

AZ ENDOKRIN RENDSZERT KÁROSÍTÓ ANYAGOK ("Endocrine disrupters")

DEFINÍCIÓ (EPA)

Endokrin vagy hormonális rendszert károsító környezeti anyag:

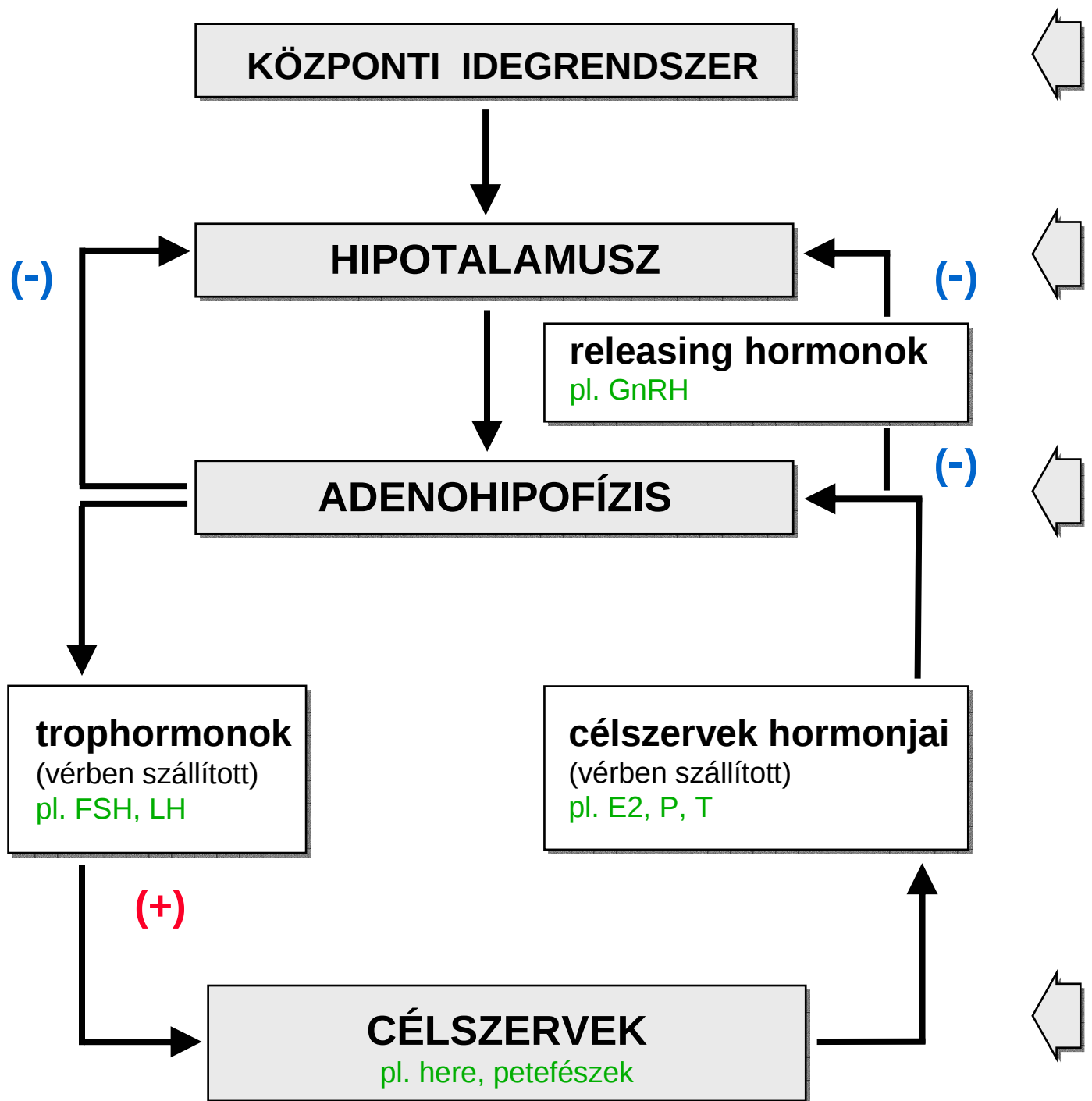
Olyan exogén tényező, amely beavatkozik:

- a homeosztázis fenntartásáért,
- a reprodukcióért,
- az utódok fejlődéséért és/vagy viselkedéséért

felelős természetes hormonok

- ☐ szintézisébe,
- ☐ szekréciójába,
- ☐ transzportjába,
- ☐ kötődésébe,
- ☐ hatásába, vagy
- ☐ eliminációjába.

AZ ENDOKRIN RENDSZERT KÁROSÍTÓ ANYAGOK LEHETSÉGES TÁMADÁSPONTJAI



(-) gátlás

(+) serkentés

a toxikus ágens
lehetséges
támadáspontja

AZ ENDOKRIN RENDSZER FUNKCIÓZAVARÁNAK MEGNYILVÁNULÁSAI

1.) **HIPERFUNKCIÓ** (fokozott hormontermelés v. válasz)

OKOK:

- Termelés ↑
- Felszabadulás ↑
- Metabolizmus ↓
- Kiválasztás ↓

2.) **HIPOFUNKCIÓ** (elégtelen hormontermelés v. válasz)

OKOK:

- Hormontermelő sejtek károsodása
- Szintézis enzimjeinek gátlása
- Metabolizáló enzimek indukciója

PÉLDÁK AZ ENDOKRIN RENDSZERT KÁROSÍTÓ ANYAGOK HATÁSÁNAK CÉLPONTJAIRA I.

1.) HORMONSZINTÉZIS

■ Szintetizáló enzimaktivitás módosulása

Fenarimol (fungicid)

tesztoszteron $\xrightarrow{\text{aromatáz}}$ ösztrogén

■ Prekurzorok hiánya

Kadmium

koleszterin szintézis $\downarrow \rightarrow \rightarrow$ tesztoszteron $\downarrow$

■ Interferencia enzim kofaktorokkal

Cu-kelátképzők (ditiokarbamátok, szén-diszulfid)

dopamin $\rightarrow$ noradrenalin $\rightarrow$ adrenalin

2.) TÁROLÁS, FELSZABADULÁS

■ amfetamin $\rightarrow$ noradrenalin felszabadulás $\uparrow$

■ LH receptor agonisták $\rightarrow$ Leydig sejtek tesztoszteron termelése $\uparrow$

■ hormonszekretáló sejtek károsodása $\rightarrow$ hiposzekréció

PÉLDÁK AZ ENDOKRIN RENDSZERT KÁROSÍTÓ ANYAGOK HATÁSÁNAK CÉLPONTJAI RA II.

