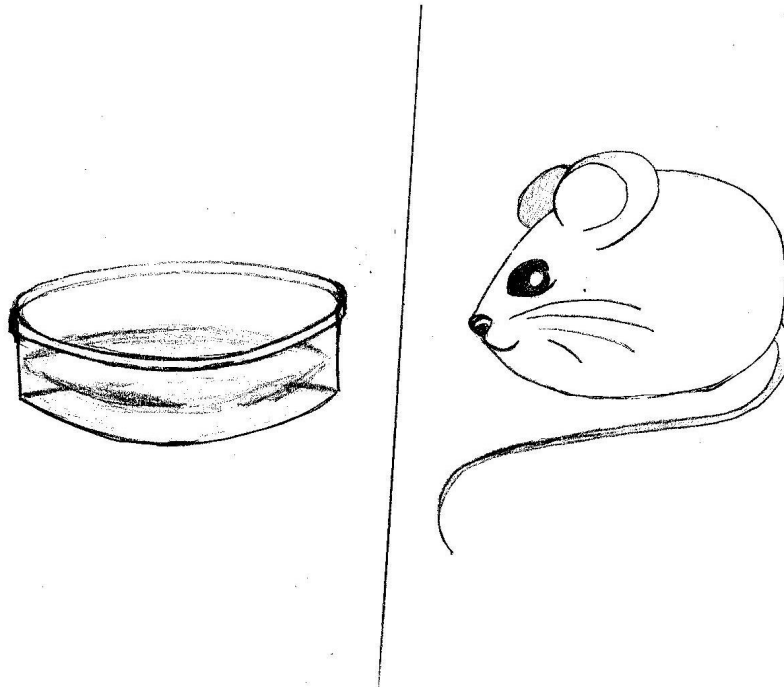




UPPSALA
UNIVERSITET

Problematik kring *in vitro*- och *in vivo*-metoder för toxicitetsstudier

In vitro och *in vivo* mikrokärntest ger olika bedömningar av estradiols DNA- skadande effekt



Hanne Carlsson

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2014
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Djurförsök, så kallade *in vivo*-försök, har många nackdelar, både etiska och rent vetenskapliga. I avsikt att förbättra forskningen har därför *in vitro*-modeller tagits fram, då används istället exempelvis celler i provrör. Men *in vitro*-modellerna har även de svagheter. För att testa ifall ett ämne ger skador på DNA, är gentoxiskt, kan ett test kallat mikrokärnstestet användas. Mikrokärnstestet kan tillämpas både *in vivo* och *in vitro*. Men när gentoxiciteten av hormonet estradiol har undersökts med hjälp av mikrokärnstestet har ett problem visat sig. *In vivo* syntes inga DNA skador men *in vitro* observerades tydlig toxicitet efter estradiolbehandling. För att försöka förklara detta tvetydiga resultat har faktorer som metabolism, biotillgänglighet, dos, effekter av tidsintervall och val av celler/ djur diskuterats. Det är vanligt att *in vitro*-metoder kritiserar på grund av deras bristande förmåga till metabolism, och i detta fall tros metabolismen av estradiol till dess metabolit 4-hydroxyestradiol ha en avgörande roll i hormonets toxicitet. Denna omvandling är beroende av vilken celltyp som studeras, men både *in vitro*- och *in vivo*- testen har använt till synes relevanta celler. En trolig anledning till de motsägelsefulla resultaten är skillnader i hormonbindande protein i de serum som använts. Nötserumet som använts *in vitro* borde inte binda estradiol på samma sätt som musblodet *in vivo*, vilket resulterar i olika biotillgänglighet i de olika testerna. Efter att ha studerat hur estradiols toxiska verkan påverkas av tiden från exponering kan slås fast att några *in vivo*- försök möjligen varit för långa för att kunna ha upptäckt ett resultat.

Introduktion

Innan ett nytt läkemedel testas på människor genomförs prekliniska studier, där försök *in vivo* (i levande organismer) och *in vitro* (i provrör) används för att bland annat testa läkemedlets säkerhet (Läkemedelsverket 2006). Bland annat utförs gentoxicitetstester för att ta reda på om ett ämne skadar arvsmassan (EMA 2012). Sådana skador kan orsaka tumörer och cancer, ärftliga skador och aneuploidi (EMA 2012).

Levande djur har används för att studera anatomi redan före vår moderna tidsräkning. Medicinsk forskning grundar sig, historiskt sett, i studier av djur. Fast än djurförsök har gett mänskligheten ovärderlig information är det inte en problemfri metod. Ifall det är etiskt acceptabelt att utsätta djur för lidande för vetenskapen förblir en fråga som engagerar många. Detta sammanfattas av Monamy (1996). Det finns också stora vetenskapliga problem med djurförsök. Djur är mycket olika människor, både i hur de fysiskt ser ut och hur deras sjukdomar fungerar. Många försöksdjur ges sjukdomar som ska efterlikna människans, men dessa artificiella sjukdomar kan ha en annan mekanism än i människan och de kan i djuret ge andra symptom. Bara ungefär 50% av alla djurförsök förutspår effekten i människan någorlunda rätt. Det visar en studie som jämfört prekliniska studier av vanliga sjukdomar och vad de efterföljande kliniska studierna visat (Perel *et al.* 2007).

I hopp om att undvika problemen med djurförsök har läkemedelsforskningen börjat använda sig mer och mer av *in vitro*-modeller. Mikrokärnstestet är en väletablerad metod för att undersöka ifall ämnen är gentoxiska, detta test kan utföras både *in vitro* och *in vivo* (OECD 1997, OECD 2010, EMA 2012). Skillnaden mellan tillvägagångssätten är endast att *in vivo* utsätts ett levande djur för kemikalien och *in vitro* behandlas en cellkultur (OECD 1997, OECD 2010). I syfte att utreda fördelar och problematik kring att använda *in vitro* tester i stället för *in vivo* har *in vitro* mikrokärnstestet jämförts med *in vivo* mikrokärnstest. Dessa båda tillämpningsmetoder har visat sig kunna ge mycket olika resultat, exempelvis då gentoxiciteten av hormonet estradiol har undersökts (Joosten *et al.* 2004). I denna artikel

diskuteras anledningar till att resultaten från *in vitro* mikrokärnstest tydligt skiljer sig från *in vivo* mikrokärnstest gällande toxiciteten av estradiol.

Mikrokärnstest

Mikrokärnor

Mikrokärnor (MN – från eng. micronucleus) liknar små cellkärnor och innehåller delar av eller enstaka hela kromosomer som vid celldelning inte lyckats inneslutas i en av dotterkärnorna. I celldelningens metafase lägger sig alla kromosomer på rad för att sedan i anafas flyttas till de olika polerna med hjälp av kärnspolen. En avbruten kromosom som saknar centromer kan inte vandra i anafas, det samma gäller hela kromosomer där exempelvis deras kärnspole har skadats. I telofas innesluts även dessa förlorade kromosomer och kromosomfragment i membran. Det bildas någonting som liknar en liten extra kärna (figur 1 och 2). Denna mikrokärna existerar sedan i en av dottercellerna, utanför den riktiga kärnan. Mikrokärnor uppkommer då och då i de flesta celltyper, cirka 1-10 MN per miljoner celler. Detta sammanfattas av Grawé (2005).

