

**REACH JA KEMIKAALIEN TOKSIKOLOGINEN TESTAAMINEN:  
ENDOKRIINIJÄRJESTELMÄÄ HÄIRITSEVIEN KEMIKAALIEN  
TUNNISTAMINEN KÄYTTÄEN MASSASPEKTROMETRIÄ**

Oskari Uski  
Pro gradu tutkielma  
Toksikologian koulutusohjelma  
Itä-Suomen yliopisto  
Farmasian laitos [Toksikologia]  
9.1.2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Farmasian laitos, [Toksikologia]

Toksikologian koulutusohjelma

USKI OSKARI, J: REACH JA KEMIKAALIEN TOKSIKOLOGINEN

TESTAAMINEN: ENDOKRIINIJÄRJESTELMÄÄ HÄIRITSEVIEN

KEMIKAALIEN TUNNISTAMINEN KÄYTTÄEN MASSASPEKTROMETRIÄ

Lopputyö 39 s.

Ohjaajat: Professori Markku Pasanen ja FM Heikki Vuorikoski

[04.2012]

---

Avainsanat: REACH; endokriinijärjestelmän häiriintyminen; massaspektrometria;  
H295R

Euroopan unionin uusi kemikaalilainsäädäntö REACH on suoraan jäsenmaita sitovaa lainsäädäntöä. REACH -asetuksen myötä kemikaalien maahantuojat ja valmistajat veloitetaan rekisteröimään kaikki aineet, joita heidän yrityksensä valmistavat tai maahantuovat EU-alueella vähintään tonnia vuodessa. Yritysten on itse kerättävä rekisteröintiin vaadittavat tiedot sekä tarvittaessa tehtävä asetuksen määrittämiä testejä tai tutkimuksia. REACH -asetuksessa kohdellaan erityisen tiukasti erityistä huolta aiheuttavia aineita, joita ovat muun muassa syöpää aiheuttavat, perimää vaurioittavat, lisääntymiselle vaaralliset ja hitaasti hajoavat aineet. Perustelluista syistä Euroopan komissio voi asettaa aineiden käytölle rajoituksia.

Eräs merkittävä lisääntymiselle vaarallisten yhdisteiden ryhmä on hormonienkaltaiset yhdisteet. Tämä sisältää luonnosta saatavia ja ihmisen tuottamia yhdisteitä, jotka voivat vaikuttaa haitallisesti ihmisten ja eläinten endokriinijärjestelmään.

Endokriinijärjestelmää häiritsevien aineiden osoittamiseksi ollaan kehittämässä uusia eläinkokeista vapaita menetelmiä. Yksi lupaava menetelmä perustuu H295R solulinjaan. H295R-solut ovat ihmisen sikiön erilaistumattomia lisämunuaisen soluja. Solut edustavat *in vitro* -mallia, joka pystyy tuottamaan kaikkia aikuisen ihmisen lisämunuaisen kuorikerroksen ja sukurauhasten tuottamia steroidihormoneja.

Tässä erikoistyössä H295R solut altistettiin tunnetuille hormonitoimintaa häiritseville aineille (forskoliini, prokloratsini ja aminoglutetimidi). Tämän jälkeen solujen kasvatusmediumista mitattiin estradiolin, testosteronin, androstenedionin, estronin, estratriolin ja progesteronin pitoisuudet käyttäen massaspektrometria. Forskoliinille altistettujen solujen kasvatusmediumista mitattiin tilastollisesti merkitsevä testosteronin, androstenedionin ja estronin määrän lisääntyminen. Kun taas prokloratsini-käsittely laski kasvatusnesteen androstenedioni-, estroni- ja testosteronipitoisuuksia. Toisaalta prokloratsini vaikutti progesteronin määrään päinvastaisesti. Aminoglutetimidi vähensi androstenedionin, estronin ja testosteronin pitoisuutta solumediumissa, mutta vaikutus oli vähäisempi kuin prokloratsiniilla. Aminoglutetimidi oli ainoa aine, joka lisäsi estriolin pitoisuutta solumediumissa.

Tulokset ovat lupaavia ja kannustavat kehittämään nestekromatografia-massaspektrometri -menetelmiä endokriinijärjestelmää häiritsevien aineiden seulontaan.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health  
Department of Pharmacy, [Toxicology]  
Master of Science in Toxicology program  
USKI OSKARI, J: REACH and toxicological testing of chemicals: screening of  
endocrine disruptors using mass spectrometer  
Master's thesis: 39 pages.  
Supervisors: Professor Markku Pasanen and M.Sc. Heikki Vuorikoski  
[04.2012]

---

Keywords: REACH; endocrine disruptors; mass spectrometer; H295R

REACH is a European Union regulation which obligates member countries. REACH require all companies manufacturing or importing chemical substances into the European Union in quantities of one tonne or more per year to register these substances. REACH also addresses strictly use of chemical 'substances of very high concern' (SVHC) because of their potential negative impacts on human health or the environment. SVHC are carcinogenic, mutagenic, toxic for reproduction, persistent and bioaccumulative. ECHA can restrict use of SVHC chemicals.

One chemical group which is causing reproductive toxicity is endocrine disruptors. Endocrine disruptors are chemicals or natural products that interfere with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body.

There are several programs ongoing organized by the international community to develop and validate of *in vitro* tests to recognize endocrine disruptors. One promising assay is H295R cell line screening test which can evaluate toxicant-induced effects on steroidogenesis. The H295R steroidogenesis assay is intended to identify xenobiotics that affect the steroidogenic pathway beginning with the sequence of reactions occurring after the gonatropin hormone receptors through the production of testosterone, estradiol, estrone and estriol.

In this Master's theses H295R cell line was exposed to known endocrine disruptors (prochloraz, aminoglutethimide and forskolin). After exposure cell medium was collected and was analyzed for hormones (estradiol, testosterone, androstenedione, estrone, estriol and progesterone) by using liquid chromatography–mass spectrometry. Forskolin exposure caused dose-dependent and statistically significant increase at levels of testosterone, androstenedione and estrone. Prochloraz treatment had contrary effect. Aminoglutethimide exposure decreased levels of androstenedione, estrone and testosterone but responses were weaker then noted after prochloraz treatment. Aminoglutethimide was only chemical which caused increase in estriol concentration.

Results are promising and encourage further development work of liquid chromatography–mass spectrometry methods for screening to endocrine disruptors.

# **SISÄLTÖ**

## **Tiivistelmä**

## **Kiitokset**

## **LYHENTEET**

## **1. KIRJALLISUUSKATSAUS**

### **1.1 REACH**

- 1.1.1 Taustaa
- 1.1.2 REACH -asetuksen aikataulu
- 1.1.3 Aineiden testaaminen REACH:issä
- 1.1.4 Toksikologisen tiedon hankinta REACH:issä

### **1.2 Endokriinijärjestelmä ja sen häiriintyminen**

- 1.2.1 Endokriinijärjestelmä ja tumareseptorit
- 1.2.2 Endokriinijärjestelmän häiriintyminen vierasaineiden johdosta ja sen tunnistaminen

### **1.3 Steroidihormonien analyysimenetelmät**

- 1.3.1 ELISA-menetelmä
- 1.3.2 Kaasukromatografia-massaspektrometria
- 1.3.3 HPLC-ESI-MS/MS laitteisto

## **2. TYÖN TARKOITUS**

## **3. MENETELMÄT**

- 3.1.1 H295R-solujen kasvatus ja jakaminen
- 3.1.2 H295R-solujen altistaminen
- 3.1.3 Hormonien uutto ja kvantitointi LC-MS/MS laitteella

## **4. TULOKSET**

- 4.1.1 Hormonien pitoisuudet solumediumissa

## **5. POHDINTA**

## **LÄHDELUETTELO**

## **Kiitokset**

Haluaisin kiittää Heikki Vuorikoskea siitä, että hän mahdollisti *pro gradun* tekemisen Orthotopix -yrityksessä. Hän on myös motivoinut minua REACH -asetuksen koukeroiden tulkinnassa antamalla minulle mielenkiintoisia sivuprojekteja. Hyvän työskentelyilmapiirin luomisessa Turussa ovat auttaneet Yvonne Konkol, Jenni Bernoulli, Jani Seppänen, Johanna Tuomela ja myös käytännön töissä paljon auttanut Leif Viklund. Kuopiossa tehdyssä käytännön osuudessa suurena apua ovat olleet Pasi Huuskonen ja Seppo Aureala. Tutkimuksen hahmottamisessa ja rajaamisessa auttoivat Professorit Markku Pasanen ja Kirsi Vähäkangas. Lisäksi haluan kiittää perhettäni ja ystäviäni ja vaimoani Irinaa kaikesta siitä tuesta, jota olen saanut tämän projektin aikana.

## Lyhenteet

APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
ATCC	American Type Culture Collection
CMR	Carcinogenic, mutagenic, toxic for reproduction
CoAs	Koaktivaattori
CoRs	Korepressori
CSA	Chemicals Safety Assesment
CSR	Chemical Safety Report
CYP	Cytochrome P450
DBD	DNA binding domain
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
ECHA	European Chemicals Agency
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EFTA	European Free Trade Association
ES	Electrospray
ETA	Euroopan talousalue
EU	Euroopan Unioni
GLP	Good Laboratory Practise
HPLC	High performance liquid chromatography
LC	liquid cromatography
MS/MS	dandem massaspektrometri
NR	Nuclear receptor
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PBT	Persistent, bioaccumulative, toxic chemical
QSAR	Quantitative structure-activity relationship
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of CHemicals
SDS	Safety Data Sheet
SIEF	Substance Information Exchange Forum
SVHC	Substances of Very High Concern,
t/a	Tonnia vuodessa
TF	Transcription factor
TG	Test Guideline
US-EPA	US Environmental Protection Agency
vPvB	Very Persistent and Very Bioaccumulative

# 1. KIRJALLISUUSKATSAUS

## 1.1 REACH

### 1.1.1 Taustaa

Euroopan Unionin (EU) uusi kemikaalilainsäädäntö REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of CHemicals; kemikaalien rekisteröinti-, arviointi-, lupa- ja rajoitusmenettely) tuli voimaan kesäkuun 1. päivänä 2007. Asetus on jäsenmaita sitovaa lainsäädäntöä. Samalla aloitti toimintansa myös Euroopan kemikaalivirasto (European Chemicals Agency, ECHA) Helsingissä. Asetuksen tärkeimpänä tavoitteena on varmistaa terveyden- ja ympäristönsuojelun korkea taso, sekä taata tavaroiden vapaa liikkuvuus. REACH on vaikutuksiltaan hyvin laaja. Sen piiriin kuuluvat niin EU:ssa valmistetut ja EU:n ulkopuolelta maahantuodut aineet, kuin myös välituotteina käytetyt tai markkinoille saatetut aineet sellaisenaan tai ollessaan komponentteina valmisteissa (REACH -asetus: artikla 2 ja liitteet IV ja V).

REACH -asetuksessa aineen rekisteröinnillä tarkoitetaan rekisteröitävän aineen valmistajan tai maahantuojan asetuksen tietovaatimuksen täyttävän rekisteröintiasiakirjan toimittamista Euroopan kemikaalivirastolle. Rekisteröinti koskee kaikkia aineita, joita valmistetaan tai tuodaan EU:n alueella yli kymmenen tonnia vuodessa. Asetus koskee yksittäistä valmistajaa tai maahantuojaa. Onnistuneen rekisteröinnin jälkeen kemikaalivirasto kirjaa kyseiselle aineelle rekisteröintinumeron ja toimittaa sen rekisteröijälle (REACH -asetus: artikla 20).

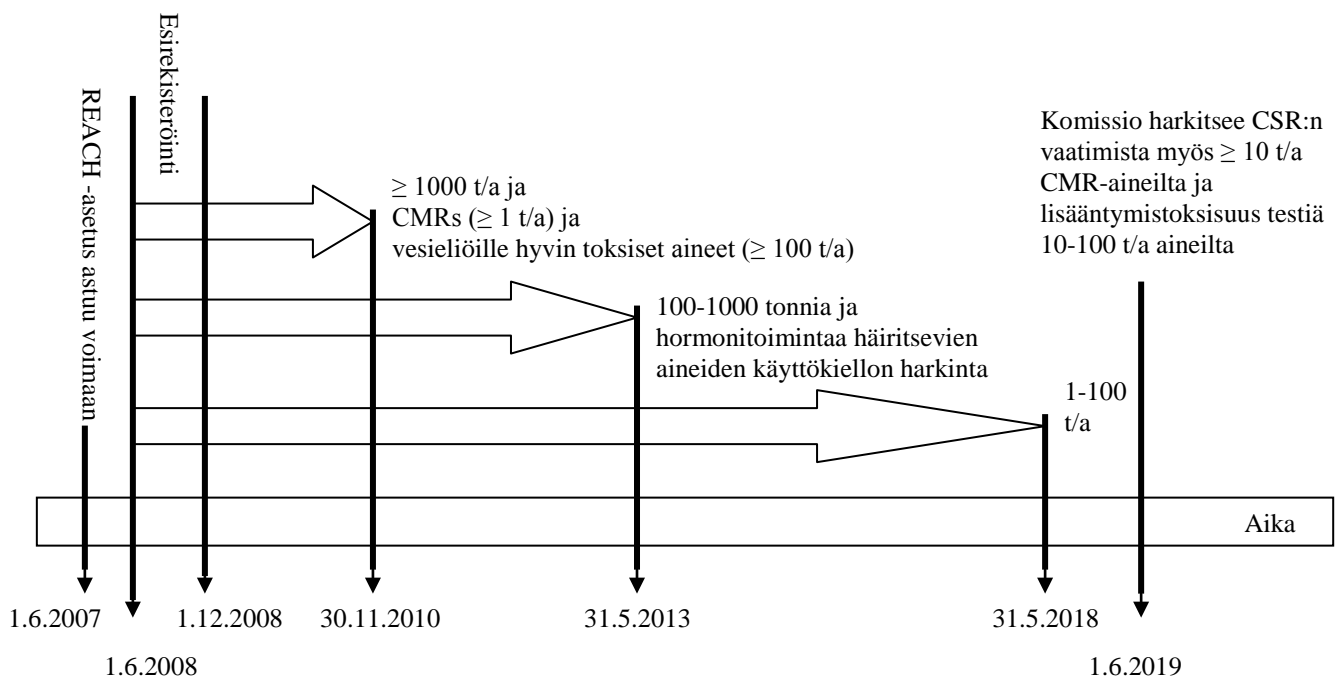
Asetus vaatii tietoa aineiden sisäisistä ominaisuuksista (fysikaaliset vaarat, terveydelle aiheutuvat vaarat ja ympäristövaarat) ja velvoittaa näitä koskevien tietojen yhteiskäytön rekisteröijien kesken. Tämä koskee erityisesti tietoa, jota saadaan vain selkärankaisilla tehtävillä kokeilla (REACH -asetus: artikla 25). Kaikki informaatiota toimittavat osapuolet ovat mukana ainekohtaisessa tietojenvaihtofoorumissa (Substance Information Exchange Forum, SIEF). SIEF:in tavoitteena ovat kokeiden (varsinkin eläinkokeet) päällekkäisyyksien välttäminen ja toisaalta aineen tai aineryhmän harmonisointiluokituksen ja merkintöjen sopiminen (REACH -asetus: artikla 29).

Erityistä huolta aiheuttavien aineiden (Substances of Very High Concern, SVHC) valmistamisella, maahantuonnilla ja käytöllä on REACH -asetuksessa oma lupamenettelynsä. Näitä aineita ovat direktiivin 67/548/ETY -kriteerien mukaisesti karsinogeeniset, mutageeniset ja lisääntymistoksiset kategoriaan 1-2 luokitellut aineet (Carcinogenic, mutagenic, toxic for reproduction, CMR). Näiden aineiden lisäksi REACH -asetus katsoo myös pysyvät, biokumuloituvat ja toksiset aineet (Persistent, bioaccumulative, toxic chemical, PBT) sekä erittäin pysyvät ja biokumuloituvat aineet (Very Persistent and Very Bioaccumulative, vPvB) ja vielä tämän lisäksi aineet joiden osalta on tieteellistä näyttöä haitallisista vaikutuksista ihmisiin tai ympäristölle. Tällaisia aineita ovat muun muassa hormonitoimintaa häiritsevät kemikaalit (REACH -asetus: artikla 57). SVHC aineita pyritään korvaamaan vähemmän haitallisilla aineilla. Aineiden korvaamisen tekninen toteuttaminen ja taloudelliset näkökohdat on otettava huomioon lupahakemuksessa. Tätä prosessia kutsutaan REACH:ssä sosioekonomiseksi analyysiksi (REACH -asetus: artikla 55).

