

17- β Estradiole ile İndüklenen İnsan Lenfositlerindeki Mikronükleus Sıklığının İncelenmesi

Gülgün S. GÜVEN¹, Tuğba CUNA¹, Nazlı BİRİNCİ¹, Mehmet GÜVEN¹, İlhan ONARAN¹,
Seniha HACIHANEFİOĞLU¹, Turgut ULUTİN¹

¹ İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Özet

Bazı epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, kanser gelişimi ile östrojenler arasında bir ilişkinin olduğunu göstermiştir. Estrojenler ile ilişkili karsinogenezin, reaktif metabolitlerle direk DNA hasarı ve reaktif oksijen metabolitleriyle indirek genotoksik etkinin bir kombinasyonunun sonucu olduğunu düşündürmektedir. İnsan periferel kan lenfositlerinde uygulanan 'Sitokinez-blok' mikronükleus (MN) metodu, genetik toksikoloji testleri arasında standart bir sitogenetik test olarak dünya üzerindeki birçok laboratuvarca kabul edilen bir metoddur. Sunulan çalışmanın amacı, lenfosit kültürlerinde estradiol (E_2)'ün muhtemel genotoksik etkilerini 'Sitokinez-blok' MN metodu kullanarak araştırmaktır. Çalışma, 50 sağlıklı erkek donörden izole edilen lenfositlerde gerçekleştirildi. Kontrol kültürleriyle (1-15 MN / 1000 hücre) karşılaştırıldığında E_2 (36 μ M) uygulanan kültürlerde (1-11 MN / 1000 hücre) MN sıklığında herhangi bir istatistiksel fark tespit edilmedi ($p > 0.05$). Ayrıca binükleuslu hücredeki MN sıklığı, E_2 uygulaması ile değişmedi (Kontrol kültürlerinde: 5.88 ± 2.9 ; E_2 kültürlerinde 5.64 ± 2.5 , $p > 0.05$). Sonuçlarımız; estradiolün kültüre edilmiş lenfositlerde herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Genotoksik test; estradiol 17- β ; lenfosit kültür

Cerrahpaşa Tıp Derg 2006; 37: 10 - 13

17- β Estradiole Induced Micronucleus Formation in Human Lymphocytes

Abstract

Some epidemiological and experimental studies showed that there is a relation between oestrogen and development of some cancers. The carcinogenicity of estrogens is considered to be the result of a combination of DNA damage by reactive metabolites and indirect genotoxicity by redox cycling and production of reactive oxygen species. Cytokinesis-block micronucleus test (CBMN) in human peripheral blood lymphocytes has been accepted by many laboratories all over the world as a standard cytogenetic investigation for testing the genetic toxicology. The objective of the present study was to evaluate possible genotoxic effects of estradiol (E_2) in cultured lymphocytes, using the CBMN assay. This study was performed in human peripheral blood lymphocytes from a group of 50 healthy men. No statistically significant difference in micronucleus frequency was detected in E_2 (36 μ M) treatment (1-11 MN / 1000 cells) cultures compared to control (1-15 MN / 1000 cells) cultures ($p > 0.05$). The frequency of MN in binucleate lymphocytes was not altered by E_2 treatment (5.88 ± 2.9 in control cultures and 5.64 ± 2.5 in treatment cultures; $p > 0.005$). Our results suggest that there are not any genotoxic effects of estradiol in cultured lymphocytes.

