



Heterocykliczne aminy aromatyczne: charakterystyka i znaczenie w indukcji procesów nowotworowych

Anna Woziwodzka i Jacek Piosik

Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii,
Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna, Gdańsk

Heterocyclic aromatic amines and their role in the induction of carcinogenesis

Summary

Cancer is one of the most frequent causes of human death worldwide. It is a consequence of inherited DNA impairments or mutations induced by several exogenous factors. Diet is one of the most important exogenous factors, which is responsible for one-third cancer incidents in humans. Heterocyclic aromatic amines (HCA) arise during thermal processing of food. Based on the results on rodents and epidemiological data IARC classified HCA as probably (class 2A) or possibly (class 2B) carcinogenic to humans. After metabolic activation by cytochrome P450, *N*-hydroxy derivatives of HCA demonstrate strong mutagenic activity as they can form adducts with DNA. Experiments on laboratory animals indicated that HCA induce digestive tract, breast and lung cancers. Epidemiological data also confirm the association between HCA consumption and cancer appearance in humans. Although it is impossible to completely eliminate HCA from diet, there are several ways to limit the exposure to HCA and decrease their negative impact on human organisms.

Key words:

cancer, heterocyclic aromatic amines, food derived mutagens, cytochrome P450.

1. Wstęp

Choroby nowotworowe są wywołane uwarunkowanymi dziedzicznie nieprawidłowościami na poziomie DNA lub mutacjami powstałymi wskutek działania czynników środowiska. Jednym

Adres do korespondencji

Jacek Piosik,
Katedra Biologii
Molekularnej
i Komórkowej,
Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii,
Uniwersytet Gdański
i Akademia Medyczna,
ul. Kładki 24,
80-822 Gdańsk;
e-mail:
piosik@biotech.ug.gda.pl

z najistotniejszych takich czynników jest dieta, która odpowiada za jedną trzecią wszystkich przypadków nowotworów. Heterocykliczne aminy aromatyczne (HCA) należą do grupy związków kancerogennych powstających w wyniku termicznej obróbki żywności. Wedle klasyfikacji IARC z 1997 r., dokonanej na podstawie wyników badań na gryzoniach oraz danych epidemiologicznych, HCA zakwalifikowano jako związki prawdopodobnie (klasa 2A) lub możliwe (klasa 2B) kancerogenne dla ludzi.

HCA są metabolizowane za pośrednictwem enzymów I i II fazy metabolizmu ksenobiotyków. Powstałe w wyniku tych przemian reaktywne formy mogą wiązać się z DNA tworząc addukty, które, jeśli nie zostaną usunięte w wyniku skutecznej naprawy, mogą być odpowiedzialne za mutagenność tych związków. HCA u zwierząt laboratoryjnych indukują nowotwory w wielu narządach, m.in. w obrębie układu pokarmowego, piersi i płuc. Na podstawie wyników badań populacyjnych wskazuje się na powiązanie spożycia przez ludzi produktów zawierających HCA z większą częstością występowania u nich chorób nowotworowych. Całkowite wyeliminowanie HCA z diety jest niemożliwe, jednak istnieje szereg sposobów pozwalających na ograniczenie spożycia tych związków oraz zminimalizowanie negatywnych efektów ich działania w organizmie.

2. Przyczyny występowania chorób nowotworowych

Choroby nowotworowe stanowią jedną z najczęstszych przyczyn śmierci. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia z 2002 r. na świecie co roku na raka umiera ponad 7 milionów osób, co stanowi 12,6% wszystkich przypadków śmierci (1).

Pojawienie się nowotworu przebiega wieloetapowo. Pierwszym etapem jest inicjacja nowotworowa normalnych komórek, która może być wywołana bezpośrednim oddziaływaniem mutagenów z DNA, jak to się dzieje w przypadku HCA. Zazwyczaj chemiczne mutageny atakują DNA tworząc addukty. Addukty te w przypadku niezadziałania mechanizmów naprawczych mogą prowadzić do zmian w sekwencji DNA, które mogą być utrwalone w procesie replikacji. W konsekwencji może dojść do mutacji somatycznej (lub wielu mutacji somatycznych), a zainicjowane komórki mogą utracić kontrolę różnicowania, proliferacji i apoptozy przekształcając się w komórki nowotworowe. Kolejnym etapem powstawania nowotworu jest promocja. Komórki nowotworowe na skutek dalszej proliferacji mogą utworzyć łagodny guz nowotworowy. Należy podkreślić, że zmiany nowotworowe zachodzące podczas etapów inicjacji i promocji są odwracalne. Następnie może dojść do nieodwracalnego etapu progresji nowotworu. Zachodząca angiogeneza może doprowadzić do przerzutów komórek nowotworowych do odległych narządów (2).

Bezpośredni związek z procesem kancerogenezy mogą mieć mutacje w genach związanych z kontrolą cyklu komórkowego, transdukcją sygnału, naprawą DNA, stabilnością chromosomów, metaboliczną aktywacją/detoksykacją ksenobiotyków, jak

również te zaangażowane w działanie receptorów i neurotransmiterów czy pełniące funkcje immunologiczne (3). Występowanie takich mutacji może być uwarunkowane dziedzicznie czynnikami genetycznymi lub też czynnikami środowiskowymi (4). Na podstawie analiz przeprowadzonych na bliźniętach wskazuje się, że rola dziedzicznych czynników genetycznych w rozwoju nowotworów jest stosunkowo niewielka. Na ich podstawie stwierdzono, że uwarunkowania genetyczne są odpowiedzialne za 42% nowotworów prostaty, 35% nowotworów okrężnicy oraz 27% nowotworów piersi; pozostałe przypadki zachorowań na te nowotwory są związane z czynnikami środowiskowymi (5). Potwierdzeniem istotności roli środowiska w powstawaniu chorób nowotworowych są prace przeprowadzone na emigrantach z Polski. Zauważono, że ryzyko zachorowania takich osób na niektóre nowotwory po osiedleniu się w Stanach Zjednoczonych, czy też Australii zbliżyło się do poziomu obserwowanego w danym kraju (6,7).

3. Środowiskowe czynniki kancerogenne

Spośród czynników środowiskowych przyczyniających się do powstawania chorób nowotworowych najczęściej wymienia się czynniki związane ze stylem życia, takie jak: palenie papierosów, spożywanie alkoholu, niewłaściwa dieta oraz rodzaj wykonywanego zawodu. Prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworu zwiększa się również u osób po przebytych infekcjach bakteryjnych (wywołanych przez np. *Helicobacter pylori*) oraz wirusowych (m.in. wirusowe zapalenie wątroby typu B i C, zakażenia wirusami brodawczaka i Epsteina-Barr). Na częstość występowania nowotworów wpływają ponadto zanieczyszczenia wody i powietrza, przyjmowane leki (m.in. preparaty hormonalne, środki stosowane w chemioterapii nowotworów) oraz promieniowanie jonizujące (8,9). Bardzo istotnym czynnikiem środowiskowym wpływającym na zapadalność na nowotwory jest dieta, która może stanowić bezpośrednią przyczynę nawet jednej trzeciej wszystkich nowotworów (10,11). Szacuje się, że poprzez zmianę przyzwyczajeń żywieniowych możliwe byłoby uniknięcie nawet 75% przypadków raka prostaty, 70% przypadków raka jelita grubego oraz 50% zachorowań na raka piersi, trzustki, pęcherza żółciowego i śluzówki macicy (11). Według raportu AICR (American Institute for Cancer Research) z 1997 r. spożywanie posiłków wysokokalorycznych zwiększa prawdopodobieństwo zachorowania na raka trzustki, a osoby otyłe łatwiej zapadają na nowotwory śluzówki macicy, nerki, piersi, okrężnicy i pęcherza żółciowego. Wykazano również związek pomiędzy wysoką zawartością tłuszczu w pożywieniu a zachorowalnością na raka płuc, okrężnicy i odbytnicy oraz prostaty, natomiast częste spożywanie mięsa jest związane ze wzrostem występowania raka jelita grubego, trzustki, piersi, prostaty i nerki (12). Wiele obecnych w pożywieniu substancji kancerogennych, jak: mykotoksyna – aflatoksyna B₁, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne oraz heterocykliczne aminy aromatyczne (HCA), ma zdolność bezpośredniego oddziaływania z DNA (13). Afla-

toksyna B₁ występuje w wyniku zanieczyszczenia pleśniami orzechów i zbóż w czasie ich przechowywania i należy do najsilniejszych spośród wszystkich znanych kancerogenów ssaczych (14). Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne powstają w czasie obróbki termicznej żywności, np. podczas pieczenia, grillowania czy wędzenia (15), a w większych ilościach występują jako zanieczyszczenia powietrza i mogą odkładać się na powierzchni roślin uprawnych (16). Heterocykliczne aminy aromatyczne, podobnie jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, powstają w wyniku obróbki termicznej żywności (4).

