

Małgorzata Kalemba-Drożdż¹, Maria Kapiszewska¹

DESTABILIZACJA GENETYCZNA WYWOŁANA SKUMULOWANYM DZIAŁANIEM ZANIECZYSZCZEŃ ŚRODOWISKOWYCH I ESTROGENÓW²

Wszystkie organizmy są w sposób ciągły i nieunikniony narażone na kontakt z szeregiem egzogennych hydrofobowych związków ksenobiotycznych. Substancje te mają zdolność do przenikania lipidowych błon komórkowych i akumulacji w tkance tłuszczowej [1]. Zanieczyszczenia przemysłowe są źródłem powstawania związków o właściwościach mutagennych, cytotoksycznych, teratogennych i kancerogennych. Związki o podobnych właściwościach znajdujące się również w roślinach, nazywane są często ksenobiotykami. Do najczęściej badanych związków należą m.in.: dioksyny, aminy aromatyczne, benzopireny, benzoantarceny, polichlorowane bifenyle i nitrozaminy. Natomiast do najbardziej rakotwórczych i mutagennych zanieczyszczeń zalicza się wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (PAH, z ang.: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), wytwarzane głównie przy spalaniu węgla, ale także pochodne chlorku winylu [1]. Zwłaszcza te ostatnie są badane szczególnie intensywnie, gdyż wiele z nich ma działanie estrogenowe, a tym samym mogą wpływać na funkcję reprodukcyjną. Do organizmu zwierząt czy człowieka dostają się one przez układ oddechowy drogą kropelkową oraz przez układ pokarmowy wraz z zanieczyszczoną wodą lub żywnością [1-8]. Eliminacja lipofilnych ksenobiotyków jest uzależniona od ich metabolicznej transformacji przede wszystkim w wątrobie.

Ksenobiotyki ingerujące w steroidogenezę, podobnie jak skumulowana ilość estrogenów w całym okresie życia kobiety, mogą powodować destabilizację genetyczną, która zwiększa ryzyko chorób nowotworowych, takich jak rak piersi i narządów rozrodczych. Na całkowity czas życiowej ekspozycji wpływa m.in. wczesne rozpoczęcie miesiączkowania, krótki okres laktacji oraz późne wejście w menopau-

¹ Krakowska Szkoła Wyższa im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego.

² Stosowane skróty: AhR – receptor arylowych węglowodorów, ER – receptor estrogenowy, ERE – sekwencja rozpoznawana przez ER, PAH – policykliczne węglowodory aromatyczne, XRE – sekwencja rozpoznawana przez AhR, DNA – kwas deoksyrybonukleinowy.

zę. Zakłada się, iż kancerogenne właściwości 17β -estradiolu wynikają z ich zdolności do stymulacji proliferacji komórek lub/i z genotoksycznych właściwości metabolitów pośrednich estrogenów, głównie estrogenów katecholowych oraz generacji reaktywnych form tlenu. Ponadto estrogeny wykazują właściwości cytotoksyczne, teratogenne i kancerogenne.

Intensywna ekspozycja na ksenobiotyki w połączeniu z wysokim stężeniem estrogenów w organizmie prowadzi do współzawodnictwa o metabolizujące je enzymy, działające we wspólnych metabolicznych szlakach detoksykujących obydwie rodzaje związków. Niedobory tych enzymów wynikające zarówno z nadmiaru substratów, jak i niskiej aktywności enzymów mogą z kolei prowadzić do nasilenia produkcji wolnorodnikowych form metabolitów pośrednich oraz reaktywnych form tlenu. To one bezpośrednio uszkadzają materiał genetyczny komórki poprzez tworzenie adduktów DNA i/lub pęknięć nici DNA. Takie uszkodzenia w komórkach proliferujących mogą zainicjować proces kancerogenezy.

