

Received: 15.04.2019
Accepted: 26.09.2019
Published: 31.12.2019

Wpływ genotoksyczności estrogenów i ich metabolitów na patogenezę oraz progresję estrogenozależnego raka gruczołu sutkowego

Effect of estrogens and their metabolites genotoxicity on the pathogenesis and progression of estrogen-dependent breast cancer

Ewa Sawicka¹, Arkadiusz Woźniak², Małgorzata Drąg-Zalesińska³, Agnieszka Piwowar¹

¹Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

²Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

³Katedra i Zakład Embriologii i Histologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

Choroby onkologiczne, ze względu na wciąż wzrastającą zachorowalność i śmiertelność, są jednym z głównych problemów współczesnej medycyny. Rak gruczołu sutkowego jest nowotworem, który najczęściej występuje u kobiet na całym świecie i jest drugą, po raku płuc, przyczyną zgonów nowotworowych w tej grupie. Należy do nowotworów estrogenozależnych o udowodnionym związku z zaburzeniami hormonalnymi w organizmie, występującymi zwłaszcza w okresie okołomenopauzalnym oraz w wyniku stosowania hormonalnej terapii zastępczej, a także działania różnorodnych ksenobiotyków, mogących oddziaływać z receptorem estrogenowym. Steroidy hormonalne mają szerokie zastosowanie w medycynie, a o ich działaniach niepożądanych wciąż trwają dyskusje. Rola tych związków i ich metabolitów w utrzymaniu równowagi hormonalnej jest dobrze poznana, natomiast wiele badań wskazuje na możliwy udział steroidów w progresji procesu nowotworowego, zwłaszcza w tkance gruczołu sutkowego. W związku z tym przedmiotem badań pozostaje również aktywność genotoksyczna tej grupy związków. Ze względu na ograniczoną liczbę doniesień naukowych, celem autorów był przegląd i krytyczna analiza danych z piśmiennictwa o udziale estrogenów (17 β -estradiolu) i ich metabolitów (2-metoksyestradiolu, 4-hydroksyestradiolu, 16 α -hydroksyestronu) w indukowaniu procesu kancerogenezy w gruczole sutkowym, a zwłaszcza genotoksyczne działanie metabolitów 17 β -estradiolu.

Słowa kluczowe:

estrogeny • metabolity estrogenów • genotoksyczność • rak piersi

Summary

Oncological diseases, due to the still increasing morbidity and mortality, are one of the main problems of modern medicine. Cancer of the mammary gland is the most common cancer among women around the world, and is the second cause of cancer deaths in this group, immediately after

lung cancer. This kind of cancer belongs to an estrogen-dependent cancer, with proven associations with hormonal disorders in the body, occurring especially in the perimenopausal period and among women using hormone replacement therapy, as well as a result of the action of various xenobiotics that may interact with the estrogen receptor. Hormone steroids are widely used in medicine and their side effects are constantly discussed. The role of these compounds and their metabolites in maintaining hormonal balance is well understood, while many studies indicate the possible contribution of these steroids in the progression of the cancer process, especially in mammary gland tissue. Therefore, the genotoxic action of this group of compounds is still studied. Due to the limited number of scientific reports, the aim of this paper was to review and critically analyze data from the literature regarding the participation of estrogens (17 β -estradiol) and their metabolites (2-methoxy estradiol, 4-hydroxy estradiol, 16 α -hydroxyestrone) in the induction of carcinogenesis in mammary gland, in particular concerning the genotoxic activity of 17 β -estradiol metabolites.

Keywords: estrogens • estrogen metabolites • genotoxicity • breast cancer

GICID: 01.3001.0013.7541
DOI: 10.5604/01.3001.0013.7541
Word count: 5399
Tables: 1
Figures: 2
References: 63

Adres autorki: dr Ewa Sawicka, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław; e-mail: ewa.sawicka@umed.wroc.pl

WSTĘP

Estrogeny należą do grupy hormonów steroidowych o znanych właściwościach regulacyjnych i protekcyjnych. Jest to heterogenna grupa endogennych hormonów płciowych, do której należą: estron (E1), 17 β -estradiol (E2) czy estriol (E3), a także związki o charakterze egzogennym, np. estrogeny stosowane w hormonalnej terapii zastępczej (HZT) [28]. Endogenna synteza estrogenów zachodzi w różnych tkankach, najczęściej powstają w tkance: jajnika, łożysku, korze nadnerczy, w tkance tłuszczowej, w wątrobie, mózgu oraz w skórze. 17 β -estradiol syntetyzowany jest przede wszystkim w jajnikach, estron powstaje głównie w tkance tłuszczowej, a estriol jest syntetyzowany podczas ciąży przez komórki łożyska. Gruczoł piersiowy, kora nadnerczy czy wątroba są drugorzędowymi miejscami syntezy estrogenów, które w głównej mierze wytwarzają je w okresie pomenopauzalnym [38]. W warunkach fizjologicznych steroidogeneza w jajnikach podlega kontroli osi przysadka-podwzgórze z udziałem gonadotropin: LH (hormon luteinizujący) i FSH (hormon folikulo-tropowy). Związki steroidowe mają wiele zastosowań w antykoncepcji hormonalnej i HTZ, jednak istnieją dane świadczące o tym, że niektóre z tych hormonów mogą indukować kancerogenezę. Dlatego też ryzyko zdrowotne związane z ich stosowaniem, a zwłaszcza zagrożenie ich genotoksycznym działaniem jest przedmiotem wielu badań. W piśmiennictwie naukowym dostępne są prace poświęcone nie tylko protekcyj-

nemu, ale także toksycznemu działaniu E2. Uważa się, że kierunek tego działania ma ścisły związek z zastosowanym stężeniem steroidu, co wiąże się z rozwojem raka gruczołu sutkowego [51]. Estrogeny egzogenne, wykorzystywane w leczeniu, będące odpowiednikami estrogenów endogennych, stosowane m.in. w HTZ, są najczęściej syntetyzowane z surowców roślinnych, a następnie poddawane obróbce chemicznej, np. dietylostilbestrol (DES) [32]. Mimo korzystnego, terapeutycznego działania hormonów steroidowych, coraz więcej danych wskazuje również na możliwość ich niekorzystnego wpływu na organizm. Estrogeny mogą indukować zaburzenia w materiale genetycznym w komórkach, powodujących trwałą zmianę w jego ilości lub strukturze. Określane jest to mianem genotoksyczności i jest ważnym elementem w ocenie bezpieczeństwa stosowania estrogenów [22, 58].

Celem pracy jest przegląd i krytyczna analiza danych z piśmiennictwa dotyczących właściwości genotoksycznych estrogenów i ich metabolitów oraz ich wpływu na proces kancerogenezy, ze szczególnym uwzględnieniem roli w powstawaniu oraz progresji estrogenozależnego raka gruczołu sutkowego. Znajomość mechanizmów działania estrogenów, również tych niekorzystnych, jest istotna dla świadomego ich stosowania w hormonalnej terapii zastępczej czy antykoncepcji hormonalnej, a przede wszystkim w prowadzeniu prewencyjnych działań zdrowotnych związanych z zapobieganiem ich kancerogennego działania.

