

PREGLEDNI ČLANCI

MUTAGENI EFEKTI HORMONA

Ninoslav DELIĆ i Dijana ĐELIĆ

Fakultet veterinarske medicine u Beogradu

Široko je prihvaćeno gledište da endogene supstance, uključujući hormone, nemaju mutagene efekte kada su prisutni u uobičajenim fiziološkim koncentracijama. Međutim, pored relativne stabilnosti i stalnosti genetičkog materijala, potrebna je i njegova promenljivost da bi postojala biološka evolucija. Stoga je moguće očekivati da izvesne reakcije, usled kompleksnosti mehanizama transdukcije signala pod dejstvom hormona, ipak dovode do stvaranja reaktivnih derivata sposobnih da interreaguju sa molekulima DNK i potpomognu nastanak mutacija. U ovom radu dat je pregled istraživanja genotoksičnih efekata hormona u različitim test-sistemima: od bakterijskih, preko kultura ćelija, *in vivo* eksperimenata na laboratorijskim životinjama, do utvrđivanja mutagenih efekata kod ljudi tretiranih hormonima. Efekti steroidnih hormona detaljno su opisani u literaturi, dok se nasuprot tome, još uvek nedovoljno zna o mogućim promenama naslednog materijala pod uticajem nesteroidnih hormona. Ispitivanja genotoksičnosti steroidnih hormona u bakterijskim sistemima uglavnom su dala negativne rezultate. U kompleksnijim eukariotskim sistemima *in vitro* i *in vivo* većina steroidnih hormona ispoljava mutagene efekte, mada rezultat može da varira zavisno od tipa ćelije ili biološke vrste upotrebljene u eksperimentu. Što se tiče nesteroidnih hormona, mada su znatno manje proučavani, stiče se utisak da uglavnom ne ispoljavaju mutagene efekte. Danas je jasno da su steroidni hormoni (naročito estrogeni) kompletni kancerogeni sposobni da podstaknu proces kancerogeneze, kako indukcijom kovalentnih oštećenja DNK koja se mogu prevesti u mutacije (tumor inicijatori) tako i putem stimulacije deobe ćelija (tumor promotori).

Cljučne reči: hormon, mutagen, genotoksičnost, kancer

Uvod

Jedna od osnovnih karakteristika multicelularnih organizama jeste sposobnost međućelijskih komunikacija i koordinisane aktivnosti organskih sistema. Glavnu ulogu u integraciji ćelija u kompleksan biološki entitet kakvi su organizmi životinja, imaju nervni i endokrini sistem. Tokom evolucije dolazilo je do postepenog usložnjavanja strukture, funkcija i broja različitih

ćelijskih tipova u adultnom organizmu. Uporedo sa usložnjavanjem morfo-fizioloških karakteristika pojavila se potreba za humoralnom regulacijom vitalnih funkcija. Kod jednostavno građenih beskičmenjaka nervna i humoralna funkcija nisu anatomski odvojene, već nervne ćelije vrše sekreciju biološki aktivnih supstanci nalik hormonima. Međutim, sa porastom kompleksnosti građe, individualnog razvića i fizioloških procesa, došlo je do pojave posebnih tkiva sa endokrinom funkcijom. Razvoj endokrinog sistema dostigao je visok stepen naročito kod kičmenjaka.

Nervna i humoralna regulacija doprinose održavanju homeostazisa uprkos promenljivosti spoljašnje i unutrašnje sredine. Hormoni, kao međućelijski signalni molekuli, utiču na metaboličke procese, rast, razviće i usklađivanje međusobno antagonističkih procesa u intermedijarnom metabolizmu i fiziologiji.

Polazeći od činjenice da su hormoni uključeni u regulaciju niza životnih procesa i opšteprihvaćenog gledišta po kome su hormoni filogenetski stariji od funkcija koje se nalaze pod njihovom kontrolom (*Petrović, 1991*), potrebno je zapitati se da li mogu svojim uticajem na nivou naslednog materijala doprineti nastanku mutacija. Tokom evolucije životinja odabrani dovoljno efikasni medijatori i endokrini regulatori vitalnih procesa koji ne dovode do narušavanja genetičkog integriteta. Ipak, rezultati savremenih istraživanja ukazuju na postojanje tzv. endogenih mutagena - supstanci koje su normalno prisutne u organizmu, ali pod izvesnim okolnostima mogu da ispolje mutagene osobine. Steroidni hormoni mogu se svrstati u najbolje proučene endogene mutagene. Nasuprot tome, moguća nepoželjna dejstva nesteroidnih hormona na genetički materijal čoveka i životinja nisu dovoljno istražena.

Poznato je da postoji relativno dobra korelacija između mutageneze i kancerogeneze. Zato bi podaci koji govore o povezanosti nekih oblika kancera i primene hormona mogli ukazivati na izvestan mutageni potencijal. Tako su podaci iz eksperimenata sa ćelijama u kulturi, pojedinim vrstama glodara, kao i rezultati ekstenzivnih epidemioloških i endokrinoloških studija kod čoveka, ukazali na uticaj hormona u nastanku i/ili održavanju maligno transformisanih ćelija (*Henderson i sar., 1982*). Uticaj hormona u nastanku malignih bolesti prema nekim autorima (*Upton i sar., 1984; Key i Beral, 1992*) podrazumeva efekte na nivou promocije procesa kancerogeneze, stoje u saglasnosti sa negativnim rezultatima pri testiranju hormona na genotoksičnost u pojedinim sistemima (*Braun, 1977; Rinkus i Legaror, 1979; Barret i sar., 1981; Herzog i Leuschner, 1995*). S druge strane, postoje literaturni podaci o genotoksičnim efektima hormona (*McQuarrie i sar., 1970; van Aswegen i sar., 1989; Bali i sar., 1990; Tsutsui i sar., 1990*) koji su podstakli istraživače na razmatranje njihove moguće uloge u fazi inicijacije kancerogeneze.

