

**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**EPIGENETI KI I MOLEKULARNI MEHANIZMI  
TUMORIGENEZE UZROKOVANE DUHANSKIM DIMOM**

**EPIGENETIC AND MOLECULAR MECHANISMS OF  
TUMORIGENESIS CAUSED BY TOBACCO SMOKE**

**SEMINARSKI RAD**

Luka Horvat  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular biology)  
Mentor: Prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Zagreb, 2012.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>2</b>
<b>2. EPIGENETI I MEHANIZMI.....</b>	<b>4</b>
<b>3. TUMORIGENEZA UZROKOVANA DUHANSKIM DIMOM.....</b>	<b>6</b>
3.1. Inicijacija tumorigeneze.....	6
3.2. Promocija.....	7
3.2.1. U inak duhanskog dima na signalne putove proliferacije.....	7
3.2.2. U inak duhanskog dima na signale protiv proliferacije.....	9
3.2.3. Otpornost na apoptozu kao posljedica u inka duhanskog dima.....	10
3.2.4. U inak duhanskog dima na životni vijek stanice.....	11
3.2.5. U inak duhanskog dima na mobilizaciju hranjivih tvari.....	12
3.3. Progresija.....	12
<b>4. U INAK DUHANSKOG DIMA NA ANGIOGENEZU.....</b>	<b>13</b>
<b>5. U INAK DUHANSKOG DIMA NA INVAZIJU I METASTAZIRANJE TUMORA .....</b>	<b>14</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>16</b>
<b>7. SAŽETAK .....</b>	<b>18</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>19</b>
<b>9. LITERATURA.....</b>	<b>20</b>

# 1. UVOD

**Epigenetika** (gr . - pokraj, povrhu; 'iznad genetike') proučava nasljedne promjene u genskoj aktivnosti koje mogu biti naslijene ali ne uključuju mijenjanje genske sekvence kao i imbenike koji upravljaju ponašanjem nasljedne informacije od spolne stanice do smrti [1]. Aktivnost gena je i pod utjecajem vanjskih imbenika a ne samo unutarnjih, genima određenih obrazaca ekspresije [1,2]. Epigenetički biljezi nalaze se duž molekule DNA ili na histonima. Oni su prekidači koji uključuju ili isključuju gene. Epigenom predstavlja skup epigenetičkih biljega. Za razliku od gena kojima je za promjenu strukture i funkcije potreban dugi vremenski period, epigenetička promjena se može dogoditi relativno brzo. Epigenetički signali protežu se na nekoliko naraštaja. Promjene epigenoma događaju se za vrijeme specifičnih razvojnih perioda (razvoj embrija, pubertet) ali mogu biti i posljedica individualnog stila života (prehrana, pušenje, alkohol) i okoliša (onečišćenje, stres). Molekularna baza epigenetike je vrlo kompleksna. Najčešće epigenetičke promjene odnose se na promjene u metilaciji DNA, modifikacije histona i nekodirajuće RNA molekule, a služe u regulaciji važnih staničnih funkcija poput genske ekspresije i genomskog utiska (engl. genomic imprinting) [1].

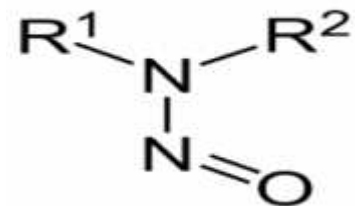
**Tumorigeneza ili karcinogeneza** je složen proces kojim se normalne stanice transformiraju u tumorske stanice. Odlikuje se nizom promjena na staničnoj i genskoj razini koje u konačnici uzrokuju reprogramiranje staničnih mehanizama te dovode do nekontrolirane diobe stanica i stvaranja maligne mase-tumora [3,4]. Tradicionalno postoje tri stadija tumorigeneze: inicijacija (ireverzibilna modifikacija DNA, aktivacija onkogeni, inaktivacija tumor-supresorskih gena), promocija (stimulacija rasta iniciranih stanica) i progresija (dodatne promjene genoma, proliferacija stanica s oštećenom DNA, indukcija dodatnih oštećenja DNA) [5]. Karcinogene promjene u DNA najčešće uzrokuju aktivaciju onkogeni i inaktivaciju tumor-supresorskih gena.. **Onkogeni** su oni geni koji snažno aktiviraju proces umnožavanja stanica. Tako dugo dok ti geni ne mutiraju odnosno sve dok obavljaju svoju funkciju u pravo vrijeme i u pravom obimu, nazivaju se protoonkogeni. **Tumor-supresorski geni** kodiraju protu proliferirajuće signale i proteine koji kontroliraju stanični ciklus. To su transkripcijski faktori koje aktivira stanični stres ili oštećenje DNA. Uzrokuju zaustavljanje stanične diobe i tako omogućuju popravak molekule DNA. U razvitku tumora dolazi do njihovog utišavanja. Jedan od najpoznatijih tumor-supresorskih gena je gen *p53*.

Kako bi normalna stanica postala tumorskom najmanje šest puta mora biti izmijenjeno što uključuje da stanica postane neovisna o signalima rasta, neosjetljiva na

signale koji zaustavljaju rast, da izbjegava apoptozu, da zapo ne invaziju u tkiva i metastaziranje, kontinuiranu angiogenezu te da ima neograni eni replikacijski potencijal. Promjene u tim glavnim putovima mogu se pojaviti kroz genske promjene u dobro definiranim genima ili putem brojnih epigeneti ih procesa (metilacija DNA, post-translacijska modifikacija proteina, modifikacija genske ekspresije). Rast tumora zahtjeva i molekularne promjene mijenjaju i interakciju izme u tumorskih stanica i okolne strome te imunološkog sustava [6]. Da bi tumorska stanica proliferirala ne smije biti prepoznata od imunološkog sustava jer bi ina e bila uništena. Navedene promjene na kraju dovode do rasta tumora, invazije i metastaziranja. Karcinogenom se smatra bilo koji agens koji uzrokuje formaciju tumora, a dijelimo ih na genotoksi ne, epigeneti ke i neklasificirane.

**Duhanski dim** nastaje izgaranjem suhog lista biljke *Nicotiana tabacum* L., a u ljudskoj populaciji konzumira se pušenjem cigareta. Pušenje povisuje rizik za razvoj bolesti srca, kroni ne opstruktivne plu ne bolesti, moždanog udara te akutnih bolesti dišnog sustava. Osim ovih netumorskih bolesti velika je povezanost pušenja i sa razvojem karcinoma u ljudi.

U duhanskome dimu ima preko 5000 kemijskih spojeva, a 62 su ocijenjena od internacionalne agencije za istraživanja raka IRAC (engl. International Agency for Research on Cancer) kao karcinogeni u životinja i ljudi [7,8]. Glavne karcinogene tvari uklju uju spojeve poput N-nitrozamina (Slika 1), policikli kih aromatskih ugljikovodika (**PAH**), benzena i radioaktivnog polonija [9]. PAH-ovi i nitrozamini su najgenotoksi nije komponente duhanskog dima.



Slika 1. Op a formula nitrozamina

Ve ina genotoksi nih istraživanja ra ena je na kondenzatu duhanskog dima (**CSC**- engl. cigarette smoke condensate). CSC se pokazao genotoksi an u skoro svim sustavima uzrokuju i izmjenu sestrinskih kromatida (**SCE** – engl. sister chromatid exchanges), mikronukleuse, DNA lomove i sli na ošte enja ali i mutacije molekule DNA. Duhanski dim je danas najekstremniji primjer sustavnog mutagena i karcinogena u ljudi [6].

