

DANUTA PALUT, GRAŻYNA KOSTKA, MARZENA ADAMCZYK

## MOLEKULARNE MECHANIZMY CHEMICZNEJ KANCEROGENEZY

## MOLECULAR MECHANISMS OF CHEMICALLY INDUCED CARCINOGENESIS

Zakład Toksykologii Środowiskowej, Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24  
Kierownik: prof. dr hab. J.K. Ludwicki

*W artykule omówiono obecne poglądy na temat molekularnych podstaw rozwoju nowotworów, tj. zmiany o charakterze mutacyjnym w protoonkogenach i genach supresorowych. Rola protoonkogenów i genów supresorowych w prawidłowej komórce polega na regulowaniu proliferacji i różnicowania komórek. Opisano mutacje tych genów w nowotworach u gryzoni po narażeniu na wybrane genotoksyczne kancerogeny. Przedstawiono też obecny stan wiedzy w zakresie działania niegenotoksycznych kancerogenów i/lub promotorów wzrostu nowotworowego.*

## WSTĘP

Prawidłowe komórki każdej tkanki żyją w złożonej wspólnocie – wzajemnie regulując proliferację, czyli złożoną sekwencję zdarzeń, dzięki którym komórka powiększa się i dzieli na dwie komórki potomne o kompletnym zestawie chromosomów. Dzięki temu nieustannemu współdziałaniu każda tkanka zachowuje właściwe rozmiary i odpowiednią budowę, stosownie do potrzeb organizmu. Natomiast komórki nowotworowe wyłamują się z tej wspólnoty i realizując własny program reprodukcji stają się z czasem nieśmiertelne. Mają one też inną zdradziecką cechę, a mianowicie przechodzą z fazy raka *in situ* w stan inwazyjnego wzrostu, który polega na tworzeniu guzów w przyległych tkankach oraz w odległych miejscach organizmu.

Molekularne podstawy rozwoju chorób nowotworowych  
(ogólny zarys)

W ciągu ostatnich 20 lat naukowcom udało się wyjaśnić podstawowe prawa rządzące rozwojem nowotworów. Zmiany nowotworowe można obecnie rozpatrywać jako chorobę genów<sup>1)</sup>, stanowiących zaledwie niewielką część z dziesiątków tysięcy genów obecnych w komórce, a których rola polega na programowaniu i regulacji proliferacji i różnicowania komórek [21]. Geny te można zaliczyć do co najmniej dwóch kategorii:

<sup>1)</sup> Nośnikiem genów są cząsteczki chromosomalnego DNA w jądrze komórkowym. Centralny dogmat genetyczny: DNA → transkrypcja → RNA → translacja → białko. Gen wyznacza zatem sekwencję aminokwasów, które muszą się połączyć, aby powstał określony rodzaj białka. A zatem białka wykonują funkcje zaprogramowane w genie. Gdy gen jest włączony, komórka syntetyzuje kodowane przez niego białko.

tw. protoonkogenów oraz genów supresorowych. Protoonkogeny kodują białka, które stymulują proliferację. Działanie drugiej klasy genów określanych jako geny supresorowe polega, jak sama nazwa wskazuje, na przeciwnym, tj. hamującym oddziaływaniu na proliferację. Z reguły bardziej skomplikowana jest ocena aktywności negatywnej. Wydaje się zatem zrozumiałe, że zidentyfikowano i opisano znacznie mniej genów supresorowych niż protoonkogenów.

Obecnie wiadomo, że przynajmniej zapoczątkowanie procesu nowotworowego jest wynikiem aktywacji protoonkogenów i unieczynnienia genów supresorowych [1, 21, 24, 25, 27]. Istnieje kilka możliwych dróg aktywacji i unieczynnienia tych genów: są to m.in. różne formy mutacji<sup>2)</sup>. Przyczyny mutacji nie są w pełni poznane.

Postuluje się, że mutacje mogą być indukowane przez czynniki genotoksyczne – w tym substancje chemiczne, posiadające zdolność do oddziaływania na DNA i swoistego uszkodzenia jego struktury [2, 27]. Należy przypomnieć, że uszkodzenie DNA jest tylko zmianą premutacyjną. O tym czy uszkodzenie stanie się przyczyną mutacji decyduje rodzaj i liczba uszkodzeń, rodzaj naprawy DNA (która może być poprawna lub błędna), a także wzrost proliferacji komórek, ponieważ warunkiem utrwalenia się mutacji jest przekazanie uszkodzenia w materiale genetycznym komórce potomnej.

Protoonkogeny ulegając mutacji stają się rakotwórczymi onkogenami, które mogą produkować zbyt dużo kodowanego przez siebie białka lub nadmiernie aktywne jego odmiany: w konsekwencji komórki otrzymują sygnały stymulujące wzrost. Natomiast unieczynnienie genów supresorowych prowadzi do utraty funkcjonalnych białek supresorowych, pozbawiając w ten sposób komórki głównych ograniczeń (hamulców), które normalnie zapobiegają niewłaściwemu ich namnażaniu się (Ryc. 1).

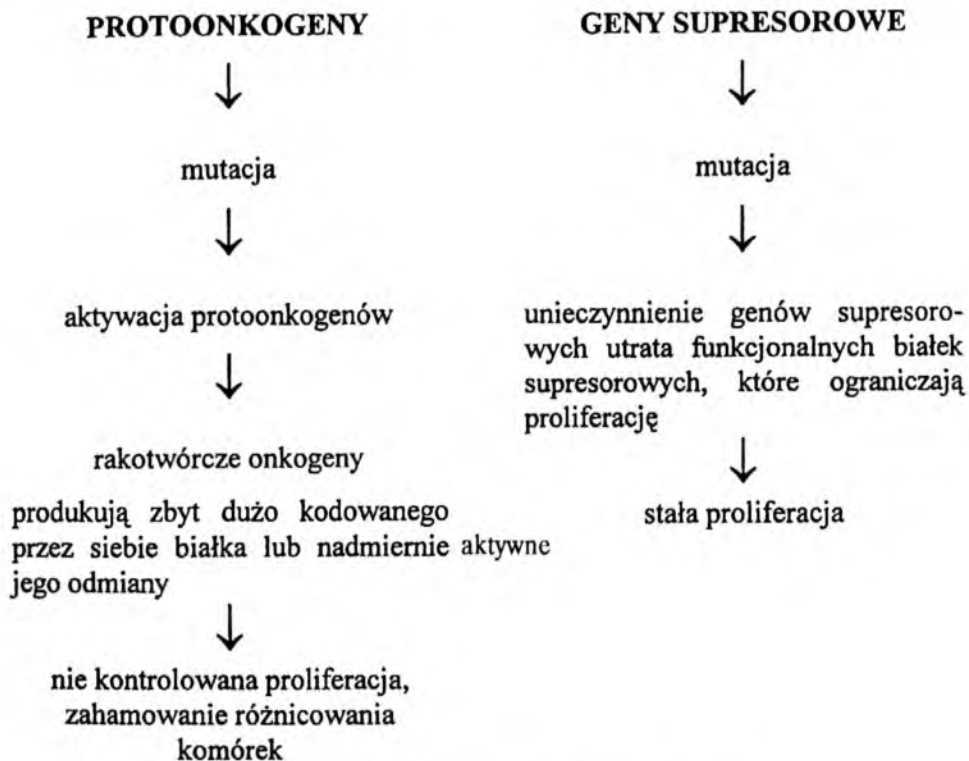
Według *Horsta* [24] przewaga rakotwórczych onkogenów i niedobór czynników supresorowych powoduje wzrost nowotworowy, natomiast mała ilość onkogenów z przewagą czynników supresorowych zapobiega powstawaniu nowotworów.

