

**Cellulære effekter av bromerte  
flammehemmere i leverceller fra  
regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*)**

Inger Katharina Gregersen

Program for toksikologi og økofysiologi  
Avdeling for Biologi  
Universitetet i Oslo

2005

## **Forord**

Denne hovedfagsoppgaven ble utført i tidsrommet 2003-2005 ved Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA). Arbeidet er veiledet av Knut-Erik Tollefsen og Ketil Hylland. Jeg vil takke dem for å ha gitt meg en interessant og lærerik hovedfagsperiode og for god veiledning underveis. En takk går også til Jørgen Stenersen for å ha svart på spørsmål jeg har lurt på under skrivingen.

Jeg ønsker å takke alle ansatte på biolab på NIVA, spesielt Åse Bakketun, Harry Efraimsen og Åse Kristine Gudmundson Rogne for god opplæring, rådgiving og oppmuntring under arbeidet. En stor takk går også til Camilla Blikstad Halstvedt for opplæring i celleisolering og til kjemikerne for all hjelp. Jeg er veldig glad for all hjelp og hyggelige avbrekk som mastergradstudentene og stipendiatene på NIVA har gitt meg.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke mamma, pappa, Finn, Håkon og alle vennene mine for den gode støtten og oppmuntring gjennom denne perioden. Jeg setter utrolig stor pris på dere!

Oslo, desember 2005

Inger Katharina Gregersen

# Innholdsfortegnelse

1 Innledning .....	1
1.1 Bromerte flammehemmere.....	1
1.2 Biologiske effekter av bromerte flammehemmere.....	4
1.2.1 Effekter mediert via arylhydrokarbon-reseptor.....	4
1.2.2 Effekter mediert via østrogen-reseptor .....	6
1.3 Interaksjoner.....	8
1.4 Problemstilling.....	9
2 Materialer og metoder.....	11
2.1 Kjemikalier og løsninger.....	11
2.2 Forsøksdyr.....	12
2.3 Isolering av leverceller (hepatocytter) fra regnbueørret.....	12
2.4 Eksponering av hepatocytter.....	13
2.5 7-Etoksyresorufin- <i>O</i> -deetylase-aktivitet.....	14
2.6 Metabolsk aktivitet og membranintegritet .....	15
2.7 Analyse av vitellogenin.....	16
2.8 Statistiske analyser.....	17
3 Resultater .....	18
3.1 Testforbindelser til standardisering.....	18
3.1.1 Metabolsk hemming og membranintegritet .....	18
3.1.2 Induksjon og hemming av 7-Etoksyresorufin- <i>O</i> -deetylase-aktivitet .....	20
3.1.3 Induksjon og hemming av vitellogenin-produksjon .....	21
3.2 Bromerte flammehemmere.....	21
3.2.1 Metabolsk aktivitet og membranintegritet .....	21
3.2.2 Induksjon av 7-Etoksyresorufin- <i>O</i> -deetylase-aktivitet .....	25
3.2.3 Hemming av 7-Etoksyresorufin- <i>O</i> -deetylase-aktivitet .....	26
3.2.4 Induksjon av vitellogenin-produksjon.....	28
3.2.5 Hemming av vitellogenin-produksjonen.....	29
3.3 Resultatoppsummering.....	30
4 Diskusjon .....	33
4.1 Induksjon av 7-etoksyresorufin- <i>O</i> -deetylase-aktivitet.....	33
4.2 Hemming av 7-etoksyresorufin- <i>O</i> -deetylase-aktivitet.....	35
4.3 Induksjon av vitellogenin-produksjon .....	36
4.4 Hemming av vitellogenin-produksjon .....	38
4.5 Reseptor-samarbeid.....	39
4.6 Variabilitet ved isoleringene .....	40
4.7 Framtidig arbeid.....	41
5 Konklusjon.....	42
6 Referanser .....	44

## Sammendrag

Bromerte flammehemmere (BFR) er persistente og hydrofobe kjemikalier som har vist seg å kunne akkumuleres i forskjellige organismer, inkludert mennesker og miljø. Det globale omfanget av disse forurensningene gir grunn til bekymring siden mange av disse stoffene har vist seg å ha samme virkningsmekanisme som polyklorerte bifenyler (PCB) og dioksiner.

I dette arbeidet er subletale effekter av polybromerte difenyletere (PBDE), polybromerte bifenyler (PBB), tetrabrombisfenol A (TBBPA) og polybromerte fenoler (PBP) i primære hepatocytter fra regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) studert. Dette er utført ved bruk av ulike biomarkør- og effektendepunkter.

Arbeidene ble gjennomført ved bruk av *in vitro* forsøk med primære leverceller (hepatocytter) fra regnbueørret. Akutt giftighet (metabolsk hemming og tap av membranintegritet) og subletale effekter som induksjon/hemming av arylhydrokarbonreseptor-mediert 7-etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet (EROD-aktivitet) og østrogenreseptor-mediert produksjon av biomarkøren vitellogenin (Vtg) ble bestemt ved bruk av mikroplatebaserte analyser.

Resultatene viste at BFR hadde en lav akutt giftighet, men at denne brede gruppen av kjemikalier kan virke som både AhR-agonister/antagonister og ER-agonister i leverceller fra fisk. Stoffene BDE-47 og BDE-99 viste seg å ha en antagonistisk virkning på AhR-signalveien, hvor BDE-100 og BB-153 så ut til å være svake agonister. De polybromerte difenyleterne var den gruppen av BFR som ga størst effekt i produksjonen av den østrogene biomarkøren Vtg.

Dette studiet indikerer at BFR kan interferere med AhR- og ER-signalvei *in vitro* ved nivåer som er rapportert tidligere for polyklorerte bifenyler. Nivået av PBDE i miljøet er økende, det er derfor viktig å fortsette kartleggingen av virkningsmekanismen og potensielle negative biologiske effekter av eksponering for disse stoffene.

## Forkortelser og forklaringer

Agonister	virker på samme måte som signalstoffet til en reseptor
AhR	Arylhydrokarbon-reseptor
$\alpha$ -NF	$\alpha$ -naftaflavon
Antagonister	har motsatt virkning av signalstoffet til en reseptor
Antropogen	menneskeskapt
BFR	bromert flammehemmer
Bioakkumulering	stoffets evne til å få høyere konsentrasjon i organismer enn i næringen eller vannmassene.
Biotransformasjon	metabolsk omdanning av fremmedstoffer i organismen
CYP	Cytokrom P450
CYP1A	Cytokrom P4501A
Detoksikering	gjør kjemikalier mindre giftig
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	dimetylsulfoksid
EC <sub>50</sub>	konsentrasjon av en forbindelse som fører til effekt på 50% av individene i en populasjon
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	østrogen-reseptor
ERE	østrogen-responselement
EROD	7-Etoksyresorufin- <i>O</i> -deetylase
E-SCREEN	en brystkreft-cellelinje (MCF-7) som vokser ved eksponering for østrogen og er i bruk som <i>in vitro</i> testmetode for kunstige østrogen

E2	17 $\beta$ - $\text{estradiol}$
IC <sub>50</sub>	konsentrasjonen av en forbindelse som fører til hemming av effekt på 50% av individene i en populasjon
Ligand	et molekyl som binder til en spesifikk reseptor eller annet målmolekyl
mRNA	budbringerRNA
PAH	polysykliske aromatiske hydrokarboner
PBB	polybromert bifenyl
PBDD	polybromerte dibenzo- <i>p</i> -dioksiner
PBDE	polybromert difenyleter
PBDF	polybromerte dibenzofuraner
PBP	polybromert fenol
PBS	fosfatbuffer med natriumklorid
PCDD	polyklorete dibenzo- <i>p</i> -dioksiner
PCDF	polyklorete dibenzofuraner
RR	resorufin
TCDD	2,3,7,8-tetraklordibenzo- <i>p</i> -doksiner
TBBPA	tetrabrombisfenol A
Transkripsjon	kopiering av DNA for dannelsen av budbringerRNA (mRNA) som del av proteinsyntesen
Transkripsjonsfaktor	et protein som setter i gang aktivering av eukaryotisk transkripsjon
Translasjon	oversetting av nukleotidsekvens i en budbringerRNA (mRNA) til aminosyrer som settes sammen til et protein
Vtg	vitellogenin

XRE	xenobiotisk-responselement
ZM	ZM 189.154
4-BP	4-bromfenol
2,4-BP	2,4-dibromfenol
2,4,6-BP	2,4,6-tribromfenol
7-ER	7-etoksyresorufin- <i>O</i> -deetylase

# 1 Innledning

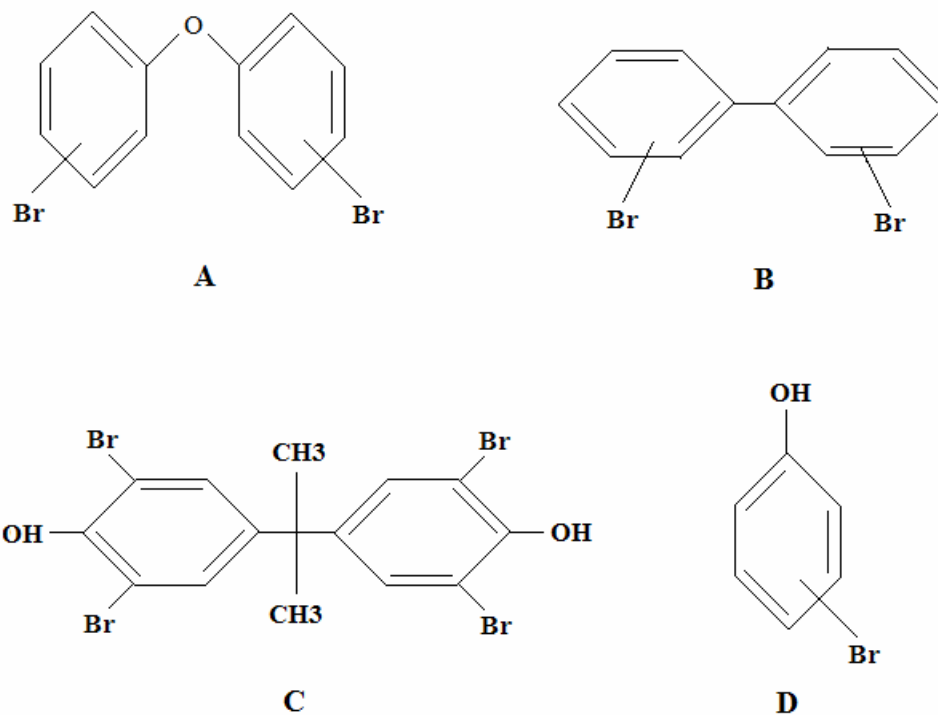
Det akvatiske miljøet er et oppsamlingssted for et stort antall miljøgifter tilført fra industrielle prosesser, jordbruk og urbane miljøer. Disse miljøgiftene er kjemikalier som selv i små konsentrasjoner kan gi skadeeffekter ved at de er giftige og kan oppkonsentreres til skadelige konsentrasjoner i næringskjeden og/eller har særlig lav nedbrytbarhet (Miljøstatus 2005). Flere land har i de siste årene fokusert mye på bromerte flammehemmere (BFR), hvis egenskaper har vist å ha alvorlige skadevirkninger på miljø og helse. Bromerte flammehemmere er kjemikalier som hovedsakelig brukes i elektronikk, elektriske artikler, møbler og bygningsmateriell for å hindre brannfare. De har vist seg å kunne frigis fra materialet de brukes i til miljøet, hvor de vil være tilgjengelige for opptak i organismer. Den lave vannløseligheten, persistensen og høye bindingsaffiniteten til partikler fører til at disse stoffene kan nå kritiske nivåer i det akvatiske miljøet (Darnerud et al. 2001). I Norge er disse funnet i økende mengder i miljøet blant annet i fisk, sjøfugl og sjøpattedyr som sel (SFT 2005).

Som følge av høy produksjon og stort forbruk av disse blandingene, økende kontaminering i miljøet, fauna og mennesker, og begrenset kjennskap til deres potensielle effekter, er det nødvendig å avdekke hvilke skadelig effekter som kan oppstå som følge av eksponering for disse stoffene (Birnbaum og Staskal 2004).

## 1.1 Bromerte flammehemmere

De bromerte flammehemmerne kan deles opp i fem hovedklasser: Bromerte bisfenoler, difenyletere, sykloodekaner, fenoler og ftalatsyrederivater (Birnbaum og Staskal 2004). Figur 1. Viser strukturen til hver av stoffgruppene i dette arbeidet.





Figur 1. Kjemisk struktur av (A) polybromerte difenyletere (PBDE), (B) polybromerte bifenyler (PBB), (C) tetrabrombisfenol A (TBBPA) og (D) polybromerte fenoler (PBP).

Polybromerte difenyleter (PBDE) finnes som tre kommersielle blandinger: pentabrom difenyleter (pentaBDE), oktabrom difenyleter (oktaBDE) og dekabrom difenyleter (dekaBDE). Produksjon, import, eksport, omsetning og bruk av stoff og stoffblandinger med 0,1 vektprosent eller mer av pentaBDE og oktaBDE ble forbudt i EU fra og med midten av august 2004. Dette skyldtes deres uønskede helse- og miljøvirkninger, samt deres stabile egenskaper, spredning i miljøet og oppkonsentrering i næringskjeden. Det finnes ingen restriksjon mot bruk av dekaBDE, og blandinger av dekaBDE brukes i dag i elektronikk og elektrisk utstyr til bruk i transport- og bygningssektoren. Ved forbrenning av produkter med PBDE blir det dannet polybromerte dibenzofuraner (PBDF) og polybromerte dibenzo-*p*-dioksiner (PBDD) (WHO/IPCS 1994). Polybromerte difenyletere er funnet i prøver fra luft, slam, sediment, akvatiske og terrestriske organismer verden over (Darnerud et al 2001).

Stoffene BDE-47, -49, -99, -100 og -153 er blant de kongenerne som er funnet i de fleste prøvene.

Polybromerte bifenyler (PBB) ble produsert av ”Michigan Chemical Corporation” som flammehemmere for polymeriske blandinger (Safe 1984). I begynnelsen av 1970-årene ble dyrefôr i Michigan kontaminert med Firemaster FF-1 (en kommersiell PBB-blanding), noe som førte til tap av husdyrbestander og langtidspåvirkning av helsen til bønder (Dunckel 1975; Mercer et al. 1976; Fries 1985). Etter denne hendelsen har den globale produksjonen av PBB avtatt og fullstendig opphørt etter år 2000.

Tetrabrombisfenol A (TBBPA) brukes i dag hovedsakelig som reaktiv flammehemmer (90%) i ulike elektroniske kretskort. Bruken av TBBPA er utbredt og siden stoffet er lite vannløselig vil eksponering for TBBPA og dens fettløselighet kunne føre til akkumulering i biologiske systemer (Kitamura et al. 2002). 2,4,6-tribromfenol (2,4,6-BP), PBDD og PBDF er fotolyse- og forbrenningsprodukter av dette stoffet (WHO/IPCS 1995). Tetrabrombisfenol A er blant annet funnet i luft, sediment, fisk og skalldyr i Japan og Sverige (WHO/IPCS 1995) og i blodprøver fra mennesker (Thomsen et al. 2001).

Polybromerte fenoler (PBP) brukes som trebevarende middel, soppmiddel og som et mellomprodukt i flammehemmerprodukter (WHO/IPCS 2005). Ved forbrenning av materialer med 2,4,6-BP vil PBP bli frigitt til miljøet (Rios et al. 2003). 2,4,6-tribromfenol er dokumentert i høy konsentrasjon i blodprøver fra mennesker (Thomsen et al. 2001). Naturlige PBP, som 4-bromfenol (4-BP), 2,4-dibromfenol (2,4-BP), 2,6-dibromfenol og 2,4,6-BP, er vanlige i marint sediment (Fielman et al. 2001; WHO/IPCS 2005). Tabell 1 viser forbruket av utvalgte flammehemmere i ulike verdensdeler.

**Tabell 1 Estimert markedsbruk for polybromerte difenyletere og tetrabrombisfenol A i 1999 i tonn**

	PentaBDE	OktaBDE	DekaBDE	TBBPA
Amerika	8 290 <sup>a</sup>	1 375 <sup>a</sup>	24 300 <sup>a</sup>	21 600 <sup>a</sup>
Europa	210 <sup>a</sup>	450 <sup>a</sup>	7 500 <sup>a</sup>	13 800 <sup>a</sup>
Asia	0 <sup>a</sup>	2 000 <sup>a</sup>	23 000 <sup>a</sup>	85 900 <sup>a</sup>
Norge	0,1 <sup>b</sup>	-	25 <sup>b</sup>	153 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>(de Wit 2002)<sup>b</sup>(Mariussen 2003)

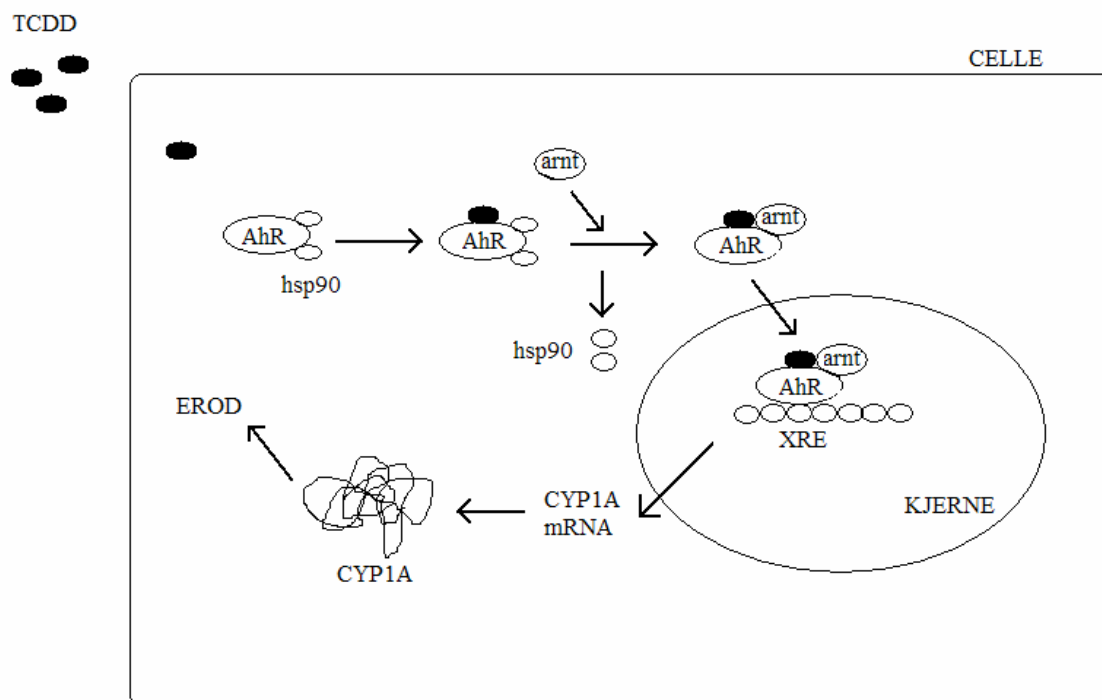
## 1.2 Biologiske effekter av bromerte flammehemmere

De bromerte flammehemmerne har vist seg å ha en lav akutt og kronisk giftighet (de Wit 2002), men kan potensielt påvirke flere cellulære signalveier assosiert med langtidseffekter av fremmedstoffer.