### 1.1.2 REACH -asetuksen aikataulu

REACH -asetuksen hyväksynnän yhteydessä sidottiin asetuksen velvoitteiden aikataulu tarkkoihin päivämääriin. Näin Euroopan kemikaaliviraston perustaminen ja toiminnan virallinen aloittaminen konkretisoitui. Tällöin määritettiin myös teollisuuden vaiheittain rekisteröitävien aineiden ennakkorekisteröintien ja rekisteröintien aikarajat (REACH -asetus: artikla 141).

Kuvaan 1 on koottu vaiheittain rekisteröitäviin aineisiin liittyviä kriittisiä ennakkorekisteröinti- ja rekisteröintipäivämääriä. Aikataulu kuvaa ja määrittelee osittain asetuksen prioriteetteja, joissa tuotanto- ja maahantuontivolyymilla on hyvin merkittävä painoarvo. REACH -asetus tuli voimaan kesäkuun 1. päivänä 2007. Vuosi asetuksen voimaantulon jälkeen alkoi kemikaalien esirekisteröiminen (1.6.2008), jolle annettiin puoli vuotta aikaa. Esirekisteröinnin päätyttyä (1.12.2009) seuraava kriittinen aikaraja täyttyi 30.12.2010, johon mennessä suurten tuotantovolyymien aineet ja CMR-aineet oli rekisteröitävä (rekisteröintihakemus tuli olla lähetetty). Tätä seuraavat nopealla tahdilla keskisuuren tuotantovolyymin aineet (31.5.2013). Pienen tuotantovolyymin aineet on rekisteröitävä 31.5.2018 mennessä. Tämänkään jälkeen teollisuus ei ole vapautettu kaikista rekisteröintivelvoitteista. Viimeistään 1. kesäkuuta 2019 komissio tarkastelee tulisiko teollisuuden tehdä kemikaaliturvallisuusraportti (chemical safety report, CSR) myös alle 10 tonnia vuodessa tuotettavista CMR-aineista. Lisäksi komissio harkitsee laajennetaanko velvollisuus kuluttajien tiedottamisesta muihin vaarallisiin tai epämiellyttäviin aineisiin kuin SVHC luokituksen saaneisiin (esimerkiksi allergeenit). Komissio myös päättää vaaditaanko lisääntymistoksisuudesta tuotantovolyymien 10 ja 100 tonnia vuodessa -välillä (REACH in brief, October 2007).



**Kuva 1. REACH -asetuksen velvoitteiden aikataulu (Muokattu: REACH in brief, October 2007).** Kuvassa on REACH -asetuksen aikajana alkaen 1.6.2007, jolloin asetus tuli voimaan. 1.6.2008 alkaen kemikaalien ennakkorekisteröinti alkoi ja sille annettiin puoli vuotta aikaa. Tätä seuraa aineiden rekisteröinti tuotantovolyymin tai toksisuusominaisuuksien perusteella. Lyhenteet: CMR = Carcinogenic, mutagenic, toxic for reproduction; CSR = chemical safety report; t/a = tonnia vuodessa.



### **1.1.3 Aineiden testaaminen REACH:issä**

Aineen rekisteröintiä ja arviointia varten tarvitaan tietoa aineen fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista, toksisuudesta ja ekotoksisuudesta. Lisäksi on kerättävä tietoa aineelle altistumisesta, sen käytöstä ja käyttöön liittyvistä riskinhallintatoimista. Tarkat tietovaatimukset ovat erilaiset jokaiselle rekisteröinnille, koska ne riippuvat rekisteröitävän aineen tuotantovolyymista, aineen käytöstä ja aineelle altistumisesta koko sen elinkaaren aikana. Siksi ainekohtaisia tietovaatimuksia, sekä testaustarvetta on tarkasteltava laajempina kokonaisuutena (REACH -asetus: liite VI).

EU:ssa on käytössä OECD:n (Organisation for Economic Cooperation and Development) testimenetelmät, jotka EU on nimennyt uudelleen omilla koodeillaan. EU:lla on myös muutamia omia testiprotokollia, mutta suurimmaksi osaksi se käyttää OECD:n testejä. Taulukossa 1 on esitetty REACH -asetuksen kohdespesifisiin testeihin liittyvät OECD:n testit ja vastaavat EU:n hyväksymät testit koodeineen. REACH -asetuksessa kuitenkin mainitaan, että rekisteröijän on annettava myös muita saatavilla olevia asiaan kuuluvia tietoja kaikilta kolmelta osa-alueelta, eli fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, toksisuuden ja ekotoksisuuden osalta tuotanto määrästä riippumatta (REACH -asetus: liitteet VII-X).

**Taulukko 1. REACH -asetuksen vaikutuskohdespesifiset testit ja EU:n hyväksymät testi koodit (REACH -asetus: liitteet VI – X)**

≥ 1000 t/a (Liitteet VII, VIII, IX ja X)

100 - 1000 t/a (Liitteet VII, VIII ja IX )

10 - 100 t/a (Liitteet VII ja VIII)

1 - 10 t/a (Liite VII)

<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Toksikologinen informaatio</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ihoärsytys tai ihon syöpyminen (<i>in vitro</i>) B.4</li> <li>•Silmien ärtyminen (<i>in vitro</i>) B.5</li> <li>•Mutageenisuus <i>in vitro</i> -geenimutaatiokoe bakteereilla B.13/14</li> <li>•Välitön myrkyllisyys suun kautta B.1 bis, B.1tris</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Silmien ärtyminen (<i>in vivo</i>) B.5</li> <li>•Ihoärsytys (<i>in vivo</i>) B.4</li> <li>•Mutageenisuus <i>in vitro</i> -sytogeenisuustutkimus nisäkäsoluilla tai <i>in vitro</i> -mikronukleustesti B.12</li> <li>•<i>In vitro</i> -geenimutaatiotutkimus nisäkäsoluilla B.21</li> <li>•Äkillinen myrkyllisyys hengitysteitse B.2</li> <li>•Äkillinen myrkyllisyys ihon kautta B.3</li> <li>•Lyhytaikainen toistuvalla annostuksella tehtävä myrkyllisyystutkimus (28 vuorokautta) yhdellä lajilla</li> <li>•Lisääntymis- ja/tai kehitysmyrkyllisyyden seulonta yhdellä lajilla B.34</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Lyhytaikainen toistuvalla annostuksella tehtävä myrkyllisyyden tutkimus (28 vuorokautta) yhdellä lajille B.7, B.8, B.9</li> <li>•Subkrooninen Myrkyllisyystutkimus (90 vuorokautta) yhdellä jyrtsijä lajilla B.26, B.28, B.29</li> <li>•Lisääntymisvaarallisuus yhdellä lajilla B.34</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Kehitysmyrkyllisyystutkimus yhdellä lajilla B.27</li> <li>•Kahden sukupolven lisääntymisvaarallisuustutkimus B.35</li> <li>•Karsinogeenisyystutkimus B.15</li> </ul>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Ekotoksikologinen informaatio</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Lyhytaikainen myrkyllisyystestaus selkärangattomilla C.2</li> <li>•Kasvunestymistutkimus vesikasveilla (mieluiten levillä) C.3</li> <li>•Nopea biohajoavuus C.4</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Lyhytaikainen myrkyllisyystesti kaloilla C.1</li> <li>•Aktiivilietteen hengityksenestymistesti C.5</li> <li>•Abioottinen Hydrolyysi pH:n funktiona C.7</li> <li>•Aineen kohtalo ja käyttäytyminen ympäristössä Adsorptio-/ Desorptioseulonta C.18</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Pitkäaikainen myrkyllisyystestaus selkärangattomilla vesieläimillä (Daphnia) C.2</li> <li>•Pitkäaikainen myrkyllisyystestaus, kalanpoikasilla C.14</li> <li>•Bioottisen hajoamisen simulaatiotestaus pintavedessä, maaperässä ja sedimentissä C.10</li> <li>•Kertyminen vesieläimiin, mieluiten kalaan C.13</li> <li>•Lisätietoa adsorptiotasta ja/tai desorptiotasta C.19</li> <li>•Lyhytaikainen myrkyllisyys selkärangattomille (maaeliöt) C.16 C.17</li> <li>•Vaikutukset maaperän mikroeliöstöön C.11</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aineen kohtalo ja käyttäytyminen ympäristössä</li> <li>•Selkärangattomilla tehtävä pitkäaikainen myrkyllisyystestaus (maaeliöstö)</li> <li>•Pitkäaikainen myrkyllisyystestaus kasveilla</li> <li>•Pitkäaikainen myrkyllisyys sedimentin eliölle</li> <li>•Pitkäaikainen myrkyllisyys tai lisääntymisvaarallisuus linnuille</li> </ul>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Fysikaalis-kemiallinen informaatio</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aineen olomuoto 20 °C ja paineessa 101,3 kPa</li> <li>•Sulamis- tai jäätymispiste A.1</li> <li>•Kiehumispiste A.2</li> <li>•Suhteellinen tiheys A.3</li> <li>•Höyrynpaine A.4</li> <li>•Pintajännitys A.5</li> <li>•Vesiliukoisuus A.6</li> <li>•Jakautumiskerroin A.8</li> <li>•Leimahduspiste A.9</li> <li>•Syttyvyys A.10, A.11, A.12</li> <li>•Räjähävyys A.14</li> <li>•Itsesyttymislämpötila A.15</li> <li>•Hapetusominaisuudet A.21</li> <li>•Raekokojakauma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Stabiilisuus orgaanisissa liuottimissa ja relevanttien hajoamistuotteiden tunnistetiedot</li> <li>•Hajoamisvakio</li> <li>•Viskositeetti</li> </ul>		

REACH -asetus tähtää systemaattiseen tietojen jakamiseen ja niiden yhteiseen toimittamiseen ECHA:lle toimijoiden kesken. Näin useat eri toimijat voivat käyttää samoja tietoja, jotka perustuvat historian saatossa tehtyihin toksisuustestauksiin. Siten voidaan välttää tarpeettomia testejä ja minimoida kustannuksia. Rekisteröijän on myös kerättävä sellaisia toksisuus- ja ekotoksisuustietoja, joita ei välttämättä vaadita kyseisen tonnimäärän rekisteröintikategoriassa. Näillä ylimääräisillä tiedoilla, sekä vaihtoehtoisilla testimenetelmillä saaduilla tiedoilla voidaan vähentää perinteisten eläinkokeiden tarvetta. Tämän toivotaan vähentävän kuluja, jotka syntyvät vaatimuksesta, jonka mukaan kaikki uudet toksisuus- ja ekotoksisuustestit on tehtävä GLP-käytäntöjen (good laboratory practise, GLP) mukaan. REACH -asetuksessa korostetaan ja vaaditaan nimenomaan tietoa eikä niinkään yksittäisen toksisen vaikutuskohteen testaamista tietyllä spesifisellä toksisuustestillä (REACH -asetus: artikla 13 ja liite XI). Vaikka REACH -asetus sallii niin vakiotietovaatimusten mukauttamisen, vaihtoehtoisten menetelmien käyttämisen, kuin myös tietojen jakamisen rekisteröijien kesken, niin siitä huolimatta suorien testikustannusten on arvioitu olevan korkeat (Angerer ym. 2008). On myös arvioitu, että yli puolet tarvittavasta rahasummasta kuluu kehitystoksikologisiin tutkimuksiin (Piersma, 2006).

Toksikologisten testien ja tiedon laadun, sekä soveltuvuuden arviointi aineen sisäisten ominaisuuksien määrittämiseksi ja sitä seuraava kemikaalin turvallisuusarviointi on tehtävä systemaattisesti. Testiraporttien ja julkaisujen luotettavuuden arvioinnissa korostuu standardisoidujen menetelmien käyttö. Testauksen kuvauksen ja tulosten selkeyttä ja luotettavuutta arvioitaessa käytetään neliportaista kategorisointia (Klimisch ym. 1997). Ensimmäiseen kategoriaan (luotettava ilman rajoituksia) kuuluvat ne tutkimukset ja kirjallisuustiedot, jotka on tehty täysin kansainvälisesti hyväksytyjen testiohjeiden ja GLP-periaatteiden mukaisesti. Toiseen kategoriaan (luotettava tietyin ehdoin) kuuluvat ne testit, jotka eivät täysin noudata määriteltyjä ja standardisoituja testiohjeita, mutta jotka ovat dokumentointinsa puolesta tieteellisesti hyväksyttävissä ja jotka suurimmaksi osaksi noudattavat GLP-periaatteita. Kolmanteen kategoriaan (ei luotettava) kuuluvat ne tutkimukset, joissa on puutteita mittausjärjestelmässä, jossa on käytetty epärelevantteja testausjärjestelmiä suhteessa tapahtuneeseen altistamiseen, testausmenetelmä ei ole hyväksytty, dokumentaatio ei ole riittävää ja johtopäätökset eivät ole vakuuttavia. Neljäs kategoria (epäkelpo) kuuluvat ne tutkimukset ja kirjallisuus, jotka eivät anna riittävän yksityiskohtaista tietoa koeolosuhteista ja jotka on listattu vain lyhyinä abstrakteina tai tiedot ovat peräisin toissijaisesta kirjallisuudesta (Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.4: Evaluation of available information).

#### **1.1.4 Toksikologisen tiedon hankinta REACH:issä**

REACH -asetuksen implementoinnissa ensimmäisenä askeleena on selvittää rekisteröintiä vaativat aineet. Aine on ennakkorekisteröitävä ja rekisteröitävä sen juridisen toimipaikan nimissä, jossa kyseistä ainetta valmistetaan tai tuodaan EU:n alueelle ensimmäisen kerran. Aine voi olla itse valmistettu, tai sitten tuotu EU:n alueelle ulkopuolisesta valtiosta. Aine saattaa olla myös kokonaan vapautettu rekisteröintivelvollisuudesta REACH -asetuksen määrittelyjen mukaisesti (REACH -asetus, Liite VI).

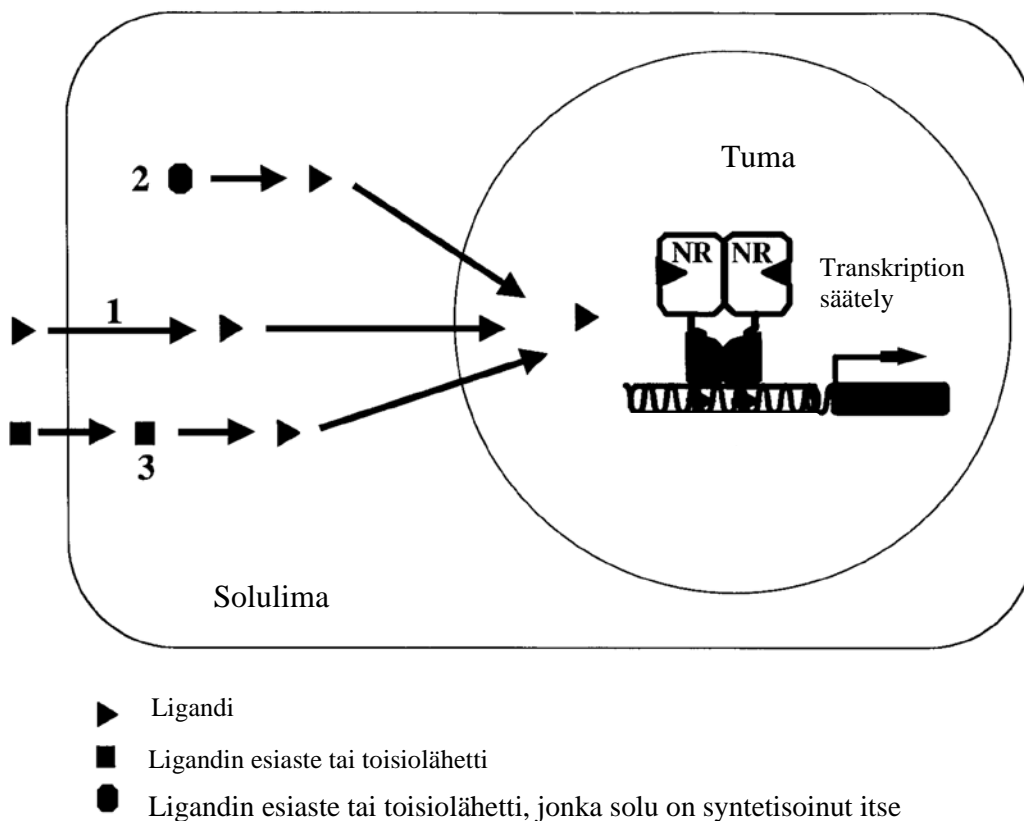
Toksisuustietojen keräämisen kannalta merkittävät aineeseen liittyvät tiedot ovat sen vuosittainen tuotantovolyyymi sekä toksisuus- ja ekotoksisuusluokitus. Nämä tiedot vaikuttavat vakiotietovaatimukseen pääsääntöisesti siten, että tietovaatimukset kasvavat volyymin kasvaessa portaittain ja osin myös aineen luokituksen mukainen vaarallisuus toimii laukaisevana tekijänä tietovaatimuksille. Toinen merkittävä toksikologisiin (kuten myös fysikaalis-kemiallisiin ja ekotoksisiin) tietovaatimukseen liittyvä kriteeri on aineen käyttötarkoitus (REACH -asetus, Liite VI).

