

**GENOTOKSIČNI POTENCIJAL NESTEROIDNIH HORMONA\***  
**GENOTOXIC POTENTIAL OF NONSTEROIDAL HORMONES**

Topalović Dijana, Živković Lada, Đelić N., Bajić V., Čabarkapa Andrea, Jović S.,  
Spremo-Potparević Biljana\*\*

*Hormoni su ćelijski proizvodi uključeni u regulaciju velikog broja procesa u živim sistemima koji svojim dejstvom utiču na rast, funkciju ili metabolizam ćelija. Obzirom da su hormoni jedinjenja koja su uobičajeno prisutna u organizmu, značajno je utvrditi da li oni mogu pod izvesnim okolnostima dovesti do genetičkih promena na naslednom materijalu. Eksperimentalna ispitivanja u in vitro i in vivo uslovima u različitim sistemima, od bakterija do sisara, bavila su se istraživanjem mutagenih i genotoksičnih efekata hormona. U ovom radu je dat pregled istraživanja genotoksičnih efekata nesteroidnih hormona, pošto još uvek nisu dovoljno poznate moguće promene naslednog materijala pod njihovim uticajem, a i ispitivanja njihovog genotoksičnog dejstva su dala oprečne rezultate. Rezultati studija pokazuju da se mehanizmi genotoksičnog dejstva nesteroidnih hormona ispoljavaju kroz povećanje oksidativnog stresa nastankom reaktivnih vrsta kiseonika (reactive oxygen species - ROS). Uobičajeni mehanizam nastanka ROS kod tireoidnih hormona i kateholamina je putem metaboličke oksidacije njihovih fenolnih grupa. Ispoljavanje genotoksičnog efekta insulina se zasniva na produkciji ROS putem aktivacije NADPH izoformi, dok je ispitivanje oksitocina pokazalo odsustvo genotoksičnog efekta. Uzimajući u obzir da su ispitivanja genotoksičnosti nesteroidnih hormona pokazala i pozitivne i negativne rezultate, objašnjenja ovog neslaganja obuhvataju ograničenja samih test sistema, različite tipove ćelije ili bioloških vrsta upotrebljenih u*

\* Rad primljen za štampu 19. 05. 2015. godine

\*\* Dijana Topalović, asistent, dr Lada Živković, docent, Katedra za fiziologiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr Ninoslav Đelić, profesor, Katedra za biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr Vladan Bajić, viši naučni saradnik, Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Andrea Čabarkapa, istraživač saradnik, Katedra za fiziologiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr Slavoljub Jović, docent, Katedra za fiziologiju i biohemiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr Biljana Spremo-Potparević, profesor, Katedra za fiziologiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

*eksperimentima, različiti nivo reaktivnosti u in vitro i in vivo uslovima, kao i moguće razlike u tkivno specifičnoj ekspresiji. Objedinjeni, navedeni podaci doprinose boljem razumevanju genotoksičnih efekata nesteroidnih hormona i ukazuju na ulogu i načine delovanja ovih hormona u procesu nastanka efekata izazvanih oksidativnim stresom.*

*Ključne reči: nesteroidni hormoni, genotoksičnost, tiroksin, adrenalin, insulin, oksitocin*

#### **Uvod / Introduction**

Pored velikog broja sredinskih genotoksičnih agenasa i neka jedinjenja koja su uobičajeno prisutna u životinjskom ili ljudskom organizmu mogu pod izvesnim okolnostima ispoljiti genotoksični i mutageni efekat. Uzimajući u obzir da su ova jedinjenja uključena u regulaciju biohemijjskih i fizioloških procesa, zajedno su nazvana endogeni mutageni (Djelić, 2001a). S obzirom da su hormoni biološki aktivna jedinjenja normalno prisutna u organizmu i da su uključeni u regulaciju velikog broja procesa u živim sistemima, važno je ispitati da li hormoni mogu biti endogeni mutageni tj da li svojim dejstvom mogu da doprinesu nastanku mutacija na nivou naslednog materijala. Hormoni su ćelijski proizvodi koji svoje dejstvo ispoljavaju kao signalni molekuli između ćelija, čime utiču na njihov rast, funkciju ili metabolizam. Oni mogu regulisati procese na nivou celog organizma ili delovati u okviru odgovarajućih tkiva, kao i na ciljne ćelije. Iako nije očekivano da bi prirodna selekcija favorizovala prisustvo supstanci sposobnih da poremete genetički integritet u organizmu, nasledni materijal je sklon promenama kompatibilnim sa evolucionim procesima, tako da složeni događaji koji stoje u osnovi dejstva hormona mogu da dovedu do genetičkih promena (Asselin-Labat i sar., 2010; Ferlin i Foresta, 2014).

Obzirom da postoji korelacija između mutageneze i karcinogeneze, podaci koji ukazuju na povezanost između nekih tipova kancera i terapijske primene hormona mogu ukazati na njihov mutageni potencijal (Djelić, 1997). Studije mutagenih efekata hormona su izvođene u različitim *in vitro* i *in vivo* sistemima, od bakterija do sisara. Odabir hormona je uglavnom obuhvatao steroidne hormone zbog očigledne korelacije između pojave određenih tipova maligniteta i upotrebe prirodnih i sintetičkih hormona u terapiji (Djelić, 2001a, Asselin-Labat i sar., 2010; Liehr, 2001). Osim steroidnih hormona i tireoidni hormoni su pored mutagenog efekta delovali i kao ko-karcinogeni u razvoju kancera debelog creva (Iishi i sar., 1992) i želuca (Iishi i sar., 1993) pacova.