KANCEROGENY GENOTOKSYCZNE

Jednym z podstawowych czynników zwiększających zachorowalność na choroby nowotworowe jest narażenie na substancje powodujące uszkodzenie materiału genetycznego. Tego typu związki są nazywane genotoksycznymi, a skutki ich działania są określane genotoksycznością i pojawiają się po pewnym czasie utajenia [19, 50]. Za genotoksyczne uważa się wszystkie związki mające zdolność wiązania się z DNA w komórkach, naruszania jego struktury i funkcji, a także systemów naprawy uszkodzeń DNA. Ich działanie prowadzi wówczas do powstania mutacji, czyli trwałych zmian materiału genetycznego, polegających np. na zaburzeniach w strukturze oraz liczbie chromosomów czy na transformacji komórek [22, 49].

Istnieje wiele związków chemicznych o potencjale kancerogennym, a ich udział w indukowaniu procesu nowotworowego, określane mianem chemicznej kancerogenezy, jest zwykle procesem wieloetapowym, powodującym wiele zmian fenotypowych i genotypowych. Związki chemiczne, które indukują nowotwory, na podstawie względnej zdolności do oddziaływania na genomowe DNA, są kwalifikowane do dwóch kategorii: kancerogenów genotoksycznych, czyli reagujących z DNA oraz niegenotoksycznych, czyli tzw. epigenetycznych, nieingerujących w strukturę nukleotydową DNA. Kancerogeny genotoksyczne inicjują proces nowotworowy, wchodząc w interakcje z DNA, powodują uszkodzenia lub zmiany struktury kwasu nukleinowego. Mogą oddziaływać bezpośrednio z DNA, zanim ulegną biotransformacji. Mogą też działać pośrednio, po aktywacji metabolicznej, ulegając biotransformacji z wytworzeniem wtórnych metabolitów wiążących się z DNA. Wiele genotoksycznych związków ma aktywne ugrupowania elektrofilowe, łatwo reagujące z nukleofilowymi grupami kwasów rybonukleinowych i białek. Są zawsze mutagenne, a ich interakcje z DNA doprowadzają do konwersji nowotworowej. Kancerogeny epigenetyczne nie wiążą się bezpośrednio z DNA, a podstawą ich rakotwórczego oddziaływania mogą być procesy oraz reakcje biologiczne, do których należą: cytotoksyczność, zaburzenia hormonalne oraz immunologiczne czy chroniczne uszkodzanie tkanek [29, 36]. Kancerogeny niegenotoksyczne mogą zmieniać ekspresję genów bez modyfikacji lub bezpośredniego uszkodzenia struktury DNA, mogą też zwiększać podatność komórek lub tkanek na uszkodzenia DNA pochodzące z innych źródeł [30, 36, 39].

Estrogeny są kompletnymi kancerogenami, ponieważ mają zdolność uszkodzenia DNA i stymulacji namnażania komórek [10, 53]. Nadmierna ekspozycja na estrogeny wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi. Elementem indukującym kancerogenne właściwości estrogenów jest ich biotransformacja. Mechanizmy kancerogenezy w gruczole sutkowym, indukowane metabolizmem estrogenów, obejmują tworzenie adduktów depurynujących, które są uwalniane z DNA, wytwarzając miejsca apurynowe i powodując wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT). Nadmiar RFT nie tylko indukuje genotok-

syczność przez pośredni wzrost niestabilności genomicznej, ale również może stymulować proces kancerogenezy gruczolu sutkowego przez indukowanie szlaku sygnałowego związanego z zaburzeniem stanu redoks komórek. Estrogeny są metabolizowane do 2-hydroksyestrogenów, 4-hydroksyestrogenów oraz 16 α -hydroksyestronów, a te są przekształcane do semichinonów i chinonów, generując RFT, których synteza jest wskazywana jako pozagenomowa droga ich działania, a także wpływają destrukcyjnie na DNA przez bezpośrednie działanie [10, 28, 34]. Zwiększone ryzyko rozwoju raka gruczolu sutkowego dotyczy szczególnie osób mających podwyższone stężenie estrogenów w organizmie i narażonych jednocześnie na ksenoestrogeny, np. bisfenol A, ftalany, parabeny czy metaloestrogeny (np. kadm, chrom, nikiel, glin), imitujące działanie estrogenów endogennych [1, 4, 15].

Estrogeny mogą działać uszkadzająco na DNA, zarówno w komórkach zdrowych, jak i w komórkach nowotworowych, również poprzez aktywne metabolity o potencjale genotoksycznym. Działanie to jest przekazywane w wyniku stymulacji receptorów estrogenowych (ERs), głównie ER α (receptor estrogenowy alfa), które utrwała powstałe uszkodzenia przez zwiększanie wzrostu i podziałów komórkowych [21, 31, 33]. Genotoksyczna aktywność 4-hydroksy metabolitów E2 oraz E1 jest dobrze udokumentowana. Niektóre dane wskazują jednak, iż genotoksyczny potencjał E2 i E1 może nie odgrywać istotnej roli w warunkach fizjologicznych i terapeutycznych. Jest to związane z brakiem odpowiednich warunków metabolicznych w organizmie człowieka, które są niezbędne do generowania metabolitów estradiolu oraz RFT, oddziałujących z DNA. Syntetyczne steroidowe estrogeny mają porównywalny do endogennych estrogenów profil negatywnych oddziaływań [22, 37, 46].

Należy jednak podkreślić dualistyczną rolę estrogenów, bo oprócz działania niekorzystnego estrogenów, dane z piśmiennictwa wskazują również na ich działanie pozytywne w terapii raka gruczolu sutkowego. Wykazano, iż E2 użyty w wysokich dawkach w terapii addytywnej indukuje regresję komórek raka gruczolu sutkowego wykazujących ekspresję receptorów estrogenowych u kobiet w okresie postmenopauzalnym [50, 51]. Korzystnie również wpływa na terapię raka gruczolu sutkowego po zastosowaniu metabolitu estradiolu-2-metoksyestradiolu (2-MeOE₂). Mechanizm jego działania jest niezależny od receptorów estrogenowych, przez co związek ten działa na komórki niewykazujące ekspresji tych receptorów. Mechanizm działania przeciwnowotworowego polega na uszkodzeniu cytoszkieletu komórek nowotworowych. 2-Metoksyestradiol może także zatrzymywać proces podziału komórki w fazach G₁/S oraz G₂/M cyklu komórkowego [8, 43].

2-MeOE₂ jest ponadto obiecującą strukturą przeciwnowotworową, także z powodu indukowania procesu programowanej śmierci komórki. Proapoptotyczne działanie 2-MeOE₂ odbywa się przez indukcję fragmentacji łańcucha DNA oraz fosforylację histonu H2A.X. Sugeruje

się również wpływ 2-MeOE₂ na zwiększanie ekspresji tzw. receptora śmierci 5 (DR5, death receptor 5), białka STAT1, a także białka p53 oraz kaspaz-3, -8 i -9 [27].