4. Występowanie heterocyklicznych amin aromatycznych (HCA)

Pierwsze doniesienie o kancerogennym działaniu mięsa poddanego obróbce termicznej pochodzi już z 1939 r., kiedy zauważono, że ekstrakty z pieczonej koniny powodują powstawanie guzów piersi u myszy (17). W latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia stwierdzono, że dym powstający podczas pieczenia mięsa i ryb wykazuje działanie mutagenne wobec bakterii *Salmonella typhimurium* (18). Następnie, poprzez zastosowanie ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi i różnych rodzajów chromatografii kolumnowej wyizolowano aktywne składniki wykazujące działanie mutagenne i kancerogenne oraz określono ich strukturę (19). Odkryto, że grupą mutagenów/kancerogenów powstających podczas obróbki termicznej mięsa są heterocykliczne aminy aromatyczne (HCA). W tabeli 1 przedstawiono powszechnie stosowane skróty i pełne nazwy najczęściej występujących heterocyklicznych amin aromatycznych.

Tabela 1

Powszechnie stosowane skróty i pełne nazwy najczęściej występujących heterocyklicznych amin aromatycznych

| Skrót | Pełna nazwa |
|------------------------------|---|
| 1 | 2 |
| IQ | 2-amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinolina |
| MeIQ | 2-amino-3,4-dimetyloimidazo[4,5-f]chinolina |
| IQx | 2-amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinoksalina |
| MeIQx | 2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina |
| DiMeIQx | 2-amino-3,4,8-trimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina |
| 7,8-DiMeIQx | 2-amino-3,7,8-trimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina |
| 4-CH ₂ OH-8-MeIQx | 2-amino-4-hydroksymetylo-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina |
| PhIP | 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydyna |
| 4'-hydroksy-PhIP | 2-amino-6-(4-hydroksyfenilo)-1-metyloimidazo[4,5-b]pirydyna |
| Trp-P-1 | 3-amino-1,4-dimetylo-5H-pirydo[4,3-b]indol |
| Trp-P-2 | 3-amino-1-metylo-5H-pirydo[4,3-b]indol |

| 1 | 2 |
|----------------|---|
| A α C | 2-amino-9 <i>H</i> -pirydo[2,3- <i>b</i>]indol |
| MeA α C | 2-amino-3-metylo-9 <i>H</i> -pirydo[2,3- <i>b</i>]indol |
| Glu-P-1 | 2-amino-6-metylodipirydo[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazol |
| Glu-P-2 | 2-amino-dipirydo[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazol |

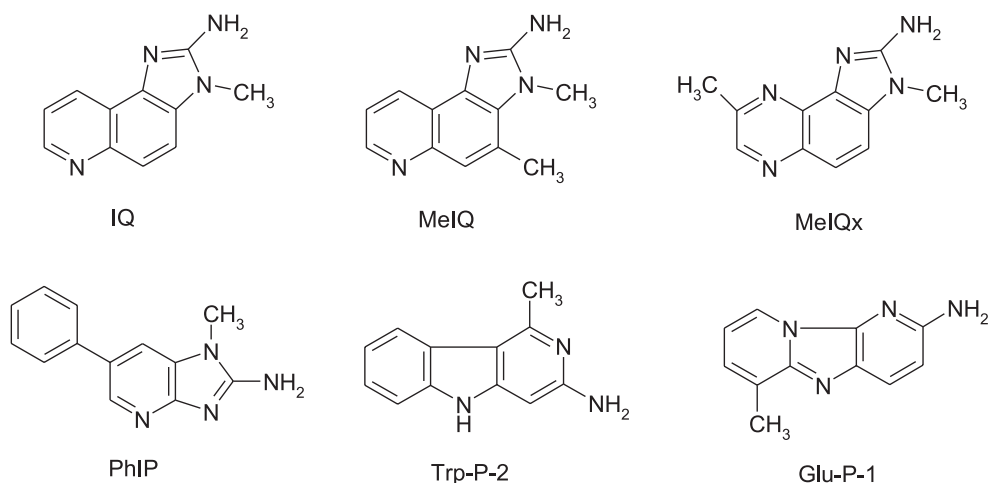
HCA występują w próbkach żywności w stężeniach rzędu ng/g próbki, a ich zawartość jest zróżnicowana w zależności od metody przygotowania i wzrasta wraz ze zwiększaniem temperatury obróbki termicznej. W tabeli 2 przedstawiono stężenia wybranych HCA w przykładowych produktach poddanych obróbce termicznej. Rezultaty uzyskane przez konkretne ośrodki badawcze mogą wykazywać znaczne różnice wynikające ze zmiennego składu prób poddawanych analizie, jak również z faktu trudnych do ujednoczenia warunków traktowania pokarmu. Można jednak stwierdzić, że najczęściej występującymi HCA w mięsie poddanym obróbce termicznej są PhIP i MeIQx, przy czym stężenia PhIP są wyższe niż stężenia MeIQx. Zawartość innych HCA, takich jak IQ, IQx, MeIQ, Trp-P-1, Trp-P-2, A α C i MeA α C zwykle nie przekracza 1ng/g (20). Oprócz żywności HCA zostały również wykryte w niskich stężeniach w powietrzu, wodzie deszczowej, ściekach komunalnych, dymie papierosowym, spalinach (21), dymie pochodzącym ze spalania drewna i gumy (22) oraz w próbkach wody pobranych z rzeki (23).

Tabela 2

Zawartość amin heterocyklicznych w wybranych produktach poddanych obróbce termicznej (26)

| Rodzaj produktu | Rodzaj obróbki termicznej | Stężenie [ng/g próbki] | | | | | | |
|------------------|---------------------------|------------------------|------|-------|-------------|------|---------|---------|
| | | IQ | MeIQ | MeIQx | 4,8-DiMeIQx | PhIP | Trp-P-1 | Trp-P-2 |
| wołowina | pieczenie | 0,19 | | 2,11 | | 15,7 | 0,21 | 0,25 |
| wołowina mielona | smażenie | | | 0,64 | 0,12 | 0,56 | 0,19 | 0,21 |
| kurczak | pieczenie | | | 2,33 | 0,81 | 38,1 | 0,12 | 0,18 |
| baranina | pieczenie | | | 1,01 | 0,67 | 42,5 | | 0,15 |
| dorsz | smażenie | 0,16 | 0,03 | 6,44 | 0,10 | 69,2 | | |

Ze względu na budowę chemiczną HCA można podzielić na dwie grupy: aminy grupy I, które po potraktowaniu 2 mM NaNO₂ tracą swoją aktywność mutagenną w wyniku zamiany reszty aminowej w hydroksylową, oraz aminy grupy II (aminy typu IQ), charakteryzujące się tym, że ich reszta aminowa nie ulega przemianie pod wpływem 2 mM NaNO₂ (4). Aminy grupy I są reprezentowane m. in. przez Trp-P-1,



Rys. 1. Struktury wybranych mutagennych amin heterocyklicznych. IQ: 2-amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinolina; MeIQ: 2-amino-3,4-dimetyloimidazo[4,5-f]chinolina; MeIQx: 2-amino-3,8-dimetyloimidazo[4,5-f]chinoksalina; PhIP: 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydyna; Trp-P-2: 3-amino-1-metylo-5*H*-pirydo[4,3-*b*]indol; Glu-P-1: 2-amino-6-metylodipirydo[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazol.

