

Blandingseffekter av bromerte
flammehemmere, metylkvikksølv og
polyklorete bifenyler på opptak av
nevrotmittere i synaptiske vesikler

Kjetil Haugstad

Masteroppgave

Program for toksikologi og økofysiologi

Biologisk institutt

Universitetet i Oslo

August 2006

Forord:

Denne masteroppgaven i toksikologi er en del av mastergraden i biologi ved Universitetet i Oslo (UiO). Arbeidet med oppgaven er i hovedsak utført ved institutt for basalmedisin, avdeling for biokjemi (UiO), i perioden januar 2005 til august 2006. Deler av denne oppgaven har blitt benyttet til en kortartikkel til dioxinkonferansen som blir holdt i Oslo i august, Dioxin 2006; Andersen, I.S., Haugstad, K., Fonnum, F., Mariussen, E. (2006). The effects of different combinations of brominated flame retardants, polychlorinated biphenyls and methylmercury on neurotransmitteruptake in synaptosomes and synaptic vesicles *in vitro*. Den blir presentert som poster i sesjonen om nevrotoksisitet av organohalogenerte miljøgifter. Manuskriptet blir publisert i abstractsamlingen fra konferansen.

Arbeidet har vært veiledet av professor Frode Fonnum (UiO) og dr. scient. Espen Mariussen (Norsk institutt for luftforskning). De har servert god innføring og veiledning i metoder og teori rundt dette spennende området. En stor takk til dem. En stor takk går også til professor Ivar Walaas for å ha stilt lokaler og midler til rådighet. En takk går også til stipendiatene Inger Lise Bogen og Kristin Huse Haug for god hjelp og hyggelige stunder på laben. Takk også til min internveileder Jørgen Stenersen.

Arbeidet med denne oppgaven har vært en spennende prosess, preget av de gleder og frustrasjoner som følger med å jobbe med område som er relativt utrådt mark.

En spesielt stor takk til Ingrid for godt samarbeid, gode diskusjoner og mange hyggelige stunder på og utenfor laben. Uten deg hadde denne oppgaven blitt en ganske annen.

Til slutt vil jeg takke kjæresten min Gunhild for tålmodighet, støtte og hjelp til å stå opp om morgenen.

Innhold:

FORORD:	3
FORKORTELSER:	9
1. INNLEDNING	11
1.1 NERVESYSTEMET.....	11
1.1.1 <i>Synaptiske vesikler</i>	12
1.1.2 <i>Det glutamaterge systemet</i>	13
1.1.3 <i>Det dopaminerge systemet</i>	15
1.2 POLYKLORETE BIFENYLER (PCB).....	16
1.2.1 <i>Nevrotoksisitet; epidemiologi og laboratorieforsøk</i>	18
1.3 BROMERTE FLAMMEHEMMERE.....	21
1.3.1 <i>Tetrabrombisfenol-A (TBBPA)</i>	22
1.3.2 <i>Heksabromsyklododekan (HBCD)</i>	24
1.3.3 <i>Polybromerte difenyletere (PBDE)</i>	25
1.4 METYLKVIKKSØLV.....	26
1.4.1 <i>Nevrotoksisitet; epidemiologi og laboratorieforsøk</i>	29
1.5 INTERAKSJONSMODELLER.....	31
1.5.1 <i>Effektsummering</i>	33
1.5.2 <i>Loewes additivitetsmodell</i>	34
1.5.3 <i>Bliss' uavhengighetsmodell</i>	36

1.6	MÅLET MED OPPGAVEN.....	36
2.	MATERIALER OG METODER	39
2.1	DYR	39
2.2	KJEMIKALIER.....	39
2.3	ISOLERING AV SYNAPTISKE VESIKLER FRA ROTTEHJERNE	40
2.3.1	<i>Isolering av synaptiske vesikler fra rottehjerne.....</i>	<i>40</i>
2.3.2	<i>Pilotforsøk på andre isoleringsprosesser for synaptiske vesikler</i>	<i>41</i>
2.4	OPPTAK AV DOPAMIN OG GLUTAMAT I SYNAPTISKE VESIKLER.....	42
2.4.1	<i>Forsøksoppsett</i>	<i>42</i>
2.4.2	<i>Opptak av dopamin ved ulike testbetingelser</i>	<i>42</i>
2.4.3	<i>Tidsavhengig opptak av dopamin i vesikler</i>	<i>43</i>
2.4.4	<i>Opptak av dopamin ved ulike konsentrasjoner DMSO</i>	<i>43</i>
2.5	KINETIKKSTUDIE AV METYLKVIKKSØLV'S HEMMING AV DOPAMINOPPTAK I VESIKLER	43
2.6	STUDIER AV EFFEKTER AV BINÆRE BLANDINGER	44
2.6.1	<i>Virkingen av MeHg i blanding med 5 µM A1254, HBCD eller DE-71 på glutamatopptak i vesikler.....</i>	<i>44</i>
2.6.2	<i>Isoeffektive blandinger; Bliss uavhengighet og Löewe additivitet</i>	<i>44</i>
2.7	PROTEINMÅLING.....	48
2.8	TALLBEHANDLING OG STATISTIKK.....	49
2.8.1	<i>Regresjon og interpolering</i>	<i>49</i>

2.8.2	<i>Statistikk</i>	49
3.	RESULTATER	51
3.1	PILOTFORSØK METODEUTVIKLING	51
3.1.1	<i>Pilotforsøk på andre isoleringsmetoder for synaptiske vesikler</i> ..	51
3.2	KARAKTERISERING AV VESIKKELOPPTAK	52
3.2.1	<i>Opptak av dopamin ved varierende forsøksbetingelser</i>	52
3.2.2	<i>Opptak av dopamin i vesikler som funksjon av tid</i>	53
3.2.3	<i>Opptak av dopamin ved ulike konsentrasjoner DMSO</i>	54
3.3	EFFEKTER AV PCB PÅ VESIKKELOPPTAK AV GLUTAMAT OG DOPAMIN	54
3.4	EFFEKT AV ULIKE BROMERTE FLAMMEHEMMERE PÅ VESIKKELOPPTAK AV GLUTAMAT OG DOPAMIN	57
3.5	EFFEKT AV METYLVIKKSØLV PÅ VESIKKELOPPTAK AV GLUTAMAT OG DOPAMIN	59
3.6	KINETIKKSTUDIE AV METYLVIKKSØLV'S EFFEKT PÅ DOPAMINOPPTAK I VESIKLER	61
3.7	EFFEKT AV BLANDINGER AV STOFFER PÅ VESIKULÆRT OPPTAK AV GLUTAMAT.....	62
3.7.1	<i>Virkingen av MeHg i blanding med 5 µM A1254, HBCD eller DE-71 på opptak av glutamat i vesikler</i>	62
3.7.2	<i>Effekter av isoeffektive blandinger på opptak av glutamat i vesikler</i>	64
3.8	EFFEKTER AV ULIKE STOFFBLANDINGER PÅ VESIKKELOPPTAK AV DOPAMIN	69

3.8.1 *Effekter av isoeffektive blandinger på opptak av dopamin i vesikler* 69

4. DISKUSJON	76
4.1 VURDERING AV METODEN.....	76
4.2 PILOTFORSØK PÅ ALTERNATIVE METODER FOR ISOLERING AV VESIKLER	77
4.3 EFFEKTER AV ENKELTSTOFFER PÅ VESIKKELOPPTAK AV GLUTAMAT OG DOPAMIN.....	78
4.3.1 <i>Effekter av PCB og ulike BFR på vesikkelopptak av glutamat og dopamin</i>	78
4.3.2 <i>Effekter av MeHg på vesikkelopptak av glutamat og dopamin</i> ...	80
4.4 EFFEKTER AV BLANDINGER PÅ VESIKKELOPPTAK AV GLUTAMAT OG DOPAMIN I VESIKLER	81
4.4.1 <i>Virkingen av MeHg i blanding med 5 µM A1254, HBCD eller DE-71 på vesikkelopptak av glutamat</i>	81
4.4.2 <i>Effekter av isoeffektive blandinger av PCB, BFR og MeHg på vesikkelopptak av glutamat og dopamin</i>	82
4.5 IMPLIKASJONER AV INTERFERENS MED TRANSPORT AV NEVROTRANSMITTERE I VESIKLER	85
4.6 VURDERING AV INTERAKSJONSMODELLENE	86
4.7 KONKLUSJON.....	87
KILDELISTE	89

Appendiks 1 Kortartikkel til konferansen Dioxin2006

Appendiks 2 Plakat til konferansen Dioxin2006

Forkortelser:

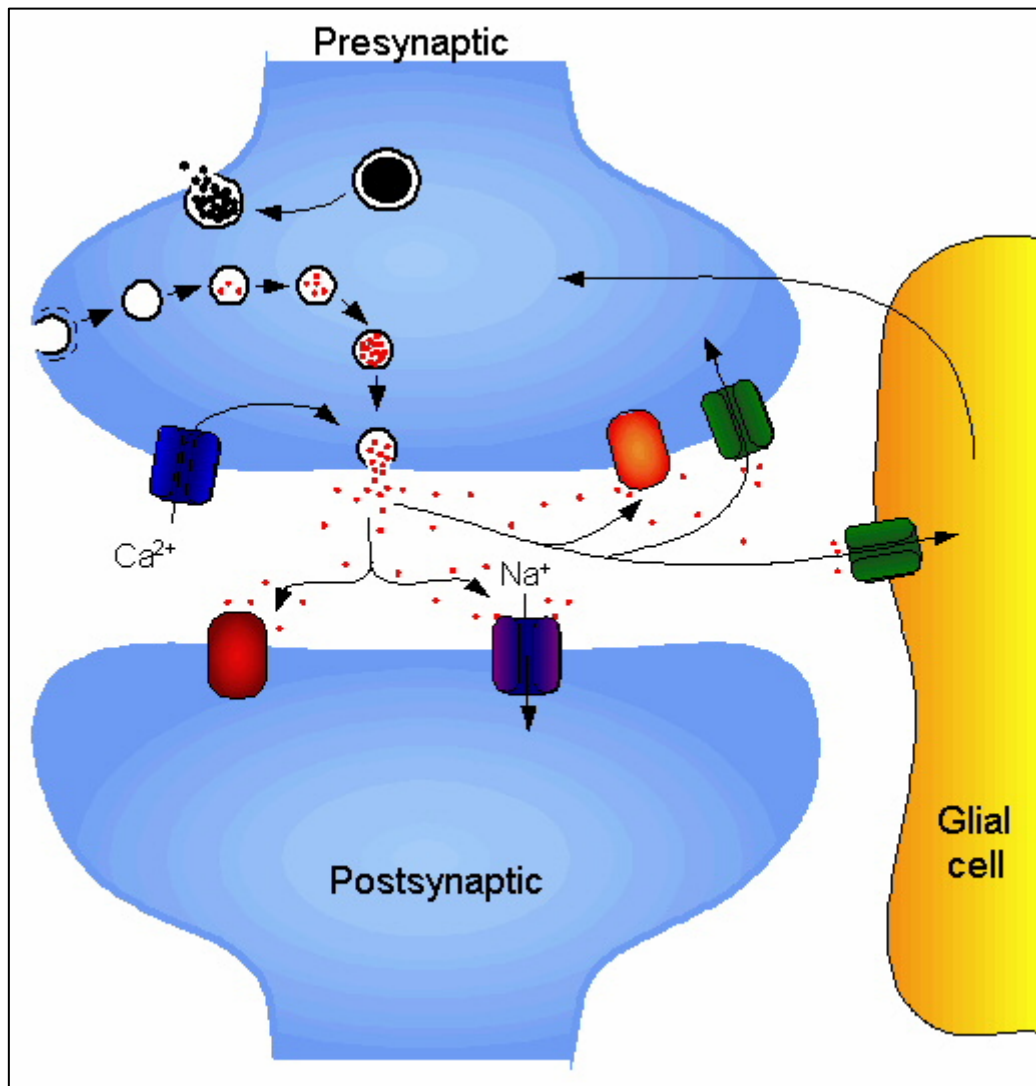
A1254	Kommersiell PCB-blanding, bestående av 54 vektprosent klor
ADHD	"Attention deficit hyperactivity disorder" ; hyperaktivitet
AhR	Arylhydrokarbon reseptor
ANOVA	Variansanalyse
ATP	Adenosin trifosfat
BDE	Bromert difenyleter
BFR	Bromert flammehemmer
BPA	Bisfenol-A
BSA	Bovint serumalbumin
C.I.	Kombinasjonsindeks
CNS	Sentralnervesystemet
cpm	Telling per minutt
CYP	Cytokrom P450 enzymer
DAT	Dopamintransportør i presynaptisk membran
DE-71	Pentabromert difenyleter blanding
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ELISA	"Enzyme linked immuno sorbent assay"
GABA	γ -aminosmørsyre
HBCD	Heksabrom syklododekan
HEPES	4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazinetansulfonsyre
IC _x	Inhibitorisk konsentrasjon som fører til X % hemming av en parameter
IQ	Intelligenskvotient
K _m	Michaelis-Mentenkonstant
K _{ow}	Fordelingskoeffisient mellom oktanol og vann
L-DOPA	Dihydroksyfenylalanin
LTP	Langtidspotensiering

MAO	Monoamin oksidase
MeHg	Metylkvikksølv
NMDA	N-metyl-D-aspartat
NOEL	"No observed effect level"; Konsentrasjon hvor man ikke ser effekt
P 1 - 4	Pellet 1 - 4
p47	Hydroksylert PCB metabolitt
PBB	Polybromerte bifenyler
PBDE	Polybromert difenyleter
PC12-celler	Cellelinje som syntetiserer, lagrer, frigir og metaboliserer katekolaminer
PCB	Polyklorerte bifenyler
PCB153	PCB enkeltkongeneren 2,4,5,2',4',5'-heksaklorbifenyl
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
rpm	Rotasjoner per minutt
S 1 - 4	Supernatant 1 - 4
S.E.M.	"Standard error of mean"; Standardfeil
SH-	Sulfhydrylgruppe
TBBPA	Tetrabrombisfenol-A
TEF	Toksisk ekvivalensfaktor
TEQ	Toksiske ekvivalenter
TTR	Transtyrethrin
V-ATPaser	Mg ²⁺ -avhengig ATPase som sitter i vesikkelmembranen
VGLUT 1 - 3	Vesikulær glutamattransportør 1 - 3
VMAT - 2	Vesikulær monoamintransportør 2
Vmax	Maksimal opptakshastighet
YES	Recombinant yeast estrogen screen
ΔpH	pH gradient
ΔΨ	Spenningsgradient

1. Innledning

1.1 Nervesystemet

Nervesystemet hos pattedyr er svært komplekst og består av opptil 100 milliarder celler av mange ulike typer i et ordnet nettverk. Hvert nevron mottar impulser fra en rekke andre nevrone, og dersom adekvat stimuli mottas, sendes et signal videre til andre celler. Hvert nevron kan danne synapser med fra noen få og opptil 200 000 andre nevrone. Signaloverføring mellom celler skjer i all hovedsak gjennom kjemiske synapser (Elliot, 1905), og en rekke ulike neurotransmittere benyttes i signaloverføring hos forskjellige celletyper og populasjoner. Neurotransmitterne syntetiseres intracellulært og lagres i små spesialiserte vesikler. Ved depolarisering av en nerveterminal vil det skje en innstrømning av Ca^{2+} til cytosol som vil gi en fusjonering av membranassosierte vesikler med plasmamembranen, slik at neurotransmittere blir frigjort til den synaptiske spalten ved exocytose (fig.1.1). Transmittorene diffunderer så over den synaptiske spalten og utøver sin virkning ved å binde til og aktivere reseptorer i membranen på den postsynaptiske cellen. Reseptorer kan også sitte i membranen på den presynaptiske cellen og utøve regulatorisk virkning, samt på omliggende astrocytter. Transmitterstoffet må så fjernes fra den synaptiske spalten for å avslutte stimuleringen. Dette kan skje ved diffusjon, reopptak tilbake i den presynaptiske cellen og/eller til astroglia-celler, eller ved nedbrytning (Masson et al., 1999).



Figur 1.1 Ved stimulering av nevroner vil spenningsaktiverte Ca²⁺-kanaler i den presynaptiske membranen åpnes .og utløse eksocytose av neurotransmittere fra synaptiske vesikler. Frigjorte transmittorer binder til, og aktiverer reseptorer i både pre- og postsynaptiske membraner. Responser på de frisatte neurotransmitterne avsluttes ved reopptak tilbake i den presynaptiske cellen, og til omliggende astroglialceller eller ved nedbrytning. I den presynaptiske cellen blir transmittorerne tatt opp og lagret i synaptiske vesikler for lagring, beskyttelse mot oksidasjon og for senere frisetting. Basert på Masson et al.(1999).

1.1.1 Synaptiske vesikler

Synaptiske vesikler er små spesialiserte organeller på ~50 nm i diameter, som muliggjør lagring og rask frisetting av neurotransmittere (Siegel et al., 1999).

Opptaket av transmittorer drives indirekte av temperatur- og Mg²⁺-avhengige ATPaser

(Fykse and Fonnum, 1988) og er karakterisert i detalj (Arai et al., 1988; Puopolo et al., 1992; Zhang et al., 1992). ATPasene er protonpumper i den vakuolære klassen (V-ATPaser) (Maycox et al., 1988) og transporterer H^+ fra cytosol og inn i vesikkellumen. Transporten er drevet ved hydrolyse av ATP og skaper en elektrokjemisk gradient over membranen. Denne gradienten har en spenningskomponent ($\Delta\Psi$) og en protonkomponent (ΔpH). Inne i vesiklene er pH målt til mellom pH 4.5 og pH 6. mens pH i cytosol er 7.4. Potensialet over vesikkelmembranen er målt til +80 mV (Johnson, 1987).

Vesikulært glutamatopptak er avhengig av både spennings- og protongradienten, mens dopaminopptak drives av protongradienten. Transportørene (VGLUT1-3 og VMAT-2) frakter henholdsvis glutamat og monoaminer inn i vesikkellumen i bytte mot 2 H^+ . Glutamatopptak har relativt lav affinitet med en K_m rundt 1 mM (Naito and Ueda, 1985), som reflekterer et normalt høyt intracellulært nivå. Dopaminopptak har på den annen side høy affinitet med en K_m under 1 μM (Finn and Edwards, 1997; Volz et al., 2006).

1.1.2 Det glutamaterge systemet

I hjernen er glutamat den kvantitativt viktigste eksitatoriske neurotransmitteren, mens GABA og glycin er de viktigste inhibitoriske (Fonnum, 1984). Glutamat binder seg til NMDA-, AMPA- og kainatreseptorer. AMPA- og kainatreseptorene er ionotrope og gir en innstrømning av Na^+ til cytosol, og bidrar således til å depolarisere cellen. I tillegg til glutamatbinding krever NMDA-reseptoren en depolarisering av cellen for å aktiveres. Aktivering fører til at et Mg^{2+} -ion som blokkerer ioneporen dissosierer, og kanalen kan slippe gjennom Na^+ og Ca^{2+} til cytosol (Alberts et al., 2002).

Glutamat blir fjernet fra den synaptiske spalten ved høyaffinitetsopptak til omkringliggende astrocytter, og til pre- og postsynaptiske nevroner. Opptaket drives av et elektrokjemisk potensial skapt av Na^+/K^+ -ATPasen. Glutamat blir transportert inn i cellen ved at Na^+ og H^+ slipper gjennom med sin elektrokjemiske gradient. K^+ og Cl^- slippes samtidig ut for ladningsbalansering (Danbolt, 2001).

I astrocytter blir glutamat omgjort til glutamin katalysert av enzymet glutamin syntetase i mitokondrier (Norenberg and Martinez-Hernandez, 1979; Ottersen et al., 1992). Glutamin blir så transportert ut fra astrocyttene, og tas deretter opp av nevroner, hvor glutamin deaminase gjendanner glutamat ved deaminering. Denne mekanismen beskytter cellene mot høye ekstracellulære konsentrasjoner av glutamat som kan virke toksisk. Frigjort glutamat i synapsen fjernes raskt (~1 ms) ved diffusjon og aktiv transport. Ved vedvarende stimulering, eller hemmet reopptak, vil nivået av glutamat kunne akkumulere. Ekstracellulære konsentrasjoner av glutamat over 1-3 μM er vist å være toksisk både for nevroner og astroglia-celler (Lipton and Rosenberg, 1994). Mekanismen for denne toksisiteten er ikke klarlagt, men flere mekanismeer er sannsynligvis involvert. Vedvarende depolarisering og aktivering av NMDA-reseptorer gir en innstrømming av Ca^{2+} til cytosol som, ved akkumulering til høye nivåer, kan gi en ukontrollert aktivering av flere signalveier som NO-syntetase, phospholipase A_2 og xantin oksidase. Glutamatindusert toksisitet kalles derfor eksitotoksisitet (Fonnum, 1998). De nevnte signalveiene, samt frigjøring av Ca^{2+} fra intracellulære lagre, kan gi dannelse av skadelige reaktive oksygenmetabolitter, ROS (Reistad et al., 2005).

Glutamat er involvert i en rekke prosesser knyttet til læring og hukommelse, blandt annet gjennom langtids potensiering (LTP) (Andersen et al., 1966). LTP antas å være en molekylær mekanisme for hukommelse. Ved glutamaterg stimulering av en synapse på en allerede depolarisert celle, vil det skje en forandring som fører til en kraftig forsterket sensitivitet av denne synapsen. Dette medfører en kraftig forsterket respons i cellen neste gang denne synapsen blir stimulert. NMDA-reseptorer spiller en nøkkelrolle i denne prosessen. Endringen i følsomhet er en respons på den økede Ca^{2+} -konsentrasjonen NMDA aktiveringen gir og kan vare i dager, uker eller måneder, avhengig av antall synapser der dette har skjedd og styrken på stimuleringen (Alberts et al., 2002; Malenka and Bear, 2004).

1.1.3 Det dopaminerge systemet

Dopamin er et katekolamin syntetisert fra aminosyren tyrosin, og er også en forløper for adrenalin og noradrenalin. Det første, og hastighetsbegrensende trinnet i dopaminsyntesen er en omdanning av tyrosin til dihydroksyfenylalanin (L-DOPA), katalysert av tyrosin hydrolase. L-DOPA blir så omdannet til dopamin ved aromatisk aminosyre dekarboksylase (Alberts et al., 2002).

Dopamin benyttes av en relativt liten gruppe celler i hjernen, lokalisert i substantia nigra og corpus striatum. Cellene i substantia nigra utgjør det mesostriatale systemet, og sender projeksjoner fremover til flere striatale områder. Det mesostriatale systemet spiller en viktig rolle i kontroll av frivillige bevegelser, og betydningen av dette systemet gjør seg gjeldende ved Parkinsons sykdom som skyldes en selektiv degenerering av nevroner i dette området (Reith et al., 1997). Det mesolimbiske og mesokortikale systemet består av celler lokalisert i det ventrale-tegmentum og sender projeksjoner til limbiske- og kortikale områder. Disse nervebanene er av stor betydning, spesielt for høyere kognitive funksjoner hos pattedyr, og utgjør blant annet hjernens motivasjons- og belønningssenter. Forstyrrelser i disse områdene kan være involvert i lidelser som depresjon, schizofreni, ADHD og Tourettes syndrom (Miller et al., 1999; Reith et al., 1997).