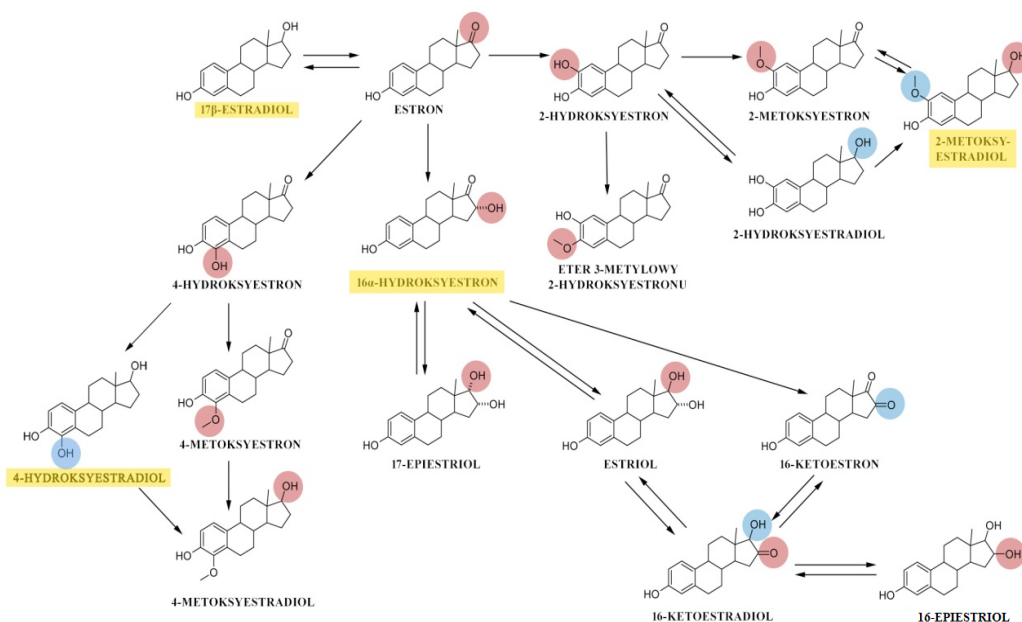
WPLYW ESTROGENÓW NA INICJOWANIE ORAZ PROGRESJĘ RAKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO

Synteza głównych estrogenów endogennych, tj. estradiolu, estronu i estriolu odbywa się w różnych tkankach organizmu; jest dobrze poznana i opisana w opracowaniach zbiorczych [28], dlatego też nie będzie tu omawiana szczegółowo. Metabolizm estrogenów jest również szczegółowo opisany, a to pozwala na przedstawienie tego zagadnienia w zarysie. Metabolizm estrogenów, począwszy od głównego steroidu – 17β-estradiolu, jest procesem bardzo złożonym i wieloetapowym (ryc. 1). Zachodzi zarówno w wątrobie, jak i w komórkach i tkankach organów docelowych, takich jak np. jajnik czy gruczoł piersiowy, powodując powstanie dużej liczby pochodnych o różnorodnej aktywności hormonalnej, które następnie są usuwane z organizmu w postaci m.in. estrów kwasów tłuszczowych, glukuronidów czy siarczanów. Pierwsza faza biotransformacji 17β-estradiolu to utlenianie, na które składa się kilka serii hydroksylacji. Swoista hydroksylacja może być indukowana albo hamowana przez endo- lub egzogenne związki, które wpływają na aktywność izoform cytochromu P450 (CYP). 17β-estradiol ulega hydroksylacji w trzech podstawowych kierunkach. Hydroksylacja C-2, która jest procesem dominującym, kierowana jest przez CYP1A1/2 i prowadzi do powstania: 2-hydroksyestronu, 2-hydroksyestradiolu i 2-metoksyestronu. Hydroksylacja C-16 indukowana przez CYP3A4/5 prowadzi do powstania 16α-hydroksyestronu, estriolu,

16-ketoestradiolu i śladowych ilości innych metabolitów. Natomiast hydroksylacja C-4 z udziałem izoformy CYP1B1 dostarcza 4-hydroksyestradiolu, 4-hydroksyestronu, 4-metoksyestronu i 4-metoksyestradiolu. Hydroksylacja C-4 i C-16 prowadzi do powstania dwóch endogennych kancerogenów, 16-hydroksyestronu i 4-hydroksyestradiolu [45, 48].

Ostatnie lata przyniosły duży postęp w zrozumieniu mechanizmów działania estrogenów na poziomie molekularnym. Niezależnie od podstawowej drogi przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego indukowanego przez hormony steroidowe (mechanizm genomowy), coraz więcej uwagi zwraca się również na alternatywne drogi szybkiego działania steroidów, czyli mechanizm niegenomowy. Za niegenomowe działanie estrogenów odpowiada receptor estrogenowy umiejscowiony w błonie komórkowej. W tym szlaku, zwanym inaczej nietranskrypcyjnym, nie jest wymagane wiązanie się ER do DNA i synteza mRNA określonych genów. Wiadomo, że niegenomowa droga przekazywania sygnału przez estrogeny jest zależna od rodzaju komórki, w której zachodzi, a skutki wywołane za jej pośrednictwem ujawniają się znacznie szybciej niż te indukowane przez mechanizm genomowy [6, 44, 52, 63].

Estrogeny są związkami, które stymulują proliferację komórkową. Należy także pamiętać, że podziały komórek poprzedzane są replikacją DNA, co stwarza ogromne możliwości utrwalenia potencjalnie kancerogennych uszkodzeń genomu [10]. Metabolity estrogenów w postaci chinonów generują reaktywne formy tlenu, a także wpływają destrukcyjnie na DNA przez bezpośred-

