



Hümik maddelerin AhR aracılı ve antiöstrojenik aktivitesi

J. Janořek^a, M. Bittner^{a,*}, K. Hilscherová^a, L. Blařha^a, JP Giesy^{b,c,d}, I. Holoubek^a

^a RECETOX, Masaryk Üniversitesi, Brno, 625 00 Brno, Çek Cumhuriyeti

^b Bölüm Biyomedikal Veterinerlik Bilimleri ve Toksikoloji Merkezi, Saskatchewan Üniversitesi, Saskatoon, Saskatchewan, Kanada

^c Zooloji Bölümü, Ulusal Gıda Güvenliği ve Toksikoloji Merkezi, Bütünleştirici Toksikoloji Merkezi, Michigan Eyalet Üniversitesi, E. Lansing, MI 48823, ABD Biyoloji ve Kimya Bölümü, Hong Kong Şehir Üniversitesi, Kowloon, Hong Kong, ÖİB,

^d Çin

19 Mayıs 2006'da alındı; revize edilmiş şekliyle 23 Kasım 2006'da alındı; 24 Kasım 2006'da kabul edildi

16 Ocak 2007'de çevrimiçi olarak erişilebilir

Soyut

Hümik maddeler (HS), olası toksisite açısından onlarca yıldır ekosistemlerde inert olarak kabul edildi. Bununla birlikte hümik maddelerin son zamanlarda genel olarak ksenobiyotiklere atfedilen çeşitli olumsuz etkileri ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Çalışmamızda, antiöstrojenik ve AhR'nin değerlendirilmesi için östrojen reseptörü (ER) ve Ah reseptörünün (AhR; sözde dioksin benzeri toksite ile bağlantılı reseptör) kontrolü altında lusiferaz geni ile kararlı bir şekilde transfekte edilmiş MLVN ve H4IIE-luc hücre hatlarını kullandık. ticari olarak temin edilebilen 12 hümik maddenin aracılı etkileri. Bunlardan beş hümik asidin AhR aracılı aktiviteyi TCDD ile ilgili bağılı etkilerle indüklediği gösterildi $2.6 \cdot 10^8 - 7.4 \cdot 10^8$ Hümik asit çözeltilerinin organik ekstraktları da yüksek aktiviteler ortaya çıkardı, bu da etkinin büyük bir kısmından lipofilik moleküllerin sorumlu olduğu anlamına gelir. Bununla birlikte, ekstre edilmiş çözeltide kalan nispeten yüksek aktivite, polar AhR-agonistlerinin varlığını da düşündürür. Kalıcı organik bileşiklerin gözlenen etkilere katkısı, H₂SO₄ işlemi ile ortadan kaldırılmıştır. On iki hüzmeden sekizi, 40 ila 164 mg/1 arasında değişen IC₅₀ ile önemli antiöstrojenik etkiler ortaya çıkardı. Antiöstrojenik etkinin olası açıklaması, hümik asitlerin spesifik 17β-Östrojen (E₂) emilimini, E₂ için zar geçirgenliğindeki

2006 Elsevier Ltd. Tüm hakları saklıdır.

Anahtar Kelimeler: Ah reseptörü; AhR aracılı aktivite; Antiöstrojenik etkiler; endokrin bozulması

1. Giriş

Hümik maddeler (H₂S), ölü organik maddenin ayrışmasının her yerde bulunan doğal ürünleridir. Hümik maddeler genel olarak üç gruba ayrılabilir: hümik asitler (HA), fulvik asitler (FA) ve huminler. Su ortamında Hümik Maddeler, çoğu doğal tatlı suda 0,5–50 mg l1 konsantrasyon aralığında bulunan çözünmüş/doğal organik maddenin yaklaşık %50–70'ini oluşturur (D/NOM, Timofeyev ve diğerleri, 2004) (Steinberg, 2003).

Yakın zamana kadar hümik maddelerin ekosistemlerdeki sadece dolaylı etkileri, örneğin organik kirleticilerin biyoyararlanımındaki değişiklikler ve/veya inorganik iyonların kompleksleşmesi, özellikle de

ağır metaller bildirilmiştir (Steinberg, 2003). Varsayılan büyük H₂S moleküllerinin hücrelere nüfuz edebildiği düşünülmemiştir. Bununla birlikte, H₂S alımına odaklanan son çalışmalar, doğal ve yapay H₂S'nin en azından bazı kısımlarının kültürdeki bitki hücreleri (Wang ve diğerleri, 1999) ve ayrıca kabuklular (Gamma rus pulex) ve hatta omurgalılar (Rana) tarafından asimile edilebileceğini göstermiştir. arvalis kurbağa yavruları; Steinberg ve diğerleri, 2003). Ayrıca hümik maddelerin algler, omurgasızlar ve omurgalılar için biyolojik etkileri bildirilmiştir (Pflugmacher ve diğerleri, 2001; Steinberg ve diğerleri, 2003).

Hümik maddelerin doğrudan toksik etkileri tatlı su salyangozu Lymnea stagnalis için rapor edilmiştir. Suwannee Nehri'nden gelen hümik maddelerin doğal konsantrasyonlarına (0,5 mg l1) maruz kalmak, bireylerin %20'ye varan oranda ölümüne neden olmuştur (Steinberg ve diğerleri, 2003). Hümik maddelerin toksik etkilerinin spesifik olmayan belirteçlerinin tepkileri de gözlemlendi. Detoksifikasyon enzimleri glutatyon-S-transferaz ve glutatyonun yüksek seviyeleri

* Sorumlu yazar. Tel.: + 420 549491462; faks: + 420 549492840.