Trp-P-2, AαC, MeAαC, Glu-P-1 oraz Glu-P-2, natomiast do amin grupy II należą m. in. IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx i 7,8-DiMeIQx. Inny podział HCA obejmuje dwie klasy: aminowe pochodne imidazoazaarenów (imidazochinoliny, imidazochinoksaliny i imidazopirydyny) oraz aminokarbony (pirydoindole i pirydoimidazole) (20). Na rysunku 1 przedstawiono struktury wybranych HCA (4). W niektórych danych literaturowych wskazuje się, że powstawanie amin heterocyklicznych typu IQ (imidazochinolin i imidazochinoksalin) zachodzi poprzez reakcję Maillarda, z udziałem kreatyny lub kreatyniny, wolnych aminokwasów oraz cukrów (24). Udział tych samych prekursorów prowadzi do powstania imidazopirydyn (25). Z kolei aminokarbony produkowane są w czasie pirolizy aminokwasów i białek (4). HCA wykazują wysoką stabilność, zarówno gdy są używane jako składnik pokarmu do testów na gryzoniach, jak również w rozcieńczonych roztworach wodnych przeznaczonych do eksperymentów biologicznych (26).

5. Mutageność HCA

HCA wykazują silne działanie mutagenne w teście Ames, przewyższające mutagenność innych mutagenów występujących w pożywieniu, takich jak aflatoksyna B₁, benzo[α]piren (przedstawiciel wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych) czy też metyloglioksal obecny w kawie. W tabeli 3 przedstawiono wyniki mutagenności w teście Ames uzyskane dla HCA oraz innych mutagenów/kanceroge-

nów izolowanych z pożywienia. Należy jednak nadmienić, że podczas badań przeprowadzonych na ssaczych liniach komórkowych nie stwierdzono istnienia znaczących różnic w mutagenności tych związków. Może to wynikać z faktu aktywności enzymów estryfikujących, takich jak acetylotransferazy czy transferazy sulfoniano-we, występujących w komórkach ssaczych (26). Wszystkie badane HCA wykazują działanie mutagenne dopiero po aktywacji metabolicznej (27). W badaniach dotyczących mutagenności HCA na ssaczych liniach komórkowych wykazano, że ta grupa związków indukuje powstawanie charakterystycznych typów mutacji. Wykryto, że mutacje w genie *Ha-ras* u gryzoni potraktowanych MeIQ to głównie transwersje G:C na T:A, z kolei u zwierząt, którym podano PhIP zmiany dotyczyły głównie delecji G z sekwencji 5'-GGGA-3' genu *Apc* (28). Niezbędnym elementem struktury chemicznej decydującym o mutagennym działaniu HCA jest pierwszorzędowa grupa aminowa. Związki zbliżone pod względem budowy chemicznej do HCA, nie posiadające takiego ugrupowania są bardzo słabymi mutagenami lub wcale nie wykazują charakteru mutagennego (29). Ponadto wykazano szereg zależności pomiędzy strukturą a aktywnością mutageną HCA, takich jak: liczba pierścieni aromatycznych (im większa, tym większe działanie mutagenne) oraz rodzaj połączenia pomiędzy pierścieniami aromatycznymi (pierścienie sprzężone są silniejszymi mutagenami). Istotna jest również pozycja grup zawierających azot w odniesieniu do szkieletu aromatycznego cząsteczki (obecność takich grup wzdłuż długiej osi cząsteczki zwiększa charakter mutageny), a także obecność, liczba i położenie heterocyklicznego atomu azotu oraz występowanie pierścienia metyloimidazolowego połączonego z innym układem aromatycznym (chinoliną, chinoksaliną, naftalenem czy fenylopirydyną) (30). Niezwykle istotnym elementem związku struktury z aktywnością mutageną HCA jest grupa metylowa przyłączona do pierścienia aromatycznego. Otrzymana syntetycznie pochodna IQ posiadająca zdemetylowany pierścień imidazolowy wykazuje mutagenność 6 razy mniejszą od IQ (31). Również grupy metylowe na pierścieniach chinolinowych czy chinoksalinowych wpływają na wzrost mutagenności HCA (32).

Tabela 3

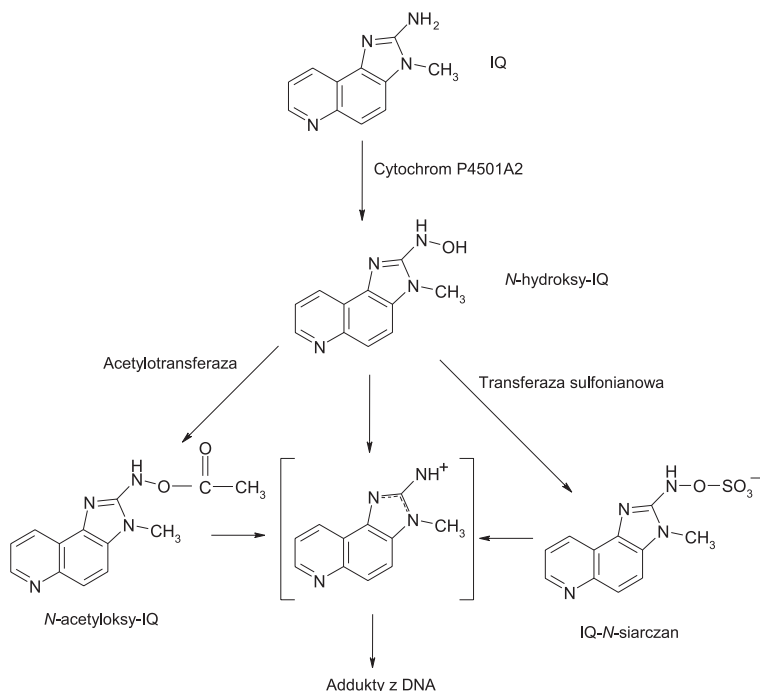
Mutagenne i rakotwórcze działanie niektórych składników żywności (91)

| Związek | Przykłady występowania | Mutagenność – test Ames (liczba kolonii rewertantów/ μ g) | Nowotwory u gryzoni |
|---------|----------------------------------|---|---------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| HAA | MeIQ | 661 000 | wątroba, żołądek |
| | MeIQx | 145 000 | pluca |
| | Trp-P-2 | 104 200 | wątroba, jelito cienkie i grube |
| | Glu-P-1 | 49 000 | |
| | mięso i ryby pieczone na ruszcie | | |

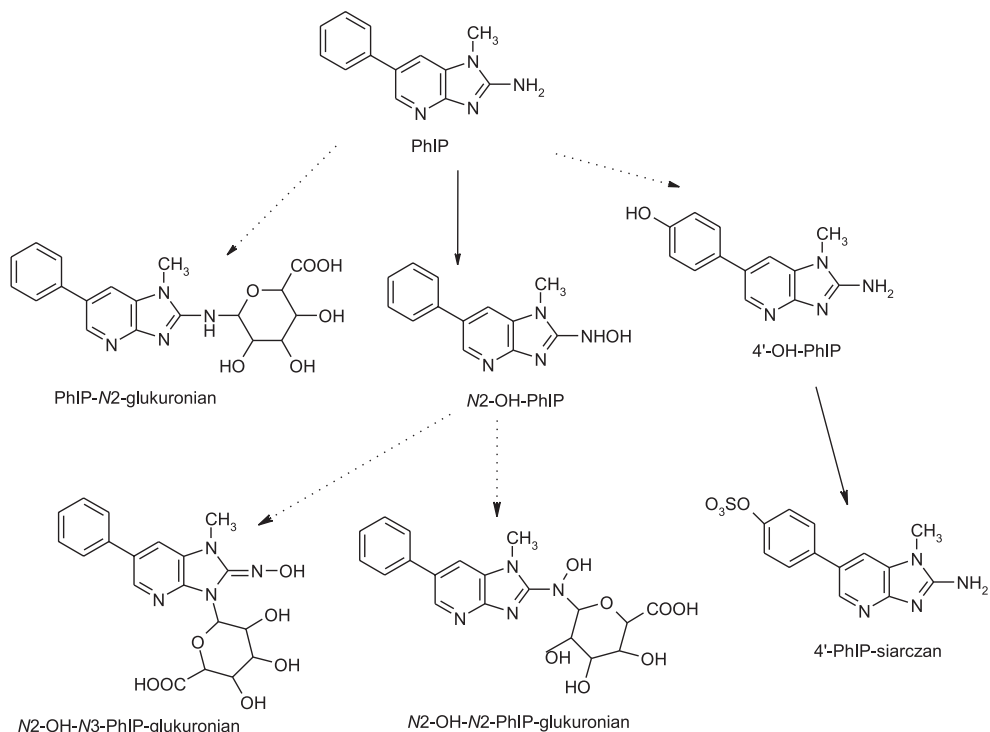
| 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------------------|-----------------|------|--------------------|
| Aflatoksyna B ₁ | kukurydza | 6000 | wątroba |
| N,N-dimetylonitrozoamina | peklowane mięso | 0 | pęcherz moczowy |
| Benzo[<i>a</i>]piren | wędzone ryby | 970 | skóra |
| Metyloglioksal | kawa | 100 | w miejscu iniekcji |