Vad testet visar

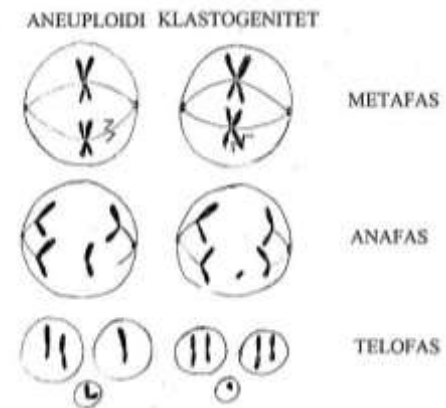
Då Evans *et al.* (1959) utförde ett antal experiment för att studera effekten av strålning, slog han fast att antalet mikrokärnor i celler är ett bra mått på hur mycket skada kromosomerna tagit av en viss strålningsbehandling. Desto mer genomet skadades desto fler mikrokärnor uppträdde. Antalet MN är dock inte direkt proportionellt mot antalet skador. Experimenten visar att antalet MN är ungefär 60 procent av antalet kromosomskador, detta eftersom flera kromosomfragment kan inneslutas i en MN. Ett ämne som orsakar avbrutna kromatider som saknar centromer kallas för klastogena (EMA 2012). Ämnen som ger en hel förlorad kromosom, aneuploidi, kallas för aneugena (EMA 2012, OECD 2010).

Mikrokärnstestet (MNT – eng. micronucleus test) är ett av de test som rekommenderas av OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2010). I deras riktlinjer beskriver de testet som ett test av gentoxicitet genom att mikrokärnor bildas under cellens interfase på grund av acentriska kromosomfragment eller hela kromosomer som inte kan röra sig till polerna under celldelningen.

Mikrokärnstestet kan utföras *in vitro*, genom att utsätta celler för det ämne som man vill testa. Detta är ett pålitligt test som kom att delvis ersätta det tidigare använda chromosome aberrations tests (Corvi *et al.* 2008). Testet kan även utföras *in vivo*, genom att exempelvis räkna antalet mikrokärnor i benmärgen hos gnagare som tidigare utsatts för testsubstansen. Så utfördes testet första gången (Matter & Schmid 1971).

Cytokinesblockerings- metoden (CBMN)

Mikrokärnor kan endast bildas efter en celldelning, och i en cellkultur delar sig inte alla celler samtidigt. Därför vid avläsningstillfället, efter att cellerna utsatts för någon form av potentiellt skadlig behandling, kommer vissa celler ha hunnit bilda MN och andra inte. Andelen celler med MN blir alltså inte ett korrekt mått på skadligheten eftersom den också påverkas av tiden från försökets början. Celldelningshastigheten är olika mellan celltyper och individer. Fenech



Figur 1. En schematisk bild av hur mikrokärnor bildas, via aneugena ämnen och klastogena ämnen. Resultatet blir att förutom de två dottercellerna bildas en, eller flera mikrokärnor. Författarens bild.

och Morley (1985) letade lösningar till detta problem och uppfann då en metod som kom att kallas för cytokinesblockerings- metoden (eng. Cytokinesis-block method). Cellerna behandlades med cytochalasin B, som genom att inhibera bildandet av aktintrådar förhindrar cellerna att gå in i cytokines. Dessa celler som stoppats från att dela sig kan i mikroskop tydligt skiljas från andra celler, då de är stora och innehåller två kärnor (figur 2).

Användandet av cytochalasin B har dock vissa nackdelar, det har visats både kunna öka antalet mikrokärnor i en kultur, och minska dem (Tajiro *et al.* 1999). Så även andra tillvägagångssätt har tagits fram, exempelvis den matematiska metoden av Fenech (2000). OECD skriver uttryckligen att användandet av cytochalasin B för *in vitro* MNT inte är obligatoriskt (OECD 2010). Cytokinesblockerings- metoden är dock än idag flitigt använd (Hernandez *et al.* 2013, Stopper 2003, Eckert & Stopper 1996).

CREST

För att ta MNT ett steg längre har det utvecklats flera tekniker som man kan användas för att skilja mellan aneugena och klastogena ämnen (Yamamoto & Kikuchi 1980, Vig & Swearngin 1986). Detta kan vara av intresse eftersom de olika mutationerna får olika följder, både klastogena och aneugena ämnen tycks leda till cancer men aneugena ämnen ger aneuploidi, så som trisomi 21 (downs syndrom) (Emerit 1994, Sen 2000). En vanlig metod för att särskilja dessa mutationer kallas för CREST (döpt efter sjukdomen som förkortas från symptomen: calcinosis, Raynaud´s fenomenon, esophageal dysfunction, sclerodactyly, telangiectasias). Genom att med hjälp av antikroppar märka kinetokoren, en proteinstruktur som sitter vid centromeren, kan man se ifall mikrokärnorna bildats av centriska fragment (med centromer och kinetokor) eller inte (acentriskt DNA) (Vig & Swearngin 1986). Detta kan göras med hjälp av serum från personer med sjukdomen CREST, detta serum innehåller antikroppar som reagerar med kinetokoren och ger immunofluorescens (Fritzler *et al.* 1980, Fenech & Morley 1985). Denna metod har bland annat använts utav Schnizler *et al.* (1994), Eckert och Stopper (1996), Yared (2002) och Kayani och Parry (2008).

Vad testet inte visar

Kirkland *et al.* (2005) tillämpade några *in vitro* test på ett stort antal substanser med klarlagd toxicitet. Känsligheten, som är ett mått på hur många av de cancerframkallande ämnena som hittades som cancerframkallande av MNT, var i detta fall 78,7%, ytterligare 2,2% av de cancerframkallande kemikalierna gav osäkra resultat. Specificiteten, andelen icke cancerframkallande ämnen som markerades som ofarliga, var 30,8%, ytterligare 23% av testarna gav här ett osäkert resultat. Jämfört med andra *in vitro*-tester (Ames test, Mouse lymphoma assay, chromosomal aberrations test) har MNT bäst förmåga att upptäcka cancerframkallande ämnen, men sämst förmåga att bedöma icke cancerframkallande ämnen som ofarliga. Detta är ett problem eftersom det kan sätta stopp för exempelvis nya läkemedel som försöker komma ut på marknaden, och som är ofarliga men ändå bedöms som farliga. Benigni *et al.* (2009) utförde liknande studier av *in vivo* MNT i några gnagare. De kom fram till att känsligheten för ämnen som borde framkalla mikrokärnor var 65% och specificiteten



Figur 2. En tvåkärnig cell som med hjälp av cytochalasin B har stannat i celledelningen just innan dottercellerna separeras. Denna cell har en mikrokärna. Cellen är färgad med acridin orange, vilket binder in till nukleinsyror. Kärnan (DNA) fluorescerar i grönt och cytosolen (RNA) syns som rött. Omgjord efter Hernández (2013).

57%. Jämförs dessa resultat slår man fast att *in vitro* MNT är bättre på att varna för gentoxiska ämnen, men *in vivo* MNT är bättre på att visa ofarligheten hos riskfria ämnen.

Man kan fråga sig varifrån dessa många falska positiva resultat kommer. En anledning kan vara dosen. I *in vitro* går det att testa mycket högre doser än *in vivo*, så höga doser att det blir irrelevant. Då Walmsley och Billinton (2011) sammanfattade området var *in vitro* test rekommenderade (av OECD) att, med vissa undantag, testa koncentrationer upp till 10mM av de flesta ämnen. Detta är en mycket hög koncentration som *in vivo* oftast är dödlig. I dessa höga koncentrationer, argumenterar Walmsley och Billinton, kan många aspekter av cellen påverkas. Rekommendationerna är nu sänkta till max 1mM (EMA 2012).

Mikrokärnor bildas endast då DNA förloras. MNT visar alltså inte mutationer så som enbaspolymorfismer (eng. - single nucleotide polymorphism, SNP). Därför kombineras gärna MNT med ett genmutationstest som då ofta utförs i bakterier (EMA 2012).