Razlike u dobijenim rezultatima testiranja hormona na genotoksičnost mogu biti prouzrokovane ograničenjima samih test-sistema, različitoj reaktivnosti u *in vitro* i *in vivo* uslovima, mogućnostima postojanja tkivne i species-specifičnosti u ispoljavanju genotoksičnih efekata.

Steroidni hormoni

Evaluacija mutagenih efekata hormona u bakterijskim sistemima

Ispitivanja mutagenih efekata hormona izvršena su u različitim *in vitro* i *in vivo* sistemima, od bakterija do sisara. Izbor hormona obuhvatao je uglavnom steroide usled jasne korelacije između pojave izvesnih oblika maligniteta i upotrebe prirodnih i sintetičkih hormona u terapiji.

Primenom testa reverznih mutacija kod *Salmonella typhimurium* (Ames-ov test) dobijeni su gotovo isključivo negativni rezultati kako u testu bez metaboličke aktivacije, tako i pri dodatku mikrozomalnih enzima ("S-9 mešavina"). Potpuno negativni rezultati utvrđeni su ispitivanjem hidrokortizona (Bali i sar., 1990), medroksiprogesteron acetata (Herzog i Leuschner, 1995), dietilstilbestrola i etinil estradiola (Lang i Redmann, 1979), dietilstilbestrola i njegovih derivata (Glatt i sar., 1979). Posebno je detaljno proučen trenbolon - sintetički androgen koji se u nekim zemljama koristi kao stimulator rasta pri uzgoju domaćih životinja. Testiranjem trenbolona na različitim slojevima *S. typhimurium* metodom inkorporacije u čvrsti medijum i metodom preinkubacije, većina autora pokazala je odsustvo mutagenog potencijala (Ingerowski i sar., 1981; Schiffman i sar., 1985; Richold, 1988). Lutz i sar. (1988) su, međutim, ispitivanjem trenbolona Ames-ovim testom bez primene metaboličke aktivacije zapazili umeren porast u broju revertanata kod soja TA 100, dok su pri radu sa sojevima TA 98 i TA 102 izostali pozitivni rezultati. Nešto kasnije, Marzin (1989) je ponovio eksperimente sa istim sojevima i ustanovio odsustvo mutagenosti. Neuobičajeni rezultati Lutz-a i sar. verovatno su proistekli usled onečišćenja u testiranoj supstanci. Sem toga, većina autora je saglasna daje neophodan dvostruki porast u broju revertanata pre donošenja zaključka da je agens zaista ispoljio pozitivne efekte (Marzin, 1991).

Posebno su interesantni i kontroverzni podaci dobijeni na *Escherichia coli* (u tzv. "Toxi-Chromotest" i "SOS-Chromotest" sistemima) koji ukazuju na genotoksične efekte estradiola i njegovih reaktivnih derivata — kateholestrogena (2-hidroksiestradiol i 4-hidroksiestradiol) (van Aswegen i sar., 1989). Prema trenutno raspoloživim literaturnim podacima ne postoji zadovoljavajuće objašnjenje pozitivnog rezultata pri testiranju estradiola u bakterijskom sistemu. Uprkos ovim diskutabilnim rezultatima, može se zaključiti da prirodni i sintetički hormoni ne ispoljavaju mutagene efekte na bakte-

rijama. Mada je poželjno otpočeti sa ispitivanjem hemijskog agensa na genotoksičnost u bakterijskom test-sistemu, pri čemu se za veoma kratko vreme uz minimalna finansijska ulaganja dobijaju relativno pouzdani rezultati (korelacija između mutagenosti u Amesovom testu i kancerogenosti kod sisara kreće se između 63-92%, *Rinkus i Legator*, 1980), negativan rezultat kod mikroorganizama često ne podrazumeva da ispitivani agens nema mutagene efekte u kompleksnijim eukariotskim sistemima, posebno u ćelijama sisara kod životinja tretiranih *in vivo*.

Ispitivanje mutagenosti hormona u ćelijama sisara in vitro

Od *in vitro* testova na sisarskim ćelijama za ispitivanje genotoksičnosti hormona često su korišćene posebne ćelijske linije, fibroblasti, kao i limfociti periferne krvi čoveka. Tako je ispitivanjem nekoliko estrogena (IVp estradiol, estriol, estron i etinil estradiol) uočen porast frekvence SCE (razmena sestrinskih hromatida) u ćelijama ovarijuma kineskog hrčka (CHO ćelije) pri tretmanu CHO ćelija u fazi eksponencijalnog rasta u kulturi (*Kochhar*, 1988). Isti set hormona dovodi do pojave različitih strukturnih i numeričkih aberacija hromozoma kod CHO ćelija (*Kochhar*, 1985). Pored toga, slični estrogeni ispitivani u kulturama HeLa ćelija (*Rao i Engleberg*, 1967) ispoljili su visok nivo strukturne specifičnosti u indukciji neodvajanja hromatida tokom mitoze. Indukcija aneuploidija i smanjena mitotska aktivnost zapaženi su takođe i u kulturama CHO ćelija (*Wheeler i sar.*, 1986). Posebno su interesantni eksperimentalni rezultati dobijeni na limfocitima periferne venske krvi žena tretiranih kontraceptivima koji sadrže estrogen i progesteron (*Murthy i Prema*, 1979; *Murthy i Prema*, 1983) koji ukazuju na značajan porast frekvence SCE po ćeliji. Postoje, međutim, radovi u kojima su izostali pozitivni rezultati nakon citogenetičke evaluacije genotoksičnih efekata hormonskih kontraceptiva (*Drevon i sar.*, 1981; *Ftusum i sar.*, 1982).