Istraživanja koja ispituju kancerogene efekte steroidnih hormona navode i podatke u prilog njihovoj genotoksičnosti (Liehr, 2001; Li i sar., 1994). Sa druge strane, mnogo je manji broj studija u kojima su ispitivane sposobnosti drugih hormona da izazovu genotoksične efekte. Postoje literaturni podaci koji ukazuju na genotoksičnost adrenalina (Čabarkapa i sar., 2014; Djelić i sar., 2015; Radaković

i sar., 2014), tiroksina (Djelić i Anderson, 2003; Dobrzyńska i sar., 2004; Žukovec Topalović i sar., 2015) i insulina (Othman i sar., 2013a; Othman i sar., 2013b; Othman i sar., 2014). Pored pozitivnih, neki autori navode i negativne rezultate dobijene u testiranju genotoksičnosti hormona u određenim sistemima (Herzog i Leuschner, 1995; Djelić, 2001a; Djelić i sar., 2007a). Razlike između dobijenih rezultata genotoksičnosti hormona mogu biti uzrokovane ograničenjima samih test sistema, različitim nivoom reaktivnosti u in vitro i in vivo uslovima, kao i mogućim razlikama u tkivno specifičnoj ekspresiji genotoksičnih efekata (Djelić, 2001a).

### Sinteza i receptori nesteroidnih hormona

Hormoni adrenalin i tiroksin predstavljaju derivate amino kiseline tirozina, ali se razlikuju po mestu sinteze i mehanizmima delovanja. Tireoidni hormoni tiroksin ( $T_4$ ) i trijodtironin ( $T_3$ ), koji se sintetišu u štitnoj žlezdi, su jodirani derivati amino kiseline koji nastaju oksidativnim uparivanjem dva jodirana ostatka tirozina u tireoidni protein tireoglobulin (Pommier i sar., 1973). Ovi hormoni imaju ulogu u regulaciji rasta, razvoja i diferencijacije (Dobrzyńska i sar., 2004). Od ukupne količine izlučenih hormona, oko 90% je tiroksin ( $T_4$ ), a 10% trijodtironin ( $T_3$ ). U velikom broju tkiva se pod uticajem više enzima dešava dejodinacija  $T_4$  u  $T_3$ , obzirom da je  $T_3$  biološki aktivniji od  $T_4$ . Receptori za tireoidne hormone predstavljaju ligand-zavisne transkripcione faktore koji pripadaju velikoj "superfamiliji" steroidnih i tireoidnih receptora (Djelić, 1997).

Dopamin, noradrenalin i adrenalin, sintetisani najvećim delom u srži nadbubrežnih žlezda, spadaju u grupu endogenih kateholamina i nastaju hidrosilacijom tirozina do dihidroksifenilalanina (DOPA), koji se dekarboksilacijom prevodi u dopamin (Axelrod i Reisine, 1984). Biološki efekti adrenalina i noradrenalina odigravaju se preko specifičnih adrenergičkih  $\alpha$  i  $\beta$  receptora. Zbog sličnosti u hemijskoj strukturi, oba hormona deluju na oba tipa receptora. Ipak, noradrenalin više deluje na  $\alpha$  a adrenalin na  $\beta$  receptore (Djelić, 1997).

Kada govorimo o proteinskim hormonima, humani insulin, sintetisan u  $\beta$  ćelijama Langerhansovih ostrvaca u pankreasu, čine A i B polipeptidni lanac međusobno povezani disulfidnim mostovima. Prekursorski molekul preproinsulin vrlo brzo nakon sinteze biva preveden u proinsulin, koji uklanjanjem povezujućeg C lanca biva konvertovan u insulin. Insulin ispoljava svoje dejstvo vezivanjem za heterotetramerne insulinske receptore na membrani ciljnih ćelija (Othman, 2013). Hormon oksitocin sintetisan je u neuronima hipotalamusa, odakle se transportuje u hipofizu, iz koje se izlučuje u krvotok, a može biti sintetisan i od strane perifernih tkiva (Arrowsmith i Wray, 2014). Predstavlja oligopeptid koji se sastoji od devet amino kiselina, a koji nastaje od polipeptidnog prekursora (Rehbein i sar., 1986). Fiziološki efekti oksitocina ispoljavaju se preko specifičnih oksitocinskih receptora koji spadaju u rodopsin tip GPCR familije (Gimpl i Fahrenholz, 2001).

### **Oštećenja naslednog materijala izazvana nesteroidnim hormonima**

Postoje indicije da fenolne grupe nesteroidnih hormona, kao što su adrenalin i tiroksin, povećavaju endogeno formiranje reaktivnih vrsta kiseonika (reactive oxygen species - ROS), dovodeći do oksidativnog stresa i prekida na lancima DNK (Moldeus i sar., 1983; Djelić i Anderson, 2003; Dobrzyńska i sar., 2004; Khansari i sar., 2009). Ispitivanjem različitih kateholamina i srodnih supstanci došlo se i do zapažanja da je, iako fenolna komponenta nije mutagena, dodavanje druge hidroksilne grupe kojom dolazi do formiranja katehola dovoljno za sticanje mutagenog potencijala (McGregor i sar., 1988). Takođe, studije pokazuju da tireoidni hormoni povećanjem aerobnog metabolizma utiču na produkciju reaktivnih vrsta kiseonika, što kao rezultat ima stanje oksidativnog stresa (Oppenheimer i sar., 1996; Fernandez i sar., 2005; Chandra i sar., 2010). Stoga, nastanak oksidativnog stresa tj metabolička oksidacija fenolnih grupa predstavlja uobičajeni mehanizam genotoksičnog dejstva kako steroidnih tako i nesteroidnih hormona sa fenolnim grupama (Djelić i sar., 2008). Mehanizam dejstva insulina počinje fosforilacijom insulinskih receptora, nakon čega dolazi do aktivacije fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K). Kao posledica ovoga, aktivacijom NADPH izoformi dolazi do produkcije ROS i DNK oksidacije (Othman i sar., 2014).

