

Prosjektoppgaver

**Generell toksikologi
BIO241**

våren 2003

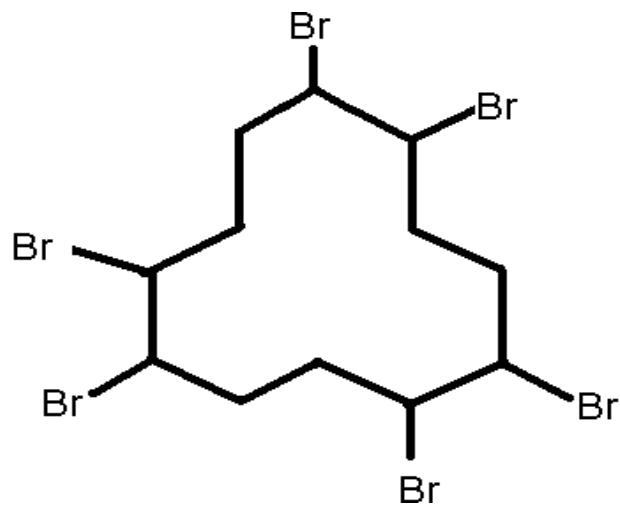
Innhold

1. Effekter av brominerte flammedempere på genekspressjon.....1 Azra Sarancic, Ville Erling og Sipinen	1
2. Genotoksiske effekter i mannlige kjønnsceller.....12 Ana Slipicevic, Mari Sandbakken og Muthana Salam	12
3. Effekter av svevestøv på cytokinfrigøring fra epiteliale lungeceller.....44 Lubna Zaidi og Marianne Aastebøl Minge	44
4. Effekten av CYP1A1 hemmeren α -naftoflavon (ANF) på benzo(a)pyren (B(a)P og syklpentapyren (CPP) induisert apoptose.....59 Solveig Aamodt og Jostein Bakke	59
5. Toksisitet av α -cypermetrin på meitemark.....69 Linda Marie Skryseth og Christina Sørensen	69
6. Ditionits effekter på mikroorganismer i grunnvann.....93 Vibeke Ansteinsson og German Tapia	93
7. <i>In vitro</i> benzo[a]pyren adduktdannelse og kvantitativ bestemmelse.....109 Carlos Sagredo og Jorunn Kirkeleit	109
8. Virkning av bromerte flemmehemmere på dannelsen av reaktive oksygen- forbindelser hos humane granulocytter og kornceller fra infantile rottehjerner.....144 Marius Gudbrandsen og Anne Marthe Jevnaker	144
9 og 10. <i>In vivo</i> og <i>in vitro</i> eksponering av østrogenagonister i juvenile hannfisk.....160 Inger Katharina Gregersen, Marit Nøst Hegseth, Awale Warsame og Nina E Landvik	160

Effekter av bromerte flammehemmere på genekspresjon

Utført av: Azra Sarancic
Ville Erling Sipinen

Veiledere: Professor Harald Osmundsen
Hovedfagstudent Maria Landin



Hexabromocyclododecane (HBCD)

Utført ved:
Institutt for Oral Biologi, UiO på Rikshospitalet.

INNHOLDSFORTEGNELSE

INNLEDNING	Side 2
TEORI	Side 2-4
Bromerte flammehemmere	Side 2
Genekspresjon	Side 2
METODER	Side 5-7
PCR	Side 5-6
RT-PCR	Side 6
Agarosegelelektroforese	Side 7
PRAKTISK GJENNOMFØRELSE	Side 7-8
Protokoll	Side 8
RESULTATER	Side 9
BEREGNINGER	Side 10
DISKUSJON	Side 10
KONKLUSJON	Side 11
REFERANSER	Side 12
VEDLEGG 1	Side 13-14

INNLEDNING

Når levende organismer påvirkes av fremmedstoffer medfører dette oftest endringer i ekspresjon av gener i ett eller flere av organismens organer. Det kan være at gener som kontrollerer cellesyklus enten aktiveres eller inaktiveres. Gener som er implisert i cellulære stressreaksjoner kan bli aktivert. Dessuten kan gener som koder for bestemte enzymer få endret sin ekspresjon. Derfor kan måling av genekspresjon være et nyttig verktøy for både å påvise eksponering for fremmedstoffer, og for å kunne angi mulige konsekvenser av fremmedstoffeksponering. I denne sammenhengen har vi sett på effekten av eksponering for en flammehemmer, nemlig hexabromocyclododecan (HBCD).

Vi har sett på HBCD's påvirkning på genekspresjon hos mus. Genene undersøkt var c-myc og cyp, med L27 som kontrollgen.

TEORI

Bromerte flammehemmere(BFH)

Flammehemmere kan deles inn i tre hovedgrupper:

1. halogenerte hydrokarboner (inkl. BFH)
2. organiske fosforforbindelser
3. uorganiske produkter

Bromerte flammehemmere har i den senere tid blitt omtalt som nye miljøgifter i media. Bromerte flammehemmere er betegnelsen for en gruppe bromerte organiske stoffer med hemmende effekt på flammer i organisk materiale. De brukes i elektriske og elektroniske produkter, tekstiler og plast i transportmidler, byggematerialer, maling og fugemidler. Den totale mengden BFH som brukes i produkter i Norge er anslått til å være mellom 300-600 tonn pr. år. Mange BFH har uønskede helse og miljøvirkninger. Fordi de er stabile skjer det en spredning i miljøet og en oppkonsentrering i næringskjeden. Det finnes ca. 70 ulike BFH på markedet.

De første BFH som ble introdusert var polybromerte bifenyler (PBB), men etter en ulykke i Michigan i 1974 hvor kuer og kyllinger ble forgiftet av forurenset for, ble disse forbudt brukt og erstattet av polybromerte difenyletere(PBDE) som er blitt den mest anvendte gruppen av BFH.

Bromerte flammehemmere er kronisk giftige, skader nyrer, lever og immunsystemet. Stoffene penta-, okta og deka- BromDifenyl- Eter (-BDE), tetrabrombisphenol (TBB), hexabromocyclododekan (HBCD) utgjør den største andelen bromerte flammehemmere. HBCD brukes i tekstilproduksjon. Forskerne er ikke enige om hvor skadelig dette stoffet er, men man har mistanke om at det er kreftfremkallende. HBCD har man bla. funnet fritt i elver i Sverige og Danmark. De siste årenes forskning har vist at BFH er spredt i miljøet over store deler av verden, også i sedimenter og fisk fra Norge. Dette fører til at vi mennesker eksponeres for BFH, og bla. er mange av stoffene blitt påvist i både blodprøver og i morsmelk. Det er viktig å fortsette overvåkingen av BFH i miljøet og mennesker. I Sverige og Danmark har myndighetene allerede gått inn for å fase ut bruk av PBDE, og PBB er på SFTs liste over kjemikalier hvis bruk ønskes vesentlig redusert innen 2010.

Genekspresjon

For å opprettholde homøostase er alle organismer avhengige av et kontrollsystem som regulerer cellefunksjoner, f. eks proteinsyntese og proliferasjon. Reguleringen skjer på gennivå, ved at gener slås av og på, som følge av aktiverte transkripsjonsfaktorer. I vår hverdag blir vi utsatt for tusenvis av ulike stoffer hvorav mange er potensielt skadelige på en el. annen måte. Mange slike stoffer opptrer som falske signalstoffer el. på andre måter forstyrrer celleaktivitet. Mange bioaktiveres under metabolismen, dvs. omdannes til giftige forbindelser som igjen gjør skade på målorganer, el. bare generelt har en giftig virkning på vev.

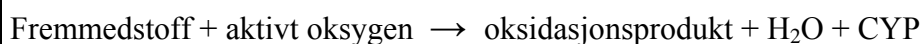
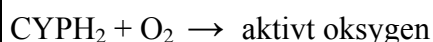
Vi har i vårt forsøk sett på ekspresjonen av c-myc og cyp genene relatert til ekspresjonen av ribosomalt protein L27, hos forsøksmus. I praksis vil det si at isolert RNA fra leverceller ble brukt til å amplifisere c-myc, cyp og L27 vha. RT-PCR, og kjørt i agarosegelelektroforese. Deretter ble mengden av c-DNA kvantifisert i egen apparatur og resultatene mellom behandlede mus og kontroll mus sammenliknet. L27 koder for protein 27 i den lille ribosomale underenheten og er et husholdningsgen. Det betyr at det er permanent og sterkt uttrykt på et stabilt nivå. Derfor har vi sett på forholdet mellom uttrykt c-myc og cyp mot L27 innad i gruppene, behandlet og kontroll, og deretter sammenliknet forholdene mellom gruppene. Ellers ville det bli for mye usikkerhet knyttet opp mot konsentrasjonene av RNA i prøvene før amplifiseringen.

Litt om genene vi har sett på:

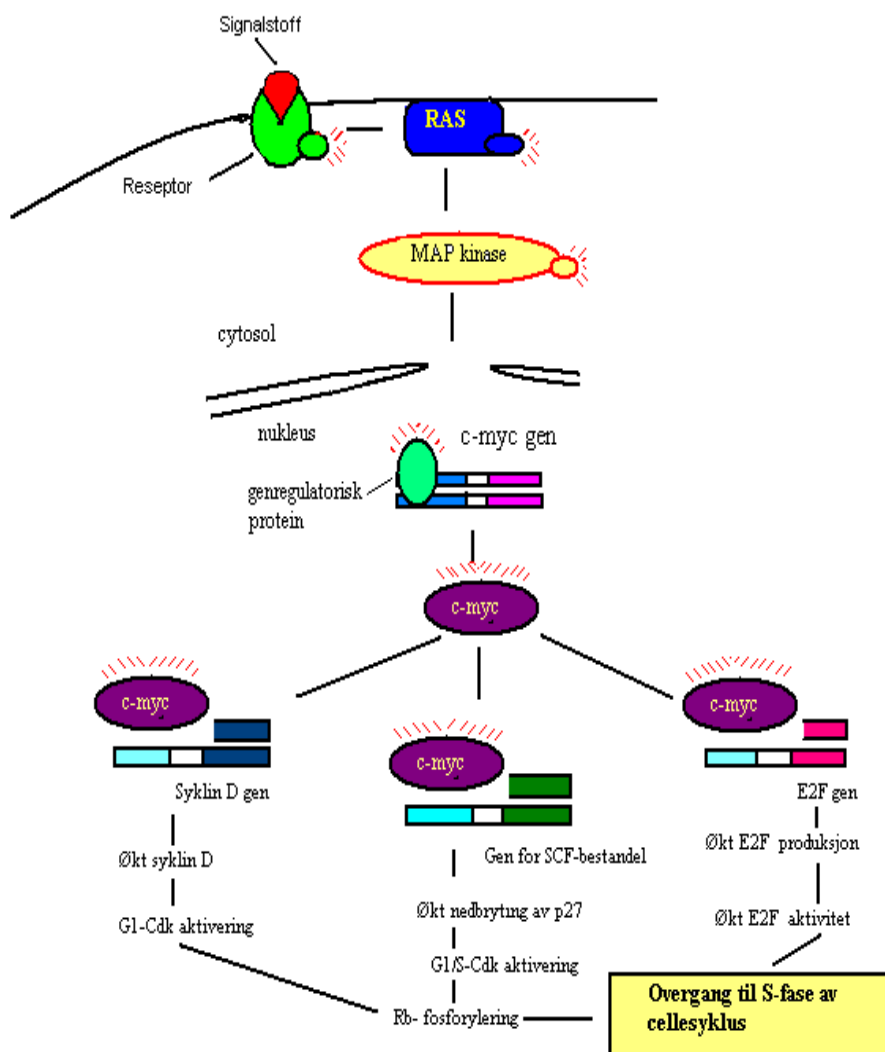
Cytochrom P450, eller CYP er biotransformasjonsenzymer som har stor betydning for omdanningen av fremmedstoffer. For eksempel innen metabolisme av medisiner. Andre oppgaver er metabolisme av kolesterol og steroider, samt vitamin D₃ og steroid syntese. En indikasjon på høy CYP-enzym aktivitet kan ofte ses ved økt levervekst. CYP-enzymene er viktige i detoksifisering av giftstoffer i leveren, men i tillegg skjer også det motsatte, nemlig bioaktivering. Et godt eksempel på dette er bioaktiveringen av paracetamol av CYP2E1, som omdanner dette til N-acetyl-benzokininimin, en meget levertoksisk forbindelse. Sammen med etanol som hindrer nedbryting av enzymet slik at nivået blir høyere er særlig ille ved at det øker risikoen for levernekrose. Bioaktivering av fremmedstoffer utført av CYP-enzymene kan også gi økt sjans for kreftutvikling ved at karsinogener dannes.

Eksempel på dette er omdannelsen av benzo(a)pyren via CYP1A1 til ulike epoksidforbindelser, hvorav noen er kraftige karsinogener,.

Aktiviteten og betydningen av CYP-enzymene inngår også i en rekke andre enzymatiske prosesser i en organisme, og mutasjoner i mange av CYP-genene kan gi alvorlige metabolske forstyrrelser. Antall CYP-enzymene er veldig stort og funksjonene de utfører er mange. Vi har sett på genet for en felles bestanddel til alle disse, nemlig NADPH-reduktase delen. Generell reaksjonen er som følger:



C-MYC, det andre genet vi var interessert i koder for det genregulatoriske proteinet c-myc og aktiverer en rekke andre gener som til sammen fører til celledeling. Kort fortalt aktiverer c-myc både gener som fremmer celledeling, samtidig med at den hemmer ekspresjon av gener som koder for inhibitoriske proteiner. Dette skjer både direkte og indirekte. Resultatet blir at cellene hvor dette skjer entrer S-fasen av cellesyklus. Hyperaktivitet av c-myc vil i normale celler, ende med at cellen arresteres i cellesyklus el. gjennomgår apoptose. Dette er takket være kontrollpunktene som bestemmer om cellen tillates å gå inn i neste fase av celledelingen eller ikke. Men skulle det skje en mutasjon i genene som koder for proteinene ansvarlig for dette oppsynet, da er muligheten for kreft nærliggende.



Figur 1. Målgener til c-myc.

METODER

PCR-polymerase chain reaction

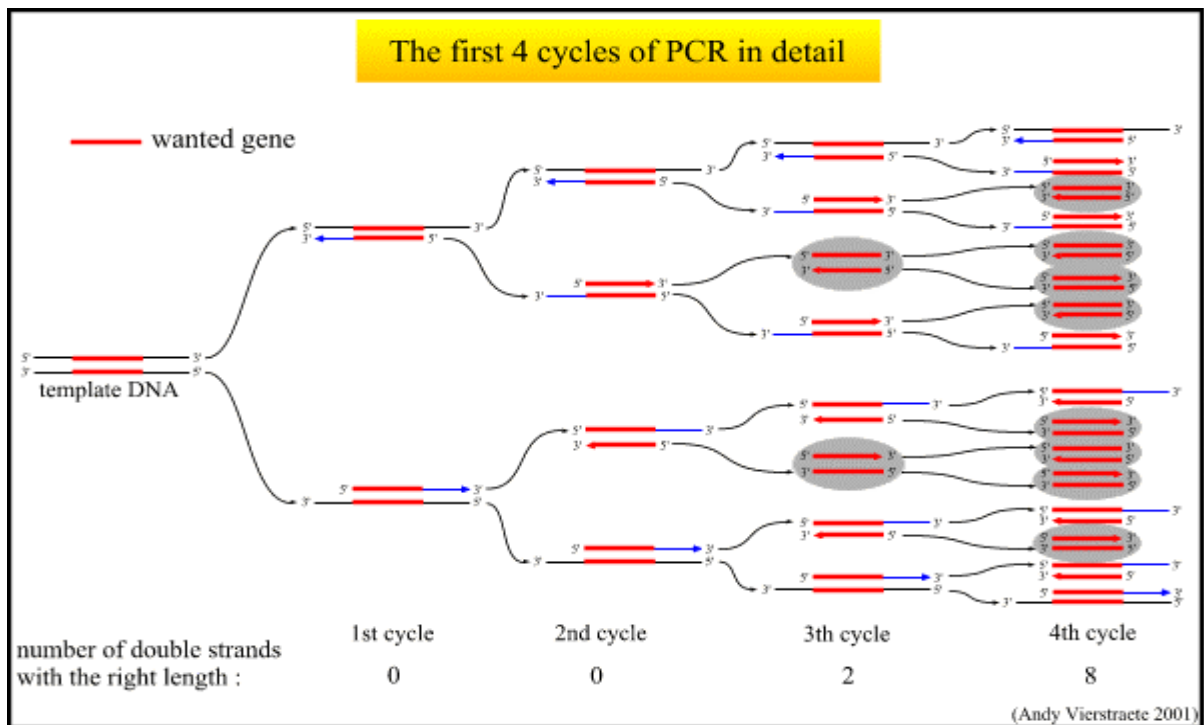
PCR er en effektiv og automatisert måte å mangedoble et dobbeltrådet DNAfragment. Man bruker primere(oligonukleotider, kun få titals bp lange), komplementære til en sekvens nær fragmentet(templatet) man ønsker å amplifisere. Primerne binder seg til 3' siden av den ønskede sekvensen på hver sin enkelttråd av DNA(etter denaturering av dobbeltråden), og fungerer som startpunkt for polymerasen. Polymerasen er enzymet som står for ekstensjonen av enkelttrådene, dvs. legger til komplementære nukleotider langs tråden og danner ny dobbeltråd. Polymerasen leser templatet i 3→5' retning, ekstensjonen går i 5→3' retning. DNAtrådene skilles fra hverandre ved varmebehandling(94°C) og avkjøles til et par grader under smeltepunktet til primerne som brukes(bestemmes av antall G≡C i primersekvensen, varierer fra 30°C-65 °C)

Det dannes mange kontakter mellom de enkelttrådede templatene og primerne, hydrogenbånd formes og brytes stadig. De mer stabile kontaktene mellom DNA og primer(der hvor bindingen blir riktig), varer lenge nok til at polymerasen kan feste seg og starte ekstensjonen av templatet, i nærvær av frie dNTP i løsningen. Etter at noen få baser er lagt til blir bindingen såpass sterk at den ikke lenger brytes. Prøven varmes opp til 65°C-75°C i 2-5 min, den optimale arbeidstemperaturen til polymerasen. Primerne som ikke har festet seg spesifikt, vil nå løsne og ikke føre til ekstensjon av DNA. Etter et par minutter med ekstensjon er det blitt dannet to kopier av det opprinnelige templatet. Deretter følger ny denaturering hvor temperaturen heves igjen til 94°C, men denne gang bare for noen sekunder. Disse trinnene gjentas 25-30 ganger. Prosessen er eksponentiell og innen et par timer er det produsert ~ milliard kopier. Se figur 2.

Ettersom polymerasen bare fortsetter til templatet tar slutt, vil det bli produsert noen fragmenter av feil lengde i starten, polymerasen "overskyter". Disse fragmentene utgjør derimot en forsvinnende liten andel av sluttproduktet og spiller ingen stor rolle.

Polymerasene brukt i dag er varmestabile over denatureringspunktet i PCR og har gjort det mulig å automatisere prosessen så elegant.

Den største begrensningen til metoden er at den bare kan brukes til å amplifisere relativt korte DNA fragment ~ noen tusen bp.



Figur 2.

RT-PCR

RT-PCR er likt som vanlig PCR, men skiller seg ved at starten for amplifisering er m-RNA og ikke DNA. For at man skal kunne transkribere m-RNA over til cDNA må man ha enzymet revers transkriptase. Enzymet brukes av retrovirus, som bruker revers transkriptase til å integrere sitt eget genom inn i en vertscelle. For å få til dette må virusene gjøre om RNA-genomet til DNA først.

RT-PCR prosedyren:

De ønskede m-RNA blir transkribert over til cDNA ved hjelp av revers transkriptase og spesifikke primere for sekvensene. Først danner revers transkriptase en komplementær DNA tråd til m-RNA templatet, slik at det blir en dobbelttrådet m-RNA-DNA hybrid. Deretter degraderes m-RNA delen i dobbelttråden av en RNase, slik at bare DNA tråden blir igjen. DNA tråden fungerer så som templat for DNA-polymerasen som også er tilstede i løsningen. Videre skjer amplifisering likt med vanlig PCR, som vist i figur 2.

AGAROSEGELELEKTROFORESE

Agarosegelelektroforese er en metode som brukes til å isolere, identifisere og rense DNA-fragmenter. Agarose er et polysakkarid og utvinnes fra stortare.

Agarosegel lages ved at agarosepulver løses i en elektrolyttbuffer, ved koking. Når gelen kjølnes, danner agarosen en matriks, et slags porøst nettverk, hvilket utgjør grunnlaget for separering av DNA-fragmenter i gelen. Tettheten av nettverket el. porene, bestemmes av konsentrasjonen av agarose. Mengden agarose beregner man etter hvor store molekyler man ønsker å separere. Gelen lages med små brønner hvor prøvene appliseres, etter at gelen har blitt senket ned i et bufferbad tilkoblet en spenningskilde. Ved å skru på strømmen starter separasjonen av DNA-fragmentene, ved at de vandrer mot den positive polen i systemet. DNA er negativt ladet. Fragmentene blir separert etter størrelse ved at de minste vandrer raskest. Kortfattet er vandringshastigheten avhengig av 1) størrelsen til molekylene som skal atskilles. 2) Spenningen over gelen. 3) Porestørrelse og konsentrasjon av agarose. Ved å applisere i en av brønnene fragmenter av kjent størrelse, en såkalt "molekylærvekt-el. DNA-stige", kan man ut ifra denne anslå størrelsen på fragmentene i den ukjente prøven. For å synliggjøre båndene som dannes tilsettes enten gelen el. prøvene ulike kjemiske forbindelser slik at de kan ses i uv-lys. Ethidiumbromid er vanlig å bruke i gelen, men det forutsetter at gelen tas i bruk relativt kort tid etter at den er støpt, ettersom stoffet brytes ned av lys. Gelen kan evt. lagres mørkt, men erfaringsmessig for mange kan dette føre til svakere resultater. Forbindelsen vi brukte heter Gel-star og blandes med DNA-prøvene direkte før applisering i gel. Gel-star brytes også ned av lys, men man unngår noe av problemet ved at man heller venter med å blande inn gel-star til alt annet er gjort klart. For å avgjøre når elektroforesen har gått lenge nok tilsetter man ofte et fargestoff, f. eks bromfenolblått. Man følger bare vandringen til fargen.

PRAKTISK GJENNOMFØRELSE

Forsøkene ble utført ved Institutt for Oral Biologi, UiO på Rikshospitalet.

Vi fikk utlevert RNA ferdig isolert fra muselever. Disse RNA prøvene ble brukt til å bestemme ekspresjon av c-myc, cyp og L27 ved hjelp av RT-PCR.

RT-PCR resultatene ble analysert ved hjelp av agarosegelelektroforese.

RNA prøvene var fra kontrollmus og fra mus behandlet med 4 vekt prosent hexabromocyclododecan (HBCD), over fire dager.

Resultatene fra elektroforesen ble analysert i en apparatur som måler mengden c-DNA i båndene ved å telle opp antall piksler ved en gitt lysintensitet.

Protokoll

Prøver med RNA: 1,4,5,7,10 og 11.

Fra prøvene 1,4 og 5 amplifiserte vi L27 hvor 4 og 5 var fra behandlede mus , mens prøve nr.1 var fra kontrollmus.

Fra prøvene 7,10 og 11 amplifiserte vi både c-myc og cyp. Prøve 7 og 11 var fra behandlede mus, mens prøve 10 var fra kontrollmus.

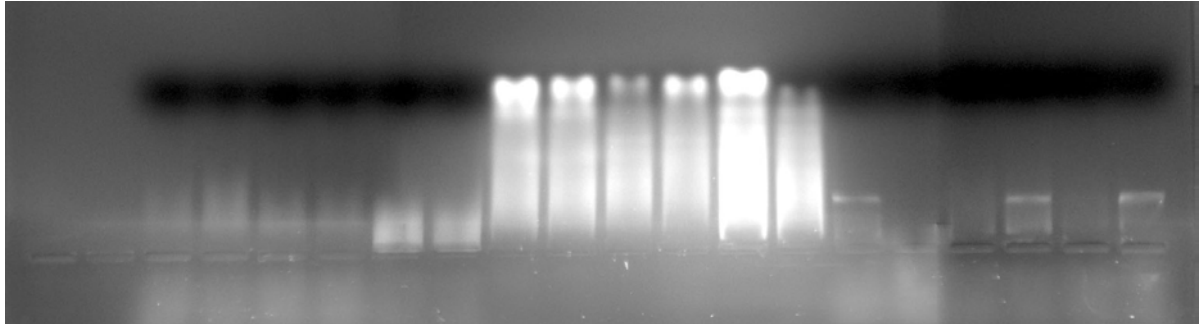
Alle RNA prøvene var forhåndsbehandlet med DNase, for å hindre kontaminering med DNA.

Vi laget en mastermiks som ble brukt til alle RT-PCR prøvene (kontroll og flammedemper prøver), som inneholdt c-myc, cyp og L27 primerpar.

Mastermiks	Mengde pr. prøve	Totalvolum til 18 prøver
5x Qiagen OneStep Buffer	5 μ l	95 μ l
dNTP miks (10mM)	1 μ l	19 μ l
Rnase inhibitor	1 μ l	19 μ l
Primere til L27,c-myc og cyp	1 μ l	19 μ l
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 μ l	19 μ l
Totalvolumet av miksen	9 μ l	171 μ l

Etter at alle prøvene var ferdig amplifisert i RT-PCR, ble produktene kjørt i en 4 % agarosegelelektroforese.

RESULTATER



Brønn: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
 Mus : B B K K B B B B K K B B K K B B B B
 B: Behandlet gruppe.
 K: Kontroll gruppe.

Brønn. nr	Volum	c-DNA	Prøve. Nr	Mus
1	2 130 565,21	c-myc	7	B
2	2 564 091,40	c-myc	7 parallell	B
3	2 795 522,26	c-myc	10	K
4*	-----	c-myc	10 parallell	K
5	8 627 409,12	c-myc	11	B
6	13 388 225,63	c-myc	11 parallell	B
7	29 789 311,59	cyp	7	B
8	44 164 824,34	cyp	7 parallell	B
9	24 956 798,59	cyp	10	K
10	25 229 095,27	cyp	10 parallell	K
11	28 074 986,98	cyp	11	B
12	27 098 453,11	cyp	11 parallell	B
13	8 490 282,45	L27	1	K
14	7 112 155,94	L27	1 parallell	K
15	4 258 276,16	L27	4	B
16	6 767 841,96	L27	4 parallell	B
17*	1 527 222,62	L27	5	B
18	5 172 360,73	L27	5 parallell	B

* : Prøver ikke med i utregning.

BEREGNINGER

Prøve	mus	Gj.snitt volum	Prøver B/ L27B	Prøver K / L27K
c-myc 7	B	2 347 328,31	0,425776014	-----
c-myc 11	B	11 007 817,38	1,996680474	-----
c-myc 10	K	2 795 522,26	-----	0,358344278
cyp 7	B	36 977 067,97	6,707177914	-----
cyp 11	B	27 586 720,05	5,003886181	-----
cyp10	K	25 092 946,93	-----	3,21654171
L27 (4,5)	B	5 513 059,06		
L27 (1)	K	7 801 219,20		

DISKUSJON

La oss starte med å sammenlikne ekspresjonen av c-myc hos behandlede mus mot kontroll gruppen. Ser vi på prøve nr. 7 sammenliknet med kontrollgruppen (c-myc 10), er verdiene tilnærmet like. Derimot er verdiene i prøve nr. 11 nesten 6 ganger høyere enn i kontrollgruppen. Årsaken til de ulike verdiene hos de behandlede gruppene (prøve 7,11), skyldes mest sannsynlig feil ved utførelse av forsøket. Av de viktigste feilkildene kan vi nevne følgende: utelatt oppvarming av noen av prøvene før uttak av m-RNA til videre arbeid. Oppvarmingen er nødvendig for fordele RNA jevnt i prøvene. Dette medførte antakelig til at noen av prøvene fikk mindre c-DNA enn antatt ved slutten av amplifiseringen. Ellers er også pipettering og generell behandling av prøvene mulige årsaker til variasjon i resultatene. Sett bort i fra prøve nr. 7, som mest sannsynlig skyldes feil ved utførelsen, ser det ut til at HBCD medførte en økning i ekspresjonen av c-myc hos behandlede mus, prøve nr. 11. Som nevnt tidligere i teksten er c-myc en viktig komponent i kontroll av cellyklus og er blant annet implisert i ulike typer kreft, for eksempel APC (tykktarmskreft). Ekspresjonen av cyp hos behandlede mus mot kontrollgruppen er mer ensydig, dvs. at begge de behandlede prøvene har tilnærmet like verdier. Ekspresjonen er hos begge prøvene ca. dobbelt så stor som kontrollgruppen. Dette er forenlig med hva vi vet om aktivering av CYP-enzymmer ved eksponering av fremmedstoffer.

KONKLUSJON

Resultatene fra forsøket er ikke så gode som vi kunne ønsket oss, og å trekke noen sterke slutninger basert på forsøket alene er ikke klokt. Derimot er det bekymringsverdig at HBCD og en rekke andre forbindelser som lenge har blitt brukt og brukes som flammehemmere, viser seg å ha en skadelig effekt på miljøet. HBCD fører til økt genekspressjon i gener som er implisert i cellyklus og kan muligens gi økt risiko for kreft. I tillegg kan man jo tenke seg en bioaktivering av HBCD og andre flammehemmere, via detoksifiseringsmekanismer, f. eks via CYP-enzymmer. Uansett er det mye man fortsatt ikke vet om disse stoffene når det gjelder skadevirkninger i biologiske systemer, hvilket omfang og hvilke følger det vil ha på lang sikt. Forskningen er i allefall kommet godt i gang 😊

REFERANSER

- Molecular biology of the cell, Alberts, Johnson, Lewis (Fourth edition).
- Gifter, Stenersen.
- www.sft.no.
- <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>
- Harald Osmundsen, Institutt for Oral Biologi, UiO.
- Maria Landin, hovedfagsstudent i toksikologi ved institutt for Oral Biologi, UiO

VEDLEGG 1

FAKTA OM FLAMMEHEMMERE

Eksempler på stoffer:	Navn (synonym):
CAS-nr /EC-nr/ Indeks-nr:	
79-94-7/201-236-9 1163-19-5/214-604-9	2,2',6,6'-tetrabrombisfenol A (TBBPA)(1)
25637-99-4/247-148-4 32534-81-9/251-084-2/602-083-00-4 32536-52-0/251-087-9	Dekabromodifenyleter (DBDPE, 2,2',6,6' tetrabrom 4,4'-isopropylidendifenol) (2)
	Heksabromsyklododekan (HBCD) (3)
	Pentabromodifenyleter (PBDPE) (4)
	Oktabromdifenyleter (OBDPE) (5)
Bransjer	<ul style="list-style-type: none">• Produksjon av elektriske maskiner og apparater• Bygge- og anleggsbransjen• Produksjon av trelast og varer av tre• Produksjon av kjemikalier og kjemiske produkter
Produktgrupper	<ul style="list-style-type: none">• Flammehemmer i elektriske og elektroniske produkter• Bygningsmaterialer• Isolasjonsmaterialer• Lim• Plast• Tekstiler
Mengder (tonn)	100-500 (inkludert faste produkter)
Begrunnelse	Meget giftig for vannlevende organismer, bioakkumulerer, lite nedbrytbart, kan skade barn som får morsmelk.
Klassifisering	(4) Xn;R48/21/22,R64,N;R50-53 (5) Forslag til klassifisering T; Rep 2;R62, Rep3;R61 i en senere teknisk

	tilpasning til EU direktiv 67/548/EØF
Spesielle reguleringer/aktivitet	<p>Forskrift om begrensning av import, bruk med mer av enkelte skadelige stoffer og produkter inne bærer et forbud mot enkelte forbindelser i noen tekstiler.</p> <p>(1) Stoffet er til vurdering i EUs program for risikovurdering av eksisterende kjemikalier (4. prioritetsliste).</p> <p>(2) Stoffet er til vurdering i EUs program for risikovurdering av eksisterende kjemikalier (1.prioritetsliste).</p> <p>(3) Stoffet er til vurdering i EUs program for risikovurdering av eksisterende kjemikalier (2.prioritetsliste).</p> <p>(4) Stoffet er vurdert i EUs program for risikovurdering av eksisterende kjemikalier (2. prioritetsliste). Det er utarbeidet " Risk Assessment Report" og konklusjon ble publisert i Official Journal 05.03.01.</p> <p>(5) Stoffet er til vurdering i EUs program for risikovurdering av eksisterende kjemikalier (1.prioritetsliste).</p>

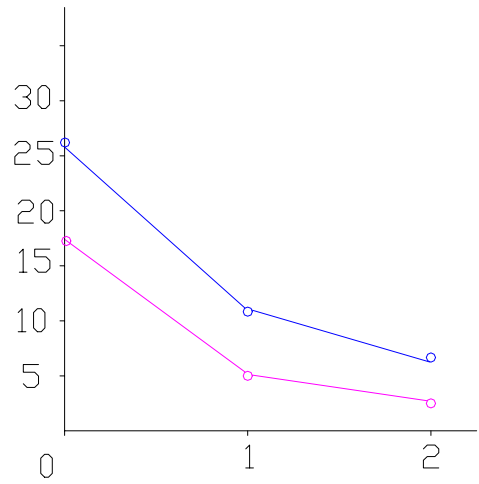
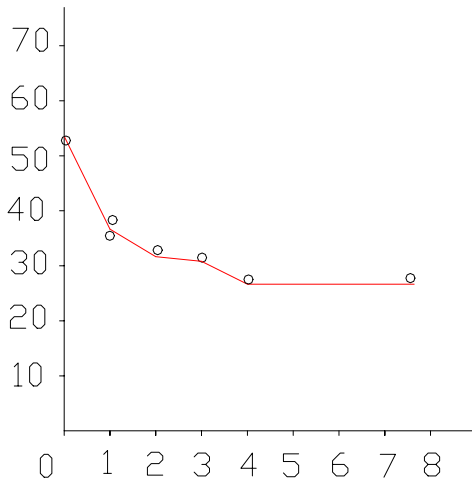
Prosjektoppgave i generell toksikologi bio 241

Genotoksiske effekter i mannlige kjønnsceller

Ana Slipicevic
Mari Sandbakken
Muthana Salam

Veileder: Gunnar Brunborg

<u>PROSJEKTOPPGAVE I GENERELL TOKSIKOLOGI BIO 241</u>	12
<u>GENOTOKSISKE EFFEKTER I MANNLIGE KJØNNSCELLER</u>	12
<u>INNLEDNING:</u>	15
<u>TO MILJØMUTAGENER: IONISERENDE STRÅLING OG ULTRAFIOLETT LYS</u> 16	
<u>IONISERENDE STRÅLING (RØNTGENSTRÅLING)</u>	16
<u>ULTRAFIOLETT STRÅLING</u>	16
<u>DNA REPARASJON</u>	19
<u>BASEEKSISJONSREPARASJON (BER)</u>	20
<u>NUKLEOTIDEEKSISJONSREPARASJON (NER)</u>	21
<u>REPARASJON AV DOBBELTRÅDBRUDD (DBS)</u>	23
<u>FREMGANGSMÅTE OG METODER</u>	26
<u>FRAMGANGSMÅTE FOR PREPARERING AV TESTIKKELCELLER FRA MUS</u>	26
<u>FLOWCYTOMETRI (VÆSKESTRØMSCYTOMETRI)</u>	27
<u>ANALYSE OG KARAKTERISERING AV SPERMATOGONISKE CELLER VED HJELP AV</u> <u>FLOWCYTOMETRI:</u>	28
<u>TESTIKKELSTRUKTUR</u>	28
<u>RESULTATER FRA FLOWCYTOMETRI ANALYSE AV VÅR CELLESUSPENSJON:</u>	29
<u>BESTRÅLING AV MUSETESTIKKELCELLER</u>	34
<u>KOMET METODEN (ENKELTCELLE GELELEKTROFORESE)</u>	35
<u>FRAMGANGSMÅTE, KOMET</u>	39
<u>RESULTATER FRA KOMET ANALYSEN AV VÅR CELLESUSPENSJON</u>	40



.....42

UT FRA GRAFENE OVER SER VI AT TAIL MOMENT BLIR MINDRE DET VIL SI AT CELLENE HAR FÅTT TID TIL Å REPARERE SKADER. DET KOMMER OGSÅ FREM AT FORSKJELLIGE TYPE
CELLER HAR FORSKJELLIGE GRAD AV SKADER OG REPARASJON......43

DISKUSJON.....43

DISSE TYPER STUDIER ER VIKTIGE DEL AV GENTOKSIKOLOGISK FORSKNING. PÅ GRUNN AV DE ER DET MULIG Å FÅ INFORMASJON OM HVOR STORE SKADER VISSE AGENTER KAN GJØRE, HVOR FLINK FORSKJELLIGE CELLE ER TIL Å TAKLE SLIKE SKADER OG HVORDAN VISSE CELLULÆRE MEKANISMER VIRKER I FORSKJELLIGE STADIER. DETTE ER VIKTIG BL.A. FOR VURDERING AV RISIKO FOR UTSETTELSE FOR SLIKE AGENTER......43

Innledning:

Genetisk toksikologi er rettet mot å belyse effekter av kjemiske og fysiske agenter på Arvemateriale og genetiske prosesser i levende celler. Eksponering for slike agenter kan føre til skade på DNA molekylet som igjen kan være medvirkende årsak til helseskader som kreft,

arvelige sykdommer, skader på reproduksjonssystemet og på avkom.

Kunnskap om kjemiske og fysiske agentenes evne til å skade DNA er viktig for å kunne vurdere mulige helseskader forbundet med eksponering for disse.

Effekten av slik eksponering kan kartlegges direkte ved måling av interaksjon mellom agenten og DNA eller mer indirekte gjennom måling av DNA reparasjon etter eksponering.

Hensikten med denne oppgaven er å gi en innblikk i noen av problemstillinger knyttet til arbeid med gentoksikologi og innføring i noen av metoder som anvendes for å belyse disse.

Studier av reparasjon av DNA-skader i mannens kjønceller har pågått over mange år. Til dette har det vært benyttet celler fra mennesker og fra laboratoriedyr, først og fremst rotter.

I videre arbeid er det hensiktsmessig å gå over til mer utstrakt bruk av mus. Dette skyldes at mus er mest brukt for å konstruere genetisk modifiserte linjer (knockout).

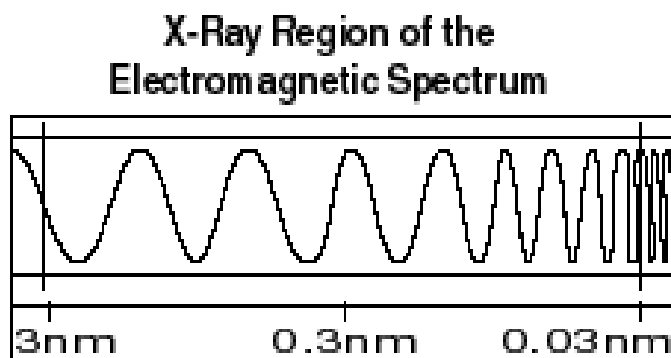
Opgaven omfatter følgende hovedmomenter:

- 1 Preparering av testikkelceller fra mus
- 2 Analyse og karakterisering av spermatogenetiske celler ved hjelp av flowcytometri
- 3 Bestråling av celler med ioniserende stråling og kortbølget UV lys.
- 4 Inkubasjon av celler i tilpasset medium for å tillate reparasjon av DNA skader
- 5 Analyse av gjenværende DNA skader i enkeltceller ved hjelp av kometmetoden sammenligning med resultatene fra rotte og menneske

To miljømutagener: Ioniserende stråling og ultrafiolett lys

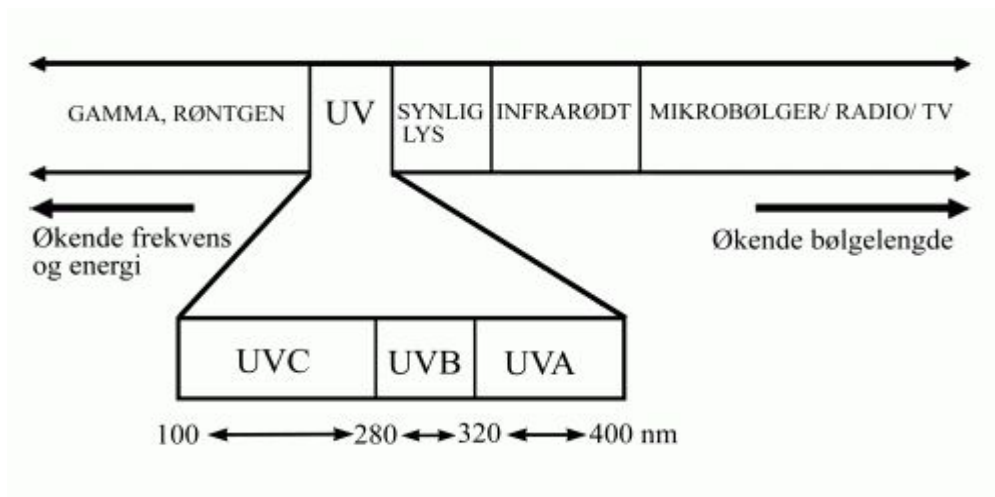
Ioniserende stråling (røntgenstråling)

Ioniserende stråling (radioaktiv stråling og røntgenstråling) er kortbølget og energirik stråling som kan ionisere eller eksitere biomolekyler. Ioniserende stråling gir DNA skader i form av desstabilisering av sukkerfosfat kjeden (alkalilabile skader) og direkte trådbrudd. Strålingen kan forårsake trådbrudd direkte eller via reaksjon med hydroksylradikaler som dannes ved radiolyse av vann. Røntgenstråling gir enkle trådbrudd, mens ioniserende stråling med større tetthet for eksempel α stråling gir doble trådbrudd. Enkelt trådbrudd og alkalilabile skader kan måles direkte ved kometmetoden.

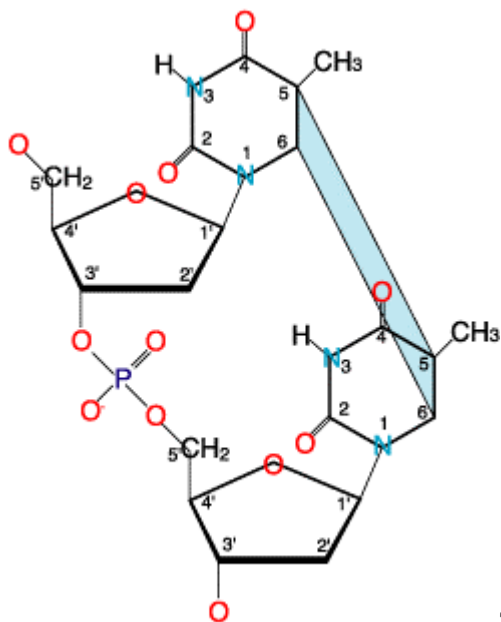


Ultrafiolett stråling

UV lys deles inn etter bølglengde i UVA, UVB og UVC. Den delen av sollyset som inneholder UVC, og det meste av UVB lyset absorberes fullstendig av ozon og andre gasser i stratosfæren.

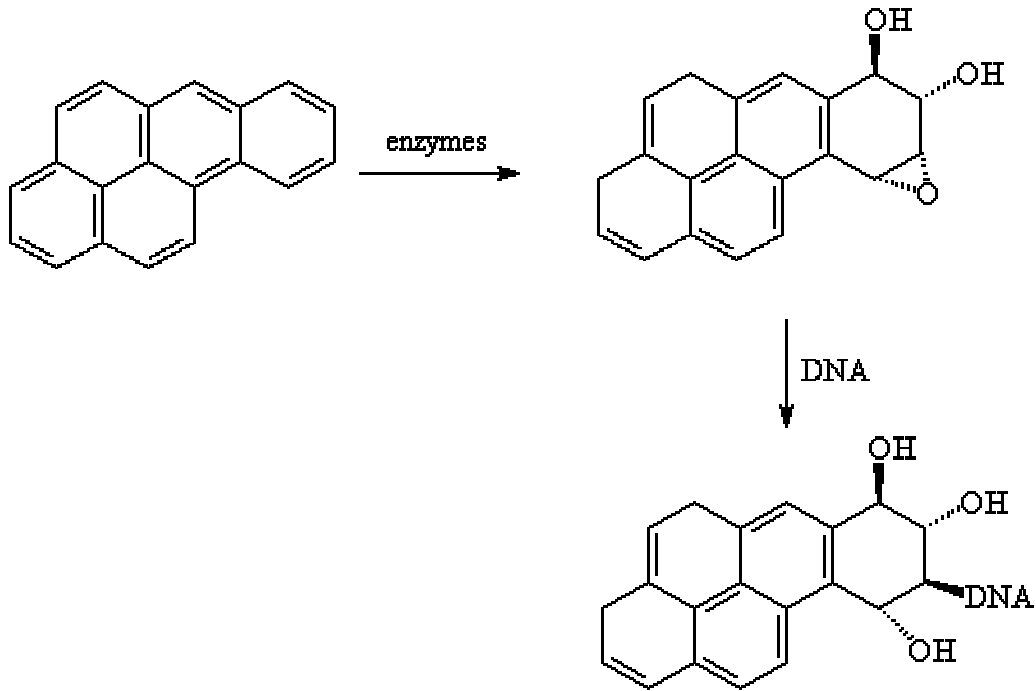


UV stråling kan absorberes av basene i DNA og dette kan føre til skader. De vanligste skadene er bindinger mellom pyrimidinbaser; cyclobutyl pyrimidindimere (CPDs) og bindinger mellom 6 og 4 posisjonene i pyrimidinbaser; 6-4 fotoprodukter (6-4PPs). Av CPDs er den vanligste typen bindinger mellom to tymin baser T-T, mens det dannes mindre av T-C og C-C og Fordi disse skadene ikke gir direkte trådbrudd kan de ikke måles direkte med kometmetoden, det må tilsettes et enzym som gjenkjenner skaden og kutter DNA. I vårt forsøk bruker vi enzymet T4 endo V som gjenkjenner og kutter DNA ved T-T CPDs.



T-T CPD

Mannlige kjønnceller er i praksis lite eksponert for UV lys, men systemet som fjerner UV skader, nukleotid eksisjons reparasjon (NER), fjerner også mange andre typer DNA skader. Eksempler er skader fra metabolitter av benzo[a]pyrene og N-2 acetylaminofluorene. Bestråling med UV lys gir derfor et godt utgangspunkt for å studere cellenes reparasjonsmekanismer.



Metabolitter av benzo[a]pyrene bindes til DNA og kan gi opphav til mutasjoner

DNA reparasjon

For å forhindre DNA – skader og forsikre genetisk stabilitet er alle organismer utstyrt en med en lang rekke komplementære DNA reparasjons systemer som tar seg av alle typer DNA skader.

Reparasjon kan skje på to hovedmåter:

1. Direkte reparasjon, (skaden blir omgjort)
2. Eksisjonsreparasjon

Eksempel av direkte reparasjon skjer bl.a. ved dannelse av T-dimere .

To thyminbaser kan bindes sammen til en T-dimer av UV-lys, og dette kan medføre feil ved replikasjon. Det finnes et eget enzym som kan bryte denne bindingen igjen. Enzymet kalles fotolyase, og det krever synlig lys for å virke mekanisme kalles fotoreaktivering og resultatet er altså at T-dimeren oppheves.

Eksisjonsreparasjon skjer via kompleks flere trinns reparasjonsmekanismer.

De omfatter baseeksisjonsreparasjon (BER), nukleotideeksisjonsreparasjon (NER), mismatchreparasjon (MMR)og rekombinasjonsreparasjon. I tillegg har cellen mekanismer for reparasjon av trådbrudd.

NER er spesielt viktig for eliminering av DNA skader induisert av UV lys og mange kjemiske addukter i DNA .

Homologi avhengig og homologi uavhengig rekombinasjonsreparasjons veier er viktige ved reparasjon av radiasjon induisert dobbeltråds brudd.

