

EPIGENETICKÉ ÚČINKY CIGARETOVÉHO KOUŘE V PROCESU KARCINOGENEZE

EPIGENETIC EFFECTS OF CIGARETTE SMOKE IN CARCINOGENESIS

DRAHOSLAVA HRUBÁ

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Ústav preventivního lékařství, Brno

SOUHRN

Cigaretový kouř obsahuje unikátní množství humánních karcinogenů, včetně tabákově specifických nitrosaminů a polycyklických aromatických uhlovodíků. Tyto dvě skupiny genotoxických karcinogenů hrají společně s nikotinem významnou úlohu v promočních a progresivních stádiích karcinogeneze prostřednictvím epigenetických (ne-genotoxických) mechanismů. Z nich je pravděpodobně nejvýznamnější aktivace některých nikotin- acetylcholinových receptorů (nAChR), β -adrenoreceptorů (β -AR) a aryl-uhlovodíkových receptorů (AhR). Aktivace uvedených receptorů indukuje expresi růstových faktorů a neurotransmiterů, které ovlivňují buněčnou proliferaci, syntézu proteinů a funkci mitochondrií, inhibují apoptózu a podporují angiogenezi, invazi tumoru a tvorbu metastáz.

Klíčová slova: karcinogeneze, epigenetika, kouř cigaretový

SUMMARY

Cigarette smoke contains unique amounts of human carcinogens, including tobacco-specific nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons. These two families of genotoxic chemicals and nicotine also play an important role in stages of tumorigenesis promotion and progression through epigenetic (non-genotoxic) mechanisms. Probably the most important pathways are activation of certain nicotinic acetylcholine receptors (nAChR), β adrenoreceptors (β AR) and aryl hydrocarbone receptors (AhR) by these chemicals. The activation of these receptors results in the release of growth factors and neurotransmitters which influence cell proliferation and protein synthesis, inhibition of apoptosis, mitochondrial dysfunction, angiogenesis, tumor invasion and metastasis.

Key words: carcinogenesis, epigenetics, cigarette smoke

Úvod

Cigaretový kouř je pokládán za nejkomplexnější směs chemických karcinogenů, kterým mohou být lidé expozováni: podle klasifikace IARC (International Agency for Research on Cancer) obsahuje 62 prokázaných nebo vysoce pravděpodobných humánních karcinogenů z celkového výčtu cca 73 takto klasifikovaných látek (1, 2). Kouření cigaret vyvolává zhoubné bujení v mnohem širším spektru orgánů, než kterýkoliv jiný známý původce rakoviny. Chemické karcinogeny z cigaretového kouře působí nejen v místech přímého kontaktu (dutině ústní, hrtanu, hltanu, jícnu, dutině nosní a vedlejších dutinách, průduškách a plicích), ale i v místech vzdálených, bez přímého kontaktu s chemickými látkami (žaludku, pankreatu, střevech, játrech, ledvinách, močovém měchýři, děložním čípku, kostní dřeni) (3).

Genotoxické chemické karcinogeny v cigaretovém kouři (některé až po metabolické aktivaci) **iniciují** mutagenní změny DNA. V průběhu procesu aktivace vznikají volné radikály, které jsou schopné vázat se na adeninové a guaninové pozice DNA a vytvářet tzv. DNA addukty (4). Chemické reakce při metabolické transformaci chemických látek mohou probíhat pouze za účasti katalyzujících mikrosomálních enzymů. Mezi nimi hraje

z pohledu rizika vzniku biologicky aktivnějších metabolitů významnou úlohu komplex mikrosomálních monoxygenáz, závislých na cytochromu P450. Jednotlivé enzymy tohoto komplexu jsou specifické pro různé chemické látky a schopnost jejich indukce je determinována především hereditárně (genetický polymorfismus). V expresi jednotlivých genů není vzájemná souvislost, tzn., že každý jedinec může být relativně rezistentní k působení jedné látky a současně vysoce vnímavý k působení jiné látky (5). Tím lze do jisté míry vysvětlovat široké spektrum klinických manifestací nádorových onemocnění u stejně expozovaných kuřáků. Genotoxické karcinogeny (s mutagenním potenciálem) ovlivňují molekulu DNA a související endogenní struktury prostřednictvím řady mechanismů (například bodové mutace, vysazení nebo vsunutí sekvence, rekombinace nebo chromozomální aberace) (6). Pokud uvedené mutagenní změny nejsou včas opraveny DNA reparačním systémem, nastupují v procesu karcinogeneze další dvě fáze v podobě promoce a progresu. Při nich dochází k poruchám vzájemných interakcí mezi nádorovými buňkami, k poruchám jejich vztahu k okolnímu prostředí a k ovlivnění funkcí imunitního systému. Faktory působící během těchto stádií se řadí mezi **faktory epigenetické** a je jim přikládán stejný význam, jako činitelům genotoxickým (7).