### 1.2.1 Effekter mediert via arylhydrokarbon-reseptor

I likhet med polyklorerte bifenyler har flere studier vist at BFR kan indusere og hemme mikrosomal enzymaktivitet hos ulike organismer *in vitro* (Chen et al. 2001; Kuiper et al. 2004) og *in vivo* (Babish et al. 1975; Elcombe og Lech 1978; Law og Addison 1981; Bursian et al. 1983; Norrgren et al. 1993; Tjarnlund et al. 1998; Ronisz et al. 2004) i det akvatiske miljøet. Ved forbrenning av PBDE, PBB, TBBPA, PBP og andre BFR blir det dannet PBDF og PBDD (WHO/IPCS 1994). Stoffene PBDF og PBDD minner om polyklorerte dibenzofuraner (PCDF) og polyklorerte dibenzo-*p*-dioksiner (PCDD) som har vist seg å binde til arylhydrokarbon-reseptor (AhR). Bindingen av stoffet til AhR gjør at varmesjokkproteinene, hsp 90-proteinene, dissosierer fra reseptoren, og det ligandbundne-komplekset vil bli translokalisert til kjernen. Via dimerisering til Arnt, et nukleært translokeringsprotein, bindes komplekset til en sekvens på DNA, xenobiotisk-

responselement, i regulerende område av genet. Dette fører til transkripsjon av en rekke ulike gener, blant annet gene som koder for cytokrom P4501-enzym (Figur 2).



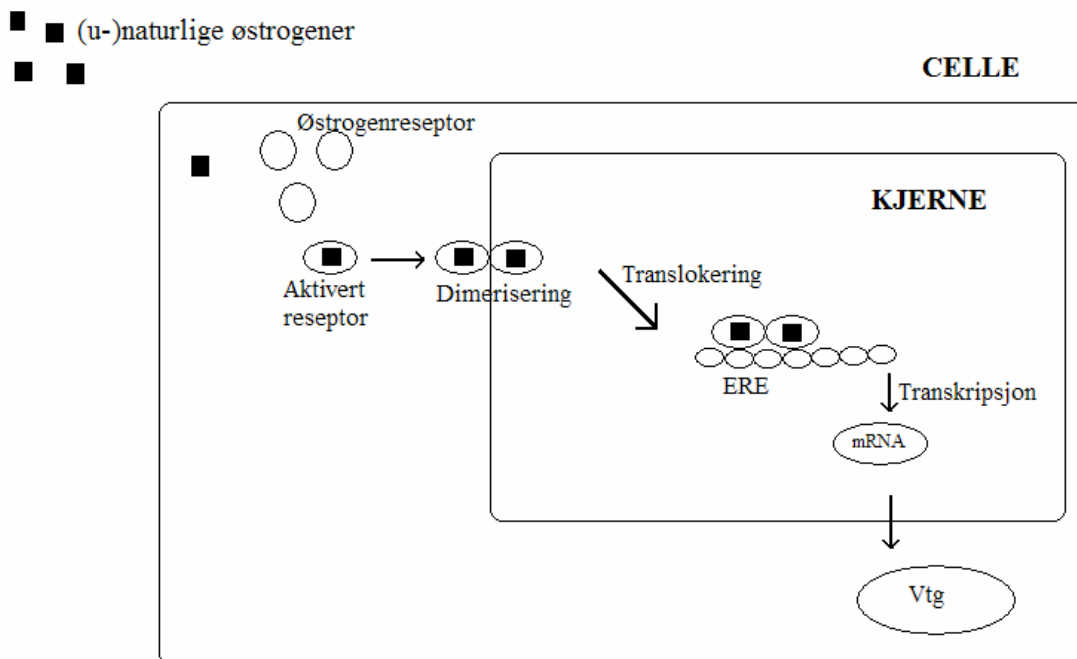
Figur 2. Mekanisme for aktivering av arylhydrokarbon-reseptor (AhR) signaltransduksjonsvei. TCDD entrer cellen og aktiverer AhR. Varmesjokkproteiner, hsp90, dissosierer fra reseptoren og Arnt, et nukleært translokiseringsprotein, binder seg til ligand-reseptorkomplekset. Dette komplekset translokiseres til kjernen og bindes til xenobiotisk-responselement (XRE) som aktiverer transkripsjon av gener for cytokrom P4501A (CYP1A) og økt proteinsyntese. Cytokrom P4501A-aktiviteten kan måles via 7-etoksyresorufin-*O*-deetylase (EROD).

I det akvatiske miljøet brukes induksjon av cytokrom P4501A (CYP1A) og assosiert 7-etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet (EROD-aktivitet) som en biomarkør for eksponering for miljøgifter som polyhalogenerte aromatiske hydrokarboner og polysykliske aromatiske hydrokarboner (Stegeman et al. 1988; Addison et al. 1994; Monosson og Stegeman 1994; Bucheli og Font 1995; Eggens et al. 1995; Sleiderink et al. 1995). Cytokrom P4501A hører til en superfamilie av hemproteiner, som katalyserer monoogsygenering av flere lipofile endogene og eksogene stoffer (Whyte et al. 2000). Det er et membranbundet protein som hovedsakelig er lokalisert i endoplasmatisk

retikulum i lever, men proteinet finnes også i lavere nivåer i andre organeller og vev (Celandier 1993). I leveren blir giftige stoffer biotransformert via fase I og fase II transformasjonsreaksjoner til et produkt som lettere skilles ut (Whyte et al. 2000). Cytokrom P4501A er involvert i fase I reaksjoner hvor stoffet blir gjort polart for å øke vannløseligheten slik at eliminasjonen fra organismen blir lettere og stoffet blir gjort tilgjengelig for fase II biotransformasjon (Andersson og Forlin 1992). Fase I reaksjoner kan imidlertid også føre til dannelse av mer toksiske metabolitter enn utgangsstoffet (Guengerich og Liebler 1985). Cytokrom P4501A underfamilien i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) har to medlemmer som til slutt har fått navnene CYP1A3 og CYP1A1 (Nelson et al. 1996).

### **1.2.2 Effekter mediert via østrogen-reseptor**

Mange industrielle kjemikalier har vist seg å virke som kunstige hormoner, spesielt som østrogener (Jobling et al. 1995; Soto et al. 1995; Zava et al. 1997). De kan påvirke endokrine funksjoner som fører til reproduksjonsforstyrrelser og kreft i østrogen-sensitive vev i mennesker og andre organismer (Colborn et al. 1993). Bromerte flammehemmere har vist potensialet for å være svakt østrogene i *in vitro* arbeid med mus (Meerts et al. 2001) og regnbueørret (Nakari og Pessala 2005). 17 $\beta$ -østradiol (E2) er den naturlige liganden for østrogen-reseptoren (ER), men industrielle, naturlige og farmasøytiske kjemikalier med strukturelle likheter kan binde seg til og aktivere reseptoren (Legler et al. 1999). Mekanismen for 17 $\beta$ -østradiol og kunstige østrogener er like og involverer binding til ER, dissosiasjon av varmesjokkproteinene (hsp 90-proteiner), fra reseptoren og homodimerisering av to enkeltreseptorer (Figur 3). Homodimer-komplekset binder seg til et bestemt område på DNA-sekvensen kalt østrogen-responselement. Transkripsjonen settes i gang og budbringerRNA (mRNA) oversettes til vitellogenin (Vtg) (Legler et al. 1999).



Figur 3. Mekanisme for aktivering av østrogen-reseptor (ER) signaltransduksjonsveien. Østrogen entrer leverceller via diffusjon og aktiverer ER. Etterfulgt av dimerisering translokaliseres ligand-reseptorkomplekset til kjernen og bindes til østrogen-responselement (ERE). Binding til ERE aktiverer transkripsjon av østrogenfølsomme gener som vitellogenin (vtg) og resulterer i økt produksjon av proteinet vitellogenin. Vitellogenin skiller ut av cellene og kan måles immunologisk ved spesifikke antistoffer.

Vitellogenin er en hovedbyggesten for eggeplommeprotein, vitellin, som er et energilager for det utviklende fosteret i eggleggende dyr. I kjønnsmodne hunner skjer vitellogenin-syntesen som en respons på endogene østrogen. Vitellogenin finnes i varierende konsentrasjoner i blodet til hunnfisk under utviklingen, men den er hovedsakelig fraværende hos hannfisk (Copeland et al. 1986). Hannfisk har Vtg-genet og det genetiske maskineriet til å produsere proteinet, så eksponering for både naturlig og syntetiske østrogen kan sette i gang ekspresjonen av gener og produksjonen av proteinet Vtg (Chen 1983). Vitellogenin brukes derfor som en biomarkør for stoffets østrogene potensial både *in vitro* og *in vivo* (Sumpter og Jobling 1995).

### 1.3 Interaksjoner

Kjemikalier i blanding kan virke på forskjellige måter. Noen av begrepene som brukes for samvirke av stoffer er ”lik virkning-ingen interaksjon” (”simple similar action”), ”ulik virkning-ingen interaksjon” (”simple dissimilar action”) og ”interaksjoner” (Feron og Groten 2002). ”Lik virkning-ingen interaksjon”, også kalt additivitet (Mauderly 1993) foreligger i en blanding når den kombinerte effekten av to kjemikalier er lik summen av effektene som hvert stoff gir alene. ”Ulik virkning-ingen interaksjon” får man når virkningen og muligens, men ikke nødvendigvis, natur og sted for toksisk effekt er forskjellig blant kjemikaliene i blandingen (Feron og Groten 2002). Begrepet ”interaksjon” fraviker fra de andre to begrepene ved at effekten av kjemikaliene i blandingen kan enten føre til en sterkere (synergistisk, potensierte) eller svakere (antagonistisk, hemmende) effekt enn forventet ved additivitet (Feron og Groten 2002). Mekanismen bak interaksjonen kan være av fysikokjemisk og/eller av biologisk natur. Interaksjonen kan skje i ulike faser som eksponeringsfasen ved at stoffene reagerer med hverandre, i toksikokinetisk fase (prosess for opptak, fordeling, metabolisme og ekskresjon) eller i toksikodynamisk fase (effekten av kjemikaliene på reseptor, cellulært mål eller organ) og kan skyldes direkte kjemiske og fysiske reaksjoner mellom stoffene (Cassée 1999).

Kjemikalier kan virke direkte på en reseptor for å gi en effekt, men effekten til et stoff kan også virke indirekte inn på en annen reseptor. Et eksempel på dette er samarbeidet mellom ER og AhR. Flere *in vitro* arbeid har vist at AhR-agonister hemmer effekter som er induert av østrogen (Wormke et al. 2003; Bermanian et al. 2004). Mekanismen bak denne effekten er fortsatt usikker, men mange teorier er foreslått. Bermanian og medarbeidere (2004) viste at nærvær av 2,3,7,8-tetraklordibenzo-p-doksin (TCDD) hemmet E2-indusert ER- og Vtg-genekspressjon antakelig via direkte interferens mellom AhR og den autoregulerende transkripsjonssløyfen til ER. Bakgrunnen for denne teorien var blant annet at den kjente AhR-antagonisten,  $\alpha$ -naftaflavon ( $\alpha$ -NF), reverserte den hemmende effekten til TCDD og at TCDD førte til en reduksjon i nivå av Vtg- og ER-mRNA. Denne effekten skyldtes ikke destabilisering av Vtg- og ER-mRNA etter transkripsjon (Bermanian et al. 2004). I følge Wormke og

medarbeidere (2000) er samarbeid mellom ER og AhR involvert i aktivering av proteasomer (proteinstruktur som er involvert i degraderingen av andre proteiner). Arylhydrokarbon-reseptoren (AhR) binder mange strukturelt forskjellige ligander, hvor struktur-bindingsforholdet korrelerer med struktur-aktivitetsforholdet. På samme måte viste tre forskjellige AhR-agonister seg å aktivere proteasomavhengig degradering av ER-proteinet i forhold til binding av AhR, som betyr at effekten var korrelert med affiniteten til AhR. Celler med fraværende AhR som ble eksponert for TCDD virket ikke inn på degradering av ER. Dette antyder at ligand-aktivert degradering av ER i brystkreftceller er avhengige av AhR (Wormke et al. 2000). Andre foreslåtte mekanismer er hemmende transkripsjonsfaktorer, hemmende xenobiotisk-responselementer i ER-promotergener eller at de deler samme koaktivator/repressor (Safe og Wormke 2003).

#### 1.4 Problemstilling

Målet med denne oppgaven var å undersøke cytotoxiske og subletale effekter av PBDE, PBB, TBBPA og PBP i primære hepatocytter fra regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ved bruk av et utvalg av forskjellige biomarkør- og effektendepunkter. Som biomarkører for induksjon/hemming av CYP1A i lever ble EROD-aktivitet målt. Induksjon/hemming av vitellogenin-syntese ble brukt som biomarkør for stoffenes østrogene og antiøstrogene effekt. Metabolsk hemming og tap av membranintegritet ble brukt som mål på cytotoxisitet (akutt giftighet).

Regnbueørret er en viktig modellorganisme for miljøovervåking av flere miljøgifter i det akvatiske miljø. Den er en av de mest studerte fiskeartene innenfor økotoksikologien. Regnbueørret er en viktig organisme i akvakultur og er en god modell for andre økonomisk viktige laksefisk som atlantehavslaks (*Salmo salar*) (Thorgaard et al. 2002). Selv om *in vivo* studier er å foretrekke grunnet behov for å vurdere alle kroppens mekanismer under ett, er bruk av *in vitro* testsystemer ofte brukt. Argumentene for dette er å redusere forbruk av dyr og å gjennomføre kostnadseffektiv testing av mange eksponeringssammensetninger. Bruk av primærceller framfor



cellelinjer er gunstig med tanke på at disse cellene bevarer mange viktige *in vivo* mekanismer (Segner 1998).

**Problemstillinger som skulle belyses med oppgaven:**

1. Har ulike bromerte flammehemmere evne til å aktivere/hemme CYP1A i leverceller (hepatocytter) fra fisk?
2. Kan bromerte flammehemmere indusere eller hemme Vtg i leverceller (hepatocytter) fra fisk?
3. Finnes det interaksjoner mellom bromerte flammehemmere og TCDD eller E2 i leverceller (hepatocytter) fra fisk?
4. Hvilken virkningsmekanisme (Cytotoksisitet, AhR-mediert giftighet eller ER-mediert giftighet) er av størst betydning for BFR?

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Kjemikalier og løsninger

2,2', 4,4'-tetrabrom difenyleter (BDE-47), 2,2', 4,5'-tetrabrom difenyleter (BDE-49), 2,2', 4,4', 5-pentabrom difenyleter (BDE-99), 2,2', 4,4', 6-pentabrom difenyleter (BDE-100), 2,2', 4,4', 5,5'-heksabrom difenyleter (BDE-153) og 2,2', 4,5'-tetrabrom bifenylyl (BB-49), 2,2', 4,4', 5,5'-heksabrom bifenylyl (BB-153) ble levert av Chiron AS (Trondheim, Norge) og hadde alle en renhet større enn 99,8%. 4-bromfenol (4-BP) (> 99%), 2,4-dibromfenol (2,4-BP) (> 97%), 2,4,6-tribromfenol (2,4,6-BP) (> 99%), 17 $\beta$ - $\alpha$ -estradiol (E2),  $\alpha$ -naftaflavon ( $\alpha$ -NF), Dulbeccos modified eagles medium (DMEM) uten fenolrødt, kollagenase, dimetylsulfoksid (DMSO), bovin serum albumin (BSA), 7-etoksyresorufin (7-ER), resorufin (RR), trizma-base, trizma-HCL ble levert fra Sigma (St. Louis, Oregon, USA). 2,3,7,8-tetraklordibenzodioksin (TCDD) ble levert av Cambridge Isotope Laboratories (Woburn, MA, USA). Karboksyfluoresindiacetat-acetoksymetylester (CFDA-AM) ble levert av Molecular probes (Leiden, Nederland), Alamar Blue (AB) ble levert av BioSource Europe S.A. (Nivelles, Belgia), mens Leibowitz L-15 medium, L-glutamin, penicillin, streptomycin og fungison, NaHCO<sub>3</sub>, 0,4% trypanblått ble levert av Biowhittaker Inc. (Walkersville, Maryland, USA). Geit Anti-mus IgG (H+L)-HRP konjugat ble levert av BIO-RAD. Mus anti-laks Vtg, monoklonalt antistoff, BN-5 ble levert av Biosense Laboratories AS (Bergen, Norge). Etanol ble levert av Arcus AS Oslo (Norge). NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaOH var alle fra Merck. Antiøstroget ZM 189.154 (ZM) og Tetrabrombisfenol A (TBBPA) (98,5%) var generøse gaver donert av henholdsvis T. Hutchinson (AstraZeneca, Brixham Environmental Laboratory, Brixham, UK) og Dr. Christel Olsen (Folkehelseinstituttet). Alle kjemikalier brukt i eksponeringsforsøk ble løst i vannfritt og ultraren DMSO (>99,8%) og lagret mørkt.