Key Words: Genotoxicity test; estradiol 17- β ; lymphocytes culture

Cerrahpaşa J Med 2006; 37: 10 - 13

Estrojenlerin, dokuların büyüme, farklılaşma ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Bununla birlikte epidemiyolojik çalışmalarından elde edilen bulgular, tümör gelişimi ile estrojene uzun süreli maruz kalma arasında bir ilişki olabileceğini de göstermektedir [1,2,3]. E_2 (17- β estradiol)'e bağlı karsinogenez ile ilgili iki mekanizma ileri sürülmektedir; a) E_2 'nin hücre döngüsü proteinlerinin ekspresyonunu arttırmak suretiyle

hücre proliferasyonunu uyarıcı etkisi: Spontan replikasyon hatalarına sahip olan hücrelerin çoğalmasını sağlamak b) E_2 'nin genotoksik etkisi: E_2 metabolitlerinin DNA'ya direk etkisi ya da bu metabolitler tarafından reaktif oksijen metabolitleri üzerinden DNA hasarı meydana getirmesidir [4,5,6,7]. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda da reaktif oksijen metabolitlerinin DNA'da mutajenik etkilere neden olduğu veya ploidi gibi kromozomal anomalilere ve mikronükleus (MN) oluşumuna yol açtığı iyi bilinmektedir [8,12].

E_2 premenapozal kadınlarda over foliküllerinden salınan en önemli hormondur. E_2 'nin, DNA baz modifikasyonu, mutasyonu ve fragmantasyonu gibi genotoksik etkilerinin olduğu da bilinmektedir [13]. Bununla birlikte E_2 'nin doza ya da dokuya bağlı olarak bir antioksidan gibi davran-

Alındığı Tarih: 17 Kasım 2005

Yazışma Adresi (Address): Uzm. Dr. Gülgün S. Güven

Hulusi Demirelli Sok. İpek Apt. No:12 D. 9

Bakırköy - İstanbul

E-posta : gsguven@istanbul.edu.tr / gmguven@ttnet.net.tr

bildiğini gösteren karşıt görüşlü çalışmalar da mevcuttur. Son yıllardaki çalışmalar, E₂'nin bilinen genotoksik etkilerinin oksidatif stres ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir [14,15].

MN'ler, hücre siklusunun anafaz evresinde kromozomların geri kalmalarından ya da kromozom fragmentlerinden köken almaktadır. Fenech ve ark'ları tarafından geliştirilen 'Sitokinezi-Blok' MN metodu, klasik MN testlerinde karşılaşılan bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştı [16]. Bu metod, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin B (Cyt - B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt B ilavesiyle, ilk nükleus bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirmemiş binükleuslu (BN) hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir [16]. İnsan hücrelerinde 'mikronükleus indeksi' genetik toksikoloji araştırılmasında kullanılan standart sitogenetik testlerinden biri olmuştur [17].

Çalışmamızda genotoksisite testleri içinde güvenli ve hızlı bir test olarak yer alan 'Sitokinezi - Blok' MN testini kullanarak sağlıklı erkeklerden elde edilen lenfositlerde E₂'nin olası *in vitro* genotoksik etkisini araştırmak istedik.

YÖNTEM ve GEREÇLER

Çalışma, yaşları 20 - 40 arasında değişen ve çalışma hakkında önceden bilgilendirilmiş, sigara ve ilaç kullanmayan, herhangi bir kronik hastalığı ve enfeksiyonu olmayan sağlıklı 50 erkek donörle gerçekleştirilmiştir.

Hücre Kültür Yöntemi ve 'Sitokinezi - Blok Mikronükleus' Metodu: Donörlerden heparinli tüpe alınan kandan, Boyum'un 'Ficoll-Histopaque 1077' yöntemine göre lenfositler izole edilmiştir [18]. İzole lenfosit kültürü için Moorhead ve ark'larının geliştirdiği 72 saatlik kültür yöntemi uygulanmıştır [19]. Hazırlanan tam vasat (100 ml RPMI 1640, % 20 fetal calf serum, % 1 L Glutamin, % 1.5 phytohemagglutinin (PHA), % 0.2 Streptomisin Penisilin) 2'şer ml olarak kültür tüplerine bölünmüştür. Her donör için iki kültür tüpüne 100'er µl lenfosit süspansiyonu (106 lenfosit) ilave edilmiştir. Kültürün 24. saatinde kültür tüplerinden birine son konsantrasyonu 10 µg / ml (36 µM) olan steril E₂ (Suda çözülebilen) ilave edilirken, kontrol tüplerine ise hiçbir ajan ilave edilmemiştir. Ön çalışmalarımızda, 36 µM'luk konsantrasyonu hücrelerin ölümlerine neden olmayan en yüksek konsantrasyon olarak tespit edilmiş ve çalışmamızda bu konsantrasyon kullanılmıştır.