Při studiu karcinogenních účinků vybraných chemických látek v cigaretovém kouři, jimž jsou kuřáci v porovnání s ostatní populací exponováni buď výlučně nebo významně více, byla z hlediska jejich karcinogenního působení věnována zvýšená pozornost skupině polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), vybraných nitrosaminů a nikotinu. Zatímco **PAU** a nitrosaminy **NNK** (4-(metylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon), **NNN** (N'-nitrosonornikotin) a **NNAL** (4-(metylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol) mají potvrzené genotoxické účinky (8, 9), **nikotin** mutagenem není. Četné studie ovšem prokázaly, že všechny uvedené skupiny chemických látek, včetně nikotinu, mají významnou úlohu jako epigenetické karcinogeny v dalších dvou stádiích karcinogeneze, tj. promoci a progresi.

Promoční stadium karcinogeneze

Promotory karcinogeneze ovlivňují signální mechanismy kontrolující buněčnou **proliferaci** a **apoptózu**. Nádorové buňky mají vyšší vnímavost i k velmi nízkým hladinám růstových hormonů a naopak se stávají rezistentní na působení proti-růstových faktorů (10). Apoptóza má významnou úlohu při kontrole normálního vývoje, homeostázy a imunitní obrany organismu, cestou eliminace přebytečných nebo abnormálních buněk z těla. Snížení účinnosti apoptotických mechanismů má za následek nežádoucí a nekontrolované množení nefunkčních buněk, mezi něž patří ty, v nichž byly stabilizovány mutagenní změny (11). Pro-růstové a anti-apoptické účinky na mutované nádorové buňky byly prokázány u nikotinu, kde je epigenetický proces spouštěn následně po **aktivaci nikotin-acetylcholinových receptorů** (nAChR, především $\alpha 7$ nAChR) (12). Podobným způsobem aktivují nAChR také výše citované nitrosaminy (13).

Nikotin-acetylcholinové receptory nervových buněk centrálního nervového systému hrají významnou roli při vyplavování neurotransmiterů a hormonů. Jejich působení na duševní a fyzický stav je kuřáky vnímán pozitivně a vede u většiny z nich ke vzniku závislosti na kouření (14). Uvedené receptory jsou přítomné i v buňkách dalších tkání (epidermálních, keratinocytech, endotelu, v zažívacím traktu, plicích, imunitním systému) a mnohé z těchto buněk syntetizují a vyplavují acetylcholin (15). Acetylcholinové receptory mají několik subtypů ($\alpha 1$ – $\alpha 10$; $\beta 1$ – $\beta 4$) symetricky umístěných na ose kolmé k membráně a jsou propustné pro ionty Na^+ , K^+ a Ca^{2+} . Kompozice každého jednotlivého subtypu nAChR determinuje jeho farmakologii, selektivitu kationtů, kinetiku desenzibilizace a prostorovou distribuci (16, 17). Přestože dosud nebyly zcela funkčně charakterizovány, zdá se, že jednotlivé typy receptorů jsou tkáňově specifické. Epigenetické mechanismy v promoci karcinogeneze byly, kromě výše zmíněných $\alpha 7$ nAChR, zjištěny také u $\alpha 9$, $\alpha 4$, $\beta 2$ nAChR; jejich aktivování nikotinem a nitrosaminy s následnými promočními účinky bylo prokázáno na různých tkáňových kulturách (18). Novější práce popisují, že v procesu promoci a progresi mohou uplatnit svůj vliv i stresogenní hormony nadledvin, vyplavované po aktivaci nAChR v centrálním nervovém systému nikotinem či nitrosaminy (19, 20). Ačkoliv je nikotin obecně považován za faktor aktivující nikotinové nAChR, jeho