### **Tiroksin**

Vezivanje tireoidnih hormona za specifične jedarne receptore u ciljnim ćelijama indukuje ekspresiju enzima povezanih sa redoks procesima i povećanjem ukupnog nivoa potrošnje kiseonika (Oppenheimer i sar., 1996). Primećeno je da povećanjem aerobnog metabolizma u mitohondrijama, tireoidni hormoni mogu dovesti do intenzivne produkcije ROS, dovodeći do povećanja oksidativnog stresa koji je uključen u patogenezu mnogih ljudskih bolesti, uključujući hronična oboljenja vezana sa starenjem, rak, degeneraciju mišića i koronarne bolesti srca (Venditti i sar., 2003; Fernandez i sar., 2005; Chandra i sar., 2010; Schmidt-Ott i Ascheim, 2006). Neka patološka stanja mogu izmeniti nivo tireoidnih hormona, menjajući nivo bazalnog metabolizma, što takođe dovodi do porasta oksidativnog stresa (Schmidt-Ott i Ascheim, 2006; Venditti i Di Meo, 2006; Villanueva i sar., 2013). Generalni princip je da hipertireoidizam izaziva oksidativni stres, dok hipotireoidizam dovodi do blagog ili nivoa oksidativnog stresa koji nije moguće detektovati (Magsino i sar., 2000; Villanueva i sar., 2013; Venditti i Di Meo, 2006). Opšte je prihvaćeno da oksidativni stres narušava homeostazu u ćelijama organizma kada produkcija ROS premaši kapacitet ćelije da ga smanji. Tretman tiroksinom direktno stimuliše produkciju superoksidnih anjona u neutrofilima i makrofagama (Nishizawa i sar., 1998; Kanazawa i sar., 1992), a smanjuje i nivo antioksidativne zaštite (Fernandez i sar., 1988; Saičić i sar., 2006). Povećani oksidativni stres izaziva oštećenja na proteinima, lipidima membrane i DNK. Osim lipidne peroksidacije, povišen nivo tireoidnih hormona izaziva proteinsku oksidaciju u humanim leukocitima (Magsino i sar., 2000) i jetri pacova (Tapia i sar.,

1999), dok neki eksperimentalni podaci pokazuju da tireoidni hormoni indukuju DNK oštećenja u ćelijama sperme i humanim limfocitima (Djelić i Anderson, 2003).

Činjenica da tireoidni hormoni utiču na više aspekata oksidativnog stresa može objasniti nedoslednost u literaturi o njihovom efektu (Villanueva i sar., 2013), kao i neslaganja u rezultatima vezanim za genotoksičnu aktivnost ovih hormona. Dok se oštećenje proteina uočava i posle kratke izloženosti tiroksinu, oksidativna DNK oštećenja u jetri i srcu miševa nisu konstatovana čak ni posle duže izloženosti (Venditti i Di Meo, 2006). Jedno od objašnjenja može biti nedostatak porasta nivoa jednog od glavnih produkata DNK oksidacije, 8-okso-2'-deoksiguanozina (8-oxo-dG), nakon kratkotrajnog izlaganja. Razlog tome mogu biti uklanjanje  $H_2O_2$  od strane antioksidanasa u citosolu pre nego što on stigne do jedra, intenzivna prekrivenost jedarne DNK histonima koji je čine manje izloženom ROS, kao i povećanje reparacije oksidativnih oštećenja jedarne DNK tokom oksidativnog stresa izazvanog tiroksinom (Venditti i Di Meo, 2006). U prilog ovoj tvrdnji, evaluacija mogućeg klastogenog efekta L-tiroksina na kulturama ćelija limfocita pune krvi nije pokazala statistički značajno prisustvo strukturnih hromozomskih aberacija, a on je samo pri najvećim koncentracijama značajno smanjio mitotski indeks (Djelić i sar., 2007a; Djelić i sar., 2007b). Sa druge strane, prekomerne količine tireoidnih hormona izazvale su hipermetaboličko stanje *in vivo*, pri čemu je kod ispitivanih pacova ispoljen nizak antioksidantski kapacitet i povećano stvaranje slobodnih radikala (Venditti i sar., 1997). Promene u tireoidnoj funkciji od strane  $T_4$  dovode do toga da povećana koncentracija tiroksina ima stresogeni efekat na jetru i druge organe (Chandra i sar., 2010). Iako nema previše studija procene oksidativnog stresa izazvanog tiroksinom korišćenjem Komet testa u *in vitro* uslovima, postoje rezultati koji pokazuju da su  $T_3$  i  $T_4$  izazvali povećan nivo DNK oštećenja u leukocitima (Djelić i Anderson, 2003; Žukovec Topalović, 2015) i ćelijama ljudske sperme (Dobrzyńska i sar., 2004). Pomenuti rezultati pružaju jake dokaze da tireoidni hormoni izazivaju oksidativni stres u ciljnim ćelijama.