E-posta adresi: bittner@recetox.muni.cz (M. Bittner).

peroksidad, 0.5-100 mg l1 konsantrasyon aralığında Hüyük Madde tedavisinin ardından Daphnia magna kabuklularında rapor edilmiştir (Wiegand ve diğerleri, 2003). Birkaç amfipod türünde (Timofeyev ve diğerleri, 2004) ve sazanda (Wiegand ve diğerleri, 2003) peroksi daz aktivitesinde ve ısı şoku proteinlerinin salınmasında bir artış da gözlemlendi. Hos ve ark. (2001), doğal organik maddenin (NOM), nematod Caenorhabditis elegans'ın üremesini değiştirdiğini bildirmiştir ve bu, hüyük maddelerin daha geniş spektrumları ile yapılan bir çalışmada daha da doğrulanmıştır (Steinberg ve diğerleri, 2002).

Sentetik bir hüyük madde HS1500'ün (bir polifenol oksidasyon ürünü), Xenopus laevis kurbağa yavruları üzerinde önemli östrojenik ve anti-tiroidal etkiler ortaya çıkardığı gösterilmiştir (Lutz ve diğerleri, 2005). Ayrıca, kılıçkuyruk balığı Xiphophorus helleri yavrularının yüksek konsantrasyonda HS1500'e (5'ten 180 mg l1'e) uzun süre maruz kalması, dişiler lehine cinsiyet oranında değişikliklere ve hem erkeklerde hem de dişilerde vücut kütlesi artışına yol açar (Meinelt ve diğerleri, 2004), yavruların hayatta kalması 500 mg l1'e maruz kaldığında bile azalmamıştır (Steinberg ve diğerleri, 2003). Bununla birlikte, HS1500'ün aynı çok yüksek konsantrasyonu, Danio rerio balığının maruz kalan embriyolarının hayatta kalma oranını önemli ölçüde azaltırken, 5-50 mg l1'lik daha düşük konsantrasyonlara maruz kalma, kontrole göre embriyoların hayatta kalma oranını biraz artırdı (Steinberg ve diğerleri, 2003).

Bu in vivo deneylere rağmen, doğrudan etkilerin etki şeklini belirlemek için hiçbir mekanik in vitro çalışma yapılmamıştır.

Gözlenen östrojenik etkilerin yanı sıra detoksifikasyon enzimlerinin seviyelerindeki artışla ilgili olarak, geniş bir hüyük madde yelpazesinin (çeşitli kaynaklardan elde edilen HA, FA ve NOM dahil) östrojen reseptörü (ER) ve aril hidrokarbon ile olası etkileşimlerini araştırmaya karar verdik. reseptörü (AhR). Sonucusu, örneğin detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesinde muazzam bir artış dahil olmak üzere omurgalılarda çok çeşitli in vivo etkilerle sonuçlanan dioksin benzeri etki tarzından sorumludur.

2. Materyal ve yöntemler

2.1. Kimyasallar

Farklı matrislerden izole edilen hüyük maddeler, çeşitli kaynaklardan satın alınmıştır: HA-Fluka (Ürün No. 53680; Fluka, İsviçre), HA sodyum tuzu (Ürün No. H16752; Sigma-Aldrich, Prag, Çek Cumhuriyeti). Aşağıdaki referans hüyük maddeler Uluslararası Hüyük Maddeler Topluluğundan (IHSS, Denver, ABD) satın alınmıştır: Suwannee River HA (Ürün No. 2S101H), Suwannee River FA (1S101F) ve Suwannee River NOM (1R101N), Florida Peat HA (1S103H) ve Florida Peat FA (2S103F), Nordic Aquatic FA (1R105F), Nordic Reservoir NOM (1R108N), Waskish Peat HA (1R107H), Elliot Soil HA (1S102H) ve Leonar dite HA (1S104H). Referans bileşikler, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Almanya (2,3,7,8-tetra klorodibenzo-p-dioksin, TCDD) ve Sigma-Aldrich'ten (17-b estradiol, E2) satın alınmıştır.

2.2. örnek hazırlama

Hüyük maddeler, 0.05 M NaOH içinde çözüldü ve son konsantre 1,9 ile 150 mg l1 arasında değişen oranlar incelenmiştir. Aktif moleküllerin doğasını değerlendirmek için daha fazla araştırma yapıldı. H2S'nin alkali çözeltisi üç kez 3:1 heksan:diklorometan karışımı ile özümlendi.

Bu ekstraktın yarısı, in vitro analizler için DMSO'ya aktarıldı (ayrıca organik ekstrakt olarak kabul edildi); diğer yarısı, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından izlenen yedi gösterge PCB (IUPAC No. 28, 52, 101, 118, 138, 153 ve 180) ve 16 PAH gibi bilinen ksenobiyotikler için GC-MS kullanılarak analiz edildi. .

Standart malzemelerde bulunabilecek diğer kalıcı organik bileşiklerin olası katkılarını belirlemek için, alkali çözeltiler (200 ul) %96'yı aşan H2SO4 (5 mi) içine aktarıldı ve heksan:diklorometan (3) ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna aktarıldı. · 5 ml) yapılmıştır. Bu yöntem kullanılarak yalnızca PCDD, PCDF ve PCB gibi kalıcı bileşikler ekstrakte edildi. Orijinal alkali solüsyonlar hem AhR aracılı hem de anti/östrojenik aktivite açısından incelendi, organik ekstraktlar ve ayrıca alkali solüsyonların ekstraksiyon kalıntıları ve H2SO4 ile işlenmiş ekstraktlar AhR aracılı aktivite için test edildi.

