

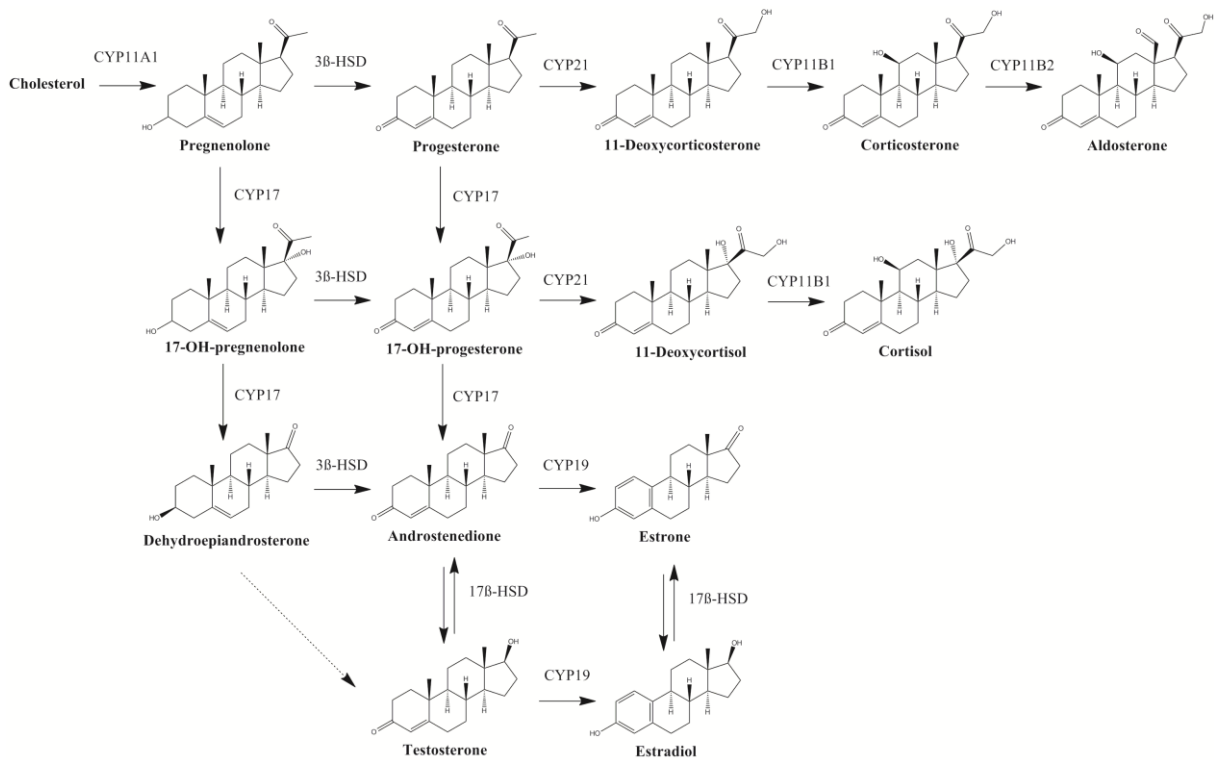
# In vitro methode voor onderzoek naar verstoring van de steroid hormoonbalans

Blootstelling aan stoffen die de hormoonbalans beïnvloeden kunnen ongewenste toxische effecten bij mensen en dieren veroorzaken. Zulke stoffen (EDCs: endocrine disrupting chemicals) kunnen de hormoonbalans via verschillende routes in het lichaam verstoren. Dit kan bijvoorbeeld via de hormoonreceptoren (zie [onderzoek Si Wang](#)), maar ook door de aanmaak van de lichaamseigen hormonen te beïnvloeden.

Voor het evalueren van chemicaliën op mogelijke hormoon verstorende werking worden nog steeds veel proefdieren gebruikt. Voorbeelden hiervan zijn de zogenaamde “pubertal female assay” en de “pubertal male assay”, waarbij ratten voor 30 dagen worden blootgesteld aan de te testen stof, waarna de schildklier, de geslachtsorganen en hormoonniveaus in bloed worden geanalyseerd. Hiervoor moeten de diertjes wel opgeofferd worden. “Gelukkig bestaan er in vitro alternatieven die kunnen bijdragen aan het reduceren van dit soort dierproeven”, aldus Jeroen Rijk, Postdoc bij het RIKILT – Instituut voor voedselveiligheid, Wageningen UR. Hij werkt aan een door het Netherlands Toxicogenomics Centre gefinancierd onderzoek naar nieuwe en snelle in vitro methoden om stoffen te evalueren op mogelijke effecten op de steroid hormoon aanmaak in het menselijk lichaam (steroid biosynthese).

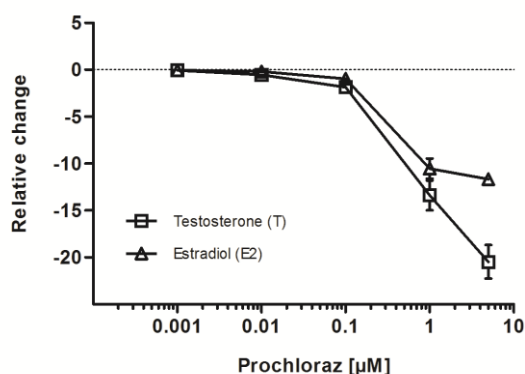
## H295R steroidogenese assay

De meest bekende in vitro test om effecten op de steroid biosynthese te onderzoeken is de al bestaande H295R steroidogenese assay. Deze test is gebaseerd op humane H295R bijnier-carcinoma cellen die, in tegenstelling tot gezonde bijnier cellen, de gehele steroid biosynthese pathway tot expressie brengen; d.w.z. van cholesterol tot estradiol, aldosteron en cortisol (figuur 1). “Dat is handig, want al deze processen vinden in het menselijk lichaam op verschillende plekken plaats, maar kunnen nu dus in vitro met slechts 1 celtype worden onderzocht.”