Generelt, defekter i DNA reparasjons systemer resulterer i hypersensitivitet for visse genotoksiner

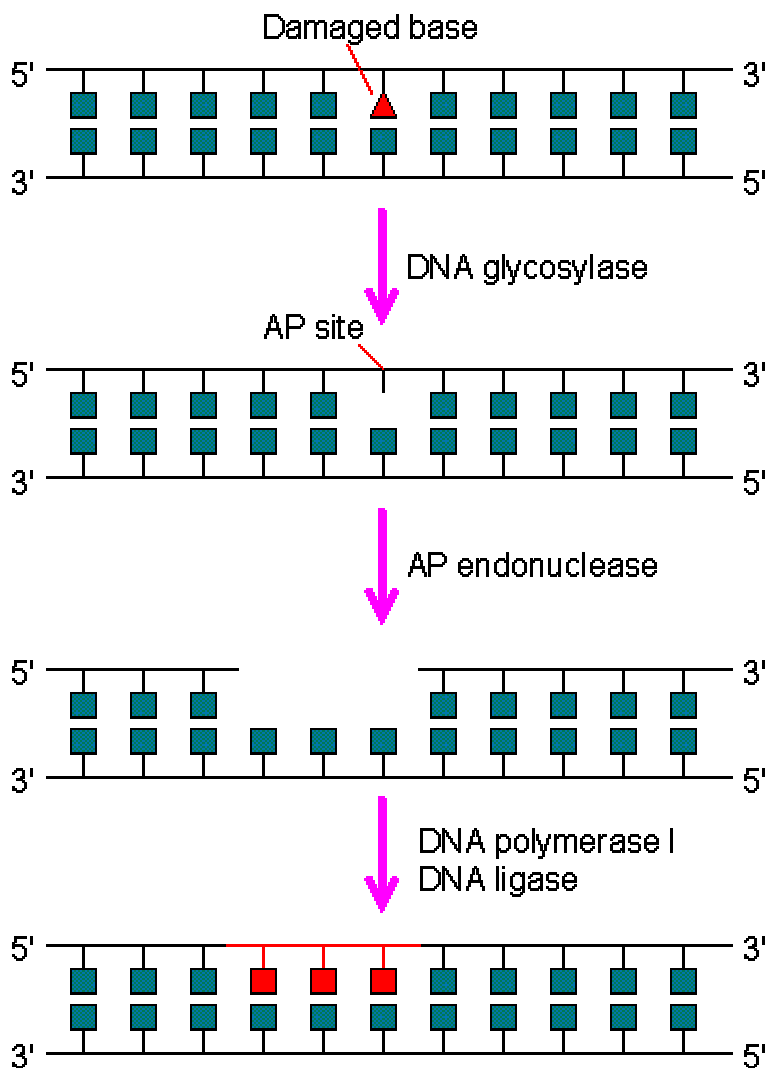
Baseeksisjonsreparasjon (BER)

Baseeksisjonsreparasjon er hovedmekanismen for reparasjon av baseskader og er en viktig reparasjonsmekanisme for reparasjon av oksidative skader.

Reparasjonsmekanismen kan deles inn i 3 trinn.

1. En DNA N-glycosylase fjerner den skadede basen og det blir dannet et AP sted (apureinic eller apyrimidinic)
2. AP endonuklease kutter DNA tråden ovenfor AP stedet og danner en 3'-OH ende.
3. DNA polymerase syntetiserer en ny tråd fra den frie 3'-OH enden.
4. Ligering.

DNA N-glycosylaser hydrolyserer N-glycosylbinding mellom basen og deoksyribose. Et stort antall DNA N-glycosylaser har blitt identifisert. Alle har bindings sete for baser de gjenkjenner.



Nukleotideeksisjonsreparasjon (NER)

NER gjenkjenner skader basert både på deres unormale struktur og kjemi, skjærer de ut og erstatter dem.

I alle organismer består NER av følgende trinn:

1. Gjenkjennelse av skaden
2. Binding av multiproteinkompleks ved skade sted
3. Dobbel innskjæring på den skadde tråden flere nukleotider fra skaden på både 5' og 3' siden
4. Fjerning av oligonukleotide med skaden mellom de to kuttene
5. Utfylling av det nytt oppståtte gapet ved DNA polymerase
6. Ligering

NER maskineriet har bred spesifisitet og fjerner skader som fører til større distorsjoner i DNA

for eksempel syklobutanpyrimidindimerer og addukter mellom benzo(a)pyren og guanin i DNA.

Nuklotideksisjonsreparasjon er et komplekst reparasjonsspor som krever ca. 30 ulike polypeptider.

Initierings trinn avhenger av om skaden er i det aktivt transkriberte tråden av en gen Eller et annet sted i genomet. Hvis skaden ikke er i aktivt transkriberte tråden, gjenkjennes den og bindes av heterodimer som består av XPC og hHR23R proteiner.

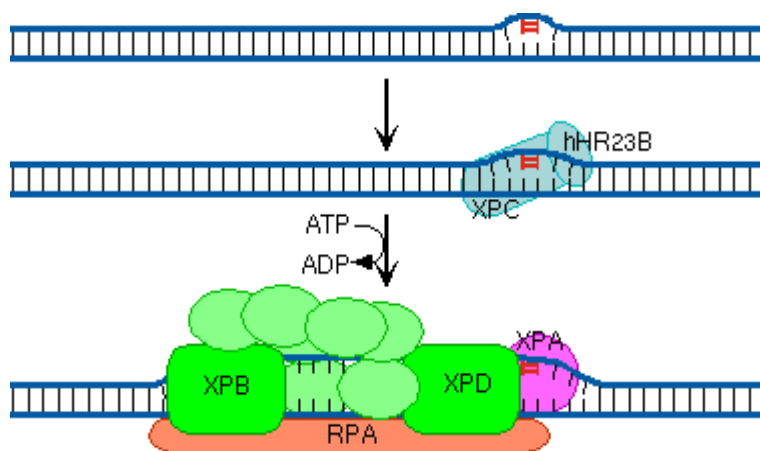
Binding av disse initierer prosess av "global genome repair", som betyr reparasjon Hvor som helst i genomet.

I alle eukaryote organismer, virker det som at XPC/hHR23B dimer gjenkjenner skadet DNA basert på omfang av distorsjon av det normale DNA struktur forårsaket av skaden. Bindingen til den skadde regionen øker ytterligere distorsjon av DNA struktur (vist på bilde, rødt området viser skade for eksempel tymin dimerer)

Økt distorsjon skapt av XPC/hHR23B gjør at tre tilleggs protein kan binde.

En av disse er generell transkripsjons faktor TFIIH (9 subbenheter fremstilt i grønt)

To av disse subbenheter (XPB og XPD) er helikaser som bindes til den skadde tråden og samarbeider med RPA (eukaryot enkeltråds DNA bindende protein kompleks) og XPA for å åpne et område rundt 20-30 nukleotider inkludert det skadde stedet.

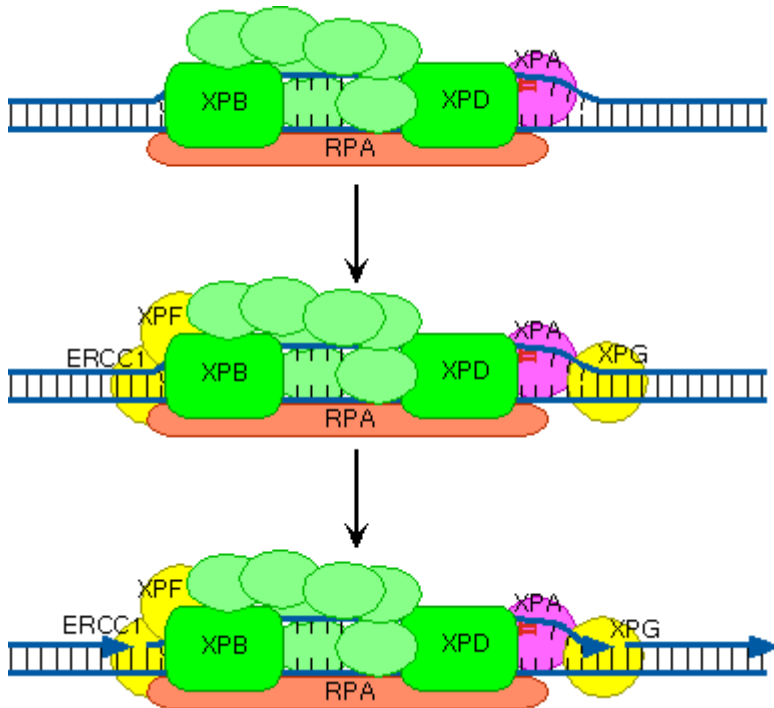


Neste trinn er rekruttering av to struktur-spesifikke endonukleaser XPG og XPF/ERCC1(gult)

Begge nukleaser er spesifikke for forbindelse mellom enkelt og dobbelt tråd DNA.

XPG kutteri dsDNA på 3' siden mens ERCC1/XPF (heterodimer protein kompleks) kutter på 5' siden.

Mekanismen ved hvilken den skadde oligonukleotide område er fjernet er fortsatt under oppklaring men etter fjerning fylles den resulterende gapen av DNA polymerase. Til slutt limer DNA ligase I tråden sammen.



Reparasjon av dobbeltrådbrudd (DBS)

Doppeltrådbrudd i DNA skyldes ofte ionisert stråling eller høye doser av alkylende kreftgener som polysykliske hydrokarboner. Doppeltråds brudd er betraktet til å være veldig letal form av DNA skader for eukaryote celler.

De høyere eukaryoter har utviklet multiple veier for reparasjon av *DBS* disse er homolog rekombinasjon, *non-homologous end joining (NHEJ)* og *singel strand annealing (SSA)*.

Homolog rekombinasjon mekanisme utnytter proteiner som promoterer og får informasjon fra søster-, eller homolog kromosom for å reparere brudd. Det initierende trinnet her er produksjon av enkeltråds hale med 3' enden v.h.a eksonuklease eller helikase aktivitet. Denne halen invaderer videre det uskadde homologe DNA molekylet etterfulgt av DNA syntese og dannelse av såkalt *Holliday junction* DNA kompleks. Ved spaltning av dette komplekset dannes det to nye molekyler uten trådbrudd.

Non-homologous end joining (NHEJ) mekanisme er ansett til å være hovedveien for reparasjon av slike skader. Den tillater sammenføring av ender selv om det bare finnes begrenset sekvens likhet mellom dem.

Subbenheter av heterodimerer proteiner Ku70/Ku80 binder frie DNA ender ved skade stedet og i tillegg *rekrutterer* DNA-protein kinase som fosforylerer Ku70/Ku80 heterodimerer.

De fleste skader som oppstår skyldes oksidasjon eller stråling og endene kan ikke føres sammen pga. kjemiske skader. Det må rekrutteres tilleggs proteiner som fjerner skaden og fyller gapen som oppstår.

Rad50-Mre11-Nbs1 kompleks som inneholder helikase og eksonuklease aktivitet medvirker ved å trimme DNA ender som etterfølges av ligering av de frie ender av DNA ligase i konjugasjon med XRCC4

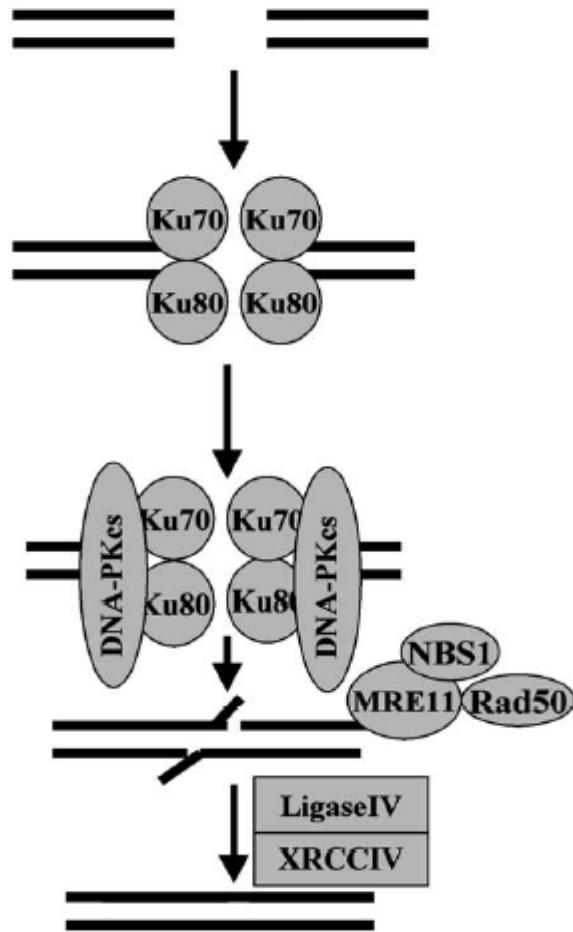


Fig. 1. Repair of a DSB by NHEJ. Ku heterodimers bind free DNA ends and recruit DNA-PKcs. DNA ends are unwound and processed possibly by the Rad50-MRE11-Nbs1 complex. Processed DNA ends are subsequently ligated by the DNA ligase IV/XRCCIV complex.

Fremgangsmåte og metoder

Fremgangsmåte for preparering av testikkelceller fra mus.

1. Musene ble avlivet med eter
2. Testiklene ble dissekert ut og vasket i ca 25 ml RPMI medium uten serum (RPMI 1640 tilsatt 0,1 mg/ml pyruvat (50,5 mg pyruvat/505mL), 5mM DL-Laktat (214,6ul laktat) og 1 % P/S (5ml))
3. Kapselen rundt testiklene ble fjernet og de ble overført til 5 ml kaldt RPMI- medium tilsatt 100 U/ml collagenase (7.0 mg/25 ml medium)
4. Testikkelvevet ble klippet opp med saks til en suspensjon og resultatet overført til et tellerglass. Suspensjonen ble innkubert i 15 min i vannbad med risting ved 104 rpm, 32°C. Den ble ristet manuelt hvert 5 min. Lokket ble holdt åpent for å gi luft.
5. 0,25 mg/ml trypsin ble tilsatt suspensjonen og den ble videre innkubert i 8 min.
6. Suspensjonen ble filtrert og skylt med romtemperert RPMI/10 % FCS (RPMI1640 tilsatt 1 mg/ml pyruvat (55,5mg pyruvat til 555ml) 5 mM DL-laktat (235,9ul laktat), 1 % P/S (5.55ml) og 10 % FCS (55.5 ml FCS)) før avkjøling gjennom små filtre for musetestis for å fjerne større tubulifragmenter/sperm. Suspensjonen ble overført til falconrør på is som ble fylt helt opp med RPMI /10 % FCS.
7. Suspensjonen ble sentrifugert ved 1200 rpm, 5 min (4C)
8. Cellene ble vasket og sentrifugert x 3 med RPMI/ 10 % FCS, løst i 2-10 ml medium og filtrert gjennom et fint nylonnett
9. Levende/døde celler ble telt (etter farging med tryptofanblått) og cellene ble tynnet ut til ønsket konsentrasjon.

Fargingen av celler med tryptofanblått viste at viabiliteten til cellene i vår suspensjon var rundt 90 %. Dette er tilfredsstillende for å kunne jobbe videre med suspensjonen. Tilsvarende tall er det å finne i tidligere utførte forsøk

Flowcytometri (væskestrømscytometri)

Flowcytometri er en metode for karakterisering eller separering av celler mht størrelse og indre struktur.

Denne metoden baserer seg på målinger på enkeltceller en væskestrøm mens de passerer en lyskilde med en hastighet av mange tusen celler per sekund.

Cellesuspensjonen strømmer igjennom en dyse sammen med en saltholdig føringsvæske som leder cellene enkeltvis gjennom fokus til en laserstråle eller til lysstråle fra en kvikksølvlampe

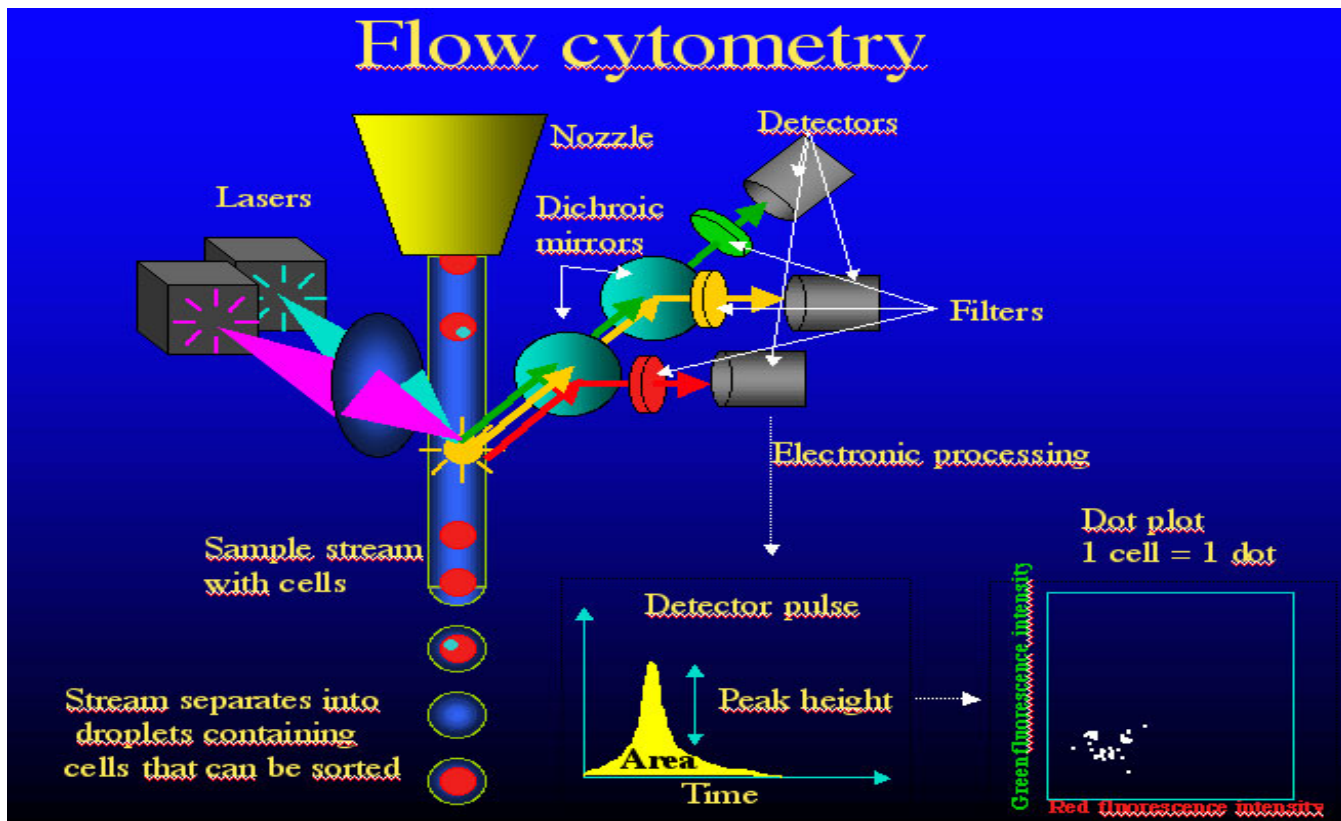
Det vanligste er å merke de cellekomponenter man ønsker å analysere med et fluorescerende fargestoff som binder seg kvantitativt til makromolekyler som DNA, RNA eller protein, eller

Er bundet til et spesifikt antistoff rettet mot molekyler i cellen.

Når eksitasjonslyset treffer den fluorescensmerkede cellen, vil fluorokromet emittere en lyspuls med en bølgelengde noe lengre enn eksitasjonsbølgelengden. Styrken på denne lyspulsen vil være proporsjonal med mengde bundne fluorescerende molekyler, og dermed gi

Et mål for mengden av cellekomponenter man ønsker å måle. Lyspulsen som fluorokromene sender ut, oppfanges av et linse- og filtersystem som leder til detektorer som overfører dataene til lagrings og prosessorenhet.

I tillegg til fluorescerende lys kan også lysspredning måles. Spredning i forlengelsesretning til eksitasjonslys (lavvinkel lysspredning), reflekterer størrelsen til celler, mens spredning til siden (høyvinkel lysspredning) reflekterer cellenes indre struktur.



Analyse og karakterisering av spermatogoniske celler ved hjelp av flowcytometri:

I vår studie av DNA skader og reparasjon er det hensiktsmessig å kunne identifisere forskjellige celletyper for å kunne bestemme om enkelte celletyper har forskjellig følsomhet.

Testikkelstruktur

Testikler er dekket av en fibrøs kapsel og bindevev. Mengde av bindevev varierer fra art til art. Røtter og mus har lite av det intertubulære bindevev mens hos mennesker er testikler avgrenset av bindevevs septum.

Testikler har to hovedområder: interstitielt område og sædkanaler.

Interstitielt område består av blod og lymfe kar og flere andre celletyper som f eks Leydige celler som er hoved-kilden til testosteron og makrofager

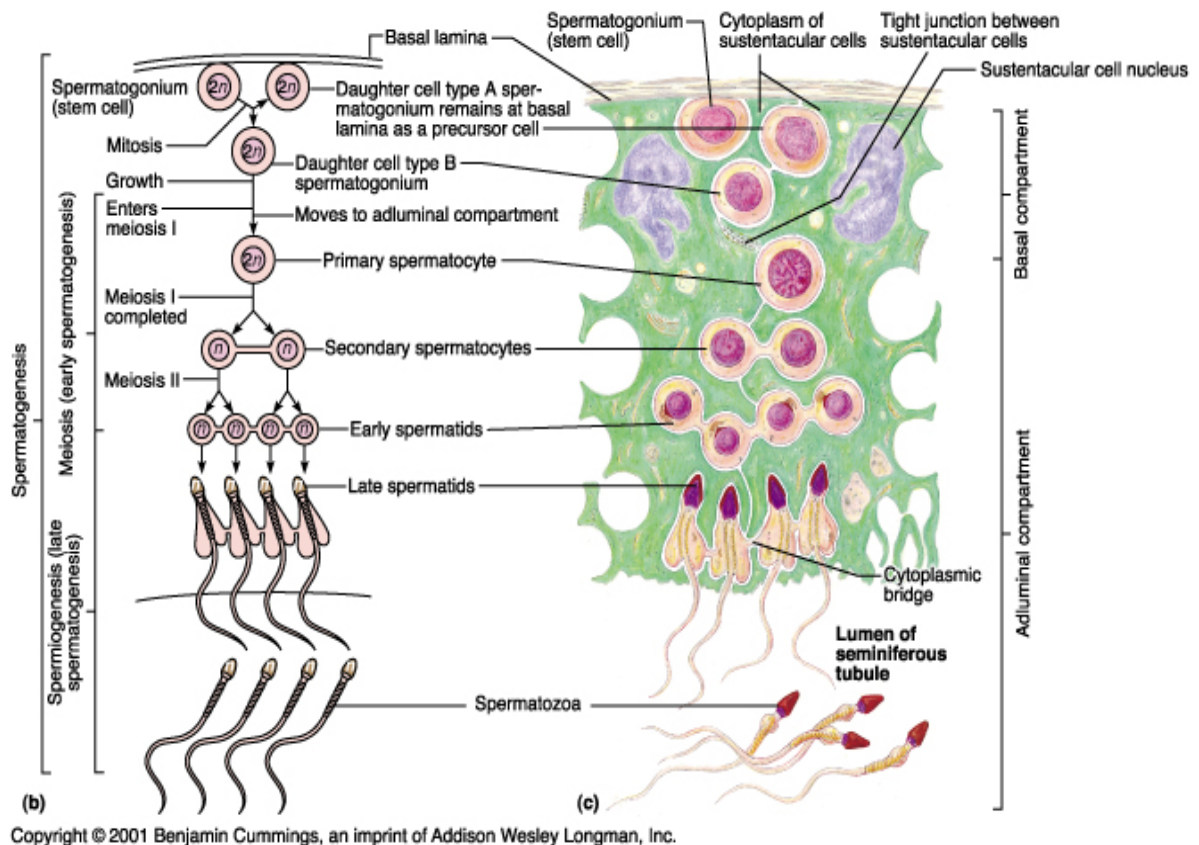
Sædkanaler er ordnet i sløyfer som har endene forbundet med begynnelsen av utførende kanal system av rette tubuli (tubuli recti)

Prosess hvor spermatogonia danner spermatozoa er kjent som spermatogenese.

Spermatogenese skjer i sædkanalene som inneholder både spermatogene celler og Sertoli celler.

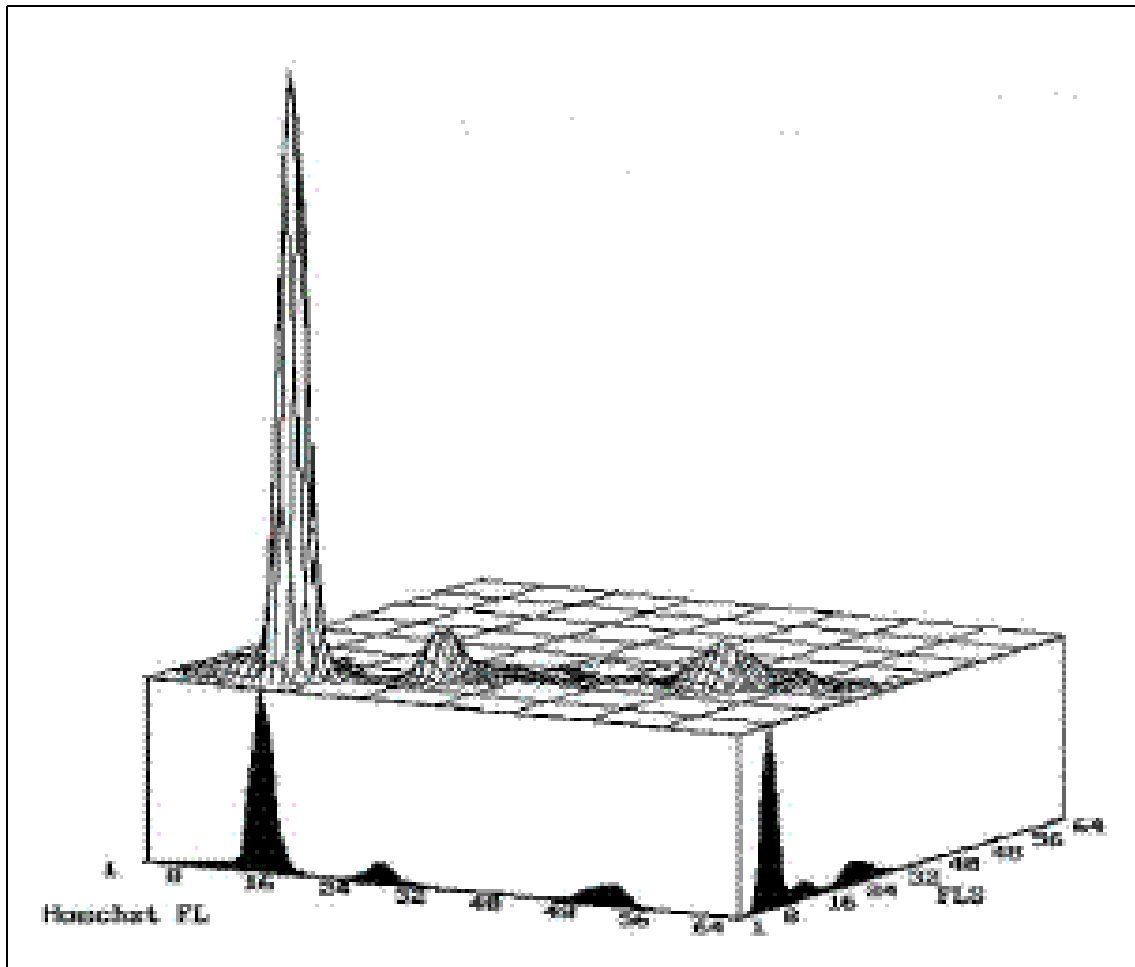
Utvikling skjer i 3 hovedfaser: spermatogonial multiplikasjon (spermatogonia),

meiose (spermatocyt), og spermiogenese (spermatider)

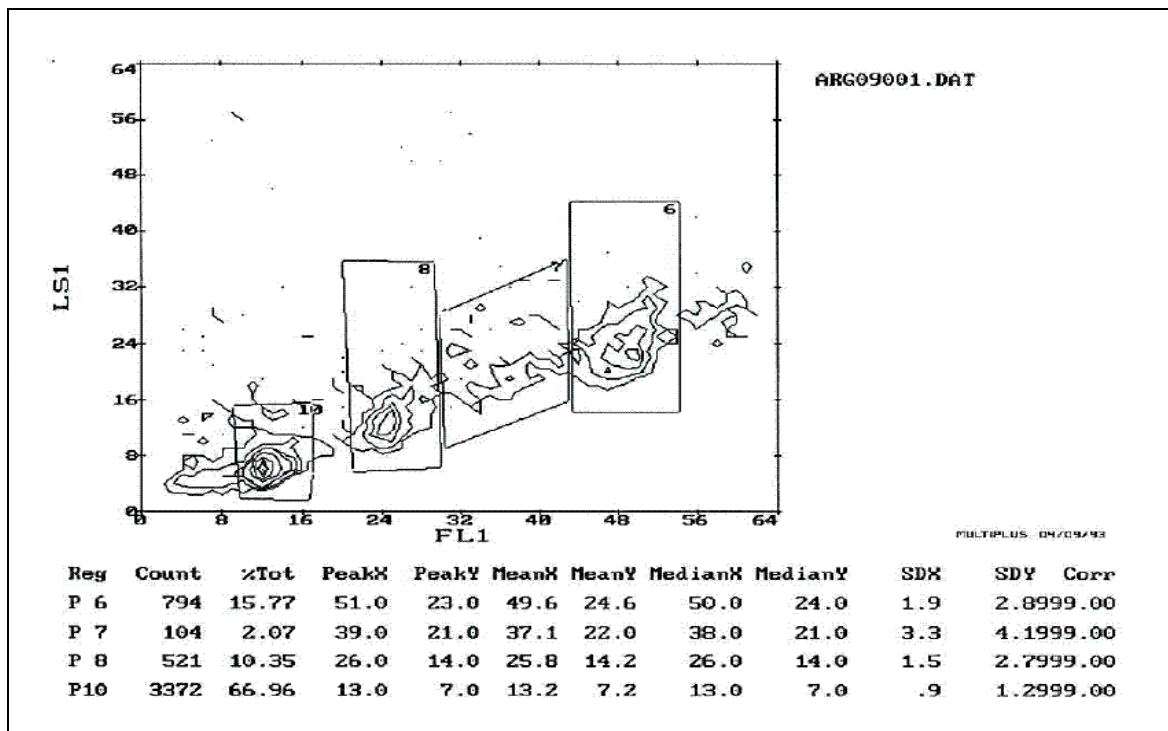


De forskjellige stadier kan bl. gjenkjennes v.h.a. flowcytometri.
 Isolert celleduspensjon var justert til ca. 1-2 millioner celler per ml.
 100 μ l/ml av celleduspensjon ble behandlet med:
 0,03 % Triton X 100 og farget med Hoechst 33258, et DNA spesifikt fluorokrom
 Blå fluorescens fra Hoechst ble målt ved 550 nm i flowcytometer

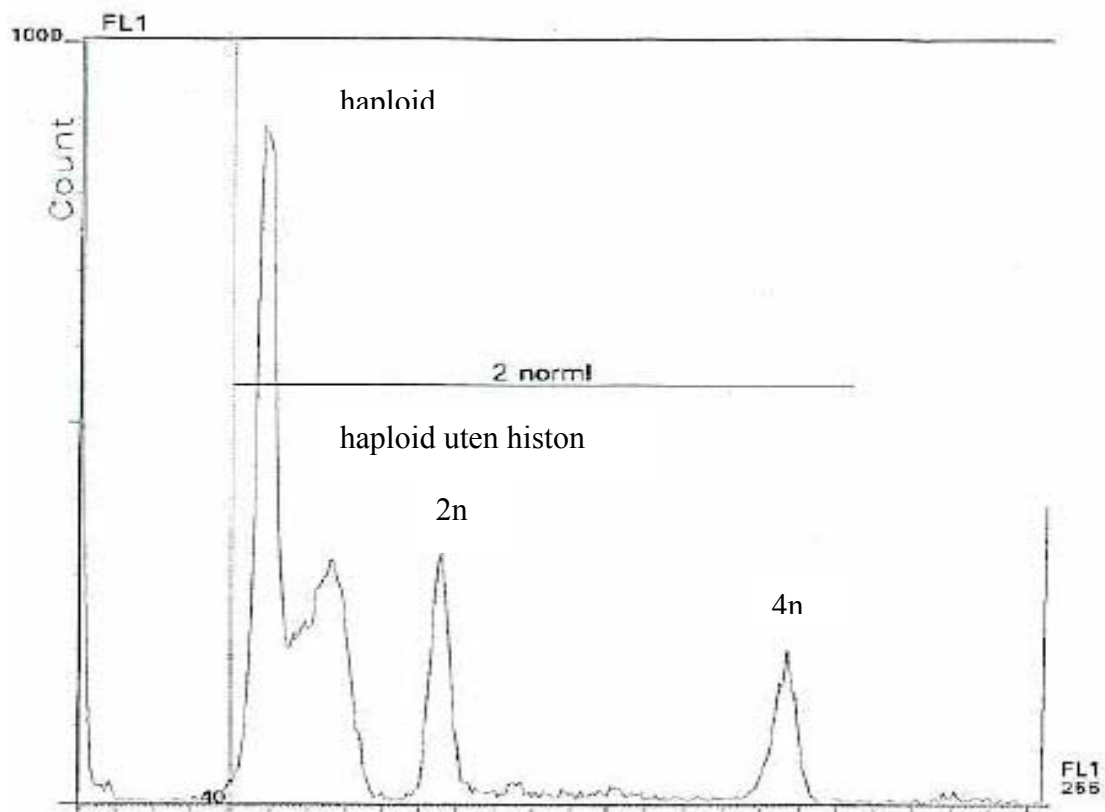
Resultater fra flowcytometri analyse av vår celleduspensjon:



Grafisk fremstilling av flowcytometri analysen



Grafisk fremstilling av flowcytometri analyse sett fra vertikal plan



En dimensjonal fremstilling av analysen

Grafen over fremstiller innhold og fordeling av de forskjellige cellene i vår suspensjon.

Vi kan se fire forskjellige grupperinger av celler som hver er i forskjellige stadier i spermatogenesisen.

Cellenes totale fluorescens står i forhold til deres DNA-mengde dvs. ploiditet

Vi ser en gruppering av celler med $2n$ altså diploide celler som er i G1 fasen. Disse har ikke begynt å dele seg.

Toppen $4n$ viser tetraploide celler som er under deling.

Det er en stor topp som representerer de haploide spermatide cellene som dannes etter meiosen. Etter hvert som cellene modner og spermier dannes (etter ca 10 dager) pakkes DNA tettere og uten histoner. Dette gir viser den mindre toppen ved haploide celler.

Bestråling av musetestikkelceller

I dette forsøket ble UV-C lys og røntgen stråling brukt som mutagener.

Cellene ble justert til 1 million pr ml (fra ca 55 millioner pr ml) i kaldt RPMI- medium og fordelt på 8 små bakterieskåler, 2ml pr skål. Skålene ble holdt kalde, på kald aluminiumsplate

		BEHANDLING AV CELLEN	REPARASJON	ENZYM
1	A	0 UV	Kaldt (4 °C) (ingen reparasjon).	60 mg/ml T4 endo V
2				
3	B			
4				
5	C	0,5 J/m ² UVC	Kaldt (4 °C)	Ikke behandlet med enzym
6				
7	D			
8				
9	E	0 røntgen	Kaldt (4 °C)	Ikke behandlet med enzym
10				
11	F			
12				
13	G	5 Gy	Kaldt (4 °C)	Ikke behandlet med enzym
14				
15	H			
16				

Komet metoden (enkeltcelle gelelektroforese)

Dette er en rask, enkel, følsom og visuell teknikk til å måle enkelttrådbrudd. Metoden kan benyttes til å undersøke DNA-skade og reparasjon.

Metoden går ut på at celler støpes inn i en liten tynn gel etter at de har vært behandlet (bestrålt/repairert). De lyseres så i gelen, endogene proteiner vaskes ut, DNA gjøres enkelttrådig ved å legge gelen i en buffer med høy pH (pH 13,2), og deretter elektroforeres gelene i kort tid ved en lav voltstyrke. Så nøytraliseres gelen, og den farges med ethidiumbromid, som farger DNA og gjør det synlig i et fluorescensmikroskop. Dersom DNA har trådbrudd, vil DNA relakseres, og ”sløyfer” vil bli dradd ut fra kjerneområdet ved elektroforese og danne en kometlignende struktur (derav navnet). Denne er lett synlig i mikroskopet.

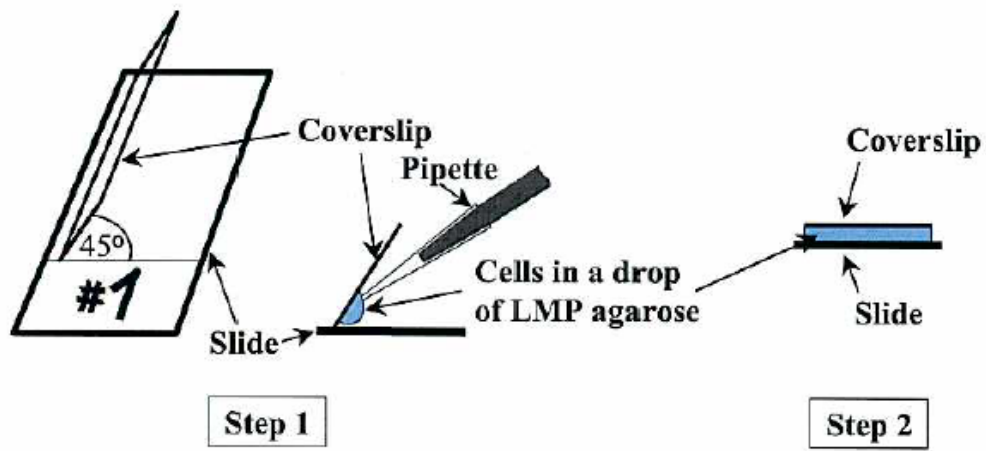


Fig. Montering av celler på et slide

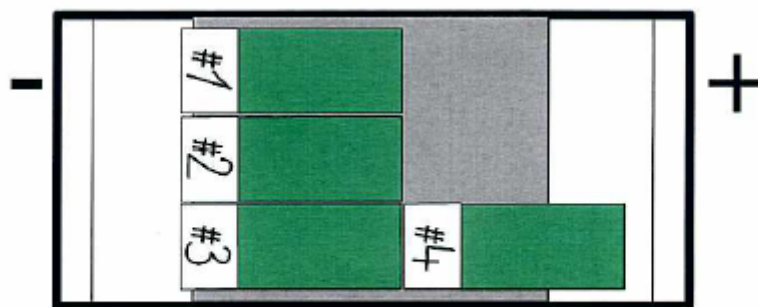
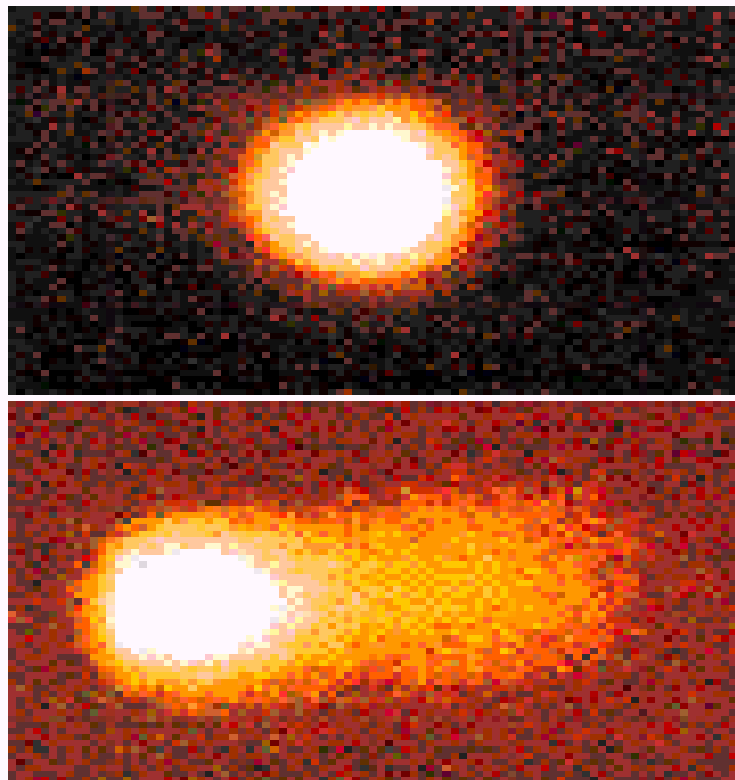


Fig. Elektroforesekammer



**Celler visualisert v.h.a komet metoden.
Øver cellen uten DNA skade, under cellen med DNA skade**

Halens lengde og mengden DNA i den gir et produkt som kalles "halemoment" (Tail Moment", TM). TM kan beregnes av et bildebehandlingsprogram koplet til et CCD- kamera på mikroskopet. TM er lineært korrelert med antall DNA trådbrudd (så lenge skadenivået ikke er alt for høyt). Systemet kan kalibreres med røntgen, siden man kjenner til antallet DNA-trådbrudd i en diploid celle etter en viss stråledose (1 Gy røntgen gir ca. 1000 DNA enkeltrådbrudd per diploid humane celle). Metoden kan modifiseres til å måle DNA-skader som ikke direkte fører til DNA trådbrudd. Dette foregår ved at man *etter* lysering innkuberer gelene i nærvær av et eksogent enzym

som gjenkjenner spesifikke skadetyper og konverterer dem til DNA enkelttrådbrudd, som påvises som kometer.

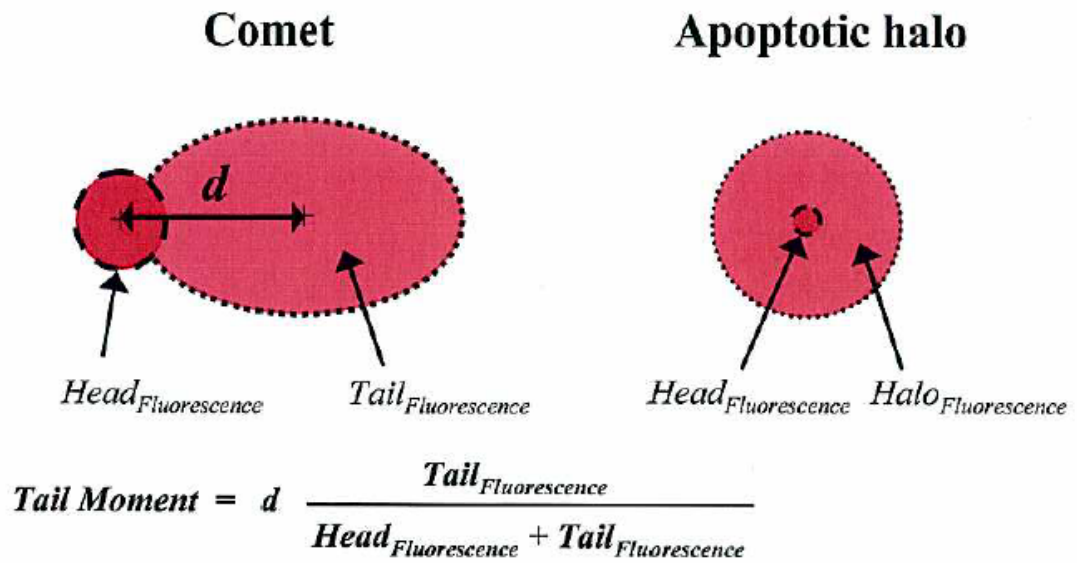
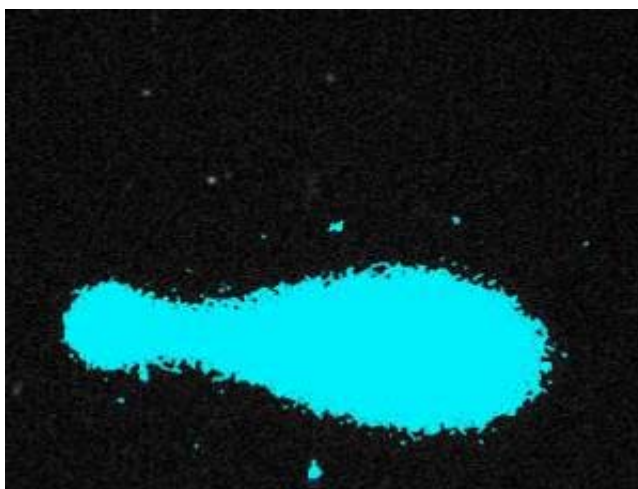
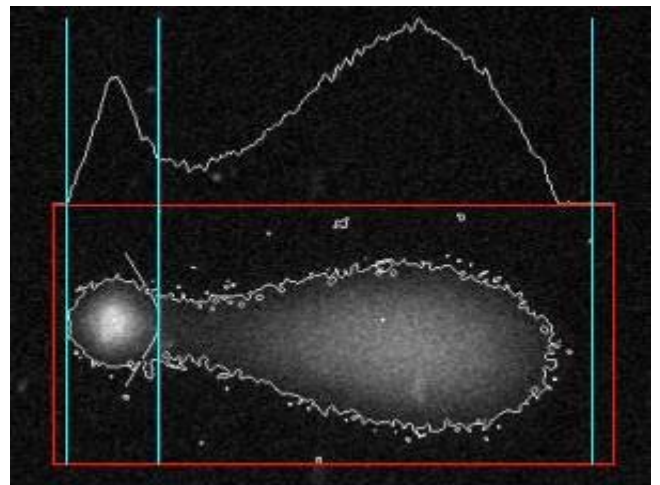


Fig. Kvantifisering av DNA skade i enkelt celle



Feil!



Kometmetoden har en spesiell verdi ved analyse av spermatogene celler, fordi de forskjellige stadiene i spermatogenesis har celler av spesifikk ploidditet (spermatogonier: 2N (unntatt i S-fase); premeiotiske celler (spermatocytter) 4N, postmeiotiske celler: 1N (etter annen meiotiske deling). Cellenes totale fluorescens står i forhold til deres DNA-mengde dvs. ploidditet. Dermed kan man identifisere DNA-mengden for hver enkelt celle, slik at det blir mulig å analysere induksjon og reparasjon av DNA-skader spesifikt i celler i forskjellige stadier i spermatogenesis, selv i en blandet populasjon av testikkelceller.

Framgangsmåte, komet

Alt ble utført så mørkt som mulig fordi kortbølget lys vil skade DNA

1. 1 % agaroseløsning (normalt smeltepunkt) ble smeltet og holdt varm i vannbad (56C) og 100 µl løsning ble brukt til å støpe et underlag på et mattet objektglass (16 stk pr eksperiment) Dekkglass behandlet med Nonidetløsning ble plassert på toppen. Etter støping ble objektglassene plassert i kjøleskap (4 C, 10 min) for at agarosen skulle stivne.
2. Innstøping av celler på objektglass: 10 µl celler (8×10^6 celler/ml) ble overført til eppendorfrør som inneholdt 75 µl 0,7 % agaroseløsning (lavt smeltepunkt) ved 37C. 75 µl av disse blandingene ble brukt til å støpe inn cellene i geler på objektglassene med Nonidetbehandlede dekkglass på toppen. De ble deretter avkjølt (4C) i 10 min.
3. Lysering: Cellene ble lysert ved å plassere objektglassene i et kar med lyseringsvæske i 1 time (4C) etter at dekkglassene var fjernet.
4. Vasking med Collinsbuffer: Objektglassene ble plassert i et kar med ca 200 ml Collinsbuffer i 10 min (4C) Dette ble gjentatt 2 ganger. Prøvene ble vasket for å fjerne rester av lyseringsvæsken og dermed klargjøre for enzymbehandlingen.
5. Enzym-behandling: Cellene ble behandlet med enzym ved at objektglassene ble plassert i kar med Collinsbuffer (200ml) tilsatt BSA (0,2mg/ml) som var varmet opp på forhånd til 37C. Enzym (0,7µg/ul Fpg) ble tilsatt denne løsningen umiddelbart før enzymbehandlingen og deretter innkubert ved 37 C i 30 min. Fpg gjenkjenner og lager tråddrudd der DNA skadene som ble påført cellene ved eksponering for lys er.
6. Unwinding: Objektglassene ble plassert i et kar med elektroforesebuffer (pH13,2) i 40 min (4C) slik at DNA kunne vikles ut.
7. Elektroforese: Objektglassene ble plassert tett inntil hverandre i et elektroforesekar. Karet ble fylt opp med kald elektroforesebuffer til objektglassene var fullstendig dekket, og elektroforesen ble utført ved 20 V og ~300mA i 20 min.

8. Nøytralisering: Etter elektroforesen ble objektglassene nøytralisert ved å skylle 3 ganger med nøytraliseringsbuffer.

9. Farging: Gelene ble farget med 75 ul EtBr (20 µg/ml) og dekkglass ble lagt på

10. Kvantifisering av DNA skade: Kometene ble visualisert med et Leitz fluorecensmikroskop koblet til et CCD kamera og et bildeanalyseprogram. Kometer fra objektglassene ble analysert.

Resultater fra komet analysen av vår cellesuspensjon

Analyse av våre preparater viste svært få kometer, og mange celler var fragmentert. Dette var uheldig med hensyn til statistisk signifikans.

For få målbare kometer gjør det vanskelig å kunne vurdere resultatene, og å trekke en konklusjon. For å kunne gjøre dette er det vanlig med måling av minst 50 kometer per slide.

Årsaker at preparatene ga få kometer, skyldes trolig feilbehandling av celler under prosedyren.

For hardhendt behandling av celler under støping i agarosen kunne forårsake fragmentering.

Siden rådata fra vår suspensjon uteble benyttet vi oss av data fra tidligere forsøk, for å illustrere prinsippene bak slike forsøk.

Følgende tall kommer fra forsøk utført på kjønnseller fra rotter.