2.3. in vitro tahliller

H4IIE-luc (sıçan hepatokarsinomu) ve sırasıyla AhR ve ER'nin kontrolü altında lusiferaz geni ile kararlı bir şekilde transfekte edilmiş MVLN (insan meme karsinomu) hücreleri, reseptör aktivasyonunun analizi için kullanıldı. Her iki hücre dizisi de çevresel numunelerin yanı sıra saf maddelerin AhR aracılı (H4IIE-luc) ve anti/östrojenik (MVLN) aktivitelerinin değerlendirilmesi için iyi kurulmuş modellerdir (Demirpence ve diğerleri, 1993; Machala ve diğerleri, 2001; Villeneuve ve diğerleri, 2002).

H4IIE-luc hücreleri: Hücreler, %5 CO2 ve 37°C'de %10 fetal buzağı serumu (her ikisi de PAA laboratuvarları, Pasching, Avusturya) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içinde büyütüldü ve tutuldu. pasajlandı ve 15 000 hücre/oyuk yoğunlukta steril 96 oyuklu bir plakaya tohumlandı. 24 saat sonra hücreler, test edilen örneklerle (konsantrasyonlar 1.9, 5.6, 16.7, 50 ve 150 mg 11) veya referans bileşiğe (seyreltme serisi 0.1-100 pM TCDD) 24 saat 37°C'de (nihai araç) üç kopya halinde maruz bırakıldı. konsantrasyon %0,5 v/v idi). %0,5 DMSO ve %0,5 0,05 M NaOH ile DMEM'e maruz bırakılan hücreler, uygun araç kontrolleri için kullanıldı. Lusiferaz lüminesansının yoğunluğu, 24 saat maruz kaldıktan sonra Promega Steady Glo Kit (Promega, Mannheim, Almanya) kullanılarak ölçüldü. Test edilen her konsantrasyon için en az üç bağımsız analiz yapılmıştır.

MVLN hücreleri: Hücreler, %10 fetal dana serumu içeren fenol kırmızısı (Sigma Aldrich, ABD) içermeyen DMEM-F12 içinde büyütüldü. Deneyler için hücreler, dekstran kaplı kömür kömürü (doğal steroidlerin büyük ölçüde azaltılmış konsantrasyonları) ile işlenmiş cenin dana serumu içeren ortamda büyütüldü. Hüyük maddelerin anti/östrojenik etkilerine ilişkin çalışmalar için, hücreler

1 ila 100 pM arasında değişen E2 kalibrasyon serileri ile 33 pM E2'ye eř zamanlı maruz bırakılarak/olulmadan H2S'ye maruz bırakılır. Diğer koşullar, H4IIE-luc hücreleri için açıklananlarla aynıydı.

2.4. hesaplamalar

Sonuçlar, Villeneuve ve diğerleri tarafından açıklanan eř etkili yaklaşım kullanılarak hesaplandı . (2000) ve TCDD'ye göre bağlı güçler (REP) olarak ifade edilmiştir. REP, EC50 değerlerinden hesaplanmıştır. Ekstraktların kütle dengesinin belirlenmesi için ng TEQ g-1 HA olarak ifade edilen toksik eşdeğerler (TEQ) EC25'ten hesaplanmıştır çünkü bazı ekstraktların ve ekstraksiyon kalıntılarının maksimum TCDD indüksiyonunun %50 etkisine ulaşmadı.

3. Sonuçlar

3.1. AhR aracılı aktivite

Test edilen 12 HS'den beşi, H4IIE-luc hücrelerinde önemli bir AhR aracılı aktivite ortaya çıkardı (Şekil 1). Aktif numunelerin tümü HA iken, hiçbir FA ve NOM numunesi önemli bir aktivite göstermedi. Tüm AhR-aktif HA'ların görece etkileri (TCDD ile ilgili), 2,6–8,4 · 108 gibi nispeten dar bir aralıktaydı . HA (LOEC 1,6–7,4 mg l⁻¹ organik Ekstraktları, polar olmayan AhR aktivatörlerinin varlığını doğrulayan önemli aktivitelere neden oldukları, nispeten büyük tepkiler ortaya çıkardı (Şekil 2).

Kalıntıların neden olduğu lusiferaz aktivitesindeki artış, HA-Fluka ve HA sodyum tuzu hariç , organik ekstraktlardan (Tablo 2) bile daha fazlaydı . Bu sonuç, polar bileşiklerin HA'nın AhR aracılı aktivitesine önemli bir katkı sağladığını göstermektedir.

tablo 1

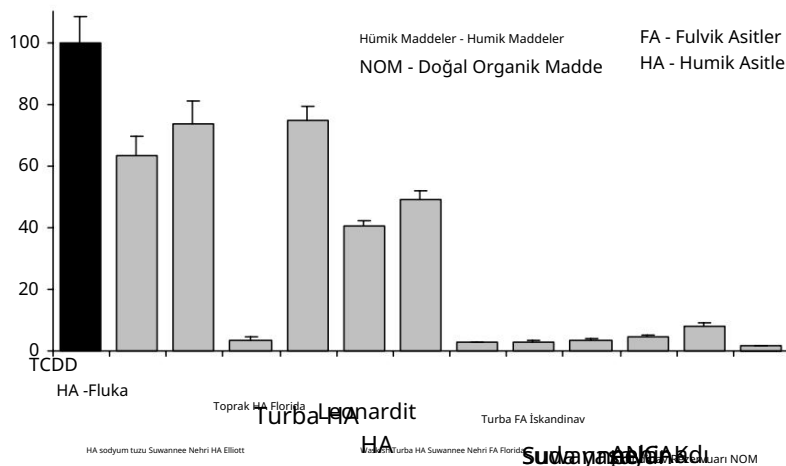
H2S'nin ham alkali çözeltilerinin AhR aracılı ve antiöstrojenik aktivitesi