Komponente duhanskog dima uzrokuju tumorigenezu pomo u nekoliko mehanizma koji uklju uju sve tri faze tumorigeneze [9].

Osim genotoksi nih u inaka, negenotoksi ni (epigeneti ki) u inci duhanskog dima su vrlo važni. Oni mogu djelovati kao modulatori stani nih funkcija te kao takvi mogu pove ati rizik nastanaka tumora.

## 2. EPIGENETI KI MEHANIZMI

**Kromatin** je kompleks molekule DNA i malih bazi nih proteina **histona**. DNA koja omata histonski oktamer (H2A, H2B, H3, H4), stvara interakcije s proteinima uglavnom preko svoje fosfodieterske okosnice i preko funkcionalnih grupa A-T parova baza u malom utoru. Dvolan ana DNA duga 146 pb obavija histonski oktamer 1,8 puta i tvori **nukleosom**. Nukleosomi se pakiraju u ure eniju solenoidnu strukturu koja se zatim pakira (kondenzira) u kompaktni eukariotski kromosom. Nukleosomi služe kao op i represori pri eukariotskoj transkripciji [10]. Pri replikaciji ne dolazi do 'raspadanja' nukleosoma. Stari nukleosomi ostaju vezani za novu dvolan anu DNA nastalu kontinuiranom replikacijom, dok se novosintetizirani nukleosomi vežu za diskontinuirano repliciranu dvolan anu DNA.

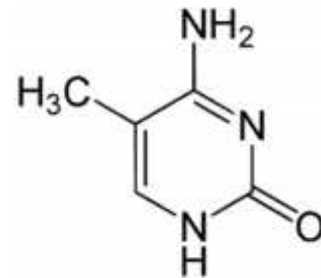
Kod eukariota kromatin utje e na kompleksniju regulaciju ekspresije gena. Geni koji se eksprimiraju nalaze se u manje kompaktnim regijama kromatina. Takva manje kompaktna regija kromatina naziva se **eukromatin**. Heterokromatinom nazivamo kromatin koji je guš e pakiran od eukromatina i transkripcijski je inaktivan. Eukromatin zbog 'rahlog' pakiranja omogu ava pristup RNA polimerazi te je zbog toga transkripcijski aktivan. Struktura kromatina se za vrijeme transkripcije remodulira. Eukromatin je biokemijski razli it od heterokromatina, a te razlike su posljedica razli itih modifikacija histona. Nukleosomalni histoni su acetilirani, nukleosomalni histon H2B je manje fosforiliran, a histon H1 vezan je slabije na nukleosome koje povezuje s vanjske strane. Tako er zbog takvih modifikacija histona aktivni kromatin selektivno veže neke proteine koji pospješuju daljnje remoduliranje kromatina [10, 1].

Histon-acetiltransferaza (**HAT**) acetilira lizin na amino-terminalnom kraju histona. Amino-terminalni rep histona H3 proteže se u džep u kojem lizinski bo ni ogranak može prihvatiti acetilnu skupinu s acetil-CoA. Acetiliranjem histona smanjuje se afinitet prema DNA i dolazi do interakcije s proteinima koji imaju **bromodomen** (acetil-lizin-veznu domen). Takvu domen sadrže **TAF proteini** (engl. TATA-box-binding protein associated factors) (proteini aktivatori transkripcije) te proteini koji uz pomo ATP-a remoduliraju strukturu kromatina [10].

Deacetiliranje histona histon-deacetilazama (**HDAC**) doprinosi represiji transkripcije. Aktivacijom gena se kromatin ne mijenja trajno, nego dolazi do dinami kog procesa u kojemu se nukleosom rearanžira na aktivnom promotoru, a potom se inaktivacijom gena opet formira 'vrš i' nukleosom. Osim acetilacije histona mogu a je i metilacija histonskih repova. Metilacija pove ava bazi nost i hidrofobnost histona te se oni kao takvi bolje vežu za

anionsku molekulu kao što je DNA. Metilacija se postiže pomoću enzima histon metiltransferaza (**HMT**) a demetilacija pomoću još neidentificiranih histon demetilaza (**HDM**). Metilacijom histona stvara se kompaktniji kromatin koji služi utišavanju ekspresije gena [1].

Osim pakiranja DNA s histonima, promjene u metilaciji DNA su u vezi s genskom aktivnosti. DNA metilacija se odnosi na kovalentno dodavanje metilne grupe sa S-adenozil-L-metionina na peti ugljikov atom citozinskog prstena formiraju i tako bazu 5-metil citozin (5meC) (Slika 2). **Metilacija DNA** može promijeniti obrazac ekspresije gena za određeni tip stanice. Metilacija promotora dovodi do utišavanja ekspresije gena dok metilacija u kodirajućoj regiji može pojačati ekspresiju gena [11]. Najčešća je metilacija citozina



Slika 2. 5-metil citozin

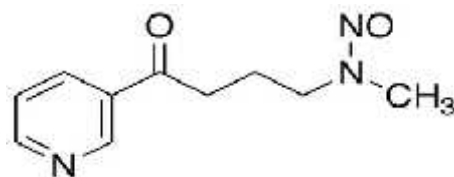
unutar dinukleotidnog slijeda CpG ili trinukleotidnog slijeda CpNpG. Enzim metiltransferaza MET1 metilira CpG dok DRM1, DRM2 i CMT3 metiliraju citozin u drugim slijedovima. Ugljikov atom broj 5 u citozinu može se metilirati specifičnim metiltransferazama i ometati vezanje aktivacijskog proteina. Metilna skupina 5-metilcitozina prodire u veliki udjel molekule DNA gdje može ometati vezanje proteina koji potiču u transkripciju.

Također postoji skupina proteina poznatih kao metil citozin vezujući proteini (MeCP) koji specifično prepoznaju CpG metilirane sekvence te stvaraju smetnje pri vezanju transkripcijskih faktora (TF) na njihove regulatorne elemente. MeCP privlače histonske deacetilaze i histonske metiltransferaze, enzime koji posreduju modifikaciji histona, te uzrokuju stvaranje represivnih kromatinskih struktura [1]. Oko 75% sekvenci 5' CpG 3' u genomu uvijek je metilirano. Obrasci metilacije DNA su uspostavljeni za vrijeme razvoja organizma [10].

