

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar  
Továbbképzési Központ

A fertilitásra ható hormonmoduláns anyagok  
hatásmechanizmusa és vizsgálati lehetőségei

Készítette: Németh Gyöngyi

Témavezető: Dr. Druga Alice

Általános toxikológiai  
és szaporodásbiológiai szakértő

Budapest

2012.

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>ÁBRAJEGYZÉK</b> .....	- 3 -
<b>BEVEZETŐ</b> .....	- 5 -
1. Hormonok, reprodukció, fertilitás .....	- 7 -
1.1 Hormonok.....	- 7 -
1.2 A fertilitás hormonális szabályozása nőkben .....	- 9 -
2. Endokrin károsítók .....	- 14 -
2.1 Kezdetek.....	- 14 -
2.2 Definíciók .....	- 17 -
2.3 Eltérek a hagyományos toxikológiától .....	- 19 -
2.4 Reprodukció károsításhoz való viszony .....	- 26 -
3. Vizsgálati rendszer bemutatása .....	- 28 -
3.1 Az egyes szintek bemutatása.....	- 29 -
3.1.1 1. szint: Válogatás és rangsorolás a rendelkezésre álló információk alapján.....	- 29 -
3.1.2 2. szint: Mechanisztikus információt szolgáltató <i>in vitro</i> tesztek.....	- 29 -
3.1.3 3. szint: Egyetlen mechanizmusról és hatásáról információt nyújtó <i>in vivo</i> tesztek.....	- 30 -
3.1.4 4. szint: Több folyamatról információt szolgáltató <i>in vivo</i> tesztek.....	- 30 -
3.1.5 5. szint: <i>In vivo</i> tesztek, amelyek ED- és más hatásokról is adnak információt.....	- 31 -
<b>ELEMZŐ RÉSZ</b> .....	- 32 -
4. Fertilitást károsító hatásmechanizmusok.....	- 32 -
4.1 Hormonok/receptorok.....	- 33 -
4.2 Hipotalamo-hipofizeális-gonadális rendszer .....	- 34 -
4.3 Szövetek, szervek szintjén végbemenő hatások .....	- 34 -
4.4 Apikális és végpont irányú megközelítés .....	- 35 -
5. Végpontok és vizsgálatok .....	- 36 -
5.1 Végpontok.....	- 36 -
5.2 Vizsgálatok .....	- 38 -
6. Következtetések .....	- 41 -
<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	- 44 -
<b>SUMMARY</b> .....	- 46 -

I. Függelék - Eredeti angol nyelvű szövegek.....	- 52 -
II. Függelék - A koncepcionális keretrendszer bemutatása.....	- 52 -
III. Függelék - Szerzői jogi nyilatkozat .....	- 55 -

## **ÁBRAJEGYZÉK**

1. ábra: A szakirodalom áttekintésének sematikus ábrázolása .....	- 5 -
2. ábra Szaporodási folyamatok [Evans, 2011] .....	- 9 -
3. ábra: Az ösztroz ciklus szakaszai.....	- 11 -
4. ábra: Hormonok szintjének változása a ciklus során [ <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Menstruation">http://en.wikipedia.org/wiki/Menstruation</a> ]..	- 12 -
5. ábra: Női fertilitás hormonális szabályozása [Evans, 2007] .....	- 13 -
6. ábra: Forrás: Endokrin zavarók expozíciós forrásai [Åke Bergman Exposure to Endocrine disruptors: Which substances from which sources EU Conference on Endocrine Disruptors; Brussels, June 11-12, 2012].....	- 17 -
7. ábra Endogén és exogén hormonszint [Vanderberg et al., 2012] .....	- 21 -
8. ábra: Tradicionális dózis-válasz görbék [Calabrese, 2003].....	- 21 -
9. ábra Dózis-válasz görbe és biztonsági küszöb [Vandenberg et al., 2012].....	- 22 -
10. ábra: Érzékeny prenatális fejlődési szakaszok [Forrás: Linda S. Birnbaum EU Conference on Endocrine Disruptors Monday, June 11, 2012] .....	- 23 -

## **KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS**

*Konzulensemnek, Dr. Druga Alicenak, aki türelemmel, értékes hozzászólásokkal segítette, és Lehel Józsefnek, aki őt javasolta.*

*Kollégáimnak a KÉKI Ökotoxikológia osztályán, hogy kérdéseimet meghallgatták, és konstruktív ötletekkel segítettek az elindulásban, és különösen Takács Eszternek, aki segített abban, hogy dolgozatom ilyen messziről is időben beérkezzen.*

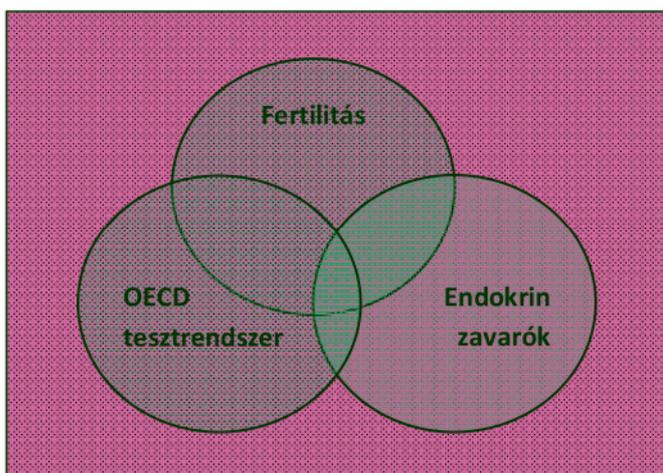
*Családomnak, mert a dolgozat írása idejére lemondtak családi kötelezettségeimről, és végül férjemnek, aki mindvégig támogatott a képzés elvégzésében és különösen a szakdolgozat írása alatt.*

## BEVEZETŐ

Több mint 15 év telt el, hogy Theo Colborn Ellopott jövőnk című könyvével megalapozta az endokrin zavaró anyagok tudományterületét, és csaknem ugyanennyi, mióta az OECD elindította endokrin zavaró anyagokra vonatkozó nemzetközi munkacsoportját. Mégsem látunk a mai napig sem egy kiforrott stratégiát, meglapozott és egyértelmű vizsgálati útmutatókkal, jogi követelményekkel. Bár az elmúlt másfél évtizedben a téma publicitása hatalmasra nőtt, még mindig nincs egyetértés a téma valódi horderejét illetően. Egyesek szerint az endokrin zavaró anyagok felfedezésének jelentősége egyenértékű lehet a mutagenitás felfedezésével [Krimsky, 2000], mások mondvacsinált problémának látják. Dolgozatom egyik célja ezért az endokrin zavaró anyagok valódi helyének és fontosságának meghatározása a hagyományos toxikológia keretein belül vagy kívül.

Következő lépésként a termékenység hormonális szabályozásának feltérképezését fogom elvégezni, hogy megvizsgálhassam, az endokrin zavaró anyagok hogyan fejthetik ki káros hatásukat ezen a speciális területen. (A dolgozat keretein belül ez az első helyet foglalja majd el az követhetőség kedvéért, és a helyi megszorítások miatt mindvégig a nőkre szorítkozom majd.) Ehhez pedig ismertetni szükséges az OECD által kidolgozott vizsgálati rendszert, melynek építőköveit az endokrin zavaró anyagok detektálására dolgozták ki/át. Irodalmi kutatásom ezért három területet is felölel, hogy a dolgozatom fő kérdéseire a három együttes vizsgálatával találjak választ.

1. ábra: A szakirodalom áttekintésének sematikus ábrázolása



Az elemzés első részében a két jobboldali halmaz metszetét értékelem majd, azaz áttekintem, melyek lehetnek azok a hatásmechanizmusok, amelyek által az endokrin zavaró anyagok káros hatást fejthetnek ki a fertilitásra. Ezután a három halmaz közös metszete következik, vagyis az OECD tesztrendszer (OECD Conceptual Framework for the Screening and Testing of Endocrine Disrupting Chemicals, továbbiakban CF) azon vizsgálatainak elemzése, amely alkalmas lehet a fertilitásra káros anyagok kiszűrésére. Végezetül az így feltárt vizsgálati módszerek részletes áttekintése következik, mindvégig szem előtt tartva a CF lépcsőzetes megközelítését. Céloom annak megállapítása, hogy a fertilitásra káros anyagok vajon fennakadnak-e az OECD által kialakított vizsgálati rostán.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 1. Hormonok, reprodukció, fertilitás

#### 1.1 Hormonok

Brencsán János Orvosi szótára [Brencsán, 1990] szerint a hormon "belső elválasztású mirigyek terméke, melyet a testnedvek szállítanak; a hormonok az egyes szervek működését specifikusan szabályozzák". Hagyományosan szervek közötti kommunikációra utal (endokrin), de ideértjük a sejtek közötti (parakrin) és a sejten belüli (autokrin), valamint vemhes emlősök esetében az egyedek közötti jelátvitelt is [Evans, 2007].

A hormonok általában receptorokon keresztül hatnak, amelyek elindítanak, vagy éppen meggátolnak valamilyen szignál transzdukciós utat; vagy pedig a gén expresszióban indukálnak változásokat [Evans, 2011]. Hogy a kettő közül melyik útvonalon történik a jelátvitel, többek között a hormon kémiai szerkezetétől is függ. Ugyanis a hidrofil hormonok nem jutnak át a sejtmembránon, ezért azok receptorai a célsejtek plazmamembránjában ülnek. Miután a hormon kötődik a receptor extracelluláris doménjéhez, beindul az intracelluláris reakciólánc. Ezzel szemben a lipofil hormonok, mint például a nemi működés szabályozásában jelentős szteroid hormonok receptorai a sejten belül helyezkednek el, és támadáspontjuk a sejtmagban van. Ezek hatása a transzkripció módosításával a protein szintézis ütemének megváltoztatásán alapul [Lüllmann-Rauch, 2007].

Korábban úgy gondolták, hogy a szexszteroid hormonok működése kizárólagosan a hormon-receptor komplex és a DNS-en lévő '*hormone response element*' (HRE) közötti kölcsönhatással megy végbe, később azonban kiderült, hogy a fenti genomikus hatásmechanizmus mellett a szexszteroidok más módon is befolyásolhatják a sejtek működését. Például egyes ionok, a ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) vagy annak másodlagos messenger-ének koncentrációját befolyásolják, vagy a mitogén-aktivált protein (MAP) kináz útvonalra fejtenek ki hatást. Ennek azért van jelentősége, mert szemben az időigényes genomikus hatásmechanizmussal, ezek másodpercek vagy néhány perc alatt végbemennek. Ezekről a gyors lefolyású szteroid hormonhatásokról az ismereteink meglehetősen

korlátozottak, valószínűsíthető azonban, hogy az érintett receptorok a plazmamembránhoz kötődnek [Evans, 2011]. A szteroidok klasszikus genomikus jelátvitelle azért vesz igénybe hosszabb időt, mivel a ligand-aktivált receptort át kell vinni a sejtmaghoz, ezután a génexpresszió modulációja következik, és általában még a gének *de novo* szintézisét is magában foglalja [Kortenkamp et al., 2011].

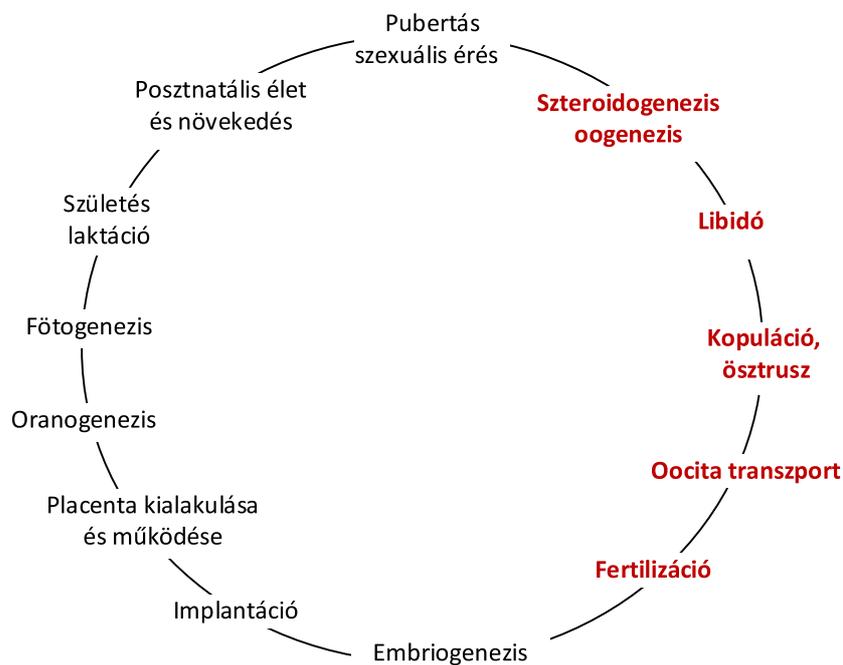
A hormon célsejtje már rendkívül alacsony hormonkoncentrációra is válaszol (a szabad hormon fiziológias plazmakoncentrációja általában pM-nM nagyságrendben van) [Lüllmann-Rauch, 2007]. A szteroid hormonok a vérben három formában fordulhatnak elő: szabad (nem konjugált, nem kötött), biológiailag hozzáférhető (alacsony affinitású carrier fehérjékhez kötve), illetve inaktív (nagy affinitású fehérjékhez kötve) [Vandenberg et al., 2012]. A hormon-receptor interakciót számos faktor befolyásolhatja, mint például a jelenlévő hormon mennyisége, a receptorhoz való affinitása, receptor sűrűség és telítettség, más hormonokkal, receptorokkal, hormon-receptor komplexekkel való interakció, valamint számos endogén gátló és serkentő faktor [Evans, 2011].

Míg az androgének kötődésére csupán egyetlen receptor alakult ki az evolúció során, mind a progeszteron, mind az ösztrogének esetében két-két különböző receptor-típus létezik. Progeszteron esetében ezek ugyanazon gén termékei, az ösztrogén-receptorok különböző kromoszómán lévő különböző gének termékei [Evans, 2011]. Ennek ott van szerepe, hogy egyes hormonhatású xenobiotikumok (EDC, endocrine disruptor chemical) nem olyan választ indukálnak, mint az endogén hormon. Ezeket az ösztrogén esetében szelektív ösztrogén receptor modulátornak hívjuk (SERM, selective estrogen receptor modulator), és a két eltérő típusú ösztrogén-receptor SERM-ekhez való affinitásukban is különböznek. Az EDC-k hatásai emellett a következők lehetnek: agonista, ha megváltoztatja a klasszikus transzkripciót; antagonist, ha a kötődés után nem váltja ki a megfelelő jelátvitelt. De hatásuk független is lehet a receptor-kötődéstől, például hatással lehetnek az endogén hormonok metabolizmusára, transzportjára, vagy ioncsatornák működésére, stb. [Vandenberg et al., 2012].