3.) SZÁLLÍTÓFEHÉRJÉK

A hormonok fiziológiás hozzáférhetősége függ:

- totál
- szabad koncentrációjuktól

Fehérjékhez kötődve: nincs receptorkötődés

Szállítófehérjék hiány → nem jut el a célszervekhez
nagy mennyiség → szabad hozzáférés ↓

- Néhány xenoösztrógen → szexhormon kötő globulin (TEBG) mennyiség ↑
- Androgének, glukokortikoidok → TEBG ↓
- Szalicilátok, difenil-hidantoin → tiroxinkötő globulin változása → szabad tiroxin változása

PÉLDÁK AZ ENDOKRIN RENDSZERT KÁROSÍTÓ ANYAGOK HATÁSÁNAK CÉLPONTJAI RA III.

4.) RECEPTOR-LIGAND KÖLCSÖNHATÁSOK

Az endokrin rendszert károsító anyagok gyakran endogén hormonok szerkezeti analógjai.

AGONISTÁK

■ Xenoösztrogének

- metoxiklór
- o,p'-DDT hidroximetabolitok
- alkilfenolok
- néhány PCB metabolit
- dietil-stilbösztrol

ANTAGONISTÁK

- tamoxifen -antiösztrogén)
- vinclozolin (fungicid) metabolit -antiandrogén
- p,p'-DDE (DDT fő metabolit) -antiandrogén

HORMONKÖTŐ RECEPTOR TULAJDONSÁGAINAK MEGVÁLTOZÁSA

- TCDD
- PCB ösztrogénreceptor ösztrogén iránti érz. ↓

PÉLDÁK AZ ENDOKRIN RENDSZERT KÁROSÍTÓ ANYAGOK HATÁSÁNAK CÉLPONTJAI RA IV.

5.) METABOLIZMUS ÉS ELIMINÁCIÓ

pl. máj citokróm P450 aktivitás megváltozása → hormonok metabolizmusának/eliminációjának megváltozása

- DDT → az androgéneket metabolizáló P450 dependens monooxygenázok indukciója → antiandrogén hatás
- Lindán → ösztrogén metabolizmus/elimináció ↑ → antiösztrogén hatás

Tartós hormonális egyensúlyzavar →→ hormonérzékeny szervek rákos megbetegedései (gonádok, mellékvese, pajzsmirigy, prosztata, emlő)

Lipidoldékony vegyületek → tartós hatás!

Több citokróm P450 induktor (PCB-k, DDT) →→ méh, pajzsmirigy rák

REPRODUKTÍV TOXIKOLÓGIA: ALAPFOGALMAK

A REPRODUKTÍV TOXIKOLÓGIA TÁRGYA:

Toxikus anyagok hatását vizsgálja a *felnőtt reprodukcióra és az utódok fejlődésére*.

A megtermékenyítés előtti expozíció hatásait vizsgálja (melyek sok esetben a fertilizáció alatt, az intrauterin fejlődés során vagy posztnatálisan manifesztálódnak).

Gesztáció alatti és posztnatális károsodások → **TERATOLÓGIA**

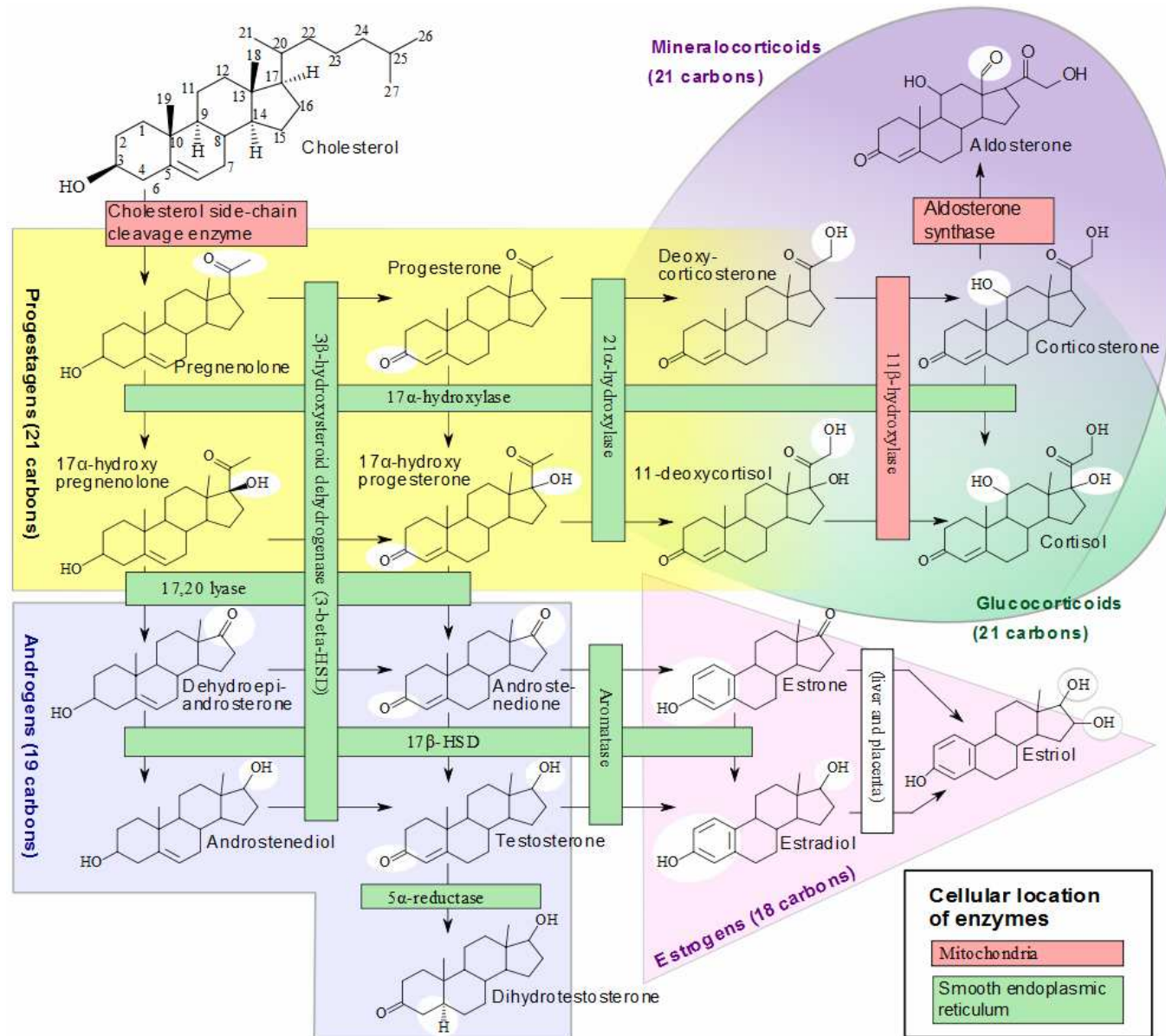
REPRODUKCIÓRA BIZONYÍTOTTAN TOXIKUS ANYAG:

- 1.) Elegendő *humán* bizonyíték a *sikeres reprodukciót* károsító hatásról és / vagy
- 2.) Elegendő, biológiailag releváns, emberre extrapolálható, *állatkísérletes* bizonyíték a *sikeres reprodukciót* károsító, *szelektív* hatásról, ami *nem* egy jelentősebb *szisztémás* toxicitás másodlagos következménye.

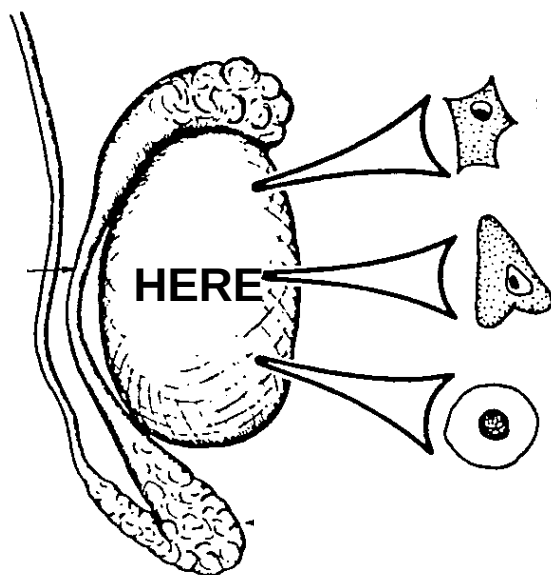
A SIKERES HUMÁN REPRODUKCIÓ ELEMEI:

- 1.) A pár *optimális életkorában* létrejövő *terhesség*;
- 2.) a terhesség *kellő ideig* történő fennmaradása;
- 3.) morfológiailag és funkcionálisan *egészséges utódok* születése

SZTEROIDSZINTÉZIS



HÍM NEMI HORMONOK SZINTÉZISE - I



MELLÉKHERE

erős vaszkularizáció és androgéndependencia, spermiumok érése, tárolása, motilitásának kifejlődése

LEYDIG-SEJTEK

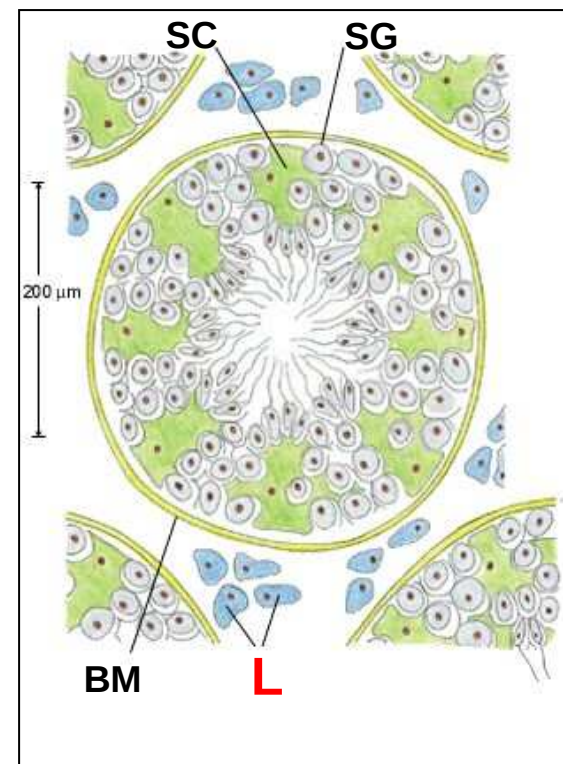
ICSH (LH) kontroll alatt, intersticiumban, **tesztoszteron szintézis**

SERTOLI-SEJTEK

FSH kontroll alatt, szemíniferus tubulusokban, ivarsejtek táplálása, vér-testis barrier, spermatogenezis szab.

SPERMATOGÓNIUMOK

(az ivarsejtek őssejtjei) és az ivarsejtek különböző fejlődési formái (primer spermatociták, szekunder spermatociták, spermatidák, spermatozoonok)