vliv na biologický systém je pravděpodobně širší, včetně vlivu desenzibilizačního. Výsledný účinek závisí na délce expozice (akutní, chronická), koncentraci a expresi jednotlivých subtypů receptorů (21). Některé studie naznačily, že nikotin může snižovat účinnost cytostatik, která při léčbě nádorů indukují zvýšenou apoptózu. U pacientů, kteří nepřestávají kouřit ani v průběhu terapie, může mít onkologická léčba nižší efektivitu (15). Promoční účinky nikotinu a nitrosaminů mohou být v průběhu karcinogeneze zprostředkovány, vedle aktivace nAChR, rovněž aktivací β -adrenoreceptorů (β -AR). Tyto mechanismy se uplatňují zejména u různých adenokarcinomů (22, 23).

Zatímco genotoxické účinky PAU byly už zevrubně prostudovány, výsledky studií o jejich epigenetické aktivitě jsou zatím kontroverzní: někteří autoři popsali, že tyto látky mohou v organismu působit jako estrogény a touto cestou vyvolávat buněčnou proliferaci (24). Naopak v jiných studiích byly nalezeny účinky anti-estrogenní (25) a vlivy podporující apoptózu (26, 27).

Progresivní stadium karcinogeneze

Malignita různých zhoubných nádorů bývá obvykle posuzována podle jejich **progrese**, **invazivity** a schopnosti tvořit **metastázy**. Tyto procesy jsou determinovány především **angiogenezí**, protože nové cévy zvyšují přísuv kyslíku a nutrientů do nádorové tkáně. V procesu (neo)angiogeneze rozhoduje rovnováha mezi pro- a anti-angiogenními molekulami, k jejímuž narušení dochází při hypoxii a zánětu s následným vyplavováním angiogenních růstových faktorů; buňky v cévách začnou proliferovat a migrovat do okolní tkáně (28). Bylo prokázáno, že nikotin indukuje angiogenezi *in vitro* i *in vivo*, a to už v dávkách, které jsou typické pro expozici slabých a středně silných kuřáků (29) i nekuřáků exponovaných tzv. pasivnímu kouření (30). I tyto účinky se uplatňují cestou aktivace nAChR, především receptorů $\alpha 7$ (31, 32). V experimentech vyvolával nikotin angiogenezi rovněž cestou aktivace β -adrenoreceptorů (β -AR) (33). Je pravděpodobné, že angiogenezi podporují i další látky v cigaretovém kouři. Výsledky výzkumu v této oblasti by mohly mít významné terapeutické využití, např. v chirurgii (podpora hojení ran), v kardiologii (terapie pomocí kmenových buněk), v očním lékařství (stimulace retinální angiogeneze) apod. (15, 34).

Konečným stupněm karcinogenního procesu jsou **metastázy** nádorových buněk do tkání a orgánů vzdálených od původní lokalizace. Zatím máme jen málo poznatků o genetických a biologických determinantách a molekulárních mechanismech, které se na invazivním metastatickém stadiu podílejí. Celý proces zahrnuje sérii buněčných a molekulárních změn, které redukuje adhezi nádorových buněk a umožní jim diseminaci z původní tkáně. Klíčovou úlohu má změna epitelo-mezenchymální propustnosti, která souvisí se snížením až ztrátou buněčných vazebných proteinů (zejména E-cadherinu) (35). V tomto ohledu má organismus další ochrannou pojistku proti metastázám nádorových buněk, kterou je smrt buňky, která ztratila svoji adhezi (anoikis). U nikotinu bylo objektivně prokázáno, že indukuje jak snížení exprese E-cadherinu a obdobných proteinů, tak i zvýšení rezistence nádorových buněk k anoikis (36). Tím

byly potvrzeny dřívější indicie, svědčící o tom, že kouření cigaret metastatické procesy významně podporuje (37). Stejným mechanismem podporuje vznik a šíření metastáz i NNK (13), u něhož se dále také zjistilo, že po aktivaci $\alpha 7$ nAChR mění regulaci contactinu-1 uplatňujícího se rovněž při podpoře metastáz (38). Dalšími obecnými mediátory metastáz jsou mimobuněčné proteiny, které, pod kontrolou enzymů metaloproteináz, tvoří extracelulární matrix. Jejich aktivitu ovlivňuje nikotin, který narušuje jejich vzájemný poměr a tím přispívá k eskalaci metastatického šíření zhoubných buněk (39). Regulaci enzymů metaloproteináz mohou narušovat, po aktivaci **aryl-uhlovodíkových receptorů** (AhR), také PAU (40, 41).