Ipak, citogenetička analiza efekata tiroksina na humane limfocite pune krvi dala je dvosmislene rezultate. Postojalo je povećanje učestalosti razmene sestrinskih hromatida (SCE) po ćeliji pri relativno visokim dozama tiroksina, ali rezultati mikronukleus testa su bili negativni (Djelić i sar., 2006), tako da su dobijeni podaci interpretirani kao odsustvo genotoksičnih efekata (Djelić i sar., 2006). Istraživanja praćenja hromozomskih prekida u kulturama humanih limfocita pune krvi pokazala su nedostatak klastogenog efekta tiroksina (Djelić i sar., 2007a).

Raskorak između pozitivnih i negativnih rezultata genotoksičnih efekata tiroksina tumači se kroz primenu različitih test sistema (Djelić i sar., 2008). Razmena sestrinskih hromatida se smatra pomoćnim testom u genotoksikologiji, dok mikronukleus i Komet test predstavljaju pouzdane testove za procenu genotoksičnog potencijala. Mikronukleusi potiču ili od acentričnih fragmenata hromozoma ili su to celi hromozomi koji nisu migrirali tokom anafaze, tako da mikronukleus test detektuje aktivnost i klastogenih i aneugenih hemikalija i može služiti za utvrđivanje razlike između ove dve kategorije, dok Komet test

registruje jednonančane i dvolančane DNK prekide, kao i alkalna labilna mesta. Navodi se da Komet test poseduje veću osetljivost od mikronukleus testa i da, u kombinaciji oni daju pouzdanu sliku potencijalne genetičke nestabilnosti izazvane različitim agensima (Kazimirova i sar., 2012). Takođe, efekti tireoidnog hormona prilikom korišćenja Komet testa su evaluirani na izolovanim limfocitima (Djelić i Anderson, 2003), dok je citogenetička analiza rađena na kulturama limfocita pune krvi (Djelić i sar., 2006). Ovo se navodi kao razlika zato što eritrociti iz uzoraka pune krvi sadrže katalazu i glutation peroksidazu koje eliminišu vodonik peroksid i doprinose smanjenju stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (Andreoli i sar., 1999), a genotoksični efekat reaktivnih vrsta kiseonika je izraženiji prilikom izvođenja testova na izolovanim limfocitima nego na limfocitima iz uzoraka pune krvi (Djelić i sar., 2008).

### **Adrenalin**

Postoje eksperimentalne naznake da kateholne grupe dopamina, noradrenalina i adrenalina mogu biti uključene u redoks cikluse koje prati nastanak reaktivnih vrsta kiseonika (Moldeus i sar., 1983; Miura i sar., 2000; Djelić i Anderson, 2003; Dobrzyńska i sar., 2004). Skoriji eksperimentalni dokazi potvrđuju sposobnost adrenalina da izazove promene na DNK (Miura i sar., 2000; Djelić i Anderson, 2003; Dobrzynska i sar., 2004; Čabarkapa i sar., 2014). Pretpostavke da adrenalin može dovesti do genetičke nestabilnosti podržavaju i istraživanja koja objašnjavaju kako biohemijski događaji u pozadini dejstva ovog i drugih kateholamina, kao što su dopamin i noradrenalin, mogu eventualno izazvati genetičke promene (Cavalieri i Rogan, 2004; Djelić i Anderson, 2003; Genova i sar., 2006; Moldeus i sar., 1983). Studije su pokazale da DNK oštećenja nastaju tokom oksidacije i ciklizacije adrenalina do semikvinonskog noradrenohroma i adrenohroma, rezultujući stvaranjem nusprodukata kao što su ROS i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Miura i sar., 2000; Bindoli i sar., 1990; Behonick i sar., 2001; Genova i sar., 2006). To potvrđuju i nalazi da superoksidni anjoni, nastali u reakciji semikvinona sa molekularnim kiseonikom (Genova i sar., 2006), predstavljaju verovatan mehanizam genotoksičnog dejstva kateholamina (Moldeus i sar., 1983; McGregor i sar., 1988), obzirom da ovi anjoni mogu izazvati prekide na hromozomima i SCE u humanim limfocitima *in vitro* (M'Bemba-Meka i sar., 2007).

Utvrđeno je da kateholamini utiču na transkripciju gena direktno povezanih sa putevima signalizacije i sensorima signalnih puteva DNK oštećenja, čime je pokazano da ovi hormoni utiču na povećanje nivoa DNK oštećenja (Flint i sar., 2007). Novija istraživanja sa Komet testom potvrđuju da adrenalin u visokim koncentracijama izaziva prekide na DNK lancima (Čabarkapa i sar., 2014), a pri najvećim korišćenim koncentracijama adrenalin dovodi i do značajnog smanjenja mitotskog indeksa, što se tumači verovatnim zaustavljenjem mitoze radi reparacije genetičkih oštećenja (Djelić i sar., 2015). Osim ovih, postoje i podaci

da otpuštanje kateholamina u količinama koje premašuju fiziološke koncentracije izaziva citotoksični efekat u neuroblastima, ćelijama melanoma i miokarda (Behonick i sar., 2001; Miura i sar., 2000; Okamoto i sar., 1996). Takođe, otkriveni su i mutageni efekti adrenalina na ćelijama limfoma kod miševa (McGregor i sar., 1988).