## 1.2 A fertilitás hormonális szabályozása nőkben

A következő ábra a szaporodási folyamat egymást követő lépéseit mutatja be, ezek közül pirossal jelöltem, amelyekkel dolgozatomban foglalkozni fogok. Alapfeltételezésem szerint a pubertás megfelelően végbement, egészséges, szexuálisan érett nő fertilitásának a hormonális szabályozását mutatom be.

2. ábra Szaporodási folyamatok [Evans, 2011]



Az emlősök szaporodása az idegrendszer – elsősorban a hipotalamo-hipofizeális-gonadális rendszer – szabályozása alatt áll. A hipotalamuszban termelt ún. gonadotropin serkentő hormon (gonadotrop releasing hormon, GnRH) az adenohipofízis (hipofízis mellső lebenye) gonadotrop sejtjeit serkenti. Ezek a sejtek, szemben az adenohipofízis többi hormontermelő sejtjével két különböző hormon előállításáért és szekréciójáért felelnek, ezek a luteneizáló (Luteinizing hormone, LH), és a folliculus stimuláló (Follicle-stimulating hormone, FSH) hormonok [Austin és Short, 1984]. (A férfiakban egyébként a LH-t ICSH-nak, azaz intersticiális sejteket stimuláló hormonnak nevezik.) Szintén fontos szerepet tölt be a reprodukció szempontjából az adenohipofízis laktrotrop sejtcsoportja, amely a prolaktint választja ki. Mivel az alapaktivitásuk igen

magas, ezért működésüket leginkább gátló faktorok szabályozzák, amelyek közül legfontosabb egy biogén amin, a dopamin hatása [Lüllmann-Rauch, 2007].

A rendszer szabályozásában neuronok és maguk a hormonok is részt vesznek. Az eddig azonosított legfontosabb résztvevő neurotranszmitterek jellemzően monoaminok: a már említett dopamin, a noradrenalin és a szerotonin. A dopamin a prolaktinra kifejtett hatása nyomán egyúttal hormonként is működik, sőt valószínűsíthetően szerepe van a GnRH szekréciónak is, ez magyarázza, miért alacsony a gonadotropin szekréció, ha a prolaktinszint magas. Az opioid peptideknek szintén szerepük lehet az LH és FSH-szekréciónak, a GnRH pedig neurotranszmitterként részt vesz a szexuális viselkedés szabályozásában.

A hormonális szabályozás visszacsatolások (feedback loop) útján valósul meg, azaz a célsejtek (a legtöbbször negatív) visszacsatolásokat küldenek a szabályozó sejteknek, ami befolyásolja a célsejtet stimuláló hormon kiválasztását. A visszacsatolások a hipotalamo-hipofízis-gonádális rendszer különböző szintjei között is végbemehetnek (gonádok – hipofízis – idegrendszer), azt lehet mondani, hogy ha „a hipofízis elülső lebenye a karmester az endokrin zenekarban, a hipotalamusz írja a kottát, a közönségtől kapott visszajelzés alapján” [Austin és Short, 1984].

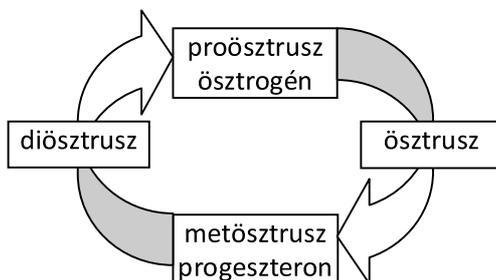
A petefészek két fő funkciója a tüszőérés és a női nemi hormonok termelése egymással szorosan összefügg, az endokrin funkció teszi lehetővé a rendszeres és egészséges oociták termelődését arra az időpontra, amikor a megtermékenyítés esélye a lehető legnagyobb. A petefészek működését teljes mértékben az adenohipofízis által termelt gonadotropinok (LH és FSH) szabályozzák, illetve indirekt módon a hipotalamusz által termelt GnRH [Lüllmann-Rauch, 2007].

Az LH és az FSH szekréciója két központ szabályozása alatt áll a hipotalamuszban, ezek a tónusos és a ciklus-központ. Előbbi egy folyamatos alacsony szintet indukál, amely segíti a gonádok germinális és endokrin elemeinek fejlődését. A ciklus-központ ezzel szemben ugrásszerű, akár néhány százszoros emelkedéseket idéz elő a keringő gonadotropin koncentrációjában, ez felelős nőknél az ovuláció előidézéséért, illetve a ciklus meglétéért. A ciklus során változik a hipotalamusz GnRH-kibocsátásának a mintázata, amely hatására az adenohipofízis eltérő arányú FSH-t és LH-t választ ki. (Valószínűleg az ürítések frekvenciája dönti el, hogy a gonadotropin sejtek

főleg FSH-t vagy LH-t szecernálnak.) A ciklus-központ a legtöbb faj esetében csak a nőstényekben funkcionál, bár magzati korban mindkét nemben jelen van, hímekben tartósan működésképtelen. Ez a nemek közötti különbség leképezhető a hipotalamuszban is. A ciklus-központ rágcsálókban kapcsolatban áll a napszakok változásával (pl. patkány, egér, hörcsög), más fajokban pedig a kopuláció váltja ki a LH-csúcsot, ezek az ún. reflex vagy indukált ovulálók (pl. nyúl).

Az alacsonyabb rendű emlősöknél a ciklust ősztusz ciklusnak, a főemlősöknél menstruációnak nevezzük. Alapvető különbség, hogy a menstruáció esetén nem beszélünk meghatározott periódushoz köthető szexuális fogadókészségről. Az ősztuszt folliculáris és luteális szakaszokra szokás osztani, melyeket az ovuláció választ el. Az előbbire az ösztrogén, az utóbbira a progeszteron-szekréció dominanciája jellemző. A szakaszok tovább oszthatók a következő ábra szerint, amelyen feltüntettem az endokrin milió átmeneteit is [Evans, 2007].

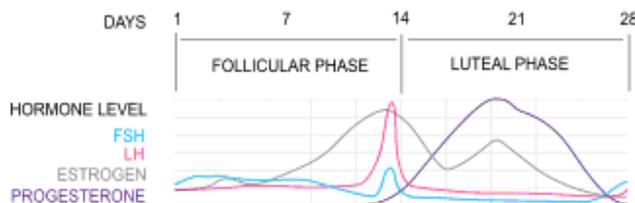
**3. ábra: Az ősztusz ciklus szakaszai**



Az egyes periódusok hossza fajonként változik. A ciklus elején az FSH elindítja a tüszők érési folyamatát, ekkor az LH-szekréció minimális. A tüszők a harmadlagos fázisban már jelentős mennyiségű ösztrogént választanak ki (a legtöbbet a domináns tüsző). Az ösztrogének az adenohipofízisre kifejtett visszacsatolások útján gátolják az FSH-t, serkentik az LH-t. Az ovulációt a vér LH-koncentrációjának hirtelen emelkedése váltja ki (LH-csúcs), ezután a tüszők átlépnek a luteális szakaszba, sárgatestekké alakulnak, amelyek az ösztrogének mellett már gesztagéneket is termelnek [Evans, 2007]. A gesztagének (fő képviselője a progeszteron) leglényegesebb hatása a genitális csatorna szöveti differenciálódása (elsősorban méhnyálkahártya), és adott esetben a terhesség megtartása, de a hatásuk kifejtése érdekében szükség van a szövetek

előzetes ösztrogén-expozíciójára [Austin és Short, 1984]. Bizonyos visszacsatolási mechanizmusok alapján, amelyekben a progeszteron és ösztrogén is részt vesz, megváltozik az adenohipofízis által szecernált LH és FSH aránya, ami a progeszteron és ösztrogén kiválasztás enyhe csökkenését eredményezi. A ciklus végén a magzat hiánya a méhben a sárga testek regresszióját eredményezi, amely a progeszteron és ösztrogén meredek csökkenésével jár, valamint leukotriének és prosztaglandinok helyi kiválasztásával, és olyan vaszkuláris események kaszkádjával, amely végső soron az endometrium lelködéséhez és a vérzéshez vezet [Evans, 2007]. A következő ábra az egyes hormonok szintjének változását ábrázolja adott cikluson belül.

4. ábra: Hormonok szintjének változása a ciklus során [http://en.wikipedia.org/wiki/Menstruation]



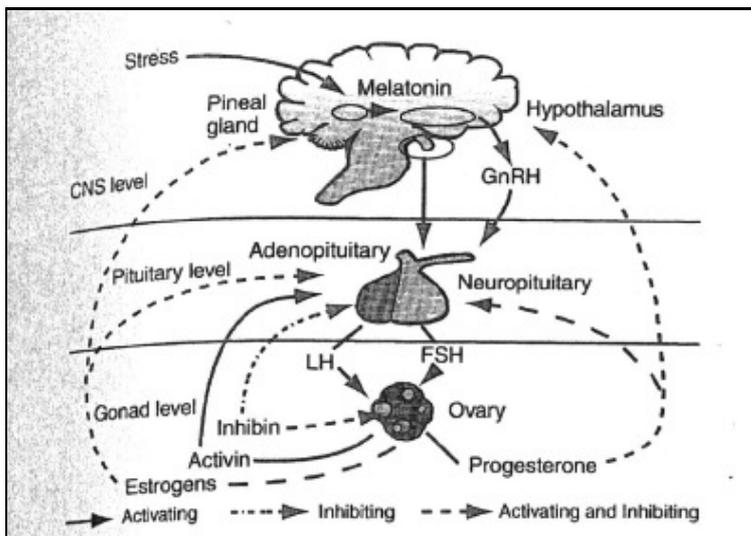
A rendszer szabályozása nagymértékben függ az egyes hormonok visszacsatolásaitól. A granulosa-sejtek aktivitást bocsátanak ki, ami az adenohipofízis serkentése folytán növeli az FSH-t. Az ösztrogenben a növekvő ösztrogen negatívan visszahat mind a hipotalamusz GnRH-termelésére, mind az adenohipofízis FSH-termelésére, miközben jelentősen növeli az LH termelést (LH-csúcs). A granulosa-sejtek által termelt inhibin csökkenti az FSH-t, a domináns tüszők azért nem esnek át atresia-n (tüszők programozott elhalása), mivel időközben érzékenyebbé válnak az FSH-ra. A Gráf-tüszők granulosa-sejtjei ovuláció előtt fogékonyabbak lesznek az LH-ra. Ahogyan az LH növekszik, a granulosa-sejtek továbbra is átalakítják a pregnolont progeszteronná, de az ösztradiol-termelés enyhén csökken ovuláció előtt [Evans, 2007].

Az antrális tüszők ösztrogen-szintézise az ún. „két-sejt” vagy „két-gonadotropin” modell szerint valósul meg, azaz a theca interna és a granulosa-sejtek kooperációján alapul. A theca interna az androgéneket szintetizálja a következő sorrendben: koleszterinből, pregnolont, progeszteront, majd androgéneket állít elő (alacsony LH hatására), a granulosa-sejtek pedig azokat ösztrogénekké alakítják át [Lüllmann-Rauch,

2007]. Ahhoz, hogy a terciér tüszők ösztrogéntermelésre alkalmassá váljanak, mindkét gonadotropin hormonra szükség van tehát, de a döntő szerepet az FSH játssza, mivel ez serkenti az aromatáz-enzimet a granulosa-sejtekben [Evans, 2007].

Az ovuláció után a folluikuláris ösztradiol és az inhibin szintje visszatér a bazális szintre, a granulosa-sejtek tovább növekednek, differenciálódnak és egyre több progeszteront termelnek az LH hatására. A legtöbb fajban ez a folyamat egészen a luteolízisig tart. A magasabb rendű emlősökben a luteolízis a petefészekben végbemenő folyamat, az alacsonyabb rendűekben oxitocin hatására termelődik a luteolizin és az  $F_{2\alpha}$  prosztaglandinok. A progeszteron negatívan hat a GnRH- és a gonadotropin-termelésre [Evans, 2007]. Az adenohipofízis által kiválasztott harmadik gonadotropin a prolaktin, amely elnyomhatja a tüszők fejlődését, valószínűsíthetően aromatáz-gátláson keresztül [Austin és Short, 1984]. A következő ábra illusztrálja a rendszer visszacsatolásait.

5. ábra: Női fertilitás hormonális szabályozása [Evans, 2007]



## 2. Endokrin károsítók

### 2.1 Kezdetek

Éppen 50 évvel ezelőtt jelent meg Rachel Carson nagyhatású könyve, a Néma tavasz [Carson, 1962]. Jubileumi kiadásához Al Gore, az Amerikai Egyesült Államok akkori alelnöke (aki maga is számos kitüntetésben részesült a klímaváltozás elleni harcban betöltött szerepéért) írta az előszót, amelyben azt írja, e könyv nélkül a civil környezetvédelmi mozgalmak talán sohasem szerveződtek volna meg, s az EPA 1970-es felállítása is a könyv megjelenésére vezethető vissza. (Carson sajnos már nem élhette meg, hogy végül elfogadták az elképzeléseit és betiltották a DDT-t (1968-ban elsőként Magyarország [Darvas, 2000].) Csakugyan Al Gore írta az előszót Theo Colborn 1996-ban megjelent *Our Stolen Future* című könyvéhez, melyben a hormonálisan aktív szennyező anyagokkal kapcsolatos hipotézisét, saját szavaival „oknyomozó riportját” publikálta. Colborn könyvének megjelenése óta több mint 15 év telt el, de sajnos az elindított kutatási láz és tudományos vita nem vezetett el olyan jelentős jogszabályi lépésekhez, mint amilyen korábban a DDT betiltása volt.

Colborn számos addig függetlennek tűnő esemény között látta meg a kapcsolatot és elsőként ismerte fel, hogy ezen események mindegyikének háttérében egyetlen, bár meglehetősen komplex hatásmechanizmus, a hormonháztartásra kifejtett károsító hatás áll. A könyvében bemutatott jelenségekkel rámutat, hogy a környezetünkbe kibocsátott vegyi anyagok szerteágazó mechanizmusokkal fejtenek ki hatást a vadon élő fajok és az ember hormonháztartására, végső soron csökkentve azok fennmaradási esélyeit [Colborn et al., 1996].