Sintetički estrogen dietilstilbestrol (DES) posebno privlači pažnju istraživača, s obzirom da se masovno upotrebljava u humanoj (*Smith*, 1948; *Holter \ Fish*, 1974) i veterinarskoj medicini (*Knight*, 1980). U većini primenjenih testova na genotoksičnost, DES je ispoljio pozitivne rezultate. Proučavanjem aneugenog potencijala, primećeno je da DES izaziva porast procenta aneuploidnih ćelija *in vitro* (*Tsutsui i sar.*, 1983). Komparativnim analizama aneugenih efekata DES i 17(3 estradiola zapaženi su species-specifični odgovori. Humani fibroblasti JHU-1 manje su osetljivi na indukciju aneuploidija u poređenju sa SHE (od engl. "Syrian hamster embryo") ćelijama hrčka u *in vitro* uslovima (*Tsutsui i sar.*, 1990). Ova razlika je izraženija kod pseudodiploidnih u odnosu na pseudotetraploidne ćelije (*Tsutsui i sar.*, 1990). Pored toga, DES usporava proliferaciju humanih limfocita (*Hilli i Wolff*, 1982) i indukuje poliploidije kod ćelijskih linija pacova, -kineskog hrčka i čoveka (*Sawada i Iskidate*, 1978) i endo-

reduplikaciju u CHO ćelijama (*Hili i Wolff*, 1983). Pozitivni rezultati testiranja pokazani su indukcijom genskih mutacija u ćelijama limfoma miša (*Clive i sar.*, 1979). Potrebno je, međutim, napomenuti da rezultati testiranja DES mogu da variraju zavisno od tipa ćelija upotrebljenih u eksperimentu. *Barret i sar.* (1981) došli su do podataka da DES povećava nivo hromozomskih aberacija u kulturi ćelija, ali nema sposobnost indukovanja tačkastih ("point") mutacija. Primenom SCE testa pokazano je da DES povećava broj SCE po ćeliji u kulturi humanih fibroblasta (*Rudiger i sar.*, 1979) i limfocitima gravidnih i žena u menopauzi (*Hill i Wolff* 1983). Nasuprot ovim rezultatima, frekvencija SCE po ćeliji ne raste se značajno kod ćelija kineskog hrčka (*Abe i Sasaki*, 1977) i hepatocita pacova (*Althaus i sar.*, 1982). Testom neplanirane sinteze DNK (UDS, odengl. "unscheduled DNA synthesis") dobijeni su pozitivni rezultati na HeLa (*Martin i sar.*, 1978) i SHE ćelijama (*Tsutsui i sar.*, 1984), dok su efekti izostali u kulturi hepatocita pacova (*Althaus i sar.*, 1982).

Medroksiprogesteron acetat koristi se kao terapijski agens tokom menopauze i pri lečenju kancera dojke. *In vitro* citogenetičke analize na humanim limfocitima i test genskih mutacija na HGPRT lokusu u kulturi V79 ćelija kineskog hrčka dali su negativne rezultate (*Herzog i Leuschner*, 1995).

Glukokortikoidni hormon hidrokortizon nalazi široku primenu kao antiinflamatorni i imunosupresivni agens. Postoje literatura i podaci o povećanju frekvencije hromozomskih aberacija u kulturama humanih limfocita tretiranih različitim koncentracijama hidrokortizona (*Bali i sar.*, 1990).

Sintetički androgen trenbolon ispitivanje u nekoliko *in vitro* sistema na ćelijama sisara. Testovima genskih mutacija na HGPRT (hipoksantin-guanin fosforibozil transferaza) i TK (timidin-kinaza) lokusima, praćenjem hromozomskih aberacija, UDS i SCE, dobijeni su isključivo negativni rezultati (*Schifman i sar.*, 1985; *Scheutwinkel i sar.*, 1986; *Richold*, 1988). Mikronukleus testom na CHO ćelijama (*Richold*, 1988) konstatovano je odsustvo genotoksičnih efekata. Međutim, *Schiffmann* (1988) je poređenjem rezultata dobijenim na SHE i C3H ćelijama zapazio species-specifičnost u odgovoru na tretman trenbolonom.

Ispoljavanje genotoksičnih efekata pod *in vivo* uslovima nalazi se pod uticajem kompleksnih fizioloških regulacionih mehanizama, otuda je moguće dobiti rezultate koji se razlikuju od podataka iz *in vitro* testova, naročito u slučajevima kada je agens podložan biotransformaciji. Sem toga, detekcija mutagenih efekata zavisi od tipa ćelije ili tkiva koje se ispituje, vrste ili soja životinje, načina i dužine tretmana.

Testiranje mutagenih efekata hormona na ćelijama sisara in vivo

Postoje literaturni podaci iz *in vivo* eksperimenata koji potvrđuju rezultate ostvarene na ćelijama sisara u *in vitro* uslovima. Tako je pokazano

da medroksiprogesteron acetat ne menja značajno nivo hromozomskih aberacija u ćelijama kostne srži pacova, što je u skladu sa efektima u kulturi humanih limfocita (*Herzog i Leuschner, 1995*). Hidrokortizon povećava frekvencu SCE i procenat polihromatskih eritrocita sa mikronukleusima u kostnoj srži miševa (*Bali i sar., 1990*). Pored toga, *Logninoва i sar. (1970)* opisali su aneugene efekte hidrokortizona u kostnoj srži pacova. Citogenetičkim analizama dejstva trenbolona na kostnoj srži i primenom dominantno-letalnog testa kojim se mogu otkriti mutacije u germinativnim ćelijama došlo se do negativnih rezultata (*Richold, 1988*) kod pacova, koji su u saglasnosti sa *in vitro* testiranjima.

Proučavanjem efekata dietilstilbestrola (DES) na kostnoj srži miševa uočena je sposobnost indukovanja hromozomskih aberacija, dok se nivo SCE po ćeliji nije značajno promenio (*Ivett i Tiče, 1981*). Pozitivan rezultat u testu na prisustvo aberacija, potvrđuje rezultate *in vitro* istraživanja. Rezultati SCE testa, međutim, ne mogu se jednostavno porediti, s obzirom da pod *in vitro* okolnostima pozitivnost DES u SCE testu zavisi od tipa ćelije upotrebene u eksperimentu.

Richold (1988) je istraživao efekte trenbolona mikronukleus testom na miševima pri čemu su dobili negativne rezultate i potvrdili opservacije iz *in vitro* mikronukleus testa na C3H ćelijama miša. S obzirom da trenbolon indukuje mikronukleuse na ćelijama hrčka u *in vitro* uslovima, ispitivanja na kostnoj srži hrčka pružila bi jasniju sliku o efektima trenbolona *in vivo*.