Den dopaminerge plasmamembrantransportøren, Dopamine transporter (DAT), tilhører familien av høyaffinitets Na^+/Cl^- -koblede neurotransmittertransportører sammen med transportørene for serotonin og noradrenalin. Disse er indirekte drevet av det elektrokjemiske potensialet som blir skapt av Na^+/K^+ -ATPasen. Dopamin blir transportert inn i cellen ved at Na^+ samtidig slipper inn med sin elektrokjemiske gradient. Fra cytosol blir dopamin fraktet videre inn i vesikler for lagring. Den vesikulære transportøren, VMAT2, er generell for alle monoaminene, og har svært høy affinitet. K_m for opptak av dopamin under $1 \mu\text{M}$ (Finn and Edwards, 1997; Volz et al., 2006). Dette reflekterer at monoaminene normalt foreligger i svært lave konsentrasjoner intracellulært. Fritt intracellulært dopamin er vist å være svært skadelig for celler, pga. hemming av mitokondriefunksjon og autooksidasjon av

dopamin til reaktive quinoner og semiquinoner (Ben-Shachar et al., 1995; Hastings et al., 1996). Intracellulært blir dopamin også brutt ned av monoamin oksidaser (MAO) ved deaminering. Dette gir opphav til hydrogenperoksid, som videre kan gi radikaldannelse gjennom fentonreaksjonen i reaksjon med transisjonsmetaller (Chiueh et al., 1993). Den lave pH i vesikkellumen beskytter dopamin mot oksidasjon og muliggjør således lagring og omfattende gjenbruk.

1.2 Polyklorerte bifenyler (PCB)

Polyklorerte bifenyler (PCB) er en stoffgruppe som har felles bifenyyl grunnstruktur, men har ulik grad av klorering. PCB har empirisk formel $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ (fig.1.2). Dette gir mulighet for 209 ulike

kongenerer, hvorav ca. 135 er påvist i miljøet (Seegal, 1996b). De enkelte kongenerenes fysiske og kjemiske egenskaper avhenger av antallet og plasseringen av klorsubstituenten. Industrielt

fremstilles PCB ved klorering av

bifenyler. Ved å variere reaksjonstiden, vil det dannes kongenerer med ulik kloreringsgrad og substitusjonsmønster. Fra 1930 tallet ble ulike kongenerblandinger produsert under handelsnavn som Aroclor, Clophen, Phenoclor og Kaneklor. For Aroclor er de ulike blandingene spesifisert av en 4-sifret kode der det første tallet, 12, representerer antall C-atomer i grunnstrukturen, etterfulgt av et tall som angir gjennomsnittlig grad av klorering i vektprosent. Vanlig brukte blandinger er Aroclor 1221, 1254 og 1260, som vil inneholde henholdsvis 21, 54 og 60 vektprosent klor (Safe, 1992).

Generelt er forbindelsene stabile og hydrofobe, og disse egenskapene øker med graden av klorering (Kimbrough, 1987). Deres stabilitet og brannhemmende virkning har gjort at de ble mye brukt som tilsetning i maling, fugemasser, lim og som

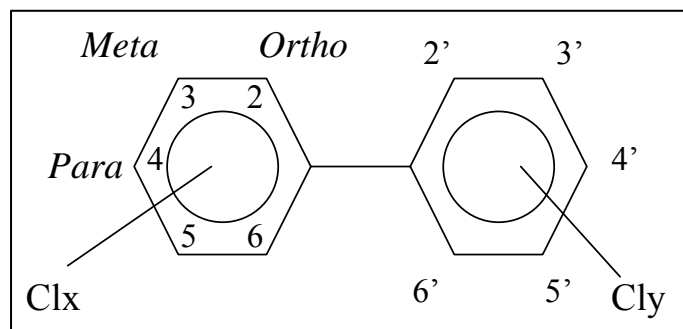


Fig.1.2. Generell struktur for PCB

isolasjon i elektriske artikler. Andre bruksområder har vært hydraulikkolje, varmeoverføringsmedie, trykksverte, karbonfritt kopipapir, plastprodukter m.m. De samme egenskapene gjør PCB uønsket i naturen og til en potensiell miljøgift. Stabiliteten og lipofiliteten gjør at de har blitt spredt og har akkumulert i miljøet, slik at de i dag påvises i miljø og biota over hele verden (Seegal, 1996b).

I hovedsak finnes det 3 ulike strukturelle klasser av PCB-forbindelser. *Nonortho*-substituerte PCB kongenerer, deres *monoortho*-klorerte analoger, og de *ortho*-substituerte. *Nonortho*- og *monoortho* substituerte PCB-kongenerer vil kunne innta en plan konfigurasjon, mens *ortho*-substituerte kongenerer ikke vil være planare grunnet sterisk hindring mellom klorsubstituentene i *orthoposisjon* (Safe, 1994).

Nonortho- og *monoortho*-substituerte PCB kongenerer er ofte omtalt som dioksin-liknende PCBer. Disse er kjent å gi sin toksiske virkning hovedsakelig gjennom aktivering av arylhydrokarbon reseptoren (AhR), og er integrert i et system med toksiske ekvivalensfaktorer (TEF), utviklet for integrert risikovurdering av dioksinliknende stoffer (Pollitt, 1999; Van den Berg et al., 1998).

AhR-medierte effekter omfatter effekter på immunsystemet, teratogenese, leverskader, induksjon av CYP 1A1, 1A2 og 1B1, og karsinogenese i forsøksdyr (Kociba et al., 1978; Pascussi et al., 2004; Pollitt, 1999; Safe, 2001). For at en PCB kongener skal ha dioksin-liknende egenskaper, må følgende kriterier være oppfylt: mer enn 4 kloratomer uansett posisjon, kloratomer i begge *para*- posisjoner, minimum to kloratomer i *meta*-posisjoner og ett eller ingen kloratomer i *ortho*-posisjonene (Van den Berg et al., 1998).

Orthosubstituerte, ikke-koplanare PCB-kongenerer er først og fremst tilregnet nevrotoksiske effekter (Seegal et al., 1991b; Tilson and Kodavanti, 1998). I miljøet og i biota er det også disse som dominerer (Borgå et al., 2005; Bright et al., 1995).

1.2.1 Nevrotoksisitet; epidemiologi og laboratorieforsøk

Epidemiologiske studier har vist at PCB kan innvirke på neurologisk utvikling, og påvirke motoriske og kognitive evner (Schantz, 1996; Schantz et al., 2003; Seegal, 1996b). De første hendelsene som ga mistanke om PCBs nevrotoksiske virkning var forgiftningsulykker. I Japan i 1968 og i Taiwan 1979 ble et stort antall mennesker forgiftet av risolje kontaminert med termisk degradert PCB (Hsu et al., 1984; Kuratsune et al., 1971). Disse hendelsene har blitt kjent som Yusho- og Yu-Cheng ulykkene. Vanlige symptomer blant voksne omfattet alvorlig klorakne, økt pigmentering av huden og dessuten neurologiske symptomer som nummenhet i ekstremiteter, hodepine og hukommelsestap. Barn som var eksponert *in utero*, gjennom brystmelk eller som unge hadde lav fødselsvekt, viste forsinket motorisk utvikling, og dessuten kognitive effekter som redusert IQ og korttidsminne (Guo et al., 2004) (Rogan et al. 1988) Effekter på IQ er bare sett hos barn eksponert *in utero*, noe som også er vist i flere andre studier, men ble til gjengjeld observert hos barn født opptil 6 år etter ulykken (Jacobson and Jacobson, 1996; Patandin et al., 1999). Disse kognitive effektene har også vist seg å være varige. Barn fra Yu-Cheng har også vist høyere score på tester for aktivitetsnivå og adferdsvansker.

Risoljen fra disse ulykkene inneholdt også dibenzofuraner og andre halogenerte aromatiske forbindelser, og dette kan ha vært avgjørende for sykdomsbildet. (Kashimoto et al., 1981). Dermed er det noe usikkerhet rundt hvilke effekter som kan tilskrives PCB. Mange av de observerte fysiske symptomene, som klorakne og økt pigmentering, er imidlertid typiske for dioksiner.

I etterkant av disse ulykkene har det vært gjennomført en rekke epidemiologiske studier av befolkningsgrupper som antas å ha en jevn lav eksponering for PCB ved at de lever i områder med mye industri eller gjennom inntak av fisk og andre sjødyr fra forurensede områder. Eksempler er Michigan (Jacobson and Jacobson, 1988; Jacobson and Jacobson, 1996), Oswego, New York (Darvill et al., 2000), Nederland (Patandin et al., 1999), Tyskland (Walkowiak et al., 2001; Winneke et al., 1998) og Færøyene (Budtz-Jørgensen et al., 1999; Grandjean et al., 2001; Weihe et al., 1996).

Disse studiene har påvist en sammenheng mellom prenatal eksponering for PCB og tester for kognitiv funksjon i barndommen (Schantz, 1996; Schantz et al., 2003; Seegal, 1996b).

En rekke forsøk på dyr har vist at eksponering, spesielt *in utero* eller under tidlig utvikling, gir hyperaktivitet, samt kognitive effekter på læring og hukommelse. Eksponering av voksne dyr gir oftest hypoaktivitet (reduisert aktivitet) (Mariussen and Fonnum, 2006; Seegal, 1996a; Tilson et al., 1990).

I en serie studier eksponerte Erikssons gruppe mus neonatalt for PCB ved ulike tidspunkt, og fant at dyrene var spesielt sårbare i en periode som preges av rask hjerneutvikling. Hos gnagere omfatter denne perioden de første to til fire ukene etter fødselen, mens den hos mennesker begynner i tredje trimester i svangerskapet og varer til toårs alder. Effekter på reflekser, læring og hukommelse viste seg å vedvare til voksen alder (Eriksson and Fredriksson, 1998).

En utfordring har vært å avdekke virkningsmekanismer som kan forklare de observerte effektene. Seegal eksponerte voksne aper (*Macaca nemestrina*) for Aroclor 1016 i 20 uker. A1016 er en teknisk PCB blanding som inneholder både koplanare og orthosubstituerte PCB kongenerer med relativt lav kloreringsgrad. Eksponeringen førte til at dopaminnivåene i spesifikke hjerneområder var signifikant redusert, og ved analyse ble kun tre orthosubstituerte PCB kongenerer påvist. Dette viser at disse kongenerene har mye større evne til å akkumulere i hjerne, og at de kan ha effekt på hjernens dopaminsystem. Kongenerene som ble påvist akkumulert i apehjernen, ble så testet i et *in vitro* system på PC12 celler, en dopaminerg cellelinje som syntetiserer, lagrer, frigjør og metaboliserer dopamin. Kongenerene ble testet enkeltvis og i blanding, og i tillegg ble enkelte andre kongenerer testet. De tre kongenerene alene og i blanding, reduserte dopamininnholdet i PC12 cellene signifikant. Blandingen av de tre var signifikant mer effektiv enn enkeltstoffene, og indikerte en mulig additiv eller synergistisk effekt. Videre testing av ytterligere 45 PCB kongenerer viste at de *orthosubstituerte* klart var mest potente til å redusere cellenes dopamininnhold. Videre ble det vist at planare dioksinlike kongenerer var

uten effekt, klorering i minst en *orthoposisjon* økte effekten, klorering i *metaposisjon* reduserte effekten og at økt kloreringsgrad ikke ga redusert effekt (Seegal et al., 1991a; Seegal et al., 1990).

I denne studien ble det også postulert en mulig virkningsmekanisme. Cellulært dopamininnhold kan reduseres via flere mekanismer, som økt frisetting, økt metabolisme, hemming av syntese og redusert reopptak. Ved å studere konsentrasjonene av dopamin og dets metabolitter i både celler og mediet, postulerte forfatterne at årsaken til det reduserte nivået av dopamin skyldtes hemming av tyrosin hydroxylase, som er det hastighetsbegrensende enzymet i monoaminsyntesen.

I senere forsøk har Seegal vist at reduksjonen av dopaminnivåene i primathjerner er en varig effekt (Seegal et al., 1994).

Mariussen og Fonnum (Mariussen et al., 2001; Mariussen and Fonnum, 2001; Mariussen et al., 1999) har vist tilsvarende struktur-aktivitetsforhold for hemming av opptak av glutamat, GABA, serotonin og dopamin i synaptosomer og vesikler. Hemming av neurotransmitteropptaket i både synaptosomer og synaptiske vesikler ble her vist å være avhengig av orthoklorering. For vesikulært opptak av dopamin var tetraklorerte kongenerer de mest potente hemmerene, mens hexa- og heptaklorerte hemmet dårlig. For glutamat var kongenerer med 4-6 klorsubstituenten de mest potente hemmerene. Det er også vist i disse studiene at hemmingen av monoaminopptaket i vesikler, skyldes en selektiv effekt på VMAT2, den vesikulære monoamintransportøren i CNS. PCBs innvirkning på neurotransmittersystemer er i dag en bredt akseptert hypotese for virkningsmekanismen bak de observerte nevrotoksiske effektene etter PCB-eksponering.

Andre studier har vist at PCB kan påvirke en rekke cellulære mekanismer som kan ha virkning på nervesystemet. PCB påvirker kalsiumhomeostasen og kan virke inn på LTP (Gilbert et al., 2000; Hussain et al., 2000; Mariussen and Fonnum, 2006). PCB og hydroksylerte PCB-metabolitter er også vist å kunne redusere serumnivåene av tyroksin, ved å binde med høy affinitet til plasmabærerproteinet til tyroksin,

transtyrethrin (TTR) (Schantz et al., 2003). Tyroidhormoner er viktige for hjernens utvikling i fosterlivet, og både lave og høye nivåer kan ha betydelige effekter på nevrologisk funksjon (Zoeller et al., 2002).

1.3 Bromerte flammehemmere

Branner har i gjennomsnitt tatt 61 menneskeliv årlig i Norge de siste 10 årene. I tillegg til personlige tragedier er det store materielle og økonomiske tap involvert. Tall fra Finansnæringens Hovedorganisasjon viser at norske forsikringselskaper i 2004 utbetalte over 3 milliarder kroner, og dette var en nedgang på 20% fra 2003. (Direktoratet for samfunnssikkerhet og beredskap 2004)

Det er relativt få kjente forbindelser som har en flammehemmende effekt. Det finnes i dag rundt 175 ulike flammehemmere, og de bromerte utgjør den største gruppen på markedet med over 75 ulike forbindelser (Birnbaum and Staskal, 2004; Hakk and Letcher, 2003). Årlig produksjon er på omlag 150 000 tonn og den årlige bruken i Norge er på ca. 300 tonn (Mariussen and Fønnum, 2003).

Bromerte flammehemmere (BFR) er en betegnelse på en svært heterogen gruppe bromholdige organiske forbindelser som tilsettes ulike produkter for å redusere brannfare. Møbelstoff, tekstiler, elektronisk utstyr, plast og isolasjonsmaterialer er de vanligste produktene. Under varmeutvikling frigis bromradikaler som stopper kjedereaksjoner i forbrenningsprosessen og således hemmer brannforløpet (SFT.no).

Som stabile halogenerte organiske forbindelser, har flere av disse stoffene mange av egenskapene som skal til for å defineres som en miljøgift. De er påvist i miljøet svært mange steder i verden, akkumulerer i næringskjeder og er påvist i morsmelk i stadig økende mengder (de Wit, 2002; Fangstrom et al., 2005). Kunnskapen om biologiske effekter er mangelfull, men en del kunnskap har oppstått de senere årene (Birnbaum and Staskal, 2004; Hakk and Letcher, 2003).

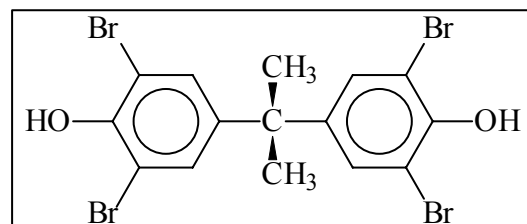
BFR kan deles i to hovedgrupper, reaktive og additive. Reaktive flammehemmere er kovalent bundet i materialet de er tilsatt, ofte polymerer, og skal således ikke kunne lekke ut av produktene. Additive flammehemmere blir tilsatt uten noen kovalent binding til materialet, og har derfor mulighet til å lekke ut og vil på den måten tilføres miljøet (Sjödín et al., 2003).

De bromerte flammehemmerne deles inn i 5 klasser:

- 1 Bromerte bisfenoler (TBBPA)
- 2 Syklododecaner (HBCD)
- 3 Difenylettere (PBDE) (penta, okta og deca- blandinger)
- 4 Fenoler
- 5 Ftalsyrederivater

1.3.1 Tetrabrombisfenol-A (TBBPA)

TBBPA (fig. 1.3) er den mest brukte flammehemmeren på global basis. Den brukes hovedsakelig reaktivt i kretskort, i elektronisk utstyr og i ulike polymerer, men kan også brukes additivt. Ved reaktiv bruk blir molekylet kovalent bundet via hydroksylgruppene til polymeren. Det er allikevel vist at TBBPA og metabolitter, selv ved reaktiv bruk, kan lekke ut av produkter (Birnbaum and Staskal, 2004).



Figur 1.3. Tetrabrombisfenol-A

TBBPA er ikke akutt giftig. LD₅₀ etter en enkelt oral dose er >5g for rotte og >4g for mus (WHO 1995). Gnagere eksponert for 0,05-100 mg/kg/dag i 30 og 90 dager ga heller ingen effekt på adferd, matinntak, vektøkning eller dødelighet. (Birnbaum and Staskal, 2004; Sjödín et al., 2003). To eldre høydosestudier på rotter konkluderte med

at TBBPA i liten grad ble tatt opp fra tarm, og at 95% skilles ut i uforandret form etter 72 timer (Hakk and Letcher, 2003; Szymanska et al., 2001).

I en studie på Sprague-Dawley rotter med og uten dren fra galleblæren, ble det vist at TBBPA blir absorbert, og at 72,3% av dosen ble skilt ut som glukoroniderte, diglukoroniderte, sulfaterte, eller både glukoroniderte og sulfaterte metabolitter gjennom gallen. Dette tyder på at TBBPA kan være gjenstand for bakteriell dekonjugering i tarm og hepatisk sirkulering (Hakk et al., 2000).

Hydroksylgruppene på TBBPA gjør den til et lett mål for konjugering og utskilling. Disse vil også gjøre molekylet noe polart, og dette gjør at TBBPA trolig ikke er i stand til krysse blod-hjerne barrieren.

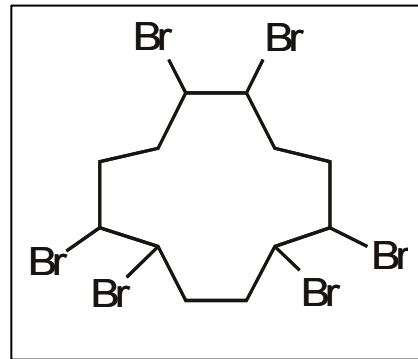
TBBPA har gitt en rekke effekter i *in vitro* forsøk. Den er en svært potent hemmer av både synaptosomalt og vesikulært glutamat- og dopaminopptak. Hemmingen av det synaptosomale opptaket ble her vist å være forårsaket av en effekt på membranpotensialet (Mariussen and Fonnum, 2003), samt at den er vist å inducere sterk ROS dannelse og å gi celledød av granulærceller fra cerebellum (Reistad et al., 2002). Videre er det mistanke om at TBBPA kan påvirke det endokrine systemet. Det ubromerte molekylet, bisfenol-A, er kjent å ha en svak østrogen virkning. En rekke publikasjoner viser derimot at BPA har østrogene effekter i langt lavere konsentrasjoner enn de offisielle NOEL-konsentrasjonene, og det reises tvil om korrektheten av disse dataene, da de er basert på ekstrapolering fra høye doser (vom Saal and Welshons, 2006).

TBBPA har også vist å binde kompetitivt til TTR med affinitet opp til 10 ganger høyere enn tyroksin (Meerts et al., 2000).

1.3.2 Heksabromsyklododekan (HBCD)

Heksabromsyklododekan (HBCD) (fig.1.4) er en bromert syklisk alkan med molekylvekt 641,7g/mol, og $\log K_{ow} = 5,6$. Årlig produksjon var 16700 tonn i 2001 (BSEF, 2000).

HBCD brukes primært additivt i isopor- og plastmaterialer. Det brukes også i tekstiler, kabler, og umettede polyestere. HBCD brukes i mye større utstrekning i Europa enn i Amerika siden det her har erstattet PBDE i flere produkttyper etter et forbud mot enkelte PBDE-blandinger (Birnbaum and Staskal, 2004).



Figur 1.4. Heksabromsyklododekan

Kommersiell HBCD er en blanding av tre diastereomerer, α -, β - og γ -HBCD, der γ -HBCD dominerer. Ved temperaturer over $\sim 160^\circ\text{C}$ vil termisk omarrangering mellom diastereomerene forekomme. γ -HBCD utgjør $>90\%$ av HBCD i sediment, sammen med små mengder α - og β -HBCD ($\alpha > \beta$), men α -HBCD er den dominerende diastereomeren i biota (De Boer et al., 2002). HBCD har en fisk-sediment ratio opp til 15, og en bioakkumuleringsfaktor på 18100 i fathead minnow (Sällström et al., 1998). HBCD er persistent, med halveringstider på 3 dager i luft og 2-25 dager i vann (Birnbaum and Staskal, 2004).

HBCD er også påvist i human brystmelk hos kanadiske kvinner, med median og gjennomsnittskonsentrasjoner hos 30 kvinner på henholdsvis 6,6 og 1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fett (Birnbaum and Staskal, 2004). Forskjeller i giftighet mellom de ulike diastereomerene er ikke kjent (Birnbaum and Staskal, 2004).

Lite er kjent om metabolisme av HBCD. En studie på rotter foretatt av en produsent viste at HBCD tas effektivt opp fra tarm, metaboliseres og skilles raskt ut med avføring med en halveringstid på ca. 2 timer (Hakk and Letcher, 2003).

En studie av (Eriksson et al., 2002a) har vist at tidlig neonatal eksponering av mus kan gi endringer i spontan adferd, læring og hukommelse og gir et redusert antall nikotinerge reseptorer. Koeksponering med PCB ga en økt respons enn sett for enkelstoffene.

Reistad viste nylig at HBCD i lave konsentrasjoner induserer celledød i granulærceller fra cerebellum. I denne studien ble også HBCD påvist i signifikante nivåer i hjerne 72 timer etter en intraperitoneal injeksjon (Reistad et al., 2006). *In vitro* er HBCD vist å være en potent hemmer av synaptosomalt og vesikulært opptak av både glutamat og dopamin (Mariussen and Fonnum, 2003).