Wspólne szlaki kataboliczne ksenobiotyków i estrogenów

Proces inaktywacji hydrofobowych ksenobiotyków oraz estrogenów przebiega dwuetapowo. Pierwszym etapem (Faza I) usuwania ksenobiotyków jest ich hydroksylacja, czyli proces polegający na dołączeniu do nich grupy OH pochodzącej z rozkładu wody, po to, aby uczynić je związkami polarnymi, czyli rozpuszczalnymi w wodzie, które łatwo mogą być wydalone z organizmu. Procesom tym nie podlegają jednak ksenobiotyki dobrze rozpuszczalne w tłuszczach, a także polarne i kwaśne. Procesy hydroksylacji wymagają energii, co oznacza, że ich przebieg katalizują enzymy. Enzymy I fazy detoksyfikacji należą do monooksygenaz z grupy cytochromów P450, kodowanych przez rodzinę genów polimorficznych CYP. Poszczególne formy genu CYP pojawiły się w odpowiedzi na różnorodność w środowisku ksenobiotyków i związków chemicznych obecnych w łańcuchu pokarmowym. Oznaczane są numerami definiującymi cztery rodziny genów, litery oznaczają podrodziny. Na przykład CYP1A1, enzym kodowany przez silnie konserwowany ewolucyjnie gen metabolizujący związki z grupy PAH, takich jak: dioksyny, aminy aromatyczne, polichlorobifenyle i nitrozaminy, ale także metabolizujący estrogeny enzym CYP1A2, metabolizujący aflatoksyny, lub CYP2E1, metabolizujący etanol i chlorek winylu. Także CYP1B1 jest głównym enzymem odpowiedzialnym w równym stopniu za hydroksylację 17β -estradiolu, jak i związków heterocyklicznych, zanieczyszczających środowisko, takich jak np.: PAH, aminy aryłowe, TCDD (tetrachlorodibenzenodioksyny). CYP1B1 ulega konstytutywnej ekspresji, czyli niewymagającej działania czynników zewnętrznych. Ekspresja genu kodującego ten enzym jest także dodatkowo indukowana przez wspomniane heterocykliczne substraty za pomocą receptora aryłowęglowodorowego AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor). Oznacza to możliwość addytywnego działania obydwu związków, a tym samym znaczne zwiększenie poziomu uszkodzeń DNA w zanieczyszczonym środowisku np. w okresie owulacji czy ciąży, gdy stężenie estrogenu jest wysokie.

Zmiany polimorficzne, których efektem będzie wzrost aktywności enzymu, czyli np. mutacje w pojedynczym nukleotydzie, w tych genach, wydają się zwiększać ryzyko zachorowania na nowotwory hormonozależne. Pokazano np. związek pomiędzy obecnością polimorficznych form genu CYP1A1 a wzrostem ryzyka zapadnięcia na nowotwory piersi kobiet mających ten alternatywny allel. Jednak dopiero obecność w organizmie kobiet polichlorowanych bifenyli (PCB), pochodzących z zanieczyszczonego środowiska, ujawnia tę zależność. Przypuszczalnie indukowanie wzrostu ekspresji CYP1A1 przez te środowiskowe zanieczyszczenia podnosi hydroksylację w tkance piersiowej. Te hydrofilowe związki mają silne powinowactwo do DNA, powodując ich uszkodzenia i przyczyniając się do wzrostu ryzyka kancerogenezy.

Innymi związkami, pod których wpływem rośnie aktywność CYP1A2, enzymu odpowiedzialnego za 2-hydroksylację 17β -estradiolu i estronu, są: nikotyna, omeprazol, fenobarbital oraz rifampicyny [17]. Tak więc także palenie papierosów czy zażywanie pewnych leków wpływa na ryzyko nowotworzenia.

Inaktywacja hydroksylowych pochodnych

Szybkie i wydajne usunięcie z organizmu hydroksylowych metabolitów Fazy I, czyli zarówno estradiolu, jak i heterocyklicznych ksenobiotyków, wymaga, aby weszły one w reakcje koniugacji ze związkami drobnocząsteczkowymi, takimi jak np. glutation w tzw. Fazie II. Wszystkie reakcje koniugacji katalizują enzymy Fazy II. Koniugacje z glutationem katalizują transferazy glutationowe (GST). Inną drogą usuwania hydrofilowych związków jest przyłączenie grupy sulfonowej. Procesy acetylacji katalizują N-acetylotransferazy, które inaktywują reaktywne pochodne aromatycznych amin heterocyklicznych. Natomiast transferazy glukuronowe koniugują hydroksylowane związki aromatyczne z kwasem glukuronowym.

Do najbardziej interesujących szlaków metabolicznych usuwania metabolitów Fazy I należy koniugacja z grupami metylowymi. Reakcję tę katalizuje O-metyltransferaza katecholowa (COMT), kodowana przez polimorficzny gen. Gen zawierający polimorfizm w obrębie 3. eksonu, w którym nastąpiła zmiana adeniny na guaninę w kodonie 108 (w formie cytoplazmatycznej, a 158 w formie zasocjowanej z błoną) powoduje trzy lub czterokrotne zmniejszenie aktywności enzymatycznej COMT w porównaniu z aktywnością enzymu kodowanego przez allel dziki, czyli niezmutowany.

Głównymi substratami dla COMT są związki aromatyczne, zawierające ugrupowanie katecholowe. Oznacza to, że o aktywność tego enzymu współzawodniczą estrogeny, katecholaminy i flawonoidy. Te ostatnie związki, występujące w pokarmach roślinnych, herbacie i winie, mogą ograniczyć metylację katecholowych estrogenów, narażając komórki na ich genotoksyczne działania, zwiększając ryzyko nowotworów hormonozależnych.

