

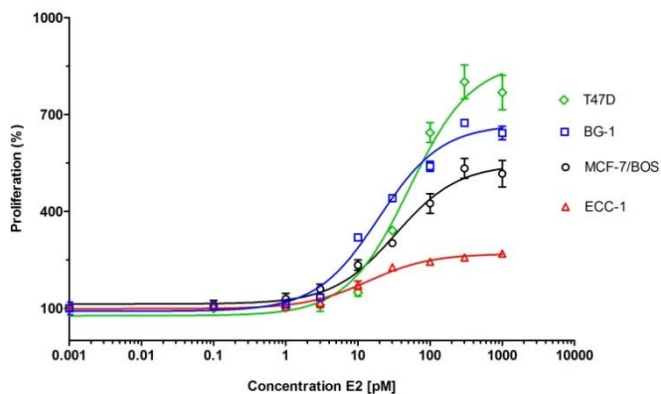
Onderzoek naar in vitro test batterij ter vervanging van de rat/muis uterus test

Voor onderzoek naar toxiciteit van stoffen worden nog steeds veel proefdieren gebruikt. Stoffen die onze hormoonbalans verstoren (endocrine disrupting chemicals (EDCs), zoals ftalaten en bisphenol A) staan nog steeds sterk in de belangstelling vanwege hun mogelijke toxiciteit. Ftalaten worden onder meer gebruikt bij het vervaardigen van drukinkt, lijmen, geparfumeerde producten en parfums, en worden als weekmakers gebruikt in plastics en PVC. Bisphenol A wordt net als de ftalaten gebruikt voor de productie van plastics. Binnen de stoffen die de hormoonbalans kunnen verstoren, nemen de oestrogenen een belangrijke plek in. De rat/muis uterus test is de standaard test voor het vaststellen van de oestrogene potentie van een stof. Hiervoor worden jonge dieren geïnjecteerd met de teststof en de gewichtstoename van de uterus geldt als een positieve uitslag. Hiervoor moet het diertje wel worden opgeofferd. "Hoewel er vele in vitro alternatieven bestaan voor het meten van de oestrogene potentie van een stof, zijn er nauwelijks onderzoeken die aantonen in hoeverre die alternatieven geschikt zijn om de uterus test te vervangen" aldus Si Wang, AIO bij de Vakgroep Toxicologie van Wageningen UR en het RIKILT- Wageningen UR. Hij werkt aan een door het NTC gefinancierd onderzoek om tot een test batterij van in vitro alternatieven te komen die de test met dieren op den duur overbodig zou moeten maken.

In vitro modellen voor oestrogene activiteit

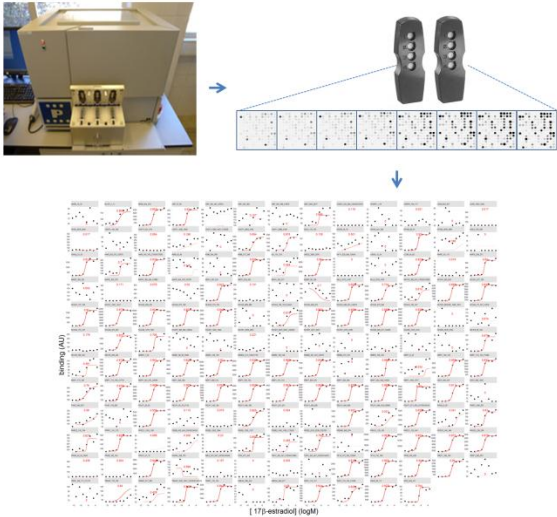
Proliferatie assays

Het onderzoek van Si Wang heeft zich in eerste instantie gericht op de proliferatie van humane cellijnen die oestrogenen gereguleerd zijn. Hiervoor heeft hij cellen gebruikt die afstammen van borst (T47D en MCF-7/BOS celen), endometrium (ECC1 cellen) en ovarium (BG1 cellen). Onder invloed van oestrogenen, gaan deze kankercellen sneller delen (proliferatie). Zie onderstaande figuur. De humane MCF-7/BOS borst kanker cellijn bleek de meeste overeenkomst te vertonen met de uitslagen in de uterus test zoals die voor de geteste stoffen in de literatuur bekend waren. "Zelf hebben we natuurlijk geen dierproeven gedaan, hoewel dat uiteindelijk noodzakelijk is om de ontwikkelde alternatieven eenmalig te valideren", aldus Si Wang.



Oestrogeen receptor bindingsassays

De oestrogene activiteit van een stof wordt voornamelijk bepaald door zijn bindingsaffiniteit met de oestrogeen receptor. Recent is er echter een unieke test op de markt verschenen. Deze door PamGene ontwikkelde test maakt op een array platform inzichtelijk hoe een stof op zijn beurt de affiniteit van de humane oestrogeen receptor voor andere cofactoren (co-activators en co-repressors) verandert. Elk welletje bevat een array met 155 cofactoren, en door de oestrogeen receptor met teststof toe te voegen worden uiteindelijk 155 profielen voor de teststof verkregen (zie foto hieronder). Het onderzoek van Si Wang gaf aan dat de gevonden bindingsprofielen in hoge mate voorspellend waren voor de activiteit van de stof in de uterus test.