### 3. TUMORIGENEZA UZROKOVANA DUHANSKIM DIMOM

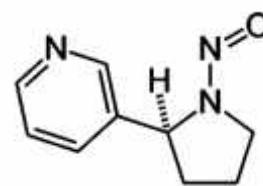
#### 3.1. Inicijacija tumorigeneze

Vrlo je teško odrediti po etni uzrok za ve inu specifi nih vrsta tumora. Tumorigeneza može biti rezultat biološkog ili kemijskog izlaganja normalnih stanica kroz cijeli niz procesa koji uklju uju promjene u DNA. To mogu biti promjene same molekule DNA (mutacije) ili promjene epigeneti ke prirode (primjerice metilacija koja uzrokuje pove anu ekspresiju onkogeni). Neki od sastojaka duhanskog dima djeluju direktno na molekulu DNA, ali ve ina njih iziskuje **enzimsku konverziju** prije nego što postanu kancerogeni [12]. Ve ina takvih konverzija uklju uje metaboli ke promjene preko citokroma P450 pri emu nastaju elektrofilni spojevi koji se mogu vezati s DNA i tvoriti DNA adukte. Takvo stvaranje adukata je uobi ajeno na dijelovima DNA s adeninom ili gvaninom i vode k mutacijama sli nim onima koje su primije ene u onkogenu *KRAS* (važna uloga u normalnoj tkivnoj signalizaciji) ili onima u genu *TP53*, a koji su karakteristi ni za rak plu a [6]. Ireverzibilna modifikacija DNA, aktivacija onkogeni te inaktivacija tumor-supresorskih gena predstavljaju tzv. inicijacijski korak u karcinogenezi.



Slika 3. 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK)

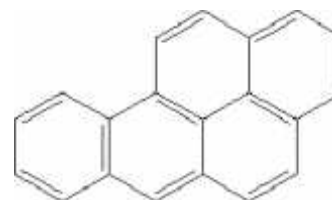
4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK) (Slika 3) i



Slika 4. N'-nitrosonornikotin (NNN)

N'-nitrozonornikotin (NNN) (Slika 4) su najja i duhan-specifi ni nitrozamini u duhanskom dimu. Ovi spojevi nastaju iz duhanskih alkaloida (poput nikotina) za vrijeme sušenja duhana i važni su karcinogeni koji mogu utjecati na razli ita tkiva. NNK je potencijalni karcinogen koji uzrokuje rak plu a, jetre pa ak i tumore nosne šupljine. NNN je potencijalni karcinogen jednjaka, nosne šupljine i dišnog trakta. U ljudi su identificirani metaboliti NNK u urinu puša a pa stoga urin puša a može biti mutagen [6].

Benzo[a]piren (**BaP**) (Slika 5), jedan od PAH spojeva, svrstan je u grupu I. kancerogenih spojeva za ljude [8]. Dokazan je veliki tumor induciraju i potencijal u razvoju tumora plu a, dušnika i mlije nih žlijezdi [9]. Njegovi metaboliti stvaraju DNA adukte sa mjesno specifi nom mutacijom u tumor supresorskom genu *p53*. To potvr uje pozitivna korelacija takvih adukata i



Slika 5. Benzo[a]piren

tumora u tkivu plu a puša a. Iako treba istaknuti da formiranje DNA adukata još uvijek ne

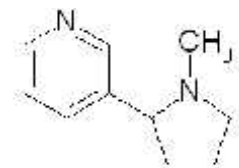
može predstavljati glavni rizik za razvoj tumora u pušača. Tomu ide u korist činjenica da iako je veća učestalost tumora gušterače u pušača nego u nepušača, test prisutnosti metabolita NNK u tkivu gušterače obiju skupina pacijenata ne pokazuju značajnu razliku [7]. Dakle, o to je da sam NNK nije odgovoran za razvoj tumora gušterače u pušača. Ipak NNK i njegovi metaboliti su jedini poznati okolišni karcinogeni koji induciraju tumor gušterače u laboratorijskih životinja. Zato doprinos NNK razvoju tumora gušterače u ljudi ne smije biti zanemaren. Moguće je da osim oštećenja DNA, sinergističke interakcije između DNA reaktivnosti i epigenetičkih promjena uzrokovanih drugim komponentama duhanskog dima, mogu biti dovoljni za razvoj tumora.

### 3.2. Promocija

Promocija tumora okarakterizirana je deregulacijom signalnih putova koji kontroliraju staničnu proliferaciju, apoptozu i dr. Iako su mogući različiti putovi koji vode do nastanka tumora neki biljezi karakteristični su za sve tumore. Primjerice većina tumora ima defektan gen *p53*.

#### 3.2.1 Učinak duhanskog dima na signalne putove proliferacije

Normalne stanice iziskuju signal rasta kako bi krenule u proliferaciju. Ti signali se prenose u stanicu preko receptora koji vežu različite signalne molekule. U tumorskim stanicama receptori koji provode takve signale često su mete deregulacije za vrijeme tumorigeneze. Pojava ekspresija tih receptora omogućava tumorskoj stanici da postane hipersenzitivna na niske razine faktora rasta koji nisu dovoljni da izazovu proliferaciju normalnih stanica [13]. Zanimljivo je da neki sastojci duhanskog dima mogu oponašati takve signalne molekule.



Slika 6. Nikotin

Nikotin (Slika 6), glavni sastojak duhanskog dima, igra važnu ulogu u tumorigenezi. Nikotin se ponaša poput faktora rasta i djeluje kroz nikotinski acetilkolinški receptor (**nAChR**),  $\alpha$ -adrenergički receptor ( **$\alpha$ -AR**) ili preko receptora za epidermalni faktor rasta (**EGFR**). Ovi receptori su tkivno specifični, a razina njihove ekspresije i senzitivnosti može biti izmijenjena djelovanjem nikotina [7]. Nedavna studija ukazala je na povećanu ekspresiju **9 nAChR** kod tumora dojke te kako taj receptor ima važnu ulogu u tumorigenezi. Nikotin posreduje u signalizaciji i povećava ekspresiju ciklina D3 u tkivu tumora dojke. Povećana ekspresija **9 nAChR** kroz AKT signalizaciju (protein kinaza B- serin/treonin protein kinaza koja ima važnu ulogu u kontroliranju staničnih procesa poput metabolizma glukoze, apoptoze, proliferacije itd.) povećava fosforilaciju adhezijskih molekula bitnih za metastaziranje tumora.



Nikotin također potiče proliferaciju mezotelijskih stanica. Mezotelijske stanice tumora koje se razvijaju iz transformiranih stanica podrijetlom iz mezotelijskog, zaštitne ovojnice unutarnjih organa. Ta signalizacija ide preko  $\alpha 7$  nAChR s aktivacijom **ERK1/2** kaskade (engl. extracellular-signal-regulated kinases). Svi ti događaji konačno dovode do inhibicije apoptoze i tako povećavaju rizik za nastanak tumora [7].

Također je pokazano da nikotin preko  $\alpha 7$  nAChR potiče proliferaciju posredovanu aktivacijom MAP kinaza (p44/p42-**MAPK**, engl. Mitogen-activated protein kinases). Između ostalog  $\alpha 7$  nAChR potiče proliferaciju stanica mokra nog mjehura preko ERK1/2 i Stat3 smanjuju i ekspresiju  $\alpha 7$  nAChR i  $\alpha 4\beta 2$ -AR. Sve te studije dokazuju da nikotin kao jedan od glavnih sastojaka duhanskog dima ima važnu ulogu u poticanju stanice proliferacije koja pak ima kritičnu ulogu u nastanku tumora tj. u tumorigenezi [7].

