

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

ÚLOHA BENZO[A]PYRENU V ROZVOJI RAKOVINNÉHO BUJENÍ

ROLE OF BENZO[A]PYRENE IN CANCER DEVELOPMENT

Vedoucí práce: RNDr. Michaela Moserová, Ph.D.

Praha 2013

Petra Vaňátková

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí práce RNDr. Michaely Moserové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

v Praze dne:

Podpis:

## **ABSTRAKT**

Rakovina je jedním z nejzávažnějších onemocnění dnešní doby. Rozvoj nádorového bujení je několikastupňovým procesem, při němž účinkem vnitřních a vnějších faktorů dochází k selhání regulačních a obranných mechanismů organismu, a tím k nahromadění vzniklých mutací. Mezi vnější činitele patří vedle biologických a fyzikálních, také chemické karcinogeny. Početnou skupinu chemických karcinogenů tvoří polycyklické aromatické uhlovodíky. Jedním z nejznámějších a nejstudovanějších je benzo[a]pyren. Při testech na laboratorních zvířatech byly prokázány karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky benzo[a]pyrenu. V případě člověka, je nejvíce dáván do souvislosti s rozvojem rakoviny plic při kouření cigaret. Je jedním z hlavních karcinogenů tabákového kouře. Po jeho inhalaci dochází v organismu biotransformačními pochody k jeho aktivaci za účasti systému enzymů monooxygenáz se smíšenou funkcí. Nejdůležitějšími enzymy podílejícími se na aktivaci benzo[a]pyrenu jsou CYP1A1 a CYP1B1. Oxidací vzniklé reaktivní metabolity jsou schopny tvořit kovaletní adukty s DNA, což vede k tvorbě mutací. Nejvýznamnějším konečným karcinogenním produktem benzo[a]pyrenu je benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid, který může způsobit nevratné změny v molekule DNA.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Benzo[a]pyren, cytochrom P450, karcinogeneze, polycyklické aromatické uhlovodíky, kouření

## **ABSTRACT**

Cancer is nowadays one of the most serious diseases. Tumor development is a multistage process in which the effect of internal and external factors lead to failure of regulatory and defense mechanisms of the organism and to the accumulation of mutations which are generated by these organisms. Chemical carcinogens and also biological and physical factors can be regarded as the main external factors. Polycyclic aromatic hydrocarbons are large group of chemical carcinogens. One of them, benzo[a]pyrene is the most studied polycyclic aromatic hydrocarbon. Carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects of benzo[a]pyrene had been shown on laboratory animals. Benzo[a]pyrene is considered as the main carcinogen in tobacco smoke and is connected with lung cancer development among smokers. Benzo[a]pyrene is metabolized in activation or detoxication pathways by enzymes of mixed function monooxygenase system of cytochromes P450. The most important enzymes involved in the activation of these compounds are CYP1A1 and CYP1B1 with cooperation of epoxide hydrolase. The reactive species generated in its activation pathway are able to form covalent adducts with DNA. The most important carcinogenic product of benzo[a]pyrene is benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide, which can cause irreversible changes in molecules of DNA.

## **KEY WORDS**

Benzo[a]pyrene, cytochrome P450, carcinogenesis polycyclic aromatic hydrocarbons, smoking

[In Czech]

## OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>6</b>
<b>1. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>7</b>
<b>2. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
2.1. Rakovina.....	8
2.2. Charakteristika druhů nádorů.....	11
2.3. Nádorová klasifikace.....	13
<b>3. KARCINOGENEZE</b> .....	<b>13</b>
3.1. Mechanismus karcinogeneze.....	14
3.2. Geny uplatňující se při regulačních pochodech.....	15
3.3. Etiologie karcinogeneze.....	16
3.3.1. Faktory způsobující nádorová onemocnění.....	16
<b>4. CHEMICKÉ KARCINOGENY</b> .....	<b>19</b>
4.1. Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	20
4.1.1. Charakteristika polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich výskyt.....	20
4.1.2. Účinky polycyklických aromatických uhlovodíků na zdraví.....	22
4.1.3. Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků.....	23
<b>5. BENZO[a]PYREN</b> .....	<b>24</b>
5.1. Metabolismus benzo[a]pyrenu.....	25
5.2. Benzo[a]pyren a jeho vliv na lidské zdraví při inhalaci zplodin tabákového kouře.....	31
5.2.1. Zdroje tabákového kouře – cigarety, tabáky, vodní dýmky.....	31
5.3. Limity pro výskyt benzo[a]pyrenu.....	35
<b>6. RAKOVINA PLIC</b> .....	<b>37</b>
6.1. Vliv kouření na incidenci rakoviny plic u kuřáků a nekuřáků.....	40
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>42</b>
<b>LITERÁRNÍ ZDROJE</b> .....	<b>44</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
BaP	benzo[a]pyren
CYP	cytochrom P450
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GST	glutathion-S-transferázy
Hsp90	protein teplotního šoku (heat shock protein 90)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
JECFA	Společnost FAO/WHO pro potravinářské přísady (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
POPs	perzistentní organické polutanty
Rb gen	Retinoblastomový gen
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCLC	malobuněčný karcinom plic
SULT	sulfotransferázy
UGT	UDP-glukuronosyltransferázy
UV	ultrafialové záření
w/w	hmotnost/hmotnost
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

## **1. CÍL PRÁCE**

Cílem této práce je souhrn informací (rešerše) o rozvoji nádorového onemocnění a roli benzo[a]pyrenu, který může po své metabolické aktivaci, enzymovými systémy cytochromů P450 na reaktivní intermediáty, poškozovat DNA. Dalším cílem je zhodnocení vlivu kouření na incidenci nádorového onemocnění plic u kuřáků a nekuřáků zapříčiněné vdechováním zplodin obsahujících benzo[a]pyren.

## 2. ÚVOD

### 2.1. Rakovina

Pojem rakovina nebo též nádorové onemocnění představuje různorodou skupinu těchto onemocnění, které lidstvo provázejí od nepaměti. Bývá řazena mezi tzv. civilizační choroby. Název vychází z řeckého (*karkinos* = rak, *onkos* = krab) či latinského (*cancer* = rak), díky výběžkům, připomínající klepeta raka, které prorůstají z centrálního ložiska nádoru do okolních tkání [1]. V dnešní době je, po kardiovaskulárním onemocnění, považována za druhou nejčastější příčinu úmrtí na celém světě. Při srovnání úmrtnosti mezi lety 1990 a 2011 v České republice (ČR), dochází k poklesu na nemoci oběhové soustavy u mužů o 8,0 % a u žen o 8,6 %, zatímco nárůst úmrtí je zaznamenán v případě novotvarů, a to o 4,0 % u mužů a u žen je toto zvýšení rovno 5,2 % (viz obrázek č. 1, str. 11). Zhoubné nádory jsou příčinou asi čtvrtiny úmrtí v ČR [3].

Tato zhoubná onemocnění charakterizuje několik základních znaků. Hlavním znakem je přeměna zdravé tkáně, jejíž buňky se začnou v důsledku mutací v genomu nekontrolovatelně dělit a patologicky bujit, ve zhoubný nádor. Tato přeměna buněk bývá označována jako neoplastická transformace. Celý proces vedoucí ke vzniku nádorového bujení se potom nazývá karcinogeneze, onkogeneze nebo také tumorigeneze [4]. Mezi faktory ovlivňující riziko vzniku rakoviny můžeme zahrnout – věk, životní styl, zdravotní stav a míru prevence.

Nádorová onemocnění bývají spojována s vysokým věkem. Jak uvádí Americká onkologická společnost (American Cancer Society) přibližně 77 % všech druhů rakoviny postihuje dospělé jedince okolo 55 roku, a zejména pak starší generace [3, 5, 6]. Věk je jedním z klíčových faktorů při výskytu rakoviny a riziko jejího vzniku s exponenciálně se zvyšujícím věkem roste. To souvisí s dobou a množstvím působících nežádoucích činitelů na organismus. Zároveň v průběhu stárnutí klesá účinnost buněčných opravných mechanismů. Avšak žádná věková kategorie není vůči rozvoji této choroby imunní [7].

Dalším faktorem ovlivňující riziko může být životní styl. Sám jedinec může svým způsobem života podpořit riziko jejího vzniku. Podle statistických údajů má asi 50 % všech nádorových onemocnění souvislost s nesprávným životním stylem (nedostatek pohybu, kouření, požívání nadměrného množství alkoholu, nesprávné stravování, nadváha, expozice karcinogenním látkám) a současně nedostatečným kontaktem s ochrannými



faktory (dostatečný přísun ovoce a zeleniny obsahující vlákninu, vitamíny A, C a E aj.) [1, 4].

Mezi další činitele, kteří mohou k rozvoji tohoto onemocnění přispět, je prodělání některých infekčních chorob (např. virus hepatitidy B způsobující žloutenku). [8]

Jedním z nejdůležitějších faktorů je prevence, kterou můžeme dále dělit do několika skupin:

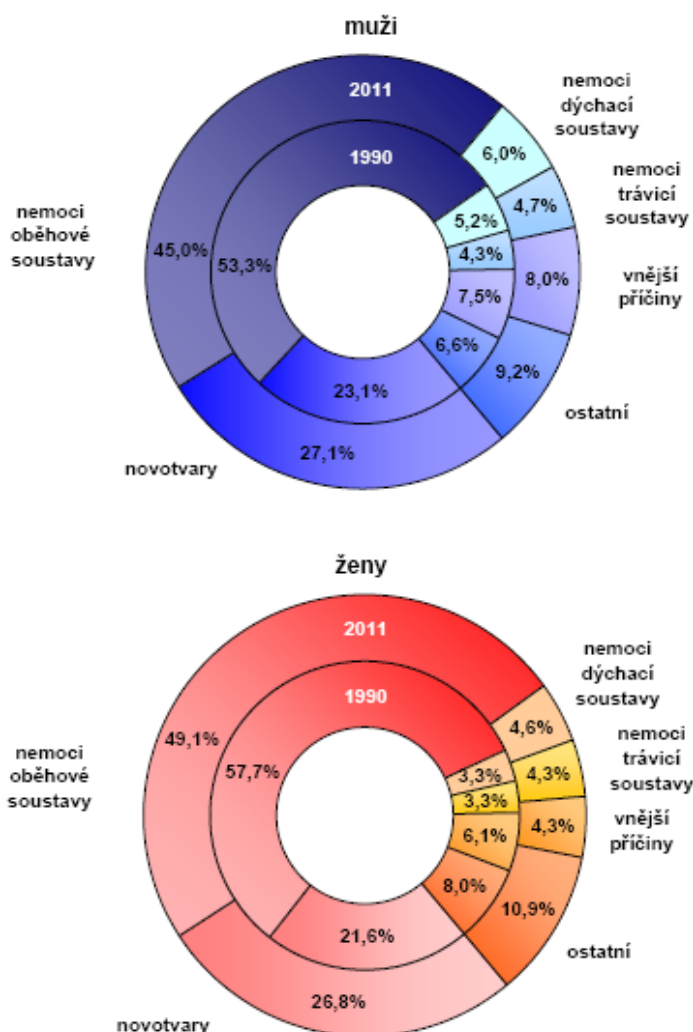
- Primární, jejímž cílem je co nejvíce snížit riziko vzniku nádorových onemocnění ovlivňováním jeho příčin, některé z těchto ovlivnitelných rizikových faktorů jsou uvedeny v tabulce č. 1.
- Sekundární prevence představuje včasné stanovení diagnózy a zahájení léčby, a tím přispívá ke snížení úmrtnosti. Včasná diagnóza zvyšuje šanci na uzdravení např. u karcinomu prsu.
- Terciární prevence, která se snaží snížit počty úmrtí u onkologicky nemocných pacientů, kteří již podstoupili primární léčbu [1].

Snahou lékařů je pokud možno nádor odstranit. Chirurgické odstranění nádoru, bylo v minulosti téměř jediným řešením, avšak i v dnešní době je jedním z nejpoužívanějších zákroků. Do dnešní doby se možnosti léčby díky vědě značně rozšířily. Příkladem onkologické léčby je chemoterapie, radioterapie, hormonální léčba, imunoterapie či biologická léčba [5]. Odstranění nádoru však ve značném množství případů samotnou chorobu nezastaví, pokud není jeho léčba započata včas. Navíc je toto onemocnění často spojováno s následnou recidivou. Jednotlivé molekulární mechanismy nejsou dodnes ještě zcela objasněné. Proto se toto téma stává předmětem každodenního vědeckého výzkumu a prací onkologů, zabývajících se nádorovými onemocněními, jejich prevencí, léčbou a diagnostikou.

Tabulka č. 1 Přehled možných rizikových faktorů ovlivňujících vznik nádorových onemocnění [1].

<b>Rizikový faktor</b>	<b>Nádory, které rizikový faktor zvyšuje</b>
kouření	nádory plic, močového měchýře, ledvin, pankreatu, děložního čípku, žaludku, akutní myeloidní leukémie
strava s vysokým obsahem tuků	kolorektální karcinom, karcinom dělohy, prostaty
obezita a tělesná inaktivita	karcinom prostaty, tlustého střeva, prsu, endometria, jícnu, ledvin
alkohol	karcinom dutiny ústní, hltanu, jícnu, jater, prsu
ionizující záření (expozice radonu, rentgen, CT vyšetření)	karcinom prsu, lymfomy, chronické leukémie, karcinomy plic a štítné žlázy
sluneční UV záření, solária	karcinom kůže, melanom
expozice chemikáliím (např. azbest, benzen, benzidin, kadmium, nikl, vinylchlorid)	karcinom plic, kůže, močového systému, mezoteliom
nechráněný pohlavní styk (infekce papilomaviry, viry hepatitidy B a C, HIV)	HPV – karcinom děložního čípku, řiti, vulvy, pochvy a sliznic hlavy a krku, HBV a HCV – hepatocelulární karcinom, HIV – lymfomy, Kaposiho sarkom, karcinom děložního čípku
hormonální terapie	karcinom prsu, vaječníku a endometria

### Struktura standardizované úmrtnosti



Obrázek č. 1 Přehled úmrtnosti na jednotlivá onemocnění v ČR v roce 2011, spolu se srovnáním z roku 1990. <http://www.uzis.cz/system/files/kardcz2011.pdf> ÚZIS (1.5.2013) [2].

## 2.2. Charakteristika druhů nádorů

Jednotlivé nádory mohou být děleny podle několika hledisek [8].

- Jedním z nich je klasifikace podle jejich biologické povahy, která souvisí s jejich schopností invazivního růstu. Rozlišují se dva základní typy:
  - benigní (nezhoubné) – vznikají z benigních buněk, což jsou buňky, zachovávající si alespoň částečnou funkci a vzhled buněk, z nichž se přeměnily. Buňky při svém růstu utlačují okolní tkáň (expanzivní růst), ale

neprorůstají do ní, ani do kapilár a nezakládají tedy sekundární ložiska. Jsou-li tyto nádory menších rozměrů, pak se často ani chirurgicky neodstraňují, neboť nepřinášejí větší riziko.

➤ maligní (zhoubné) – naproti tomu tento typ nádoru je poněkud agresivnější. Maligní buňky, značně odlišné od původních, prorůstají do okolních tkání (invazivita), čímž dochází k jejich poškození. Často pronikají i do oběhového systému, prostřednictvím něhož mohou putovat a zakládat nová ložiska na vzdálených místech v organismu tzv. metastázy.