1.3.3 Polybromerte difenyletere (PBDE)

Polybromerte difenyletere (PBDE) (fig.1.5), omfatter som for PCB 209 teoretiske kongenerer, men det reelle antallet er en del lavere da en del kongenerer er lite stabile og vil debromeres. PBDE er mye brukte flammehemmere med en global produksjon på 67400 tonn (BSEF, 2000). Amerika står for over 50% av bruken, mens bruken i Europa har gått kraftig ned de senere år på grunn av et forbud mot enkelte av blandingene fra 2004.

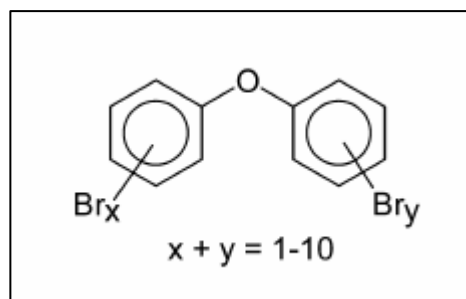


Fig.1.5. Generell struktur for polybromerte difenyletere

PBDE markedsføres som ulike kongenerblandinger som pentaBDE, oktaBDE og dekaBDE og er klassifisert etter gjennomsnittlig bromeringsgrad. DekabDE er den dominerende blandingen med over 80% av markedet. Det er penta- og okta-blandingene som er omfattet av forbudet i EU. Forbudet omfatter produksjon, salg, import og eksport av varer som inneholder over 0,1 vektprosent av disse blandingene, og begynte som en frivillig bruksstans flere år tidligere, grunnet økende nivåer i miljøet og usikkerhet rundt effekter. PBDE er persistente med halveringstider på >2 dager, 2 måneder og 6 måneder i henholdsvis luft, vann og jord (Birnbbaum and Staskal, 2004; BSEF, 2000). De lavere bromerte kongenerene med 4-7 bromsubstituenten har størst bioakkumuleringsevne

med bioakkumuleringsfaktorer på >5000, og dominerer i biota (de Wit, 2002). Høybromerte kongenerer som dekaBDE er vist å kunne debromeres til lavere bromerte kongenerer med 6-9 bromsubstituenten ved UV-belysning og biotisk metabolisme (Birnbaum and Staskal, 2004).

Flere studier har vist at PBDE kan ha nevrotoksiske effekter. Erikssons gruppe eksponerte nyfødte mus for ulike PBDE kongenerer gjennom et eksponeringsregime utviklet ved studier av pre- og postnatal PCB-eksponering. Musene hadde nedsatte motoriske reflekser, og viste effekter på læring og hukommelse. Som for PCB fant de et følsomt vindu for eksponering rundt postnatal dag 10 som sammenfaller med en periode med rask hjerneutvikling (Eriksson et al., 2002b; Viberg et al., 2002).

Mariussen viste at pentaBDEblandingen DE-71 hadde en svak evne til å hemme opptak av glutamat og dopamin i synaptosomer og vesikler. Okta- og dekaBDE hadde ingen hemmende effekt (Mariussen and Fonnum, 2003).

PBDE er også vist å gi celledød i granulær celler (Reistad et al., 2006; Reistad et al., 2002). PentaBDE blandingen DE71 var her mer effektiv enn okta- og dekaBDEblandinger.

DE-71 kan indusere ”respiratory burst” i humane nøytrofile granulocytter (Reistad and Mariussen, 2005). PBDE samt hydroksylerte PBDE-metabolitter er også vist å kunne binde til TTR og således redusere serumnivået av tyroksin (Hakk and Letcher, 2003).

1.4 Metylkvikksølv

Kvikksølv har lenge vært kjent å være svært skadelig for mennesker, og utgjør i dag et globalt forurensningsproblem verdenssamfunnet har fått økt fokus på. (WHO).

Naturlige kilder til kvikksølv i miljøet er vulkansk aktivitet, skogbranner og fordampning fra kvikksølvholdig grunn. Antropogene kilder er forbrenning av fossilt brennstoff, hovedsakelig kull, men også noe fra olje og gass. Dessuten er forbrenning

av søppel, medisinsk avfall og kremasjoner viktige kilder. Industriprosesser som metallfremstilling, sementproduksjon, klor-alkaliproduksjon og papirfremstilling var tidligere betydelige kilder. Kvikksølv brukes fortsatt i amalgam til tannfyllinger, men bruken av dette er sterkt redusert de senere år. Det brukes dessuten i blodtrykksmålere, barometere, noen termometere, samt lysstoffrør og sparepærer.

Estimert årlig global atmosfærisk tilførsel er om lag 2200 tonn (Ferrara et al., 2000), mens det norske bidraget ligger på om lag ett tonn (2003) (www.miljostatus.no).

Store mengder kvikksølv brukes som amalgameringsmateriale ved utvinning av gull og sølv for å ekstrahere de edle metallene fra malm og sediment. De rene metallene får man så ved å dampe bort kvikksølvet ved oppvarming. Det er estimert at over 130 tonn kvikksølv årlig er sluppet ut i Amazonasbassenget alene gjennom denne praksisen (Nriagu et al., 1992).

Man antar at det naturlige tilskuddet utgjør omlag 1/3 av det totale utslippet, men det er mye usikkerhet knyttet til estimatet. Dette skyldes fordampning av avsatt kvikksølv av antropogen opprinnelse, slik at det opprinnelige bakgrunnsnivået er usikkert.

Kvikksølv i naturen forekommer i 3 ulike former, elementært, som salt og som organiske forbindelser. Hver form har ulik toksikokinetikk og dynamikk.

Atmosfærisk kvikksølv er primært i form av elementær kvikksølv Hg^0 og kan således transporteres over store avstander. Elementært kvikksølv har en viss løselighet i vann (0,08 mg/l ved 25°C), og vil kunne avsettes direkte med nedbør, men i hovedsak vil det oksideres til Hg^{2+} av atmosfæriske oksidanter som ozon og oksygen. Hg^{2+} er langt mer vannløselig og vaskes lett ut fra atmosfæren. I jord og sediment vil noe felle ut som tungtløselig sulfid, noe vil bindes opp i komplekser, mens noe vil bli metylert til metylkvikksølv, MeHg^+ , av bakterier under anaerobe forhold, i hovedsak i akvatiske systemer. Denne dannelsen er en sidereaksjon til andre metyleringsreaksjoner i mikroorganismer som for eksempel *Desulfobacter*, en gruppe sulfatreduserende

bakterier, der metylgruppen fra metyl-B₁₂ som normalt skal overføres til homocystein og videre til fettsyren 16:1ω7, i stedet blir overført til kvikksølv (Stenersen, 2002).

MeHg tas effektivt opp fra tarm (95%). I likhet med Hg²⁺ har MeHg høy affinitet for SH-grupper. Ved å reagere med sulfhydrylgruppen i L-cystein, vil MeHg danne et kompleks som er strukturelt analogt til L-methionin, og vil på denne måten kunne transporteres aktivt over blod-hjerne-barrieren over transportøren for nøytrale aminosyrer (Kerper et al 92). Hjernen vil på denne måten motta en langt større del av byrden enn den normalt ville gjort. Av inntatt MeHg, vil om lag 5% finnes i blod, mens 10% finnes i hjernen (Clarkson TW 2002). MeHg i hjerne omgjøres sakte til uorganisk kvikksølv, og ved obduksjon av hjerner utsatt for MeHg eksponering, er tilnærmet alt i form av Hg²⁺ (Clarkson, 2002; Mottet et al., 1997).

MeHg krysser lett blod-placenta-barrieren og foster vil kunne ha 25 % høyere konsentrasjon i blod enn mor (Amin-Zaki et al., 1976; Castoldi et al., 2003). Fosteret kan også ha en konsentrasjon i hjerne som er 5-7 ganger høyere enn mor (Cernichiari et al., 1995). MeHg skilles også ut med morsmelk, noe som representerer enda en rute for eksponering (Grandjean et al., 1994).

MeHg skilles ut fra celler som et kompleks med redusert glutathion, og skilles ut til galle i denne formen.(Ballatori and Clarkson, 1985; Dutczak et al., 1991).

Eliminasjonen er tilnærmet første ordens kinetikk, og varierer fra vev til vev, og er oppgitt å være 45-70 dager (Claassen, 2001). MeHg som kompleks med cystein, er også gjenstand for omfattende enterohepatisk sirkulasjon.

Med unntak av ulykker, gjennom amalgam eller gjennom yrkeseksponering, kommer all betydelig human eksponering for Hg gjennom inntak av fisk og andre sjødyr, og da i form av MeHg. Biokonsentrasjonsfaktoren for MeHg kan komme opp i 10 millioner for enkelte arter fersk- og saltvannsfisk øverst i næringskjeden og konsentrasjonen kan komme opp i over 1μg/g (Castoldi et al., 2003). 90-100% av all Hg i fisk er i form av MeHg, hovedsaklig bundet til proteiner. Generelt har ferskvannsfisk høyere nivåer enn saltvannsfisk, da Hg er mindre biotilgjengelig i

saltvann grunnet høy kloridkonsentrasjon og ulike red-oks forhold i sedimentene (Eggleton and Thomas, 2004). Av denne grunnen har vi i Norge nasjonale kostholdsråd for de mest aktuelle artene ferskvannsfisk, mens kostholdsråd for saltvannsfisk er begrenset til enkelte områder og fjorder med spesiell lokal forurensning (Fjeld et al., 2001).

1.4.1 Nevrotoksisitet; epidemiologi og laboratorieforsøk

Tre store forgiftningsulykker er grunnlaget for mye av de humane data og risikovurderinger som foreligger om MeHg.

I Minamata bay i Japan på 50 tallet ble et stort antall mennesker alvorlig forgiftet av MeHg etter å ha spist lokal fisk og skalldyr som var forurenset etter utslipp fra acetaldehydproduksjon ved Chisso kjemiske fabrikk. At MeHg oppkonsentrert i fisk var årsaken til den mystiske sykdommen som var observert, ble oppdaget i 1960, og ble først rapportert av Kurland (Kurland et al., 1960). Kun 5 år senere i Niigata, Japan ble det påvist enda en liknende hendelse.

Ofre for disse forgiftningene utviklet alvorlige neurologiske symptomer. Mer alvorlige følger fikk det for barn født av mødre med høye nivåer. Mange var dødfødte, eller ble født blinde, med uttalt mental retardasjon, og med alvorlige cerebral parese-lignende symptomer. Obduksjoner av døde ofre viste store lesjoner i cerebellum, og ulike steder i korteks. Perifer nevropati ble også observert. Slike skader ble også observert hos barn av mødre som selv ikke hadde uttalte symptomer på forgiftning (Castoldi et al., 2003; Harada, 1995).

I 1971 i Irak ble et stort antall mennesker forgiftet etter å ha spist såkorn beiset med MeHg som fungicid over en periode på ca. 6 mnd. Det er rapportert om mer enn 6000 sykehusinnleggelses og 459 dødsfall i forbindelse med denne hendelsen (Bakir et al., 1973).

Disse ulykkene har vist at MeHg først og fremst påvirker sentralnervesystemet, og at virkningen er ulik i en hjerne under utvikling i fosterlivet enn hos voksne individer..

Symptomer som parestesi, nummenhet og prikkende, stikkende fornemmelser og er de vanligste symptomene ved lav eksponering hos voksne. Dette kan videre utvikle seg til cerebral parese-liknende symptomer (cerebellar ataxia), dysarthria (vanskeligheter med å snakke), konstriksjon av synsfeltet, døvhet, forsterkede reflekser og i verste fall død. Disse symptomene skyldes at celler i spesifikke områder i hjernen, bl.a. cerebellum og i synskorteks, dør (Castoldi et al., 2003; Clarkson, 2002).

Fosterlivet er en spesielt følsom periode for MeHg induisert toksisitet. I disse studiene ble det observert at barn av mødre uten, eller med milde symptomer, i flere tilfeller var dødfødte eller hadde alvorlig hjerneskade. Ved obduksjon av dødfødte barn ble det observert omfattende skader i form av lesjoner i store deler av hjernen. Dette er i kontrast til de svært selektivt lokaliserte lesjonene sett hos voksne. Det er også observert redusert celletall og unormal cytoarkitektur av nevroner i både cerebral- og cerebellar korteks grunnet degenerering av nevroner, innvirkning på cellemigrering og differensiering (Castoldi et al., 2003; Choi, 1989). Ved lavere eksponering var barna tilsynelatende normale, men viste en noe forsinket utvikling i forhold til ueksponerte barn.

På det molekylære nivå er eneste kjente effekt av MeHg, dens høye affinitet for sulfydrylgrupper. Binding til disse i proteiner kan føre til denaturering, hemming eller endring av funksjon. Hjernens utvikling er en svært komplisert prosess av celledelinger, differensiering, migrering, myelinering, vekst av dendritter og axoner og synaptogenese. Forstyrrelser av bare én disse prosessene, selv i et svært avgrenset tidsrom, kan gi store konsekvenser for den videre utviklingen. Flere laboratorieforsøk har vist at MeHg effektivt hemmer polymerisering og gir depolymerisering av mikrotubuli ved å binde til cysteinresidier på subenhetene (Abe et al., 1975; Sager, 1988; Sager et al., 1983). Mikrotubuli er sentrale ved at de utgjør spindelapparatet som skiller søsterchromatidene ved celledeling, og er sentrale ved cellemigrering og aksodendrittisk transport. Disse effektene kan ligge til grunn mangelen på organisering i hjerner hos barn eksponert *in utero* (Abe et al., 1975).

Mye tyder på at glutamatmediert eksitotoksisitet er blant mekanismene for MeHg mediert nevrotoksisitet. MeHg er vist å hemme opptak av glutamat i både nevronale kulturer og i astrocytter (Aschner et al., 2000; Trotti et al., 1997a; Trotti et al., 1997b). NMDA antagonister motvirker effektivt virkningen av MeHg i kulturer av cerebrale nevroner, som underbygger rollen til glutamat i MeHg induisert nevrotoksisitet (Castoldi et al., 2003). Videre er MeHg vist å hemme opptak av glutamat i synaptiske vesikler ved å hemme den vesikulære H⁺-ATPasen (Porciuncula et al., 2003). Denne hemmingen gjør det nærliggende å tro at MeHg også vil hemme det vesikulære opptaket av andre transmittere som dopamin. Hemming av det vesikulære dopaminopptaket vil kunne gi økte intracellulære nivåer som og er kjent å kunne ha en toksisk virkning da dopamin kan oksidere til reaktive quinoner og semiquinoner (Ben-Shachar et al., 1995; Hastings et al., 1996).

1.5 Interaksjonsmodeller

En additiv effekt kan defineres som den effekten et stoff gir, når det blandes med seg selv (Sühnel, 1990). Interaksjonseffekter mellom stoffer på, er som regel definert som et avvik fra en forventet additiv effekt. Det er beregningen av denne forventede effekten som er av stor betydning for tolkningen av testresultatene. Dersom effekten av en blanding stoffer er sterkere enn forventet, sies den å være synergistisk, og dersom den er lavere enn forventet er den antagonistisk. Dersom effekten stemmer overens med den beregnede, er virkningen additiv.

Blandingseffekter er et område som lider under en mangel på kunnskap om modeller og korrekte definisjoner, slik at mye publisert materiale om temaet er tvilsomt eller direkte feilaktig (Berenbaum, 1989; Kortenkamp and Altenburger, 1998). En konsensus mellom 6 av de ledende forskerne innen området, om konsepter, terminologi og analysemodeller, ble nådd ved den femte internasjonale konferansen om kombinasjonseffekter i Saariselkä, Finland i 1992 (tabell 1.1) (Grecko et al., 1992). I praksis er det to ulike modeller for beregning av forventede additive effekter av stoffer i blanding som er aksepterte og som brukes i miljøer som driver denne type forskning; Löewes additivitetsmodell og Bliss' uavhengighetsmodell.

Tabell 1.1. Konsensus terminologi for blandingseffekter etter Saariselkä-avtalen. (Grecko et al 1992)

	Begge stoffer er aktive individuelt. Loewes additivitetsmodell er referansemodell.	Begge stoffer er aktive individuelt. Bliss' uavhengighetsmodell er referansemodell.	Kun ett av stoffene er aktivt individuelt.	Ingen av stoffene er aktive individuelt.
Kombinasjonen er mer effektiv enn beregnet	Loewe synergi	Bliss synergi	Synergi	Koalisme
Kombinasjonseffekten er lik den beregnede	Loewe additivitet	Bliss additivitet	Inertisme	Inertisme
Kombinasjonen er mindre effektiv enn beregnet	Loewe antagonisme	Bliss antagonisme	Antagonisme	-

På denne måten er modellene sidestilt som referansemodeller, og det er opp til den enkelte å vurdere hvilken modell en foretrekker og som passer det aktuelle forsøksoppsettet best. Ved å spesifisere hvilken referansemodell man har brukt, vil det bli langt lettere å tolke resultater, og man kan unngå mye av den forvirring som oppstår ved at hver modell er blitt brukt under mange ulike navn.

1.5.1 Effektsummering

Effektsummering er en intuitivt tiltalende metode som er mye brukt, men ikke anbefalt i Saariselkä-avtalen. Metoden er basert på en forventning om at effekten av en blanding stoffer vil være den aritmetiske summen av effektene til enkeltkomponentene.

$$1) \quad E_{AB} = E_A + E_B$$

Ofte blir de enkelte stoffene samt blandinger testet ved kun et dosenivå. Ved nærmere ettertanke er det imidlertid lett å se at denne modellen kun er gyldig for stoffer som viser en lineær dose-responsammenheng, noe som er sjeldent i biologiske systemer. (Berenbaum, 1989) har vist at denne modellen kun er brukbar for stoffer med en lineær dose-responsammenheng der kurven går gjennom grafens nullpunkt. For stoffer med sigmoide dose-responsammenhenger, vil denne modellen kunne vise feilaktige interaksjonseffekter (synergi eller antagonisme) for blandingen. Dette vil også kunne være tilfelle dersom denne metoden benyttes til å beregne effekten av en addisjon av to doser av samme stoff med sigmoid dose-responskurve. At et stoff skal ha interaksjonseffekter med seg selv, vil av tilhengere av Löewes additivitetsmodell, presentert i kap. 1.5.2, kalles absurd. En blanding av to doser av samme stoff skal, ifølge definisjonen av additivitet, gi en perfekt additiv effekt. Enkelte tilhengere av modellen som kalles Bliss uavhengighet, presentert i kap. 1.5.3, mener derimot at en slik effektsammenheng er en vanlig egenskap for en rekke stoffer.

En annerledes bruk av denne metoden kan være å sammenligne dose-responskurven for et stoff med dose-responskurven for det samme stoffet tilsatt en fast konsentrasjon av et annet for å se om effekten blir vesentlig endret av dette. Dette er ikke en metode som er anbefalt i henhold til Saariselkä-avtalen, men er nevnt som en mulig metode i en publikasjon av (Sühnel, 1998) og anbefalt i en publikasjoner av Pöck (for

eksempel (Pösch et al., 1990)). Begge disse forfatterne var deltakere, beslutningstakere og medforfattere i Saariseikä-avtalen. Signifikansen av forskjellen testes da ved en toveis ANOVA (Sühnel, 1998).

1.5.2 Loewes additivitetsmodell

Loewe additivitet, også kalt "simple similar action" eller konsentrasjonsaddisjon, er en modell som ble foreslått av farmakologene Loewe og Muischnek i 1926 (Loewe and Muischnek, 1926). Denne modellen er basert på en forventning om at komponentene i en blanding har en lik virkning, slik at en komponent i blandingen kan erstattes av en isoeffektiv konsentrasjon av en annen uten at effekten endres. Det innebærer at hver komponent bidrar til den totale effekten i forhold til dens konsentrasjon og potens, selv i konsentrasjoner under deres NOEL-verdi (Silva et al., 2002).

Loeweadditivitet er basisen for TEF-systemet for risikovurdering av dioksiner og dioksinliknende stoffer. TEF-systemet beskriver det toksiske potensialet til de ulike dioksinlike forbindelsene relativt til den sterkeste AhR agonisten, 2,3,7,8-Tetra Chloro Dibenzo-*para*-Dioxin, (2,3,7,8-TCDD) som såkalte toksiske ekvivalens faktorer (TEF). Ved å multiplisere konsentrasjonene av de ulike kongenerene med deres TEF-verdi, får man deres 2,3,7,8-TCDD ekvivalens, (TEQ), dvs. mengden 2,3,7,8-TCDD som trengs for å gi samme toksiske effekt som mengden av den gitte forbindelsen. De ulike TEQ-verdiene kan så adderes opp for å få et summert giftighetsmål i 2,3,7,8-TCDD ekvivalenser (Safe, 1990; Van den Berg et al., 1998; Van den Berg et al., 2000).

For en blanding av to stoffer vil additivitet uttrykkes ved likningen (Berenbaum, 1989):

$$2) \quad d_A/D_A + d_B/D_B = 1$$

D_A og D_B er her dosene/konsentrasjonen av stoffene A og B alene som gir en bestemt effekt. d_A og d_B er tilsvarende dosene/konsentrasjonene av stoff A og B i blanding med hverandre som gir den samme slutteffekten. Dersom stoffene i blanding gir en sterkere effekt enn den forventede additive effekten, vil $d_A/D_A + d_B/D_B < 1$, og vi har en synergistisk interaksjon. Tilsvarende, hvis blandingen gir en svakere effekt enn den forventede, har vi $d_A/D_A + d_B/D_B > 1$, som viser en antagonistisk interaksjon.

Denne modellen danner basisen for isobolmetoden for studie av interaksjoner mellom to stoffer. Et isoboldiagram er en graf der aksene representerer konsentrasjonene til hvert av de to stoffene, og en rett linje trekkes mellom konsentrasjonene av disse som gir en bestemt slutteffekt, f.eks en IC_{20} - eller IC_{50} -verdi. Denne linjen kalles en additivitetslinje, eller en isobol. Dersom stoffene ikke interagerer, men virker additivt, vil ethvert punkt langs additivitetslinjen representere en blanding mellom disse som skal gi den bestemte effekten. Dersom en trenger høyere eller lavere konsentrasjoner av stoffene for å gi den bestemte effekten, gir dette punkter som ligger henholdsvis over og under isobollinjen. Punkter under additivitetslinjen viser en synergistisk effekt, mens punkter som havner over denne viser en antagonistisk effekt. Statistisk vurdering av isobolene er vanligst å gjøre ved å plote konfidensintervall eller standardfeil på verdiene (Berenbaum, 1989).

En annen måte å benytte denne modellen på er å beregne interaksjonsindekser ut fra likning 2). Følgelig vil dette gi et tall mindre enn, lik, eller større enn 1, ved henholdsvis synergi, additivitet og antagonisme (Sühnel, 1998).

Av aksepterte interaksjonsmodeller er det Loewes additivitetsmodell som er mest brukt og den har etter hvert vunnet bred faglig aksept. Den er validert for blandinger

av stoffer uavhengig av formen på deres dose-responskurve og av bakenforliggende mekanismer for effekten (Berenbaum, 1989). Berenbaums argumenter for valideringen er akseptert av noen, mens andre har kritisert dem for å være en øvelse i sirkulær logikk (Grecko et al., 1992).