Studier av estradiol med hjälp av MNT

I sammanställningar som den skriven av Joosten *et al.* (2004) syns en tydlig problematik kring att bestämma existensen av gentoxicitet av vissa steroidhormoner. Resultaten är beroende av vilket test som användas och hur det har utformats. Utav steroidhormonerna är de estrogena ämnena de som tycks mest cancerframkallande. Ett steroidhormon vars potentiella gentoxicitet är mycket studerad är estradiol. Joosten *et al.* (2004) exemplifierar flera test där en del visar sig positiva och andra negativa.

Estradiol

Estradiol, även kallat östradiol, estradiol- β -17 eller E2 räknas som ett kvinnligt könshormon och är involverat utvecklingen av kvinnans könskaraktärer, men det tillverkas även hos män (Russo & Russo 2011, Läkemedelsverket 2014). Estradiol har setts vara ett svagt cancerogent ämne. I flertalet studier av olika gnagare har tumörer uppstått efter att djuren utsatts för farmakologiska doser av estradiol, tumörerna kunde bland annat hittas i bröst, livmoder, testiklar, hypofysen samt i ben och i blod (sammanfattat av Liehr 2000). Estradiol ger också människor en ökad risk för livmoder- och bröstcancer (Liehr 2000, Rosen 2005, Läkemedelsverket 2014). Flera potentiella vägar varigenom estradiol kan inducera cancer har diskuterats. Hormonet ger ökad celledelning genom en receptorberoende mekanism, detta leder till en ökad möjlighet för cellerna att ansamla skadliga mutationer. Hormonet misstänks också minska cellens förmåga att reparera skadat DNA. Det skulle kunna öka aktiviteten av cytokrom P450 vilket ger mutationer och aneuploidi eller vid metabolism bilda fria radikaler (Russo & Russo 2011, Liehr 2000). Processerna bakom estradiols toxicitet är ännu inte helt kartlagda och det är osäkert ifall estradiol utgör en ökad risk för kromosomavbrott och kromosombortfall i människor.

Estradiol används främst för att mildra klimakteriebesvär. Hormonet kan även förebygga benskörhet (Läkemedelsverket 2014). Andra, syntetiska, estrogener användas bland annat i preventivmedel (Rybo 2014).

Estradiol och mikrokärnstestet

Många forskare har använt sig av mikrokärnstestet för att undersöka huruvida estradiol inducerar kromosomskador. De har använt både *in vitro*- och *in vivo*- tillvägagångssätt. Då celler i kultur har behandlats med estradiol har mikrokärnor bildats vilket tyder på att estradiol är gentoxiskt. De flesta försök då djur utsatts för ökade mängder estradiol har dock inte gett

någon ökning i mängden mikrokärnor. Detta sammanfattas i tabell 1. Kommande stycken diskuterar orsaker till dessa motsägelsefulla resultat.

Tabell 1: Sammanställning av arbeten i vilka genotoxiciteten hos estradiol har undersökts med hjälp av MNT antingen *in vivo* eller *in vitro*. Artiklar äldre än 1990 är inte inkluderade. Ett positivt resultat betyder att en signifikant ökning av mikrokärnor har setts efter exponering av estradiol. Ett negativt resultat visar att ingen signifikant effekt på antalet mikrokärnor är observerad.

Referens	Test, celltyp, dos, tid för avläsning efter exponering	Resultat
Eckert & Stopper (1996)	<i>In vitro</i> , lungvävnad från kinesisk hamster, 0-100 μM , 0-25 h.	Positiv. Ökad mängd MN med ökad dos. Tydligt mest MN efter 20 h, sedan avtagande effekt.
Hernández <i>et al.</i> (2013)	<i>In vitro</i> , mänskliga lymfoblastoider, 0-1 μM , ca ett dygn.	Positiv för koncentrationer 0,8 – 1,0 μM . NOEL 0,02 μM . Minskad kärnspoleformation.
Kayani & Parry (2008)	<i>In vitro</i> , människoceller, fibroblaster från förhud & lymfoblastoider som modifierats att uttrycka metaboliska enzym, 0-8 $\mu\text{g ml}^{-1}$, ca ett dygn.	Positiv, för 2 - 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (aneugen). Tydligt mer effekt i celltyp utan extra enzym än i med enzym.
Kabil <i>et al.</i> (2008)	<i>In vitro</i> , bröstcancerceller från människa, 1 nM, 24 h behandling + 18h	Positiv
Pylkkänen <i>et al.</i> (1991)	<i>In vitro</i> , mussperimer, 0,1-100 μM , 3 dygn.	Positiv, signifikant endast vid 0,1 μM
Schnizler <i>et al.</i> (1994)	<i>In vitro</i> , sädesblåsor från får, 0,5 μM , 1-24 h	Positiv. Tydligt högst effekt 6 h efter exponeringsslut, sedan avtagande men fortfarande tydlig efter ett dygn. Aneugen och kanske klastrogen.
Schnizler <i>et al.</i> (1994)	<i>In vitro</i> , embryo från syriansk hamster, 0,5 μM , 1-24 h	Positiv. Tydligt högst effekt 3 h efter exponeringsslut. Effekt sedan avtagande, efter ett dygn nästan ingen effekt kvar. Aneugen och kanske klastrogen.
Stopper <i>et al.</i> (2003)	<i>In vitro</i> , humana äggstocksceller, 10, 100 pM, 38 h (efter 30 h behandling)	Positiv, effekt sedd redan vid 10 pM
Yared <i>et al.</i> (2002)	<i>In vitro</i> , humana bröstceller, 0,001-1000 μM , 24 och 120 h.	Positiv efter 24 h, men inte efter 120 h då MN formationen minskade med ökad dos.
Ashby <i>et al.</i> (1997)	<i>In vivo</i> benmärg, möss: 10, 100 mg kg^{-1} , 24 h.	Negativ
Dhillon & Dhillon (1995)	<i>In vivo</i> , hanmöss benmärg, 10 ³ , 10 ⁴ $\mu\text{g kg}^{-1}$, 30 h	Positiv
Pylkkänen <i>et al.</i> (1991)	<i>In vivo</i> , mussperimer, 50 mg kg^{-1} , 17 dygn.	Negativ
Shelby <i>et al.</i> (1997)	<i>In vivo</i> , benmärg från möss, råttor, 3 dagliga behandlingar, 312,5, 625, 1250 mg kg^{-1}	Negativ
Sponchiado <i>et al.</i> (2011)	<i>In vivo</i> , blodprov från fisk blodprov, 6 ng L^{-1} vatten, 1-10 dagar.	Negativ. Tydlig ($p = 0,06$) ökning av MN efter 24 h. Signifikant minskning av MN vid 10 dagar.

Estradiols metaboliter

Det finns flertalet olikheter mellan celler i kultur och celler i levande djur. Kapaciteten att biotransformera, processen där ämnen bryts ned eller omvandlas i kroppen, minskar ofta *in vitro* jämför med *in vivo* och det är en av de mest omdiskuterade begränsningarna hos *in vitro*-modeller (Hartung & Daston 2009, ECVAM 2006). Det finns sätt att delvis kringgå detta problem. Man kan i *in vitro*-försöken testa även ämnets metaboliter och man kan ge cellerna eller mediet möjlighet att metabolisera. Det senare är vanligare och brukar innebära tillsättning av enzym (ECVAM 2006). Olika celltyper har också olika förmåga att metabolisera (ECVAM 2006).