- Dále je možné maligní nádory dělit podle typu tkáně, ze které vyrůstají [9]:
  - tzv. tekuté nádory – leukémie a lymfomy – neboli hematologické nádory. Jde o zhoubné onemocnění krve, při kterém dochází k alteraci bílých krvinek v kostní dřeni.
  - solidní nádory – neboli neoplazie pevných tkání. Postihují různé orgány či tkáně, v nichž vytváří ložiska tzv. solidní útvary, které lze zobrazovacím vyšetřením či dokonce v některých případech pouhým okem nebo hmatem nalézt.
  - karcinom – tento typ maligního nádoru vzniká z epitelálních a endotelálních buněk. Postihuje tedy slizniční povrchy tělních dutin, žlázy a kůži, např. adenokarcinom – nádor sekretorní sliznice nebo spinocelulární karcinom, vznikající z dlaždicových buněk.
  - sarkom – jedná se o maligní nádor neepitelového původu, postihující mezenchymální tkáň, tedy buňky pojivových tkání. Příkladem může být maligní nádor kostí osteosarkom nebo kolagenního vaziva fibrosarkom.
  - gliom – nádory vznikající z podpůrné mozkové tkáně (neuroglie) a tvořící více jak 50 % všech nádorů centrální nervové soustavy, konkrétním příkladem je glioblastom.
- V neposlední řadě je možné dělení podle jejich lokalizace v těle, tedy orgánu, který je nádorovým onemocněním postizen.

### 2.3. Nádorová klasifikace

Pro klasifikaci maligních nádorů, kromě krevních chorob (leukémie, lymfomy), se používá mezinárodní klasifikační systém tzv. TNM systém. Tento systém slouží k popisu rozsahu nádoru a určení stádia onemocnění u pacienta pomocí vyšetření, čehož se užívá pro zvolení správného postupu léčení. Nejde však o všeobecný systém, nýbrž je pro jednotlivé nádory vypracován vlastní. Níže je uveden přehled významu jednotlivých písmen TNM klasifikace, jejichž kombinací se volí popis charakterizující konkrétní nádor [10].

- T – popisuje velikost a lokalizaci primárního nádoru.
- N – určuje lokalizaci postižených lymfatických uzlin a rozsah tohoto postižení.
- M – hodnotí přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastáz.

K jednotlivým písmenům se připisuje číslo, udávající rozsah nádorového onemocnění. Čím jsou tato čísla vyšší, tím je nádor závažnější. U T a N se používají kategorie 1 – 4 (charakterizující jeho velikost), včetně 0 (nádor není přítomen), písmena X (nádor nelze klasifikovat) a Tis (carcinoma in situ). V případě M se užívá pouze X a podle přítomnosti či nepřítomnosti 0 nebo 1. Zde se pro upřesnění někdy uvádí i místo lokalizace (PUL – plíce, SKI - kůže aj.) [10, 11].

### 3. KARCINOGENEZE

Karcinogeneze, někdy označovaná jako kancerogeneze, obecně popisuje vznik a vývoj nádoru. Představuje vícestupňový multifázový proces, v němž jednotlivé kroky odrážejí genetické změny normálních somatických buněk, transformující se na buňky maligní. Příčinou bývají interakce mezi organismem a okolním prostředím, v němž různé faktory mohou působit různými mechanismy a na různých stupních vzniku nádorového bujení. Celý průběh je velmi složitý a uskutečňuje se sledem několika stádií po delší časový úsek, uvádí se od 5 do 20 let [1].

Příčinou vzniku karcinogeneze jsou dynamické změny v genetické informaci buněk. Klíčové jsou zejména mutace genů, podílejících se na regulaci tkáňové homeostázy (udržování stálosti vnitřního prostředí buněk, v podobě řízení jejich vzniku, zrání, diferenciací a zániku). Těmito geny jsou protoonkogeny, tumor supresorové geny, geny regulující apoptózu a geny regulující opravy deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Při jejich

poškození dochází k nekontrolovatelnému růstu určité části buněčné populace a nadměrnému dělení těchto buněk (proliferace) na úkor buněk okolních. Tyto buňky ztrácejí svou funkční specializaci, jsou tzv. dediferencované. Následkem toho vznikají změny v enzymovém systému a genomu, které se dělením buněk přenáší dále na buňky dceřiné. To dává podklady pro vznik maligního nádoru či maligního onemocnění krve. Buňky primárního maligního nádoru se rozšiřují do okolní tkáně, kterou tak ničí a pronikají do cévního a mízního oběhu, díky němuž mohou být transportovány na vzdálená místa v organismu a tam zakládat nová ložiska tzv. metastázy, z kterých se tvoří tzv. sekundární nádory [8].

### **3.1. Mechanismus karcinogeneze**

Každá eukaryotická buňka má ve svém jádře uložen genetický kód zabudovaný ve dvoušroubovicové spirále DNA ( $\alpha$ -helix), který je dán sledem purinových (adenin, guanin) a pyrimidinových bází (cytosin, thymin) vzájemně spojených vodíkovými můstky. Jednotlivé geny, tvořící genetický kód, jsou zdrojem informace nezbytné pro syntézu proteinů, uplatňujících se při stavbě buňky a jejího řízení. Veškeré procesy v organismu jsou podmíněny jeho potřebami a jsou velmi pečlivě řízeny řadou mechanismů. Působením karcinogenů, interagujících různým způsobem s DNA, dochází k ireverzibilním genetickým změnám, vedoucích k maligní transformaci buňky. Mezi nejběžnější alterace patří: bodová mutace, delece, inserce, inverze, translokace a amplifikace. Pro vznik nádorového bujení jsou rozhodující mutace genů, kódujících proteiny uplatňující se v regulačních pochodech [12,13].

- **Fáze chemické karcinogeneze**

- Iniciace

Celý proces může být spuštěn jednou jedinou buňkou s ireverzibilně pozměněným genomem. K této alteraci může dojít spontánně či účinkem karcinogenních činitelů, často početnějších a dlouhodobě působících. Tato transformace pak má za následek změnu informací v buňce, díky nimž se stává rezistentní k běžným regulačním mechanismům. K nádorové přeměně může dojít v kterékoli buňce schopné dělení, která se pak označuje jako iniciovaná buňka. Nejčastěji k této přeměně dochází v kmenové buňce. Ta ještě samotné

nádorové bujení vyvolat nemusí. V některých případech může dlouhodobě setrvávat ve tkáni, aniž by jí narušovala [5, 14, 15].

Regulační mechanismy organismu, udržující homeostázu, jsou velmi složité a jsou schopny do určité míry mutace vzniklé v genech opravit. Proto, aby došlo k jejich narušení je často zapotřebí hned několik různých mutací, uvádí se okolo 5 – 6 poruch klíčových regulačních genů v jedné buňce [16]. Ty se pak během života jedince v genomu hromadí, dokud nedosáhnou kritického množství, což souvisí s výskytem rakoviny zvláště v pozdějším věku [17].

➤ Promoce

Spoluúčastí dalších, často negenetických stimulů (chemické karcinogeny, UV aj.), začne mutovaná buňka opět proliferovat, čímž se naruší buněčná rovnováha a citlivost k obranným mechanismům. Tyto další změny iniciované buňky vedou k nádorové přeměně [15].

➤ Progrese

Poslední fáze karcinogeneze je nazývána progrese. Dochází při ní k lokálnímu růstu a tvorbě samotného nádoru, který se již zcela vymknul kontrolním mechanismům organismu. U některých agresivních typů nádorů navíc dochází, při jejich vniknutí do krevního či lymfatického řečiště, k zakládání nových ložisek na vzdálených místech v organismu, tedy tvorbě metastáz. Ty bývají nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu [18].

### 3.2. Geny uplatňující se při regulačních pochodech

Mezi tyto funkční geny, nezbytné pro správné fungování celého organismu, řadíme následující tři [8, 17, 18]:

- **Protoonkogeny** - Jde o geny, jejichž hlavní úlohou je řízení proliferace buněk. Při jejich mutaci či aktivaci bez potřeby organismu, může dojít k zesílení jejich funkce. Takto pozměněné protoonkogeny označujeme jako onkogeny. Pro vznik aktivního onkogenu schopného nádorové transformace postačuje mutace pouze jedné alely protoonkogenů. Z tohoto důvodu je genotypový projev onkogenů označován jako dominantní.

- **Tumor supresorové geny** - Označované také jako antionkogeny, jejichž úlohou je regulace buněčné proliferace. Produkty těchto genů jsou nezbytné pro přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu. K jejich inaktivaci je nutná mutace obou alel, proto se označují jako tzv. recesivní onkogeny. Mezi nejznámější představitele těchto genů patří gen p53 a Retinoblastomový gen (Rb gen).
- **Geny regulující apoptózu** - Za fyziologických podmínek jsou nadbytečné, poškozené nebo přestárlé buňky autonomně ničeny programovanou buněčnou smrtí tzv. apoptózou. Při jejich mutaci pak dochází k hromadění poškozených buněk.

Dále sem také můžeme zahrnout i geny uplatňující se při opravě poškozené DNA:

- **Reparační geny**- Jejich cílem je zamezit hromadění mutací, vzniklých působením vnějším i vnitřním faktorů. Při alteraci těchto genů tudíž dochází k vyššímu počtu výskytů mutací [8].

### 3.3. Etiologie karcinogeneze

#### 3.3.1. Faktory způsobující nádorová onemocnění

V lidském těle neustále dochází ke vzniku nejrůznějších chyb a mutací v DNA, při kterých vznikají abnormální buňky s poškozenou genetickou informací. Zdravý imunitní systém je obvykle dokáže opravit nebo včas zničit. Pokud však nějakým zapříčiněním dojde k jeho selhání, nahromadí se veškeré předpoklady pro vznik rakoviny. Existuje několik faktorů, které ji mohou přímo vyvolat nebo k jejímu rozvoji svým působením napomocet. Na rozvoji rakoviny se podílí jak vnitřní tak vnější faktory, jejichž přehled je uveden níže [8]:

#### A. Faktory vnějšího prostředí

Obecně je těmto faktorům přisuzována příčina vzniku 75 – 95 % všech nádorů. [1]

1. **Fyzikální** – nejrůznější typy záření a radiace např. neionizující (ultrafialové záření) a ionizující záření ( $\gamma$  záření), které vykazují iniciační i promoční účinek.
  - UV záření můžeme podle jeho biologických účinků rozdělit následovně:



- UVC (100 – 280 nm) - toto krátkovlnné záření je ozónovou vrstvou zachycováno a na zemský povrch prakticky nedopadá, čímž nepůsobí škodlivě. Výjimkou je jeho vyzařování z umělých zdrojů např. germicidních lamp.
  - UVB (280 – 320 nm) – dosahuje středních vlnových délek. Je považováno za škodlivé záření, způsobující akutní a chronické poškození kůže. Ozonosférou bývá pohlceno 50 %, pokud ale pronikne, je absorbováno DNA, kterou tím poškozuje a může tvořit nádory kůže (karcinom, basaliom, melanom).
  - UVA (320 – 400 nm) – je dlouhovlnné záření, které představuje hlavní UV záření, které na zemský povrch dopadá. Má nepříznivé účinky, přestože nedochází přímo k jeho absorpci molekulami DNA, dochází k jejich poškození. Pohlcují ho totiž jiné molekuly, díky čemuž vznikají v těle volné radikály, způsobující stárnutí či tvorbu maligních útvarů na kůži nebo v oku.
- 3. Biologické** – patří sem onkoviry, napadající vnitřní genetický materiál buněk, čímž způsobují nádorová onemocnění [17, 19].
- viry – **DNA onkogenní** např. Human papilloma virus (HPV), který je prokázán u rakoviny děložního čípku i jiných částí genitálií. Dalším zástupcem je Virus hepatitidy B, jedná se o malý DNA virus způsobující hepatitidu typu B a karcinom jater či Virus Epstein-Barrové (EBV), patřící do čeledi herpes virů, je spojován s Burkittovým lymfomem objeveným u afrických obyvatel. Vedle tohoto onemocnění se podílí i na vzniku jiných typů nádorů a infekční mononukleóze.
    - **RNA onkogenní** např. Virus hepatitidy C (HCV), patřící do skupiny RNA virů Flaviviridae, který ovlivňuje vznik hepatocelulárního karcinomu.
  - bakterie – např. gramnegativní patogenní bakterie *Helicobacter pylori*, podílející se na vzniku adenokarcinomu žaludku či lymfomů mízní tkáně v žaludku
  - paraziti – např. *Schistosoma haematobium*, infekce jí vyvolaná podporuje vznik spinocelulárního karcinomu močového měchýře
  - plísně – jedním z nejvýznamnějších kontaminantů je aflatoxin (produkt plísně *Aspergillus flavus*), tvořící se ve špatně skladovaných potravinách. Přispívá k rozvoji nádorů jater. Vyskytuje se nejčastěji v Africe a některých oblastech Číny.
- 4. Chemické** – působení nejrůznějších chemických karcinogenů. Konkrétním příkladem může být azbest, složky tabákového kouře, aflatoxiny (kontaminující

potravin), arsen (kontaminant pitných vod). Lze je dělit, na základě jejich karcinogenních účinků nebo podle genotoxického působení.

- Přehled jejich dělení na základě jejich karcinogenních účinků na člověka podle Mezinárodní společnosti pro výzkum rakoviny (IARC) je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 Rozdělení karcinogenů do jednotlivých kategorií podle IARC [20].

Skupina	karcinogenní účinky	počet karcinogenů
I	látka je karcinogenní pro člověka	111
IIA	látka je pravděpodobně karcinogenní pro člověka	65
IIB	látka je možná karcinogenní pro člověka	274
III	látka není klasifikována jako možný karcinogen	504
IV	látka pravděpodobně není karcinogenní	1

- Další možnost je do dvou skupin podle jejich genotoxického působení [1]
  - genotoxické karcinogeny – tzv. iniciátory, které mohou být dvojího typu. Jedním typem jsou primární karcinogeny, ty poškozují DNA přímo, aniž by musely být předem aktivovány. Druhé jsou označovány jako sekundární karcinogeny neboli prokarcinogeny, stávající se karcinogenní až po jejich aktivaci biotransformací.
  - epigenetické karcinogeny – patří sem karcinogeny, jejichž mechanismus účinku nezahrnuje přímou interakci s genetickým materiálem. Opět mohou být děleny na dva typy. Na tzv. promotory, tedy sloučeniny zvyšující karcinogenní účinek nepřímo. Jejich působení je efektivní v případě, že jsou podány spolu s mutagenem, jehož účinek podporují. Mohou sem být zahrnuty například hormony, na kterých jsou některé nádory závislé (rakovina prsu hormonálně závislá na estrogeneru). A dále pak na kokarcinogeny, látky zesilující přímo působení karcinogenů např. usnadňují jejich pronikání či jejich transformační změny v buňkách.

## **B. Faktory vnitřní (genetické)**

Tyto faktory mají souvislost s genetickými predispozicemi k určitému typu nádorového onemocnění u jedinců, kteří zdělili po svém rodiči alteraci v genetickém

materiálu zárodečných buněk. Zděděná mutace genomu, týkající se obou alel somatických buněk, je u potomka přítomna ve všech buňkách. To umožňuje hromadění dalších somatických mutací v ostatních genech, což vede postupně k malignímu bujení. U hereditárních typů se často vyskytuje nádorové onemocnění v mladším věku oproti sporadickým [1].