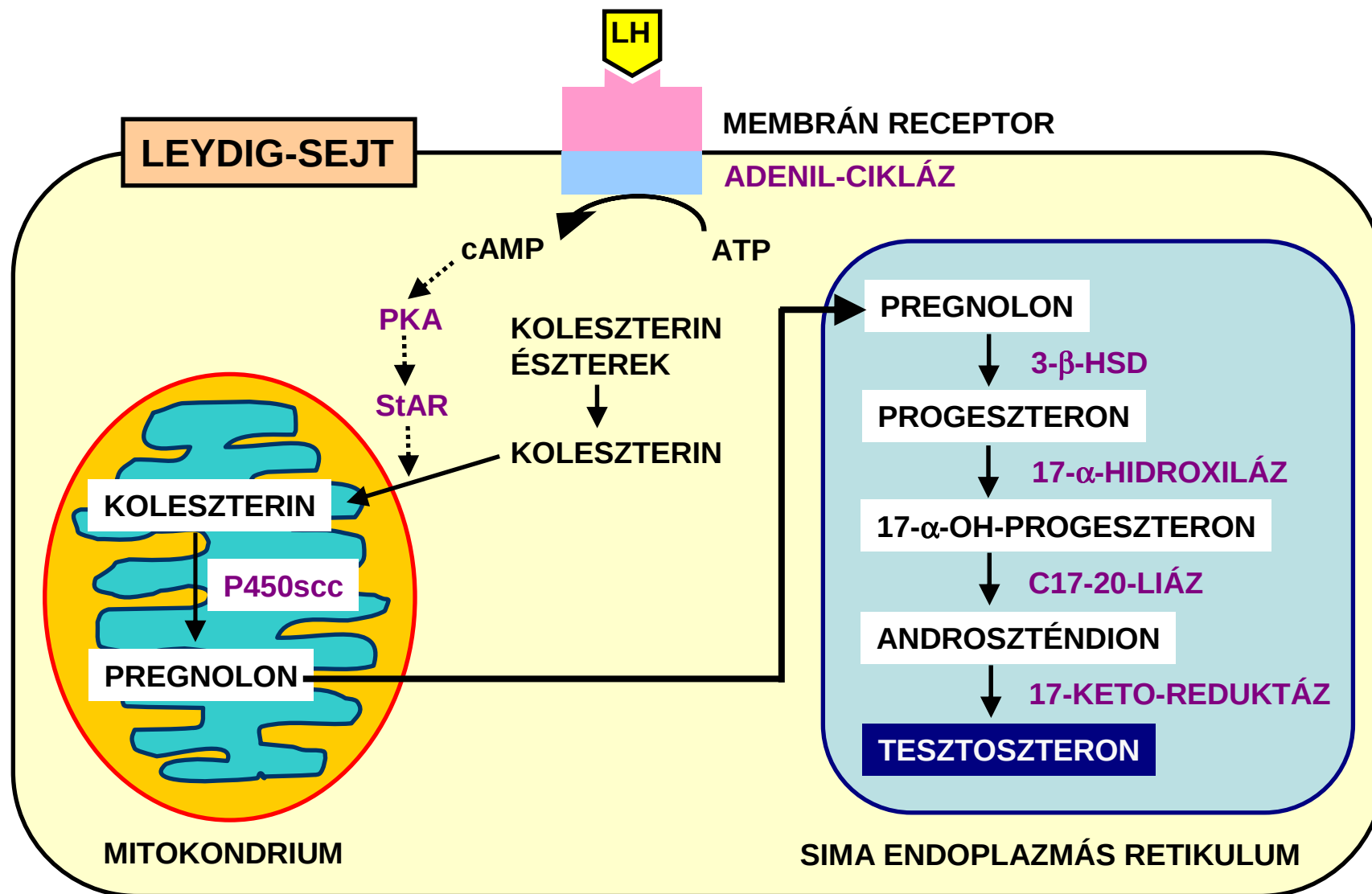
BM: bazális membrán

L: **intersticiális (Leydig) sejtek**

SC: Sertoli sejtek

SG: spermatogóniumok

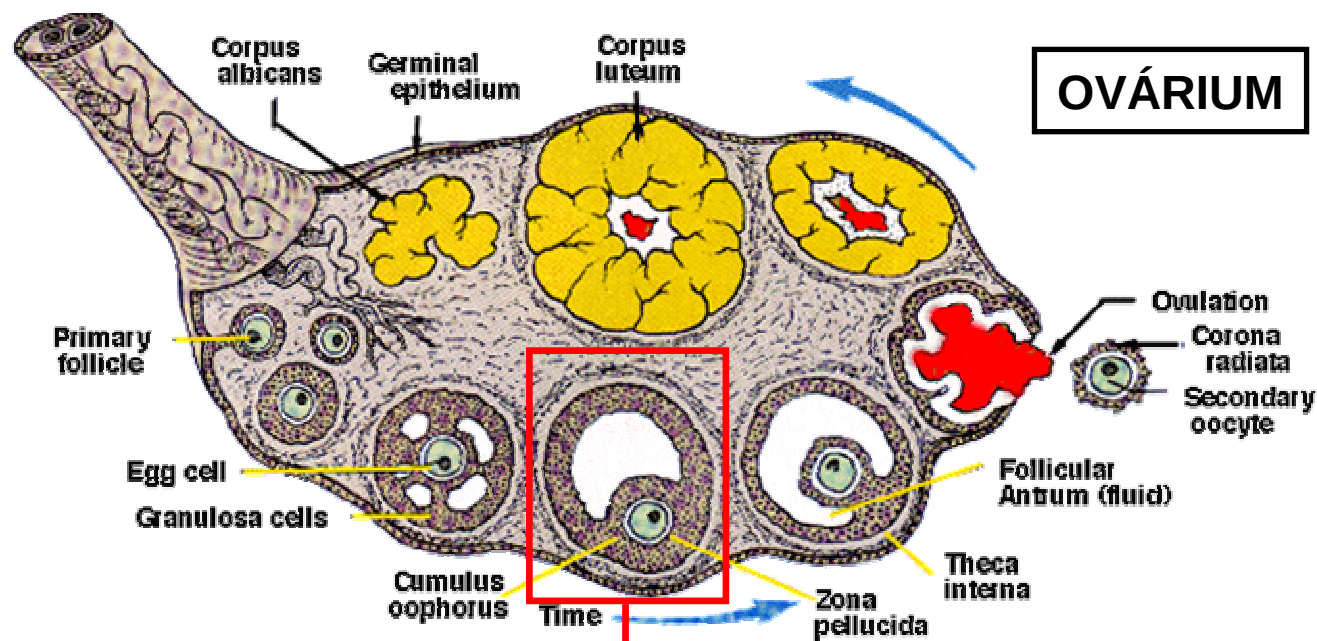
HÍM NEMI HORMONOK SZINTÉZISE - II



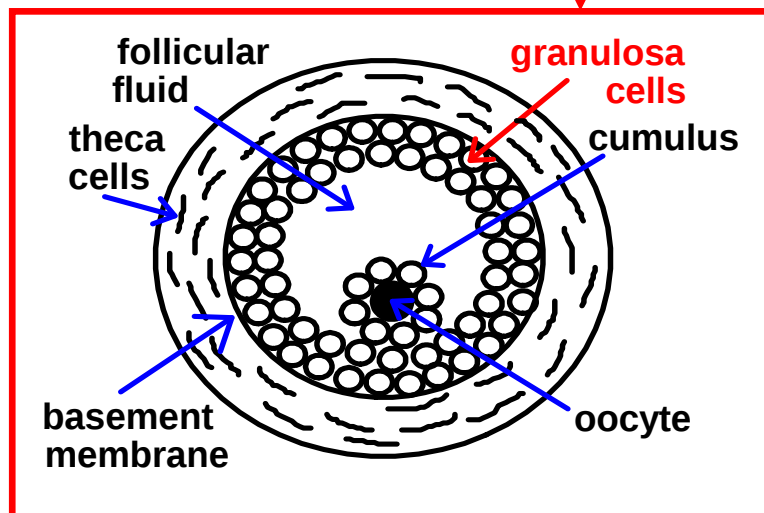
StAR = steroidogenic acute regulatory protein
 3-β -HSD = 3-β-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz

P450_{scc} = koleszterin oldallánchasító enzim
 PKA = protein kináz A (cAMP-dependens protein kináz)