	AhR aracılı aktivite		Antiöstrojenik aktivite	
	LOEC (mg l ⁻¹)	REP	LOEC (mg l ⁻¹)	IC50 (mg l ⁻¹)
HA – Fluka HA	1.9	4,5 · 108	16,7 · 108	43 ± 3
sodyum tuzu	1.9	16,7 n.ind.	n.eff.	40 ± 4
Suwannee Nehri HA	n.in.			n.eff.
Elliot toprağı HA				
1.9 Florida Turbası HA	16.7	8,4 · 108	50 · 2,6 ·	164 ± 9a
Leonardit HA	1.9 Waskish	108	150 · 4,3 · 108	w.eff. 132
Turbası HA	n.ind.	50 n.ind.	50 n.bul.	± 8 84 ±
		50		6 127 ± 8
Suwannee Nehri n.ind.				
FA				
Florida Turba FA	n.in.	n.in.	50	112 ± 4
Nordic Aquatic n.ind.			50	83 ± 7
FA				
Suwannee Nehri	n.in.	n.in.	150	w. eff.
ADI İskandinav				
Rezervuarı ADI	n.in.	n.in.	n.eff.	n.eff.

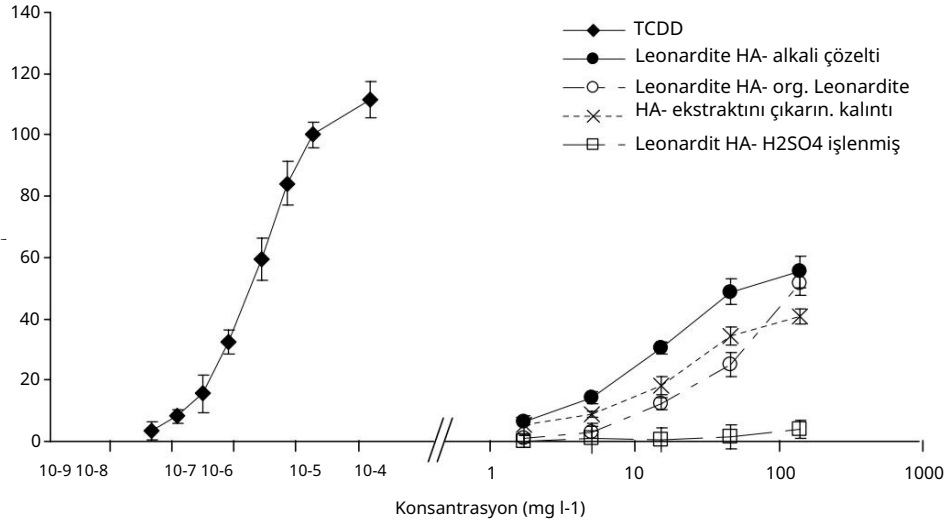
REP – TCDD ile ilgili göreceli güçler; IC50 – E2 kaynaklı lusiferaz aktivitesinin %50 inhibisyonuna neden olan konsantrasyon; n.bul. – indüksiyon yok; n.eff. - etkisi yok; w.ff. – zayıf etki.

^a Ölçülen konsantrasyon aralığının üzerinde yaklaşım.

H2SO4 ile ekstraksiyon , HA'nın AhR aracılı aktivitesini tamamen bastırdı. Dolayısıyla, gözlenen etkilerden sorumlu bileşiklerin PCDD, PCDF veya PCB gibi kalıcı organik bileşikler olmadığı sonucuna varılabilir. Ayrıca, yedi gösterge PCB türdeşinin ve 16 ABD EPA öncelikli PAH'ın (olası antropojenik kontaminasyonun göstergesi) kimyasal analizi, HA'nın nispeten büyük AhR aracılı aktivitesinden sorumlu olabilecek bu maddelerin yeterli miktarlarını ortaya çıkarmadı. Machala ve diğerleri tarafından yayınlanan REP'ler kullanılarak PAH için kimyasal verilerden hesaplanan TEQ . (2001) , HA için biyotahlilden türetilen TEQ'nun %1'inden azdı.



Şekil 1. H4IIE-luc hücrelerinde belirlenen 12 HS örneğinin AhR aracılı aktivitesi; cTCDD = 3.2 · 105 mg l⁻¹ ; cHS = 150 mg l⁻¹ . Değerler, üçlü belirlemelerin ortalama ± SD'sini temsil eder.



Şekil 2. TCDD, Leonardite HA ve H4IIE-luc hücrelerindeki farklı solüsyonları ve ekstraktlarının doz-yanıt eğrileri. Değerler, üçlü belirlemelerin ortalama \pm SD'sini temsil eder.

Tablo 2

Ekstraksiyon prosedürünün kütle dengesi

alkali solüsyon (TEQ g1 HA'nın)	Ekstrakt (alkali solüsyonun yüzdesi)	Ekstrakt kalıntısı (alkali solüsyonun yüzdesi)
HA - Fluka 205	70,4	22,2
HA sodyum tuzu 219	67,8	31,1
Elliot toprağı HA 197	37,5	47,1
Florida Turba 29	wi	55,0
HA		
Leonardit HA 68	30,4	46,1

TEQ - alkali çözeltiler, bunların organik ekstraktları ve ekstraksiyon kalıntıları ile yapılan deneylerden elde edilen EC25'ten türetilen toksik eşdeğerler ; wi - zayıf indüksiyon.