6. Aktywacja metaboliczna HCA

HCA wykazują znaczne działanie mutagenne dopiero po metabolicznej aktywacji, która polega przede wszystkim na przemianie tych związków do form elektrofilowych. Na rysunku 2 przedstawiono schemat aktywacji metabolicznej HCA na przykładzie IQ. Pierwszy etap aktywacji prowadzi do otrzymania *N*-hydroksylowych pochodnych, które mogą bezpośrednio wiązać się z DNA (27). *N*-hydroksylacja zachodzi z udziałem cytochromu P450. Zwielokrotnienie efektu genotoksycznego następuje po podaniu TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny), która jest indukto-



Rys. 2. Aktywacja metaboliczna IQ (27). Pierwszy etap aktywacji, zachodzący z udziałem cytochromu P 450, prowadzi do otrzymania *N*-hydroksylowych pochodnych, które mogą bezpośrednio wiązać się z DNA. Dalsze przemiany polegają na *O*-acetylowaniu i/lub *O*-siarczanowaniu. Tak otrzymane pochodne IQ charakteryzują się większą zdolnością oddziaływania z DNA w porównaniu z *N*-hydroksy-IQ.



Rys. 3. Ścieżki metabolizmu PhIP (92). Linią ciągłą zaznaczono przemiany prowadzące do powstania form aktywnych, natomiast linią przerywaną – form niereaktywnych. Znane są dwie drogi metabolizmu PhIP: aktywacja do *N*-hydroksy-PhIP oraz detoksykacja do 4'-hydroksy-PhIP. Dalsze drogi metabolizmu PhIP polegają na reakcjach sprzęgania. *N*-hydroksy-PhIP podlega estryfikacji przez transferazę sulfoniową i acetylotransferazę, co prowadzi do powstania wysoce elektrofilowych *O*-siarczanowych i *O*-acetylowych estrów (nie pokazano), jednak u ludzi dominującą przemianą jest glukuronidacja *N*-hydroksy-PhIP, co prowadzi do jego detoksykacji. 4'-hydroksy-PhIP może podlegać dalszym przemianom, polegającym na glukuronidacji (detoksykacja, nie pokazano) i siarczanowaniu. Istnieje również możliwość bezpośredniej glukuronidacji PhIP, co prowadzi do powstania związków niereaktywnych.

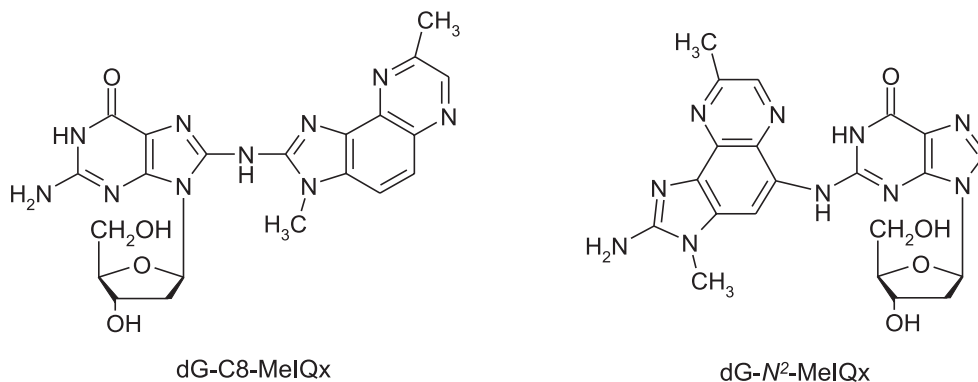
rem izoenzymów należących do rodziny CYP1A, co wskazuje na udział tej właśnie rodziny w aktywacji HCA. W kolejnych doświadczeniach dowiedziono, że głównie odpowiedzialny za aktywację jest izoenzym CYP1A2, podczas gdy izoenzym CYP1A1 wykazuje jedynie nieznaczną aktywację badanych HCA (33). W innych analizach wskazuje się, że oprócz CYP1A2 oraz CYP1A1 w metabolizmie HCA bierze udział również izoenzym CYP1B1 (34). Fakt jego konstytutywnej ekspresji w większości tkanek, m.in. okrężnicy czy piersi może mieć istotne znaczenie dla rozwoju zmian nowotworowych indukowanych HCA w tych właśnie miejscach. Należy nadmienić, że we wszystkich tkankach poza wątrobą aktywacja metaboliczna HCA może również zachodzić z udziałem syntazy prostaglandyny H (35). Dalsze przemiany HCA polegają na *O*-acetylacji i/lub *O*-siarczanowaniu. Wykazano doświadczalnie, że enzy-

my takie jak acetylotransferaza i transferaza sulfonianowa odpowiednio 30-krotnie i 5-krotnie zwiększają kowalencyjne wiązanie *N*-hydroksy-HCA do DNA (36). Należy zaznaczyć, że obok *O*-acetylacji prowadzącej do aktywacji HCA, *N*-acetylotransferazy przeprowadzają również reakcje *N*-acetylacji, powodującą detoksykację tych związków (37).

Dominującym mutagenem występującym w żywności jest PhIP należący do aminowych pochodnych imidazoazaarenów. Szacuje się, że stanowi 75% całkowitej masy związków genotoksycznych izolowanych z żywności poddanej obróbce termicznej (38). PhIP wykazuje stosunkowo słabą aktywność mutagenną w testach na bakteriach (w porównaniu z IQ czy MeIQ), stwierdzono jednak, że działanie mutagenne tego związku na komórkach ssaczych jest większe niż innych HCA (39). Drogi przemian PhIP przedstawione zostały schematycznie na rysunku 3. Znane są dwie drogi metabolizmu PhIP: aktywacja do *N*-hydroksy-PhIP oraz detoksykacja do 4'-hydroksy-PhIP (40,41). Obie formy powstają przy udziale cytochromu P450, przy czym izoenzym CYP1A2 w większości prowadzi do wytworzenia formy mutagennej: *N*-hydroksy-PhIP, natomiast CYP1A1 produkuje więcej związku inaktywowanego: 4'-hydroksy-PhIP (42). Dalsze drogi metabolizmu PhIP polegają na reakcji sprzęgania. *N*-hydroksy-PhIP podlega estryfikacji przez transferazę sulfonianową i acetylotransferazę, co prowadzi do powstania wysoce elektrofilowych *O*-siarczanowych i *O*-acetylowych estrów (43). Natomiast 4'-hydroksy-PhIP podlega dalszym przemianom, prowadzącym do glukuronidacji i siarczanowania (44). W literaturze wskazuje się, że główną drogą w metabolizmie PhIP u ludzi jest glukuronidacja. Obejmuje ona tworzenie koniugatów bezpośrednio z PhIP, jak i z *N*-hydroksy-PhIP i w obu tych przypadkach prowadzi do powstania związków niereaktywnych (45,46).