Utvrđivanje mutagenih efekata hormona kod ljudi

Podaci o *in vivo* genotoksičnim efektima hormona kod ljudi, dostupni su pri analizama limfocita periferne krvi ili drugih tkiva kod osoba izloženih hormonalnoj terapiji. *Goh (1967)* je konstatovao povećanje procenta hiperdiploidnih i hipodiploidnih ćelija u leukocitima žena koje su koristile oralne kontraceptive. Većina pseudodiploidnih ćelija imala je $2n \pm 1$ hromozoma. Nasuprot tome, *Timson. (1969)* nije dobio pozitivne rezultate nakon citogenetičke analize limfocita kod grupe žena tretiranih oralnim kontraceptivima tokom dužeg vremenskog perioda (u proseku 3,6 godina).

Interesantan je pristup citogenetičkoj analizi dejstva oralnih kontraceptiva koji su primenili *Shapiro i sar. (1972)*. Ova grupa autora koristila je iste osobe ("interne kontrole") pri analizi na prisustvo aberacija pre i posle tretmana oralnim kontraceptivima. Posmatranjem numeričkih i strukturnih aberacija nisu zapažene značajne promene pod uticajem kontraceptiva.

Lauritsen (1975) smatra da bi citogenetičkom analizom spontanijih abortusa mogli da steknemo realniji uvid u eventualne genotoksične efekte oralnih kontraceptiva. Zaista, *Carr (1970)* je pronašao povećanu incidencu triploidija u abortusima žena koje su koristile oralne kontraceptive.

Ispitivanjem kultura limfocita periferne krvi pokazano je da postoji veći broj razmena sestrinskih hromatida (SCE) kod novorođene dece čije su majke tretirane progesteronom tokom trudnoće (*Lukić i Barjaktarović, 1987*). Mada progesteron preko svojih receptora interreaguje sa hromatinom, ne može se isključiti da su mutageni efekti ovog hormona, bar delimično, posledica njegove konverzije do pregnenolona i pregnandiola koji se izlučuju u amnionsku tečnost.

Milošević i sar. (1999) su pratili efekte gestagena progesterona i ali-Istrenola *in vitro* analizom pojave mikronukleusa u binuklearnim limfocitima čoveka. Primećen je porast frekvence mikronukleusa po ćeliji kod žena koje su tokom trudnoće uzimale pomenute gestagene. Kontrolni uzorak bila je krv istih žena, ali pre tretmana pomenutim hormonima. Pored toga, kod novorođenih, čije su majke uzimale gestagene, zapažen je trostruki porast frekvence mikronukleusa u odnosu na kontrole (bebe netretiranih majki).

Nesteroidni hormoni

Nasuprot velikom broju naučnih radova u kojima se opisuje testiranje steroidnih hormona na genotoksičnost, literaturni podaci o ispitivanju nesteroidnih hormona i medijatora veoma su oskudni.

S obzirom daje molekularni mehanizam dejstva tireoidnih hormona u osnovi sličan sa onim kod steroidnih hormona, moglo bi se pretpostaviti da tireoidni hormoni takode ispoljavaju mutagene efekte. Međutim, savremena istraživanja citobiohemijskih promena odgovornih za ispoljavanje mutagenih efekata steroidnih hormona (*Liehr, 1990, 2000*) ukazuju da se usled metaboličke konverzije steroidnih hormona i nepovoljnog balansa enzima koji vrše stvaranje i detoksifikaciju štetnih produkata (slobodnih radikala, superoksidnog anjona i si.) javljaju uslovi za formiranje kovalentnih oštećenja DNK i/ili pojavu hemijski modifikovanih adicijonih produkata (DNK adukti). Drugim recima, sam mehanizam transdukcije signala pod dejstvom steroidnih hormona koji do vodi do aktivacije određenih gena u jedru, verovatno nije uključen u ispoljavanje eventualnih mutagenih efekata. Zato ne iznenaduje da postoje znatne razlike između tiroksina i 17 β estradiola prilikom testiranja na genotoksičnost u kulturama humanih limfocita (*Delić, 1997; Delić i sar., 1997; Delić i Soldatović, 1999*). Naime, 17(3) estradiol ispoljava klastogene efekte (prekidi na hromozomima), aneugene efekte (indukcija aneuploidija) i povećava frekvencu razmena sestrinskih hromatida (SCE) po ćeliji. Tiroksin, međutim, ispoljava genotoksična svojstva u testu razmene sestrinskih hromatida, ali ne dovodi do aneugeničkih i klastogenih efekata. S obzirom da tireoidni hormoni nisu testirani na genotoksičnost u tako velikom obimu kao steroidni hormoni, ne postoji zadovoljavajuće objašnjenje mehanizma kojim tiroksin povećava nivo SCE u limfocitima

čoveka. Treba se, ipak, setiti da tireoidni hormoni ubrzavanjem rnetabolizama i potrošnje kiseonika mogu stvoriti uslove oksidativnog stresa praćenog stvaranjem reaktivnih kiseoničkih derivata (*Fernandez i Videla, 1993*).

Pored eventualnih genotoksičnih mehanizama, tireoidni hormoni mogu da podstaknu kancerogenezu delujući kao ko-kancerogeni. Zapaženo je da primena tireoidnih hormona pre i za vreme tretmana pacova aflatoksinom BI znatno pojačava nastanak karcinoma bubrega, verovatno usled potenciranja narušavanja ćelijskog metabolizma (*Zawirska, 1991*). Pored toga, *Iishi i sar. (1993)* pokazali su da tiroksin pojačava kancerogene efekte N-metil-N'-nitro-N-nitrozogvanidina delujući, verovatno, kao negenotoksični stimulator rasta ćelija mukoze želuca kod pacova. Sličnim mehanizmom dejstva, tiroksin povećava incidencu tumora debelog creva kod pacova tretiranih azoksimetanom (*Iishi i sar., 1992*).