1.5.3 Bliss' uavhengighetsmodell

Bliss uavhengighet, også kalt "independent action", "independent joint action" eller effekt addisjon, er en modell som ble foreslått av biometrikeren Bliss i 1939 (Bliss, 1939). Den er basert på en ide om sannsynlighet for uavhengige hendelser, der stoffene i en blanding virker uavhengig av hverandre, og alle bidrar til en effekt. Beregningen av en additiv effekt av stoffene i en blanding ut fra deres individuelle effekter er gitt ved formelen:

$$3) \quad E_{AB} = E_A + E_B - E_A E_B$$

E_{AB} er den teoretiske additive effekten av en blanding av stoffene A og B. E_A og E_B er effektene av stoffene A og B individuelt, mens $E_A E_B$ er produktet av disse. Effektgraden angis som et tall mellom 0 og 1.

Ved bruk av denne modellen vil man fra data om dose-responssammenhenger av enkeltstoffene kunne beregne en teoretisk additiv dose-respons for en blanding av disse, og så teste eksperimentelt om blandingen er mer eller mindre potent enn denne beregnede responsen (Payne et al., 2000).

1.6 Målet med oppgaven

Både dyr og mennesker blir eksponert for en blanding av svært mange stoffer gjennom miljøet og føden. Muligheten for at noen av disse har evnen til å virke sammen og gi uønskede effekter, selv om de enkelte forbindelsene er tilstede i konsentrasjoner under deres NOEL-verdier, kan ha store konsekvenser for risikovurderingen av disse stoffene. Muligheten for at effekten av et stoff kan endres i

betydelig grad av et annet, er et kjent fenomen innen toksikologien. I kjemoterapi er kombinasjoner av medikamenter blitt stadig viktigere i behandling av både infeksjøs sykdommer og kreft. Innen toksikologien er forskning på enkeltstoffer dominerende, og kunnskap om blandingseffekter er i mange tilfeller mangelfull.

Valget av stoffer i denne studien har bakgrunn i deres aktualitet som miljøgifter, og deres nevrotoksiske virkning. MeHg er spesielt aktuell grunnet et høyt innhold i fisk. PCB er en klororganisk miljøgift som fremdeles, 25 år etter at ny bruk ble stanset, finnes i relativt høye nivåer i både miljø og biota. Mens mye tyder på at nivåene PCB i miljøet omsider har begynt å minke, er BFR en klasse stoffer som stadig blir påvist i økende mengder i miljø, biota og i mennesker (de Wit, 2002; Mariussen and Fonnum, 2006).

En rekke studier de senere år har funnet effekter som kan tillegges kombinasjonseffekter mellom stoffer. (Bemis and Seegal, 1999; Bemis and Seegal, 2000; Grandjean et al., 2001; Roegge and Schantz, 2006; Schantz et al., 2001).

Siden alle disse stoffgruppene er vist å kunne interferere med transport av neurotransmitter i vesikler, er det nærliggende å tro at det vil kunne oppstå interaksjonseffekter på dette systemet.

Jeg ønsket derfor å undersøke effekter av MeHg, PCB og noen utvalgte BFR, individuelt og i blanding, på opptak av neurotransmitterne glutamat og dopamin i synaptiske vesikler fra rotte for å se om dette kunne være tilfelle.

Min hypotese vil da være at blandinger av MeHg, PCB og BFR vil gi additive effekter på vesikkelopptak av glutamat og dopamin.

Stoffer som er testet individuelt:

- PCB: kongenerblandingen A1254, kongeneren PCB 153, og den hydroksylerte PCB-metabolitten p47.

- BFR: TBBPA, HBCD og pentaBDE-blandingen DE-71
- MeHg

Blandingseffektene som er studert:

- Virkningen av MeHg i blanding med 5 μ M A1254, HBCD eller DE-71 på vesikulært glutamatopptak.
- Effekter av binære isoeffektive blandinger mellom MeHg, TBBPA og HBCD på vesikkelopptak av glutamat og karakterisering av effektene med Bliss' uavhengighetsmodell og Löewes additivitetsmodell.
- Effekter av binære isoeffektive blandinger mellom MeHg, A1254 og HBCD på vesikulært dopaminopptak og karakterisering av effektene med Bliss' uavhengighetsmodell og Löewes additivitetsmodell.

2. Materialer og metoder

2.1 Dyr

Wistar hannrotter (150 – 200g) ble kjøpt fra Møllegaards avlslaboratorier i Ejby, Danmark. Rottene ble levert på dyrestallen ved institutt for basalmedisin og fikk stå i ro i minst en dag før dekapitering.

2.2 Kjemikalier

Kjemikalier	Leverandør
[2,5,6- ³ H]Dopamin (10 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Batch 62 (Buckinghamshire, Storbritannia)
A1254	Accustandard Inc. (New Haven, USA)
Adenosin trifosfat (ATP)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Tyskland)
Askorbinsyre (Vitamin C)	Sigma Co. (St.Louis, USA)
Bromert difenyleter (DE-71)	Great Lakes, fra Promochem, (Stockholm, Sverige)
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co. (Meriden, USA)
Filtercount	Packard instrument Co. (Meriden, USA)
Heksabromsyklododekan (HBCD)	CD-75P, Great Lakes, Promochem, (Stockholm, Sverige)
HEPES (4(2-hydroksyetyl)-1-piperazinetansulfonsyre	GibcoBRL (Storbritannia)
L- ³ H-Glutamat (49 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Batch 62 (Buckinghamshire, Storbritannia)
L-Glutamat (mononatrium salt)	Sigma-Aldrich Co. (St.Louis, USA)
Metylkvikksølv (MeHg)	Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland)
p47	Accustandard Inc. (New Haven, USA)
PCB153	Accustandard Inc. (New Haven, USA)
Saponin	Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland)
Tetrabromobisfenol-A (TBBPA)	BA-59P, Great Lakes, Lot nr 6L16C, C, Promochem, (Stockholm, Sverige)
Andre kjemikalier ble kjøpt inn fra kommersielle standardutsalg	

2.3 Isolering av synaptiske vesikler fra rottehjerne

2.3.1 Isolering av synaptiske vesikler fra rottehjerne

Synaptiske vesikler ble isolert etter en metode basert på arbeider av (Erickson et al., 1990) og (Teng et al., 1998) og senere beskrevet av (Bogen et al., 2006). Løsninger og utstyr ble oppbevart på is under hele prosessen.

For hver isolering, ble 16 Wistar hannrotter sedert med CO₂ og avlivet ved dekapitering. Hjernene ble raskt dissekert ut, cerebellum fjernet og cerebrum ble lagt i iskald 0.32 M sukrose. Hjernene ble deretter veid og forsiktig homogenisert i 0.32 M sukrose (5% v./v.) i en glass-teflon homogenisator (ca. 14 rolige strøk ved 450 rpm). Homogenatet ble så sentrifugert ved 3000 rpm (1000 x g) i en Sorwall kjølesentrifuge ved 4°C. Pelleten, P1, inneholder vevsrester, kjerner, cellekropper og fragmenter av disse, og ble kastet, mens supernatanten, S1, ble sentrifugert videre ved 13000 rpm. (20000 x g) i 30 min. Denne pelleten, P2, inneholder bl.a. synaptosomer, mens S2 ble kastet. P2 ble så gitt et hypotont sjokk ved resuspending med pipette i iskaldt ddH₂O til 7.5 % homogenat (v./v.) og inkubert ved romtemperatur i 30 minutter for å frigjøre vesiklene. Løsningen ble deretter igjen sentrifugert ved 13000 rpm. (20000 x g) i 30 min. Supernatanten, S3, fra denne sentrifugeringen ble forsiktig overført til ultrasentrifugerør og tilsatt (sluttkonsentrasjoner) 0.1 M K-tartrat og 25 mM HEPES (pH 7.4) for å gjenopprette osmolariteten, og deretter overført til ultrasentrifugerør. Pelleten, P3, bestående av synaptosom-membranrester, mitokondrier, myelin og annet debris ble kastet. Løsningen ble så sentrifugert i en Beckman Optima™ LE-80K ultrasentrifuge med Ti 70.1 rotor ved 40000 rpm (100 000 x g) og 4°C i en time. Supernatanten (S4) ble helt av og kastet, mens pelleten (P4) ble løst og forsiktig homogenisert i totalt 4 ml (pr. dyr) 0.32M sukrose. Vesikkelløsningen ble deretter overført til eppendorfrør, frosset på tørris og så lagret ved -70°C.

2.3.2 Pilotforsøk på andre isoleringsprosesser for synaptiske vesikler

a) *Isolering av synaptiske vesikler fra frosne rottehjerner*

Da synaptiske vesikler godt tåler å bli frosset, er det nærliggende å tro at det er mulig å isolere vesikler direkte fra hjerner som er frosset på forhånd. Dette kan effektivisere bruken av dyr, da det vil muliggjøre bruk av hjerner fra rotter som benyttes til andre formål.

Det ble benyttet 2 stk. cerebrum som var dissekert ut på vanlig måte, pakket i ren aluminiumsfolie, frosset på tørris og lagret ved -70°C i to uker. Vesikler ble isolert på samme måte som beskrevet i kap. 2.3.1, og deretter frosset ved -70°C .

b) *Isolering av synaptiske vesikler ved bruk av saponin*

Isoleringsprosessen av synaptiske vesikler fra hjerne innebærer å frigjøre vesikler fra avsnørte nerveender (synaptosomer). Dette gjøres ved å gi disse et hypotont sjokk ved inkubasjon i destillert vann i ca. 30 minutter slik at de lyseres. Utbyttet er antatt å være relativt lavt, da mye av vesiklene vil kunne være bundet opp i cytoskjelett, og fordi en del av synaptosomene ikke lyseres. Saponin er en detergent som benyttes mye innen molekylærbiologien til fenestrering av cellemembraner for å gjøre disse kompetente til å ta opp DNA-konstrukter.

Jeg ønsket å undersøke om det er mulig å øke utbyttet vesikler ved å benytte en svak saponinløsning ved utføring av hypotont sjokk. For høy saponinkonsentrasjon i denne prosessen vil kunne ødelegge vesiklene, men da disse også godt tåler det hypotone sjokket gitt ved den vanlig isoleringprosedyren, er det klart at de tåler mer enn synaptosomene. Isoleringen ble utført som beskrevet i kap. 2.3.1, men løsninger med 0.0003%, 0.0001%, 0.00001% og 0.00003% saponin ble brukt til å gi hypotont sjokk.

2.4 Opptak av dopamin og glutamat i synaptiske vesikler

2.4.1 Forsøksoppsett

Analyse av vesikulært neurotransmitteropptak ble utført etter metode utviklet og beskrevet av (Fykse and Fonnum, 1988) for opptak av GABA.

Testblandingen bestod av 200 µl inkubasjonsbuffer (sluttkonsentrasjoner 10 mM HEPES, 4 mM KCl, 4 mM MgSO₄ og 0.25 M sukrose, pH 7.4), 75 µl vesikkelløsning og 0.3 - 1.4 µl testsubstans. Prøvene ble preinkubert på vannbad ved 30°C i 15 minutter før tilsetning av 25 µl substrat, inneholdende enten ~19 nM ³H-glutamat og 1 mM kald glutamat, eller ~168 nM ³H-dopamin, og 2 µM ATP (sluttkonsentrasjoner) løst i 10 mM HEPES/KOH (pH 7.4). Etter tilsetning av substrat, ble prøvene inkubert på vannbad ved 30°C i 3 minutter før reaksjonen ble terminert ved tilsetning av 5 ml iskald 0.15 M KCl og filtrert gjennom Hawp Millipore filter med diameter 25 mm og porestørrelse 0.45 µm. Reagensrør og filter ble så skylt ytterligere to ganger med 5 ml 0.15 M KCl, før filtrene ble overført til tellerør og løst i 4 ml filtercount scintillasjonsvæske. Gjenværende radioaktivitet ble målt i en Packard 1900 TR scintillasjonsteller.

Hver konsentrasjon ble testet i 3 paralleller. Kontroller var tilsatt lik konsentrasjon DMSO som de andre prøvene for å korrigere for evt. effekt av DMSO på opptaket. Blindprøver ble inkubert på is for å inaktivere transportøren, men ellers behandlet likt med de øvrige prøvene. Disse viste liten variasjon og korrigerer for uspesifikk binding, i hovedsak til filtrene. Hemmingsgraden er fremstilt som opptak i prosent av kontroll, fratrukket blindprøver.

2.4.2 Opptak av dopamin ved ulike testbetingelser

Tidligere studier har vist at det vesikulære opptaket av neurotransmittere er avhengig av en rekke faktorer for å fungere optimalt. De vesikulære transportørene for dopamin, (VMAT-2) og glutamat (VGLUT 1-3) er temperatur- og Mg²⁺-avhengige

ATPaser, og opptaket drives av en protongradient over vesikkelmembranen disse skaper. Plasmamembrantransportørene for disse stoffene, DAT og EAAT1-5 er derimot Na^+ -avhengige symportere, og drives av Na^+ -gradienten over plasmamembranen som skapes av K^+/Na^+ -pumpen. For å karakterisere vesikkelopptaket og kontrollere for tilstedeværelse av synaptosom- og astrocyttrester i vesikkelfraksjonen, ble opptaket i vesiklene testet ved ulike testbetingelser, som fravær av Mg^{2+} og/eller ATP, ved tilstedeværelse av 50 mM NaCl og ved 4°C.

2.4.3 Tidsavhengig opptak av dopamin i vesikler

Dopaminopptak som funksjon av tid ble målt ved å bruke samme forsøksoppsett, men å variere inkubasjonstiden etter tilsatt substrat. Prøvene ble inkubert uten hemmer i 1.5, 3 og 5 minutter.

2.4.4 Opptak av dopamin ved ulike konsentrasjoner DMSO

Alle testsubstansene brukt i denne studien ble løst i DMSO. DMSO har potensiale til å virke destabiliserende på membraner i høyere konsentrasjoner, og har således potensiale til å innvirke på vesiklenes funksjon. Det ble testet hvorvidt DMSO hadde innvirkning på opptak i vesikler. Konsentrasjonene av DMSO som ble testet var 0.25%, 0.5%, 1%, 2% og 3%.

2.5 Kinetikkstudie av metylkvikksølvs hemming av dopaminopptak i vesikler

For å undersøke mekanismen for MeHgs hemming av dopaminopptak i vesikler, ble opptaket målt ved varierende dopaminkonsentrasjoner i substratet (sluttkons. 84 – 1680 nM). Forsøket ble utført som beskrevet i kap 2.4.1. Det ble brukt to konsentrasjoner MeHg (2 μM og 5 μM) og 75 μl vesikkelløsning (97 μg protein). Resultatene ble plottet som opptak ved de to MeHg-konsentrasjonene som funksjon

av substratkonsentrasjon, og som $1/\text{substratkonsentrasjon (nM}^{-1})$ mot $1/\text{opptak (nmol / mg protein / min)}^{-1}$.

2.6 Studier av effekter av binære blandinger

2.6.1 Virkningen av MeHg i blanding med 5 μM A1254, HBCD eller DE-71 på glutamatopptak i vesikler

Effektsummeringsmodellen ble valgt for å undersøke om tilstedeværelsen av en lav konsentrasjon av noen av de halogenerte stoffene, der disse i seg selv ikke hadde noen betydelig effekt, allikevel kunne innvirke på effekten av MeHg. Det ble benyttet en konsentrasjon av DE-71, A1254 og HBCD på 5 μM , da de individuelle effektene ved denne konsentrasjonen var lave. Ved denne konsentrasjonen hadde DE-71 ingen effekt på glutamatopptaket, mens A1254 og HBCD hadde en signifikant, men lav hemmende effekt.

Fullstendige dose-responskurver for MeHg alene, og i kombinasjon med 5 μM av de valgte forbindelsene ble konstruert. De ulike dose-responskurvene ble statistisk sammenlignet med toveis ANOVA og Bonferroni posttest.

2.6.2 Isoeffektive blandinger; Bliss uavhengighet og Löewe additivitet

For å undersøke effekter av blandinger der alle stoffene var aktive individuelt, ble et forsøksoppsett for studier av binære blandinger, anbefalt av Altenburger et al (2000), benyttet. Oppsettet går ut på å lage en fortynningsrekke av en blanding, der blandingsforholdet mellom stoffene er konstant, for så å teste denne blandingen eksperimentelt ved flere konsentrasjonsnivåer. Konsentrasjonene av komponentene i blandingerne er basert på deres individuelle effekt, justert for potens, slik at de representerer isoeffektive konsentrasjoner. Da et fåtall av stoffene individuelt ga 50% hemming av opptaket, ble det tatt utgangspunkt i deres IC 20-verdi. For opptak av glutamat var IC 20-verdiene for MeHg 2.1 μM , for TBBPA 8 μM og for HBCD 6.9

μM . For opptak av dopamin var IC 20-verdiene for MeHg 2 μM , for A1254 10 μM og for HBCD 5.1 μM . Det ble laget fortynningsrekker fra 0.125 til 4 ganger disse konsentrasjonene (0.5 til 4 ganger for opptak av glutamat), som var utgangspunktet for de binære blandinger. De molare konsentrasjonene av komponentene i de ulike blandinger brukt i studiene på opptak av glutamat er gitt i tabell 2.2. Tilsvarende konsentrasjoner i blandinger brukt i studiene på opptak av dopamin er gitt i tabellene 2.3 til 2.5. Hver binær blanding ble testet eksperimentelt ved konsentrasjonsnivåene og blandingsforholdene oppgitt i tabellene, og dose-responskurver ble laget.

Tabell 2.2. Molare konsentrasjoner av komponentene i de ulike isoeffektive blandinger brukt i studier av glutamatopptak i vesikler. Blandinger er basert på enkeltstoffene IC₂₀-verdier (i μM), og er oppgitt fra 0.5 til 4 ganger disse konsentrasjonene. Blandingsforholdet mellom stoffene ble slik holdt konstant i et 1:1 forhold gjennom hele konsentrasjonsintervallet.

Stoffblanding	TBBPA / HBCD	meHg / TBBPA	meHg / HBCD
Blandingsforhold	1:1	1:1	1:1
Konsentrasjon i x IC ₂₀			
0.5	4 / 3.45	1.05 / 4	1.05 / 3.45
1	8 / 6.9	2.1 / 8	2.1 / 6.9
2	16 / 13.8	4.2 / 16	4.2 / 13.8
3	24 / 20.7	6.3 / 24	6.3 / 20.7
4	32 / 27.6	8.4 / 32	8.4 / 27.6

Tabell 2.3. Molare konsentrasjoner av A1254 og HBCD i de ulike isoeffektive blandinger brukt i studier av dopaminopptak i vesikler. Blandingene er basert på stoffenes individuelle IC₂₀-verdier (i µM), og er oppgitt fra 0.125 til 4 ganger disse konsentrasjonene. Stoffkombinasjonen er testet ved tre ulike blandingsforhold, 1:1, 1:2 og 2:1, i det oppgitte konsentrasjonsintervallet.

Stoffblanding	A1254 / HBCD	A1254 / HBCD	A1254 / HBCD
Blandingsforhold	1:1	1:2	2:1
Konsentrasjon i x IC ₂₀			
0.125	1.25 / 0.64	1.25 / 1.25	-
0.25	2.5 / 1.3	2.5 / 2.55	2.5 / 0.64
0.5	5 / 2.55	5 / 5.1	5 / 1.3
1	10 / 5.1	10 / 10.2	10 / 2.55
2	20 / 10.2	20 / 20.4	20 / 5.1
3	30 / 15.3	-	-
4	40 / 20.4	-	40 / 10.2

Tabell 2.4. Molare konsentrasjoner av MeHg og A1254 i de ulike isoeffektive blandinger brukt i studier av dopaminopptak i vesikler. Blandingene er basert på stoffenes individuelle IC₂₀-verdier (i µM), og er oppgitt fra 0.125 til 4 ganger disse konsentrasjonene. Stoffkombinasjonen er testet ved tre ulike blandingsforhold, 1:1, 1:2 og 2:1, i det oppgitte konsentrasjonsintervallet.

Stoffblanding	meHg / A1254	meHg / A1254	meHg / A1254
Blandingsforhold	1:1	1:2	2:1
Konsentrasjon i x IC ₂₀			
0.125	0.25 / 1.25	0.25 / 2.5	-
0.25	0.5 / 2.5	0.5 / 5	0.5 / 1.25
0.5	1 / 5	1 / 10	1 / 2.5
1	2 / 10	2 / 20	2 / 5
2	4 / 20	4 / 40	4 / 10
3	6 / 30	-	-
4	8 / 40	-	8 / 20

Tabell 2.5. Molare konsentrasjoner av MeHg og HBCD i de ulike isoeffektive blandningene brukt i studier av dopaminopptak i vesikler. Blandingene er basert på stoffenes individuelle IC_{20} -verdier (i μM), og er oppgitt fra 0.125 til 4 ganger disse konsentrasjonene. Stoffkombinasjonen er testet ved tre ulike blandingsforhold, 1:1, 1:2 og 2:1, i det oppgitte konsentrasjonsintervallet.

Stoffblanding	meHg / HBCD	meHg / HBCD	meHg / HBCD
Blandingsforhold	1:1	1:2	2:1
Konsentrasjon i x IC_{20}			
0.125	0.25 / 0.64	0.25 / 1.25	-
0.25	0.5 / 1.3	0.5 / 2.55	0.5 / 0.64
0.5	1 / 2.55	1 / 5.1	1 / 1.3
1	2 / 5.1	2 / 10.2	2 / 2.55
2	4 / 10.2	4 / 20.4	4 / 5.1
3	6 / 15.3	-	-
4	8 / 20.4	-	8 / 10.2

Karakterisering av effekter etter Löewes additivitetsmodell:

For å karakterisere blandingseffektene etter Löewes additivitetsmodell, ble data om effektene av enkeltstoffene og av blandningene brukt til å konstruere isoboldiagrammer og til å beregne interaksjonsindekser (C.I.) etter formel 2) gitt i kap. 1.5.2. Konsentrasjonene av enkeltstoffene, alene og i de ulike blandningene som ga bestemte effektnivåer, ble bestemt ved interpolering av dose-responskurvene.

Forholdet mellom IC_{20} -verdiene for stoffene alene, og i de ulike blandningene, er fremstilt i isoboldiagrammer, mens forholdet mellom konsentrasjonene ved andre effektnivåer er fremstilt som interaksjonsindekser.

Beregning av additiv effekt etter Bliss uavhengighetsmodell:

For tilsvarende å studere effekter av blandinger etter Bliss' uavhengighetsmodell, ble en teoretisk additiv dose-responskurve beregnet ut fra stoffenes individuelle effekter etter formel 3) gitt i kap 1.5.3. For hver binær blanding ble både den teoretiske- og den eksperimentelle dose-responskurven plottet i samme diagram. Kurvene ble visuelt vurdert for avvik fra den teoretiske additive linjen etter Bliss' uavhengighetsmodell.