Do wyjaśnienia roli onkogenów i protoonkogenów w procesie kancerogenezy przyczyniły się wyniki badań nad rolą, jaką w komórce odgrywają prawidłowe odpowiedniki tych genów po zadziałaniu różnych mitogenów, w tym czynników wzrostu. Protoonkogeny kodują białka uczestniczące na szlakach transdukcji czyli przekazywania sygnału mitogenowego od receptora czynnika wzrostu, poprzez cytoplazmę do jądra komórki. Produkty tych genów mogą zatem działać jako czynniki wzrostu, receptory dla czynników wzrostu oraz kinazy tyrozynowe związane z czynnikami wzrostu, jako białka wiążące GTP (białka G, Ras), cytoplazmatyczne enzymy o aktywności kinaz białkowych oraz mogą pełnić rolę czynników transkrypcyjnych na poziomie jądra komórkowego.

Należy zaznaczyć, że zarówno transdukcja sygnału mitogenowego jak i cykl komórkowy obejmują złożoną sekwencję zdarzeń; co więcej nie istnieje jeden wspólny mechanizm sygnalizacji mitogennej. Z uwagi na ograniczoną objętość artykułu transmisja sygnału jak i cykl komórkowy przedstawione zostały jedynie w ogólnym zarysie (Ryc. 2).

Postuluje się, że większość protoonkogenów koduje białka o aktywności tyrozynowych kinaz białkowych. Z biochemicznego zatem punktu widzenia regulacja proliferacji komórek przez protoonkogeny polega na fosforylacji i defosforylacji białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału mitogenowego. Badania ostatnich lat dostarczyły sze-

<sup>2)</sup> Zmiany w materiale genetycznym przekazywane komórkom potomnym.

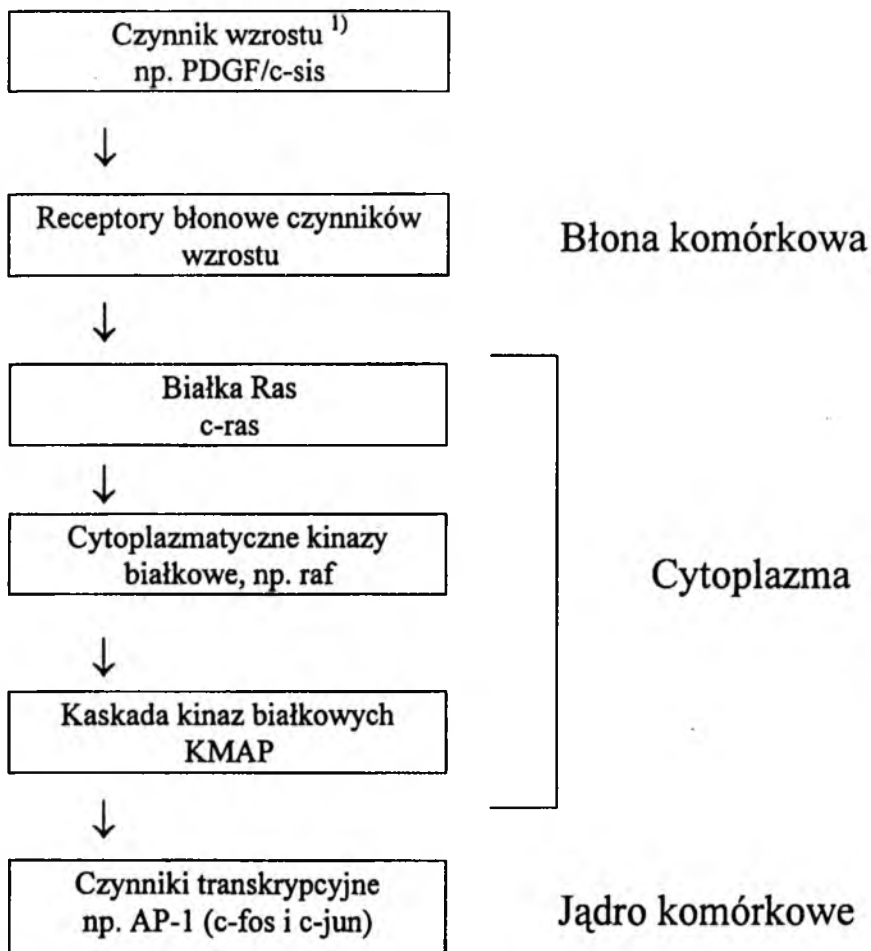


Ryc. 1. Aktywacja protoonkogenów i nieczynnienie genów supresorowych  
Activation of protooncogenes and inactivation of suppressor genes

regu interesujących faktów odnośnie białkowych kinaz tyrozynowych, natomiast brak jest wyczerpujących informacji odnośnie odpowiednich fosfataz (PTPs) [13, 20].

Receptory polipeptydowych czynników wzrostu m.in. płytkowopochodny czynnik wzrostu (PDGF) i czynnik wzrostu naskórka (EGF) są białkami transbłonowymi wykazującymi aktywność kinaz tyrozynowych [32]. Fragment receptora wystający poza błonę komórkową stanowi receptor dla czynnika wzrostu, natomiast wewnątrzcytoplazmatyczna domena receptora wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej. Interakcja czynnika wzrostu z receptorem komórki docelowej prowadzi do autofosforylacji reszt tyrozynowych występujących w domenie cytoplazmatycznej receptora, dzięki czemu zyskuje on zdolność wiązania i fosforylowania (aktywacji) licznych białek uczestniczących na szlakach molekularnych transdukcji sygnału [4].

Obecnie uważa się [4], że w odpowiedzi na stymulację przez większość receptorów błonowych, odpowiadają niskocząsteczkowe białka Ras, które uczestniczą w aktywacji kinaz białkowych należących do grupy tzw. kinaz aktywowanych przez czynniki mitogenne (kinazy MAP) – kluczowe ogniwo łańcucha kolejno aktywowanych kinaz białkowych, tworzących kaskadę fosforylacji zwaną kaskadą MAPK. Ta z kolei aktywuje w jądrze komórki czynniki transkrypcyjne. Jednym z najlepiej poznanych czynników jest czynnik transkrypcyjny AP-1. Tworzą go białka – produkty protoonkogenów c-fos



1) płytkowopochodny czynnik wzrostu

Ryc. 2. Uproszczony schemat udziału protoonkogenów w transdukcji sygnału  
Simplified scheme of protooncogenes participation in signal transduction

i c-jun, które w postaci homodimeru (Jun-Jun) bądź heterodimeru (Fos-Jun) wiążą się z określoną sekwencją DNA i aktywują zależne od niego geny uczestniczące w cyklu komórkowym.

Z przytoczonych informacji wynika, że głównym ogniwem omawianego mechanizmu są niskocząsteczkowe białka, produkty protoonkogenów z rodziny c-ras. Białka te wiążą GTP i wykazują aktywność GTPazy. Aktywacja białek Ras zachodzi poprzez wymianę związanego z nimi GDP na GTP; natomiast inaktywacja jest wynikiem hydrolizy GTP, zachodzącej dzięki wykazywanej przez białka Ras aktywność GTPazy. Białka Ras są zatem doskonale przystosowane do pełnienia swej funkcji z uwagi na szybkie reago-

wanie na bodźce, „włączanie” i „wyłączanie” sygnalizacji. Mutacje w protoonkogenach c-ras pozbawiają białka Ras aktywności GTPazy, prowadząc w ten sposób do ich permanentnej aktywacji; stale więc napędzają sygnały stymulujące wzrost komórki, nawet wtedy, gdy nie są stymulowane czynnikami wzrostu.

Mechanizmy prowadzące do wyłączania kaskady MAPK do chwili obecnej nie zostały dobrze poznane. Wydaje się, że pewną rolę mogą odgrywać tutaj fosfatazy białkowe m.in. specyficzna dla kinazy MAP-fosfataza (MAP-kinase Phosphatase) [13].