Polazeći od nalaza da različiti hinoni i hidrohinoni ispoljavaju mutagene efekte, pažnju istraživača privukli su kateholamini. *Moldeus i sar. (1983)* objavili su da dopamin indukuje jednolančane prekide DNK u humanim fibroblastima kože i dovodi do genskih mutacija u ćelijama limfoma miša. S druge strane, u Ames-ovom, SCE *in vitro*, testu za detekciju polno vezanih recesivno-letalnih mutacija na *Drosophila melanogašter* i mikronukleus testu na mišu i pacovu rezultati testiranja dopamina bili su negativni. *Suter i Matter-Jaeger (1984)* pronašli su da L-dopa, dopamin i adrenalin nemaju mutagene efekte u Ames-ovom testu, ali su rezultati bili pozitivni u DNK reper (rec) testu na *Bacillus subtilis*. *McGregor i sar. (1988)* primetili su da dopamin i adrenalin povećavaju broj revertanata u nekim sojevima *Salmonella typhimurium* i da poseduju mutageni potencijal u testu genskih mutacija na L5178Y ćelijama limfoma miša. Pri razmatranju molekularnih mehanizama odgovornih za dobijene efekte *McGregor i sar. (1988)* navode da bi superoksidni anjoni mogli biti od značaja, s obzirom da superoksid dizmutaza (SOD) umanjuje mutagene efekte dopamina.

Širok spektar koncentracija humanog rekornbinatnog insulina (od 10^{-10} M do 10^{-6} M) ispitan je na genotoksičnost u kulturama humanih limfocita periferne krvi čoveka. Odsustvo mutagenog potencijala insulina utvrđeno je standardnim citogenetičkim analizama (*Delić i sar., 2000*), kao i primenom *in vitro* testa razmene sestrinskih hromatida (SCE) i analize mikronukleusa u binuklearnim limfocitima (*Delić, 2001*). Potrebno je, međutim, napomenuti da insulin pri optimalnoj koncentraciji 10^{-10} M povećava mitotsku aktivnost i kinetiku prolaska kroz ćelijski ciklus humanih limfocita u kulturi (*Delić i Soldatović, 1998*). Smatra se da podsticanje mitotske aktivnosti povećava verovatnoću fiksacije endogenih DNK oštećenja u mutacije (*Ames i Gold, 1990; Pitot, 1991*), omogućavajući nastanak maligne ćelije na nivou procesa promocije kancerogeneze (*Delić, 2000*).

Testiranjem efekata neurohormona melatonina primenom *in vitro* testa razmene sestrinskih hromatida došlo se do negativnog rezultata, ali je primjećeno da melatonin u suprafiziološkim koncentracijama inhibira proliferaciju humanih limfocita stimulisanih fitohemaglutininom (*Vijayalaxmi* i sar., 1996).

Das i sar. (1989) proučavali su modulaciju genotoksičnih efekata γ -zračenja i hemijskih mutagena pod uticajem prostaglandina (PG). Prostaglandin E₁ (PGE₁) sprečava citotoksična i genotoksična dejstva radijacije, benzpirena i difenilhidantoina, dok PGE₂ i PGF_{2 α} nemaju protektivni efekat. Štaviše, PGE₂ i PGF_{2 α} ispoljavaju mutagene osobine u nekoliko *in vitro* i *in vivo* testova.

Prostaglandini imaju iznenađujuće širok spektar dejstva već u malim dozama. Danas se u humanoj i veterinarskoj medicini upotrebljavaju i sintetički derivati prostaglandina koji pokazuju manje neželjenih efekata ili veću specifičnost u svom dejstvu. Kloprostenol je sintetički funkcionalni analog PGF_{2 α} sa primenom u veterini radi sinhronizacije estrusa domaćih životinja. Proučavanja u kulturi limfocita periferne krvi ukazuju na značajan porast frekvence SCE (*Delić* i sar., 1994), dok su rezultati negativni pri analizi hromozomskih aberacija (*Delić* \ sar., 1997).

Polazeći od eksperimentalnih podataka da oksitocin u izvesnim biološkim sistemima do vodi do sličnih citobiohemijskih promena kao PGF_{2 α} , *Delić* i sar. (1996) su izvršili citogenetičku evaluaciju genotoksičnosti oksitocina u humanim limfocitima *in vitro*. Negativni rezultati testiranja oksitocina verovatno su posledica suptilnih razlika u unutar ćelijskim odgovorima na PGF_{2 α} i oksitocin.

Zaključak

U osnovi negenotoksičnih mehanizama kancerogenih efekata hormona nalaze se različite metaboličke i citobiohemijske promene koje mogu da podstaknu proliferaciju ćelija sa latentnim genetičkim oštećenjem. Međutim, rezultati testiranja hormona na genotoksičnost ukazali su da steroidni hormoni mogu da ispolje genotoksične efekte, što bi značilo da se ponašaju kao kompletni kancerogeni — deluju i genotoksičnim i negenotoksičnim mehanizmima. Ispitivanja genotoksičnosti steroidnih hormona u bakterijskim sistemima uglavnom su dala negativne rezultate. U kompleksnijim eukariotskim sistemima *in vitro* i *in vivo* većina steroidnih hormona ispoljava mutagene efekte, mada rezultat može da varira zavisno od tipa ćelije ili biološke vrste upotrebljene u eksperimentu. Suptilnije biohemijske analize pokazale su da metabolička konverzija steroidnih hormona (naročito estrogena) može da dovede do stvaranja reaktivnih derivata sposobnih da direktno ili indirektno oštete molekul DNK, dovodeći do nastanka mutacija. Što se tiče

nesteroidnih hormona, mada su znatno manje proučavani, stiče se utisak da uglavnom ne ispoljavaju mutagene efekte, što sugeriše mogućnost da svoje eventualne kancerogene efekte ostvaruju putem stimulacije deobe ćelija (negenotoksični mehanizam).

Literatura

Ahe, S. and Sasaki, M. (1977). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *T. Natl. Cancer Inst.*, 5S, 1635-1641.