Alle forsøk ble utført som beskrevet i kap. 2.4.1

2.7 Proteinmåling

Alle proteinmålinger ble gjort ved bruk av Pierce BCATM Protein Assay Kit. Metoden er basert på biuretreaksjonen, der proteiner reduserer Cu^{2+} til Cu^{+} i basisk miljø. To molekyler BCA (bicinchoninic acid) danner et kompleks med Cu^{+} som absorberer lys ved 562 nm. Mengden BCA-komplekser er proporsjonalt med mengden protein, og kan bestemmes spektrofotometrisk i en ELISA-leser.

10 μl av løsningene som skulle bestemmes ble pipettert ut i triplikat på et 96-brønners ELISA brett, sammen med en standard av Bovint serum albumin (BSA). Brønnene ble deretter tilsatt 200 μl BCA-reagens og inkubert ved 37°C i 30 minutter.

Proteinmengden i prøvene ble bestemt fra en standardkurve av absorbansen av prøvene med kjent konsentrasjon bovin serum albumin (BSA).

2.8 Tallbehandling og statistikk

2.8.1 Regresjon og interpolering

Alle dose-responskurver ble konstruert ved ikke-lineær regresjon ved bruk av GraphPad Prism 4.03 prøveversjon, og alle interpoleringer ble utført med samme program.

For kinetikkforsøkene ble det utført lineær regresjon med samme program.

2.8.2 Statistikk

Data ble, hvor mulig, uttrykt som gjennomsnitt \pm S.E.M.

Sammenlikninger av dose-responskurver med kontroll ble utført med enveis ANOVA med Dunnets posttest. Sammenlikninger av flere dose-responskurver ble gjort ved hjelp av toveis ANOVA med Bonferroni posttest.

3. Resultater

3.1 Pilotforsøk metodeutvikling

3.1.1 Pilotforsøk på andre isoleringsmetoder for synaptiske vesikler

a) *Isolering av vesikler fra hjerner som har vært frosset.*

Tabell 3.1 viser opptaket av dopamin, med og uten tilstedeværelse av 50 mM NaCl, i vesikler isolert fra hjerner som hadde vært frosset i forhold til vesikler isolert fra ferske hjerner. Vesiklene isolert fra frosne hjerner viser både et noe høyere opptak (27 %), samt et høyere proteininnhold enn vesikler isolert fra ferske hjerner. Det Na⁺-avhengige opptaket er derimot noe lavere enn for vesiklene isolert på vanlig måte.

Resultatet viser gjennomsnitt av ett forsøk på to hjerner utført i triplikat.

Tabell 3.1. Opptak av dopamin og proteininnhold i vesikler isolert fra hjerner som har vært frosset. Opptaket ble målt med og uten tilstedeværelse av 50 mM NaCl for å kontrollere for plasmamembranrester i de isolerte vesiklene, og er kontrollert i forhold til vesikler isolert fra ferske hjerner. Forsøket er gjort en gang på to hjerner.

	Opptak (% av kontroll)	Opptak ved tilsatt 50 mM NaCl (% av kontroll)	Proteininnhold (Mg protein/ml)
Vesikler isolert fra ferske hjerner	100	113,8	1,216
Vesikler isolert fra nedfrosne hjerner	127	105	1,315

b) *Opptak av glutamat i vesikler isolert med saponin*

Vesiklene isolert med saponin var viable. Som vist i tabell 3.2, var både opptaket av glutamat og proteininnholdet ganske likt kontrollen, med unntak av vesiklene isolert

med den høyeste saponinkonsentrasjonen som har lavest proteininnhold og et opptak 17% lavere enn kontrollen. Vesiklene isolert med 0,0001% saponin viser et opptak 15% høyere enn kontrollen, men har et noe lavere proteininnhold.

Forsøkene og proteinmålingene er utført 1-2 ganger i triplikat.

Tabell 3.2. Opptak av glutamat og proteininnhold i vesikler isolert med saponin.

[Saponin] i %	Opptak (% av kontroll)	Protein (mg/ml)
0%	100	1,16
0,00001%	102,6	1,17
0,00003%	98,8	1,14
0,0001%	115,6	1,14
0,0003%	82,9	1,12

3.2 Karakterisering av vesikkelopptak

3.2.1 Opptak av dopamin ved varierende forsøksbetingelser

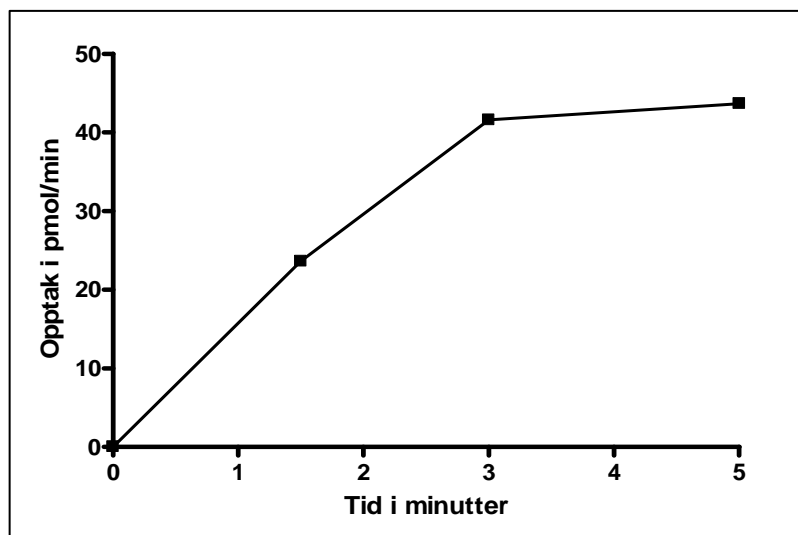
Tabell 3.3. viser opptaket av dopamin ved ulike forsøksbetingelser. Ved tilstedeværelse av 50 mM Na⁺ i inkubasjonsbufferen, økte dopaminopptaket med 13%, noe som indikerer noe forurensning av synaptosomer og andre membranrester i vesikkelløsningen. Da ingen av løsningene brukt ved opptaksforsøkene normalt inneholder noe natrium, vil det ikke foregå noe opptak til disse synaptosomene. Fonnum et al (1980) viste at det ikke foregår noe opptak til synaptosomer ved fravær av natrium.

Tabell 3.3. Opptak av dopamin i vesikler målt ved ulike forsøksbetingelser.

Behandling	Opptak av dopamin i % av kontroll
Kontroll	100 %
Med 50 mM Na ⁺	113 %
Uten Mg ²⁺	58 %
Uten ATP	39 %
Uten ATP og Mg ²⁺	37 %
Ved 4°C	9 %

3.2.2 Opptak av dopamin i vesikler som funksjon av tid

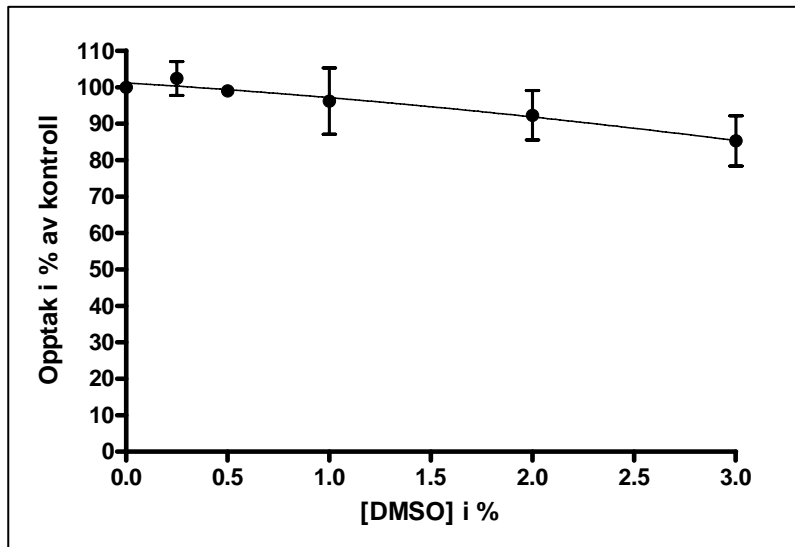
Fig. 3.1. viser opptaket av dopamin i vesikler som funksjon av tid. Opptaket økte med tiden, men flatet ut etter 5 minutter. Etter 3 minutter var opptaket fremdeles høyt, uten å være mettet, og ble derfor valgt som reaksjonstid i forsøkene. Forsøket er utført to ganger i triplikat.



Figur 3.1. Opptak av dopamin i vesikler som funksjon av tid. Prøvene er inkubert uten hemmer i henholdsvis 1.5, 3 og 5 minutter etter tilsetning av substrat. Resultatene er presentert som opptatt dopamin i pmol/mg protein.

3.2.3 Opptak av dopamin ved ulike konsentrasjoner DMSO

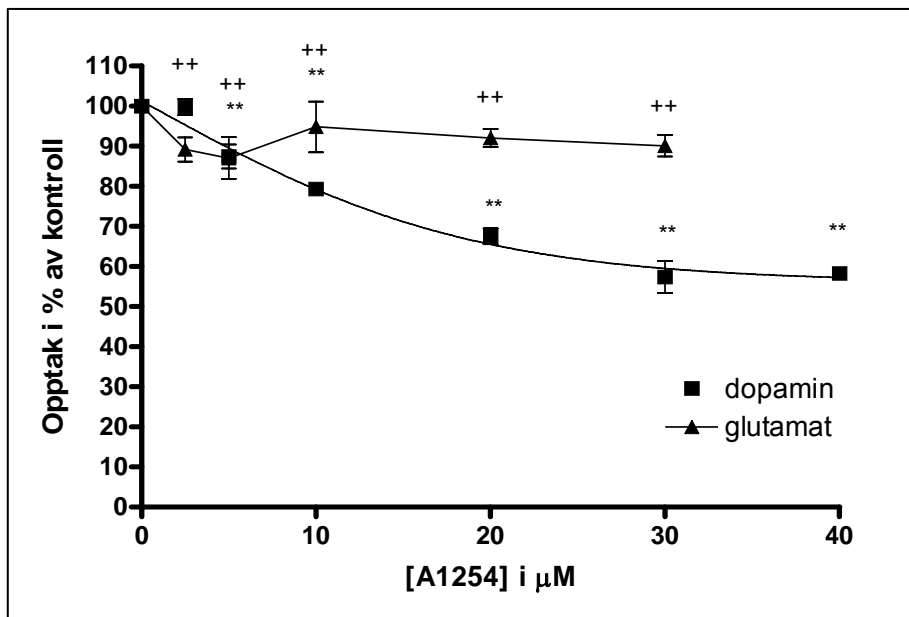
Fig. 3.2. viser opptaket av dopamin i vesikler ved ulike konsentrasjoner DMSO. Opptaket ble ikke signifikant hemmet, men synes allikevel å gå noe ned i høyere konsentrasjoner. I de påfølgende forsøkene ble det ikke benyttet DMSO i konsentrasjoner over 0,5%.



Figur 3.2. Opptak av dopamin i vesikler ved ulike konsentrasjoner DMSO. DMSO hadde ingen signifikant virkning på dopaminopptak i vesikler i forhold til ubehandlet kontroll, bestemt ved enveis ANOVA med Dunnets posttest.

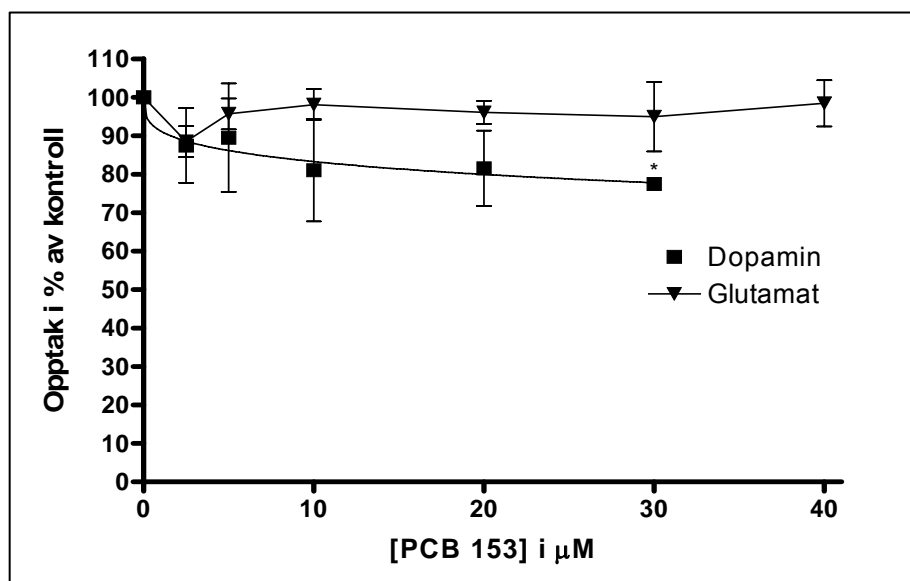
3.3 Effekter av PCB på vesikkelopptak av glutamat og dopamin

Den tekniske PCB-blandingen A1254 hadde en svak, men signifikant effekt på vesikkelopptaket av både glutamat og dopamin (fig 3.3). PCB-blandingen ga en svak effekt på glutamatopptaket og oppnådde en maksimal effekt på ~10%, mens den oppnådde ~40% hemming dopaminopptaket. For effekten på dopaminopptak ble IC_{20} - og IC_{25} -verdiene bestemt til henholdsvis $10.7 \pm 1.2 \mu\text{M}$ og $13.7 \pm 1.4 \mu\text{M}$.



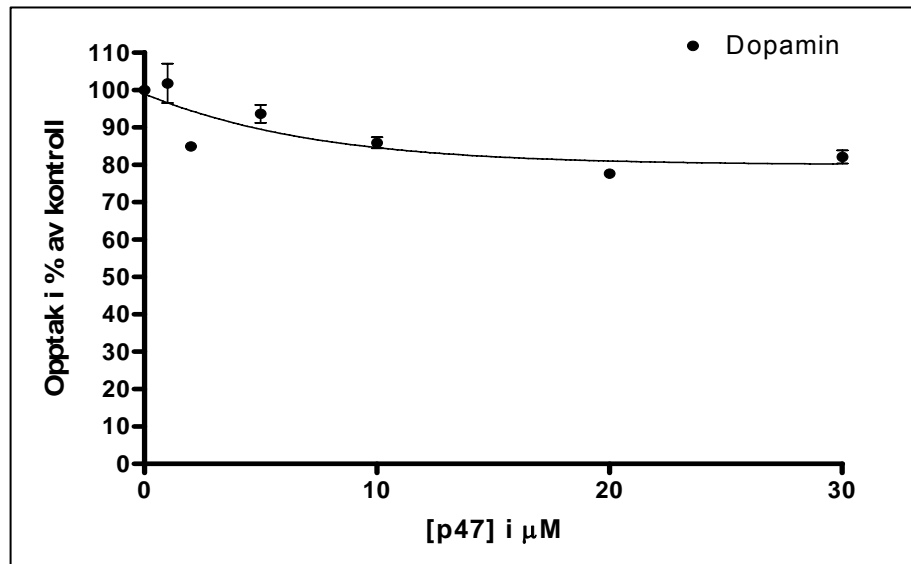
Figur 3.3. Effekten av A1254 på vesikkelopptak av glutamat og dopamin. Resultatene viser gjennomsnitt \pm S.E.M. ($3 \leq n \leq 6$). Signifikant forskjell fra ubehandlet kontroll er bestemt ved enveis ANOVA, etterfulgt av Dunnets posttest, og er angitt med + for glutamat og * for dopamin. +/* = $P < 0.05$, ++/** = $P < 0.01$.

Kongeneren PCB153 (2,2',4,4',5,5' HxCB) hadde ingen signifikant effekt på vesikkelopptaket av glutamat. Den hadde en svak hemmende effekt på dopaminopptaket, men denne er grunnet stor spredning av dataene ikke signifikant ($P < 0.05$) i konsentrasjoner under 30 μM . IC_{20} -verdien for dopaminopptaket ble bestemt til $13.6 \pm 3.7 \mu\text{M}$.



Figur 3.4. Effekten av PCB 153 på vesikkelopptak av glutamat og dopamin. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm S.E.M. ($3 \leq n \leq 6$). Signifikant forskjell fra ubehandlet kontroll er bestemt ved enveis ANOVA, etterfulgt av Dunnets posttest, og er angitt med + for glutamat og * for dopamin. +/* = $P < 0.05$, ++/** = $P < 0.01$.

Den hydroksylerte PCB-metabolitten p47 (4-OH, 2', 3, 4', 5 TCB) var på grunnlag av sin struktur mistenkt å være en dopaminantagonist. Den hadde ingen effekt på glutamatoptaket (data ikke vist), men ga en svak hemming av dopaminopptaket (Fig.3.5). Da den kun hadde en svak effekt, ble den ikke ytterligere studert.



Figur 3.5. Effekten av p47 på vesikkelopptak av dopamin. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm S.E.M. av to forsøk. Kongeneren var mistenkt på grunnlag av strukturen å være en god hemmer av dopaminopptaket, men da effekten viste seg å være lav, ble den ikke videre studert.

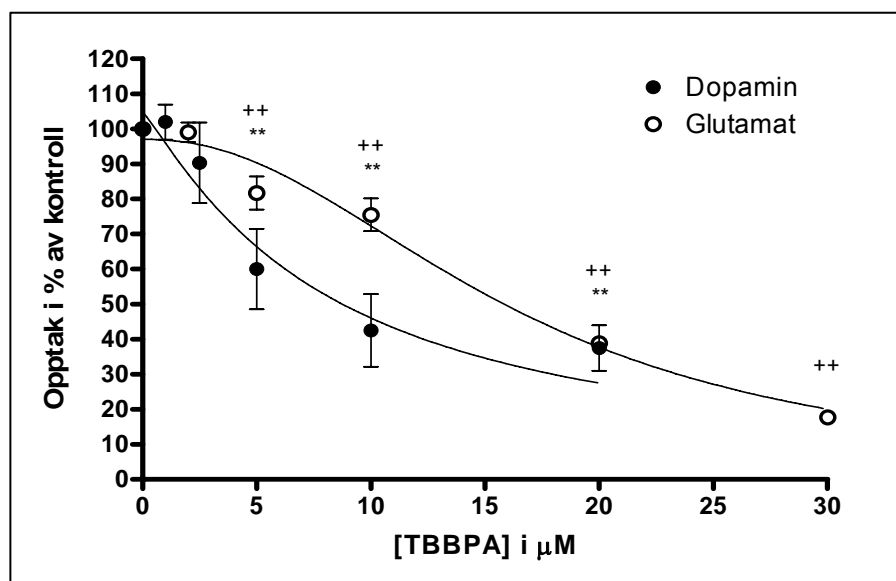
Tabell 3.4. IC_{20} og IC_{25} -verdier for opptak av dopamin i synaptiske vesikler. IC -verdier er oppgitt der disse var mulig å bestemme. Ingen av forbindelsene hadde tilstrekkelig effekt på opptak av glutamat til bestemmelse av IC -verdier. Resultatene er gjennomsnittskonsentrasjoner i $\mu\text{M} \pm$ S.E.M. ($3 \leq n \leq 6$)

Dopamin			
	A1254	PCB 153	p47
IC_{20}	10.7 ± 1.2	13.6 ± 3.7	-
IC_{25}	13.7 ± 1.3	-	-

3.4 Effekt av ulike bromerte flammehemmere på vesikkelopptak av glutamat og dopamin

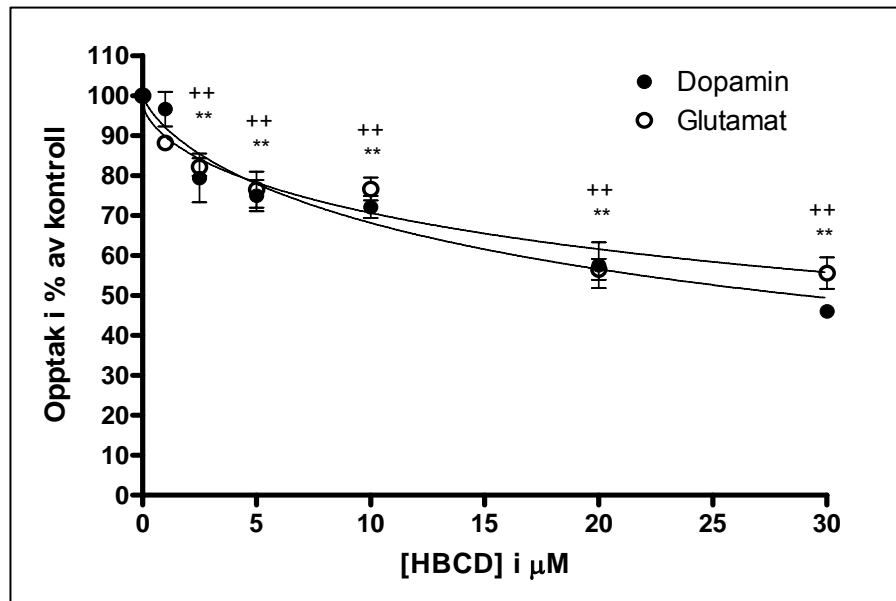
TBBPA hadde en sterk, signifikant hemmende effekt på det vesikulære opptaket av både glutamat og dopamin (Fig.3.6). For glutamatopptaket ble IC_{20} -, IC_{25} - og IC_{50} - verdiene bestemt til henholdsvis $6.5 \pm 2.3 \mu\text{M}$, $7.5 \pm 1 \mu\text{M}$ og $14.2 \pm 2.4 \mu\text{M}$.

Tilsvarende IC-verdier for dopaminopptak ble bestemt til henholdsvis $3.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$, $4.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$ og $7.8 \pm 1.5 \mu\text{M}$ (Tab. 3.5).



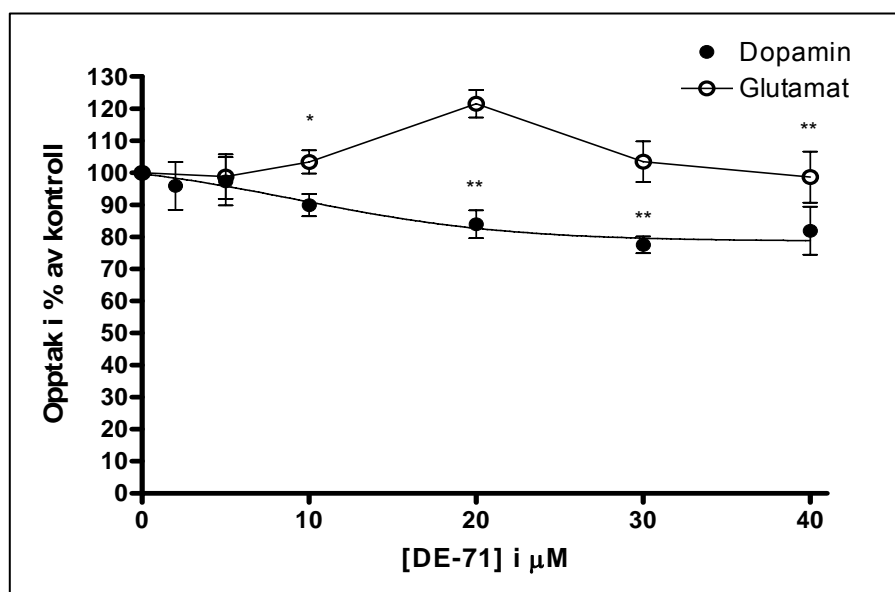
Figur 3.6. Effekter av TBBPA på vesikkelopptak av glutamat og dopamin. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm S.E.M., ($4 \leq n \leq 8$). Signifikant forskjell fra ubehandlet kontroll er bestemt ved enveis ANOVA, etterfulgt av Dunnett's posttest, og er angitt med + for glutamat og * for dopamin. +/* = $P < 0.05$, ++/** = $P < 0.01$.