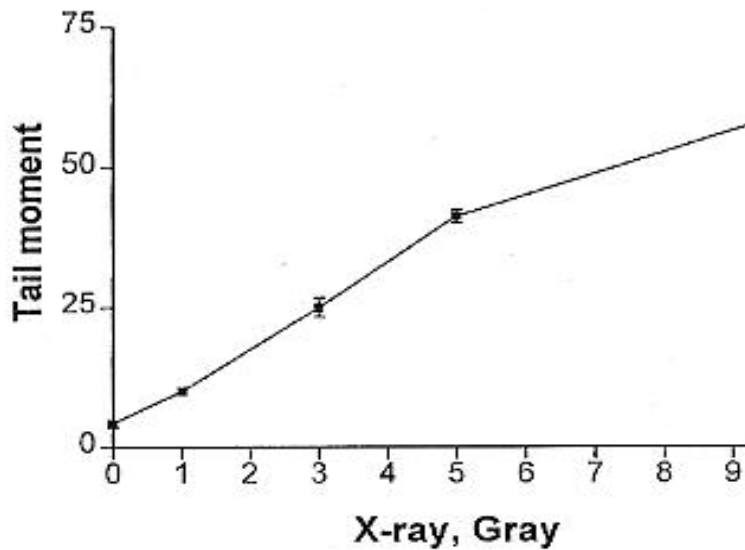
Ut fra tidligere publiserte data å dømme forventer vi å finne tilsvarende tall for mus som for rotter

Tabell nedenfor viser tail moment til prøvene behandlet med forskjellig doser av røntgen stråling

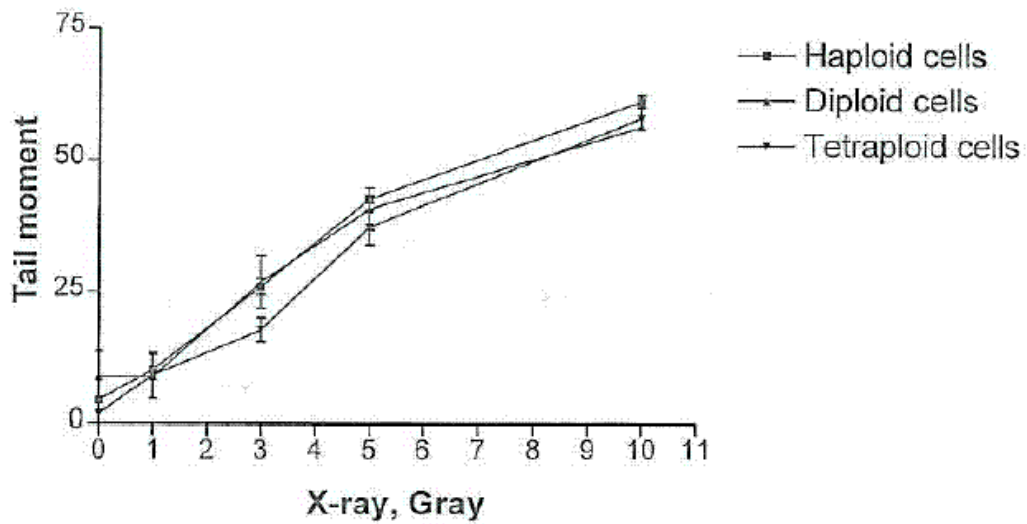
Prøve #	Behandling Røntgen / Gray	Middelerdi	Tail moment
1	0		3,59 +/- 7,29

2	0	4,31	5,69 +/- 10,55
3	0		3,66 +/- 5,85
4	1		10,45 +/- 12,29
5	1	10,11	10,17 +/- 13,17
6	1		9,70 +/- 10,16
7	3		22,70 +/- 12,85
8	3	25,01	21,59 +/- 11,91
9	3		27,45 +/- 13,71
10	3		28,30 +/- 13,45
11	5		42,81 +/- 13,66
12	5	41,34	42,22 +/- 15,66
13	5		39,0 +/- 14,64
14	10		60,56 +/- 14,30
15	10	60,26	61,9 +/- 11,27
16	10		58,32 +/- 13,74

1 **Dose-respons kurve for testikkel rotte celler etter bestråling med røntgen**

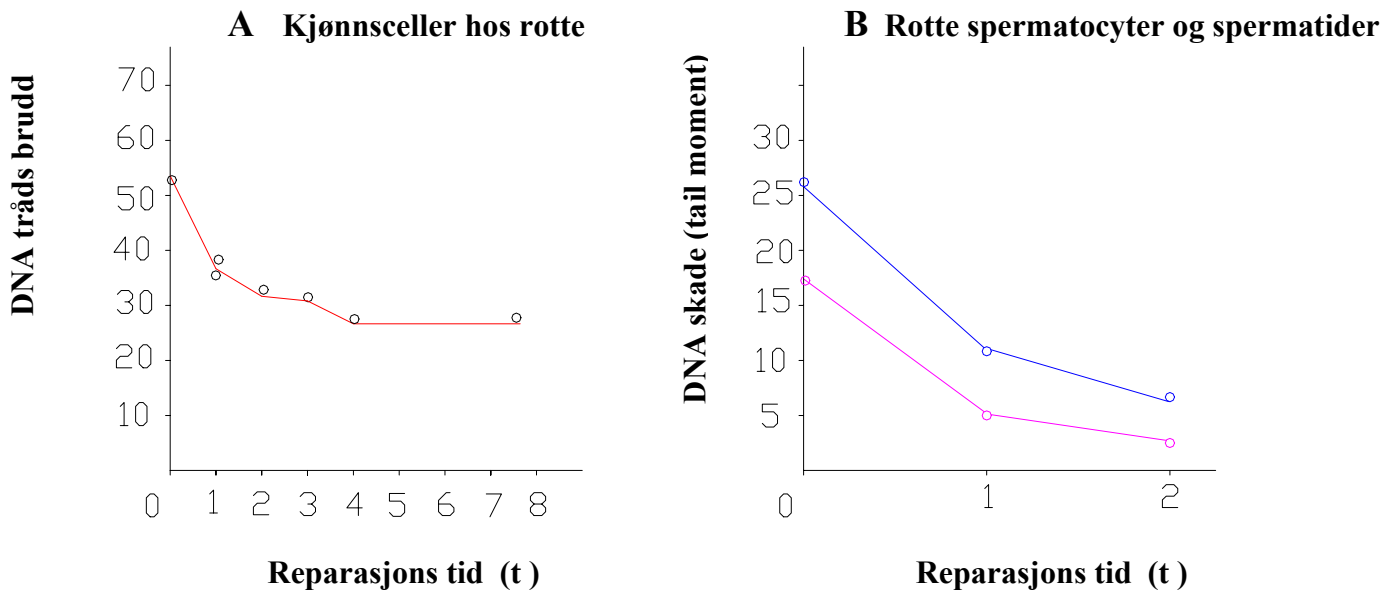


Induksjon av DNA skader i forskjellige kjønns celler fra rotte v.h.a. røntgen stråling



Doserespons kurven overfor viser økende grad av DNA skader med økende dose stråling, som forventet.

Men av den andre grafen kan vi se at skader kan variere noe mellom de forskjellige stadiene i spermatogenesisen.



Ut fra grafene over ser vi at tail moment blir mindre det vil si at cellene har fått tid til å reparere skader. Det kommer også frem at forskjellige type celler har forskjellige grad av skader og reparasjon.

Diskusjon

Reparasjon av DNA skadene viser seg å variere avhengig av cellestadiet og type mekanisme involvert i reparasjon.

I tidligere studier kom det frem at isolerte kjønnsceller viste lav nivå av utkutting av UV-C induerte DNA skader. Disse data tydet på at NER i kjønnsceller var ikke funksjonell eller veldig lav.

Dette kan ha forbindelse med kromatinstruktur til DNA i de forskjellige stadiene og subcellulær lokalisering av proteiner.

Siden disse studiene viste at NER ikke er aktiv i spermatogene celler reparasjon av skader kan reflektere andre DNA reparasjons mekanismer som rekombinasjons reparasjon og BER.

Det er blitt vist at det finnes en del enzymer involvert i BER i høye mengder i mannlige kjønnsceller hos rotter og at celler kan utføre BER.

Ved lignende forsøk ble det vist at kjønnsceller hos rotter effektivt reparerte

Fpg* – sensitive skader. Reparasjon var rask i løpet av to første timer av innkubering. 40% av skadene var fjernet

En interessant observasjon kom ut av parallell studie med de humane kjønnsceller. Den humane spermatogenesisen hos mennesker er 3.1 ganger mer følsom for ionisert stråling enn den hos mus. Reparasjon i disse celler var begrenset.

Disse typer studier er viktige del av gentoksikologisk forskning. På grunn av de er det mulig å få informasjon om hvor store skader visse agenter kan gjøre, hvor flink forskjellige celler er

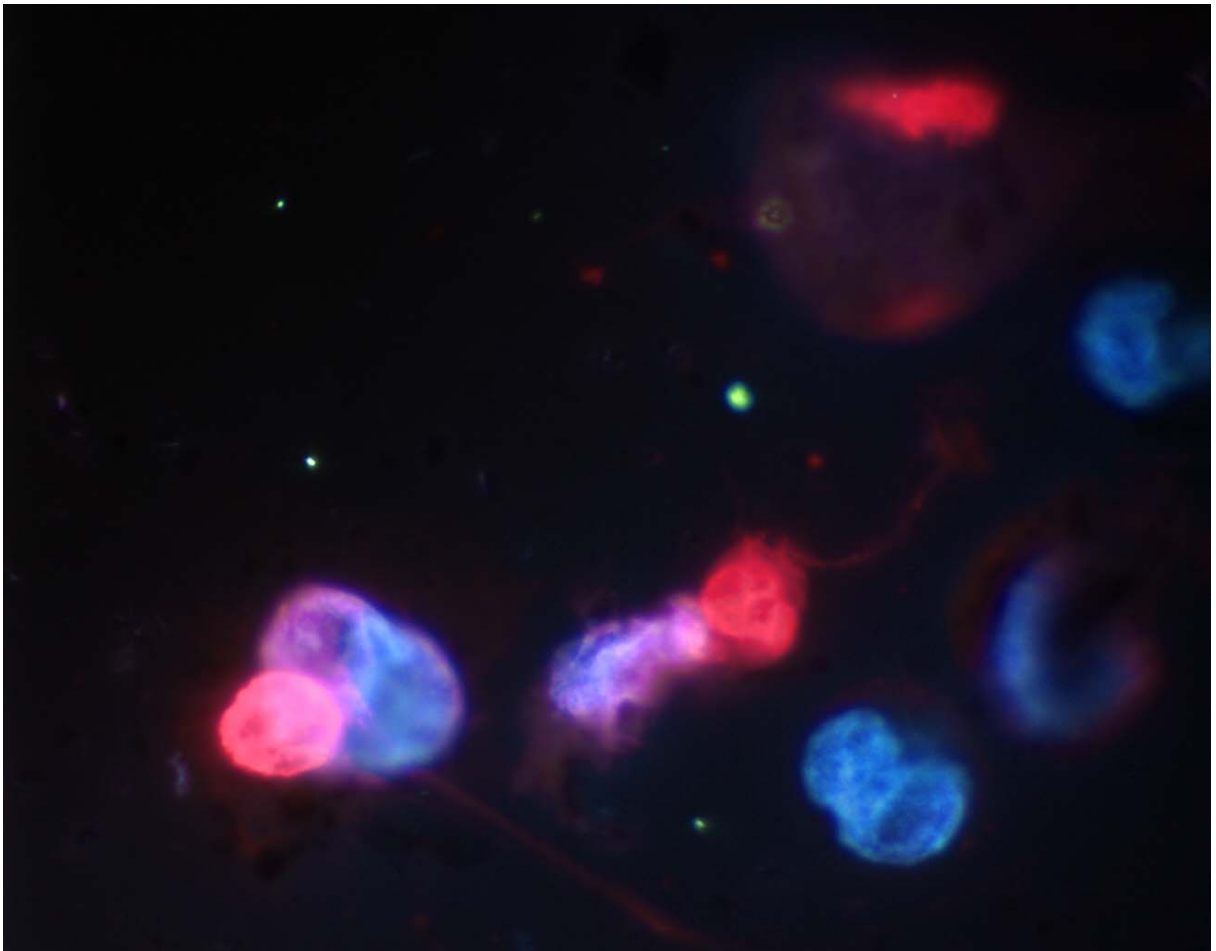
til å takle slike skader og hvordan visse cellulære mekanismer virker i forskjellige stadier.

Dette er viktig bl.a. for vurdering av risiko for utsettelse for slike agenter.

* Fpg står for formamidopyrimidin- glykosilase involvert i BER i DNA

Prosjektoppgave i toksikologi våren 2003

”Effekter av svevestøv på cytokinfrigøring fra epiteliale lungeceller”



Utført av Lubna Zaidi og Marianne Aastebøl Minge

**Veiledere: Magne Refsnes, Marit Låg og Tonje Skuland ved
Folkehelseinstituttet**

Innholdsfortegnelse

1. Innledning s. 3

- 1.1 Bakgrunn
- 1.2 Partikkelinduserte reaksjoner
- 1.3 Prosjektets hensikt

2. Materialer og metode s. 9

- 2.1 Min-u-sil, A549 celler, MAP-kinase hemmere
- 2.2 Dyrking av celler
- 2.3 Høsting av medium og celler
- 2.4 Analyse av IL-8 (Elisa)
- 2.5 Preparering av celler til mikroskopi

3. Resultater og diskusjon s. 11

- 3.1 Resultater fra IL-8 konsentrasjonsmåling
- 3.2 Resultater fra celletelling

4. Konklusjon s. 13

5. Referanseliste s. 14

Vedlegg: Beskrivelse av Elisa-prosedyre

1. Innledning

1.1 Bakgrunn

Inhalering av svevestøv har vært og er et problem som kan gi alvorlige helseplager i luftveiene, og som i tillegg ofte gir en forverring hos dem som allerede har utviklet luftveisplager som for eksempel astma. I urbane områder bidrar blant annet trafikk, olje- og vedfyring og industrielle utslipp til luftforurensning.

Den utstrakte bruken av piggdekk i Norge fører til en mekanisk generering av mineralpartikler fra asfalten. Enkelte dager, spesielt i vinterhalvåret, kan svevestøvmengdene i Oslo være langt høyere enn det Folkehelseinstituttet betrakter som akseptabelt, og dette utgjør en potensiell trussel mot lokalbefolkningens helse. Det er stadig flere studier som viser at svevestøv potensielt kroniske inflammatoriske prosesser og akutte symptomatiske responser i luftveiene. Luftveiene er dekket av epitelceller, slik at disse blir kroppens første sted for kontakt med inhalerte toksiske substanser. Lungens forsvarsmekanismer vil vanligvis takle et stort antall partikler på overflaten, men en overdose av partikler eller økt partikkeltoksisitet kan forstyrre og ødelegge disse mekanismene. Det er særlig grupper som eldre, barn og mennesker med allerede utviklet hjerte-lunge sykdommer som har høy risiko for å bli skadet av høy partikkelkonsentrasjon i innåndingsluften. En del av svevestøvet består av mineralpartikler, og målinger har vist at det ofte er mineralpartikler som står for hoveddelen av svevestøvet de dagene verdiene overstiger det akseptable nivået i vinterhalvåret. Avhengig av hvilken type stein som er brukt i asfalten, vil mineralpartiklene som genereres kunne være ulike når det gjelder potensen til å inducere negative helseeffekter. Dette kan skyldes ulikheter i mineral- og

kjemisk sammensetning, størrelse og form. Det er derfor viktig å finne ut en mineralsammensetning i asfalt som gir minst mulig helseskade når partiklene frigjøres.

Effekter av svevestøv:

- Betennelsesreaksjoner
- Allergi
- Celledød
- Mutasjoner
- Endret cellevekst

Viktige endepunkter ved studie av partikkeleffekter:

Betennelse:

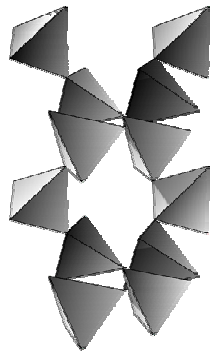
- Sentralt ved svevestøveksponering
- Involvert i utviklingen av en rekke kroniske og akutte lungesykdommer
- Produksjon og utskillelse av en rekke cytokiner og eikosanider
- Akkumulering av betennelsesceller

Celledød:

- Apoptose og nekrose
- Viktig ved lungesykdommer utløst av høye konsentrasjoner av partikler og andre luftforurensningskomponenter

1.2 Partikkelinduserte reaksjoner

I vårt prosjekt har vi utsatt lungeepitelceller for krystallisk kvarts, som kan være en bestanddel i svevestøv. Kvarts er et silikat som består av silisium og oksygen. Hvert silisiumatom er bundet til fire oksygenatomer, og hvert oksygenatom er bundet til to silisiumatomer i et tredimensjonelt gitter. Kvarts kan opptre i ulike former, den krystallinske formen kalles silika.



Silika

Kvarts er et sterkt mineral som finnes over hele jorden og forekommer i granitter og gneiser, i

sedimentære bergarter og i sand. Uren kvarts er kvarts fra sand og er et viktig råstoff i glass- og keramikkindustrien. Uren kvarts brukes også som slipemiddel som for eksempel sandpapir.

Studier har vist at krystallinsk kvarts har høyere biologisk aktivitet enn ikke-krystallinsk kvarts. Dette indikerer at krystallinitet er en viktig faktor når det gjelder skadelighet. Størrelse og form bestemmer overflatearealet av en partikkel. Små partikler har et større reaktivt overflateareal per masseenheter, og vil derfor gi mer skade pr. masseenheter sammenlignet med større partikler. Mekanismene for hvordan partikler utløser sine cellulære effekter er relativt lite kjent. Partikkelinduserte cellulære responser kan muligens følge av opptak i cellene, men mye tyder på at en direkte interaksjon mellom mineraloverflaten og reseptorer eller andre komponenter i cellemembranen kan være tilstrekkelig.

Partikler induserer kinaseaktivering og aktivering av transkripsjonsfaktorer, blant annet MAP-kinaser som er nøkkelkomponenter i en rekke intracellulære reaksjonsveier og er involvert i mange stressaktiverte responser. MAP-kinaser aktiveres av ulike ekstracellulære stimuli, og aktiverer en rekke transkripsjonsfaktorer ved hjelp av fosforylering.

Inflammasjon kan skyldes stimuli som for eksempel infeksjon, vevsskade eller autoimmune responser. Reaksjonen er en forsvarsrespons mot celle- og vevsskade, og formålet med de inflammatoriske prosessene er å ødelegge eller fjerne skadelige komponenter og skadet vev. På stedet der vevsskaden har funnet sted, vil en serie av inflammatoriske responser settes i

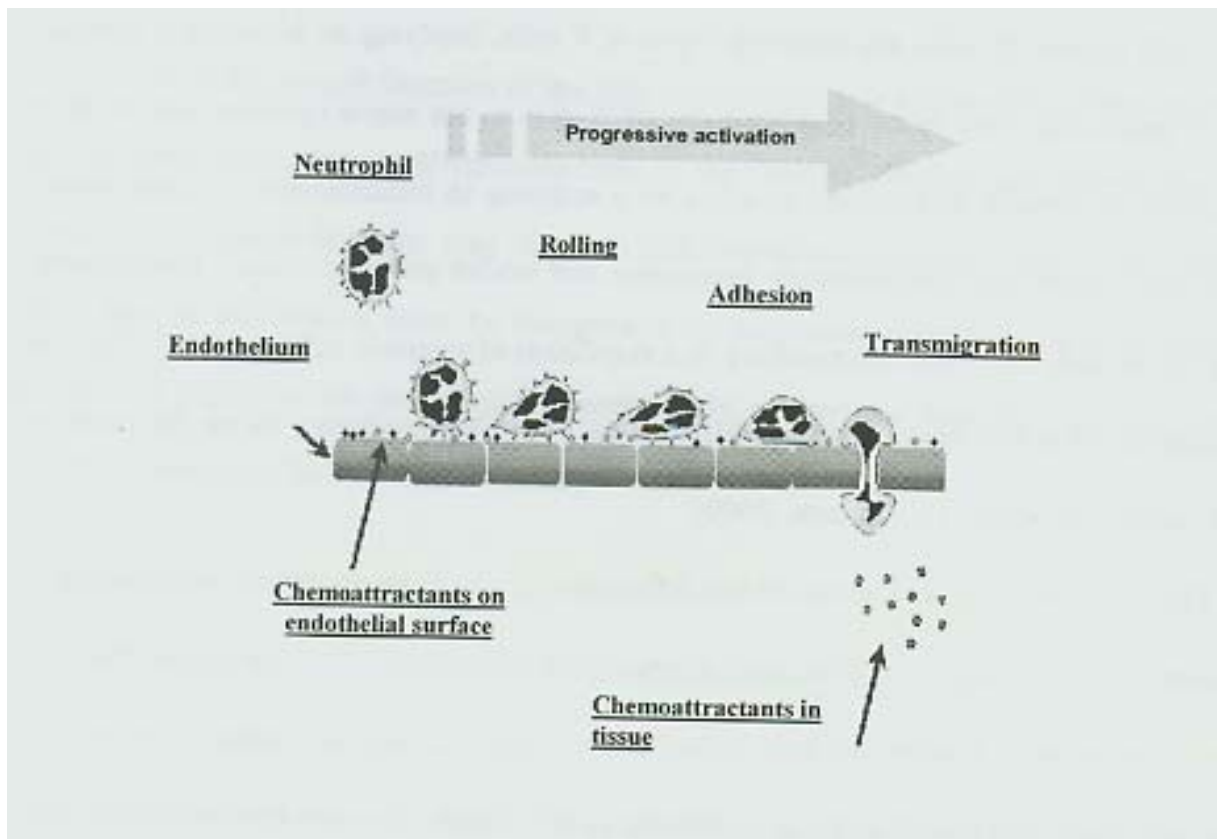
gang for å lokalisere og begrense spredningen av den skadelige påvirkningen. De inflammatoriske responsene kan settes i gang av for eksempel bakterier, parasitter og andre fremmede partikler. Inflammasjon kan defineres som en lokal reaksjon som fører til oppsamling av væske og akkumulering av betennelsesceller. Rekruttering av leukocytter er en viktig del av forsvarsmekanismene hos verten. Denne mekanismen kjennetegner både akutt og kronisk inflammatorisk respons, og avhenger av adhesjonsmolekyler og kjemotaktiske faktorer.

I situasjoner med kontinuerlig frigjøring av inflammatoriske responsprodukter i lungene kan resultatet bli vevsskade og reparasjon av vevet med etterfølgende fibrose. Fibrose gir fortykkede alveolevegger og dermed redusert gassutveksling.

Partikkel-indusert aktivering av intracellulære signalveier kan initieres gjennom reseptoravhengig eller reseptoravhengige celledesignaleringskaskader. Cytokiner og andre signalsubstanser medierer den inflammatoriske responsen i lungeceller.

Kjemotaktiske faktorer kalles chemokiner, og alle molekyler i denne gruppen inneholder fire cysteinresiduer som danner to disulfidbroer. En videre inndeling av gruppen baserer seg på den relative posisjonen av disulfidbroene.

I vårt prosjekt har vi sett på chemokinet interleukin-8 (IL-8). IL-8 som produseres transporteres ut av celles og festes til reseptoren GAG. Dette vil tiltrekke neutrofiler til stedet der inflammasjonen finner sted, og det aktiverer videre neutrofiler og andre typer av leukocytter. IL-8 produseres av mange ulike cellyper, blant annet monocytter, neutrofiler og ulike epiteliale lungeceller. Produksjonen av dette chemokinet skjer ikke konstitutivt, men produksjonen induseres som respons på inflammatorisk stimuli. IL-8 aktiverer mange funksjoner hos humane neutrofiler.. Migreringen av neutrofiler fra blodet til inflammasjonsstedet kontrolleres av selektiv "leukocytt-endotelcelle" gjenkjenning. På inflammasjonsstedet vil proteinet selectin føre til at neutrofilene festes til blodåreveggen. Selectin er et adhesjonsmolekyl som finnes på celleoverflaten hos neutrofiler. Denne bindingen mellom neutrofilene og selectin gjør at blodcellene får en "rullebevegelse", og de ruller da i samme retning som blodstrømmen.



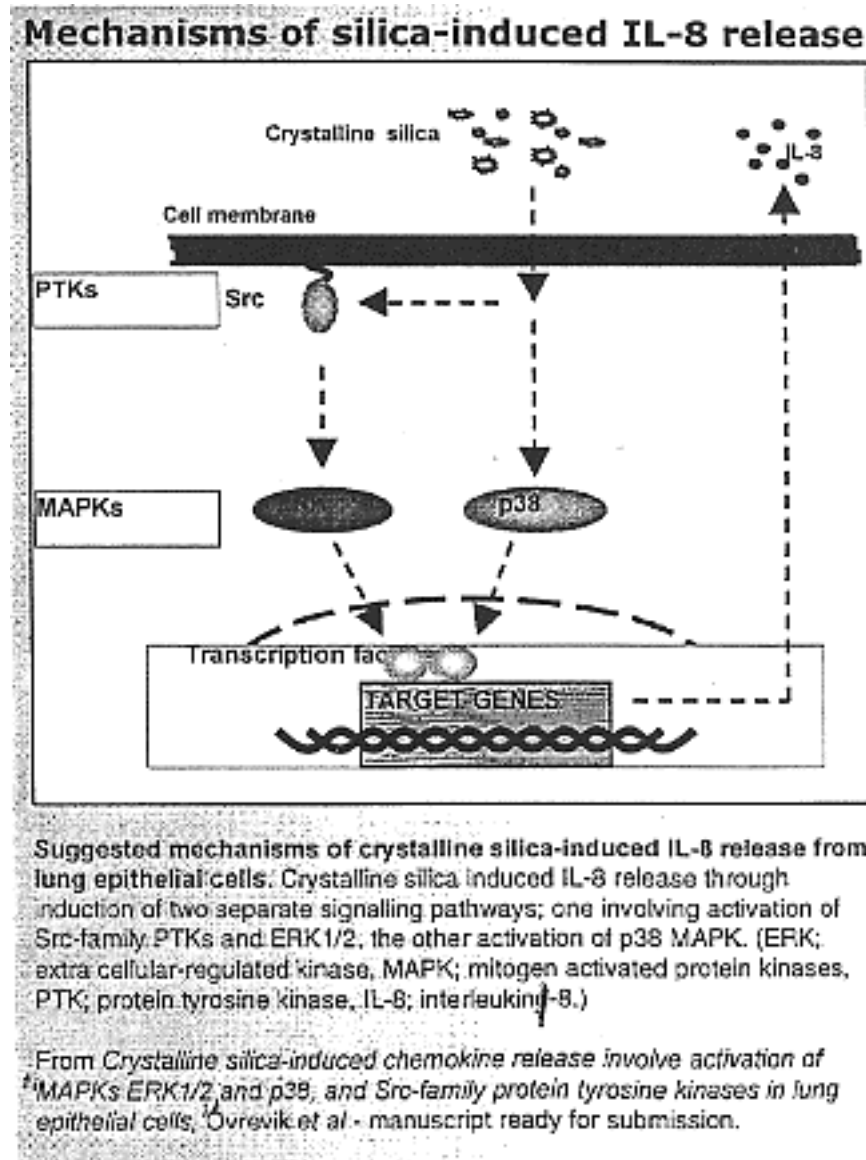
Bilde fra University of Virginia Health System

2001

IL-8 som produseres av endotelcellene vil aktivere disse neutrofilene, og overføre signaler som aktiverer integriner på overflaten av endotelcellene. Dette vil stimulere til et fast feste av neutrofilene til åreveggen og en spredning av neutrofilene på den endoteliale overflaten. Neutrofilene vil deretter gå inn i vevet gjennom åpninger mellom de endoteliale cellene ifølge konsentrasjonsgradienten av IL-8. Når de har nådd inflammasjonsstedet, spiller neutrofilene en viktig rolle i immunforsvaret gjennom ulike mekanismer som blant annet involverer fagocytose av patogener eller andre fremmede partikler og frigjøring av lysosomale enzymer. IL-8 har også effekter på andre typer av leukocytter, som T celler, B celler og IL-2-aktiverte NK celler. Forsøk har vist at IL-8 er ganske resistent mot inaktivering ved hjelp av proteaser, og IL-8 effekten er derfor relativt langvarig.

Flere studier har vist endringer i nivåene av inflammatoriske cytokiner som for eksempel IL-8 etter forsøk med partikkeeksponering. Videre har det vist seg at mitogenaktivert

proteinkinase (MAPK) kaskaden kan være involvert i den økte genekspressjonen i lungeceller etter eksponering for partikler. ERK og p38 er to typer av MAP-kinaser som er involvert i signalveien som fører til cytokin-produksjon etter at en stimulus har utløst en inflammasjonsrespons.



1.3 Prosjektets hensikt

I vårt prosjekt skulle vi utsette epiteliale lungeceller for ulike partikkelkonsentrasjoner av Min-u-sil, et produkt som inneholder kvarts. Deretter skulle vi måle konsentrasjonene av

IL-8 produsert av de partikkelutsatte cellene. IL-8 konsentrasjonen er da et mål på hvor stor inflammatorisk respons partiklene har induisert i cellene.

Vi skulle også se på de partikkelutsatte cellene i mikroskop etter å ha farget dem med en blanding av Hoechst og propidiumjodid. Vi kunne da se hvor stor andel av cellene som hadde gjennomgått nekrose eller apoptose.

Til noen av cellekulturene tilsatte vi også to ulike MAP-kinasehemmere. Vi skulle se om dette påvirket IL-8 produksjonen, ettersom MAP-kinasene kan være viktige i syntesen av cytokiner.

2. Materialer og metode

2.1 Min-u-sil, A549 celler, MAP-kinase hemmere

Vi eksponerte A549 celler med Min-u-sil, et kommersielt produkt som består av naturlig, krystallinsk silika (kvarts). Vi brukte Min-u-sil med en gjennomsnittsstørrelse på under 5 μm i diameter.

A549 celler er en human alveolær cellelinje. De synes å stamme fra type II cellene i lungene. Type II cellene er de sekretoriske cellene i alveolene, og de produserer blant annet surfaktant, en væske bestående av ulike proteiner og lipider som er med på å redusere overflatespenning i alveoler. Vi brukte to typer hemmere i forsøkene. Hemmeren PD98059 er en spesifikk hemmer av MAP-kinasen ERK, mens hemmeren SB202190 hemmer en annen MAP-kinase, p38. Disse MAP-kinasene er svært viktige i signalkaskaden som gir syntese av IL-8.

2.2 Dyrking av celler

For å kunne se hva som skjer når lunger blir eksponert for kvarts, trenger man levende celler. Vi dyrket A549 celler i Ham F12 medium med 10% inaktivert føtal kalveserum og eksponerte med Min-u-sil på følgende måte:

- 1) Skiftet til serumfritt medium
- 2) Tilsatte 50 μM PD98059 og 5 μM SB202190 til cellekulturen
- 3) Partikkeløsningen (5 mg/ml) lages i medium uten serum og settes i ultralydvannbad i 30 min like før tilsetning
- 4) Etter 1 times forbehandling med hemmere ble forskjellige konsentrasjoner med partikler tilsatt. Serum ble tilsatt til kulturene etter ytterlige 1 time. Serum er næring for cellene.

2.3 Høsting av medium og celler

- 1) Tar av 50 μl av mediet og fortynner med PBS, som står for "phosphate buffered saline" og settes på is. Løsningen sentrifugeres ved 1000 rpm i 10 min. Dette vil fjerne døde celler som vil ende opp i bunnen av eppendorfrør som en "pellet"
- 2) Supernatanten tas over i nytt eppendorfrør som sertrifugeres nå på 10000 rpm i 10 min. Dette vil fjerne andre partikler som man ikke er interessert i.
- 3) Supernatanten overføres til 2 andre rør som oppbevares i -70 C .

2.4 Analyse av IL-8 (ELISA)

Metode ELISA blir også kalt "sandwich" metoden, og er en mye brukt metode i cellebiologi. Hensikten med denne metoden er å kunne få målt konsentrasjon til et ønsket protein.

Teori:

ELISA metode går ut på å bruke antistoffer spesifikt for ønsket protein, i vår tilfelle IL-8. For å få antistoffer, brukes kanin/mus. De infiseres med det antigenet man vet vil gi en immunologisk reaksjon der dyret vil danne ønsket antistoff.

Man har to typer antistoffer i denne metoden, "capture antibody" og "detection antibody". Man fester en markør, streptavidin HRP" til "detection antibody". "Streptavidin-HRP" vil avgi en blå farge når man tilsetter TMB kromogen. Det er denne fargedannelsen man da måler i spektrofotometer og kan avgjøre konsentrasjonen til ønsket protein.

Fremgangsmåte:

- 1) Får utlevert primært antistoff vi tilsetter i mikrotiterplater i en "coating buffer" og lar det ligge i 24 timer.
- 2) Coating buffer fjernes og "blocking buffer" tilsettes i 2 timer. "Blocking buffer" har den egenskap å feste seg til veggen på brønnen og andre steder som uspesifikt binder antistoffer.
- 3) "Blocking buffer" fjernes og prøven/standard tilsettes. Samtidig tilsettes "detection antistoff". Lar dette stå i 2 timer.
- 4) Innholdet i brønnene fjernes og "streptavidin-HRP" tilsettes. Lar dette stå i 30 min.
- 5) Tilsettes TMB- kromogen og en blå farge utvikles raskt.
- 6) Stoppløsning tilsettes for å stoppe reaksjon og måles innen 2 min på spektrofotometer.

2.5 Preparering av celler til mikroskopi

Mediet tas av skålen og cellene vaskes med PBS før trypsinering. Når cellene har løsnet stoppes reaksjonen med FKS. Cellene og mediet blandes før sentrifugering. Vi sentrifugerte de høstede cellene og løste opp pelleten i 500 µl medium med 20 % FKS. Deretter tilsatte vi 10 µl av en fargeblanding og satt rørene mørkt i 30 minutter før vi sentrifugerte på nytt. Deretter løste vi på nytt pelleten i 30 µl FKS. Vi strøk ut 3 dråper av celleblandingen på et objektglass og dro dråpene utover før vi tørket utstrykene. Deretter kunne vi se på cellene i fluorescensmikroskop.

Fargeblandingen vi brukte besto av propidiumjodid (0,25 mg/ml) og Hoechst33342 (0,5 mg/ml). Begge disse binder seg til DNA i cellene, men Hoechst går over membranen i levende celler mens propidiumjodid bare kan entre cellene ved membranskade. Vi kunne da se forskjell på levende og døde celler ettersom de viable var farget blå mens de døde var farget røde.

Vi talte deretter cellene for å finne hvor stor andel som hadde gjennomgått nekrose i de forskjellige celleprøvene.

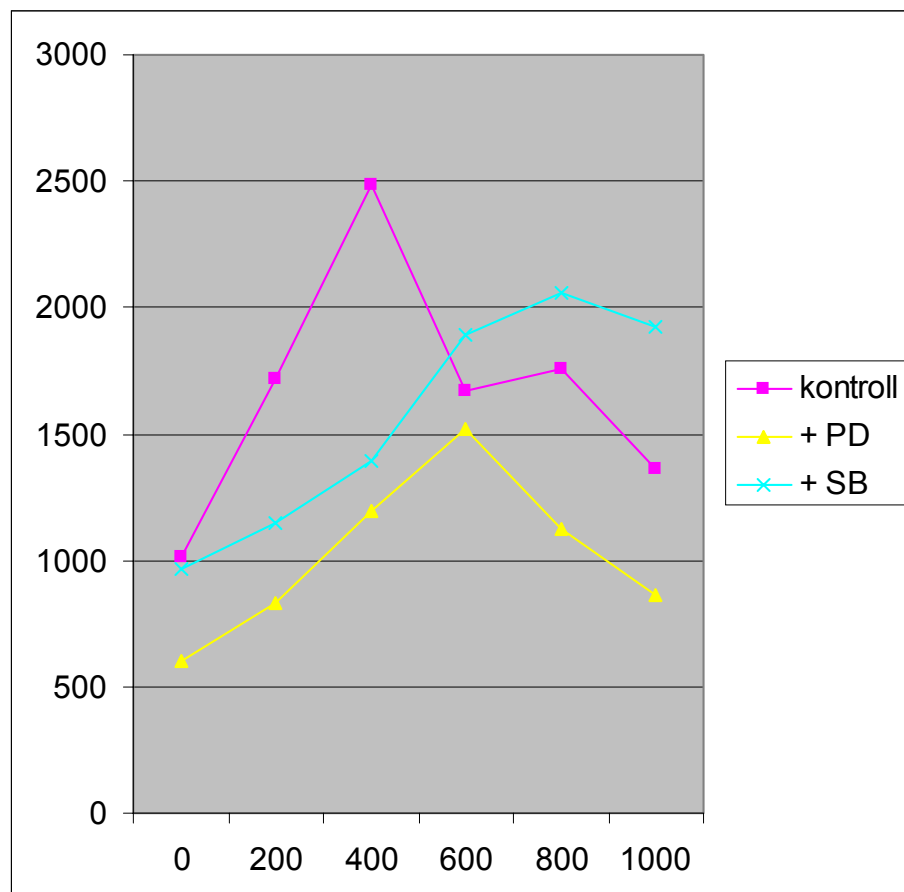
3. Resultater og diskusjon

3.1 Resultater fra IL-8 konsentrasjonsmåling

Konsentrasjonen av IL-8 i de ulike prøvene målt med ELISA-metoden. Konsentrasjonene er et gjennomsnitt fra tre paralleller fra en prøve.

Minusil μg	Kontroll pg	+ PD pg	+ SB pg
0	1014,5	600,65	963,52
200	1717,5	830,65	1148,7
400	2487,3	1192,1	1390,3
600	1671,3	1522,8	1891,4
800	1760,4	1120,5	2061,8
1000	1364	859,29	1919,6

Grafisk fremstilling:



Måle-enheten på X-aksen er pg/ml IL-8.

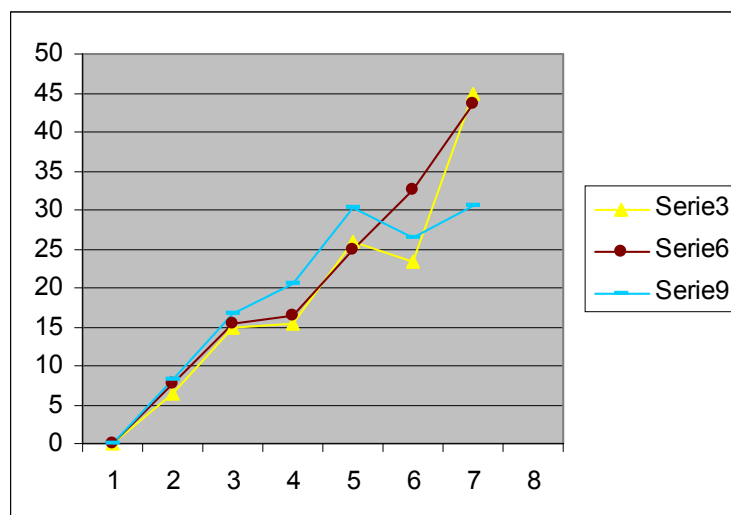
Måle-enheten på Y-aksen viser mengden kvart i μg .

3.2 Resultater fra celledelling

Telte celler uten hemmer		
Døde celler	Levende celler	% Døde celler
19	280	6
45	255	15
46	254	15
78	223	26
70	230	23
135	165	45

Telte celler med PD		
Døde celler	Levende celler	% Døde celler
23	277	8
46	254	15
49	251	16
75	225	25
98	202	33
128	172	44

Telte celler med SB		
Døde celler	Levende celler	% Døde celler
25	275	8
50	250	17
62	238	21
91	209	30
79	221	26
92	208	31



Serie 3: uten hemmer

Serie 6: med hemmer PD

Serie 9: med hemmer SB

Y-aksen viser

prosentandel døde celler, mens X-aksen viser prøverørene med økende konsentrasjon partikler.

I forsøkene der vi målte IL-8 konsentrasjonen ved hjelp av ELISA-metoden, så vi at prøven som besto av A549-celler uten hemmer viste en økning med økende min-u-sil konsentrasjon inntil cirka 400 µg. Deretter falt IL-8 konsentrasjonen (Fig.1). Dette kan skyldes den økte dødeligheten av cellene ved stigende partikkelkonsentrasjoner, spesielt over 400 µg (Fig.2).

I prøvene der ERK-hemmeren PD98059 var tilsatt, så vi en mindre økning i IL-8 konsentrasjonen sammenliknet med prøven uten hemmer. Denne hemmingen var spesielt fremtredende ved 400 µg Minu-sil. Dette kan tyde på at induksjon av IL-8 delvis skjer via ERK. Uheldigvis reduserte PD98059 også den basale IL-8 produksjonen, som gjør at resultatene er noe vanskeligere å tolke.

I prøvene der p38-hemmeren SB202190 var tilsatt, så vi også en betydelig hemming av IL-8 produksjonen etter eksponering for Min-u-sil i konsentrasjoner opptil 400 µg. Basalnivåene av IL-8 var ikke påvirket (Fig.1). Dette viser at p38 er involvert i Min-u-sil induert IL-8 økning. Ved høyere konsentrasjoner enn 400 µg Min-u-sil så vi ingen hemming av IL-8. (fig.2) Prøvene som var tilsatt hemmer viste en økning i IL-8 konsentrasjon ved partikkelkonsentrasjoner hvor prøven uten hemmer viste sterk nedgang. Vi er usikre på hva dette skyldes. Det kan ha sammenheng med at høy konsentrasjon av IL-8 skaper en stressrespons hos cellene som kan resultere i apoptose eller nekrose.

Da vi telte cellene for å finne prosentandelen døde celler, så vi at alle prøvene viste en sterk økning i dødelighet etter hvert som partikkelkonsentrasjonen ble større. Vi så ingen store forskjeller i dødeligheten mellom prøvene, men SB synes å påvirke dødeligheten ved høyeste partikkelkonsentrasjon. Etter forventningene skulle det være mindre nekrose og apoptose i prøvene tilsatt hemmer, ettersom stressresponsen som skyldes IL-8 blir mindre i disse prøvene. Resultatene var derfor ikke helt etter våre forventninger. Dette kan skyldes at andre cytokiner som produseres ved immunologisk reaksjon også gir stressrespons og påvirker cellenes dødelighet.

4. Konklusjon

Resultatene våre viser at Min-u-sil eksponering fører til en økning i IL-8 produksjonen i epiteliale lungeceller. Dette kommer frem i figur 1.

Hemming av MAP-kinasene ERK og p38 fører til lavere produksjon av IL-8.

P38-hemmeren SB synes å redusere cellenes dødelighet.

5. Referanseliste

*Akihisa Harada, Naofumi Mukaida and Kouji Matsushima. (November 1996) **Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases**, in *Molecular Medicine today*. (482-489)*

*Venu Gangur, Neil P. Birmingham and Sirinart Thanesvorakul. (Januar 2002) **Mini review Chemokines in health and disease***. (127-136)

*Ragna Bogen HetlandStudies. (September 2001) **Studies on Ambient Air Particles Generated by the Use of Studded Tires***. (12-26)

*J Ovrevik, Marit Låg, RB Hetland, PE Schwartz and Magne Refsnes. **Mechanism of particle- induced inflammation***. Utkast fra Folkehelseinstituttet

STANDARDPROSEDYRE FOR ELISA IL-8 OG MIP-2

IL-8:

- 1: 100 ul 1,0 ug/ml Capture antibody forynnet i Coating buffer A inkuberes på microtiterplaten i minimum 18 timer ved 2-8 ° C.

- 2: 300 ul Blokkings buffer inkuberes i minst 2 timer ved romtemp.

- 3: 100 stdp/prøv (cytokinene) settes på platen.

- 4: 50 ul 0,1 ug/ml Detection antibody forynnet i Assay buffer og tilsettes til stdp/prøvene. Stdp og prøvene inkuberes i 2 timer.

- 5: 100 ul 0,5 pg/ml Streptavidin- HRP tilsettes brønnene og inkuberes i 30 minutter.

- 6: 100 ul TMB- kromogen settes til brønnen og inkuberes etter visuell vurdering av fargeutvikling.

- 7: 50 ul stoppløsning tilsettes til TMB bufferen i brønnene og verdiene avleses.

⇒ Etter trim 2, 4 og 5 vaskes det 4 ganger med vaskebuffer

- 1: **MIP-2**
100 ul 1,25 µ g/ml Capture antibody forynnet i Coating buffer B inkuberes på microtiterplaten i minimum 18 timer ved 2-8 ° C.

- 2: 300 ul Blokkings buffer inkuberes i minst 2 timer ved romtemp.

- 3: 100 stdp/prøv (cytokinene) settes på platen og inkuberes i 1,5 time.

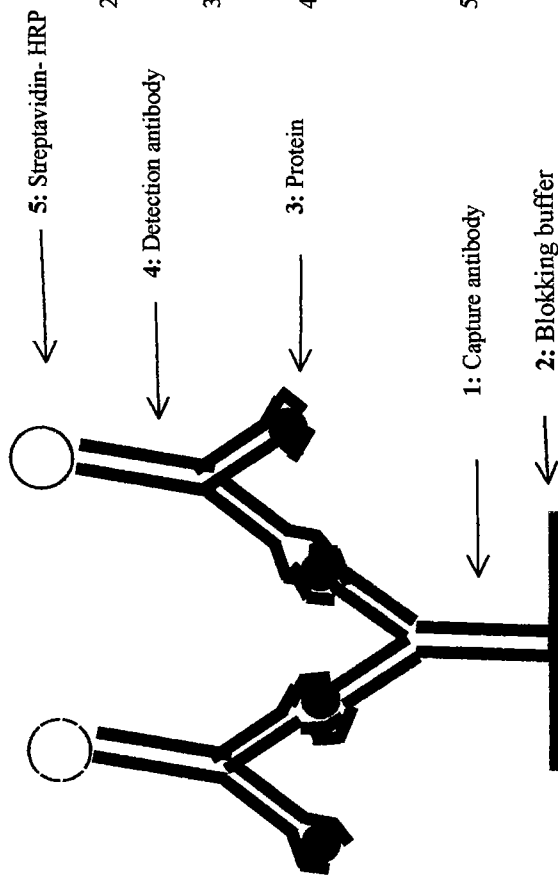
- 4: 100 ul 0,125 µl Detection antibody settes på platen og inkuberes i 1 time.

- 5: 100 ul 0,05 µl/ml Streptavidin- HRP tilsettes brønnene og inkuberes i 30 min.

- 6: 100 ul TMB tilsettes til brønnene og inkuberes etter visuell vurdering av fargeutvikling.

- 7: 50 ul stoppløsning tilsettes til TMB bufferen i brønnene og verdiene avleses.

⇒ Mellom trim 2, 3 og 5 vaskes det 4 ganger med vaskebuffer.



ELISA.

ELISA av humane IL-8 og IL-6

- Man bruker medium som blir tatt av (ofte i forbindelse med trypsinering) og lagret ved -70°C . Disse prøven inneholder $50\ \mu\text{l}$ av mediumet og ble tilsatt $450\ \mu\text{l}$ PBS (10 gangers fortykning). I dette mediumet er det et signalstoff, cytokiner, som skal måles.
→ Les alltid oppskriften og se på konsentrasjonene av antistoff og andre løsninger.

Coating.

- Tilsett $10\ \mu\text{l}$ *capture antibody* (coating) til $11\ \text{ml}$ coating- buffer A ($10\ \mu\text{l}/10\ \text{ml} = 1,0\ \mu\text{g}/\text{ml}$). Skyl tippen godt i bufferen. Bland så man får en homogen blanding.
- Tilsett $100\ \mu\text{l}$ av den fortyndede coating- løsningen til hver brønn på brettet.
- Sett brettene i kjøleskap og la de stå der i minst 24 timer.

Antistoff.

- Tom ut coating- løsningen og bank brettet mot cellevatt.
- Brettene må aldri stå lenge tørre.
- Tilsett $300\ \mu\text{l}$ blocking- løsning i hver brønn for å "stoppe" capture antistoff. Bruk aldri blocking buffer som har vært oppbevart over lengre tid. Det blir fort vekst i denne bufferen.
- La brettene stå i to timer med blocking- buffer i romtemperatur eller lengre tid i kjøleskap (et døgn eller mer), med lokk.
- Fortynn IL-8 prøvene ($1:9=100$ gangers fortykning?) med den løsningen prøvene er fortynnet i første gang (PBS?). Denne bufferen brukes også ved fortykning av standard. IL-6 måles ofte med en 10 gangers fortykning eller ufortynnet.
- Lag standardprøver til standardkurven.

IL-8:

- $100\ \mu\text{l}$ standard løsning (a $10.000\ \text{pg}/\text{ml}$) blandes med $900\ \mu\text{l}$ Assay- buffer/PBS e.l. (til sammen $1000\ \mu\text{l}$ (a $1000\ \text{pg}/\text{ml}$)) i rør merket med 1000 (de andre rørene merkes med 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 0).
- Fordel $500\ \mu\text{l}$ PBS e.l. i hvert av de andre rørene som skal brukes til standardkurve.
- Overfør $500\ \mu\text{l}$ fra det første røret til det neste (merket 500).
- Bland godt.
- Overfør til neste rør.
- Gjenta prosedyren til siste rør. NB: rør merket med 0 skal bare inneholde $500\ \mu\text{l}$ Assay- buffere/PBS e.l. Rør merket med 7.8125 vil da inneholde $1000\ \mu\text{l}$ til sammen.

IL-6:

- Bland $40\ \mu\text{l}$ standard (a $10.000\ \text{pg}/\text{ml}$) og 960 Assay- buffer/PBS (til sammen $1000\ \mu\text{l}$) i rør merket med 400 (dvs. $400\ \text{pg}/\text{ml}$).
- Tilsett $500\ \mu\text{l}$ Assay- buffer/PBS til hvert av de andre rørene (merket 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 0).
- Overfør $500\ \mu\text{l}$ fra rør merket med 400 og fortsett slik helt ned til rør merket med 6,25 (rør 0 skal ikke inneholde standard). Rør 6,25 inneholder nå $1000\ \mu\text{l}$.