Opisano też inny, alternatywny mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego AP-1 [29]. Szlak ten prowadzi poprzez fosfolipazy (aktywowane przez receptorowe kinazy tyrozynowe), które hydrolizując fosfatydyloinozytole tworzą tzw. „wtórne przekazniki informacji”: 1,4,5-trifosfoinozytol ( $IP_3$ ) mobilizujący jony  $Ca^{+2}$  oraz 1,2-diacylglicerol (DAG), który stymuluje kinazę białkową C (PCK zależną od jonów  $Ca^{+2}$ ). W wyniku aktywacji kinazy białkowej C dochodzi, poprzez kaskadę kinaz białkowych, do aktywacji czynnika transkrypcyjnego AP-1 stanowiącego ostatnie ogniwo transdukcji sygnału z cytoplazmy do jądra.

Do jądra prawidłowej komórki oprócz sygnałów stymulujących docierają z sąsiednich komórek również sygnały hamujące wzrost, na podobnych szlakach molekularnych, współdziałających z cząsteczkami przekaznikowymi – produktami białkowymi genów supresorowych. Mutacje omawianych protoonkogenów i prawdopodobnie genów supresorowych pobudzają szlaki stymulujące komórkę do wzrostu, utrzymując je w ciągłej aktywności, podczas gdy powinny być „wyłączone”.

Nadmierna stymulacja mechanizmów odpowiedzialnych za transdukcję sygnału mitogenowego nie jest jednak wystarczająca, aby komórka nabrała cech komórki nowotworowej, tj. by podlegała niekontrolowanej, nadmiernej proliferacji. Większość, a być może wszystkie ludzkie nowotwory, rosną nie tylko z powodu zakłóceń na szlakach sygnalizacyjnych, lecz także wskutek zaburzeń w przebiegu cyklu komórkowego [18, 24, 25, 64]. Złożony aparat molekularny w jądrze prawidłowej komórki integruje informacje docierające ze szlaków stymulujących i hamujących; jeżeli przeważa pierwszy z nich komórka wchodzi w cykl komórkowy obejmujący 4 fazy. W fazie  $G_1$  (przerwa 1) komórka zwiększa swoją masę i przygotowuje się do replikacji DNA w fazie S, w której komórka podwaja DNA i tym samym podwaja zestaw chromosomów. Następnie komórka wchodzi w fazę  $G_2$  (przerwa 2) przygotowując się do fazy M (mitozy). Podczas mitozy powiększona komórka macierzysta dzieli się na dwie komórki potomne, z których każda zyskuje kompletny zestaw chromosomów. Komórki potomne natychmiast wchodzi w fazę  $G_1$  i mogą ponownie przejść przez cykl, albo zatrzymać go na jakiś czas lub na stałe.

Ten szczegółowo opracowany cykl zdarzeń programuje i reguluje aparat molekularny, w który wyposażone jest jądro komórki [24, 25, 65]. Cykl komórkowy regulują:

1. dwa podstawowe białka cyklu (rozpatrywane jako produkty protoonkogenów) tzw. kinazy cyklino-zależne (CDK-Cyclin Dependent Kinasse), które tworząc kompleksy, inicjują poszczególne fazy cyklu komórkowego [18, 24, 25, 65],

2. inhibitory CDK m.in. białka supresorowe p-15, p-16, p-21 i p-27, warunkujące działanie określonych kinaz w zdefiniowanych fazach cyklu komórkowego oraz fosforylowanie przez kinazy określonych substratów [19]. Obecnie ustalił się pogląd, że zaburzenia kontroli przebiegu cyklu komórkowego są kluczowe dla procesu nowotwo-

rowego. Istotną rolę w procesie nowotworowym przypisuje się zmianom efektywności działania CDK na skutek zaburzeń syntezy podjednostek regulatorowych kinaz – cyklin, a także w wyniku braku lub upośledzenia syntezy białkowych inhibitorów CDK, hamujących aktywność kompleksu cyklina-CDK [18, 19, 64, 65]. Zdolność do przejścia komórek przez poszczególne fazy cyklu ograniczają dodatkowo inne białka hamujące – w tym m.in. produkty najlepiej poznanych i opisanych genów supresorowych: białko RB i p53 [24, 25, 35, 36]. Nieufosforylowane białko RB spełnia funkcję hamującą, blokując cykl komórkowy w fazie G<sub>1</sub>, dzięki wychwytywaniu czynników transkrypcyjnych. Gen RB zostaje „włączony” po dodaniu do białek Rb odpowiedniej ilości reszt fosforanowych, znosząc jego hamujący efekt i umożliwiając komórce wejście w fazę G<sub>1</sub>, a następnie w fazę S. Tak więc białko Rb jedynie w postaci nieufosforylowanej wykazuje aktywność przeciwnowotworową.

Niezwykle ciekawą cząsteczką regulatorową o właściwościach supresorowych jest produkt genu supresorowego – białko p53, często nazywane strażnikiem genomu [36], ponieważ w normalnych warunkach monitoruje „stan zdrowia” komórki, integralność chromosomalnego DNA oraz pomyślne zakończenie poszczególnych faz cyklu komórkowego. W przypadku, gdy DNA ulega uszkodzeniu gen p53 gromadzi się i blokuje cykl w fazie G, zapewniając komórce czas na usunięcie i naprawę uszkodzeń. W większości przypadków uszkodzenia DNA są szybko korygowane przez sprawnie działające układy naprawcze obecne w każdej komórce. Jeżeli jednak system naprawy myli się lub nie potrafi usunąć uszkodzenia DNA, białko p53 uruchamia proces zaprogramowanej śmierci komórki tzw. apoptozę, która eliminuje nieprawidłową komórkę ze środowiska [47]. Wadliwe (zmutowane) cząsteczki p53 umożliwiają zarówno przeżycie komórek z uszkodzonym DNA, jak i jego replikację; w konsekwencji uszkodzenie materiału genetycznego jest przekazywane komórkom potomnym jako trwała mutacja. W wielu ludzkich nowotworach występuje nadmierna aktywność białek stymulujących – cyklin, kinaz CDK [18, 64]. Udowodniono też występowanie unieczynnionego białka RB i p53, co eliminuje dwa podstawowe czynniki hamujące cykl komórkowy; w konsekwencji komórka nie reaguje na zewnętrzne sygnały hamujące i zaczyna dzielić się bez przerwy [23, 24, 25, 64, 65].

W tym miejscu należy wspomnieć, że komórki prawidłowe mają jeszcze jeden genetycznie zaprogramowany system, który zabezpiecza przed niekontrolowaną, nadmierną proliferacją [28]. System ten liczy i ogranicza liczbę wszystkich podziałów, jakie komórka przechodzi w ciągu swojego życia. Są to odcinki DNA na końcu chromosomów, zwane telomerami, które decydują o liczbie podziałów. Telomery nieznacznie się skracają podczas każdego podwajania się chromosomów w fazie S cyklu komórkowego. Skrócenie się telomerów poniżej pewnej wartości progowej nakazuje komórce wejście w okres starzenia się. Jednakże podczas rozwoju większości komórek nowotworowych następuje aktywacja genu kodującego enzym, zwanego telomerazą, który niweczy nadzieje na skuteczność tej ostatniej obrony. Telomeraza odbudowuje bowiem segmenty telomerów; w konsekwencji komórki zaczynają się dzielić w nieskończoność i stają się nieśmiertelne. Nieśmiertelne komórki nie mają jednak cech złośliwych.

Posiadamy zatem ogromną wiedzę na temat genetycznych uwarunkowań niekontrolowanej, nadmiernej proliferacji komórek; nadal jednak niewiele wiadomo o mutacjach genów uczestniczących w ostatnim etapie rozwoju nowotworów (inwazji).

Rola substancji chemicznych w procesie kancerogenezy.

Dla zobrazowania roli substancji chemicznych w kancerogenezie, należy szczegółowo omówić wieloetapowy charakter rozwoju nowotworów [60].