NŐI NEMI HORMONOK SZINTÉZISE - I



OVÁRIUM



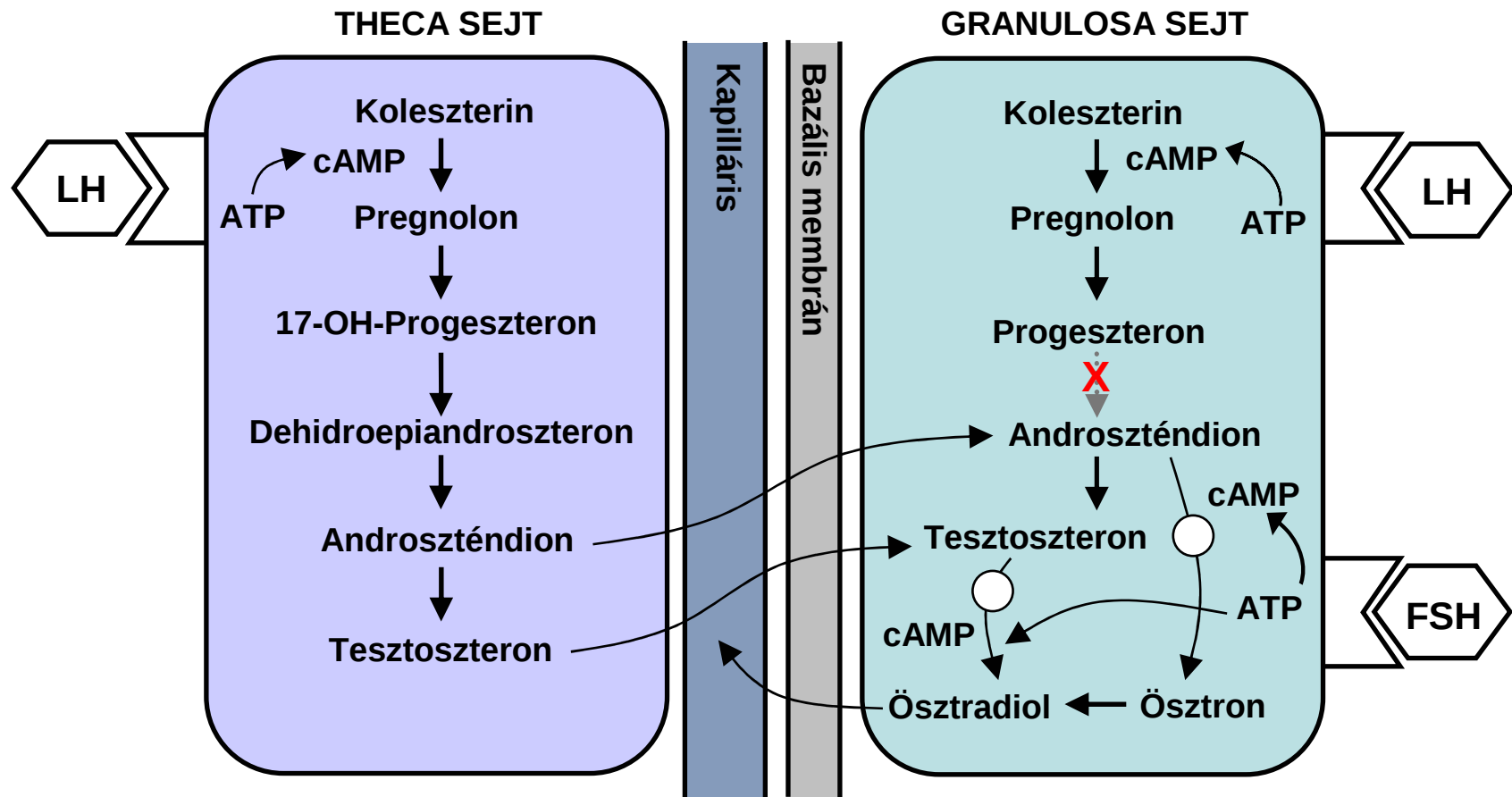
FOLLIKULUS

A granulosa sejtek legfontosabb funkciói:

- tápanyagok biztosítása
- hormonális környezet megteremtése (elsősorban progeszteron) az oocyta növekedése során

NŐI NEMI HORMONOK SZINTÉZISE - II

A follikuláris szteroidszintézis kétkompartmentes modellje



A theca sejtek LH stimulusra androgéneket termelnek, amelyek átdiffundálnak a granulosa sejtekbe, ahol FSH stimulusra ösztrogénekké alakulnak.