## 2.2 Forsøksdyr

Regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ble kjøpt fra Killi oppdrettsanlegg (Dovre, Norge). Fisken ble oppbevart i tanker ved Biologisk institutt, Universitetet i Oslo med vanntemperatur på 12°C, oksygenmetning rundt 100% og pH 6,6. Ørreten ble føret med Ewos Transfer pellet (Ewos, Bergen, Norge) og det ble benyttet 12 timer lys per dag. Kun umoden fisk eller hannfisk ble brukt i arbeidet.

## 2.3 Isolering av leverceller (hepatocytter) fra regnbueørret

Leveren består av ulike typer celler, hvorav hepatocytter er de metabolsk mest aktive cellene (Monod et al. 1998). Hepatocytter kan isoleres fra de andre levercellene ved en totrinns perfusjonsmetode opprinnelig beskrevet av Berry og Friend (1969) og modifisert for fisk av Andersson et al. (1983). Metoden baserer seg på at en kalsiumfri perfusjonsløsning først fører til brudd på celle-celle interaksjoner, og perfusjon med en kollagenaseløsning fører deretter til nedbrytning av bindevev som holder cellene sammen. Selektiv sentrifugering kan da skille hepatocytter fra de andre cellene og holdes i en primærkultur.

### Stamløsning av perfusjonsbuffer.

35,7 g NaCl, 1,8 g KCl, 0,75 g MgSO<sub>4</sub>, 8,0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,55 g NaHCO<sub>3</sub> og 5000 ml dH<sub>2</sub>O pH ble justert til 7,5.

Hepatocyttene ble isolert ved en modifisert totrinns perfusjonsmetode beskrevet av (Tollefsen et al. 2003). Fisken ble avlivet med et slag i hodet og klippet opp fra gattfinnen til leveren med en saks. Det ble laget et lite snitt i portalåren hvor en kanyle med ventil ble ført inn. En tråd ble knyttet rundt kanylen og åren for å hindre lekkasje og for å holde nålen inne i åren. Perfusjonen ble startet når ventilen ble åpnet og en kalsiumfri løsning (stamløsning med 10 mg/ml EGTA) ble skyllet gjennom sirkulasjonssystemet til fisken ved 12°C med en hastighet på 10 ml/min i 10-15 minutter avhengig av størrelsen til fisken. Det ble laget et snitt i hjertet for å redusere mottrykket

under perfusjonen. Leveren ble så perfundert med en kollagenaseløsning (stamløsning med 220 mg/ml  $\text{CaCl}_2$  og 300 mg/ml kollagenase) ved  $37^\circ\text{C}$  med samme perfusjonshastighet i 10-15 minutter. Leveren ble deretter fjernet ved bruk av pinsett og overført til en dyp petri-skål som inneholdt 1-2 ml iskald resuspensjonsløsning (perfusjonsbuffer tilsatt 1 mg/ml BSA). Petri-skålen ble ristet forsiktig for å spre cellene, mens pinsett ble brukt for å løsne store klumper med celler og nye 10 ml resuspensjonsvæske ble tilført. Cellesuspensjonen ble filtrert først gjennom et  $250\ \mu\text{m}$  og deretter et  $100\ \mu\text{m}$  nylon nett, og nettet vasket med 5 ml iskald resuspensjonsløsning. Cellene ble deretter sentrifugert i 4 minutter ved 500 rpm ( $4^\circ\text{C}$ ). Supernatanten ble fjernet og cellene ble resuspendert i resuspensjonsløsning. Cellene ble sentrifugert på nytt med samme forhold, men nå bare i 3 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellene resuspendert i Leibowitz L-15 medium (L-15) tilsatt 0,38 mg/ml  $\text{NaHCO}_3$ , 0,29 mg/ml LG, 100 enheter/ml penicillin, 0,1 mg/ml streptomycin og 0,25 mg/ml fungison. Cellene ble deretter sentrifugert på nytt under samme betingelser. Supernatanten ble fjernet og cellene ble resuspendert i L-15 medium og fortynnet til 1 million celler/ml.

Viabilitet og celleantall ble målt med trypanblått og kun celleisoleringer med viabilitet  $> 90\%$  ble benyttet til forsøk. Celleutbyttet ble også målt med en Coulter partikkelteller (celle størrelse 11-20  $\mu\text{m}$ ) for endelig fortynning i L-15 medium til 500 000 celler/ml. 200  $\mu\text{l}$  per brønn av fortynnet cellesuspensjon ble platet ut i 96 brønners plater (Microtest<sup>TM</sup> Primaria<sup>TM</sup> Flat Bottom). Alt utstyr som ble brukt under isoleringen var autoklavert og sterilisert ved bruk av 70% etanol.

## 2.4 Eksponering av hepatocytter

Hepatocytene ble eksponert for forskjellige bromerte flammehemmere to dager etter isoleringen. Eksponeringen ble gjennomført ved å løse testforbindelsene i DMSO og deretter fortynne denne stamløsningen i celledyrkningsmediet. Før eksponering ble halvparten av mediet fjernet og brønnene tilsatt eksponeringsløsninger for eksponering i 48 timer. Etter 48 timer ble en del av cellene preparert for 7-etoksyresorufin-O-deetylase-analyse (EROD-analyse), mens resterende plater ble reeksponert for nye 48 timer for måling av cellenes membranintegritet, og metabolsk aktivitet samt innhold av

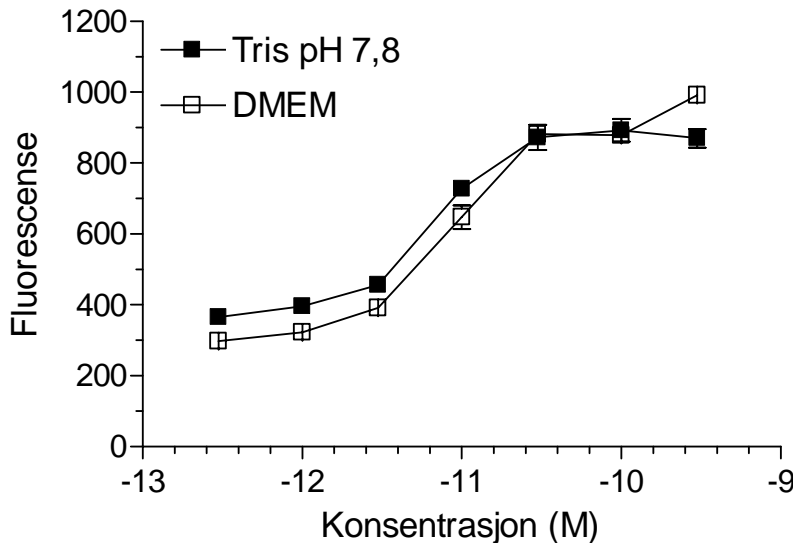
vitellogenin (Vtg) i celledyrkningsmediet. Arbeid med binære blandinger av teststoffer og hemmer ble gjennomført på tilsvarende måte. Stoffene TCDD og  $\alpha$ -NF ble brukt som positiv og negativ kontroll for EROD-induksjon, mens E2 og ZM ble henholdsvis brukt som positiv og negativ kontroll for induksjon av Vtg. Fenol ble benyttet som positiv kontroll for studier av stoffenes effekt på membranintegritet og metabolsk aktivitet. Arbeidet ble utført med minst tre paralleller av hver konsentrasjon. DMSO (konsentrasjon  $\leq 1\%$ ), som ble benyttet som løsemiddel for teststoffene, ble tilsatt i en konsentrasjon som ikke førte til negative effekter på cellene.

## 2.5 7-Etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet

Induksjon av 7-Etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet (EROD-aktivitet) i fiskecellekulturer kan brukes til å studere virkning av dioksinliknende stoffer og andre planare hydrokarboner som polysykliske aromatiske hydrokarboner og polyklorerte bifenyler i fisk (Ganassin et al. 2000). I de fleste vertebrater vil den giftige virkningen av disse stoffene bli mediert via arylhydrokarbon-reseptor-mediert (AhR-mediert) aktivering av cytokrom P4501A (CYP1A), som kan måles katalytisk i form av EROD-aktivitet (Stegeman 1989; Okey et al. 1994). Denne aktiviteten blir målt via omgjøring av det ikke fluorescerende stoffet 7-etoksyresorufin (7-ER) til det kraftig fluorescerende stoffet resorufin (RR).

Måling av EROD-aktivitet i primære hepatocytter er basert på en metode beskrevet av Ganassin et al. (2000) og optimalisert for hepatocytter fra regnbueørret. Mediet ble fjernet fra de eksponerte cellene og 100 ml av reaksjonsblandingen (DMEM eller 0,1 M Tris pH 7,8 med 8,3  $\mu$ M 7-ER) ble tilsatt hver brønn direkte. Da DMEM ikke er kompatibelt med proteinmåling direkte i brønnene ble også en reaksjonsblanding basert på 0,1 M Tris pH 7,8 med 8,3  $\mu$ M 7-ER testet. Cellene i mikrobrønnplatene ble inkubert ved romtemperatur på et ristebord satt til 100 rpm. Etter 10 og 20 minutters inkubasjon i mørket ble fluorescens målt med en fluorescens plateleser med eksitasjons- og emisjonsbølgelengde på henholdsvis 530 og 595 nm. 7-etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktiviteten, målt som dannelsen av RR, ble bestemt ved hjelp av en RR standardkurve. Alt arbeid ble utført i svak belysning for å redusere lysindusert autofluorescens og

nedbrytning av substrat og produkt. Ettersom Tris-buffer ga tilsvarende resultat som en DMEM buffer (Figur 4), ble det valgt å benytte Tris grunnet DMEMs interferens med proteinmålingene.



Figur 4. 7-Etoksyesorufin-*O*-deetylase-aktivitet i en kultur av leverceller eksponert for 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD) ved bruk av to forskjellige buffere, Tris pH 7,8 og DMEM. Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

## 2.6 Metabolsk aktivitet og membranintegritet

Hemming av metabolsk aktivitet og tap av membranintegritet kan måles fluoremetrisk ved inkorporering og fanging av fluorescerende fargestoffer i cellene. Alamar Blue (AB), som er en markør for metabolsk aktivitet og 5-karboksyfluoresceindiacetat-acetoksymetylester (CFDA-AM), som er en markør for membranintegritet, kan måles direkte i cellebrønnene. De ikke fluorescerende kjemikaliene blir primært tatt opp i mitokondriene (AB) og cytosol (CFDA-AM) hvor de blir hydrolysert til fluorescerende produkter ved hjelp av intracellulære esteraser.

Etter to eksponeringer av 48 timer, ble mediet fjernet fra de eksponerte cellene og 100  $\mu$ l av en løsning bestående av CFDA-AM (4  $\mu$ M) og Alamar Blue (5% (v/v))

løst i DMEM tilført. Etter en inkuberingsperiode på 30 minutter i mørket ved 20°C på et roterende bord (85 rpm) ble fluorescens målt med en fluorescens plateleser (Cytofluor 2300, Millipore) ved bruk av bølgelengdeparet 530 nm/590 nm (eksitasjon/emisjon) for AB og 485 nm/530 nm (eksitasjon/emisjon) for CFDA-AM.

## 2.7 Analyse av vitellogenin

Målingene av vitellogenin (Vtg) i dyrkningsmediet er basert på en ”capture ELISA”-metode der Vtg bindes til brønnoverflaten på en mikrotiterplate. Mengde Vtg bundet til platen måles ved bruk av et spesifikt primært monoklonalt antistoff for regnbueørret Vtg. Et enzymkonjugert sekundært antistoff, bindes deretter til det primære antistoffet med høy affinitet. Det konjugerte enzymet vil så konvertere et ufarget substrat til et farget produkt som kan detekteres spektrofotometrisk. Fargereaksjonen stoppes ved tilsetning av syre når reaksjonen er i den lineære delen av instrumentets måleområde.

Følgende buffer ble benyttet:

### PBS (Fosfatbuffer med natriumklorid).

8,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,72 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 87,66 g NaCl og 10 l  $\text{dH}_2\text{O}$  pH ble justert til 7,2.

Ved slutten av eksponeringsperioden (96 timer) ble 100  $\mu\text{l}$  av cellemediet fra hver brønn i celledyrkningsplaten overført til ELISA plater (Nunc-immuno™ plate). Platene ble lagret i fryser (-80°C) til analysen skulle foregå. Dagen før analyse ble platene tint i kjølerom og tilsatt Vtg standard med konsentrasjoner fra 3-3000 ng/ml. Neste dag ble platene vasket tre ganger med 250  $\mu\text{l}$  vaskebuffer (0,05% Tween-20 i PBS). Uspesifikk binding til veggene i brønnene ble redusert ved inkubering med 200  $\mu\text{l}$  2% BSA i PBS (1 time 20°C). Vaskeprosedyren ble gjentatt som beskrevet ovenfor. Så ble 100  $\mu\text{l}$  av fortynnet monoklonalt antistoff (mus anti-laks Vtg, fortynnet 1:6000 i PBS tilsatt 1% BSA) tilført brønnene og inkubert i 2 timer ved 37°C. Vaskeprosedyren ble gjentatt igjen før 100  $\mu\text{l}$  sekundært enzymkonjugert antistoff (geit anti-mus IgG (H+L)-HRP konjugert, fortynning 1:6000 i PBS tilsatt 1% BSA) ble tilsatt brønnene og det hele

inkubert i 1 t ved 37°C. Platene ble deretter vasket fem ganger med 250 µl vaskebuffer og 100 µl av enzymsubstrat ble tilført brønnene og inkubert i 10 minutter før den enzymatiske reaksjonen ble stoppet med 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbansen ble målt ved 450 nm ved bruk av en Thermomax plateleser (Molecular Devices).

## 2.8 Statistiske analyser

Cellene ble eksponert i triplikater (n=3) og arbeidet ble utført på hepatocytter fra tre individuelle fisk. Statistiske analyser ble utført ved bruk av Statistica® Software (versjon 6.1; Statsoft). Alle dataene ble analysert for varianslikhet med Levene's test og undersøkt for normalfordeling. Levene's test tester om variansen mellom replikater av en behandling er like stor/liten som variansen i de andre behandlingene, noe som er en forutsetning for enveis ANOVA (analysis of variance). Ved normalfordeling og lik varians ble det utført enveis ANOVA med signifikans nivå  $\alpha=0,05$ . For å teste forskjell mellom kontroll og eksponerte grupper ble enveis ANOVA etterfulgt av Dunnet's test. Ved ulikhet i variansen eller normalfordeling ble dataene log<sub>10</sub>-transformert og nye tester for varianslikhet og normalfordeling utført. Dersom dataene fortsatt ikke var normalfordelt eller hadde homogen varians ble det brukt en ikke-parametrisk test, Kruskal-Wallis-test, etterfulgt av Mann Whitney U-test for å avdekke forskjell mellom kontroll og eksponerte grupper.



## 3 Resultater

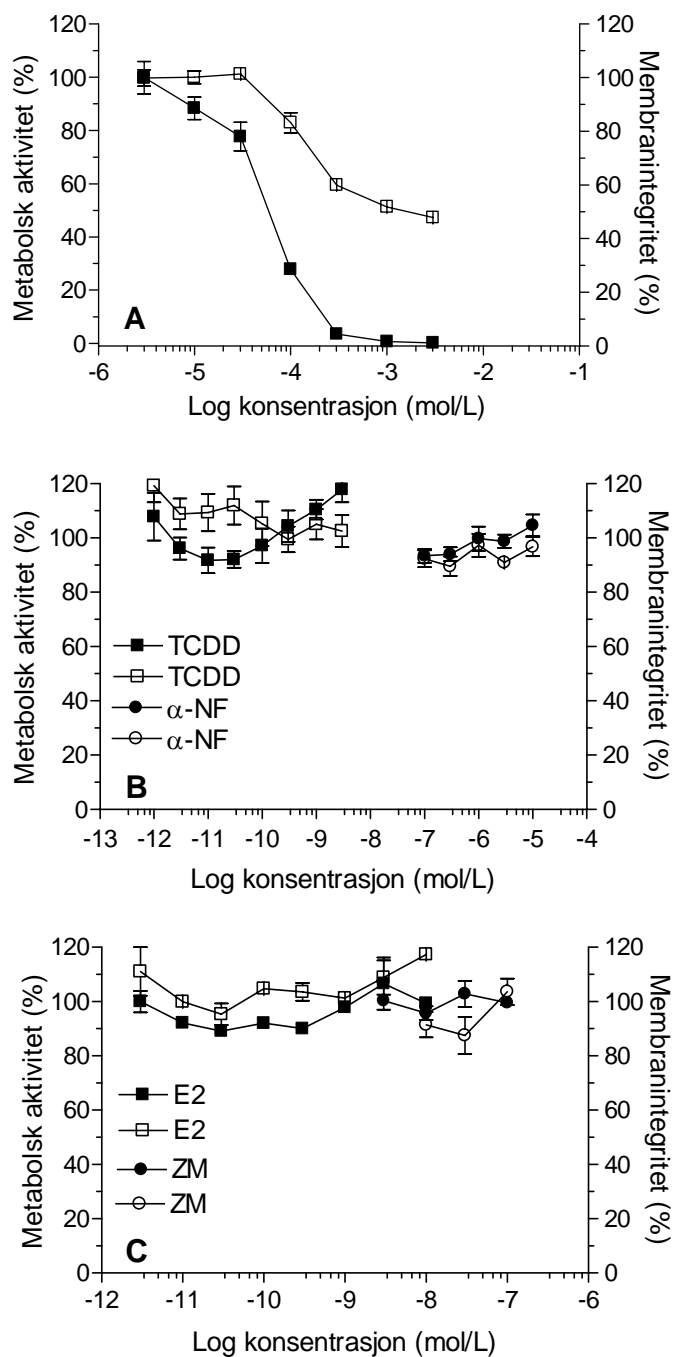
### 3.1 Testforbindelser til standardisering

#### 3.1.1 Metabolsk hemming og membranintegritet

Metabolsk hemming (Alamar Blue) og membranintegritet (CFDA-AM) ble målt etter eksponering for modellstoffet, fenol (Figur 5A). Ved økende dose av fenol ble den metabolske aktiviteten hemmet i forhold til kontroll. Fenol ga en klar dose-responskurve, hvor  $EC_{50}$ -verdien ved eksponeringen var på  $0,1 \mu\text{M}$ . Eksponering for fenol førte også til økt celledødelighet selv om dette skjedde ved høyere konsentrasjoner ( $EC_{50}=135,1 \mu\text{M}$ ).