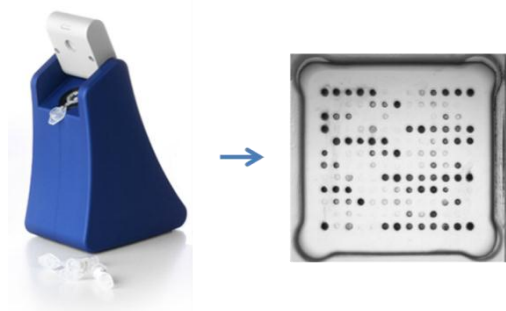


Reporter gen assays

Reporter gen assays zijn testen die op zoogdier cellijnen of gist cellen zijn gebaseerd. Deze cellen zijn in het laboratorium gemaakt en geven na blootstelling aan een oestrogene stof een signaal af dat gemakkelijk is te meten. Si Wang toonde in zijn onderzoek aan dat ook deze testen een grote overeenkomst vertonen met de bevindingen zoals die voor de uterus test al bekend waren. Vergeleken met de hierboven beschreven proliferatie assays, zijn deze testen sneller en goedkoper en beter geschikt om snel en efficiënt een groot aantal stoffen te testen. Vergeleken met de snelle PamGene™ eiwit array, zijn de receptor gen assays minder duur, maar stelt de eiwit array op zijn beurt weer minder strenge eisen aan de laboratoriumfaciliteiten.

Genexpressie array

Gedurende zijn werkzaamheden op het RIKILT kreeg Si lucht van het bestaan van een kleinschalige DNA microarray, gericht op de detectie van oestrogenen in voedingsmiddelen. In zijn onderzoek heeft Si onderzocht in hoeverre die in het EU BioCop project nieuw ontwikkelde oestrogene microarray voor zijn doeleinden geschikt was. Deze DNA microarray test voor oestrogenen is gebaseerd op een 24-uurs blootstelling van de humane MCF-7/BOS kanker cellijn aan een teststof. Na blootstelling wordt het RNA geïsoleerd waarna met de microarray de regulatie van 11 oestrogene merkgenen wordt bekeken. De array bevindt zich op de bodem van een plastic reactievatje en kan na een kleuringreactie in een draagbare camera worden afgelezen (zie foto hieronder). "De resultaten waren bevredigend, maar vergeleken met de andere in vitro alternatieven, is de deze test tijdrovend en is de test ook minder snel dan de bindingsassays en reporter gen assays. De test is dan ook minder geschikt om onderdeel uit te maken van een high through-put test batterij voor oestrogene activiteit."



Stand van zaken

"Een combinatie van receptor gen assays en de PamGene™ eiwit array lijkt de beste combinatie en is in hoge mate voorspellend voor de gevonden in vivo uterus activiteit. Maar de verschillen zijn klein. Iedere assay heeft zijn eigen specifieke voor- en nadelen. De uitkomsten van de in vitro testbatterij maken wel al duidelijk dat het mogelijk is de dierproeven te verfijnen en verminderen en wellicht in de toekomst volledig te vervangen. Het "voordeel" van de in vivo uterus test is dat in deze test automatisch andere parameters, zoals biobeschikbaarheid en metabolisme, zijn "ingebouwd". Maar ons panel heeft nu ook al voordelen ten opzichte van de dierproef, niet alleen zijn de in vitro testen een stuk sneller, de uitkomsten van het in vitro panel maken bovendien duidelijk hoe een stof werkt, terwijl de dierproef alleen maar "ja"

of "nee" "oestrogeen actief" als uitkomst heeft. Om het in vitro voordeel verder uit te bouwen, nemen we dit moment de H295R steroidogenesis assay onder de loep om als kandidaat te worden opgenomen in het panel. Om het voordeel van de dierproef teniet te doen, zal het uiteindelijke panel moeten worden gecombineerd met in vitro modellen voor digestie, biobeschikbaarheid en metabolisme. Deze modellen zijn op het RIKILT aanwezig en worden daar al toegepast voor toxiciteitsonderzoek aan o.a. nanodeeltjes, mariene toxinen en ook hormonen. Op den duur staat dan niets meer het vervangen van de dierproef in de weg."

Wang S, Aarts JMMJG, Evers NM, Peijnenburg AACM, Rietjens IMCM, Bovee TFH (2012) Proliferation assays for estrogenicity testing with high predictive value for the in vivo uterotrophic effect. *JSBMB* **128**: 98-106.

Wang S, Houtman R, Melchers D, Aarts JMMJG, Peijnenburg AACM, Van Beuningen R, Rietjens IMCM, Bovee TFH (2012) A 155-plex high-throughput in vitro coregulator binding assay for (anti-)estrogenicity testing evaluated with 23 reference compounds. *ALTEX* **in press**.

Wang S, Rijk JCW, Pen MJ, Aarts JMMJG, Peijnenburg AACM, Rietjens IMCM, Bovee TFH (2012) A low-density DNA microchip for the detection of (anti-)estrogenic compounds and their relative potencies. *Bioanalytical Chemistry* **in press**.



Contact: ir. Si Wang: si.wang@wur.nl