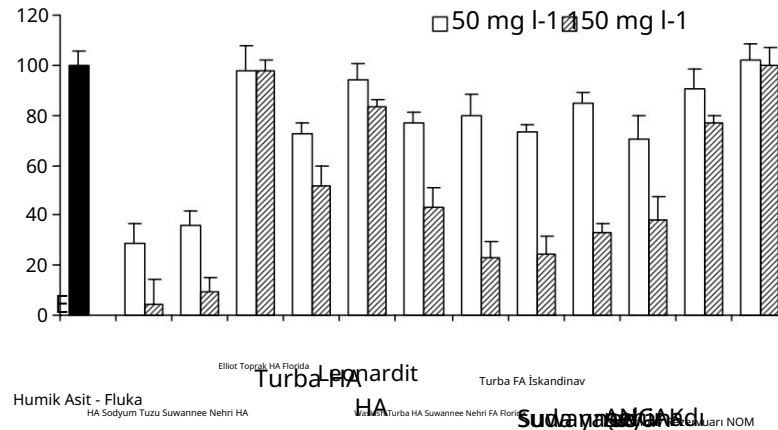
3.2. ER yolu ile etkileşim

Test edilen hümkik maddelerin hiçbiri, ER-agonisti E2'nin hem yokluğunda hem de varlığında herhangi bir östrojenik aktivite göstermedi. Yine

Test edilen on iki hümkik asitten onu, ER'ye bağlı gen ifadesinde önemli düşüşlere neden oldu (Şekil 3). AhR aracılı aktiviteden farklı olarak, HA, FA ve NOM uygulamasından sonra antiöstrojenik etkiler gözlemlendi. 40-164 mg l1 konsantrasyon aralığında H2S için E2'ye bağlı lusiferaz aktivitesinde (IC50) %50 azalmaya neden olan konsantrasyonlar gözlemlendi (bkz. Tablo 1). ER sinyalinin en güçlü şekilde bastırılmasına HA-Fluka ve HA sodyum tuzu neden olmuştur.

4. Tartışma

Bu çalışmanın sonuçları bazı hümkik maddelerin, özellikle HA'nın "dioksin benzeri" sinyal yolunu aktive edebildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, "dioksin benzeri" ifadesi de kalıcılığı ifade ettiğinden, burada bu aktiviteyi AhR-aracılı olarak adlandırıyoruz. Bu tahlillerde FA'nın aktif olmadığı bulundu. Buna göre, HA yalnızca yaklaşık %6-8'ini temsil ettiğinden,



Şekil 3. MVLN hücrelerinde HS'nin antiöstrojenik etkileri - 33 pM E2 tarafından ortaya çıkarılan lusiferaz aktivitesinin HS'ye bağlı inhibisyonu. Değerler, üçlü belirlemelerin ortalama \pm SD'sini temsil eder.

toplam NOM (Yamamoto ve diğ̃erleri, 2004), test edilen NOM numuneleri de çalışılan konsantrasyonların hiçbirinde AhR aracılı aktivite ortaya çıkarmadı.

HA yapılarının geleneksel görüşü, yalnızca AhR'nin ligand bağlama bölgesine bağlanma olasılığı düşük olmakla kalmayıp, aynı zamanda hücrelere girme olasılığı da düşük olan nispeten büyük molekülleri önerir. Bununla birlikte, son araştırmalar hümik maddelerin bitki (Nardi ve diğ̃erleri, 2002) ve memeli hücre zarlarını geçebildiğini ve bazı reseptörlerle etkileşime girebildiğini göstermiştir (Beer ve diğ̃erleri, 2000). Ayrıca hümik maddeler yapısına ilişkin son araştırmalar, bunun kovalent olmayan etkileşimlerle birbirine bağlanmış nispeten düşük moleküler ağırlıklı (<2 kDa) organik bileşikler ve metal iyonlarından oluşan kümelerden oluştuğunu ileri sürmektedir (Simpson ve diğ̃erleri, 2002). Bu, AhR-aktif bileşiklerin bu kompleksten salınan olduğa kk moleküller olabileceği hipotezine yol açar. HA'nın PCDD, PCDF ve PCB gibi "klasik" yüksek afiniteli AhR ligandları ile yapısal farklılığına gelince, son zamanlarda "klasik" ligandlardan yapısal olarak çok farklı olan çeşitli AhR aktivatörleri tanımlanmıştır (Denison ve Heath -Pagliuso, 1998). Oksitlenmiş karotenoidler, indoller ve heterosiklik aminler gibi bu "klasik olmayan" ligandlar, halojenli aromatik hidrokarbonlar (HAH) ile karşılaştırıldığında genellikle çok zayıf aktivatrlerdir. HA da bu "klasik olmayan" AhR ligandları grubuna ait görünmektedir.

AhR aktivasyonuna atfedilen HAH'ın olumsuz biyolojik etkilerinin, genellikle AhR'ye yüksek afiniteleri ve biyolojik bozunmaya karşı düşük duyarlılıkları nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Bu etkilerin çoğu, yalnızca birkaç gün ila haftalarca maruz kaldıktan sonra gözlemlenebilir; bu, nedenlerinin AhR sinyal yolunun uzun vadeli sürekli aktivasyonunda yattığını gösterir (Denison ve Heath-Pagliuso, 1998). Bu nedenle, düşük afiniteli ligandlara sürekli maruz kalma, kahverengi boğa başlı Ameiurus nebulosus'ta (Grady ve diğ̃erleri, 1992) gösterildiği gibi, HAH'ın neden olduğu etkilere benzer etkilerle sonuçlanabilir. Öte yandan, kalıcı olmayan ligandlar tarafından AhR sinyal yolunun tek bir aktivasyonu da sadece zarar vermemekle kalmaz, aynı zamanda bazı yararlı etkiler de üretir (Jeuken ve diğ̃erleri, 2003). Bu nedenle, HA'nın AhR-aracılı aktivitesi, özellikle H2S'nin yüksek konsantrasyonları ile akuatik sistemlerde yaşayan omurgalılar (yani, AhR'nin ligand bağlama alanına sahip hayvanlar) için önemli olabilir.