Den positive kontrollen til 7-etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktiviteten (EROD-aktiviteten), 2,3,7,8-tetraklordibenzodioksin (TCDD), førte til en reduksjon i den metabolske aktiviteten for deretter å øke den ved høyere konsentrasjoner (Figur 5B). TCDD hadde ingen virkning på membranintegriteten til cellene. Stoffet  $\alpha$ -naftaflavon ( $\alpha$ -NF), som er en hemmer av EROD-aktiviteten, virket ikke inn på den metabolske aktiviteten eller membranintegriteten til cellene ved disse konsentrasjonene.

ZM 189.154 (ZM), et kjent antiøstrogen, ble brukt som en positiv kontroll for hemming av produksjonen av Vtg, mens  $17\beta$ -østradiol (E2) ble brukt som positiv kontroll for Vtg-induksjon (Figur 5C). Disse stoffene virket ikke inn på den metabolske aktiviteten eller membranintegriteten til cellene.

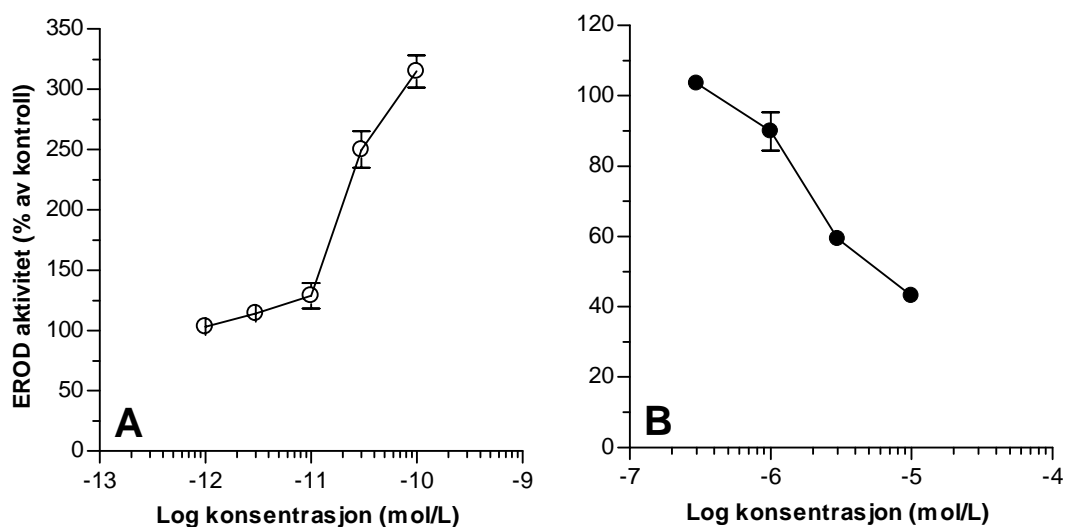


Figur 5. Metabolsk aktivitet (fylte symboler) og membranintegritet (åpne symboler) i kultur av leverceller eksponert for fenol (A), 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD) og  $\alpha$ -naftaflavon ( $\alpha$ -NF) (B) og 17 $\beta$ -østradiol (E2) og ZM 189.154 (ZM) (C). Resultatene er uttrykt som prosent av målinger i forhold til kontroll (DMSO). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

### 3.1.2 Induksjon og hemming av 7-Etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet

Hepatocytene fra regnbueørret hadde en doseavhengig effekt på EROD-aktiviteten etter eksponering for TCDD (Figur 6A: EC<sub>50</sub>: 75 pM). TCDD ga en sterk induksjon ved lave konsentrasjoner, mens den spesifikke hemmeren  $\alpha$ -NF ikke førte til induksjon av EROD-aktiviteten for de konsentrasjoner som ble benyttet.

Koeksponering av TCDD (30 pM) med AhR-antagonisten,  $\alpha$ -NF, ga en doseavhengig hemming i EROD-aktiviteten (Figur 4B). Hemmeren hadde en IC<sub>50</sub>-verdi på 3,8  $\mu$ M.

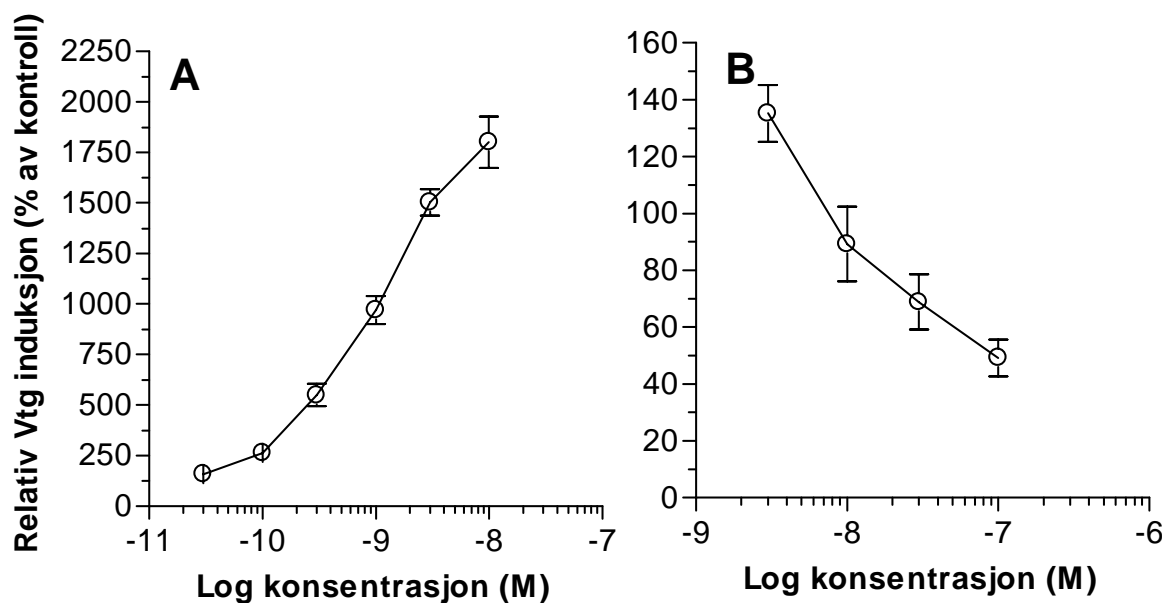


Figur 6. 7-Etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet (EROD-aktivitet) i en kultur av leverceller eksponert for 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD) (A) eller  $\alpha$ -naftaflavon ( $\alpha$ -NF) koeksponert med 30 pM TCDD (B). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (0,1% DMSO for A og 30 pM TCDD for B). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

### 3.1.3 Induksjon og hemming av vitellogenin-produksjon

17 $\beta$ -østradiol (E2), som ble brukt som positiv kontroll, og ZM 189.154 (ZM) sammen med 100 pM E2 ble Vtg induksjonen målt via ELISA metoden (Figur 7). 17 $\beta$ -østradiol (E2) ga en konsentrasjonsavhengig Vtg-induksjon (Figur 7A: EC<sub>50</sub>=1,2 nM).

Koeksponering av E2 (100 pM) med ZM ga en doseavhengig hemming av Vtg (Figur 7B). Hemmeren, ZM, hadde en IC<sub>50</sub>-verdi på 71 nM.



Figur 7. Induksjon av vitellogenin (Vtg) i en kultur av leverceller eksponert for 17 $\beta$ -østradiol (E2) (A) eller ZM 189.154 (ZM) koeksponert med 100 pM E2 (B). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (0,1% DMSO for A og 100 pM E2 for B). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

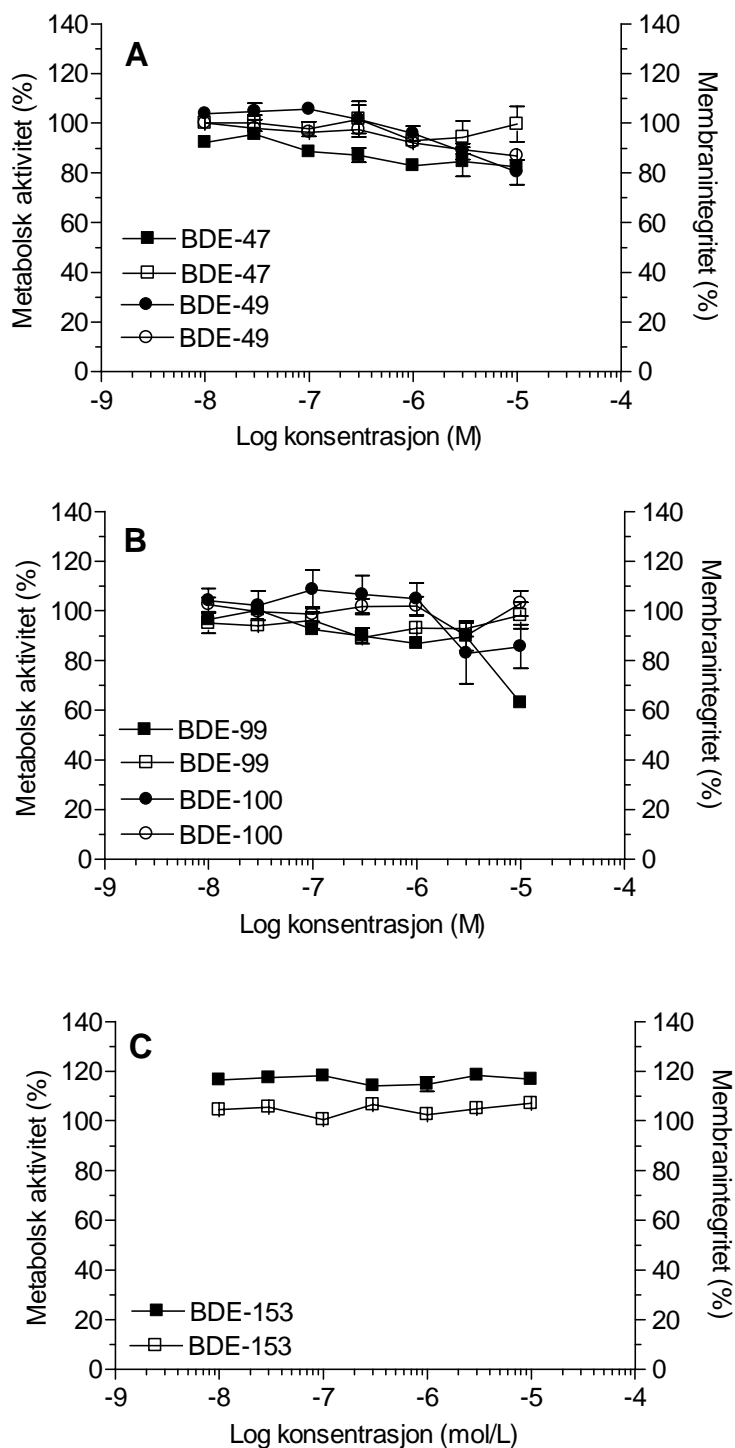
## 3.2 Bromerte flammehemmere

### 3.2.1 Metabolsk aktivitet og membranintegritet

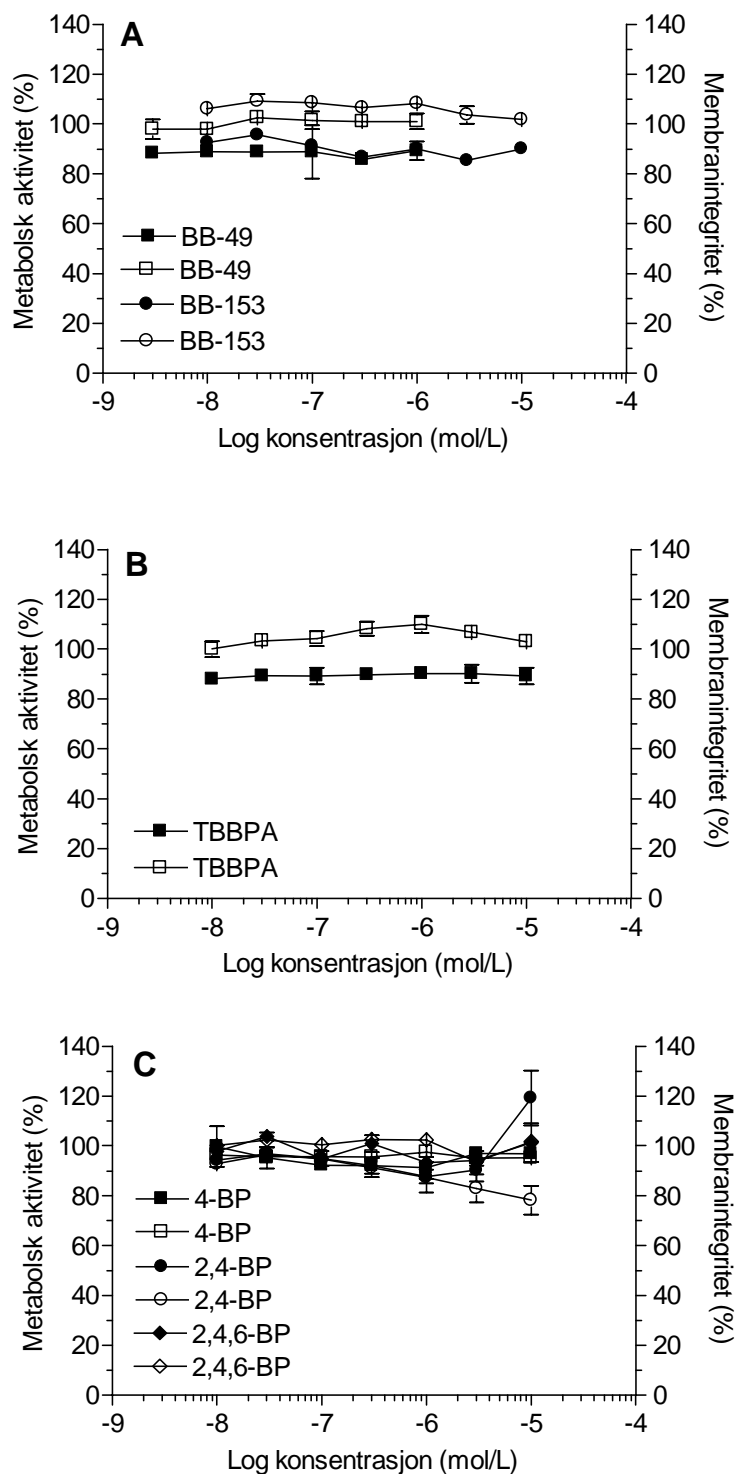
De polybromerte difenyleterne (PBDE) BDE-47, -49 og -100 ga en 20% nedgang i metabolsk aktivitet i forhold til kontroll (Figur 8A). Overlevelsen målt som tap av membranintegritet til celler eksponert for BDE-47 og -100 så ikke ut til å bli endret, men BDE-49 ga en reduksjon i membranintegriteten på 14%. Den polybromerte

difenyleteren, BDE-99, ga ca. 60% hemming av metabolsk aktivitet ved den høyeste eksponeringskonsentrasjonen, men den så ikke ut til å medføre endring i membranintegritet ved disse konsentrasjonene (Figur 8B). BDE-153 førte ikke til endringer i metabolsk aktivitet eller membranintegritet ved disse konsentrasjonene (Figur 8C).

De andre bromerte flammehemmerne (BFR) ga ingen signifikante endringer i den metabolske aktiviteten eller membranintegriteten til levercellene (Figur 9).



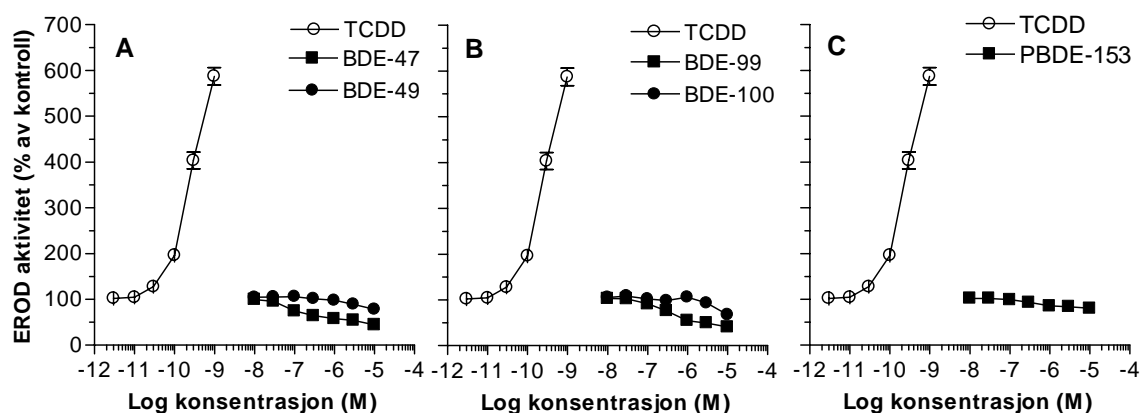
Figur 8. Metabolisk aktivitet (fylte symboler) og membranintegritet (åpne symboler) i kultur av leverceller eksponert for BDE-47 og -49 (A), BDE-99 og -100 (B) og BDE-153 (C). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (0,1% DMSO). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.