4-hydroxyestradiol och 2-hydroxyestradiol

Liehr (2000) sammanfattar att i de flesta däggdjur utgörs den huvudsakliga oxidativa metabolismen av estradiol av 2-hydroxylering. 2-hydroxylaser (främst cytokrom P450 1A i extrahepatisk vävnad) omvandlar estradiol till huvudsakligen 2-hydroxyestradiol (80-85%) och en mindre del till 4-hydroxyestradiol (15-20%). Men det tycks som att i de organ vari ökade mängder estradiol inducerar cancer sker en annan metabolism, detta via 4-hydroxylaser vilka istället bildar huvudsakligen 4-hydroxyestradiol. Detta har studerats i njure från hamster, livmoder från möss, hypofysen i råttor och i livmoder och bröst hos människor. I bröstcancervävnad från människor hittades fyra gånger så mycket 4-hydroxyestradiol som 2-hydroxyestradiol, detta sammanfattas i Liehr (2000). Dessa resultat är av intresse eftersom 4-hydroxyestradiol har setts, något beroende på testsituation, betydligt mer cancerframkallande och genotoxisk än 2-hydroxyestradiol (Cavaliere 2000, Liehr 2000, Fernandez 2006). 4-hydroxyestradiol kan skada DNA genom att det bildar fria radikaler. Liehr (2000) sammanfattar därför att organ som via estradiol drabbas av cancer troligen också har högre mängder av 4-hydroxyestradiol som ett resultat av enzymen närvarande i denna vävnad.

För att mikrokärntestet ska kunna indikera gentoxicitet av 2-hydroxyestradiol och 4-hydroxyestradiol måste de inducera mikrokärnor, det räcker inte bara att de är cancerogena och gentoxiska. Dessa metaboliter tycks dock kunna frambringa mikrokärnor, då de båda har visat gentoxicitet *in vitro* chromosome aberrations test (CAT), ett test som upptäcker liknande skador som MNT (Tsutsui *et al.* 2000, OECD 1997).

Andra metaboliter

Estradiol kan metaboliseras till en rad olika metaboliter, förutom de tidigare diskuterade 2-hydroxyestradiol och 4-hydroxyestradiol. Estradiol kan exempelvis omvandlas till estron (E1) och till estriol (Labrie 1997, Lord *et al.* 2002). Estron har visat sig vara gentoxiskt i MNT, estriol var inte det (Yared *et al.* 2002). Andra metaboliter är exempelvis 16 α -hydroxyestradiol, 2- metoxyestron vilka var negativa i *in vitro* CAT (Tsutsui *et al.* 2000, Lord *et al.* 2002).

Cellens förmåga att metabolisera

Estradiol har alltså metaboliter som kan ge positiva resultat i MNT. Dessa metaboliter borde vara närvarande *in vivo*, de kan även vara närvarande *in vitro*.

Sammanställningen av Liehr (2000) och det faktum att 4-hydroxyestradiol borde kunna inducera mikrokärnor leder till frågan ifall de celltyper som använts i mikrokärntesten är sådana som drabbas av estradiolinducerad cancer och då naturligt innehåller betydande mängder 4-hydroxylaser (Tsutsui *et al.* 2000). Tre av fem *in vivo* MNT test i denna studie är gjorda i benmärg. Estradiol har setts inducera cancer i ben, rättare sagt osteosacoma (Highman 1981). I benmärgen i *in vitro*- studierna är det alltså möjligt att det fanns 4-hydroxylaser. Pylkkänen *et al.* (1991) utförde *in vivo* och *in vitro* test på mussperimer där resultatet blev negativt respektive positivt. Huruvida estradiol kan påverka spermier är oklart,

men en koppling kan ses mellan estradiol och prostatacancer (Jason *et al.* 2011). För vidare diskussion om resultaten från Pylkkänen *et al.* (1991) se främst avsnittet ”Effekten av tidsintervallet” nedan. *In vitro*-experiment med lungvävnad från cancer gav positiva resultat, lungor är ett organ som tros kunna drabbas av estradiolinducerad cancer (Eckert & Stopper 1996, Stabile 2002). *In vitro* positiva resultat har också setts i celler från sädesblåsor, äggstockar, bröst och blod, alla vilka är organ som har koppling till estradiolinducerad cancer (Schnizler *et al.* 1994, Liehr 2000 Stopper *et al.* 2003, Yared *et al.* 2002, Nelles 2011, Sponchiado *et al.* 2011). Ingen information har hittats gällande estradiolinducerad cancer i embryon.

Även om ett organ har möjlighet att metabolisera estradiol betyder det inte att alla cellinjer från det organet innehåller rätt enzym. Eckert och Stopper (1996) uppger att de har använt sig av hamsterlungcellinjen V79. Denna linje innehåller naturligt inga cytokrom P450 och alltså inget 4-hydroxylas, cellinjen har dock flertalet gånger modifierats för att innehålla metaboliserande enzym så som P450 (ECVAM 2006, Hong 2011).

En av de mänskliga celltyperna som användes av Kayani och Parry (2008) var genetiskt modifierad och uttryckte olika cytokrom P450. Jämfört med en naturlig cellinje som antas sakna dessa enzym visade den modifierade svagare toxisk respons på estradiol (Kayani & Parry 2008). En möjlig slutsats från detta är att biotransformationen av estradiol minskade estradiols sammanlagda gentoxicitet. Den modifierade celltypen uttryckte *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2A6*, *CYP3A4* och *CYP2E1*. Cytokrom P450 1A är de mest förekommande 2-hydroxylaserna och inkluderar enzymen *CYP1A1* och *CYP1A2* (Liehr 2000). I människor tycks 4-hydroxylasaktiviteten främst utgöras av 1B1 (Liehr 2000, Badawi 2001). 1B1 uttrycks inte i den modifierade celltypen. Så resultatet från Kayani och Parry (2008) kan vara förenligt med att förekomsten av 4-hydroxylaser i vävnaden är viktigt för att estradiol ska kunna inducera gentoxicitet.

Hormonbindande protein

I plasman finns det proteiner som binder steroidhormoner för att transportera dem runt i blodomloppet (Hammond 1995). Dessa proteiner reglerar hormonets möjlighet att nå ut i vävnaderna. Större delen steroidhormoner i plasman binder till protein, främst SHBG (sex hormonbindande globulin) och albumin (Hammond 1995, Langley *et al.* 1985). I kvinnor är endast cirka 2% av estradiol i blodet obundet och därav bioaktivt, ca 70% är bundet till albumin och ca 30% till SHBG, hos män är andelen obundet estradiol liknande men andelen bundet till albumin minskar och för SHBG ökar andelen bundet estradiol (Södergard *et al.* 1982).

I *in vitro* försöken tillsätts blod till cellkulturen vilket borde efterlikna effekten av hormonbindande proteiner *in vivo*. I många fall används 5-10% serum från nöt (Eckert & Stopper 1996, Yared *et al.* 2002, Kabil *et al.* 2008, Stopper *et al.* 2003). Det tycks dock finnas stora skillnader mellan serum från olika arter. I serum från nötkreatur är andelen albumin signifikant lägre än i människan och SHBG från nöt tycks inte binda till estradiol med samma affinitet som i människan (Reinor *et al.* 1980, Sedelaar & Isaacs 2009). Andra serum så som från häst har också använts (Hernández *et al.* 2013). I *in vitro* försöken överlag tycks alltså mängden proteinbundet estradiol vara mindre än i människan på grund av skillnader i serumets egenskaper. Men hur mycket estradiol binds till proteiner i *in vivo*-testen? De flesta *in vivo*-test i denna studie är gjorda på möss. Möss (gnagare) uttrycker inget SHBG i plasman (postnatalet) (Renoir *et al.* 1980). De har istället ABP (androgen-bindning protein), vilket kodas av samma gen som SHBG men tillverkas i olika organ. SHBG i människor har setts binda in steroidhormoner med större affinitet och längre dissociationstid än ABP i råttor

(sammanfattat i Danzo och Joseph 1994). Vidare ses att genen för albumin och SHBG/ ABP är mer lika mellan kor och människor än mellan möss och människor (UCSD Signaling Gateway 2014, Metalife AG 2014).