7. Tworzenie przez HCA adduktów z DNA

HCA, tak jak większość chemicznych mutagenów/kancerogenów, tworzą addukty z DNA. Aby do tego doszło, wymagana jest ich aktywacja metaboliczna do *N*-hydroksylowych pochodnych z charakterystyczną silnie elektrofilową grupą aminową. Takie pochodne mogą bezpośrednio reagować z nukleofilowymi miejscami w DNA (np. w pozycji C8 lub *N*² guaniny) tworząc addukty (47). Reaktywność ta może zostać dodatkowo zwiększona poprzez estryfikację *N*-hydroksylowych pochodnych siarczanem czy octanem, przeprowadzaną przez enzymy II fazy (36). Doświadczenie, w którym przeprowadzono reakcje *N*-hydroksylowych pochodnych IQ i MeIQx z deoksynukleotydami wykazało, że HCA tworzą addukty z deoksyguanozyną głównie w pozycji C8, oraz w niewielkiej ilości w pozycji *N*² tego deoksynukleotydu (48). Na rysunku 4 przedstawiono struktury adduktów MeIQx z deoksyguanozyną. Addukty z pozostałymi deoksynukleotydami nie zostały stwierdzone. U małąp karmionych IQ największa ilość adduktów z DNA pojawiła się w wątrobie (28,6 adduktów/10⁷ nukleotydów), w której zachodzi metabolizm HCA. Mniejsze ilości adduk-



Rys. 4. Struktury adduktów MeIQx z deoksyguanozyną. Enzymatycznie aktywowane *N*-hydroksylo-we pochodne HCA lub ich estry posiadają silnie elektrofilową grupę aminową reagującą z zasadami azo-towymi w DNA. Tworzenie adduktów zachodzi głównie w pozycji C8 deoksyguanozyny, oraz w niewiel-kiej ilości w pozycji N² tego deoksynukleotydu (47).

tów wykryto w nerce, sercu i pęcherzu moczowym. Natomiast PhIP tworzyła najwięcej adduktów w sercu (12 adduktów/ 10^7 nukleotydów), znacznie mniej wykryto kolejno w wątrobie, śliniance i nerce (27). U ludzi, którym podano PhIP przed zabiegiem usunięcia guzów okrężnicy, wykazano obecność w zdrowej tkance adduktów z DNA w ilości 35-135 adduktów/ 10^{12} nukleotydów. Ponadto zauważono, że PhIP tworzy addukty z białkami obecnymi w okrężnicy oraz białkami krwi: albuminą i hemoglobina (49). Tworzenie adduktów białkowych przez PhIP, mimo że najprawdopodobniej nie jest związane z kancerogenezą, również znajduje się w kręgu zainteresowań badaczy ze względu na możliwość wykorzystania takich adduktów jako wewnątrzustrojowego wskaźnika ekspozycji na PhIP oraz poziomu jej aktywacji (50).

Addukty HCA z DNA są odpowiedzialne za powstawanie zmian genetycznych prowadzących do kancerogenezy (26). Należy jednak pamiętać, że poziom adduktów nie musi być powiązany z prawdopodobieństwem wystąpienia nowotworu. Wynika to z faktu inicjacji kancerogenezy przez addukty tylko w przypadku nieskutecznej naprawy w krytycznych genach i/lub uniknięcia apoptozy. Jako przykład służyć mogą doświadczenia z wykorzystaniem szczurów Fischer-344 karmionych IQ. Addukty stwierdzono w wątrobie, płucach, nerkach, żołądku, okrężnicy, leukocytach i jelicie cienkim. Nowotwory powstawały jedynie w wątrobie, okrężnicy i jelicie cienkim. Nie obserwowano nowotworów płuc, nerek i żołądka, mimo że ilość adduktów w tych organach była wyższa niż w okrężnicy i jelicie cienkim. Można zatem wnioskować, że inicjacja kancerogenezy spowodowana obecnością adduktów HCA-DNA jest inna w obrębie różnych tkanek (47).

8. Kancerogenność HCA

W celu określenia aktywności kancerogennej HCA przeprowadzono szereg badań z wykorzystaniem gryzoni. W doświadczeniach przeprowadzonych na myszach wykazano, że HCA zwiększają ryzyko powstania nowotworów wątroby, żołądka, płuc, chłoniaków i białaczek. U szczurów karmionych HCA guzy rozwijały się w okrężnicy, jelicie cienkim, wątrobie, mózgu, gruczole piersiowym, skórze i jamie ustnej. W przeciwieństwie do większości HCA, PhIP nie wywołuje raka wątroby, zarówno u myszy, jak i u szczurów. Jest z kolei odpowiedzialny za rozwój chłoniaków u myszy, u szczurów wywołuje nowotwory okrężnicy i gruczołu piersiowego (26). Bardzo niepokojące są doniesienia, w których wskazuje się, że HCA zawarte w żywności są wydzielane do mleka samic szczurów i powodują powstawanie adduktów DNA w wątrobach karmionych noworodków, co może prowadzić do inicjacji procesu transformacji nowotworowej (51). W badaniach z wykorzystaniem ssaków naczelnych potwierdzono kancerogeny charakter HCA; np. IQ podawane makakom powodowało rozwój raka wątroby (4).

Zarówno gryzonie, mały, jak i ludzie posiadają zdolność do aktywowania HCA. Co więcej, w badaniach z użyciem mikrosomów wątroby wykazano, że aktywacja HCA jest silniejsza u ludzi niż u innych naczelnych, czy gryzoni (52). Profil metabolizmu PhIP w ludzkich i szczurzych hepatocytach wskazuje na międzygatunkowe różnice w przekształcaniu tego związku. W ludzkich hepatocytach dominowała droga prowadząca do otrzymania silnie genotoksycznej, *N*-hydroksylowej pochodnej PhIP, szczurze hepatocyty przekształcały PhIP głównie do związku inaktywowanego: 4'-hydroksy-PhIP (44). Wykazano ponadto, że ilości adduktów PhIP oraz MeIQx w ludzkich tkankach są wyższe niż u gryzoni, po podaniu odpowiednich dawek tych HCA (53). Dane te świadczą, że kancerogeny wpływ HCA na ludzi może przewyższać efekty rakotwórcze obserwowane u zwierząt laboratoryjnych.

Wyniki prac populacyjnych dotyczących związku między spożyciem HCA a zapadalnością na nowotwory są niejednoznaczne. W diecie zachodniej (europejskiej, amerykańskiej itp.) główne źródło HCA stanowi smażone i grillowane mięso (54). Wyznacznikiem ekspozycji na HCA w przeprowadzonych analizach była ilość oraz sposób przygotowania potraw mięsnych. Zauważono 4,6-krotnie wyższe ryzyko zachorowania na raka piersi u kobiet spożywających mięso poddane silnej obróbce termicznej w porównaniu do kobiet preferujących mięso średnio lub słabo wysmażone (55). W innych analizach wskazuje się, że spożywanie mięsa o silnie zarumienionej powierzchni zwiększa ryzyko zachorowania na raka okrężnicy i odbytnicy, odpowiednio 2,8 i 6 razy (56). Ryzyko zachorowania na raka trzustki jest 1,7 razy większe u ludzi spożywających smażone lub grillowane mięso raz w tygodniu i około 13,4-krotnie większe w przypadku konsumpcji takich potraw prawie codziennie (57). Stwierdzono również większą zapadalność na raka układu moczowego wśród ludzi spożywających smażone mięso przynajmniej raz w tygodniu (58).

Wykazano ponadto związek między częstym jedzeniem czerwonego mięsa a ryzykiem zachorowania na raka żołądka i przełyku (59). Jednakże dostępne są prace świadczące o braku związku pomiędzy ilością spożywanego HCA a częstością występowania nowotworów. W analizach przeprowadzonych na populacji Holendrów nie wykazano korelacji pomiędzy częstością spożywania potraw mięsnych oraz sposobem ich przygotowania a zapadalnością na gruczolaka jelita grubego. W tych samych badaniach nie wykazano jednak związku pomiędzy ryzykiem zachorowania na ten nowotwór a występowaniem różnych wariantów genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm HCA, z wyjątkiem nieznacznie zwiększonej zachorowalności u osób posiadających wolno acetylujący wariant *N*-acetylotransferazy 2 i jednocześnie często spożywających mięso (więcej niż 5 razy w tygodniu) (60). Jest to rezultat zaskakujący; w przypadku zapadalności na raka jelita grubego większość prac populacyjnych za grupę ryzyka uważa osoby posiadające wariant *N*-acetylotransferazy 2 szybko acetylujący (61). Na podstawie analizy upodobań żywieniowych mieszkańców Sztokholmu wykazano, że HCA przyjmowane wraz z pożywieniem w typowych dla Szwedów ilościach nie są przyczyną powstawania nowotworów jelita grubego, pęcherza moczowego czy nerki (62). Wyniki prac populacyjnych są zatem, jak widać, rozbieżne. Wpływać to może z faktu trudnej do jednoznacznego określenia intensywności obróbki cieplnej mięsa konsumowanego przez osoby uwzględnione w analizach, a co za tym idzie – rzeczywistych ilości spożywanego HCA. Ponadto, należy zauważyć, że szczególnie podczas grillowania obok HCA powstają także wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (PAH) (63), które również wykazują działanie kancerogenne i mogą dodatkowo wpływać na rezultaty analiz epidemiologicznych.