Figur 9. Metabolsk aktivitet (fylte symboler) og membranintegritet (åpne symboler) i kultur av leverceller eksponert for BB-49 og -153 (A), TBBPA (B) og 4-, 2,4- og 2,4,6-BP. Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (0,1% DMSO). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer fra en representativ fisk.

### 3.2.2 Induksjon av 7-Etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet

Ingen av de utvalgte PBDE induserte EROD-aktiviteten ved de testede konsentrasjonene, men enkelte av stoffene hemmet den basale aktiviteten (Figur 10). To av kongenerne, BDE-47 og -99, hemmet aktiviteten med ~60%, mens BDE-49 og -153 hemmet aktiviteten i mindre grad (~20%).

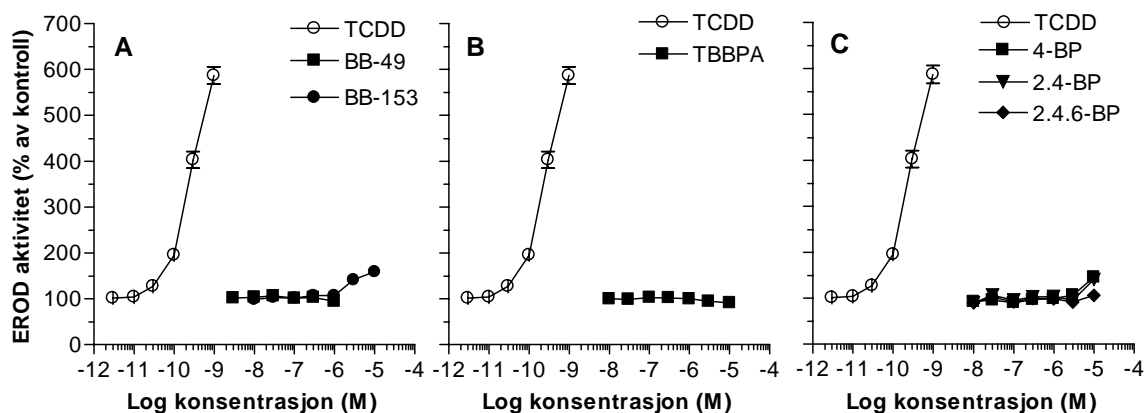


Figur 10. 7-Etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet (EROD-aktivitet) i en kultur av leverceller eksponert for polybromerte difenyleter-kongenerer og 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (0,1% DMSO). Verdiene (gjennomsnitt ± SEM) representerer data fra en representativ fisk.

Av de polybromerte bifenylenene (PBB) var det bare BB-153 som så ut til å virke inn på EROD-aktiviteten ved konsentrasjonene testet i dette arbeidet (Figur 11A). Stoffet BB-153 økte EROD-aktiviteten noe ved 3 µM. Den førte til 69% økning av aktiviteten i forhold til kontrollen. Tetrabrombisfenol A (TBBPA) virket på samme måte som PBDE ved at aktiviteten syntes å bli hemmet (Figur 11B).

For de tre polybromerte fenolene (PBP) testet ga 4-BP og 2,4-BP en økning av EROD-aktiviteten ved høyeste konsentrasjon testet (Figur 11C).

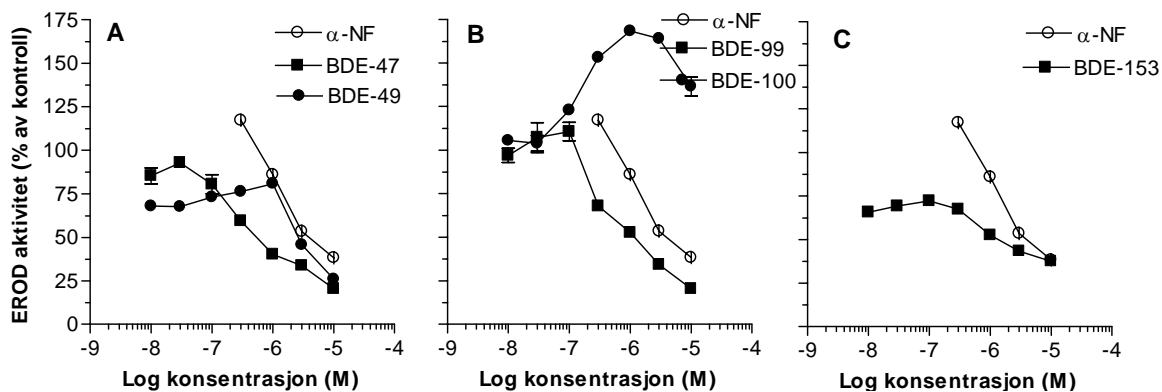




Figur 11. 7-Etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet (EROD-aktivitet) i en kultur av leverceller eksponert for de bromerte flammehemmerne polybromerte bifenyler (PBB), Tetrabrombisfenol A (TBBPA), polybromerte fenoler (PBP) og 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (0,1% DMSO). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

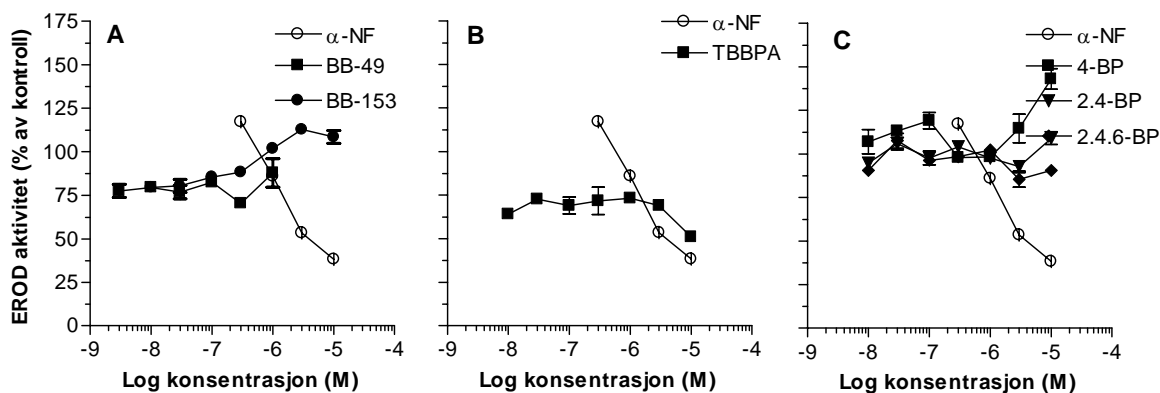
### 3.2.3 Hemming av 7-Etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet

Ved å koeksponere cellene med TCDD og ulike BFR, ble hemming av EROD-aktivitet målt for å avdekke eventuell antagonistisk virkning av stoffene. Kongenerne BDE-47, -49, -99 og -153 hemmet TCDD-indusert EROD-aktivitet (Figur 12). De to kongenerne BDE-47 og -99 viste seg å være de sterkeste hemmerne av aktiviteten. De hemmet induksjonen av TCDD med 80%. De polybromerte difenyleter-kongenerne, BDE-47 ( $IC_{50}=0,5 \mu M$ ), -99 ( $IC_{50}=0,7 \mu M$ ) og -153 ( $IC_{50}=1 \mu M$ ), var mer potente i hemmingen av TCDD-indusert EROD-aktivitet enn  $\alpha$ -NF ( $IC_{50}=4 \mu M$ ) (Figur 12). Kongeneren BDE-100 ble induisert mer ved tilsetning av TCDD enn ved eksponering alene. BDE-100 viste seg å øke EROD-aktiviteten med 68% ved koeksponering for TCDD.



Figur 12. 7-Etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet (EROD-aktivitet) i en kultur av leverceller koeksponert for polybromerte difenyleter-kongenerer eller  $\alpha$ -naftaflavon ( $\alpha$ -NF) med 30 pM 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (30 pM TCDD). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

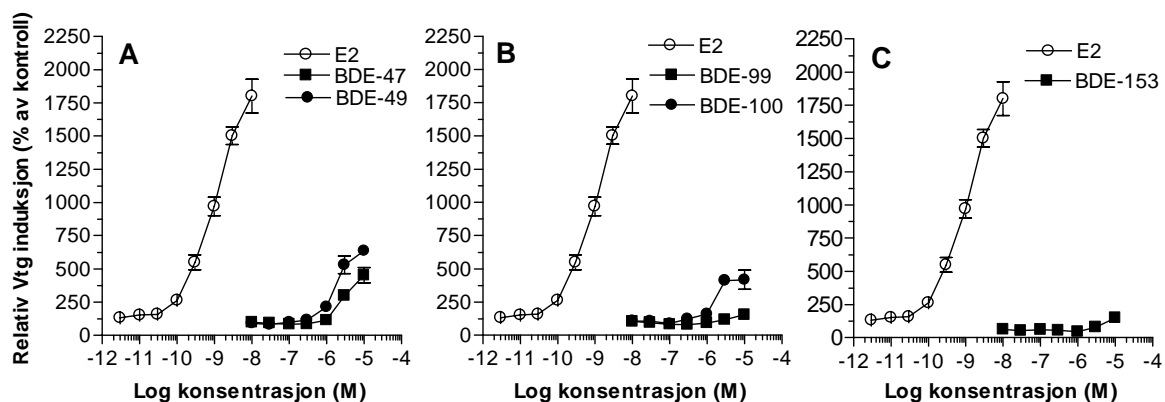
Av de polybromerte bifenylerne var det fortsatt bare BB-153 som førte til en økning i EROD-aktiviteten (Figur 13A), mens man så en reduksjon for TBBPA på den høyeste konsentrasjonen (Figur 13B). De polybromerte fenolene ga en induksjon av EROD-aktiviteten i dette arbeidet på samme måte som uten koeksponering.



Figur 13. 7-Etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet (EROD-aktivitet) i en kultur av leverceller koeksponert for polybromerte bifenyler (PBB), Tetrabrombisfenol A (TBBPA), polybromerte fenoler (PBP) eller  $\alpha$ -naftaflavon ( $\alpha$ -NF) med 30 pM 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (30 pM TCDD). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

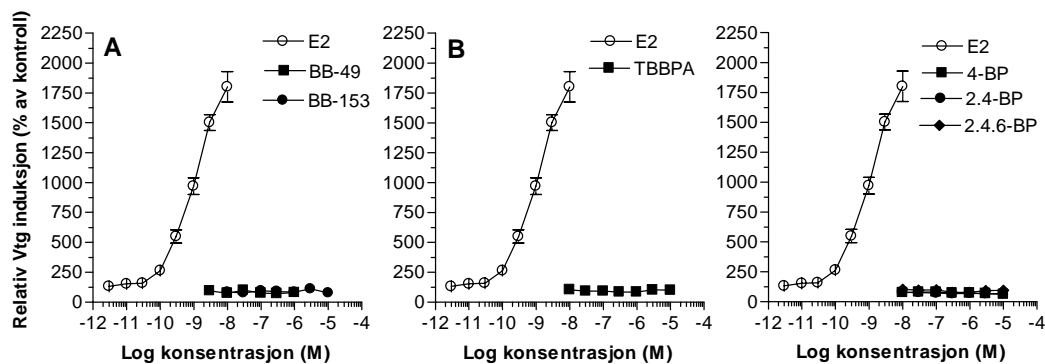
### 3.2.4 Induksjon av vitellogenin-produksjon

De bromerte flammehemmerne ble sammenlignet med E2 i forhold til evnen til å inducere Vtg i cellekulturen. Samtlige PBDE viste seg å ha evnen til å inducere Vtg i hepatocytene, men de var fra 16 000-300 000 ganger mindre potente enn E2 (Figur 14).



Figur 14. Induksjon av vitellogenin (Vtg) i en kultur av leverceller eksponert for polybromerte difenyleter-kongenerer og  $17\beta$ -østradiol (E2). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (0,1% DMSO). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

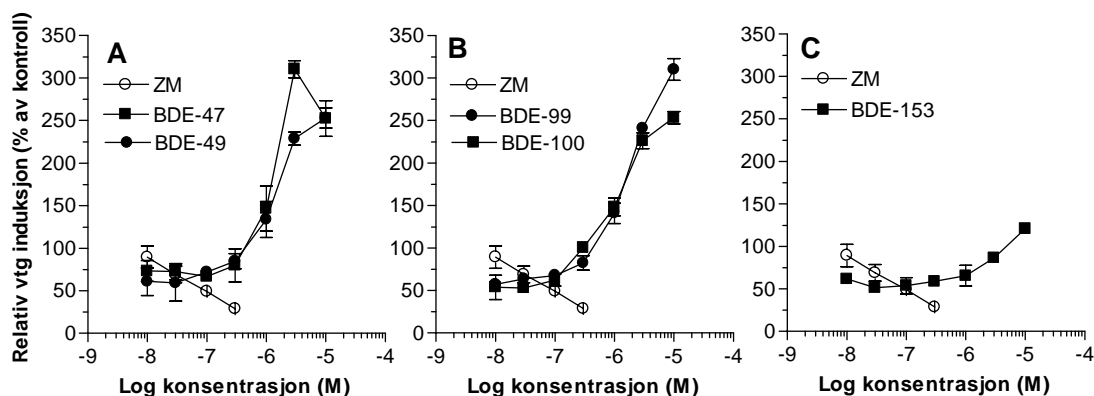
De polybromerte bifenylerne, TBBPA og polybromerte fenolene så ikke ut til å føre til noen produksjon av Vtg (Figur 15).



Figur 15. Induksjon av vitellogenin (Vtg) i en kultur av leverceller eksponert for polybromerte bifenyler (PBB), Tetrabrombifenol A (TBBPA) og polybromerte fenoler (PBP) og  $17\beta$ -østradiol (E2). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (0,1% DMSO). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

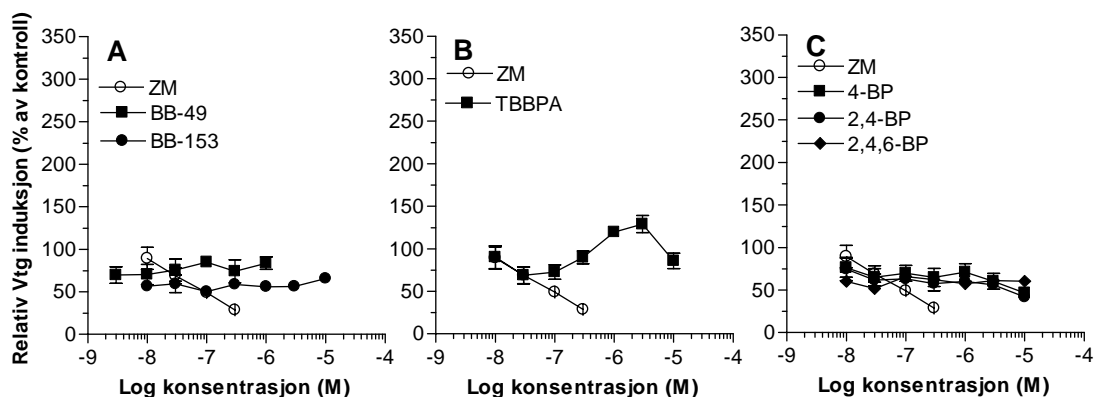
### 3.2.5 Hemming av vitellogenin-produksjonen

Levercellene ble koeksponert for E2 (100 pM) med ulike flammehemmere. Stoffenes evne til å hemme Vtg-produksjonen ble målt. Ingen av stoffene testet hadde evnen til å hemme produksjonen av Vtg mediert gjennom E2 ved disse konsentrasjonene (Figur 16 og 17). Da cellene ble eksponert for E2 sammen med PBDE eller TBBPA ble Vtg-produksjonen større enn ved eksponering for PBDE og TBBPA alene.



Figur 16. Induksjon av vitellogenin (Vtg) i en kultur av leverceller koeksponert for polybromerte difenyleter-kongenerer eller ZM 189.154 (ZM) med 100 pM 17 $\beta$ -østradiol (E2). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (100 pM E2). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

De polybromerte bifenylenene (PBB) og polybromerte fenolene (PBP) så ikke ut til å hemme E2-mediert Vtg-produksjon ved konsentrasjonene som cellene ble eksponert for (Figur 17 A og C). Tetrabrombisfenol A økte den E2-medierte Vtg-produksjonen (Figur 17B).



Figur 15. Induksjon av vitellogenin (Vtg) i en kultur av leverceller koeksponert for polybromerte bifenyler (PBB), Tetrabrombisfenol A (TBBPA), polybromerte fenoler (PBP) eller ZM 189.154 (ZM) med 100 pM  $17\beta$ -østradiol (E2). Resultatene er uttrykt som prosent av kontroll (100 pM E2). Verdiene (gjennomsnitt  $\pm$  SEM) representerer data fra en representativ fisk.

### 3.3 Resultatoppsummering

De ulike isoleringene ga en variasjon i EROD-aktivitet og Vtg-induksjon.  $EC_{50}$ -verdiene for TCDD i de ulike EROD-kjøringene varierte fra  $7,5 \cdot 10^{-11}$  –  $3,6 \cdot 10^{-10}$  M, mens induksjonen av Vtg for E2 varierte med  $EC_{50}$ -verdier fra  $6,7 \cdot 10^{-10}$  -  $1,2 \cdot 10^{-9}$  M.