HBCD hadde også en signifikant hemmende effekt på opptak av både glutamat og dopamin i vesikler (Fig. 3.7). For effekten på glutamatopptaket ble IC_{20} -, IC_{25} - og IC_{50} - verdiene bestemt til henholdsvis $6.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$, $7.5 \pm 1 \mu\text{M}$ og $14.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$. For effekten på dopaminopptak ble tilsvarende IC-verdier bestemt til henholdsvis $5.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$, $6.4 \pm 1.2 \mu\text{M}$ og $17.8 \pm 2.5 \mu\text{M}$ (Tab. 3.5).



Figur 3.7. Effekter av HBCD på det vesikkelopptak av glutamat og dopamin. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm S.E.M., ($3 \leq n \leq 8$). Signifikant forskjell fra ubehandlet kontroll er bestemt ved enveis ANOVA, etterfulgt av Dunnets posttest, og er angitt med + for glutamat og * for dopamin. +/* = $P < 0.05$, ++/** = $P < 0.01$.

Penta BDE-blandingen, DE-71, hadde ingen effekt på vesikkelopptaket av glutamat, mens den ga en svak, men signifikant hemming av opptaket av dopamin (Fig. 3.8). 20% hemming ble nådd ved en konsentrasjon på $23.2 \pm 1.9 \mu\text{M}$, og representerer den maksimale hemmingseffekten (Tab.3.5).



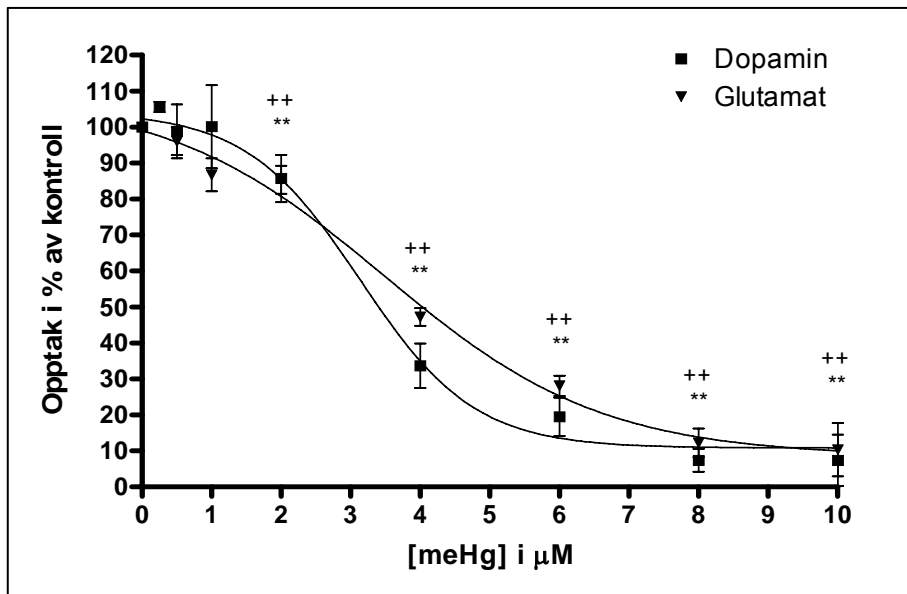
Figur 3.8. Effekten av DE-71 på det vesikulære opptaket av glutamat og dopamin. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm S.E.M., ($3 \leq n \leq 8$). Signifikant forskjell fra ubehandlet kontroll er bestemt ved enveis ANOVA, etterfulgt av Dunnets posttest, og er angitt med + for glutamat og * for dopamin. +/* = $P < 0.05$, ++/** = $P < 0.01$.

Tabell 3.5. IC-verdier for hemmingsevnen til ulike BFR på vesikkelopptak av glutamat og dopamin. Alle verdier er bestemt ved interpolering fra dose-responskurver, og er uttrykt som gjennomsnitt \pm S.E.M. i μM , ($3 \leq n \leq 8$).

Stoff Effekt	Dopamin			Glutamat		
	TBBPA	HBCD	DE-71	TBBPA	HBCD	DE-71
IC₂₀	3.6 \pm 0.3	5.2 \pm 1.1	23.2 \pm 1.9	6.5 \pm 2.3	6.1 \pm 1.1	-
IC₂₅	4.2 \pm 0.4	6.4 \pm 1.2	-	7.5 \pm 1	7.5 \pm 1	-
IC₅₀	7.8 \pm 1.5	17.8 \pm 2.5	-	14.2 \pm 2.4	14.7 \pm 0.5	-

3.5 Effekt av metylkvikksølv på vesikkelopptak av glutamat og dopamin

MeHg var en svært potent hemmer av det vesikulære opptaket av både glutamat og dopamin og hemmet, i motsetning til de studerte halogenerte forbindelsene, opptaket tilnærmet totalt (Fig.3.9). Effekten var svært lik på opptaket av både glutamat og dopamin. IC₂₀-, IC₂₅- og IC₅₀-verdiene for glutamatopptaket ble bestemt til henholdsvis 2.2 \pm 0,2 μM , 2.5 \pm 0.2 μM og 3.9 \pm 0.1 μM . Tilsvarende IC-verdier for effekten på dopaminopptaket var henholdsvis 2.1 \pm 0.1 μM , 2.3 \pm 0.1 μM og 3.3 \pm 0.2 μM (Tab. 3.6).



Figur 3.9. Effekten av MeHg på det vesikulære opptaket av glutamat og dopamin. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm S.E.M., ($3 \leq n \leq 9$). Signifikant forskjell fra ubehandlet kontroll er bestemt ved enveis ANOVA, etterfulgt av Dunnets posttest, og er angitt med + for glutamat og * for dopamin. +/* = $P < 0.05$, ++/** = $P < 0.01$.

Tabell 3.6. IC-verdier for effekter av MeHg på vesikkelopptak av glutamat og dopamin. Alle verdier er bestemt ved interpolering fra dose-responskurver, og er uttrykt som gjennomsnitt \pm S.E.M. i μM , ($3 \leq n \leq 7$).

	Dopamin	Glutamat
IC ₂₀	2,1 \pm 0,1	2,2 \pm 0,2
IC ₂₅	2,3 \pm 0,1	2,5 \pm 0,2
IC ₅₀	3,3 \pm 0,2	23,9 \pm 0,1

3.6 Kinetikkstudie av metylkvikksølvs effekt på dopaminopptak i vesikler

Fig.3.10. viser effekten av MeHg på opptak av dopamin i vesikler ved økende substratkonsentrasjon. Resultatene er plottet i et Lineweaver-Burk plot.

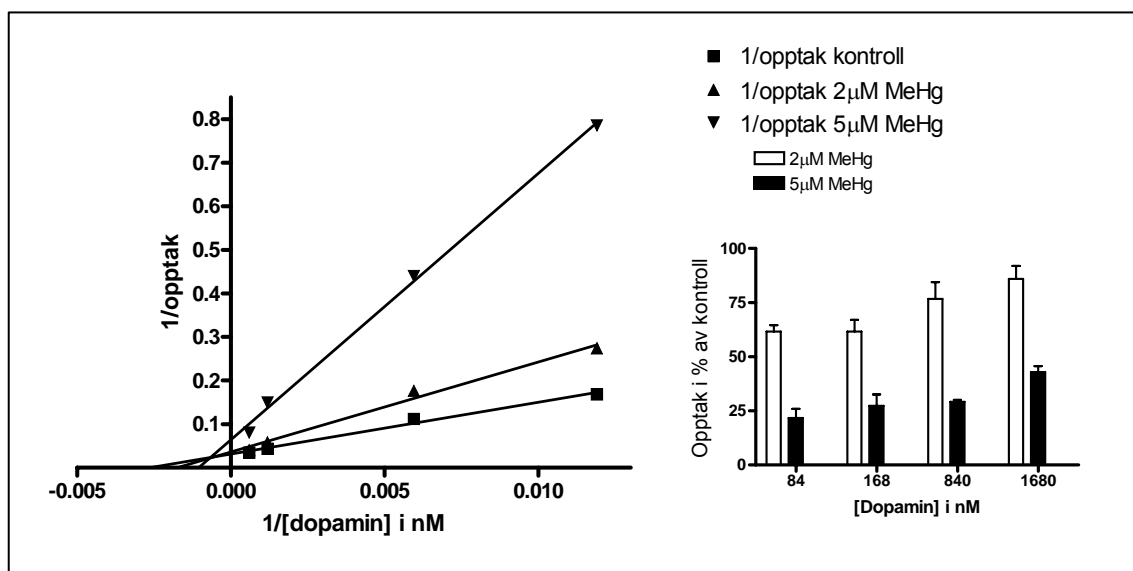
Stolpediagrammet viser i tillegg hemmingsgraden ved ulike dopaminkonsentrasjoner.

K_m for dopaminopptaket ble bestemt til 514.2 ± 53 nM og V_{MAX} til 37.3 ± 1.4

pmol/mg protein x minutt. Ved tilsetning av $2 \mu\text{M}$ MeHg var $K_m = 1057 \pm 197$ nM og

V_{MAX} 40 ± 3.55 pmol/mg protein x minutt, mens med $4 \mu\text{M}$ MeHg var $K_m = 4533 \pm$

3647 nM og $V_{MAX} = 45.3 \pm 27.9$ pmol/mg protein x minutt.

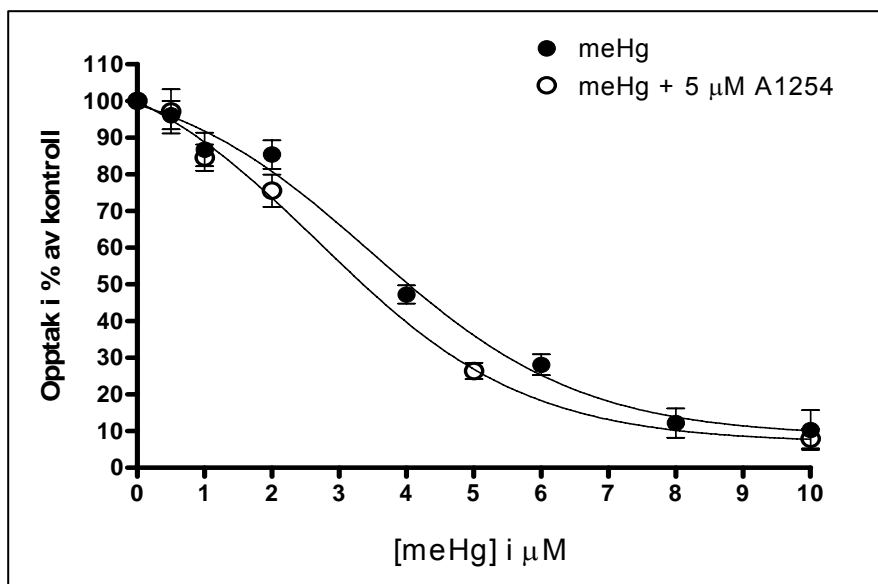


Figur 3.10. Effekter av MeHg på opptak av dopamin i synaptiske vesikler ved økende substratkonsentrasjon. Resultatene er plottet som $1/[\text{dopamin}]$ (nM^{-1}) mot $1/\text{opptak}$ ($\text{pmol} / \text{mg protein} / \text{minutt}$) $^{-1}$. Stolpediagrammet viser opptak i % av kontroll ved økende substratkonsentrasjon. K_m for dopaminopptaket ble bestemt til 514.2 ± 53 nM og V_{MAX} til 37.3 ± 1.4 pmol/mg protein x minutt. Ved tilsetning av $2 \mu\text{M}$ MeHg var $K_m = 1057 \pm 197$ nM og V_{MAX} 40 ± 3.55 pmol/mg protein x minutt, mens med $5 \mu\text{M}$ MeHg var $K_m = 4533 \pm 3647$ nM og $V_{MAX} = 45.3 \pm 27.9$ pmol/mg protein x minutt. Resultatene er gjennomsnittsverdier av tre forsøk.

3.7 Effekt av blandinger av stoffer på vesikulært opptak av glutamat

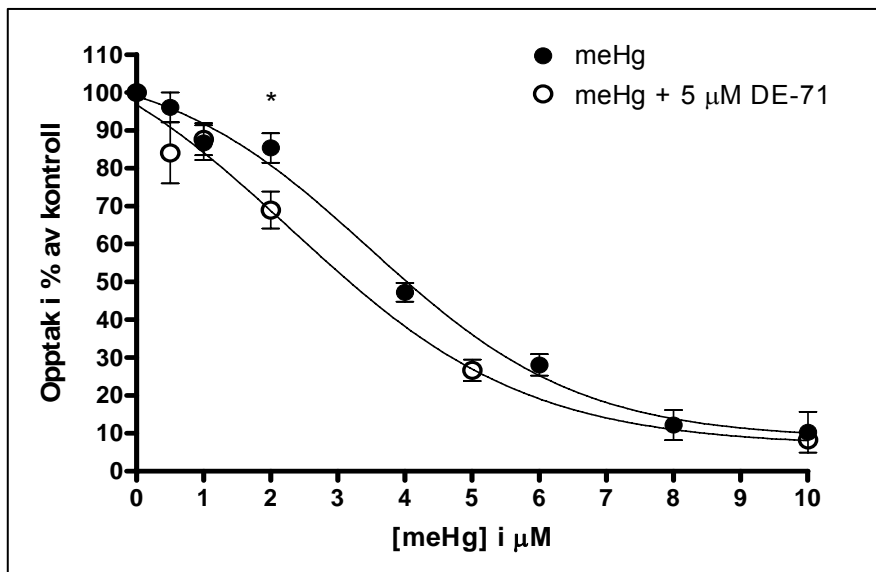
3.7.1 Virkningen av MeHg i blanding med 5 μM A1254, HBCD eller DE-71 på opptak av glutamat i vesikler.

Effekten av en blanding av MeHg med 5 μM A1254 var ikke signifikant forskjellig fra effekten av MeHg alene på opptak av glutamat i vesikler (Fig.3.11).



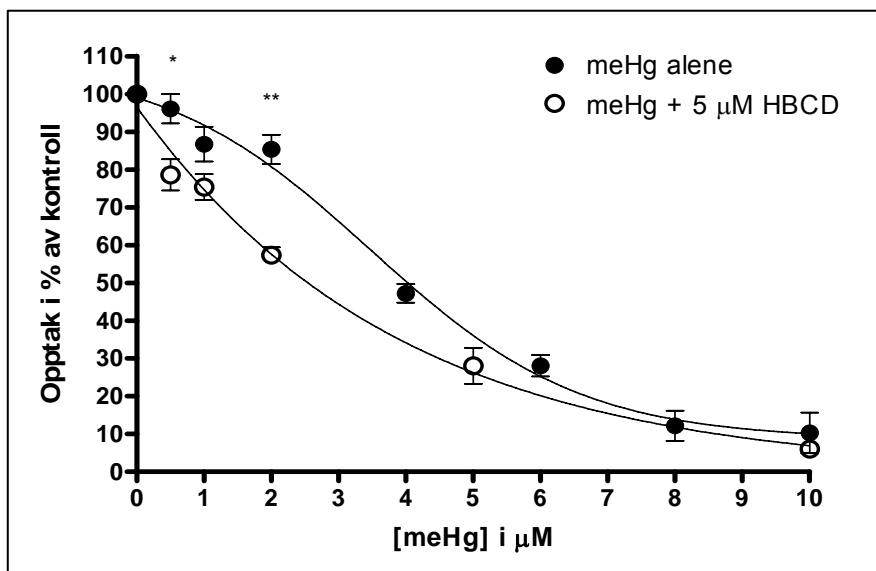
Figur 3.11. Virkningen av MeHg i blanding med 5 μM A1254 på opptak av glutamat i vesikler. Effekten av tilstedeværelse av 5 μM A1254 er ikke signifikant forskjellig fra effekten av MeHg alene (toveis ANOVA med Bonferroni posttest). Signifikans er markert med * ($P < 0.05$) og ** ($P < 0.001$). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm S.E.M. i μM ($n=4$).

Blandingen av MeHg med 5 μM DE-71 (fig.3.12), ga ved 2 μM MeHg en effekt som var signifikant forskjellig ($P < 0.05$) fra effekten av MeHg alene på glutamatopptak i vesikler.



Figur 3.12. Effekten av MeHg alene og i kombinasjon med 5 μM DE-71 på opptak av glutamat i vesikler. Effekten av tilstedeværelse av 5 μM DE-71 er ikke signifikant forskjellig fra effekten av MeHg alene (toveis ANOVA med Bonferroni posttest). Signifikans er markert med * ($P < 0.05$) og ** ($P < 0.001$). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm S.E.M. i μM ($n=4$).

MeHg i blanding med 5 μM HBCD (fig.3.13), ga ved 0.5 μM og 2 μM effekter på vesikulært glutamatopptak som var signifikant forskjellige fra effekten av MeHg alene, $P < 0.05$ og $P < 0.01$.



Figur 3.13. Effekten av MeHg alene og i kombinasjon med 5 μM HBCD på opptak av glutamat i vesikler. Effekten av tilstedeværelse av 5 μM HBCD er ikke signifikant forskjellig fra effekten av MeHg alene (toveis ANOVA med Bonferroni posttest). Signifikans er markert med * ($P < 0.05$) og ** ($P < 0.001$). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm S.E.M. i μM ($n=4$).

3.7.2 Effekter av isoeffektive blandinger på opptak av glutamat i vesikler

For studier av isoeffektive blandinger på vesikkelopptak av glutamat, ble MeHg, HBDE og TBBPA valgt ut for å testes mot hverandre. Valget hadde bakgrunn i at de alle var aktive individuelt, og i deres aktualitet som miljøgifter. Hver binær blanding ble laget som isoeffektive blandinger basert på enkeltstoffenes IC_{20} -verdi, og testet i blandingsforholdet 1:1.

Den isoeffektive blandingen av TBBPA og HBCD ga en signifikant hemming av vesikkelopptaket av glutamat ($P < 0.01$) ved alle dosenivåer (fig.3.14). Sammenlignet med den teoretiske additive effekten etter Bliss' uavhengighetsmodell, ga blandingen eksperimentelt en synergistisk effekt på opptaket gjennom hele effektområdet. Denne synergieffekten ble bekreftet av Löewes additivitetsmodell, ved alle effektnivåer (fig.3.15 og tabell 3.7).

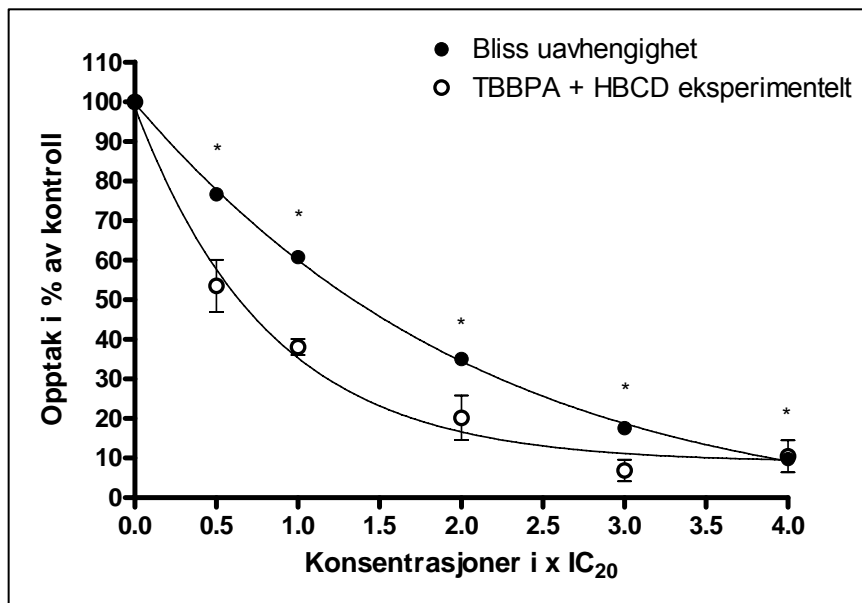
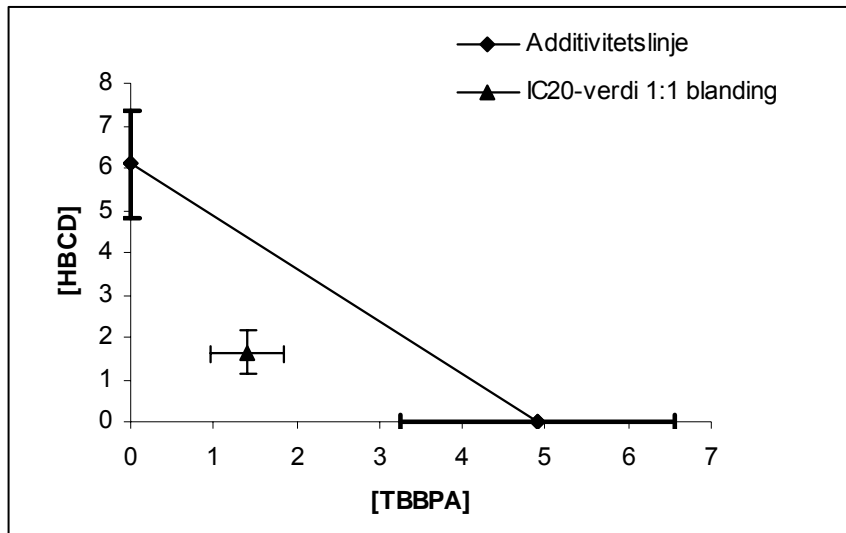


Fig. 3.14. Teoretisk og eksperimentell effekt av en isoeffektiv blanding av TBBPA og HBCD på opptaket av glutamat i vesikler. Resultatene er plottet som konsentrasjon av isoeffektiv blanding i $x IC_{20}$ -verdier, i blandingsforhold 1:1*, mot opptak som prosent av ubehandlet kontroll. Den eksperimentelle additive linjen ble beregnet fra enkeltstoffenes individuelle effekter etter formelen 3) for Bliss additivitet gitt i kap.1.5.3. De eksperimentelle verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm S.E.M. ($n=3$). Statistisk signifikans i forhold til kontroll ble bestemt med enveis ANOVA og Dunnett's posttest og er symbolisert ved * ($P < 0.01$). * Konsentrasjoner og blandingsregimet er forklart i kap. 2.6.2, tabell 2.2.