ELISA.

- Bland godt.
 - Lag et begerglass med 4 μ l **detection- antibody** (biotinylated sekundært antistoff) **pr. brett** (nytt antistoff mars -03). (gammelt: 0,5 μ l/ 5-6 ml PBS/Assey buffer)
 - Tøm av blocking- buffer.
 - Skyll 4 ganger med vaske- buffer (ca 400 μ l vaske- buffer i hver brønn = full brønn).
 - Bank brettet mot cellevatt.
 - Sett på 100 μ l av standarden på brettet. ³ 2 paralleller av hver konsentrasjon.
 - Overfør 100 μ l prøve til brettet.
 - *Husk å merke godt så du vet hvem prøve som er i hvilken brønn!*
 - Tilsett 50 μ l av detection- løsning til hver brønn (til standard og prøvene).
 - La brettet stå med lokk på i to timer med forsiktig bevegelse.
-
- Lag en løsning med 0,5 μ l strept- HRP/11 ml PBS. Denne finnes i -20°C fryseren. (gammelt: 4 μ l Strept. HRP(streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate) /11 ml PBS) til hvert brett. Dette stoffet er felles for både IL.6 og IL.8. Nytt strept HRP står i fryseren.
 - Tøm ut innholdet i brønne.
 - Vask 4 ganger med vaske- buffer.
 - Bank av på cellevatt.
 - Tilsett 100 μ l Strept. HRP til hver brønn.
 - La det stå i 30 minutter i romtemperatur.
 - Vask 4- 5 ganger.
 - Lag TMB (tetramethyl benzidine) rett før bruk:
 - 6 mg TMB stokk/ml DMSO (kan oppbevares i kjøleskap)
 - 200 μ l TMB i DMSO/11 Citrat buffer
 - 2,2 μ l 30 % H₂O₂ (tilsettes like før bruk!)
 - Tilsett 100 μ l TMB- substrat i hver brønn, blå farge utvikles.
 - Settes mørkt på forsiktig risting i ca 5-15 minutter (en visuell vurdering må gjøres).
 - Se på brettene ca hvert 5. minutt for å kontrollere fargeutviklingen.
 - Etter max 30 minutter tilsettes 50 μ l stopp solution til hver brønn. Dette er 1M H₂SO₄ (fargen blir gul).
 - Mål absorbansen på spektrofotometer(450nm). Målingen BURDE måles innen 2 minutter for best resultat.

**Effekten av CYP1A1 hemmeren
 α -naftoflacon (ANF)
på benzo(a)pyren (B(a)P)
og syklopentapyren (CPP)
indusert apoptose**

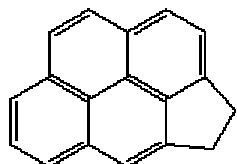
ved

Solveig Aamot og Jostein H. Bakke

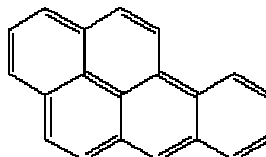
**Veiledere: Jørn A Holme
Anita Solhaug**

PAH og CYP1A1

Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) er en gruppe molekyler som er bygget opp av et ulikt antall benzenringer i ulike konformasjoner. De to molekylene vi har undersøkt i dette prosjektet er benzo[a]pyren (B[a]P) og syklopenta[c,d]pyren (CPP).

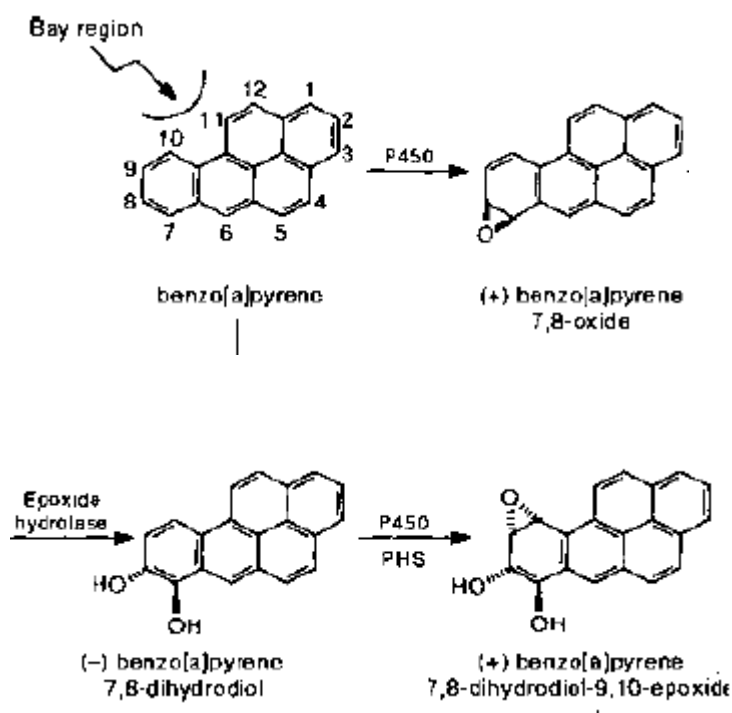


B[a]P



CPP

Disse molekylene er begge substrater for cytokrom P450-enzymet av type CYP1A1. CYP1A1 øker molekylens affinitet for DNA. CYP1A1-aktivering av B[a]P skjer ved epoksidring og hydroksylering:



De aktiverte PAH-forbindelsene binder seg til guanin i DNA, slik at det dannes klumper i DNA-molekylet pga PAH-molekylens størrelse. De skader altså DNA-molekylet ved å endre dets form.

Vanligvis fjernes disse klumpene på DNA-tråden ved hjelp av et reparasjonssystem bestående av restriksjonszymer, DNA-polymerase og DNA-ligase.

Hvis derimot skader overses av reparasjonssystemet eller hvis antallet skader er høyt, vil det kunne skje mutasjoner eller igangsettes apoptose.

Apoptose og nekrose

Apoptose er en kontrollert form for celledød. For at vev skal holdes friskt må av og til noen celler dø og nye, friske celler ta deres plass; apoptose igangsettes da i de foreldede, dårlig fungerende cellene.

Det hender også, for eksempel under fosterutvikling, at noen celler ikke lenger er nødvendige for organismen. Eksempler på dette er å finne i utviklingen av menneskefostre; i de tidlige stadier har fostre hud mellom fingrene; etter hvert igangsettes apoptose i disse cellene slik at de forsvinner – mellom fingrene våre har det altså vært hud, men cellene som utgjorde den gjennomgikk en programmert død.

Det samme gjelder halen til rumpetroll, som heller ikke er tilstede i en voksen frosk.

Apoptose skiller seg vesentlig fra den andre typen celledød; den mer dramatiske nekrosen. Nekrose inntreffer oftest på grunn av akutt skade, for eksempel svært store fysiologiske endringer som fører til ekstreme forstyrrelser i ionebalansen eller skade forårsaket av virus. Nekrose krever ikke energi.

Plasmamembranen ødelegges slik at cellen tar inn vann og sveller opp. Etter tilfeldig (usystematisk) nedbrytning av DNA og ødeleggelse av proteiner i cellen, sprekker den slik at innholdet ”søles” ut over omgivelsene, noe som fører med seg en inflammatorisk respons i vevet.

Apoptose er derimot en energikrevende død som forutsetter aktivering av bestemte gener og proteiner, slik at cellen brytes ned fra innsiden mens plasmamembranen holdes intakt gjennom hele prosessen. Cellen krymper, kjernen og kromatinet kondenseres og etter hvert fragmenteres cellen i mindre biter, apoptotiske legemer, som fagocytteres enten av makrofager eller naboceller. DNA i apoptotiske celler fragmenteres på systematisk vis – dette kommer vi tilbake til ved forklaring av DNA-laddering.

Det hender at apoptotiske celler har for lite energi til å fullføre prosessen – da glir apoptosen over i nekrose. Slike celler kalles apoptotisk-nekrotiske.

Det er to måter apoptose kan igangsettes på; signalene som initierer prosessen kan enten komme fra cellens omgivelser (naboceller, for eksempel) og aktivere såkalte dødsreseptorer på cellens overflate, eller de kan komme fra cellen selv.

Uansett opprinnelse er det kaspaser som forårsaker nedbrytningene av cellens innhold ved at de kløyver proteiner, bl.a. et protein som vanligvis holder DNase inaktivt, slik at DNase frigjøres til å kutte opp cellens DNA. Kaspasene kløyver også hverandre, og med dette aktiverer de også hverandre. Det oppstår altså en kaspase-kaskade inni cellen som gjør at dens innhold brytes ned effektivt.

PAH og apoptose

For at cellesyklusen skal kunne gå over i S-fase (replikasjonsfase) må DNA være uskadd. Kort fortalt aktiverer DNA-skade, i vårt tilfelle klumping på DNA på grunn av PAH-molekylers binding til guanin, p53-genet som enten fører til at cellesyklusen stopper opp slik at skadene kan repareres eller, hvis skadene er for omfattende til å kunne repareres, til igangsetting av apoptose.

Cellen tar altså på en måte selvmord i stedet for å la mutasjoner akkumuleres.

P53-genet er dermed meget viktig for å forhindre at mutasjoner akkumuleres i cellens genom. Mutasjoner i p53-genet forekommer i omtrent halvparten av alle kreftformer som rammer mennesket!

Vi skulle altså i dette forsøket undersøke apoptose forårsaket av PAH-molekyler, som kan forårsake DNA-skader.

Det er et eksempel på apoptose induisert av cellens egne, indre signaler, og ifølge den rådende teorien er det da følgende som skjer:

p53 aktiverer transkripsjon av gener kodende for proteiner som fører til at bl.a. cytokrom c slippes ut fra mitokondriene. Cytokrom c binder seg til proteinet Apaf-1 som aktiverer kaspase 9, og dermed er det i gang.

Hemming av CYP1A1

α -naftoflacon hemmer CYP1A1 enzymet, og en mulig mekanisme er konkurrerende hemming for substrat. Stoffet induserer dermed CYP1A1.

Forklaring av anvendte metoder og tolkning av resultater

På tre forskjellige måter undersøkte vi effekten av CYP1A1-hemmeren α -naftaflavon (ANF) på grad av apoptose. Vi brukte to ulike polyaromatiske hydrokarboner – benzo[a]pyren (B[a]P) og syklopentapyren (CPP) – som apoptoseinduktorer, og observerte forskjeller mellom disse evne til å forårsake apoptose og/eller evt. nekrose.

Cellene vi brukte som “forsøkskaniner” var fra cellelinjen Hepa 1c1c7 dyrket frem fra museleverceller.

De tre ulike metodene vi benyttet:

1. DNA-laddering
2. Flowcytometri
3. Mikroskopi

DNA-laddering

Kaspaser aktivert i apoptosefasen kløyver mange av cellens proteiner, deriblant et som vanligvis binder seg til og holder en type DNase inaktivt. Denne DNasen kutter DNA opp i fragmenter på multipler av ~180 basepar.

Kjører man en elektroforesegel vil man altså kunne se forskjell på en prøve fra en frisk og en apoptotisk celle; DNA fra den apoptotiske vil fremstå som en stige av bånd med fragmenter på X ganger ~180 basepar (derav den engelske betegnelsen laddering), mens DNA fra den friske cellen vil ligge som en samlet klump nær gelens brønn.

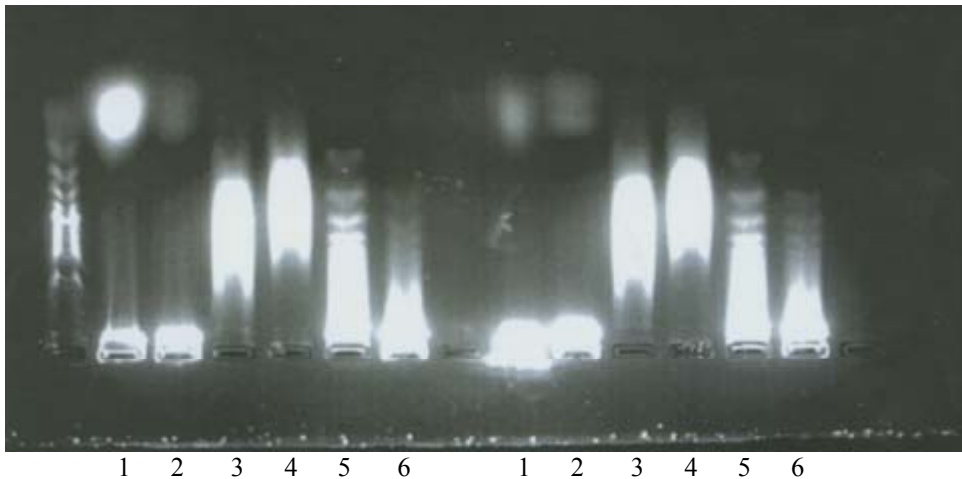
Vi vurderte altså effekten ANF ved å se i hvilken grad DNA i cellene tilsatt denne hemmeren var fragmentert i forhold til DNA i celler med uhemmede CYP1A1-enzymet.

RNA kuttet opp med en RNase før gelelektroforesen, så de små RNA-fragmentene vil være synlige langt borte fra brønnene, på bildet under vises de som små skyer lengst opp på gelen.

Innholdet i hver prøve (prøve 1 ble pipettert ned i brønn 1 osv.) er som følger:

Prøve 1: Hepa 1c1c7-celler	<i>kontroll 1</i>
Prøve 2: Hepa 1c1c7-celler + ANF	<i>kontroll 2</i>
Prøve 3: Hepa 1c1c7-celler + 20 µM B(a)P	
Prøve 4: Hepa 1c1c7-celler + 20 µM B(a)P + 25 µM ANF	
Prøve 5: Hepa 1c1c7-celler + 30 µM CCP	
Prøve 6: Hepa 1c1c7-celler + 30 µM CCP + 25 µM ANF	

Resultat av gelelektroforesen:



Helt til venstre: molekylærvæktstige

Prøve 1 og 2: Ingen fragmentering, altså ingen apoptose.

Prøve 3 og 4: Feil under tilberedning av prøver for gelelektroforese.¹

Prøve 5: Forholdsvis høy grad av fragmentering (laddering), noe som tyder på apoptotisk DNase-aktivitet.

Prøve 6: Mindre fragmentering enn i prøve 5.

Her kan man si prøve 5 mot prøve 6 er de mest interessante.

Siden ANF her har hemmet CYP1A1-enzymene i prøve 6, tyder resultatet på at CPP lettere forårsaker apoptose når det har blitt metabolisert vha. CYP1A1.

I følge resultatet fremmer altså CYP1A1 apoptose.

Men likevel er det i prøve 6 i forhold til i de to kontrollene mye fragmentering. Dette tyder enten på at [ANF] var for liten i forhold til [CYP1A1] til å få tilstrekkelig hemming, eller at ikke all induksjon av apoptose nødvendigvis er CYP1A1-avhengig – at CPP kan ha induisert apoptose uten innvirkning av CYP1A1-enzymet.

Flowcytometri

Et flowcytometer måler cellenes fluorescens etter de har blitt tilsatt det DNA-bindende fargestoffet Hoechst 33258 (også kalt H258). Siden H258 ikke kan passere

¹ På Folkehelseinstituttet mente de ujevn fordeling av ultralydbølger på hver av prøvene ved sonikering kunne ha skylden for dette. Flere av de ansatte som benyttet denne metoden fikk sporadisk slike resultater på tilfeldige DNA-prøver.

cellemembranen, må cellene først behandles med en detergent, vi brukte Triton X-100, som gjør membranen permeabel for fargestoffet.

Celler i de ulike delene av celledyklusen har ulike DNA-mengder.

Etter G₁-fasen følger replikasjonsfasen (S-fasen), deretter G₂-fasen. Celler i G₂-fasen vil derfor ha dobbelt så mye DNA som de i G₁-fasen, mens celler i S-fasen vil ha en DNA-mengde som ligger et sted mellom de to, avhengig av hvor langt i S-fasen de ulike cellene har kommet.

Det fluoriserende signalet fra hver celle vil da være proporsjonalt med mengden DNA i cellen.

I tillegg til fluorescens måles cellenes lysbrytning. Dette målet sier noe om cellens volum (størrelse).

Cellene kjøres en etter en gjennom et syltynt rør inn i flowcytometeret, som måler hver celleds fluorescens og lysbrytning. Ut fra de standarder som er programmert i det tilhørende dataprogrammet, bestemmes andelen apoptotiske celler samt andelen celler i de ulike deler av celledyklusen, og man kan få en grafisk fremstilling av dette.

Resultatene av flowcytometrien:

Prøvenes rekkefølge (innhold) er likt som for gelelektroforesen. Det samme gjelder mikroskopien (se lenger ned).

Prøve	Apoptotiske/nekrotiske celler	Celler i G ₁ -, G ₂ -, S- og M-fasen
1 og 2	8 %	92 %
3	30 %	70 %
4	31 %	69 %
5	38 %	62 %
6	22 %	78 %

Prøve 1: 5556 talte celler

Prøve 5: 682 talte celler

Prøve 3: 2134 talte celler

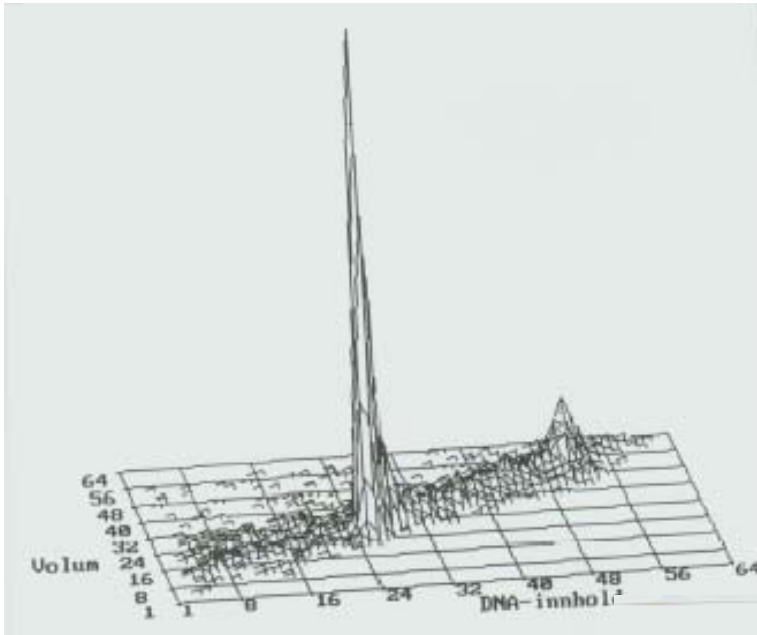
Prøve 6: 234 talte celler

Prøve 4: 437 talte celler

Da vi hadde så få celler i noen av prøvene (dette kan skyldes mangel på risting/blanding av løsningen vi tok cellene fra – de fleste av cellene lå muligens igjen på bunnen av rørene), er det vanskelig å med sikkerhet trekke konklusjoner fra forsøket. Vi ventet for eksempel å få en lavere prosentandel apoptotiske celler i prøve 4 enn i prøve 3.

CPP i prøve 5 har flere apoptotiske celler enn CPP med ANF i prøve 6, men som sagt gjør det lave antallet celler i enkelte av prøvene det umulig å trekke noen sikker konklusjon.

Grafisk sammenligning av prøve 1 og 3:



Kontroll 1:

Mange celler i G_1 -fasen, ganske mange i G_2 - og M -fasen og noen få i S -fasen. Meget få celler er apoptotiske.

De største cellene i området som viser celler med lavt DNA-innhold kan være nekrotiske.

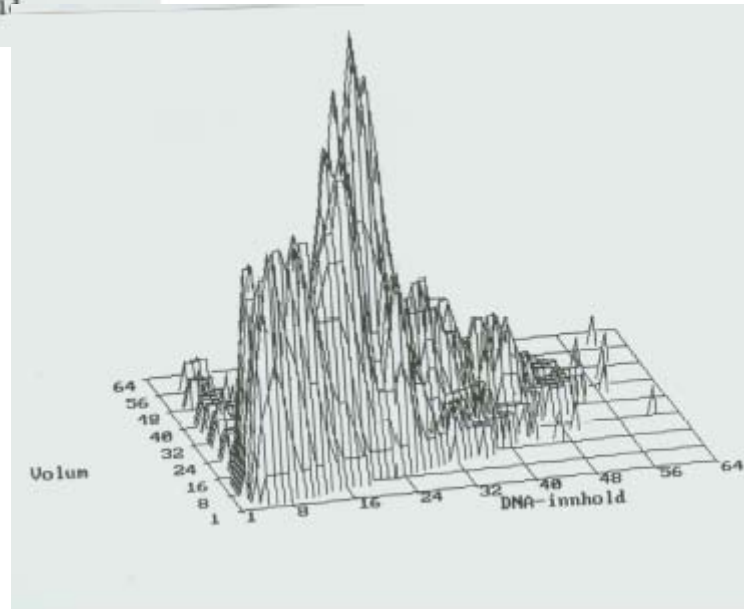
Celler tilsatt B[a]P:

Fortsatt mange celler i G_1 -fasen, men svært mange apoptotiske celler, en god del i S -fasen og få i G_2 - og M -fasen.

Det at det er såpass få celler i G_2 -fasen kan skyldes celle-syklusstans før M -fasen for å reparere skadene som B[a]P har forårsaket.

Mikroskopi

For at de ulike cellenes tilstander skulle bli tydelige for det blotte øyet, tilsatte vi to fargestoffer; propidiumiodid (PI) og Hoechst 33342 (H342).



PI kan ikke passere cellemembranen og vil derfor ikke gå inn i friske og apoptotiske celler. Siden membranen til en nekrotisk celle er ødelagt, vil derimot PI gå inn i nekrotiske celler og farge nukleinsyrene røde.

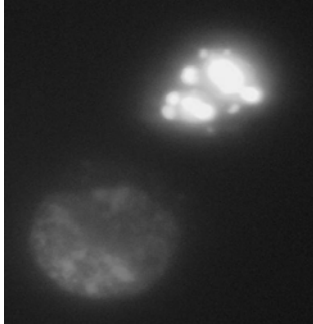
Det hender også at membranen til apoptotiske celler ødelegges i de sene stadier av apoptosen – slike celler kalles apoptotisk-nekrotiske – og dermed vil PI farge det kondenserte kromatinet rødt.

H342 passerer intakte cellemembraner og farger DNA blått.

Altså ser man en frisk celle som jevnt blåfarget, kjernen gjerne tydeligst, en apoptotisk celle vil ha en langt mer intenst lysende kerne i og med at DNA er kondensert, mens en

nekrotisk celle får rødfarge og er stor i forhold til de andre cellene da den nekrotiske prosessen involverer svelling av cellen.

De store, røde cellene med intense kjerner er apoptotisk-nekrotiske.



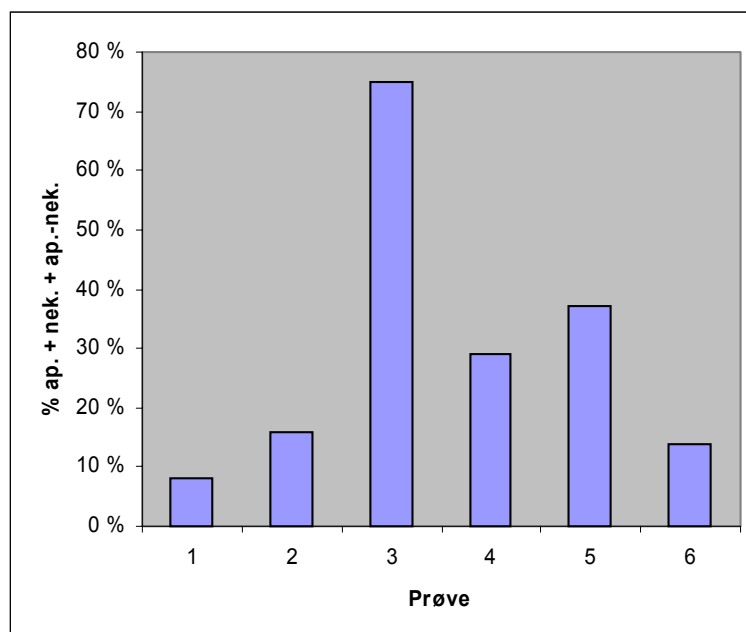
Den øverste cellen på bildet er apoptotisk, og har tydelig gjennomgått en del fragmentering, man kan tydelig se flere apoptotiske legemer.

Cellen nederst er en vanlig, frisk celle.

Vi talte 126 celler i hver prøve, og fikk følgende prosentfordelinger:

Prøve	Celletilstand				
	Frisk	Apoptotisk	Nekrotisk	Ap.-nek.	Sum ap. + nek. + ap.-nek.
1	92 %	2 %	6 %	-	8 %
2	84 %	2 %	13 %	1 %	16 %
3	25 %	13 %	31 %	31 %	75 %
4	71 %	10 %	2 %	17 %	29 %
5	63 %	10 %	10 %	17 %	37 %
6	86 %	8 %	6 %	-	14 %

Grafisk fremstilling av verdiene; sum i prosent av apoptotiske, nekrotiske og apoptotisk-nekrotiske celler pr. prøve:



Konklusjon

DNA-ladderingen viser at CPP fører til apoptose og at ANF hemmer graden av apoptose. Siden ANF hemmer CYP1A1, viser dette at CPP-indusert apoptose er avhengig av CYP1A1-aktivitet.

Selv om enkelte av resultatene fra prøvene flowcytometrien er noe upålitelige, konkluderer vi med at ANF har evnen til å nedsette graden av PAH-indusert apoptose.

Prosjektoppgave i Toksikologi

BIO241 Våren 2003

Toksisitet av α -cypermetrin på meitemark



Utført av: Linda Marie Skryseth

Christina Sørensen

Veileder: Thomas Hartnik

Utført på Jordforsk, NLH

26. mars og 4. april 2003

1	Innledning	3	
1.1	Målsetning	3	
1.2	Toksisitetstestning og endepunktvalg		3
1.2	Pyretroide insekticider og α -cypermetrin	5	
1.3	Testorganismen; <i>Eisenia andrei</i>	8	
2	Materialer og metode	10	
2.1	Modellstoff	10	
2.2	Testorganisme	10	
2.3	Jordtype	11	
2.4	Prøveopparbeidelse	11	
2.5	Testmetode	12	
2.6	Opptelling av meitemark og kokonger	13	
3	Resultater	14	
4	Diskusjon	17	
5	Referanser	19	
6	Vedlegg	21	
	Vedlegg 1 - Rådata		
	Vedlegg 2 - Beregning av NOEC- og LOEC-verdier		
	Vedlegg 3 - Etikett FASTAC		

1 Innledning

1.1 Målsetning

Hensikten med oppgaven var å undersøke toksisiteten til det pyretroide insekticidet α -cypermetrin på meitemark, med dødelighet, vektendring og reproduksjon som endepunkter. Disse endepunktene inngår i standardtester for undersøkelse av toksisitet av kjemikalier og pesticider på meitemark, og en av disse standardtestene ble benyttet.

1.2 Toksisitetstesting og endepunktvalg

For risikovurdering av kjemikalier og pesticider er toksisitetstesting på forsøksdyr i laboratoriet med bestemmelse av dose-responsforhold, NOEC- og EC_X-verdier et uvurderlig verktøy. Resultatene fra slike tester gir mesteparten av grunnlaget til lovgivning om og regulering av bruk av pesticider. Det er derfor viktig å ha standardiserte tester, en testorganisme som er sensitiv for testkjemikalien, og som er en økologisk relevant og typisk representant for det miljøet som skal beskyttes. I tillegg er det viktig å velge endepunkter som gjenspeiler det aktuelle stoffs toksisitet overfor forsøksdyret.

Generelt ved utforming av en laboratorie-toksisitetstest må følgende parametere tas med i betraktningen; reproduserbarhet, praktiskhet, validitet og relevans. Med reproduserbarhet menes at repetering av testen vil gi lignende resultater. Dette kan testes i såkalte ring-tester, hvor samme substans testes flere steder etter samme retningslinjer. At testen er praktisk innebærer at den er lett å utføre, slik at man får færrest mulig feilkilder. Å sikre testens validitet kan innebære å sette bestemte validitetskriterier for parametere som kroppsvekt og antall overlevende individer for å sikre at testresultatene møter en viss standard. At testen har relevans innebærer at de valgte endepunktene i laboratorietesten er passende i forhold til det naturlige miljøet.

Det finnes to standardlaboratorietester for toksisitetstesting av pesticider på meitemark; en for testing av dødelighet¹ og en for testing av reproduksjon². I begge testene inngår også kontroll av vektendring. Test for dødelighet uttrykt som LC₅₀ er tradisjonelt mest anvendt for standardtesting i laboratoriet og brukes i pesticidgodkjenningen³. Testen er både reproducerbar og praktisk, og endepunktets relevans i forhold til felten er høyt. Test på meitemarkens reproduksjonsevne er et mer sensitivt endepunkt for testing av kronisk toksisitet. Reproduktiv suksess kan undersøkes på flere måter; ved antall kokonger, antall juvenile, vekt av juvenile og kjønnsmodning. Av disse er det bare antall juvenile og antall kokonger som både er praktiske nok og sensitive og valide nok til å brukes i noe særlig utstrakt grad. Det aller beste er å teste for antall juvenile, for da testes ikke kun for reproduktivitet, men også for de juveniles levedyktighet. Endring i kroppsvekt som endepunkt er ikke like klart definert som dødelighet og reproduksjon. Det kan være noen større problemer i forhold til registreringen av dette endepunktet (f.eks. når noen av testdyrene dør), men når visse validitetskrav stilles viser det seg at kroppsvekt er et veldig presist og sensitivt endepunkt. Derimot er det uklart hvor stor biologisk relevans vektendringen har.

I standardtestene uttrykkes resultatene i form av LC₅₀- og EC_X-estimer og NOEC-verdier. LC₅₀ er den estimerte konsentrasjonen av en testsubstans som vil forårsake død hos 50% av forsøksdyrene. EC_X er den estimerte konsentrasjonen av testsubstansen som vil forårsake X % effekt hos forsøksdyrene. F.eks. vil EC₁₀ for reproduksjon med antall kokonger produsert som parameter være den konsentrasjonen hvor det produseres 10% færre kokonger enn i kontrollen. NOEC (No observed effect concentration) er den høyeste testsubstanskonsentrasjonen som ikke gir noen statistisk signifikant effekt. Det er LC₅₀, EC₅₀ og NOEC som blir benyttet innen lovgivning om og regulering av bruken av pesticider.

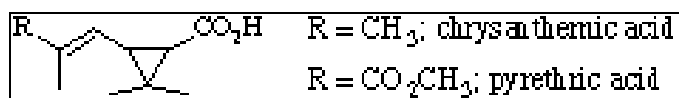
¹ OECD Guideline no. 207

² ISO

1.3 Pyretroide insekticider og α -cypermetrin

Syntetiske pyretroidene er en viktig gruppe av syntetiske insekticider som er mye brukt i norsk landbruk. De springer ut fra en mye eldre klasse botaniske insekticider; pyrethrum, en blanding av pyretriner, cineriner og jasmoliner ekstrahert fra pyrethrum-blomsten; *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Disse stoffene ble etter alt å dømme oppdaget av kineserne for omkring 2000 år siden, og har vært i utstrakt bruk siden da. De har vært høyt verdsatt på grunn av sin høye toksisitet hos insekter, fordi insektene ikke utvikler noen toleranse mot dem, og fordi de ikke er toksiske for pattedyr. Utviklingen av de syntetiske pyretroidene har kommet som en respons på at etterspørselen etter pyretroide insekticider eksploderte i løpet av 1900-tallet, og at de naturlige pyretroidene er forholdsvis ustabile i lys og luft. Håpet var å utvikle analoger med høyere fotokjemisk stabilitet, lav toksisitet overfor pattedyr og høyere selektivitet for mållartene.

Pyretrinene er alle bygget opp rundt en krysantemumsyre- eller en pyretrumsyrekjerne (figur 1).



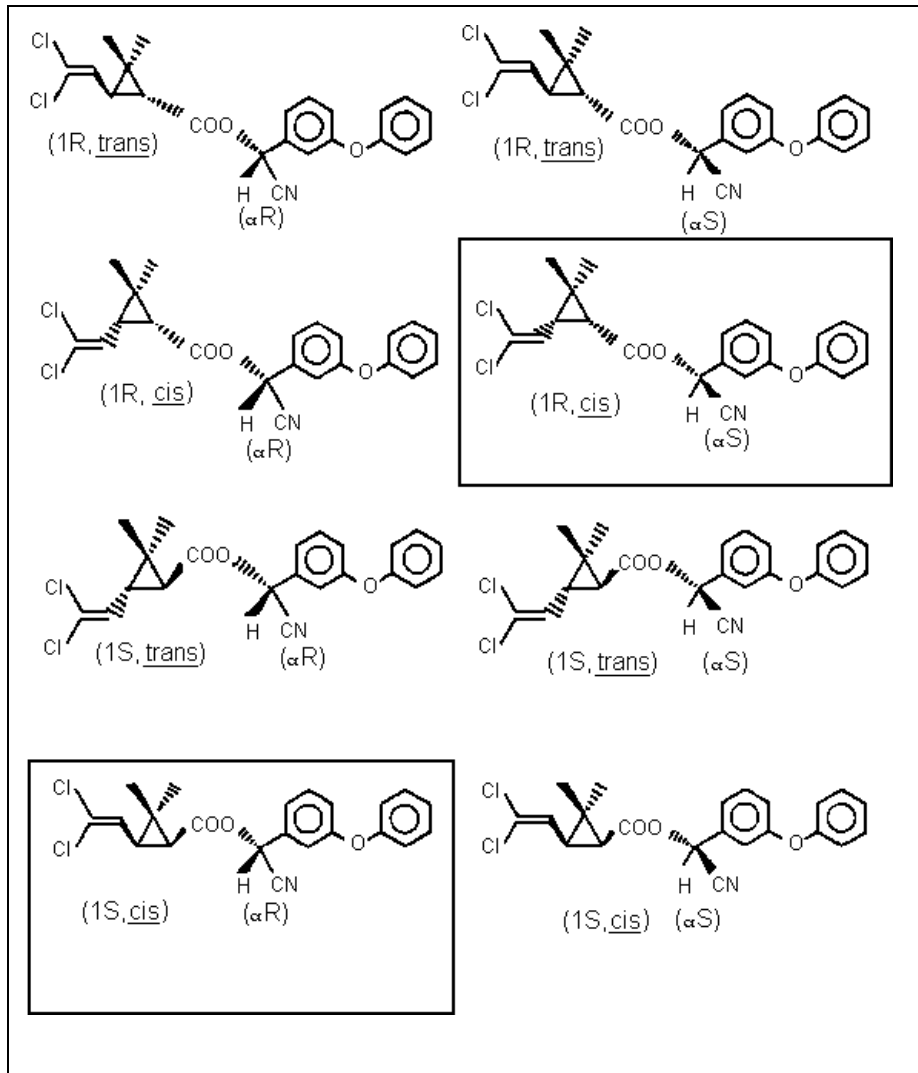
Figur 1. Strukturformel av krysantemumsyre og pyretrumsyre

I de syntetiske pyretroidene er det gjort diverse substitusjoner som har gitt nettopp de egenskapene man var på jakt etter.

De syntetiske pyretroidene deles inn i to klasser; Type I-pyretroider har ikke en α -cyanosubstituent, og forårsaker forgiftningssymptomer hos insekter som rastløshet, dårlig koordinasjon, utmattelse og paralysering, mens Type II-pyretroidene har en α -cyanosubstituent og gir symptomer som intens hyperaktivitet, mangel på koordinasjon og kramper. α -cypermetrin er en type II-pyretroid. Disse virker ved å forlenge tidskonstanten for inaktivering av natriumkanaler i nerveceller, slik at det

³ Advances in earthworm ecotoxicology

kan gå fra flere hundre millisekunder og opptil sekunder lenger enn normalt før kanalene inaktiveres. Dette forårsaker en vedvarende depolarisering og repetitiv firing av aksjonspotensialer og fører til alvorlige forstyrrelser i nervesignaliseringen og ved høye doser irreversible skader i nervesystemet.

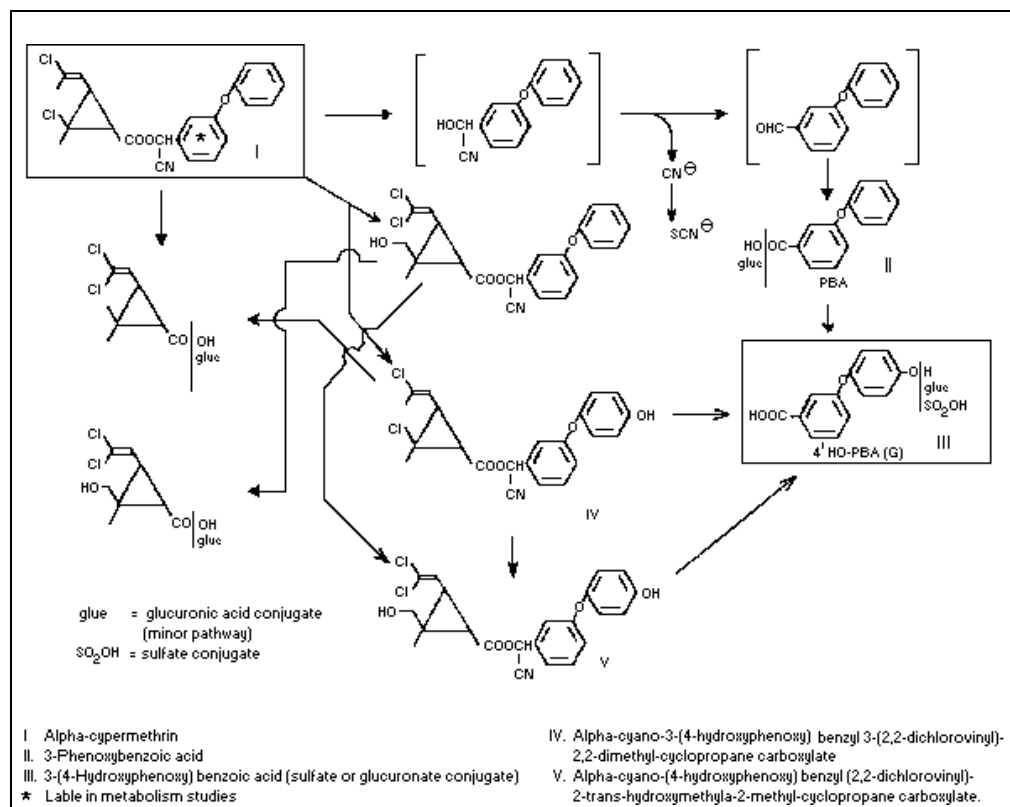


Figur 2. Isomerer av cypermetrin, de to isomere formene av α -cypermetrin er uthevet.

α -cypermetrin er betegnelsen for to av isomerene til forbindelsen cypermetrin (D- og G-isomerene). De har molekylærformelen $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$, og strukturene er vist i figur 2. α -cypermetrin er hydrofobt, med en meget høy oktanol-

vannfordelingskoeffisient, $\log P_{OW} = 5,16^4$, og det har høy adsorpsjon og lav mobilitet i jord. α -cypermetrin har lav fotolytisk nedbrytning og er relativt stabilt i nøytral og sur pH, med DT_{50} på mellom 14 og 179 dager avhengig av temperatur og dose. Derimot hydrolyseres stoffet raskt i basiske miljøer, med DT_{50} på 2,9 timer ved pH 9⁵.

I organismene brytes α -cypermetrin og andre pyretroider ned av hydrolytiske enzymer, muligens av uspesifikke mikrosomale karboksylestaser. I tillegg er det mikrosomale monooksygenasesystemet viktig i detoksifiseringen. Hvordan detoksifiseringen foregår spesifikt hos meitemark vet vi ikke, men i figur 3 vises biotransformasjonen i rotter.



Figur 3. Biotransformasjon av α -cypermetrin i rotte.

⁴Alpha-cypermethrin (environmental health criteria)

⁵Økotoksikologisk vurdering

1.4 Testorganismen; *Eisenia andrei*

I dette forsøket ble meitemark arten *Eisenia andrei* brukt som testorganisme.

Meitemarken er en fåbørstemark som bare finnes på den nordlige halvkule. Maten til meitemarken består av råtnende planterester og annet organisk materiale som den finner på overflaten eller støter på når den graver seg gjennom jorden. Når marken har hentet maten ned i jorden fukter den det med spytt, slik at det råtner fortere, før den river det i stykker og spiser det. Ved sin aktivitet binder meitemarken jordsmonnet bedre sammen. Den blander det øvre jordlaget (humus), som inneholder døde plante- og dyrerester, med den dypereliggende mineraljorda, og påskynder dermed nedbrytningen av organisk materiale. Meitemarken er selv på en måte en nedbryter, siden materiale som har gått gjennom markens tarm, er lettere nedbrytbart for andre nedbrytere, som sopp og bakterier. Ettersom meitemarken graver seg gjennom jorda produserer den slim som avsettes langs veggene i gangene den graver ut. Slimet reagerer med jorda og danner en slags sement som stabiliserer tunnelveggen, slik at tunnelene kan brukes om igjen. Ved sin gravevirksomhet gjør dessuten marken jorda porøs, og tunnelene forbedrer dreneringen av vann i jorda ned til sonen med planterøtter. Gangene vil også bedre ventilasjonen ved å lede luft ned i jorden, slik at blant annet mikroorganismer kan bryte ned det organiske materialet. Drensystemet kan øke lekkasjen av næringsstoffer, som nitrater og fosfater, ut i vann. Meitemarkgangene gjør det også lettere for plantenes røtter å ta seg frem og trenge ned. Derfor vokser plantene godt der hvor det er mye meitemark.

Meitemarkens stadige graving gjør at den tar opp og akkumulerer en del forurensningsprodukter fra jorda. Nivåer av forurensningsstoffer i meitemark kan dermed utnyttes til å overvåke forurensningssituasjonen i jorda. Siden ulike meitemarkarter trives under ulike forhold, kan artssammensetningen og mengden av meitemark også brukes til å anslå pH, komposteringsrate og andre jordproduktivitetsmål for et område.



Figur 4. Meitemark; *Eisenia andrei*

Meitemarken blir ofte brukt i tester hvor en vurderer om et pesticid kan benyttes eller ikke. Det er en veldig viktig invertebrat i jord, siden den bedrer livsgrunnlaget bl.a. for alle planter. Den økologiske rollen til meitemark, gjenspeiles også i at den er en viktig matressurs for mange rovdyr, som fugler, pattedyr, biller, frosk, fisk og lignende. Med hensyn til biomassen, er meitemarken en predominant organisme i jordfaunaen, med 10-200g våtvekt per m². Den har en relativt kort reproduksjonssyklus, hvor det tar eggene en måned for å klekkes og juvenile blir kjønnsmodne etter ca. en måned. Denne korte reproduksjonssyklusen gjør at reproduksjon er et velegnet endepunkt i kronisk toksisitetstesting.

2 Materialer og Metode

2.1 Modellstoff

α -cypermetrin som ble brukt i dette forsøket var det kommersielle produktet FASTAC som er produsert av BASF (Vedlegg 3).

2.2 Testorganisme

I dette forsøket ble meitemarkarten *Eisenia andrei* brukt som testorganisme. Dyrene som ble valgt ut til testen var voksne, mellom åtte måneder og ett år gamle, og de var kjønnsmodne, dvs at de hadde utviklet et clitellum, et belte rundt kroppen litt foran midten. De kom alle fra en synkronisert kultur med relativt homogen aldersstruktur. Alderen til individene i testgruppen varierte ikke mer enn åtte uker. Før testen begynte ble alle individene akklimatisert, og matet med den samme maten som de fikk under forsøket. Meitemarkene ble foret en gang i uken, med tørr oppmalt hestemøkk. Hver beholder fikk 5g.



Figur 5. Meitemark; *Eisenia andrei*

2.3 Jordtype

I dette forsøket ble en sandig leittleire fra Norderås i Ås kommune benyttet. Informasjon om jorden er gitt i tabell 1.

Tabell 1. Detaljer om forsøksjorden.

Jordinnhold	Sand	72,4%
	Silt	17,5%
	Leire	10,1%
Øvrige parametre	pH	5,85
	Innhold organisk materiale	7,26%
	Vanninnhold	2,67%
	Vannholdingskapasitet	35,0%
	Kationbyttekapasitet	132 mmol/kg

2.4 Prøveopparbeidelse

Kjemikaliet FASTAC (teknisk blanding), med 100 g/L, ble løst i vann og blandet inn i tørr jord. Emulgator som et additiv til den tekniske blandingen ble dampet av i avtrekkskap i 24 timer. Det ble laget fem forskjellige konsentrasjoner med α -cypermetrin i jord. Konsentrasjonene var henholdsvis 7.5, 30, 100, 300 og 1000 mg/kg. Jorden var i aluminiumsformer og glassformer mens den var i avtrekkskap. Da jorda var blitt tørr igjen, etter å ha stått i avtrekkskap, ble det veid opp 500 gram jord fra hver konsentrasjon og lagt over i egne beholdere. Fra hver konsentrasjon ble det lagd tre paralleller. Av kontrollen ble det også lagd tre paralleller.

2.5 Testmetode

Testen ble gjennomført i henhold til forslag til standardisert test laget av OECD⁶, men litt forkortet og med bruk av en annen jordtype. Det ble også bare sett på antall overlevende voksne og antall kokonger. Å se på antall juvenile og hvor mange av disse som nådde kjønnsmoden alder, ble det ikke tid til da dette ville ha krevd ytterligere 4 ukers inkubasjon.

Testbeholderne som ble brukt i denne testen var 1000 mL glassbeholdere med ventilert skrulokk. Da jorden fra prøveopparbeidelsen var blitt tørr, etter å ha stått i avtrekkskap, ble det veid opp 500 gram jord fra hver konsentrasjon. Den ble deretter tilsatt vann tilsvarende 65% av vannholdningskapasiteten, og så ble jorden lagt over i testbeholderne. Det ble lagd tre paralleller av hver konsentrasjon, samt kontrollen. I hver beholder ble det plassert ti voksne meitemark, som på forhånd var veid. Eksponeringstiden var fire uker ved 20°C.

Annet utstyr som ble brukt var Store petriskåler, vann, sil, aluminiumsbeholdere, ildfaste former, pinsett, skjeer, engangshansker og papir.

2.6 Opptelling av meitemark og kokonger

⁶ OECD, Draft test guideline 222

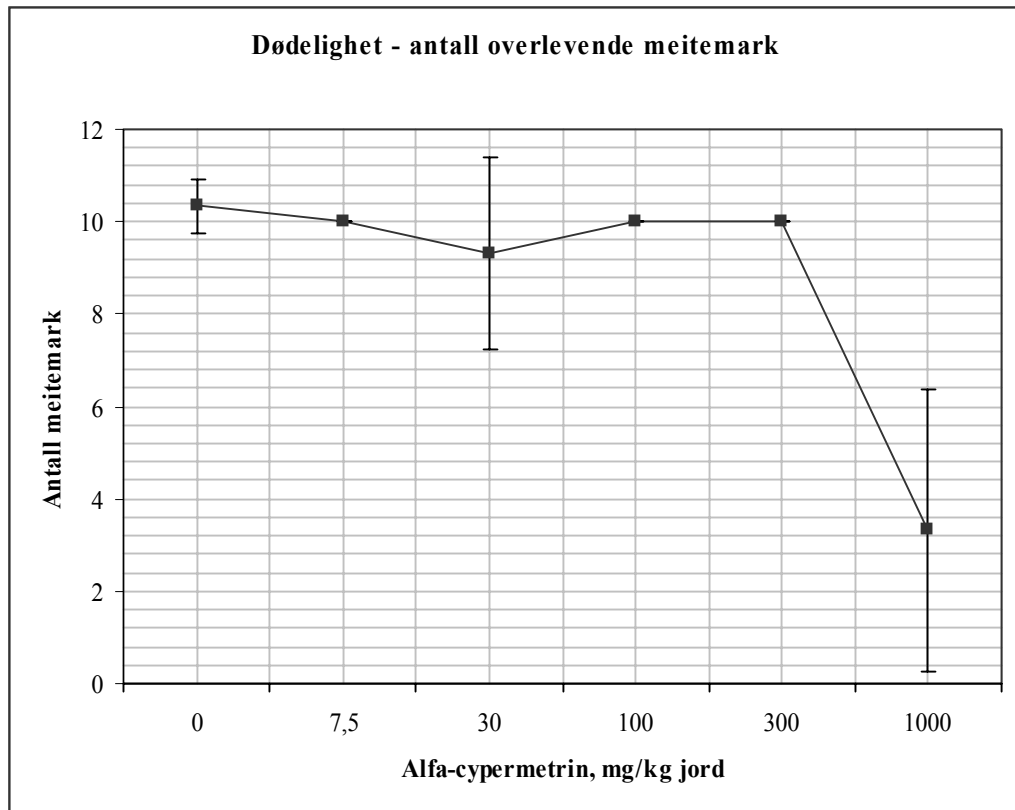
Opptellingen av meitemark gikk ut på å tømme glassbeholderne for jord litt etter litt, i glassformer. Det ble så pirket med skjeer for å finne kokongene som er på størrelse med hvetekorn. Meitemarken ble plukket ut etter hvert og telt. Etter at meitemark og kokonger var tatt ut av jordprøvene, ble jorda skylt i en sil for å være sikker på at alle kokongene var telt. Kokongene ble kastet, siden de ikke lengre var til nytte for forsøket. Meitemarken ble tatt vare på og veid.