INICJACJA	PROMOCJA	PROGRESJA	INWAZJA
uszkodzenie DNA	Proliferacja	Destabilizacja	
- mutacje		genomu	
----->	----->	----->	----->
1. Genotoksyczne związki chemiczne	1. Czynniki wzrostu	1. Dodatkowe mutacje w genach,	
2. Genotoksyczne czynniki fizyczne	2. Hormony	głównie w genach	
3. Błędna synteza DNA	3. Niegenotoksyczne substancje chemiczne	supresorowych.	

Ryc. 3. Wieloetapowy proces kancerogenezy (wg *Greena*) [16]  
The multistep process of carcinogenesis

Należy zaznaczyć, że komórki guza pochodzą od jednej komórki, która zwykle dziesiątki lat przed ujawnieniem się nowotworu zainicjowała program nieprawidłowego namnażania się, czyli nieprawidłowej proliferacji. Termin inicjacja określa zatem pierwsze, trwałe i nieodwracalne zmiany dotyczące głównie genów sterujących i kontrolujących prawidłowy przebieg proliferacji (protoonkogeny i geny supresorowe). Proponowanymi czynnikami inicjującymi są: promieniowanie UV i jonizujące, genotoksyczne substancje chemiczne oraz błędy w replikacji DNA [16]. Zainicjowana nowotworowo komórka może pozostać w utajeniu przez długi i nieokreślony okres czasu, jeśli nie zadziałają czynniki wspomagające. Dlatego też następny etap, tj. etap promocji, określany jest jako proces, w którym następuje selektywny wzrost zainicjowanych komórek – do stanu widocznej klinicznie zmiany o łagodnym charakterze. Przejawem klonalnego wzrostu np. w wątrobie gryzoni jest powstawanie ognisk hepatocytów (AHF = altered hepatic foci) różniących się morfologicznie. Ten etap rozwoju nowotworów jest do pewnego momentu odwracalny i uwarunkowany działaniem czynników niegenotoksycznych. Wg *Greena* [16] promotorami wzrostu nowotworowego mogą być czynniki wzrostowe, hormony oraz grupa niegenotoksycznych substancji chemicznych posiadających zdolność do stymulowania proliferacji komórek. Etap promocji budzi jednak najwięcej kontrowersji. Nie ma bowiem pewności czy jest on obligatoryjny dla wszystkich nowotworów i we wszystkich lokalizacjach narządowych. Nie wiadomo też czy istnieje jeden wspólny, czy też kilka alternatywnych mechanizmów promocji. Oddziaływanie czynników promocyjnych jest bowiem wielostronne i zróżnicowane. Etap progresji ma swoje odzwierciedlenie w kumulowaniu się w komórkach coraz większej liczby zmutowanych genów (dodatkowe mutacje genów, głównie genów supresorowych); doprowadza to w końcu



do destabilizacji (rozchwiania) funkcji genów i do powstawania klonów komórek najbardziej przystosowanych do automatycznego wzrostu.

Badania na zwierzętach potwierdzają, że wśród chemicznych kancerogenów można wyróżnić:

1. kancerogeny niekompletne, tj. związki mutagenne posiadające zdolność do inicjacji procesu nowotworowego,
2. czynniki wspomagające, tj. niegenotoksyczne i niemutagenne związki, tzw. promotory wzrostu nowotworowego, które wspomagają i przyspieszają proces nowotworowy,
3. kancerogeny kompletne, które posiadają zdolność do inicjacji procesu nowotworowego i dopełniają go na drodze promocji.

Aby chemiczny kancerogen genotoksyczny lub niegenotoksyczny uczestniczył w rozwoju procesu nowotworowego – musi być zachowana pewna kolejność zdarzeń. Obejmuje ona narażenie na czynnik chemiczny, jego absorpcję i transport do docelowej tkanki. Genotoksyczne kancerogeny mogą bezpośrednio uszkadzać DNA; szereg jednak genotoksycznych związków, tzw. prokancerogeny, wymagają w ustroju aktywacji metabolicznej do reaktywnych metabolitów, które uszkadzają DNA i w wyniku błędnej naprawy lub braku naprawy DNA – indukują mutacje w docelowych komórkach (Ryc. 4).

Postuluje się, że głównym mechanizmem, przez który środowiskowe genotoksyczne kancerogeny wywołują proces nowotworowy jest aktywacja protoonkogenów i unieczynnienie genów supresorowych. W tabeli I przedstawiono mutacje tych genów w nowotworach indukowanych przez wybrane kancerogeny chemiczne. Z informacji tych wynika, że genotoksyczne związki m.in. typu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i N-nitrozozwiązki indukują mutacje punktowe (typu transwersji i tranzycji) w protoonkogenach K-ras i H-ras, głównie u myszy i rzadziej u szczura. Unieczynnienie genu supresorowego p53 na drodze mutacji stwierdzono w nowotworach myszy, szczura i człowieka po narażeniu m.in. na benzo(a)piren, metylocholanren, butadien i aflatoksynę B<sub>1</sub>. Przedstawione dowody eksperymentalne przemawiają na rzecz genetycznego podłoża choroby nowotworowej. Tymczasem wzrasta lista substancji chemicznych obejmujących zanieczyszczenia przemysłowe, rozpuszczalniki, leki oraz środki ochrony roślin, które nie uszkadzają DNA i nie indukują mutacji, natomiast w długookresowych badaniach żywieniowych wywołują nowotwory u zwierząt laboratoryjnych. W dwustopniowym modelu kancerogenezy, inicjowanej czynnikami genotoksycznymi, szereg niegenotoksycznych kancerogenów oddziałuje na etapie promocji (promotory wzrostu nowotworowego) (tabela II) [15, 16, 42, 43].





Tabela I. Mutacje protoonkogenów i genów supresorowych w nowotworach indukowanych przez wybrane kancerogeny chemiczne  
Mutations in protooncogenes and suppressor genes in human and rodent tumors

Gen	Związek kancerogeny	Rodzaj mutacji	Rodzaj nowotworu	Gatunek	Piśmien- nictwo
1	2	3	4	5	6
K-ras	N-acetoksymetylo- metylo-nitrozoamina	tranzykcje GC/AT w 12 kodonie	nowotwór płuc	mysz	41
	aflatoksyna B1	transwersje GC/TA i tranzykcje GC/AT	pierwotny nowotwór wątroby, nowotwór płuc	szczur, mysz AC3F1	11
	benzo(a)piren	tranzykcje GC/AT i transwersje GC/TA w 12 kodonie	nowotwór płuc	mysz A/J	7,20,39, 45,62
	benzo(b)fluorantren	tranzykcje GC/AT i transwersje GC/TA w 12 kodonie	nowotwór płuc	mysz A/J	39
	7H-dibenzo(c,g)karbazol	transwersje AT/TA w 61 kodonie	nowotwór płuc	mysz A/J	62
	dibenzo(a,l)piren	transwersje CG/AT i tranzykcje AT/CG w 12 kodonie, transwersje w 61 kodonie	nowotwór płuc	mysz A/J	45
	1,2-dimetylohydrazyna	tranzykcje GC/AT	nowotwór okrężnicy	człowiek	26,37
	1,8-dinitropiren	transwersje GC/TA		mysz	20
	karbaminian etylu	tranzykcje GC/AT	nowotwór płuc		7,20
	3-metylocholanren	mutacje punktowe	włóknak mięsakowy	mysz	2,9
	metylo-(metoksyme- tylo)-nitrozoamina	tranzykcje GC A/T i transwersje GC/TA w 12 kodonie	nowotwór nerek	szczur F344	41
	N-metylo-N-nitrozo- mocznik	tranzykcje GC/AT	nowotwór płuc		7,20
	nitrogliceryna triazotan gliceryny	transwersje GC/TA w 12 kodonie	nowotwór wątroby	szczur F344	59
	N-nitrozodimetyloamina	tranzykcje GC/AT w 12 kodonie	nowotwór płuc, nowotwór nerek	mysz, szczur F344	5,9,41

Tabela I c.d.