Yüzey suyundaki DOM konsantrasyonları, ötrofik gllerde ve bataklıklarda ~~birlikte bağlıklarda (Steinberg, 2003) ve yk gzlenmiş~~ suyunda (Zsolnay, 1996) 100 mg l⁻¹'den fazlaya ulaşabilir. . Yukarıda bahsedildiği gibi HA, DOM'un yalnızca kk bir kısmını (%6-8) oluşturur. Turba HA (16,7 mg l⁻¹) hariç tüm AhR-aktif HA için LOEC 1,9 mg l⁻¹ olduğundan, HA'nın AhR aracılı aktivitesi özellikle ötrofik su sistemlerinde, turba bataklıklarında veya toprak organizmalarında yaşayan hayvanlar için vresel açıdan önemli olabilir. gözenek suyuna maruz kalır. Ayrıca, HA'nın AhR aktivitesinin ekotoksikolojik önemi, tüm AhR-aktif HA'ların LOEC değerlerinin, örneğin yukarıda belirtilen HS1500 konsantrasyonundan çok daha düşük olması gerçeğiyle de vurgulanabilir, rneğin Danio rerio balıklarının maruz kalan embriyolarının hayatta kalma oranını önemli lde azaltır. hangisiydi

500 mg l⁻¹ iken, Xiphophorus helleri yavrularının hayatta kalması bu kadar yüksek HS1500 konsantrasyonunda bile etkilenmemiştir (Steinberg ve ark., 2003).

Çok yüksek konsantrasyonlarda (150 mg l⁻¹) bile AhR-aktif H2S numuneleri ile elde edilen maksimal yanıtın, standart agonist TCDD'nin neden olduğu maksimal indüksiyonun yalnızca yarısına ulaştığını vurgulamak da önemlidir. Bu nedenle AhR-aktif HA numuneleri, tam bir yanıt ortaya ıkaramadıkları için "kısmi agonistler" olarak kabul edilebilir. Farmakolojik reseptör ilkelerine göre, kısmi agonistler, güçlü tam agonistlere karşı antagonistler olarak hareket edebilir. AhR-aktif hümik maddelerin (zayıf agonistler), TCDD gibi güçlü AhR agonistlerinin toksisitesini fiilen antagonize edebilmesi, örneğin zayıf AhR-agonistleri a-naftoflavon (Santostefano ve ark., 1993) veya 40 -iyodoflavon (Lu ve diğ̃., 1996). Bu bakış açısına göre hümik maddeler, su organizmalarını tam güçlü AhR agonistlerinin toksisitesinden korumaya yardımcı olabilir.

Alkali solüsyonunun organik çözücülerle ekstraksiyonu ilginç bir sonuca yol açtı - AhR aracılı aktivite, hem organik ekstrakt hem de ekstraksiyon kalıntısı arasında dağıldı. Daha aktif bileşikler için kütle dengesi olduğa iyiydi (Tablo 2). Ancak, en az aktif numunede (Florida Peat HA) organik ekstraktın aktivitesi, 100 pM TCDD'nin neden olduğu indüksiyonun %25'ine ulaşmadı. Bu nedenle etkinliği hesaplanamadı. Herhangi bir Şekilde, AhR aracılı etkilerin hem organik hem de sulu zeltileler tarafından indüklenmesi, hem lipofilik hem de hidrofilik AhR aktivatörlerinin varlığını gösterir.

HS'nin antiöstrojenik etkileri sadece HA ile sınırlı değildir; FA'nın yanı sıra NOM'nin de E2 ile indüklenen lusiferaz aktivitesini olumsuz etkilediği gösterildi. Ancak bu bulgu, kılıç kuyruklu balık Xiphophorus helleri (Meinelt ve diğ̃erleri, 2004) ve African pençeli kurbağa Xenopus laevis (Lutz ve diğ̃erleri, 2005) üzerinde yapılan ve daha sonra iribaşlarda dişileşmenin gözlemlendiği yakın tarihli çalışmaların sonuçlarıyla tutarlı değildir. sentetik bir HS1500'e maruz kalma. Ancak bu çalışmalar sentetik bir hümik madde (kafeik asidin bir oksidasyon ürünü) ve tüm organizmalar ile gerçekleştirilmiştir ve bu durum sonuçlarda farklılıklara neden olabilir. Üreme üzerindeki diğer etkiler, nematodlarda gözlemlenmiştir (Steinberg ve diğ̃erleri, 2004), burada doğal turba FA, maruz kalan bireylerin yavru sayısını güçlü bir Şekilde engellemiştir. Kurbağa Rana temporaria'nın oositleri ile yakın zamanda yapılan bir in vitro alışma (Zenkevics ve diğ̃erleri, 2005), hümik maddelerin oositlerin gonado tropik hormona duyarlılığını azalttığını ve böylece olgunlaşmalarını geciktirdiğini göstermiştir. Bu yazarlar bu etkiyi, gonadotropik hormonun membran transportunu bloke etmesine bağlamaktadır. E2 için membran geçirgenliğindeki değişiklikler de çalışmamızda gözlemlenen antiöstrojenik etkilerin nedeni olabilir. Diğer bir neden, test ortamında nispeten hidrofobik E2 molekülünün karbonca zengin H2S'ye basit sorpsiyonu olabilir. Bu hipotez, NOM'nin E2'nin su fazı ve yapay bir zar arasında bölünmesi üzerindeki etkisi üzerine yakın tarihli bir çalışma ile desteklenmektedir (Yamamoto ve diğ̃erleri, 2004). Araştırmacılar, 3 mg l⁻¹ kadar düşük konsantrasyonlarda E2'nin zar/su bölme katsayılarında %30 azalma gzlemleniler .