Figur 6. Kokong

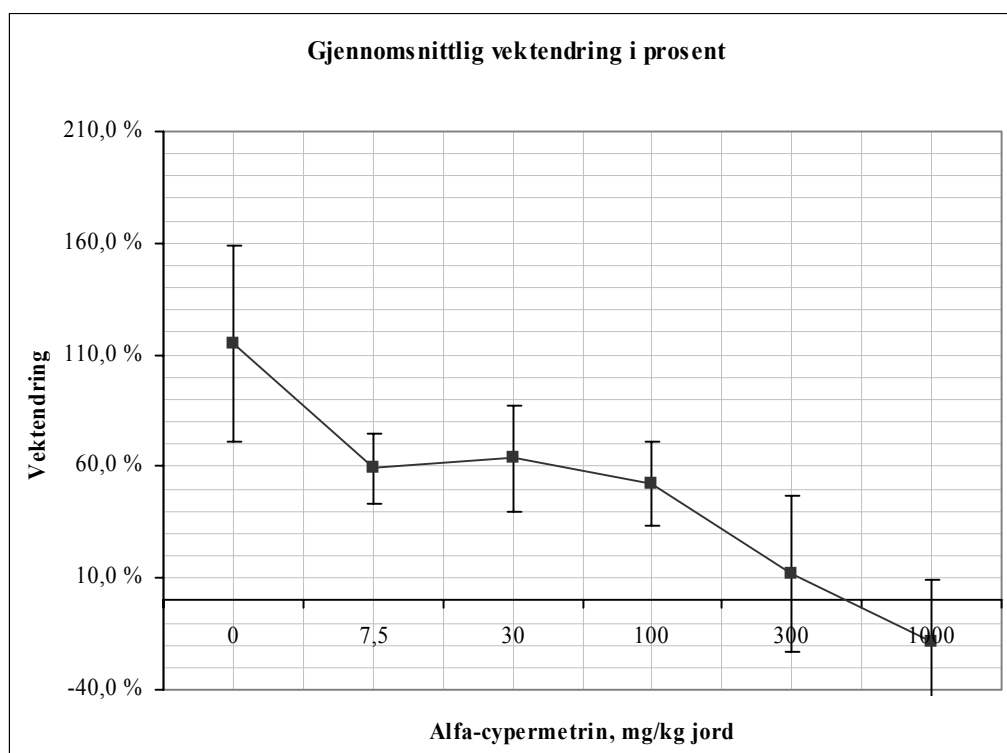
3 Resultater

For dødelighet er det ikke noe signifikant utslag før i prøven med 1000 mg/kg, (figur 7). LC₅₀ ble beregnet til 800,9 mg/kg.



Figur 7. Gjennomsnittlig antall overlevende meitemarker etter fire ukers inkubasjon.

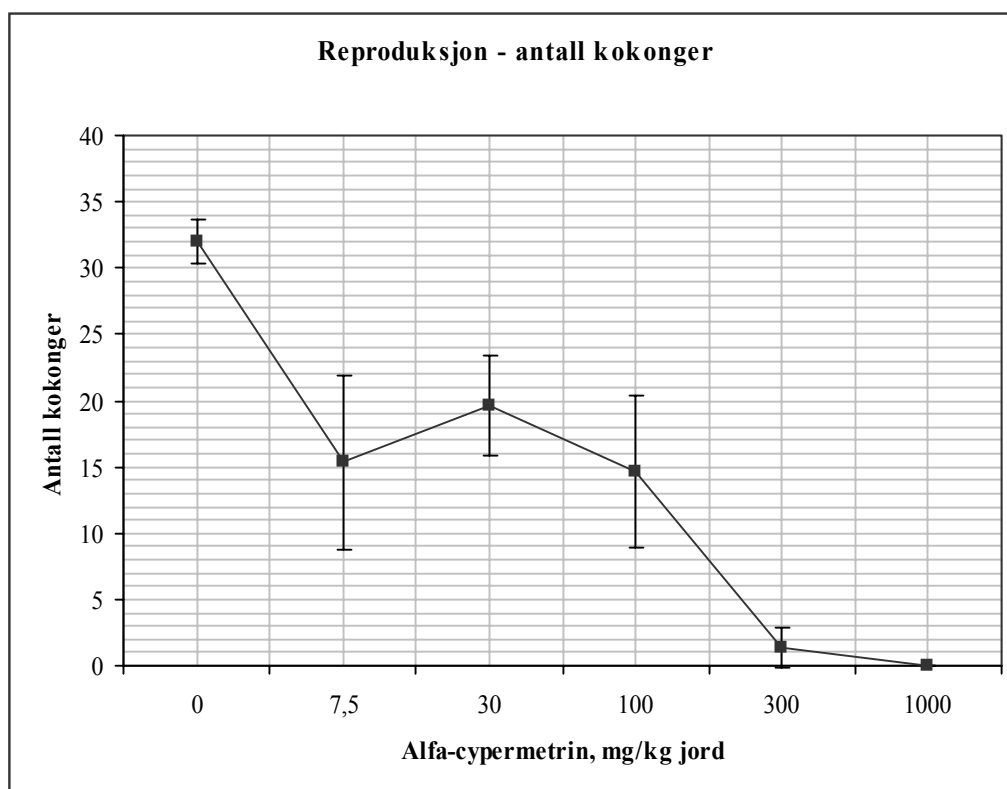
Det er en tydelig sammenheng mellom konsentrasjon av α -cypermethrin og vektendringen til meitemarkene (figur 8). Allerede ved 7,5 mg/kg er det en halvering i vektøkningen i forhold til kontrollen. Det skjer deretter ikke noen vesentlig reduksjon i vektendringen igjen før i prøven med 300 mg/kg, der er det til gjengjeld en dramatisk nedgang i vektøkningen.



Figur 8. Gjennomsnittlig vektendring hos meitemarkene etter fire ukers inkubasjon.

Det er en generell nedgang i reproduksjonen med økende konsentrasjon av α -cypermethrin. Som ved vektendringen, er det allerede i prøven med 7,5 mg/kg en halvering av antall kokonger. Ved 30 mg/kg er det en liten økning av antall kokonger, men senere fortsetter det å avta igjen, ned til 0 kokonger i prøven med 1000 mg/kg (figur 9).

NOEC, LOEC og EC-verdier for de forskjellige endepunktene er vist i tabell 2.



Figur 9. Gjennomsnittlig antall kokonger tilstede i prøvene etter fire ukers inkubasjon.

Tabell 2. Estimerte konsentrasjoner av α -cypermethrin (i mg/kg jord) som gir 50 % effekt (EC_{50}) eller 10% effekt (EC_{10}), beregnet med programmet ICp. Laveste konsentrasjon av α -cypermethrin som har en signifikant effekt (LOEC) og høyeste konsentrasjon av α -cypermethrin som ikke har noen signifikant effekt (NOEC), bestemt med statistikkprogrammet Jump fra SAS-institute (vedlegg 2).

Endepunkt	EC_{50}	NOEC	LOEC	EC_{10}
Død	800,9 mg/kg	-	-	-
Vektendring	60,11 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1,608 mg/kg
Reproduksjon	67,06 mg/kg	<7,5 mg/kg	7,5 mg/kg	1,655 mg/kg

4. Diskusjon

Ifølge våre resultater er dødeligheten hos meitemark eksponert for α -cypermetrin lav, med en estimert LC_{50} på 800,9 mg/kg jord. I den økotoksikologiske vurderingen av α -cypermetrin fra Landbruksstilsynet sies det at stoffet har en lav til moderat akutt giftighet, og at det for meitemark har en LC_{50} på over 100 mg/kg⁷. Ved bruk av α -cypermetrin i insektbekjempelse benyttes vanligvis om lag 2 g/da (mengdene spenner fra 1-6 g/da, se vedlegg 3), dette tilsvarer 2 mg α -cypermetrin pr. m². Det er vanskelig å beregne hvor høy jordkonsentrasjon det tilsvarer, da det kommer an på typen jord, og hvor langt ned α -cypermetrinen trekker, men det er ingen tvil om at det er langt unna LC_{50} -verdien. Meitemark vil altså i utgangspunktet aldri bli utsatt for så store mengder α -cypermetrin at det vil forårsake noen dødelighet. I feltforsøk er det tilført 10 g/da (tilsvarende 10 mg/m²) uten at det ga skadelig effekt⁸.

Det ser derimot ut til at α -cypermetrin har klare effekter på både reproduksjon og vektøkning ved langt lavere konsentrasjoner. Det er en betydelig effekt i både reproduksjon og vektøkning allerede ved 7,5 mg/kg jord, og EC_{50} -verdiene er på henholdsvis 67,06 mg/kg og 60,11 mg/kg. Disse verdiene ligger også godt over den mengden meitemark vil kunne eksponeres for i felten, men EC_{10} -verdiene på 1,608 mg/kg og 1,655 mg/kg for henholdsvis vektendring og reproduksjon tilsier at det er fare for en viss toksisk effekt.

En litt interessant detalj man kan merke seg er at for testen med reproduksjon som endepunkt er at effekten ved 7,5 mg/kg er større enn ved 30 mg/kg og nesten lik effekten ved 100 mg/kg. Dette kan skyldes at meitemarken responderer på stress i

⁷ Økotoksikologisk vurdering

⁸ ibid

form av lave konsentrasjoner av α -cypermetrin med å øke reproduksjonen. Dette er en vanlig respons hos mange arter, men det er umulig å si noe sikkert om det i denne studien da fenomenet ikke tilsvarer noen signifikant forskjell.

Resultatene tyder altså på en lav dødelighet, men en moderat effekt på reproduksjon og vektøkning hos meitemark utsatt for α -cypermetrin.

5. Referanser

Økotoksikologisk vurdering av α -cypermetrin, Landbrukstilsynet i Ås, 1996

World Health Organization, *Alpha-cypermethrin (environmental health criteria)*, 1992

FAO, *Residues of Some Veterinary Drugs in Animals and Foods: Monographs Prepared by the 47th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome 4-13 June 1996 (FAO Food and Nutrition Paper: 41/9)*, FAO, 1997

Jørgen Stenersen, *Kjemiske plantevernmidler*, Yrkeslitteratur as, 1988

Stephen Sheppard, John Bembridge, Martin Holmstrup, Leo Posthuma (editors), *Advances in earthworm ecotoxicology*, Society of Env. Toxicology and Chemistry (SETAC-Press), 1998

Curtis D. Klaassen, *Casarett & Doull's Toxicology, The basic science of poisons, 5th edition*, McGraw-Hill Companies Inc., New York, 1996

FIFRA Scientific Advisory Panel, *Environmental Fate Assessment of Synthetic Pyrethroids*, EPA, 1999

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), *OECD guidelines for testing of chemicals; Earthworm acute toxicity test. OECD Guideline No. 207*, OECD, 1984

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), *OECD guidelines for testing of chemicals; Draft test guideline 222: Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/andrei)*, OECD, 2000

ISO (International Standards Organization), *Soil quality: effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida/andrei). Part 2: Determination of effects on reproduction*, ISO 1996

Eline Benestad Hågvar, *Det zoologiske mangfoldet, 2. utgave*, Universitetsforlaget 1998

<http://miljolare.no/fagstoff/dyr/meitemark/>

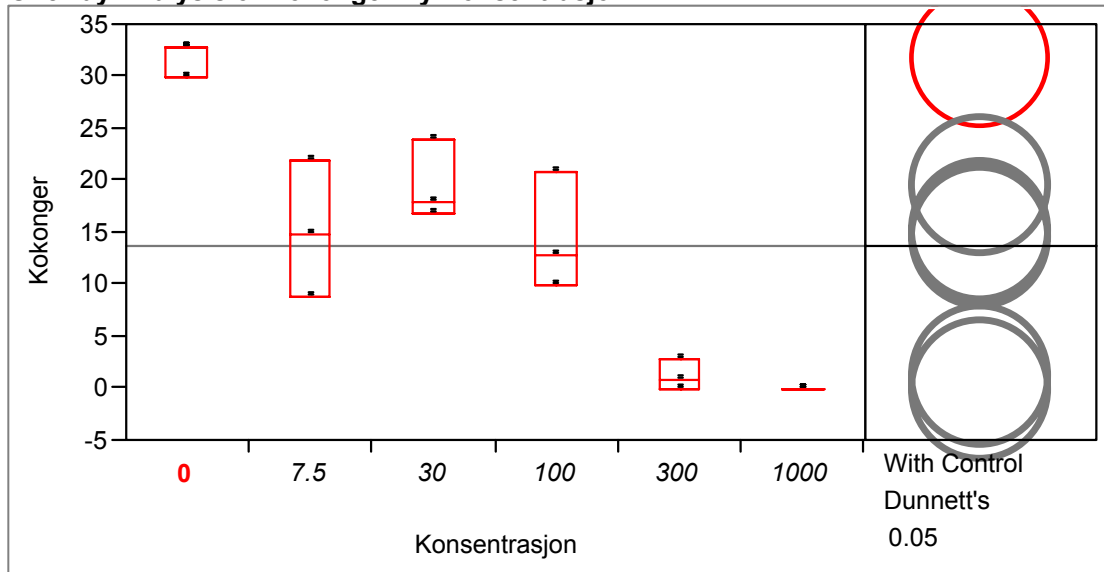
6. Vedlegg

Vedlegg 1 – Rådata

Konsentrasjon (mg/kg)	Replikat	Vekt meitemark før (g)	Vekt meitemark etter (g)	Antall meitemark etter	Antall kokonger
0	1	2,85	4,82	10	30
	2	2,46	6,31	11	33
	3	2,16	4,74	10	33
7,5	1	2,55	4,18	10	15
	2	2,48	3,51	10	22
	3	2,43	4,17	10	9
30	1	2,89	3,94	7	18
	2	2,48	4,40	10	17
	3	2,38	4,22	11	24
100	1	2,89	3,99	10	21
	2	2,38	3,47	10	13
	3	2,23	3,86	10	10
300	1	2,49	1,98	10	0
	2	2,60	2,78	10	3
	3	2,77	4,14	10	1
1000	1	2,60	2,63	6	0
	2	2,42	1,50	4	0
	3	2,49	0,00	0	0

Vedlegg 2 – Bestemmelse av NOEC- og LOEC-verdier

Oneway Analysis of Kokonger By Konsentrasjon



Quantiles

Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
0	30	30	30	33	33	33	33
7.5	9	9	9	15	22	22	22
30	17	17	17	18	24	24	24
100	10	10	10	13	21	21	21
300	0	0	0	1	3	3	3
1000	0	0	0	0	0	0	0

Means Comparisons

Dif=Mean[i]-Mean[j]	0	30	7.5	100	300	1000
0	0.0000	12.3333	16.6667	17.3333	30.6667	32.0000
30	-12.3333	0.0000	4.3333	5.0000	18.3333	19.6667
7.5	-16.6667	-4.3333	0.0000	0.6667	14.0000	15.3333
100	-17.3333	-5.0000	-0.6667	0.0000	13.3333	14.6667
300	-30.6667	-18.3333	-14.0000	-13.3333	0.0000	1.3333
1000	-32.0000	-19.6667	-15.3333	-14.6667	-1.3333	0.0000

Alpha=0.05

Comparisons with a control using Dunnett's Method

Control Group = 0

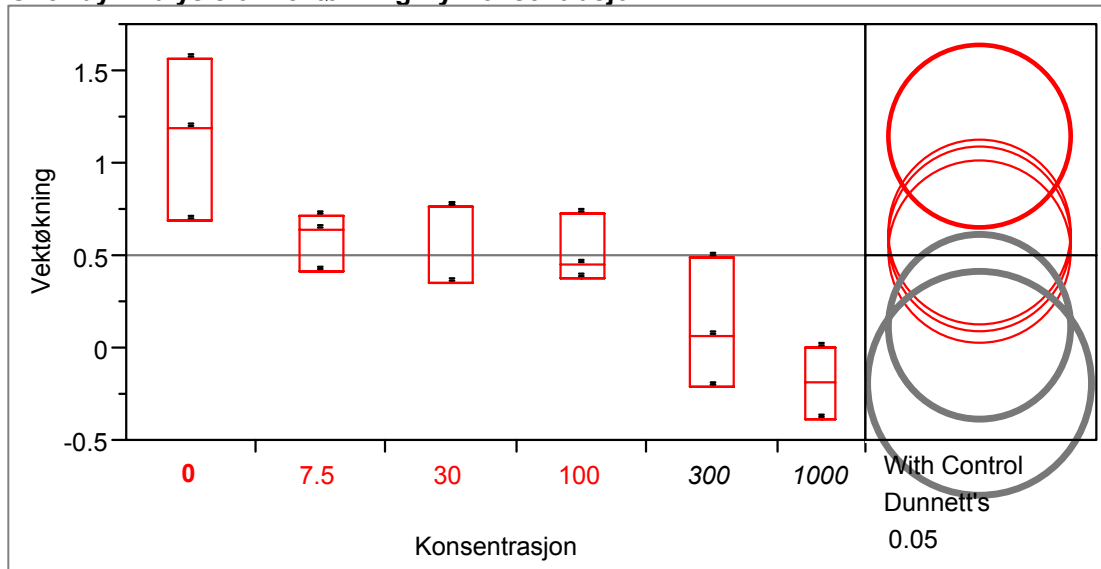
|d|
2.90139

Abs(Dif)-LSD
0 0
0 -9.3933

Abs(Dif)-LSD	0
30	2.9400
7.5	7.2734
100	7.9400
300	21.2734
1000	22.6067

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Oneway Analysis of Vektøkning By Konsentrasjon



Quantiles

Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
0	0.69	0.69	0.69	1.19	1.57	1.57	1.57
7.5	0.42	0.42	0.42	0.64	0.72	0.72	0.72
30	0.36	0.36	0.36	0.77	0.77	0.77	0.77
100	0.38	0.38	0.38	0.46	0.73	0.73	0.73
300	-0.2	-0.2	-0.2	0.07	0.49	0.49	0.49
1000	-0.38	-0.38	-0.38	-0.185	0.01	0.01	0.01

Means Comparisons

Dif=Mean[i]-Mean[j]	0	30	7.5	100	300	1000
0	0.00000	0.51667	0.55667	0.62667	1.03000	1.33500
30	-0.51667	0.00000	0.04000	0.11000	0.51333	0.81833
7.5	-0.55667	-0.04000	0.00000	0.07000	0.47333	0.77833
100	-0.62667	-0.11000	-0.07000	0.00000	0.40333	0.70833
300	-1.03000	-0.51333	-0.47333	-0.40333	0.00000	0.30500
1000	-1.33500	-0.81833	-0.77833	-0.70833	-0.30500	0.00000

Alpha=0.05

Comparisons with a control using Dunnett's Method

Control Group = 0

|d|
2.95002

Abs(Dif)-LSD	0
0	-0.70226
30	-0.1856
7.5	-0.1456
100	-0.0756

Abs(Dif)-LSD	0
300	0.327737
1000	0.549846

Positive values show pairs of means that are significantly different.

FAS TAC®

Alfacypermetrin emulsjonskonsentrat

Mot skadedyr i korn, gras, kløver, oljevekster, potet, korsblomstra førvekster, gulrot, persille, selleri, agurk, bete, ert, bønne, mais, kålvekster, løkvekster, jordbær, bringebær, solbær, stikkelsbær, rips og prydblatter i veksthus og på friland.

SAMMENSETNING: Alfacypermetrin 100 g/ltr.
Løsningsmidler 814 g/ltr.



HELSEKADELIG

ADVARSEL

Farlig ved svelging. Irriterer øynene og huden.
Farlig: Kan forårsake lungeskade ved svelging.
Unngå kontakt med huden og øynene.
Oppbevares innelåst og utilgjengelig for barn.
Ekstremt giftig for vannlevende organismer - må ikke nyttes nærmere vannførende grøfter, bekker, samt dammer og større vannforekomster enn 30 meter.
Farlig for bier og andre pollinerende insekter - må ikke brukes på eller over blomstrende vegetasjon om dagen.
Skadelig for nytteedyr.
Bruk egnet verneutstyr (se forsiktighetsregler).
Uskadeliggjør tomemballasjen (se avfallshåndtering).



BRANNFARLIG



BEHANDLINGSFRISTER: 14 dager

Avgiftsklasse: 3

Tilvirker:

BASF

Importer:

BASF Aktiengesellschaft
D-67056 Ludwigshafen, Tyskland

LAGRES FROSTFRITT

BASF AS, Leangbukta 40, Postboks 233,
NO-1372 Asker, Tel. 66 79 21 00

UN: 1993

Reg.nr. 2000.31

Nettoinnhold: **1 liter**

© Registrert varemerke for BASF AG, Tyskland

Det er forbudt å bruke Fastac i strid med godkjent bruksområde, behandlingsfrist eller å overskride den tillatte maksimale dosering / konsentrasjon.

BRUKSOMRÅDE

Fastac er tillatt brukt i korn, gras, kløver, oljevekster, potet, korsblomstra førvekster, gulrot, persille, selleri, agurk, bete, ert, bønne, mais, kålvekster, løkvekster, jordbær, bringebær, solbær, stikkelsbær, rips og prydblatter på friland og i veksthus.

Preparatet må ikke brukes i blomstrende vekster i den tid av døgnet som pollinerende insekter flyr (kl 0400 til 2300, eller kl 0600 til kl 2200 dersom temperaturen ikke overstiger 10°C).

Behandlingsfrist: Vekster til mat eller fôr må ikke behandles senere enn 14 dager før høsting.

VIRKEOMRÅDE

Fastac er et pyretroid med kontakt-, mage- og frastøtende virkning mot de fleste insekter. Preparatet er skadelig for rovmidde og nytteinsekter og har lang ettervirkning (8-12 uker). Fastac er skånsomt mot planter, men er ikke prøvd i alle mulige arter og sorter og heller ikke under alle mulige forhold. Utfor derfor en prøvesprøyting for et stort antall verdifulle planter behandles hvis det mangler erfaring med arten og sorten.

BLANDING MED ANDRE MIDLER

Fastac kan blandes med de fleste andre sprøytemidler hvis det er sammenfallende bruksområder og -tider. Bland helst ikke mer enn 2 preparater hvis ikke noe annet er anbefalt.

FORSIKTIGHETSREGLER:

Bruk kjemikaliebestandige vernehansker av PVC eller nitril gummi, øyevern, støvler og egnet arbeidstøy ved håndtering og bruk av preparatet. Ved langvarig sprøyting og når det er fare for innånding av sprøyetåke, skal overtrekksdress og halvmaske med kombinasjonsfilter A1/P2 S og L brukes. Ved tåkesprøyting skal helmaske med kombinasjonsfilter A2/P3 S og L brukes. Får man stoffet i øynene, skylt straks med store mengder vann og kontakt lege eller

Giftinformasjonssentralen. Ved svelging må ikke brekning fremkalles: Kontakt lege omgående og vis denne etiketten eller emballasjen. Søl av preparatet på hud må straks skylles eller vaskes av. Klær tilsølt med preparatet må fjernes straks. Vask hender og ansikt når arbeidet er ferdig eller avbrytes. Vask klærne når arbeidet er ferdig. Ved uhell eller mistanke om forgiftning kontakt lege eller Giftinformasjonssentralen - telefon 22 59 13 00.

Anbefalt verneutstyr må nyttes dersom en går inn i behandlet område, eller håndterer behandlede plantedeler i en periode på inntil 24 timer etter sprøyting. Hansker bør benyttes utover denne perioden.

RENGJØRING

Tomemballasjen skylles minst tre ganger med vann og innholdet tomnes i sprøyetanken. Rester fra sprøyetanken fortynnes omlag 5 ganger med vann og sprøytes ut i henhold till bruksrettleddningen. Skylt sprøyetutstyr med vann etter bruk på et sted som ikke gir avrenning til vann. Ved skifte av preparat for sprøyting i ømfintlige kulturer må sprøyetutstyret rengjøres med soda, salmiakk eller annet anbefalt vaskemiddel.

AVFALLSHÅNDTERING

Grundig rengjort tomemballasje leveres med husholdningsavfall eller deponeres på offentlig fyllplass. Konsentrerte plantevernmiddelester og ikke rengjort tomemballasje må innleveres til mottak for spesialavfall.

LAGRING:

Lagres tørt og kjølig, men frostfritt.

MERK

Det er mange faktorer som kan ha innflytelse på produktets virkning, spesielt støds- eller regionsbetingede faktorer. Herunder hører for eksempel vær- og jordforhold, kulturplantesorter, vekselbruk, behandlingstidspunkt, anvendt mengde, blanding med andre produkter, forekomst av resistente organismer, sprøyeteknikk og så videre. Ved spesielle ugunstige forhold kan man ikke utelukke at det kan skje forandringer i produktets virkning eller at det kan oppstå skader på kulturplanter. For slike forhold har ikke produsent eller forhandler noe ansvar.

Produksjonsår: 2001

02.2001.GTK.D

BRUKSRETTLEDNING

Kultur etc.	Skadeinsekter	Dose 1)	Sprøytetid m.m.
Korn	Fritflue, hveteflue, kornjordloppe	20 ml	Når kornplantene har 1-3 blad
	Minerfluer (fluer)	15 ml	Når kornplantene har 3-4 blad
	Minerfluer (larver)	45-60 ml	Holkstadiet
	Bladlus	12 ml	Ved angrep
	Trips, kornbladbille	10 ml	
	Hvetegallmygg	20 ml	
Gras	Hvitaksmidd, timoteiflue, bladlus, minerfluer, fritflue	20 ml	Sist i mai
Kløver	Kløversnutebille	20 ml	Før blomstring
Oljevekster Kålvvekster til frø	Rapsglansbille	10-20 ml	Fra tidlig knoppdanning til like før blomstring
	Jordlopper, skulpesnutebille, sommerfugllarver, nepebladveps	20 ml	Ved angrep
Potet	Potetsikade, bladlus, teger	20 ml	
Korsbl. fôrvekster	Jordlopper, sommerfugllarver, nepebladveps	20 ml	
Gulrot	Gulrotsuger (krus)	20 ml	Under spiring og 2-3 ganger til med ca. 1 ukes mellomrom
	Jordfly, andre bøddellarver, stankelbein, smellere	20 ml	Ved angrep

1) Preparatmengde pr. dekar i 20-40 liter vann hvis ikke noe annet er oppført.

BRUKSRETTLEDNING

Kultur etc.	Skadeinsekter	Dose 1)	Sprøytetid m.m.
Agurk, friland	Trips, bønneflue	20 ml	Ved angrep
Bete	Beteflue, betejordloppe		
Ert, bønne	Ertevikler, trips, bladlus		
Mais	Fritflue, kornbladbiller		
Kålvekster	Jordlopper, sommerfugllarver, kålfly, kålmøll, skyggevikler, jordfly, teger, nepebladveps m.fl.		
Løkvekster	Purremøll, trips, jordfly		
Jordbær	Jordbærsmuttbille, jordbærmjøllus, skumsikade, teger, viklere, nattflylarver	20 ml	Like før blomstring. Bruk minst 100 l væske pr. 1000 m planterad eller pr. dekar
Bringebær	Bringebærmøll	15 ml i 100 l vann	På svellende knopper
	Bringebærbille		Like før blomstring
Solbær Stikkelsbær Rips	Ripsskuddmøll		På svellende knopper
	Teger, bladlus, solbærgallmygg, stikkelsbærmåler		Like før blomstring
	Stikkelsbærbladveps		Ved angrep
Prydplanter, friland og veksthus	Bladlus (unntatt ferskenbladlus), bartrelus, skjoldlus, veksthusmjøllus (enkelte populasjoner kan være resistente), sikader, teger, trips, minerfluer, nattfly-, vikler-, sommerfugllarver m.fl.		

1) Preparatmengde pr. dekar i 20-40 liter vann hvis ikke noe annet er oppført.

PROSKJEKTOPPGAVE I TOKSIKOLOGI, BIO 241.

Studenter:

Vibeke Ansteinsson og
German Tapia.

Veilede:

Forsker Trine Eggen og
Ingeniør Geir Aaslie.

DITIONITS EFFEKTER PÅ MIKROORGANISMER I GRUNNVANN.

Forsøket ble gjennomført ved
Jordforsk ved NLH
Fredriks A. Dahls vei 20
N-1432 ÅS



INNHold:

Innledning.....	3
Beskrivelse av forsøk og resultater.....	4
Gassmålinger.....	4
FDA analyse.....	6
FDA analyse Resultater.....	6
Kimtall.....	10
Kimtall resultater.....	10
Diskusjon.....	14
Referanser.....	16

KJEMISKE REDUKTANTERS VIRKNING PÅ MIKROORGANISMER.

Forsøket ble gjennomført ved Jordforsk, NLH, 1432 Ås.

Forsøket ble gjennomført under veiledning av Trine Eggen og Geir Aasli.

Skrevet av Vibeke Elise Ansteinsson og German Tapia

Innledning:

Hensikten med dette forsøket er å fastslå Ditionits, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, effekt på mikroorganismer. Forsøkene ble gjort på en slurry med mikroorganismer (ferdig anrikt fra anaerob behandlingstrinn fra sivevann). Slurryen var ferdig lagd av Ove Bergesen ved Jordforsk. Vannet kom fra en test-reaktor på Jordforsk som simulerer en avfallsfylling.

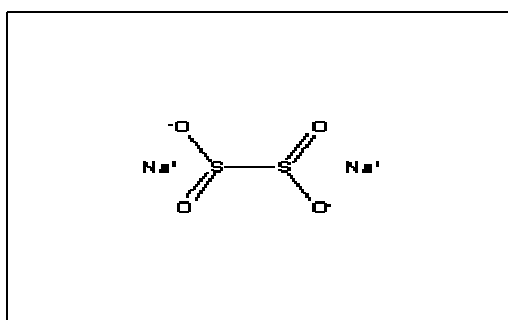


Fig 1: Strukturformel for Ditionit

Ditionit er et reduksjonsmiddel, og brukes i flere sammenhenger. Ditionit er lite stabilt og kjent for å reagere med oksygen. Ditionit er membranpasserende, noe mange andre reduksjonsmidler ikke er. Kjemiske reduktanter blir ofte brukt ved dyrking av anaerobe mikroorganismer og i forsøk som krever anaerobe betingelser. Bakgrunnen for dette er at reduktanten reagerer med oksygen og fjerner derfor grunnlaget for aerob vekst. Ditionit blir brukt til dette formålet i forskningssammenheng og i laboratoriearbeid. Ditionit blir også hyppig brukt i tekstilindustrien som blekningsmiddel. Dette blir ofte sett på som et potensielt miljøproblem siden tekstilindustrien oftest befinner seg i utviklingsland hvor det er minst kostnader, og mangelfulle miljø- og arbeidslover. Ditionit blir også brukt for å redusere metaller i jorden, denne måten å rense jord på er under stor utvikling.

På grunn av den hyppige anvendelsen av Ditionit og den manglende kunnskapen om Ditionits og andre reduksjonsmidlers effekt på miljøet og organismer, så har det i det siste blitt fokus på forskning rundt effektene av reduktanter i jord og grunnvann.

Problemstillingen vi ønsker å ta for oss i dette forsøket er:

- Hvorvidt Ditionit har effekt på mikroorganismer, anaerobt og aerobt.
- Hvordan forskjellige konsentrasjoner kan ha forskjellig effekt på mikroorganismene i prøvene.
- Hvilke effekter reduktanten kan ha på den generelle metabolismen i cellen.
- Hvor grensen går for hva som fremmer anaerob aktivitet og hva som gir celledød.
- Prøve å komme fram til en teori om hvilke mekanismer som står bak.

Beskrivelse av forsøket og resultater:

Vi laget i stand seks paralleller med fem forskjellige konsentrasjoner Ditionit tilsatt grunnvann. Konsentrasjonene tilsatt var:

- 0,00% (0.00g i 150ml)
- 0.01% (0.03g i 150ml)
- 0.10% (0.31g i 150ml)
- 1,00% (3.00g i 150ml)
- >2.50%(10.83g i 150 ml, altså 5.4%)

Vi lot prøvene stå en uke i romtemperatur. Etter 1 og 2 uker gjorde vi flere tester for å undersøke den mikrobiologiske aktiviteten i prøvene. Vi foretok:

- Gassmålinger.
- FDA (fluoroscein diacetate) analyse.
- Kintall.
- pH målinger.

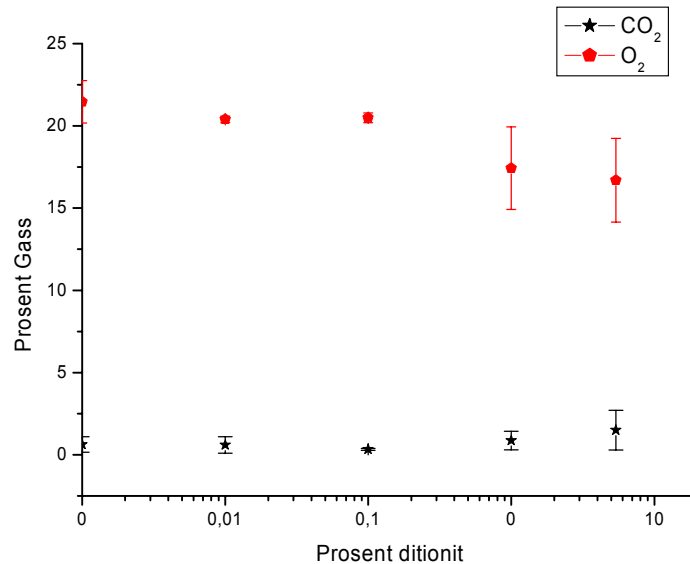
Gassmålinger:

Vi målte gassinnholdet (CH₄, O₂, CO₂) i tre prøver fra hver parallell etter at prøvene våre (med tilsatt Ditionit) hadde stått ved romtemperatur i 1 uke. CH₄ ble ikke påvist i noen av prøvene, noe som var uventet da anaerobe bakterier ofte produserer CH₄.

Konsentrasjon av Dithionitt	Karbondioksid %	Oksygen %	Gj.snitt karbondioksid	st.avvik	Gj.snitt Oksygen	st.avvik
0,00	1,00	20,00				
0,00	0,80	22,00	0,63	0,47	21,47	1,29
0,00	0,10	22,40				
0,01	0,60	20,40				
0,01	1,10	20,20	0,60	0,50	20,40	0,20
0,01	0,10	20,60				
0,10	0,30	20,80				
0,10	0,30	20,20	0,33	0,06	20,50	0,30
0,10	0,40	20,50				
1,00	1,50	14,60				
1,00	0,70	18,30	0,87	0,57	17,43	2,51
1,00	0,40	19,40				
5,40	0,40	19,30				
5,40	1,30	16,60	1,50	1,21	16,70	2,55
5,40	2,80	14,20				

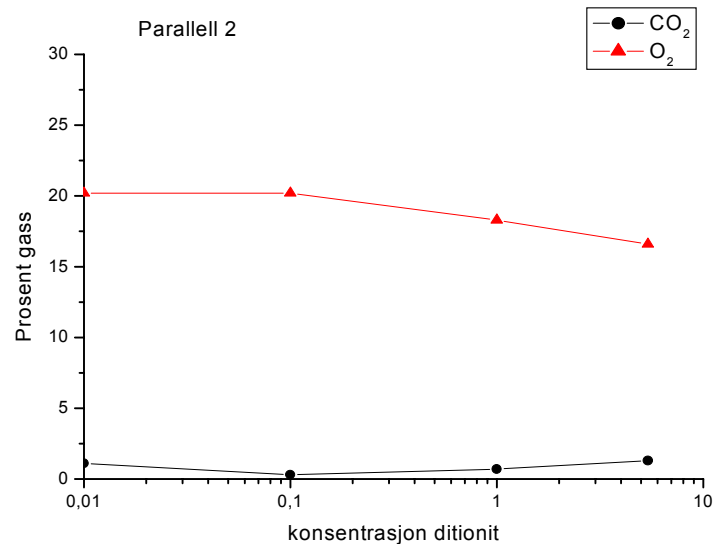
Tabell 1: Resultat fra tre parallelle gassmålinger

Vi hadde forventet å finne mer CO₂ enn det som ble målt, da dette også er typisk for anaerobe bakterier.



Figur 2: Gassprosent mot prosent tilsatt Ditionit, gj.snitt av de tre parallellene med standardavvik.

Vi ser fra figur 2 at vi får en nedgang av prosent oksygen jo mer Ditionit vi har tilsatt. Vi ser også en økning av CO₂ konsentrasjonen etter økende Ditionit. Videre så har vi plottet en av de tre parallellene, slik at denne tendensen kommer klarere fram.



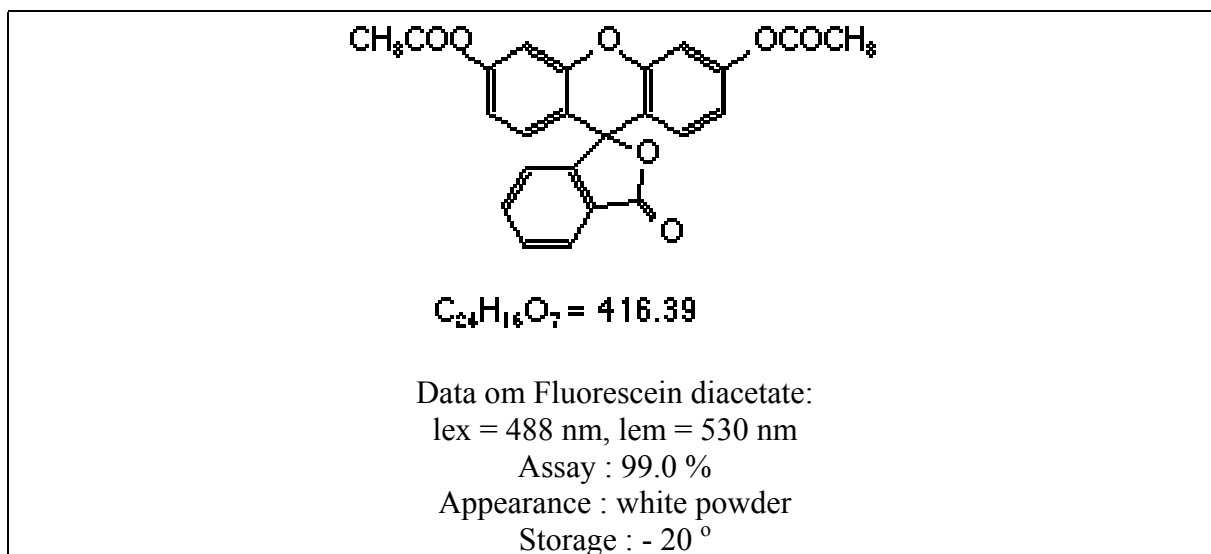
Figur 3: Prosent av gass mot prosent Ditionit for parallell 2

FDA analysen:

Forsøket: Til prøvene tilsettes FDA til en sluttkonsentrasjon på 10 µl/ml. Blandingen ristes på ristebord ved 125 rpm før suspensjonen sentrifugeres ved 6000 rpm i 20 grader i 5 min. Prøvene ble fortynnet 5X - med destillert vann før tilsetting av FDA. Som buffer brukte vi sodium fosfatbuffer pH 7,6. FDA er pH og termostabil

Bakgrunn for FDA analyse.

Måling av biologisk aktivitet i prøvene våre ble gjort ved FDA analyse. FDA Fluorescein (3', 6'-diacetylfluorescein) blir hydrolysert av en rekke enzymer, blant annet proteaser, lipaser, og esteraser. Produktet av disse enzymatiske reaksjonene er fluorescein, som kan bli målt kvantitativt ved spektrofotometri(490 nm). Denne metoden er kjent for å være lite selektiv når det kommer til biologisk aktivitet i prøven. Det er bevist fra tidligere forsøk at denne metoden er meget god for denne typen analyse av biologisk aktivitet i jordsmonn og grunnvann. Den er meget sensitiv og enkel å gjennomføre. Grad av hydrolyse øker lineært med den biologiske aktiviteten i prøven og materie tilsatt prøven. En god sammenheng vises også hvis man ser på den hydrolytiske aktiviteten og respirasjon. I forsøk finner vi at hvis dypere lag av jordsmonn ble testet finner man redusert aktivitet. FDA analysen bestemmer kun den totale aktiviteten til mikroorganismer, FDA skiller bare mellom aktiv og inaktiv biomasse.



Figur 4: Fluorescein diacetate strukturformel og data

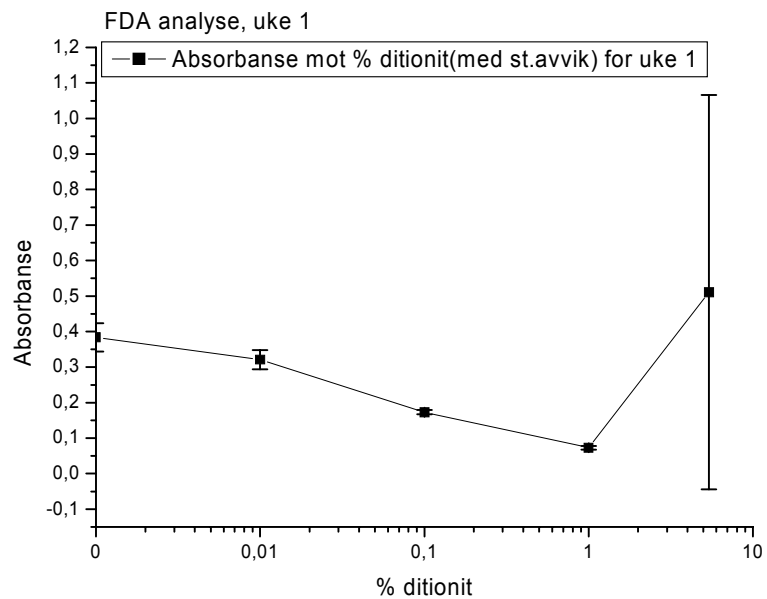
Vi målte pH for de forskjellige konsentrasjonene i uke 1. Dette har vi plottet i figur 7. Vi har ført opp resultatene fra FDA Analysen i uke 1 og 2 i tabell 2.

FDA	Uke 1			
Målt ved 490 nm				
% Ditionit	Absorbansen	pH	Gj.snitt	St.avvik
0,00	0,352	7,5		
0,00	0,370	-	0,384	0,040
0,00	0,429	-		
0,01	0,339	7,42		
0,01	0,333	-	0,321	0,027
0,01	0,290	-		
0,10	0,167	6,87		
0,10	0,177	-	0,173	0,006
0,10	0,176	-		
1,00	0,068	4,42		
1,00	0,072	-	0,073	0,005
1,00	0,078	-		
5,40	0,068	3,9		
5,40	0,332	-	0,511	0,555
5,40	1,134 ¹	7,03		

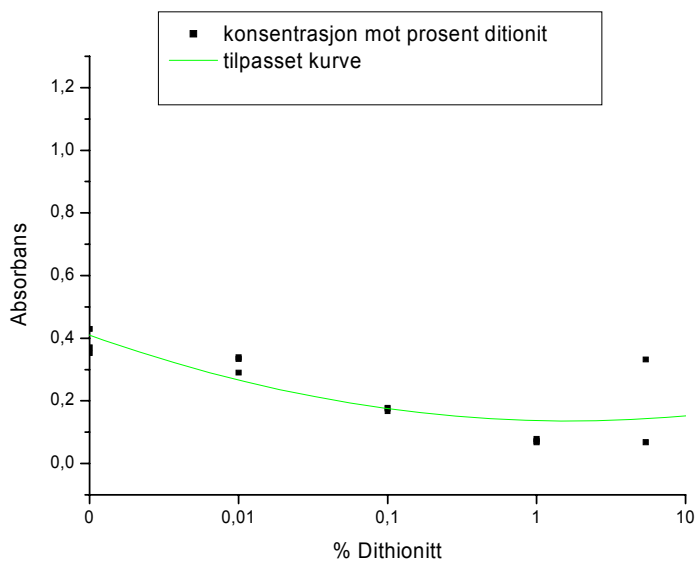
FDA	2 Uker			
Målt ved 490 nm				
% Ditionit	Absorbansen	Gj.snitt	St.avvik	
0,00	0,265			
0,00	0,314	0,302	0,033	
0,00	0,328			
0,01	0,195			
0,01	0,220	0,205	0,013	
0,01	0,200			
0,10	0,301			
0,10	0,266	0,250	0,061	
0,10	0,183			
1,00	0,083			
1,00	0,079	0,079	0,005	
1,00	0,074			
5,40	0,064			
5,40	0,066	0,065	0,001	
5,40	0,065			

Tabell 2: FDA data fra uke 1 og 2 ved forskjellige konsentrasjoner Ditionit

Vi ser at absorbansen synker med økende tilsatt Ditionit konsentrasjon. Vi ser at i uke 1 så har vi en måling¹ som avviker sterkt fra de andre. Denne målingen tror vi er feil, men vi har tatt den med i utregning av gj.snitt og standardavvik. I uke 2 så ser vi at målingene ser ut til å stemme veldig bra med de forventede resultatene. Vi har plottet absorbansen for de tre parallellene i begge ukene i figur 5 og 7.



Figur 5: Absorbance mot % Ditionit, uke 1



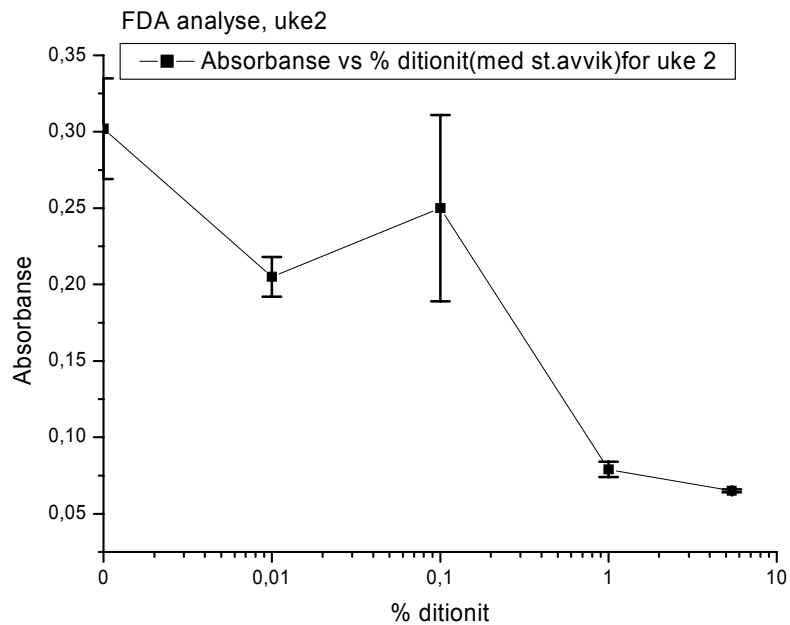
Figur 6: Tilpasset absorpsjon mot konsentrasjon Ditionit ,uke 1

Polynomial Regression for Data1_B:

$$Y = A + B1 \cdot X + B2 \cdot X^2$$

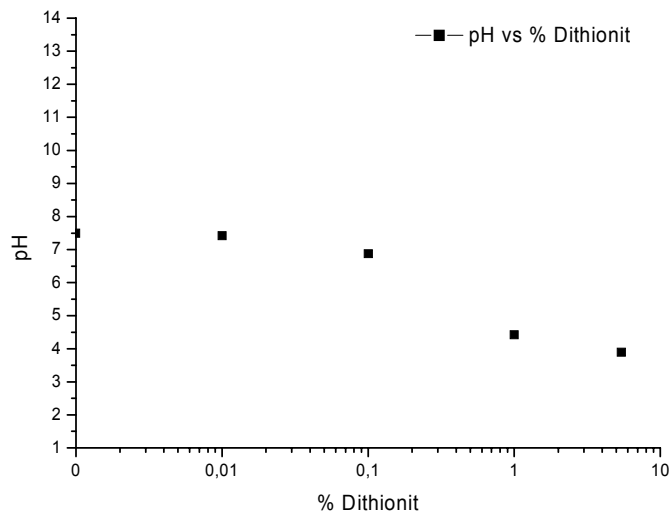
Parameter	Value	Error
A	0,13711	0,02902
B1	-0,0119	0,04001
B2	0,02634	0,01525

I figur 6 så har vi plottet absorbansdata fra uke 1 mot % Ditionit. Vi har fjernet uteliggeren (punktet som så ut il å være feil) fra plottet, og tegnet inn en tilpasset kurve med Origin. Da ser vi tydelig en nedgang i absorbansen.



Figur 7: Absorbanse mot % Ditionit, uke 2

Vi kan se fra disse grafene at vi får en klar nedgang i absorbans med økende konsentrasjon av Ditionit. Vi ser at ved 0,1 % Ditionit så er det en økning av absorbansen i den andre uken.



Figur 8: pH mot % Ditionit.

Fra figur 8 så ser vi at pH synker jevnt med økende Ditionit.

Kimtall:

Kimtall (total antall bakterier) er et uttrykk for det totale innholdet av bakterier og mikroskopiske sopp i et næringsmiddel. Det fins flere måter å beregne kimtall på. Det enkleste er å bruke et gitt område for antall kolonier der platene (petrifilmen i vårt tilfelle) er lettest å lese av. Dvs. det antallet som gir et mest riktig svar på hvor mange kolonier det faktisk er. For de platene vi brukte var dette antallet mellom 25 – 250 kolonier. Vi så på fortynningen hvor vi hadde det høyeste tallet mellom 25 og 250 i hver parallell og ganget med fortynningsgrad (for fortynningsgrad -4, så tar vi og ganger tallet med 10^4). På denne måten fant vi totalt antall bakterier.