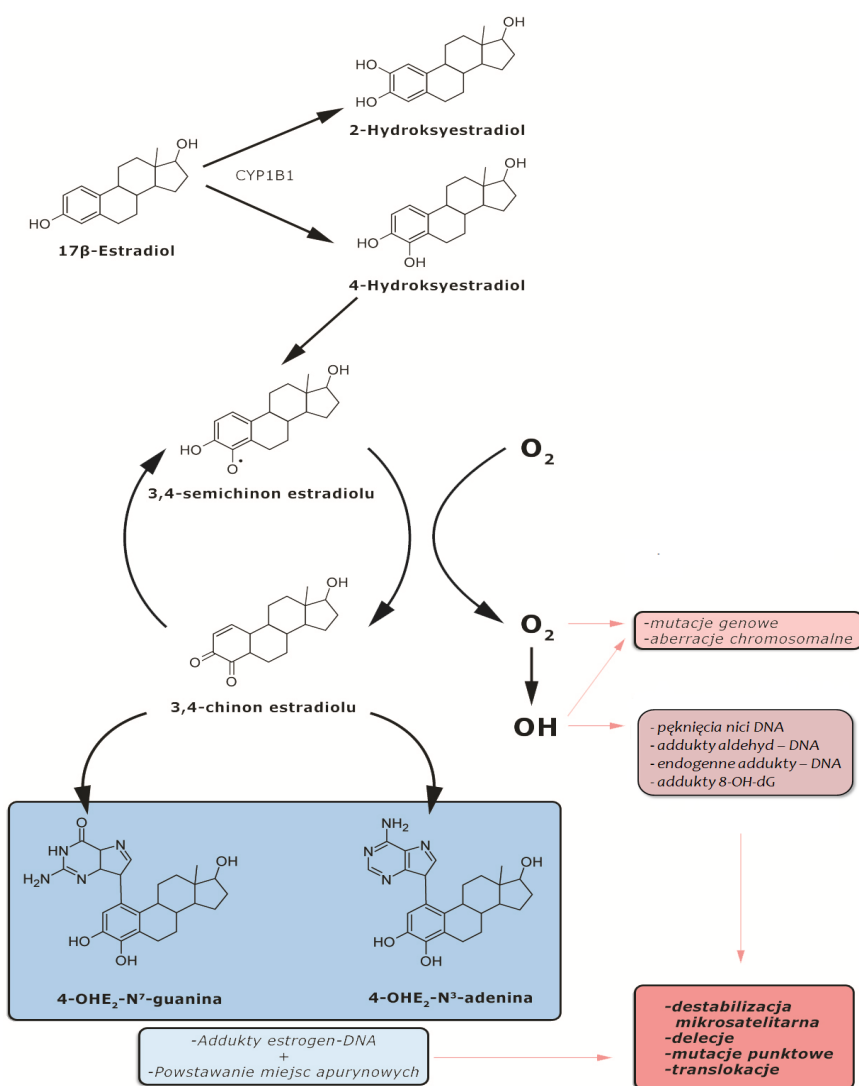


Ryc. 1. Biotransformacja 17β-estradiolu (na żółto wyróżniono metabolity E2 będące przedmiotem bieżącego przeglądu, na czerwono i niebiesko grupy najbardziej aktywne w metabolizmie E2) [wg 12, 40, zmodyfikowano]

nie działanie na jego strukturę [10, 28]. Reaktywne metabolity uszkadzają DNA przez tworzenie adduktów, a tym samym mogą inicjować proces kancerogenezy w gruczole piersiowym. Mechanizm tego procesu nie jest jednak wyjaśniony. Istotna jest obecność pierścienia aromatycznego w ich strukturze, która wyróżnia estrogeny wśród pozostałych steroidów. Dzięki takiej budowie chemicznej mogą tworzyć wspomniane wyżej pochodne, które są związkami reaktywnymi, należą tu zwłaszcza pochodne chinonowe. Niestabilne chinony ulegają addycji do DNA, dzięki temu mogą powstać 4-hydroksy-estradiolo-1(α,β)-N⁷-guanina oraz 4-hydroksyestradiolo-1(α,β)-N³-adenina. Ponadto 4-hydroksyestrogeny są potencjalnymi ligandami dla ERs, a więc mogą inicjować proces nowotworzenia, jak i odgrywać rolę promotora tego procesu [28, 58]. Istotnym jest to, iż procesy biotransformacji, którym podlegają estrogeny, powodują zmianę ich działania biologicznego, a otrzymane produkty hydroksylacji estrogenów w pozycjach C⁴ oraz C¹⁶ stają się szczególnie

destrukcyjne. Należy tu dodać, że katecholowe pochodne wykazują większe powinowactwo do receptorów estrogenowych, co zwiększa oddziaływanie z DNA, z którym tworzą addukty, przyczyniając się do powstawania mutacji [35]. Na ryc. 2 schematycznie przedstawiono najważniejsze punkty uchwytu uszkodzeń DNA indukowanych przez estrogeny i ich metabolity.

Długotrwałe przyjmowanie estrogenów egzogennych jest głównym czynnikiem przyczyniającym się do zwiększenia ryzyka zachorowania na raka gruczołu sutkowego, a rola ich metabolitów w indukowaniu tego procesu poprzez mechanizm działania genotoksycznego jest wciąż niewyjaśniona, stąd zainteresowanie tym procesem wydaje się uzasadnione. Proponowane mechanizmy działania obejmują m.in. aktywowane receptorem zwiększenie szybkości proliferacji komórek, powodujące akumulację uszkodzeń genetycznych, wynikających z błędów odczytu, wytwarzanie uszkodzeń DNA przez



Ryc. 2. Uszkodzenia DNA indukowane przez estrogeny i ich metabolity, opracowano [wg 10, 28, zmodyfikowano]

produkty metabolizmu 17β -estradiolu powodującego mutacje [38, 41]. Estrogeny powodują rozwój, proliferację, migrację i przeżywalność wielu komórek. Biologiczne działanie estrogenów zależy od ich związania się z receptorami estrogenowymi, co wpływa na regulację procesów transkrypcyjnych. Wymaga to translokacji receptora związanego z estrogenem do jądra komórkowego i związania się do swoistego elementu odpowiedzi w DNA oraz regulacji ekspresji genów [38].

Estrogeny mogą działać antyapoptotycznie i proapoptotycznie na różne komórki. Wykazano, iż wpływają protekcyjnie na proliferację i przeżywalność komórek nowotworowych, co zaobserwowano dla E2, w stosunku do komórek linii MCF-7, gdzie 17β -estradiol chronił przed apoptozą indukowaną m.in. promieniowaniem UV, ale tylko w stężeniu do 1 nM. W przeciwieństwie do tego działania, 10 nM E2, progesteron lub testosteron nie blokowały śmierci komórek indukowanej przez UV [20, 52]. Song i wsp. [50] wykazali, że wysokie dawki estrogenu mogą sprzyjać regresji nowotworu u kobiet po menopauzie ze stwierdzonym hormonozależnym rakiem piersi. Badając molekularne podstawy tego procesu z wykorzystaniem komórek LTED (long-term estrogen deprivation, długotrwanie pozbawione estrogenów), które uzyskano w hodowli komórek raka sutka MCF-7 wykazano, że stężenia E2 powyżej 0,1 nM powodowały statystycznie istotne osłabienie wzrostu komórek LTED (prawie o 60%) oraz nasilenie apoptozy (siedmiokrotne), w porównaniu do komórek MCF-7. Potwierdza to hipotezę, iż wyższe dawki estrogenów promują regresję hormonozależnych nowotworów piersi u kobiet po menopauzie. Jednak autorzy wykazali, że komórki LTED są wrażliwe na apoptotyczne działanie estradiolu, natomiast komórki MCF-7 są chronione przez E2 przed apoptozą, co wskazuje na możliwe odmienne mechanizmy molekularnego działania estrogenów na te komórki czy odmienną wrażliwość komórek użytych w eksperymentach [50].

Powodem pozwalającym na wskazanie estrogenów, jako związków o potencjalnym działaniu rakotwórczym, jest to, iż obserwuje się wzrost zachorowań na raka piersi u kobiet przyjmujących antykoncepcję hormonalną lub hormonalną terapię zastępczą [59]. Do grupy najbardziej podatnej, o zwiększonym ryzyku zachorowania na raka piersi, należą kobiety powyżej 65. roku życia oraz paradoksalnie także kobiety młode, u których pierwsza miesiączka pojawiła się przed 12. rokiem życia. Ponadto w grupie ryzyka znajdują się także kobiety, które pierwsze dziecko urodziły po 30. roku życia oraz te, u których menopauza wystąpiła po 55. roku życia [10, 31, 50].