Althaus, F. R., Lawrence, S. D., Sattler, G. L., Longfellow, D. G. and Pitot, H. C. (1982). Chemical quantification of unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes as an assay for the rapid screening of potential chemical carcinogens. *Cancer Res.*, 42, 3010-3015.

Bali, D., Singh, J. R., Singh, H. and Sandhu, D. (1990). In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of homional drags I. Hydrocortisone. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16, 250-254.

Barrett, J. C., Wong, A. and Mc.Lachlan, J. A. (1981). Diethylstilbestrol induces neoplastic transformation without measurable gene mutation at two loci. *Science*, 2/2, 1402-1404.

Braun, A. C. (1977). The story of Cancer. Addison-Wesley. London, 170-170.

Carr, D. H. (1970). Chromosome studies in selected spontaneous abortions T. Conception after oral contraceptives. *Can. Med. Assoc. J.*, 103, 343-348.

Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown, M. M. (1979). Validation and characterization of the L51784Y TK⁻ mouse lymphoma mutagen assay system. *Mutat. Res.*, 59, 61-108.

Daš, U. N., Ramađević, G., Rao, K. P. and Rao, M. S. (1989). Prostaglandins can modify gamma-radiation and chemical induced cytotoxicity and genetic damage *in vitro* and *in vivo*. *Prostaglandins*, 38, 689-716.

Delic, N., Soldatovic, B. and Anđelkovic, M. (1994). Effect of cloprostenol on the mitotic index and SCE frequency in cultures of human lymphocytes. *Acta Vet.*, 44, 337-344.

Delic, N., Soldatovic, B., Anđelkovic, M. and Cvetkovic, D. (1996). In vitro cytogenetic analysis of the effects of oxytocin on human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, 356, 265-268.

Delic, N., Anđelkovic, M., Soldatovic, B. and Cvetkovic, D. (1997). In vitro and in vivo cytogenetic analysis of the effects of cloprostenol on inammalian cells. *Acta Vet.*, 47, 151-158.

Delic, N. (1997). Citogenetički efekti estradiola, tiroksina, insulina i adrenalina na humane limfocite in vitro. Doktorska disertacija. Univerzitet. Beograd.

Delic, N. and Soldatovic, B. (1998). Mitotic activity and ćeli cycle kinetics in cultures of human lymphocytes treated with insulin. *Genetika*, 50, 125-131.

Delic, N., Anđelkovic, M. i Soldatovic, B. (1997). Analiza hromozomskih aberacija u kulturama humanih limfocita tretiranih tiroksinom i 17(3 estradiolom. I Simpozijum mutageneze i genotoksikologije. Zlatibor, 15-18. Sept., str. E4

- Delic, N. and Saldatovic, B.* (1999). Evaluation of the effects of thyroxine in micronucleus test on cultured human lymphocytes. Abstracts from 29 Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. Copenhagen, 44-44.
- Delic, N., Soldatovic, B. and Delic, D.* (2000). Cytogenetic evaluation of insulin effects on cultured human lymphocytes. Arch. Biol. Sci (in press).
- Delic, N.* (2000). Epigenetički mehanizmi kancerogeneze, Acta medica Medianae (u štampi).
- Delic, N.* (2001). Analysis of sister-chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes treated with insulin. Folia Biol., 47, 28-31.
- Drevan, C, Piccolli, C. and Montesano, R.* (1981). Mutagenicity assays of estrogenic hormones in mammalian cells. Mutat. Res., 89, 83-90.
- Fernandez, V. and Videla, L. A.* (1993). Influence of hyperthyroidism on superoxide radical and hydrogen peroxide production by rat liver submitochondrial particles. Free Rad. Res. Comms., 18, 329-335.
- Glutt, H. R., Metzler, M. and Oesch, F.* (1979). Diethylstilbestrol and 11 derivatives: a mutagenicity study with Salmonella typhimurium. Mutat. Res., 67, 113-121.
- Goh, K. O.* (1967). Chromosomal breaks in women taking birth control pills. USAEC-ORAU, Research Report, J06, 97-104.
- Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C. and Casagrande, J. T.* (1982). Endogenous hormones as a major factor in human cancer. Cancer Res., 42, 3232-3239.
- Herzog, R. and Leuschner, J.* (1995). Evaluation of the mutagenicity of medroxyprogesterone acetate *in vitro* and *in vivo*. Arzneim.-Forsch./DrugRes., 45 (I) Nr. J, 311-314.
- Hill, A. and Wolff, S.* (1982). Increased induction of sister chromatid exchange by diethylstilbestrol in lymphocytes from pregnant and premenopausal women. Cancer Res., 42, 893-896.
- Hill, A. and Wolff, S.* (1983). Increased induction of sister chromatid exchange by diethylstilbestrol in lymphocytes from pregnant and premenopausal women. Cancer Res., 43, 4114-4118.
- Husim, B., Wuff, H. C. and Neihuhr, E.* (1982). Normal sister-chromatid exchanges in oral contraceptive users. Mutat. Res., 103, 161-164.
- Iishi, H., Tatsuta, M., Baba, M., Okuda, S. and Taniguchi, H.* (1992). Enhancement by thyroxine of experimental carcinogenesis in rat colon induced by azoxymethane. Int. J. Cancer., 50, 974-976.
- Iishi, H., Tatsuta, M., Baba, M., Yamamoto, R. and Taniguchi, H.* (1993). Enhancement by thyroxine of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. Br. J. Cancer, 68, 515-518.
- Ingeronski, G. H., Scheutwinkel, M., Reich, M. and Stan, H. J.* (1981). Mutagenicity studies on veterinary anabolic drugs with the Salmonella/microsome test. Mutat. Res., 97, 93-98.
- Iveff, J. L. and Tiče, R. R.* (1981). Diethylstilbestrol-diphosphate induces chromosomal aberrations but not sister chromatid exchanges in murine bone marrow cells *in vivo*. Environ. Mutagen., 5, 445-452.
- Key, T. J. A. and Beral, V.* (1992). Sex hormones and cancer; in: Mechanisms of carcinogenesis in risk identification, (Ed. H. Vainio, P. N. Magee, D. B. McGregor

and A. J. McMichael), Lyon, International Agency for Research on Cancer, 255-269 ©IARC.