- Spontánní tvorba - vyskytuje se méně často a může k ní dojít, vyskytne-li se při replikaci chyba v DNA v průběhu buněčného cyklu. Těchto chyb běžně připadá na jednu buňku  $10^{-5}$  až  $10^{-10}$  za generaci. V mnohých případech se nemusí vůbec funkčně projevit a jsou kontrolními mechanismy zničeny. Pokud ale dojde k jejich narušení, dojde k tzv. klonální expanzi, tedy množení klonu buněk s maligním potenciálem [8].

#### 4. CHEMICKÉ KARCINOGENY

Již v roce 1761 se objevují první zmínky o výskytu nádorového onemocnění po kontaktu s některými chemickými látkami. Konkrétní studie se týkala nádorů nosohltanu v souvislosti se šňupáním tabáku, kterou zpracoval John Hill [21]. V roce 1795 Samuel T. Soemmerring zaznamenal spojitost mezi kouřením a rakovinou spodního rtu [22]. Popisované případy byly dávány do souvislosti s přítomností polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) v kontaktních směsích. Tento předpoklad byl na počátku 20. století potvrzen a PAU, jedny z předních karcinogenů, byly identifikovány jako prokazatelně karcinogenní složka dehtu [23].

Mezi chemické karcinogeny můžeme zahrnout látky jak s mutagenními, tak i karcinogenními účinky. Zhruba 80 – 90 % karcinogenů jsou prokázanými mutageny [24]. Základem vzniku karcinogeneze jsou právě mutace v řetězci DNA. Ne však každá mutagenní látka musí být nutně karcinogenem. V řetězcích DNA dochází ke vzniku mutací i bez vlivu karcinogenů. Je-li jejich působení nepatrné, mohou být vzniklé mutace opravným mechanismem odstraněny. Naopak látky nevykazující mutagenní účinek, ale nepříznivě působící na tyto opravné mechanismy, mohou vznik nádoru vyvolat. Velký vliv má i struktura a reaktivita dané látky. Například alkylační činidla mohou reagovat s DNA přímo (methyljodid, oxiran aj.), nebo až po jejich aktivaci na reaktivnější metabolity (některé PAU, vinylchlorid, aromatické aminy aj.) a narušovat řetězec svojí strukturou

(polychlorované dibenzo-p-dioxiny). Tyto účinky má i elektromagnetické záření o vysoké frekvenci ( $\gamma$ -záření, rentgenové či UV záření) [24].

Člověk bývá účinkům karcinogenů vystaven často dlouhodobě, s dobou latence i několik desítek let, po nichž může dojít k rozvoji karcinogeneze. Přibližně 90% všech nádorů bývá zapříčiněno právě chemickými karcinogeny, zvláště pak alkylačními činidly. Díky složitosti celého nádorového procesu, který je ovlivňován jak vnitřními tak vnějšími faktory, je obtížné přisoudit jednotlivým karcinogenům podíl na vzniku rakoviny [24, 25].

Přehled jednotlivých karcinogenů dle jejich vlivu na lidské zdraví je uveden níže [26].

- **Karcinogen kategorie 1** – prokázaný lidský karcinogen, např. benzo[a]pyren (BaP), azbest a dehet.
- **Karcinogen kategorie 2A** – u těchto látek není karcinogenní účinek na člověka zcela prokázán, ale díky dlouhodobým studiím na zvířatech se předpokládá, např. akrylamid, 2-nitrotoluen a dimethylsulfát.
- **Karcinogen kategorie 2B** – mají možná karcinogenní účinky na člověka, např. akrylonitril, olovo a benz[a]anthracen.
- **Karcinogen kategorie 3** – u těchto látek jsou jejich karcinogenní účinky na lidi nedostačující, např. akrolein, anthracen a ethylen.
- **Karcinogen kategorie 4** – považovány, že pravděpodobně pro člověka karcinogenní nejsou, např. kaprolaktam.

## 4.1. Polycyklické aromatické uhlovodíky

### 4.1.1. Charakteristika a jejich výskyt

PAU tvoří početnou skupinu organických sloučenin, v jejichž struktuře se vyskytují dvě či více různě uspořádaných kondenzovaných benzenových jader s konjugovaným systémem dvojných vazeb, které neobsahují žádné heteroatomy ani substituenty. V čisté formě to jsou bezbarvé, bílé či mírně nažloutlé krystalické látky. Jejich fyzikálně-chemické vlastnosti (tlak par, rozpustnost aj.) se liší v závislosti na jejich molekulové hmotnosti. S jejím vzrůstem roste bod tání, varu, lipofilní charakter apod. Díky své lipofilní povaze se dobře rozpouští v tucích a olejích, na rozdíl od vody, ve které jsou ve většině případů téměř nerozpustné [27, 28].

Zároveň se řadí mezi typické představitele perzistentních organických polutantů (POPs). Tyto látky se do okolního prostředí dostávají především antropogenní činností. Bývají jedněmi z produktů nedokonalého spalování jakékoli organické látky, např. při hoření dřeva, uhlí, ropy. Jsou také součástí automobilových a průmyslových emisí, nacházejí se v tabákovém kouři, sazích, pesticidech, tvoří se při výrobě řady látek (hliníku, koks), vyskytují se i přirozeně např. v sopečném prachu apod. Vznikají při tepelné úpravě potravin (nad 200 °C), jejich vysoké koncentrace byly naměřeny např. při grilování, pečení a uzení masa. Vyskytují se tedy ve všech složkách životního prostředí [29, 30].

- **Ovzduší** - často bývá prvotní cestou vstupu těchto látek do životního prostředí. Do ovzduší se uvolňují, mimo jiné, např. během spalování. Dochází při něm ke kondenzaci PAU na povrch vznikajících sazí a prachových částic. Takto vázané mohou dlouhodobě setrvávat v ovzduší a být unášeny vzduchem od původního zdroje na dlouhé vzdálenosti. Jejich doba života je závislá na tepelných a reakčních podmínkách daného místa. Slunečním zářením dochází k jejich fotochemické oxidaci a rozkladu na jednotlivé atomy nebo radikály [31, 32]. Na zemský povrch se potom dostávají usazováním prachových částic tzv. suchou depozicí, nebo společně se srážkami tzv. mokrou depozicí.
- **Voda** - dostávají se do ní z odpadních vod průmyslových podniků a čistíren, z polí na nichž jsou používány chemické prostředky, ze vzduchu nebo z nesprávně založených skládek. Díky jejich vysoké adsorpci na pevné částice mohou ve vodách sedimentovat, a tak kontaminovat povrchové i spodní vody. Jejich největším rezervoárem jsou moře a oceány, odkud se mohou po určité době opět uvolňovat i do ovzduší.
- **Půda** - do půdy se tyto substance dostávají suchou či mokrou depozicí ze vzduchu, skládek, z chemikálií používaných v zemědělství (pesticidy) i průmyslu aj. Do podzemních vod jich touto cestou proniká nepatrné množství. Většina jich je navázána na půdní organickou hmotu. Takto v ní mohou setrvávat i několik let. Odtud pak může docházet k jejich vypařování, k rozkladu slunečním zářením nebo degradaci mikroorganismy [24].

Jejich typickými vlastnostmi jsou:

- toxicita – představují vážné zdravotní riziko, díky svým toxickým, karcinogenním a mutagenním vlastnostem [30]
- bioakumulace – ukládají se v živých organismech, kde mohou různou mírou působit škodlivě
- perzistence – tedy schopnost beze změny dlouhodobě setrvávat v životním prostředí, díky čemuž může docházet k jejich hromadění v půdě či pro jejich schopnost vazby na pevné částice i ve vodních sedimentech
- transport vzduchem.

#### **4.1.2. Účinky polycyklických aromatických uhlovodíků na zdraví**

Do živých organismů se mohou dostávat třemi způsoby – dýcháním, potravou (pitím, jídlem) nebo kožním kontaktem [33]. Působí zpravidla dlouhodobě na organismus, proto se v jejich případě nesetkáváme s akutními otravami [34]. Projevy účinku každého PAU se u různých jedinců vystavených stejným dávkám mohou lišit. To je ovlivněno zdravotním stavem jedince, jeho stářím, pohlavím, genetickými predispozicemi, životním stylem a prostředím, ve kterém se vyskytuje. V úvahu je třeba také brát toxicitu příslušné chemické látky. Míra škodlivosti jakékoli látky je dána jejími biologickými účinky, způsobem vstupu do organismu (inhalačně, perorálně, transdermálně aj.), jejím množstvím a délkou expozice [35].

Po jejich vstupu do organismu, bývají v řadě orgánů (játra, ledviny, plíce) metabolizovány a aktivovány na daleko reaktivnější substance než původní PAU, mající tzv. prokancerogenní účinek [36, 37]. Bývají pak vylučovány do žluči, moči, mateřského mléka, a v menší míře se také ukládají do tukové tkáně. Díky jejich lipofilnímu charakteru snadno pronikají buněčnými membránami a může dojít k jejich kumulaci v organismu [33]. Jejich hlavní vylučovací cesta z organismu je prostřednictvím stolice a moči, nezávisle na způsobu podání [38].

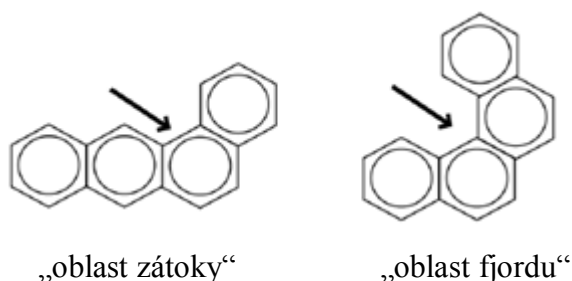
#### 4.1.3. Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků

PAU v organismu, ať už živočišném nebo rostlinném, podléhají procesům metabolismu. Biotransformačními pochody dochází k jejich postupné detoxikaci, avšak v některých případech mohou být aktivovány na daleko reaktivnější substance, které mohou reagovat s DNA a tak ji poškozovat [39].

Během I. fáze biotransformace podléhají PAU oxidačním reakcím, katalyzovaných mikrosomálním systémem monoxygenáz se smíšenou funkcí, nacházejících se v endoplasmatickém retikulu (cytochromy P450 (CYP), peroxidázy atd.) nebo některými reduktázami (NAD(P)H:chinon-oxidoreduktáza). Během těchto reakcí dochází k vnášení polárních skupin (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub>) do molekul PAU za vzniku hydroxylovaných a epoxidovaných derivátů, díky čemuž se z původních lipofilních molekul, stávají molekuly hydrofilní [40, 41, 42].

II. Fáze biotransformace zahrnuje konjugační reakce metabolitů vzniklých v I. fázi s endogenními sloučeninami jako je glutathion, sulfáty atd. [43]. Specifickými enzymy podílejícími se na těchto reakcích jsou UDP-glukuronosyltransferázy (UGT), glutathion-S-transferázy (GST) a sulfotransferázy (SULT). Takto vytvořené konjugáty, značně polární, bývají lépe rozpustné ve vodě, čímž je usnadněna jejich exkrece z organismu [41].

Struktury některých PAU tvoří planární tzv. „oblast zátoky“ (bay region) a rovinou „oblast fjordu“ (fjord region) (obrázek č. 2). PAU obsahující „oblast fjordu“ se vyznačují vyšší reaktivností, v porovnání s těmi, které tvoří „oblast zátoky“. Prostřednictvím těchto oblastí se PAU kovalentně váží na nukleofilní části DNA („oblast fjordu“ se přednostně váže na adenin, „oblast zátoky“ na guanin). Takto vzniklé kovalentní adukty jsou zodpovědné za mutagenní a karcinogenní aktivitu molekuly [44, 45].



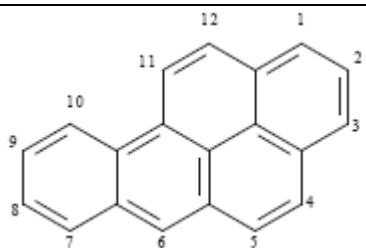
Obrázek č. 2 Struktury znázorňující „oblast zátoky“ a „oblast fjordu“ na molekulách polycyklických aromatických uhlovodíků [46].

Jsou-li kontrolní mechanismy organismu poškozeny, dochází k nahromadění těchto mutací, které mohou vyvolat karcinogenezi.

## 5. BENZO[a]PYREN

BaP je organickou sloučeninou patřící do skupiny PAU. Spolu s méně známým benzo[e]pyrenem tvoří jednu z izomerních forem benzopyrenu. Přehled některých jeho základních vlastností je uveden v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 Přehled některých základních vlastností benzo[a]pyrenu [47, 48].

Sumární vzorec	$C_{20}H_{12}$
Strukturní vzorec	
Vzhled za běžných podmínek	žlutá krystalická pevná látka
Relativní molekulová hmotnost	252,31
Bod varu (při 10 mm Hg)	310 – 312 °C
Bod tání	179 – 179,3 °C
Rozpustnost ve vodě při 25 °C	0,00162 mg / l

BaP spolu s dalšími PAU jsou široce rozšířenými kontaminanty životního prostředí. Díky lidské činnosti se BaP vyskytuje ve všech sférách přírody. Člověk mu bývá nejvíce vystaven především prostřednictvím inhalací tabákových zplodin, znečištěného ovzduší, či příjmem kontaminovaných potravin a vody, přičemž se jejich přísun liší u každého jedince.

Moderní výzkum chemické karcinogeneze započal v roce 1930, kdy se podařilo izolovat BaP z uhlého dehtu. U něho a několika dalších syntetických PAU pak byly pokusy na laboratorních zvířatech prokázány jejich karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky [49, 50]. Od roku 2012 se BaP řadí podle společnosti IARC mezi karcinogeny I. třídy [20]. Pozorované karcinogenní účinky BaP u lidí byly odvozeny z epidemiologických studií, dokazujících vztah mezi expozicí různým směsím obsahujících



BaP (např. cigaretový kouř, emise při výrobě koksu apod.) a zvýšeným rizikem rozvoje rakoviny plic a dalších typů rakoviny (kůže, jícnu, močového měchýře, hltanu, ústní dutiny aj.). Přesto, díky přítomnosti dalších potenciálně karcinogenních PAU, nelze vyhodnotit, jak velký přínos karcinogenních účinků má právě BaP [49, 51, 52].

Jeden z nejvýznamnějších karcinogenních metabolitů BaP je BaP-7,8-diol-9,10-epoxid, který způsobuje mutace nejrůznějších genů včetně těch, které se podílejí na regulaci základních pochodů v buňce. Pokud dojde při dlouhodobější expozici PAU k selhání opravných mechanismů organismu, nashromáždí se veškeré předpoklady pro rozvoj karcinogeneze. Většina buněk obsahuje mutace důležitého genu p53. Tyto mutace byly prokázány v plicích především kuřáků nebo lidí vystavených kouřovým emisím [49, 53]. Produkt tohoto genu, protein p53, působí jako transkripční faktor, který je odpovědný za regulaci buněčné proliferace, diferenciace, apoptózy a opravných mechanismů DNA, a proto mutace tohoto genu se značně podílejí na rozvoji rakoviny. Další z genů, k jejichž poškození dochází, jsou Ras geny (H-Ras, K-Ras, N-Ras), patřící do skupiny protoonkogenů. V lidských nádorech bylo zjištěno, že bodová mutace v H-Ras genech, vede k produkci proteinů s pozměněnou aminokyselinou v jednom ze tří kodonů 12, 13 a 61 [54, 55, 56].