9. Ocena potencjalnego ryzyka związanego z ekspozycją na HCA

Szacuje się, że średnie dzienne spożycie HCA przez jedną osobę wynosi około 0,4-16 μg (26). Doświadczalnie wykazano brak HCA w moczu pacjentów karmionych pozajelitowo. Jako kontrolę przeprowadzono analizę moczu ochotników przyjmujących normalne pożywienie, w wyniku której wykazano obecność HCA w każdej z prób kontrolnych. Wyniki tych badań potwierdzają ciągłą i nieuniknioną ekspozycję ludzi na HCA, jak również wykluczają możliwość endogennego wytwarzania tej grupy związków (64). Ilości poszczególnych HCA spożywanego dziennie nie są wystarczające do uzyskania aktywności rakotwórczej, przy założeniu takiej samej wrażliwości ludzi i gryzoni na tę grupę związków (26). Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że działanie kancerogenne HCA może być addytywne lub synergistyczne. Wykazano doświadczalnie, że efekty działania kilku HCA podanych do ustroju jednocześnie są wyższe w porównaniu z efektami uzyskiwanymi przy podaniu odpowiedniej ilości każdej z analizowanych HCA osobno (65). Należy jednak zauważyć, że jednoczesny kontakt z kilkoma HCA nie zawsze oznacza zwiększenie ich potencjału

kancerogennego, np. przy równoczesnym podaniu PhP i IQ obserwowane efekty kancerogenne były mniejsze niż w przypadku podania samego IQ (66).

Istnieją ponadto doniesienia, które pokazują, że HCA nie działają jako kompletne kancerogeny, lecz jako inicjatory procesu nowotworzenia. Świadczą o tym wyniki eksperymentu, w którym wykazano, że Trp-P-2 aplikowany na skórę myszy w testowanych dawkach nie powodował zmian nowotworowych. Jednakże, kiedy po zastosowaniu Trp-P-2 nakładano dodatkowo promotor nowotworzenia, octan 12-*O*-tetradekanoiloforbolu (TPA), u myszy pojawiły się zmiany o charakterze nowotworowym (4).

10. Sposoby minimalizowania ekspozycji na HCA

Całkowite wyeliminowanie HCA z diety wydaje się niemożliwe. Istnieje jednak szereg sposobów pozwalających na zminimalizowanie potencjalnego ryzyka związanego z ich spożyciem. Przede wszystkim można w tym celu zredukować spożycie mięsa (67), jak również zmienić przyzwyczajenia dietetyczne, biorąc pod uwagę fakt, że zawartość HCA w mięsie jest wyższa niż w rybach czy w produktach pochodzenia mięsnego, takich jak kiełbasy (68). Ponadto w związku z tym, że ilość HCA wytwarzanych podczas obróbki termicznej mięsa zależy tak od długości jej trwania, jak i od jej temperatury, należy podczas przygotowywania potraw mięsnych dążyć do skrócenia czasu i/lub zastosowania możliwie jak najniższej temperatury (69). Wykazano również, że można w znaczący sposób obniżyć zawartość HCA, jeśli przed właściwą obróbką termiczną zastosuje się wstępne przygotowanie mięsa w kuchenke mikrofalowej (70). Możliwe jest również zablokowanie produkcji HCA poprzez dodanie do przyrządzanej potrawy antyoksydantów takich jak katechiny, flawonoidy czy kwas kofeinowy (4). Podobne działanie wykazują koncentraty białek sojowych oraz powszechnie stosowany przeciwutleniacz: butylohydroksyanizol (BHA) (71). Hamowanie syntezy HCA zachodzi ponadto w obecności występujących w czosnku i cebuli związków siarkoorganicznych (72). Hipoteza wyjaśniająca działanie związków blokujących syntezę HCA mówi o ich zdolności do wymiatania powstających w reakcji Maillarda wolnych rodników (67). Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że wyniki badań dotyczących formowania się HCA bywają rozbieżne. Niektóre analizy dowodzą, że BHA czy inne antyoksydanty mogą prowadzić do zwiększenia ilości powstających HCA (68).

Innym sposobem minimalizowania ekspozycji na HCA jest ich wiązanie przez tak zwane substancje przechwytyjące, co powoduje zmniejszenie stężenia HCA w organizmie (67). Jednym ze związków wykazujących tego typu działanie jest chlorofilina (CHL). Skuteczność działania CHL została wykazana wobec wielu mutagenów i kancerogenów o aromatycznej strukturze, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, aflatoksyna B₁ czy HCA (73). Mechanizm działania CHL opiera się na tworzeniu niekowalencyjnych kompleksów z HCA (74). Kompleksy te są stabilizowa-

ne zarówno przez oddziaływania typu π - π pomiędzy pierścieniami aromatycznymi CHL i mutagenu, jak i przez oddziaływanie elektrostatyczne/wodorowe pomiędzy egzocykliczną grupą aminową HCA a ugrupowaniem karboksylowym występującym w CHL (75).

Potwierdzeniem istnienia takich kompleksów są wyniki testów mutagenności HCA na bakteriach, podczas których stwierdzono zmniejszenie mutagenności HCA w przypadku jednoczesnego zastosowania konkretnej HCA i CHL (76). Na podstawie testów przeprowadzonych na gryzoniach wykazano, że CHL zmniejsza ilość adduktów HCA-DNA tworzonych w wątrobie, poprzez redukcję wchłaniania kancerogenu z jelita, powodując tym samym zwiększone wydalanie z kałem niezmetabolizowanych HCA (77). Działanie podobne do CHL – zmniejszanie wchłaniania HCA w jelicie – wykazuje również błonnik (78). Oddziaływania niekowalencyjne mogą zachodzić również na dalszych etapach metabolizmu HCA. Wychwytywaniu na drodze tworzenia niekowalencyjnych kompleksów mogą podlegać oprócz niezmetabolizowanych HCA również ich aktywowane pochodne (*N*-hydroksy-HCA czy też jony arylo-nitreniowe) (67).

Obniżenie negatywnego wpływu HCA na organizm jest także możliwe dzięki substancjom zmieniającym profil metabolizmu tych mutagenów. Katechiny i kwas taninowy obniżają mutagenność PhIP, ale zmniejszenie mutagenności nie wystąpiło, kiedy zamiast PhIP użyto jego zaktywowanej pochodnej. Świadczy to o tym, że te dwa związki osłabiają działanie genotoksyczne HCA poprzez zakłócanie ich metabolizmu (79). Galusan epigalokatechiny (EGCG), polifenol wyizolowany z zielonej herbaty, działa jako kompetycyjny inhibitor reduktazy NADPH cytochromu P450, tym samym pośrednio hamując jego aktywność (80). W związku z tym galusan epigalokatechiny okazał się skutecznie hamować aktywację metaboliczną nie tylko HCA, ale również innych kancerogenów, wymagających do swojej aktywacji innych niż 1A2 izoform cytochromu P450 (81). Chlorofilina swoje antygenotoksyczne właściwości zawdzięcza nie tylko tworzeniu niekowalencyjnych kompleksów z HCA, ale również zdolnością do niespecyficznego hamowania wielu izoform cytochromów P450 (82). Sulforafan, izotiocyjanian produkowany przez warzywa z rodziny krzyżowych, obecny w szczególnie dużym stężeniu w brokułach, hamuje genotoksyczność IQ poprzez inhibicję CYP1A2 (83). Resweratrol, antyoksydant występujący w winogronach, powoduje znaczące zmniejszenie ilości adduktów HCA-DNA, co może być związane ze zdolnością tego związku do hamowania aktywności *O*-acetylotransferazy i transferazy sulfonianowej, a zatem enzymów zaangażowanych w przekształcanie *N*-hydroksylowych pochodnych HCA w aktywniejsze genotoksycznie estry (84). Zauważono, że indolo-3-karbinol silniej indukuje CYP1A1 niż CYP1A2, w związku z czym zmienia profil metabolizmu HCA w kierunku zwiększonej produkcji związków zainaktywowanych (4'-hydroksy-HCA). W rezultacie prowadzi to do zredukowania ilości adduktów HCA-DNA u gryzoni, które przed podaniem HCA karmiono indolo-3-karbinolem (85). Zmiana profilu metabolizmu HCA może również dotyczyć modulacji enzymów zaangażowanych w drogi prowadzące do detoksykacji tych mu-