Knight, W. N. (1980). Estrogens administered to food-producing animals: environmental considerations, in: McLachlan J. A. (Ed.), *Estrogens in the environment*, Elsevier/North Holland, NY, 391-401.

Kochhar, T. S. (1985). Inducibility of chromosome aberrations by steroid hormones in cultured Chinese hamster ovary cells. *Toxicol. Lett.*, 29, 201-206.

Kochhar, T. S. (1988). Steroid hormones enhanced sister-chromatid exchange in cultured CHO cells. *Experientia*, 44, 62-63.

Lang, R. and Redmann, U. (1979). Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 67, 361-365.

Lauritsen, J. G. (1975). The significance of oral contraceptives in causing anomalies in spontaneous abortions. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 54, 261-264.

Lehr, J. G. (1990). Genotoxic effects of estrogens. *Mutat. Res.*, 255, 269-276.

Lehr, J. G. (2000). Testosterone estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen. *Endocr. Rev.*, 27, 40-54.

Logninova, V. V., Kerkis, Y. Y. and Popova, I. A. (1970). Hydrocortisone induced aneuploidy in rat bone marrow cells. *Tsitologiya*, 72, 1579-1582.

Lukic, B. and Barjaktarović, N. (1987). Sister-chromatid exchanges in newborns after normal and progesterone-treated pregnancies. *Mutat. Res.*, 197, 121-324.

Lutz, W. K., Deuher, R., Caviezel, M., Sagelsdorff, P., Friederich, U. and Schlatter, C. (1988). Trenbolone growth promoter: covalent DNA binding in rat liver and in *Salmonella typhimurium* and *mutagenicity* in the Ames test. *Arch. Toxicol.*, 62, 103-109.

Martin, C. N., Mc.Dermid, A. C. and Garner, R. C. (1978). Testing of known carcinogens and non-carcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells. *Cancer Res.*, 38, 2621-2627.

Marzin, D. (1989). Ames test and trenbolone. *Arch. Toxicol.*, 63, 492-493.

Marzin, D. (1991). Trenbolone: application of the Ames test. *Recentdata. Ann. Rech. Vet.*, 22, 257-262.

McGregor, D. B., Raich, C. G., Brown, A., Edwards, L., Reynolds, D., West, K. and Willington, S. (1988). Reactivity of catecholamines and related substances in the mouse lymphoma L5178Y cell assay for mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.*, 77, 523-544.

McQuarrie, H. G., Scott, C. D., Ellsworth, H. S., Harris, J. W. and Stone, R. A. (1970). Cytogenetic studies on women using oral contraceptives and their progeny. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 108, 659-663.

Milošević, O., Grujicic, D., Marinkovic, D., Arsenijevic, S., Bankovic, S., Živanovic, A. i Dimitrijevic, A. (1999). Efekat različitih dozage estrogena na frekvenciju mikronukleusa u humanim limfocitima periferne krvi. II Kongres genetičara Srbije, Sokobanja, 100-101.

Moldeus, P., Nordenskjold, M., Bolcsfoldi, G., Eiche, A., Haglund, U. and Lambert, B. (1983). Genetic toxicity of dopamine. *Mutat. Res.*, 124, 9-24.

Murthy, P. B. K. and Prema, K. (1983). Further studies on sister-chromatid exchange frequency in users of hormonal contraceptives. *Mutat. Res.*, 124, 351-354.

Noller, K. L. and Fish, C. R. (1974). Diethylstilbestrol usage: its interesting past, important present, and questionable future. *Med. Clin. North Am.*, 55, 793-810.

Pefrović, V. M. (1991). Uperedna fiziologija - I deo. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd.

Rao, P. N. and Engelberg, J. (1967). Structural specificity of estrogens in the induction of mitotic chromatid non-disjunction in HeLa cells. *Exp. Celi Res.*, 48, 71 - 81.

Richold, M. (1988). The genotoxicity of trenbolone, a synthetic steroid. *Arch. Toxicol.*, 67, 249-258.

Rinkus, S. J. and Legator, M. S. (1979). Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* system. *Cancer Res.*, 59, 3289-3318.

Rinkus, S. J. and Legator, M. S. (1980). The need for both in vitro and in vivo systems in mutagenicity screening, in: *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*, Vol. 6 (Eds. F. T. de Serres, A. Hollaender), Plenum Press. New York, 365-473.

Rudiger, H. W., Haenisch, F., Metzler, M., Oesch, F. and Glatt, H. R. (1979). Metabolites of diethylstilbestrol induce sister chromatid exchange in human cultured fibroblasts. *Nature*, 257, 392-394.

Sawada, M. and Ishidate, M. Jr. (1978). Colchicine-like effect of diethylstilbestrol (DES) on mammalian cells *in vitro*. *Mutat. Res.*, 57, 175-182.

Scheutvinkel, M., Hude, W. V. D. and Easier, A. (1986). Studies on the genotoxicity of the anabolic drugs trenbolone and zeranol. *Arch. Toxicol.*, 59, 4-6.

Schiffmann, D., Hieber, L., Schmuck, G., Pechan, R., Metzler, M. and Henschler, D. (1988). Trenbolone induces micronucleus formation and neoplastic transformation in Syrian hamster embryo fibroblasts but not in mouse C3H10T1/2 cells. *Arch. Toxicol.*, 62, 49-53.

Schiffmann, D., Metzler, M., Neudecker, T. and Henschler, D. (1985). Morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by the anabolic agent trenbolone. *Arch. Toxicol.*, 58, 59-63.

Shapiro, L. R., Graves, Z. R. and Hirshhorn, K. (1972). Oral contraceptives and *in vivo* cytogenetic studies. *Obstet. Gynecol.*, 39, 190-192.

Smith, O. W. (1948). Diethylstilbestrol in the prevention and treatment of complications of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 56, 821-834.