GENOTOKSYCZNOŚĆ 17β -ESTRADIOLU

17β -estradiol jest hormonem steroidowym o najlepiej przebadanym działaniu genotoksycznym spośród wszystkich estrogenów. Jego aktywność w testach mutacji genowych, przeprowadzonych zarówno w komórkach bakteryjnych, jak i ssaczych, jest jednak nadal dyskusyjna, bez względu czy zastosowano aktywację metabo-

liczną, czy też nie [25, 63]. Tsutsui i wsp. [56] oceniali bezpośredni udział genotoksycznych skutków estrogenów w inicjacji kancerogenezy hormonalnej. Należały do nich aberracje chromosomów, aneuploidia lub mutacje genów. Zbadano głównie potencjał E2, a także ośmiu jego metabolitów do indukowania transformacji komórkowej i skutków genetycznych z użyciem modelu komórek zarodka chomika syryjskiego (SHE). Inkubacja z E2, E1, 2-hydroksyestronem (2-OHE1), 4-hydroksyestronem (4-OHE1), 2-metoksyestronem (2-MeOE1), 16-alfa-hydroksyestronem (16 alfa-OHE1), 2-hydroksyestradiolem (2-OHE2), 4-hydroksyestradiolem (4-OHE2) lub E3 przez 1-3 dni hamowała wzrost komórek SHE w sposób zależny od stężenia. Podobne dane przedstawili Kong i wsp. [25], którzy do badań genotoksyczności wykorzystali linię komórkową V79 (fibroblasty z płuc chomika), którą inkubowano z E2 o stężeniach zarówno fizjologicznych (10^{-11} i 10^{-10} M), jak i farmakologicznych (10^7 oraz 10^6 M). Autorzy zaobserwowali znacznie częstsze mutacje genu fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HPRT) wraz ze wzrostem stężenia (odpowiednio o 2,5-, 3,4-, 2,6- i 8,8-krotnie) w porównaniu do kontroli. Największe było w przypadku najwyższego zastosowanego stężenia E2. Natomiast stężenia od 10^{-13} - 10^{-8} M E2 indukowały jedynie niewielką zmianę (prawie 0,9-krotną) w stosunku do kontroli [25].

W badaniu genotoksycznego efektu E2 dokonanego za pomocą elektroforezy pojedynczych komórek (Single Cell Gel Electrophoresis; SCGE) Yared i wsp. [61] w komórkach raka gruczołu sutkowego (linia komórkowa MCF-7), po 2 godzinach inkubacji z E2 oraz E1 i E3 w stężeniach 10^{10} - 10^{-7} M, zaobserwowali znamienne statystyczny wzrost pęknięć pojedynczych nici DNA (single-strand breaks; SSBs), 7-razy większe niż w próbie kontrolnej. Ponadto autorzy odnotowali dla wszystkich 3 badanych estrogenów dodatni wynik testu kometyowego w hodowli pierwotnej komórek wyizolowanych z mleka matki, co sugeruje, że estrogeny te są zdolne do uszkodzenia komórek w gruczole sutkowym, z których ostatecznie mogą powstać komórki nowotworowe i w efekcie rozwija się rak gruczołu sutkowego [61]. W innych badaniach zaobserwowano, że degradacje DNA indukowane estradiolem nie były tak znaczące w komórkach gruczolakoraka piersi (MDA-MB-231) ER-ujemnych, w porównaniu do komórek MCF-7 ER-dodatnich [21]. Nie stwierdzono zmian indukowanych za pomocą E2 w linii komórek ludzkich limfocytów JM-1 (human lymphocyte cell line JM-1) w porównaniu do zmian wykazanych w MCF-7 [33]. Natomiast Bajpayee i wsp. [2] w komórkach JM-1 wykazali genotoksyczny wpływ niskich, fizjologicznych stężeń E2 (0,-2,0 nM), ale nie zaobserwowali uszkodzającego działania tego steroidu na DNA.

Innym wskazywanym mechanizmem genotoksycznego działania E2 jest wpływ na strukturę chromosomu, jednak wyniki przeprowadzonych eksperymentów są niejednoznaczne. Kong i wsp. [25] w badaniach *in vitro* na linii komórkowej V79 (Chines hamster V79 cells) po ekspozycji na E2 zaobserwowali, że estrogen ten indu-

kuje z niską częstotliwością mutacje chromosomowe (delekcje i mutacje punktowe). Potwierdzono to w badaniach *in vitro* na różnorodnym materiale – linie komórkowe V79 lub SHE, czy ludzkie izolowane limfocyty [25]. Tsutsui i wsp. [56], wykazali, że niektóre metabolity estrogeny mogą indukować aberracje chromosomowe w komórkach linii SHE po 24-godzinnej inkubacji, natomiast takiego działania nie zaobserwowano dla E2. Nie bez znaczenia dla wyników prowadzonych eksperymentów pozostaje izomeria estradiolu, bowiem inne badania na linii komórkowej SHE wykazały, iż 17β -E2 powodował powstawanie aberracji chromosomowych, a 17α -estradiol był pozbawiony tego działania [22].

Ostatnim ze wskazywanych mechanizmów genotoksycznego działania estradiolu są zaburzenia w ilości materiału genetycznego zawartego w jądrze komórkowym oraz zmiany ploidalności. Ekspozycja komórek SHE na E2 powodowała zaburzenia ilościowe materiału genetycznego, jednak kierunek zmian nie został do końca poznany i wyjaśniony. Zmiany o charakterze aneuploidii wykazano m.in. na linii komórkowej SHE [56].

GENOTOKSYCZNOŚĆ 2-METOKSYESTRADIOLU

Jednym z głównych metabolitów estradiolu jest 2-metoksyestradiol (2-MeOE2), który powstaje na skutek hydroksylacji 17β -E2 w pozycji 2, a następnie metylowaniu grupy hydroksylowej. Jak już podano wyżej związek ten jest uznawany za inhibitor wzrostu komórek nowotworowych oraz procesu angiogenezy [3, 44].

Jednak 2-MeOE2 jest także inhibitorem powstawania mikrotubuli, przez co indukuje powstawanie aneuploidii oraz mutacji komórek ssaczych, czego dowodzą badania prowadzone w warunkach *in vitro* na linii komórkowej SHE, ekspozowanej na działanie tego związku. Inkubacja komórek SHE z 2-MeOE2 o stężeniu 0,3 lub 1,0 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny wywoływała aberracje chromosomowe. Na częstotliwość występowania aberracji chromosomowych nie miała wpływu jednoczesna ekspozycja na alfa-naftoflawon, inhibitora 2-hydroksylazy, który może hamować oksydacyjną konwersję 2-metoksyestradiolu do 2-hydroksyestradiolu. W komórkach inkubowanych z 2-MeOE2 wykryto również numeryczne zmiany chromosomalne o charakterze diploidalnym oraz tetraploidalnym. Odkrycia te wskazują, że 2-metoksyestradiol jest jednak zdolny do transformacji komórek [55]. Badania Khoei i wsp. [24] wykazały udział wysokich stężeń 2-MeOE2 (250 μM) w powstawaniu pęknięć nici DNA, co potwierdzono w teście kometyowym na linii komórkowej U87MG (glejak wielopostaciowy człowieka). Zaobserwowano ponadto, że metabolit ten uwrażliwia DNA badanych komórek na działanie promieniotwórczego izotopu kobaltu (^{60}Co), co mogłoby zwiększyć skuteczność terapii glejaka wielopostaciowego. Badanie to ujawniło, że 2-MeOE2 hamuje proliferację i sprzyja apoptozie komórek glejaka. Badania prowadzone przez Saczko i wsp. [43] na linii komórkowej MCF-7 oraz OvBH-1 (komórki raka jasnokomórkowego jajnika) potwierdziły genotoksyczność 2-MeOE2. Autorzy zastosowali test kome-

towy zarówno w warunkach alkalicznych, pozwalających na wykrycie pojedynczych lub podwójnych pęknięć nici DNA i miejsc naprawy DNA, jak i neutralnych, które umożliwiają jedynie identyfikację pęknięć podwójnych łańcucha DNA, charakterystycznych dla procesu apoptozy.