Hormonhatású szintetikus anyagokról már jóval korábban is beszámoltak. Említésre méltó Edward Charles Dodds brit orvos kutató munkásság, aki az 1930-as években szintetikus úton előállítható ösztrogén után kutatva azonosította a biszfenol-A-t, majd az annál jóval hatékonyabb dietilsztilbesztrolt (DES). A DES-t 40 évig használták szarvasmarhák növekedés-fokozására, ami jelentős környezeti (aktív metabolitok) és humán (húsban és tejben felhalmozódó szermaradék) expozíciót okozhatott, a biszfenol-A expozíciója pedig ennél is jóval nagyobb lehet [McLachlan, 2001]. A DES-t később a humán gyógyászatban is alkalmazták, veszélyeztetett terhesek kezelésére, és

a lány utódokban rosszindulatú elváltozásokat okozott [Bern, 1992]. Környezeti ösztrogénekről először McLachlan számolt be 1980-ban [McLachlan, 1980].

Az endokrin károsító (ED-) hipotézis azonban, valamint maga az elnevezés Colborn-tól származik. 1991-ben prezentálta a tudós közösségnek Wingspread-ben, ahol a résztvevő 21 tudós a következő nyilatkozatot tette (eredeti angol szöveg: I. Füg. /1): „Bizonyosak vagyunk abban, hogy nagyszámú ember által előállított, környezetbe kikerült vegyianyag, és néhány természetes eredetű is rendelkezik az állatok (és köztük ember) endokrin rendszerét károsító tulajdonsággal” [Colborn és Clement, 1992].

Ezt az állítást jelentős számú megfigyeléssel alátámasztották, az általa generált kutatási láz pedig további bizonyítékokhoz vezetett. A feljegyzések elsősorban vadon élő állatokra irányuló ED-hatásról számoltak be. Mivel az eredmények olyan területekről származtak, amelyek esetében jelentős volt az ipari háttérszennyezés, Guillette szerint "ezek az erősen szennyezett területek adnák a pozitív kontrollt egy folyamatban lévő világméretű kísérlethez" [Guillette, 2000]. Evans [2007] arra hívja fel a figyelmet, hogy nem fordítunk kellő figyelmet a házi állatok kitettségére, pedig nem csak a környezeti terheléshez járulnak hozzá, de a táplálkozás útján, általuk a humán expozíció is jelentős lehet. Idetartoznak elsősorban a fitoösztrogének, amelyek sterilitást okoztak háziállatoknál (pl. a szója - *Glycine max*), egyes herefélésegek, vagy a takarmánylucerna - *Medicago sativa*), valamint az állatoknak adott növekedésfokozók (mint pl. a korábban említett DES).

Az élővilág mellett a laboratóriumokban is megjelentek ösztrogén-hatású vegyületek, az egyik első a pH-indikátorként alkalmazott fenolvörös volt (később kiderült, hogy az egyik szennyezője, bisz-(4-hidroxifenol-[2-(fenoxiszulfonil)fenol] metán okozta a megfigyelt ösztrogén-hatást)]. Ezért az 1986 után született, sejt- vagy szervkultúrákon ösztrogénhatásokat vizsgáló publikációknál lejegyzik, hogy fenolvöröstől mentesek voltak az eszközök, amelyeket a kísérletben alkalmaztak [McLachlan, 2001]. Nagyjából egy időben azonosította Soto a p-nonil-fenolt [Soto, 1991] és Feldman csapata a biszfenol-A-t [Krishnan et al., 1993], melyek a laboratóriumban alkalmazott műanyag edényekből oldódtak ki és okoztak ösztrogén-utánzó hatást a kísérleteikben. Soto ösztrogénre érzékeny emberi mellrákból elkülönített (MCF7-) sejtvonalakkal, Feldman élesztőgombákkal (*Saccharomyces cerevisiae*) dolgozott. A biszfenol-A nem csak a

laboratóriumokban, hanem a mindennapi használati tárgyainkban is széleskörűen fellelhető, ami előrevetíti a lehetséges humán expozíció mértékét.

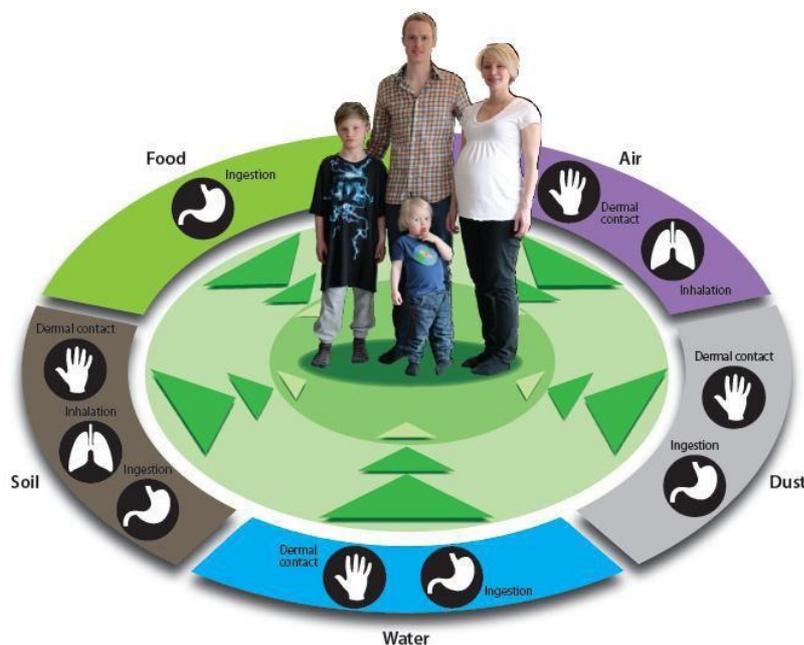
Az első években a kutatások főként a szexszteroidok, és közülük is elsősorban az ösztrogének hatását utánzó (estrogen mimic), vagy gátló xenobiotikumokra irányultak. Később egyre több publikáció számolt be pl. pajzsmirigy-gátló anyagokról (pl. PCB-k és PBDE-k), Guillette [2006] kiemeli a DDT-metabolit p,p'-DDE prosztaglandin-szintézist gátló hatását, amely részben magyarázza a ragadozó madaraknál megfigyelt tojáshéj-elvékonyodást. Mindez arra hívja fel a figyelmet, hogy egyéb hormonhatásokra is ki kellene szélesíteni az ED-hatásokkal kapcsolatos kutatások látókörét a vizsgált mechanizmusokat és végpontokat tekintve [Guillette, 2006]. Ez persze ellentétes azzal a jogszabályi törekvéssel, hogy minél szűkebben, megfoghatóbban, körülírhatóbban definiáljuk a témakört.

Kezdetben cáfolták, hogy az élővilágban leírt események emberekre is hatással lehetnek, később elkezdtek összekapcsolni az ED-hatású xenobiotikumokat különböző emberi jelenségekkel, mint pl. a humán sperma minőségi és mennyiségi romlása [Skakkebaek, 2006], az emlőrák kialakulása [McLachlan, 2001], valamint egyéb nemi szerveket és reprodukciós rendszert érintő születési rendellenességek. A legjobb modellt ennek megalapozására a DES-történet szolgáltatta [Bern, 1992]. McLachlan [2001] szerint, jelentős humán kitétséget okozhatnak a növényvédő szerek, hiszen, azon anyagok, amelyeket a rovarok reprodukciós kapacitásának károsítására hoztunk létre, jó eséllyel hatnak más, nem-célzott fajok sejtdifferenciálódására is. Állítását azzal indokolta, hogy a reprodukció fenntartásában, illetve a sejtdifferenciálódásban résztvevő jelátviteli rendszerek evolúciós szempontból különösen fontos szerepet töltenek be, és ezért széles körben mutatnak hasonlatosságokat (pl. az ösztrogén reprodukciós szerepe azonos minden gerincesben és néhány gerinctelenben).

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) megbízásából készített 'State-of-the-science' dokumentum (az elnevezés a tudomány aktuális állásának áttekintésére utal) [Damstra et al., 2002] szerint tudásunk az ember és az élővilág valódi kitétségéről erősen korlátozott. Elismeri, hogy nagyon szerteágazó a potenciálisan vagy bizonyítottan ED-hatású anyagok köre mind szerkezetileg, mind hatékonyságukat tekintve; valamint kiemeli, hogy nem állnak rendelkezésünkre adatok időbeli vagy

geográfiai trendekről, és az EDC-k környezeti sorsára, terjedésére vonatkozó ismereteink szintén korlátozottak. A dokumentum szerint a legnagyobb kitettséget jelentő expozíciós út az étkezés, de a többi expozíciós utat is vizsgálni szükséges az integrált expozíció-elemzések keretében.

6. ábra: Forrás: Endokrin zavarók expozíciós forrásai [Åke Bergman Exposure to Endocrine disruptors: Which substances from which sources EU Conference on Endocrine Disruptors; Brussels, June 11-12, 2012]



## 2.2 Definíciók

A legelterjedtebb definíciót a Weybridge-workshopon [Weybridge, 1996] fogalmazták meg, melyet 'Az endokrin károsítók hatása az emberi egészségre és a vadvilágra' címmel rendeztek meg 1996. december 2-4. között. Itt a következőképpen definiálták az endokrin károsítókat (eredeti szöveg I. Füg./2.): "exogén anyag, amely káros egészségi hatásokat okoz intakt élőlényen, annak utódján, vagy másodlagosan, (annak következményeként, hogy) megváltoztatja annak endokrin funkcióját."

A WHO korábban említett, 'State-of-the-Science' tanulmánya [Damstra et al., 2002], a következőképpen módosította a Weybridge-definíciót (eredeti szöveg I. Füg./3.): "exogén anyag vagy keverék, amely módosítja az endokrin rendszer

*funkcióját(-it), következésképpen káros egészségi hatást okozva intakt élőlényben, annak utódjában, vagy (szub-)populációjában.*" Bevonta tehát a definícióba a keverékeket, valamint a (szub)populációkat, megteremtve ezzel a lehetőséget, hogy a definíciót ne csak humán, hanem ökotoxikológiai szempontból is alkalmazni lehessen (különbségek jelölése aláhúzással).

Ezt a definíciót fogadja el az Európai Bizottság megbízásából készült 2011-es State-of-the-Art tanulmány is [Kortenkamp et al., 2011], amely kifejezetten azzal a céllal készült, hogy a WHO/IPCS-elemzés megjelenése óta eltelt mintegy 10 évben bekövetkezett tudományos fejlődést áttekintse és értékelje. Ez a tanulmány azonban már több problémát megfogalmaz a definícióval kapcsolatban. Ezeket többnyire arra vezeti vissza, hogy a WHO/IPCS definíció tudományos szempontból közelítve határozza meg az endokrin károsítók fogalmát, ami nem egyezik meg a jogi szempontokkal, nem eléggé megfoghatóak ugyanis az alkalmazott fogalmak. Rögtön problémákba ütközünk, amikor pl. az *endokrin rendszert* szeretnénk definiálni, ugyanis egyrészt a tudományos előrehaladással az endokrin-, az ideg- és az immunrendszer határai összemosódni látszanak, másrészt nem tisztázott, hogy csupán a gerincesek endokrin rendszerére szorítkozzunk, avagy az egész élővilágra). További nehézséget jelent a *káros hatás* fogalmának meghatározása; de problémákat okoz a *következésképpen* szó használata is, hiszen a hatásmechanizmus ismeretének hiánya nem teremti meg a kapcsolatot az adott anyag és a megfigyelt végpontok között. Ráadásul koncentráció-függő hatás-válasz függvény lenne a cél, ami még nehezebbé teszi a feladatot [Kortenkamp et al., 2011].

A tanulmány készítése során számos interjút készítettek a téma kutatóival, és arra a kérdésre, hogy hiányosságaival együtt érdemes lenne-e jogszabályba építeni a jelenlegi WHO/IPCS definíciót. A megkérdezett kutatók egyik része azt felelte, hogy a jelenlegi formában túl részletes információt követel meg a végpont és a hatás között, ami hátráltatná a jogi következményeket. Más szakértők a definíció módosítása ellen szólaltak fel, hiszen ez egy konszenzuson alapuló definíció, amelyet az elmúlt évtizedek alatt számos nemzetközi eseményen megvitattak.

Fontos megemlíteni és tisztázni a különbséget a témával kapcsolatosan az irodalomban fellelhető, következő fogalmak között: míg az *endocrine disruptor* vagy

EDC elnevezés negatív jelentéstartalommal, a HAA (*hormonally active agent*), azaz *hormonálisan aktív anyag* elnevezés csak arra utal, hogy az adott anyag a hormonrendszert befolyásolni képes, tehát ez egy semlegesebb (politikailag korrekt) fogalom. Ez utóbbit elsősorban az amerikai National Research Council alkalmazza szívesen [Evans, 2007]. A magyar szakirodalomban nincs egyértelmű megfelelője, a REACH az *endokrin rendszert károsító tulajdonságokkal rendelkező anyagok* (those having endocrine disrupting properties) nem éppen rövid elnevezést alkalmazza [European Parliament and Council, 2006]; a peszticid rendelet pedig a *hormonrendszert károsító tulajdonságú anyagnak* [European Parliament and Council, 2009] fordította. Egyes szerzők a *hormonmoduláns* kifejezést részesítik előnyben [Darvas, 2007], ez talán inkább a HAA-hoz áll közelebb. A legtöbben az angol nomenklatúrát követik, és EDC-ként hivatkoznak rájuk [Székács, 1999]. McLachlan összefoglaló jellegű cikkében [2001] felsorolja az irodalomban fellelhető *xenoestrogen*, *environmental hormones*, *environmental signals* kifejezéseket is.

### **2.3 Eltérések a hagyományos toxikológiától**

Sheldon Krimsky tette fel a kérdést 2001-ben az ED-tézis ismeretelméleti vizsgálata című cikkében [2001], hogy vajon "az ED-anyagok a vegyianyagok által kiváltott megbetegedések új etiológiáját (kóroktanát) szimbolizálják, vagy pedig a hagyományos kémiai toxikológia variációit?" Publikációjában fontos kérdéseket fogalmaz meg, például, hogy pontosan mitől új ez a terület, mi az, amit a hagyományos toxikológiai protokoll nem vizsgált, amivel tehát át kell alakítani, ki kell egészíteni a vizsgálati rendszereket ahhoz, hogy az ED-alapú káros hatások ne kerüljék el a figyelmünket a vegyianyagok, növényvédőszer, gyógyszer engedélyezésénél. Hiányolja az "elméleti keretrendszert, amely a tapasztalati eredmények koherenciáját megteremtené". Számos tényező nehezíti ezen kérdések megválaszolását, amelyek az EDC-k természetéből fakadnak.