Osim nikotina i nitrozamini poput NNK i NNN potiču proliferaciju tumorskih stanica preko nAChR. NNK potiče tumorigenezu vežući se za nAChR, pogotovo za  $\alpha 7$  nAChR, dok se NNN uglavnom veže za  $\alpha 4\beta 2$  nAChR [7]. Dokazano je da nikotin ili NNK stimuliraju proliferaciju stanica tumora pluća preko  $\alpha 7$  nAChR aktiviraju i različite protein kinaze i transkripcijske faktore [7]. Kako je pojedina ekspresija određenih receptora tkivno specifična (pokazano na primjeru nAChR) postoji mogućnost da oni budu molekularne mete za potencijalnu kliničku terapiju [14]. Nažalost većina nAChR prisutnih u tumorskim tkivima još nije funkcionalno okarakterizirana. Tu se otvara prostor za nova istraživanja koja bi trebala dati odgovor na pitanje kako pojedini podtipovi nAChR i njihova promijenjena ekspresija utječu na tumorigenezu.

NNK potiče rast plućnih adenokarcinoma (vrsta malignog tumora koji se javlja u žljezdastom tkivu) *in vitro* ali i *in vivo* uzrokujući i otpuštanje arahidonske kiseline preko **COX-2** enzima odgovornog za upalne procese i bol i 5-lipoksigenaze (**5-LOX**) koji su regulirani preko  $\alpha 4\beta 2$ -AR. Postoje naznake da **antagonisti  $\alpha 4\beta 2$ -AR** mogu inhibirati razvoj plućnog adenokarcinoma uzrokovanog NNK. Takvi antagonisti smanjuju i efekt nikotina. Nikotin preko  $\alpha 7$  nAChR povišuje razinu noradrenalina dovodeći do značajnih promjena u rastu i angiogenezi tumora želuca i debelog crijeva [7].

Nikotin doprinosi razvoju adenokarcinoma izvodnog kanala gušterače (**PDAC** engl. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma) potičući i povećavajući razinu neurotransmitera odgovornih za stres (adrenalin i noradrenalin) ali smanjujući razinu  $\gamma$ -amino-maslačne kiseline (**GABA**). GABA posjeduje tumor supresivnu funkciju suprimirajući rast i migraciju stanica u uvjetima *in vitro*. Oslobođanje adrenalina i noradrenalina preko nAChR ima važnu ulogu u

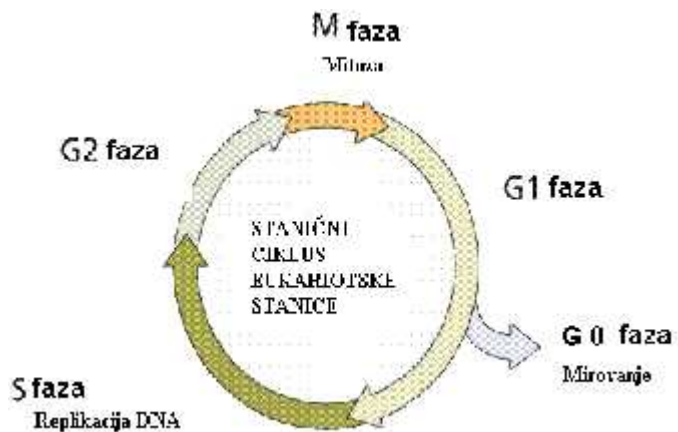
tumorigenezi uzrokovanoj duhanskim dimom iako to an mehanizam još nije u potpunosti poznat [7].

Ukratko sva istraživanja aktivacije preko nAChR ali i njegove transaktivacije preko drugih receptora idu u prilog tome da nAChR ima ključnu ulogu u regulaciji stanih kaskada, stanih funkcija ali i u tumorigenezi.

U zadnje vrijeme velika se pažnja posvećuje negenotoksičnom djelovanju PAH-ova. Biološki efekti PAH-ova su posredovani preko arilnog ugljikovodnog receptora (**AhR**). Primjerice jedan od PAH-ova je benz[a]antracen (**BaA**) koji povećava sintezu DNA i promovira G1-S fazu ciklusa, dakle potiče stanice na proliferaciju. Većina PAH-ova imaju djelovanje slično estrogenu te zbog toga mogu potaknuti stanice na proliferaciju [7].

### 3.2.2. Učinak duhanskog dima na signale protiv proliferacije

U normalnim tkivima signali protiv proliferacije rade na održavanju stanice u mirovanju i homeostaze tkiva. Signali protiv proliferacije blokiraju diobu stanica tako što prisiljavaju stanicu da uđe u G0 fazu stanih ciklusa. Stanica ulazi u G0 fazu u točnom trenutku koji se nalazi unutar faze G1 (Slika 7).



Slika 7. Stanih ciklus [15]

Prijelaz stanice iz G1 faze u S fazu

predstavlja ključni regulatorni korak u stanih ciklusu, a kontroliran je pomoću kompleksa ciklin-ovisnih kinaza CDK4/6-ciklin D i CDK2-ciklin E (engl. Cyclin-Dependent Kinases). Ovi kompleksi induciraju fosforilaciju proteina **pRb** (engl. retinoblastoma protein - tumor supresor) i oslobađaju transkripcijski faktor E2F koji usmjerava stanicu u proliferaciju. Poremećaji u Rb putu mogao bi učiniti stanice neosjetljivima na signale koji zaustavljaju proliferaciju [7]. Nikotin inducira vezanje Raf-1 kinaze na pRb uz aktivaciju ciklina kao i samu aktivaciju pRb-a. Nikotin i NNK djeluju preko receptora nAChR i  $\alpha$ -AR potiču i pojačanu ekspresiju ciklina D1 koja potiče prijelaz iz G1 u S fazu te tako potiču proliferaciju.

**Kinaza P13K** (fosfatidil-inozitol kinaza) i AKT-ovisna proliferacija također je potaknuta pomoću NNK. PI3K/AKT put je kritičan u tumorskim stanicama jer utječe na samu tumorigenezu, rast tumora, metastaziranje, ali i na otpornost na lijekove [7]. PI3K/AKT aktivacija je zabilježena u mišjim stanicama A/J soja (miševi s razlikom u proteinskoj

sekvenci NLR, engl. NOD-like receptors) tretiranim NNK-om, ali i u tumorskom tkivu pušača [7]. Ipak PI3K/AKT-ovisna proliferacija se ne pojavljuje u svim tumorskim stanicama induciranim nikotinom. Važno je napomenuti da i druge komponente duhanskog dima osim nikotina i NNK također mogu omesti mehanizme koji sprečavaju proliferaciju i tako pojačati razvoj i promociju tumora.

### 3.2.3. Otpornost na apoptozu kao posljedica u inka duhanskog dima

Apoptoza ima važnu funkciju u kontroli normalnog razvoja, homeostaze i imunosne obrane organizma tako što eliminira višak stanica ili one koje su abnormalne. Neuspjeh u eliminaciji nepotrebnih stanica odnosno otpornost na apoptozu može voditi nekontroliranom rastu istih. Otpornost na apoptozu je česta u tumorskim stanicama koje su izgubile proapoptotski potencijal zbog mutacije određenih gena. Najvažnije mutacije uključuju tumor-supresorske gene kao što je *p53*.

Nikotin inhibira apoptozu uzrokovanu faktorom tumorske nekroze (**TNF**), ultraljubičastim zračenjem (UV) ili kemoterapijskim lijekovima poput cisplatine, vinblastina i paklitaksela [16]. Ovakva inhibicija odvija se preko kaskada signalnih puteva od kojih su neki objašnjeni u daljnjem tekstu. Inhibicija apoptoze i poticanje proliferacije stanica epitela bronhija inducirana NNK-om preko aktivacije  $\alpha 3 / \alpha 4$  nAChR slijedi povećanom ekspresijom AKT-a (poznate kao i protein kinaza B, PKB), mitogen-aktivirajuće protein kinaze (**MAPK**), ali i PKC-a (protein kinaza C) [7]. Protein kinaza bitnih u regulaciji proliferacije stanica.