### **5.1. Metabolismus benzo[a]pyrenu**

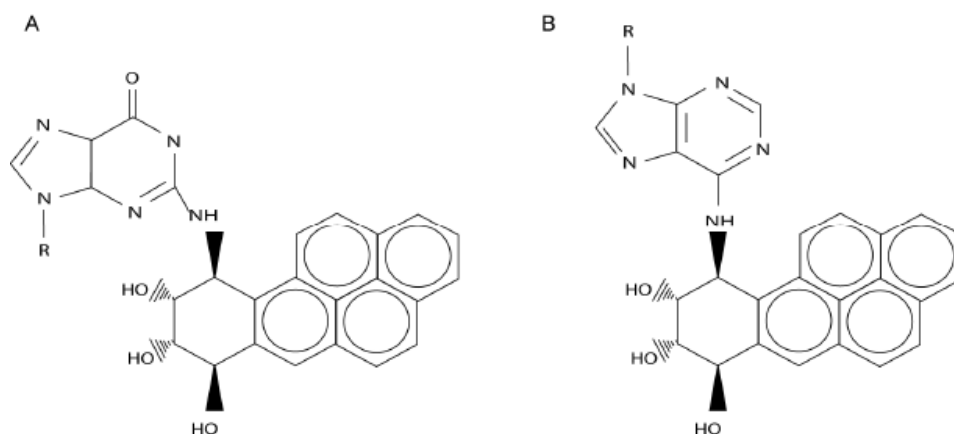
BaP je prokázaným prokarcinogenem s genotoxickými účinky (tvoří kovalentní adukty s DNA). Ke svému biologickému působení vyžaduje metabolickou aktivaci. V organismu podléhá přeměnám I. a II. fáze biotransformace, během kterých často vznikají velmi reaktivní metabolity [43, 57]. Mezi nejdůležitější patří dihydrodioly (nebo zkráceně dioly), arenoxidy, fenoly, chinony a jejich polární konjugované sloučeniny s glutathionem, sulfáty a glukuronidy [43]. Obecné schéma jeho metabolismu je na obrázku č. 3.



buněčných oxidantů a antioxidantů. Rovnováha mezi tvorbou ROS a jejich odstraňováním je jedním ze základních poruch, vedoucí k tzv. oxidačnímu stresu. Přebytek volných radikálů kyslíku způsobuje poškození DNA [59, 60]. Také polymorfismy vzniklé v CYP a v enzymech II. fáze biotransformace jsou spojeny se zvýšenou náchylností k rozvoji rakoviny [57, 61]. Existují tři hlavní metabolické cesty BaP, při kterých vznikají:

- **radikální kationty**

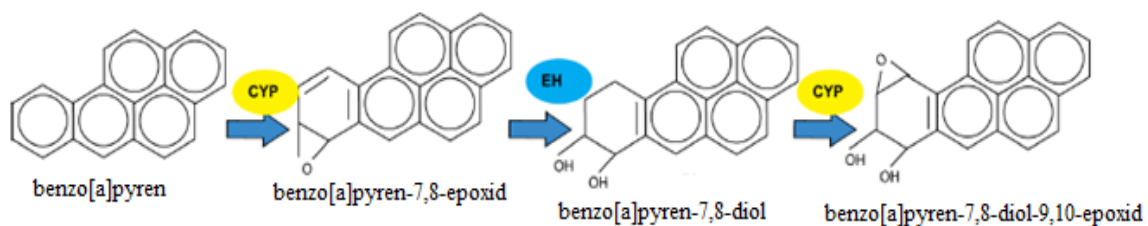
Tento typ metabolické cesty byl pozorován při tvorbě nádorů kůže u myši, jimž byl BaP lokálně aplikován na kůži [62]. Mechanismem jednoelektronové oxidace katalyzované systémem CYP a peroxidáz, vznikají radikální kationty BaP, lokalizované na šestém uhlíku. Ty způsobují zvýšenou tvorbu kovalentně vázaných aduktů s buněčnými nukleofily (guanin, adenin) (obrázek č. 4) [60, 62]. Tyto radikální kationty jsou prekurzory pro 6-hydroxy-BaP, jehož autooxidací mohou vznikat chinony [54, 63].



Obrázek č. 4 Strukturální vzorec kovalentních aduktů benzo[a]pyren-diolepoxidů (A) s guaninem, (B) s adeninem [46].

- **dihydrodioly a dihydrodiolepidy**

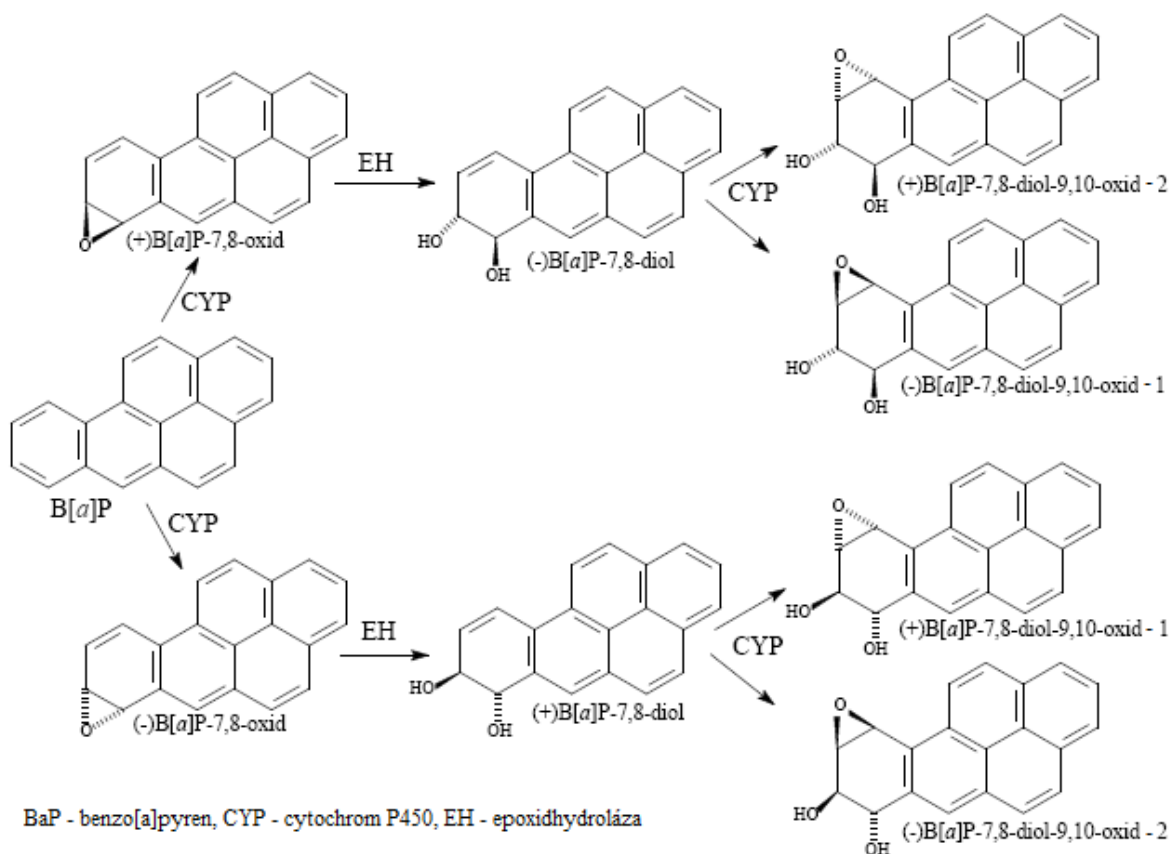
Působením CYP (CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1) se tvoří dihydrodioly a dihydrodiolepidy, které jsou jedněmi z konečných karcinogenních a mutagenních metabolitů BaP, viz obrázek jejich syntézy č. 5 [57, 58].



Obrázek č. 5 Mechanismus aktivace benzo[a]pyrenu působením cytochromů P450 (CYP1A1, CYP1B1) a epoxidhydrolázy [46].

Počáteční oxidace BaP je katalyzována pomocí CYP, z nichž nejdůležitější enzymy v tomto procesu jsou CYP1A1 a CYP1B1 (obrázek č. 5) [64]. Vzniklý epoxid je za účasti mikrosomální epoxidhydrolázy převeden na jeden z nejvýznamnějších metabolitů BaP je BaP-7,8-diol, který je následně opět aktivován CYP1A1 a CYP1B1 na konečný reaktivní metabolit, BaP-7,8-diol-9,10-epoxid. Tento metabolit je schopen vytvářet kovalentní adukty s DNA.

Na jejich mechanismu účinku se výrazně podílí jejich stechiometrie. Díky přítomnosti chirálních uhlíků v „oblasti zátoky“, existuje vždy několik stechiometrických forem (enantiomerů, diastereoizomerů) příslušné sloučeniny, jak ukazuje obrázek č. 6 [65]. Mohou vznikat celkem čtyři opticky aktivní izomery každého diolepoxydu (+) / (-)-anti- a (+) / (-)-syn-BaP-7,8-diol-9,10-epoxid. Diolepoxydy lze otevřením epoxidového kruhu převést na elektrofilní částice (alkylační látky), které se kovalentně vážou na nukleofilní části molekul. Reagují zejména s purinovými bázemi (deoxyguanosinem a deoxyadenosinem) přičemž každý produkt může být v konformaci cis nebo trans. Vzniká tedy celkem 16 BaP-7,8-diol-9,10-epoxid DNA aduktů [60]. Zejména trans-izomer byl nalezen ve většině zkoumaných nádorů, kovalentně vázaný na buněčné makromolekuly, především DNA [58]. Nejčastěji se vyskytujícím DNA aduktem je 10-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP [66].



Obrázek č. 10 Metabolická aktivace benzo[a]pyrenu za vzniku izomerních forem benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxidů [48].

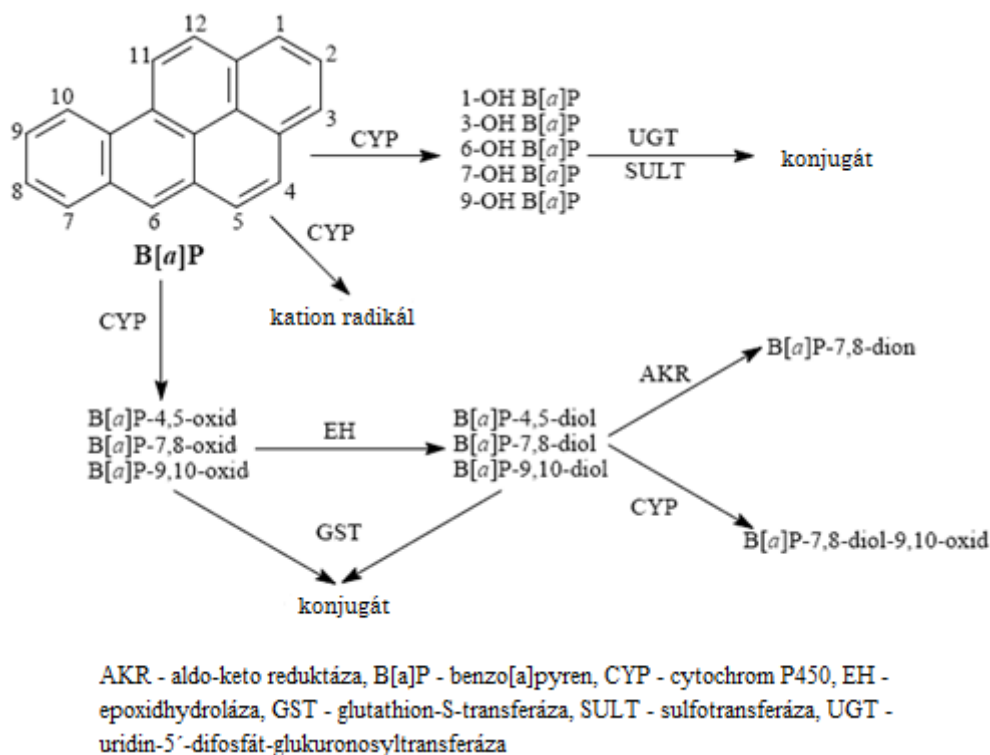
- **chinony a hydrochinony**

Z trans-diolů (rovněž i z 6-hydroxy-BaP) účinkem aldo-keto reduktáz vznikají BaP-o-chinony (konkrétně BaP-7,8-dihydrodiol je oxidován na BaP-7,8-chinon) [67]. Tyto metabolity mohou být opakovaně re-oxidovány za vzniku ROS, které poškozují DNA [68, 69]. Volné radikály se pak podílejí na tvorbě řetězcových zlomů a vysoce mutagenního 7-hydro-8-oxo-20-deoxyguanosinu (8-oxo-deoxyguanosinu), který byl nalezen v lidských nádorových buňkách karcinomu plic [67, 70, 71].

- **II. fáze biotransformace**

V metabolismu II. fáze biotransformace dochází ke konjugaci metabolitů (monohydroxylovaných) z I. fáze s endogenními sloučeninami (např. glutathionem, kyselinou glukuronovou, sulfátem aj.), za účasti specifických enzymů, jako sulfotransferázami (SULT), UDP-glukuronosyltransferázami (UGT) nebo glutathion-S-transferázami (GST), jejichž působením dochází ve většině případů

k detoxikaci. Jedním z nejdůležitějších enzymů je GST, který katalyzuje navázání reaktivní formy BaP, zejména epoxidů, na glutathion. Vzniklý konjugát je poté v ledvinách a játrech přeměněn na finální produkt, který může být močí vyloučen [72]. Na obrázku č. 7 je zobrazen souhrn vznikajících metabolitů BaP.



Obrázek č. 7 Souhrnné schéma metabolismu benzo[a]pyrenu [48].

### Cytochromy P450 a jeho role v biotransformačních pochodech benzo[a]pyrenu

CYP jsou hemové enzymy a spolu se svou reduktázou (např. NAD(P)H:CYP reduktáza) patří do rodiny monooxygenáz se smíšenou funkcí, nacházejících se u eukaryotních organismů v membráně endoplasmatického retikula či v mitochondriích, na rozdíl od bakteriálních CYP, které jsou rozpustné [73, 74]. Ve své molekule obsahují porfyrinový skelet (protoporfyrin IX), který je k proteinové části vázán hydrofóbními silami a prostřednictvím SH skupin cysteinu [75, 76]. Tyto enzymy potřebují pro svou funkci přítomnost molekuly kyslíku a kofaktor, kterým nejčastěji bývá přechodný kov např. železo [73, 74]. Podílejí se na reakcích, při kterých je jeden atom kyslíku vnášen do molekuly hydrofóbního substrátu, za současné redukce druhého atomu na vodu [77].