Badania prowadzone przez zespół Górskiej i wsp. [13, 14] wykazały, że właściwości przeciwnowotworowe 2-MeOE2 są związane z selektywną stymulacją neuronalnej syntazy tlenku azotu (nNOS) w komórkach OS143B (kostniakomiesak przerzutowy) oraz HT22 (komórki hipokampa myszy), co powodowało wzrost ilości tlenku azotu, stymulując uszkodzenia DNA. 2-MeOE2 użyty fizjologicznie (10^{-12} - 10^{-8} M) oraz farmakologicznie (10^{-7} - 10^{-5} M) istotnych stężeniach, w wyżej wymienionych komórkach, wykazuje działanie neurotoksyczne i genotoksyczne przez zwiększenie lokalizacji jądrowej nNOS, co spowodowało pęknięcie nici DNA i wzrost niestabilności genomu w hipokampowej linii komórkowej HT22. Autorzy postulują, że metabolit ten może być uważany za fizjologiczny modulator przeżycia neuronów.

GENOTOKSYCZNOŚĆ 4-HYDROKSYESTRADIOLU

Głównym szlakiem biotransformacji estradiolu jest hydroksylacja. Końcowym produktem C-4 hydroksylacji jest 4-hydroksyestradiol (4-OHE2). Rola tego metabolitu w kancerogenezie jest nieustannie badana, ale istnieją jednak pewne raporty potwierdzające obecność adduktów 4-OHE2 w raku piersi [46, 47]. Są tylko pojedyncze dane opisujące genotoksyczność 4-hydroksyestradiolu, a długotwałą ekspozycja na ten metabolit może być głównym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia raka piersi. 4-Hydroksyestradiol jest utleniany do E2-3,4-chinonu, który reaguje z DNA, tworząc addukty indukujące genotoksyczność i rakotwórczość [60]. Badania prowadzone na linii komórkowej SHE i NEG (komórki gruczołowe endometrium) potwierdzają właściwości mutagenne 4-OHE2 [23, 56]. Tsutsui i wsp. [56] wykazali, iż 1–3-dniowa inkubacja komórek SHE z 4-OHE2 hamowała ich wzrost w sposób zależny od stężenia, indukowała aberracje chromosomowe oraz powodowała znaczący wzrost odsetka komórek aneuploidalnych [56]. Dobrze udokumentowany jest mechanizm tworzenia adduktów 4-OHE2 z DNA indukujący mutacje, a następnie transformację nowotworową w komórkach sutka. Ponadto wykazano, że w unieśmiertnionych komórkach gruczołowych endometrium, 4-OHE2 może się przyczyniać do powstawania raka endometrium przez indukowanie mutacji PTEN na kodonie 130/131 [23].

Jednak nie każda ekspozycja na ten metabolit powoduje mutacje. Jedynym z możliwych zaburzeń jest powstanie pęknięć nici DNA pod wpływem 4-OHE2. Jak wykazują badania prowadzone m.in. przez Rajapakse i wsp. [41] na linii komórkowej MCF-7 oraz Zahid i wsp. [62] w komórkach nabłonka gruczołu sutkowego (MCF-10A), 4-hydroksyestradiol znacząco zwiększa liczbę uszkodzeń DNA. Stężenie 4-OHE2 wywołujące te zmiany wynosiło 100 nM i było znacznie niższe niż stosowane wcześniej

stężenia metabolitu. Ponadto proponowane mechanizmy obejmują również aktywowane receptorem zwiększenie szybkości proliferacji komórek prowadzące do akumulacji uszkodzeń genetycznych wynikających z błędów odczytu [41]. Zahid i wsp. [62] wskazali na mechanizm depurynizacyjny DNA z wytworzeniem adduktów jako drogę działania genotoksycznego 4-OHE2. Udowodnili, że takie metabolity estrogenów jak katecholowe chinony estrogenów, jeśli są wytwarzane w stosunkowo dużych ilościach, mogą stać się chemicznymi czynnikami

rakotwórczymi poprzez reakcję z DNA, tworząc głównie depurynujące addukty DNA [62]. Pośrednio uszkodzenia takiego typu zaobserwowali także Chen i wsp. [5] na linii komórkowej MCF-10A (linia prawidłowa nabłonka gruczołu sutkowego) przez pomiar konwersji DNA faga ϕ X174 do otwartej kolistej i liniowej formy. W ten sposób określono, czy DNA ulega fragmetacji poprzedzającej apoptozę. 4-OHE2 powodował także przejściową aktywację kinaz białkowych regulowanych sygnałem pozakomórkowym (ERK, extracellular signal-regulated

Tabela 1. Zestawienie wybranych badań dotyczących genotoksyczności 17 β -estradiolu i jego metabolitów

Oceniana zmiana	Autorzy	Linia komórkowa	Wynik badania
17β-estradiol			
Mutacje genowe	[7]	Bakteryjne	Negatywny
	[42]	Bakteryjne	Negatywny
	[26]	Bakteryjne	Negatywny
	[25]	V79 <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
	[9]	V79 <i>in vitro</i>	Negatywny
	[54, 56]	SHE <i>in vitro</i>	Negatywny
	[42]	L5178Y	Negatywny
Niemutagenne uszkodzenia DNA	[54]	SHE <i>in vitro</i>	Negatywny
	[16]	Nerka chomika syryjskiego	POZYTYWNY
	[61]	MCF-7 <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
	[2]	MCF-7 <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
		JM-1 <i>in vitro</i>	Negatywny
	[41]	MCF-7 <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
	[21]	MCF-7 <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
2-metoksyestradiol			
Mutacje genowe	[55]	SHE <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
Niemutagenne uszkodzenia DNA	[13]	HT22 <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
	[24]	U87MG <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
	[13]	OS 143B <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
	[57]	MCF-7 <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
	[43]	MCF-7 <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
4-hydroksyestradiol			
Mutacje genowe	[56]	SHE <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
	[23]	NEG <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
Niemutagenne uszkodzenia DNA	[17]	DNA chomika syryjskiego	POZYTYWNY
	[18]	SHE <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
	[16]	Nerka chomika syryjskiego	POZYTYWNY
	[41]	MCF-7 <i>in vitro</i>	POZYTYWNY
	[62]	DNA z grasicy cielęcej	POZYTYWNY
16α-hydroksyestron			
Mutacje genowe	[56]	SHE <i>in vitro</i>	Negatywny
Niemutagenne uszkodzenia DNA		BRAK DANYCH	

kinases), zaangażowanych w przekazywanie sygnałów przeżycia lub śmierci komórek. W doświadczeniach na linii komórkowej SHE wykazano ponadto, iż metabolit ten powoduje także zmiany strukturalne chromosomów oraz zmiany o charakterze aneuploidii [56].