Toksikologisen testaustiedon kerääminen on jaettu REACH:issä kolmeen vaiheeseen. Ensimmäisessä vaiheessa yritys tai maahantuojä käy läpi omassa laboratorioissaan tehdyt tutkimukset. Toisessa vaiheessa selvitetään kemianteollisuuden toimialajärjestöjen, kilpailijoiden ja asiakkaiden kanssa yhteistyössä teetetut toksikologiset tutkimukset. Kolmantena vaiheena kerätään toksikologiset testitiedot kirjallisuudesta ja muista julkisista lähteistä. Tehdyt tietohaut julkisista tietokannoista on tarkkaan dokumentoitava, käytetyt tietokannat kuvattava yksityiskohtaisesti, sekä kattavuus on kirjattava ja päivättävä. Käytetyt Internetin hakukoneet ja hakujen päiväykset on dokumentoitava. (Q)SAR-malleja (Quantitative structure-activity relationship) käytettäessä on mallin nimi, ohjelmistoversio ja viitteet kirjattava (Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.3: Information gathering).

## 1.2 ENDOKRIINIJÄRJESTELMÄ JA SEN HÄIRIINTYMINEN

### 1.2.1 Endokriinijärjestelmä ja tumareseptorit

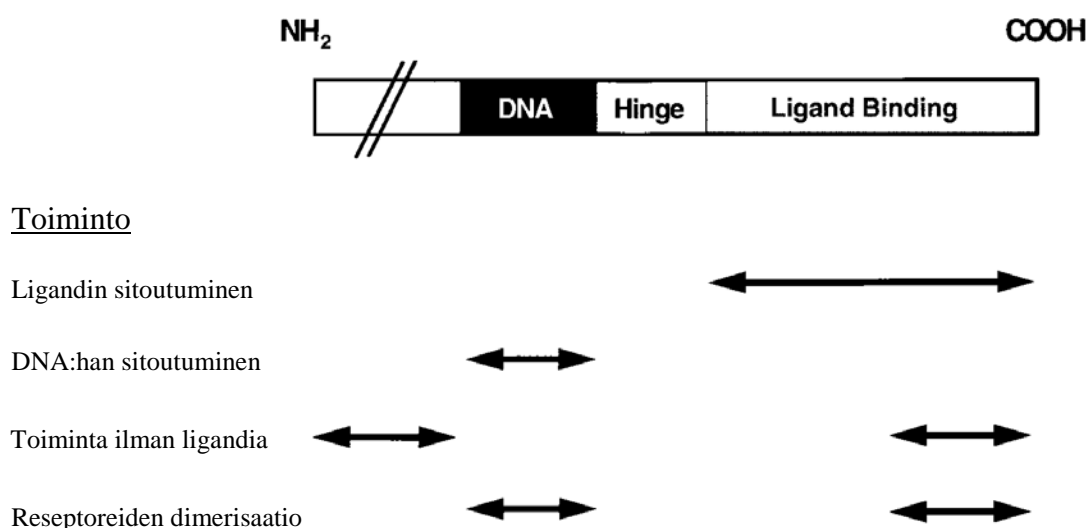
Endokriinijärjestelmä eli umpirauhasten muodostamat hormonit säätelevät kaikkien eliöiden perustoimintoja. Hormonit toimivat viestinviejinä ja leviävät verenkierron välityksellä elimistön eri osissa oleviin elimiin, kudoksiin ja soluihin, jotka vastaavat hormonien välittämien viestien mukaisesti. Hypotalamuksen ja aivolisäkkeen muodostama sääteilyjärjestelmä ohjaa hormonieritystä. Hormonierityksen säätely on siten hermoston ja umpirauhasten yhteistoimintaa. Umpirauhasten toiminnan säätelyssä on keskeistä negatiivinen palautevaikutus eli takaisinkytkentä. Verenkiertoon vapautunut hormoni vaikuttaa hormonia tuottavaan rauhasen tai rauhasen eritystoimintaa säätelevään rauhasen sen toimintaa inhiboiden. Tämän lisäksi hormonit myös säätelevät omaa metaboliaansa lisäämällä sitä vähentävien entsyymien määrää. Hormonien toiminta perustuu soluissa oleviin tumareseptoreihin, joita ne aktivoivat sitoutumalla niihin (Escriva ym. 1997; Owen ja Zelent, 2000).



**Kuva 2. Tumareseptorien toiminta ja aktivoituminen (muokattu: Principles of Molecular Regulation, P. Michael Conn, Anthony R. Means, 2000).** Ligandit voidaan tuottaa solun ulkoisesti (1), ne voidaan myös muokata aktiiviseen muotoon solussa (3) tai ne tuotetaan solussa itsessään (2). Ligandi siirtyy tumaan, jossa se aktivoi tumareseptori dimeerin, joka säätelee transkriptiota.

Ihmisellä on 48 tumareseptoriproteiinia (TR), joiden toiminta ja aktivoituminen on esitetty kuvassa 2. TR:t ovat transkriptiotekijöitä (TT), joista monet ovat ligandiaktivoituja. TT:t säätelevät kohdegeenejään, jotka osallistuvat kaikkiin keskeisiin kehon prosesseihin kuten kasvuun, kehitykseen ja metaboliaan (Chawla ym. 2001). TR:ien ligandit ovat joko korkean affiniteetin steroidihormoneja, tai matalan affiniteetin ravintolipidejä tai niiden johdoksia. Yhteisenä piirteenä on, että ligandit voivat läpäistä solukalvon ja näin päästä kohdereseptoriinsa solulimaan tai tumaan (Mitro ym. 2007). Kuten kaikki TT:t myös TR:t toimivat koaktivaattorien (CoAs) ja korepressorien (CoRs) kanssa. Näiden proteiinien vuorovaikutus saa aikaan kromatiinirakenteen uudelleenjärjestymisen, joka johtaa kohdegeenin aktivoitumiseen tai suppressoitumiseen (Glass ja Rosenfeld, 2000).

Spesifisen ligandin sitoutuessa TR:iin se käy läpi konformaatiomuutoksen, joka mahdollistaa koaktivaattorien tai korepressorien rekrytoinnin. Koaktivaattorit voivat toimia monin tavoin. Jotkut koaktivaattorit muodostavat sillan geenin promoottorin ja geenin tehostaja-alueiden välillä. Toiset taas keräävät transkriptiokoneiston, joka käynnistää geenin kääntämisen lähetti-RNA:ksi. TR:t ovat yksi tärkeimmistä tekijöistä geenien säätelyssä ja ilmentymisessä. TR:lla on paljon yhteisiä piirteitä, jotka on koottu kuvaan 3 (Folkertsma ym. 2004).



**Kuva 3. Tumareseptorien yleisrakenne (muokattu: Principles of Molecular Regulation, P. Michael Conn, Anthony R. Means, 2000).** Tumareseptoreissa on yleensä kolme domeenia. Proteiinin N-terminaalista seuraava rakenne on hyvin säilynyt DNA:han sitoutuva domeeni (kuvassa DNA). Tämä alue tunnistaa vaste-elementit. Seuraava on hypervaihteleva domeeni (kuvassa Hinge). Viimeisenä domeeninä on ligandia sitovan alue (Kuvassa Ligand Binding).

Tumareseptorien suurperhe voidaan jakaa kolmeen luokkaan (Germain ym. 2006). Ensimmäiseen ryhmään kuuluvat klassiset endokriinireseptorit, joiden luonnollisia ligandeja ovat muun muassa trijodityroniini (thyroid hormone receptor), *trans*-retinoli happo (retinoic acid receptor), 1,25-dihydroksikolekalsiferoli (vitamin D receptor), estradioli (estrogen receptor  $\alpha$  ja  $\beta$ ), kortisoli (glucocorticoid receptor), aldosteroni (mineralocorticoid receptor), progesteroni (progesterone receptor) ja dihydrotestosteroni (androgen receptor). Näiden reseptorien affiniteetti ligandiinsa on hyvin voimakasta (Chawla ym. 2001). Toiseen ryhmään kuuluvilla tumareseptoreilla ligandi affiniteetti on heikompi. Näille TR:lle ligandeina toimivat rasva- ja sappihapot ja niiden johdannaiset. Viimeisenä ryhmänä ovat ne tumareseptorit, joilla ei ole ligandia tai sitä ei ole vielä löydetty (Ingraham ja Redinbo, 2005).

### 1.2.2 Endokriinijärjestelmän häiriintyminen vierasaineiden johdosta ja sen tunnistaminen

Hormonitoiminnan häiriintyminen voi ilmetä eri tavoin. Jotkut kemikaalit voivat jäljitellä luonnollista hormonia, aiheuttaen vääräaikaista tai väärän suuruista stimulaatiota kohdesoluissa sitoutumalla tumareseptoreihin. Muut häiritsevät kemikaalit voivat estää hormonin vaikutukset kohdereseptoreihin (antagonismi). Toiset taas voivat suoraan edistää tai estää endokriinijärjestelmää, mikä aiheuttaa hormonien yli- tai alituotantoa. Tiettyjä lääkkeitä käytetään tarkoituksellisesti aiheuttamaan joitakin näistä vaikutuksista, kuten ehkäisytabletteja (Hutchinson ja Matthiessen 1999; Taylor ja Harrison, 1999).

Hormonitoiminnan häiriintyminen voidaan todeta monella eri solubiokemian tasolla. Eri mittausmenetelmiä on kehitetty lähinnä lääketeollisuuden tarpeisiin potenttien lääkeainemolekyylien seulontaa varten. Joitakin näistä menetelmistä voi käyttää myös kemikaalien tai niiden aineosien hormonitoimintaa häiritsevien ominaisuuksien tunnistamiseen *in vitro*. Nykyisillä menetelmillä voidaan havaita aineiden aiheuttama geenin transkription aktivoitumisen tai translaation muutos, geenin tuottaman proteiinin määrän muutos tai jopa luonnollisten hormonien metabolian tai katabolian häiriintyminen. Eri menetelmät palvelevat erilaisia tarkoituksia ja kuvaavat eri vaiheita solun biokemiallisessa ympäristössä (Soto ym. 2006).

Kansainvälinen hormonihäiriöiden tunnistamistutkimusyhteistyö keskittyy tällä hetkellä estrogeeneihin ( $17\beta$ - estradioli ja estroni), androgeeneihin (testosteroni ja dehydroepiandrosteroni) ja tyroidihormonijärjestelmien (tyroksiini ja trijodityroniini) häiriintymisen tunnistamiseen. Nämä hormonit aktivoivat klassisia endokriinireseptoreja ja näin ollen niiden häiriintymisen vaikutukset on suhteellisen helppo havaita (COM (1999) 706; EDSTAC (1998)).

Monet hormonitoimintaa häiritsevien kemikaalien testimenetelmät on kehitetty lääketeollisuuden käyttämistä ligandin seulomismenetelmistä. Näiden menetelmien hyvä puoli on, että ne ovat kaupallisesti saatavilla ja niillä voidaan seuloa suuria molekyyliä. Tarvittaessa menetelmät soveltuvat myös seosten testaamiseen. Protokollien päätepiestet ovat selkeitä ja antavat yleensä yksiselitteisen kyllä/ei vastauksen. Uudemmat kemikaalien testaamista varten kehitetyt testit ovat monimutkaisia ja niistä on vaikeampi löytää selkeitä kyllä/ei -päätepiestetä. Tämän lisäksi niiden vähäiset käyttökokemukset vaikeuttavat niiden toimivuuden arviointia. Uusien testien heikko taloudellinen hyödynnettävyys on myös hidastanut tuotekehitystä. Taulukkoon 2 on kerätty hormonitoimintaa häiritsevien kemikaalien

testaamiseen kehitetyt *in vitro* testit. Kehitystyötä rahoittavat ja koordinoivat OECD, US-EPA ja EU (Charles, 2004).

**Taulukko 2. Hormonitoimintaa häiritsevien kemikaalien testaamiseen kehitetyt *in vitro* testit (OECD, US-EPA ja EU).**

Menetelmän lyhenne	Testisysteemi	Lisätietoja/lähde
	<b>Tumahormonireseptoriin sitoutumisen tunnistaminen</b>	
hrER $\alpha$ (METI)	Ihmisen rekombinantti proteiini	( <a href="http://www.meti.go.jp/english/report/data/gEndoctexte.pdf">http://www.meti.go.jp/english/report/data/gEndoctexte.pdf</a> )
rER	Testaa radioleimatun estradiolin kilpailevaa sitoutumista testikemikaaliin nähden.	ER-RUC ISR, v3.16c.doc ( <a href="http://www.epa.gov/endo/pubs/assayvalidation/er_ruc_isr.pdf">http://www.epa.gov/endo/pubs/assayvalidation/er_ruc_isr.pdf</a> )
hrAR (METI)	Ihmisen rekombinantti proteiini, joka tuotetaan E. Colissa	( <a href="http://www.meti.go.jp/english/report/data/gEndoctexte.pdf">http://www.meti.go.jp/english/report/data/gEndoctexte.pdf</a> )
rAR	Rotan rekombinantti proteiini	-
rAR (US-EPA)	Testaa radioleimatun testosteronin kilpailevaa sitoutumista testikemikaaliin nähden.	( <a href="http://www.epa.gov/endo/pubs/ar_binding_isr.pdf">http://www.epa.gov/endo/pubs/ar_binding_isr.pdf</a> )
hrTR (METI)	Ihmisen rekombinantti proteiini, joka tuotetaan E. colissa	( <a href="http://www.meti.go.jp/english/report/data/gEndoctexte.pdf">http://www.meti.go.jp/english/report/data/gEndoctexte.pdf</a> )
	<b>Tumahormonireseptorivälitteisen transkription tunnistaminen</b>	
HeLa-9903 (OECD)	HeLa-9903 soluja joissa stabiili Era ja lusiferaasi transfektio	( <a href="http://www.oecd.org/dataoecd/46/29/39821664.pdf">http://www.oecd.org/dataoecd/46/29/39821664.pdf</a> )
HeLa-9903	hER $\alpha$ /pcDNA3.1 plasmidi ja ERE-AUG-Luc+ systeemi	-
HeLa-9903	hER $\beta$ /pcDNA3.1 plasmidi ja ERE-AUG-Luc+ systeemi	-
MELN	MCF-7 soluja joissa stabiili Era ja lusiferaasi transfektio	-
ER-CALUX	T47 D soluja joissa stabiili Era ja lusiferaasi transfektio	-
LUMI cell (NICEATM)	BG1 soluja joissa stabiili Era ja lusiferaasi transfektio	( <a href="http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endo/ocrine/end_eval.htm">http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endo/ocrine/end_eval.htm</a> )
CV-1	CV-1 soluja joissa hAR/pcDNA3.1 plasmidi ja ERE-AUG-Luc+ systeemi	-
AR-Ecoscreen <sup>TM</sup>	CHO soluja joissa stabiili AR ja lusiferaasi transfektio	Araki ym. 2005
PALM	PC-3 soluja joissa stabiili hAR ja lusiferaasi transfektio	-
CALUX (BDS)	U2-OS soluja joissa stabiili hAR ja lusiferaasi transfektio	( <a href="http://www.biodetectionsystems.com/1/hoofd/2.php">http://www.biodetectionsystems.com/1/hoofd/2.php</a> )
TR $\beta$	CHO soluja joissa RXR transfektio	-
	<b>Ei-reseptorivälitteinen hormonihäiriön tunnistaminen</b>	
Microsomal aromatase assay (US-EPA)	KGN tai H295R solujen CYP19 toiminnan häiriintymisen mittaaminen	( <a href="http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/sterooidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf">http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/sterooidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf</a> )
Steroidogenesis (US-EPA)	H295R solujen steroidisynteesin häiriintymisen mittaaminen	( <a href="http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/sterooidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf">http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/sterooidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf</a> )
	<b>Solujen proliferaation testues</b>	
NICEATM	MCF-7 soluilla suoritettava HTS kemikaalien estrogeenin kaltaisten vaikutusten löytämiseksi	( <a href="http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endo/ocrine/end_eval-CChem.htm">http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endo/ocrine/end_eval-CChem.htm</a> )



Taulukkoon 3 on kerätty tämänhetkiset US-EPA:n tier I (ensimmäinen vaihe) testiprotokollat hormonitoimintaa häiritsevien kemikaalien löytämiseksi. Testit ovat sekä *in vivo*- että *in vitro*-testejä ja niiden kehitystyö on piakkoin valmis. Ensimmäisen vaiheen testien tarkoitus on tunnistaa ne aineet, jotka voivat vaikuttaa endokriinijärjestelmän toimintaan (O'Connor ym. 2002).