Zanimljivo je da lijekovima uzrokovana povećana ekspresija *p53* i *p21* može biti suprimirana nikotinom. Taj protu-apoptotski mehanizam posredovan je  $\alpha 3$  nAChR-om. NNK može spriječiti apoptozu modulirajući i protuapoptotske proteine Bcl-2 i c-Myc [7]. Hem oksigenaza-1 (**HO-1**) je protein čija se ekspresija inducira za vrijeme oksidacijskog stresa. Njegova funkcija je povezana sa staninom proliferacijom, a zapaženo je da je njegova ekspresija povećana za vrijeme razvoja nekih tumora poput želudca i tumora štitnjače. Usporedbom ekspresije HO-1 u tumorskom tkivu pušača i nepušača zapažena je izrazito povećana ekspresija u oba tkiva. Iz tih činjenica lako je zaključiti da NNK i njegovi metaboliti uzrokuju oksidacijski stres u plućnom tkivu, a tako i povišuju ekspresiju HO-1. Takav događaj u konačnici vodi do izbjegavanja apoptoze i stanine proliferacije [12].

Stanina proliferacija i apoptoza mogu biti modulirane pomoću u peroksisomalnog proliferatorom-aktiviranog receptora (**PPAR**). PPAR su članovi velike superfamilije jezgrinih receptora hormona, a ovisno o ligandu djeluju kao transkripcijski faktori. Najveće skupine PPAR su  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$  [7]. PPAR  $\alpha$  su eksprimirani u većini tkiva, a povezani su s rastom

tumora, osobito tumora jetre, debelog crijeva, dojke i pluća. Nikotin povećava ekspresiju PPAR $\alpha$  preko  $\alpha$ 3 nAChR i unutarstaničnog signalnog puta važnog u apoptozi PI3K/mTOR (mTOR, engl. mammalian target of rapamycin) što ima za posljedicu proliferaciju tumorskih stanica. PPAR $\alpha$  ima suprotno djelovanje jer vezan s odgovarajućim ligandom uzrokuje apoptozu i inhibira staničnu proliferaciju. Njegova aktivacija smanjuje rizik nastanka tumora. Zanimljivo je da je aktivacija PPAR $\alpha$  utišana u tkivu tumora pluća [7].

Suprotno nikotinu, PAH-ovi induciraju ili sprječavaju apoptozu. Primjerice BaP djeluje preko receptora **IGFR** (engl. Insulin-like Growth Factor Receptor) koji povećava preživljavanje stanice preko aktivacije PI3K. PI3K zatim aktivira AKT i ERK1/2 koji djeluju protiv apoptotskih signala fosforiliraju i Bad (proapoptotska molekula regulirana fosforilacijom). BaP inducira apoptozu preko *p53* i *p21*. Dok apoptotski signal BaP-a uzrokuje smrt stanice (citotoksično djelovanje), njegovo antiapoptotsko djelovanje važno je u tumorigenezi. Točan faktor koji određuje put njegova djelovanja nije poznat [17].

Mehanizmi kojima sastojci duhanskog dima sprječavaju apoptozu vrlo su složeni. Očito je da apoptoza igra jednu od ključnih uloga u tumorigenezi uzrokovanoj duhanskim dimom. Ako izmijenjena stanica krene u apoptozu to neće imati posljedicu ali ako je stanica izmijenjena a odlazak u apoptozu je spriječen bilo kojim od navedenih mehanizama dolazi do definitivne tumorigeneze. Nužna su daljnja istraživanja jer točno razumijevanje molekularnih mehanizama regulacije apoptoze može nam omogućiti nove strategije u razvoju lijekova i borbi protiv tumora.

### **3.2.4** *Učinak duhanskog dima na životni vijek stanice*

Kada neka stanica na populaciji pređe određeni broj dioba ona se prestane dijeliti te ulazi u proces zvan senescencija ili starenje. Tumorske stanice mogu se dijeliti neograničeno za vrijeme progresije tumora, one su imortalne tj. besmrtno. Ključni enzim koji im omogućava tu prilagodbu je **telomeraza** (RNA ovisna DNA polimeraza). Telomeraza je enzim koji se sastoji od proteinske i RNA komponente i ona u kompleksu s potrebnim proteinima produljuje krajeve kromosoma specifičnim kratkim ponavljajućim sekvencama (TTAGGG) $_n$  [10]. Telomere su važne za normalnu strukturu i vijabilnost stanice. Ne mogu se replicirati pomoću DNA polimeraze, te se skraćuju u svakom ciklusu replikacije DNA i diobe stanice. Tu dolazi do izražaja važnost adicije TTAGGG ponavljanja. Bitno je napomenuti da se telomeraza u normalnim somatskim stanicama inaktivira te se takve stanice ne mogu beskonačno dijeliti, gube replikativnu sposobnost i stare zbog skraćivanja telomera.

Telomeraza se ne inaktivira u nekim tumorskim stanicama koje stoga imaju mogućnost neograničene diobe. Detekcija aktivnosti telomeraze važna je u dijagnostici i potencijalno u terapiji. U nekim tumorima produženje telomera nije povezano s aktivnom telomerazom, što ukazuje na alternativne mehanizme produženja telomera.

Primijetila se visoka korelacija između aktivnosti telomeraze i izloženosti stanica bronhijalnog epitela duhanskome dimu. Povećana telomerazna aktivnost produljuje životni vijek stanicama i tako povećava rizik za malignu transformaciju i tumorigenezu [7].

Činjenica da izloženost stanica duhanskome dimu povećava aktivnost telomeraze naglašava potencijal duhanskog dima u promociji tumora. Nažalost još se uvijek ne zna koja to no komponenta duhanskog dima djeluje na povećanje aktivnosti telomeraze.

#### **3.2.4. Uloga duhanskog dima na mobilizaciju hranjivih tvari**

Tumorigeniza zahtjeva veliku količinu hranjivih tvari i energije. Sintaza pojedinih proteina i mitohondriji imaju određenu ulogu u neoplastičnoj transformaciji (transformacija normalne stanice u tumorsku). Dobro je poznata činjenica da **mTOR** (engl. mammalian target of rapamycin) i MAPK moduliraju fosforilaciju transkripcijskih faktora, stabilnost mRNA i sintezu proteina. Nikotin i njegovi metaboliti (NNK) mogu izazvati ekspresiju inhibitora apoptoze **survivina**, preko AKT-mTOR puta i također posredovati u njegovoj *de novo* sintezi u normalnim stanicama epitela pluća (HBE stanice). Ekspresija survivina ima značajnu ulogu u malignoj transformaciji HBE stanica stimulirajući i putove preživljavanja [18].