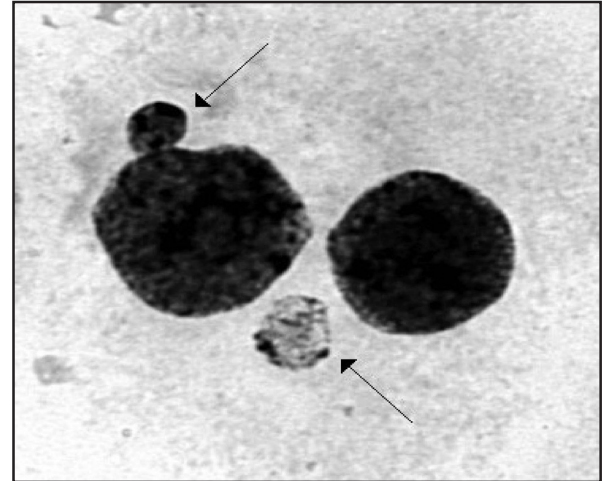
BN'li hücrelerde MN oluşumunu tespit etmek amacıyla kültürün 44. saatinde her bir kültür tüpüne son konsantrasyonu 6 µM olacak şekilde Cyt-B eklenmiştir. Standart çıkış işlemlerinden sonra hazırlanan preparatlar % 5 Giemsa solüsyonunda 5 dakika boyanmıştır, 1000 x büyütmede (Olympus BX 50) 1000 BN'li hücrede raslanan MN sayıları tespit edilerek MN sıklıkları hesaplanmıştır [20]. İstatistiksel analiz paired *t*- testi ile yapılmıştır.

BULGULAR

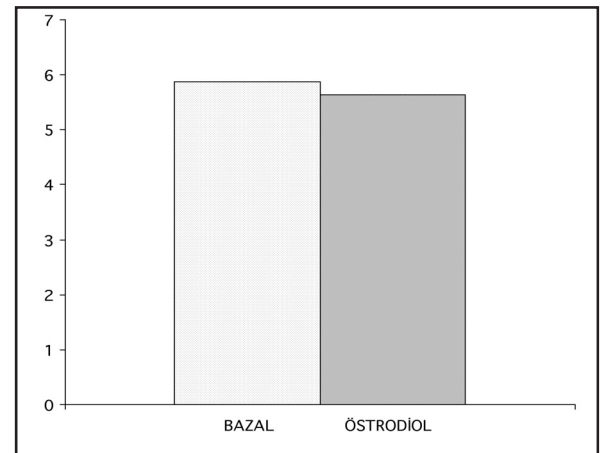
Her bir donörün, E₂ ile indüklenmiş kültürlerinde 1000 BN'li hücrede tespit edilen MN sayısı 1-11 arasında değişirken, kontrol (Bazal MN sayısı) kültürlerinde ise bu değer 1-15 arasında değişmekteydi (Şekil 1). 50 donörün kontrol kültürlerindeki MN sıklığının ortalaması 5.88 ± 2.9 iken E₂ ilave edilmiş kültürlerindeki MN sıklığının ortalaması 5.64 ± 2.5 olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). Bu iki değer istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.005$).

TARTIŞMA

Lenfositler DNA hasarları, kromozomal anomaliler ve MN oluşumu gibi genotoksik etki mekanizmalarını araştırmak için uygun hücreler olarak kabul edilmektedir. Biz de çalışmamızda, E₂'nin etkilerini araştırmak için model



Şekil 1. Binükleuslu bir hücrede görülen mikronükleuslar.