**Taulukko 3. US-EPAs tier I protokollat**

Protokolla	Testisysteemi
Puberteetti malli (uros ja naaras)	<i>In vivo</i> malli jossa selvitetään kemikaalin mahdollisia sukupuolihormonivaikutuksia kehittyviin koe-eläimiin.
Aikuinen urosmalli	<i>In vivo</i> malli, jonka tarkoituksena on testata kemikaalin androgeenisia- ja tyroidihormonivaikutuksia.
Kalamalli	<i>Pimephales promelas</i> kaloja altistetaan testikemikaaleille 21 päivän ajan. Menetelmä testaa hormonihäiriötä yleisellä tasolla
Sammakkomalli	<i>Xenopus laevis</i> sammakon toukkia altistetaan testikemikaaleille 21 päivän ajan. Menetelmä testaa tyroidihormonien kaltaisia vaikutuksia.
Androgeeni reseptorimalli (RPC)	Katso taulukko 8
Rotan Androgeeni reseptorimalli	Katso taulukko 8
Estrogeeni reseptorimalli (RUC)	Katso taulukko 8
Ihmisen estrogeeni reseptorimalli	Katso taulukko 8
Aromataasimalli (H295R)	Katso taulukko 8
Steroidigeneesi (H295R)	Katso taulukko 8
Hershberger-protokolla	Lyhytkestoinen <i>in vivo</i> menetelmä, joka mittaa androgeenisia tai antiandrogeenisia vaikutuksia tai 5 $\alpha$ -reduktaasin inhibitiota.
Uterotrophinen malli	<i>In vivo</i> -malli jossa testataan kemikaalin vaikutusta kohtusolukkuon.

EU:ssa aineiden hormonitoimintaa häiritsevän ominaisuuksien paljastamiseksi on kehitteillä joitakin *in vivo* – menetelmiä. Keskeisimmät näistä on koottu taulukkoon 4. Taulukkoon kootut testit eivät yleensä anna suoraa tietoa endokrinologisia häiriöitä aiheuttavien aineiden päätepeisteistä. Tämä johtuu osittain endokrinologisen häiriöilmion huonosta ymmärtämisestä ja toistaiseksi vielä epäselvistä päätepeisteistä. Käytössä olevat testit testaavat jotakin yleisesti hyväksyttyä päätepeistettä ja tämän tiedon sivutuotteena voidaan tehdä johtopäätöksiä aineen hormonitoimintaa häiritsevistä ominaisuuksista (Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7c: Endpoint specific guidance; Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7b: Endpoint specific guidance).

**Taulukko 4. REACH -asetukseen sovellettavat endokrinologisia häiriöitä mittaavat testit**

Testiohjeen nimi	EU-koodi	OECD-koodi
Prenataalisen kehityksen toksisuustutkimus	B.31	TG 414
Lisääntymistoksisuuden seulonta yhdellä lajilla	B.34	TG 421
Kahden sukupolven lisääntymisvaarallisuustutkimus	B.35	TG 416
Kalan alkio- ja ruskuaispussivaiheen poikasten lyhytaikainen myrkyllisyystesti	C.15	TG 212
Kalanpoikasten kasvutesti	C.14	TG 215
<i>Daphnia Magnan</i> lisääntymismyrkyllisyys testi	C.20	TG 211

Hormonitoiminnan häiriintymisen tunnistamiseen suunniteltuja *in vitro*-testejä ei ole vielä OECD-validoitu. Näitä testejä ollaan aggressiivisesti tuomassa hallinnolliseen käyttöön EU:n ja USA:n toimesta (Grindon ym. 2008). EU:ssa koe-eläimille vaihtoehtoisten menetelmien validointia hoitaa Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskus (ECVAM). Se perustettiin vuonna 1991 ja siitä asti sen tehtävät ovat olleet koe-eläimille vaihtoehtoisten koemenetelmien validoinnin koordinointi EU-tasolla, toimia tietojen vaihtopaikkana asioissa, jotka koskevat vaihtoehtoisia testimenetelmiä, ylläpitää tietokantaa vaihtoehtoisista testimenetelmistä ja edistää vuoropuhelua lainsäätäjien, teollisuuden, tutkijoiden, kuluttajien ja eläinsuojeluryhmien välillä. Tällä hetkellä ECVAM keskittyy validoimaan sellaisia vaihtoehtoisia menetelmiä, jotka korvaavat eläinkokeita tai vähentävät tarvittavien eläinten määrää eläinkokeissa (Balls, 2002).

REACH – asetuksen mukaan vakiotestausohjelman mukaisesti sopivilla *in vitro* -menetelmillä saaduilla tuloksilla voidaan osoittaa aineen vaaraominaisuudet, tai niitä voidaan käyttää toksisen mekanismin ymmärtämiseen. Tässä yhteydessä "sopivilla" tarkoitetaan kansainvälisten testien kehittämiseen liittyvää kriteerien mukaista, riittävän pitkälle kehitettyä, mutta ei vielä virallisesti validoitua menetelmää. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että testi on kirjattu ennakkovalidointiprosessiin ECVAM:issa. Tällaisella menetelmällä saadun negatiivisen tuloksen varmistamiseksi rekisteröinnissä Euroopan kemikaalivirasto vaatii kuitenkin laajempia selvityksiä (REACH -asetus: liite XI).

Toksikologisen näkemyksen mukaan *in vitro* -menetelmä voi tällä hetkellä antaa riskinarviointiin käyttökelpoista tietoa paikallisvaikutuksista, genotoksisuudesta ja yleisesti toksisuuden mekanismeista. Lisäksi *in vitro* -tietoja voi käyttää vaihteittain toteutettaviin testausstrategioihin ja niiden seulontaan. Niitä ei voi vielä käyttää uuden kemikaalin toksisuusprofiilin luonnehdintaan, annosekstrapolaatioon ihmiselle, systeemi- tai pitkäaikaisvaikutusten tutkimuksiin, mutta ne ovat hyödyllisiä lisätiedon lähteitä käytettynä yhdessä *in vivo* -tutkimusten kanssa (Combes, 2007).

## 1.3 STEROIDIHORMONIEN ANALYYSIMENETELMÄT

Steroidihormonien kvantitatiiviseen analytiikkaan liittyy monia haasteita. Steroidien suhteellisen niukat pitoisuudet biologisissa nesteissä ja kudoksissa ja niiden rakenteen samankaltaisuus vaatii analyysimenetelmältä hyvää resoluutiota. Lisäksi steroidin erottaminen matriksista voi osoittautua haastavaksi. Näin ollen analyysimenetelmän täytyy olla herkkä ja selektiivinen. Nykyään steroidianalytiikassa käytetään entsyymi-immunologista menetelmää (enzyme-linked immunosorbent assay tai enzyme immunoassay, ELISA) tai massaspektrometria (MS), koska ne ovat herkkiä ja yleisesti kaupallisesti saatavilla (Makin HLJ, Glasgow 1995).

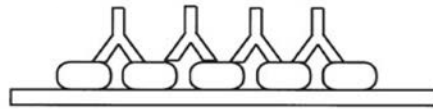
### 1.3.1 ELISA-menetelmä

ELISA-menetelmä perustuu vasta-aineen ja antigeenin väliseen sitoutumiseen (Kuva 4). Yleisimmin käytetään niin sanottua sandwich-tekniikkaa, jossa näytteen sisältämä antigeeni jää kahden vasta-ainekerroksen väliin ja näin tehtävä kaksinkertainen tunnistaminen vähentää taustaa. ELISA:n herkkyteen vaikuttaa levyyn sitoutuneiden ensimmäisten vasta-aineiden määrä ja antigeenin kyky sitoutua vasta-aineisiin. Juuri vasta-aineiden spesifisyys ja affiniteetti analytyttiin määräävät ELISA:n herkkyden ja luotettavuuden. Vasta-aineet valitaan yleensä niin, että ensimmäinen vasta-aine on monoklonaalinen, mikä varmistaa mahdollisimman spesifisen sitoutumisen. Toinen vasta-aine taas usein on polyklonaalinen. Lisäksi molempien vasta-aineiden ja antigeenin on oltava oikein laskostuneita, joten ELISA:a ei voida tehdä proteiineja denaturoivissa oloissa. Immunologisia menetelmiä käytetään edelleen tutkimustyössä ja varsin laajasti kliinisessä laboratoriotyössä. Suurimpina ongelmana steroidihormonien määrittämisessä on huono tarkkuus ja selektiivisyys vasta-aineen ristiinsitoutumisen vuoksi. Lisäksi menetelmä ei sovellu steroidiprofiilien määrittämiseen, koska sillä voidaan analysoida kerrallaan vain yhden steroidihormonin pitoisuus. Usean hormonin mittaaminen nostaa analyysin hintaa ja näytettä saatetaan tarvita jopa useita millilitroja (Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Seventh Edition; Swart ja Pool, 2008).

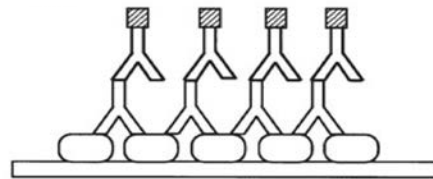
1. Antigeeni kiinnittyy levyn pintaan



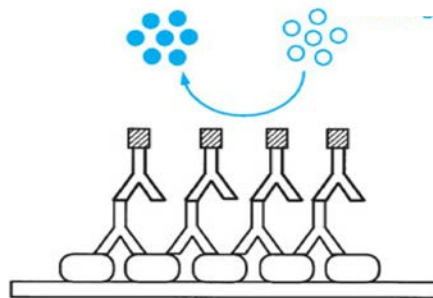
2. Primäärinen vasta-aine sitoutuu antigeeniin



3. Entsyymillä varustettu sekundaarinen vasta-aine sitoutuu primääriin vasta-aineeseen



4. Entsyymi katalysoi värireaktion, jonka absorbanssi mitataan



Kuva 4. ELISA-menetelmän periaate (Muokattu: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Seventh Edition, 2008).

### 1.3.2 Kaasukromatografia-massaspektrometria

Kaasukromatografia (GC, gas chromatography) yhdistettynä massaspektrometriin (MS) tuli käyttöön steroidianalytiikassa 1960-luvulla. Kaasukromatografilla saadaan aikaiseksi erinomainen aineiden erottuminen. Lisäksi GC-MS-menetelmä on herkkä ja spesifinen, sekä sillä voidaan päästä alhaisiin määritysrajoihin. Yleisin käytetty ionisaatiomenetelmä GC-MS-steroidianalytiikassa on elektronipommitus (EI) (Hubbard ym. 1994). Liikkuvana faasina kaasukromatografiassa käytetään inerttiä kaasua, jonka avulla tutkittavat komponentit kulkeutuvat kolonnin läpi massa-analysaattorille. Liikkuvana faasina käytetään tavallisesti typpeä, vetyä, heliumia tai argonia. Näyte syötetään kolonniin sopivaan liuottimeen liuotettuna, jossa se höyrystyy 200 - 300 °C:n lämpötilassa. Kolonnissa komponentit liikkuvat erilaisilla nopeuksilla riippuen niiden haihtuvuudesta ja vuorovaikutuksista kolonnin stationaarifaasin kanssa. Kuljettuaan kolonnin läpi komponentit saapuvat vuorollaan detektorille.

GC-MS-menetelmän käytössä steroidien analysoimisessa on kuitenkin ongelmakohtia vaikka sitä on käytetty laajasti doping-analytiikassa. Kaasukromatografiassa analyytin täytyy olla haihtuva ja lämpöstabili. Jos steroidilta puuttuvat nämä ominaisuudet, täytyy molekyylistä tehdä johdannainen derivatisoinnilla (Gao ym. 2005). Tämä lisää näytteen esikäsittelyvaiheita ja siihen kulunutta aikaa. Steroideista vain androgeenit ja estrogeenit voidaan analysoida GC-MS-menetelmällä ilman derivatisointia. Tällöinkin päädytään usein käyttämään derivatisointia resoluution parantamiseksi, ajoajan lyhentämiseksi ja steroidien kemiallisen stabiliteetin lisäämiseksi. Erilaisille funktionaalisille ryhmille käytetään eri derivatisointireagensseja mikä taas monimutkaistaa analyysiä (Higashi ym. 2004).

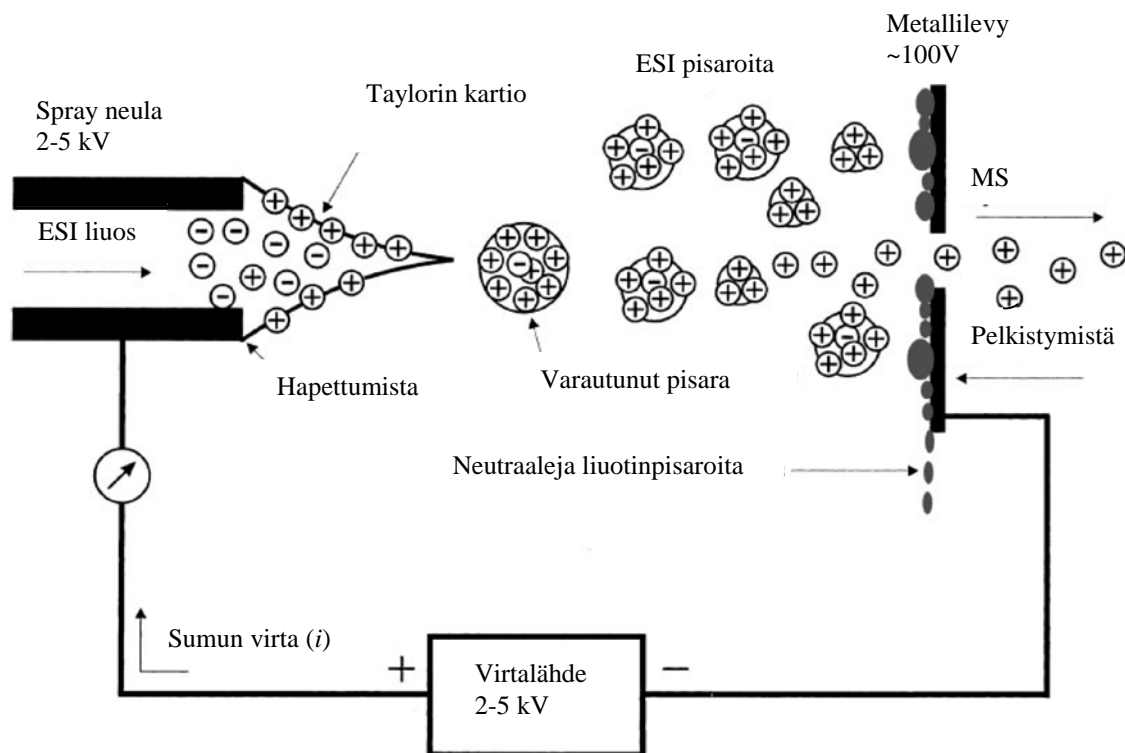
GC-MS- ja ELISA-menetelmien ongelmakohtien vuoksi kiinnostus on kasvanut viime vuosina HPLC-ESI-MS/MS-menetelmän kehittämiseen steroidien kvantitatiivisessa analytiikassa.