Duhanski dim može smanjiti funkciju dišnog lanca u mitohondrijima te tako izazvati oksidacijski stres koji vodi do nefunkcionalnih mitohondrija. Izlaganje organizma nikotinu rezultira smanjenjem aktivnosti mitohondrijskih enzima gušterače, degranulacijom  $\beta$ -stanica, povišenim oksidacijskim stresom u tim stanicama te smanjenom sekrecijom inzulina [7]. Kontinuirana izloženost slobodnim radikalima kisika (**ROS** engl. Reactive oxygen species), dobivenih izazivanjem 'mitohondrijskog stresa', može dovesti do mutacija u mitohondrijskoj DNA koje imaju važnu ulogu u tumorigenezi [19]. Analizom kliničkih uzoraka stanica bukalne sluznice pušača pokazano je kako tumorske stanice sa mutacijama u mtDNA rastu brže nego stanice bez takvih mutacija [19].

### **3.3. Progresija**

Malignost nekog tumora procijenjena je po njegovoj sposobnosti invazije i metastaziranja kao i s angiogenezom. Za progresiju su karakteristične dodatne promjene genoma, proliferacija

stanica s oštećenom DNA i indukcija dodatnih oštećenja DNA. Postoji obilje dokaza koji povezuju duhanski dim sa procesom angiogeneze, invazije i metastaziranja kojima se bavi u ostatku ovoga rada.

#### 4. U INAK DUHANSKOG DIMA NA ANGIOGENEZU

Angiogeneza je proces nastajanja novih krvnih žila iz endotelnih stanica (EC). To je vrlo važan proces jer njime nastaju žile koje opskrbljuju tumorsko tkivo hranjivim tvarima i kisikom. Angiogeneza uključuje promjene zrelih krvnih žila, odvajanje pericita (stanice koje obavijaju endotel kapilara), degradaciju ekstracelularnog matriksa, proliferaciju, migraciju i formaciju novih endotelnih stanica u cjevaste strukture. Tumorske stanice potiču angiogenezu mijenjajući i balans induktora angiogeneze poput **VEGF** (engl. vascular endothelial growth factor) i **bFGF** (engl. basic fibroblast growth factor) i kompenzacijom inhibitora kao što je trombospondin-1. VEGF potiče angiogenezu i limfoangiogenezu u tumoru omogućavajući mu tako mogućnost širenja [7].

Nikotin može uzrokovati angiogenezu *in vitro* i *in vivo* te tako pridonijeti rastu tumora [20]. Slično kao i **FGF** (engl. fibroblast growth factor) nikotin potiče migraciju, proliferaciju, formaciju cjevica i produkciju dušikovog(II) oksida (NO) u endotelnim stanicama. NO potiče širenje krvnih žila ali je i medijator u angiogenezi. Nikotin također potiče ekspresiju vaskularnih endotelnih faktora rasta poput VEGF, bFGF, PDGF, TGF- $\beta$  i TGF- $\alpha$  u endotelnim stanicama i u glatkome mišiću. Osim toga nikotin inducira sekreciju prostaciklina, vazodilatirajuće molekule koja može uzrokovati proliferaciju, preživljavanje i migraciju stanica endotela [7]. Ove činjenice nas upućuju na to da duhanski dim utječe na hiperplaziju intime (najdubljeg sloja arterije koji je u izravnom kontaktu s krvlju) krvnih žila što znači i kolagenozno zadebljanje ili fibrozu intime krvnih žila.

Tumorska angiogeneza može biti modulirana preko nAChR.  $\alpha 7$  nAChR je važan i u fiziološkoj ali i u tumorskoj angiogenezi.  $\alpha 7$  nAChR mora biti podražen ili aktiviran hipoksijom ili ishemijom kako bi inducirao angiogenezu. Specifični antagonist  $\alpha 7$  nAChR je  $\alpha$ -bungaratoksin koji inhibira angiogenezu induciranu nikotinom. Inhibicijom ERK1/2, p38, MAPK i PI3K/AKT moguće je u potpunosti blokirati i spriječiti formaciju cjevica iz endotela koja je inducirana nikotinom preko receptora  $\alpha 7$  nAChR [7]. Nikotin pojačava angiogenezu tako što aktivira PKC, PI3K/AKT, ERK1/2, mTOR, i Src u tumorskim stanicama pluća a NSCLC (engl. Non-small cell lung cancer). U tim istim stanicama nikotin može

potaknuti proangiogenetski u inak estradiola. Tako er je zabilježena indukcija angiogeneze u debelome crijevu potaknuta nikotinom preko  $\alpha$ -AR i puta arahidonske kiseline [7].

## 5. U INAK DUHANSKOG DIMA NA INVAZIJU I METASTAZIRANJE TUMORA

Sposobnost invazije i metastaziranja omogu ava tumorskim stanicama da 'pobjegnu' od primarnog tumora i zauzmu nova područja u tijelu. Metastaza je završna i najdestruktivnija faza razvoja zlo udnih tumora. Sam proces invazije i metastaziranja je vrlo kompleksan, a njegov mehanizam vrlo slabo istražen. Unato tome postoje brojni dokazi kako duhanski dim uzrokuje proliferaciju stanica ali potiče i metastaziranje [7]. Kliničke i epidemiološke studije ukazuju na to da je kod puša a brže napredovanje tumora i njegovog metastaziranja.

Zasad je poznato da su ovi procesi ovisni o stani noj i stromalnoj interakciji ali i o degradaciji izvan stani nog matriksa. E-kadherin je molekula koja je zaslužna za interakciju između dvije stanice, eksprimirana je na površini epitelnih stanica. Gubitak ekspresije E-kadherina je jedna od glavnih patoloških manifestacija koja uzrokuje metastaziranje tumora. Kronična ekspozicija stanica nikotinu uzrokuje smanjenje ekspresije vanstani nih proteina (ECM; engl. extracellular matrix) poput E-kadherina i  $\alpha$ -katehina s istodobnim povećanjem ekspresije fibronektina i vimentina u stanicama tumora pluća. Neke studije pokazuju da NNK-om inducirane tumorske stanice debelog crijeva migriraju u smjeru opadanja ekspresije E-kadherina [21]. Opadanje ekspresije E-kadherina je uzrokovano tako što je NNK povećao ekspresiju **Snail** i **ZEB1**, dva glavna transkripcijska represora ekspresije E-kadherina. Nikotin tako er preko  $\alpha 7$  nAChR/ERK aktivacije uzrokuje povećanje ekspresije kontaktina-1, glikofosfatidilinozitolom usidrene adhezijske molekule, te tako povećava invazivnost tumorskih stanica pluća.

Drugi ključni faktor za invaziju i metastaziranje su izvanstani ne proteaze [13]. Razgradnju izvanstani nog matriksa potpomaže familija enzima zvanih matriks metaloproteinaze (**MMP**). MMP su potrebne kako bi se tumorske stanice oslobodile i 'napale' susjedna tkiva (metastazirale). Istraživanja su pokazala da nikotin povisuje ekspresiju MMP-2, MMP-9 kao i aktivatore plazminogena (COX-2). Osteopontin (**OPN**) je protein kojeg sintetiziraju različite vrste stanica, uključujući i epitelne, a izlučuju ga u izvanvanstani ni prostor. Djeluju i kao citokin i kao protein izvanvanstani nog matriksa, OPN se veže za receptore na stani noj površini i time pobuđuje prijenos signala kojim se reguliraju brojni

fiziološki i patološki procesi. Povećana ekspresija OPN-a, utvrđena u pokusima *in vitro* i u nekim humanim tumorima *in vivo*, upućuje na njegov značaj u procesu invazije i metastaziranja tumora. Njegova ekspresija može biti pojačana nikotinom. OPN služi kao dobar marker za metastaze adenokarcinoma izvodnog kanala gušterače (PDAC), osobito u populaciji pušača [7].