Låt säga att estradiol binds mer *in vitro* (med koserum) än *in vivo* (i möss). Instinktivt kan detta tolkas som att mängden biotillgängligt estradiol minskar *in vitro*. Men det finns teorier som talar emot detta. Partridge (1988) är en av dem som beskriver att albumin och SHBG släpper bindningen till hormon, så som estradiol, selektivt i olika organ. Detta stöds av observationer som att dissociationskonstanten för estradiol bundet till albumin är mer än dubbelt så stor i lymfnoden än i hjärnan. Denna selektivitet skulle leda till att vissa organ får höga doser av estradiol under tiden som andra får lägre. Detta i motsats till den ursprungliga hypotesen att alla organ utsätts för liknande mängder hormon (sammanfattat i Partridge 1988). Alltså skulle en ökad närvaro utav hormonbindande protein kunna öka mängden estradiol i målorganet. Det tycks som att varken nöt- eller musserum har proteiner som binder estradiol lika väl som i människan, men av dessa två binder troligen serum från nöt estradiol med högst affinitet. Detta skulle kunna förklara varför *in vitro*-försöken (med nötserum) såg en större effekt av estradiol än *in vivo*-försöken (i möss).

Dosen *in vivo* jämfört med *in vitro*

När det gäller toxikologi är dosen mycket viktig, alla ämnen är skadliga i alltför höga doser. Doserna i *in vitro*-försöken kan anges i molar men detta exakta mått är svårt att använda *in vivo*, istället används volymen estradiol per kroppsvikt (tabell 1). Jag valde att göra några antaganden gällande kroppsvikt och räknade med hjälp av estradiols molekylvikt och distributionsvolym ut ungefärliga koncentrationer som använts för *in vivo*-försöken. Doserna blev höga, exempelvis blev 100 mg estradiol kg^{-1} i möss 367 μM . Uträkningen tog emellertid inte hänsyn till absorption, exkretion och metabolism (omvandling till annat ämne). Enligt Bayer (2011) reduceras estradiols bioavailabilitet till 5% då det absorberats och passerat levern, efter att ha givits oralt. Mycket snabbt skulle också estradiol metaboliseras till sina konjugat (varav vissa också är toxiska). Estradiols halveringstid, och dess metabolers halveringstid är mindre än en dag (Lord 2002, Bayer 2011). Frågan är om en tillräcklig mängd estradiol kvarvarar i djurens kroppar tillräckligt länge för att motsvara de lägre doserna (10pM) och de kortare tiderna som *in vitro* cellerna har behandlats med.

Det tycks som att estradiol endast skapar MN upp till en viss koncentration. I Pykkänen (1991) *in vitro* var effekten endast signifikant vid 1 μM , inte 10 μM och inte 0,1 μM . Yared (2002) visade *in vitro* en tredubblad ökning av MN i test med 0,01 μM , sedan minskade effekten med ökad dos. Från detta dras slutsatsen att för höga doser av estradiol inte heller inducerar MN.

Dosering kan vara svår *in vivo*, speciellt då man vill testa en mycket liten dos. För en sådant studie skulle det behövas en stor mängd djur och dessutom varierar mängden naturligt estradiol i honor, beroende på var i menstruationscykeln de befinner sig (Lehr 2000). Den egna produktionen av estradiol tycks ha en mycket stor påverkan på den totala dosen. Ett annat problem med doseringen *in vivo* är att mängden estradiol i blodet inte alltid avspeglar mängden som kommit in i vävnaden. Van Landeghem *et al.* (1985) visade att premenopausala kvinnor hade en betydligt högre mängd estradiol i plasman än postmenopausala kvinnor, men höjningen av estradiol i kvinnornas bröst avspeglade inte denna skillnad. Detta kan tyda på att mängden estradiol i vävnaden beror mer på vävnadernas egna förmåga att bilda hormon, det vill säga omvandla exempelvis testosteron via aromatas till estradiol, än hur mycket de tillförs från blodet (Lehr 2000).

Hur estradiols gentoxicitet induceras

Från testen kan vi anta att estradiol är aneugent och alltså får hela kromosomer att avvika från kärnan. I lungceller från hamster var andelen MN innehållande kinetokor i kontrollen cirka 20% och kort efter behandling med estradiol ca 70% (Eckert & Stopper 1996).

I experimentet av Schnizler *et al.* (1994) var 50% av MN CREST positiva, 50% av mikrokärnorna innehöll alltså fragment med kinetokor. Detta borde betyda att 50% var aneugena och resterande 50% klastogena. Schnizler *et al.* (1994) diskuterar dock att andelen MN med kinetokorer i verkligheten kan vara högre, eftersom estradiol misstänks förändra kinetokorstrukturen vilket skulle göra att CREST inte känner igen den (Schnizler *et al.* 1994).

Det har föreslagits att en ökad celldelning (vilket är en av effekterna av estradiol) ger instabilitet i genomet och därav bildas MN (Stopper *et al.* 2003, Fisher *et al.* 2001). Då MN inducerades var i dessa försök också celldelningen högre.

Effekten av tidsintervallet

En mycket intressant studie är gjord av Pylkkanen *et al.* (1991), de utförde både *in vivo*- och *in vitro*-test av estradiol, vilka gav helt olika resultat. Spermieceller från unga möss användes i båda fallen. Studier av MN gjordes 17 dagar efter behandling *in vivo*. *In vitro* utsattes cellerna för behandling i 3 dagar innan MN räknades. *In vivo* experimentet var negativt och *in vitro* experimentet var positivt.

Eftersom *in vivo* mätning av MN hos mössen endast gjordes 17 dagar efter exponering är det möjligt att effekten av hormonet då hade avklingat. Det har nämligen visats att estradiol *in vitro* ger en stor MN produktion ett par timmar efter exponering men att effekten och antalet MN sedan minskar och möjligtvis försvinner (Schnizler *et al.* 1994) samt *in vivo* att den genotoxiska effekten försvinner efter några dagar (Sponchiado *et al.* 2011). Stopper *et al.* (2003) rapporterar också att celler som varit i kontakt med hormonet en längre tid, 74h, har ett mindre antal MN än efter 30h. Antalet MN som innehöll kinetokor var efter 74h samma som i obehandlade celler. Att antalet MN minskar med tiden efter behandling borde bero på kroppens förmåga att byta ut skadade celler (Campana 1991). Den exakta tiden det tar från exponering till att effekten avklingar borde variera mellan *in vitro* och *in vivo*, då det i ett levande djur tar längre tid för hormonet att nå cellerna efter exponering.

Även då Sponchiado *et al.* (2011) inte fann någon signifikant ökning av MN syntes en möjlig effekt av estradiol. Efter 24 timmar syntes en tredubbling av antalet MN jämfört med kontrollen. Förtioåtta timmar efter start var MN antalet ungefär tillbaka till det normala. Tio dagar efter start var det färre MN i fiskens blod än det var i kontrollen. Detta tyder också på att MN kan ha inducerats och att cellerna sedan börjat byta ut de som var skadade. Kayani och Parry (2008) såg att med ökad mängd estradiol ökade också mängden apoptos och nekros (celldöd) i cellkulturen.