### 1.3.3 HPLC-ESI-MS/MS laitteisto

HPLC (High performance liquid chromatography) eli suuren erotuskyvyn nestekromatografia on tärkeä analytiikassa käytetty menetelmä, jonka eri lajeja soveltamalla voidaan mitata suurin osa biomolekyyleistä. Tärkein näistä lajeista on käänteisfaasi-HPLC (reversed phase HPLC). HPLC-laitteistossa liikkuvaa faasia ajetaan kolonnin läpi suurella paineella (20–300 bar) käyttäen pumppuja, joiden virtausnopeus on tarkkaan säädettävissä. Useimmat käytössä olevat laitteet ovat gradienttilaitteita, joissa käytetään kahta tai useampaa ajoliuosta, joiden pitoisuussuhde voidaan säätää. Matalapainegradienttilaitteessa ajoliuoksen koostumus säädetään ennen liuoksen imemistä pumppuun ja korkeapainegradienttilaitteissa järjestelmä koostuu kahdesta pumpusta, joilla on oma ajoliuospullo ja liuosten sekoitus tapahtuu korkeapaineessa pumppujen jälkeen (Jemal, 2000).

Käänteisfaasikolonneissa piioksidi on ylivoimaisesti käytetyin faasi kantajamateriaalina, jonka pinnoituksessa käytetään useimmiten kovalenttisesti sidottuja C18 hiilivetyjä. Lyhemmät hiilivetyketjut C8 ja C4 voidaan valita käyttöön, jos C18 sitoo poolittomia analyyttejä liian tiukasti. Näitä kromatografiapylväitä on saatavilla useilta valmistajilta ja niiden ominaisuudet ovat käytännössä hyvin erilaisia. Käänteisfaasikromatografian heikoin liikkuva faasi on vesi, koska siinä liikkuvat vain suolat ja sakkaridit. Analyyttien eluointinopeus kasvaa lisättäessä veteen sekoitettavaa orgaanista liuotinta, tavallisesti metanolia tai asetonitriiliä. Neutraalit ionisoitumattomat yhdisteet, kuten steroidit tulevat kolonnista polaarisuusjärjestyksessä niin, että lipofiilimmät tulevat viimeisenä. Happojen ja emästen liikkuvuuteen vaikuttavat myös niiden varausaste. Ionisoituneessa muodossa ne viihtyvät paremmin liikkuvassa polaarissa faasissa kuin neutraalissa. HPLC soveltuu myös ionisoituneiden yhdisteiden erotteluun, mutta ajoliuoksen pH:ta pitää kontrolloida puskurilla tai happolisäyksellä (LaCourse, 2002).

HPLC-massaspektrometria soveltuu hyvin yhdisteiden tunnistamiseen ja pitoisuuksien määrittämiseen. Yhdisteiden tunnistus perustuu molekyylipainon ja/tai pilkkoutumisspektrin mittaukseen. HPLC soveltuu massaspektrometrissä oleviin ionilähteisiin kuten sähkösumutukseen (electrospray, ES) ja ilmanpaineessa tapahtuvaan kemialliseen ionisaatioon (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI). Kuvassa 5 on kuvattu ES -ionisaatiomenetelmä (Jemal, 2000).



**Kuva 5. ES-ionisaatio menetelmä (muokattu Griffiths ym 2001).** Näyte saapuu spray neulaan kantaja-aineeseen liuenneena. Näyte varautuu positiivisesti ja pisaroituu Taylorin kartiossa jännite-eron ansiosta. Lentomatalla MS-analysaattorille näytepisarat pilkkoutuvat ja ylimääräinen kantaja-aine haihtuu.

Sähkösumutus-massaspektrometri (ESI-MS) on erittäin valikoiva ja herkkä detektor. Laitteistolla voidaan tehdä biomolekyylien rakenneanalyyskejä ja kvantitoida steroidien ja proteiinien määriä (Shevchenko ym 1996, Wilm ym. 1996). Tosin ainoastaan harvoin näyte voidaan syöttää laitteeseen ilman kunnollista HPLC-erottelua (LaCourse, 2002). ESI:n herkkyys voidaan määrittää kahden muuttujan perusteella: kuinka tehokkaasti molekyylit muuttuvat kaasufaasissa varautuneiksi ja kuinka hyvin nämä varautuneet molekyylit päätyvät massaspektrometrin detektorille. Herkkyyteen vaikuttavat huono vaste, sekalaisen kimppuionien synty, kilpailutilanne saatavilla olevasta varauksesta molekyylien välillä, laitteiston likaantuminen, liian kova sähkövirta sekä näytteen aiheuttama tausta tai signaalin vaimentuminen (Shaffer et al., 1999; Meng ja Fenn, 1990). Kemiallinen tausta on yksi merkittävimmistä ESI-analyysiä häiritsevistä tekijöistä. Kemiallinen tausta esiintyy usein tietyillä  $m/z$  (massa/varaus) luvuilla. Häiritsevät aineet voivat olla esimerkiksi liuottimen epäpuhtauksia tai niiden suoloja (Guevremont ym. 2000).

Sähkösumutus-ionisaatiossa HPLC:stä tuleva ajoliuos ruiskutetaan ionilähteeseen ohuen (1-100  $\mu\text{m}$ ) metallineulan (spray needle) avulla. Neulan ja päätylevyn välille kytketään 2000 – 5000 V jännite. Neulaan muodostuu sähkökentässä kapea nestekärki (Taylor cone), josta irtoaa varautuneita pisaroita. Pisarassa on ylimäärin protoneja, jotka toisaalta voivat ionisoida molekyylit ja toisaalta ne kuljettavat sähkövirtaa neulan ja päätylevyn välillä. Tasaisen ESI-suihkun syntyyn vaikuttavat monet muuttujat. Niistä tärkeimmät ovat jännite, kuivaavan kaasun virtausnopeus, sumutuksen ja vastaelektrodin etäisyys, kapillaarin nesteen virtausnopeus ja

ajoliuottimen sähkönjohtavuus (Chen ja Pui, 1997). ES-sumu on vakaa silloin kun nestekärki on vakaa ja kun pisaroita lentää tasaisena virtana (Wei ym. 2002).

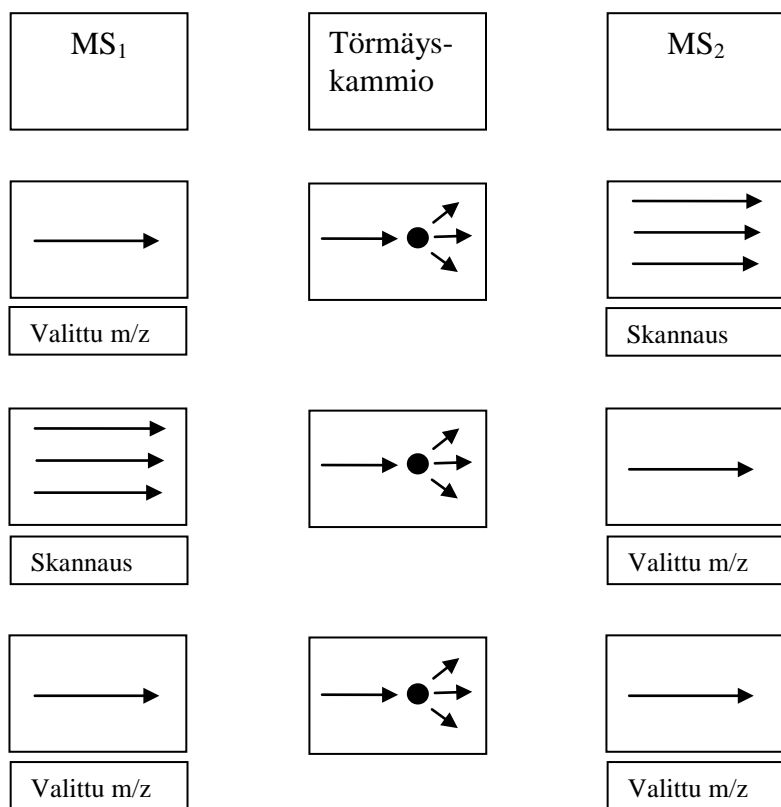
Sähkösumutuksessa syntyvien pisaroiden muodostumista ja käyttäytymistä ei vielä täysin ymmärretä (Kebarle ja Verkerk, 2009). Syötetystä nestevirrasta varausten hyljintävoiman vaikutuksesta muodostuu hyvin pieniä (noin 1  $\mu\text{m}$ ) positiivisesti varautuneita pisaroita. Sprayneula suunnataan yleensä hiukan ohi ioninkeräsaikon, koska sumun laitamilla on hienojakoisempia pisaroita ja vähemmän likaa. Ionit ohjataan aukkoon sähkövirran avulla (Cole, 2000). Syntyneiden pisaroiden koko pienenee liuottimen haihtuessa, kun ne lentävät kuumen kapillaarin tai kaasuverhon läpi massaspektrometrin sisälle. Protonoituneet näyteionit irtoavat pisaran pinnalta pintavarauksen kasvaessa ja lopulta liotin haihtuu ionin ympäriltä (Zhou ja Cook, 2001). Pisaroiden kuivumista edistetään kuivalla tyyppikaasuverholla tai lämmityksellä. Ionien lentoenergiaa lisäämällä poistetaan kimpusta viimeiset vesimolekyylit ja rikotaan molekyylirykelmät. Suurilla nopeuksilla ionit pilkkoutuvat. Pisaroiden hajoaminen ja ionien synty tehostuu, kun nesteen pintajännitys pienenee ja haihtuvuus paranee. Vedellä on suuri pintajännitys ja heikko haihtuvuus. Tästä syystä orgaanisten liuottimien osuuden kasvaessa ionisaatio tehostuu (Kostiainen ja Kauppila, 2009).

Sumutettaviin pisaroihin mahtuu vain rajattu määrä varausta. Mikäli puskurin konsentraatio on liian korkea, varaus sitoutuu lähinnä puskurionioneihin, eikä analyylille riitä varauksia. Puhtaita happoja (muurahaishappo) tai emäksiä (ammoniakki) ilman vastaionia voidaan sen sijaan käyttää korkeinkin pitoisuuksina, koska niiden sähkönjohtokyky on pieni. Toisaalta pieniä nestevirtauksia ja korkeita jännitteitä käytettäessä neulan kärjessä voidaan havaita sininen sähköpurkaus (corona discharge). Sähköpurkaus haittaa ionisaatiota ja synnyttää kemiallisen ionisaation tyyppisiä prosesseja. Pahimmillaan purkaus voi aiheuttaa laitevaurion. Purkaus syntyy erityisen helposti mitattaessa negatiivisia ioneja, kun elektroneja irtoaa neulan kärjestä (Enke, 1997).

Analyytin ominaisuudet vaikuttavat ionisaation tehokkuuteen. Mitä emäksisempi yhdiste ja mitä suurempi protoniaffinneetti sillä on, sitä tehokkaampi ionisaatio on. Paras positiivinen signaali saadaan käytettäessä happamia ajoliuoksia, jolloin emäkset ovat protonoituneita jo liuosfaasissa. Positiivisia ioneja saadaan kuitenkin aikaan myös neutraaleista yhdisteistä sekä emäksisistä yhdisteistä. Tämän ilmiön selitys on, että varautuneessa sumupisarassa on aina ylimäärä protoneja. Kun liotin haihtuu, ylimääräiset protonit tarttuvat analyyttimolekyyleihin, vaikka olot liuoksessa eivät suosisi varautumista. Toinen merkittävä ionisaatioon vaikuttava tekijä on analyytin poolisuus: Polaariset aineet pysyvät piilossa pisaran sisällä, pooliton yhdiste pyrkii pisaran pinnalle, josta sen on helpompaa irtoaa (ionisoitua) (Cech ym. 2001).

Onnistuneen analyytin ionisaation jälkeen jäljellä on niin sanottu tandem massaspektrometrin (MS/MS) analyysivaihe. MS/MS analyysi tarkoittaa sitä, että useampi massa-analyysaattori on kytketty peräkkäin. Tämä mahdollistaa analysoitavien ionien valinnan ja niiden pilkkomisen ja pilkkeiden analysoimisen. Ensimmäisessä MS<sub>1</sub> yksikössä voidaan suorittaa ionien valinta niiden massan perusteella. Ennen toista MS<sub>2</sub> yksikköä on törmäyskammio, jonka tarkoituksena on inertin kaasun avulla pilkkoa valittu lähtöioni (precursor ion) tuoteioneiksi (product ion). Syntyneistä pilkeioneista voidaan sitten valita mitattava ioni toisessa MS<sub>2</sub> yksikössä. Kuvassa 6 on koottu MS/MS laitteiston mahdollisuuksia ionien analysoimiseksi (Griffiths ym. 2001).

Massaspektrometritekniikoita on hyödynnetty biomolekyylien ja synteettisten aineiden analytiikassa jo pitkään. Sen parhaat ominaisuudet ovat pienten helposti ionisoituvien molekyylien kvantitatiivisessa analyysissä.



Kuva 6. MS/MS analysaattorin mahdollisuudet (muokattu de Hoffmann ym. 1996).



## 2. KOKEELLINEN OSA

### 2.1 TYÖN TARKOITUS

Tässä työssä tutkittiin alustavasti onko mahdollista mitata hormonien pitoisuuksia H295R-solujen solumediumista LC-MS/MS laitteistolla. Hormonitasoihin myös pyritään vaikuttamaan tunnetuilla endokriinijärjestelmää häiritsevillä aineilla. Solulinjana käytetään H295R-soluja, joilla on regulatorista merkitystä USA:n lainsäädännössä ja todennäköisesti myös EU:n uudessa kemikaalilainsäädännössä lähitulevaisuudessa. Orthotopix -yritys on jo optimoinut solulinjan kasvatus- ja altistusprotokollat. Tarkoituksena on saada mitattua hormonipitoisuuksia, joita voidaan verrata toisen yleisessä käytössä olevan mittausmenetelmän antamiin tuloksiin, joita on jo toteutettu Orthotopixissa ja US-EPA:ssa. US-EPA:n työlistalla olevien hormonien (estradioli, testosteroni ja androstenedioni) lisäksi määritetään muita hormoneja (estrone, estradioli ja progesteroni) antamaan lisätietoa H295R-solulinjan ominaisuuksista ja muista mahdollisista käyttötarkoituksista.

Testikemikaaleiksi on valittu H295R-solulinjalla aikaisemmin testattuja yleisesti tunnettuja endokriinijärjestelmää häiritseviä aineita; aminoglutetimidi, prokloratsi ja forskoliini.

Aminoglutetimidi on steroidisynteesiä hillitsevä lääke. Sitä käytetään kliinisesti Cushingin syndrooman ja metastasoineen hormoniherkän rintasyövän hoitoon. Suurina pitoisuuksina se estää CYP11A1 toimintaa pysäyttäen steroidisynteesin kolesteroliin. Pienemmät pitoisuudet estävät CYP19:ta toimintaa vähentäen estrogeenien synteesiä (Gross ym. 2007; Gibson ym. 2009). Prokloratsi on imidatsoli-fungisidi ja sitä käytetään yleisesti Euroopassa, Australiassa ja Etelä-Amerikassa. *In vitro* -tutkimuksissa sen on havaittu antagonisoivan androgeeni- ja estrogeenireseptoreja ja inhiboivan CYP19:ta. *In vivo*-hershberger -protokollassa prokloratsin on todettu vähentävän sukupuolielinten painoa, joka on johtanut androgeenireseptorien säätelemien geenien ilmenemisen muuttumiseen eturauhasessa sekä lisääntyneeseen luteinisoivan hormonin eritykseen (Vinggaard ym 2006). Forskoliini on labteeni diterpeeni, jota tuottaa Indian Coleus kasvi (*Coleus forskohlii*). Sitä käytetään solufysiologisissa tutkimuksissa nostamaan syklisen AMP:n (cAMP) määrää. Forskoliini aktivoi adenylaattisyklaasi -entsyymiä ja näin lisää cAMP:n määrää solun sisällä. cAMP:ta tarvitaan muun muassa hormonien negatiivisen palautusjärjestelmän aktivoimiseen proteiini kinaasi A:n avulla (Insel ja Ostrom, 2003).