Variasjonen i  $EC_{50}$ -verdiene var i størrelsesorden 2-5 ganger mellom maksimum- og minimumsverdier både for TCDD og E2 (positive kontroller) og for de bromerte flammehemmerne. Dette gjorde direkte sammenlikning mellom individuelle forsøk vanskelig og følgelig ble det valgt å fremstille data for representative fisk. Responser for de ulike individuelle forsøk er imidlertid gjengitt i tabell 2 og 3.

**Tabell 2 Bromerte flammehemmeres evne til å indukere/hemme 7-etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet, uttrykt som EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>**

Kjemikalie	Induksjon av EROD						Hemming av EROD					
	EC <sub>50</sub>						IC <sub>50</sub>					
	Fisk 1	Fisk 2	Fisk 3	Gjennomsnitt	SEM	REP	Fisk 1	Fisk 2	Fisk 3	Gjennomsnitt	SEM	REP
BDE-47	-	-	-	-	-	-	$3,6 \cdot 10^{-7}$	$5,0 \cdot 10^{-7}$	$6,9 \cdot 10^{-7}$	$5,2 \cdot 10^{-7}$	$\pm 9,7 \cdot 10^{-8}$	30,8
BDE-49	-	-	-	-	-	-	SE	SE	SE	SE	SE	SE
BDE-99	-	-	-	-	-	-	$7,7 \cdot 10^{-7}$	$7,2 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$8,7 \cdot 10^{-7}$	$\pm 1,3 \cdot 10^{-7}$	18,4
BDE-100	-	-	-	-	-	-	SE	SE	SE	SE	SE	SE
BDE-153	-	-	-	-	-	-	SE	SE	SE	SE	SE	SE
BB-49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BB-153	SE	SE	SE	SE	SE	SE	-	-	-	-	-	-
TBBPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-BP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-BP	SE	SE	SE	SE	SE	SE	-	-	-	-	-	-
2,4,6-BP	SE	SE	SE	SE	SE	SE	-	-	-	-	-	-
TCDD	$7,5 \cdot 10^{-11}$	$3,1 \cdot 10^{-10}$	$3,6 \cdot 10^{-10}$	$2,5 \cdot 10^{-10}$	$\pm 8,7 \cdot 10^{-11}$	1	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -NF	-	-	-	-	-	-	$3,8 \cdot 10^{-8}$	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$8,1 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$\pm 1,1 \cdot 10^{-5}$	1

SE=svak effekt

-=ikke observert

**Tabell 3 Bromerte flammehemmeres evne til å indusere/hemme vitellogenin-produksjon, uttrykt som EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>**

Kjemikalie	Induksjon av Vtg						Hemming av Vtg					
	EC <sub>50</sub>						IC <sub>50</sub>					
	Fisk 1	Fisk 2	Fisk 3	Gjennomsnitt	SEM	REP	Fisk 1	Fisk 2	Fisk 3	Gjennomsnitt	SEM	REP
BDE-47	SE	SE	SE	SE	SE	SE	-	-	-	-	-	-
BDE-49	SE	SE	SE	SE	SE	SE	-	-	-	-	-	-
BDE-99	SE	SE	SE	SE	SE	SE	-	-	-	-	-	-
BDE-100	SE	SE	SE	SE	SE	SE	-	-	-	-	-	-
BDE-153	SE	SE	SE	SE	SE	SE	-	-	-	-	-	-
BB-49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BB-153	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TBBPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-BP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-BP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4,6-BP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	1,2·10 <sup>-9</sup>	1,1·10 <sup>-9</sup>	6,7·10 <sup>-10</sup>	9,9·10 <sup>-10</sup>	±1,6·10 <sup>-10</sup>	1	-	-	-	-	-	-
ZM	-	-	-	-	-	-	7,1·10 <sup>-8</sup>	7,9·10 <sup>-8</sup>	2,0·10 <sup>-8</sup>	5,7·10 <sup>-8</sup>	±1,8·10 <sup>-8</sup>	1

SE=svak effekt

-=ikke observert

## 4 Diskusjon

Bromerte flammehemmere (BFR) brukes i store mengder verden over for å redusere brannfaren i ulike artikler. Mange av disse forbindelsene har vist seg å være persistente og lipofile, slik at de har en evne til å bioakkumulere i miljøet. Bromerte flammehemmere minner om polyklorerte bifenyler, polyklorerte dibenzo-*p*-dioksiner (PCDD) og polyklorerte dibenzofuraner (PCDF) som binder seg med høy affinitet til arylhydrokarbon-reseptor (AhR) i menneske og andre organismer (Brown et al. 2004). Det er derfor viktig å få kartlagt potensielle effekter av BFR i forskjellige organismer. I dette studiet ble det målt subletale effekter av polybromerte difenyletere (PBDE), polybromerte bifenyler (PBB), tetrabrombisfenol A (TBBPA) og polybromerte fenoler (PBP) i primære hepatocytter fra regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ved bruk av et utvalg av forskjellige biomarkør- og effektendepunkter. Siden stoffene viste en lav akutt giftighet, noe som også er bekreftet i andre studier (Chen og Bunce 2003; Kuiper et al. 2004), er fokus lagt på subletale effekter.

### 4.1 Induksjon av 7-etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet

Stoffenes evne til å indusere cytokrom P4501A-aktivitet (CYP1A-aktivitet) ble målt ved bruk av 7-etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet (EROD-aktivitet). Resultatene fra EROD-målingene viste at de kongenerne av PBDE som er testet i dette arbeidet ikke induserte CYP1A-aktivitet ved konsentrasjonene som ble brukt her. I stedet ga to av dem (BDE-47 og -99) en klar reduksjon i den basale EROD-aktiviteten, (Figur 6A og B), mens de andre tre (BDE-49, -100 og -153) reduserte EROD-aktiviteten i mindre grad (Figur 6A, B og C). Det er tidligere vist at tolv ulike PBDE bandt seg til AhR i seks forskjellige celletyper, deriblant BDE-47, -49, -99, -100 og -153 (Chen et al. 2001). I arbeidet av Chen et al. (2001) ble EROD indusert av BDE-100 og -153, men ikke av BDE-47 og -99. De to kongenerne BDE-100 og -153 viste seg å ha en relativ induksjonsevne rundt  $10^{-4}$  til  $10^{-5}$  (Chen et al. 2001), mens de ikke induserte EROD-aktivitet i primærcellene fra fisk i dette arbeidet. Forskjellen i evnen til å indusere



EROD-aktivitet kan skyldes at primærkulturcellene er mindre sensitive enn de andre cellekulturene. Dette er blant annet observert for østrogene effekter i cellelinjer og leverceller fra regnbueørret (Olsen et al. 2004). Forskjeller i metabolsk evne kan spille en rolle (Segner 1998; Beresford et al. 2000). Primærkulturer av regnbueørret-hepatocytter opprettholder det meste av enzymsystemene (Pesonen og Andersson 1991), mens cellelinjene kan ha en begrenset biotransformasjonssevne. I en studie med en cellelinje fra rottelever ble ti ulike PBDE-kongenerer testet, deriblant BDE-100 og BDE-153. Kongenerne BDE-100 og BDE-153 ga ingen AhR-mediert induksjon i dette reseptor-reportersystemet (Villeneuve et al. 2002). Nedgang i den basale EROD-aktiviteten hos regnbueørret fôret med BDE-47 er observert av Tjarnlund et al. (1998). Dette stemmer godt overens med våre resultater.

Flere laboratorier har vist at PBB kan indusere mange forskjellige mikrosomale enzymer (Moore et al. 1978). Av PBB som ble testet i dette studiet ga BB-153 en induksjon av EROD-aktiviteten. De øverste konsentrasjonene av BB-153 ga en økning på opptil ~50 % i forhold til kontrollen (Figur 7A). Arylhydrokarbon-reseptoren ble aktivert av BB-153, men den relative induksjonsevnen i forhold til TCDD var liten. Stoffet BB-153 har samme egenskaper som fenobarbital-liknende induserende stoffer (Moore et al. 1978). I pattedyr er fenobarbital en *in vivo* induser av cytokrom P4502B-familien, men hos regnbueørret ble CYP1A-genekspressjonen sterkt indusert av fenobarbital (Sadar et al. 1996). Cytokrom P450-systemet har lavere spesifikk aktivitet i fisk sammenlignet med pattedyr (Goksoyr et al. 1987). Brown et al. (2004) viste at eksponering for BB-153 førte til stimulering av AhR-avhengig genekspressjon i en cellelinje fra muselever. Elcombe og Lech (1978) så en økt EROD-aktivitet i regnbueørret etter administrering av FireMaster BP-6, en blanding bestående hovedsakelig av BB-153. I andre studier med BB-153 utført på regnbueørret (Franklin et al. 1981; Hornung et al. 1996) er det ikke funnet induksjon av EROD-aktivitet. Eksponering for BB-153 i "Sheepshead seabream" (*Archosargus probatocephalus*) førte ikke til induksjon av fenobarbital-liknende aktivitet (James og Little 1981). Forskjell i induksjon av CYP1A-mediert aktivitet i dette og andre studier (Franklin et al. 1981; James og Little 1981; Hornung et al. 1996) kan skyldes at de andre studiene er gjort *in*

*vivo*, mens dette er utført *in vitro*. I *in vivo* studier kan stoffene elimineres via galle-, urin- og gjelle-ekskresjon, mens *in vitro*-systemer har lavere biotransformasjons- og ekskresjonsaktivitet slik at konsentrasjonen av morsubstansen trolig er høyere over tid (Monod et al. 1998). De ulike eksponeringsdosene som er brukt i de forskjellige studiene kan også spille en rolle.

Tetrabrombisfenol A ga ingen induksjon av EROD-aktiviteten i dette arbeidet, noe som stemmer overens med arbeid gjort på en cellelinje fra rottelever (Behnisch et al. 2003). Den høyeste konsentrasjonen syntes å hemme EROD-aktiviteten. Dette stemmer godt overens med data fra Ronisz et al. (2004) som observerte at EROD-aktiviteten ble hemmet ved eksponering av regnbueørret for TBBPA.

De polybromerte fenolene viste en svak økning av EROD-aktiviteten ved høyeste konsentrasjon. Det var ikke mulig å oppnå EC<sub>50</sub>-verdier siden responsen var lav ved disse konsentrasjonene. I studiet gjort av Behnisch et al. (2003) får man en svak, men ikke signifikant økning av aktiviteten i en genetisk modifisert cellelinje fra rottelever testet for 4-BP og 2,4,6-BP.

## 4.2 Hemming av 7-etoksyresorufin-O-deetylase-aktivitet

Siden flere av de bromerte flammehemmerne som ble testet viste seg å hemme EROD-aktiviteten, ble cellene koeksponert for en blanding av BFR og TCDD. Dette kan gi en indikasjon på om hemmingen skyldes binding til AhR, hemming av CYP1A-gentranskripsjon eller CYP1A-relatert proteinsyntese. Av PBDE viste alle kongenerne unntatt BDE-100 å ha en antagonistisk virkning på TCDD-indusert EROD-aktivitet, hvor deres rangerte evne til hemming var BDE-99>BDE-47>BDE-153>BDE-49. Kuiper et al. (2004) koeksponerte BDE-47, -99, -100 og -153 med økende konsentrasjoner av TCDD (0, 1, 3, 10, 30 og 100 pM) i hepatocytter fra karpe (*Cyprinus carpio*). Deres resultater er samsvarende med mine, hvor man så en reduksjon av TCDD-indusert EROD-aktivitet i nærvær av BDE-47, -99 og -153, men ikke for BDE-100. Besselink et al. (1998) rapporterte at den TCDD-induserte EROD-aktiviteten ble hemmet av de ulike PCB-kongenerne med PCB-126 (IC<sub>50</sub>=0,24 µM) og PCB-153 (IC<sub>50</sub>=31,88 µM) (Kuiper et al. 2004). Mine resultater indikerte hemmende potensial for PBDE på samme nivå

som PCB. Dette indikerte at PBDE i miljøprøver i det minste kan bidra til hemming av EROD-aktivitet på samme måte som foreslått for PCB. Reduksjon i TCDD-indusert lusiferase-ekspresjon eller TCDD-indusert EROD-aktivitet ble også observert for BDE-47 i cellelinjer fra rottelever (Meerts et al. 1998; Brouwer et al. 2001) og primære kulturer av hepatocytter fra rotte (Chen og Bunce 2003). BDE-99 viste seg å være delvis antagonistisk/agonistisk i en cellelinje fra rottelever (Meerts et al. 1998) og hemmende i primære hepatocytter fra rotte (Chen og Bunce 2003) og *in vivo*-studier på regnbueørret (Tjarnlund et al. 1998). Kuiper et al. (2004) hadde PBDE i EROD-reaksjonsblandingen, rett før måling, for å teste om dette påvirket TCDD-indusert EROD-aktivitet. Dette påvirket ikke aktiviteten, noe som indikerer at PBDE må være tilstede under eksponeringen med TCDD for å hemme EROD-aktiviteten. Dette støtter teorien om en negativ effekt på CYP1A-syntesen som er mediert via AhR (Kuiper et al. 2004). I studiet av Chen og Bunce (2003) så man også en moderat respons i induksjonen av CYP1A ved eksponering for BDE-100, noe som støtter mine funn. Den bifasiske effekten til BDE-100 i EROD-koeksponeringsarbeidet mitt er påvist i andre arbeid med PBDE (Chen et al. 2001) og andre stoffer (Sawyer og Safe 1982; Hahn et al. 1993; Hahn et al. 1996; Kennedy et al. 1996; Verhallen et al. 1997). Forklaringen på den reduserte EROD-aktiviteten ved høyere konsentrasjoner av kjemikalier kan være cytotoxicitet, redusert proteinnivå av CYP1A, forstyrret hemsyntese (Hahn et al. 1993) eller konkurrerende hemming av EROD-aktiviteten av stoffet (Petrulis og Bunce 1999).

Ved koeksponering av TBBPA med TCDD ser man fortsatt en hemming av EROD-aktiviteten ved den høyeste konsentrasjonen. Siden EROD-kjøringene måler CYP1A via dens katalytiske virkning, kan reduksjonen i induert EROD-aktivitet blant annet skyldes redusert mengde av CYP1A eller redusert katalytisk aktivitet.

### **4.3 Induksjon av vitellogenin-produksjon**

Av PBDE testet i vitellogenin-arbeidene viste alle en evne til å induere produksjon av vitellogenin (Vtg) ved høye konsentrasjoner. Stoffene BDE-47 og -99 viste en svak østrogen effekt i en brystkreft-cellelinje fra menneske (Meerts et al. 2001) og primærceller fra regnbueørret (Nakari og Pessala 2005), men ikke i rekombinante

gjærforsøk (Nakari og Pessala 2005), eller i *in vitro* lusiferase-forsøk med humane brystkreftceller (Villeneuve et al. 2002). Kongeneren BDE-100 var blant de polybromerte difenyleterne som induerte høyest østrogen aktivitet i brystkreft-cellelinjen fra menneske (Meerts et al. 2001), noe som stemmer overens med resultatene i mitt arbeid. Som antydnet av Nakari og Pessala (2005) kan ulik konsentrasjon brukt i de forskjellige arbeidene spille inn på den østrogene effekten man får. De forskjellige reseptorene kan ha ulik sensitivitet noe som fører til ulik induksjon av effekt.

Ingen av de polybromerte bifenylerne viste noen induksjon av Vtg, selv om BB-153 har vist seg å kunne inducere Vtg *in vitro* i regnbueørret, men ikke i rekombinante-gjærceller utført av Nakari og Pessala (2005). Forskjellen observert her kan eventuelt skyldes bruk av forskjellige konsentrasjoner og cellenes følsomhet for østrogener. Ved høye konsentrasjoner så Nakari og Pessala (2005) en reduksjon i produksjonen av Vtg og mine konsentrasjoner er høyere enn hva de har brukt i sine studier.

Tetrabrombisfenol A ga ingen induksjon av Vtg. Dette stemmer overens med tidligere arbeid på en brystkreft-cellelinje fra pattedyr (Meerts et al. 2001). Arbeid utført på en cellelinje fra hypofysen til en rotte (Kitamura et al. 2002) og en human-cellelinje (Korner et al. 1998; Samuelsen et al. 2001) har vist at TBBPA kan binde seg til østrogenreseptoren (ER) og gi en svak østrogen aktivitet. Forskjell i induksjon kan eventuelt skyldes at cellelinjene er mer sensitive i deteksjon av østrogene effekter enn primærceller som vist av Olsen et al. (2004).

Polybromerte fenoler ga ingen induksjon av Vtg i celloarbeidene. Olsen et al. (2002) testet blant annet 4-BP, 2,4-BP og 2,4,6-BP sin evne til å inducere østrogenliknende effekter i en human-cellelinje. Disse PBP bandt seg til ER, men de hadde en manglende evne til å inducere østrogenliknende effekter, som antydnet at PBP kunne virke antiøstrogen (Olsen et al. 2002). Resultatene i mitt arbeid støtter ikke denne teorien med tanke på at PBP ikke hemmet Vtg-induksjonen til E2. Denne forskjellen kan skyldes forskjellig ER-typer eller muligens sensitivitet i de forskjellige forsøkene. Arbeid utført med eksponering for ulike miljøkemikalier i en human-cellelinje og leverceller fra regnbueørret viste at det var forskjeller mellom binding til ER og induksjon av østrogene effekter i disse artene (Olsen et al. 2004). Primærceller

fra regnbueørret kan inneholde flere ulike isoformer av ER og inneholde proteiner som kan modulere bindingen til reseptoren, mens de humane cellene inneholder kun ER $\alpha$  og trolig også lavere konsentrasjoner av interfererende proteiner (Olsen et al. 2004). Forskjell i reseptorene er også observert ved at det ligand-bindende området til regnbueørrets ER utgjør bare 60 % homologi med ER fra mennesket (Tollefsen et al. 2002). I arbeid gjort av Olsen et al. (2004) så man at *in vitro*-induksjon av Vtg i leverceller fra regnbueørret var mindre sensitiv enn det humane testsystemet "E-SCREEN". Noe av denne forskjellen kan skyldes ulik metabolsk evne da primærkulturer av regnbueørret-hepatocytter opprettholder det meste av enzymsystemene (Pesonen og Andersson 1991), mens "E-SCREEN" trolig har en mer begrenset biotransformasjonsevne (Olsen et al. 2004).