Pored prethodno navedenih istraživanja koja govore u prilog genotoksičnosti adrenalina, postoje i studije u kojima se zaključuje da nisu zabeleženi njegovi citogenetički detektibilni genotoksični efekti (Djelić i sar., 2015). U navedenom istraživanju su korišćeni SCE i mikronukleus test i tom prilikom nije primećena značajna promena učestalosti razmene sestrinskih hromatida, a ni učestalosti mikronukleusa nisu dostigle statistički značajne promene u tretiranim kulturama humanih limfocita. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ranije studije genotoksičnosti dopamina, u kojoj su rezultati mikronukleus testa na kostnoj srži bili negativni, a ovo jedinjenje sa kateholnom grupom nije uticalo ni na učestalost SCE u tretiranim kulturama humanih limfocita (Moldeus i sar., 1983). Takođe, postoje podaci da adrenalin nije izazvao hromozomske aberacije u kulturi humanih limfocita pune krvi (Djelić i sar., 2003).

Prilikom sagledavanja svih navedenih rezultata treba imati na umu nekoliko stvari. U pogledu primene određenih test sistema i njihove pouzdanosti, može se primeniti tumačenje navedeno i za tiroksin tj. da SCE predstavlja pomoćni test u genotoksikologiji, a da mikronukleus i Komet test predstavljaju pouzdane testove za procenu genotoksičnog potencijala i da zajedno daju prikaz potencijalne genetičke nestabilnosti izazvane različitim agensima (Kazimirova i sar., 2012). Ako govorimo o pozitivnim tj negativnim rezultatima genotoksičnosti adrenalina u ovim test sistemima, takođe treba uzeti u razmatranje nekoliko faktora. Antioksidantski enzimi prisutni u eritrocitima uzoraka pune krvi doprinose smanjenju stvaranja ROS (Andreoli i sar., 1999), kao što je već navedeno i za tiroksin. Veći porast nivoa DNK oštećenja zabeležen je nakon inkubacije sa adrenalinom u trajanju od 15 minuta u odnosu na inkubaciju u trajanju od 1 sat (Djelić i sar., 2015). Ovo je objašnjeno time da je 1 sat dovoljan vremenski period da se aktiviraju mehanizmi reparacije (Djelić i sar., 2015), čime je pokazano da pozitivni tj negativni rezultati genotoksičnog dejstva adrenalina zavise i od dužine inkubacije. Takođe, negativnim rezultatima citogenetičkog *in vitro* testa mogao je doprineti i kratak poluživot adrenalina u humanoj plazmi od samo nekoliko minuta (Djelić i sar., 2008).

### **Proteinski hormoni**

Testiranje genotoksičnosti proteinskih hormona do sada nije bilo predmet intenzivnih istraživanja. Istraživanje koje su sproveli Othman i sar. (2013a) pokazuje da insulin može izazvati DNK oštećenja na ćelijama debelog creva sisara *in vitro*, što može doprineti razvoju ili progresiji kancera debelog creva. Slične efekte su konstatovali i kod ćelija bubrega svinja i pacova *in vivo* (Othman i sar.,

2013b). Interesantni eksperimentalni nalazi dobijeni na insulinu i insulinu sličnom faktoru rasta IGF-1, pokazuju da IGF-1 ispoljava potencijalni klastogeni efekat tj da povećava učestalost spontanih hromozomskih prekida (Cianfarani i sar., 1998). Takođe, tretman insulinom ili IGF-1 pre izlaganja radijaciji inhibira reparaciju potencijalno letalnih oštećenja, dovodeći do porasta nivoa hromozomskih aberacija u pretretiranim ćelijama karcinoma pluća (Jayanth i sar., 1995).

Kao i u slučaju prethodna dva hormona i ovde postoje studije koje osim pozitivnih daju i negativne rezultate genotoksičnosti insulina. Ranija eksperimentalna zapažanja Bildina i sar., (1990) pokazuju da izlaganje insulinu neposredno pre radijacije značajno smanjuje broj jedno i dvolančanih DNK prekida. Takođe, testiranje spektra koncentracija insulina na humanim limfocitima SCE i mikronukleus testom *in vitro* nije pokazalo genotoksične efekte insulina (Djelić, 2001b), a insulin nije uticao ni na učestalost hromozomskih prekida i aberacija u kulturama humanih limfocita pune krvi (Djelić i sar., 2000), iako je stimulisao proliferaciju limfocita iz kultura (Djelić i Soldatović, 1998).

Osim insulina, ispitivana je i genotoksičnost peptidnog hormona oksitocina. Citogenetička studija oksitocina na kulturama humanih limfocita periferne krvi je pokazala da hormon nije ispoljio genotoksične osobine ni u testovima hromozomskih aberacija ni u SCE testu *in vitro* (Djelić i sar., 1996).

#### **Zaključak / Conclusion**

Rezultati testiranja hormona pokazali su da tireoidni hormoni i kateholamini mogu da ispolje genotoksične efekte i da, i pored različitih funkcija koje obavljaju u biološkim sistemima, metabolička oksidacija fenolnih grupa i nastanak reaktivnih vrsta kiseonika predstavlja uobičajeni mehanizam genotoksičnog dejstva i steroidnih i nesteroidnih hormona sa fenolnim grupama. Mehanizam genotoksičnog dejstva proteinskog hormona insulina se zasniva na produkciji ROS putem aktivacije NADPH izoformi. Eksperimentalna ispitivanja u *in vitro* i *in vivo* uslovima u različitim eukariotskim sistemima pružaju oprečne rezultate, obzirom da pojedine studije pokazuju da nesteroidni hormoni ispoljavaju genotoksičnost, dok su u drugim studijama rezultati ispitivanja genotoksičnog dejstva negativni. Rezultati studija variraju u zavisnosti od tipa ćelije ili biološke vrste upotrebljene u eksperimentu, kao i od ograničenja samih test sistema. Objedinjeni, navedeni podaci doprinose boljem razumevanju genotoksičnih efekata nesteroidnih hormona i ukazuju na ulogu i načine delovanja ovih hormona u procesu nastanka efekata izazvanih oksidativnim stresom.