H-ras	chloroform	mutacje punktowe w kodonie 61	nowotwór wątroby, gruczolaki	mysz BC6C3F1	14
	chlerek metylenu	tranzycje i tranzwersje w kodonie 61	nowotwór płuc, nowotwór wątroby	mysz	10
	siarczek 2-chloroetylo-metylowy	transwersje CG/AT w 61 kodonie, transwersje AT /TA i tranzycje AT/GC w 61 kodonie	nowotwór wątroby	mysz B6C3F1	56
	chlorowodorek benzydyny	transwersje AT/TA w 61 kodonie	nowotwór wątroby, gruczolaki	mysz B6C3F1	14
	7,12-dimetylobenzo(a)-antracen	transwersje AT/TA w 61 kodonie	nowotwór skóry, nowotwór sutka	mysz, szczur	2,20
	N-hydroksy-2-acetyloaminofluoren	mutacje punktowe w kodonie 61	nowotwór wątroby	mysz B6C3F1	5
	N-butylo-N-(4-hydroksy-butylo)-nitrozoamina	mutacje punktowe w kodonie 44		mysz	70
	N-metylo-N-nitrozo-mocznik	tranzycje GC/AT w 12 kodonie	nowotwór sutka	szczur	2
	karbaminian winylu	transwersje CG/AT w kodonie 61	nowotwór wątroby	mysz B6C3F1	5,20
	metyloklofibrat	mutacje punktowe w kodonach: 61, 117	nowotwór wątroby	mysz	55
p53	aflatoksyna B1	transwersje GC/TA w kodonie 249	pierwotny nowotwór wątroby, nowotwór płuc	linie kom. wątroby, człowieka, człowiek	31,38
	benzo(a)piren	transwersje GC/CG i transwersje GC/TA	nowotwór płuc, nowotwór wątroby	człowiek	33
	1,3-butadien	mutacje punktowe	nowotwór płuc, nowotwór wątroby	mysz B6C3F1	22
	metylocholanren	mutacje punktowe	włóknak mięsakowy	mysz	22

Tabela I c.d.

N-butylo-N-(4-hydroksy-butylo)-nitrozoamina	mutacje punktowe w kodonach: 135, 148, 159, 181, 186, 243, 252, 257, 263	nowotwór pęcherza moczowego	mysz NON/Shi	9,69,70
N-nitrozodimetyloamina	mutacje punktowe	nowotwór nerki, nowotwór przełyku	szczur	20
N-nitrozometylo-benzyloamina	tranzykcje GC/AT w kodonach: 131, 149, 153, 242, 243, 248	brodawczak przełyku	szczur F344	61
Chlorek metylenu	utrata heterozygotyczności	rak płuc	mysz B6C3F1	22

Tranzykcja – mutacja punktowa polegająca na zamianie jednej zasady purynowej (A-adenina lub G-guanina) na drugą purynową, czy też pirymidynowej (T-tymina lub C- cytozyna) na inną pirymidynową.

Transwersja – mutacja punktowa polegająca na zamianie zasady purynowej na pirymidynową lub odwrotnie.

Do niegenotoksycznych hepatokancerogenów i/lub promotorów raka wątroby zakwalifikowano związki z grupy tzw. proliferatorów peroksysomów (PPs)<sup>3)</sup> oraz induktorów cytochromu P-450 [15, 16, 17, 42, 43, 66]. Klasyczne promotory raka skóry wywodzą się z grupy estrów forbolu. Pomimo licznych badań mechanizmy leżące u podstaw oddziaływania związków rozpatrywanych jako niegenotoksyczne kancerogeny i/lub promotory wzrostu nowotworowego – nie zostały wyjaśnione. Co więcej – wyniki badań sugerują, że działają one na zasadzie wielu odrębnych mechanizmów. Stwarza to szereg problemów zarówno w ich wczesnej identyfikacji, jak i w ocenie ryzyka dla ludzi.

Należy podkreślić, że niegenotoksyczne kancerogeny i/lub promotory wzrostu nowotworowego mają wspólne cechy. Charakteryzują się one m.in. brakiem bezpośredniego oddziaływania na DNA i zdolnością do stymulowania proliferacji komórek w docelowych tkankach [6, 12, 15, 16]. Substancje chemiczne mogą wzmacniać proliferację bezpośrednio, na zasadzie wiązania się ze specyficznym receptorem komórkowym (mechanizm receptorowy) lub pośrednio – poprzez działanie cytotoksyczne i odnowę regeneracyjną (proliferaacja regeneracyjna) [6]. Co więcej, w wątrobie szczura stwierdzono dwie fazy wzrostu proliferacji hepatocytów: 1) namnażanie się komórek w pierwszych dniach podawania związków, następnie pomimo kontynuowania narażenia, proces proliferacji hepatocytów powraca do normy oraz 2) proliferację persystentną, utrzymującą się przez wiele miesięcy [15, 43].

<sup>3)</sup> Peroksysomy są cytoplazmatycznymi organellami występującymi we wszystkich komórkach ssaków, oprócz czerwonych ciałek krwi. W peroksysomach występują m.in. enzymy uczestniczące w  $\beta$ -oksydacji nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych o długich łańcuchach oraz katalaza rozkładająca produkt reakcji: nadtlenek wodoru do wody i tlenu. Narządem szczególnie bogatym w peroksysomy jest wątroba.

Tabela II. Wykaz wybranych niegenotoksycznych kancerogenów i/lub promotorów wzrostu nowotworowego

Some nongenotoxic carcinogens and/or tumor promoters

Związek	Rodzaj / miejsce nowotworu u zwierząt doświadczalnych	Oddziaływanie na etapie promocji
<b>LEKI</b>		
nafenopin <sup>1)</sup>	wątroba	
klofibrat <sup>1)</sup>	wątroba	
fenobarbital	wątroba	+
etinyloestradiol	wątroba, macica, sutek	+
<b>PESTYCYDY</b>		
DDT i jego analogi	białaczka, wątroba, płuco	+
HCH	białaczka, wątroba	+
2,4-D	nowotwory o różnej lokalizacji	
2,4,5-T	wątroba	+
<b>ZANIECZYSZCZENIA PRZEMYSŁOWE, ROZPUSZCZALNIKI</b>		
chloroform	białaczka, nowotwory o różne lokalizacji	
trichloroetylen	białaczka, wątroba, płuco	
tetrachloroetylen	białaczka, gonady	
2,4-dichlorobenzen	białaczka	
kwas trichlorooctowy	wątroba	
PCB	skóra, układ limfatyczny i krwiotwórczy, wątroba	+
TCDD	nowotwory o różnej lokalizacji	+
ftalan dietyloheksylowy	wątroba	+
<b>INNE</b>		
estry forbolu	skóra	+
sacharyna	pęcherz moczowy	+
BHT	wątroba, żołądek	+

Można zatem sądzić, że przynajmniej utrzymująca się proliferacja hepatocytów może być przyczyną rozwoju nowotworowego. Jednakże rola proliferacji komórek *per se* w chemicznej kancerogenezie jest w dalszym ciągu niejasnym i kontrowersyjnym zagadnieniem i ma zarówno wielu zwolenników [63], jak i przeciwników [40].

Większość niegenotoksycznych kancerogenów i/lub promotorów wzrostu nowotworowego z omawianych grup substancji chemicznych, oprócz stymulowania proliferacji komórek wykazuje zdolność do hamowania tzw. komunikacji międzykomórkowej (Gap Junctional Intracellular Communication, GJIC) poprzez uszkodzenia struktur błonowych zw. połączeniami nekusus [8, 34, 48, 49]. Połączenia nekusus zbudowane z białek, zw. koneksynami, stanowią strefę łączącą cytoplazmę sąsiadujących komórek. Rola tych połączeń polega na wymianie jonowej i metabolicznej pomiędzy sąsiadującymi komórkami; ostatnio sugeruje się również przekazywanie sygnałów stymulujących i hamujących wzrost komórek przez połączenie nekusus. Utrwała się zatem pogląd, że komunikacja międzykomórkowa uczestniczy w regulacji proliferacji komórek i różnicowaniu [68], jak również może odgrywać istotną rolę w procesie kancerogenezy [67].