A granulosa sejtek a 17- α -hidroxiláz enzim hiánya miatt nem tudják a progeszteront androszténdionná alakítani.

IN VITRO MÓDSZEREK A REPRODUKTÍV TOXIKOLÓGIÁBAN

ELŐNYÖK

- 👍 Nagy érzékenység
- 👍 Magas specificitás
- 👍 Alacsony költségek és kis időráfordítás
- 👍 Nagyteljesítményű assay-k tervezhetők (automatizálás)
- 👍 Állatfelhasználás csökkentése
- 👍 Hatásmechanizmus meghatározása

KORLÁTOK

- 👎 Változó metabolikus kapacitás
 - 👎 Csak egyféle hatásmechanizmussal számolnak
 - 👎 A receptorkötési vizsgálatok nem tudnak különbséget tenni agonista és antagonisták hatás között
- } ➡ A negatív teszteredmények jelenleg nem alkalmasak a reprodukció toxicitás kizárására

FŐBB VIZSGÁLAT-TÍPUSOK

Receptorkötés (in vitro)

A természetes szexuálisztteroidokéhoz hasonló szerkezetű kémiai anyagok képesek az androgén (AR), ill. az ösztrogén (ER) receptorokhoz kötődni és a természetes hormon hatását utánozni vagy blokkolni. Az AR-kötődési vizsgálatokhoz patkány prosztata citoszolt vagy patkány rekombináns AR-t használnak, míg az ER-kötődési vizsgálatokhoz patkány uterusz citoszolt vagy humán rekombináns ER α -t alkalmaznak. A vizsgálatokkal sajnos nem különíthető el az agonista vagy antagonistá hatás.

Aromatáz assay

Az aromatáz egy olyan ösztrogénszintézisért felelős enzimkomplex, amely az androgéneket ösztrogénekké, ösztradiollá és ösztronná alakítja. Az aromatáz assay a szteroidszintézisnek ezt a szakaszát vizsgálja az aromatáz aktivitását gátló anyagok detektálása céljából.

Szteroidtermelés

A szteroidtermelést vizsgáló eljárások a gonádok hormontermelő (szomatikus) sejtjeire (Leydig, granulosa) gyakorolt közvetlen hatásokat detektálják. A korábban alkalmazott szerv- ill. szöveti kultúrákat (pl. „sliced testis”) egyre jobban kiszorítják a primer és sejtvonal alapú sejtenyészetek. Utóbbiak között több ígéretes rendszer is intenzív kutatások tárgya, így a továbbiakban ezeket ismertetjük részletesebben.

PRIMER SEJTKULTÚRÁK

A gonádok egyes szomatikus sejtjei jól tenyésztethetők és in vitro körülmények között is megtartják számos biológiai funkciójukat. Ilyenek a here intersticiumban elhelyezkedő Leydig vagy az ovárium follikulusainak belső falát borító granulosa sejtek. Jól mérhető ezekben a kultúrákban a citotoxicitás (MTT-teszt, neutral red assay), az apoptózis (TUNEL assay) és a szteroidtermelés (ELISA, RIA). A sejtek lehetnek állati (pl. egér, patkány), ill. humán eredetűek. Az expozíció lehet in vitro vagy in vivo (ex vivo kísérletek). Ezek előnyeit / hátrányait később tárgyaljuk.

Leydig sejt kultúrák

A Leydig sejtek legfontosabb feladata a tesztoszteron termelése. Mechanikus eljárással izolálhatók egér heréből vagy enzimemesztéssel patkány heréből. Mind a tisztított intersiticiális sejtpreparátum, mind a gradiens centrifugálással szeparált sejtek hormontermelése jól mérhető 48 órás tenyészetben. LH (hCG) stimulusra adott hormonválaszuk kiváló, de toxikus anyagok hatására hamarabb visszaesik, mint a stimulus nélküli hormontermelés. Így a stimulált hormontermelés mérése fokozza a módszer érzékenységét. A módszer egyetlen fő hátránya, hogy állatot igényel.

Granulosa sejt kultúrák

A granulosa sejtek fő feladata a pete táplálása és hormonális környezetének (progeszteron) biztosítása. Enzimemesztéssel kiegészített gradiens centrifugálásos eljárással állati eredetű (pl. patkány) follikulusokból vagy in vitro fertilizációs (IVF) eljárás során feleslegessé vált follikuláris folyadékból nyerhetők. Utóbbi előnye, hogy állatot nem igényel, hátránya viszont, hogy a páciensek nem tekinthetők homogén, egészséges populációnak. A granulosa sejtek is kifejezett hormonválaszt adnak LH stimulusra és a stimulált hormontermelés itt is hamarabb visszaesik toxikus hatásokra.

AZ EXPOZÍCIÓ TÍPUSAI

A **primer kultúrákon** végzett kísérletekben a toxikus anyaggal történő expozíció történhet in vitro vagy a tenyésztést megelőzően in vivo. Ez utóbbiakat nevezzük ex vivo kísérleteknek. Az alábbi táblázatban a kétféle expozíció előnyeit és hátrányait foglaljuk össze.

EXPOZÍCIÓ TÍPUSA	ELŐNYÖK	KORLÁTOK
IN VITRO In vitro expozíció In vitro mérés	➡ Az expozíció a vizsgálni kívánt sejtekre, szövetekre korlátozódik ➡ A kezelésben résztvevő sejtek/szövetek véletlenszerű eloszlása csökkenti a szórást ➡ Állatszükséglet csökkenése, rövidebb expozíciós idők	👎 A sejt kultúrák fenntartása bonyolultabb lehet 👎 Figyelman kívül hagyja a vizsgált anyag generalizált toxicitását 👎 A vizsgált anyag esetleges oldódási problémái a médiumban
EX VIVO In vivo expozíció In vitro mérés	➡ Expozíciós idő növelhető, ismételt expozíció lehetséges ➡ A szisztémás expozíció lehetővé teszi a szervek és szövetek közötti normál interakciókat ➡ Standard expozíciós utak	👎 Az expozíciós szintek kevésbé kontrollálhatók, mint az in vitro expozíciónál 👎 A vizsgált anyag kiáramlása a tenyésztett sejtekből/szövetekből megváltoztathatja az in vivo körülmények között tapasztalt hatás jellegét

SEJTVONALAK

Sejtvonalakat főleg szexuálissteroid termelő in vitro biológiai modellként használnak a reprodukív toxikológiában. Költséghatékonyak, jól standardizálhatók, azonban nagyrészüket a 17- α -hidroxiláz hiánya miatt androgének előállítására nem képes. Az alábbiakban leggyakrabban használt típusaikat tekintjük át.