Şekil 2. Bazal (kontrol) ve östrodiol ile indüklenen kültürlerdeki binükleuslu hücrelerdeki mikronükleus sıklıkları.

hücre olarak lenfositleri kullanmayı tercih ettik.

Çalışmamızda erkek donörleri kullanma amacımız, premenepozal kadınlarda menstürel siklus boyunca estradiol düzeyinin büyük dalgalanmalar yapması ve bu dalgalanmaların bazı sitogenetik parametreler üzerinde etkisinin olduğunu gösterilmiş olmasıdır [21]. İzole lenfosit kültür yöntemini uyguladığımız çalışmamızda, E₂ ilave edilmiş kültürlerde tespit ettiğimiz MN sıklığı ile E₂ ilave edilmemiş kültürlerde tespit ettiğimiz MN sıklığı arasında herhangi bir fark tespit edilmemiştir.

Erkek donörlerden elde edilen lenfositlerin *in vitro* 17-β estradiole maruz bırakılarak SCE ve kromozomal aberrasyon (CA) parametrelerinin incelendiği bir çalışmada, bizim de çalışmamızda kullandığımız 10 µg / ml konsantrasyonda (24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar) SCE ve CA parametrelerinde herhangi bir değişiklik saptanamazken, uzun süreli (48 ve 72 saatlik inkübasyonlar) ve yüksek konsantrasyonlu (25 ve 50 µg / ml) inkübasyonlarda SCE ve CA parametrelerinde artış tespit edilmiştir [13]. Yazarlar estradiolün inkübasyon süresine bağlı olarak etkisinin ortaya çıkmasını, estradiolün ancak uzun süreli inkübasyonlarda lenfositlerde metabolize olarak etkisini gösterebilmesi olarak izah etmektedirler. İnsan lenfosit kültürleri ile yapılan diğer bir çalışmada da, estradiolün MN düzeyindeki genotoksik etkisinin ancak yüksek dozlarda ve uzun süreli inkübasyonlarda ortaya çıkabildiği bildirilmiştir [22].

Estradiol'ün *in vitro* kullanımı ile ilgili diğer çalışmalar ise çeşitli hücre soylarında gerçekleştirilmiştir. İnsan over ve meme kanser hücre soylarında gerçekleştirilen çalışmalarda, *in vitro* estradiol tedavisinin sadece estrogen reseptör pozitif hücre soylarında MN düzeyinde artışa neden olduğu bildirilmektedir [12,23]. Çin hamsterlerinin V79 hücrelerinde fizyolojik konsantrasyonlarda E₂'nin delesyon ve nokta mutasyonu gibi genotoksik etkileri rapor edilirken [24], Suriye hamsterlerinin hücre soylarında fizyolojik konsantrasyonlarda daha az bir karsinojenik etki tespit edilmiştir [25]. E₂'nin gerek postmenepozal sağlıklı kadınlarda tedavi amaçlı gerekse gebeliğin önlenmesi (oral kontraseptifler) amaçlı *in vivo* kullanımının MN düzeyinde herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir [7].