Hamowanie komunikacji międzykomórkowej pod wpływem niegenotoksycznych kancerogenów i/lub promotorów wzrostu nowotworowego w warunkach *in vivo* i *in vitro* przejawia się spadkiem liczby i przepuszczalności połączeń nekusus [48, 49, 68] oraz prawdopodobnie ekspresją genów (rozpatrywanych jako geny supresorowe), które kodują koneksyny. Modelowy promotor raka skóry: octan 12-O-tetradekanoiloforbolu (TPA) uszkadza połączenia nekusus [49]; związek aktywuje kinazę C zastępując endogenny aktywator tego enzymu – 1,2-diacylglicerol (DAG). Można zatem wnioskować, że obserwowane uszkodzenia połączeń nekusus pod wpływem TPA są wynikiem fosforylacji koneksyn przez kinazę białkową C, stymulowaną tym związkiem [49]. Podobne działanie wykazuje modelowy związek z grupy PPs – nafenopin [34].

Ostatnio wykazano, że niegenotoksyczne hepatokancerogeny i/lub promotory raka wątroby z grupy PPs i induktorów form molekularnych cytochromu P-450 posiadają jeszcze jedną wspólną cechę, a mianowicie zdolność hamowania apoptozy w zainicjowanych nowotworowo hepatocytach [50, 51, 53, 58]. Pochodne tego typu hamują zatem jeden z ważniejszych mechanizmów obronnych organizmu, którego rolą jest usuwanie ze środowiska uszkodzonych i zmutowanych komórek [47]. Uważa się, że hamowanie apoptozy sprzyja klonalnej ekspansji zainicjowanych komórek na etapie promocji [54].

Badania w zakresie mechanizmów leżących u podstaw oddziaływania niegenotoksycznych kancerogenów i/lub promotorów wzrostu nowotworowego wykazały, że pochodne tego typu działają na zasadzie mechanizmu receptorowego. TPA zastępuje 1,2-diacylglicerol, PPs aktywują w wątrobie gryzoni receptor jądrowy z rodziny hormonów steroidowych, który nazwano Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR $\alpha$ ); tworzy on heterodimer z innym receptorem retinoidowym X, który wiążąc się ze specyficzną sekwencją DNA oddziałuje na transkrypcję genów kodujących peroksisomalne enzymy i mikrosomalną formę cytochromu P-4504A [3, 17, 46, 52]. Ponadto należy zauważyć, że PPAR $\alpha$  wydaje się pośredniczyć zarówno we wzmożonej proliferacji hepatocytów [46], jak też w hamowaniu apoptozy [51] w odpowiedzi na oddziaływanie PPs. Na zasadzie mechanizmu receptorowego działają też związki z grupy induktorów form molekularnych cytochromu P-4501A i prawdopodobnie induktory form molekularnych cytochromu 2B [15, 16]. Udowodniono, że nieplanarne polichlorowane bifenyle (PCB) i dioksyny np. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyna (TCDD) – induktory form molekularnych P-4501A – wiążą się z cytoplazmatycznym receptorem zwanym receptorem Ah [52], który prawdopodobnie w postaci dimeru z innym białkiem wzmaga ekspresję genów kodujących odpowiednie formy molekularne cytochromu

mu P-450 i jest prawdopodobnie odpowiedzialny za plejotropowe oddziaływanie tej grupy induktorów enzymatycznych [52, 58].

Grupa induktorów cytochromu P-4502B obejmuje liczną grupę pestycydów chloroorganicznych m.in. DDT i jego analogi oraz modelowy promotor raka wątroby – fenobarbital. DDT zakwalifikowano do związków niegenotoksycznych o udowodnionym działaniu rakotwórczym dla zwierząt i prawdopodobnie rakotwórczym dla ludzi – grupa 2B (wg IARC, 1990). W dwustopniowym modelu hepatokancerogenezy inicjowanej DEN<sup>4)</sup> lub 2-AAF<sup>5)</sup> wykazano, że fenobarbital oraz DDT i jego analogi oddziałują na etapie promocji, w teście wymiany metabolicznej i jonowej pomiędzy komórkami hamują połączenia neksum oraz hamują apoptozę zainicjowanych hepatocytów [15, 42, 49, 53].

#### Podsumowanie

Na podstawie przyjętej obecnie koncepcji rozwoju nowotworów oraz przyjmując wieloetapowy charakter tego procesu można wnioskować, że aktywacja pojedynczego protoonkogenu lub unieczynnienie genu supresorowego nie wystarcza do wywołania pełnej transformacji nowotworowej. Natomiast kumulowanie się błędów genetycznych w prawidłowej komórce, tj. zmian przynajmniej w kilku niezależnych, ale współdziałających genach, może wyjaśniać złożoność i wieloetapowość procesu nowotworowego. Połowa wszystkich typów ludzkich nowotworów traci funkcjonalne białko p53 w wyniku mutacji punktowych: delecji i insercji, w niektórych nowotworach obserwowano nadmierną aktywność białek stymulujących – cyklin, CDK, unieczynnienie białka RB; udowodniono też obecność zmutowanych produktów genów c-ras.

Z przytoczonych w artykule przykładów (tabela I) wynika, że charakterystyczną cechą genotoksycznych kancerogenów, bez względu na ich budowę chemiczną – są obserwowane w nowotworach gryzoni i człowieka głównie mutacje punktowe (typu transwersji i tranzycji) w protoonkogenach c-ras i genie supresorowym p53. Jednakże w nowotworach płuc myszy indukowanych chlorkiem metylenu obserwowano oprócz mutacji punktowych w genie H-ras utratę heterozygotyczności (LOH)<sup>6)</sup> genu p53. Wynika z tego, że genotoksyczne substancje chemiczne oddziałują na szlakach transmisji sygnału mitotycznego, stymulując komórkę do wzrostu oraz wywołują zaburzenia w przebiegu cyklu komórkowego.

Wielu autorów preferuje pogląd, że niegenotoksyczne kancerogeny działające na zasadzie mechanizmu receptorowego, z uwagi na obserwowane różnice gatunkowe w ich działaniu, nie stwarzają większego ryzyka dla ludzi. Można się zgodzić z takim podejściem w przypadku fenobarbitalu i estrów forbolu, natomiast proponowany pogląd może być przedwczesny dla związków chemicznych z grupy PPs i induktorów cytochromu P-4501A. Np. Grupa Ekspertów Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem z siedzibą w Lyonie zakwalifikowała 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksynę do związków o rakotwórczym działaniu u ludzi – grupa 1 (IARC, 1997). Ostatecznym bowiem sprawdzianem czy określony związek może być zakwalifikowany do kategorii

<sup>4)</sup> 2-nitrozodimetyloamina.

<sup>5)</sup> 2-acetyloaminofluoren.

<sup>6)</sup> LOH – utrata drugiego allelu z powodu braku pierwszego z pary alleli – na skutek utraty całego chromosomu lub jego fragmentu



czynników rakotwórczych u ludzi są obserwacje kliniczne i badania epidemiologiczne. W powstawaniu bowiem nowotworów u ludzi, oprócz środowiskowych kancerogenów odgrywają rolę infekcje niektórymi wirusami, dysfunkcje hormonalne i układu odpornościowego, jak również predyspozycje genetyczne. Na zakończenie należy dodać, że znamy szereg substancji chemicznych, których rakotwórcze działanie udowodniono u ludzi narażonych zawodowo, tj. przy stałej ekspozycji na wysokie stężenia tych związków. Natomiast rola, jaką chemiczne zanieczyszczenia środowiska odgrywają w procesie nowotworowym jest trudna do udokumentowania i dokładnej oceny. Wynika to z faktu, że organizm człowieka narażony jest jednocześnie na wiele różnych czynników kancerogennych występujących w środowisku w niskich stężeniach. Utrwalił się jednak pogląd, że zanieczyszczenia środowiska są co najmniej przyczyną raka płuc i pęcherza.