Prøven ble gjennomført ved at vi dyrket forskjellige fortynninger av vannprøven på et egnet næringsmedium. Vi lagde en fortynningsrekke ved å ta 9 ml saltvann i 10 reagensrør. Vi tilførte 1ml prøve til reagensrør 1. Fra reagensrør 1 så tok vi 1 ml og tilførte til neste reagensrør i rekken. Denne framgangsmåten ble gjentatt videre bakover i rekken for de 10 rørene, slik at det ble økende grad av fortynning. Fortynningsgrad -1 er den minst fortynnete, fortynningsgrad -10 er den mest fortynnete. Fortynningen er da 10^{-x} , der X er fortynningsgraden. Fra disse rørene tok vi etter endt fortynning 1 ml på to petrifilmer. Petrifilmene ble deretter plassert i ett anaerobt og ett aerobt miljø. Dermed fikk vi 100 petrifilmer totalt fra de 50 reagensrørene. Den totale bakterieveksten (kimtall) ble talt etter 1 og 2 uker. Disse dataene har vi i tabellene 3 og 4.

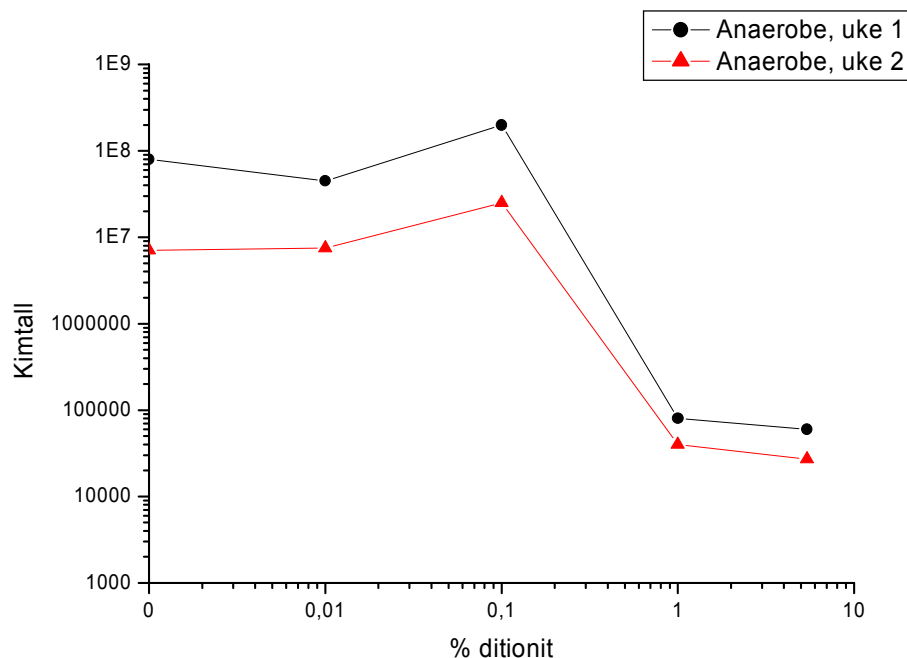
Uke1	Fortynning	Kimtall	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
	Ditionit 5.4%											
	Anaerob	6,00E+04	o.v.	450	60	9	7	4	0	3	0	0
	Aerob	1,30E+04	300	130	17	4	0	0	0	0	0	0
	Ditionit 1%											
	Anaerob	8,00E+04	o.v.	o.v.	80	13	7	6	5	4	1	0
	Aerob	1,30E+04	o.v.	130	10	9	0	0	0	0	0	0
	Ditionit 0.1%											
	Anaerob	2,00E+08	o.v.	o.v.	o.v.	o.v.	o.v.	200	25	2	0	0
	Aerob	5,40E+08	o.v.	o.v.	o.v.	o.v.	o.v.	350	54	7	0	0
	Ditionit 0.01%											
	Anaerob	4,50E+07	o.v.	o.v.	o.v.	o.v.	300	45	6	1	0	0
	Aerob	8,20E+08	o.v.	o.v.	o.v.	o.v.	o.v.	700	82	7	1	0
	Ditionit 0%											
	Anaerob	8,00E+07	o.v.	o.v.	o.v.	o.v.	450	80	5	0	0	0
	Aerob	7,50E+08	o.v.	o.v.	o.v.	o.v.	o.v.	750	75	19	0	0

Tabell 3: Kimtall for de forskjellige konsentrasjonene ved forskjellig fortynninger, uke 1

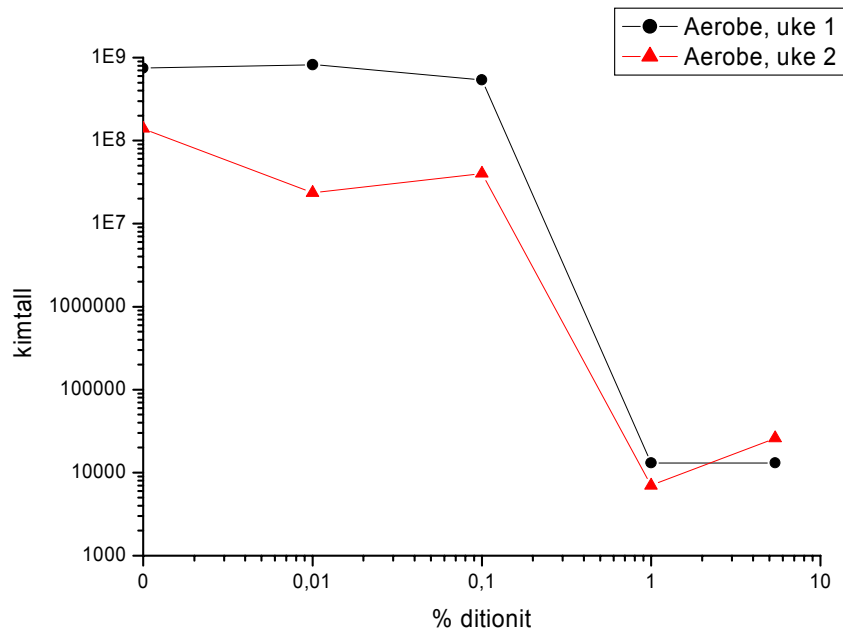
Uke2	Fortynning	Kimtall	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
	Ditionit 5.4%											
	Anaerob	2,70E+04	270	20	6	0	0	0	0	0	0	0
	Aerob	2,60E+04	260	40	7	1	0	0	0	0	0	0
	Ditionit 1%											
	Anaerob	4,00E+04	o.v	400	40	9	2	0	0	0	0	0
	Aerob	7,00E+03	o.v	70	8	4	1	0	0	0	0	0
	Ditionit 0.1%											
	Anaerob	2,50E+07	o.v	o.v	o.v	o.v	250	23	3	1	0	0
	Aerob	4,00E+07	o.v	o.v	o.v	o.v	440	40	6	3	1	0
	Ditionit 0.01%											
	Anaerob	7,50E+06	o.v	o.v	o.v	o.v	75	12	1	0	0	0
	Aerob	2,35E+07	o.v	o.v	o.v	o.v	235	20	6	1	0	0
	Ditionit 0%											
	Anaerob	7,10E+06	o.v	o.v	o.v	o.v	71	4	0	0	0	0
	Aerob	1,40E+08	o.v	o.v	o.v	o.v	900	140	18	8	1	0

Tabell 4: Kimtall for de forskjellige konsentrasjonene ved forskjellige fortynninger, uke 2

Vi ser av tabell 3 og 4 at kimtall avtar fra uke 1 til uke 2. Ved Ditionit konsentrasjoner over 1 % så trives bakterier best under anaerobe forhold. Ved for høye konsentrasjoner (>1 %) ser vi at vi får en kraftig nedgang i antall bakterier (kimtall). Ved lavere Ditionit konsentrasjoner (0,01 % og 0 %) så trives bakterier bra, både under anaerobe og aerobe forhold. Ved 0,1 % ser det ut som vi har fått en økt vekst.

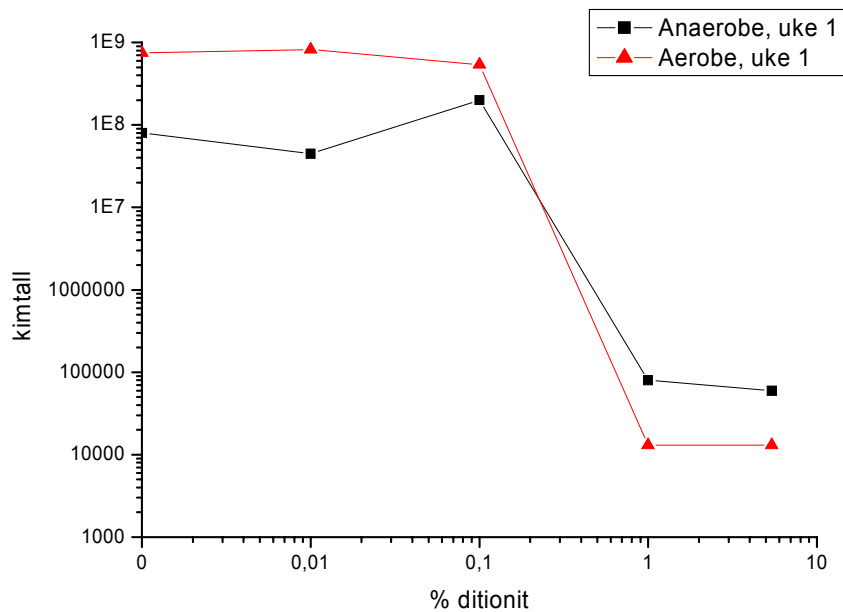


Figur 9: Kimtall mot % Ditionit for Anaerobe bakterier, uke 1 og 2

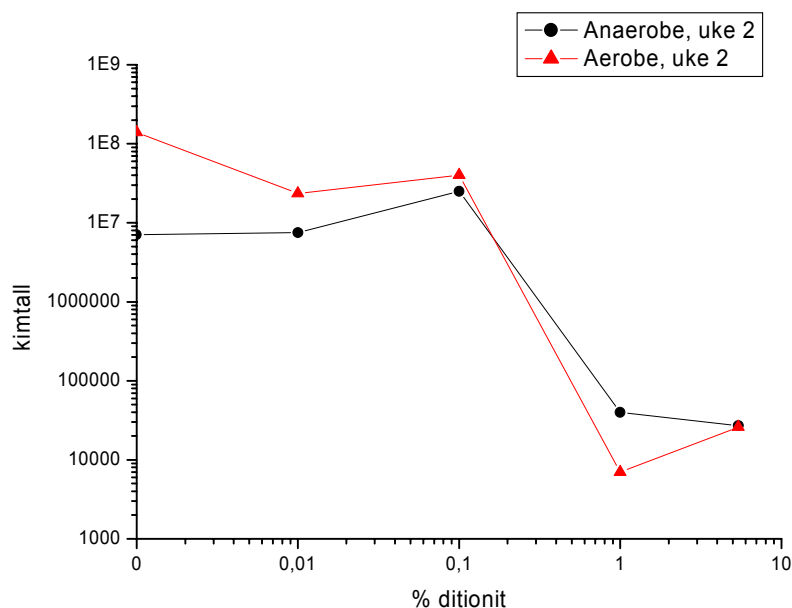


Figur 10: Kimtall mot Ditionit for Aerobe bakterier, uke 1 og 2

Vi ser en nedgang i kimtall fra uke 1 til uke 2 i figur 9 og 10.



Figur 11: Kimtall mot Ditionit for bakterier, uke 1



Figur 12: Kimtall mot Ditionit for bakterier, uke 2

Vi ser av figur 12 at kimtallet øker ved 0,1 % Ditionit i uke 2. Dette samsvarer med FDA analyse dataene for uke 2.

Diskusjon:

Vi fikk tilfredsstillende resultater. FDA analyse målingen i uke 1 på 5,4 % hadde to målinger som vi tror må ha skjedd noe feil med underveis, men ellers så stemmer alle dataene fint med hverandre. Vi gjorde ingen store feil under forsøkene som vi er klar over. Vi har all grunn til å tro at resultatene våre er pålitelige.

Fra grafene og tabellene våre så har vi kommet fram til følgende observasjoner:

- Vi ser at ved høy Ditionit konsentrasjon (5,4 %) vil veksten til bakterier bli hemmet under både anaerobe og aerobe forhold. Ved lave konsentrasjoner (eller uten Ditionit) vil bakterieantallet øke.
- Ved økt tilførsel av Ditionit blir det færre og færre bakterier i anaerobe og aerobe forhold. (med unntak av 0,1 %)
- Ditionit hemmer bakteriene mest under aerobe forhold. Bakteriene minsker derfor mest under aerobe forhold.
- Ved 1 % Ditionit og høyere er det flere bakterier under anaerobe forhold enn under aerobe forhold. Ved konsentrasjoner på 0,01 % Ditionit og lavere vokser det flere bakterier i areobe forhold enn anaerobe forhold.
- Det ser ut som 0,1 % Ditionit har en vekstfremmende effekt (i forhold til bakterieveksten ved 0,01 % og 1,00 %). Dette kan vi se ut i fra resultatene fra

kimtall beregningene og FDA data. Etter uke 1 ser vi en økning av bakterier under anaerobe forhold, ved 0,1 % Ditionit. Etter to uker ser vi den samme effekten hos bakteriene i aerobe forhold.

- pH målinger viser at vi får en sterk nedgang i pH ved økt tilsatt Ditionit.

Ut i fra disse observasjonene kan vi trekke følgende konklusjoner om Ditionits virkning på mikroorganismer;

- Ditionit har en klar reduserende effekt på mikroorganismer, både under anaerobe og aerobe forhold.
- Ditionit har mest hemmende effekt på aerobe bakterier. På grunn av Ditionits evne til å reagere med oksygen og legge til rette for anaerobe forhold.
- Vi antar at Ditionitens toksiske effekt stammer fra endringer i pH og reduksjon av viktige enzymer. For aerobe bakterier er mangel på oksygen en sannsynlig dødsårsak.
- Ditionit fører til at høy celledød ved en tilsatt konsentrasjon på 5,4 %
- Ut ifra dette kan bruken av Ditionit i riktige konsentrasjoner brukes til å rense jorden for tungmetaller og fremme mikrobiologisk vekst.

Hvorfor Ditionit har en toksisk effekt på mikroorganismer kan skyldes flere faktorer. Som nevnt i innledningen brukes Ditionit til å skape gunstige vekstforhold for anaerobe bakterier. Ditionit er et reduksjonsmiddel som har bevist sterkt innvirkning på den biologiske aktiviteten i prøvene. Årsakene til generell inhibering av vekst i celler kan deles inn i tre grupper:

1. Reduksjon av medium molekyler som kan føre til begrenset tilgjengelighet av substrat eller økning av toksisitet for forskjellige produkter.
2. modifisering av celleoverflaten, og slik påvirke transport av forskjellige stoffer inn og ut av cellen.
3. senke det intracellulære red-oks potensialet som kan påvirke dannelsen av disulfidbroer, og dermed også enzymaktivitet, eller senke kofaktor reoksidasjon.

Forsøk har tideligere vist at mikroorganismer har store problemer med å opprettholde sin intracellulære pH, grunnet økt permeabilitet for protoner. Dette kan senke den intracellulære pH og dermed ha effekt på essensielle enzymer og enzymatisk aktivitet. (punkt 3 over)

Ditionit er meget reaktivt og er membranpasserende. Det betyr at Ditionit har evnen til å gå gjennom cellulære membraner. Den er membranpasserende i større grad enn tidligere antatt og i større grad enn andre ofte brukte reduksjonsmidler. Dermed kan Ditionit lett passere inn i cellen og inn i membranbundne organeller. Ditionit kan da redusere viktige enzymer i elektrontransportkjeden. Ditionit reduserer ketoner, aldehyder, quinones og dobbeltbindinger i umettede konjugerte ketoner og diumettede syrer. Den brukes til å redusere redoks enzymer.

Quinoner fungerer som elektronakseptor i elektron transport kjeden. Hvis denne allerede er redusert, vil ikke den kunne akseptere elektroner. Elektronbærere i elektrontransport kjeden

i cellens mitokondrier genererer ATP ved hjelp av proton gradienten som dannes over matrix. Det er energien som dannes ved transport av elektroner brukes til å pumpe protoner ut av matrix og danne denne protongradienten. Denne essensielle funksjonen vil opphøre hvis reduksjonspotensialet i cellen forandres kraftig, som følge av en inhibering av elektrontransporten mellom enzymkompleksene. Hvis dette opphører som følge av nedsatt reduksjons potensial vil dette føre til at produksjonen av ATP opphører.

Proton strømmen, altså energien som er "lagret" i cellen er avhengig av to faktorer membranpotensialet og differansen i pH over membranen:

$$\Delta p = \Delta \psi - Z \Delta pH$$

$$Z = 2.3 RT/F$$

F= Faraday konstanten

$\Delta \psi$ = membranpotensialet.

R= gasskonstanten

T= temperatur i K

Δp = proton motive force

Som formelen viser vil en nedsatt ΔpH føre til nedsatt membranpotensial. Målinger gjort for å undersøke cellens proton motive force på celler med tilsatte reduktanter. Når cellen ble tilsatt Ditionite viste det seg at $\Delta \psi$ ved pH 7 var 30mV (lavt) og ved pH 4 var $\Delta \psi = 0$. Den målte pH i de forskjellige prøvene våre viser en kraftig nedgang i pH ved tilsatt Ditionit, som igjen ser ut til å ha kraftig innflytelse på cellens generelle metabolisme. Dette vil føre til at cellene etter hvert dør.

Vi kan ut i fra resultatene og observasjonene vi har gjennomført trekke noen helt klare slutninger om Ditionits virkning på mikroorganismer. Ditionit har forskjellig toksisitet ved forskjellige konsentrasjoner. Ditionit er mer toksisk er ved høye konsentrasjoner, grunnet Ditionits virkning på membranpotensialet og mangel på oksygen for aerobe mikroorganismer. Ved lavere konsentrasjoner gir Ditionit en fordel for vekst av anaerobe bakterier, i konkurransen mot aerobe.

Referanser:

D. Voet & J. G. Voet (1995) Biochemistry, second edition. John Wiley & sons, Inc.

Cox, M.M. Nelson, D.L.(2000) Lehninger Principles of Biochemistry, third edition.

Schnürer, J. Rosswall, T.(1982) Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. Applied and environmental microbiology Vol.43 No.6.

Wache, Y. Riondet, C. Diciés, C. Cachon, R. (2002) Effect of reducing agents on the acidification capacity and the proton motive force of *Lactococcus lactis* spp. *Cremoris* resting cells. Bioelectrochemistry 57 (2002) 113-118.

Cynthia J. Paul, Faruque, A.Khan, and Robert W. Puls. In-situ Remediation of Chromium-Contaminated soils and sediments using Sodium Dithionite.

Chemfinder; <http://chemfinder.cambridgesoft.com/>

Pubmed; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Blekingsprosesser; <http://www.wmich.edu/ppse/pekarovicova/160999b.html>

Produktinformasjon om sodium Ditionit fra Basf:

http://www.basf.de/en/produkte/chemikalien/anorganika/schwefel/hydrosulfit_p_sorten.htm?id=V00--Q2W-e**bsf300

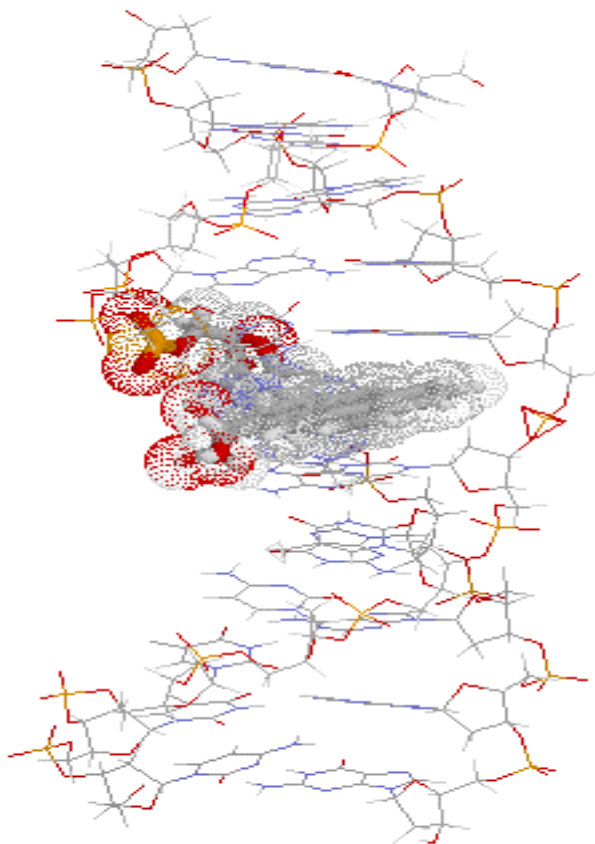
***In vitro* benzo[a]pyren adduktdannelse og kvantitativ bestemmelse**

Utført av:

Carlos Sagredo og Jorunn Kirkeleit

Veiledere:

Forsker Steinar Øvrebø og ingeniør Ingrid Botnen



**Utført ved Statens arbeidsmiljøinstitutt
April 2003**

INNHOLDSFORTEGNELSE

INNHOLDSFORTEGNELSE	110
1. INNLEDNING	111
1.1 EKSPONERING	111
1.2 HELSESKADELIGE EFFEKTER.....	112
1.2.1 Toksikokinetikk	112
1.2.2 Toksikodynamikk	128
1.3 BIOLOGISK MONITORERING AV EKSPONERING FOR PAH.....	129
1.3.1 Mulige biomarkører for PAH	130
1.3.2 Benzo[a]pyren addukter på DNA som biomarkør.....	130
1.4 MÅL MED UNDERSØKELSEN	130
2. MATERIALE OG METODE.....	131
2.1 MATERIALE	131
2.1.1 Kjemikalier	131
2.1.2 HPLC-utstyr.....	131
2.2 METODER	132
2.2.1 Tillaging av kalve tymus DNA løsning.....	132
2.2.2 Dannelse av DNA-addukter.....	133
2.2.3 Isolering av DNA-addukter	133
2.2.4 Syrehydrolyse av DNA-addukter	133
2.2.5 Tillaging av standardløsning.....	133
2.2.6 HPLC analyse	134
3. RESULTATER OG DISKUSJON	135
3.1 BESTEMMELSE AV BPDE I OG BPDE II	135
3.2 KVANTITERING AV BPDE I OG BPDE II	136
3.3 OM METODEN	137
3.4 FEILKILDER.....	137
4. REFERANSER	138
APPENDIKS A	141
APPENDIKS B.....	142

1. INNLEDNING

Polysykliske hydrokarboner (PAH) er en stor gruppe av organiske forbindelser med to eller flere ringer. Ved romtemperatur er PAH et fast stoff. Generelle egenskaper som er felles for stoffgruppen er høyt smelte- og kokepunkt og lavt damptrykk. Videre har PAH-forbindelser generelt en lav vannløselighet som avtar med økende molekylvekt, og høy fettløselighet som øker med økende kompleksitet av molekylet [se IPCS, 1998;Boström *et al.* 2002].

1.1 Eksponering

PAH dannes hovedsakelig som et resultat av pyrolytiske prosesser, særlig under ufullstendig forbrenning av fossilt eller organisk materiale. Viktige eksponeringskilder for PAH er fra brenning av ved og kull, biltrafikk og andre forbrenningsreaksjoner. Den generelle befolkning eksponeres for PAH gjennom innpusting av forurenset uteluft, ved inntak av mat (grillet/stekt) og drikke og gjennom røyking. Arbeidstakere eksponeres i tillegg for PAH gjennom flere typer av industriforetak (koks- og aluminiumsverk, petroleumsindustrien, asfaltarbeidere, gummi-industri, feiere m.v.).

Man har identifisert flere hundre PAH-forbindelser, noe som gjør at det ikke er praktisk mulig å analysere og kvantitere alle. Det har derfor vært vanlig å prioritere et antall PAH-forbindelser, særlig de som er kreftfremkallende. Det finnes ingen internasjonal enighet om hvilke individuelle forbindelser som skal prioriteres ved måling av PAH-eksponering. Dette skyldes blant annet at sammensetningen av PAH-forbindelsene i utslippet varierer med type industri. Siden endringer i parametre for forbrenningsprosessen (temperatur, tilgang på oksygen, etc.) vil resultere i variasjon i type, mengde og fysisk status av PAH-forbindelsene i blandingen [Goss & Schwarzenbach, 1998], vil utslippsprofilen også kunne variere innen en type industri. Som en tommelfingerregel har det vært foreslått at PAH-forbindelser med to eller tre ringer hoved-sakelig forekommer i gassfase, PAH-forbindelser med fire ringer

forekommer i både gass og partikkelfase, mens PAHer med fem eller seks ringer hovedsakelig er bundet til partikler [Baek *et al.* 1991].

PAH-forbindelsen benzo[a]pyren (BP) har vært mye benyttet som en indikator på PAH-eksponering. Årsaken til dette er at den er kreftfremkallende ved at den metaboliseres til den ultimate karsinogene forbindelsen, diolepoksidet BP-7,8-diol-9,10-epoksid I (se senere). Denne metabolitten er en elektrofil forbindelse som reagerer med nukleofile seter i DNA, og danner addukter, som kan føre til mutasjoner og kreft.

1.2 Helseskadelige effekter

1.2.1 Toksikokinetikk

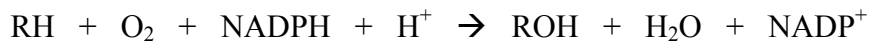
PAH-forbindelser tas opp gjennom både lunger, magetarmsystemet og hud hos pattedyr, og fordeles likt i organismen uavhengig av administrasjonsvei. Detekterbare nivå av BP kan måles i de fleste organer fra minutter til timer etter administrasjon, med høyeste nivå i lever [Foth *et al.* 1988; IARC, 1983]. PAH-forbindelsene er lipofile, og fettvevet er derfor et viktig depot for disse [Modica *et al.* 1983]. På grunn av den hurtige metabolismen finner det imidlertid ikke sted en betydelig akkumulering av PAH-forbindelser. Hovedparten av metabolisert BP skilles ut gjennom feces, uavhengig av administrasjonsvei [Foth *et al.* 1988;van de Wiel *et al.*1993].

Biotransformasjonen (metabolismen) av xenobiotika (fremmedstoffer) som f.eks PAHer, deles inn i to faser [Klaassen, 2001;Timbrell, 2000]. I fase I reaksjonen, med oksidasjon, reduksjon og hydrolyse, vil enzymer gjøre fremmedstoffet mer polart ved å innføre funksjonelle grupper som –OH, - NH₂, -SH eller –COOH. I fase II reaksjonen vil enzymer konjugere den innførte gruppen fra fase I og øke polariteten og dermed vannløseligheten av metabolitten ytterligere. Typiske konjugeringsreaksjoner er sulfatering, glucoronidering, acetylering, glutation-konjugering, aminosyre-konjugering og metylering. Acetylering og

metylering avviker fra de andre konjugeringene ved at metabolittene blir mindre vannløselige.

De viktigste enzymene ved biotransformeringen av PAH forbindelser inngår i cytokrom P450-superfamilien, underlagt fase I enzymene. CYP-enzymene er intracellulære transmembran-proteiner, med hoveddelen vendt ut mot cytoplasma. Størst konsentrasjon finner man i endoplasmatiske retikulum, som danner et omfattende nettverk i cellen. CYP-enzymene finnes i nesten alle humane vev, med høyest konsentrasjon i lever.

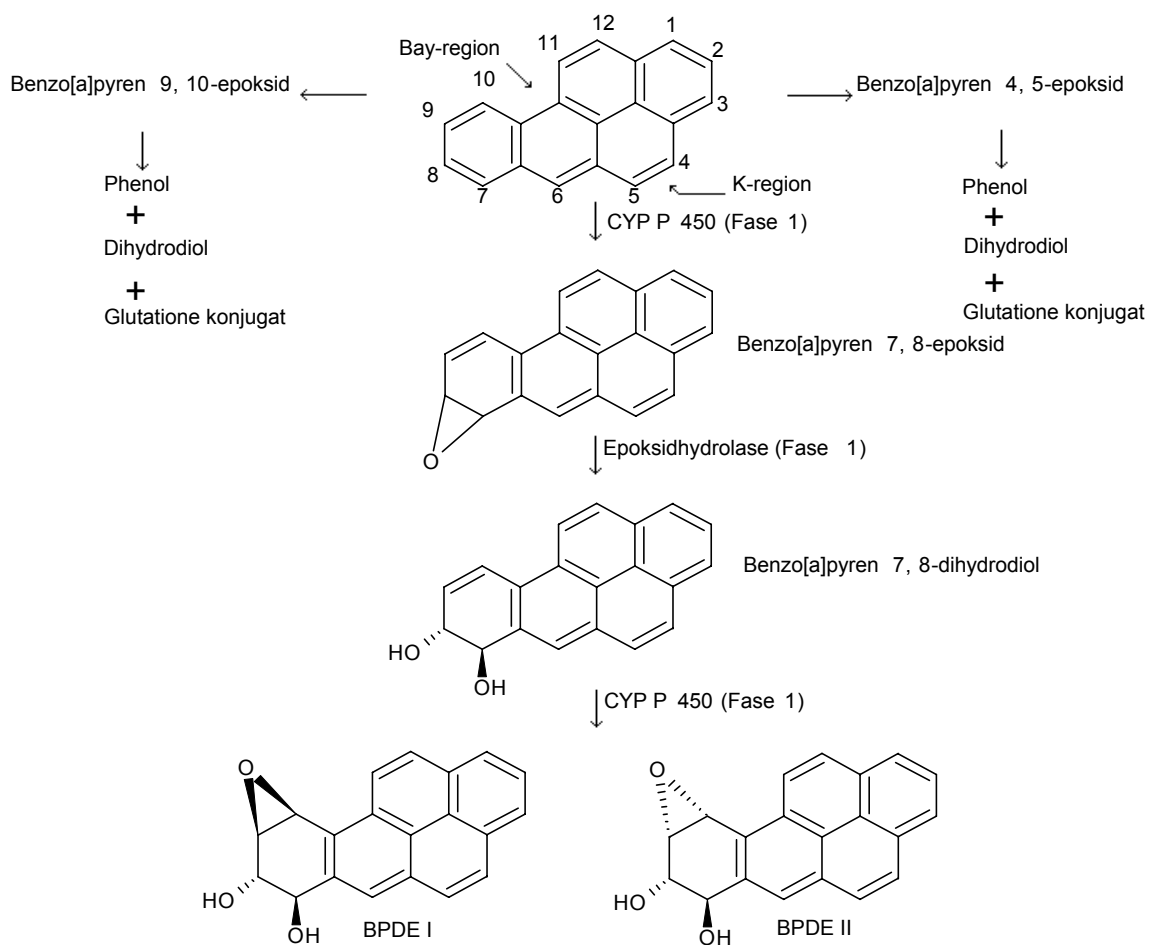
Den generelle oksidasjonsreaksjonen for CYP-enzymene er :



Substratet bindes først til et hydrofobt område ved jern-protoporfyrinstrukturen, og muliggjør reduksjon av Fe^{3+} til Fe^{2+} vha. NADPH reduktasen. Det dannes videre et oksygenkompleks med Fe^{2+} , og etter ytterligere en reduksjon og addering av et proton, får man spaltning av vann og til slutt en spaltning av det oksiderte substratet.

Epoksidhydrolase er et annet viktig fase I enzym. Dette enzymet finnes også i de fleste humane vev, og hydroliserer primært epoksider til *trans*-dihydrodioler.

I flere omfattende studier av BP, som inkluderte syntese av metabolitter og stabilitetstudier av disse, blant annet ved bruk av rene cytokrom P-450 og epoksidhydrolase enzymsystemer, har man langt på vei kartlagt det metabolske reaksjonsmønstrer til BP (se figur 1).



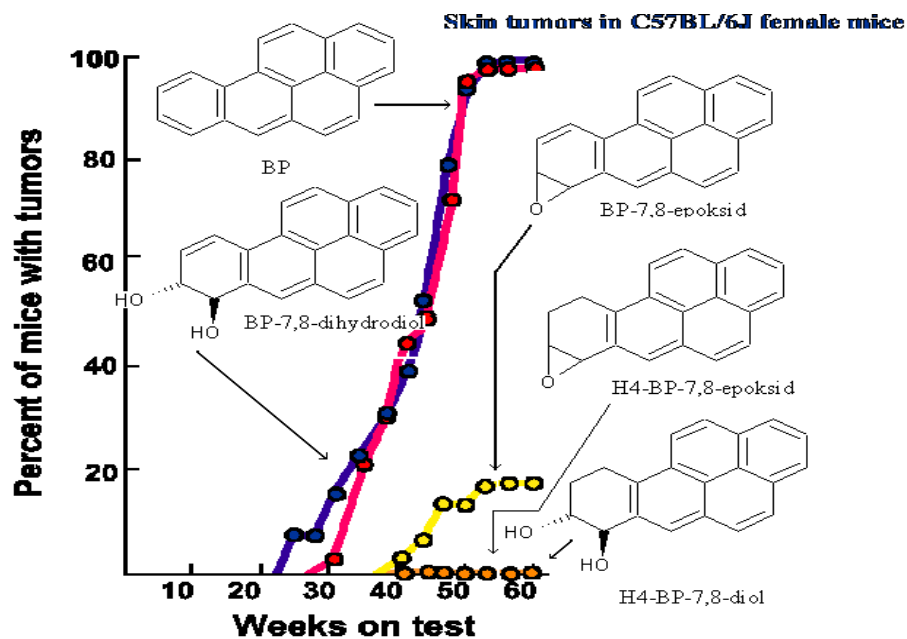
Figur 1 Metabolisme av BP. Dannelsen av det ultimate karsionegenet

På grunn av delokalisering av elektronene i det aromatiske ringsystemet er BP et veldig stabilt og lite reaktivt molekyl. Elektrontettheten fordeler seg noe ulikt i molekylet, hvilket har gitt opphav til to interessante regioner. K regionen mellom karbonatom 4 og 5 er den mest elektronrike regionen, men også "bay"-regionen mellom karbon 9 og 12, med karbon 10 som det aktive sete, er elektronrikt. Begge disse områdene vil være mer tilbøyelige for metabolsk aktivitet. "Bay"-regionen er videre unik ved at den i større grad vil være sterisk skjermet for enzymer som epoksidhydrolase eller konjugeringer.

I første trinn (Fase I), vil CYP 450-enzymene oksidere BP til 4,5-, 7,8- eller 9,10-epoksid. Bindingene kan deretter hydrolyseres til fenol og dihydrodiol, og videre konjugeres med sulfotransferase eller glukuronsyre (se figur 1). Dette siste trinnet (Fase II) vil altså gi vannløselige forbindelser som raskt skilles ut. Enzymene som katalyserer

biotransformasjonen av BP er stereo og regionsspesifikke, slik at BPDE I og BPDE II er stereoisomere der betegnelsen *cis* og *trans* beskriver retningen på epoksidet (opp eller ned), med retningen på 7-OH som referanse.

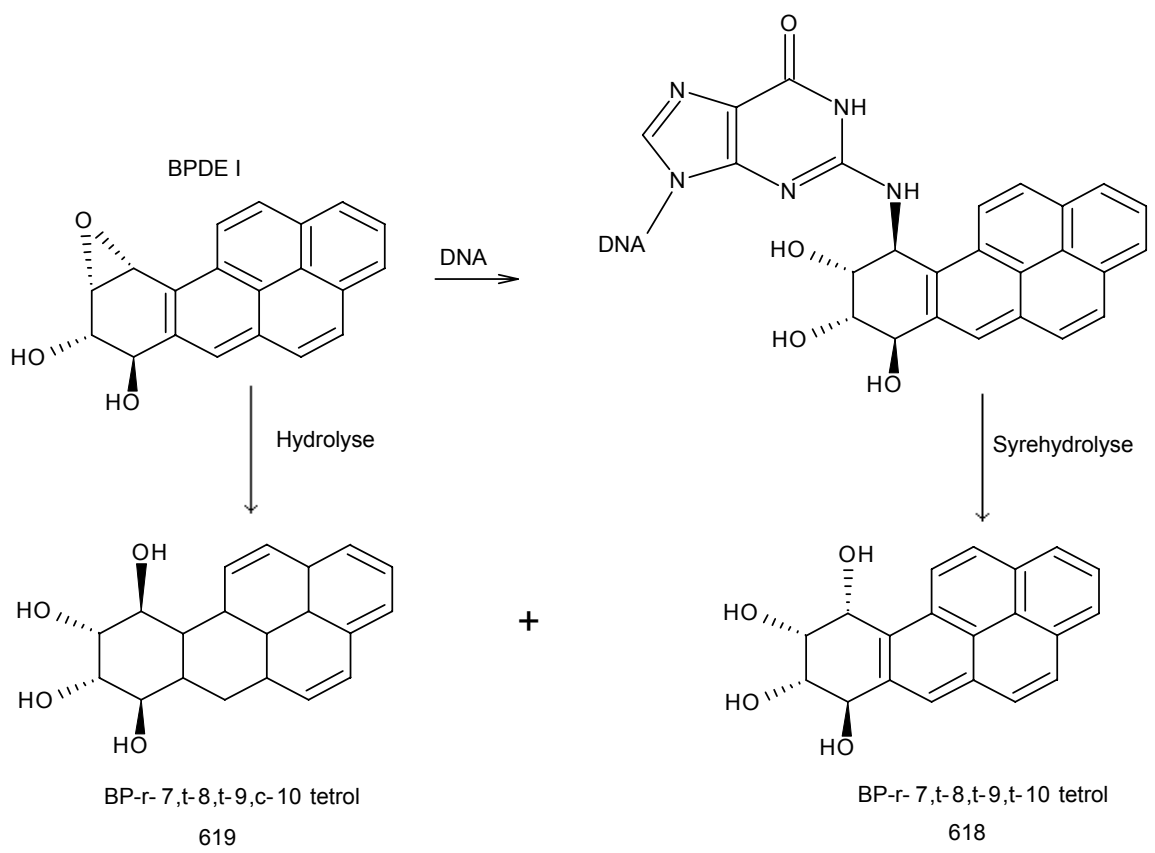
I *in vivo* og *in vitro* forsøk har man videre bestemt mutagenisitet og karsinogenisitet til de ulike metabolittene, og funnet det antatte ultimate karsinogenet (se figur 2).



Figur 2 I forsøket ble 0,15 μmol av stoffene penslet på huden til mus en gang annenhver uke i en periode på 60 uker. [Conney, 1982. Figuren er modifisert og er hentet fra Øvrebøs BIO241-forelesning].

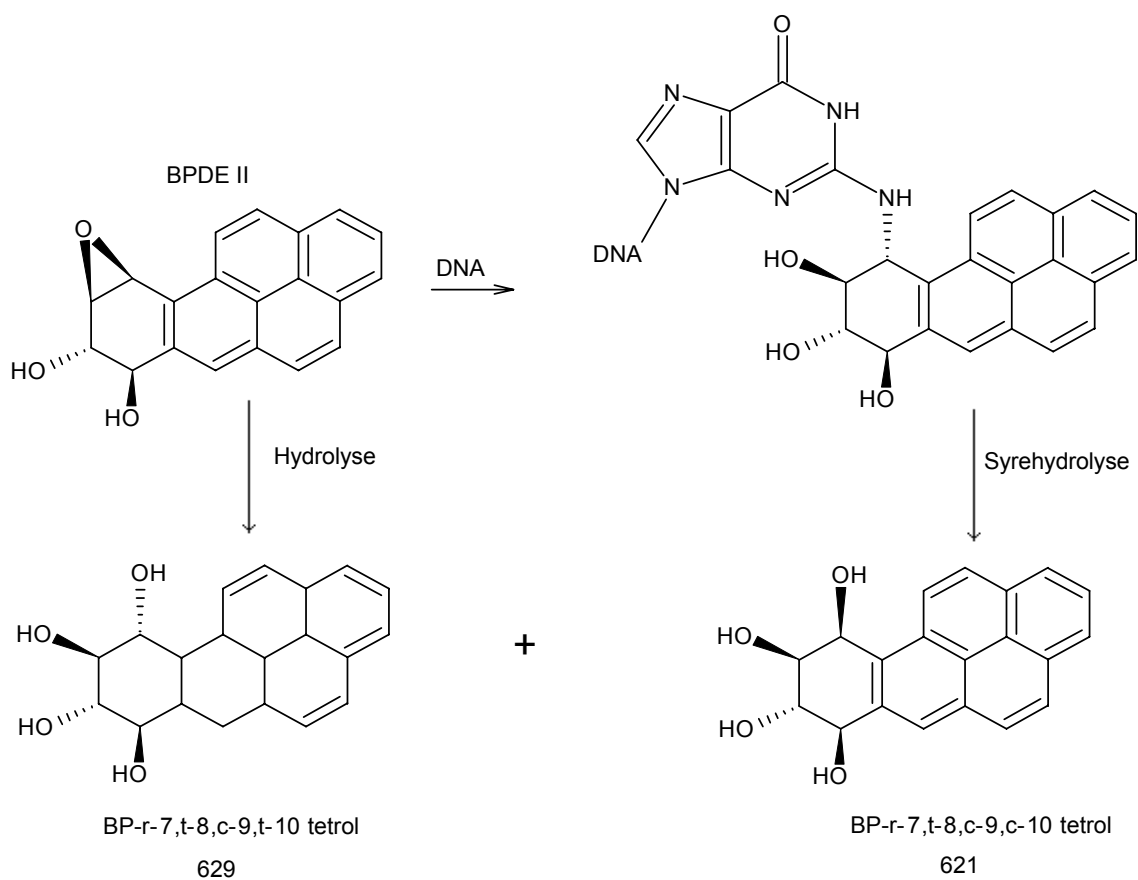
Den høye karsinogene aktiviteten til BP-7-8-dihydrodiol og BP-7,8-epoksid er en sterk indikasjon på at det er metabolitten BP-7,8-diol-9,10-epoksid som er det ultimate karsinogenet. Diol-epoksidene i seg selv er kjemisk veldig lite stabile, og dermed vanskelige å benytte i slike forsøk. Det er blitt antatt at dannelsen av en epoksidgruppe i "bay"-regionen, som medfører en sterisk hindring for epoksidhydrolasen og dermed en økt stabilitet for diol-epoksidet, gjør metabolitten til det ultimate karsinogenet.

Reaktive og elektrofile PAH-metabolitter, som BP-diolepoksidene, kan binde seg kovalent til nukleofile seter i DNA og danne PAH-DNA addukter. Binding til DNA skjer hovedsakelig ved addisjon av OH-gruppen i C10 i diolepoksidet til N2, N7 eller den eksosykliske aminogruppen i guanin (se figur 3). Et DNA-addukt kan føre til en mutasjon som kan være et første trinn i utviklingen av kreft. Diolepoksidene, og da særlig BPDE I, anses for å være den mest mutagene og karsinogene BP-metabolitten.



Figur 3 BPDE I og dannelse av DNA addukter, hydrolyse av BPDE I og syrehydrolyse av BP-DNA addukt.

Slik figur 3 viser vil BPDE I enten danne et DNA addukt med for eksempel guanin, eller hydrolyseres av vann til 619 og 618 tetroler. Ved en vanlig syrehydrolyse av BP-DNA adduktet spaltes bindingen til den eksosykliske aminogruppen, med dannelse av både 618 og 619 tetroler. Tilsvarende vil BPDE II (se figur 4) danne et DNA addukt, eller hydrolyseres til 621 og 629 tetroler. Ved en vanlig syrehydrolyse av DNA adduktet vil det bli dannet både 621 og 629 tetroler.



Figur 4 BPDE I og dannelse av DNA addukter, hydrolyse av BPDE II og syrehydrolyse av BP-DNA addukt.

1.2.2 Toksikodynamikk

Det finnes lite informasjon om helseskader etter eksponering for *enkeltforbindelser* av PAH. Tilgjengelige data rapporterer bare om helseskader etter eksponering for en blanding av

PAH-forbindelser, og epidemiologiske studier og dyreforsøk har vist at PAH er kreftfremkallende.

Sir Percival Pott fant allerede i 1775 en sammenheng mellom kreft i pungen og eksponering for sot blant feiere [Pott, 1775], mens von Volkman [1875] rapporterte om økt insidens av hudkreft blant arbeidere i kulltjære-industrien. Basert på epidemiologiske undersøkelser har IARC klassifisert flere typer av industriproduksjon (bl.a. koksverk og aluminiumsverk) som kreftfremkallende og basert på dyreforsøk er flere enkeltstoffer, som BP, klassifisert som kreftfremkallende [IARC, 1983]. En har funnet øket forekomst av kreft i både lunge, blære og hud ved PAH eksponering.

Den mest siterte kvantitative risikovurderingen for PAH [WHO, 1987:1989:2000] baserer seg på en risikovurdering av PAH-eksponering med hensyn på lungekreft blant arbeidere på koksverk [US EPA, 1984]. BP ble brukt som en indikatorforbindelse og det ble beregnet en livstidsrisiko på $8,7 \times 10^{-5}$ per ng BP/m³. Det ble beregnet at tilsvarende BP-konsentrasjoner på 1,2, 0,12 og 0,012 ng/m³ ga en ekvivalent livstidskreftisiko på 1:10 000, 1:100 000 og 1:1 000 000.

Forsøk på dyr har også vist toksisk effekt både på hud (fotosensibilisering), reproduksjonssystem, bloddannende system og lever ved eksponering for høye nivåer av PAH. Flere PAH forbindelser har også vist en immuntoksisk effekt og/eller gentoksisk effekt [se IPCS, 1998].

1.3 Biologisk monitorering av eksponering for PAH

Biologisk monitorering av eksponering for kjemiske stoffer i arbeidslivet brukes til å vurdere intern eksponering av arbeidstakeren (intern dose) med en biologisk metode.

Biologisk monitorering av eksponering er et supplement til luftmålinger.

Biomonitorering baserer seg på analyse av en markør, ofte kalt biomarkør, som kan være stoffet selv, metabolitter, protein- og DNA-addukter, utskillelsesprodukter, m.v.,

i biologisk materiale. Det biologiske materiale er som oftest blod og urin, men utåndingsluft, avføring, hår, negler etc. benyttes også.

1.3.1 Mulige biomarkører for PAH

Det har vært utviklet flere metoder for biomonitorering av PAH-eksponering. Vanlige metoder har vært bestemmelse av PAH og metabolitter av PAH-forbindelser i urin og blod, måling av gentoksisk aktivitet i urin og feces, kromosomaberrasjoner og søsterkromatid-utbyttinger i perifere lymfocytter i blod, samt dannelse av addukter på DNA, RNA og proteiner. For mer informasjon om disse, se oversiktsartiklene til Jacob & Seidel, 2002, Jongeneelen, 1997 og Dor *et al.* 1999.

1.3.2 Benzo[a]pyren addukter på DNA som biomarkør

BP er kreftfremkallende og brukes ofte som en indikatorforbindelse for PAH-fraksjonen både med hensyn på luftmålinger og ved biomonitorering. BP er den eneste enkelt PAH-forbindelsen som har vært testet med hensyn på kreftfremkallende effekt ved inhalasjon [WHO, 2000].

En av metodene som benyttes ved biomonitorering av eksponering for PAH er kromatografisk separasjon, kombinert med spektrofotometrisk fluorescensdeteksjon. I metoden utnyttes de fluorescerende egenskapene til BP og BPs metabolitter [Vahakangas *et al.* 1985; se dell'Omo & Lauwerys, 1993], og metoden er derfor spesifikk for BP. Deteksjonsgrensen er 1 addukt per 10^7 nukleotide.

1.4 Mål med undersøkelsen

Målet med undersøkelsen er å lage BP-DNA addukter *in vitro* og kvantitativt bestemme mengden som er dannet med hjelp av HPLC-fluorescens. Adduktene vil bli dannet ved å blande DNA fra kalvetymus med BP-metabolittene BPDE I og BPDE II.

2. MATERIALE OG METODE

2.1 Materiale

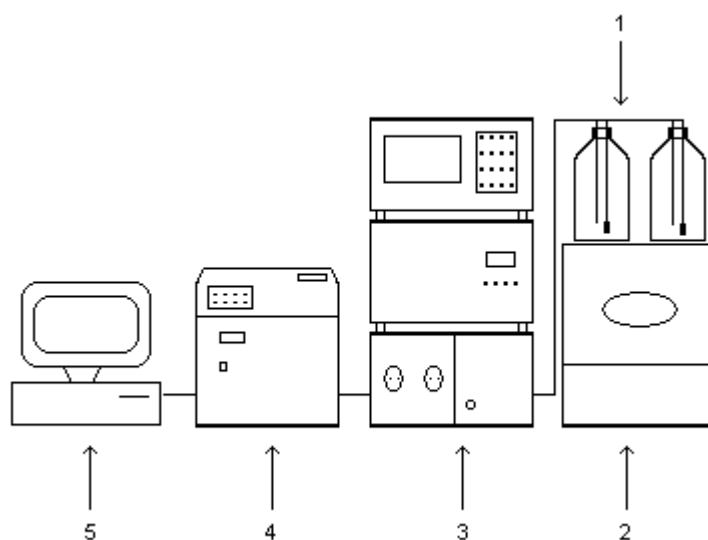
2.1.1 Kjemikalier

Benzo[a]pyren-diolepoksid I og II (98 % renhet) ble kjøpt fra National Cancer Institute (NCI), Chemical Carcinogen Repository, Mid west Research Institute, Kansas City, MI, USA.