Závěr

Nikotin, tabákově specifické nitrosaminy a polycyklické aromatické uhlovodíky mají kromě jiných i epigenetické účinky v procesu karcinogeneze. Hlavním patologickým mechanismem je aktivace některých nikotin-acetylcholinových receptorů (nAChR), β -adrenoreceptorů (beta-AR) a aryl-uhlovodíkových receptorů (AhR) s následným vyplavením neurotransmiterů, růstových faktorů a dalších biologicky aktivních látek. Těmito způsoby výše uvedené komponenty cigaretového kouře inhibují apoptózu, podporují buněčnou proliferaci a syntézu proteinů, vyvolávají mitochondriální dysfunkce, angiogenezi a invazi nádorových buněk. I když nejlepší prevencí zhoubných nádorů je nekouření, poskytují studie o epigenetických účincích nikotinu a dalších komponent v cigaretovém kouři nové podněty pro vývoj metod časně diagnostiky a zpomalení progresu a léčby zhoubného bujení. Z pohledu preventivního působení jsou významné nálezy interakcí mezi chemickými látkami v cigaretovém kouři a některými environmentálními faktory, které mohou genotoxické i epigenetické účinky kouření mírnit, nebo naopak posilovat (7).

LITERATURA

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2004;83:1-1438.
2. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2010;92:1-853.
3. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. J Intern Med. 2002 Sep;252(3):206-24.
4. Williams GM. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. Toxicology. 2001 Sep 14;166(1-2):3-10.
5. Carbone M, Pass HI. Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen? Semin Cancer Biol. 2004 Dec;14(6):399-405.
6. Hecht SS. Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. Langenbecks Arch Surg. 2006 Nov;391(6):603-13.
7. Chen RJ, Chang LW, Lin P, Wang YJ. Epigenetic effects and molecular mechanisms of tumorigenesis induced by cigarette smoke: an overview. J Oncol. 2011;2011:654931. doi: 10.1155/2011/654931.
8. DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. Mutat Res. 2004 Nov;567(2-3):447-74.
9. Peterson LA. Formation, repair, and genotoxic properties of bulky DNA adducts formed from tobacco-specific nitrosamines. J Nucleic Acids. 2010 Sep 5;2010. doi:pii: 284935. 10.4061/2010/284935.
10. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
11. Chen X, Bai F, Sokol L, Zhou J, Ren A, Painter JS, et al. A critical role for DAP10 and DAP12 in CD8+ T cell-mediated tissue damage in large granular lymphocyte leukemia. Blood. 2009 Apr 2;113(14):3226-34.
12. Trombino S, Cesario A, Margaritora S, Granone PL, Motta G, Falugi C, et al. Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: role of mitogen-activated protein kinase pathway. Cancer Res. 2004 Jan 1;64(1):135-45. Erratum in: Cancer Res. 2004 Feb 15;64(4):1559. Cancer Res. 2010 Mar 15;70(6):2568-9.
13. Wei PL, Chang YJ, Ho YS, Lee CH, Yang YY, An J, et al. Tobacco-specific carcinogen enhances colon cancer cell migration through alpha7-nicotinic acetylcholine receptor. Ann Surg. 2009 Jun;249(6):978-85.
14. Benowitz NL. Nicotine addiction. N Engl J Med. 2010 Jun 17;362(24):2295-303.
15. Cardinale A, Nastrucci C, Cesario A, Russo P. Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. Crit Rev Toxicol. 2012 Jan;42(1):68-89.
16. Dajas-Bailador F, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. Trends Pharmacol Sci. 2004 Jun;25(6):317-24.
17. Szabo SI, Zelles T, Lendvai B. Intracellular Ca^{2+} dynamics of hippocampal interneurons following nicotinic acetylcholine receptor activation. Neurochem Int. 2008 Jan;52(1-2):135-41.
18. Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P. Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. Trends Pharmacol Sci. 2008 Mar;29(3):151-8.
19. Al-Wadei HAN, Plummer HK 3rd, Schuller HM. Nicotine stimulates pancreatic cancer xenografts by systemic increase in stress neurotransmitters and suppression of the inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid. Carcinogenesis. 2009 Mar;30(3):506-11.
20. Schuller HM. Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? Nat Rev Cancer. 2009 Mar;9(3):195-205.
21. Buccafusco JJ, Beach JW, Terry AV Jr. Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors as a strategy for drug development. J Pharmacol Exp Ther. 2009 Feb;328(2):364-70.
22. Schuller HM, Cekanova M. NNK-induced hamster lung adenocarcinomas over-express beta2-adrenergic and EGFR signaling pathways. Lung Cancer. 2005 Jul;49(1):35-45.
23. Shin VY, Wu WKK, Chu KM, Koo MW, Wong HP, Lam EK, et al. Functional role of beta-adrenergic receptors in the mitogenic action of nicotine on gastric cancer cells. Toxicol Sci. 2007 Mar;96(1):21-9.
24. Vondráček J, Kozubík A, Machala M. Modulation of estrogen receptor-dependent reporter construct activation and G0/G1-S-phase transition by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells. Toxicol Sci. 2002 Dec;70(2):193-201.
25. Arcaro KF, O'Keefe PW, Yang Y, Clayton W, Gierthy JF. Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells. Toxicology. 1999 Apr 15;133(2-3):115-27.
26. Chen S, Nguyen N, Tamura K, Karin M, Tukey RH. The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. J Biol Chem. 2003 May 23;278(21):19526-33.