Figuur 1: Humane steroid biosynthese pathway

In de huidige test worden de H295R cellen blootgesteld aan verschillende concentraties van de te testen stof en worden na 48 uur de geproduceerde concentraties testosteron en estradiol bepaald. “Het schimmeldodend middel prochloraz remt bijvoorbeeld de productie van zowel testosteron als estradiol. Omdat alleen veranderingen in de estradiol en testosteron productie worden gemeten, die zich op het einde van de biosynthese pathway bevinden (zie figuur 1), is de uiteindelijke testuitslag “negatief” of “positief”. Negatief – de stof heeft geen effect op de steroid biosynthese of positief – de stof heeft wel effect op de steroid biosynthese. Op basis van deze uitslag wordt besloten of, en hoe, stoffen verder moeten worden getest in opvolgende dierproeven. “De uitkomst van de huidige H295R steroidogenesis assay is dus redelijk beperkt. Zo vertelt het bijvoorbeeld niets over hoe een geteste stof de steroid biosynthese beïnvloed”, aldus Jeroen Rijk. “Dat is jammer, want door niet alleen naar de estradiol en testosteron productie te kijken, maar naar alle steroiden in de pathway, is er veel meer informatie te verzamelen. Die essentiële informatie is tot op zeker hoogte wel degelijk ook uit de bestaande in vitro test te halen. Dit kan leiden tot het reduceren van het aantal dierproeven, of kan er uiteindelijk voor zorgen dat deze dierproeven zelfs helemaal niet meer nodig zijn.”



Figuur 2: Effecten van prochloraz op de testosteron en estradiol productie in H295R cellen.

### Huidig onderzoek

Het huidige onderzoek van Jeroen Rijk richt zich dan ook met name op de ontwikkeling en toepassing van methodes om enerzijds het benodigde en bestaande “negatief-positief” antwoord verstrekken, maar daarnaast ook meer vertellen over de manier waarop een stof werkt. Hij doet dat door in plaats van alleen naar testosteron en estradiol te kijken, de gehele steroid biosynthese pathway te analyseren. “Het blijkt technisch nog niet zo heel eenvoudig om alle steroid hormonen tegelijk te meten, maar het is ons wel gelukt. De resultaten geven een goede indicatie van waar in de pathway een stof aangrijpt” aldus Jeroen Rijk. “Daarnaast halen we ook nog meer informatie uit dit in vitro H295R cel model door gen-expressie analyse. Zo blijken genen die coderen voor enzymen, zoals CYP17 en CYP19 (figuur 1), sterk te worden gereguleerd door bepaalde chemicaliën.”

Een praktisch voorbeeld van stoffen waar op het RIKILT onderzoek naar wordt gedaan zijn de zogenaamde thioxanthone photoinitiators, zoals 2-isopropylthioxanthone (ITX). Deze stof wordt toegepast in inkt en zorgen ervoor dat de inkt snel droogt. Het is bekend van dit soort stoffen dat ze bijvoorbeeld via bedrukt verpakkingsmateriaal in de voeding terecht kunnen komen. De resultaten van de H295R steroidogenesis assay laten zien dat ITX de concentraties testosteron verlaagd en concentraties estradiol verhoogd. “Echter wanneer we naar de complete steroid biosynthese pathway kijken, blijken de concentraties pregnenolon en progesteron ook omhoog te gaan (figuur 1). De conclusie was dat ITX zowel CYP17 als CYP19 kan beïnvloeden. Dit komt overeen met een ander onderzoek waar ITX in mannelijke ratten de testosteron niveaus in het bloed bleek te verlagen.

Precies wat we met de huidige in vitro steroidogenesis assay ook vinden en voorspeld zouden hebben.”

“Het idee is om deze uitgebreide steroidogenesis test met andere in vitro testen te combineren, zodat een panel van in vitro assays ontstaat dat het mogelijk maakt endocriene verstoringen te voorspellen, en de bijbehorende dierproeven te reduceren of op termijn zelfs overbodig te maken. Hiervoor dient zo'n panel te worden gecombineerd met in vitro modellen voor digestie, biobeschikbaarheid en metabolisme. Ook aan dit soort modellen wordt op het RIKILT en andere onderzoeksinstellingen gewerkt” aldus Jeroen Rijk.

*Rijk, J.C.W., Peijnenburg, A.A.C.M., Blokland, M.H., Lommen, A., Hoogenboom, R.L.A.P., Bovee, T.F.H., 2012. Screening for modulatory effects on steroidogenesis using the human H295R adrenocortical cell line: A metabolomics approach. Chemical Research in Toxicology 25, 1720-1731.*

*Reitsma, M., Bovee, T.F.H., Peijnenburg, A.A.C.M., Hendriksen, P.J.M., Hoogenboom, R.L.A.P., Rijk J.C.W., 2013. Endocrine-disrupting effects of thioxanthone photoinitiators. Toxicological Sciences in press.*



Contact:

Dr. Ir. Jeroen Rijk

RIKILT – Institute of Food Safety, Wageningen UR

E-mail: [jeroen.rijk@wur.nl](mailto:jeroen.rijk@wur.nl)