D. Palut, G. Kostka, M. Adamczyk

#### MOLECULAR MECHANISMS OF CHEMICALLY INDUCED CARCINOGENESIS

##### Summary

In this review recent point of view concerning the molecular mechanisms of chemically induced carcinogenesis is presented. The new and promising trends of neoplasia investigations are based on discovery of protooncogenes and tumor suppressor genes, which maintain tissue homeostasis by controlling cellular proliferation and differentiation. It is generally recognised, that mutations induced by genotoxic carcinogens, particularly those resulting in activation of protooncogenes and inactivation of suppressor genes, play a crucial role in the initiation step of multistage process of tumorigenesis. Tumor promotion is recognized as a process whereby initiated cells are stimulated to selective growth and then, to develop into the cancer during progression step. Tumor promotion can be affected by many nongenotoxic carcinogens.

In this review the attention is given to the mutational activation of the c-ras oncogenes and inactivation of p53 suppressor gene in rodent and human cancers by genotoxic carcinogens. Moreover, the significance of nongenotoxic carcinogens and the mechanisms by which these compounds may accelerate tumorigenesis are discussed.

#### PIŚMIENNICTWO

1. *Anderson M.W., Reynolds S.H., You M.*: Role of proto-oncogenes activation in carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 1992, 98, 13.
2. *Barbacid M.*: Mutagens, oncogens and cancer. Reprinted from *Trends in Genetics*. 1986, 2, 187.
3. *Barrett J.C.*: Mechanisms for species in receptor-mediated carcinogenesis. *Mut. Res.*, 1995, 333, 189.
4. *Biedermann R.W.*: Kinazy MAP i ich rola w regulacji poziomu, składu podjednostkowego oraz stopnia fosforylacji czynnika transkrypcji AP-1. *Postępy Biochemii* 1966, 42, 244.
5. *Chen B., Liu L., Castonguay A., Maronpot R.E., Anderson M.W., You M.*: Dose-dependent ras mutation spectra in N-nitrosodiethylamine induced mouse liver tumor and 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induced mouse lung tumors. *Carcinogenesis*, 1993, 14, 1603.
6. *Cohen S.M., Ellwien I.B.*: Cell proliferation in carcinogenesis. *Science*, 1990, 249, 1007.
7. *Colapietro A.M., Goodell A.L., Smart R.C.*: Characterization of benzo(a)pyrene-induced mouse skin papillomas for H-ras mutations and protein kinase C-levels. *Carcinogenesis* 1993, 14, 2289.

8. *Cruciani V., Rast C., Durand M.J., Vasseur P.*: Comparative effects of clofibrate and methyl clofenape on morphological transformation and intracellular communication of Syrian hamster embryocells. *Carcinogenesis* 1997, 18, 701.

9. *Devereux T.R., Anderson M.W., Belinsky S.A.*: Role of ras proto-oncogene activation in the formation of spontaneous and nitrosamine-induced lung tumors in the resistant C3H mouse. *Carcinogenesis* 1991, 12, 299.

10. *Devereux T., Foley J.F., Maronpot R., Karl F., Anderson M.W.*: Ras proto-oncogene activation in liver and lung tumors from B6CF1 mice exposed chronically to methylene chloride. *Carcinogenesis* 1993, 14, 759.

11. *Donnelly P.J., Devereux T.R., Foley J.F., Anderson M.W., Massey T.E.*: Activation of K-ras in aflatoxin B<sub>1</sub> - induced lung tumors from AC3F1 (A/JxC3H/HeJ) mice. *Carcinogenesis* 1996, 17, 1735.

12. *Farber E.*: Hepatocyte proliferation in stepwise development of experimental liver cell. *Cancer Digestive Diseases and Sciences* 1991, 7, 973.

13. *Fischer E.H., Charbonneaus H., Tonks N.K.*: Protein tyrosine phosphatases a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 1991, 253, 401.

14. *Fox T.R., Schumann A.M., Watanable P.G., Yano W.B., Maher V.M., McCormick J.J.*: Mutational analysis of H-ras oncogene in spontaneous C57B1/6 x C3H/He mouse liver tumors and tumors induced with genotoxic and nongenotoxic hepatocarcinogens. *Cancer Res.* 1990, 50, 1014.

15. *Grasso P., Hinton R.H.*: Evidence for and possible mechanism of non-genotoxic carcinogenesis in rodent liver. *Mut. Res.* 1991, 248, 271.

16. *Green S.*: The search for molecular mechanisms of non-genotoxic carcinogens. *Mut. Res.* 1991, 371.

17. *Green S.*: PPAR: - a mediator of peroxisome proliferator action. *Mut. Res.*, 1995, 333, 101.

18. *Grzelakowska-Sztart B.*: Cykliny fazy G<sub>1</sub> cyklu komórkowego, ich funkcje i udział w nowotworzeniu. *Postępy Biochemii* 1966, 42, 99.

19. *Grzelakowska-Sztart B.*: Regulacja cyklu komórkowego - udział białkowych inhibitorów kinaz cyklicznych. *Postępy Biochemii* 1955, 41, 80.

20. *Guerrero I., Pellicer A.*: Mutational activation of oncogenes in animal model systems of carcinogenesis. *Mut. Res.* 1987, 185, 293.

21. *Hartłozńska-Szymańska A.*: Nowotwory jako choroba genów. *Postępy Biochemii* 1995, 41, 7.

22. *Hegi M.E.*: Characterization of p53 mutation in methylene chloride-induced lung tumors from B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 1993, 14, 803.

23. *Hollstein M., Ogelstein B., Harris C.C.*: p53 Mutations in human cancers. *Science* 1991, 253, 49.

24. *Horst A.*: Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek. *Post. Biol. Komórki* 1992, 19, 3.

25. *Horst A.*: Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego. *Post. Biol. Komórki* 1993, 20, 311.

26. *Jakson P.E., Hall C.N., O'Connor P.J., Cooper D.P., Margison G.P., Poverly A.*: Low O<sup>6</sup>-alkylguanine DNA-alkyltransferase activity in normal colorectal tissue is associated with colorectal tumors containing a GC → AT transition in the K-ras oncogene. *Carcinogenesis* 1997, 18, 1299.

27. *Jakóbsiak M.*: Onkogeny. *Post. Biol. Komórki* 1985, 289.

28. *Jaruga E.*: Telomerazowa hipoteza starzenia się komórek. *Postępy Biochemii* 1994, 40, 161.