GENOTOKSYCZNOŚĆ 16 α -HYDROKSYESTRONU

16 α -hydroksyestron jest metabolitem estradiolu, którego genotoksyczność jest najslabiej przebadana. Brak jest danych o uszkodzeniach DNA, takich jak np. pęknięcia nici DNA. W dostępnych badaniach nie wykazano powstawania zmian struktury chromosomu, a także mutacji genowych pod wpływem działania tego metabolitu [56]. Jedynie Tsutsui i wsp. [56] zaobserwowali na linii komórkowej SHE genotoksyczność 16 α -hydroksyestronu w formie aneuploidii. Brak jest natomiast danych literaturowych oceniających wpływ tego metabolitu na pęknięcia nici DNA z użyciem testu kometowego. Genotoksyczność estrogenów jest ściśle powiązana z ich hydroksylacją i to często warunkuje toksyczność steroidów [11]. W tabeli 1 zestawiono dostępne dane dotyczące genotoksyczności 17 β -estradiolu i jego metabolitów.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ayyanan A., Laribi O., Schuepbach-Mallepell S., Schrick C., Gutierrez M., Tanos T., Lefebvre G., Rougemont J., Yalcin-Ozuyal Ö., Briskin C.: Perinatal exposure to bisphenol A increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Mol. Endocrinol.*, 2011; 25: 1915–1923
- [2] Bajpayee M., Pandey A.K., Parmar D., Mathur N., Seth P.K., Dhanwan A.: Comet assay responses in human lymphocytes are not influenced by the menstrual cycle: a study in healthy Indian females. *Mutat. Res.*, 2005; 565: 163–172
- [3] Batsi C., Markopolou S., Kontargiris E., Charalambous C., Thomas C., Christoforidis S., Kanavaros P., Constantinou A.I., Marcu K.B., Kolettas E.: Bcl-2 blocks 2-methoxyestradiol induced leukemia cell apoptosis by a p27 Kip1-dependent G1/S cell cycle arrest in conjunction with NF- κ B activation. *Biochem. Pharmacol.*, 2009; 78: 33–44
- [4] Byrne C., Divekar S.D., Storchan G.B., Parodi D.A., Martin M.B.: Metals and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2013; 18: 63–73
- [5] Chen ZH., Na H.K., Hurh Y.J., Surh Y.J.: 4-hydroksyestradiol induces oxidative stress and apoptosis in human mammary epithelial cells: Possible protection by NF- κ B and ERK/MAPK. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005; 208: 46–56
- [6] Chmielewska M., Skibińska I., Kotwicka M.: Mitochondria jako organelle docelowe dla działania estrogenów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2017; 71: 454–465
- [7] Dhillon V.S., Dhillon I.K.: Genotoxicity evaluation of estradiol. *Mutat. Res.*, 1995; 345: 87–95
- [8] Dingli D., Timm M., Russell S.J., Witzig T.E., Rajkumar S.V.: Promising preclinical activity of 2-methoxyestradiol in multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 3948–3954
- [9] Drevon C., Piccoli C., Montesano R.: Mutagenicity assays of estrogenic hormones in mammalian cells. *Mutat. Res.*, 1981; 89: 83–90
- [10] Foksiński M., Piekutowski K., Roszkowski K., Oliński R.: Rola estrogenów w procesie karcinogenezy. *Współcz. Onkol.*, 2002; 3: 137–140
- [11] Fortner R.T., Oh H., Daugherty S.E., Xu X., Hankinson S.E., Ziegler R.G., Eliassen A.H.: Analgesic use and patterns of estrogen metabolism in premenopausal women. *Horm. Cancer*, 2014; 5: 104–112
- [12] Fuhrman B.J., Schairer C., Gail M.H., Boyd-Morin J., Xu X., Sue L.Y., Buys S.S., Isaacs C., Keefer L.K., Veenstra T.D., Berg C.D., Hoover R.N., Ziegler R.G.: Estrogen metabolism and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2012; 104: 326–339
- [13] Górka M., Kuban-Jankowska A., Zmijewski M., Marino Gammazza A., Cappello F., Wnuk M., Gorzynik M., Rzeszutek I., Daca A., Lewinska A., Wozniak M.: DNA strand breaks induced by nuclear hijacking of neuronal NOS as an anti-cancer effect of 2-methoxyestradiol. *Oncotarget*, 2015; 6: 15449–15463
- [14] Górka M., Zmijewski M.A., Kuban-Jankowska A., Wnuk M., Rzeszutek I., Wozniak M.: Neuronal nitric oxide synthase-mediated genotoxicity of 2-methoxyestradiol in hippocampal HT22 cell line. *Mol. Neurobiol.*, 2016; 53: 5030–5040
- [15] Gray J.M., Rasanayagam S., Engel C., Rizzo J.: State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. *Environ. Health*, 2017; 16: 94
- [16] Han X., Liehr J.G.: DNA single-strand breaks in kidneys of Syrian hamsters treated with steroidal estrogens: hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 997–1000
- [17] Han X., Liehr J.G.: Microsome-mediated 8-hydroxylation of guanine bases of DNA by steroid estrogens: correlation of DNA damage by free radicals with metabolic activation to quinones. *Carcinogenesis*, 1995; 16: 2571–2574
- [18] Hayashi N., Hasegawa K., Komine A., Tanaka Y., McLachlan J.A., Barrett J.C., Tsutsui T.: Estrogen-induced cell transformation and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Mol. Carcinog.*, 1996; 16: 149–156
- [19] Hernández L.G., van Benthem J., Johnson G.E.: A mode-of-action approach for the identification of genotoxic carcinogens. *PLoS One*, 2013; 8: e64532
- [20] Hosford S.R., Shee K., Wells J.D., Traphagen N.A., Fields J.L., Hampsch R.A., Kettenbach A.N., Demidenko E., Miller T.W.: Estrogen therapy induces an unfolded protein response to drive cell death in ER+ breast cancer. *Mol. Oncol.*, 2019; 13: 1778–1794