Gore és munkatársai szerint [2006] a legnagyobb nehézséget az endokrin zavaró anyagok tanulmányozása során a hatásmechanizmus komplexitása jelenti. Ugyanaz az anyag a szervezeten belül több célsejtre is hatással lehet, lehet például ugyanaz az EDC agonista egy adott hormonra nézve, és antagonistája egy másikra. Különböző

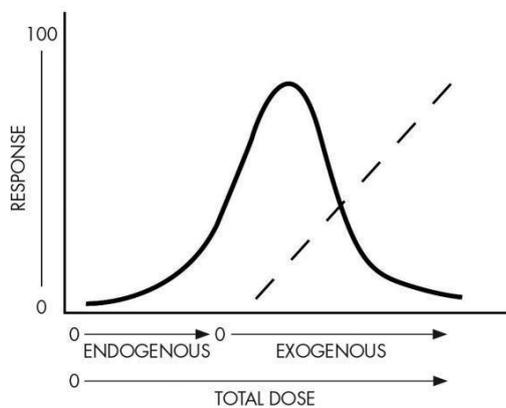
rendszerekben más hatásos dózistartományban, különböző szövetekben eltérő módon fejthetik ki hatásukat. A már alaposan megismert sejtmag receptor szupercsalád képviselőin (ösztrogén, androgén és pajzsmirigyhormon) túl kapcsolatba léphetnek más szteroidok és neurotranszmitterek membrán receptoraival is. Bizonyos EDC-k hatással lehetnek hormonok metabolizmusát vagy bioszintézisét szabályozó enzimrendszerekre, sőt azok visszahathatnak rájuk. Ezen többszörös hatásoknak a kombinált eredményének interpretálása nehézségekbe ütközhet; Gore és munkatársai szerint összetéveszthető a teszt variabilitásával. Végül pedig, a vizsgálati egyed állapota is befolyásolhatja a kimenetet [Gore et al., 2006].

A következő nehézséget az jelenti, hogy az ED-hatású anyagok dózistartománya eltér – alacsonyabb – a hagyományos toxikológiában megszokottól. Az EPA által felkért National Toxicology Program (NTP) panel ezt az alacsony dózisszintet a következőképpen határozta meg: a humán expozíció nagyságrendje, vagy a hagyományos toxikológiai vizsgálatok nagyságrendje alatti (a hagyományos toxikológiai protokoll környezeti anyagok esetében jellemzően nem vizsgálta a mg/kg alatti tartományt) [Vandenberg et al., 2012]. A korábbi epidemiológiai adatok jellemzően magas kitettséggel hozták összefüggésbe a betegségeket, de a közelmúltban olyan eredményeket publikáltak, amelyek a környezetileg releváns alacsony koncentrációk és betegségek között teremtettek kapcsolatot [Vandenberg et al., 2012]. Amellett, hogy a vizsgálati útmutatók nincsenek erre a tartományra validálva, az alacsony dózison folytatott kísérletek számos technikai nehézséget okoznak a kísérletet végzőknek, és tervezőknek, ilyen például a kis mennyiségek dozírozása, az eredmények robusztussága és reprodukálhatósága [Vandenberg et al., 2012].

Az alacsony dózis tartomány magyarázata a hormonok természetes viselkedésében keresendő, ugyanis a hormon célsejtje már rendkívül alacsony hormonkoncentrációra is válaszol (a szabad hormon fiziológiás plazmakoncentrációja általában pM-nM nagyságrendbe esik) [Lüllmann-Rauch, 2007]. Vandenberg és munkatársai szerint [2012] ez a következőkkel magyarázható: kifejezetten magas kötési affinitás a megfelelő molekulához; a receptor telítettség nem lineáris függvénye; nem lineáris kapcsolat a telített receptorok és a biológiai hatás között (előbb a válasz telítettsége figyelhető meg, és azután a receptoroké); egyes hormonokat egyetlen mirigy

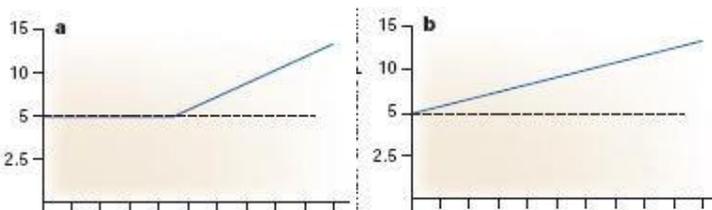
választ ki és hatásukat mégis a teljes szervezetben kifejtik; egyes hormonok kiválasztása ritmikus és azok frekvenciája és amplitúdója határozza meg a választ. Hozzá kell tenni, hogy az exogén hormonok esetében (amilyenek az EDC-k), a dózis mindig hozzáadódik az endogén hormon koncentrációjához, mivel a már meglévő endogén hormon hatását modulálja, így sohasem beszélhetünk nulla dóziszról. Ez elvezet minket a küszöbérték és a dózis-válasz görbe kérdéseire [Vandenberg et al., 2012].

**7. ábra Endogén és exogén hormonszint [Vandenberg et al., 2012]**



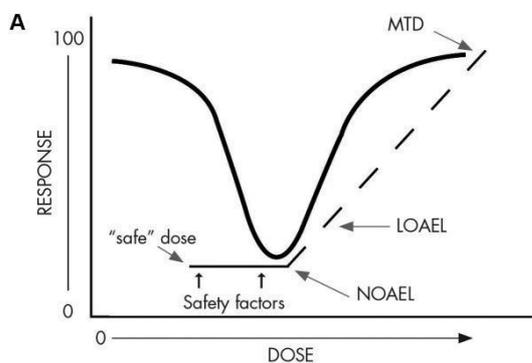
A hagyományos toxikológia és minden jelenleg érvényben lévő expozíciós standard a monoton dózis-válasz görbét veszi alapértelmezettnek [Vandenberg et al., 2012]. Mutagén karcinogének esetében ez a görbe küszöbérték nélküli, az összes többi anyag esetében 'még nem veszélyes küszöbértéket' feltételez; a vizsgálatok célja pedig ennek a küszöbértéknek, azaz a NOAEL-nek (No observable adverse effect level) a meghatározása.

**8. ábra: Tradicionális dózis-válasz görbék [Calabrese, 2003]**



Mivel mindkét esetben monoton növekvő függvényről beszélünk, a vizsgálatnál alacsonyabb koncentráció nem rejthet figyelmen kívül hagyott kockázatot. Azonban az ED-hatású anyagok esetében gyakran nem monoton dózis-válasz görbéket (NMDRC, azaz non monotonic dose-response curve) figyeltek meg, pl. U- vagy inverz U-alakú válaszokat. Ugyanakkor, az endokrinológusokat nem lepi meg a nem monoton dózis-válasz görbe, mivel a hormon rendszerben ezek szokványosak [Gore et al., 2006].

9. ábra Dózis-válasz görbe és biztonsági küszöb [Vandenberg et al., 2012]

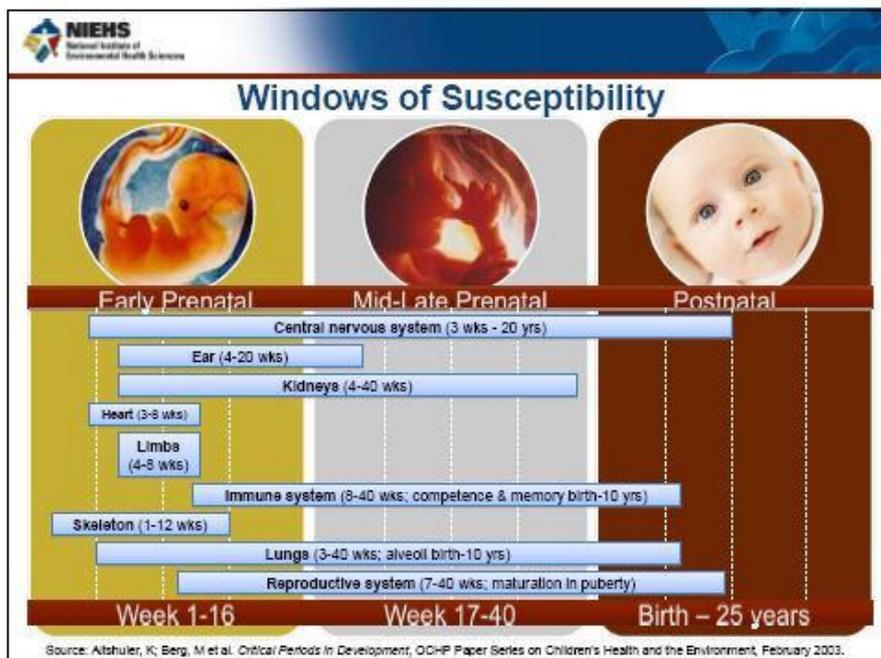


Vandenberg és munkatársai szerint a következő hormonokra jellemző jelenségek járulhatnak hozzá az NMDRC kialakulásához: különböző dózis-válasz görbék összegződése (ha pl. egy EDC különböző receptorokra is hat, de azokhoz eltérő affinitással kötődik, akkor más dózisoknál más-más hatásokat fogunk megfigyelni); receptor down-regulation (a megkötődött receptornak előbb-utóbb deaktiválódnia kell); deszenzibilizáció; versengés a receptorok között, és végül a feedback mechanizmusok (melyek során az adott hormon növekvő dózisa negatív visszacsatolás útján kioltja a stimuláló hatást).

Az endokrin zavaró anyagok nem monoton dózisgörbéjét gyakran magyarázzák, vagy hozzák összefüggésbe a radiológiában jól ismert 'hormézis' jelenségével [Calabrese, 2003]. Fontos azonban megkülönböztetni mind az alacsony dózist, mind a NMDRC-t a hormézis elméletétől, amely egy bizonyos típusú választ jelent, ahol a görbe bizonyos pontjai előnyös vagy hátrányos hatást interpretálnak a biológiai vagy ökológiai kontextus alapján. Ezzel szemben a dózis-válasz görbe irányából nem lehet következtetéseket levonni a hatás káros vagy előnyös mivoltára nézve [Cook és Calabrese, 2006; Vandenberg et al., 2012].

További alapvető eltérés, amit az ED-hatású anyagok értékelésénél figyelembe kell venni McLachlan szerint, hogy ún. fejlődési modellt kell alkalmazni (szemben a toxikológiában hagyományos karcinogenikus modellel), emellett, hogy késleltetett zavarokat okozhatnak [McLachlan, 2001]. Hasonlóan olvashatjuk Vandenberg és munkatársai cikkében, [2012], hogy az EDC-expozíció a fejlődés során szerveződési (organizational) változásokat okozhat, olyan permanens hatásokat, amelyek esetenként csak késői felnőtt korban manifesztálódnak. Ennek egyik oka, hogy - szemben az érett hormonrendszerrel - a magzati hormonrendszer nem képes fenntartani a homeosztázist, ezért EDC-expozíció esetén tartósan ki van téve az alacsony dózisú hormonnak [Vandenberg et al., 2012]. Az ED-zavaró anyagok vizsgálatakor ezért kritikus, hogy adott végpontot a fejlődés mely szakaszában vizsgálunk, különösen fontos tekintetbe venni az egyes érzékenyebb időszakokat. Gore szerint a legsérülékenyebb időszakok a prenatális és a korai posztnatális periódusok, mivel ekkor változnak leggyorsabban a szervek és az idegrendszer. Szintén érzékeny a pubertás és a pre-menopauzális időszak, mivel ekkor jelentős hormonális változások mennek végbe [Gore et al., 2006].

**10. ábra: Érzékeny prenatális fejlődési szakaszok [Forrás: Linda S. Birnbaum EU Conference on Endocrine Disruptors Monday, June 11, 2012]**



Az endokrin-zavaró anyagok sajátos természete azt eredményezte, hogy a tudományterületen a publikált eredmények sokszor számottevő ellentmondásokat hordoztak. Ehhez vélhetően jelentős mértékben hozzájárult a terület multidiszciplináris jellege is, amely a kísérletek megtervezésekor, elvégzésekor és kiértékelésekor egyidejű szakértelmet kívánna az endokrinológia, toxikológia, szaporodásbiológia, ökotoxikológia, ökológia, biológia, zoológia, vegyészet, stb. területeiről. A szituációt kiválóan szemlélteteti, hogy vom Saal elemzése szerint 2004 decemberéig mintegy 115 *in vivo* vizsgálatot publikáltak a biszfenol-A alacsony dózisú hatásáról, amelyek közül 94-ben számoltak be szignifikáns hatásról a következő megoszlás szerint: míg az ipar által támogatott vizsgálatok egyike sem talált szignifikáns hatást, az államilag finanszírozott vizsgálatok 90%-a igen [vom Saal és Hughes, 2005].

Az NTP független elemzésében áttekintette a BPA-ról publikált ellentmondásos eredményeket, és végeredményben azon vizsgálatokat is helytállónak minősítette, amelyek találtak, és azokat is, amelyek nem írtak le szignifikáns hatást. Feltártak azonban számos különbséget a vizsgálatok között, amelyek hozzájárultak az eltérő eredményekhez: az **állatok éltrendjében** való különbség, különböző **törzsek** alkalmazása, eltérő **expozíciós** út, **vizsgálati anyag** esetleges **szennyezettsége**, állatok **tartási** és **pároztatási körülményei**, stb. A tanulmány elismerte ugyan, hogy számos EDC-nek van hatása alacsony, környezetileg releváns dózisban, de ennek toxikológiai relevanciáját tisztázatlannak találta. Ugyanakkor azt is kijelentették, hogy a „jelenlegi vizsgálati paradigmát, amelyet reprodukív és fejlődési toxicitás ellenőrzésére használnak, felül kellene vizsgálni” [NTP, 2001].

A BPA körül zajló heves viták miatt 2010-ben vom Saal és több mint 20 további az ED tudományterületen dolgozó neves tudós (köztük Soto, Crain) jelentetett meg publikációt, amiben a nem helytálló kutatási eredmények elkerülése végett két alapvető követelményt fogalmaztak meg az endokrin-zavarókkal történő vizsgálatok végzésével szemben. 1, Meg kell határozni a **modellállatok érzékenységét** a vizsgálatok tervezése előtt megfelelő pozitív kontrollal felállított dózis-válasz görbével; 2, **Megfelelő pozitív kontrollt** (pl. ösztrogén hatás esetén EE) kell vizsgálatba állítani [vom Saal et al., 2010].