#### **NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:**

Rezultati rada su deo naučno istraživačkog projekta u oblasti osnovnih istraživanja, evidencioni broj 173034, finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.



## Literatura / References

1. Andreoli C, Rossi S, Leopardi P, Crebelli R. DNA damage by hydroquinone in human white blood cells: analysis by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 1999; 438: 37–45.
2. Arrowsmith S, Wray S. Oxytocin: Its Mechanism of Action and Receptor Signalling in the Myometrium. *J Neuroendocrinol* 2014; 26: 356–69.
3. Asselin-Labat ML, Vaillant F, Sheridan JM, Pal B, Wu D, Simpson ER, Yasuda H, Smyth GK, Martin TJ, Lindeman GJ, Visvader JE. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 2010; 465(7299): 798–802.
4. Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: Their interaction and regulation. *Science* 1984; 224: 42–9.
5. Behonick GS, Novak MJ, Nealley EW, Baskin SI. Toxicology update: the cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (Aminochromes). *J Appl Toxicol* 2001; 21(1): 15–22.
6. Bildin VN, Seregina TB, Zhestianikov VD. The regulation of DNA repair in mammalian cells. I. The repair of DNA radiation damages in Swiss 3T6 mouse cells under the action of the epidermal growth factor and insulin. *Tsitologija* 1990; 32(10): 1037–45.
7. Bindoli A, Deeble DJ, Rigobello MP, Galzigna L. Direct and respiratory chain-mediated redox cycling of adrenochrome. *Biochim Biophys Acta* 1990; 26: 349–356.
8. Čabarkapa A, Živković L, Žukovec D, Djelić N, Bajić V, Dekanski D, Spremo-Potparević B. Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes. *Toxicol in Vitro* 2014; 28(3): 451–6.
9. Cavalieri EL, Rogan EG. A unifying mechanism in the initiation of cancer and other diseases by catechol quinones. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1028: 247–257.
10. Chandra A K, Sinha S, Choudhury SR. Thyroxine induced stress and its possible prevention by catechin. *Indian J Exp Biol* 2010; 48(6): 559–565.
11. Cianfarani S, Tedeschi B, Germani D, Prete SP, Rossi P, Vernole P, Caporossi D, Boscherini B. In vitro effects of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I and II (IGF-I and -II) on chromosome fragility and p53 protein expression in human lymphocytes. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(1): 41–7.
12. Djelić N, Soldatović B, Andjelković M, Cvetković D. In vitro cytogenetic analysis of the effects of oxytocin on human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 1996; 356: 265–8.
13. Djelić N. Citogenetički efekti estradiola, tiroksina, insulina i adrenalina na humane limfocite in vitro. Doktorska disertacija 1997; Univerzitet u Beogradu, 1–179.
14. Djelic N, Soldatovic B. Mitotic activity and cell cycle kinetics in cultures of human lymphocytes treated with insulin. *Genetika* 1998; 30: 125–131.
15. Djelic N, Soldatovic B, Djelic D. Cytogenetic evaluation of insulin effects on cultured human lymphocytes. *Arch Biol Sci* 2000; 52: 27P–28P.
16. Djelić N. Mechanisms of genotoxic effects of hormones. *Genetika* 2001a; 34(2-3): 59-71.
17. Djelic N. Analysis of sister-chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes treated with insulin. *Folia Biologica* 2001b; 47: 28–31.
18. Djelic N, Anderson D. The effect of the antioxidant catalase on oestrogens, triiodothyronine, and noradrenaline in the comet assay. *Teratog Carcin Mut* 2003; Supplement 2: 69–81.
19. Djelić N, Djelić D, Spremo-Potparević B, Marković B, Živković L. Cytogenetic analysis of the effects of epinephrine on cultured human lymphocytes. *Acta Veter* 2003; 53(2-3): 113–120.
20. Djelic N, Spremo Potparevic B, Bajic V, Djelic D. Sister chromatid exchange and micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with thyroxine in vitro. *Mutat Res* 2006; 604: 1–7.