tagenów. Faza II w metabolizmie HCA to przede wszystkim aktywność UDP-glukuronylotransferazy (UDPGT), transferazy S-glutationu (GST) oraz transferazy sulfonianowej (SULT) (67). Istnieje zatem hipoteza, że związki będące induktorami tych enzymów mogą działać jako czynniki przeciwrakotwórcze (86). Palmityny kaweolu i kafestolu, wykazujące zdolność do indukcji GST, znacząco obniżają ilość adduktów PhIP-DNA w okrzężnicy (87). Zaobserwowano ponadto ochronne działanie białej herbaty wobec PhIP u szczurów, związane prawdopodobnie ze zwiększoną aktywnością enzymów metabolizujących HCA, m. in. GST i UDPGT po jednoczesnym podaniu białej herbaty i PhIP (88). Podobne rezultaty osiągnięto, kiedy szczurom oprócz HCA podawano zieloną herbatę: zaobserwowano m. in. zmniejszenie ilości adduktów IQ-DNA. Za prawdopodobną przyczynę tego zjawiska można uznać zdolność zielonej herbaty do zwiększania aktywności jednego z enzymów detoksykacji HCA, UDPGT (89). Sprawa jest bardziej skomplikowana w przypadku transferazy sulfonianowej, jako że oprócz detoksykacji katalizuje ona również reakcje prowadzące do powstania estrów HCA charakteryzujących się wysoką genotoksycznością (67). Ilość adduktów tworzących się podczas inkubacji PhIP z DNA z grasicy cielęcej w obecności transferazy sulfonianowej estrogenu jest około 3,5-krotnie większa niż w przypadku ilości adduktów obserwowanych dla inkubacji PhIP z DNA pod nieobecność tego enzymu (90). Świadczy to o tym, że ochronę przed szkodliwym działaniem HCA można by osiągnąć raczej poprzez zastosowanie związków o charakterze inhibitorów niż induktorów transferazy sulfonianowej (67).

11. Podsumowanie

Na podstawie danych zarówno epidemiologicznych, jak i wyników prac doświadczalnych przeprowadzonych na zwierzętach wskazuje się na szczególną rolę diety w powstawaniu chorób nowotworowych. W typowej dla naszych szerokości geograficznych diecie niezwykle istotne dla procesów nowotworzenia mają tworzące się podczas obróbki termicznej mięsa HCA, które ze względu na swój mutageny charakter mogą zwiększać ryzyko wystąpienia nowotworów. Jednak chcąc ocenić to ryzyko należy wziąć pod uwagę różną wrażliwość osobniczą na HCA oraz fakt, że w diecie obecne są również związki zdolne do obniżania aktywności kancerogennej HCA.

Praca finansowana z projektu nr N N301 029834.

Literatura

1. World Health Organization, (2002), *The World Health Report 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life*.
2. Williams G. M., (2001), *Toxicology*, 166, 3-10.
3. Sinha R., Caporaso N., (1999), *J. Nutr.*, 129, 556S-559S.
4. Sugimura T., Wakabayashi K., Nakagama H., Nagao M., (2004), *Cancer Sci.*, 95, 290-299.
5. Lichtenstein P., Holm N. V., Verkasalo P. K., Iliadou A., Kaprio J., Koskenvuo M., Pukkala E., Skytthe A., Hemminki K., (2000), *N. Engl. J. Med.*, 343, 78-85.
6. Staszewski J., Haenszel W., (1965), *J. Natl. Cancer Inst.*, 35, 291-297.
7. Tyczynski J., Tarkowski W., Parkin D. M., Zatonski W., (1994), *Eur. J. Cancer*, 30A, 478-484.
8. Ames B. N., Gold L. S., (1997), *Environ. Health Perspect.*, 105 Suppl 4, 865-873.
9. Davis D. L., Muir C., (1995), *Environ. Health Perspect.*, 103 Suppl 8, 301-306.
10. Doll R., Peto R., (1981), *J. Natl. Cancer Inst.*, 66, 1191-1308.
11. Willett W. C., (1995), *Environ. Health Perspect.*, 103 Suppl 8, 165-170.
12. American Institute for Cancer Research, (1997), *Fod, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective*.
13. Strickland P. T., Groopman J. D., (1995), *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 710S-720S.
14. Ferguson L. R., (2002), *Toxicology*, 181-182, 79-82.
15. Phillips D. H., (1999), *Mutat. Res.*, 443, 139-147.
16. Durant J. L., Busby W. F., Jr., Lafleur A. L., Penman B. W., Crespi C. L., (1996), *Mutat. Res.*, 371, 123-157.
17. Widmark E. M. P., (1939), *Nature*, 143, 984.
18. Nagao M., Honda M., Seino Y., Yahagi T., Sugimura T., (1977), *Cancer Lett.*, 2, 221-226.
19. Sugimura T., (2000), *Carcinogenesis*, 21, 387-395.
20. Skog K., Solyakov A., (2002), *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1213-1221.
21. Kataoka H., (1997), *J. Chromatogr. A*, 774, 121-142.
22. Kataoka H., Kijima K., Maruo G., (1998), *Bull. Environ. Contam Toxicol.*, 60, 60-67.
23. Kataoka H., Hayatsu T., Hietsch G., Steinkellner H., Nishioka S., Narimatsu S., Knasmuller S., Hayatsu H., (2000), *Mutat. Res.*, 466, 27-35.
24. Jagerstad M., Grivas S., Olsson K., Laser R. A., Negishi C., Sato S., (1986), *Prog. Clin. Biol. Res.*, 206, 155-167.
25. Pais P., Salmon C. P., Knize M. G., Felton J. S., (1999), *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1098-1108.
26. Wakabayashi K., Nagao M., Esumi H., Sugimura T., (1992), *Cancer Res.*, 52, 2092s-2098s.
27. Snyderwine E. G., Schut H. A., Adamson R. H., Thorgeirsson U. P., Thorgeirsson S. S., (1992), *Cancer Res.*, 52, 2099s-2102s.
28. Nagao M., Ushijima T., Toyota M., Inoue R., Sugimura T., (1997), *Mutat. Res.*, 376, 161-167.
29. Grivas S., Jagerstad M., (1984), *Mutat. Res.*, 137, 29-32.
30. Wild D., Kerdar R. S., (1998), *Z Lebensm Unters Forsch A*, 207, 428-433.
31. Kaiser G., Harnasch D., King M. T., Wild D., (1986), *Chem. Biol. Interact.*, 57, 97-106.
32. Nagao M., Wakabayashi K., Kasai H., Nishimura S., Sugimura T., (1981), *Carcinogenesis*, 2, 1147-1149.
33. Snyderwine E. G., Battula N., (1989), *J. Natl. Cancer Inst.*, 81, 223-227.
34. Crofts F. G., Strickland P. T., Hayes C. L., Sutter T. R., (1997), *Carcinogenesis*, 18, 1793-1798.
35. Wild D., Degen G. H., (1987), *Carcinogenesis*, 8, 541-545.
36. Snyderwine E. G., Wirth P. J., Roller P. P., Adamson R. H., Sato S., Thorgeirsson S. S., (1988), *Carcinogenesis*, 9, 411-418.
37. Hein D. W., Doll M. A., Rustan T. D., Gray K., Feng Y., Ferguson R. J., Grant D. M., (1993), *Carcinogenesis*, 14, 1633-1638.
38. Felton J. S., Knize M. G., Shen N. H., Lewis P. R., Andresen B. D., Happe J., Hatch F. T., (1986), *Carcinogenesis*, 7, 1081-1086.
39. Thompson L. H., Tucker J. D., Stewart S. A., Christensen M. L., Salazar E. P., Carrano A. V., Felton J. S., (1987), *Mutagenesis*, 2, 483-487.