- [21] Iso T., Watanabe T., Iwamoto T., Shimamoto A., Furuichi Y.: DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol. Pharm. Bull.*, 2006; 29: 206–210
- [22] Joosten H.F., van Acker F.A., van den Dobbelsteen D.J., Horbach G.J., Krajnc E.L.: Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicol. Lett.*, 2004; 151: 113–134
- [23] Ke H., Suzuki A., Miyamoto T., Kashima H., Shiozawa T.: 4-hydroxyestrogen induces DNA damage on codon 130/131 of PTEN in endometrial carcinoma cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2015; 400: 71–77
- [24] Khoei S., Delfan S., Neshasteh-Riz A., Mahdavi S.R.: Evaluation of the combined effect of 2ME2 and ⁶⁰Co on the induction of DNA damage by IUDr in a spheroid model of the U87MG glioblastoma cancer cell line using alkaline comet assay. *Cell J.*, 2011; 13: 83–90
- [25] Kong L.Y., Szaniszló P., Albrecht T., Liehr J.G.: Frequency and molecular analysis of hprt mutations induced by estradiol in Chinese hamster V79 cells. *Int. J. Oncol.*, 2000; 17: 1141–1149
- [26] Lang R., Reimann R.: Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: examination for the induction of gene mutations using the Ames Salmonella/microsome test and the HGPRT test in V79 cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 1993; 21: 272–304
- [27] LaVallee T.M., Zhan X.H., Herbstritt C.J., Kough E.C., Green S.J., Pribluda V.S.: 2-Methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors α and β . *Cancer Res.*, 2002; 62: 3691–3697
- [28] Licznarska B., Baer-Dubowska W.: Intrakrynologia estrogenów a terapia i chemioprewencja w nowotworach piersi. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 220–230
- [29] Loeb L.A., Harris C.C.: Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res.*, 2008; 68: 6863–6872
- [30] Lu Y., Liu Y., Yang C.: Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. *J. Vis. Exp.*, 2017; 2017: e56450
- [31] Makowski M., Połać I., Pertyński T.: Estrogeny a rak sutki. *Prz. Menopauz.*, 2007; 3: 150–154
- [32] Matejczyk M., Zalewski P.: Związki endokrynnie aktywne i ich aktywność biologiczna. *Kosmos*, 2011; 1–2: 17–32
- [33] Maura N., Santen R.J., Colón-Otero G., Hossain J., Wang Q., Mesaros C., Blair I.A.: Estrogens and their genotoxic metabolites are increased in obese prepubertal girls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2015; 100: 2322–2328
- [34] McGowan E.M., Lin Y., Hatoum D.: Good guy or bad guy? The duality of wild-type p53 in hormone-dependent breast cancer origin, treatment, and recurrence. *Cancers*, 2018; 10: E172
- [35] Mueck A.O., Seeger H., Lippert T.H.: Estradiol metabolism and malignant disease. *Mutagenesis*, 2002; 43: 1–10
- [36] Nohmi T.: Thresholds of genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Toxicol. Res.*, 2018; 34: 281–290
- [37] Park S.A., Lee M.H., Na H.K., Surh Y.J.: 4-Hydroxyestradiol induces mammary epithelial cell transformation through Nrf2-mediated heme oxygenase-1 overexpression. *Oncotarget*, 2017; 8: 164–178
- [38] Pietrzak B., Właźlak E., Zwierzyńska E.: Estrogeny stosowane długotrwale: korzyści czy ryzyko. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 285–293
- [39] Pogribny I.P., Rusyn I., Beland F.A.: Epigenetic aspects of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogenesis: studies in rodents. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2008; 49: 9–15
- [40] Pruthi S., Yang L., Sandhu N.P., Ingle J.N., Beseler C.L., Suman V.J., Cavalieri E.L., Rogan E.G.: Evaluation of serum estrogen-DNA adducts as potential biomarkers for breast cancer risk. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2012; 132: 73–79
- [41] Rajapakse N., Butterworth M., Kortenkamp A.: Detection of DNA strand breaks and oxidized DNA bases at the single-cell level resulting from exposure to estradiol and hydroxylated metabolites. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2005; 45: 397–404
- [42] Richold M.: The genotoxicity of trenbolone, a synthetic steroid. *Arch. Toxicol.*, 1988; 61: 249–258
- [43] Sączko J., Choromańska A., Rembiałkowska N., Dubińska-Magiera M., Bednarz-Misa I., Bar J., Marcinkowska A., Kulbacka J.: Oxidative modification induced by photodynamic therapy with PhotofrinII and 2-methoxyestradiol in human ovarian clear carcinoma (OVBH-1) and human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells. *Biomed. Pharmacother.*, 2015; 71: 30–36
- [44] Sączko J., Michel O., Chwiłkowska A., Sawicka E., Mączyńska J., Kulbacka J.: Estrogen receptors in cell membranes: Regulation and signaling. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 2017; 227: 93–105
- [45] Santen R.J., Yue W., Wang J.P.: Estrogen metabolites and breast cancer. *Steroids*, 2015; 99: 61–66
- [46] Sawicka E., Długosz A.: The role of 17 β -estradiol metabolites in chromium-induced oxidative stress. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2017; 26: 215–221
- [47] Sawicka E., Piwowar A., Musiała T., Długosz A.: The estrogens/chromium interaction in the nitric oxide generation. *Acta Pol. Pharm.*, 2017; 74: 785–791
- [48] Sepkovic D.W., Bradlow H.L.: Estrogen hydroxylation – the good and the bad. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2009; 1155: 57–67
- [49] Singh S.: Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Toxicol. Mech. Methods*, 2019; 29: 300–311
- [50] Song R.X., Mor G., Naftolin F., McPherson R.A., Song J., Zhang Z., Yue W., Wang J., Santen R.J.: Effect of long-term estrogen deprivation on apoptotic responses of breast cancer cells to 17 β -estradiol. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 93: 1714–1723
- [51] Stetkiewicz T., Stachowiak G., Pakalski A., Makuła A., Surkont G., Pertyński T.: Kontrowersje wokół antyoksydacyjnego działania estrogenów. *Prz. Menopauz.*, 2006; 6: 343–346
- [52] Świtalska M., Strządała L.: Niegenomowe działanie estrogenów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 541–547
- [53] Tripathi K., Mani C., Somasagara R.R., Clark D.W., Ananthapur V., Vinaya K., Palle K.: Detection and evaluation of estrogen DNA-adducts and their carcinogenic effects in cultured human cells using biotinylated estradiol. *Mol. Carcinog.*, 2017; 56: 1010–1020
- [54] Tsutsui T., Suzuki N., Fukuda S., Sato M., Maizumi H., McLachlan J.A., Barrett J.C.: 17 β -estradiol-induced cell transformation and aneuploidy of Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis*, 1987; 8: 1715–1719
- [55] Tsutsui T., Tamura Y., Hagiwara M., Miyachi T., Hikiba H., Kubo C., Barrett J.C.: Induction of mammalian cell transformation and genotoxicity by 2-methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 735–740
- [56] Tsutsui T., Tamura Y., Yagi E., Barrett J.C.: Involvement of genotoxic effects initiation of estrogens-induced cellular transformation: studies using Syrian hamster embryo cells treated with 17 β -estradiol and eight of its metabolites. *Int. J. Cancer*, 2000; 86: 8–14
- [57] Visagie M.H., Joubert A.M.: 2-Methoxyestradiol-bis-sulfamate induces apoptosis and autophagy in a tumorigenic breast epithelial cell line. *Mol. Cell. Biochem.*, 2011; 357: 343–352
- [58] Wen C., Wu L., Fu L., Wang B., Zhou H.: Unifying mechanism in the initiation of breast cancer by metabolism of estrogen (Review). *Mol. Med. Rep.*, 2017; 16: 1001–1006
- [59] Witczak K., Sajdak S., Kojs Z.: Hormonalna terapia zastępcza w ginekologii onkologicznej. *Curr. Gynecol. Oncol.*, 2013; 11: 62–73

[60] Yamazaki S., Sakakibara H., Takemura H., Yasuda M., Shimo K.: Quercetin-3-O-glucuronide inhibits noradrenaline binding to α 2-adrenergic receptor, thus suppressing DNA damage induced by treatment with 4-hydroxyestradiol and noradrenaline in MCF-10A cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2014; 143: 122–129

[61] Yared E., McMillan T.J., Martin F.L.: Genotoxic effects of oestrogens in breast cells detected by the micronucleus assay and the Comet assay. *Mutagenesis*, 2002; 17: 345–352

[62] Zahid M., Gaikwad N.W., Rogan E.G., Cavaliere E.L.: Inhibition of depurinating estrogen-DNA adduct formation by natural compounds. *Chem. Res. Toxicol.*, 2007; 20: 1947–1953

[63] Zielniok K., Gajewska M., Motyl T.: Molekularne aspekty działania 17β -estradiolu i progesteronu w komórkowych szlakach sygnałowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 777–792

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.