#### **4.4 Hemming av vitellogenin-produksjon**

Ingen av BFR viste seg å ha evnen til å hemme induksjonen av Vtg når de ulike stoffene ble koeksponert for en blanding av BFR og E2. De bromerte difenyleterne viste seg å kunne gi en ytterligere induksjon av Vtg ved koeksponering for E2. Disse stoffene er altså agonister, men det er vanskelig å si om effekten man får ved koeksponering av cellene for PBDE og E2 er additiv eller synergistisk. Det er imidlertid kjent at østrogene responser i fisk er avhengig av oppregulering av ER over et minimum nivå, og koeksponering for E2 kan bidra til å oppregulere både Vtg-genekspresjon og cellulære nivåer av ER i fisk (Andreassen et al. 2005). Andreassen et al. (2005) viste at eksponering for 4-*tert*-oktylfenol før E2 i tid ga en lenger periode mellom induksjon av ER-mRNA til induksjon av den bindende ER-aktiviteten eller akkumulering av Vtg. De antok at dette reflekterte at 4-*tert*-oktylfenol trengte større mengder med ER-protein for å kunne virke effektivt inn på det østrogene systemet (Andreassen et al. 2005).

I studiet utført av Meerts et al. (2001) viste BDE-153 seg å ha en antiøstrogen effekt, mens dette kan vi ikke påvise ved koeksponering av cellene for E2 og BDE-153 i mitt arbeid. Forskjellen i effekt kan blant annet skyldes interspesifikke forskjeller mellom menneske og fisk eller at cellelinjene er mer sensitive enn primærcellene som dokumentert andre steder (Olsen et al. 2004).

Ved koeksponering av TBBPA med 100 pM E2, ser man en svak økning av Vtg-induksjonen. Arbeid utført på en rotte-cellelinje (Kitamura et al. 2002) og menneske-cellelinje (Korner et al. 1998; Samuelsen et al. 2001) har vist at TBBPA kan binde seg til ER og viser en svak østrogen aktivitet. Dette støtter opp antagelsene om at TBBPA har evne til å indusere Vtg, men at konsentrasjonene av TBBPA brukt med dette stoffet uten koeksponering for E2 er for lave og at mine celler eventuelt er mindre sensitive for østrogen enn cellelinjer.

#### 4.5 Reseptor-samarbeid

Levercellekulturer fra fisk er et unikt verktøy for å studere samspillet mellom AhR og ER siden disse cellene opprettholder induserende CYP1A-evne og syntese av Vtg (Anderson et al. 1996). Miljøgifter som 2,3,7,8-tetraklordibenzo-*p*-dioksin (TCDD), planare polyklorerte bifenyler og polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH), som binder seg til AhR og induserer biotransformasjonsenzymene CYP1A, har vist seg å være antiøstrogen (Anderson et al. 1996; Navas og Segner 1998; Navas og Segner 2000; Navas og Segner 2001). I regnbueørret ble tre forskjellige PAH, 3-metylkolantren, antrasen og  $\beta$ -naftaflavon, testet for deres evne til å indusere EROD-aktivitet, samt påvirke Vtg induisert av E2 (Navas og Segner 2000). 3-metylkolantren og  $\beta$ -naftaflavon økte EROD-aktiviteten, samtidig som de førte til en reduksjon av Vtg-syntesen induisert av E2. Antrasen virket verken inn på EROD-aktiviteten eller Vtg-syntesen. Graden av antiøstrogen effekt til stoffene korrelerte godt med stoffenes evne til å indusere EROD-aktivitet. Når cellene ble eksponert for  $\alpha$ -naftaflavon ( $\alpha$ -NF), som er en AhR-antagonist, eller 8-metoksy-psoralen, som hindrer binding av aktivert AhR til xenobiotisk-responselement, sammen med PAH og E2 opphørte den antiøstrogene effekten. Disse observasjonene viser en potensiell østrogen hemming via AhR (Navas og Segner 2000). Flere *in vitro* studier i fisk og pattedyr har vist at AhR-agonister kan hemme E2-mediert østrogen effekt via en AhR-mediert mekanisme (Anderson et al. 1996; Wormke et al. 2003; Bemanian et al. 2004). Den polybromerte bifenylen, BB-153, og de polybromerte fenolene ga en svak CYP1A-induksjon, men de hadde ingen effekt på Vtg-produksjonen i primærcellene i mitt arbeid. Dette er også observert for andre stoffer som er svake

CYP1A-indusere (Anderson et al. 1996; Donohoe et al. 1999), noe som antyder at grad av hemmende effekt på vitellogenin-produksjonen avhenger av stoffets affinitet for AhR (Anderson et al. 1996)

Hemming av basal CYP1A-aktivitet ved eksponering for østrogen er observert *in vitro* i regnbueørret (Anderson et al. 1996; Navas og Segner 2001; Elskus 2004) og *in vivo* (Elskus et al. 1992; Arukwe og Goksoyr 1997). Mekanismen bak østrogen og østrogenhermere sin evne til å hemme CYP1A-aktiviteten er fortsatt ukjent, men ulike *in vitro* og *in vivo* arbeid foreslår at CYP1A-hemmingen er mediert gjennom ER (Ricci et al. 1998; Elskus 2004). Hepatocytter fra regnbueørret som var eksponert med E2 viste en signifikant nedgang i den basale EROD-aktiviteten og CYP1A-mRNA (Navas og Segner 2001). Denne effekten opphørte ved koeksponering av cellene med en binær blanding av E2 og en ER-antagonist (Tamoksifen). Observasjonene i dette arbeidet viser at hemming av CYP1A sin katalytiske evne skjer før translasjonen av mRNA til protein, siden mengde mRNA ble redusert (Navas og Segner 2001).

De polybromerte difenyleterne (PBDE) har vist seg å være svake østrogen i mitt arbeid, mens de hemmer både basal og induert EROD-aktivitet. Den mest sannsynlige virkningsmåten til PBDE er interaksjoner via AhR, men innvirkning av ER-medierte signalveier kan ikke utelukkes, siden hemming av basal og induert EROD-aktivitet sammenfaller med aktivering av ER. Oppfølgende studier må til for å kartlegge de eventuelle mekanismene.

#### **4.6 Variabilitet ved isoleringene**

De ulike isoleringene ga en variasjon i EROD-aktivitet og Vtg-induksjon. I begge tilfeller var variasjonen i størrelsesorden faktor 2-5. Variabiliteten mellom de forskjellige isoleringene kan skyldes stress påført under celleisoleringen og nivå av kjønnsmodning hos fisken som er brukt i studiet.

Variasjon i absolutte nivåer av spesifikk EROD-aktivitet er også observert av andre ved uavhengige celleprepareringer av regnbueørret (Anderson et al. 1996; Scholz og Segner 1999; Sadar og Andersson 2001; Elskus 2004). Som foreslått av Scholz og Segner (1999) kan variasjonene muligens skyldes forskjell i metabolsk status eller

genetisk variasjon. Den metabolske statusen til fisken kan påvirkes av alder, størrelse, reproduksjonsstadium, diett- og næringsstatus (Whyte et al. 2000). Landi et al. (1994) observerte genetiske variasjoner i basal og induisert EROD-aktivitet i mennesker med en mutasjon i CYP1A-genet (Scholz og Segner 1999).

Variasjoner i målingene av Vtg i *in vitro* levercellesystemer har tidligere blitt dokumentert av andre (Anderson et al. 1996; Mathisen 1998) og kan forklares med variasjon i reseptoraffinitet, reseptorrikelighet, prolaktin, vekst- og tyroidhormoner (Campbell et al. 1994; Kwon og Mugiya 1994; Rabelo et al. 1994). Mengde av ER i vev kan påvirkes av flere faktorer som alder, utviklingsstadium og nivå av endogene- og eksogene-hormoner tilstede (Campbell et al. 1994). De observerte variasjonene kan også skyldes individuelle forskjeller i reguleringen av ER i hepatocytene og/eller evnen til å syntetisere Vtg ved E2-stimulering.

#### **4.7 Framtidig arbeid**

7-etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet som en biomarkør viser at eksponering av celler for stoffer kan påvirke AhR-signalveien på flere måter. Det er viktig å få kartlagt hvilke prosesser disse stoffene påvirker. Framtidig arbeid bør fokusere på om reduksjonen i EROD-aktiviteten ved eksponering for PBDE skyldes hemming av CYP1A-enzym eller hemming av AhR, og om denne hemmingen eventuelt er påvirket av et samvirke med ER. For å teste dette bør man gå ned på gennivå, for å se hvilke gener som blir uttrykt. Dette kan for eksempel gjøres ved bruk av mikromatriser, hvor man kan måle opp- eller nedregulering av opptil flere tusen gener samtidig. Ved å benytte kvantitativ rtPCR kan differensiell genekspressjon fra mikromatrise verifiseres og kvantifiseres mer nøyaktig for å bedre kartlegge hvor hemmingen av AhR-signalveien skjer.



## 5 Konklusjon

På grunn av bromerte flammehemmeres (BFR) høye produksjonsvolum, persistens og evne til å akkumulere i miljøet har det i denne oppgaven blitt gjennomført *in vitro* studier for å kartlegge mulige biologiske effekter. Resultatene viser at enkelte BFR som BB-153 og de polybromerte fenolene (PBP) førte til induksjon av 7-etoksyresorufin-*O*-deetylase-aktivitet (EROD-aktivitet). Disse stoffene viste seg å være svake indukere, hvor effekten inntrådte først ved betraktelig høyere konsentrasjoner enn for 2,3,7,8-tetraklordibenzo-*p*-doksinn (TCDD). De polybromerte difenyleterne (PBDE) viste seg imidlertid å være potente hemmere av Cytokrom P4501A-mediert (CYP1A-mediert) EROD-aktivitet, hvor to av de kongenerne (BDE-47 og BDE-99) som dominerer i miljøet viste seg å være de sterkeste hemmerne. Disse stoffene var faktisk sterkere hemmere enn den kjente CYP1A-hemmeren  $\alpha$ -naftaflavon. Ved koeksponering av de ulike BFR med TCDD ble det en nedgang i den induserte EROD-aktiviteten til TCDD for BDE-47, -49, -99, -153 og tetrabrombisfenol A (TBBPA). Dette indikerer at nedgangen i EROD-aktivitet skyldes mekanismer som er mediert gjennom arylhydrokarbon-reseptoren (AhR).

Dette arbeidet viste også at flere rene PBDE-kongenerer hadde evnen til å indukere produksjon av den østrogen-reseptor-medierte (ER-medierte) biomarkøren vitellogenin (Vtg), men at disse stoffene var 16 000-300 000 ganger mindre potente enn 17 $\beta$ -østradiol (E2).

Ved testing av akutt giftighet hadde stoffene generelt en lav giftighet. Enkelte virket inn på membran aktiviteten, men dette inntraff først ved høye konsentrasjoner.

*In vitro* arbeid utført på primærceller har vist seg å være et nyttig verktøy for å teste ulike kjemikaliers evne til å indukere AhR- og ER-medierte signalveier.

Variabilitet mellom hver isolering som følge av individuelle forskjeller mellom fiskene reduserer imidlertid reproduktibiliteten til forsøkene, men kan eventuelt justeres for ved å normalisere dataene til en standard konsentrasjon. På grunn av høyt produksjonsvolum og deres evne til å akkumulere i miljøet er det viktig å utføre *in vivo* studier for å

kartlegge mulige implikasjoner. Videre arbeid bør fokusere på om den reduserte EROD-aktiviteten skyldes hemming av CYP1A-enzym eller hemming av AhR. Det er også viktig å kartlegge om den eventuelle hemming muligens skyldes et eventuelt samarbeid med ER.

## 6 Referanser

- Addison, R. F., D. E. Willis and M. E. Zinck (1994). "Liver Microsomal Monooxygenase Induction in Winter Flounder (*Pseudopleuronectes Americanus*) from a Gradient of Sediment PAH Concentrations at Sydney-Harbor, Nova-Scotia." Marine Environmental Research **37**(3): 283-296.
- Anderson, M. J., M. R. Miller and D. E. Hinton (1996). "In vitro modulation of 17-beta-estradiol-induced vitellogenin synthesis: Effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells." Aquatic Toxicology **34**(4): 327-350.
- Andersson, T. and L. Forlin (1992). "Regulation of the Cytochrome-P450 Enzyme-System in Fish." Aquatic Toxicology **24**(1-2): 1-19.
- Andersson, T., L. Forlin and T. Hansson (1983). "Biotransformation of 7-Ethoxycoumarin in Isolated Perfused Rainbow-Trout Liver." Drug Metabolism and Disposition **11**(5): 494-498.
- Andreassen, T. K., K. Skjoedt and B. Korsgaard (2005). "Upregulation of estrogen receptor alpha and vitellogenin in eelpout (*Zoarces viviparus*) by Waterborne exposure to 4-tert-octylphenol and 17 beta-estradiol." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **140**(3-4): 340-346.
- Arukwe, A. and A. Goksoyr (1997). "Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in Turbot (*Scophthalmus maximus* L)." Journal of Experimental Zoology **277**(4): 313-325.
- Babish, J. G., W. H. Gutenmann and G. S. Stoewsand (1975). "Polybrominated biphenyls: tissue distribution and effect on hepatic microsomal enzymes in Japanese quail." Journal of Agricultural and Food Chemistry **23**(5): 879-82.
- Behnisch, P. A., K. Hosoe and S. Sakai (2003). "Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds." Environment International **29**(6): 861-77.
- Bemanian, V., R. Male and A. Goksoyr (2004). "The aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of vitellogenin synthesis in the fish liver: Cross-talk between AHR- and ERalpha-signalling pathways." Comparative Hepatology **3**(1): 2.

- Beresford, N., E. J. Routledge, C. A. Harris and J. P. Sumpter (2000). "Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity." Toxicology and Applied Pharmacology **162**(1): 22-33.
- Berry, M. N. and D. S. Friend (1969). "High-Yield Preparation of Isolated Rat Liver Parenchymal Cells - A Biochemical and Fine Structural Study." Journal of Cell Biology **43**(3): 506-&.
- Besselink, H. T., M. S. Denison, M. E. Hahn, S. I. Karchner, A. D. Vethaak, J. H. Koeman and A. Brouwer (1998). "Low inducibility of CYP1A activity by polychlorinated biphenyls (PCBs) in flounder (*Platichthys flesus*): Characterization of the Ah receptor and the role of CYP1A inhibition." Toxicological Sciences **43**(2): 161-171.
- Birnbaum, L. S. and D. F. Staskal (2004). "Brominated flame retardants: cause for concern?" Environmental Health Perspectives **112**(1): 9-17.
- Brouwer, A., I. A. Meerts, A. Bergman and H. T. Besselink (2001). Thyroidogenic, estrogenic, and dioxin-like activity of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in vitro. BFR 2001-The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants, University of Stocholm, Sweden.
- Brown, D. J., I. Van Overmeire, L. Goeyens, M. S. Denison, M. J. De Vito and G. C. Clark (2004). "Analysis of Ah receptor pathway activation by brominated flame retardants." Chemosphere **55**(11): 1509-18.
- Bucheli, T. D. and K. Font (1995). "Induction of Cytochrome-P450 as a Biomarker for Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems." Critical Reviews in Environmental Science and Technology **25**(3): 201-268.
- Bursian, S. J., D. Polin, B. A. Olson, L. R. Shull, H. L. Marks and H. S. Siegel (1983). "Microsomal-Enzyme Induction, Egg-Production, and Reproduction in 3 Lines of Japanese Quail Fed Polybrominated Biphenyls." Journal of Toxicology and Environmental Health **12**(2-3): 291-307.
- Campbell, P. M., T. G. Pottinger and J. P. Sumpter (1994). "Changes in the Affinity of Estrogen and Androgen Receptors Accompany Changes in Receptor Abundance in Brown and Rainbow-Trout." General and Comparative Endocrinology **94**(3): 329-340.
- Cassee, F. R., Sühnel, J., Groten, J.P., Feron, V.J. (1999). Toxicology of Chemical Mixtures. London, Macmillian Reference Ltd.