40. Turteltaub K. W., Knize M. G., Buonarati M. H., McManus M. E., Veronese M. E., Mazrimas J. A., Felton J. S., (1990), *Carcinogenesis*, 11, 941-946.
41. Buonarati M. H., Felton J. S., (1990), *Carcinogenesis*, 11, 1133-1138.
42. Wallin H., Mikalsen A., Guengerich F. P., Ingelman Sundberg M., Solberg K. E., Rossland O. J., Alexander J., (1990), *Carcinogenesis*, 11, 489-492.
43. Buonarati M. H., Turteltaub K. W., Shen N. H., Felton J. S., (1990), *Mutat. Res.*, 245, 185-190.
44. Langouet S., Paehler A., Welti D. H., Kerriguy N., Guillouzo A., Turesky R. J., (2002), *Carcinogenesis*, 23, 115-122.
45. Styczynski P. B., Blackmon R. C., Groopman J. D., Kensler T. W., (1993), *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 846-851.
46. Kaderlik K. R., Mulder G. J., Turesky R. J., Lang N. P., Teitel C. H., Chiarelli M. P., Kadlubar F. F., (1994), *Carcinogenesis*, 15, 1695-1701.
47. Schut H. A., Snyderwine E. G., (1999), *Carcinogenesis*, 20, 353-368.
48. Turesky R. J., Rossi S. C., Welti D. H., Lay J. O., Jr., Kadlubar F. F., (1992), *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 479-490.
49. Dingley K. H., Curtis K. D., Nowell S., Felton J. S., Lang N. P., Turteltaub K. W., (1999), *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 8, 507-512.
50. Chepanoske C. L., Brown K., Turteltaub K. W., Dingley K. H., (2004), *Food Chem. Toxicol.*, 42, 1367-1372.
51. Ghoshal A., Snyderwine E. G., (1993), *Carcinogenesis*, 14, 2199-2203.
52. Adamson R. H., Thorgeirsson U. P., Sugimura T., (1996), *Arch. Toxicol. Suppl*, 18, 303-318.
53. Turteltaub K. W., Dingley K. H., Curtis K. D., Malfatti M. A., Turesky R. J., Garner R. C., Felton J. S., Lang N. P., (1999), *Cancer Lett.*, 143, 149-155.
54. Augustsson K., Skog K., Jagerstad M., Steineck G., (1997), *Carcinogenesis*, 18, 1931-1935.
55. Zheng W., Gustafson D. R., Sinha R., Cerhan J. R., Moore D., Hong C. P., Anderson K. E., Kushi L. H., Sellers T. A., Folsom A. R., (1998), *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 1724-1729.
56. Gerhardsson V., Hagman U., Peters R. K., Steineck G., Overvik E., (1991), *Int. J. Cancer*, 49, 520-525.
57. Norell S. E., Ahlbom A., Erwald R., Jacobson G., Lindberg-Navier I., Olin R., Tornberg B., Wiechel K. L., (1986), *Am. J. Epidemiol.*, 124, 894-902.
58. Steineck G., Hagman U., Gerhardsson M., Norell S. E., (1990), *Int. J. Cancer*, 45, 1006-1011.
59. Ward M. H., Sinha R., Heineman E. F., Rothman N., Markin R., Weisenburger D. D., Correa P., Zahm S. H., (1997), *Int. J. Cancer*, 71, 14-19.
60. Tiemersma E. W., Voskuil D. W., Bunschoten A., Hogendoorn E. A., Witteman B. J., Nagengast F. M., Glatt H., Kok F. J., Kampman E., (2004), *Cancer Causes Control*, 15, 225-236.
61. Hein D. W., Doll M. A., Fretland A. J., Leff M. A., Webb S. J., Xiao G. H., Devanaboyina U. S., Nangju N. A., Feng Y., (2000), *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9, 29-42.
62. Augustsson K., Skog K., Jagerstad M., Dickman P. W., Steineck G., (1999), *Lancet*, 353, 703-707.
63. Knize M. G., Salmon C. P., Pais P., Felton J. S., (1999), *Adv. Exp. Med. Biol.*, 459, 179-193.
64. Ushiyama H., Wakabayashi K., Hirose M., Itoh H., Sugimura T., Nagao M., (1991), *Carcinogenesis*, 12, 1417-1422.
65. Ito N., Hasegawa R., Shirai T., Fukushima S., Hakoi K., Takaba K., Iwasaki S., Wakabayashi K., Nagao M., Sugimura T., (1991), *Carcinogenesis*, 12, 767-772.
66. Tsuda H., Sekine K., Uehara N., Takasuka N., Moore M.A., Konno Y., Nakashita K., Degawa M., (1999), *Cancer Lett.*, 143, 229-234.
67. Dashwood R. H., (2002), *Mutat. Res.*, 511, 89-112.
68. Skog K. I., Johansson M. A., Jagerstad M. I., (1998), *Food Chem. Toxicol.*, 36, 879-896.
69. Felton J. S., Pais P., Salmon C. P., Knize M. G., (1998), *Z Lebensm Unters Forsch A*, 207, 434-440.
70. Felton J. S., Fultz E., Dolbeare F. A., Knize M. G., (1994), *Food Chem. Toxicol.*, 32, 897-903.
71. Wang Y. Y., Vuolo L. L., Spingarn N. E., Weisburger J. H., (1982), *Cancer Lett.*, 16, 179-189.
72. Tsai S. J., Jenq S. N., Lee H., (1996), *Mutagenesis*, 11, 235-240.
73. Waters M. D., Stack H. F., Jackson M. A., Brockman H. E., De F. S., (1996), *Mutat. Res.*, 350, 109-129.

74. Dashwood R., Guo D., (1992), *Carcinogenesis*, 13, 1121-1126.
75. Dashwood R., Yamane S., Larsen R., (1996), *Environ. Mol. Mutagen.*, 27, 211-218.
76. Dashwood R., Guo D., (1993), *Environ. Mol. Mutagen.*, 22, 164-171.
77. Dashwood R. H., (1992), *Carcinogenesis*, 13, 113-118.
78. Sjodin P., Nyman M., Nielsen L. L., Wallin H., Jagerstad M., (1992), *Nutr. Cancer*, 17, 139-151.
79. Apostolides Z., Balentine D. A., Harbowy M. E., Hara Y., Weisburger J. H., (1997), *Mutat. Res.*, 389, 167-172.
80. Hasaniya N., Youn K., Xu M., Hernaez J., Dashwood R., (1997), *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 553-558.
81. Muto S., Fujita K., Yamazaki Y., Kamataki T., (2001), *Mutat. Res.*, 479, 197-206.
82. Yun C. H., Jeong H. G., Jhoun J. W., Guengerich F. P., (1995), *Carcinogenesis*, 16, 1437-1440.
83. Barcelo S., Mace K., Pfeifer A. M., Chipman J. K., (1998), *Mutat. Res.*, 402, 111-120.
84. Dubuisson J. G., Dyess D. L., Gaubatz J. W., (2002), *Cancer Lett.*, 182, 27-32.
85. Xu M., Bailey A. C., Hernaez J. F., Taoka C. R., Schut H. A., Dashwood R. H., (1996), *Carcinogenesis*, 17, 1429-1434.
86. Kensler T. W., (1997), *Environ. Health Perspect.*, 105 Suppl 4, 965-970.
87. Huber W. W., McDaniel L. P., Kaderlik K. R., Teitel C. H., Lang N. P., Kadlubar F. F., (1997), *Mutat. Res.*, 376, 115-122.
88. Santana-Rios G., Orner G. A., Xu M., Izquierdo-Pulido M., Dashwood R. H., (2001), *Nutr. Cancer*, 41, 98-103.
89. Bu-Abbas A., Clifford M. N., Ioanides C., Walker R., (1995), *Food Chem. Toxicol.*, 33, 27-30.
90. Lewis A. J., Walle U. K., King R. S., Kadlubar F. F., Falany C. N., Walle T., (1998), *Carcinogenesis*, 19, 2049-2053.
91. Sugimura T., Sato S., (1983), *Cancer Res.*, 43, 2415s-2421s.
92. Felton J. S., Knize M. G., Bennett L. M., Malfatti M. A., Colvin M. E., Kulp K. S., (2004), *Toxicology*, 198, 135-145.