Hasonló nagyszabású publikációt jelentettek meg az endokrin-zavarók témakörében tapasztalt ellentmondások tisztázásának céljával Vandenberg, Colborn,

Hayes, Soto, vom Saal, Zoeller és további szakemberek 2012-ben. Írásukban az alacsony dózistartományra és a nem monoton dózis-válasz görbére helyezték a hangsúlyt, áttekintve gyakorlatilag a teljes ED-irodalmat (több mint 800 hivatkozás). Végeredményben arra a következtetésre jutottak, hogy egy (vagy néhány) negatív eredmény nem közömbösítheti a pozitív eredmények sokaságát. Az ellentmondások csökkentése végett az előzőekben említetteken túl a következő további paraméterek standardizálását javasolják: **negatív kontroll**; a **pozitív kontroll** kiválasztásánál, annak hatásos **expozíciós útja és potenciálja** a dózisok megállapítása során. A megfelelő kísérleti állat (fajának és törzsének) kiválasztásával kapcsolatban ED-vizsgálatokra **megfelelőbbnek** találták a **genetikailag diverz törzseket** [Spearow et al., 1999]. További javasolták figyelembe venni az eredmények értékelésekor a **szezonális változásokat és az expozíció időzítését**. A bemutatott példák alapján bizonyítottnak találják, hogy az alacsony dózisú hatásokat alapértelmezettnek kellene tekinteni az ED-hatású anyagoknál. Bizonyítottnak találják továbbá azt is, hogy esetükben nem létezik küszöbérték. Levonják a következtetést, hogy az NMDRC miatt a toxikológiai vizsgálatok során magas dózsból megállapított biztonságos dózis nem biztosít veszélytelenséget az ennél alacsonyabb, nem vizsgált dózisok esetében. Ráadásul, mivel a standard protokoll a NOAEL-ből vagy LOAEL-ből egy (3-1000) biztonsági faktor alapján kalkulálja a referencia dózist, azt (magát a biztonságosnak tekintett referencia dózist) nem is vizsgálják. Javasolják ezért az ED-k és azok valós humán kockázatainak alaposabb megértése érdekében a **dózisok számának növelését** a következők szerint: az alacsony dózis vizsgálata során a legmagasabb legyen a NOAEL, a legalacsonyabb a környezetileg releváns dózis (amennyiben az ismert), valamint egy vagy néhány dózis a kettő között a dózisválasz görbe karakterisztikájának feltérképezésére. Így mindösszesen 5-8 dózis vizsgálatára lenne szükség a hagyományos hárommal szemben. Mivel ez a feláldozott állatok számának jelentős emelkedésével járna, a szignifikáns hatás keresése helyett ezért a power analysis alkalmazását javasolják, amely egyébként is megfelelőbb, ha sokrétűbb végpontokat szeretnénk elemezni [Vandenberg et al., 2012]. Érdemes itt megjegyezni, hogy Hecker és Hollert szerint [2011] a US EPA vizsgálati rendszerének első-lépcsős vizsgálati csomagjának elvégzése mintegy 130 patkány, 30 ebihal és 60 hal életének

feláldozásával jár. Szerintük az érintett anyagok száma, amelyek végső soron tesztelésre kerülnek majd, nagyjából 80 000-re tehető.

Az Endocrine Society publikált egy nyilatkozatot, amiben sürgeti a kockázatértékelést végző szakembereket, hogy éljenek a társaság tagjainak szakértelmével, mikor új megközelítést dolgoznak ki az EDC-k kockázatértékelésére az endokrinológia törvényszerűségei alapján [Diamanti-Kandarakis, 2009]. Ennek végrehajtása valódi paradigmaváltást hozna a toxikológiába. Ennek a nyilatkozatnak a támogatására 8 társaság írt levelet a Science-nek 2011 márciusában, melyek együttesen mintegy 40 000 tudós és orvos támogatását jelenti [American Society of Human Genetics et al., 2011].

#### **2.4 Reprodukció károsításhoz való viszony**

Az endokrin károsító anyagok vizsgálatához a jelenlegi toxikológiai vizsgálatok közül a szaporodásbiológiai tesztek állnak a legközelebb. Ennek egyik kézenfekvő oka, hogy talán a szaporodás során a legintenzívebb a biológiai jelátvitel, hiszen három élő organizmus „vesz részt” ebben a komplex folyamatban. „A reprodukciós képesség nagymértékben függ ezen jelátviteli útvonalaktól – beleértve a géntranszkripciót is –, ezzel magyarázható a folyamat fenyegetettsége a xenobiotikumok által a kommunikációra kifejtett káros hatások tekintetében. Evans [2007] szerint a legtöbb reprotoxikus anyag hatással van valamilyen módon a hormonrendszerre”.

A szaporodásbiológiai vizsgálatok végzése a *thalidomide* katasztrófát követően vált kötelezővé. A szaporodásbiológiai vizsgálatok követelményrendszerét úgy építették fel, hogy lehetőség szerint az utódot érintő összes lehetséges károsodás az ivarsejtképzéstől az ivarérett kor eléréséig az állatkísérletek során vizsgálatra kerüljön [Druga, 2010]. Szintén nem ismeretlen a fejlődési modell alkalmazása ezen a területen, a fentiek alapján mégis felmerül, hogy az ED-károsító anyagok speciális viselkedésük és jellegzetességeik okán esetleg nem akadnak fenn ezeknek a teszteknek a szűrőjén. Az ismétlések elkerülése végett csak érintőlegesen említem a legfontosabb érveket: alacsony dózis, érzékeny periódusok, eltérő érzékenységű törzsek. A patkány (és az egér is) mind a prolaktinszint, mind az ösztrogén-progeszteron arány változásaira igen érzékeny, így ilyen anyagok vizsgálatára nem is lenne alkalmas, azonban mégis

használják, mert a nyúl nagyon drága és szaporodási ciklusát sem ismerjük eléggé. A rágcsálók ezen tulajdonságát ezzel szemben jól ki lehet használni éppen az ösztrogén-antiösztrogén hatású/mellékhatású vegyületek vizsgálatában [Druga, 2010].

Az elemző rész szolgál majd arra, hogy ennek a kérdésnek bizonyos tekintetében a tükörképével foglalkozzon, vagyis, hogy azon anyagokat, amelyek hormonrendszert zavaró hatásuk következtében terméketlenséget okoznak, képes-e a jelenleg tervezett ED-vizsgálati rendszer kiszűrni.

### 3. Vizsgálati rendszer bemutatása

Az OECD 1998-ban felállította nemzetközi szakemberekből álló munkacsoportját, amelynek feladata az ED-anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó útmutatók, az ún. Endokrin zavaró anyagok Szűrésére és Vizsgálatára vonatkozó Konceptcionális Keretprogram (OECD Conceptual Framework for the Screening and Testing of Endocrine Disrupting Chemicals, továbbiakban CF) kidolgozása volt. Az ED-anyagok meghatározására a WHO definícióját alkalmazzák, tehát alapfeltétel, hogy a hatás káros legyen, és ennek meghatározását *in vivo* eredményhez kötik. A CF-et egyfajta eszköztárnak kell tekinteni, a benne foglalt vizsgálatokat nem szükséges sorra elvégezni az elsőtől az ötödik szintig, hanem az aktuális kérdés és a rendelkezésre álló információk alapján kell őket kiválasztani és elvégezni, az elemzés során „weight-of-the-evidence” megközelítést alkalmazva. Egyetlen vizsgálat ugyanakkor nem elegendő az ED-tulajdonság megerősítésére, avagy kizárására. Az alacsonyabb szinteken a pozitív eredmény lehetséges ED-hatást jelent, segít a magasabb rendű, laborállatokon végzett vizsgálatok megtervezésében. Negatív eredmény esetében csak a vizsgált mechanizmus vonatkozásában, csak a vizsgált expozíciós úton, stb. vonható le következtetés. Az öt különböző szint eltérő biológiai komplexitásnak felel meg, az *in vitro* sejtvonalaktól az intakt élőlényeken végzett vizsgálatokig, az *in vivo* tesztek kiterjednek toxikológiára és ökotoxikológiára is. Expozícióval ugyanakkor nem foglalkozik a CF, sőt csak a következő endokrin hatásokra terjed ki: ösztrogén receptor, androgén receptor, pajzsmirigyhormon receptora által közvetített hatások, valamint a szteroidogenezis zavarása. Ennélfogva vannak olyan egyelőre kevésbé értett hormonális hatások, amelyeket nem feltétlenül mutatnak ki a tesztek, továbbá egyelőre vizsgálják azt is, hogy a hosszú-távú ED-tesztek kimutatják-e az **epigenetikus** úton ható EDC-ket [OECD, 2010]. A keretprogram jelenlegi formájában nem végleges, számos teszt validálása még folyamatban van, az egyes szinteket az ott szereplő vizsgálatokkal a II. Függelék tartalmazza.

### **3.1 Az egyes szintek bemutatása**

#### **3.1.1 1. szint: Válogatás és rangsorolás a rendelkezésre álló információk alapján**

Az anyagok értékelését minden esetben a rendelkezésre álló információk összegyűjtésével kell kezdeni. Hasznosnak bizonyulhatnak a fizikai-kémiai tulajdonságokra (pl. molekulatömeg, reakciókészség, illékonyosság), a környezeti sorsra (biodegradálhatóság), a humán és élővilág kitettségére vonatkozó adatok (gyártási mennyiség, kibocsátások, felhasználások), valamint meglévő toxikológiai és ökotoxikológiai eredmények, azok dózissai, toxikokinetika. Ezek alapján kell eldönteni, hogy milyen tesztek kell elvégezni, emellett hozzájárulnak a többi teszt interpretálásához is. Erre a szintre tartoznak még a (Q)SAR-modellekkel nyerhető adatok is.

#### **3.1.2 2. szint: Mechanisztikus információt szolgáltató *in vitro* tesztek**

***ER, AR, TR receptorkötési vizsgálatok, Transzkripció aktiválás (TG 455), Aromatáz és szteroidogenezis esszé, AhR (aryl hydrocarbon) receptor felismerési/kötési vizsgálat, Nagy teljesítményű előszűrések, Pajzsmirigy funkció, Hal hepatocita vitellogenin esszé***

A veszély detektálására szolgáló szűrővizsgálatok tartoznak ide elsősorban, amelyek hozzájárulnak a lehetséges hatásmechanizmus (MOA, mechanism of action), káros kimenetű útvonalak (AOP, adverse outcome pathways) feltárásához, prioritások megállapításához, és általában a „bizonyítékok súlya” értékeléshez. Az itt található *in vitro* esszék, többnyire hatékonyságra vonatkozó adatot szolgáltatnak (pl. kötési affinitás), figyelembe kell venni azt is, hogy van-e előtte metabolizáló rendszer. Ugyan hajlamosak fals pozitív választ nyújtani, de ez összhangban van a kockázat minimalizálásával. A CF-be foglalt jelenlegi *in vitro* tesztek többnyire emlős-eredetűek, ezeknek nem emlősökre történő extrapolációja azonban megfelelő körültekintéssel lehetséges, ugyanis ezek a rendszerek sokszor genetikailag erősen konzervált hormon-receptorokra, vagy kulcs enzimekre épülnek, amelyek megegyeznek minden gerincesben. Néhány (Q)SAR modell ezen a szinten is alkalmazható.

### **3.1.3 3. szint: Egyetlen mechanizmusról és hatásáról információt nyújtó *in vivo* tesztek**

#### ***Uterotróp- (TG 440) és Herschberger-teszt (TG 441), Nem-receptor által közvetített hormonfunkció, Hal vitellogenin teszt***

Ezek a lehetséges ED-hatásra irányuló *in vivo* szűrő tesztek még mindig csupán kvalitatív választ nyújtanak: képes-e az adott anyag kölcsönhatásba lépni az ösztrogén-, androgén, vagy pajzsmirigy hormon receptorral, illetve a szteroidogenezissel (léteznek egyes nem receptorális folyamatok is). A veszély detektálására alakították ki őket, ezért az érzékenységük szándékosan magas. Általában rendelkeznek metabolikus aktiválással (ami a legtöbb *in vitro* tesztből hiányzik), jellemzően rövid lefutású tesztek kevés számú dózis-szinttel. A pozitív eredmény lehetséges káros hatást jelez előre a szaporodásbiológiai vizsgálatokban, melyek a 4-5. szintek részét képezik, valamint bizonyos esetekben fejletlen egyedeken. Pozitív eredményt általában a nemi szervek súlyában vagy fejlődésében bekövetkező szignifikáns változás jelenti.

### **3.1.4 4. szint: Több folyamatról információt szolgáltató *in vivo* tesztek**

#### ***Kiterjesztett OECD 407-es vizsgálat, Nőstény és hím pubertás teszt, Felnőtt intakt hím vizsgálat, Hal gonád kórszövettan, Kétéltű (béka) metamorfózis esszé***

Ezek a tesztek alaposabb vizsgálatra is lehetőséget adnak fejlődő vagy fejlett élőlényben, mivel egynél több ED-hatásra érzékenyek. Apikálisak (expozíció empirikusan ellenőrizhető kimenetele), ezáltal alkalmasak veszély és kockázat értékelésre egyaránt, amihez hozzájárul az is, hogy egyes vizsgálatokból kiderül, az endokrin rendszerre kifejtett hatások az érzékenyebbek vagy az általános toxicitás. Alacsonyabb dózisszám esetén ugyanakkor kevésbé pontos információt szolgáltatnak a NOAEL megállapításához. Bár az intakt élőlény alkalmazása lehetővé teszi a normál fiziológiás körülmények tanulmányozását, a hormonális folyamatokra jellemző kompenzációs mechanizmusok miatt, egyes esetekben ezek a tesztek kevésbé érzékenyek, mint a 3. szint vizsgálatai.

### **3.1.5 5. szint: In vivo tesztek, amelyek ED- és más hatásokról is adnak információt**

**1-generációs vizsgálat (kiterjesztett TG 415), 2-generációs vizsgálat (kiterjesztett TG 416), Szaporodásbiológiai szűrővizsgálat (kiterjesztett TG 421), Egyesített 28 napos/reprodukciós szűrő vizsgálat (kiterjesztett TG 422), Részleges és teljes életciklus esszék (hal, madár, kétélű, gerinctelen - fejlődési és reprodukciós)**

Az 5. szinthez tartozó vizsgálatok különösen jól használhatók kockázatértékeléshez, mivel a dózis-válasz görbe felállításában is segítenek. A patkányokon végzett vizsgálatok, valamint az életciklust teljesen vagy részlegesen lefedő, halakon, kétélűeken és madarakon végzett vizsgálatok során megfigyelt hatások jelezhetik, hogy az endokrin rendszer is érintett. Még az erre a szintre tartozó vizsgálatok közül is csupán a két-generációs vizsgálat az, amely a korai (szaporodásbiológiai) öregedést kivéve minden egyéb ED-végpontot feltár. Az ezen a szinten lévő ökotoxikológiai vizsgálatok olyan végpontokat foglalnak magukba, amelyek végső soron populáció-károsodáshoz vezetnek.