Přítomné NAD(P)H:CYP reduktázy pak fungují jako donory elektronů CYP, při jeho tzv. první a druhé redukci. CYP se podílejí na oxidaci celé řady karcinogenů, za vzniku reaktivních elektrofilních meziproductů [78]. Jedněmi z nejvýznamnějších zástupců těchto enzymů jsou CYP1A1 a CYP1B1. Katalyzují oxidaci celé řady sloučenin, např. PAU (především pak BaP) a jiných karcinogenů, cizorodých látek jako teofylinu, kofeinu, endogenních steroidů 17 $\beta$ -estradiolů, estronů atd. [79, 80, 81]. Ukázalo se, že CYP1A1 se podílí také na detoxikaci a ochraně před orální toxicitou BaP [82].

PAU se prostřednictvím nejrůznějších mechanismů závislých na receptorech podílejí na transkripční aktivaci genů CYP. Celý proces je regulován receptorem pro aromatické uhlovodíky (AhR). Jde o transkripční faktor podílející se na indukci jednotlivých CYP, především CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1, a také některých enzymů II. fáze biotransformace. AhR je přítomen v cytoplasmě, kde vytváří komplex spolu s dalšími proteiny, jako je „heat shock“ protein 90 (Hsp90), p23 a AhR interagující protein. Po navázání PAU či jiné cizorodé látky, se z komplexu Hsp90 uvolní a zbytek komplexu AhR-PAU je transportován do jádra. Zde vytváří heterodimer s Ah receptor nuclear translocator. Takto obsazený heterodimer se potom váže na CYP geny a způsobuje tak zvýšení genové transkripce [48].

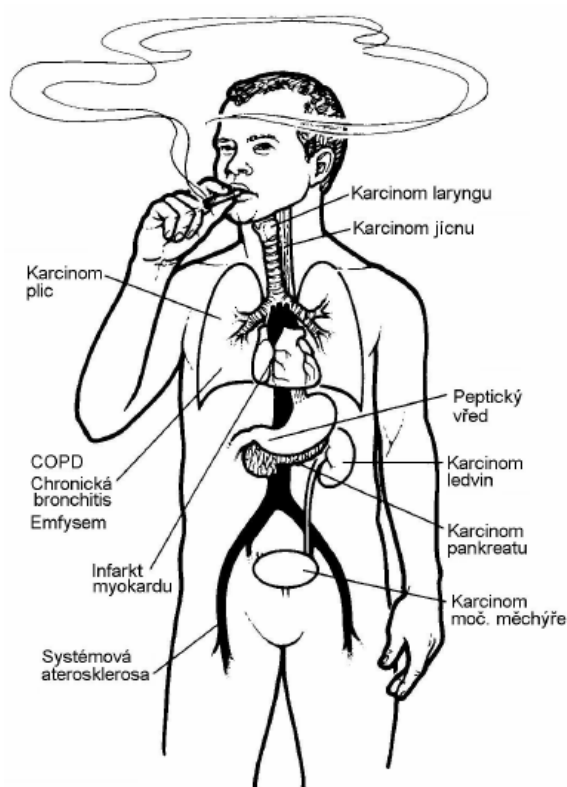
CYP1A1 se podílí na vzniku celé řady druhů nádorových onemocnění [83]. Polymorfismy v něm vzniklé výrazně přispívají k rozvoji rakoviny a to zejména plic u kuřáků [61]. Míra vzniklých BaP-DNA aduktů v buňkách souvisí s rychlostí biotransformace a následných opravných mechanismů DNA.

## **5.2. Benzo[a]pyren a jeho vliv na lidské zdraví při inhalaci zplodin tabákového kouře**

### **5.2.1. Zdroje tabákového kouře – cigarety, tabáky, vodní dýmky**

Jednou z možností, kde můžeme přijít do kontaktu s karcinogenními PAU, a zejména pak BaP, je mimo jiné tabákový kouř. Kouření je velmi starou zvyklostí, jejíž vznik je přisuzován americkým indiánům, kteří kouřili tabák během obřadů. Do Evropy se tabák dostal v době zámořských objevů (v dubnu roku 1493), kdy se začal zprvu pěstovat a používat ve Španělsku. Návykové vlastnosti tabákového kouře jsou připisovány nikotinu, hlavnímu alkaloidu tabákového kouře, který dostal své jméno po francouzském

vyslanci v Portugalsku Jeanu Nicotinovi (1530 – 1600) [84]. Vznik cigaret bývá přisuzován egyptským vojákům v době egyptsko-turecké války. K jejich velkému rozšíření došlo zejména během první světové války. Již v 17. století bylo kouření označováno za škodlivé. Během století 19. byly tyto účinky potvrzeny mnohými vědeckými pracemi. Celá řada historických faktů je sepsána v publikaci „Tobacco Risk Awareness Timeline“ [85]. V dnešní době je kouření přisuzována jedna z hlavních příčin vzniku maligních nádorů, především plic [86]. Zároveň se také podílí na rozvoji kardiovaskulárních chorob, zvyšuje se výskyt některých dalších druhů rakoviny (dutiny ústní a nosní, nosohltanu, hltanu, hrtanu, jícnu, žaludku, jater, močového měchýře, ledvin, pankreatu nebo děložního čípku) a mnoho jiných zdravotních problémů [1].



Obrázek č. 12 Schéma částí lidského těla, která jsou postižena vlivem kouření [87].

## Cigarety

Cigarety jsou surovinou, která je v dnešní společnosti zcela běžným konzumním zbožím, tím spíše ve vyspělých zemích. Jsou hlavním produktem ve spotřebě tabáku. Nachází se v nich celá škála látek, od těch, co dráždí oči a dýchací systém, přes látky toxické a mutagenní, až po karcinogenní. Uvádí se, že se obecně v tabákovém kouři



vyskytuje okolo 5300 chemických substancí, pocházejících z různých zdrojů a vyskytujících se v pevné, plynné či kapalně fázi [88]. V tabulce č. 4 je uveden přehled některých sloučenin a prvků, nacházejících se v inhalovaném cigaretovém kouři. Ze všech 5300 substancí, jich bylo více než 70 označeno, že mají karcinogenní účinky [89]. Přehled několika chemických tříd karcinogenů (např. PAU, N-nitrosaminy, aromatické aminy, aldehydy, fenoly aj.) a jejich vybraných zástupců, nacházejících se v cigaretách, je zobrazen v tabulce č. 5. Šestnáct z nich je přitom společností IARC klasifikováno jako karcinogeny I A třídy, jsou to - BaP, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon a N'-nitrosonornikotin, 2-naftylamin, 4-aminobifenyl, formaldehyd, 1,3-butadien, benzen, vinylchlorid, ethylenoxid, arsen, beryllium, sloučeniny niklu, chromu v oxidačním čísle VI, kadmium, a polonium-210 [88, 90]. Cigaretový kouř je považován za tzv. komplexní karcinogen (jedná se o směs více karcinogenních látek, jejichž účinek je různý) [91].

Kapalná fáze, jejíž hlavní složkou je vysoce viskozitní černohnědá kapalina – dehet (složka neobsahující nikotin ani vodu), tvoří asi 1 % objemu vdechovaného kouře. V dehtu je obsažena celá řada sloučenin, z nichž převážná část je karcinogenních. Mezi ně patří PAU, kterých v něm bylo identifikováno více než 500, včetně vysoce karcinogenního BaP, aromatické aminy způsobující rakovinu močového měchýře a anorganické sloučeniny jako jsou těžké kovy (např. kadmium, železo) podílející se na rakovině plic a kůže [90, 92]. Plynná fáze tvoří přibližně 91 % a rovněž obsahuje řadu karcinogenních látek např. nitrosaminy a formaldehyd. Další toxické látky obsažené v této fázi jsou kyanovodík, acetaldehyd nebo oxid uhelnatý aj. Pevnou fázi tvoří především saze, na které se vážou PAU (BaP, 5-methylchrysen, naftalen aj.). Představuje asi 8 % objemu celkového kouře [91].

Řada látek je do nich přidávána jako přísada pro zlepšení jejich vlastností, ať už sensorických nebo pro lepší účinek. Škodlivých substancí pak vzniká ještě více při samotném hoření cigarety. Vlivem vysoké teploty, která dosahuje na konci cigarety okolo 910 °C, se přeměňují pyrolýzou z látek v cigaretách přítomných [93]. Koncentrace jednotlivých PAU v proudu cigaretového kouře jsou obecně v rozsahu 3 - 50 ng na cigaretu, obsah BaP je 1,5 – 15 ng [94]. Chemické složky kouře, které vznikají hořením cigarety a jsou hlavní složkou pasivního kouření, se liší od těch, které jsou vdechovány. Při pasivním kouření byla zaznamenána koncentrace BaP v rozmezí 52 – 95 ng na jednu cigaretu, což představuje mnohem vyšší koncentraci než v přímo vdechovaném kouři [49].

Tabulka č. 4 Orientační složení proudu kouře z obyčejné cigarety [93].

Sloučeniny nebo třída prvků	Relativní množství w/w (%)
Dusík	58,0
Kyslík	12,0
Oxid uhličitý	13,0
Oxid uhelnatý	3,5
Vodík, argon	0,5
Voda	1,0
Těkavé organické látky	5,0
Pevné částice	8,0

Tabulka č. 5 Přehled chemických tříd karcinogenů s několika uvedenými zástupci [90].

Chemická třída	Počet karcinogenů	Zástupce karcinogenů
Polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich heterocyklická analoga	15	Benzo[a]pyren Dibenz[a,h]anthracen
N-nitrosaminy	8	4-(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon N'-nitrosoornikotin
Aromatické aminy	12	4-aminobifenyl 2-naftylamin
Aldehydy	2	Formaldehyd Acetaldehyd
Fenoly	2	Katechol Kyselina kávová
Těkavé uhlovodíky	3	Benzen 1,3-butadien
Ostatní organické sloučeniny	12	Ethylenoxid Akrylonitril
Anorganické sloučeniny	8	Kadmium Polonium-210

## **Doutníky a vodní dýmky**

Jsou dalším zdrojem tabákového kouře, starým přes 400 let [95]. Jejich užívání je rozšířené zejména ve východním Středomoří, v některých částech Asie včetně Indie a v severní Africe [96]. Kouření vodních dýmek je mezi širokou veřejností spíše trendem poslední doby, zvláště ve vyspělých zemích. Proto složení a účinky kouře nejsou prozkoumány tak jako je tomu v případě kouře cigaretového. Z klinických studií vyplývá, že kouření vodních dýmek má podobné negativné dopady na zdraví jako kouření cigaret [95, 97, 98]. Tyto nežádoucí vlastnosti jsou pak ovlivňovány:

- použitím jiného tabáku – obsah nikotinu v tabáku vodní dýmky je  $2 \pm 4$  %, pro cigarety pak  $1 \pm 3$  % [99]
- částečnou filtrací látek přes vodu – přesto, že se v ní rozpouští některé rozpustné sloučeniny (plyny a částice, jako např. nikotin a dehet), odfiltruje se pouze malý podíl škodlivin
- způsobem kouření - větší objem vdechovaného kouře v případě dýmek, obvykle i vyšší frekvence a hloubka vdechování (díky méně dráždivému hydratovanému kouři), delší doba kouření
- větší koncentrace oxidu uhelnatého, díky spalujícímu se uhlíku [95].

### **5.3. Limity pro výskyt benzo[a]pyrenu**

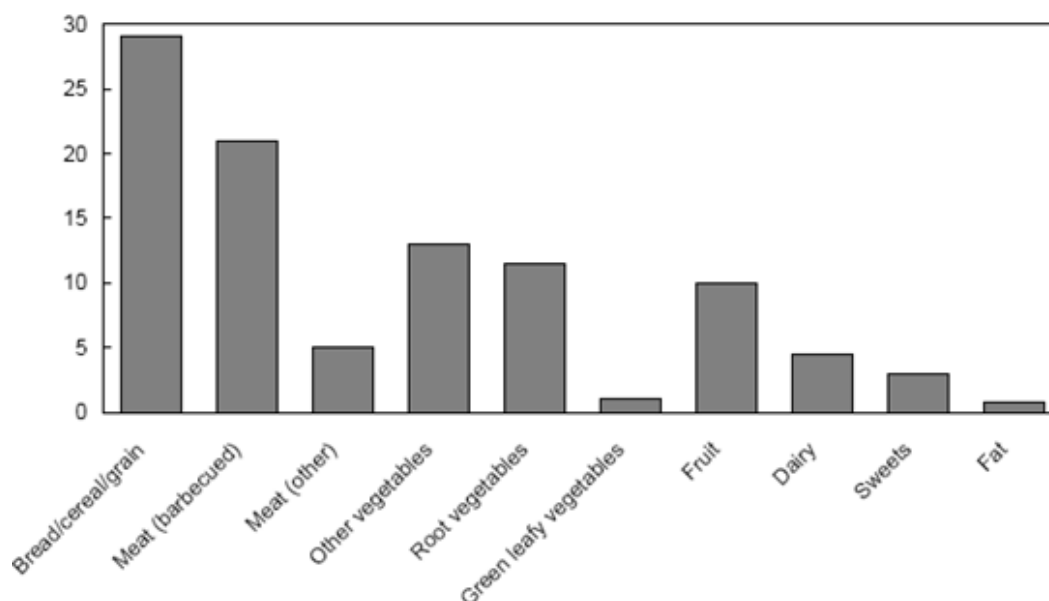
#### **Potraviny**

BaP se vyskytuje jednak v potravinách, které jsou tepelně upravované (smažené, grilované na otevřeném ohni), přičemž množství vzniklých PAU je závislé na metodě, teplotě a době úpravy [100]. Dále také v potravinách, jako je zelenina, ovoce, rostlinné oleje, mléčné výrobky a mořské plody. K jejich kontaminaci může dojít příjmem z půdy, vody a jejich sedimentů nebo z atmosféry [101]. Kromě rostlinné stravy, je kontaminována i potrava živočišná, díky znečištění krmiv. Příklady hodnot denního příjmu PAU v některých zemích jsou shrnuty v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6 Přehled denního příjmu polycyklických aromatických uhlovodíků v některých státech světa [102].

Země	Příjem ( $\mu\text{g}$ / osoba / den)
USA	0,04 – 0,06
Velká Británie	3,7
Německo	0,02 – 0,04
Rakousko	3,4
Itálie	3,0
Španělsko	6,3 – 8,4
Řecko	1,6 – 4,5
Nizozemí	5,0 – 17
Švédsko	0,08

Společnost FAO/WHO pro potravinářské přísady (JECFA) v nedávné době navrhla jako průměrný příjem BaP **4 ng / kg za den a 10 ng / kg za den** pro PAU jako takové. Tento příjem se ale u každého člověka liší v závislosti na stravě, kterou konzumuje, prostředí, v němž se vyskytuje, a je-li kuřák či nikoli [102]. V případě nekuřáků je potrava jednou z hlavních cest jejich vstupu do organismu a pohybuje se okolo 70 % [103]. Na obrázku č. 16 je graficky znázorněn průměrný denní příjem BaP z různých druhů potravin.



Obrázek č. 16 Procentuální zastoupení jednotlivých složek potravy v závislosti na množství denního příjmu benzo[a]pyrenu. Převzato z [104].

Největší podíl má chléb a obilné výrobky (29 %) a dále grilované / pečené maso (21 %). Naopak nejmenší měly tuky spolu se zeleninou a ovocem. Příklad konkrétních obsahů BaP a PAU v jednotlivých potravinách, metody vaření a uchování, analytická metoda užitá k jejich stanovení, je k nalezení na <http://www.epic-spain.com/libro.html> [105].