21. Djelić N, Djelić D, Spremo-Potparević B, Živković L, Marković B, Lozance O, Blagojević M. Lack of clastogenic effects of L-thyroxine in whole-blood cultured human lymphocytes. *Genet Molec Bio* 2007a; 30(4): 1144–9.
22. Djelić N, Nešić I, Stanimirović Z, Jovanović S. Evaluation of the genotoxic effects of thyroxine using in vivo cytogenetic test on Swiss albino mice. *Acta Veter* 2007b; 57(5–6): 487–495.
23. Djelić N, Spremo-Potparević B, Živković L. Molecular mechanisms of mutagenic effects of hormones. *Recent Trends in Toxicology* 2008; 1–22.
24. Djelić N, Radaković M, Spremo-Potparević B, Živković L, Bajić V, Stevanović J, Stanimirović Z. Evaluation of cytogenetic and DNA damage in human lymphocytes treated with adrenaline in vitro. *Toxicol in Vitro* 2015; 29: 27–33.
25. Dobrzyńska MM, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants modulate thyroid hormone- and nor-adrenaline-induced DNA damage in human sperm. *Mutagenesis* 2004; 19(4): 325–330.
26. Ferlin A, Foresta C. Testis cancer: genes, environment, hormones. *Front Endocrinol* 2014; 5: 1-2.
27. Fernandez V, Llesuy S, Solari L, Kipreos K, Videla LA, Boveris A. Chemiluminescent and respiratory responses related to thyroid hormone-induced liver oxidative stress. *Free Radical Research* 1988; 5(2): 77–84.
28. Fernandez V, Tapia G, Varela P, Romanque P, Cartier-Ugarte D, Videla LA. Thyroid hormone induced oxidative stress in rodents and humans: a comparative view and relation to redox regulation of gene expression. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2005; 142(3–4): 231–9.
29. Flint MS, Baum A, Chambers WH, Jenkins FJ. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinology* 2007; 32(5): 470–9.
30. Genova ML, Abd-El Salam NM, Mahdy ESME, Bernacchia A, Lucarini M, Pedulli GF, Giorgio Lenaz. Redox cycling of adrenaline and adrenochrome catalysed by mitochondrial Complex I. *Arch Biochem Biophys* 2006; 447: 167–173.
31. Gimpl G, Fahrenholz F. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiol Rev* 2001; 81(2): 629–83.
32. Herzog R, Leuschner J. Evaluation of the mutagenicity of medroxyprogesterone acetate in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung* 1995; 45(1): 311–4.
33. Iishi H, Tatsuta M, Baba M, Okuda S, Taniguchi H. Enhancement by thyroxine of experimental carcinogenesis induced in rat colon by azoxymethane. *Int J Cancer* 1992; 50: 974–6.
34. Iishi H, Tatsuta M, Baba M, Yamamoto R, Taniguchi H. Enhancement by thyroxine of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Br J Cancer* 1993; 68: 515–8.
35. Jayanth VR, Belfi CA, Swick AR, Varnes ME. Insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inhibit repair of potentially lethal radiation damage and chromosome aberrations and alter DNA repair kinetics in plateau-phase A549 cells. *Radiat Res* 1995; 143(2): 165–74.
36. Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K, Terakawa K, Fujiwara H, Matsushita H, Ota K, Takeda T. The effect of thyroid hormone on generation of free radicals by neutrophils and alveolar macrophages. *Arerugi* 1992; 41(2 Pt 1): 135–9.
37. Kazimirova A, Magdolenova Z, Barancokova M, Staruchova M, Volkovova K, Dusinska M. Genotoxicity testing of PLGA-PEO nanoparticles in TK6 cells by the comet assay and the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 2012; 748: 42–7.
38. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009; 3(1): 73–80.
39. Li Y, Trush MA, Yager JD. DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis* 1994; 15(7):1421–7.

40. Liehr JG. Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *Hum Reprod Update* 2001; 7(3): 273–281.
41. M'bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti SK. Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol* 2007; 81: 89–99.
42. Magsino Jr CH, Hamouda W, Ghanim H, Browne R, Aljada A, Dandona P. Effect of triiodothyronine on reactive oxygen species generation by leukocytes, indices of oxidative damage, and antioxidant reserve. *Metabolism* 2000; 49(6): 799–803.
43. McGregor D, Raich CG, Brown A, Edwards I, Reynolds D, West K, Willington S. Reactivity of catecholamines and related substances in the mouse lymphoma L5178Y cell assay for mutagens. *Environ Mol Mutagen* 1988; 11: 523–44.
44. Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y, Zhao K. DNA damage induced by catechol derivatives. *Chem Biol Interact* 2000; 126: 125–136.
45. Moldeus P, Nordenskjold M, Bolcsfoldi G, Eiche A, Haglund U, Lambert B. Genetic toxicity of dopamine. *Mutation Research* 1983; 124(1): 9–24.
46. Nishizawa Y, Fushiki S, Amakata Y, Nishizawa Y. Thyroxine-induced production of superoxide anion by human alveolar neutrophils and macrophages: a possible mechanism for the exacerbation of bronchial asthma with the development of hyperthyroidism. *In Vivo* 1998; 12(2): 253–7.
47. Okamoto T, Adachi K, Muraishi A, Seki Y, Hidaka T, Toshima H. Induction of DNA breaks in cardiac myoblast cells by norepinephrine. *Biochem. Mol Biol Int* 1996; 38(4): 821–7.
48. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Strait KA. The molecular basis of thyroid hormone actions. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbars The thyroid. A fundamental and clinical text*, 7th ed.; Lippincott-Raven, New York; 1996; 162–184.
49. Othman EM. In vitro and in vivo analysis of insulin-induced oxidative stress and DNA damage. *Doktorska disertacija* 2013; Julius-Maximilians-University Würzburg, 1–142.
50. Othman EM, Leyh A, Stopper H. Insulin mediated DNA damage in mammalian colon cells and human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 2013a; 745–746: 34–9.
51. Othman EM, Kreissl MC, Kaiser FR, Arias-Loza PA, Stopper H. Insulin-mediated oxidative stress and DNA damage in LLC-PK1 pig kidney cell line, female rat primary kidney cells, and male ZDF rat kidneys in vivo. *Endocrinology* 2013b; 154(4): 434–443.
52. Othman EM, Hintzsche H, Stopper H. Signaling steps in the induction of genomic damage by insulin in colon and kidney cells. *Free Radic Biol Med* 2014; 68: 247–257.
53. Pommier J, Deme D, Nunez J. Effect of iodide concentration on thyroxine synthesis catalysed by thyroid peroxidase. *Eur J Biochem* 1973; 37: 406–14.
54. Radaković M, Đelić N, Stevanović J, Anđelković M, Kolarević S, Dačić S, Stanimirović Z. The investigation of DNA damage induced by adrenaline in human lymphocytes in vitro. *Acta Veter* 2014; 64(3): 281–92.
55. Rehbein M, Hillers M, Mohr E, Ivell R, Morley S, Schmale H, Richter D. The neurohypophyseal hormones vasopressin and oxytocin. Precursor structure, synthesis and regulation. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986; 367(8): 695–704.
56. Saičić ZS, Mijalković DN, Nikolić AL, Blagojević DP, Spasić MB. Effect of thyroxine on antioxidant defense system in the liver of rats of different age. *Physiol Res* 2006; 55: 561–8.
57. Schmidt-Ott UM, Ascheim DD. Thyroid hormone and heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2006; 3(3): 114–9.
58. Tapia G, Cornejo P, Fernandez V, Videla LA. Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol Letters* 1999; 106(2–3): 209–214.
59. Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *Journal of Endocrinology* 1997; 155(1): 151–7.