Figur 3.15. Blandingseffekt mellom TBBPA og HBCD illustrert i isoboldiagram. Aksene representerer konsentrasjoner av enkeltstoffene, og en additivitetslinje er trukket mellom deres individuelle IC_{20} -verdier. Punktet representerer konsentrasjonene av stoffene i blanding som gir 20% hemming av opptaket. Resultatene er presentert som gjennomsnittsverdier \pm S.E.M. uttrykt i μ M ($3 \leq n \leq 8$ for enkeltstoffene og $n = 4$ for blandingen).

Den isoeffektive blandingen av MeHg og TBBPA ga en signifikant hemming av vesikkelopptaket av glutamat ($P < 0.01$) ved alle dosenivåer (fig.3.16). Den eksperimentelle dose-responslinjen avvok ikke vesentlig fra den teoretiske additive effekten etter Bliss' uavhengighetsmodell. Löewes additivitetsmodell viste samme additiv effekt på opptaket. Den indikerte en tendens mot en antagonistisk effekt på opptaket i det lave effektområdet, men denne falt innenfor området av additivitetslinjen (fig 3.17 og tabell 3.7).

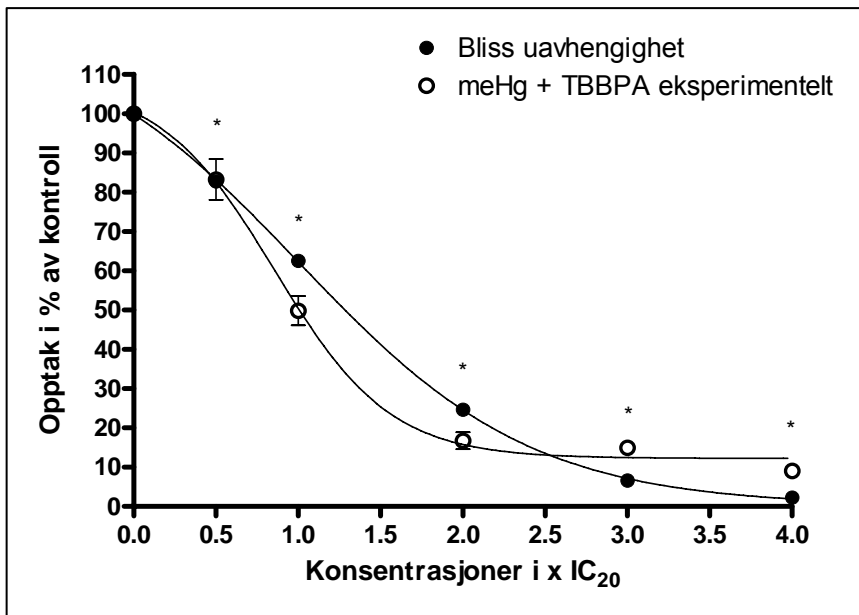
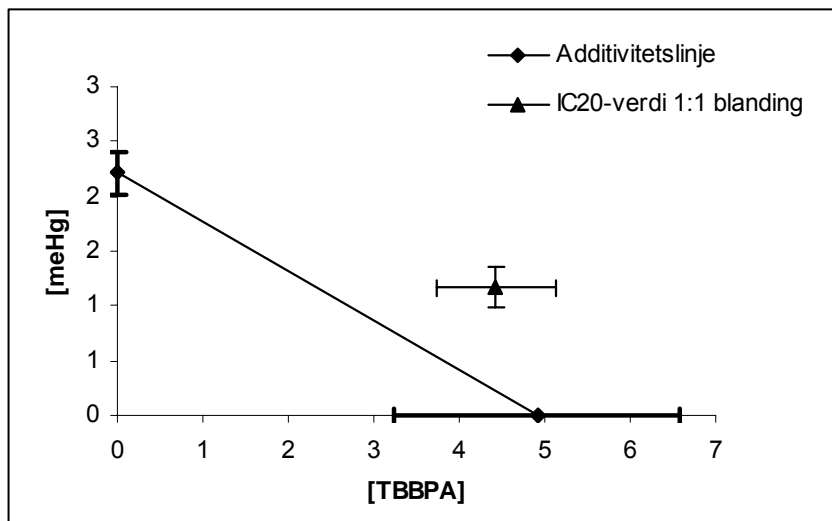


Fig.3.16. Teoretisk og eksperimentell effekt av en isoeffektiv blanding av MeHg og TBBPA på opptaket av glutamat i vesikler. Resultatene er plottet som konsentrasjon av isoeffektiv blanding i x IC₂₀-verdier, i blandingsforhold 1:1*, mot opptak som prosent av ubehandlet kontroll. Den eksperimentelle additive linjen ble beregnet fra enkeltstoffenes individuelle effekter etter formel 3) for Bliss additivitet gitt i kap.1.5.3. De eksperimentelle verdiene er presentert som gjennomsnitt ± S.E.M. (n=3). Statistisk signifikans i forhold til kontroll ble bestemt med enveis ANOVA og Dunnets posttest og er symbolisert ved * (P<0.01). ** Konsentrasjoner og blandingsregimet er forklart i kap. 2.6.2, tabell 2.2.



Figur 3.17. Blandingseffekt mellom MeHg og TBBPA illustrert i isoboldiagram. Aksene representerer konsentrasjoner av enkeltstoffene, og en additivetslinje er trukket mellom deres individuelle IC₂₀-verdier. Punktet representerer konsentrasjonene av stoffene i blanding som gir 20% hemming av opptaket. Resultatene er presentert som gjennomsnittsverdier ± S.E.M., uttrykt i μM (3 ≤ n ≤ 8 for enkeltstoffene og n = 4 for blandingen).

Den isoeffektive blandingen av MeHg og HBCD ga en signifikant hemming av vesikkelopptaket av glutamat ($P < 0.01$) ved alle dosenivåer (fig.3.18). I forhold til den teoretiske additive effekten etter Bliss' uavhengighetsmodell, viste blandingen en tendens mot synergistisk hemming av glutamatopptaket i den lavere halvdel av konsentrasjonsområdet. Den tilsvarende effekten ved høyere doser gikk mot antagonisme. I forhold til Löewes additivitetsmodell (fig. 3.19), viste denne blandingen en synergistisk interaksjon på glutamatopptaket ned til et effektnivå på ~70% hemming av opptaket, men kom til kort for å beskrive den antagonistiske effekten sett ved høyere konsentrasjoner. Dette fordi det ikke er mulig å beregne interaksjonsindekser for effektnivåer der både et av enkeltstoffene og blandingen mangler effekt.

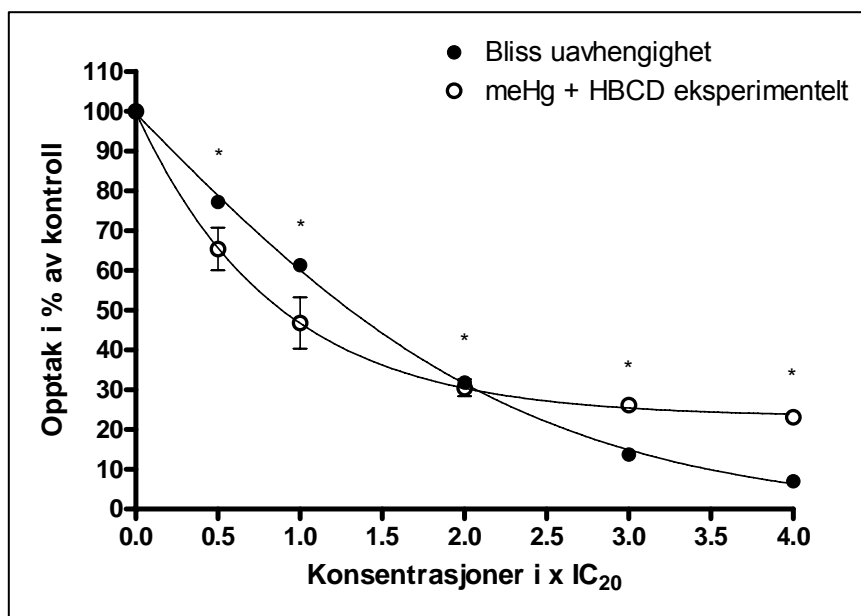
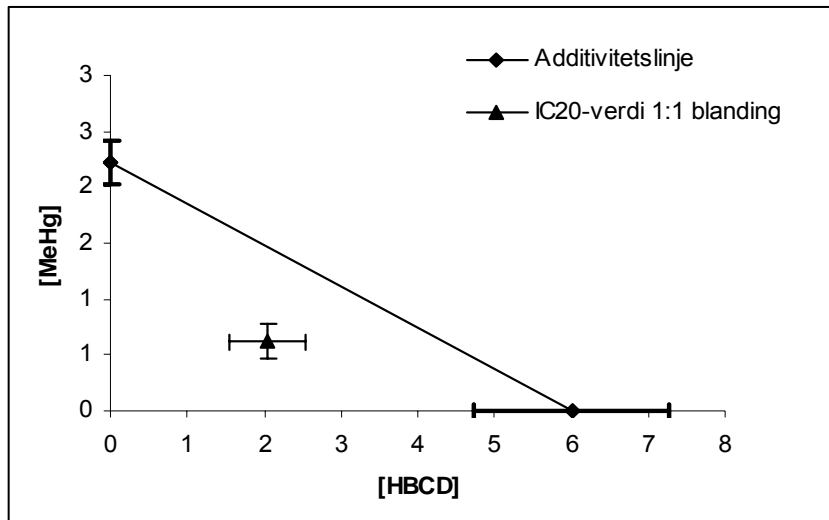


Fig.3.18. Teoretisk og eksperimentell effekt av en isoeffektiv blanding av MeHg og HBCD på opptaket av glutamat i vesikler. Resultatene er plottet som konsentrasjon av isoeffektiv blanding i x IC₂₀-verdier, i blandingsforhold 1:1*, mot opptak som prosent av ubehandlet kontroll. Den eksperimentelle additive linjen ble beregnet fra enkeltstoffenes individuelle effekter etter formel 3) for Bliss additivitet gitt i kap.1.5.3. De eksperimentelle verdiene er presentert som gjennomsnitt ± S.E.M. (n=3). Statistisk signifikans i forhold til kontroll ble bestemt med enveis ANOVA og Dunnets posttest og er symbolisert ved * ($P < 0.01$). * Konsentrasjoner og blandingsregimet er forklart i kap. 2.6.2, tabell 2.2.



Figur 3.19. Blandingseffekt mellom MeHg og HBCD illustrert i isoboldiagram. Aksene representerer konsentrasjoner av enkeltstoffene, og en additivetslinje er trukket mellom deres individuelle IC_{20} -verdier. Punktet representerer konsentrasjonene av stoffene i blanding som gir 20% hemming av opptaket. Resultatene er presentert som gjennomsnittsverdier \pm S.E.M., uttrykt i μM ($3 \leq n \leq 8$ for enkeltstoffene og $n = 4$ for blandingen).

Tabell 3.7. Interaksjonsindekser for isoeffektive blandinger mellom MeHg, HBCD og TBBPA på opptak av glutamat i vesikler. Interaksjonsindeksene ble bestemt fra formel 2) for Löewes additivetsmodell (kap.1.5.2.). Effekter ble beregnet ved ikke-lineær regresjon og interpolering fra dose-responskurver.

Effektnivå \ Blanding	Blanding		
	TBBPA + HBCD	MeHg + TBBPA	MeHg + HBCD
IC₂₀	0,57	1,43	0,62
IC₂₅	0,55	1,35	0,64
IC₄₀	0,51	1,22	0,65
IC₅₀	0,38	1,15	0,49
IC₆₀	0,39	1,06	0,57
IC₇₀	0,44	1,01	0,73
IC₈₀	0,60	1,04	-

3.8 Effekter av ulike stoffblandinger på vesikkelopptak av dopamin

3.8.1 Effekter av isoeffektive blandinger på opptak av dopamin i vesikler

For studier av effekter av isoeffektive blandinger på dopaminopptak i synaptiske vesikler, ble A1254, HBCD og MeHg valgt ut for å testes mot hverandre. De er representanter for hver sin stoffgruppe, og var alle aktive individuelt. Hver binær blanding ble laget som isoeffektive blandinger basert på enkeltstoffenes IC_{20} -verdi, og testet ved blandingsforholdene 1:1, 1:2 og 2:1 (Se kap 2.6.2, samt tabell 2.3 - 2.5).

De isoeffektive blandningene av A1254 og HBCD (fig. 3.20) ga signifikant hemming av dopaminopptaket i vesikler ($P < 0.01$). I forhold til den teoretiske additive effekten etter Bliss' uavhengighetsmodell, ga blandingen ved blandingsforholdet 1:1 en additiv effekt i de laveste konsentrasjonene. Blandingseffekten gikk så over i antagonisme ved høyere konsentrasjoner.

I forhold til Loewes additivitetsmodell viste denne kombinasjonen en svak tendens mot en synergistisk effekt på dopaminopptaket i de lavere konsentrasjonene i alle blandingsforholdene (fig 3.21). Som det fremgår av isoboldiagrammet ligger punktene som representerer blandningene svært nære additivitetslinjen.

Interaksjonsindeksene (tabell 3.8) viser også at effektene på opptaket ved alle blandingsforholdene går mot, og overstiger additivitet ved økende effektnivå. Det var ikke mulig å analysere effektene av disse blandningene etter Loewes additivitetsmodell ved effekter over 50% hemming av dopaminopptaket, da verken enkeltstoffene eller noen av blandningene oversteg dette effektnivået.

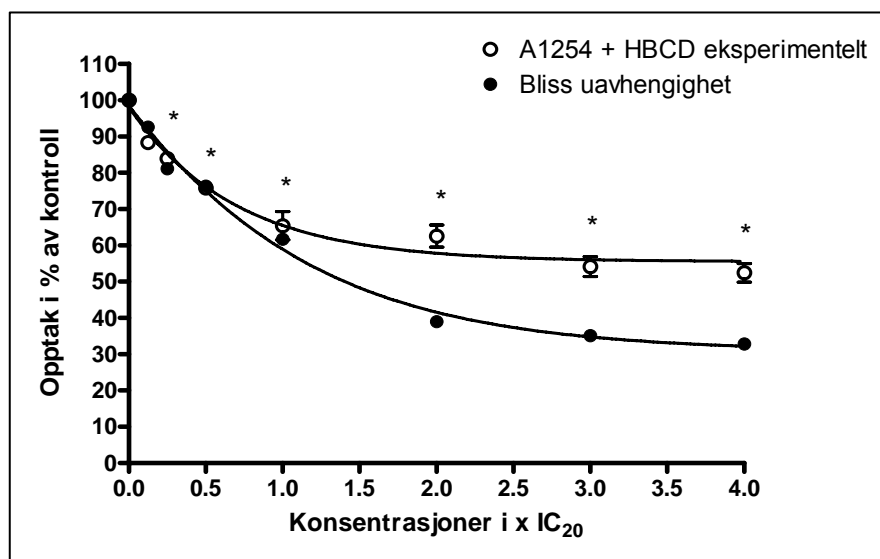
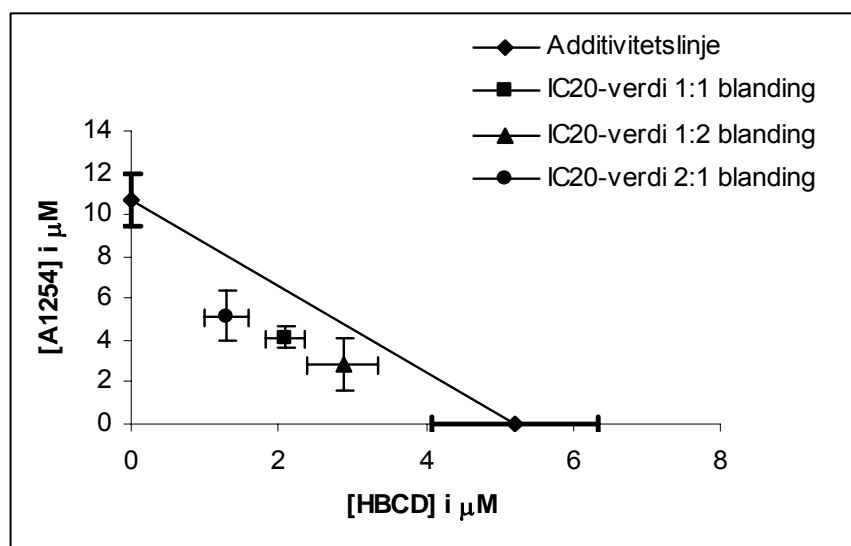


Fig. 3.20. Teoretisk og eksperimentell effekt av en isoeffektiv blanding av A1254 og HBCD på opptaket av dopamin i vesikler. Resultatene er plottet som konsentrasjon i x IC_{20} -verdier av isoeffektiv blanding, i blandingsforhold 1:1*, mot opptak som prosent av ubehandlet kontroll. Den eksperimentelle additive linjen ble beregnet fra enkeltstoffenes individuelle effekter etter formel 2) for Bliss additivitet gitt i kap.1.5.3. De eksperimentelle verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm S.E.M. ($3 \leq n \leq 5$). Statistisk signifikans i forhold til kontroll ble bestemt med enveis ANOVA og Dunnets posttest og er symbolisert ved * ($P < 0.01$). *Konsentrasjoner og blandingsregimet er forklart i kap. 2.6.2, tabell 2.3.



Figur 3.21. Blandingseffekter mellom A1254 og HBCD illustrert i isoboldiagram. Aksene representerer konsentrasjoner av enkeltstoffene, og en additivitetslinje er trukket mellom deres individuelle IC_{20} -verdier. Punktene representerer konsentrasjonene av stoffene i tre ulike blandinger som gir den samme slutteffekten. Resultatene er presentert som gjennomsnittsverdier \pm S.E.M. uttrykt i μM ($3 \leq n \leq 8$ for enkeltstoffene og $3 \leq n \leq 5$ for blandningene).

Tabell 3.8. Interaksjonsindekser for effektene av en isoeffektive blanding mellom A1254 og HBCD ved tre blandingsforhold på opptak av dopamin i vesikler. Interaksjonsindeksene ble bestemt fra formel 2) for Löewes additivitetsmodell (kap.1.5.2.). Effekter ble beregnet ved ikke-lineær regresjon og interpolering fra dose-responskurver.

Interaksjonsindekser A1254 + HBCD			
Blandingsforhold \ Effektnivå	1:1	1:2	2:1
IC ₁₀	0,5	0,5	0,64
IC ₂₀	0,79	0,816	0,73
IC ₃₀	0,88	0,98	0,78
IC ₄₀	1,0	1,2	1,1
IC ₅₀	>1	>1	>1
IC ₆₀	-	-	-
IC ₇₀	-	-	-

Den isoeffektive blandingen av MeHg og A1254 (fig. 3.22), ga en signifikant doseavhengig hemming av det vesikulære dopaminopptaket ($P < 0.01$). Sammenlignet med den teoretiske additive effekten etter Bliss' uavhengighetsmodell, ga blandingen en synergistisk interaksjon i det lave konsentrasjonsområdet. Ved konsentrasjoner over ~ 1.5 ganger IC₂₀-verdiene, viste blandingen derimot en betydelig antagonistisk interaksjon. Analysert med Löewes additivitetsmodell (fig. 3.23), viste blandingen en tilsvarende synergistisk interaksjon i det lave effektområdet ved alle blandingsforholdene som gradvis minket med økende effektnivå opp mot $\sim 50\%$ opptakshemming. A1254 ga individuelt en maksimal hemming av dopaminopptaket på $\sim 40\%$. I kombinasjon med MeHg ved blandingsforholdet 1:1 ga dette en maksimal reduksjon på $\sim 60\%$ av opptaket, mens blandingsforholdene 1:2 og 2:1 oppnådde $\sim 50\%$ hemming. Det er ikke mulig å beregne interaksjonsindekser i effektområder der både et av enkeltstoffene og blandingen mangler effekt, slik at effektene i det høyere konsentrasjonsområdet ikke var mulig å analysere med denne modellen. Det

er imidlertid klart at det foreligger en betydelig antagonistisk effekt i dette området. I de to høyeste konsentrasjonene av den isoeffektive blandingen (blandingsforhold 1:1), hvis eksperimentelle effekt er plottet i fig.3.22, foreligger MeHg i konsentrasjoner på henholdsvis 6 μM og 8 μM . Individuelt hemmer MeHg ved disse konsentrasjonene opptaket av dopamin med henholdsvis 70% og 80% (fig.3.9), slik at A1254 i dette tilfellet antagoniserer effekten av MeHg på dopaminopptaket i betydelig grad.

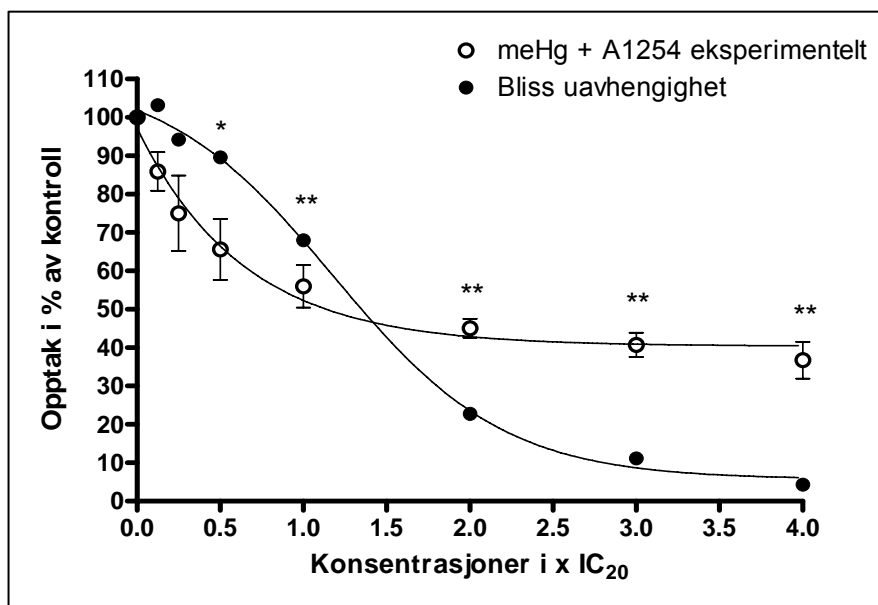
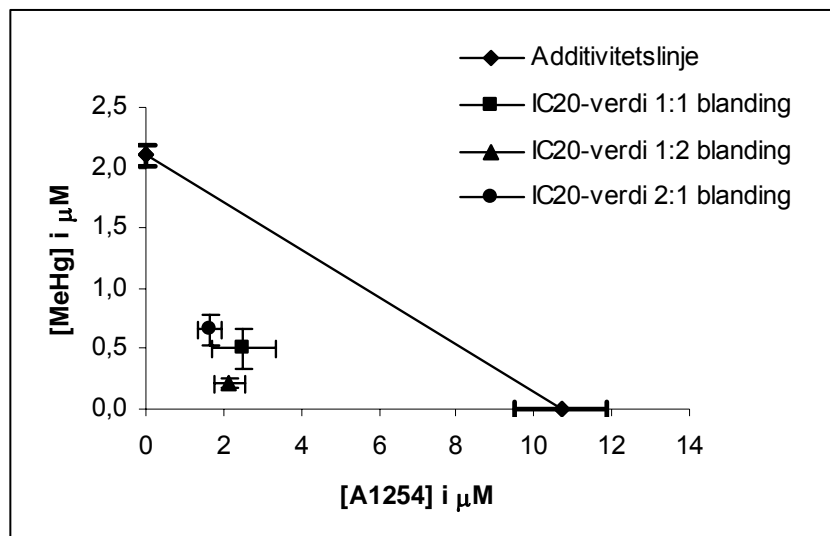


Fig.3.22. Teoretisk og eksperimentell effekt av en isoeffektiv blanding av MeHg og A1254 på opptaket av dopamin i vesikler. Resultatene er plottet som konsentrasjon i x IC₂₀-verdier av isoeffektiv blanding, i blandingsforhold 1:1*, mot opptak som prosent av ubehandlet kontroll. Den eksperimentelle additive linjen ble beregnet fra enkeltstoffenes individuelle effekter etter formel 3) for Bliss additivitet gitt i kap.1.5.3. De eksperimentelle verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm S.E.M. ($3 \leq n \leq 5$). Statistisk signifikans i forhold til kontroll ble bestemt med enveis ANOVA og Dunnets posttest og er symbolisert ved * ($P < 0.01$). *Konsentrasjoner og blandingsregimet er forklart i kap.2.6.2, tabell 2.4.