PAH-ovi, uključujući i BaP, potiču u metastaziranje tumora. Pojačanjem ekspresije COX-2 i PGE2 preko AhR-a, BaP potiče invaziju stanica tumora dojke [7]. Mješavina PAH-ova i BaP-a inducira invaziju stanica tumora i metastaziranje preko pojačavanja ekspresije MMP-a, aktiviranog proteolitičkog receptora-2, fibronektina i Bcl-2 proteina. BaP povećava invazivni potencijal tumorskih stanica pluća *in vitro*. To postiže povećanjem ekspresije FGF-a (engl. fibroblast growth factor) preko p38 i ERK1/2 [7].

Za vrijeme metastaziranja, tumorske stanice koriste signale koji kontroliraju promet leukocita i kemokinima upravljajući migraciju stanica. Među te kemokine spadaju CXCR4 (engl. chemokine receptor type 4) i njegov prirodni ligand CXCL12 kao medijatori metastaziranja. Nikotin povećava ekspresiju nekih CXC kemokinskih receptora (CXCR2, CXCR3, CXCR4 i CCL12) u malim stanicama tumora pluća (SCLC, engl. Small Cell Lung Cancer) [22]. Stoga možemo zaključiti da nikotin stimulira migraciju tumorskih stanica i metastaziranje [21,7].

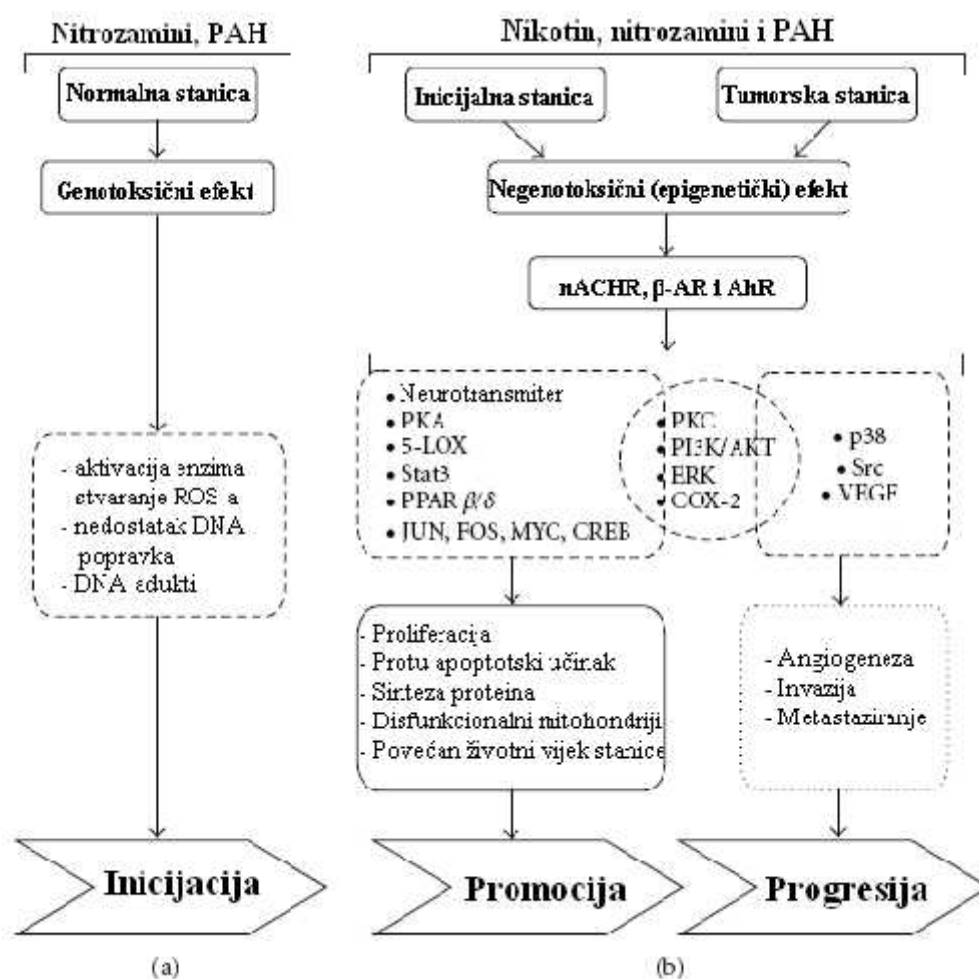


## 6. ZAKLJUČAK

Stani i signalni putovi igraju važnu ulogu u nastanku tumora. To su veoma složene interakcije te je zbog toga dat i shematski pregled osnovnih molekularnih mehanizama kojima duhanski dim utječe na tumorigenezu (Slika 8).

Izbjegavanje duhanskog dima je najbolji način prevencije tumorigeneze inducirane pušenjem i/ili duhanskim dimom. No nažalost danas je pušenje duhanskih proizvoda dozvoljeno iako su znanstveno dokazane štetne posljedice konzumacije duhanskog dima. Zbog toga je nužno stalno istraživati utjecaj duhanskog dima na zdravlje ljudske populacije. Razumijevanje procesa i mehanizama tumorigeneze uzrokovane duhanskim dimom je prvi korak ka rješavanju tog globalnog problema.

Kao što mnogi prirodni spojevi iz duhana djeluju štetno, tako bi mnogi drugi prirodni spojevi mogli djelovati pozitivno u svrhu sprječavanja rasta i razvoja tumora. Mnogi prehrambeni dodaci, ali i biljni ekstrakti kao lijekovi značajno utišavaju utjecaj duhanskog dima te općenito pomažu u borbi protiv tumora. Potrebna su opsežnija ali perspektivna istraživanja prirodnih spojeva koji bi mogli pomoći u smanjivanju rizika dobivanja tumora. Kada se još detaljnije istraže mehanizmi i putovi kojima štetni sastojci duhana, pogotovo oni koji djeluju epigenetičkim mehanizmima, uzrokuju tumorske promijene oni će biti smjernica za pronalazak prirodnih spojeva protutumorskog djelovanja.



**Slika 8. Shematski prikaz pojednostavljenih molekularnih mehanizama genotoksičnih i ne-genotoksičnih (epigenetičkih) u inaka duhanskog dima, preuzeto iz [7].**

- Nitrozamini i PAH-ovi su kancerogeni genotoksični djelovanja
- Epigenetički u inak duhanskog dima (nikotin, nitrozamini i PAH) u promociji i progresiji tumora. Aktivacija nAChR, β-AR i AhR popraćena je oslobađanjem neurotransmitera, aktivacijom signalnih putova (PKA, 5-LOX, Stat3 i PPAR β/δ) i povećanom ekspresijom transkripcijskih faktora (JUN, FOS, MYC i CREB) koji reguliraju promociju tumora uzrokovanu duhanskim dimom. PKC, PI3K/AKT, ERK i COX-2 su signalni putevi koji smanjuju ekspresiju receptora i tako igraju važnu ulogu u promociji i progresiji tumora. Otpuštanje p38, Src-a, VEGF-a i NO-a uzrokuje napredovanje progresije tumora uzrokovane duhanskim dimom.