Suwannee River FA'nın 7,7 mg l⁻¹'i için sırasıyla HA (Sigma) ve %20 azalma. Bu, HA'nın (Sigma) çok daha yüksek antiöstrojenik aktivite ortaya çıkardığı bulgumuza karşılık gelir.

Ne yazık ki, Yamamoto ve ark. (2004) daha yüksek H2S konsantrasyonları üzerinde çalışma yapmamıştır ve bu nedenle onların sonuçlarını bizimkilerle doğrudan karşılaştıramayız. Bu kadar düşük konsantrasyonlarda, eğer varsa, %10'dan daha büyük bir etki gözlemlenmedi. Öte yandan, sorpsiyon, tüm numunelerin aktif olduğunu düşündüren nispeten spesifik olmayan bir süreçtir. Bununla birlikte, dört numune (iki NOM numunesi, bir HA ve bir FA) yüksek konsantrasyonlarda bile hiç antiöstrojenik aktivite göstermedi veya çok zayıf antiöstrojenik aktivite ortaya çıkardı. Bu nedenle, daha spesifik bir etki mekanizması sorunu hala çözülmemiş durumda.

5. Sonuçlar

Bu çalışmanın sonuçları, hümitik maddelerin AhR sinyal yolu ile etkileşimlerini göstermektedir. Bazı HA'lar, ancak FA'ların hiçbiri, 2,6–8,4 · 10⁸ aralığında görece potansiyellerle önemli AhR aracılı etkiler ortaya çıkarabildi. Dolayısıyla hümitik maddelerin doğrudan etkiler, toprak organizmaları veya turba bataklıklarından gelen organizmalar gibi hümitik maddelerin yüksek konsantrasyonlarına sürekli maruz kalan organizmalar üzerinde bazı olumsuz etkilere neden olabilir. E2'nin hümitik maddeler üzerinde basit bir şekilde emilmesinden, hümitik maddeler moleküllerinin parçalarının neden olduğu E2 için azaltılmış zar geçirgenliğinden veya başka bir daha spesifik mekanizmadan kaynaklanabilecek in vitro antiöstrojenik etkiler de tespit edilmiştir. Ancak, etki şeklinin belirlenmesi daha fazla araştırma gerektirir.

teşekkürler

Çek Cumhuriyeti Eğitim Bakanlığı'nın (INCHEMBIOL MSM 0021622412) ve Çek Cumhuriyeti Hibe Ajansı'nın (525/05/P160) araştırma hibelerinden sağlanan mali desteği çok takdir ediyoruz. PCB ve PAH içeriği için hümitik maddelerin analizi için Dr. Jana Klanova'ya teşekkür etmek isteriz ve ayrıca değerli yorumlarından dolayı nazik yorumculara teşekkür ederiz.