### **Voda**

Přestože jsou koncentrace PAU, vzhledem k jejich malé rozpustnosti, obvykle malé, pohybují se okolo 1 – 50 ng / l v povrchových vodách. Vyšší hodnoty byly zaznamenány v zamořených oblastech, v dešťové vodě (10 – 200 ng / l) a zejména pak ve sněhu a mlze (1000 ng / l) [106]. Limitní obsah BaP byl podle společnosti Světová zdravotnická organizace (WHO) navržen na hodnotu 0,7 mg / l. Evropská unie stanovila pro pitnou vodu hodnotu 0,01 mg / l pro BaP [107].

### **Ovzduší**

Podrobný přehled limitního množství jednotlivých látek znečišťujících ovzduší viz zdroj [108]. Pro BaP je uvedena hodnota 0,2 mg / m<sup>3</sup>. Průměrné koncentrace jednotlivých PAU v městských oblastech se obvykle pohybují od 1 do 30 ng / m<sup>3</sup> (kromě naftalenu), přičemž v některých částech jsou hodnoty vyšší (v blízkosti silnic, tunelů, ve městech apod.) [108].

## **6. RAKOVINA PLIC**

Rakovina plic, v minulosti zřídka se vyskytující nádorové onemocnění, je v dnešní době jedním z nejčastěji se vyskytujících onemocnění na světě. Hlavním rizikovým faktorem je kouření tabáku, což bylo podloženo mnohými epidemiologickými studiemi [5, 89, 90]. Pro tento druh nádorového onemocnění je charakteristické, že se vyvíjí několik let. Riziko roste zejména s délkou kouření, dále pak s počtem vykouřených cigaret a věkem [109].

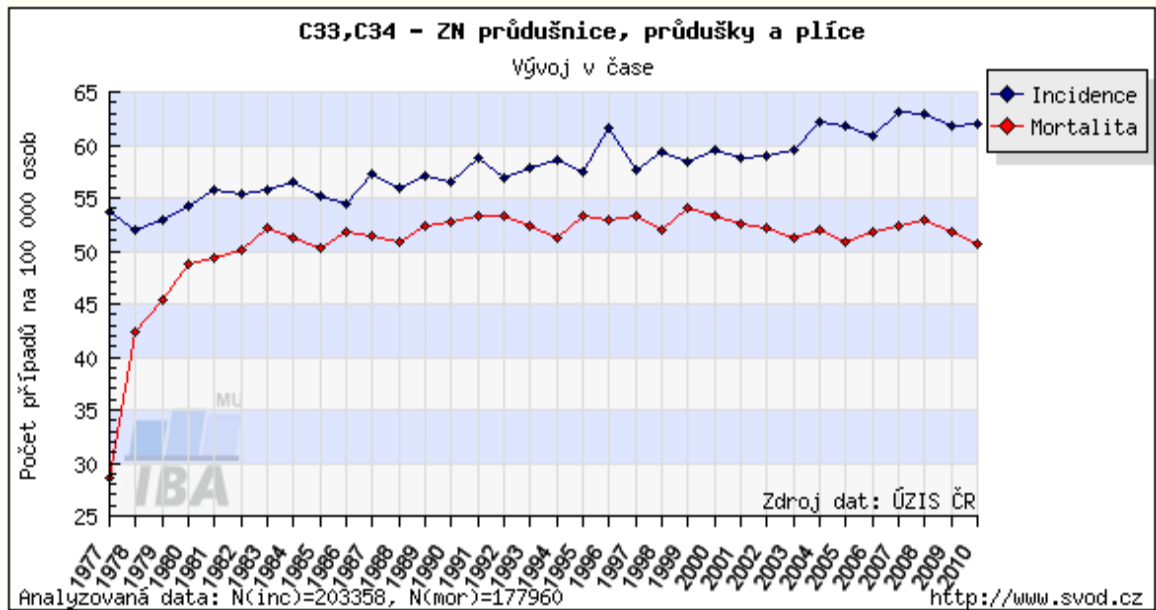
Mechanismus jeho rozvoje, je stejný jako v jiných částech těla a je opět vícestupňovým procesem. Dochází při něm k neregulovatelnému růstu a množení buněk v plicní tkáni, nejčastěji epitelové, a tím ke vzniku nádoru. Ten může být opět benigní nebo maligní. Jednotlivé buňky se mohou v případě maligního karcinomu odštěpit,

a proniknutím do cévních a lymfatických cév, šířit a usadit v odlehlých částech těla. Při takovémto metastazování je vzniklý nový nádor tvořen stejnými abnormálními buňkami jako nádor primární. Bývá tedy označován i stejným názvem např. rozšíří-li se buňky nádoru v plicích do kostí, nejedná se o rakovinu kostí, ale metastazující rakovinu plic [8, 110].

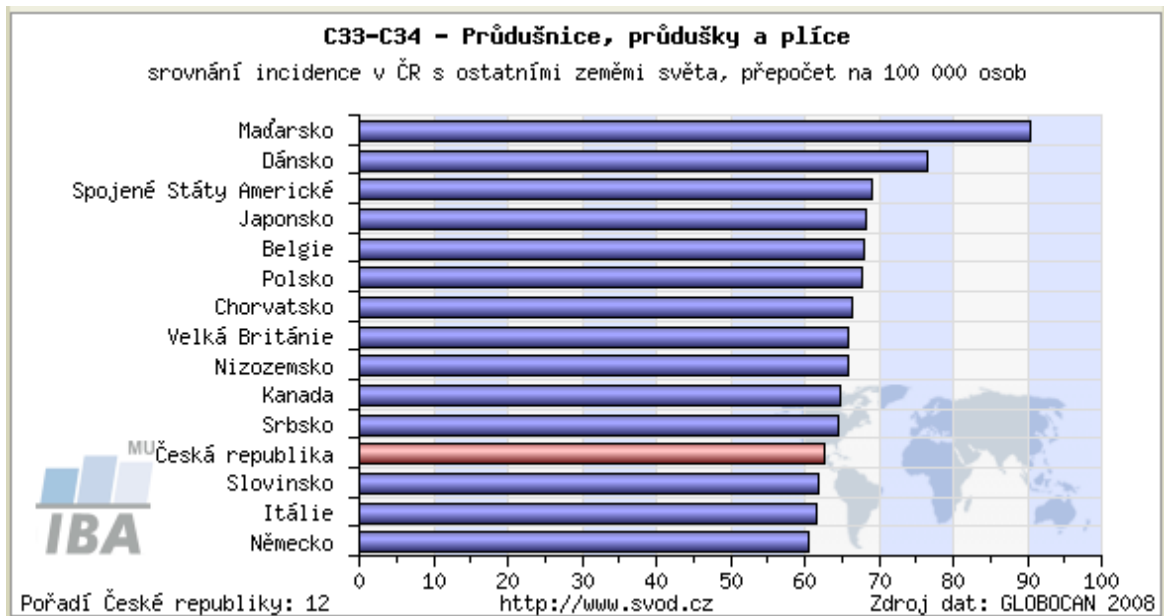
Nejběžněji se vyskytujícím maligním nádorem je tzv. bronchogenní karcinom. Zahrnuje jak nádory průdušek, tak nádory tvořící se v plicním parenchymu. Rozlišují se dva základní typy maligních nádorů plic, a to podle jejich vzhledu a rozměrů. Toto dělení je nezbytné pro předpokládaný vývoj onemocnění a jeho následnou léčbu. Jedná se o [8, 110]:

- **Malobuněčný karcinom plic (SCLC)** – Často dochází k jeho prorůstání do horních cest dýchacích a projevuje se rychlým růstem. Dosahuje velkých rozměrů a v brzkých stádiích zakládá metastázy do kostí, jater, centrální nervové soustavy nebo nadledvin. Pro léčebné postupy se posuzuje z hlediska svého ohraničení (ohraničené / neohraničené stádium). Je léčen spíše pomocí chemoterapie či radioterapie.
- **Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC)** – Jde o souhrnný název, zahrnující další tři typy nádorů – dlaždicobuněčný karcinom, adenokarcinom a velkobuněčný karcinom. Vyznačuje se pomalejším růstem a v pozdějších stádiích tvorbou metastáz. Bývá spíše chirurgicky odstraněn, v pokročilých stádiích za pomoci chemoterapie nebo radioterapie.

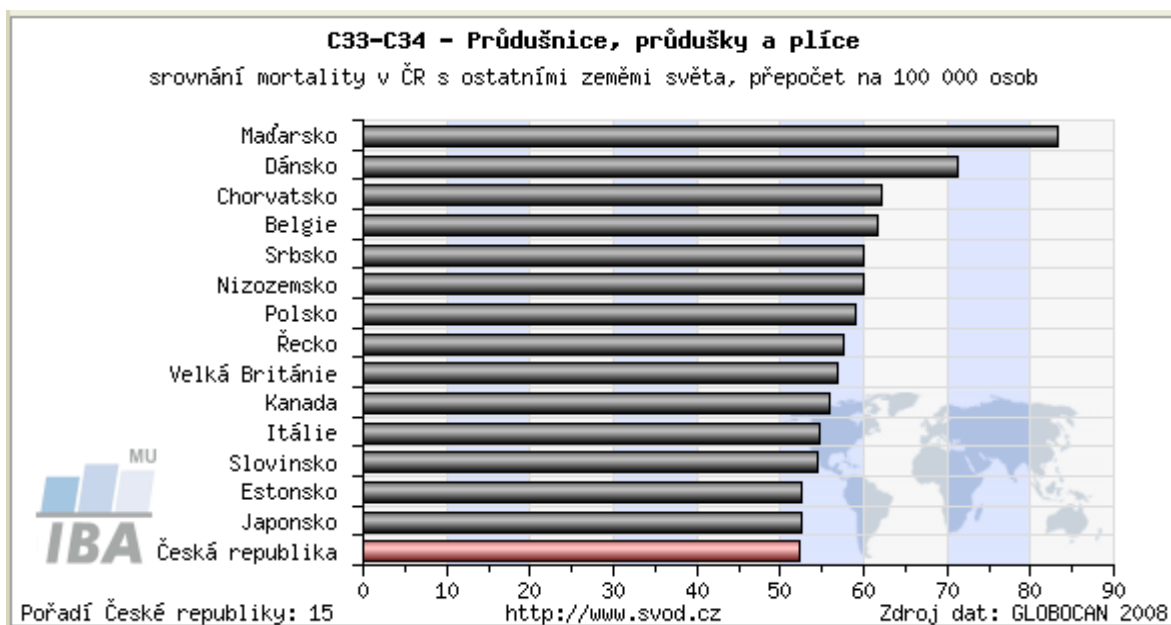
V případě rakoviny průdušnice, průdušek a plic bylo v roce 2010 zaznamenáno v ČR 6532 případů (4641 mužů a 1891 žen). Oproti roku 2009 došlo k nárůstu výskytu přibližně o 1,5 %. [6]. Obrázek č. 8 zobrazuje vývoj incidence a mortality rakoviny plic, průdušnice a průdušek u obou pohlaví v ČR od roku 1977 do roku 2010. Jak je patrné, došlo k mírnému poklesu mortality, avšak incidence stále vzrůstá. Na dalších obrázcích č. 9 a č. 10 jsou uvedeny grafy výskytu a úmrtí těchto nádorových onemocnění v některých státech světa. V případě incidence nových případů je ČR na 12. místě a v počtech úmrtí zaujímá z porovnávaných zemí místo 15.



Obrázek č. 8 Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) zhoubných nádorů průdušnice, průdušek a plic v celé populaci v České Republice od roku 1977 do roku 2010 - <http://www.svod.cz/> (6.5.2013) [111].



Obrázek č. 9 Incidence zhoubných nádorů průdušnice, průdušek a plic v České Republice a jiných státech v přepočtu na 100 000 osob - <http://www.svod.cz/> (6.5.2013) [111].



Obrázek č. 10 Mortalita zapříčiněná zhoubnými nádory průdušnice, průdušek a plic v České Republice a jiných státech v přepočtu na 100 000 osob - <http://www.svod.cz/> (6.5.2013) [111].

### 6.1. Vliv kouření na incidenci rakoviny plic u kuřáků a nekuřáků

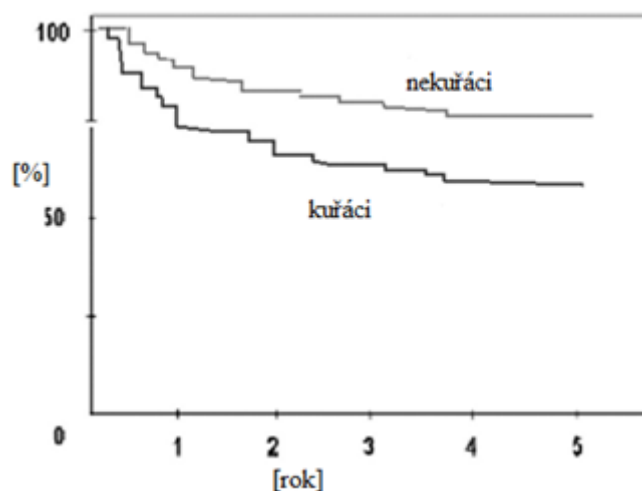
Navzdory důkazům, že kouření cigaret způsobuje rakovinu plic, účinek, jaký má přetrvávající kouření na přežívání pacienta po stanovení diagnózy je rozporuplný. Existují studie uvádějící, že kouření cigaret je negativním rizikovým faktorem [112-115], zatímco jiné přímý vztah mezi kouřením a rakovinou plic nenašli [116-119]. Takovéto závěry jsou však ovlivněny dostupností potřebných dat.

Je známo, že kouření způsobuje snížení systémové a lokální imunity v dýchacích cestách [120]. Kromě toho dochází v plicích kuřáků (i bývalých) k molekulárním změnám, přetrvávajících i několik let, které mají predispozici k rozvoji karcinogeneze [121]. Kouření způsobuje zvýšenou činnost onkogenů a sníženou regulační schopnost tumor supresorových genů [122].

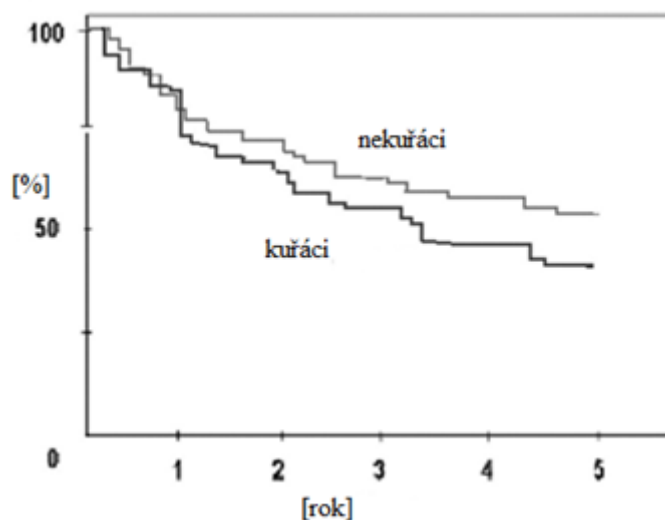
V roce 2006 bylo ve Spojených Státech zaznamenáno 174 470 nových případů onemocnění rakoviny plic a 162 460 úmrtí v důsledku této nemoci [123]. Kouření způsobuje zhruba 90 % úmrtí na rakovinu plic u mužů a téměř 80 % u žen ve Spojených Státech. I přes značný pokrok terapie a „stagingu“ je pětileté přežití pacientů s karcinomem plic stále velmi nízké, pohybuje se okolo 15 % [124]. Odhaduje se, že 10 % mužů a 20 % žen, u nichž došlo k rozvoji rakoviny plic, byli nekuřáci [122].