Suter, W. and Matter-Jaeger, J. (1984). Genotoxicity of apomorphine and various catecholamines in the *Salmonella* mutagenicity test (Ames test) and in tests for primary DNA damage using DNA repair-deficient *B. subtilis* strains (Rec assay). *Mutat Res.*, 737, 17-28.

Tinison, J. (1969). Chromosomes and an oral contraceptive (Lyndiol 2.5). *J. Repro. Fert.*, 79, 581-583.

Tsutsui, T., Degen, G. H., Schiffmann, D., Wong, A., Maizumi, H., McLachlan, J. A. and Barrett, J. C. (1984). Dependence on exogenous metabolic activation for induction of unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells by diethylstilbestrol and related compounds. *Cancer Res.*, 44, 184-189.

Tsutsui, T., Maizumi, H., McLachlan, J. A. and Barrett, J. C. (1983). Aneuploidy induction and celi transfection by diethylstilbestrol: a possible chromosomal mechanism in carcinogenesis. *Cancer Res.*, 43, 3814-3821.

Tsutsui, T., Suzuki, N., Maizumi, H. and Barrett, J. C. (1990). Aneuploidy induction in human fibroblasts: comparison with results in Syrian hamster fibroblasts. *Mutat. Res.*, 240, 241-249.

Upton, A. C., Clayton, D. B., Jansen, J. D., Rosenkranz, H. S. and Williams, G. M. (1984). International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.*, 133, 1-49.

Van Aswegen, C. H., Nieuwoudt, L. B., Van Rensburg, H. G. J., Steyn, P. L. and du Plessis, D. J. (1989). Estradiol and catecholestrogens as possible genotoxic carcinogens. *Clin. Physiol. Biochem.*, 7, 34-39.

Vijayalaxmi, Reiter, R. J., Leal, B. Z. and Meltz, M. L. (1996). Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices, and sister chromatid exchange in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, 357, 187-192.

Wheeler, W. J., Cheirv, L. M., Downs, T. and Hsu, T. C. (1986). Mitotic inhibition and aneuploidy induction by naturally occurring and synthetic estrogens in Chinese hamster cells in vitro. *Mutat. Res.*, 777, 31 -41.

Zawirska, B. (1991). Aflatoxin carcinogenesis in Wistar rats enhanced by thyroideum POLFA. *Mater. Med. Pol.*, 79, 191-194.

EFFECTS MUTAGENES DES HORMONES

Ninoslav ĐELIĆ et Dijana ĐELIĆ

Faculte de la medecine veterinaire de Belgrade

On a largement accpete l'avis que les substances endogenes, ci-inclu les hormones n'ont pas des effets mutagenes quand ils sont presents dans les concentrations physiologiques. Pourtant outre la stabilite et la certitude relatives du materici genetique, sa mutabilite est aussi necessaire pour que l'evolution biologique puisse exister. C'est pourquoi il est possible d'attendre que certaines reactions, a cause de la complexite du mecanisme de la transduction des signaux sous l'influence des hormones, amenant a la formation des derives capables de reagir avec les molecules DNA et aides la formation des mutations. On a donne dans ce travail la revision des recherches des effets genotoxiques des hormones dans les divers test systemes: de bacteriques, par les cultures des cellules, des experimentations *in vivo* sur les animaux de laboratoire, jusqu'au fixation des effets mutagenes chez les hommes traites par les hormones. Les effets des hormones steroïdes sont en detail decrit dans la litterature, tandis que et malgre cela, on sait encore insuffisamment sur les changements possibles du materici hereditaire sur l'influence des hormones nonsteroides. Dans les systemes plus complexes eucariotiques *in vitro* et *in vivo* la plupart des hormones steroïdes manifestent des effets mutagenes; quoique le resultat peut varier en dependance du type de la cellule ou du genre biologique employe dans l'experiment. Quand il s'agit des hormones non steroïdes, quoiqu'ils sont moins etudies, on a l'impression qu'ils en general, ne manifestent pas les effets mutagenes. Aujourd'hui il est clair que les hormones steroïdes (surtout estrogenes) sont cancerogenes complets capables de stimuler le proces de la cancerogenese, que par

l'induction des endommagements covalents de DNA qui peuvent se transformer en mutation (tumeurs initiateurs) aussi par la stimulation la division des cellules (tumeur promoteur).

Les mots des: Hormone, mutagène, génotoxique, cancer

MUTAGENOUS EFFECTS OF HORMONES

Ninoslav ĐELIĆ and Dijana ĐELIĆ

Faculty of Veterinary Medicine in Belgrade

There is a widely accepted view that the endogenous substances, including hormones, do not have any mutagenous effect when present in the usual physiological concentrations. However, beside relative stability and permanence of the genetic material, its changeability is also needed to provide for the biological evolution. Thus, it is possible to expect that certain reactions, due to the complexity of the mechanism of the signal transduction under the effect of hormones, still lead to the creation of reactive derivatives able to inter-react with the DNA molecules thus encouraging the emergence of mutations. This paper gives a survey of the exploration of the hormones' genotoxic effects in various test-systems, namely, from the bacteric through the cell cultures and experiments *in vivo* upon laboratory guinea-pigs, up to the determination of the mutagenous effects in the people that were treated by hormones. The steroid hormones effects are described in detail in the literature while, on the other hand, there is not sufficient knowledge yet about possible changes of the genetic material under the influence of the non-steroid hormones. The examinations of the steroid hormones genotoxicity in the bacterial systems have mainly given negative results. In more complex eukaryotic systems *in vitro* and *in vivo* most of the steroid hormones manifest mutagenous effects, though the result may vary depending on the type of cell or the biological species used in the experiment. As for the non-steroid hormones, though they have been studied less, it seems that they do not mostly express mutagenous effects. Today it is clear that the steroid hormones (especially estrogen) are completely cancerigenic and that they are capable of encouraging the process of cancerogenesis both by inducing covalent simulating the cell division (tumor promoters).

Key words: Hormone, mutagen, genotoxicity, cancer

Autor: Doc. dr Ninoslav Đelić, biolog, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; kućna adresa: Beograd, Kralja Milutina 35.