60. Venditti P, De Rosa R, Di Meo S. Effect of thyroid state on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by rat liver mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 205(1-2): 185-192.
61. Venditti P, Di Meo S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(4): 414-434.
62. Villanueva I, Alva-Sánchez C, Pacheco-Rosado J. The role of thyroid hormones as inducers of oxidative stress and neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2013; Article ID 218145, 15 pages.
63. Žukovec Topalović D, Živković L, Čabarkapa A, Djelić N, Bajić V, Dekanski D, Spremo-Potparević B. Dry olive leaf extract counteracts L-thyroxine-induced genotoxicity in human peripheral blood leukocytes in vitro. *Oxid Med Cell Longev* 2015; Article ID 762192, 8 pages.

ENGLISH

### GENOTOXIC POTENTIAL OF NONSTEROIDAL HORMONES

**Topalovic Dijana, Zivkovic Lada, Djelic N., Bajic V., Cabarkapa Andrea, Jovic S., Spremo-Potparević Biljana**

Hormones are cellular products involved in the regulation of a large number of processes in living systems, and which by their actions affect the growth, function and metabolism of cells. Considering that hormones are compounds normally present in the organism, it is important to determine if they can, under certain circumstances, lead to genetic changes in the hereditary material. Numerous experimental studies in vitro and in vivo in different systems, from bacteria to mammals, dealt with the mutagenic and genotoxic effects of hormones. This work presents an overview of the research on genotoxic effects of nonsteroidal hormones, although possible changes of genetic material under their influence have not still been known enough, and moreover, investigations on their genotoxic influence have given conflicting results. The study results show that mechanisms of genotoxic effect of nonsteroidal hormones are manifested through the increase of oxidative stress by arising reactive oxygen species. A common mechanism of ROS occurrence in thyroid hormones and catecholamines is through metabolic oxidation of their phenolic groups. Manifestation of insulin genotoxic effect is based on production of ROS by activation of NADPH isophorms, while testing oxytocin showed absence of genotoxic effect. Considering that the investigations on genotoxicity of nonsteroidal hormones demonstrated both positive and negative results, the explanation of this discordance involve limitations of test systems themselves, different cell types or biological species used in the experiments, different level of reactivity in vitro and in vivo, as well as possible variations in a tissue-specific expression. Integrated, the provided data contribute to better understanding of genotoxic effect of nonsteroidal hormones and point out to the role and mode of action of these hormones in the process of occurring of effects caused by oxidative stress.

Key words: nonsteroidal hormones, genotoxicity, thyroxine, adrenaline, insulin, oxytocin

## ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕСТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

**Топалович Дияна, Живкович Лада, Джелич Н., Байич В.,  
Чабаркапа Андреа, Йович С., Спремо-Потпаревич Биляна**

Гормоны являются продуктами деятельности клеток, участвующими в регуляции многочисленных процессов в живых организмах, воздействующими на рост клеток, функции или клеточный метаболизм. Учитывая, что гормоны являются соединениями, присутствующими в организме, важно установить, могут ли они при определенных условиях привести к генетическим изменениям наследственного материала. Экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo* в различных системах (от бактерий до млекопитающих) были направлены на изучение мутагенных и генотоксических эффектов гормонов. В данной работе приведен обзор исследований генотоксических эффектов нестероидных гормонов, поскольку недостаточно известны возможные изменения наследственного материала, обусловленные их воздействием, а исследования их генотоксического действия дали противоречивые результаты. Результаты исследований показали, что механизмы генотоксического действия нестероидных гормонов проявляются в усилении окислительного стресса при образовании активных форм кислорода. Обычным механизмом формирования АФК для гормонов щитовидной железы и катехоламинов является окислительный метаболизм их фенольных групп. Проявление генотоксического эффекта инсулина основывается на образовании АФК путем активирования изоформ НАДФ, при этом исследование окситоцина показало отсутствие генотоксического эффекта. С учетом того, что исследования генотоксичности нестероидных гормонов дали как положительные, так и отрицательные результаты, объяснение этого несоответствия включает ограничения самих тест-систем, различные типы клеток или биологических видов, использованных в ходе экспериментов, различные уровни активности в условиях *in vitro* и *in vivo*, а также возможные различия в тканеспецифической экспрессии. В совокупности полученные данные способствуют более глубокому пониманию генотоксических эффектов нестероидных гормонов и указывают на роль и характер воздействия этих гормонов в процессе возникновения эффектов, вызванных окислительным стрессом.

Ключевые слова: нестероидные гормоны, генотоксичность, тироксин, адреналин, инсулин, окситоцин