Pomocí dat elektronických databází od roku 1999 do roku 2005 byl ve Spojených Státech proveden výzkum, zkoumající rozdíly v rozvoji NSCLC u kuřáků a nekuřáků. Výzkumu se zúčastnilo celkem 730 pacientů, 562 kuřáků (21 % ženy, 79 % muži) a 168 nekuřáků (59 % ženy, 41 % muži). Ukázalo se, že v případě mužů, mají kuřáci asi třiadvacetkrát vyšší pravděpodobnost vzniku rakoviny plic než nekuřáci. U kuřáček je tato pravděpodobnost asi třináctkrát vyšší. Prokázalo se také, že kouření nejenže způsobuje rakovinu plic, ale také výrazně zhoršuje prognózu v průběhu počáteční fáze NSCLC (tj. stadium I a II) u kuřáků [122]. Překvapující však byl rozvoj tohoto onemocnění u nekuřáků, a to především žen mladšího věku. Jednalo se o větší výskyt karcinoidů a bronchoalveolárních karcinomů a adenokarcinomů [125]. To může být ovlivněno hormonálními a genetickými rozdíly u obou pohlaví, stejně jako rozdílným metabolismem některých látek (např. metabolismus nikotinu je v případě žen odlišný než u mužů), stejně jako se u žen objevuje vyšší výskyt mutací genů p53 a K-Ras apod. [126, 127, 128]. Na druhé straně se ukázalo, že to jsou právě ženy, které mají větší předpoklady pro přežití než muži [129, 130]. V této studii měli nekuřáci vyšší pětileté přežití pro etapy I, II a III onemocnění, jak je dokazují obrázky č. 11 a č. 12, na nichž jsou zobrazeny grafy pětiletého přežití zkoumaných kuřáků a nekuřáků s onemocněním NSCLC ve stadiu I a II. Prognóza přežití u tohoto onemocnění byla také vyšší u kuřáků s počtem vykouřených cigaret menším než 20 krabiček za rok. Přičemž v roce 1999 byla stanovená prahová hodnota na 30 krabiček za rok. U lidí kouřících více jak 30 krabiček byl zaznamenán výrazný nárůst výskytu rakoviny plic s častou recidivou [131]. To může mít souvislost s vyřazenou funkcí ochranného genu p53.



Obrázek č. 11 Křivky pětiletého přežití kuřáků (59 %) a nekuřáků (75 %) (z celkového počtu 730 pacientů) ve stadiu I NSCLC [122].



Obrázek č. 12 Křivky pětiletého přežití II. stadia NSCLC u kuřáků (46 %) a nekuřáků (53 %) (z celkového počtu 730 pacientů) [122].

## ZÁVĚR

Benzo[a]pyren je jedním z nejprozkoumanějších polycyklických aromatických uhlovodíků s prokázanými karcinogenními účinky u zvířat i člověka. Díky lidské činnosti se nachází ve všech složkách životního prostředí. Vzniká nedokonalým spalováním fosilních paliv, je součástí automobilových a průmyslových emisí, v přírodě se nachází např. v sopečném prachu. Jeho vysoké hodnoty byly také naměřeny při úpravě potravin za vysoké teploty (pečení, uzení, grilování). Člověk mu bývá nejvíce vystaven inhalací např.

znečištěného ovzduší, příjmem kontaminovaných potravin včetně vody nebo kožním kontaktem.

Ke svému plnému genotoxickému působení v organismu, vyžaduje metabolickou aktivaci. K té dochází během I. fáze biotransformace, při které oxidačními reakcemi vznikají často velmi reaktivní metabolity benzo[a]pyrenu. Na těchto reakcích se podílí řada významných enzymů, mezi něž patří cytochromy P450 (CYP1A1 a CYP1B1), z rodiny monooxygenáz se smíšenou funkcí, hydrolázy (epoxidhydrolázy) aj. Jedním z nejvýznamnějších produktů těchto reakcí je benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid, který je schopen tvořit kovalentní vazby s nukleofilními bázemi (adeninem, guaninem) DNA řetězců. To vede ke vzniku mutací, které mohou být příčinou rozvoje karcinogeneze, pokud dojde k selhání opravných a kontrolních mechanismů organismu. II. Fáze biotransformace pak zahrnuje konjugační reakce polárních funkčních skupin metabolitů z I. fáze s endogenními sloučeninami např. glutathionem, sulfáty atd. Při nichž dochází, za pomoci specifických enzymů (glutathion-S-transferázy, sulfotransferázy aj.) k postupné exkreci metabolitů benzo[a]pyrenu z organismu.

Velká pozornost ze stran vědců i veřejnosti je věnována roli benzo[a]pyrenu v rozvoji nádorového bujení v plicích v souvislosti s kouřením tabákových výrobků. Benzo[a]pyren patří mezi hlavní karcinogeny tabákového kouře, podílejícího se na vzniku rakoviny plic, která je jedním z nejčastějších nádorových onemocnění, postihující především kuřáky, ale i nekuřáky.

## LITERÁRNÍ ZDROJE

- [1] Zdeněk A., Krejčí M., Vorlíček J. *Obecná onkologie*. Vyd. Galén. Praha. 2011.
- [2] Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky. *Zdravotnictví České republiky 2011 ve statistických údajích*. ÚZIS ČR. 2012. s. 7-17. [cit. 2013-05-01].
- [3] Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky. *Zdravotnická ročenka České republiky*. ÚZIS ČR. 2012. s. 43-114. [cit. 2013-05-01].
- [4] Upton A. C., Albert R. E., Burns F. J., Shore R. E. (1986): *Radiation Carcinogenesis*. Elsevier. New York. s. 1-10.
- [5] American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2013*. American Cancer Society Atlanta. 2013. s. 1-60. [cit. 2013-04-30].
- [6] Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky. *Incidence zhoubných novotvarů v ČR v roce 2010*. ÚZIS ČR. 2013. s. 1-11. [cit. 2013-04-29].
- [7] Dienstbier Z., Stáhalová V. *Onkologie pro laiky*. Vyd. Radix, spol. s. r. o. Praha. 2012.
- [8] Petruželka L., Konopásek B. *Klinická onkologie*. Vyd. Karolinum. Praha. 2003.
- [9] <http://lekarske.slovniky.cz/> [cit. 2013-04-22].
- [10] UICC-International Union Against Cancer. *TNM klasifikace zhoubných novotvarů*. ÚZIS ČR. 2011. s. 2-246.[cit. 2013-05-06].
- [11] European Network of Cancer Registries. *ENCR Recommendations*. ENCR. 2002. s. 1-14. [cit. 2013-05-04].
- [12] Skuse G. R., Ludlow J. W. (1995): *Tumor suppressor genes in disease and therapy*. Vol. 345(8954): 902-906.
- [13] Karp J. E., Broder S. (1995): *Molecular foundations of cancer: new targets for intervention*. *Nature Med.* Vol. 1(4): 309-320.
- [14] Bishop J. M. (1982): *Oncogenes*. *Scientific American*. Vol. 246: 69-72.
- [15] UNSCEAR -United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. (1993): *Sources and Effects of Ionizing Radiation*. Report to the General Assembly. United Nations. New York. s. 1-33.
- [16] Land H., Parada L. F., Weinberg R. A. (1983): *Cellular oncogenes and multi-step carcinogenesis*. *Science*. Vol. 222: 771-778.
- [17] Douglas H., Weinberg R. A. (2000): *The Hallmarks of Cancer*. Cambridge. Vol. 100: 57-70.

- [18] Department of Research. (2004): Basics of carcinogenesis . Health Administration Vol: 17(1): 16-24.
- [19] <http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/bacteria.html> [cit. 2013-05-04].
- [20] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> [cit. 2013-05-02]
- [21] Hill J. (1761): Cautions Against the Immoderate Use of Snuff. R Baldwin, Vyd. Cengage Gale. London.2009.
- [22] Von Soemmering S. T. (1795): De morbis vasorum absorbentium corporis humani. Vyd. Varrentrapp u. Wenner. Frankfurt.
- [23] Phillips D. H. (1983): Fifty years of benzo(a)pyrene. Nature. Vol. 303: 468–472.
- [24] Bardoděj Z. Úvod do chemické toxikologie. Vyd. Karolinum. Praha. 1999.
- [25] Horák J., Linhart I., Klusoň P. Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky. Vyd. VŠCHT Praha. Praha. 2007.
- [26] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf> [cit. 2013-05-02]
- [27] Fetzer J. C., Biggs W. R. A. (1994): Review of the Large Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Vol. 4: 3 – 17.
- [28] Kummerová M., Slovák L., Holoubek I.(1995): Phytotoxicity studies of benzo[a]pyrene with *Lactuca sativa*. Toxicol. Environ. Chem. Vol. 51: 197-203.
- [29] Edwards N. T. (1983): Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment – a review. J. Environ. Qual. Vol. 12(4): 427-441.
- [30] Sims R. C., Overcash M. R. (1983): Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. Residue Rev. Vol. 88: 1-68.
- [31] Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe. 1987. s. 105–117.
- [32] Agency for toxic substances and disease registry. (1994): Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): update. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Services. s. 255-266.
- [33] Yu M.-H. (2005): Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants (2nd). s. 1-21.
- [34] OAK Ridge Reservation Environmental Restoration Program. (1994): Toxicity summary for benzo[a]pyrene. s. 1-12.
- [35] Bolognesi C., Parrini M., Aiello C., Rossi L. (1991): DNA damage induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in the liver and the mammary gland of rats

- exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon enzyme inducers during perinatal life. *Mutagenesis*, Vol. 6(2): 113-116.
- [36] Williams J. A., Phillips D. H. (2000): Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer. *Cancer Research*, Vol. 60(17): 4667-4677.
- [37] Holoubek, I. (koordinátor, projekt manager), Adamec, V., Bartoš, M., Černá, M., Čupr, P., Bláha, K., Demnerová, K., Drápal, J., Hajšlová, J., Holoubková, I., Jech, L., Klánová, J., Kocourek, V., Kohoutek, J., Kužílek, V., Machálek, P., Matějů, V., Matoušek, J., Matoušek, M., Mejstřík, V., Novák, J., Ocelka, T., Pekárek, V., Petira, K., Provazník, O., Punčochář, M., Rieder, M., Ruprich, J., Sářka, M., Tomaniová, M., Vácha, R., Volka, K., Zbiral, J. Úvodní národní inventura persistentních organických polutantů v České republice. Projekt GF/CEH/01/003. Enabling activities to facilitate early action on the implementation of the Stockholm convention on persistent organic pollutants (POPs) in the Czech Republic. Project GF/CEH/01/003. TOCOEN. s.r.o. Brno, v zastoupení Konsorcia RECETOX - TOCOEN & Associates. TOCOEN. No. 249. Brno. 2003.
- [38] Van de Wiel J.A., Fijneman P. H., Duijf C. M., Anzion R. B., Theuws J. L., Bos R. P. (1993): Excretion of benzo[a]pyrene and metabolites in urine and feces of rats: influence of route of administration, sex and long-term ethanol treatment. *Toxicology*. Vol. 80(2-3): 103–115.
- [39] Stiborová M., Šulc M., Hodek P., Hudeček J. (2000): Biodegradace polutantů životního prostředí enzymovými systémy rostlin. UK v Praze PřF, katedra biochemie. Vyd. VŠCHT, Praha.
- [40] Hückelhoven R., Schuphan I., Thiede B., Schmidt B. (1997): Biotransformation of Pyrene by Cell Cultures of soybean (*Glycine max. L.*), wheat (*Triticum aestivum L.*), jimsonweed (*Datura stramonium L.*) and Purple Foxglove (*Digitalis purpurea L.*). *J. Agric. Food Chem.* Vol. 45: 263-269.
- [41] Knejzlík Z., Káš J., Ruml T. (2000): Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy*. Vol. 94: 913-918.
- [42] Hall M., Forrester L. M., Parker D. K., Grover P. L., Wolf C. R. (1989): Relative contribution of various forms of cytochrome P450 to the metabolism of benzo[a]pyrene by human liver microsomes. *Carcinogenesis*. Vol. 10(10): 1815–1821.

- [43] Osborne M. R., Crosby N. T. (1987): Benzopyrenes. Cambridge Monographs on Cancer Research. Cambridge, England: Cambridge University Press.
- [44] Buterin T., Hess M. T., Luneva N., Geacintov N. E., Amin S., Kroth H., Seidel A., Naegeli, H. (2000): Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in ras codon 61 mutational hot spots. *Cancer Research*, Vol. 60(7): 1849-1856.
- [45] Geacintov N. E., Cosman M., Hingerty B. E., Amin S., Broyde S., Patel D. J. (1997): NMR Solution Structures of Stereoisomeric Covalent Polycyclic Aromatic Carcinogen-DNA Adducts: Principles, Patterns, and Diversity. *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 10(2): 111-146.
- [46] Clark C. Ch. : Selected topics in DNA repair. DNA Damage Caused by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Mechanism and Markers. Pub. In Tech. USA. 2011. s. 126-138.
- [47] U.S. EPA. Health Effects Assessment for Benzo(a)pyrene.(1984). Prepared by the Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH, for the Office of Emergency and Remedial Response. s. 7-31.
- [48] IARC: Other Data Relevant to an Evaluation of Carcinogenicity and its Mechanisms. IARC Monogr. Vol. 92: 512-682.
- [49] IARC (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum. Vol. 92: 1–853.
- [50] IARC (1973). Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Man. Vol. 3: 1–271.
- [51] IARC (1983). Benzo[a]pyrene. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data. World Health Organization, Lyon, France. Vol. 32: 33-224.
- [52] U.S. EPA. Health Effects Assessment for Benzo(a)pyrene. (1991). Drinking Water Criteria for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Prepared by the Environmental Criteria and Assessment, Office, Office of Health and Environmental Assessment, Cincinnati, OH, for the Office of Water, Washington, DC.
- [53] IARC (1986). Tobacco smoking. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Hum. Vol. 38: 1–421.