## 7. SAŽETAK

U ovome radu opisani su osnovni procesi nastanka i razvoja tumora te njihovi mehanizmi. Svi opisani procesi su povezani sa duhanskim dimom kao karcinogenom. Iako komponentata duhanskoga dima sa karcinogenim potencijalom ima mnogo (preko 62), ve ina istraživanja je usmjerena na tri komponente: nikotin, 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK) i policikli ki aromatski ugljikovodici (PAH). Nikotin i NNK su specifi ni za duhanski dim dok su PAH-ovi spojevi koji se mogu na i i u okolišu, a nastaju industrijskim zaga enjem.

U radu su opisani genotoksi ni mehanizmi, ali i vrlo važni ne-genotoksi ni odnosno epigeneti ki mehanizmi tumorigeneze. Naj eš e epigeneti ke promjene odnose se na promjene u metilaciji DNA, modifikacije histona i nekodiraju ih RNA molekula, a služe u regulaciji važnih stani nih funkcija Takve modifikacije vode do promjena u ekspresiji proteina bitnih za normalni stani ni ciklus.

Mehanizmi koji uzrokuju promociju i progresiju tumora su kompleksni i uklju uju mnoge molekularne mete kao što su: receptori, regulatori stani nog ciklusa, MAP kinaze, medijatori apoptoze, faktori angiogeneze te medijatori invazije i metastaziranje. Me u receptorima, nAChR, -AR i AhR su najzna ajniji posrednici u tumorigenezi uzrokovanoj duhanskim dimom. Poja ana ekspresija ili aktivacija ovih receptora može rezultirati osloba anjem neurotransmitera i faktora rasta koji sudjeluju u inhibiciji apoptoze, stani noj proliferaciji, angiogenezi te invaziji i metastaziranju tumorskih stanica. Signalni putovi PI3K/AKT, Stat3, ERK1/2 imaju važnu ulogu u procesima tumorigeneze. To su tako er zajedni ki putovi na koje djeluju komponente duhanskog dima (nikotin, NNK i PAH). Signalni putovi poput PKC, AKT, ERK i COX-2 uklju eni su u promocijski i progresijski korak tumorigeneze uzrokovane duhanskim dimom. Pretpostavlja se da bi se ove molekule mogle iskoristiti kao potencijalne mete za budu i razvoj terapija i lijekova protiv tumora.

## 8. SUMMARY

This paper described the basic processes responsible for the emergence and development of tumors (tumorigenesis) and their mechanisms. All the described processes were associated with tobacco smoke as the carcinogen. There are many (over 62) components of tobacco smoke with carcinogenic potential; however, most research has focused on three components: nicotine, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Nicotine and NNK are specific to tobacco smoke while the PAH compounds are found in the environment as a result of industrial pollution.

In this paper genotoxic mechanisms were described, but the focus was placed on the the very important non-genotoxic i.e. epigenetic mechanisms of tumorigenesis. The most common epigenetic changes are related to the changes in DNA methylation, histone modifications, and noncoding RNA molecule, which serve to regulate important cellular functions. These modifications lead to changes in the expression of proteins essential for normal cell cycle.

Mechanisms that cause tumor promotion and progression are complex and involve many molecular targets, such as receptors, cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, apoptosis mediators, angiogenic factors, and invasion and metastasis mediators. Among the receptors, nAChR,  $\beta$ -AR, and AhR have the closest association with cigarette smoke-induced carcinogenesis. Over expression or activation of these receptors may result in a release of neurotransmitters and growth factors that participate in apoptosis inhibition, cell proliferation, angiogenesis, cancer cell invasion and metastasis. Signaling pathways PI3K/AKT, Stat3, and ERK1/2 play an important role in the carcinogenetic processes. They are also common paths affected by cigarette smoke components, including nicotine, NNK, and PAHs. In addition, PKC, AKT, ERK, and COX-2 signaling pathways are involved in both promotion and progression stages of tumorigenesis caused by cigarette smoke. It is assumed that these molecules could be used as potential targets for future development of therapies and medicines against tumors.

## 9. LITERATURA

- [1] Tang W.Y. and S.M. Ho, 2007, "Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease," *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 8: 173–182.
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/Epigenetics>
- [3] <http://en.wikipedia.org/wiki/Carcinogenesis>
- [4] Borani M., "Karcinogeneza," Zagreb: Medicinska naklada, 2000.
- [5] Carbone M. and H. I. Pass, 2004, "Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen?" *Seminars in Cancer Biology* 6: 399–405.
- [6] DeMarini D. M., 2004, "Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review," *Mutation Research* 567: 447–474.
- [7] Chen R.J., L.W. Chang, P. Lin, and Y.J. Wang, 2011. "Epigenetic Effects and Molecular Mechanisms of Tumorigenesis Induced by Cigarette Smoke: An Overview," *Journal of Oncology*, doi:10.1155/2011/654931.
- [8] IARC, 2010, "Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures", *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, France.
- [9] Hecht S. S., 2006, "Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms," *Langenbeck's Archives of Surgery* 6: 603–613.
- [10] Nelson D. L., M. M. Cox, "Lehninger principles of biochemistry," New York: W.H. Freeman and company, 2008.
- [11] Costello J.F., C. Plass., 2001, "Methylation matters," *Journal of Medical Genetics* 38: 285–303.
- [12] Akopyan G. and B. Bonavida, 2006, "Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis," *International Journal of Oncology* 4: 745–752.
- [13] Hanahan D. and R. A. Weinberg, 2000, "The hallmarks of cancer," *Cell* 1: 57–70.
- [14] Grozio A., L. Paleari, A. Catassi et al., 2008, "Natural agents targeting the  $\alpha 7$ -nicotinic-receptor in NSCLC: a promising prospective in anti-cancer drug development," *International Journal of Cancer* 8: 1911–1915.
- [15] <http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/biobookmito.html>
- [16] Xu J., H. Huang, C. Pan, B. Zhang, X. Liu, and L. Zhang, 2007, "Nicotine inhibits apoptosis induced by cisplatin in human oral cancer cells," *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 8: 739–744.

- [17] Solhaug A., M. Refsnes, and J. A. Holme, 2004, "Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo[a]pyrene and cyclopenta[c,d]pyrene in hepa1c1c7 cells," *Journal of Cellular Biochemistry* 6: 1143–1154.
- [18] Jin Q., D. G. Menter, LI. Mao, W. K. Hong, and HO. Y. Lee, 2008, "Survivin expression in normal human bronchial epithelial cells: an early and critical step in tumorigenesis induced by tobacco exposure," *Carcinogenesis* 8: 1614–1622.
- [19] Penta J.S., F. M. Johnson, J. T. Wachsman, W. C. Copeland, 2001, "Mitochondrial DNA in human malignancy," *Mutation Research* 2: 119–133.
- [20] Heeschen C., J. J. Jang, M. Weis et al., 2001, "Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis," *Nature Medicine* 7: 833–839.
- [21] Dasgupta P., W. Rizwani, S. Pillai et al., 2009, "Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines," *International Journal of Cancer* 1: 36–45.
- [22] Martinez-Garcia E., M. Irigoyen, O. Gonzalez-Moreno et al., 2010, "Repetitive nicotine exposure leads to a more malignant and metastasis-prone phenotype of SCLC: a molecular insight into the importance of quitting smoking during treatment," *Toxicological Sciences* 2: 467–476.