Calf Thymus DNA (høymodifisert), EDTA (99 % renhet) og Trizmabase (TRIS, 99,9+ % renhet) ble levert av Sigma, USA. Metanol (HPLC kvalitet) ble kjøpt fra Fluka, Sveits. Dietyleter (99,5 % renhet), isoamylalkohol (98 % renhet), NaCl og HCl ble levert av Merck, Tyskland. Sep-Pak C₁₈ ekstraksjonskolonner kom Waters, USA. N₂ ble levert av AGA, Norge. Det ble benyttet destillert vann fra et Millipore Elix S renseanlegg under hele forsøket.

2.1.2 HPLC-utstyr

Det kromatografiske systemet bestod av en Waters 625 LC pumpe koblet med en Waters 717 autoinjektor, en kolonneovn (Waters), og en LC 240 fluorescens detektor fra Perkin Elmer. Analysene ble gjort på en Nova-pak C₁₈ kolonne (3,9 x 150 mm) pakket med 4 µm partikler. Systemet var koplet til PC med software for data behandling og styring av instrumentene. For oppsett av utstyr, se figur 5.



Figur 5 HPLC systemet. 1) Mobilfase reservoarene 2) Autoinjektor 3) Pumpe 4) Fluorescens detektor 5) PC-kontroll

2.2 Metoder

2.2.1 Tillaging av kalve tymus DNA løsning

Det ble laget en standard DNA løsning ved å først veie ut 0,001 g Calf Thymus DNA, og deretter løse denne i en 10 mL vandig buffer bestående av 10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA pH 8 løsning. Ved henstand over natten i kjøleskap var tilsatt DNA løst opp.

2.2.2 Dannelse av DNA-addukter

Det ble laget to løsninger med DNA-benzo[a]pyren addukter ved å blande sammen 1 mL 0,1 mg/mL Calf Thymus DNA med hhv 10 µL 0,04 mg/mL BPDE I og 10 µL 0,04 mg/mL BPDE II. Reaksjonsblandningene ble inkubert over natten i romtemperatur i mørket.

2.2.3 Isolering av DNA-addukter

De to DNA-addukt løsningene ble ekstrahert med like volum vannmettet dietyleter (8x), og deretter med like volum vannmettet isoamylalkohol (4x). Det ble videre tilsatt 20 µL 5 M NaCl løsning til en endelig konsentrasjon på ca. 100 mM NaCl, og DNA-adduktene ble felt ut med 2,5 volum iskald etanol (-20 °C). Løsningene ble sentrifugert og bunnfallet vasket med 70 % etanol.

2.2.4 Syrehydrolyse av DNA-addukter

Bunnfallet fra isoleringen av DNA-addukter ble løst opp i 900 µL 10 mM TRIS-HCl/1 mM EDTA, pH 8 og tilsatt 100 µL 1 M HCl. Løsningene ble deretter inkubert i 3 timer ved 70 °C.

2.2.5 Fastfase ekstraksjon (SPE)

En Sep-Pak C₁₈ kolonne ble kondisjonert med 5 mL metanol, og vasket med 10 mL vann. Prøven ble applisert, kolonnen vasket med 10 mL vann, og prøven eluert med 5 mL metanol. Eluatet ble dampet inn til tørrhet ved 45 °C under gjennomstrømning av N₂ gass, og deretter løst opp i 50 µL metanol og tilsatt 450 µL vann. Prøvene ble oppbevart ved 4 °C i påvente av HPLC analyse.

2.2.5 Tillaging av standardløsning

For å kunne identifisere og kvantifisere tetrolene ble det benyttet en blanding med kjent konsentrasjon av de fire tetrolene: 618, 619, 621 og 629 (se appendix B).

2.2.6 HPLC analyse

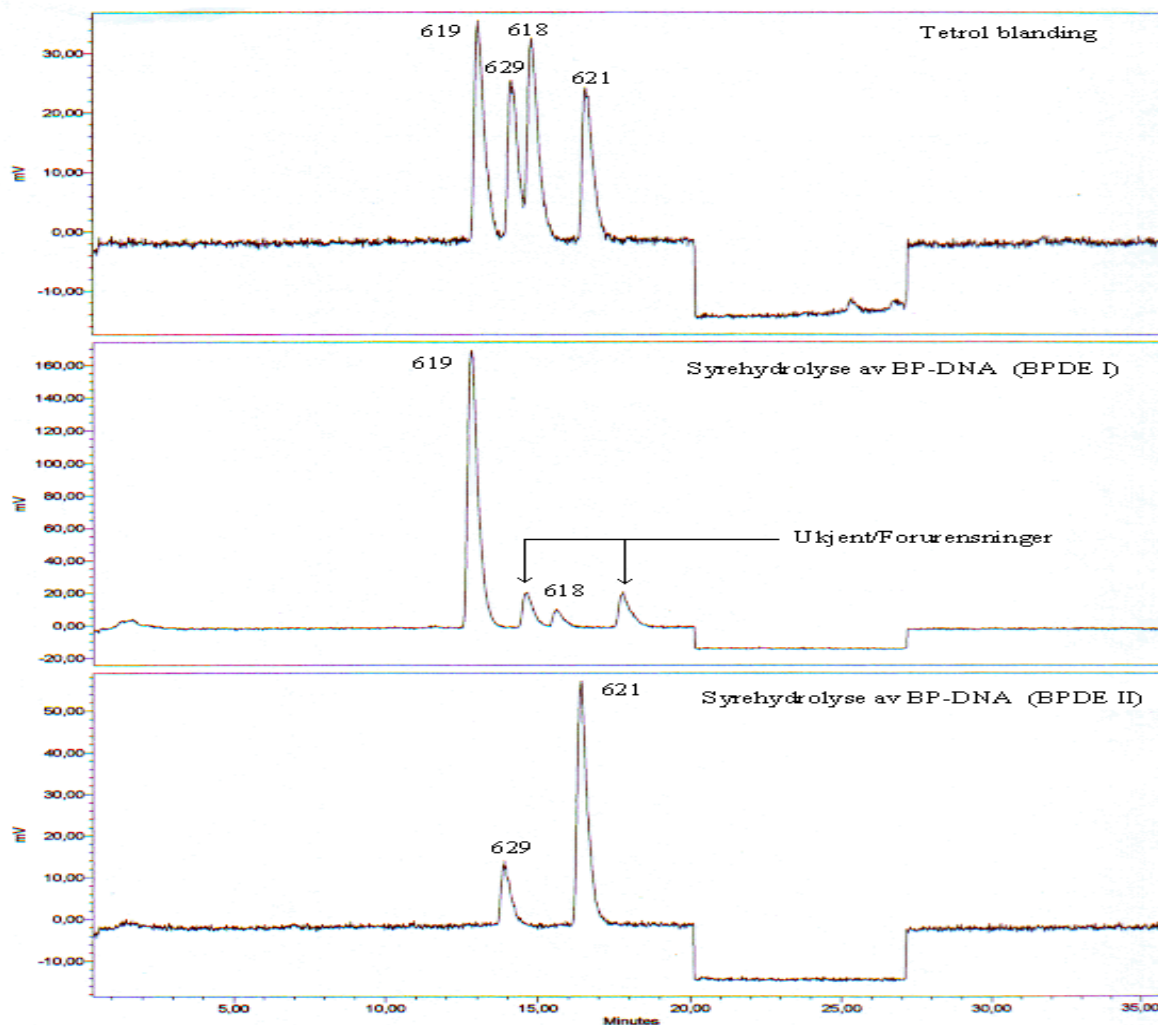
HPLC (high performance liquid chromatography) er en kromatografisk separasjonsteknikk som benytter en mobilfase (væske) og en stasjonærfase (fast stoff) til å separere komponentene i en blanding. Fordelingen mellom stasjonærfase og mobilfase for et gitt stoff er karakteristisk ved gitte betingelser som mobilfase sammensetting, ionestyrke, pH, mobilfasehastighet, type stasjonærfase og temperatur. Det er denne fordelingen som bestemmer retensjonstiden for stoffet, og dermed hvordan komponentene i en blanding separeres over tid. For å separere tetrolene, som er hydrofobe og lite vannløselige forbindelser, benyttes HPLC med omvendt fase prinsipp, dvs stasjonærfasen (kolonnen) er hydrofob og ikke-polar, og mobilfasen er hydrofil og polar. Upolare stoffer vil elueres langsommere enn polare stoffer under slike betingelser, men ved å variere mobilfase sammensetningen slik at mobilfasen blir mer hydrofob kan retensjonstiden i kolonnen for de upolare stoffene reduseres. Dette muliggjør en separasjon av stoffer med ulike grad av polaritet innenfor et rimelig tidsrom. Redusert vann- og øket metanolinnhold i mobilfasen vil altså gi en lavere retensjonstid for tetrolene. Metoden benyttet i dette forsøket er utviklet av forskere ved Statens arbeidsmiljøinstitutt for å separere komplekse blandinger med tetroler, trioler, dioler, benzo[a]pyren og polare konjugater. Deteksjonen av stoffene gjøres vha fluorescens, som er en veldig selektiv og følsom deteksjonsteknikk. For oppsett av utstyr, se figur 5.

Det ble injisert 200 µL hver av prøve og standarder inn i det kromatografiske systemet vha autoinjektor. Mobilfasehastigheten var under hele analysen på 1 ml/min, og det ble benyttet en gradienteluering (øket metanolinnhold i mobilfasen) med en total analysetid for hver kjøring på 70 minutter. Se appendiks A for gradientelueringens programmet. Temperaturen var konstant 40 °C over kolonnen og deteksjonen ble gjort med fluorescens med en eksitasjonsbølglengden lik 341 nm og en emisjonsbølglengden lik 381 nm.

3. RESULTATER OG DISKUSJON

3.1 Bestemmelse av BPDE I og BPDE II

Figur 6 viser kromatogrammene for BP-tetrolene. Elueringsrekkefølgen er karakteristisk og konstant ved mobilfasebetingelsene, kolonnen og temperaturen benyttet i denne oppgaven. Man ser at tetrolen 619 kommer først, så følger 629, 618 og til slutt 621. Topp høyde (i mV) og areal (mV*s) er bestemt av konsentrasjonene til stoffene.



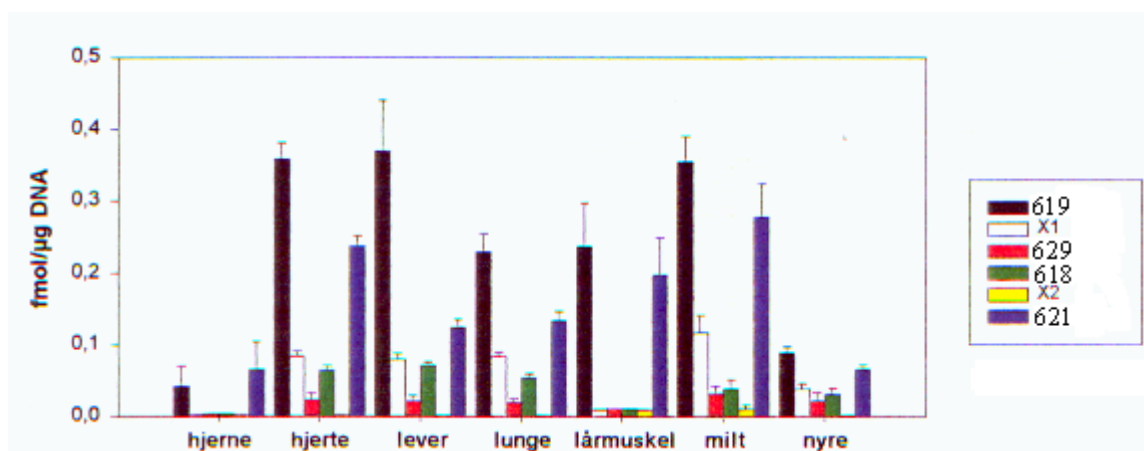
Figur 6. Kromatogram av en standard tetrolblanding (øverst), syrehydrolysatet av BPDE I-DNA adduktet (midten), og syrehydrolysatet av BPDE II-DNA adduktet (nederst)

3.2 Kvantitering av BPDE I og BPDE II

Av de 127 220 fmol BPDE I og BPDE II (dvs. 1272,20 fmol pr μg DNA) som ble blandet med DNA fra kalvetymus, gjenfant vi 253,3 fmol BPDE I og 101,6 fmol BPDE II bundet til DNA som addukter (pr μg DNA). Dette tilsvarer henholdsvis 20 og 8 %. For beregninger se appendix B.

BPDE I dannet altså 2,5 ganger flere addukter enn BPDE II. Kjemisk sett er BPDE II mer ustabil, og derfor mer reaktiv, enn BPDE I. Man kan derfor forvente at BPDE II i større grad enn BPDE I hydrolyseres av vann før den når DNA.

Adduktdannelsen vil være langt lavere *in vivo*. I et *in vivo*-forsøk ble Wistar hannrotter eksponert for 100 mg BaP/kg intraperitonalt og avlivet etter tre dager [Nordheim, 1999]. DNA ble isolert fra vev fra hjerne, hjerte, lever, lunger, lårmuskel, milt og nyre. BP-tetroler ble ekstrahert fra prøvene og detektert ved HPLC-analyse med fluorescensdeteksjon. Resultatet er vist i figur 7, og viser fordeling av BP-tetroler i DNA-prøvene fra de ulike organene. Den høyeste konsentrasjonen som ble målt var $< 0,4$ fmol BPDE I/ μg DNA i lever.



Figur 7 Konsentrasjonen av BP-tetroler i DNA-prøver fra ulike organer fra rotte [Nordheim, 1999].

3.3 Om metoden

Fordelen med bruk av HPLC med fluorescensdeteksjon er at den er robust, effektiv, spesifikk og gir mulighet til en høy grad av automatisering. Den er imidlertid ikke følsom nok for deteksjon av BP-addukter hos mennesker.

Det finnes også andre metoder som benyttes for kvantitering av DNA-addukter, som:

- **P³² ettermerkingsmetoden [se Beach & Gupta, 1992]. Immunoassayet detekterer total aromatiske DNA-addukter. Ofte benyttes hvite blodlegemer som surrogat for mål-DNA. Ettermerkingsmetoden har en lav deteksjonsgrense (1 addukt per 10¹⁰ nukleotide), men er uspesifikk [Øvrebø *et al.* 1994].**
- **Immunologiske metoder. Metodene baserer seg på reaksjonen mellom antigen og spesifikke antistoffer. For PAH brukes antistoffer som reagerer med epoksider, og da særlig BPDE. Deteksjonsgrensen for USERIA (Ultra Sensitive Enzyme RadioImmuno Assay) og ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) er henholdsvis 2 og 1-4 addukter per 10⁸ nukleotide [se Santella, 1988; se Dor *et al.* 1999].**

Resultater fra forsøk hvor disse tre metodene er benyttet korrelerer svært sjelden med hverandre. En av årsakene til dette er at de ikke detekterer de samme forbindelsene. Videre, de forskjellige trinnene i metodene (som preparering og ekstraksjon av DNA, vasking, merking m.v) er vanskelige og krever erfaring. Standardisering og interkalibrering av disse metodene er derfor nødvendig før resultatene fra de forskjellige metodene kan sammenlignes.

3.4 Feilkilder

I denne undersøkelsen er det flere aktuelle feilkilder, som ved veiing av kjemikalier, ved utmåling av volum og i samtlige ekstraksjonstrinn. Ekstraksjon av ureagerte tetroler kan for eksempel ha forårsaket både tap av DNA og at DNA ikke ble rensset godt nok opp.

4. REFERANSER

Baek SO, Field RA, Goldstone ME, Kirk PW, Lester JN, Perry R. A review of atmospheric polycyclic hydrocarbons: sources, fate and behaviour. *Water Air Soil Pollut.* 1991;60:279-300.

Beach AC, Gupta RC. Human biomonitoring and the 32P-postlabeling assay. *Carcinogenesis* 1992;13(7):1053-74.

Bostrøm C-E, Gerde P, Hanberg A. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Env Health Persp.* 2002;110 (suppl. 3);451-485.

Conney AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 1982;42(12):4875-917.

dell'Omo M, Lauwerys RR. Adducts to macromolecules in the biological monitoring of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Crit Rev Toxicol.* 1993;23(2);111-26.

Dor F, Dab W, Empereur-Bissonnet A, Zmirou D. Validity of biomarkers in environmental health studies: the case of PAHs and benzene. *Crit Rev Toxicol.* 1999;29(2);129-168.

Foth H et al. Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food Chem Toxicol.* 1988;26;45-51.

Goss KU, Schwarzenbach RP. Gas/solid and gas/liquid partitioning of organic compounds: critical evaluation of the interpretation of equilibrium constants. *Environ Sci Technol.* 1998;32;2025-2032.

International Agency of Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Polynuclear aromatic compounds, Part 1. Chemical, environmental and experimental data. 1983: Volume 32.
<http://monographs.iarc.fr/htdocs/indexes/vol32index.html>

International Programme on Chemical Safety (IPCS). Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. World Health Organization, Geneva. 1998: Environmental Health Criteria 202. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm>

Jacob J, Seidel A. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;778;31-47.

Jongeneelen FJ. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Sci Total Environ.* 1997;199(1-2);141-9.

Klaassen CD. Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons. McGraw-Hill Companies, Inc. 2001, 6. Utgave.

Modica R et al. Comparative kinetics of benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration. I. Study with single compounds. *Toxicol lett.* 1983;18;103-109.

Nordheim K. Eksponering for benzo[a]pyren hos rotter og *Eisenia veneta*. En komparativ undersøkelse av metabolisme og dannelse av DNA- og proteinaddukter. Hovedfagsoppgave ved Biologisk Institutt, Universitetet i Oslo. 1999.

Pott P. 1775. Chirurgical observations. Reproduced in National Cancer Inst Monogr. 1963:7-13

Santella RM. Application of new techniques for the detection of carcinogen adducts to human population monitoring. *Mutat Res.* 1988;205(1-4);271-82.

Timbrell JA. Principles of Biochemical Toxicology. Taylor & Francis. 2000, 3. utgave.

US Environmental Protection Agency (EPA). Carcinogenic assessment of coke oven emissions. Final report. Washington DC, Office of Health and Environmental Assessment. 1984. EPA 600/6-82-003F; NTIS PB84-170182.

Vahakangas K, Haugen A, Harris CC. An applied synchronous fluorescence spectrophotometric assay to study benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA adducts. Carcinogenesis. 1985;6(8);1109-15.

van de Wiel JA, Fijneman PH, Duijf CM, Anzion RB, Theuws JL, Bos RP. Excretion of benzo[a]pyrene and metabolites in urine and feces of rats: influence of route of administration, sex and long-term ethanol treatment. *Toxicology.* 1993;80;103-115.

Von Volkman, R. 1875. Beiträge zur Chirurgie. Leipzig, Germany.

World Health Organization (WHO). Air quality guidelines for Europe. WHO Regional publication, European series, Copenhagen. 1987: no. 23.

World Health Organization (WHO). Air quality guidelines for Europe. WHO Regional publication, European series, Copenhagen. 2000: no. 91.

Øvrebø S, Haugen A, Fjeldstad PE, Hemminki K, Szyfter K. Biological monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon in an electrode paste plant. J Occup Med. 1994;36;303-310.

APPENDIKS A

Gradienteluerings programmet bestod av :

	Betingelser	Metanol	Vann
Start		30 %	70 %
0-40 minutter	gradient	100 %	0 %
40-50 minutter	konstant	100 %	0 %
50-51 minutter	gradient	30 %	70 %
51-70 minutter	konstant	30 %	70 %

Ved start inneholdt mobilfasen 30 % metanol og 70 % vann. Deretter ble metanol innholdet i mobilfasen øket til 100 % i løpet av 40 minutter. Den ble holdt konstant på 100 % metanol i 10 minutter, og deretter redusert til 30 % metanol i løpet av 1 minutt, og holdt konstant på 30 % metanol i 19 minutter.

APPENDIKS B

Konsentrasjon på standard tetrol løsningen:

Forbindelse	fmol/μL
619	110,28
629	91,20
618	100,00
621	83,76

Forholdet mellom stoffmengde og areal ble regnet ut for hver standard tetrol. Snittverdien ble brukt til å finne stoffmengde i prøvene ut fra arealet disse hadde på kromatogrammene. Stoffmengde i 20 μ L injeksjon av standard tetrolløsning og areal målinger fra kromatogrammene:

Forbindelse	fmol	Areal (μV)	Areal (mV)	fmol/areal
619	2205,6	858762	858,762	2,57
629	1824,2	597311	597,311	3,05
618	2000	814922	814,922	2,45
621	1675,2	604797	604,797	2,77

Stoffmengde i 200 μ L injeksjon av standard tetrolløsning og areal målinger fra kromatogrammene

Forbindelse	fmol	Areal (μV)	Areal (mV)	fmol/areal
619	22056	11560346	11560,346	1,91
629	18242	8488838	8488,838	2,15
618	20000	11606688	11606,688	1,72
621	16752	9208789	9208,789	1,82

Snittverdi av stoffmengde/arealverdiene i 20 µL og 200 µL injeksjonene:

Forbindelse	fmol/areal
619	2,24
629	2,60
618	2,09
621	2,29

Utregning av tetroler i 200 µL injeksjon av BPDE I-DNA syrehydrolysatløsning:

			200 µL	Total
	Areal (µV)	Areal (mV)	fmol	fmol
619	4036320,0	4036,32	9033,8	22584,5
618	526268,0	526,268	1099,2	2748,0
			<u>SUM</u>	25332

Utregning av tetroler i 200 µL injeksjon av BPDE II-DNA syrehydrolysatløsning:

			200 µL	Total
	Areal (µV)	Areal (mV)	fmol	fmol
629	332509,0	332,509	865,0	2162,5
621	1394931,0	1394,931	3200,7	8001,6
			<u>SUM</u>	<u>10164</u>

Virkning av bromerte flammehemmere på dannelsen av reaktive oksygenforbindelser hos humane granulocytter og kornceller fra infantile rottehjerner.

Utført av: Marius Gudbrandsen
Anne Marthe Jevnaker

Veiledere: Stipendiat Trina Reistad

8 og 10 mars 2000

Innhold

-Innledning	s. 3
-Mekanismer for produksjon av ROS etter eksponering for bromerte flammehemmere	s. 5
-Metoder	s. 8
-Tolkning av resultater	s. 12
-Diskusjon	s. 14
-Referanser	s. 15

Effekten av Bromerte Flammehemmere på dannelsen av reaktive oksygenforbindelser(ROS).

I disse forsøkene så vi på effekten av bromerte flammehemmere på dannelsen av ROS i to ulike typer celler; kornceller fra lillehjernen hos rottebarn og granulocytter fra menneske. For å måle dannelsen av ROS, brukte vi en probe som fluoriserer etter reaksjon med ROS, slik at effekten av de bromerte flammehemmerne kan måles med et luminisensspektrometer.

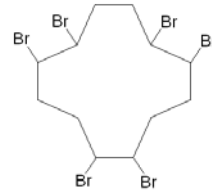
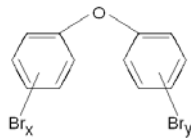
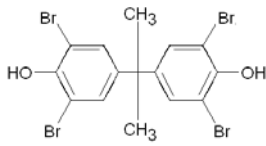
I korte trekk kan de to forsøkene sies å ha bestått av fire steg. Vi startet med å isolere celler, eksponere dem for bromerte flammehemmere, for så å laste dem opp med den fluoriserende proben, DCF-DA, og til slutt måle fluorisensen.

Bromerte Flammehemmere er en gruppe stoffer som produseres i store mengder på verdensbasis. Blant disse finner vi stoffene Tetrabromobisphenol (TBBP-A), Poly Bromerte Difenoletre (PBDE) og heksabromocyclododecane (HBCD), som vi skal bruke i forsøkene våre. Som navnet antyder, brukes de for å hindre brann, og er vanlige i blant annet plastmaterialer som brukes i Tv-apparater og annet elektrisk utstyr. Disse stoffene er relativt tungt nedbrytbare og har strukturer som kan minne om dioksiner og PCB'er. Dette gjør stoffene til potensielle miljøgifter, der graden av toksisk potensial for de individuelle stoffene er omvendt proporsjonal med graden av bromering. Av den grunn brukes nå stort sett bare bromerte flammehemmere med en høy grad av bromering, da disse ikke bioakkumulerer slik de med en lav grad av bromering kan. Selv om det her blitt mer vanlig å bruke BFR med høyere grad av bromering, er det ikke sikkert at problemet er løst likevel. Studier med UV stråling har vist at BFR kan debromeres. Dersom dette er en viktig prosess i miljøet, kan det føre til omdanning av polybromerte flammehemmere til en form der mindre brom er inkorporert i strukturen, stoffer som i større grad vil bioakkumulere. Toksikologiske tester har vist at giftigheten kan sammenlignes med PCB, i det at de fører til induksjon av CYP-enzymmer, men at de er mye mindre toksiske.

TBBP-A:

PBDE:

HBCD:



Reaktive oksygenforbindelser (ROS), er en gruppe molekyler som har sterkere oksiderende egenskaper enn oksygen. Disse inkluderer blant annet superoksid anion (O_2^-), hydroksylradikalet ($\cdot OH$) og peroksidradikaler ($XOO\cdot$). De reagerer lett med biomolekyler, og er blitt koblet til en rekke neurodegenerative sykdommer, som for eksempel Alzheimer og Parkinson. Disse stoffene dannes regelmessig i cellen som et ledd i cellens metabolisme. Reaktive oksygenforbindelsene av både fremmede og familiære stoffer. Blant enzymene som produserer ROS finner vi CYP 1A1 og 1A2, som vi kommer tilbake til.

Cellene inkuberes med *proben* vår, *DCF-DA*, som diffunderer passivt over membranen. Vel inne i cellen spaltes den så av en intracellulær esterase. Dette resulterer i at vi får stoffet DCFH, som vil avgi fluorescens dersom det bli oksidert. Fluorescensen av dette stoffet gir derfor et bilde av den oksidative situasjonen inne i cellen.

Humane neutrofile granulocytter spiller en avgjørende rolle i vårt forsvar mot fremmede patogener og er viktige effektorceller i akutte inflammasjonsreaksjoner. De reagerer på mange ulike fremmedstoffer ved å skille ut store mengder superoksid anion (O_2^-), et fenomen kalt et respiratorisk utbrudd. O_2^- er forløperen til ROS, som spiller en viktig rolle i cellens evne til å drepe bakterier og starte inflammasjonsreaksjoner.

Kornceller ble tatt fra lillehjernen på nyfødte rotter. Disse var ikke ferdig potensierte da vi tok dem ut, men utviklet seg til neuroner etter ca en uke i kultur. Denne typen celler ble valgt til dette forsøket da de er enkle å isolere fra andre celletyper under dyrkingen, og forholdsvis enkle å dissekere ut. Dette gjør dem til gode modeller, da vi kan avgrense forsøket i stor grad til å gjelde bare *en* type celler.

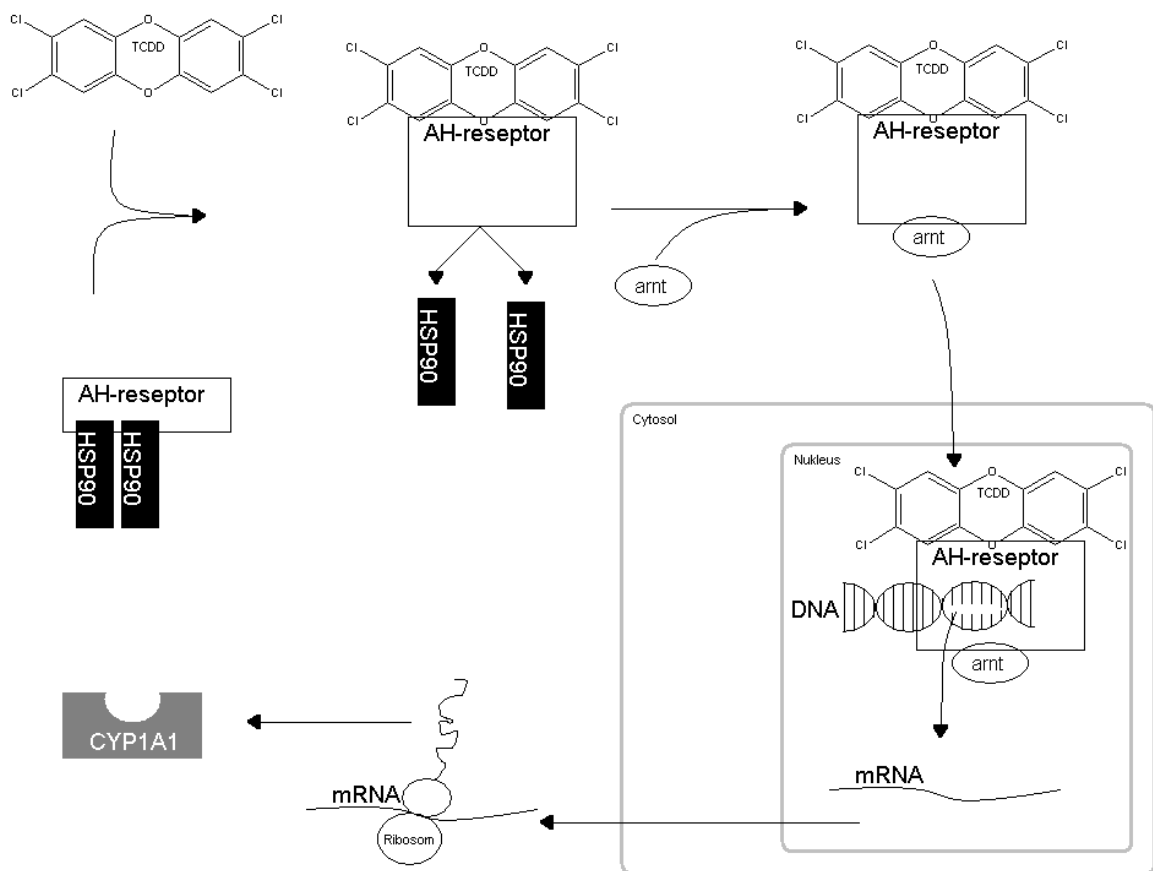
Mekanismer for produksjon av ROS etter eksponering for bromerte flammehemmere

Det er to ganske så forskjellige mekanismer som initieres når kornceller og granulocytter reagerer på BFR.

Kornceller

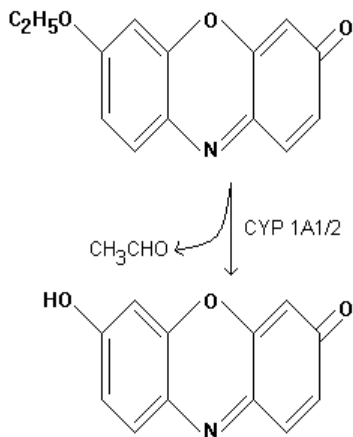
For korncellene dreier dette seg i hovedsak om en induksjon av CYP-enzymene, hovedsaklig CYP 1A1 og 1A2, som induseres av flate molekyler gjennom AH-reseptoren (AH: aromatiske hydrokarboner). Vi nevnte i innledningen at disse er blant de enzymene som produserer ROS. De deltar i den innledende runden av metabolisme av stoffer i leveren, kalt fase 1 reaksjoner. Etter en indusering forårsaket av bromerte flammehemmere vil mengden av fase 1 enzymer øke uten at mengden av fase 2 og 3 enzymer nødvendigvis øker i samme takt. Dette kan gi en flaskekork lignende effekt der det hopen opp reaktive og vannløselige metabolitter fra fase 1 reaksjoner, som dermed får lengre tid til å virke på biomolekyler.

AH-reseptormediert induksjon av CYP-enzymene:

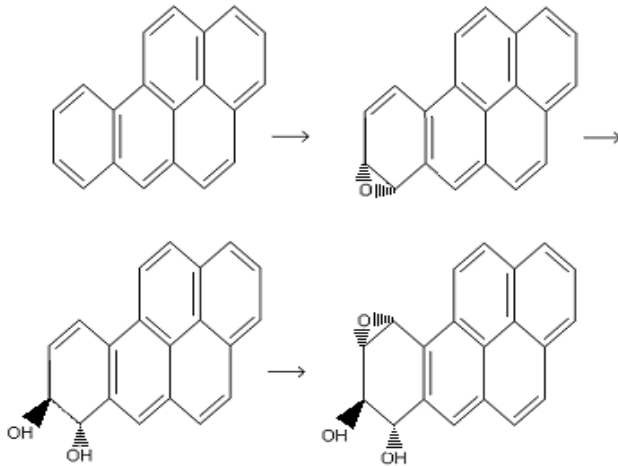


Metabolisme via CYP 1A1/2 kan gå via tre veier; de har begge to O-de-etylering, mens CYP 1A1 tar seg av hydroxylering og CYP 1A2 står for N-hydroxylering.

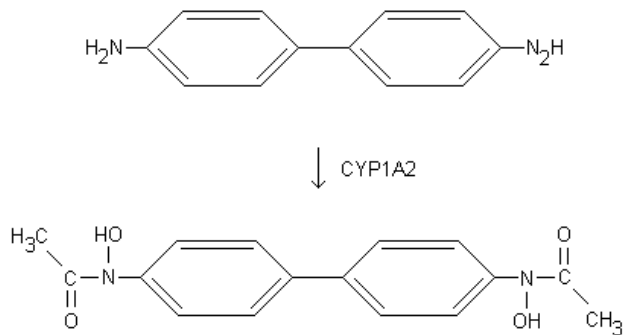
Etoxyresorufin kan metaboliseres av både CYP 1A1 og CYP 1A2 i en reaksjonstype kalt O-de-etylering:



Benzo[A]pyren blir bioaktivert via hydroxylering som medieres av CYP 1A1:



Den siste av hovedvirkningsmåtene for CYP-enzymene som induseres av BFR er N-hydroxylering, der et eksempel på metabolitt er Benzidin:

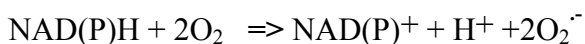


Humane neutrofile granulocytter

For de humane neutrofile granulocytene er det et fenomen som kalles respiratorisk utbrudd som i hovedsak står for økning av ROS produksjonen. Dette oppstår som et ledd i cellens rolle i immunforsvaret, der cellen produserer store mengder superoksid anion som respons på et antigen. Signalene som setter i gang denne aktiviteten når cellen reagerer på bromerte flammehemmere går gjennom MAP-kinase veien, som er en vanlig måte for en celle å reagere på små mengder ekstracellulære molekyler. Veien startes av Ras, for så å fortsette gjennom Raf, Mek og endelig Erk som fosforylerer flere ulike nedstrøms molekyler; både andre kinaser og genregulatoriske proteiner.

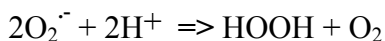
Det er i hovedsak gjennom to reaksjonsveier at ROS produseres i humane neutrofile granulocytter; NAD(P)H oksidase og myeloperoksidase. Makrofager har enda en måte for å produsere frie radikaler, Nitrisk oksid syntase, men den er ikke tilstede i granulocytter.

NAD(P)H oksidase er et membranbundet enzym som lager superoksid anion fra molekylært oksygen under et respiratorisk utbrudd.

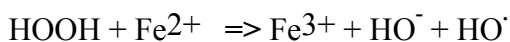


Superoksid anion kan videre danne HO• i gjennom to steg.

1. Spontan reaksjon, eventuelt hjulpet av oksid dismutase:

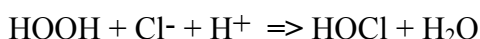


2. Reaksjon med metallioner:

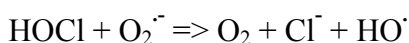


Ved å eksponere celler for NAD(P)H-oksidase-inhibitoren DPI, kan vi hindre dannelsen av ROS gjennom denne veien. Selv om den ikke er den eneste som deltar i produksjonen av ROS i immunresponsen, burde vi kunne merke en drastisk nedgang i produksjonen av ROS, noe vi skal undersøke om stemmer i dette forsøket.

Myeloperoksidase er et enzym som danner hypokloritt via hydrogenperoksid og klorioner inne i vesikler med fagocyttert materiale. Dette er et kobberenzym, som bare finnes hos neutrofiler. Mens makrofager som regel vil overleve en fagocyttering av en partikkel, vil en neutrofil ofte bli drept. Det er myeloperoksidasen fra døde og døende neutrofiler som gir verk sitt grønne skjær.



Videre kan vi få dannet HO• fra HOCl



Metoder;

1. Preparering av korncellekulturer

6-7 dager gamle hannrotter ble dekapitert. Lillehjernen ble dissekert ut og hjernehinnen ble fjernet før de ble kuttet i små biter med en skalpell i buffret løsning (120mM NaCl, 4,8mM KCl, 1,2mM KH₂PO₄, 25mM NaCHO₃, 14mM glukose (dextrose), 0,6mM MgSO₄ • 7H₂O, 15% BSA (v/v) og 0,01 mg/ml phenol rødt som pH indikator). Bitene ble sentrifugert og trypsinert (2700 U/ml) ved 37°C i 15 minutter. De trypsinerte cellene ble tilsatt 1-2 ml buffret løsning som inneholdt DNase (40U/ml) og trypsin inhibitor (0,07 mg/ml), etterfulgt av sentrifugering. Pelleten ble så tilsatt 3ml løsning som inneholdt DNase (282 U/ml) og trypsin inhibitor (0,5 mg/ml) og homogenisert med en pasteurpipette til vi hadde en homogen og klumpefri løsning. Cellesuspensjonen ble så tilsatt 3ml løsning med 1,6mM MgSO₄ • 7 H₂O og 0,7mM CaCl₂ • 2H₂O, før sentrifugering. Pelleten ble så resuspendert i cellekulturmediet (12ml/hjerne av Basal Medium Eagle med 10% varmeinaktivert kalveserum, 2mM glutamin, 25 mM KCl, 100IU/ml penicillin og 100µg/ml streptomycin) og sådd på 55mm plastikk skåler med poly-L-lysin (10µg/ml). Antall celler per ml var rundt $1,6 \times 10^6$. For å hindre vekst av ikke-nevronale celler tilsatte vi Ara-C (10µM) til skålene 16-18 timer etter utsåing. Korncellene ble inkubert i skålene ved 37°C i 5% CO₂ i 6-8 dager før de ble benyttet i forsøk. Alle løsningene ble sterilfiltrert før bruk.

2. Separasjon av hviteblodlegemer

80 ml humant blod ble tappet i 8 EDTA- rør. Blodet ble overført til 50ml plastrør og tilsatt 3ml 60% Dextran løst i NaCl. Separasjonen skjedde ved at ved at de røde blodlegemene sank til bunns i rørene. Etter 30 minutter ble leukocytriakt plasma fra dextranedimenteringen pipettert ut og overført til nye plastrør (2×5ml blodplasma). 3ml Lymphoprep ble forsiktig tilsatt under plasmalaget, slik at det ble en klar gradient. Rørene ble så sentrifugert i 15 minutter i romtemperatur ved 1900 rpm. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet. Celleknappen, som inneholdt granulocytter, og noe erythrocytter og makrofager, ble resuspendert i 10ml 0,9% NaCl og overført til nye rør for å unngå forurensning. Rørene ble så sentrifugert i 7 minutter ved 1900 rpm. Supernatanten ble igjen fjernet og hemolyse av erythrocytter ble satt i gang ved å resuspendere cellene i 5ml 0,83%

NH₄Cl. Etter 7- 10 minutter ble rørene sentrifugert i 7 minutter ved 1900 rpm. Hemolysen ble deretter gjentatt. Den hvite fine pelleten som ble oppnådd ved hemolysen ble løst i 5ml kald HBSS. Antall granulocytter ble telt (celletettheten) i Cell- Dyn 610. Fortynninger på 2 mill celler/ ml ble laget. Fortynningsformelen ble brukt: $C_1V_1 = C_2V_2$

3. Pipettering av løsninger i 96 brønnersbrett

Det ble kjørt to ulike forsøk, et med granulæreceller (kornceller), forsøk 1, og et med granulocytter (hviteblodceller), forsøk 2. I forsøk 1 ble det laget løsninger med buffer, ulike konsentrasjoner av TBBP – A, PBDE og HBCD. Forsøk 2 ble utført på samme måte, men her ble det i tillegg bukt en hemmer, DPI.

Metode for måling av reaktive oksygen metabolitter (ROS);

Målingen av ROS ble gjort ved å benytte den fluorescerende proben DCFH – DA.

Kornceller;

Cellene ble preinkubert med DCFH – DA (5µM), som er løst i metanol (10mM), ved 37°C i 5% CO₂ luft i 20 minutter. DCFH – DA trenger gjennom cellemembranen og inne i cellene vil acetatdelen spaltes av ved hjelp av cellulære esteraser og danner DCFH. DCFH oksideres av ROS til det fluorescerende derivatet DCF. Vekstmedium med DCFH – DA ble fjernet og cellene ble tilsatt 1,5 ml forvarmet HEPES-buffret (20mM) HBSS (pH 7,4), med 5 med mer glukose, PCB og/eller nevrobekyttende substanser. Deretter ble cellene (250 µl) skrappt forsiktig fra skålene og overført til 250µl brønner for måling av ROS. Dannelsen av DCF (fluoreserer ved 530nm), ble målt ved hjelp av luminescence spektrometer på en plateleser ved 37 ° i 180 minutter.

Granulocytter;

Cellene ble inkubert med DCFH–DA på vannbad (37°C) i 20 minutter. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet. Dannelsen av DCF ble målt ved hjelp av et luminescence spektrometer ved 37° i 120 minutter.

	1-3	4-6	7-9	10-12
A	250µl buffer	Kontroll; 125µl buffer 125µl celleløsning	Kontroll	TBBP –A 1µM
B	TBBP –A 1µM	TBBP –A 2µM	TBBP –A 2µM	TBBP –A 4 µM
C	TBBP –A 4µM	TBBP –A 6µM	TBBP –A 6µM	HBCD 12µM
D	HBCD 12µM	PBDE 12µM	PBDE 12µM	TBBP –A 6µM + DPI 3µM

Granulocytter;

Hver prøve inneholder 125µl buffer, 125µl celleløsning og ulike konsentrasjoner av de aktuelle stoffene.

Kornceller;

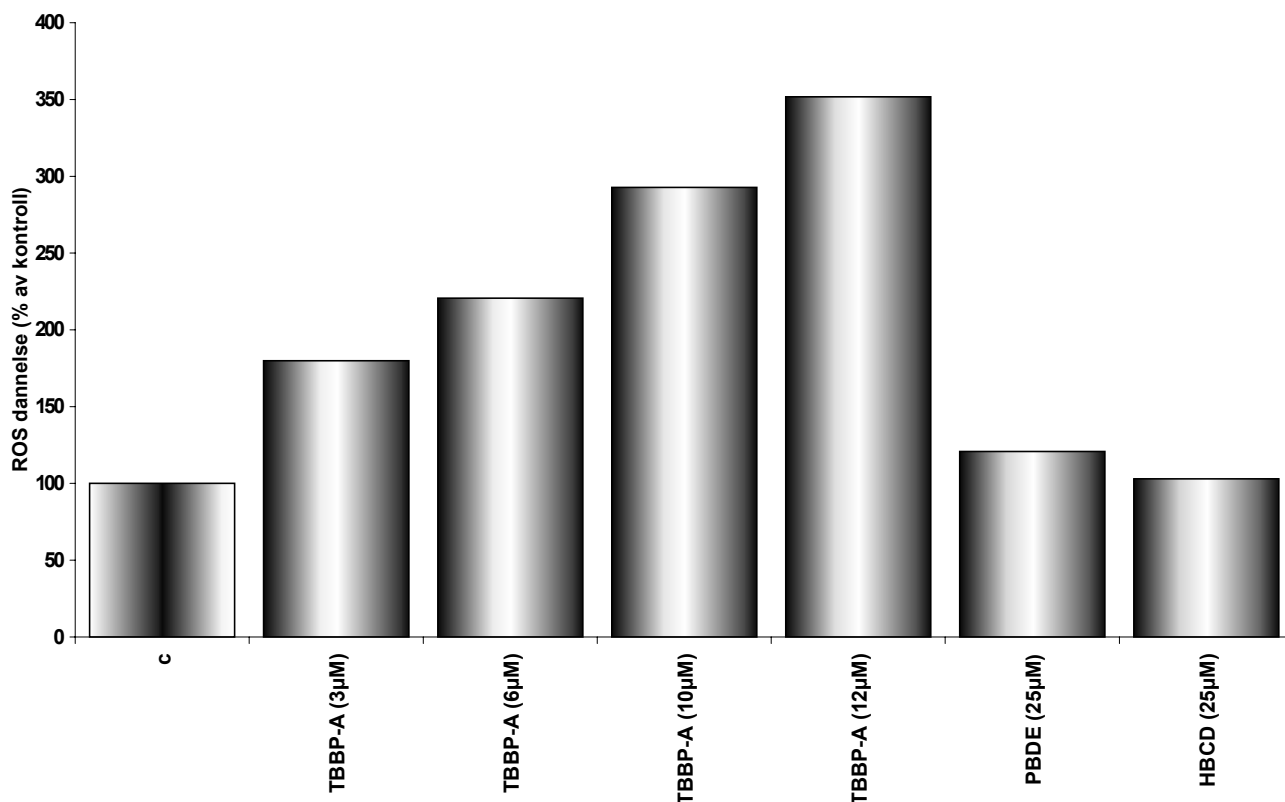
	1-3	4-6	7-9	10-12
A	250µl buffer	Kontroll; 125µl buffer 125µl celleløsning	Kontroll	TBBP-A 3µl
B	TBBP-A 3µl	TBBP-A 6µl	TBBP-A 6µl	TBBP-A 10µl
C	TBBP-A 10µl	TBBP-A 12µl	TBBP-A 12µl	PBDE 25µl
D	PBDE 25µl	HBCD 25µl	HBCD 25µl	

Hver prøve inneholder 125µl buffer, 125µl celleløsning og ulike konsentrasjoner av de aktuelle stoffene.

Tolkning av resultater:

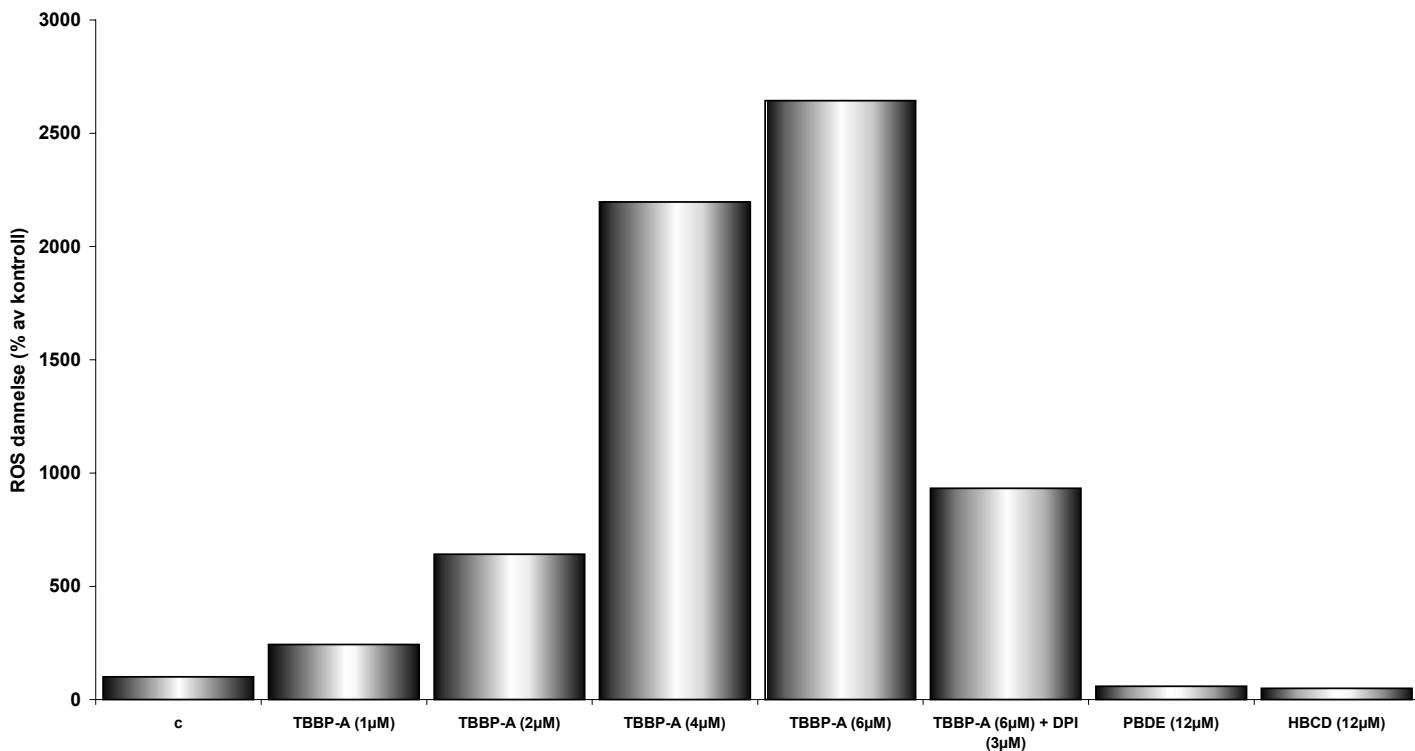
Kornceller fra rotte:

Søylene viser hvor mye fluorescens vi fikk i de eksponerte cellene i prosent i forhold en kontroll som ikke ble eksponert. Vi kan se en svært klar sammenheng mellom dosen av bromerte flammehemmere og fluorescens, der fluorescensen angir mengden ROS inne i cellene. Vi har avgrenset forsøket til å bare måle dose responsen for TBBP-A, da tidligere forsøk har vist at PBDE og HBCD ikke gir en tydelig øket fluorescens, og da heller ikke øket produksjon av ROS, selv om dosene er mye høyere for disse stoffene enn TBBP-A. Vi ser at produksjonen av ROS i cellene øker jevnt med økende dose for TBBP-A, mens utslaget uteblir for PBDE og HBCD.