Työ tehtiin Orthotopix -yrityksen ja Kuopion yliopiston yhteistyönä. H295R solujen viljely ja altistus kokeet tehtiin Turussa Orthotopix -yrityksessä. Hormonipitoisuudet määritettiin Kuopion yliopiston Farmaseuttisen kemian laitoksella LC-MS/MS laitteistolla.

## 3. MENETELMÄT

### 3.1.1 H295R-solujen kasvatusta ja jakaminen

H295R-solujen (ATCC CRL-2128) saavuttua solupankista ne viljeltiin keskikokoiseen solupulloon (T-75, Fisher Scientific, Lontoo, UK), niin että soluja oli 300 000/ml ja pullo siirrettiin inkubaattoriin (37 °C 5 % CO<sub>2</sub> normaali-ilmanpaine, Galaxy® 170 R, New Brunswick, Lontoo, UK). Solupullon täyttyttyä 80 %:sti (3-4 päivän kuluttua), solut irrotettiin trypsiinimalla (1x Trypsiini-EDTA liuos, kantaliuos: 0.5% Trypsin-EDTA (10x), Gibco, NY, USA), jonka jälkeen ne jaettiin uuteen pulloon (T-75, 300 000 solua/ml) ja annettiin niiden täyttää se 80 %:sti. Tämä toistettiin kolme kertaa, jonka jälkeen solut pakastettiin nestemäiseen tyypeen (600 000 solua/ml, 8 % DMSO). Soluja herätettäessä ne viljeltiin (300 000 solua/ml) keskikokoiseen solupulloon (T-75), ja annettiin täyttää se 80 %:sti, jonka jälkeen ne irrotettiin trypsiinimalla ja siirrettiin uuteen samanlaiseen pulloon. Tämä toistettiin kolme kertaa, jonka jälkeen solut olivat valmiita 24-kuoppalevyille siirrettäviksi.

H295R-soluja kasvatettiin Dulbecco's modified Eagle's mediumissa (DMEM/HIGH, SH3052502, Fisher Scientific, Lontoo, UK), johon oli lisätty ravintosekoitus F-12:sta (Ham's Nutrient Mixture F12, SH3002601, Fisher Scientific, Lontoo, UK) niin, että lopulliset kasvatustiedon komponenttien pitoisuudet olivat:

- 15 mM HEPES
- 6.25 ug/ml insuliinia
- 6.25 ug/ml transferriniä
- 6.25 ng/ml seleeniä
- 1.25 mg/ml bovine serum albumin
- 5.35 ug/ml linoliini happoa
- 2.5 % Nu seerumia

24-kuoppalevyillä suoritettavia altistuskokeita (kaksi toisistaan riippumatonta altistusta) varten H295R solut irrotettiin kasvatusalustastaan 37 °C 1x Trypsiini-EDTA liuksella (kantaliuos: 0.5% Trypsin-EDTA (10x), Gibco, NY, USA). Irronneet solut suspensoitiin kasvatusmediumiin niin, että niiden tiheys oli 300 000 solua millilitrassa. Tätä liuosta lisättiin yksi millilitra yhteen 24-kuoppalevyn kuoppaan (24-well palte, 08-757-216, Fisher Scientific, Lontoo, UK). Solujen annettiin kiinnittyä 24 tuntia (37 °C 5 % CO<sub>2</sub> normaali-ilmanpaine) inkubaattorissa (Galaxy® 170 R, New Brunswick, Lontoo, UK).

### 3.1.2 H295R-solujen altistaminen

24 tunnin esi-inkuboinnin jälkeen solut otettiin pois inkubaattorista ja niitä tarkasteltiin valomikroskoopilla. Kuoppien tuli olla 60-70 %:sti täynnä soluja. Soluille vaihdettiin tuore kasvatusmediumi (1ml/kuoppa), jonka jälkeen niihin lisättiin 1 µl tutkittavaa ainetta (aminoglutetimid:545864, forskoliini: D3658, prokloratsi: 45631, Sigma-Aldrich, Seelze, Saksa) tai kontrollina käytettyä DMSO:ta (494437, Sigma-Aldrich, Seelze, Saksa). Altistamisen jälkeen soluja inkuboitii 48 tuntia (37°C 5% CO<sub>2</sub> normaali-ilmanpaine) inkubaattorissa (Galaxy® 170 R, New Brunswick, Lontoo, UK).

### 3.1.3 Hormonien uutto ja kvantitointi LC-MS/MS laitteella

48 tunnin inkuboinnin jälkeen soluja tarkasteltiin valomikroskoopilla ja mikäli altistetut- ja kontrollikuopat olivat 60-95 %:sti täynnä soluja jatkettiin koetta. Solujen kasvatusmedium kerättiin (1 ml) varovasti pipetoimalla puhtaisiin lasiputkiin (Z653594, Sigma-Aldrich, Seelze, Saksa) niin, että pohjaan kiinnittyneet solut eivät irronneet. Solumediumnäyte puolitettiin Orhtotopix Oy:n omia ja Kuopion yliopiston LC-MS/MS analyysijä varten.

Lasiputkissa olevan solumediumin (0,5 ml) päälle pipetoitiin 2,5 ml MTBE:tä (650560, Sigma-Aldrich, Seelze, Saksa) (metyylitertiääributyylieetteri) ja seosta ravistettiin voimakkaasti yhden minuutin ajan. Orgaanisen- ja vesifaasin annettiin erottua viisi minuuttia, jonka jälkeen ylempi orgaaninen faasi pipetoitiin uuteen lasiputkeen. Tämä uuttoprosessi toistettiin ja saadut orgaaniset faasit yhdistettiin (2 x 2,5 ml). Näytteet kuivattiin typpivirrassa.

Kuivat näytteet kuljetettiin Kuopioon pakastettuina. Ennen LC-MS/MS (Agilent 6410 Triple Quad LC/MS varustettuna Agilent 1200 Series Binary Pump SL pumping system ja Agilent 1200 Autosamplerillä) analyysiä MTBE haihdutettiin kuiviin typpivirran avulla ja lasiputkissa olevat hormonit liotettiin 44% MeOH:n (322415, Sigma-Aldrich, Seelze, Saksa) (200 µl) ja niihin lisättiin 440 pmol/ml D3-testosteronia (T5536, Sigma-Aldrich, Seelze, Saksa) sisäiseksi standardiksi. Näytteet siirrettiin uusiin näyteputkiin niin, että jokaisesta näytteestä saatiin tekninen toisto (2 x 100 µl). Samalla valmistettiin jokaisesta tutkitusta hormonista standardisuora 44% MeOH:n, joka sisälsi neljä pistettä (0,2, 0,1, 0,04, ja 0,02 nM). Kuvassa 7 on esimerkki testosteronin standardisuorasta.

Näytteet ja standardiliuokset injisoitiin HPLC (XBRIDGE C18 2,5µl 2,1 x 50 mm, Waters, Milford, Massachusetts, USA) kolonniin, joka lämmitettiin 45 C°, ja jossa käytettiin seuraavia ajoliuoksia: A; 0,025 % muurahaishappo ja B; MeOH, jossa 0,025 % muurahaishappo nousevana gradienttina niin, että 44 % MeOH pitoisuus ajoliuoksessa saavutetaan kahdeksan minuutin aikana (ajonopeutena 200 µl/min). Näytteiden tai standardien jälkeen kolonni tasapainotettiin ajamalla ajoliuos A:ta viisi minuuttia ennen seuraavan näytteen ajoa. Massa-analyysissä käytetyt parametrit on koottu Taulukkoon 5.

Hormonien pitoisuuksia solumediumissa laskettaessa hyödynnettiin standardisuorasta saatua suoran yhtälöä ( Esim. testosteronille  $y = 28739x + 3292$ ) ja kromatogrammista saatua pinta-alaa seuraavasti:

Suoran yhtälö  $y = 28739x + 3292$

Kromatogrammin pinta-ala keskiarvo forskoliinikäsittelöllä (10 µM): 3336,26

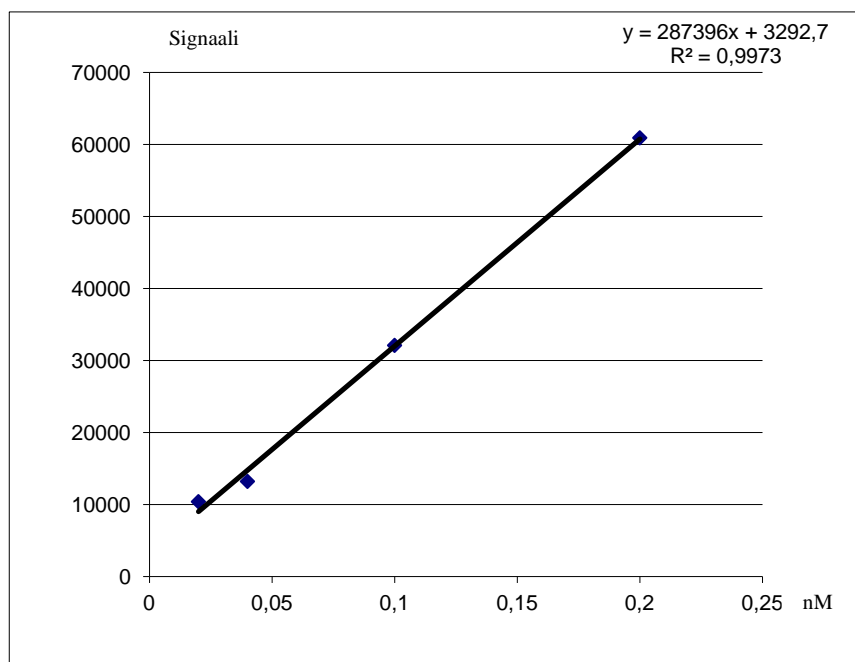
Sijoittamalla luvut suoranyhtälöön saadaan näytteen sisältämä testosteronin pitoisuus (µM) ilman laimennuskertoimia:  $x = (-3292,7 + 3336,26) / 287396$

$x = 0,00154010206$  nM

Laimennuskerroin 5 saadaan: 1 ml solumediumia puolitettiin ja uutettiin 5 ml:aan MTBE:tä. (laimennos 2x ja 5x). Näyte haihdutettiin (5 ml) ja liuotettiin 200 µl:n 44 % MeOH ja puolitettiin rinnakkaista ajoa varten (laimennos 0,25x ja 2x). Tästä saadaan:  $2 \cdot 5 \cdot 0,25 \cdot 2 = 5$

Tulos muutetaan muotoon ng/ml kertomalla laimennos kertoimella ja testosteronin molekyylipainolla (288,2):

$$0,00154 \text{ nM} \cdot 5 \cdot 288,2 = 2,22 \text{ ng/ml}$$



Kuva 7. Testosteronin standardisuora.

Taulukko 5. Hormonien massa-analyysissä käytetyt parametrit.

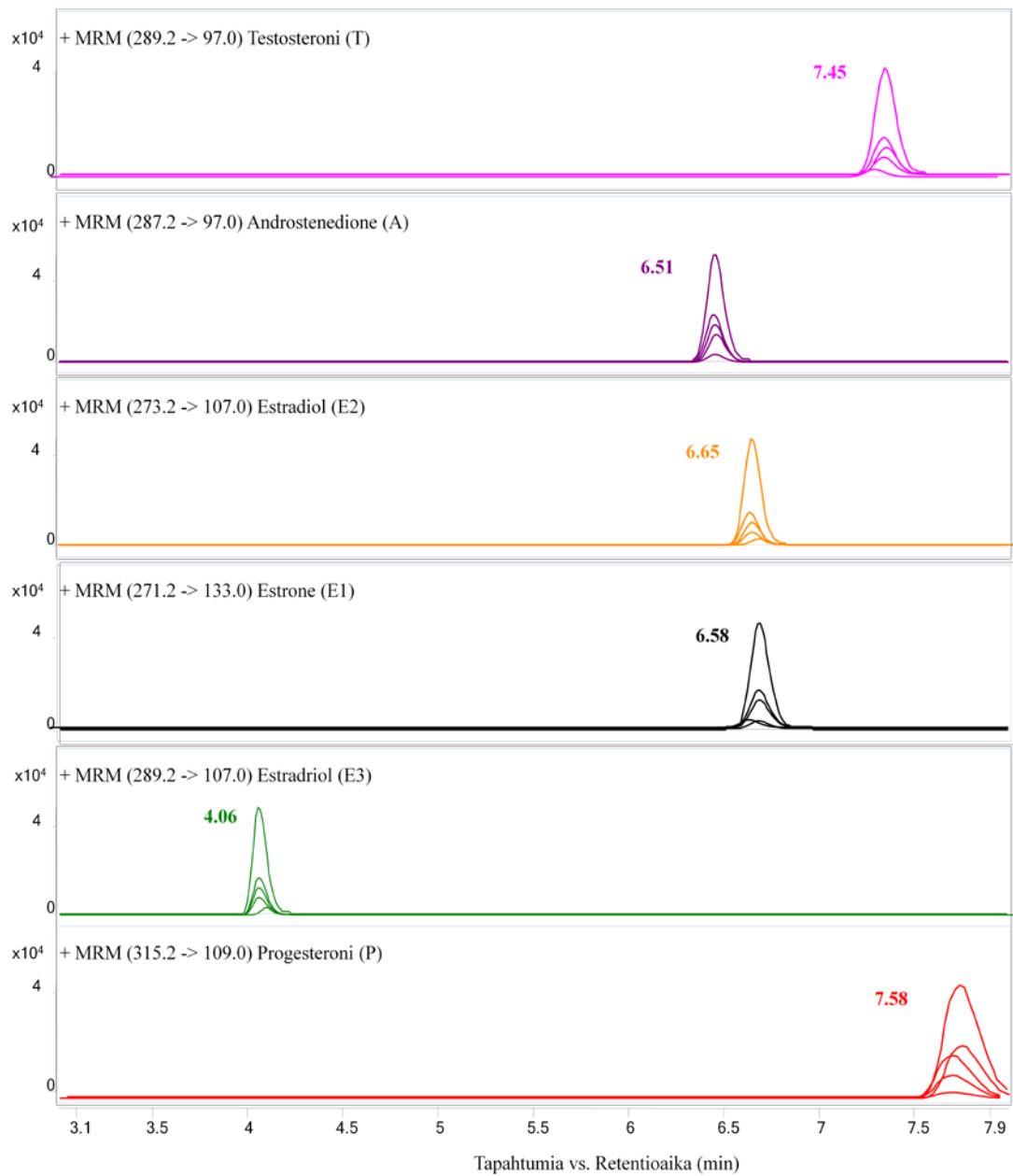
Hormoni	Mw	Törmäys energia	m/z	Fragmentointi	Valittu fragmentti
Androstenedione	286,2	160	287,2	25	97
Testosteroni	288,2	160	289,2	25	97
Estrone	270,2	100	271,2	25	133
Estradiol	272,2	100	273,2	25	107
Estradiol	288,2	100	289,2	20	107
Progesteroni	314,2	100	215,2	20	109