Endast tidsintervallet kan dock inte förklara varför *in vitro* ger positiva resultat och *in vivo* överhängande negativa (tabell 1). Ashby (1997) genomförde ett kort (24h) *in vivo* försök och fick negativt resultat. Pylkkanen (1991) gjorde ett långt (3 dagar) *in vitro* försök och fick ett positivt resultat. Anledningen att många av *in vitro*-försök utfördes under ungefär ett dygn är att detta är längden på en cellcykel, ungefär ett dygn räcker alltså för att kunna se ett resultat *in vitro* då alla cellerna direkt kommer i kontakt med testsubstansen. *In vivo* bör man dock räkna med att det tar en viss tid för estradiol att nå målorganet.

Val av djur och celltyp

Det finns en viss skillnad mellan hur olika celltyper reagerar med MN bildning. Då Morita *et al.* (1997) jämförde benmärg och blod fann de att vissa kemikalier får en större reaktion i en viss celltyp, men skillnaderna var små. Användandet av en celltyp utan estrogenreceptorer (UCI) inducerade inga MN i försök av Stopper (2003). Detta visar också på vikten av valet av celler. Därför kan det vara ett problem att de flesta, i denna rapport sammanställda, *in vivo*-försöken är utförda i benmärgsprov från hanmöss. Det finns inget *in vitro*-resultat från benmärg från hanmöss att jämföra med. Möjligt är att musens benmärg är en dålig modell för att förutspå effekt i människan och våra bröstceller.

Det finns en viss variation mellan individer i hur de reagerar på gentoxin och bildar MN (Gustavino *et al.* 2001). Variation mellan individer kan bland annat ses i förmågan att reparera skadat DNA (Goode *et al.* 2002, Gustavino *et al.* 2001). Då *in vivo*-studier utförs är det alltid en avvägning hur stort antal djur som ska användas. Flera av de studerade *in vivo*-experimenten är gjorda på ett litet antal individer (Ashby *et al.* (1997) 6st/ grupp; Dhillon & Dhillon (1995) 5 stycken/ grupp; Pylkkänen *et al.* (1991) 5-10 stycken/grupp). Eftersom standardiserade musstammar är de som mest frekvent har använts uppvisar inte försöksindividerna en så stor variation. Då cellkulturer används är också de oftast homogena. Detta kan vara ett problem då olika individer/fenotyper löper olika hög risk att drabbas av följder från en viss behandling.

Det har visat sig att mängden MN som induceras av ett gentoxin beror på försöksindividens ålder och kön. Ett exempel är att då en låg dos DES (dietylstilbestrol), en syntetisk estrogen, gavs till 3 veckor gamla möss hade effekten av MN hos honorna försvunnit efter 72 timmar, men hos hanarna höll den i sig i två veckors tid. Mängden MN, förmågan att eliminera MN, var signifikant olika mellan olika åldersgrupper och kön (Fucic *et al.* 2009).

I en sammanställning gjord av Gustavino *et al.* (2001) på mängden MN i olika fiskarter syns en stor variation i antalet MN mellan fiskarterna. Olika stammar av samma art har också setts reagera olika på samma stimuli från estrogen (Steinmetz *et al.* 1997). *In vitro*-försöken är utförda med en stor mängd olika celltyper och alla gav liknande resultat. Nästan alla *in vivo* försök är gjorda i möss och dessa var negativa, förutom Dhillon & Dhillon vars resultat är kritiserade och inte har kunnat upprepas (Ashby *et al.* 1997, Shelby *et al.* 1997), det enda *in vivo*-test som gjordes i fisk gav vaga resultat (Sponchiado *et al.* 2011).

Andra tester

In vitro-testen har visat på främst en aneugen effekt av estradiol. Därför skulle det vara intressant att se ifall denna effekt går att se *in vivo* med hjälp av andra test, exempelvis chromosome aberrations test som liknar MNT i sitt spektrum av vilka skador som kan upptäckas. Det tycks i vissa, få, fall som att estradiol kan ge kromosomskador *in vivo*. Banerjee *et al.* (1994) behandlade hamstrar med estradiol (ca 125µg dag⁻¹ djur⁻¹) under fem månaders tid, sedan analyserade de genomet i celler från hamstrarnas njurar. De såg att estradiolbehandling ökade antalet avbrutna kromosomer, det vill säga visade klastogenitet. Detta experiment var mycket långt, ingen av de studier som diskuterats i denna artikel var så långa, vilket kan vara en orsak till att resultatet syntes *in vivo*. Hajek *et al.* (1993) fick indirekta indikationer på att estradiol kan inducer aneuploidi *in vivo* i möss.

Diskussion

Genom att sammanställa forskningsrapporter som tillämpat mikrokärnstestet på estradiol kan ett antal slutsatser dras (tabell 1). Alla studier utförda *in vitro* gav positiva resultat, detta betyder att estradiol framkallar mikrokärnor *in vitro*. Det tycks även som att anledningen till mikrokärnornas bildande är att estradiol avlägsnar hela kromosomer från cellens kärna (Eckert & Stopper 1996, Kayani & Parry 2008). I nästan alla (4 av 5) *in vivo*-test syntes ingen signifikant ökning av antalet mikrokärnor då försöksdjuren behandlats med estradiol. Det tycks som att passagen genom kroppen minskar den skadliga effekten av estradiol.

Då estradiol passerar genom kroppen binds det till proteiner, omvandlas och utsöndras i hög hastighet och med hög effektivitet (Bayer 2011). Även då doserna som användes i *in vivo*-försöken var avsevärt högre än de som användes *in vitro* gav de ingen effekt. Det är mycket svårt att bedöma hur stor mängd estradiol som har nått cellerna i djurförsöken, men det är möjligt att mängden estradiol i djurförsöken var antingen för låg eller för hög för att ge effekt.

I blod, som transporterar hormoner i levande djur, binds nästan allt estradiol till proteiner (Hammond 1995, Langley *et al.* 1985). Det finns olika teorier om hur dessa proteiner påverkar hormonets biotillgänglighet, det skulle kunna minska biotillgängligheten, men nyare teorier föreslår att det istället ökar biotillgängligheten i viss vävnad (Partridge 1988). Det tycks som att blodet från mössen använda *in vivo* binder estradiol i mindre utsträckning än koserumet tillsatt *in vitro*. Ifall *in vitro*-försöken är utförda på sådan vävnad som är målorgan för en ökad dissociation av estradiol-protein komplex borde en stor mängd av estradiolen alltså inte bindas till proteinerna i blodet utan tillåtas reagera med cellen. I *in vivo*-försöken binds estradiol inte lika hårt till serumproteiner, vilket minskar effekten av ”estradiol-leverans” till vissa målorgan. Detta är en möjlig förklaring till skillnaderna mellan försöken.

Metabolismen av estradiol har visat sig ha en betydande effekt för dess toxicitet och främst kanske metabolismen till den mycket toxiska 4-hydroxyestradiol (Lehr 2000). Huruvida estradiol omvandlas till 4-hydroxyestradiol beror på vilken vävnad som studerats *in vivo* och vilka celltyper som använts *in vitro* (Lehr 2000). Då valet av djur och celltyp studerats syntes inga självklara tendenser till att *in vitro* skulle utöva mer metabolism av 4-hydroxyestradiol än *in vivo*, och på så sett skapa mer gentoxicitet. Oftast är det snarare tvärtom, att metabolismen är högre *in vivo* än *in vitro*. Har de celltyper som studerats inte kunnat bilda 4-hydroxyestradiol i större mängder, utan istället omvandlat estradiol till andra metaboliter, är det möjligt att estradiols toxicitet istället minskats (Kayani och Parry 2008).