## ELEMZŐ RÉSZ

### 4. Fertilitást károsító hatásmechanizmusok

Munkám során az első kérdés, amire választ kerestem, az volt, hogy egyáltalán foglalkoznak-e a CF keretein belül a fertilitás témakörével, szerepel-e a keretprogram céljai között a fertilitást zavaró anyagok kiszűrése? Az EU State-of-the-Art tanulmánya [Kortenkamp et al., 2011] röviden áttekinti ezt a kérdést, abból kiindulva, hogy az endokrin zavaró anyagok talán a leghatékonyabban a reprodukciós folyamatokba tudnak beavatkozni, a három élőlény között végbemenő intenzív jelátvitel megzavarásával, a szaporodásbiológiának pedig meghatározó része a termékenység épsége. Bár minden termékenységgel és terhességgel kapcsolatos végpont esetén nehézséget okoz az apai és anyai eredetű expozícióból eredő hatások elhatárolása, a tanulmány külön tárgyalja az apai és anyai expozíció hatását. Elsősorban azonban az adott folyamathoz tartozó biológiai jelenségek részletes áttekintésére szorítkozik (ennek lehetséges oka, hogy az utóbbi években a tudományos ismeretek jelentősen bővültek), emellett a szakirodalom áttekintése segítségével megkísérli megalapozni az ok-okozati kapcsolatot a bemutatott kóros jelenségek, és azokat potenciálisan kiváltó vegyi anyagok között. Nem foglalkozik azonban a tanulmány részletesen a fertilitásra káros anyagok detektálásával a vizsgálatok szintjén.

Vizsgálatom során ezért áttekintem, melyek lehetnek azok a hatásmechanizmusok, amelyek által az endokrin zavaró anyagok káros hatást fejthetnek ki a fertilitásra. Összevetve az OECD CF tesztjeivel, megkísérlem kiszűrni, ezek közül mely hatásokat vizsgálja közvetlenül. Majd annak elemzése következik, hogy a CF mely vizsgálatai érintenek olyan végpontot, amely a fertilitás vizsgálatokor elengedhetetlen. Végezetül az így feltárt vizsgálati módszerek részletes áttekintése következik, mindvégig szem előtt tartva a CF lépcsőzetes megközelítését. Céloom annak megállapítása, hogy a fertilitásra káros anyagok vajon fennakadnak-e az OECD által kialakított vizsgálati rostán.

#### 4.1 Hormonok/receptorok

A termékenységet megzavarására a legkézenfekvőbb a receptorok szintjén történő beavatkozás. Amennyiben áttekintjük a 1.2 fejezetet, kiderül, hogy a fertilitás szabályozásában legalapvetőbb szerepet játszó hormonok az ösztrogének, androgének, az LH/ICSH, az FSH, és a progeszteron (utóbbi nők esetében). Jelentős, közvetlen hatása van még a prolaktinnak, és a TSH-nak is a folyamatra; továbbá az utóbbi időben az AhR-nek is számottevő szerepet tulajdonítanak a petefészek, és általában a női szaporodásbiológia épségével kapcsolatban [Kortenkamp et al., 2011]. A legkézenfekvőbb megoldást ennek vizsgálatára az *in vitro* receptor-kötési vizsgálatok nyújtják. Minthogy azonban az *in vitro* rendszerek általában egyszerűsített vagy mesterséges körülményeket reprezentálnak, nem tükrözik egy élőlény komplexitását, annak visszacsatolásaival, a különböző biológiai útvonalak közötti áthallásokkal, metabolizmussal, stb., az így nyert információ inkább kvalitatív (kötődik - nem kötődik), ezért ezek a tesztek nyújtják a legkorlátozottabban felhasználható eredményt. A CF-ben szereplő *in vitro* tesztek vizsgálják az androgén- és ösztrogén-receptorokhoz való kötődést, nem tudják azonban megkülönböztetni az agonista és antagonistá hatást. A TG 455 már megállapítja az ER-hez kapcsolódó riporter gén aktivitását is, valamint közvetve kimutathatja az AhR-receptor aktiválását, de ez a vizsgálat még validálás alatt áll. A H295R szteroidogenezis teszt kimutatja az ösztradiol és tesztoszteron szintézis gátlását és indukálását, az aromatáz teszt pedig az aromatáz (CYP19) enzim aktivitását és gátlását. A pajzsmirigy hormon szintjében végbemenő változást jelenleg csak *in vivo* tesztek mutatják ki, ahogyan az többi felsorolt hormon szintje is mérhető a szérumban. Érdemes azonban itt megemlíteni azt a szakemberek által gyakran emlegetett gyakorlati problémát, hogy bár az irányelvek sokszor számos laborvizsgálatot írnak elő *in vivo* tesztek során, a laborállatok véreinek mennyisége azonban erősen behatárolja a lehetőségeket, különösen, ha bizonyos értékek folyamatos monitoringjáról van szó. Az *in vivo* vizsgálatok az egyéb, nem receptorok útján végbemenő hatásokat is kimutathatják, mint pl. az adott hormon termelődése, metabolizációja, transzportfehérjékhez való kötődés, stb. Azonban éppen az ezen hatások közötti komplex kiegyenlítő mechanizmusok segítségével el is fedhetik egymást.

## 4.2 Hipotalamo-hipofizeális-gonadális rendszer

Amennyiben egy szinttel feljebb lépünk a szabályozási rendszerben, a hipotalamo-hipofizeális-gonadális rendszerhez jutunk. Emlősökben ez a szabályozó rendszer prenatálisan alakul ki, és amennyiben ebben a szakaszban akár mérsékelt szintű férfi szexszteroidoknak van kitéve, az gátolja a kialakulását, ami hosszútávon a nő infertilitását okozhatja az anovuláció miatt. Ugyanez az expozíció felnőtt nő esetében maximum időszakosan gátolja az ovulációt az egyre erőteljesebb negatív visszacsatolások révén [Döhler, 1991]. (Érdekes azonban, hogy pl. a hiperprolaktémia felnőtt nők esetén is képes egymaga leállítani a termékenységet biztosító folyamatokat.) A CF-ben a következő tesztekkel lehet kiszűrni ezt a hatást: Uterotróp-teszt (a fejletlen rendszer vizsgálata, ahol a hipotalamo-hipofizeális-gonadális rendszer ép, kimutathatja a gonadotropin gátlását), kiterjesztett egy-generációs, két-generációs vizsgálatok, illetve szövettan során mérhető a hipofízis tömege. Fontos tekintetbe venni az expozíció időzítését is, ebben az esetben nyilvánvalóan csak több generációra kiterjedő *in vivo* tesztek jöhetnek számításba. Hagyományosan a szaporodásbiológiai vizsgálatok tekintetbe veszik, hogy az expozíció időzítése alapvetően befolyásolja a kísérlet kimenetelét. Azonban a különböző időszakok eltérő érzékenysége miatt jelentős problémát jelent a megfelelő dózisok kiválasztása.

## 4.3 Szövetek, szervek szintjén végbemenő hatások

Ha a szövetek, szervek szintjén történő elváltozásokat vesszük tekintetbe, szintén elmondható, hogy alapvető elváltozások inkább prenatálisan várhatók, különösen az ED anyagokra jellemző alacsony dózistartomány esetén. Ugyanakkor proliferatív reakciókból eredő daganatos elváltozások által előidézett funkcionális zavarok vezethetnek időszakos vagy akár végleges terméketlenséghez is. Pl. hosszú távon a hiperprolaktinémia okozhatja adenóma kialakulását, ami stabilizálja az átmeneti terméketlenséget. A nemi szervek szöveteinek ösztrogén-hatásra adott hipertróf reakcióját az Uterotróp-teszt vizsgálja. Az **idegrendszer szintjének vizsgálata, magatartási kérdések** (stressz, libidó, stb.) túlmutatnak a dolgozat keretein, ugyanakkor az ún. apikális jellegű tesztek kimutatják ezeket a hatásokat is.

#### 4.4 Apikális és végpont irányú megközelítés

A toxikológiában megfigyelhető az apikális jellegű tesztek felől a hatásmechanizmusokra irányuló vizsgálatok irányába történő elmozdulás. Ennek feltétele az, hogy alapos ismereteink legyenek az adott biológiai folyamatokról, ugyanakkor kiváltó okai közé tartozik az állatok védelmének irányából érkező folyamatosan növekvő nyomás. Ezt az átmenetet figyelhetjük meg jelenleg az endokrin zavaró anyagok vizsgálatánál, ami a fertilitás esetében, a folyamat komplexitásából eredően exponenciálisan érvényesül.

Tekintetbe véve a fertilitással kapcsolatos folyamatok komplexitását, valamint, hogy a jelenlegi tudásunk még nem mondható teljes körűnek a biológiát tekintve, egy anyag fertilitásra való káros hatásának kiszűrésére az *in vitro* tesztek nem találom alkalmasnak. Ez összhangban van a CF elveivel is, hiszen az alacsonyabb szinteken lévő vizsgálatok negatív eredménye alapján nem zárható ki az anyag endokrin zavaró hatása. Amíg nem kapunk teljes képet a biológiai mechanizmusokról, és nem tudjuk az összes szóba jöhető folyamatot külön-külön, olcsó, nagy teljesítményű vizsgálatokkal kizárni, addig maradnak az apikális természetű – általában *in vivo* – vizsgálatok. A következőkben áttekintem, mely apikális végpontokat tekintik a szakmai útmutatók a fertilitás szempontjából vizsgálandónak.

## **5. Végpontok és vizsgálatok**

### **5.1 Végpontok**

Az EU State of the art tanulmánya [Kortenkamp et al., 2011] szerint a következő végpontok tartoznak a fertilitáshoz: megfogásra való képesség (beleértve a hormonális profilt), menstruáció, korai vetélés, petefészek kimerülése vagy működésképtelensége, szaporodásbiológiai előregedés és menopauza. Ezek mellett a PCOS, endometriózis, méhen belüli fibrózis is okozhatnak női alulműködést a termékenységben, beleértve a menstruációs zavarokat, vagy anovulációs ciklusokat, korai menopauzát, valamint a petevezeték elváltozásaiból és a méh anomáliákból adódó implantációs problémákat.

A következő táblázat bemutatja, a fenti végpontok közül melyiket vizsgálják a CF gerinces, nőtény állatokon végzett *in vivo* vizsgálatai.

Fertilitáshoz tartozó végpontok (ember)		Uterotróp-teszt	Pubertás teszt	Kiterjesztett 28-napos vizsgálat	Két-generációs vizsgálat
Mégfogásra való képtelenség	Menstruációs zavarok	gonadotropin gátlása	első ösztroosz megjelenésének ideje, ciklus szabályossága		ciklus szabályossága (P, F1)
	Anovulációs ciklusok				Párosodás ideje, fertilitás
	Petefészek kimerülése, működés-képtelensége				
	Korai öregedés				
	Korai menopauza				
	Hormonális profil				labor
Szervi elváltozások	Petevezeték elváltozásai		petefészek tömege, szövettana	opc. petefészek tömege, szövettana	petefészek tömege, szövettana
	PCOS				méh tömege, szövettana (P,F1)
	Méh anomáliái	méh tömege, szövettana	méh tömege, szövettana	opc. méh tömege, szövettana	
	Méhen belüli fibrózis				
Endometriózis	endometriális epithelium proliferációja				
Implantáció					placenta súlya, sárgatestek száma, életképes egyedek száma, pre- és posztimplantációs veszteség
Korai vetélés					
Egyéb végpontok	opc. vagina keratinizációja, elszarusodása		vagina kinyílásának ideje	opc. cervix és vagina szövettana, és hüvelykenet	vagina kinyílásának ideje (F1), cervix és vagina szövettana
			pajzsmirigy tömege, patológiája, T4 és TSH szérumszintjei	pajzsmirigy tömege, patológiája, T4 és TSH szérumszintjei	pajzsmirigy tömege, patológiája
			máj, hipofízis és mellékvesék tömege	máj, hipofízis és mellékvesék tömege	máj, mellékvesék tömege
					vemhesség ideje, ellés lefolyása, alom nagysága, nemi megoszlás (F1,F2), ivadékok tömege, túlélése (F2), kölykök fejlődési rendellenességei (F1,F2)

1. táblázat: *In vivo* vizsgálatok végpontjainak elemzése

## 5.2 Vizsgálatok

A gerinces, nőtény állatokat vizsgáló tesztek közül az Uterotróp-teszt (TG 440) vizsgálja a méh tömegét, és opcionális a vagina keratinizációjának, elszarusodásának, az endometriális epithelium proliferációjának és a méh szövettanának vizsgálata. A vizsgálatnak két variációja létezik, az egyik fejletlen, a másik ovariektomizált nőtényeket használ. Amellett, hogy az előbbi az állatvédelmi szempontoknak is jobban megfelel, a korábbiakban említettek szerint a szaporodásbiológiai szempontból éretlen rendszer – mivel a hipotalamo-hipofizeális-gonadális rendszer még ép – lehetőséget nyújt a gonadotropin gátlásának kimutatására. A vizsgálatot csak ER-agonistákra validálálták, de az ilyen hatású anyagokra sokkal érzékenyebb, mint pl. a 4. szinten lévő *in vivo* tesztek, az ott tapasztalható kiegyenlítő hatások miatt. A tesztrendszer 3. szintjén találjuk, különböző sorrendekben is felmerülhet, de a legvalószínűbb pozitív *in vitro* teszt utáni következő lépés, vagy pedig negatív *in vitro* teszt esetén, amennyiben endokrin zavaró metabolitot gyanítanak. Szűrővizsgálatnak számít kevés állat kezelésével mindössze 3 napig.

A 4. szinten található a US EPA által kidolgozott nőtény pubertás teszt, ami már apikális jellegű vizsgálatnak számít, hiszen a megfigyelt végpontokat különböző hatások befolyásolhatják. Ebben az esetben az ösztrogén-hatás mellett a vizsgálatban detektálhatók a pajzsmirigyre, szteroidogenezisre és a hipotalamo-hipofizeális-gonadális rendszerre irányuló hatások. A legérzékenyebb végpont a vagina kinyílásának ideje, vizsgálni kell továbbá a méh és a petefészkek tömegét, valamint azok szövettanát, az első ösztrusz megjelenésének idejét, valamint a ciklus szabályosságában beálló változásokat, a pajzsmirigy tömegét, patológiáját, a máj, a hipofízis és a mellékvesék tömegét, valamint a T4 és TSH szérumszintjeit. A teszt előnye, hogy érzékeny periódust és szélesebb hatásspektrumot vizsgál, azonban kevésbé érzékenynek mondható, mint az Uterotróp-teszt, amelynek esetében a szükséges állatok száma is alacsonyabb, ezért, ha a cél *in vitro* eredmény megerősítése, akkor javasolt inkább azt választani.