## 4. TULOKSET

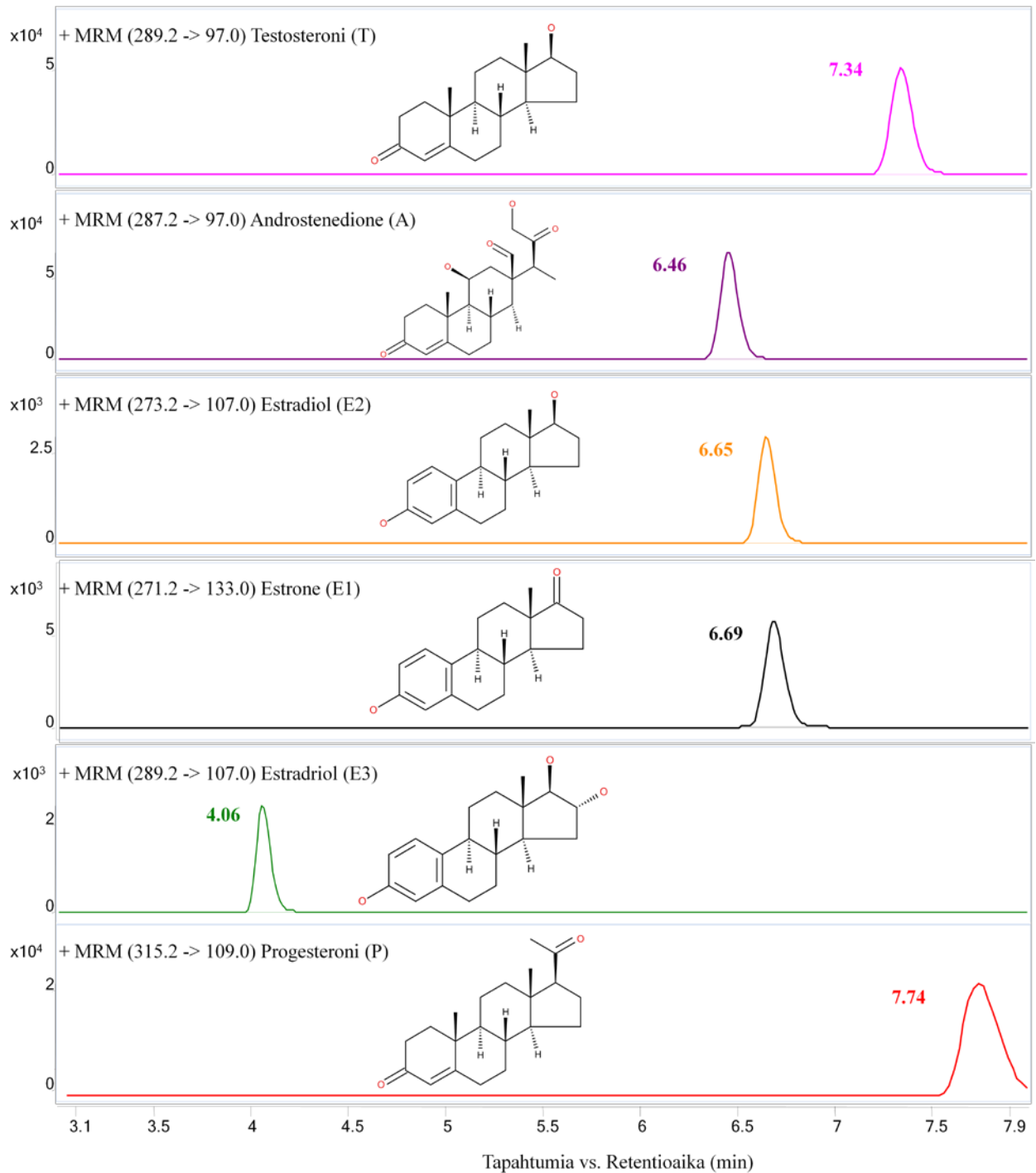
### 4.1.1 Hormonien pitoisuudet solumediumissa

Kuvassa 8 on esitetty standardeina käytettyjen hormonien kromatogrammit HPLC retentioaikoinen. Kuvasta nähdään, että standardit toimivat hyvin ja hormonien retentioajat pysyvät vakiona pitoisuudesta riippumatta. Kuvaan 9 on kerätty H295R solujen kasvatusmediumista LC-ESI-MS/MS laitteistolla analysoitujen hormonien molekyyliarakenteet, molekyyli­massat, analysoidut pilkeionit ja HPLC:n retentioajat.

Hormonit erottuivat HPLC-kolonnista hydrofobisuutensa mukaan niin, että hydrofiilisimmat saapuivat HPLC:n detektorille ensin. Ensimmäisenä erottuu estratrioli, jossa on kolme hydroksyyli­ryhmää. Seuraavaksi erottuvat aldosteroni, estradioli ja estroni, jotka saapuvat detektorille lähes samanaikaisesti. Viimeisenä erottuvat testosteroni ja progesteroni. Hormonien erottumiseen HPLC-pylväässä vaikuttaa hydrofobisuuden lisäksi niiden molekyyli­rakenne. Millään tutkituista hormoneista ei ole samaa molekyyli­painoa, joten ne on helppo erottaa toisistaan MS/MS laitteistossa. Pilkeionien seuraaminen on tärkeää mahdollisten saman­massaisten muiden aineiden aiheuttaman taustan vähentämiseksi. Estradiolin havaitut pitoisuudet jäivät niin pieniksi, että sen kvantitointi ei onnistunut.



**Kuva 8. LC-ESI-MS/MS standardien HPLC retentioajat.**



**Kuva 9.** LC-ESI-MS/MS laitteistolla solumediumista analysoitujen hormonien molekyyliarakenteet, analysoidut ionit ja HPLC:n retentioajat.

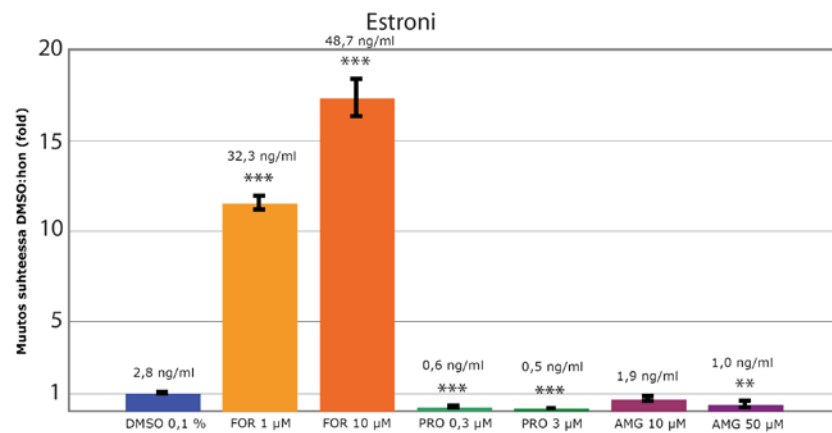
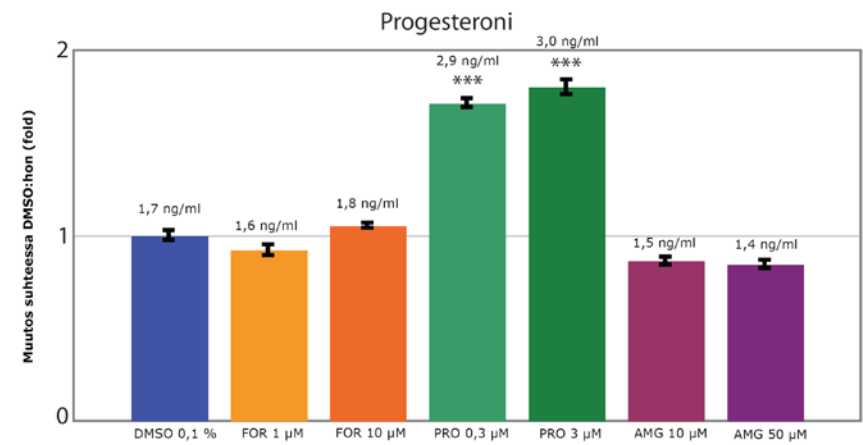
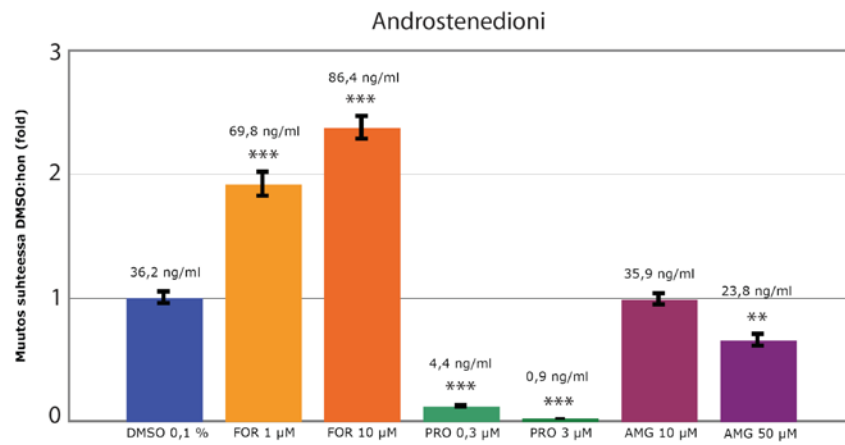
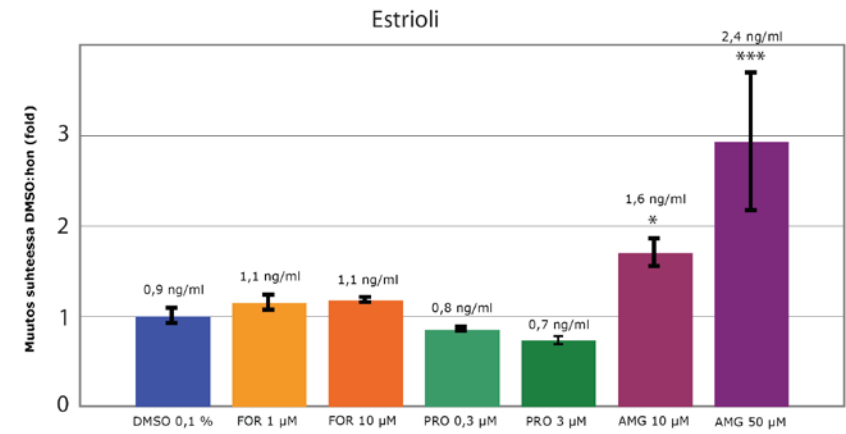
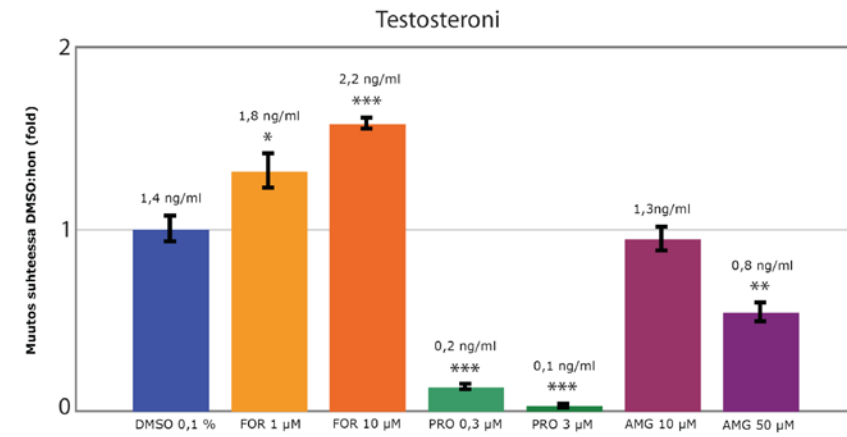
Kuvaan 10 on koottu testosteronin, androstenedionin, estronin, estriolin ja progesteronin määrän suhteellinen muutos eri endokriinijärjestelmää häiritsevillä aineilla kahdella annoksella sekä mitatut hormonipitoisuudet nanogrammoina millilitrassa (ng/ml).

Forskoliinin molemmilla solujen käsittelypitoisuuksilla (1 $\mu$ M ja 10  $\mu$ M) nähdään selvä annosvasteinen ja tilastollisesti merkitsevä testosteronin, androstenedionin ja estronin määrän lisääntyminen mitatuissa mediumnäytteissä. Eniten lisääntyy estronin pitoisuus (17-kertainen) kontrollikäsitelyyn verrattuna. Seuraavaksi eniten reagoi androstenedioni (2,7-kertainen) ja testosteroni (1,6-kertainen). Estriolin ja progesteronin määriin forskoliinikäsitelyllä ei ollut vaikutusta.

Prokloratsin käsittelyn vaikutukset näkyvät selvästi H295R solulinjassa. Niin androstenedionin, estronin kuin testosteronin pitoisuudet laskevat selvästi molemmilla prokloratsin (0,3  $\mu$ M ja 3  $\mu$ M) annoksilla kontrollikäsitelyyn verrattuna. Toisaalta prokloratsin vaikutukset progesteronin määrään ovat päinvastaiset. Progesteronin määrä lisääntyy aina 1,7-kertaiseksi kontrolliin verrattuna. Estriolin pitoisuuteen prokloratsinilla ei ollut vaikutusta.

Aminoglutetimidi vähensi androstenedionin, estronin ja testosteronin pitoisuutta solumediumissa niin kuin prokloratsini mutta vaikutus oli vähäisempi. Tilastollinen merkitsevyys saavutettiin vasta korkeimmalla (50  $\mu$ M) annoksella. Aminoglutetimidi oli ainoa aine, joka aiheutti selviä muutoksia estriolin pitoisuuksissa, sillä sen vaikutus lisääntyi aina 2,7-kertaiseen asti verrattuna kontrolliin. Progesteronin määrään aminoglutetimidikäsitelyllä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta.





Kuva 10. Testosteronin, androstenedionin, estronin, estriolin ja progesteronin suhteelliset muutokset DMSO kontrolliin verrattuna. Kuvaan on merkitty solumediumista mitattu hormonipitoisuus (ng/ml) ja tilastollinen merkitsevyys suhteessa kontrolliin kahden otoksen Studentin t-testiä käyttäen ( $p > 0,05 = *$ ,  $p > 0,01 = **$  ja  $p > 0,001 = ***$ ).

## 5. Pohdinta

H295R-solujen viljely Orthotopix-yrityksessä Turussa onnistui hyvin vaikka solulinjaa ei voida pitää perinteisenä jatkuvana solulinjana vaan vaatii erityisjärjestelyjä. Solujen altistus suoritettiin kolmella valitulla hormonitoimintaa häiritsevällä aineella kahdessa pitoisuudessa ja kantaja-aineella ongelmitta. Analysoitavien hormonien uutto solujen kasvatusmediumista tehtiin Orthotopixin tiloissa. Tarkasteltaessa uuttotehokkuuksia (dataa ei näytetä) saavutettiin 83 % saanto. Näytteet kuljetettiin kuivajähän pakattuna Kuopioon analysoitavaksi HPLC-MS/MS laitteistolla.

Näytteiden uudelleen liottamisen jälkeen ne analysoitiin HPLC-MS/MS laitteistolla. HPLC-erottelu perustuu kantajaliuoksen ja analyttien vuorovaikutukseen kromatografiapylvään seinämien kanssa. Tarkasteltaessa HPLC:n detektorin antamia histogrammeja voidaan todeta, että analysoidut hormonit eivät erottuneet täysin toisistaan. Parhaiten tämä nähdään aldosteronin, estradiolin ja estronen kohdalla, jotka tulivat HPLC-kolonnista lähes samanaikaisesti. Toinen selvä ongelma hormonien erottumisessa kolonnissa oli progesteronin kohdalla, sillä se jäi saapumatta kokonaan analysaattorille ennen analyysiajon loppua. Hormonien erottumista kromatografiapylväästä voitaisiin pyrkiä parantamaan muutamalla ajoliuosta, ajoliuoksen gradienttia tai pylvään ominaisuuksia. Pahimmat ongelmat kuitenkin olivat estradiolin kohdalla sillä sen detektio epäonnistui. Syynä tähän voisi olla estradiolin alhainen pitoisuus solumediumissa tai estradiolin kemiallinen reagoiminen uutossa tai ajoliuoksessa olevien yhdisteiden kanssa.

Ainoa selvä ongelma, joka pitäisi ratkaista ennen kuin LC-MS/MS menetelmää voidaan käyttää hormonien määrittämiseen H295R-solulinjan kasvatusmediumista, on estradiolin määrittäminen. HPLC-ajossa optimoimisen kohde olisi progesteronin saaminen aikaisemmin analysaattorille, sillä aldosteroni, estradioli ja estrone voidaan erotella MS/MS laitteistolla niiden eriävien lähtöionimassojen ja pilkeionien avulla. HPLC erotus toimi erittäin hyvin estradiolille ja testosteronille. Tehtäessä tätä tutkimusta HPLC kolonnin ominaisuudet oli optimoitu eri analyysiä varten, joten saatua tulosta voidaan pitää oikein hyvänä.

Muita ongelmia aiheutti isotooppileimattu testosteronistandardi, jota lisättiin näytteeseen analyysin monitoroimiseksi. Leimatun testosteronin signaali ei pysynyt vakiona vaan analyysin loppua kohti signaali heikkeni selvästi. Tämän takia progesteronin kvantitatiiviseen tulokseen pitää suhtautua varauksella. Tästä huolimatta muista hormoneista saatuja kvantitatiivisia tuloksia voidaan pitää jokseenkin luotettavina. Vaikka progesteronin absoluuttinen kvantitointi ei onnistunutkaan voidaan eri käsittelyjen vaikutusta progesteronitasoihin arvioida suhteellisina muutoksina kontrollikäsittelyyn verrattuna hyvinkin luotettavasti, mikä koskee myös muita määritettyjä hormoneja.