- [54] Wei S. J., Chang R. L., Merkle K. A., Gwynne M., Cui X. X., Murthy B., Huang M. T., Xie J. G., Lu Y. R., Jerina D. M., Conney A. H. (1999): Dosedependent mutation profile in the c-Ha-ras protooncogene of skin tumors in mice initiated with benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*. Vol. 20(9): 1689–1696.
- [55] Ross J. A., Nesnow S. (1999): Polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations between DNA adducts and ras oncogene mutations. *Mutation Research*, Vol. 424(1-2): 155-166.
- [56] Bos J. L. (1989): Ras oncogenes in human cancer: a review. *American Association for Cancer Research. Cancer Res.* Vol. 49(17): 4682-4689.
- [57] Shimada T. (2006): Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolic Pharmacokinetics*, Vol. 21(4): 257-276.
- [58] Graslund A., Jernstrom B. (1989): DNA-carcinogen interaction: covalent DNA-adducts of benzo(a)pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxides studied by biochemical and biophysical techniques. *Quarterly review of biophysics*. Vol. 22: 1–37.
- [59] Estensen R. D., Jordan M. M., Wiedmann T. S., Galbraith A. R., Steele V. E., Wattenberg L. W. (2004): Effect of chemopreventive agents on separate stages of progression of benzo[alpha]pyrene induced lung tumors in A/J mice. *Carcinogenesis*. Vol. 25 (2): 197–201.
- [60] IARC: Benzo[a]pyrene. *IARC Monogr.* Vol 100F:111-137.
- [61] Rojas M., Cascorbi I., Alexandrov K., Kriek E., Auburtin G., Mayer L., Kopp-Schneider A., Roots I., Bartsch H. (2000): Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis*, Vol. 21(1): 35-41.
- [62] Cavalieri E. L., Rogan E. G. (1995): Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*. Vol. (25): 677–688.
- [63] Chakravarti D., Venugopal D., Mailander P. C., Meza J. L., Higginbotham S., Cavalieri E. L., Rogan E. G. (2008): The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutat Res.* Vol. 649(1-2): 161–178.
- [64] Hamouchene H., Arlt V. M., Giddings I., Phillips D. H. (2011): Influence of cell cycle on responses of MCF-7 cells to benzo[a]pyrene. *BMC Genomics* Vol. 12: 333.



- [65] Rubin H. (2001): Historical Review. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by Tobago smoke: a bio-historical perspective with updates . USA. *Carcinogenesis*. Vol. 22(12): 1903-1930.
- [66] Phillips D. H. (2005): Macromolecular adducts as biomarkers of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Imperial College Press, London. s. 137–169.
- [67] Mangal D., Vudathala D., Park J. H. Lee S. H., Penning T. M., Blair I. A. (2009): Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. Vol. 22(5): 788–797.
- [68] Balu N., Padgett W. T., Nelson G. B., Lambert G. R., Ross J. A., Nesnow S. (2006): Benzo[a]pyrene-7,8-quinone-3'-mononucleotide adduct standards for 32P postlabeling analyses: detection of benzo[a]pyrene-7,8-quinone-calf thymus DNA adducts. *Anal Biochem*. Vol. 355(2): 213–223.
- [69] McCoull K. D., Rindgen D., Blair I.A., Penning T.M. (1999): Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem Res Toxicol*. Vol. 12(3): 237–246.
- [70] Park J. H., Mangal D., Tacka K. A., Quinn A. M., Harvey R. G., Blair I. A., Penning T. M. (2008): Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 105(19): 6846–6851.
- [71] Quinn A. M., Harvey R. G., Penning T. M. (2008): Oxidation of PAH trans-Dihydrodiols by Human Aldo-Keto Reductase AKR1B10. *Chemical Research in Toxicology*. Vol. 21(11): 2207-2215.
- [72] Bansal S. K., Zaleski J., Gessner T. (1981): Glucuronidation of oxygenated benzo(a)pyrenederivatives by UDP-glucuronyltransferase of nuclear envelope. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 98(1): 131-139.
- [73] Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999): Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem.Listy* (93): 229-237.
- [74] Stiborová M., Hudeček J., Páca J. (2000): Enzymové systémy biotransformující fenolytické látky. *Bull. Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol*. Vol. 28: 57-73.
- [75] Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A. W. (1998): Catalytically self-sufficient P450 CYP102 (cytochrome P450 BM-3): resonance Raman spectral characterization of the heme domain and of the holoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. Vol. 243(3): 811-815.

- [76] Anzenbacher P., Hudeček J., Stiborová M., Larroque C., Lange R., Heibel G., Hildebrandt P. Comparison of the structures of different cytochromes P-450 as revealed by experimental and theoretical methods. *Cytochrome P-450. Biochemistry and Biophysics*. Vyd. Archakov A.I., Bachmanova G.I. INCO-TNC. Moscow. 1992.
- [77] Stiborová M., Hudeček J., Páca J.<sup>a</sup>, Martínek V., Páca J.<sup>b</sup>. (2004): Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy*. Vol. 98: 876-890.
- [78] Guengerich F. P., Shimada T. (1991): Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P4M) enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* Vol. 4: 391-407.
- [79] Shimada T., Yun C. H., Yamazaki H., Gautier J.C., Beaune P. H., Guengerich, F. P. (1992): Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol. Pharmacol.* Vol. 41(5): 856–864.
- [80] Shimada T., Watanabe J., Inoue K., Guengerich F. P., Gillam E. M. (2001): Specificity of 17beta-oestradiol and benzo[a]pyrene oxidation by polymorphic human cytochrome P4501B1 variants substituted at residues 48, 119 and 432. *Xenobiotica*. Vol. 31(3): 163–176.
- [81] Shimada T., Gillam E. M., Sutter T. R., Strickland P. T., Guengerich F. P., Yamazaki H. (1997): Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1. *Drug Metab.Dispos.* Vol. 25(5): 617–622.
- [82] Uno S., Dalton T. P., Derkenne S., Curran C. P., Miller M. L., Shertzer H. G., Nebert D. W. (2004): Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: Detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol. Pharmacol.* Vol. 65(5): 1225–1237.
- [83] Shimada T., Inoue K., Suzuki Y., Kawai T., Azuma E., Nakajima T., Shindo M., Kurose K., Sugie A., Yamagishi Y., Fujii-Kuriyama Y., Hashimoto, M. (2002): Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*. Vol. 23(7): 1199–1207.
- [84] Hukkanen J., Jacob P. 3rd, Benowitz N. L. (2005): Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* Vol. 57(1): 79–115.
- [85] Brown W. T. obavo risk awareness timeline.

<http://www.cigarette.com/images/timeline.pdf>

- [86] Hecht S. S. (1999): Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl Cancer Inst.* Vol. 91(14): 1194-210.
- [87] [http://ubeo.lf1.cuni.cz/Studenti/Texty/MOLEKULARNI%20KARCINOGENEZE\\_2009\\_10.pdf](http://ubeo.lf1.cuni.cz/Studenti/Texty/MOLEKULARNI%20KARCINOGENEZE_2009_10.pdf)
- [88] Rodgman A., Perfetti T. A. (2009): Alphabetical Component Index. In: *The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke*. FL: CRC Press. s. 1483–1784.
- [89] Bilello K. S., Murin S., Matthay R. A. (2002): Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. *Clin. Chest. Med.* 23(1):1–25.
- [90] IARC (2004a): Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog. Risks. Hum.* Vol. 83: 1–1438.
- [91] Pazdera V., Fousek M., Ferus M., Dryahina K., Španěl P., Shestivska V., Civiš S. (2011): Spektroskopie tabákového kouře. *Praha. Č. čas. fyz.* Vol. 61(2): 65-74.
- [92] Rodgman A., Perfetti T. A. (2006): The composition of cigarette smoke: a catalogue of the polycyclic aromatic hydrocarbons. *Beitr. Tabakforschung Inti.* Vol. 22(1): 13–69.
- [93] Borgerding M., Klus H. (2005): Analysis of komplex mixtures–cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol.* Vol. 57(1): 43–73.
- [94] Roemer E., Stabbert R., Rustemeier K., Veltel D. J., Meisgen T. J., Reininghaus W., Carchman R. A., Gaworski C. L., Podraza K. F. (2004): Toxicology. *195(1):31–52.*
- [95] Knishkowsky B., MD, MPH, Amitai Y., MD, MPH.(2005): Water-Pipe (Narghile) Smoking: An Emerging Health Risk Behavior. *Pediatric* Vol. 116(1): 113-119.
- [96] Asma S., Bettcher D. W., Samet J. et al. (2009): Tobacco. In: *Oxford Textbook Of Public Health*. Detels R, editor. Oxford: Oxford University Press. s. 43-211.
- [97] Gunaid A. A., Sumairi A. A., Shidrawi R. G., al-Hanaki A., al-Haimi M., al-Absi S., al-Hureibi M. A., Qirbi A. A., al-Awlagi S., el-Guneid A. M. (1995): Oesophageal and gastrin carcinoma in the Republic of Yemen. *Br. J. Cancer.* Vol. 71(2):409–41.
- [98] El-Hakim I. E., Uthman M. A. (1999): Squamous cell carcinoma and keratoacanthoma of the lower lip associated with “Goza” and “Shisha” smoking. *Int. J. Dermatol.* Vol. 38(2):108–110.

- [99] Gold W. M. (1994): Pulmonary function testing. In Murray JF and Nadel JA, eds. Textbook of Respiratory Medicine. Philadelphia: W.B. Saunders Company. Vol.1(2): 798-900.
- [100] Larsson, B.K. (1986): Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons during the smoking and grilling of food. Prog. clin. biol. Res. Vol. 206: 169–180.
- [101] IARC (2005): Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Industrial Exposures. Vol. 92: 394-422.
- [102] Ramesh A., Walker S. A., Hood D. B., Guillen M. D., Schneider K., Weyand E. H. (2004): Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. Int. J. Toxicol. Vol. 23(5): 301–333.
- [103] JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Sixty-fourth Meeting (JECFA/64/SC). Rome. 2005. 3-47.
- [104] Sinha R., Cross A., Curtin J., Zimmerman T., McNutt S., Risch, A., Holden, J. (2005): Development of a food frequency questionnaire module and databases for compounds in cooked and processed meats. Mol. Nutr. Food Res. Vol. 49(7): 648–655.
- [105] Jakszyn, P., Agudo, A., Ibanez, R., Garcia-Closas, R., Pera, G., Amiano, P., Gonzalez, C. A. (2004): Development of a food database of nitrosamines, heterocyclic amines, and polycyclic aromatic hydrocarbons. J. Nutr. Vol. 134(8): 2011–2014.
- [106] WHO-World health organization. (1998): Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environmental Health Criteria, No. 202. Geneva. Chemistry In. Vol. 21(4): 883.
- [107] WHO-World health organization. (2004): Guidelines for Drinking-water Quality. Recommendations, 3rd Ed., Geneva. Vol. 1(3): 428–430.
- [108] [http://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show\\_document?p\\_table=STANDARDS&p\\_id=9992&p\\_text\\_version=FALSE](http://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=STANDARDS&p_id=9992&p_text_version=FALSE) [cit. 8.5.2013].
- [109] Flanders W. D., Lally C. A., Zhu B. P., Henley S. J., Thun M. J. (2003): Lung cancer mortality in relation to age, duration of smoking, and daily cigarette consumption: results from Cancer Prevention Study II. Cancer Res. Vol. 63(19): 6556–6562.
- [110] Vorlíček J., Abrahámová J., Vorlíčková H. a kolektiv. Klinická onkologie pro sestry. Vyd. Grada Publishing. Praha. 2006.

- [111] <http://www.svod.cz/> [cit. 2013-05-06].
- [112] Hinds M. W., Yang H. Y., Stemmermann G., Lee J., Kolonel L. N. (1982): Smoking history and lung cancer survival in women. *J. Natl. Cancer Inst.* Vol. 68(3): 395-399.
- [113] Kato I., Tominaga S., Ikari A. (1990): Lung cancer prognostic factors from the Aichi Cancer Registry. *Jpn. J. Clin. Oncol.* Vol. 20(3): 238-245.
- [114] Sobue T., Suzuki T., Fujimoto I., Doi O., Tateishi R., Sato T. (1991): Prognostic factors for surgically treated lung adenocarcinoma patients, with special reference to smoking habit. *Jpn. J. Cancer Res.* Vol. 82(1): 33-39.
- [115] Isobe T., Hiyama K., Yoshida Y., Fujiwara Y., Yamakido M. (1994): Prognostic significance of p53 and ras gene abnormalities in lung adenocarcinoma patients with stage I disease after curative resection. *Jpn. J. Cancer Res.* Vol. 85(12): 1240-1246.
- [116] Harpole D. H., Herndon J. E. 2nd, Wolfe W. G., Iglehart J. D., Marks J. R. (1995): A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res.* Vol. 55(1): 51-56.
- [117] Linden G., Dunn J. E., Hom P. H., Mann M. (1972): Effect of smoking on the survival of patients with lung cancer. *Cancer.* Vol. 30(2): 325-328.
- [118] Shimizu H., Tominaga S., Nishimura M., Urata A. (1984): Comparison of clinico-epidemiological features of lung cancer patients with and without a history of smoking. *Jpn. J. Clin. Oncol.* Vol. 14(4): 595-600.
- [119] Ebina M., Steinberg S. M., Mulshine J. L., Linnoila R. I. (1994): Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* Vol. 54(9): 2496-2503.
- [120] Daniele R. P., Dauber J. H., Altose M. D., Rowlands D. T., Gorenberg D. J. (1997): Lymphocytes studies in asymptomatic cigarette smokers. *Ann. Rev. Respir. Dis.* Vol. 116(6): 997-1005.
- [121] Wistuba I. L., Lam S., Behrens C., Samet J. M., Srivastava S., Minna J. D. (1997): Molecular changes in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl. Cancer Inst.* Vol. 89(18): 1366-1373.
- [122] Bryant A., MSPH, MD, Cerfolio R. J., MD, FCCP. (2007): Differences in Epidemiology, histology, and survival between cigarette smokers and never-smokers who develop non-small cell lung cancer. *Chest.* Vol. 132(1): 185-192.

- [123] American Cancer Society. US mortality public use data tapes, National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention, 2006. A cancer journal for clinicians. Vol. 56(2): 106-130.
- [124] Landis S. H., Murray T., Bolden S., Wingo P.A. (1999): Cancer statistics. CA Cancer J. Clin. Vol. 49(1): 8-31.
- [125] Liu N. S., Spitz M. R., Kemp B. L., Cooksley C., Fossella F. V., Lee J. S., Hong W. K., Khuri F. R. (2000): Adenocarcinoma of the lung in young patients: the MD Anderson experience. Cancer. Vol. 88(8): 1837-1841.
- [126] Ryberg D., Hewe A., Phillips D. H., Haugen A. (1994): Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. Cancer Res. Vol. 54(22): 5801-5803.
- [127] Kure E. H., Ryberg D., Hewe A., Phillips D. H., Skaug V., Baera R., Haugen A. (1996): p53 mutations in lung tumours: relationship to gender and lung DNA adduct levels. Carcinogenesis. Vol. 17(10): 2201-2205.
- [128] Ahrendt S. A., Decker P. A., Alawi E. A., Zhu Yr Y. R., Sanchez-Cespedes M., Yang S. C., Haasler G. B., Kajdacsy-Balla A., Demeure M. J., Sidransky D. (2001): Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. Cancer. Vol. 92(6): 1525-1530.
- [129] Radzikowska E., Glaz P., Roszkowski K. (2002): Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival: population-based study of 20,561 cases. Ann Oncol. Vol. 13: 1087-1093.
- [130] Cerfolio R. J., Bryant A. S., Scott E., Sharman M., Robert F., Spencer S. A., Garver R. I. (2006): Women with pathologic stage I, II and III non-small cell lung cancer have better survival than men. Chest . Vol. 130(6): 1796-1802.
- [131] Fujisawa T., Iizasa T., Saitoh Y., Sekine Y., Motohashi S., Yasukawa T., Shibuya K., Hiroshima K., Ohwada H. (1999): Smoking before surgery predicts poor long-term survival in patients with stage I non-small cell lung carcinomas. J. Clin. Oncol. Vol. 17(7): 2086-2091.