Att *in vivo*-försök överlag är längre än *in vitro* kan ha spelat in. Det har setts att både celler i kultur och *in vivo* snabbt reparerar skadorna efter estradiol (Schnizler *et al.* 1994, Sponchiado *et al.* 2011). Avläses resultatet för sent kan alltså effekten missas och detta kan möjligen ha varit fallet i vissa *in vivo*-test, så som de test utförda av Pylkkänen *et al.* (1991) och Sponchiado *et al.* (2011).

Valet av djur och celltyper kan diskuteras. Det är mycket möjligt att möss, som i störst del används *in vivo*, inte reagerar på estradiol på samma sätt som humana celler. Dock tycks inte heller detta vara den ensamma förklaringen till skillnaderna mellan testen, då möss även använts en gång *in vitro*. MNT *in vitro* kan anpassas exakt efter den målgrupp som är av intresse. Detta är omöjligt att göra *in vivo* med samma exakthet då inte människor kan användas. Som El-Zein (2011) beskriver ger *in vitro* MNT en möjlighet att undersöka cancerrisker för speciellt utvalda människogrupper, så som ett visst kön, ålder och bakgrund. *In vivo* experiment misslyckas med detta då de måste förlita sig på djur.

Det är svårt att ringa in en exakt förklaring till skillnaderna mellan resultaten från *in vivo*- och *in vitro*-studierna. Estradiol inducerar DNA- skador, men kroppen tycks skydda sig från dess toxiska effekt *in vivo*. Detta tros ha att göra med mängden estradiol som når målorganet, vilket sänks *in vivo*. Processerna bakom detta är komplicerade och svåra att återskapa *in vitro*. *In vitro* MNT har visat sig vara ett mycket känslig test, men kombineras det inte med andra tester saknar dess förutsägelser realitet.

Tack

Jag vill tacka min handledare Lage Cerenius och mina medstudenter Emma Thorén, Jun Mei Hu Frisk, Jennifer Jagdmann och Lennea Widén för många goda råd och givande diskussioner. Tack också till Monika Schmitz, Lilianne Abramsson och Björn Brunström för anvisningar inom ämnet.

Referenser

- Ashby J, Fletcher K, Williams C, Odum J, Tinwell H. 1997. Lack of activity of estradiol in rodent bone marrow micronucleus assay. *Mutation Research* **395**: 83-88.
- Banerjee SK, Banerjee S, Li SA, Li JJ. 1994. Induction of chromosome aberrations in Syrian hamster renal cortical cells by various estrogens. *Mutation Research* **311**: 191-197.
- Bayer. 2011. Angeliq 1ml / 2mg film-coated tablets. WWW- dokument: <http://www.medicines.ie/printfriendlydocument.aspx?documentid=9587&companyid=1804>. Hämtad 2014-02-12.
- Benigni R, Bossa C, Tcheremenskaia O, Worth A. 2009. Development of structural alerts for the in vivo micronucleus assay in rodents. JRC Scientific and technical reports: EUR 23844 EN. Europeiska Kommissionen, Luxemburg.
- Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, Dulout FN. 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research* **438**: 155-161.
- Cavaliere E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D. 2000. Chapter 4: estrogen as endogenous genotoxic agents – DNA adducts and mutations. *Oxford Journals* **27**: 75-94.
- Corvi R, Albertini S, Hartung T, Hoffmann S, Maurici D, Pfuhler S, van Benthem J, Vanparys P. 2008. ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT). *Mutagenesis* **23**: 271-283.
- Danzo BJ, Joseph DR. 1994. Structure-function relationships of rat androgen—binding protein/human sex-hormone binding globulin: the effect of mutagenesis on steroid-binding parameters. *Endocrinology* **135**: 157-167.
- Dhillon VS, Dhillon IK. 1995. Genotoxicity evaluation of estradiol. *Mutation Research* **345**: 87-95.
- Deng H, Gao H, Liu Y. 2011. Biotransformation enzyme-dependent formation of micronucleus and multinuclei in cell line V79-hCYP2E1-hSULT1A1 by 2-nitropropane and N-nitrosodimethylamine. *Mutation Research*. **726**: 84-87.
- Evans HJ, Nearly GJ, Williamson FS. 1959. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology* **3**: 216-299.
- Eckert I, Stopper H. 1996. Genotoxic effects induced by β -oestradiol in vitro. *Toxicology In Vitro* **10**: 637-642.
- ECVAM. 2006. Metabolism: A bottleneck in in vitro toxicological test development. *Alternatives to Laboratory Animals* **34**: 49-84.
- El-Zein R, Vral A, Etzel C. 2011. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. *Mutagenesis* **26**: 101-106.
- EMA (European medicines agency). 2012. ICH guidelines S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for humans use. WWW- dokument: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm074931.pdf>. Hämtad 2014-02-13.
- Emerit I. 1994. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*. **16**: 99-109.
- Fenech M, Morley AA. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* **147**: 29-36.
- Fenech M. 2000. A mathematical model of the *in vitro* micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis* **15**: 329-336.
- Fernandez SV, Russo IH, Russo J. 2006. Estradiol and its metabolites 4-hydroxyestradiol and 2-hydroxyestradiol induce mutations in human breast epithelial cells. *International Journal of Cancer* **118**: 1862-1868.

- Fritzler MJ, Kinsella TD, Garbutt E. 1980. The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *The American Journal of Medicine* **69**: 520-526.
- Fisher WH, Keiwan A, Schmitt E, Stopper H. 2001. Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis* **16**: 209-212.
- Fucic A, Stojkovic R, Markovic D, Ferencic Z, Korsic M, Jazbec AM, Gamulin M. 2009. Animal model for age- and sex-related genotoxicity of diethylstilbestrol. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **42**: 1090-1096.
- Goode EL, Dunning AM, Kuschel B, Healey CS, Day NE, Ponder BA, Easton DF, Pharoah PP. 2002. Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Research*. **62**: 3052-3057.
- Gustavino B, Scornajenghi KA, Minissi S, Coccotti E. 2001. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchine. *Mutation Research* **454**: 151-159.
- Grawé J. 2005. Flow cytometric analysis of micronuclei in erythrocytes. *Methods of Molecular Biology* **291**: 69-83.
- Hajek RA, Van NT, Johnston DA, Jones LA. 1993. In vivo induction increased DNA ploidy of mouse cervicovaginal epithelium by neonatal estrogen treatment. *Biology of Reproduction* **49**: 908-917.
- Hartung T, Daston G. 2009. Are in vitro tests suitable for regulatory use? *Toxicological Sciences* **111**: 233-237.
- Hammon GL. 1995. Potential functions of plasma steroid-binding proteins. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **6**: 298-304.
- Hernández LG, Benthem J, Johnson E. 2013. A mode-of-action approach for the identification of genotoxic carcinogens. *PLOS one*, doi 10.1371/journal.phone.0064532.
- Highman B, Roth SI, Greenman DL. 1981. Osseous changes and osteosarcomas in mice continuously fed diets containing diethylstilbestrol or 17 beta-estradiol. *Journal of the National Cancer Institute*. **67**: 653-62.
- Joosten HFP, van Acker FAA, van den Dobbelsteen DJ, Horbach GJM, Krajnc EI. 2004. Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicology letters* **151**: 113-134.
- Kabil A, Silva E, Kortenkamp A. 2008. Estrogens and genomic instability in human breast cancer cells – involvement of Src/Raf/Erk signaling in micronucleus formation by estrogenic chemicals. *Carcinogenesis* **29**: 1862-1868.
- Kayani MA, Parry JM. 2008. The detection and assessment of the aneugenic potential of selected oestrogens, progestins and androgens using the in vitro cytokinesis blocked micronucleus assay. *Mutation Research* **651**: 40-45.
- Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Müller L. 2005. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research* **584**: 1- 256.
- Langley MS, Hammond GL, Bardsley A, Sellwood RA, Andersson CD. 1985. Serum steroid binding proteins and the bioavailability of estradiol in relation to breast diseases. *Journal of the National Cancer Institute*. **75**: 823-829.
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Breton R, Bélanger A. 1997. The key role of 17 beta- hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* **62**: 148-58.
- Liher JG. 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine Reviews*. **21**: 40-54.
- Lord RS, Bongiovanni B, Bralley JA. 2002. Estrogen metabolism and the diet-cancer connection: rationale for assessing the ratio of urinary hydroxylated estrogen metabolites. *Alternative Medicine Review* **7**: 112- 129.
- Läkemedelsverket. 2006. Så här läser du nyheter om läkemedel. WWW- dokument:

- <http://www.lakemedelsverket.se/malgrupp/Allmanhet/Lakemedel/Sa-godkanns-ett-lakemedel/Sa-har-laser-du-nyheter-om-lakemedel/>. Hämtad 2014-02-10.
- Läkemedelsverket. 2014. Estradiol. WWW- dokument: <http://www.lakemedelsverket.se/LMF/Substansinformation/?substanceid=E4POBSU8ZVYVERT1&type=substance>. Hämtad 2014-02-06.
- Metalife AG. 2014. Genotype: SHBG. WWW- dokumet: <http://www.phenomicdb.de/final.asp?name=SHBG-sex-hormone-binding-globulin&geneId=6462&genotype=10350449&phenotype=1>. Hämtad 2014-03-19.
- Monamy V. 1996. Animal experimentation: a student guide to balancing the issues. Australian & New Zealand Council for the Care of Animals in Research & Teaching, Australien.
- Morita T, Asano N, Awogi T, Sasaki YF, Sato S, Shimada H, Sutou S, Suzuki T, Wakata A, Sofuni T, Hayashi M. 1997. Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A and 2B): The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS. *Mutation Research* **389**: 3-122.
- Matter B, Schmid W. 1971. Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutation Research* **12**: 417-425.
- Nagae Y, Miyamoto H, Sozuki Y, Shimizu H. 1991. Effects of estrogen on induction of micronuclei by mutagens in male mice. *Mutation Research* **263**: 21-26.
- NCBI. 2014. Compound summary for: CID 5757 Estradiol. WWW- dokument: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5757>. Hämtad 2014-02-12.
- Nelles JL, Hu WY, Prins GS. 2011. Estrogen action and prostate cancer. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*. **6**: 437-451.
- Nüsse M, Kramer J. 1983. Flow cytometric analyses of micronuclei found in cells after irradiation. *Cytometry* **5**: 20-25.
- OECD. 2010. Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. I: OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 4 health effects. OECD Publishing. DOI : 10.1787/20745788.
- OECD. 1997. Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. I OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects. OECD Publishing. DOI : 10.1787/20745788.
- OECD. 1997. Test No. 473: In vitro mammalian chromosome aberration test. I: OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects. DOI: 10.1787/20745788.
- Pardrige WM. 1988. Selective delivery of sex steroid hormones to tissues *in vivo* by albumin and sex hormone- binding globulin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **538**: 173-192.
- Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, Macleod M, Mignini LE, Jayaram P, Khan KS. 2007. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *British Medical Journal* **334**: 197-203.
- Pylkkänen L, Jahnukainen K, Parvinen M, Snatti R. 1991. Testicular toxicity and mutagenicity of steroidal and non-steroidal estrogens in male mouse. *Mutation Research* **261**: 181-191.
- Reinor JM, Mercier-Bodard C, Baulieu EE. 1980. Hormonal and immunological aspects of the phylogeny of sex steroid binding plasma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **77**: 4578-4582.
- Rosen EM, Fan S, Isaacs C. 2005. BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocrine-related Cancer* **12**: 533-548.
- Rybo G. 2014. I Nationalencyklopedin. Östrogener. WWW-dokument: <http://www.ne.se/lang/ostrogener>. Hämtad 2014-02-06.

- Russo J, Russo IH. 2012. Estradiol. I: Schwab (ed.). Encyklopedia of Cancer. 3rd ed. pp 145-149. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg.
- Schnitzler R, Foth J, Degen GH, Metzler M. 1994. Induction of micronuclei by stilbene-type and steroidal estrogens in Syrian hamster embryo and ovine seminal vesicle cells in vitro. *Mutation Research* **311**: 84-93.
- Sedalaar JPM, Isaacs JT. 2009. Tissue culture media supplemented with 10% fetal calf serum contains a castrate level of testosterone. *The Prostate*. **69**: 1724-1729.
- Sen S. 2000. Aneuploidy and cancer. *Current Opinion in Oncology*. **12**: 62-88.
- Shelby MD, Tice RR, Witt KL. 1997. 17- β -estradiol fails to induce micronuclei in the bone marrow cells of rodents. *Mutation Research* **395**: 89-90.
- Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM, Bean-Jonathan N. 1997. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinology* **138**: 1780-1786.
- Stopper H, Schmitt E, Gregor C, Mueller SO, Fisher HW. 2003. Increased cell proliferation associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies on estradiol-treated human ovarian cancer cells. *Mutagenesis* **18**: 243-247.
- Sponchiado G, de Lucena Reynaldo EMF, de Andrade ACB, de Vasconcelos EC, Adam ML, de Oliveira CMR. 2011. Genotoxic Effects in Erythrocytes of *Oreochromis niloticus* Exposed to Nanograms-per-Liter Concentration of 17 β -Estradiol (E2): An Assessment Using Micronucleus Test and Comet Assay. *Water, Air, and Soil Pollution* **218**: 353-360.
- Stabile LP, Davis AL, Gubish CT, Hopkins TM, Luketich JD, Christie N, Finkelstein S, Siegfried JM. 2002. Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen. *Cancer Research*. **62**: 2141-2150.
- Södergard R, Bäckström T, Shanbhag V, Carstensen H. 1982. Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol 17 β to human plasma proteins at body temperature. *Journal of Steroid Biochemistry*. **16**: 801-810.
- Taijiro M, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate M, Miura KF, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura H, Mure K, Koshi K, Sofuni T. 1999. Validation study of the in vitro micronucleus test in a chinese hamster lung. *Mutagenesis* **14**: 569-580.
- Tsutsui T, Tamura Y, Yagi E, Barrett JC. 2000. Involvement of genotoxic effects in the initiation of estrogen-induced cellular transformation: studies using syrian hamster embryo cells treated with 17beta-estradiol and eight of its metabolites. *International Journal of Cancer* **86**: 8-14.
- UCSD Signaling Gateway. 2014. Serum albumin. WWW- dokumet: <http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A004280&type=orthologs&adv=latest>. Hämtad: 2014-03-19.
- Van Landeghem AAJ, Poortman J, Nabuurs M, Thijssen JH. 1985. Endogenous concentrations of subcellular distribution of estrogens in normal and malign human breast tissue. *Cancer Research* **45**: 2900-2906.
- Vig BK, Swearngin SE. 1986. Sequence of centromere separation: kinetochore formation in induced laggards and micronuclei. *Mutagenesis* **1**: 461-465.
- Walmsley RM, Billinton N. 2011. How accurate is in vitro prediction of carcinogenicity? *British Journal of Pharmacology* **162**: 1250-1258.
- Yamamoto KI, Yasumoto K. 1980. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Research* **71**: 127-131.
- Yared E, McMillan TJ, Martin FL. 2002. Genotoxic effects of oestrogens in breast cells detected by the micronucleus assay and the comet assay. *Mutagenesis* **17**: 345-352.