Humane granulocytter

Viser klart ut fra grafene at det er en klar sammenheng mellom eksponering og fluorescens. Grafene her viser på samme måte som forrige graf sammenhengen mellom fluorescens fra en kontroll, og fluorescens avgitt fra eksponerte celler. Vi ser også her at PBDE og HBCD ikke gir en økning i ROS inne i cellene. I tillegg har vi under dette forsøket også inkubert noen av cellene med NAD(P)H-oksidasen inhibitor DPI, som vi nevnte i innledningen. Vi ser også her at det er en markant lavere fluorescens her sett i forhold til den samme dosen TBBP-A gitt uten inhibitoren.



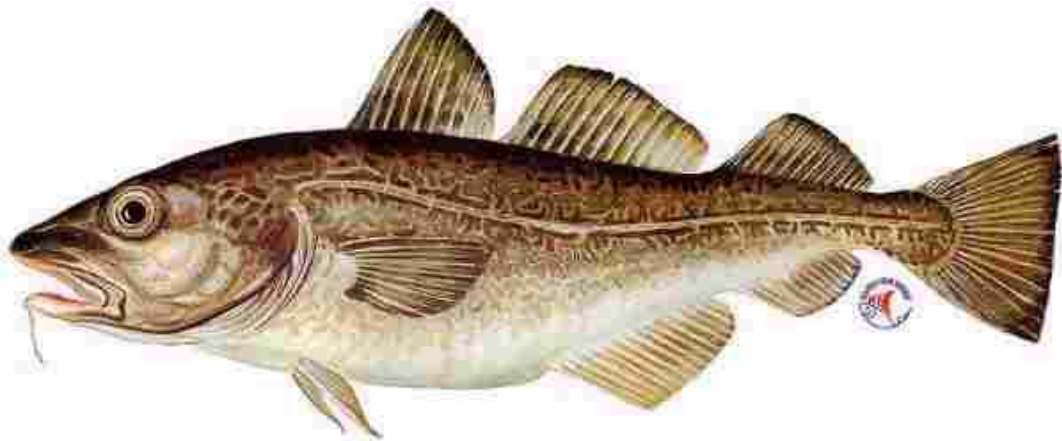
Diskusjon

Vi ser av forsøkene at bromerte flammehemmere påvirker dannelsen av ROS i kornceller og granulocytter, men dose-responskurvene i de to forsøkene er svært ulike. Mens korncellene har en jevn stigning, viser granulocytene en sterk økning fra 2 til 4 μM TBBP-A. Ut fra denne responsen, ser det ut til at granulocytene utløser en kraftig reaksjon når konsentrasjonen kommer over en viss terskelverdi. I motsetning viser korncellene en jevn stigning i ROS produksjon, noe som stemmer godt overens med en AH-reseptormediert induksjon av CYP-enzymmer.

Svakheten ved dette prosjektet er at vi bare utførte hvert av forsøkene en gang, noe som gjør resultatene mer usikre, men da teorien og tidligere forsøk stemmer godt overens med våre resultater, kan vi gå ut ifra at forsøkene har vært vellykkede.

Referanser

- Curtis D. Klaasen, Casarett & Doull's *Toxicology – the Basic Science of Poisons*, 6. utgave. McGraw-Hill, 2001.
- Fonnum, Frode; Reistad, Trine og Mariussen, Espen, *The Effect of Brominated Flame Retardants on Free Radical Formation in Human Neutrophil Granulocytes: The involvement of the MAP-Kinase Pathway*. Hovedfagsoppgave ved FFI.
- Reistad, Trine, *Isolasjon av Kornceller*, FFI
- Stenersen, Jørgen, *Gifter – Virkninger og Mekanismer; Utvalgte Emner fra Toksikologien*, 2. utgave. Yrkeslitteratur, 2002.
- Timbrell, John, *Principles of Biochemical Toxicology*, 3. utgave. Taylor & Francis, 2000.
- de Wit, Cynthia A., *An Overview of Brominated Flame Retardants in the Environment*. Elsevier Science Ltd, 2002.



TORSK

Østrogenliknende effekter av organiske ekstrakter i in vivo og in vitro testsystem fra fisk

**Inger Katharina Gregersen, Marit Nøst Hegseth, Awale Warsame og Nina E Landvik
I samarbeid med Knut-Erik Tollefsen og Ketil Hylland.
Med god hjelp av Tor Fredrik Holthe og Camilla Blikstad.**



ØRRET



Innhold:

Introduksjon.....	3
Material og metode.....	8
Resultat.....	11
Diskusjon.....	16
Konklusjon.....	19
Referanser.....	20

Introduksjon:

Forvaltningen, offentligheten og forskere er bekymret over tilstedeværelsen av hormonforstyrrende stoffer i miljøet, og særlig det akvatiske. En hormonforstyrrer er et fremmedstoff som kan føre til skadeeffekter på en organisme eller dets avkom som følge av en endring i hormonell funksjon (EU, 1997). Disse stoffene kan, som betegnelsen indikerer, forstyrre produksjon, frigjøring, transport, metabolisme, binding og virkning av de naturlige hormonene i organismen som er ansvarlig for opprettholdelse av homeostase og regulering av utviklingsprosesser (*G. Ankley et. al 1998*). Spesiell bekymring har vært rettet mot kjønnsormonforstyrrende stoffer, som ved eksponering vil kunne påvirke organismens evne til å reprodusere. Xenobiotika (ikke naturlig forekommende forbindelser) som har evnen til å herme etter virkningen til kjønnsormonet østrogen kalles ofte xenøstrogener. Utvikling av evnen til å reprodusere er en livslang prosess, og effekter av hormonforstyrrende stoffer vil påvirke alle stadier av livssyklusen hos et individ, inkludert befruktning, embryonalutvikling, kjønnsdifferensiering, egg- eller spermproduksjon og endelig modning.

Det er imidlertid vanskelig å overføre disse effektene fra individ- til populasjon- og økosystemnivå, blant annet fordi endring i populasjoner og diversiteten i et økosystem kan skyldes helt andre faktorer enn xenobiotika, som temperatur, fødetilgang, beskatning etc. Det finnes gode eksempler på at effekter på grunn av forstyrrelser av hormonsystemer er

funnet på populasjonsnivå (*G. Ankley et. al 1998*) men hvor overførbare disse resultatene er til populasjoner i en videre forstand, og hele økosystemer, er uklart.

Man kan tenke seg ulike effekter av xenoøstrogen i fiskepopulasjoner. En vil være økt allokering mot reproduksjon på bekostning av vekst, spesielt hos hunnfisken som bruker lengre tid på kjønnsmodningen enn hannfisk. Dette vil kunne føre til mindre og svakere individer, som til slutt vil gå ut over fitness. (*A. Arukwe & A. Goksøyr 1998*)

Det er også vist at hannfisk som har vært utsatt for eksponering i modningsprosessen har endt opp med redusert gonadestørrelse (*Tyler, Jobling & Sumpter, 1998*), og oocyter i gonadene (*endocrine disruption in the marine environment(EDMAR)*), noe som antas å redusere fertiliteten og dermed ha en effekt på populasjonsveksten. En annen observert effekt er femininisering av adferd hos hannfisk, men dette er lite klarlagt. Det er også vist at lever og nyreskader kan oppstå pga. høye konsentrasjoner av eggeplommeprotein vitellogenin i sirkulasjonssystemet. Vitellogeninproduksjon induseres av østrogen og dets agonister (*Tyler, Jobling & Sumpter, 1998*). Redusert vekst, nedsatt allmenntilstand og svekket reproduktiv evne er alle effekter som vil kunne påvirke populasjonsveksten negativt.

Organismer som lever i det akvatiske miljøet er ekstra sårbare for fremmede forbindelser i vannmassene, fordi de ikke kan unngå eksponering, da de befinner seg i og respirerer i det forurensede mediet.

En svekket fiskebestand vil ha uønskede effekter for fiskerinæringen, og derfor er kartlegging av enhver faktor som innvirker på dette, inkludert hormonforstyrrelser, av politisk interesse såvel som vitenskapelig. USA har blant annet opprettet egne komiteer som tar for seg problemstillinger knyttet til hormonforstyrrelser (EDSTAC) (*G. Ankley et. al 1998*).

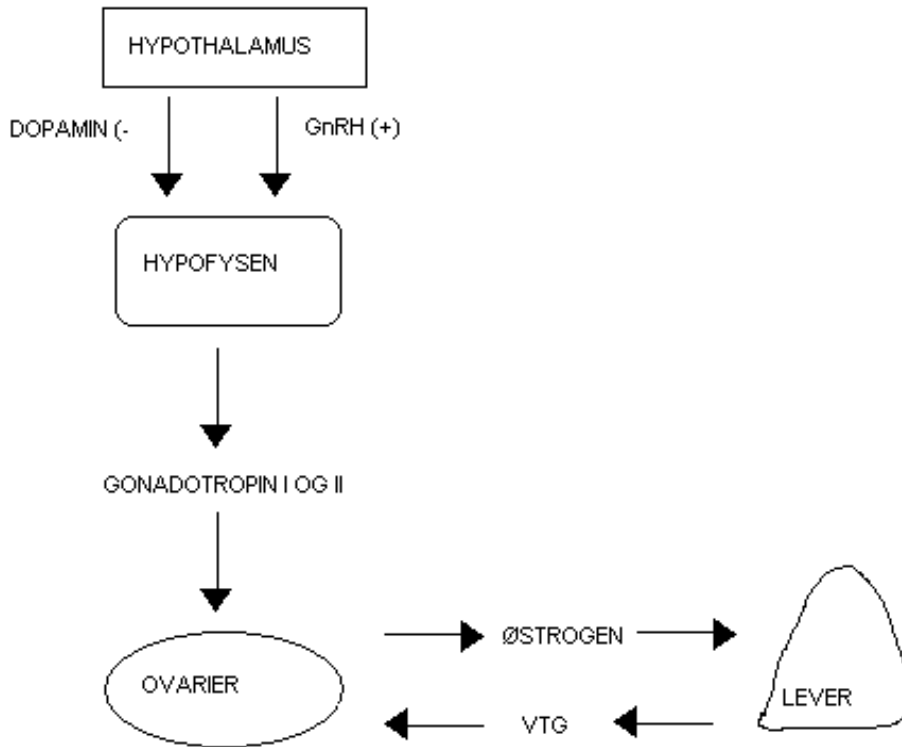
ØSTROGEN

Østrogen er et fettløselig feminint kjønnshormon som bl.a. styrer utviklingen av sekundære kjønnskaraktistika, og har en viktig funksjon for kjønnsadferd. Fettløselige forbindelser, som østrogen, tas lett opp i organismer, og har derfor potensielt skadelige virkninger.

Naturlig østrogen (17 β -Estradiol, fig.3) produseres og reguleres av hypotalamus.

Gonadotropinhormonfrigjørende faktor skilles ut fra hypotalamus, og gir signaler til

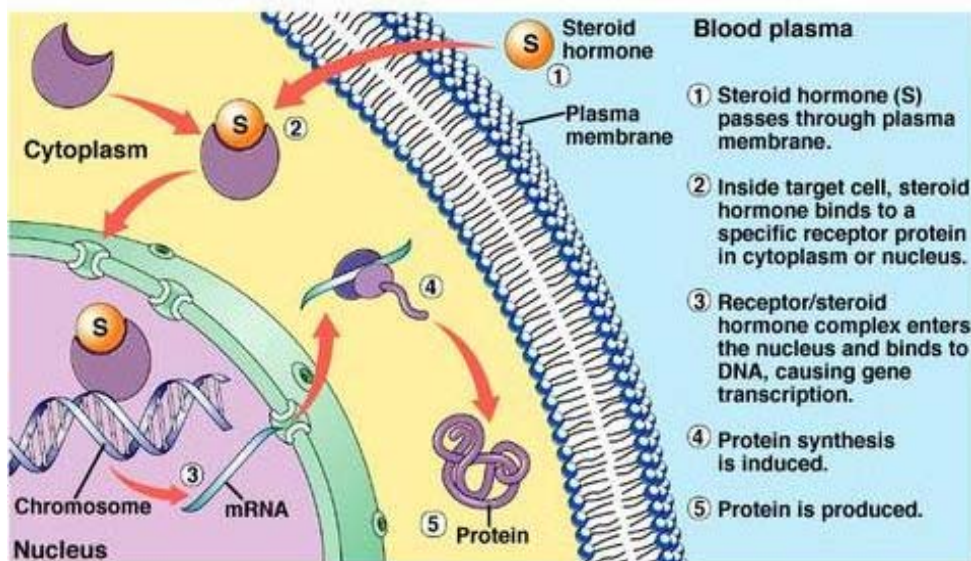
hypofysen om å aktivere produksjon av østrogen fra kolesterol. Denne aktiveringen skjer ved hjelp av gonadotropin I i ovariene. (figur1) (A. Arukwe & A. Goksøyr 1998)



Figur1: Skjematisk diagram av den hypothalamus-hypofyse-ovarie-hepatiske akse under vitellogenese. GnRH: gonadotropin releasing hormon, VTG: vitellogenin. + og - indikerer stimulerende og inhiberende effekter.

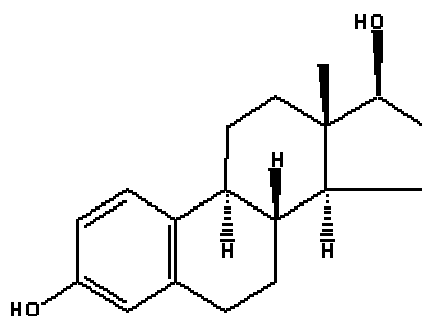
Molekylære mekanismer for østrogens virkemåte:

Steroid Hormone Action



Figur 2: Østrogens virkemåte, for forklaring, se teksten.

Østrogen transporteres via blodet til leveren, til levercellene (hepatocytene) (1, fig.2) hvor det aktiverer østrogenreseptoren (ER) (2) som binder seg direkte til DNA (3). Den aktiverte ER fungerer som en aktivator for transkripsjon og translasjon (4) av f.eks proteinet vitellogenin (5).

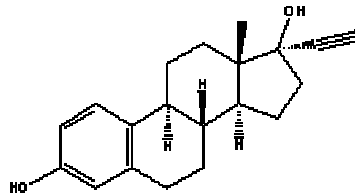


Figur3: 17β-Estradiol, den naturlig forekommende formen av østrogen

Vitellogenin er et protein som finnes i eggeplommen hos eggleggende vertebrater. Som det kommer fram av figur 2 produseres det i leveren, og produksjonen induseres av østrogen. Ved å undersøke nivået av vitellogenin i plasma hos de aktuelle forsøksdyrene kan man på et tidlig stadium finne effekter av østrogenhermere, før de blir skadelige. På den måten fungerer vitellogenin som en detektor for østrogen og østrogenhermere, og slike detektorer kalles biomarkører. Man leter etter biomarkørene ved å lage antistoffer mot dem, slik at de kan finnes og kjennes igjen. (*Teknisk ukeblad, nr.9 2001*)

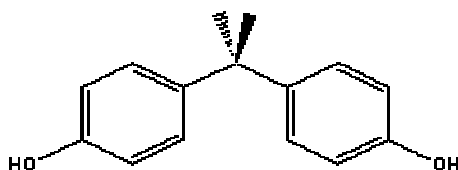
Disse metodene brukes i dag til testing av ulike typer prøver, inkludert enkeltkjemikalier, syntetiske blandinger og miljøprøver (ekstrakter av avløpsvann fra industri, kommunale rensesanlegg, kontaminert sediment, jordprøver etc.)

Kjemisk produserte østrogen har lengere halveringstid enn naturlig forekommende (de naturlige brytes ned etter noen timer). Dvs at det er først og fremst de kjemisk fremstilte produktene som kan ha en effekt på fisk og andre akvatiske organismer. Et eksempel er 17 α -ethinyl-estradiol (EE₂) (fig.4) som brukes i p-piller. Dette er et svært potent syntetisk østrogen med lang nedbrytningstid.



Figur 4: 17 α -ethinyl-estradiol (EE₂), et meget potent kjemisk produsert østrogen med lang nedbrytningstid, finnes bl.a. i p-piller.

Andre eksempler er naturlige østrogen som fytoøstrogen og mycoøstrogen (østrogen fra hhv. planter og sopp), som viser seg å ha effekter på fisk både *in vivo* og *in vitro* (Tyler, Jobling & Sumpter, 1998). Bisphenol A (fig.5) er et syntetisk kjemikalie brukt i plastproduksjon, og er en av de mest potente antropogene østrogenhermerene (Tyler, Jobling & Sumpter, 1998).



figur 5: Bisphenol A

I *in vitro*-forsøk er det funnet svake østrogene effekter av ftalater. Ftalater produseres og brukes i store mengder i produksjon av bl.a. plast, insektmidler, kosmetikk og smøreoljer. Allerede ved ganske lave konsentrasjoner er det påvist at ftalater har en effekt på avkommet *in utero*, men ikke i nevneverdig grad på de voksne individene (Tyler, Jobling & Sumpter, 1998).

Flere effekter av disse har blitt observert i ovipare vertebrater, for eksempel fisk, og disse inkluderer inhibering av, eller unormalt stor, eggutvikling og –modning, og unormal eggeplommedannelse i oocytene (A. Arukwe & A. Goksøyr 1998)

I Lake Apopka i California, USA, har det vært rapportert om hormonforstyrrelser hos alligator, hvor både hunnlige og hannlige individer produserte signifikant mer testis- og ovarie-E2, mens testosteronnivået var normalt, samtidig som alligatorene hadde tilbakedannede og unormale gonader. Det ble konkludert med at dette skyldtes utslipp av østrogenhermere fra det lokale jordbruket.

Alkylfenoletoksyler er ikkeioniske surfaktanter som bl.a. brukes i produksjon av plast og kjemikalier til bruk i landbruket. Flere alkylfenoler er testet på fisk *in vivo*, og har vist seg å være østrogene. Det er påvist at alkylfenolet TPP (*p*-tertpentylfenol) har forårsaket femininisering av hannlige karpfisk (*Carpio carpio*). Forsøket ble utført ved at kjemikaliet var dosert i vannet i løpet av perioden hvor fisken gikk gjennom kjønnsdifferensiering, og det ble funnet eggludere i de fleste forsøksfiskene, og hos fisken som var eksponert for de høyeste dosene hadde noen utviklet oocytter i testis (intersex) (Tyler, Jobling & Sumpter, 1998).

I en større undersøkelse av ulike marine og ferskvannsmiljøer i Storbritannia har man dokumentert en feminisering av ulike arter fisk. Blant effektene var økt VTG-produksjon, forstyrrelser i kjønshormonnivåer og simultan tilstedeværelse av egg og spermier i

testiklene (intersex) hos hannfisk. (*Endocrine disruption in the marine environment(EDMAR)*)

FORMÅL

Formålet med studiet er å undersøke effekter av hormonforstyrrende stoffer i ekstrakter av avløpsvann fra et kommunalt renseanlegg og kontaminert bunnsediment fra et havnebasseng i Norge. Vi ser spesielt etter effekten av østrogenliknende stoffer ved å se om det produseres den østrogene biomarkøren vitellogenin i *in vitro* og *in vivo* testsystem fra fisk.

Materialer og metode

Fisk

In vivo studier ble gjennomført med umoden Torsk (*Gadhus morrhus*), med en vekt på 225-873 gram. Forsøksdyrene var fanget i Oslofjorden, og var holdt i kar på NIVAs marinbiologiske stasjon på Solbergstrand.

Levercellene som ble benyttet for *in vitro* studiene var isolert fra en umoden regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Fisken var holdt i et oppstallingsskar ved biologisk institutt, UiO.

Eksposering, in vivo:

Fisken skulle eksponeres for ekstrakter fra to ulike prøvetakninger. En prøve inneholdt et fast fase ekstrakt av 1L avløpsvann fra utløpet på et kommunalt renseanlegg i Bergen. Den andre prøven inneholdt et organisk (soxhlet) ekstrakt av en 20 g bunnsedimentsprøve tatt fra havnebassenget i Tromsø. Hver av de to prøvene ble testet i konsentrert og i fortynnet form (10 ganger fortynning).

Første dag ble de ulike prøvene injisert i 18 torsk, fordelt på seks ulike grupper med tre fisker i hver; en positiv og en negativ kontrollgruppe, som ble eksponert for hhv. Østrogen (17 β -estradiol) løst i maisolje (2,5 mg pr. ml maisolje), og kun maisolje, og en gruppe for

hver av de to ekstraktene med fortyninger, i alt fire testgrupper. Også disse prøvene var løst i maisolje, dette for å lette opptaket av stoffene i systemet, og for å kunne løse ekstraktene i en løsning som ikke tar livet av fisken (DMSO, etanol, etc. gjør ofte dette). Injiseringene (1 ml pr. 300g fisk) ble gjort i bukhulen på fisken med stor kanyle (0,6-0,8 mm).

Hver testgruppe gikk i isolerte kar i 10 døgn før fisken ble avlivet. Fisken ble da målt, veid, kjønnsbestemt, og tatt blodprøver av. Plasma og blodceller ble separert, og plasma ble analysert mhp. vitellogeninforekomst ved hjelp av ELISA, som beskrevet nedenfor.

Forberedelse og eksponering av leverceller (In vitro):

Leverceller (hepatocytter) ble isolert fra umoden fisk (regnbueørret), holdt i kultur og eksponert som beskrevet av Tollefsen et al. (2003).

Hepatocytene ble isolert i en to-trinns perfusjons metode, fortynt med serum-fritt L-15 medium og sådd i et 96-brønners Brett som en mono-layer kultur (ved 12 °C). Etterpå ble cellene holdt en dag i ”unspiked” medium før halvparten av utgangsvolumet ble erstattet med medium som inneholdt DMSO og forskjellige konsentrasjoner for referanseforbindelser 17 β -estradiol, fenol og ekstrakter fortynt med DMSO. Halvparten av mediet ble byttet ut etter to dager og cellene reeksponert for ytterligere to dager til før mediet ble fjernet. Mediet ble da frosset ved -80 °C for påfølgende analyse av vitellogenin vha. capture ELISA. Akutt giftighet ble i slutten av forsøket analysert ved bruk av to viabilitetsmarkører prinsipielt som beskrevet av Ganassin et al. (1957).

Cytotoksisitetstest

Akutt giftighet (cytotoksisitet) ble bestemt i cellekulturen ved å bruke de fluorescerende probene Alamarblue (AB), som er markør for metabolsk integritet, og 5-carboxyfluorescein diacetateacetoxymethyl ester(CFDA-AM), som er markør for cellemembran integritet.

Eksponeringsmediet ble fjernet fra brønnene og byttet ut med 100 μ l av DMEM som

inneholdt 5 % AB og 4mmol/l CFDA-AM (molar konsentrasjon).

Cellene ble inkubert for en time(60min) i mørkt og nivåene for fluorescenceprobenes avlest ved bølgelengdeparene 530-590nm og 485-530nm (eksitasjon-emmisjon)

Analyse av VTG i torsk (ELISA)

100 ul ufortynnet cellemedium og 100 ul fortynnete plasmaprøver (i karbonatbuffer) ble inkubert ved 4 grader over natt i spesielt egnede ELISA plater.

Cellene ble så vasket 3 ganger i 0,05 % tween-20 i PBS (phosphate-buffer saline).

2 % BSA (Bovint Serum Albumin) i PBS ble tilsatt for å blokkere uspesifikk binding, og deretter satt til inkubasjon i 1t ved romtemperatur.

ELISApplatene ble vasket med PBS 3 ganger.

100ul primært antistoff ble tilsatt (*in vitro*: monoklonalt mus-anti-regnbueørret Vtg antistoff fortynnet 1:2000 i 1 % BSA i PBS, *in vivo*: polyklonalt kanin-anti-torsk Vtg antistoff fortynnet 1:2000 i 1 % BSA i PBS). Inkubering 2t ved 37 grader, for så å vaske platene 3 ganger med PBS.

100 µl sekundært HRP-konjugert antistoff ble så tilsatt (*in vitro*: polyklonalt geit-anti-mus IgG antistoff fortynnet 1:3000 i 1 % BSA i PBS, *in vivo*: polyklonalt geit-anti-kanin-IgG antistoff fortynnet 1:9000 i 1% BSA i PBS). Inkubering 1t ved 37 grader etterfulgt av vasking 5 ganger med PBS.

Tilsats av 100µl TMB, og substratløsning for HRP, for fargereaksjon. Inkubering i mørke (romtemp) ca. 10-20 minutter.

Fargereaksjonen ble stoppet med tilsetning av 50 µl 2 M H₂SO₄.

Tilslutt ble platene avlest i plateleser med absorbanavlesning ved 450 nm. Absorpsjonen øker med stigende konsentrasjon av vitellogenin.

Prøver:

Ørret, *in vitro*

Forklaring til forkortelsene brukt i forsøket:

K: Negativ kontroll, Dimethylsulfoksid (DMSO) brukt som løsemiddel i celleforsøk (fra to parallelle brett)

A: Sedimentprøve fra Tromsø havn, dampet inn i dimethylsulfoksid (DMSO) (fra to parallelle brett)

B: Ekstrakt av vann ut fra kommunalt renseanlegg i Bergen, med løsemiddel DMSO.

Torsk, *in vivo*

Forklaring til forkortelsene brukt i forsøket:

PK: positiv kontroll

NK: Negativ kontroll

AK: Vann fra renseanlegg, konsentrert

AF: Vann fra renseanlegg, fortynnet 10x

SK: Sedimentprøve, konsentrert

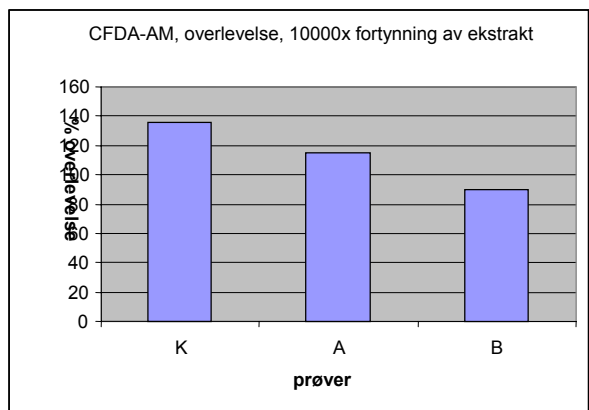
SF: Sedimentprøve, fortynnet 10x

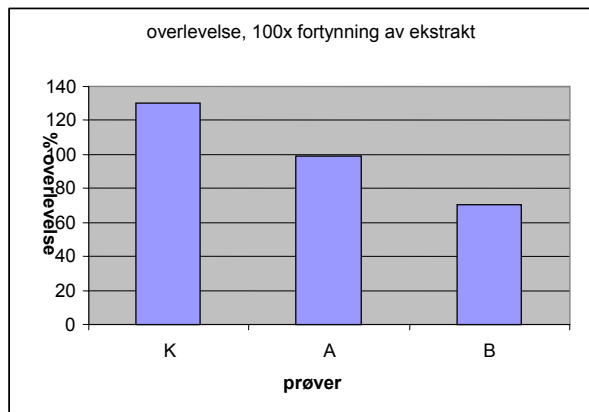
RESULTATER:

Ørret; *in vitro*:

Målinger av akutt giftighet vha AB og CFDA-AM viser at det er stor forskjell i giftpotensialet i de to ekstraktene som ble brukt. For brettene målt vha. CFDA-AM (fig.6), gir cellene eksponert for avløpsvann dødelighet ved 1000x fortynning, mens sedimentekstraktet gir dødelighet allerede ved 100 000x fortynning av originalekstraktet

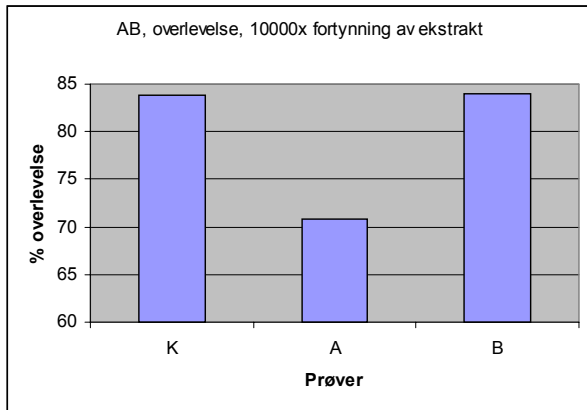
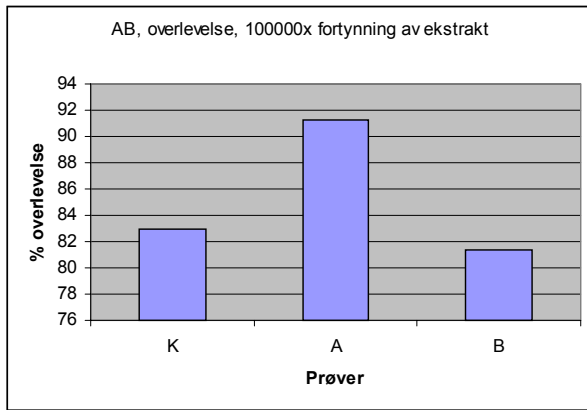
(fig. 6). Løsemiddelet som ble benyttet viste ingen tydelig dødelighet ved noen konsentrasjoner benyttet.

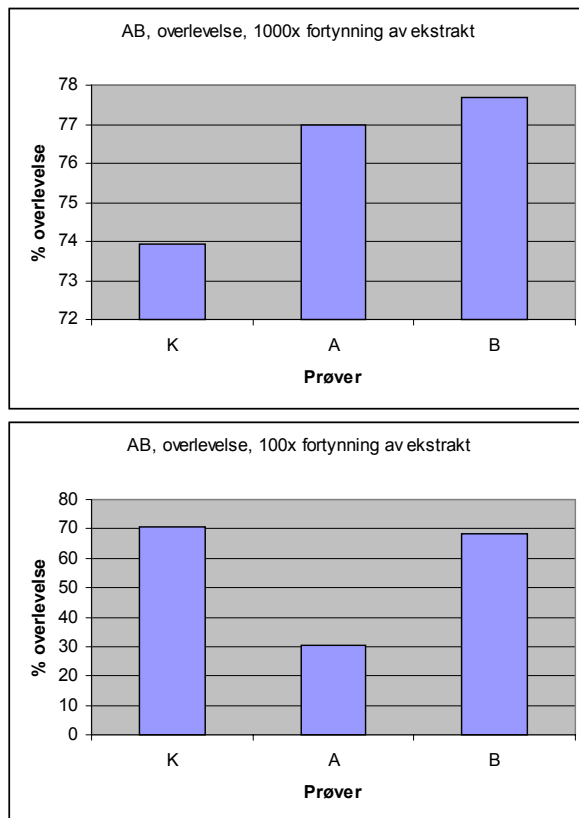




Figur 6. Antall levende celler (%) vist vha CFDA-AM, ved eksponering for ulike fortynninger av løsemiddelet (DMSO) (K), ekstrakt av avløpsvann (B) og bunnsediment (A).

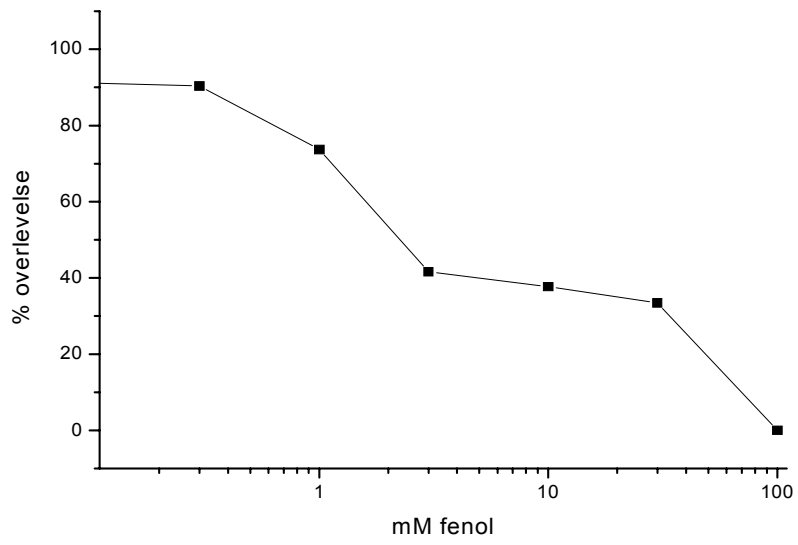
For brettene målt vha AB (fig. 7), ser vi at løsemiddelet i seg selv gir en relativt stor dødelighet allerede ved konsentrasjoner på 0,001 % (100 000x fortynnet), og denne stiger med økt konsentrasjon. For cellene som var eksponert for sedimentekstrakt (A) ser vi en økt dødelighet ved 10 000x fortynning, som øker betraktelig ved den høyeste konsentrasjonen, 1% (100x fortynnet). Dødeligheten for cellene eksponert med ekstrakter fra avløpsvann stiger kun moderat, men jevnt med økende konsentrasjon.



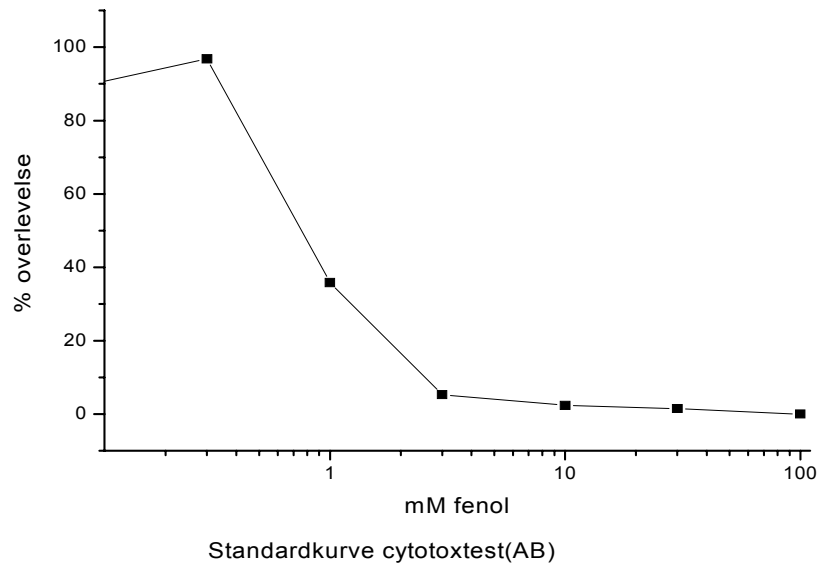


figur 7: Antall levende celler (%) vist vha AB, ved eksponering for ulike fortynninger av løsemiddelet (K), ekstrakt av avløpsvann (B) og bunnsediment (A).

Nedenfor vises standardkurvene (figur 8 og 9) for dødelighet ved økende konsentrasjoner av fenol, for hhv CFDA-AM og AB. CFDA-AM viser ødeleggelser i cellemembranen, mens AB viser inaktive/døde mitokondrier.



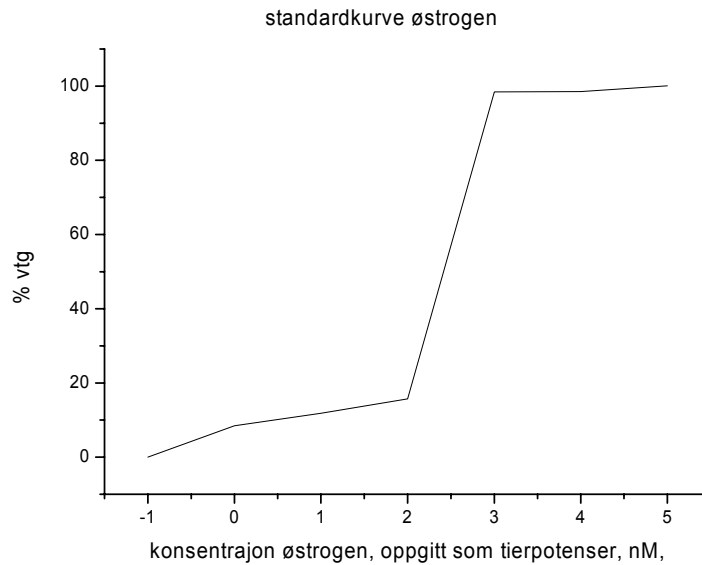
figur 8: Standardkurve cytotoksisitetstest, CFDA-AM



Figur9: Standardkurve for cytotoksisitetstesten, AB.

ELISA:

Kurven (fig.10) viser hvordan VTG-forekomsten øker ved stigende østrogenkonsentrasjon, og er den positive kontrollen i dette forsøket.

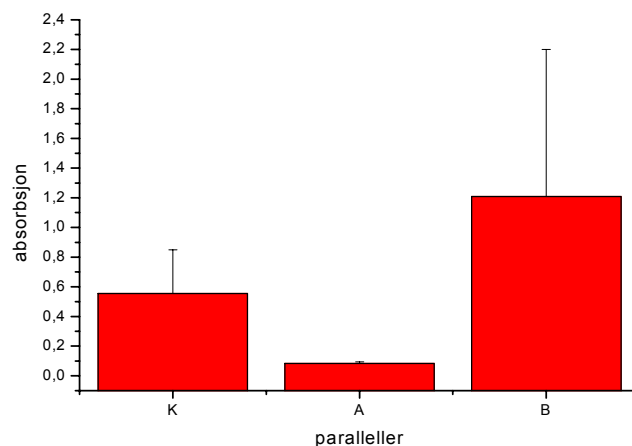


Figur 10: Verdiene fra den positive kontrollen. Kurven viser hvordan andel vitellogenin (VTG) som blir produsert av levercellene stiger med økt mengde tilsatt østrogen (E2).

Det var kun ved høyest konsentrasjon (1 %) av tilsatt ekstrakt fra avløpsvann at vi så induksjon av VTG. (fig11).

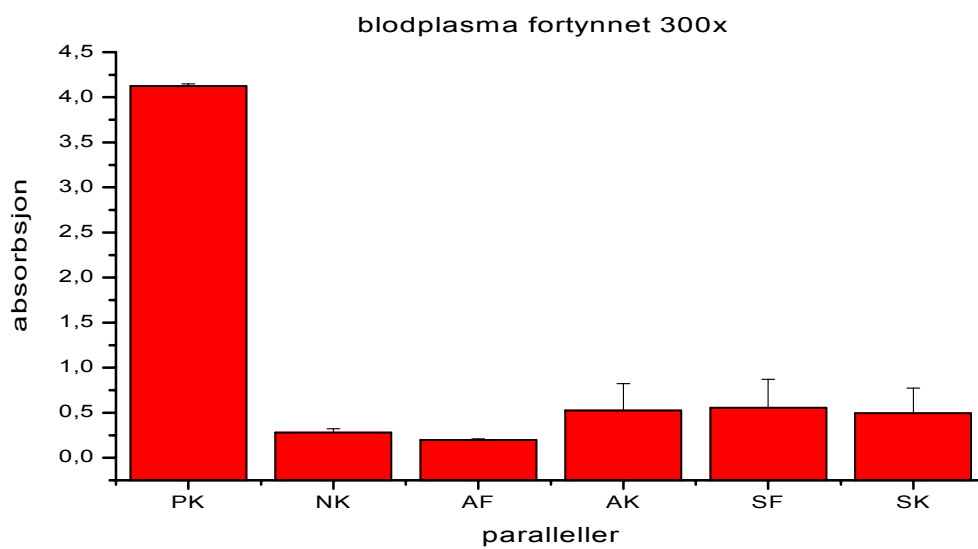
Ved de lavere konsentrasjonene (0,1, 0,01 og 0,001 %) av tilsatt avløpsvannekstrakt, og hos cellene som var eksponert for sedimentekstrakt, så vi ingen VTG-induksjon.

Figur11:
Absorbansemåling
for ELISA testen.
Histogrammet viser
VTG-nivå i
hepatocytene.



Torsk, In vivo:

Resultatene fra forsøket presenteres i figur 12. Figuren viser absorpsjonen målt etter endt ELISA, og indikerer VTG-nivåer i plasma fra gruppene utsatt for de ulike eksponeringene. Mønsteret var det samme for alle fortynninger, så vi viser kun histogrammet for 300x fortynning.



Figur 12
Analyseresultater, ELISA, in vivo.

Diskusjon:

***In vitro* eksponering:**

Cytotoksitetstest og ELISA:

Resultatene fra standardkurvene viser økt dødelighet ved økt konsentrasjon av fenol (figur 8 og 9). Vi ser at dødeligheten i CFDA-AM-kurven (fig.8) stiger jevnere enn kurven for AB (fig.9). Dette tilsier at den spesifikke dødeligheten (nedsatt metabolisme) ved tilsetning av fenol (AB) er mer akutt enn den uspesifikke (forandringer i cellemembranens integritet) (CFDA-AM).

I figur 6 ligger overlevelsen på verdier over 100 %. Dette gjelder først og fremst den negative kontrollen, K. Dette skyldes sannsynligvis at antallet levende celler i hver brønn har vært større i prøvebrettene enn i brønnene brukt til å lage fenolstandard. Vi ser likevel at overlevelsen er større i kontrollbrønnene enn i brønnene som har vært eksponert for ekstraktene, som forventet. Høyest dødelighet ser vi hos cellene eksponert for ekstrakt fra avløpsvann, med den høyeste konsentrasjonen.

Figur 7 viser økt dødelighet hos cellene tilsatt ekstrakt fra bunnsediment (A), ved den høyeste konsentrasjonen. Dette indikerer at ekstraktet inneholder stoffer som virker spesifikt på metabolismen i cellene. Østrogen, og østrogenhermere vil ikke ha denne effekten, så det er sannsynlig at denne økte dødeligheten skyldes andre stoffer enn østrogen i ekstraktet. Vi ser fra standardkurvene (figur 8 og 9) at fenol virker spesifikt inn på metabolismen. Det er derfor også mulig at selve løsemiddelet har forårsaket denne effekten.

Figur 10 antyder at cellene responderer på økt mengde E₂. Dette viser at cellene (hepatocytene) er i stand til å produsere VTG. Samtidig viser figur 11 at de negative kontrollene har svært lav absorpsjon, noe som tilsier at vi ikke har VTG produksjon i disse cellene. Figur 11 viser at cellene eksponert for sedimentekstrakt (1 %) har lav absorpsjon, til og med lavere enn den negative kontrollen, noe som antyder at det ikke har vært VTG produksjon i disse cellene. For cellene eksponert med ekstrakt fra avløpsvann vises det

derimot en økt absorpsjon ved høyest konsentrasjon. Dette tilsier at cellene har produsert VTG, og at det er forekomster av østrogenhermere i ekstraktet. Resultatene kan være noe unøyaktige grunnet mulige pipeteringsunøyaktigheter.

Fra figur 11 (ELISA) ser vi at det bare er i cellene eksponert for den høyeste konsentrasjonen av avløpsvann vi har hatt VTG-induksjon. Dette kan forklares med at prøven ble fortynnet mye ved hvert fortynningstrinn. Hadde flere fortynningstrinn vært gjennomført i konsentrasjonsområdet (0,1-1 %) kunne dette muligens ha ført til påvisning av svake sub-akutte effekter.

Det er kjent at mange av de svake østrogenene gir østrogene effekter tett opp til de konsentrasjoner som gir akutt giftige effekter (Smeets, 1999), og som figur 6 og 7 viser, i omtrent samme størrelsesorden, har vi økt dødelighet kun i brønnene tilsatt den mest konsentrerte ekstrakten av avløpsvann (B).

***In vivo* eksponering:**

Resultatene viser at VTG-produksjon er induisert i den positive kontrollen (Figur 12). Fiskene vi brukte i den negative kontrollen viste seg å være hunnfisker. Disse hadde lite utviklete gonader og vi kan anta at de ikke er modne nok til å produsere VTG fra eget, naturlig østrogen. Vi velger derfor likevel å bruke disse verdiene som negativ kontroll. Generelt forkastet vi resultatene fra hunnfiskene så fremt vi hadde hannfisk i gruppen. Figur 11 viser at VTG-produksjonen i fiskene som har vært eksponert for de fire ekstraktene, har vært lav i forhold til den positive kontrollen, ved alle blodplasmakonsentrasjoner. Det har likevel vært en viss produksjon sett i forhold til den negative kontrollen, med unntak av ekstraktet med fortynnet avløpsvann (AF). I denne gruppen hadde vi imidlertid bare en hannfisk, og med et så lite utvalg er det vanskelig å vite hvor representativt dette resultatet er.

Standardavviket for de fire parallellene er relativt stort, og viser at det er variasjon innad i gruppene, noe som gjenspeiler individuelle forskjeller i fiskens evne til å produsere VTG.

Dette kan for eksempel skyldes aldersforskjeller og ulik allmenntilstand hos fiskene. Disse faktorenes innvirkning hadde vi kunnet redusert dersom vi hadde eksponert flere fisk i hver gruppe.

På bakgrunn av resultatene fra den positive kontrollen, hvor fisken tydelig er i stand til å inducere VTG-produksjon ved eksponering for østrogen, antar vi at de lave VTG-verdiene i plasma fra fisken som var eksponert for de ulike ekstraktene, skyldes at det i utgangspunktet var små mengder østrogene forbindelser tilstede i disse. Lengre eksponeringsperiode og flere injiseringer, for å sikre opptak i fisken, ville sannsynligvis ha gitt sikrere og mer entydige resultater.

Variasjonen innad kan også skyldes at det ene brettet i ELISA testen ble inkubert for lenge med O-phenylenediamine slik at absorpsjonsverdiene på dette ble noe høyere enn det andre.

Forskjell på *in vitro* og *in vivo* eksponering.

I *In vivo* testing er alle organer i forsøksdyret man benytter intakt. Dette medfører at stoffene transporteres i sirkulasjonssystemet, og kan bli tatt opp flere ganger i lever og nyrer.

Dette vil kunne gi økt skadeeffekt i disse organene som en konsekvens av økte konsentrasjoner i organene.

Dette kan vanskelig gjøres *in vitro*. Av den grunn bør *in vitro* metoder kun brukes som et supplement til utførte *in vivo*-forsøk (Tyler, Jobling & Sumpter, 1998).

Et annet aspekt ved *in vivo*-eksperimenter, er at forbindelsene kan skilles ut eller metaboliseres før de gir utslag, og dermed gi mindre effekt enn hvis det tilsvarende forsøket var gjort *in vitro*.

In vitro metoder benyttes normalt kun til screening (testing) mens *in vivo* studier gjennomføres for risikovurdering (med økologisk relevant eksponeringsrute).

Konklusjon:

Ut fra de positive og negative kontrollene kan vi konkludere med at metodene vi har brukt kan inducere VTG-produksjon.

Fra *in vitro*-eksponeringen ser vi at dødeligheten øker når nivået av østrogenhermere nærmer seg de konsentrasjonene som skal til for å inducere vitellogenin-produksjon. Dette er effekter som også er påvist i liknende studier (*Smeets, 1999*).

In vivo-, og i noe større grad *in vitro*-forsøket viser at avløpsvannekstraktet ved høye konsentrasjoner har induisert VTG-produksjon. Disse resultatene bekrefter funn gjort i tidligere studier (*EDMAR, rapport*)

In vivo-eksponeringen antyder at også sedimentekstraktet gir en viss VTG-produksjon, men dette bekreftes ikke i det tilsvarende forsøket utført *in vitro*, noe som kan skyldes de generelle forskjellene mellom et forsøk utført *in vivo* og *in vitro* (se diskusjon).

For å kunne konkludere med større sikkerhet bør slike forsøk utføres over lengre tidsperioder, fortrinnsvis med større grupper forsøksfisk, som får en jevnere eksponering, for eksempel i form av flere injiseringer.

Med en slik forsøksdesign vil resultatene ha en større overføringsverdi til naturlige systemer.

Referanser:

- BIOLOGY; Raven and Johnson 2002
- Endocrine Disruption in Wildlife: A critical Review of the Evidence; C.R. Tyler, S. Jobling and J.P. Sumpter
- Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish; Augustine Arukwe and Anders Goksøyr
- Endocrine disruption in the marine environment(EDMAR)
- **Ganassin, R.C., Schirmer, K., Bols, N.C., 2000. Cell and Tissue Culture. In: Ostrander, G.K. (Ed.) The Laboratory Fish. Academic Press, San Diego, Vol. Chapter 38, pp. 631-651.**
- **Tollefsen, K.-E., Mathisen, R., Stenersen, J., 2003. Induction of vitellogenin synthesis in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) hepatocyte culture: a sensitive *in vitro* bioassay for (anti)estrogenic activity of chemicals. Biomarkers. (In press)**
- **<http://www.tjener.uninett.no/~karlsoy/fisk/index.html>**

- EU, 1997. European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on human Health and Wildlife. Workshop held by the European Commission (DG XII), European Environment Agency and European Centre for Environmental Health of the WHO. In: Proceedings of, December 2-4, 1996, Weybrigde, UK. Workshop publication EUR 17549, Paris, France, p. 125.
- Smeets, J.M.W., van Holsteijn, I., Giesy, J.P., Seinen, W., van den Berg, M., 1999. Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. *Toxicol. Sci.* 50, 206-213.