Tämä on ensimmäinen tutkimus, jossa HPLC-MS/MS laitteistolla on kvantitoitu hormonien pitoisuuksien muutokset tunnettujen hormonitoimintaa häiritsevien kemikaalien vaikutuksesta H295R-solulinjan mediumista. Menetelmä toimi lupaavasti vaikka kaikkien hormonien kvantitointi ei onnistunut täysin.

Perinteiseen ELISA-menetelmään verrattuna HPLC-MS/MS menetelmä on halpa ja nopea, jos tarkoituksena on analysoida useampaa kuin kahta hormonia sillä immuunianalyysiin perustuvat valmiit kitit ovat suhteellisen kalliita. Tosin HPLC-MS/MS laitteiston hankkiminen on suuri investointi ja sen käyttämiseen tarvitaan erityisosaamista, jota ELISA kittien käytössä ei tarvita. Tarvittava näytemäärä on pienempi HPLC-MS/MS menetelmässä, koska samasta näytteestä voidaan määrittää useampi hormoni yhden ajon aikana, kun taas ELISA:ssa jokaista hormonia varten on tilattava oma määrityskittinsä. ELISA vasta-aineiden tiedetään reagoivan muihin samankaltaisiin hormoneihin aiheuttaen taustaa analyysiin. Tutkittaessa hormonitasojen muutoksia on tärkeää olla varma minkä hormonin pitoisuus todella muuttuu. Tämän lisäksi eläinnäytteitä analysoidessa mahdollisten ristiin reagoivien hormonien määrä kasvaa lisäten epätarkkuutta. HPLC-MS/MS laitteistolla voidaan välttää monet näistä ongelmista sillä HPLC-MS/MS-analyysi perustuu molekyylien yksilöllisiin kemiallisiin- ja fysikaalisiin ominaisuuksiin.

ELISA -menetelmän hyvinä puolina on sen teknisen toteuttamisen helppous sekä runsaasti saatavilla oleva historiallinen taustatieto. MS/MS -tekniikan käytössä korostuvat useiden hormonien ja hormoninäytteiden analysoiminen pienestä näytetilavuudesta sekä varmuus tutkittavien aineiden mittaamisesta.

Verrattaessa tuloksia muihin tutkimuksiin huomataan, että absoluuttisten hormonipitoisuuksien mittaaminen ei ole mielekästä, sillä ne vaihtelevat suuresti eri lähteiden välillä ilmeisesti eroavien solujen kasvatusolosuhteiden takia (Hecker ym. 2006). Tämä sama ongelma havaittiin nyt tehdyssä tutkimuksessa. Vertailemalla useiden laboratorioden tuloksia on huomattu, että suhteelliset vasteet ovat huomattavasti toistettavampia ainakin testosteronin ja estradiolin osalta altistettaessa solut forskoliinille ja prokloratsinille (Hecker ja Giesy, 2008).

Jotta H295R-steroidigeneesitestin tuloksia voisi käyttää kemikaalien riskinarvioinnissa, on US-EPA määrittänyt tietyt reunaehdot solulinjalle ja hormonien mittaumenetelmälle. Niihin kuuluvat testosteronin ja estradiolin perustasot (2 ng/ml tai enemmän testosteronille ja estradiolille 0,08 pg/ml tai enemmän). Tämän lisäksi forskoliinialtistuksella (10 $\mu$ M) on saatava kaksinkertainen kasvu testosteroniin ja 15-kertainen kasvu estradioliin nähden. Tämän lisäksi prokloratsinialtistuksen (3 $\mu$ M) pitää tuottaa kaksinkertainen lasku testosteroniin nähden ja tämän lisäksi estradiolin määrän pitää olla alle 0,03 ng/ml (Hecker ym 2010).

Ainoa hormoni, joka on mukana US-EPA:n validointityössä ja tässä tutkimuksessa oli testosteroni. Vaikka testosteronilla ei saavutettu US-EPA:n vaatimaa 2 ng/ml peruspitoisuutta on tulos silti lupaava (1,4 ng/ml). Matalaksi jäänyttä pitoisuutta voisi selittää testosteronin mittaumenetelmän erolla, sillä US-EPA:n raja-arvot ovat määritetty ELISA menetelmiä käyttäen. Myös yhdeksi validiteetin kriteeriksi asetettua kaksinkertaista muutosta forskoliinialtistuksessa (10 $\mu$ M) ei saavutettu. Määritetty muutos oli melko lähellä kriteeriä (1,6-kertaa) ja muutos on tilastollisesti merkitsevä. Positiivisena tuloksena saavutettiin testosteronin vaadittu kaksinkertainen pitoisuuden lasku altistettaessa prokloratsinilla (3 $\mu$ M). Vaikka estradiolin määrittäminen ei onnistunut voidaan pitää estradiolin tuloksia ainakin jokseenkin verrattavissa mahdollisiin muutoksiin estradiolin pitoisuuksissa. Forskoliinilla (10 $\mu$ M) tapahtunut kertalukumuutos on yli 15-kertainen, eli vaadittavalla tasolla. Muita merkittäviä tuloksia saatiin progesteronin osalta, jossa havaittiin selvää tilastollisesti merkitsevää

kasvua molemmilla prokloratsinipitoisuuksilla. Tämä vahvistaa testosteronin ja estronin tulosten oikeellisuutta.

Hormonitasojen mittaamisen lisäksi H295R-solulinjalle kehitetty standardisoitu testiprotokolla tarjoaa arvokasta tietoa kemikaalien tai lääkeaineiden vaikutuksista CYP-entsyymien geenien ilmentymisestä ja aktiivisuudesta. Näiden kahden eri päätepisteen ymmärtäminen on elintärkeää, jotta voidaan kehittää malleja, joilla selvitetään kemikaalien aiheuttamia endokriinijärjestelmän häiriöitä. Saatua menetelmää ja siitä saatuja kokemuksia voitaisiin käyttää lainsäädännöllisiin tarkoituksiin arvioitaessa kemikaalien aiheuttamaa riskiä ihmiselle ja luonnolle.

## LÄHDELUETTELO

- Angerer G, Nordbeck R, Sartorius C. Impacts on industry of Europe's emerging chemicals policy REACH. *J Environ Manage.* 2008 Mar;86(4):636-47. Epub 2007 Feb 23.
- Araki N, Ohno K, Nakai M, Takeyoshi M, Iida M. Screening for androgen receptor activities in 253 industrial chemicals by in vitro reporter gene assays using AR-EcoScreen cells. *Toxicol In Vitro.* 2005 Sep;19(6):831-42.
- Balls M. The establishment of ECVAM and its progress since 1993. *Altern Lab Anim.* 2002 Dec;30 Suppl 2:5-11.
- Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. *The McGraw-Hill Companies* 2008; 7th edition
- Cech NB, Krone JR, Enke CG. Predicting electrospray response from chromatographic retention time. *Anal Chem.* 2001 Jan 15;73(2):208-13.
- Charles GD. In vitro models in endocrine disruptor screening. *ILAR J.* 2004;45(4):494-501.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* 2001 Nov 30;294(5548):1866-70.
- Chen Da-Ren, Pui David Y. H. Experimental Investigation of Scaling Laws for Electrospraying: Dielectric Constant Effect. *Aerosol Science and Technology*, Volume 27, Issue 3 1997 , pages 367 - 380
- Cole RB. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2000 Jul;35(7):763-72.
- Com (1999) 706. Community Strategy for Endocrine Disrupters. Saatavilla: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:1999:0706:FIN:EN:PDF>
- Combes R. Why 'suitable' in vitro methods, as defined in the final EU REACH legislation, are an inappropriate basis for risk assessment. *Altern Lab Anim.* 2007 May;35(2):289-93.
- de Hoffmann. Tandem Mass Spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, Vol. 31, 129-137 (1996)
- EDSTAC (1998) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final report. Saatavilla: <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm>
- Enke CG. A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. *Anal Chem.* 1997 Dec 1;69(23):4885-93.
- Escriva H, Safi R, Hänni C, Langlois MC, Saumitou-Laprade P, Stehelin D, Capron A, Pierce R, Laudet V. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 24;94(13):6803-8.
- Final detail review paper on steroidogenesis screening assay and endocrine disruptors, 2005. EPA contract number 68-W-01-023. Saatavilla: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvsv/steroidogenesis\\_drp\\_final\\_3\\_29\\_05.pdf](http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvsv/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf)
- Folkertsma S, van Noort P, Van Durme J, Joosten HJ, Bettler E, Fleuren W, Oliveira L, Horn F, de Vlieg J, Vriend G. A family-based approach reveals the function of residues in the nuclear receptor ligand-binding domain. *J Mol Biol.* 2004 Aug 6;341(2):321-35.
- Gao S, Zhang ZP, Karnes HT. Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Oct 25;825(2):98-110.

Gibson L, Lawrence D, Dawson C, Bliss J. Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009 Oct 7;(4):CD003370.

Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000 Jan 15;14(2):121-41.

Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J.* 2001 May 1;355(Pt 3):545-61.

Grindon C, Combes R, Cronin MT, Roberts DW, Garrod JF. An integrated decision-tree testing strategy for skin sensitisation with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *Altern Lab Anim.* 2008 Oct;36 Suppl 1:75-89.

Grindon C, Combes R, Cronin MT, Roberts DW, Garrod JF. Integrated decision-tree testing strategies for developmental and reproductive toxicity with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *Altern Lab Anim.* 2008 Oct;36 Suppl 1:123-38.

Grindon C, Combes R, Cronin MT, Roberts DW, Garrod JF. Integrated decision-tree testing strategies for skin corrosion and irritation with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *Altern Lab Anim.* 2008 Oct;36 Suppl 1:65-74.

Gross BA, Mindea SA, Pick AJ, Chandler JP, Batjer HH. Medical management of Cushing disease. *Neurosurg Focus.* 2007;23(3):E10.

Guevremont R, Barnett DA, Purves RW, Vandermeij J. Analysis of a tryptic digest of pig hemoglobin using ESI-FAIMS-MS. *Anal Chem.* 2000 Oct 1;72(19):4577-84.

Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.3: Information gathering. Saataavilla:

[http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance\\_document/information\\_requirements\\_r3\\_en.pdf?vers=20\\_08\\_08](http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_r3_en.pdf?vers=20_08_08)

Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.4: Evaluation of available information. Saataavilla:

[http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance\\_document/information\\_requirements\\_r4\\_en.pdf?vers=20\\_08\\_08](http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_r4_en.pdf?vers=20_08_08)

Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7b: Endpoint specific guidance. Saataavilla:

[http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance\\_document/information\\_requirements\\_r7b\\_en.pdf?vers=20\\_08\\_08](http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_r7b_en.pdf?vers=20_08_08)

Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7c: Endpoint specific guidance. Saataavilla:

[http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance\\_document/information\\_requirements\\_r7c\\_en.pdf?vers=20\\_08\\_08](http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_r7c_en.pdf?vers=20_08_08)

Hecker M, Hollert H, Cooper R, Vinggaard AM, Akahori Y, Murphy M, Nellesmann C, Higley E, Newsted J, Laskey J, Buckalew A, Grund S, Maletz S, Giesy J, Timm G. The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2011 Mar;18(3):503-15.

Hecker M, Giesy JP. Novel trends in endocrine disruptor testing: the H295R Steroidogenesis Assay for identification of inducers and inhibitors of hormone production. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Jan;390(1):287-91.

Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Tompsett, A.R., Jones, P.D., Wu, R., Giesy, J.P. Human adrenocarcinoma (H295R) cell systems for rapid testing of chemical effects of steroidogenesis. (2006) *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 217 (114), 124.

Higashi T, Yamauchi A, Shimada K. 2-hydrazino-1-methylpyridine: a highly sensitive derivatization reagent for oxosteroids in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Oct 25;825(2):214-22. Epub 2004 Dec 23.

- Hubbard WC, Bickel C, Schleimer RP. Simultaneous quantitation of endogenous levels of cortisone and cortisol in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids and plasma via gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1994 Aug 15;221(1):109-17.
- Hutchinson TH, Matthiessen P. Endocrine disruption in wildlife: identification and ecological relevance. *Sci Total Environ.* 1999 Aug 15;233(1-3):1-3.
- Ingraham HA, Redinbo MR. Orphan nuclear receptors adopted by crystallography. *Curr Opin Struct Biol.* 2005 Dec;15(6):708-15. Epub 2005 Nov 2.
- Insel PA, Ostrom RS. Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell Mol Neurobiol.* 2003 Jun;23(3):305-14.
- Jemal M. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomed Chromatogr.* 2000 Oct;14(6):422-9.
- Kebarle P, Verkerk UH. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom Rev.* 2009 Nov-Dec;28(6):898-917.
- Klimisch HJ, Andreae M, Tillmann U. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1997 Feb;25(1):1-5.
- Kostiainen R, Kauppila TJ. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2009 Jan 23;1216(4):685-99. Epub 2008 Sep 2.
- LaCourse WR. Column liquid chromatography: equipment and instrumentation. *Anal Chem.* 2002 Jun 15;74(12):2813-31.
- Makin HLJ, Honour JW, Shackleton CHL: General methods of steroid analysis. Part 1. Extraction, purification and measurement of steroids by high-performance liquid chromatography, gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Kirjassa: Steroid Analysis, ss. 114-184, 1. painos. Toim. Makin HLJ, Gower DB and Kirk B, Blackie, Glasgow 1995*
- Meng CK, Fenn JB. Analyzing organic molecules with electrospray mass spectrometry. *Am Biotechnol Lab.* 1990 Mar;8(4):54-60.
- Mitro N, Godio C, De Fabiani E, Scotti E, Galmozzi A, Gilardi F, Caruso D, Vigil Chacon AB, Crestani M. Insights in the regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene reveal a target for modulating bile acid synthesis. *Hepatology.* 2007 Sep;46(3):885-97.
- O'Connor JC, Cook JC, Marty MS, Davis LG, Kaplan AM, Carney EW. Evaluation of Tier I screening approaches for detecting endocrine-active compounds (EACs). *Rev Toxicol.* 2002;32(6):521-49.
- Owen GI, Zelent A. Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cell Mol Life Sci.* 2000 May;57(5):809-27.
- Piersma AH. Alternative methods for developmental toxicity testing. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006 May;98(5):427-31.
- Principles of Molecular Regulation. Toimittanut: P. Michael Conn, Anthony R. Means. ISBN-10: 0896036308, ISBN-13: 978-0896036307. Publication Date: August 15, 2000 Edition: 1st
- REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) Euroopan unionin virallinen lehti L 136 FI 29.5.2007. Saatavilla: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:136:0003:0280:FI:PDF>
- REACH in brief, October 2007. Saatavilla: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/pdf/2007\\_02\\_reach\\_in\\_brief.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/pdf/2007_02_reach_in_brief.pdf)

Shaffer SA, Tolmachev A, Prior DC, Anderson GA, Udseth HR, Smith RD. Characterization of an improved electrodynamic ion funnel interface for electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 1999 Aug 1;71(15):2957-64.

Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14440-5.

Soto AM, Maffini MV, Schaeberle CM, Sonnenschein C. Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;20(1):15-33.  
Taylor MR, Harrison PT. Ecological effects of endocrine disruption: current evidence and research priorities. *Chemosphere.* 1999 Oct;39(8):1237-48.

Swart N, Pool E Rapid detection of selected steroid hormones from sewage effluents using an ELISA in the Kuils River water catchment area, South Africa. *J Immunoassay Immunochem.* 2007;28(4):395-408.

Wei J, Shui W, Zhou F, Lu Y, Chen K, Xu G, Yang P. Naturally and externally pulsed electrospray. *Mass Spectrom Rev.* 2002 May-Jun;21(3):148-62.

Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, Mann M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature.* 1996 Feb 1;379(6564):466-9.

Vinggaard AM, Hass U, Dalgaard M, Andersen HR, Bonefeld-Jørgensen E, Christiansen S, Laier P, Poulsen ME. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *Int J Androl.* 2006 Feb;29(1):186-92.

Zhou S, Cook KD. A mechanistic study of electrospray mass spectrometry: charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2001 Feb;12(2):206-14.