Szintén a 4. szinten található a kiterjesztett ismételt dózisú 28-napos vizsgálat (TG 407), amit eredetileg, ahogyan a neve is mutatja, szubakut/krónikus toxicitás kimutatására dolgoztak ki. Ez egyrészt kedvező, hiszen elvileg könnyen – és plusz állatok használata nélkül – beilleszthető az engedélyezési folyamatba, ugyanakkor a

toxicitás vizsgálata prioritást élvez az endokrin végpontokkal szemben, és az állatok vérének mennyisége is számottevő korlátozást jelent. Továbbá megjelenik a dózisszinttel kapcsolatos probléma, hiszen előfordulhat, hogy még a legalacsonyabb – ártalmatlan – dózisszint is magasabb, mint ahol az adott anyag az endokrin zavaró hatását kifejti. A magas dózison tapasztalt tünetek pedig elfedhetik az endokrin hatásokat. Ez is apikális vizsgálat, szintén kevésbé érzékeny, mint az Uterotróp-teszt, csak a közepes és erős hatású endokrin zavarókat detektálja, ugyanakkor mind a négy fontos hatást kimutatja: ösztrogén, androgén, pajzsmirigy és szteoridogenezis. A végpontjai: petefészek, méh, cervix és vagina tömege, szövettana, opcionális a vagina kenet vizsgálata. Szintén előírja a pajzsmirigy tömegének, patológiájának, a máj, a hipofízis és a mellékvesék tömegének vizsgálatát, valamint a vér T4 és TSH koncentrációjának mérését. A legvalószínűbb hosszabb-távú tesztek (pl. 90 napos) elővizsgálataként való alkalmazása; vagy ha az adott anyag mennyisége, kockázata, stb. nem ér el egy bizonyos határt, és ezért nincs előírva a magasabb szintű vizsgálat.

A két-generációs vizsgálatot (TG 416) szánják az endokrin zavarók kimutatására alkalmas legfőbb vizsgálatnak. Eredetileg reprodukciókárosító anyagok vizsgálatára alakították ki, 2001-ben pedig ED-specifikus végpontokkal egészítették ki, így gazdag információval szolgál, különösen, ha ismételt dózisu vizsgálatokkal kombináljuk, ahonnan a pajzsmirigy és az emlők hisztopatológiája, valamint hormonszintekre vonatkozó adatok is elérhetők. A jelenlegi emlős szaporodási toxicitásra vonatkozó útmutatók közül csupán a két-generációs (TG 416) vizsgálat alkalmaz az érzékeny periódusokban expozíciót. A vizsgálat idő- és költségigénye azonban hatalmas, akár egy évig eltart, három dózis szintet vizsgál, így nagyszámú állatot vesz igénybe (húsz vemhes állattal indul, majd egy-egy F1 hímet és nőtényt pároztat és kísér végig az ellésen át az F2 kölykök elválasztásáig). A vizsgálat természetesen apikális, rengeteg végpontot vizsgál, a labor részéről ezért hatalmas terhelést és szakértelmet kíván meg. Vizsgálja a ciklus szabályosságát (P, F1); párosodás idejét; fertilitást mind a hímeknél, mind a nőtényeknél; petefészek, méh, cervix és vagina, pajzsmirigy, máj és mellékvesék tömegét, szövettanát (P, F1); vagina kinyílásának idejét (F1); placenta súlyát; sárgatestek és életképes egyedek számát; pre- és posztimplantációs

veszteséget; vemhesség idejét; ellés lefolyását; alom nagyságát, nemi megoszlását (F1, F2); magzatok tömegét; túlélését (F2); kölykök fejlődési paramétereit (F1, F2).

## 6. Következtetések

Az OECD koncepcionális keretrendszerét illetően elmondható, hogy a szakma a nemzetközileg elfogadott és validált teszt módszereket általánosan hasznosnak találja, véglegesítésüket nagyon várja, ugyanakkor elismeri, hogy az ED-hatások spektrumának csak egy korlátozott tartományát fedik le, hosszú távon ki kellene tehát egészíteni az ösztrogén-androgén-pajzsmirigy-szteroidogenezis-rendszeren (EATS) kívüli hatásokkal is. A téma komplexitását, valamint ismereteink hiányosságait kiválóan illusztrálja, hogy 15 év sem bizonyult elegendőnek a vizsgálati rendszer véglegesítésére. Sajnálatos, hogy még napjainkban is zajlik a vita a tudományos és jogi szakemberek között az endokrin zavarók definíciójának kérdésében, nincs általánosan elfogadott megközelítés adott anyag ED-tulajdonságának kizárására vagy megerősítésére sem. Ugyanakkor, még az OECD több száz oldalas útmutató dokumentumát tekintve sem találok olyan egyértelmű, világos stratégiát, ahogyan egy adott, új anyagról (amely esetében nem állnak rendelkezésre adatok korábbi vizsgálatokból) egy cég, hatóság, stb. eldöntheti, hogy rendelkezik-e endokrin zavaró potenciállal, vagy sem. Ezen hatások természetét tekintve érthető, hogy a szakma a „weight-of-evidence”, azaz a bizonyítékok súlya megközelítést javasolja, nyilvánvaló, hogy nem csak szakmai szempontból, de állatvédelmi okokból is alapvető fontosságú minden rendelkezésre álló információ figyelembe vétele, fontos az elmúlt évtizedek alatt generált vizsgálati eredmények értékelhetőségének kritériumaira is figyelmet szentelni, mindamelllett számomra felmerült a „fától az erdőt” problematikája.

Amennyiben az endokrin zavaró anyagok viselkedését összevetjük a fertilitási folyamatokkal, a fenti állítások még nagyobb hangsúlyt kapnak. Ezért, amíg nem kapunk teljes képet a biológiai mechanizmusokról, és nem tudjuk az összes szóba jöhető folyamatot külön-külön, olcsó, nagy teljesítményű vizsgálatokkal kizárni, az *in vitro* tesztek nem találom alkalmasnak egy anyag fertilitásra való káros hatásának kiszűrésére. Továbbá, mivel az *in vitro* vizsgálatok általában egyetlen hatásmechanizmust modelleznek egyszerűsített körülmények között, így negatív eredmény esetén sem zárható ki az endokrin zavaró tulajdonság, a vizsgálati rendszerből további, magasabb szintű vizsgálatokat is el kell végezni. Pozitív teszt

esetén szintén érdemes megerősíteni az eredményt (tekintettel többek között a fals pozitív eredmények eshetőségére), így az *in vivo* tesztek elvégzése jelenleg elkerülhetetlen.

A kérdés az, hogy melyikkel lenne érdemes kezdeni a vizsgálatot, melyik vizsgálat tölthetne be szűrő funkciót? Ha a több hatást is kiszűrő ún. apikális jellegű tesztek irányába hajlunk, az egyrészt az érzékenység csökkenését fogja magával vonni, hiszen pl. a 3. szinten lévő – csak az ösztrogén-hatását kimutató – Uterotróp-teszt érzékenyebb, mint pl. a pubertás esszé, a kiterjesztett 28-napos vagy a két-generációs tesztek. Ez utóbbiak állatvédelmi szempontból is kedvezőtlenebbek, nem beszélve a költség- és időigényükről. Optimális válasz természetesen nincsen, mégis, fentiek közül talán a pubertás teszt az, ami egyrészt érzékeny időszakot vizsgál, elsődleges célja az endokrin zavaró hatás kimutatása (szemben a 28-napos és a két-generációs vizsgálatokkal); viszonylag szélesebb hatásspektrumot vizsgál (EATS, valamint információt nyújt a hipotalamo-hipofizeális-gonád rendszerre kifejtett hatásról is) és nem is igényel olyan jelentős állatszámot.

A meglévő, egyéb célokra kialakított vizsgálatok protokolljának endokrin zavaró hatásokra jellemző végpontokkal történő kiegészítése is célszerű, akkor azonban az endokrin zavaró tulajdonság detektálása mindig másodlagos célja csupán a vizsgálatnak, továbbá beleütközünk a megfelelő dózis kiválasztásának problémakörébe is. Bár az OECD a két-generációs vizsgálatot szánta fő tesztnek az endokrin zavaró anyagok kiszűrésére, meg kell említeni, hogy itt a legkiemelkedőbb az állatszám, valamint a laboratóriumra háruló munkateher, és a megbízó költsége (mind pénzben, mind időben) is hatalmas. Ráadásul a szakemberek kételkednek abban, hogy a második generáció vizsgálata elengedhetetlen járulékos információval szolgálna, ezért a US EPA indítványozta, hogy határozzák meg a 2. generáció vizsgálatának hozzáadott értékét a két-generációs vizsgálat esetében. Elvégeztek egy több mint 300 2-generációs vizsgálat adatait alapuló visszatekintő (retrospective) értékelést, amely során kevesebb, mint 30 esetben figyeltek meg olyan hatást a második generációban, amely nagyságrendben meghaladta az első generációban megfigyelt hatást. Ezek közül mindössze 2 esetben vezetett a második generációban megfigyelt hatás kritikus dózis kijelöléséhez [EDTA, 2006]. Érdemes volna ezért a kiterjesztett egy-generációs

vizsgálatnak is több figyelmet szentelni, csakúgy, mint a szaporodásbiológiai elővizsgálatoknak, a szaporodási/fejlődési toxicitási előkísérletnek (TG 421) és a szaporodási-fejlődési toxicitási előkísérlettel kombinált ismételt dózisú toxicitás vizsgálatnak (TG 422).

A vizsgálatok protokollját áttekintve azt tapasztaltam, hogy a korábban oly sok ellentmondást eredményező kísérleti körülmények részletei, amelyek hatással lehetnek a vizsgálatok kimenetelére, mint pl. a megfelelő faj és populáció kiválasztása, a megfelelő tartási, pároztatási körülmények, valamint a fitoösztrogénektől mentes táp jelentősége, helyet kaptak az új és a felülvizsgált iránymutatásokban. Amit azonban említés szintjén sem találtam, az endokrin zavarókra jellemző U-alakú dózis-válasz görbe, és viselkedésének megállapítása az alacsony dózistartományban. Nem egészítik ki a protokollokat további alacsony dózisszintekkel sem, amit pl. Vanderberg és szerzőtársai javasoltak. Sajnos a hormézis jelensége, valamint az újabb folyamatok hatása a humán extrapolációra nem teszi lehetővé, hogy ugyanazon kísérleti állaton előbb alacsony, környezetileg releváns dózisszinteken végezzük el a vizsgálatokat, majd a dózist a nem toxikus szintre emelve a jelenlegi iránymutatások szerint végezzük tovább a tesztet. Így a járulékos dózisszintek bevezetése mindenképpen további állatok feláldozását hozná magával, nem említve a statisztikai és egyéb technikai nehézségeket.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatomban részletesen áttekintettem a női termékenység hormonális szabályozását, az endokrin zavaró anyagok felfedezését, jellegzetességeit, különös hangsúlyt fektetve arra, miben térnek el a toxikológiában hagyományosan vizsgált hatásmechanizmusoktól. Megállapítottam, hogy a fő eltéréseket az alacsony dózistartomány, az eltérő dózis-válasz görbék jelentik, valamint, hogy alapvető fontosságú a kísérletek körülményeinek standardizálása. Bár az endokrin zavaró anyagok irodalma napjainkra hatalmasra nőtt, sokan vitatják, hogy valóban ekkora figyelmet kell-e nekik szentelni. Ennek eldöntésére azonban további kutatásokra, és mindenekeelőtt világos vizsgálati rendszerre volna szükség. Bemutattam ezért az OECD endokrin zavaró anyagok azonosítására kidolgozás alatt álló koncepcionális keretrendszerét, majd áttekintve az egyes szintekre beépített vizsgálatokat, céloom annak megállapítása volt, hogy a fertilitásra káros anyagok vajon fennakadnak-e a kialakított vizsgálati rostán.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy annak ellenére, hogy az aktuális szakmai tanulmányok és vitaanyagok jelentős hangsúlyt fektetnek az endokrin zavaró hatás azonosítására és megismerésére, jelenleg fontosabbnak tartom magának a hatásnak kiszűrését. El kellene választani egymástól az anyagok azonosítását lehetővé tevő vizsgálati rendszer kialakítását és a hatásmechanizmusok megismerésére irányuló kutatási feladatot, melynek alapvető szerepe a későbbi *in vitro* metódusok kidolgozásának szempontjából vitathatatlan. Hiszen végső soron természetesen az volna a cél, hogy állatok feláldozása nélkül tudjuk kivizsgálni anyagainkat. Ezt azonban, különösen az endokrin zavaró anyagok esetében, különösen az olyan komplex hatások vizsgálatakor, mint amilyen a termékenység károsítása, a közeljövőben nem tartom megvalósíthatónak. Ezért maradnak az apikális természetű *in vivo* vizsgálatok, ahol az adott expozíció hatásának végkimenetelét figyelhetjük meg, miközben az élőlény biológiai válaszai rejtve maradhatnak.

Az értékelés során nem találtam egyetlen olyan vizsgálatot sem, aminek az alkalmazása tökéletes megoldást nyújtana a fertilitásra káros anyagok vizsgálatára. Ugyanakkor megállapítható, hogy a két-generációs vizsgálat favorizálása helyett, amelyet mind a megbízók, mind a laborok igyekeznek majd elkerülni, talán

célravezetőbb volna egyszerűbb, kevesebb állatot igénylő, de *in vivo* szűrővizsgálatokat előírni, mindezt egy világos stratégiával, amely arra a szituációra is választ nyújt, ha az anyagról nem állnak rendelkezésre korábbi vizsgálatok.

## SUMMARY

### Mode of action and testing framework for EDCs disrupting fertility

In this study the hormonal control of fertility in women has been reviewed, the major discoveries regarding endocrine disrupting chemicals, their main characteristics, focusing on the differences from the traditional toxicology. Based on the evaluation the main different features are the low dose threshold and the dose-response curve. Besides it is of utmost importance to set the basic standards for performing tests on endocrine disruptors to minimize inconsistencies among literature results. Although, the literature of endocrine disrupting chemicals has grown to enormous the latest years, many scientist call into question whether this topic earns that much attention. To decide this question, more research, and first of all a clear testing strategy is needed. Therefore the Conceptual Framework for the Screening and Testing of Endocrine Disrupting Chemicals has been introduced, which is under preparation by international experts under OECD co-operation. After evaluating the studies on the different levels of the testing system, my purpose was to conclude whether substances potentially disrupting human fertility, could be detected by this testing system.