Jedynie równowaga pomiędzy procesami I i II Fazy detoksyfikacji, czyli hydroksylacji i koniugacji, chroni komórki zarówno przed uszkodzeniami wywołanymi metabolitami pośrednimi powstającymi w metabolizmie estrogenów, jak i wy-

wołanymi ksenobiotykami. Brak zachowania tej równowagi może w konsekwencji prowadzić do utraty stabilności genetycznej komórek.

Działanie karcynogenne

Genotoksyczność hydroksylowanych metabolitów

Aktywowane metabolicznie związki aromatyczne mogą tworzyć addukty z zasadami azotowymi w DNA. Addukty DNA są stabilne lub podlegają procesom usuwania zasad, głównie zasad purynowych, czyli apurynacji. To, jakim procesom podlegają uszkodzone zasady azotowe, zależy od miejsca ataku węglowodorów aromatycznych na zasadę azotową. Silniejszy potencjał mutageny mają addukty depurynujące, w których wyniku pozostaje w nici DNA puste miejsce apurynowe, które zwiększa ryzyko błędnej naprawy lub nieprawidłowej syntezy materiału genetycznego. Utrwalenie takich błędów grozi utratą kontroli nad podziałami komórkowymi, prowadząc do transformacji nowotworowej.

Także obecność aktywowanych związków heterocyklicznych może prowadzić do nasilenia się stanu stresu oksydacyjnego. W trakcie cyklicznych reakcji utleniania i redukcji hydroksylowanych pochodnych związków aromatycznych z udziałem tlenu cząsteczkowego jest generowany anionorodnik nadtlenkowy. Może być on redukowany enzymatycznie lub nieenzymatycznie do nadtlenku wodoru i dalej do innych reaktywnych form tlenu (RFT). Produkty pośrednie tych przemian mają wystarczający potencjał, aby modyfikować zasady azotowe, wprowadzać pojedyncze pęknięcia do nici i inne oksydacyjne uszkodzenia DNA. Oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe mogą działać także mutagenie lub blokować proces replikacji DNA. Ma to miejsce zwłaszcza wtedy, gdy komórkowe układy antyoksydacyjne, takie jak dysmutazy nadtlenkowe, katalaza, peroksydazy glutationowe, ulegają wyczerpaniu z związku z nadmiarem powstających elektrofilowych substratów.

Aktywne pochodne ksenobiotyków nie tylko uszkodzają DNA, lecz także mogą wiązać się kowalencyjnie do białek lub też je modyfikować oksydacyjnie, co sprzyja powstaniu krzyżowych wiązań z kwasem deoksyrybonukleinowym i zaburza jego strukturę, prowadząc do zahamowania replikacji. Jeżeli zostaną uszkodzone białka odpowiedzialne za replikację i naprawę DNA, to przebieg tych procesów zostanie zakłócony. Hydroksylowane aromatyczne węglowodory mogą również reagować z lipidami np. w błonach komórkowych, co skutkuje wzmożoną peroksydacją kwasów tłuszczowych. Wreszcie RFT generowane przez metabolity PAH mogą modulować sygnalizację wewnątrzkomórkową, prowadząc do poważnych zaburzeń w regulacji ekspresji genów. Wszystkie te procesy mogą skutkować mutagenezą.

Obecność w środowisku licznych policyklicznych związków aromatycznych zwiększa ryzyko zachorowania na nowotwory szczególnie u osób, których systemy ochronne są upośledzone, które np.: mają polimorficzne geny kodujące mniej aktywne formy enzymów II Fazy detoksyfikacji lub bardziej aktywne formy enzymów I Fazy.

Działanie poprzez receptory wewnątrzkomórkowe

Podobieństwo strukturalne PAH do naturalnych substancji steroidowych sprawia, że ich działanie może naśladować działanie hormonów. Obecność estrogenów może spowodować różnorodną odpowiedź organizmu. Pod ich wpływem dochodzi do proliferacji i różnicowania docelowych komórek, posiadających receptory estrogenowe (ER). Oddziaływanie hormonów steroidowych odbywa się poprzez receptory wewnątrzkomórkowe obecne w cytoplazmie i jądrze docelowych komórek. Kompleks receptora związanego z cząsteczkami estrogenu pełni rolę jądrowego czynnika transkrypcyjnego, który wiąże się do regulatorowych sekwencji EREs (Estrogen Response Elements) w rejonie promotorowym docelowych genów. W wyniku tego procesu materiał genetyczny staje się dostępny dla aktywnego kompleksu polimerazy RNA, co uruchamia proces transkrypcji. Hormony sterydowe poprzez odpowiednie receptory zmieniają całe profile ekspresji genów w komórkach, a nie tylko aktywność pojedynczych genów. Jednocześnie następuje indukcja lub supresja od ok. 50 do 100 różnych genów.