Bizim çalışmamızda E₂'nin MN oluşumunda bir artışa neden olmayışının altında yatan nedenin, muhtemelen E₂'nin kendisinin veya onun metabolitlerinin bizim deneysel koşullarımız içerisinde DNA hasarı oluşturacak düzeyde oluşmaması veya oluşan hasarın DNA tamir sisteminin tamir kapasitesi düzeyinde olmasından dolayı tamir edilmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Baysal K, Losordo WD. Oestrogen receptors and cardiovascular disease. Clin Exper Pharmacol Physiol 1996; 23: 537-548.
2. Farhat MY, Abi- Younes S, Ramwell PW. Nongenomic effect of estragen and wessel wall. Biochem Pharmacol 1996; 51: 571-576.
3. Davis C, Bhana S, Shorrocks AJ, Martin FL. Oestrogens induce G (1) arrest in benzo [a] pyrenetreated MCF-7 breast cells whilst enhancing genotoxicity and clonogenic survival. Mutagenesis 2002; 17: 431-438.
4. Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?. Endocr. Rev. 2002; 21: 40-54.
5. Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolik activation. Journal of the National Cancer Institute Monographs 2000; 27: 67-73.
6. Evans MD, Butter JM, Nicoll K, Cooke MS, Lunce J. 17 β-estradiol attenuates nucleotide excision repair. FEBS Letters 2003; 535: 153-158.
7. Casella M, Manfredi S, Andreassi MG, Vassalle C, Prontera C, Simi S, Maffei S Hormone replacement therapy: oneyear follow up of DNA damage. Mutat Res 2005; 585: 14-20.
8. Kanda R, Hayata I. Effect of Estradiol on radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes. J Radiat Res. 1999; 40: 95-100.
9. Wheeler WJ, Cherry LM, Downs T, Hsu TC. Mitotic inhibition and aneuploidy induction by naturally occurring and synthetic estrogens in chinese hamster cells *in vitro*. Mutat. Res 1986; 171: 31-41.
10. Eckert I. and Stoper H. Genotoxic effects induced by E₂-estradiol *in vitro*. Toxicol. In Vitro 1996; 1: 637-642.
11. Schuler M., Hasegawa L., Parks R., Metzler M. and Eastmond D.A. Doseresponse studies of the induction of hyperdiploidy and polyploidy by diethylstilbestrol and 17 β-estradiol in cultured human lymphocytes using multicolor fluorescence in situ hybridization. Environ. Mol. Mutagen 1998; 31: 263-273.
12. Stopper H, Schmitt E, Gregor C, Mueller SO, Fisher WH. Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradioltreated human ovarian cancer cells. Mutagenesis 2003; 18: 243-247.
13. Ahmad MD, Shadab GGHA, Hoda A, Afzal M. Genotoxic effects of estradiol17 - β estradiol on human lymphocytes chromosome. Mut. Res. 2000; 466: 109-115.
14. Anderson D, Schmid TE, Baumgartner A, Cem eli-Carratala E, Brikworth MH, Wood JM. Oestrogenic compounds and oxidative stres (in human sperm and lymphocytes in the cometassay). Mut Res 2003; 544: 173-178.
15. Sur P, Sridnick EA, Wingrave JM, Nowak NW, Ray SK. Esragen attenuate oxidative stressin duced apoptosis in C6 glial cells. Brain Research 2003; 971:178-188.
16. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat. Res. 1985; 147: 29-36.
17. Fenech M: The *in vitro* micronucleus technique. Mut Res 2000; 455: 81-95.
18. Boyum A. Seperation of white blood cells. Nature 1964; 204: 793-794.

19. Moorehead PS, Nowell PC, Mellman WJ. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20: 613-616.
20. Fenech M. The cytokinesisblock micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.*1993; 285: 35 - 44.
21. Landi S, Barele R. Sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in female lymphocytes: correlations with biological rhythms, miscarriages and contraceptive pill use. *Mutagenesis* 1999; 14: 581-585.
22. Djelic N, Spremo-Potparevic B, Djelic D. Mutagenic activity of estradiol evaluated by an *in vitro* micronucleus assay. Short communication. *Acta Biol Hung* 2005; 56: 403-406.
23. Wolfgang HF, Keiwan A, S Elmar, Stoper H. Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis* 2001; 3: 209-212.
24. Kong LY, Szaniszlo P, Albrecht T, Liehr JG, Frequency and molecular analysis of hprt mutations induced by estradiol in Chinese hamster V79 cells. *Int. J. Oncol* 2000;17: 1141-1149.
25. Liehr JG, Sirbasku DA, Jurka E, Randerath K, Randerath E. Inhibition of estrogeninduced renal carcinogenesis in male Syrian hamster by tamoxifen without decrease in DNA adduct levels. *Cancer Res* 1986; 48: 779-783.