29. Kamińska B., Mosieniak G., Wiśniewska M.: Współdziałanie czynników transkrypcji AP-1 i NFAT w procesie regulacji ekspresji genów. *Postępy Biochemii* 1966, 42, 120.
30. Kawiak J., Jakóbsiak M.: Niektóre funkcje kinaz białkowych i fosfataz związane z regulacją cyklu komórkowego i różnicowaniem komórek. *Post. Biol. Komórki* 1993, 20, 87.
31. Kazachlov Y., Khaoustov V., Yoffe B., Solomon H., Klintmalm G.D.B., Tanor E.: p53 Abnormalities in hepatocellular carcinoma from Unites State patients. *Carcinogenesis* 1966, 17, 2207.
32. Klein A.: Czynniki wzrostowe komórek somatycznych. *Post. Biol. Komórki* 1993, 20, Supplement 1, 18.
33. Kure E.H., Ryberg D., Wewer A., Philips D.H., Skang V., Bera R.: p53 mutations in lung tumor: relationship to gender and lung DNA adduct levels. *Carcinogenesis* 1966, 17, 2207.
34. Leibold E., Schwarz M.: Inhibition of intracellular communication of rat hepatocytes by nafenopin: involvement of protein kinase C. *Carcinogenesis* 1994, 15, 1265.
35. Levine A.J., Momand J., Finlay C.A.: The p53 supressor gene. *Nature* 1991, 351, 453.
36. Lane D.P.: Guardian of the genome. *Nature* 1992, 358, 15.
37. Lutz W., Krajewska B.: Onkoproteiny i antyonkoproteiny surowicy krwi jako biomarkery wczesnych skutków zdrowotnych powodowanych przez kancerogeny zawodowe i środowiskowe. *Med. Pracy* 1996, 46, 511.
38. Mace K., Aguilar F. et al.: Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced DNA adduct formation and p53 mutation in CYP451-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* 1997, 18, 1297.
39. Mass M.J., Abu-Sakra A., Roop B.C., Nelson G., Galati A.J., Stoner G.D., Nesnow S., Ross J.A.: Benzo(b)fluoranthene: tumorigenicity in strain A/J mouse lung, DNA adducts and mutations in the Ki-ras oncogene. *Carcinogenesis* 1966, 17, 1701.
40. Melnick R.L., Huff J., Barrett J.C., Lucier G., Portier C.J.: Cell proliferation and chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 1993, 101, Suppl. 5, 3-7.
41. Miginbotham K.G., Rice J.M., Reed C.D., Watatani M., Enomoto T., Anderson L.M., Oerantoni A.O.: Variant mutational activity of K-ras oncogene in renal mesenchymal tumors induced in newborn F344 rats by methyl(methoxymethyl)nitrosamine. *Carcinogenesis* 1996, 17, 2635.
42. Palut D., Kopeć-Szłęzak J., Kostka G.: Rola niegenotoksycznych substancji chemicznych w procesie kancerogenezy. *Farmacja Polska* 1996, 52, 449.
43. Palut D.: Proliferacja peroksyosomów a proces hepatocytokancerogenezy. *Roczniki PZH* 1997, 48, 1.
44. Pawełczyk T.: Izoenzymy fosfolipazy C specyficznie hydrolizujące fosfatydyloinozytyle i regulacja ich aktywności. *Post. Biochemii* 1966, 42, 290-298.
45. Prahalad A.G., Ross J.A., Nelson G.B., Roop B.C., King L.C., Mass J.M.: Bibenzo(a)pyrene-induced DNA adduction, tumorigenicity, and Ki-ras oncogene mutations in strain A/J mouse lung. *Carcinogenesis* 1997, 18, 1955.
46. Petets J.M., Cattley R.C., Gonzalez F.J.: Role of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis* 1997, 18, 2029.
47. Radziszewska E.: Fizjologiczna rola apoptozy. *Post. Biol. Komórki* 1955, 22, 247.
48. Ren P., Mechta P.P., Ruch R.J.: Inhibition of gap junctional intracellular communication by tumor promoter in connexin-43 and connexin 32-expressing liver cells: Cell specificity and role of protein kinase. *Carcinogenesis* 1998, 19, 169.
49. Rivedal E., Yamasaki H., Sanner T.: Inhibition of gap junctional intracellular communication in Syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. *Carcinogenesis* 1994, 15, 689.
50. Roberts R.A., Soames A.R., Gill J.H., James N.H., Wheeldon E.B.: Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations. *Carcinogenesis* 1995, 16, 1693.

51. Roberts R.A., James N.H., Woodyatt N., Tugwood J.D.: Evidence for the suppression of apoptosis by peroxisome proliferator activated receptor (PPAR $\alpha$ ). *Carcinogenesis* 1988, 19, 43.
52. Schwarz M., Buchmann, Stinchcombe S., Luebeck G., Moolgavkar S., Bock K.W.: Role of receptors in human and rodent hepatocarcinogenesis. *Mut. Res.* 1995, 33, 69.
53. Schulte-Hermann R., Trosiener L., Barthel G., Bursch W.: DNA synthesis, apoptosis and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res.* 1990, 50, 5127.
54. Schulte-Herman R., Bursch W., Grasl-Kraupp B., Mullauer B., Nedecky B.: Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. *Mut. Res.* 1995, 333, 81.
55. Stanley L.A., Blackburn D.R., Devereaux S., Foley J., Lord P.G., Anderson M.W.: Ras mutations in methylclofibrate-induced B6C3F1 and C57B1/10J mouse liver tumors. *Carcinogenesis* 1994, 15, 1125.
56. Sohn Y., Hong G., Liem A., Miller J.A.: Activity of H-ras oncogenes in male B6C3F1 mouse liver tumor induced by vinthionine or 2-chloroethyl methyl sulfide. *Carcinogenesis* 1966, 17, 1057.
57. Steven A., Matziger A., Keith A.C., Stonner G.D., Anderson W., Pereira M.A.: K-ras mutations in lung tumors from A/J and AJ x TSG-p53F1 mice treated with 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and phenyl isothiocyanide. *Carcinogenesis* 1955, 16, 2487.
58. Stinchcombe S., Buchmann A., Bock K.W., Schwarz M.: Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin mediated tumor promotion in rat liver. *Carcinogenesis* 1995, 16, 1271.
59. Tamano S., Ward J.M., Dawan B.A., Keefer L.K., Weghorst C.M., Calvet R.J., Henneman J.R., Ramljak D., Rice J.M.: Histogenesis and role of p53 and K-ras mutation in hepatocarcinogenesis by glyceryl trinitrate (nitroglycerin) in male F344 rats. *Carcinogenesis* 1966, 17, 2477.
60. Vogelstein B., Kinzler K.M.: The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* 1993, 9, 138.
61. Wang D., Weghors C.M., Calvet R.J., Stoner G.D.: Mutations in the p53 tumor suppressor gene in rat esophageal papilloma induced by N-nitrosomethylbenzylamine. *Carcinogenesis* 1966, 17, 625.
62. Warszawsky D., Talaska G., Jaeger J., Collins T., Galati A., You L., Stonner G.: Carcinogenicity, DNA adduct formation and K-ras activation by 7H-dibenzo(c,g) carbazole in strain A/J mouse lung. *Carcinogenesis* 1966, 17, 865.
63. Weinstein B.: Cell proliferation: Concluding remarks. *Environ. Health Perspect.* 1993, 101, Suppl. 5, 159.
64. Widlak P.: Wpływ uszkodzeń DNA regulację cyklu komórkowego. *Postępy Biochemii* 1977, 43, 85.
65. Wójcik C.: Mechanizmy regulacji cyklu komrkowego. *Post. Biol. Komórki* 1993, 20, 331.
66. Yamasaki H., Ashby J., Bignani H. et al.: Non-genotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project. *Mut. Res.* 1996, 353, 47.
67. Yamasaki H., Mesnil M., Omori Y., Mironov N., Krutovski H.: Intreacellular communication and carcinogenesis. *Mut. Res.* 1995, 333, 181.
68. Yamasaki H., Naus C.C.J.: Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis* 1996, 17, 1199.
69. Yamototo S., Chen T., Murai T., Mori S., Morimura K., Oohara T., Makino S., Tatematsu M., Wanibuchi H., Fukushima S.: Genetic instability and p53 mutations in metastatic foci of mouse urinary bladder carcinogenomas induced by N-butyl-N-(hydroxybutyl)-nitrosamine. *Carcinogenesis* 1997, 18, 1877.
70. Yamamoto S., Masui T., Murai T., Mori S., Oohara T., Makino S., Fucushima S., Tatematsu M.: Frequent mutations of p53 gene and infrequent H- and K-ras mutations in urinary bladder

carcinomas of NON/Shi mice treated with N-butyl-N-(4-hydroxy-butyl)-nitrosoamine. *Carcinogenesis* 1995, 16, 2363. 131.

Otrzymano: 1997.12.18