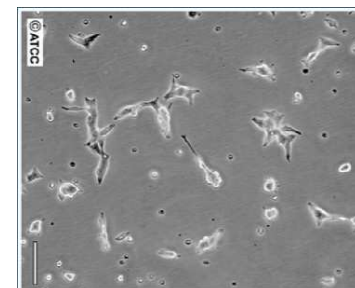
Sejtvonal	Eredet	Fontosabb tulajdonságok	Fő termelt szteroid	ATCC
mLTC-1	egér Leydig tumor	hCG, cAMP stimulusra szteroid válasz; igen széles körben használt, sok adat	P, 20-OHP	✓
MA-10	egér Leydig tumor	hCG, cAMP stimulusra szteroid válasz; igen széles körben használt, sok adat	P, 20-OHP	✗*
R2C	patkány Leydig tumor	hCG-re, cAMP-re nem reagál	P, 20-OHP	✓
KGN	humán granulosa-szerű	magas aromatáz aktivitás (cAMP-vel, FSH-val stimulálható) cAMP stimulusra P válasz	P	✓
H295R	humán adreno-kortikális cc.	a szteroidszintézis legtöbb fontos enzimjével rendelkezik	P, T, E2	✓

ATCC ✓ American Type Culture Collection sejtbankjában hozzáférhető *Prof. M. Ascoli -nál (Univ. Iowa, USA) hozzáférhető

P: progeszteron, 20-OHP: 20 α -hidroxiprogeszteron, T: tesztoszteron, E2: ösztadiol

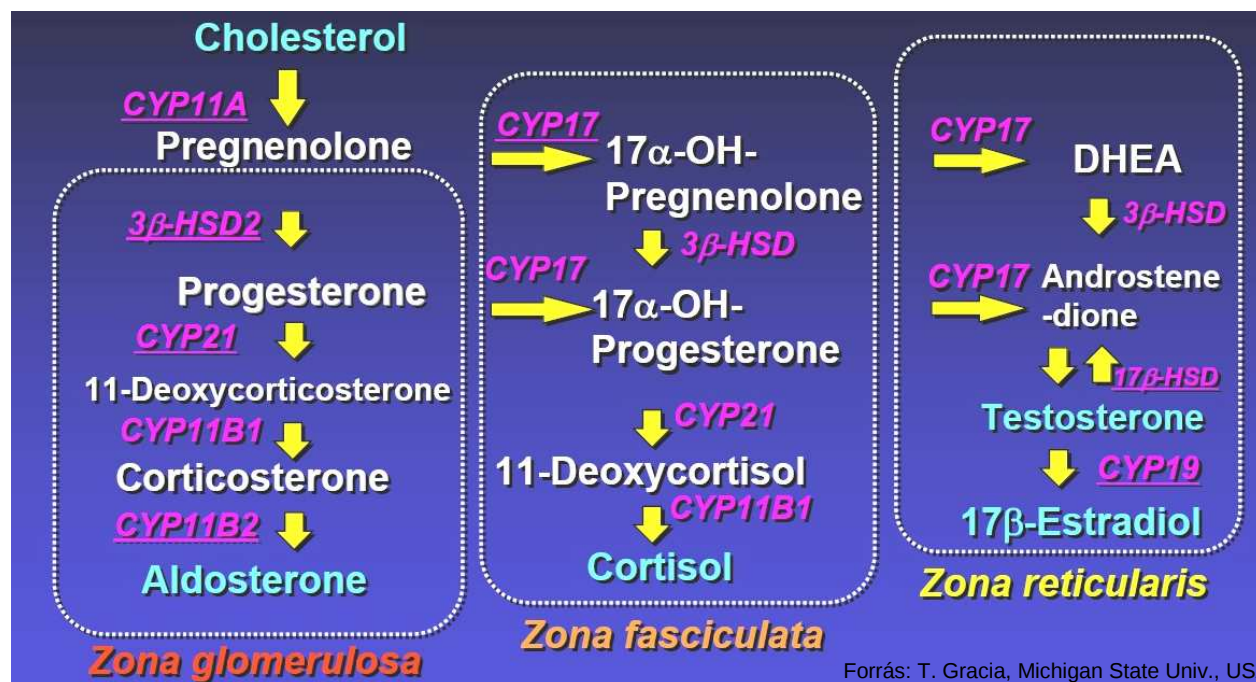
A H295R SEJTVONAL

- ❑ 48 éves néger nőbetegből származó adrenokortikális karcinóma
- ❑ Számos szteroidhormont képes szintetizálni
 - ✓ gesztagéneket
 - ✓ androgéneket és ösztrogéneket
 - ✓ glükokortikoidokat és mineralokortikoidokat
- ❑ Expresszálja a szteroidszintézis legtöbb fontos enzimjének génjeit
 - ✓ CYP11A, CYP11B, CYP17, CYP19, CYP21
- ❑ A vizsgált anyagok szteroidszintézisre gyakorolt hatása különféle szinteken mérhető
 - ✓ A génexpresszió szintjén (mRNS szintek mérése RT-PCR -rel)
 - ✓ Enzimkoncentrációk mérésével (katalitikus aktivitás mérése szelektív szubsztrátokkal)
 - ✓ A szteroid hormonok meghatározásával (ELISA, RIA)