- Celander, M. (1993). Induction of Cytochrome P450 in Teleost Fish with Emphasis on the CYP1 Gene Family. Department of Zoophysiology, University of Göteborg
- Chen, G. and N. J. Bunce (2003). "Polybrominated diphenyl ethers as Ah receptor agonists and antagonists." Toxicological Sciences **76**(2): 310-20.
- Chen, G., A. D. Konstantinov, B. G. Chittim, E. M. Joyce, N. C. Bols and N. J. Bunce (2001). "Synthesis of polybrominated diphenyl ethers and their capacity to induce CYP1A by the Ah receptor mediated pathway." Environmental Science & Technology **35**(18): 3749-56.
- Chen, T. T. (1983). "Identification and Characterization of Estrogen-Responsive Gene-Products in the Liver of Rainbow-Trout." Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology **61**(7): 802-810.
- Colborn, T., F. S. V. Saal and A. M. Soto (1993). "Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans." Environmental Health Perspectives **101**(5): 378-384.
- Copeland, P. A., J. P. Sumpter, T. K. Walker and M. Croft (1986). "Vitellogenin Levels in Male and Female Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri* Richardson) at Various Stages of the Reproductive-Cycle." Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology **83**(2): 487-493.
- Darnerud, P. O., G. S. Eriksen, T. Johannesson, P. B. Larsen and M. Viluksela (2001). "Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology." Environmental Health Perspectives **109 Suppl 1**: 49-68.
- de Wit, C. A. (2002). "An overview of brominated flame retardants in the environment." Chemosphere **46**(5): 583-624.
- Donohoe, R. M., J. L. Wang-Buhler, D. R. Buhler and L. R. Curtis (1999). "Effects of 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on cytochrome P4501A and estrogen-induced vitellogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(5): 1046-1052.
- Dunckel, A. E. (1975). "Updating on Polybrominated Biphenyl Disaster in Michigan." Journal of The American Veterinary Medical Association **167**(9): 838-841.
- Eggens, M., A. Bergman, D. Vethaak, M. Vanderweiden, M. Celander and J. P. Boon (1995). "Cytochrome P4501A Indexes as Biomarkers of Contaminant Exposure -

- Results of a Field-Study with Plaice (*Pleuronectes-Platessa*) and Flounder (*Platichthys-Flesus*) from the Southern North-Sea." *Aquatic Toxicology* **32**(2-3): 211-225.
- Elcombe, C. R. and J. J. Lech (1978). "Induction of monooxygenation in rainbow trout by polybrominated biphenyls: a comparative study." *Environmental Health Perspectives* **23**: 309-14.
- Elskus, A. A. (2004). "Estradiol and estriol suppress CYP1A expression in rainbow trout primary hepatocytes." *Marine Environmental Research* **58**(2-5): 463-467.
- Elskus, A. A., R. Pruell and J. J. Stegeman (1992). "Endogenously-Mediated, Pretranslational Suppression of Cytochrome-P4501A in PCB-Contaminated Flounder." *Marine Environmental Research* **34**(1-4): 97-101.
- Feron, V. J. and J. P. Groten (2002). "Toxicological evaluation of chemical mixtures." *Food and Chemical Toxicology* **40**(6): 825-839.
- Fielman, K. T., S. A. Woodin and D. E. Lincoln (2001). "Polychaete indicator species as a source of natural halogenated organic compounds in marine sediments." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(4): 738-747.
- Franklin, R. B., M. J. Vodcnik, C. R. Elcombe and J. J. Lech (1981). "Alterations in hepatic mixed-function oxidase activity of rainbow trout after acute treatment with polybrominated biphenyl isomers and FireMaster BP-6." *Journal of Toxicology and Environmental Health* **7**(5): 817-27.
- Fries, G. F. (1985). "The PBB Episode in Michigan - an Overall Appraisal." *Crc Critical Reviews in Toxicology* **16**(2): 105-156.
- Ganassin, R. C., K. Schirmer and N. C. Bols, Eds. (2000). *Methods for the use of fish cell and tissue cultures as model systems in basic and toxicology research*. The Laboratory Fish (Handbook of Experimental Animals series).
- Goksoyr, A., T. Andersson, T. Hansson, J. Klungsoyr, Y. Zhang and L. Forlin (1987). "Species Characteristics Of The Hepatic Xenobiotic And Steroid Biotransformation Systems Of 2 Teleost Fish, Atlantic Cod (*Gadus-Morhua*) And Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri*)." *Toxicology And Applied Pharmacology* **89**(3): 347-360.

- Guengerich, F. P. and D. C. Liebler (1985). "Enzymatic Activation of Chemicals to Toxic Metabolites." Crc Critical Reviews in Toxicology **14**(3): 259-307.
- Hahn, M. E., T. M. Lamb, M. E. Schultz, R. M. Smolowitz and J. J. Stegeman (1993). "Cytochrome-P4501A Induction and Inhibition by 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl in an Ah Receptor-Containing Fish Hepatoma-Cell Line (Plhc-1)." Aquatic Toxicology **26**(3-4): 185-208.
- Hahn, M. E., B. L. Woodward, J. J. Stegeman and S. W. Kennedy (1996). "Rapid assessment of induced cytochrome P4501A protein and catalytic activity in fish hepatoma cells grown in multiwell plates: Response to TCDD, TCDF, and two planar PCBS." Environmental Toxicology and Chemistry **15**(4): 582-591.
- Hornung, M. W., E. W. Zabel and R. E. Peterson (1996). "Toxic equivalency factors of polybrominated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and polyhalogenated diphenyl ether congeners based on rainbow trout early life stage mortality." Toxicology and Applied Pharmacology **140**(2): 227-34.
- James, M. O. and P. J. Little (1981). "Polyhalogenated biphenyls and phenobarbital: evaluation as inducers of drug metabolizing enzymes in the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*." Chemico-biological Interactions **36**(2): 229-48.
- Jobling, S., T. Reynolds, R. White, M. G. Parker and J. P. Sumpter (1995). "A Variety of Environmentally Persistent Chemicals, Including Some Phthalate Plasticizers, are Weakly Estrogenic." Environmental Health Perspectives **103**(6): 582-587.
- Kennedy, S. W., A. Lorenzen and R. J. Norstrom (1996). "Chicken embryo hepatocyte bioassay for measuring cytochrome P4501A-based 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalent concentrations in environmental samples." Environmental Science & Technology **30**(2): 706-715.
- Kitamura, S., N. Jinno, S. Ohta, H. Kuroki and N. Fujimoto (2002). "Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A." Biochemical and Biophysical Research Communications **293**(1): 554-9.
- Korner, W., V. Hanf, W. Schuller, H. Bartsch, M. Zwirner and H. Hagenmaier (1998). "Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals." Chemosphere **37**(9-12): 2395-2407.
- Kuiper, R., A. Bergman, J. G. Vos and M. van den Berg (2004). "Some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants with wide environmental distribution

- inhibit TCDD-induced EROD activity in primary cultured carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes." Aquatic Toxicology **68**(2): 129-139.
- Kwon, H. C. and Y. Mugiya (1994). "Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel, *Anguilla japonica*." General and Comparative Endocrinology **93**(1): 51-60.
- Landi, M. T., P. A. Bertazzi, P. G. Shields, G. Clark, G. W. Lucier, S. J. Garte, G. Cosma and N. E. Caporaso (1994). "Association Between Cyp1a1 Genotype, Messenger-Rna Expression and Enzymatic-Activity in Humans." Pharmacogenetics **4**(5): 242-246.
- Law, F. C. P. and R. F. Addison (1981). "Response of Trout Hepatic Mixed-Function Oxidases to Experimental Feeding of 10 Known or Possible Chlorinated Environmental Contaminants." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **27**(5): 605-609.
- Legler, J., C. E. van den Brink, A. Brouwer, A. J. Murk, P. T. van der Saag, A. D. Vethaak and P. van der Burg (1999). "Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line." Toxicological Sciences **48**(1): 55-66.
- Mariussen, E. (2003). "Hva er bromerte flammehemmere?" from [http://www.nilu.no/index.cfm?ac=topics&folder\\_id=4580&text\\_id=10797&view=text](http://www.nilu.no/index.cfm?ac=topics&folder_id=4580&text_id=10797&view=text).
- Mathisen, R. (1998). Etablering og bruk av *in vitro*-tester for påvisning av østrogenlignende stoffer. Cand. Scient. Molekylær Cellebiologi, University of Oslo
- Mauderly, J. L. (1993). "Toxicological Approaches to Complex-Mixtures." Environmental Health Perspectives **101**: 155-165.
- Meerts, I., R. J. Letcher, S. Hoving, G. Marsh, A. Bergman, J. G. Lemmen, B. van der Burg and A. Brouwer (2001). "In Vitro Estrogenicity of Polybrominated Diphenyl Ethers, Hydroxylated PBDEs, and Polybrominated Bisphenol A Compounds." Environmental Health Perspectives(4).
- Meerts, I. A., E. A. Luijks, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman and A. Brouwer (1998). "Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) as Ah-receptor agonists and antagonists." Organohalogen Compounds **37**: 147-150.



- Mercer, H. D., R. H. Teske, R. J. Condon, A. Furr, G. Meerdink, W. Buck and G. Fries (1976). "Herd health status of animals exposed to polybrominated biphenyls (PBB)." Journal of Toxicology and Environmental Health **2**(2): 335-49.
- Miljøstatus. (2005). "Leksikon." from <http://www.miljostatus.no/templates/TopPage.aspx?id=3341>.
- Monod, G., A. Devaux, Y. Valotaire and J. P. Cravedi (1998). Primary cell cultures from fish in ecotoxicology. Basel, Birkhäuser Verlag.
- Monosson, E. and J. J. Stegeman (1994). "Induced Cytochrome-P4501A in Winter Flounder, *Pleuronectes-Americanus*, from Offshore and Coastal Sites." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **51**(4): 933-941.
- Moore, R. W., G. A. Dannan and S. D. Aust (1978). "Induction of drug metabolizing enzymes in polybrominated biphenyl-fed lactating rats and their pups." Environmental Health Perspectives **23**: 159-65.
- Moore, R. W., S. D. Sleight and S. D. Aust (1978). "Induction of liver microsomal drug-metabolizing enzymes by 2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl." Toxicology and Applied Pharmacology **44**(2): 309-21.
- Nakari, T. and P. Pessala (2005). "In vitro estrogenicity of polybrominated flame retardants." Aquatic Toxicology **74**(3): 272-279.
- Navas, J. M. and H. Segner (1998). "Antiestrogenic activity of anthropogenic and natural chemicals." Environmental Science and Pollution Research **5**(2): 75-82.
- Navas, J. M. and H. Segner (2000). "Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor." Aquatic Toxicology **51**(1): 79-92.
- Navas, J. M. and H. Segner (2001). "Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor." Chemico-Biological Interactions **138**(3): 285-298.
- Nelson, D. R., L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus and D. W. Nebert (1996). "P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." Pharmacogenetics **6**(1): 1-42.

- Norrgren, L., T. Andersson and M. Bjork (1993). "Liver Morphology and Cytochrome-P450 Activity in Fry of Rainbow-Trout after Microinjection of Lipid-Soluble Xenobiotics in the Yolk-Sac Embryos." Aquatic Toxicology **26**(3-4): 307-316.
- Okey, A. B., D. S. Riddick and P. A. Harper (1994). "Molecular-Biology of the Aromatic Hydrocarbon (Dioxin) Receptor." Trends in Pharmacological Sciences **15**(7): 226-232.
- Olsen, C., E. Meussen-Elholm, J. K. Hongslo, J. Stenersen and K.-E. Tollefsen (2004). Estrogenic effects of environmental chemicals: An interspecies comparison. Doctor Philosophiae. Faculty of Medicine, University of Oslo
- Olsen, C. M., E. T. M. Meussen-Elholm, J. A. Holme and J. K. Hongslo (2002). "Brominated phenols: characterization of estrogen-like activity in the human breast cancer cell-line MCF-7." Toxicology Letters **129**(1-2): 55-63.
- Pesonen, M. and T. Andersson (1991). "Characterization and Induction of Xenobiotic Metabolizing Enzyme-Activities in a Primary Culture of Rainbow-Trout Hepatocytes." Xenobiotica **21**(4): 461-471.
- Petruilis, J. R. and N. J. Bunce (1999). "Competitive inhibition by inducer as a confounding factor in the use of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to estimate exposure to dioxin-like compounds." Toxicology Letters **105**(3): 251-260.
- Rabelo, E. M. L., B. S. Baker and J. R. Tata (1994). "Interplay between Thyroid-Hormone and Estrogen in Modulating Expression of their Receptor and Vitellogenin Genes During Xenopus-Metamorphosis." Mechanisms of Development **45**(1): 49-57.
- Ricci, S. B., D. Coradini, G. Di Fronzo, C. Bartoli and S. Villa (1998). "Estrogen-receptor status of patients who underwent mastectomy for breast cancer with a disease-free interval of not less than 8 years." American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials **21**(3): 250-252.
- Rios, J. C., G. Repetto, A. Jos, A. del Peso, M. Salguero, A. Camean and M. Repetto (2003). "Tribromophenol induces the differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells in vitro." Toxicology in Vitro **17**(5-6): 635-641.
- Ronisz, D., E. F. Finne, H. Karlsson and L. Forlin (2004). "Effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane (HBCDD), and tetrabromobisphenol

- A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and feral eelpout." Aquatic Toxicology **69**(3): 229-245.
- Sadar, M. D. and T. B. Andersson (2001). "Regulation of cytochrome P450 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes." In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal **37**(3): 180-184.
- Sadar, M. D., R. Ash, J. Sundqvist, P. E. Olsson and T. B. Andersson (1996). "Phenobarbital induction of CYP1A1 gene expression in a primary culture of rainbow trout hepatocytes." Journal of Biological Chemistry **271**(30): 17635-17643.
- Safe, S. (1984). "Polychlorinated-Biphenyls (PCBs) and Polybrominated Biphenyls (PBBs) - Biochemistry, Toxicology, and Mechanism of Action." Crc Critical Reviews in Toxicology **13**(4): 319-395.
- Safe, S. and M. Wormke (2003). "Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor a cross-talk and mechanisms of action." Chemical Research in Toxicology **16**(7): 807-816.
- Samuelsen, M., C. Olsen, J. A. Holme, E. Meussen-Elholm, A. Bergmann and J. K. Hongslo (2001). "Estrogen-like properties of brominated analogs of bisphenol A in the MCF-7 human breast cancer cell line." Cell Biology and Toxicology **17**(3): 139-151.
- Sawyer, T. and S. Safe (1982). "PCB Isomers and Congeners - Induction of Aryl-Hydrocarbon Hydroxylase and Ethoxyresorufin O-Deethylase Enzyme-Activities in Rat Hepatoma-Cells." Toxicology Letters **13**(1-2): 87-93.
- Scholz, S. and H. Segner (1999). "Induction of CYP1A in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells: concentration-response relationships of four model substances." Ecotoxicology and Environmental Safety **43**(3): 252-60.
- Segner, H., Ed. (1998). Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. Fish Ecotoxicology. Basel, Birkhäuser Verlag.
- SFT. (2005). "Hva er bromerte flammehemmere?" from <http://www.sft.no/arbeidsomr/kjemikalier/flammehemmere/dbafile12910.html>.
- Sleiderink, H. M., I. Oostingh, A. Goksoyr and J. P. Boon (1995). "Sensitivity of Cytochrome-P450 1A Induction in Dab (*Limanda-Limanda*) of Different Age

- and Sex as a Biomarker for Environmental Contaminants in the Southern North-Sea." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **28**(4): 423-430.
- Soto, A. M., C. Sonnenschein, K. L. Chung, M. F. Fernandez, N. Olea and F. O. Serrano (1995). "The E-Screen Assay as a Tool to Identify Estrogens - An Update on Estrogenic Environmental-Pollutants." Environmental Health Perspectives **103**: 113-122.
- Stegeman, J. J. (1989). "Cytochrome-P450 Forms in Fish - Catalytic, Immunological and Sequence Similarities." Xenobiotica **19**(10): 1093-1110.
- Stegeman, J. J., B. R. Woodin and A. Goksoyr (1988). "Apparent Cytochrome-P-450 Induction as an Indication of Exposure to Environmental Chemicals in the Flounder *Platichthys-Flesus*." Marine Ecology-Progress Series **46**(1-3): 55-60.
- Sumpter, J. P. and S. Jobling (1995). "Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment." Environmental Health Perspectives **103**: 173-178.
- Thomsen, C., E. Lundanes and G. Becher (2001). "Brominated flame retardants in plasma samples from three different occupational groups in Norway." Journal of Environmental Monitoring **3**(4): 366-70.
- Thorgaard, G. H., G. S. Bailey, D. Williams, D. R. Buhler, S. L. Kaattari, S. S. Ristow, J. D. Hansen, J. R. Winton, J. L. Bartholomew, J. J. Nagler, P. J. Walsh, M. M. Vijayan, R. H. Devlin, R. W. Hardy, K. E. Overturf, W. P. Young, B. D. Robison, C. Rexroad and Y. Palti (2002). "Status and opportunities for genomics research with rainbow trout." Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology **133**(4): 609-646.
- Tjarnlund, U., G. Ericson, U. Orn, C. Wit and L. Balk (1998). "Effects of two polybrominated diphenyl ethers on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed via food." Marine Environmental Research(1-5).
- Tollefsen, K. E., R. Mathisen and J. Stenersen (2002). "Estrogen mimics bind with similar affinity and specificity to the hepatic estrogen receptor in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." General and Comparative Endocrinology **126**(1): 14-22.
- Tollefsen, K. E., R. Mathisen and J. Stenersen (2003). "Induction of vitellogenin synthesis in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) hepatocyte culture: a sensitive in

vitro bioassay for the oestrogenic and anti-oestrogenic activity of chemicals." Biomarkers **8**(5): 394-407.

- Verhallen, E. Y., M. VandenBerg and A. T. C. Bosveld (1997). "Interactive effects on the EROD-inducing potency of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in the chicken embryo hepatocyte assay." Environmental Toxicology and Chemistry **16**(2): 277-282.
- Villeneuve, D. L., K. Kannan, B. T. Priest and J. P. Giesy (2002). "In vitro assessment of potential mechanism-specific effects of polybrominated diphenyl ethers." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(11): 2431-3.
- WHO/IPCS (1994). Environmental Health Criteria 162: Brominated diphenyl ethers. World Health Organization, Geneva
- WHO/IPCS (1995). Environmental health Criteria 172: Tetrabromobisphenol A and derivatives. World Health Organization, Geneva
- WHO/IPCS (2005). 2,4,6-tribromophenol and other simple brominated phenols. World Health Organization, Geneva
- Whyte, J. J., R. E. Jung, C. J. Schmitt and D. E. Tillitt (2000). "Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure." Critical Reviews in Toxicology **30**(4): 347-570.
- Wormke, M., M. Stoner, B. Saville and S. Safe (2000). "Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes." Febs Letters **478**(1-2): 109-112.
- Wormke, M., M. Stoner, B. Saville, K. Walker, M. Abdelrahim, R. Burghardt and S. Safe (2003). "The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes." Molecular and Cellular Biology **23**(6): 1843-1855.
- Zava, D. T., M. Blen and G. Duwe (1997). "Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture." Environmental Health Perspectives **105**: 637-645.