Referanslar

- Beer, AM, Lukanov, J., Sagorchev, P., 2000. Turbadan gelen fulvik ve ulmik asitlerin düz kasların spontan kasılma aktivitesi üzerindeki etkisi. *Bitki ilacı* 7, 407–415.
- Demirpençe, E., Duchesne, MJ, Badia, E., Gagne, D., Pons, M., 1993. MVLN hücreleri - östrojenik aktivitenin modülasyonunu incelemek için biyoluminesan bir Mcf-7'den türetilmiş hücre çizgisi. *J. Steroid. biyokimya* 46, 355–364.
- Denison, MS, Heath-Pagliuso, S., 1998. Ah Reseptörü: yapısal olarak çeşitli kimyasalların biyokimyasal ve toksikolojik etkilerinin düzenleyicisi. *B. Çevre. Kontaminasyon Zehir.* 61, 557–568.
- Grady, A., Fabacher, D., Frame, G., Steadman, B., 1992. Diyet a-Naphthoflavone uygulanan kahverengi boğa başlarındaki morfolojik bozukluklar. *J. Aquat. Animasyon Sağlık.* 4, 7–16.
- Hoss, S., Bergtold, M., Haitzer, M., Traunspurger, W., Steinberg, CEW, 2001. Refrakter çözünmüş organik madde Caenorhabditis elegans(Nematoda) üremesini etkileyebilir. *Tatlı Su Biol.* 46, 1–10.
- Jeuken, A., Keser, BJG, Khan, E., Brouwer, A., Koeman, J., Denison, MS, 2003. Diyet bitki takviyeleri, sebze ve meyve özlü ile Ah reseptörünün aktivasyonu. *J.Agr. Gıda Kimyası* 51, 5478–5487.
- Lu, YF, Santostefano, M., Cunningham, BDM, Threadgill, MD, Safe, S., 1996. Aril hidrokarbon (Ah) reseptörü agonistleri ve antagonistleri olarak ikame edilmiş flavonlar. *biyokimya Eczane.* 51, 1077–1087.
- Lutz, I., Jie, Z., Opitz, R., Kloas, W., Ying, X., Menzel, R., Steinberg, CEW, 2005. Çevresel sinyaller: sentetik hümitik maddeler, kseno-östrojen gibi davranır ve Xenopus laevis'in tiroid sistemi. *Chemosphere* 61, 1183–1188.
- Machala, M., Vondracek, J., Blaha, L., Ciganek, M., Neca, J., 2001. Mutajenik polisiklik aromatik hidrokarbonların aril hidrokarbon reseptör aracılı aktivitesi, in vitro rapörtör gen testi kullanılarak belirlendi. *mutasyona uğramış Hiç bir şey. Ocak Zehir. İçinde.* 497, 49–62.
- Meinelt, T., Schreckenbach, K., Knopf, K., Wienke, A., Stuber, A., Steinberg, CEW, 2004. Hümitik maddeler kılıç kuyruğunun (Xiphophorus Helleri Heckel) fizyolojik durumunu ve cinsiyet oranını etkiler. suda yaşayan bilim 66, 239–245.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A., 2002. Hümitik maddelerin yüksek bitkiler üzerindeki fizyolojik etkileri. *Toprak Biol. biyokimya* 34, 1527–1536.
- Pflugmacher, S., Tidwell, LF, Steinberg, CEW, 2001. Çözünmüş hümitik maddeler tatlı su organizmalarını doğrudan etkileyebilir. *Açta Hidroç. Hidrob.* 29, 34–40.
- Santostefano, M., Merchant, M., Arellano, L., Morrison, V., Denison, MS, Safe, S., 1993. a-Naphthoflavone-indükte Cyp1A1 gen ekspresyonu ve sitozolik aril hidrokarbon reseptör transformasyonu. *Mol. Eczane.* 43, 200–206.
- Simpson, AJ, Kingery, WL, Hayes, MHB, Spraul, M., Humpfer, E., Dvortsak, P., Kerssebaum, R., Godejohann, M., Hofmann, M., 2002. Hümitik maddelerin moleküler yapıları ve ilişkileri karasal ortam. *Doğa Bilimleri* 89, 84–88.
- Steinberg, CEW, 2003. Tatlı Sulardaki Hümitik Maddelerin Ekolojisi – Jeokimyadan Ekolojik Nişlere Belirleyiciler. Springer, Berlin.
- Steinberg, CEW, Hoss, S., Bruggemann, R., 2002. Hümitik maddelerin nematod Caenorhabditis elegans'in çoğalmasını düzenleme potansiyeline sahip olduğuna dair ek kanıtlar. *Int. Rev. Hydrobiol.* 87, 121–133.
- Steinberg, CEW, Paul, A., Pflugmacher, S., Meinelt, T., Klocking, R., Wiegand, C., 2003. Saf hümitik maddeler, ksenobiyotik kimyasallar olarak hareket etme potansiyeline sahiptir – bir inceleme. *Fresen. çevre. Boğa.* 12, 391–401.
- Steinberg, CEW, Hoss, S., Kloas, W., Lutz, I., Meinelt, T., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2004. Hümitik maddelerin balıklar, amfibiler ve omurgasızlar üzerindeki hormon benzeri etkileri. *çevre. Toksikol.* 19, 409–411.
- Timofeyev, MA, Wiegand, C., Burnison, BK, Shatilina, ZM, Pflugmacher, S., Steinberg, CEW, 2004. Doğal organik maddenin (NOM) tatlı su amfipodları üzerindeki etkisi. *bilim Toplam Çevre.* 319, 115–121.
- Villeneuve, DL, Blankenship, AL, Giesy, JP, 2000. İn vitro biyoanaliz sonuçlarına dayalı olarak bağıl güç tahminlerinin türetilmesi ve uygulanması. *çevre. Toksikol. kimya* 19, 2835–2843.
- Villeneuve, DL, Khim, JS, Kannan, K., Giesy, JP, 2002. Bireysel polisiklik aromatik hidrokarbonların, üç hücre hattında dioksin benzeri ve östrojenik tepkileri indüklemek için görece güçleri. *çevre. Toksikol.* 17, 128–137.
- Wang, WH, Bray, CM, Jones, MN, 1999. Kültürdeki pirinç hücrelerinde C-14 etiketli hümitik maddelerin kaderi. *J. Bitki Fizyol.* 154, 203–211.
- Wiegand, C., Meems, N., Timofeyev, MA, Steinberg, CEW, Pflugmacher, S., 2003. Organizmalar üzerinde biyojeokimyasallar olarak hareket eden hümitik maddeler için daha fazla kanıt. İçinde: Ghabbour, EA, Davies, G. (Eds.), Hümitik Maddeler Doğanın En Çok Yönlü Malzemeleri. Taylor ve Francis, Inc., New York, s. 349–361.
- Yamamoto, H., Liljestrand, HM, Shimizu, Y., 2004. Sentetik membran kesecikleri ve su arasında 17 b-estradiol ve p nonilfenolün bölünmesi üzerinde çözünmüş organik madde ikamelerinin etkileri. *çevre. bilim Teknoloji* 38, 2351–2358.
- Zenkevics, H., Klavins, M., Vose, V., Bucena, A., 2005. Hümitik asit, kurbağa oositlerinin gonadotropin aktivitesini ve hormonal duyarlılığını azaltır. *Su. Toksikol.* 75, 380–383.
- Zsolnay, A., 1996. Toprak sularında çözünmüş humus. İçinde: Piccolo, A. (Ed.), Karasal Ekosistemlerde Hümitik Maddeler. Elsevier, Amsterdam, s. 171–224.