A H295R SEJTVONAL SZTEROIDSZINTÉZISE

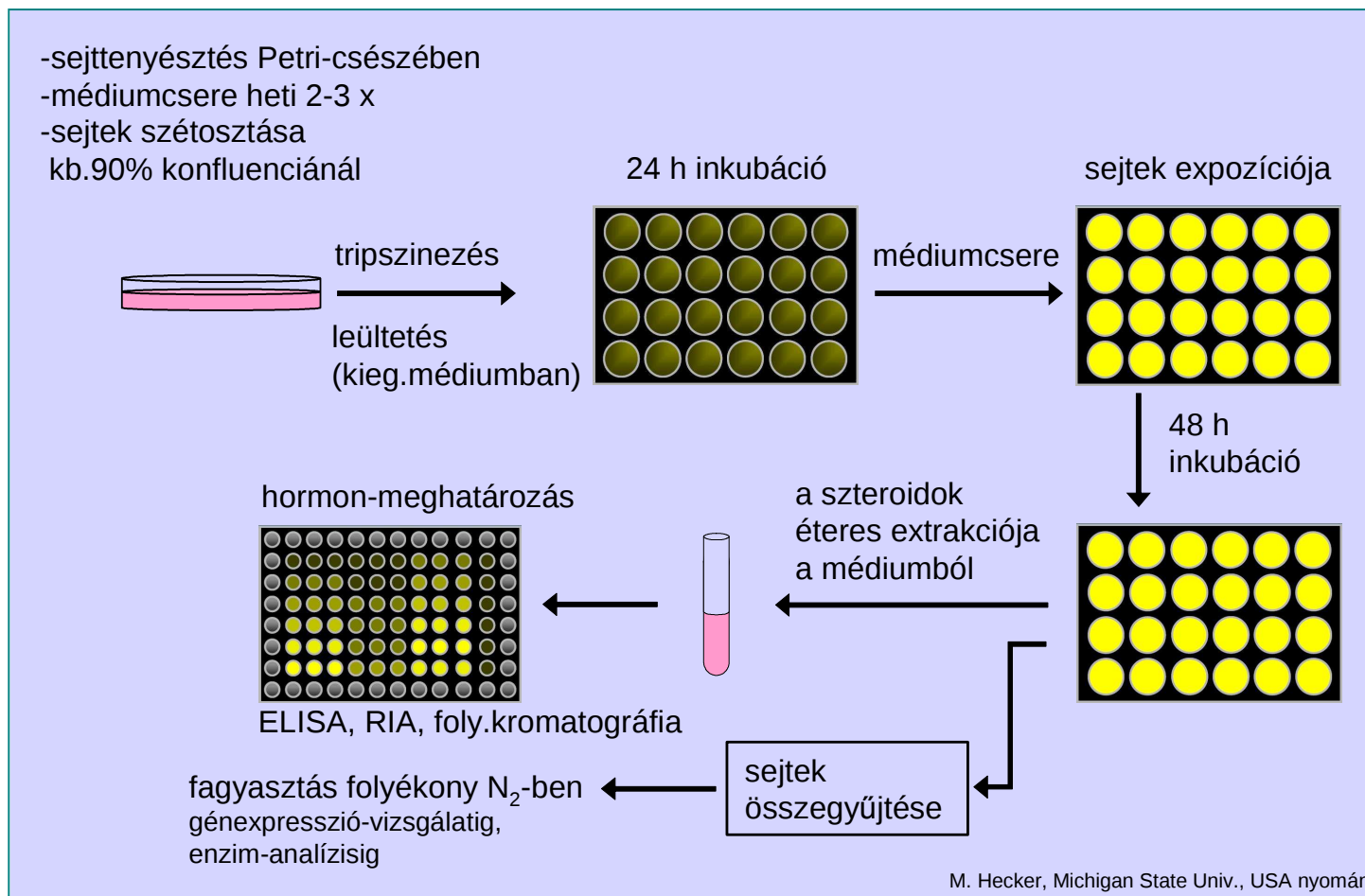
A H295R sejtvonal szteroidszintézisének legfontosabb lépései. A sejtek megtartották a mellékvesekéreg három eltérő fenotípusú zónájának szteroidtermelő képességét.



GÉN	ENZIM	GÉN	ENZIM
CYP11A	koleszterin oldalláncasító enzim	CYP17	17α-hidroxiláz / 17,20-liáz
3β-HSD, 3β-HSD2	3β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz	CYP21	21-hidroxiláz
CYP11B1	11β-hidroxiláz	17β-HSD	17β-hidroxiszteroid-dehidrogen.
CYP11B2	aldoszteron-szintetáz	CYP19	aromatáz

A H295R SZTEROIDSZINTÉZIS ASSAY

Különféle kémiai anyagok szteroidszintézisre gyakorolt hatásának vizsgálata vázlatosan a H295R sejtvonalon.



M. Hecker, Michigan State Univ., USA nyomán

KONKLÚZIÓK (IN VITRO SZTEROIDTERMELŐ MODELLEK)

- ❑ Számos szexuálissteroid termelő sejtkultúra alkalmas in vitro modell lehet kémiai anyagok reprodukzív toxikológiai előzetes gyorsesztesztelésére, ill. azok celluláris szintű hatásmechanizmusának tanulmányozására.
- ❑ A H295R sejtvonalra épülő, szteroidtermelést vizsgáló tesztrendszer tűnik jelenleg a legígéretesebbnek, melyet az USA Környezetvédelmi Hivatala (EPA) már "Test Guideline"-ként kiadott (OPPTS 890.1550:Steroidogenesis - Human Cell Line - H295R). Az OECD-ben a teszt validálás alatt van.
- ❑ A H295R tesztrendszer főbb jellemzői:
 - ✓ Gyors és egyszerű
 - ✓ Jelentős alap ösztradiol, tesztoszteron és progeszteron termelés
 - ✓ A hormontermelés változásai széles tartományban pontosan mérhetők
 - ✓ Jól reprodukálható
 - ✓ Ugyanabban a rendszerben több biológiai szinten is vizsgálhatók a változások (génexpresszió, enzimaktivitás, hormontermelés)
 - ✓ Összetett hatásmechanizmus behatárolására is alkalmas lehet
 - ✓ Nagymértékben csökkentheti az állatkísérletek számát
 - ✓ Költséghatékony
 - ✓ Gyors és gazdaságos eljárás kémiai anyagok szteroidtermelést befolyásoló potenciáljának szűrésére, prioritások megállapítására (Tier 1 screening)