27. Solhaug A, Refsnes M, Låg M, Schwarze PE, Husøy T, Holme JA. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis*. 2004 May;25(5):809-19.
28. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
29. Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med*. 2001 Jul;7(7):833-9.
30. Zhu BQ, Heeschen C, Sievers RE, Karliner JS, Parmley WW, Glantz SA, et al. Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell*. 2003 Sep;4(3):191-6.
31. Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP. A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Clin Invest*. 2002 Aug;110(4):527-36.
32. Costa F, Soares R. Nicotine: a pro-angiogenic factor. *Life Sci*. 2009 Jun 5;84(23-24):785-90.
33. Wong HPS, Yu L, Lam EKY, Tai EKK, Wu WKK, Cho CH. Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation. *Toxicol Sci*. 2007 Jun;97(2):279-87.
34. Cooke JP, Ghebremariam YT. Endothelial nicotinic acetylcholine receptors and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008 Oct;18(7):247-53.
35. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Feb;7(2):131-42.
36. Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, et al. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2009 Jan 1;124(1):36-45.
37. Murin S, Pinkerton KE, Hubbard NE, Erickson K. The effect of cigarette smoke exposure on pulmonary metastatic disease in a murine model of metastatic breast cancer. *Chest*. 2004 Apr;125(4):1467-71.
38. Hung YH, Hung WC. 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) enhances invasiveness of lung cancer cells by up-regulating contactin-1 via the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor/ERK signaling pathway. *Chem Biol Interact*. 2009 May 15;179(2-3):154-9.
39. Shin VY, Cho CH. Nicotine and gastric cancer. *Alcohol*. 2005 Apr;35(3):259-64.
40. Yoshino I, Kometani T, Shoji F, Osoegawa A, Ohba T, Kouso H, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition-related genes by benzo[a]pyrene in lung cancer cells. *Cancer*. 2007 Jul 15;110(2):369-74.
41. Ueng TH, Chang YL, Tsai YY, Su JL, Chan PK, Shih JY, et al. Potential roles of fibroblast growth factor-9 in the benzo(a)pyrene-induced invasion in vitro and the metastasis of human lung adenocarcinoma. *Arch Toxicol*. 2010 Aug;84(8):651-60.

Došlo do redakce: 3. 8. 2012

Přijato k tisku: 27. 8. 2012

Prof. MUDr. Draboslava Hrubá, CSc.

Lékařská fakulta MU Brno

Ústav preventivního lékařství

Kamenice 5

625 00 Brno

E-mail: hruba@med.muni.cz