Istnieją także specyficzne receptory wewnątrzkomórkowe rozpoznające węglowodory aromatyczne AhR, które oddziałują poprzez XRE (Xenobiotic Response Element) w obrębie promotorów na ekspresję genów związanych np. z katabolizmem związków heterocyklicznych, analogicznie do szlaków sygnalizacji estrogenów. Nie poznano jeszcze dokładnie wszystkich mechanizmów komórkowych, na które mogą wpływać heterocykliczne związki aromatyczne poprzez receptorowe szlaki sygnalizacyjne. Receptory wewnątrzkomórkowe po związaniu liganda stanowią silne stymulatory transkrypcji genów, w tym również tych zaangażowanych w proliferację komórek. Jednoniciowe DNA, występujące podczas replikacji, jest bardziej podatne na uszkodzenia niż nieaktywne DNA o strukturze zamkniętej – dwuniciowej. Nagromadzenie się mutacji w obrębie genów lub rejonów regulatorowych odpowiedzialnych np. za proliferację, naprawę DNA czy apoptozę może prowadzić do transformacji nowotworowej komórek.

Szlaki sygnalizacyjne estrogenów i PAH przeplatają się. PAH mają zdolność oddziaływania nie tylko z receptorami aryłowymi AhR, lecz także z receptorami estrogenowymi ER. Stwierdzono, że niektóre aromatyczne związki heterocykliczne mają zdolność wiązania się do receptorów estrogenowych, powodując m.in. niekontrolowaną stymulację wzrostu komórek. Różne PAH wykazują działanie proestrogenowe lub do niego antagonistyczne w zależności od swojej struktury, która determinuje siłę i sposób wiązania do receptorów.

Ekspozycja organizmu na ksenobiotyki środowiskowe może prowadzić do zapoczątkowania i przyspieszenia procesu nowotworowego. Efektywność ich działania uwarunkowana jest wydajnością detoksyfikacyjnych procesów metabolicznych (Faza I i Faza II) zależnych od aktywności enzymów, kodowanych przez polimorficzne geny oraz obecnością estrogenów. Obydwa rodzaje związków współzawodniczą bowiem o te same enzymy, oddziałują również na komórki poprzez receptorowe szlaki komunikacji wewnątrzkomórkowej. Równoczesne działanie mutagennych ksenobiotyków i stymulacja podziałów komórkowych przez estrogeny prowadzą do zwiększenia ryzyka zajścia karcynogenezy. Ponadto ekspozycja organizmu na

aromatyczne węglowodory pochodzące z zanieczyszczenia środowiska prowadzi do utraty równowagi oksydacyjno-redukcyjnej komórki szczególnie przy wysokim stężeniu estrogenów, także zwiększając ryzyko transformacji komórek.

Bibliografia

- D. Liska, M. Lyon, D.S. Jones, *Detoxification and biotransformational imbalances*, t. 2, New York 2006, s. 122-140.
- J.E. Bohonowych, M.S. Denison, *Persistent binding of ligands to the aryl hydrocarbon receptor*, „*Toxicol Sci*” Vol. 98, 2007, nr 1, s. 99-109.
- A.B. Okey, *An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: the Deichmann Lecture, International Congress of Toxicology-XI*, „*Toxicol Sci*” Vol. 98, 2007, nr 1, s. 5-38.
- M. Moretti [et al.], *Primary DNA damage and genetic polymorphisms for CYP1A1, EPHX and GSTM1 in workers at a graphite electrode manufacturing plant*, „*BMC Public Health*” Vol. 7, 2007, nr 1, s. 270.
- O. Genbacev [et al.], *Disruption of oxygen-regulated responses underlies pathological changes in the placentas of women who smoke or who are passively exposed to smoke during pregnancy*, „*Reproductive Toxicology*” Vol. 17, 2003, nr 5, s. 509-518.
- F.P. Perera [et al.], *Biomarkers in maternal and newborn blood indicate heightened fetal susceptibility to procarcinogenic DNA damage*, „*Environmental Health Perspectives*” Vol. 112, 2004, nr 10, s. 1133-1136.
- S. Pavanello [et al.], *HPLC/fluorescence determination of anti-BPDE-DNA adducts in mononuclear white blood cells from PAH-exposed humans*, „*Carcinogenesis*” Vol. 20, 1999, nr 3, s. 431-435.
- T. Van de Wiele [et al.], *Human colon microbiota transform polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogenic metabolite*, „*Environmental Health Perspectives*” Vol. 113, 2005, nr 1, s. 6-10.