To sum up, though the current research papers and conferences pay special attention to identify and learn more about the modes of action of endocrine disrupting chemicals, the actual screening of these chemicals has to have first priority. Research on the modes of action of endocrine disruptors and the identification of the chemicals under the authorization processes should be considered separately. Though the importance of the first one in developing of future *in vitro* studies cannot be ignored, as our ultimate goal has to be the evaluation of hazardous properties without the need for sacrificing animals. This however is not possible in the near future, especially in the case of endocrine disruptors, especially if we are studying such complex biological processes as damaging fertility. Therefore we shall stick to *in vivo* apical studies, in which we can observe the outcome of exposures, while the exact biological responses of the animal remain hidden. I was not able to identify a certain study which is able to provide a perfect solution for screening chemicals mean damaging human fertility. However, we can conclude that instead of preferring the two-generation reproductive toxicity study,

both companies and laboratories will be keen to avoid, shorter *in vivo* screening studies using less animals are required, under a clear testing strategy, which provides solution in a situation lacking any data on the substance from previous legal requirements.

## **IRODALOMJEGYZÉK**

AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS et al. 2011: Assessing chemical risk: societies offer expertise. Science 331 p. 1136.

AUSTIN, C.R., SHORT, R.V. 1984: Reproduction in Mammals: Volume 3, Hormonal Control of Reproduction. Cambridge University Press, p.232.

BERN, H. 1992: The fragile fetus. In: Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection (Colborn T, Clement C, eds). Princeton Scientific Publications, Princeton, p. 9–15.

BUNDESINSTITUTE FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) 2009: Establishment of assessment and decision criteria in human health risk assessment for substances with endocrine disrupting properties under the EU plant protection product regulation - Report of a Workshop hosted at the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) in Berlin, Germany, from Nov. 11th till Nov. 13th 2009. Berlin.

[http://www.bfr.bund.de/cm/343/establishment\\_of\\_assessment\\_and\\_decision\\_criteria\\_in\\_human\\_health\\_risk\\_assessment\\_for\\_substances\\_with\\_endocrine\\_disrupting\\_properties.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/establishment_of_assessment_and_decision_criteria_in_human_health_risk_assessment_for_substances_with_endocrine_disrupting_properties.pdf) Letöltés dátuma: 2012.08.27.

BRENCSÁN, J. 1990: Új orvosi szótár. Akadémia Kiadó, p. 544

CALABRESE, E.J. 2003: Toxicology rethinks its central belief. Nature , 421. p. 691

CARSON, R. 1962: Silent Spring, Houghton Mifflin Company, Boston, p. 368

COLBORN, T., CLEMENT, C. 1992: Chemically-induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection: 1. Princeton Scientific Publishing. Princeton, NJ.

COLBORN, T., et al. 1996: Our Stolen Future. Dutton, New York p. 336

COOK, R., CALABRESE, E.J. 2006: The importance of hormesis to public health. Environ Health Perspect 114. p. 1631–1635

DAMSTRA, T. et al 2002: Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors WHO/IPCS/EDC/02.2

[http://www.who.int/ipcs/publications/new\\_issues/endocrine\\_disruptors/en/](http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/) Letöltés dátuma: 2012. 08.27.

DARVAS, B. 2000: Virágot Oikosznak, L'Harmattan Kiadó, Budapest p. 133

DARVAS, B. 2007: Háttérzajok jó hallásúaknak. p. 260-265. In R. Carson Néma tavasz. Katalizátor Könyvkiadó, Páty.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. 2009: Endocrine-disrupting chemical: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30. p. 293–342

DÖHLER, K.D. 1991: The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *Int. Rev. Cytol.* 131. p. 1-57.

EDTA 2006: Draft Summary Record of the 9th Meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (26-27 April 2006, Sundyberg, Sweden) (munkaközi anyag konzulensemtől, aki tagja volt az EDTA-nak

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY 2011: SVHC Support Document - 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)Phenol, 4-tert-octylphenol

<http://echa.europa.eu/documents/10162/17157361-4016-40ff-bc90-ae8e58e9f12b> Letöltés dátuma: 2012.08.28.

EUROPEAN COMMISSION Endocrine Disruptors Website

[http://ec.europa.eu/environment/endocrine/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/endocrine/index_en.htm) Letöltés dátuma:2012.08.29.

EUROPEAN PARLIAMENT and COUNCIL 2006: Regulation (EC) No. 1907/2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), Official J. L. 396 (30.12.2006) p. 1-849.

EUROPEAN PARLIAMENT and COUNCIL 2009: Regulation (EC) No 1107/2009 concerning the placing of plant protection products on the market, Official J. L. 309 (24.11.2009), p. 1–50

EUROPEAN PARLIAMENT and COUNCIL 2012: Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, Official J.L. 167 (22.05.2012.) p.1-123

EVANS, T.J. 2007: Reproductive toxicity and endocrine disruption. In *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles* (Gupta RC, ed.). Academic Press/ Elsevier, Inc., New York, p. 206–44.

EVANS, T.J., GANJAM, V.K. 2011: Reproductive Anatomy and Physiology. In Reproductive and Developmental Toxicology (Ramesh C. Gupta ed.), Elsevier Inc. London, UK p. 7-32.

GORE, A.C. et al. 2006: Endocrine Disruption for Endocrinologists (and Others). Endocrinology 147(6):S1–S3

GUILLETTE, L.J. Jr. 2000: Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife Growth Hormone & IGF Research Volume 10, Supplement 2, April 2000, Pages S45–S50

GUILLETTE, L.J. Jr. 2006: Endocrine Disrupting Contaminants — Beyond the Dogma, Environmental Health Perspectives 114: S1

KORTENKAMP, A. et al 2011: State of the Art Assessment of Endocrine Disrupters, Final Report. Project Contract Number: 070307/2009/550687/SER/D3

[http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/4\\_SOTA%20EDC%20Final%20Report%20V3%206%20Feb%2012.pdf](http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/4_SOTA%20EDC%20Final%20Report%20V3%206%20Feb%2012.pdf) Letöltés dátuma: 2012.08.27.

KRIMSKY, S. 2000: Hormonal Chaos: The Scientific and Social Origins of the Environmental Endocrine Hypothesis. Johns Hopkins Univ. Press. Baltimore. P. 256

KRIMSKY, S. 2001: An epistemological inquiry into the endocrine disruptor thesis. In Environmental Hormones: The Scientific Basis of Endocrine Disruption (McLachlan, J.A. et al., eds.). Ann. NY Acad. Sci. 948. p. 130–42.

KRISHNAN, A. V., et al. 1993: Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinol. 132. p. 2279–2286.

LÜLLMANN-RAUCH, R. 2007: Szövevény. Alliter, Budapest p. 614

MCLACHLAN, J.A. 1980: Estrogens in the Environment. Proceedings of the symposium on estrogens in the environment, Raleigh, North Carolina, USA, September 10-12, 1979. Elsevier North Holland. New York. p. xvi + 427pp.

MCLACHLAN, J.A. 2001: Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. Endocrine Res 22: 319–41.

NTP 2001: National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors Low Dose Peer Review. Research Triangle Park, NC:National Toxicology Program. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/liason/LowDosePeerFinalRpt.pdf> Letöltés dátuma: 2012. 08.29.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) 2010: (Draft) Guidance Document on the Assessment of Chemicals for Endocrine Disruption Version 9 <http://www.oecd.org/dataoecd/63/8/46436593.pdf> Letöltés dátuma: 2012.08.27.

SKAKKEBAEK, NE. et al. 2006: Is human fecundity declining? *Int. J. Androl.* 29. p. 2-11.

SOTO, A. M., et al. 1991: p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92. p. 167–173.

SPEAROW, J.L. 1999: Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. *Science* 285. p. 1259–1261

SUZUKI, T. Japanese Strategz on Endocrine Disrupters, nyomtatott formátumú munkaközi anyag, konzulensemtől, aki tagja volt az EDTA-nak

SZÉKÁCS, A. 1999: A növényvédő szerek kockázatai, *Magyar Tudomány* 160. p. 38-49

VANDENBERG, L.N. et al. 2012: Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses *Endocrine Reviews*, 33(3) (kiadás előtt)

VOM SAAL, F.S., HUGHES, C. 2005: An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol-A Shows the Need for a New Risk Assessment. *Environ. Health Perspect.* 113. p. 926-33.

VOM SAAL, F.S. et al 2010: Flawed Experimental Design Reveals the Need for Guidelines Requiring Appropriate Positive Controls in Endocrine Disruption Research. *Toxicological Sciences* 115. p. 612-613

WEYBRIDGE 1996: European Workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. Report of Proceedings. EUR 17549.

CADBURY D. 1993: Assault on the male, BBC Horizon videos

## I. Függelék - Eredeti angol nyelvű szövegek

1. „We are certain of the following: A large number of man-made chemicals that have been released into the environment as well as a few natural ones have the potential to disrupt the endocrine system of animals, including humans. Among these are the persistent bioaccumulative, organohalogen compounds that include some pesticides (fungicides, herbicides, and insecticides) and industrial chemicals, other synthetic products and some metals.” [Colborn és Clement, 1992]
2. Weybridge, 1996, endocrine disrupter: „An endocrine disrupter is an exogenous substance that causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, secondary (consequent) to changes in endocrine function. A potential endocrine disrupter is a substance that possesses properties that might be expected to lead to endocrine disruption in an intact organism.”
3. WHO IPCS 2002, endocrine disrupter: „An exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations”

## II. Függelék - A koncepcionális keretrendszer bemutatása

A következő két ábra a koncepcionális keretrendszert mutatja be, ugyanis az eredeti elképzelésekhez képest már megváltoztatták.

Note: Document prepared by the Secretariat of the Test Guidelines Programme based on the agreement reached at the 6th Meeting of the EDTA Task Force

## OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals

<p><b>Level 1</b> Sorting &amp; prioritization based upon existing information</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- physical &amp; chemical properties, e.g., MW, reactivity, volatility, biodegradability,</li> <li>- human &amp; environmental exposure, e.g., production volume, release, use patterns</li> <li>- hazard, e.g., available toxicological data</li> </ul>
<p><b>Level 2</b> <i>In vitro</i> assays providing mechanistic data</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ER, AR, TR receptor binding affinity</li> <li>- Transcriptional activation</li> <li>- Aromatase and steroidogenesis <i>in vitro</i></li> <li>- Aryl hydrocarbon receptor recognition/binding</li> <li>- QSARs</li> <li>- High Through Put Prescreens</li> <li>- Thyroid function</li> <li>- Fish hepatocyte VTG assay</li> <li>- Others (as appropriate)</li> </ul>
<p><b>Level 3</b> <i>In vivo</i> assays providing data about single endocrine Mechanisms and effects</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uterotrophic assay (estrogenic related)</li> <li>- Hershberger assay (androgenic related)</li> <li>- Non-receptor mediated hormone function</li> <li>- Others (e.g. thyroid)</li> <li>- Fish VTG (vitellogenin) assay (estrogenic related)</li> </ul>
<p><b>Level 4</b> <i>In vivo</i> assays providing data about multiple endocrine Mechanisms and effects</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- enhanced OECD 407 (endpoints based on endocrine mechanisms)</li> <li>- male and female pubertal assays</li> <li>- adult intact male assay</li> <li>- Fish gonadal histopathology assay</li> <li>- Frog metamorphosis assay</li> </ul>
<p><b>Level 5</b> <i>In vivo</i> assays providing data on effects from endocrine &amp; other mechanisms</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1-generation assay (TG415 enhanced)<sup>1</sup></li> <li>- 2-generation assay (TG416 enhanced)<sup>1</sup></li> <li>- reproductive screening test (TG421 enhanced)<sup>1</sup></li> <li>- combined 28 day/reproduction screening test (TG 422 enhanced)<sup>1</sup></li> </ul> <p><small>1 Potential enhancements will be considered by VMG mamm</small></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Partial and full life cycle assays in fish, birds, amphibians &amp; invertebrates (developmental and reproduction)</li> </ul>

## Felülvizsgált változat

<p><b>Level 1</b> Sorting and prioritization based upon existing information</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Physical &amp; chemical properties, e.g. MW, reactivity, volatility, biodegradability</li> <li>Human &amp; environmental exposure, e.g. production volume, release, use patterns</li> <li>Hazard, e.g. available toxicological data</li> </ul>
<p><b>Level 2</b> <i>In vitro</i> assays providing mechanistic data</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ER, AR, TR receptor binding affinity</li> <li>Transcriptional activation (<u>Stably Transfected Human Estrogen Receptor-<math>\alpha</math> Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals, TG 455*</u>)</li> <li>Aromatase and steroidogenesis in vitro</li> <li><u>Arylhydrocarbon receptor recognition/binding</u></li> <li>QSAR</li> </ul>
<p><b>Level 3</b> <i>In vivo</i> assays providing data about single mechanisms and effects</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>Uterotrophic assay TG 440 (estrogenic related)*</u></li> <li><u>Hershberger assay TG 441 (androgenic related)*</u></li> <li>Non-receptor binding mediated hormone function</li> <li>Others (e.g. thyroid)</li> </ul>
<p><b>Level 4</b> <i>In vivo</i> assays providing data about multiple mechanisms and effects</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>OECD TG 407 (endpoint based endocrine effects, updated in 2008)</u></li> <li>Male and female pubertal assays</li> <li>Adult intact male assay</li> </ul>
<p><b>Level 5</b> <i>In vivo</i> assays providing data on effects on endocrine &amp; other mechanisms</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1-generation assay (TG 415 enhanced)</li> <li>2-generation assay (TG 416 enhanced)</li> <li>Reproductive screening test (TG 421 enhanced)</li> <li>Combined 28-day/reproduction screening test (TG 422 enhanced)</li> <li><u>Extended F1 reproduction toxicity study (under development)</u></li> </ul>

\* TGs approved by the WNT

Assays in bold – new added TGs    ~~Assays strikethrough~~ – deleted assays

III. Függelék - Szerzői jogi nyilatkozat

**NYILATKOZAT**  
**a szakdolgozatról**

Alulírott .....(név)  
.....(továbbképzési szak  
megnevezése)

**kijelentem, hogy**

.....  
.....  
.....

című szakdolgozatom saját kutató munkám eredménye.

A szerzői jogok tiszteletben tartása mellett a SZIE Állatorvos-tudományi Kar Könyvtárában és az egyetemi adattárban elhelyezett nyomtatott és elektronikus példányokat az érdeklődők felhasználhatják. (Kérjük aláhúzással megjelölni!)

Hozzájárulok:                      IGEN    NEM

**Nyomtatott példány** másolható: nem / részben / egészben

**Elektronikus példány** megjeleníthető: nem / csak belső hálózaton / szabad hozzáféréssel, interneten

aláírás

Budapest, .....