Figur 3.23. Blandingseffekter mellom MeHg og A1254 illustrert i isoboldiagram. Aksene representerer konsentrasjoner av enkeltstoffene, og en additivitetslinje er trukket mellom deres individuelle IC_{20} -verdier. Punktene representerer konsentrasjonene av stoffene i tre ulike blandinger som ga 20% hemming av opptaket. Resultatene er presentert som gjennomsnittsverdier \pm S.E.M. uttrykt i μ M, ($3 \leq n \leq 8$ for enkeltstoffene og $3 \leq n \leq 5$ for blandningene).

Tabell 3.9. Interaksjonsindekser for effektene av en isoeffektive blanding mellom MeHg og A1254 ved tre blandingsforhold på opptak av dopamin i vesikler. Interaksjonsindeksene ble bestemt fra formel 2) for Löewes additivitetsmodell (kap.1.5.2). Effekter ble beregnet ved ikke-lineær regresjon og interpolering fra dose-responskurver.

Interaksjonsindekser MeHg + A1254			
Blandingsforhold	1:1	1:2	2:1
Effektnivå			
IC₁₀	0,441	0,286	0,313
IC₂₀	0,476	0,302	0,467
IC₃₀	0,522	0,317	0,535
IC₄₀	0,633	0,368	0,729
IC₅₀	0,688	1,1	0,91
IC₆₀	1,09	>1	>1
IC₇₀	>1	>1	>1
IC₈₀	>1	>1	>1

Den isoeffektive blandingen av MeHg og HBCD (fig. 3.24), ga en signifikant hemming av vesikkelopptaket av dopamin ($P < 0.01$). I forhold til den teoretiske additive effekten etter Bliss' uavhengighetsmodell, ga også denne blandingen en synergistisk hemmingseffekt på dopaminopptaket ved de laveste konsentrasjonene, som så gikk over i en antagonistisk interaksjon ved konsentrasjoner fra $\sim 1.5 \times IC_{20}$ -verdiene. Löewes additivitetsmodell bekreftet denne synergieffekten i det lavere effektnivået ved alle blandingsforholdene (fig.3.25 og tab.3.10). Det var også tilfellet med denne blandingen at HBCD verken individuelt, eller i de ulike blandingsforholdene med MeHg, hemmet det vesikulære dopaminopptaket mer enn $\sim 50\%$. Det var derfor heller ikke mulig å beregne interaksjonsindekser for effektene av disse blandingene i det høyere konsentrasjonsområdet. Konsentrasjonene av MeHg i disse blandingene er de samme som i tilfellet med blandingene av MeHg og A1254 beskrevet ovenfor, slik at det også her er snakk om en betydelig antagonistisk interaksjon mellom MeHg og HBCD i det høyere effektområdet.

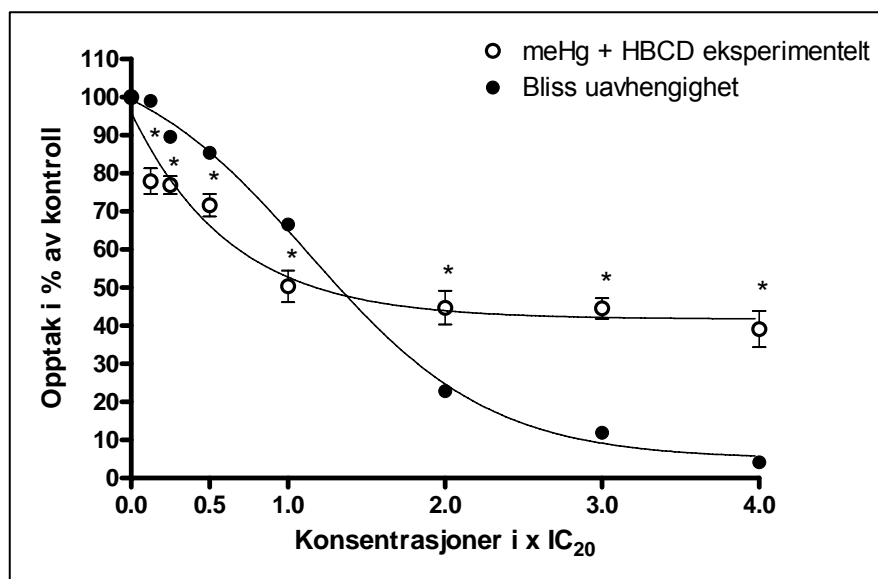
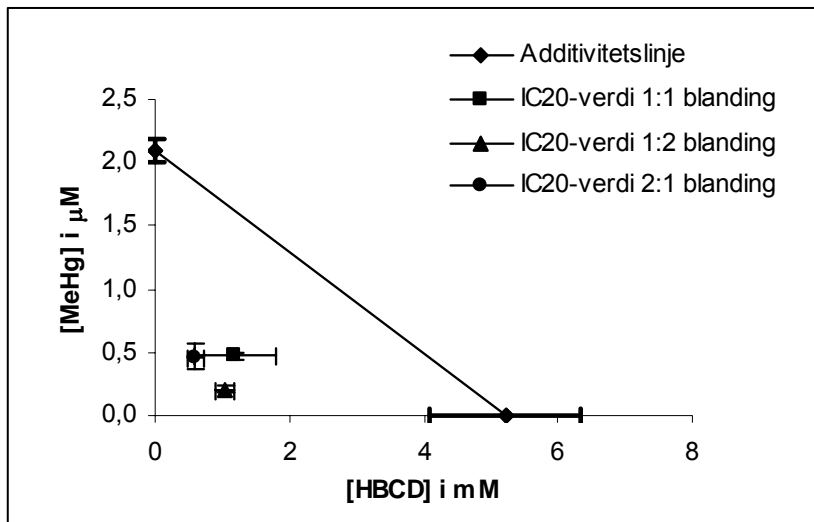


Fig.3.24. Teoretisk og eksperimentell effekt av en isoeffektiv blanding av MeHg og HBCD på opptaket av dopamin i vesikler. Resultatene er plottet som konsentrasjon i x IC_{20} -verdier av isoeffektiv blanding, i blandingsforhold 1:1*, mot opptak som prosent av ubehandlet kontroll. Den eksperimentelle additive linjen ble beregnet fra enkeltstoffenes individuelle effekter etter formel 3) for Bliss additivitet gitt i kap.1.5.3. De eksperimentelle verdiene er presentert som gjennomsnitt \pm S.E.M. ($3 \leq n \leq 5$). Statistisk signifikans i forhold til kontroll ble bestemt med enveis ANOVA og Dunnett's posttest og er symbolisert ved * ($P < 0.01$). *Konsentrasjoner og blandingsregimet er forklart i kap. 2.6.2, tabell 2.5.



Figur 3.25. Blandingseffekter mellom MeHg og HBCD illustrert i isoboldiagram. Aksene representerer konsentrasjoner av enkeltstoffene, og en additivitetslinje er trukket mellom deres individuelle IC_{20} -verdier. Punktene representerer konsentrasjonene av stoffene i tre ulike blandinger som ga 20% hemming av opptaket. Resultatene er presentert som gjennomsnittsverdier \pm S.E.M. uttrykt i μ M ($3 \leq n \leq 8$ for enkeltstoffene og $3 \leq n \leq 5$ for blandningene).

Tabell 3.10. Interaksjonsindekser for effektene av en isoeffektive blanding mellom MeHg og HBCD ved tre blandingsforhold på opptak av dopamin i vesikler. Interaksjonsindeksene ble bestemt fra formel 2) for Löewes additivitetsmodell (kap. 1.5.2). Effekter ble beregnet ved ikke-lineær regresjon og interpolering fra dose-responskurver.

Interaksjonsindekser MeHg + HBCD			
Blandingsforhold	1:1	1:2	2:1
Effektnivå			
IC₁₀	0,232	0,275	0,336
IC₂₀	0,452	0,3	0,338
IC₃₀	0,536	0,315	0,342
IC₄₀	0,772	0,374	0,374
IC₅₀	1,03	0,435	0,432
IC₆₀	>1	>1	>1
IC₇₀	>1	>1	>1
IC₈₀	>1	>1	>1

4. Diskusjon

4.1 Vurdering av metoden

Tradisjonelt blir vesikler framstilt ved hypotont sjokk av synaptosomer (avsnørte nerveterminaler). Deretter isoleres vesiklene enten ved sentrifugering i en tetthetsgradient av sukrose, eller ved differensialsentrifugering. I denne studien er differensialsentrifugering benyttet fordi det er en noe enklere metode og fordi den gir mer reproducerbare resultater. Det er imidlertid klart at den også gir en større grad av forurensninger av andre partikler. Det har gitt seg utslag i at vesikkelløsningen har et noe høyere proteininnhold og en noe lavere spesifikk aktivitet av opptaket enn rapportert i studier som har benyttet gradientsentrifugering. Det er tilfellet av samtlige studier av vesikler på avd. for biokjemi, der isoleringsmetoden med differensialsentrifugering er benyttet, har hatt en lavere basalaktivitet i vesiklene enn sett i tilsvarende forsøk utført på ved Forsvarets forskningsinstitutt (FFI), der gradientsentrifugering er brukt (pers. komm. Fonnum, Bogen og Huse).

Gjennomsnittlig proteininnhold i vesikkelfraksjonen i vår studie har vært ~1,2 mg/ml, mens den i de nevnte studiene der gradientsentrifugering er brukt, er rapportert å være ~0,5 mg/ml. Isolering ved differensialsentrifugering øker risikoen for at det foreligger forurensninger som mikrosomer og myelinfragmenter i vesikkelløsningen. Disse urenheterne vil kunne ta opp neurotransmittere og binde opp lipofile forbindelser som PCB og BFR, og slik innvirke på resultatene av opptaksforsøkene (Mariussen et al., 1999).

Imidlertid viser forsøkene beskrevet i kap. 3.2.1. at vesikkelopptaket ble betydelig redusert i fravær av Mg^{2+} og/eller ATP, og at tilsetning av 50 mM NaCl ikke ga kraftig stimulans av opptaket, som ville vært tilfellet ved tilstedeværelse av synaptosomer. Alle opptaksforsøkene er gjort i fravær av NaCl, slik at synaptosomopptaket allikevel ville ha vært ubetydelig (Fykse and Fonnum, 1988).

4.2 Pilotforsøk på alternative metoder for isolering av vesikler

Isolering av synaptiske vesikler fra hjerne er en forholdsvis enkel, men dog noe tidkrevende prosess. Ulempen er at den krever bruk av mange rotter, da utbyttet er antatt å være lavt (~4,5 mg protein pr rotte i mine forsøk). Dette er lite ønskelig av etiske og økonomiske grunner. Jeg har i denne studien sett på to muligheter for å økonomisere denne prosessen:

- 1) Isolering av vesikler fra hjerner som har vært nedfrosset.
- 2) Øke utbyttet ved å tilsette en lav konsentrasjon av detergenten saponin til å gi hypotont sjokk, for å øke andelen synaptosomer som lyserer, og dermed øke mengden vesikler som frigis.

Tanken bak isolering av vesikler fra nedfrosne hjerner var at man kunne utnytte hjerner fra dyr som brukes til andre formål for å effektivisere bruk av dyr og penger.

Vesiklene isolert fra hjerner som hadde vært nedfrosset var viable, og viste seg å både ha et høyere proteininnhold, og et høyere opptak av dopamin sammenlignet med vesikler isolert fra ferske hjerner (tabell 3.1). Det økte proteininnholdet var ikke forårsaket av økte mengder synaptosom- eller andre membranrester, da det Na^+ -avhengige opptaket ikke var høyere enn kontrollen. Det er imidlertid mulig at både det økte opptaket og det økte proteininnholdet skyldtes at denne isoleringsoperasjonen gikk raskere enn normalt. Normalt ble vesikler isolert fra 16 rotter samtidig, noe som medfører at hver prøve får en viss ventetid mellom hver operasjon. Isoleringen av vesikler fra hjernene som hadde vært nedfrosset ble utført på kun to hjerner, slik at hver prosess gikk langt raskere og proteaser fikk i dette tilfellet mindre tid til å bryte ned proteiner. En annen forklaring på det noe bedre utbyttet er at det under fryseprosessen dannes iskrystaller som kan knuse hjernevevet, og at dette kan føre til at flere vesikler frigis ved isoleringen. Metoden ble ikke forsøkt videre utviklet av mangel på tid, men pilotforsøket viste at prosessen er mulig.

Vesiklene isolert ved hjelp av saponin var også viable, og hadde et opptak av glutamat likt kontrollen (tabell 3.2). Unntaket var prøven isolert med 0.0001% saponin som viste et noe høyere opptak enn kontrollen. Dette korrelerte dårlig med proteininnholdet, og kan skyldes tilfeldig variasjon. Betingelsen satt for å utvikle denne metoden videre var en betydelig økning i opptaket opp mot 50%, men da forskjellen var minimal, ble dette ikke fulgt opp videre.

4.3 Effekter av enkeltstoffer på vesikkelopptak av glutamat og dopamin

4.3.1 Effekter av PCB og ulike BFR på vesikkelopptak av glutamat og dopamin

Effekten av den tekniske PCB-blandingen A1254, enkeltkongeneren PCB 153, forskjellige tekniske blandinger av de bromerte flammehemmerne TBBPA, HBCD og DE-71 ble testet på opptak av glutamat og dopamin i synaptiske vesikler isolert fra rottehjerne. I tillegg ble den hydroksylerte PCB-metabolitten p47, testet på dopaminopptak, da det var grunn til å tro at den ville ha effekt. Dette på bakgrunn av at TBBPA også innehar hydroksylgrupper, og er en potent hemmer av både glutamat- og dopaminopptak som vist i denne studien

Generelt hadde de ulike PCB-forbindelsene liten eller ingen effekt på opptak av glutamat i vesikler, mens effekten på opptak av dopamin var noe bedre.

Tilsvarende som for PCB-forbindelsene, ga alle de testede BFR en sterkere effekt på opptak av dopamin enn av glutamat. TBBPA og HBCD var like gode hemmere av glutamatopptaket, mens TBBPA var en mer potent hemmer av dopaminopptak enn HBCD. DE-71 viste ingen effekt på opptak av glutamat, men ga en svak, men signifikant hemming av dopaminopptaket. Med unntak av A1254 og p47 er effekten av alle disse forbindelsene på dopaminopptak i vesikler testet tidligere (Mariussen et al., 2001; Mariussen and Fonnum, 2003; Mariussen et al., 1999). I disse studiene er imidlertid en annen metode for isolering av vesikler benyttet.

Effektene sett på vesikulært dopaminopptak av PCB-kongeneren PCB 153 og de bromerte flammehemmerne i vår studie, var lavere enn effektene rapportert i disse studiene. I Mariussen et al. (1999), ble IC_{50} -verdien for PCB 153 bestemt til $14 \pm 4 \mu\text{M}$, mens denne kongeneren i vår studie nådde en maksimal effekt på $\sim 20\%$ hemming av opptaket ved en konsentrasjon på $13.6 \pm 3.7 \mu\text{M}$. TBBPA og HBCD ble i Mariussen et al (2003) rapportert å være like effektive hemmere av det vesikulære dopaminopptaket, med IC_{50} -verdier på $3 \pm 1 \mu\text{M}$, mens DE-71 var noe mindre potent med en IC_{50} -verdi på $8 \pm 4 \mu\text{M}$. Tilsvarende IC_{50} -verdier i vår studie er henholdsvis 7.8 ± 1.5 og 17.8 ± 2.5 for TBBPA og HBCD. DE-71 var i vår studie en dårlig hemmer av vesikulært dopaminopptak, og oppnådde en maksimal effekt på $\sim 20\%$ hemming av opptaket ved en konsentrasjon på $23 \pm 1.9 \mu\text{M}$. Typisk for dette studiet og studiene til Mariussen og Fonnum var at de studerte PCB- og BFR kongenerene ikke alltid ga en total hemming av transmitteropptaket. Årsakene til dette er ikke avdekket.

Vesiklene i studiene av Mariussen og Fonnum ble isolert ved gradientsentrifugering. I denne studien ble det benyttet differensialsentrifugering, i tillegg til et noe større volum vesikkelløsning for å korrigere for et lavt glutamatopptak. Dette har resultert i at proteinkonsentrasjonen brukt i våre forsøk har vært $\sim 0,3 \text{ mg/ml}$, mens den i Mariussen og Fonnums studier er oppgitt å være $\sim 0,1 \text{ mg/ml}$. I Mariussen et al. (1999) ble det vist at hemmingsgraden oppnådd av ulike PCB-kongenerer var svært avhengig av proteinkonsentrasjonen i prøvene. Stoffene som er testet er svært lipofile. Økt protein- og lipidinnhold vil kunne binde opp teststoffer slik at en mindre andel av disse vil nå målorganene. Det var derfor ikke uventet at det her ble observert en lavere hemmingsgrad av PCB 153, TBBPA og HBCD på vesikulært dopaminopptak enn tidligere rapportert av Mariussen (1999; 2001; 2003). Dette betyr imidlertid ikke at vesiklene isolert ved metoden beskrevet her utgjør en dårligere modell, da vesikler *in vivo*, ikke vil være uten påvirkning fra andre partikler.

4.3.2 Effekter av MeHg på vesikkelopptak av glutamat og dopamin

Vår studie viste at MeHg er en meget potent hemmer av opptak av både glutamat og dopamin i vesikler. MeHg hadde en lik, konsentrasjonsavhengig effekt på opptaket av begge transmittorene (fig. 3.9). Hemmingen av opptaket var signifikant i konsentrasjoner fra 2 μM , og var hemmet tilnærmet totalt ved 10 μM (tabell 3.6.).

Litteratursøk (Pubmed og ISI web of science) ga kun ett treff på effekter av MeHg på vesikler. Denne studien omhandler effekter av MeHg på vesikulært glutamatopptak, og fant at MeHg ga en doseavhengig hemming av det vesikulære glutamatopptaket (Porciuncula et al., 2003). Effekten av MeHg på glutamatopptak i vår studie stemmer godt overens med effekten rapportert i denne studien. Porciuncula et al. (2003) rapporterer videre at MeHg ga en doseavhengig effekt på H^+ -gradienten over vesikkelmembranen som korrelerte godt med hemmingen av glutamatopptaket. Denne hemmingen ble fullstendig motvirket ved tilsetning av 1 mM redusert glutathion, og dette indikerer at MeHg hemmer opptaket av glutamat gjennom en interaksjon med SH-grupper på V-ATPasen. En hemming av V-ATPase-aktiviteten vil gi en reduksjon av H^+ -gradienten over vesikkelmembranen, og dermed hemme drivkraften for transmitteropptaket. Da V-ATPasene i glutamaterge- og i dopaminerge vesikler er identiske, er det nærliggende å tro at MeHg's hemming av dopaminopptak også skyldes en effekt på V-ATPasen. Da MeHg i våre studier ga tilnærmet identisk effekt på vesikkelopptaket av både glutamat og dopamin, indikerer det at mekanismen for denne effekten er lik for de to transmitterne.

Det ble videre gjort forsøk for å belyse kinetikken for MeHgs effekt på dopaminopptak i vesikler ved å måle opptaket ved varierende substratkonsentrasjoner og med to konsentrasjoner MeHg og resultatene er presentert i kap.3.6.

Resultatene viste at MeHg hemmet vesikkelopptak av dopamin gjennom en kompetitiv/ikke-kompetitiv (Mixed competitive) mekanisme og hovedsakelig påvirket K_m for opptaket. Hemmingsgraden ved begge MeHg konsentrasjonene ble redusert ved økt dopaminkonsentrasjon. Dette er mest uttalt for prøvene med 2 μM

MeHg, mens hemmingsgraden i prøvene med 5 μM MeHg først ble redusert ved den høyeste dopaminkonsentrasjonen. Det kan bety at MeHg har en mer kompleks effekt på vesiklene, og hemmer vesikkelopptaket både gjennom en effekt på V-ATPasen, og på det aktive setet på VMAT-2.

Videre forsøk for å belyse mekanismen for effekten av MeHg på dopaminopptak i vesikler er nødvendig. Mulige forsøk kan være en sammenlikning av effekten av MeHg med virkningen av den spesifikke V-ATPasehemmeren, bafilomycin A₁, måling av effekter på spennings- og H⁺-gradienten, samt virkningen av glutathion.

4.4 Effekter av blandinger på vesikkelopptak av glutamat og dopamin i vesikler

4.4.1 Virkningen av MeHg i blanding med 5 μM A1254, HBCD eller DE-71 på vesikkelopptak av glutamat

I disse forsøkene er dose responslinjene for effekten av MeHg i blanding med 5 μM A1254, HBCD eller DE-71 på vesikulært glutamatopptak, sammenlignet med dose responslinjen for MeHg's individuelle effekt. Formålet var å undersøke om addisjon av en konsentrasjon av de halogenerte stoffene som individuelt hadde liten eller ingen effekt, likevel kunne innvirke på effekten av MeHg på glutamatopptaket. Da de valgte forbindelsene ved en konsentrasjon på 5 μM hadde liten eller ingen effekt, var det forventede utfallet at effektene av blandningene skulle falle overens med effekten av MeHg alene.

Resultatene viste at effektene ved enkelte lave doser MeHg i blanding med de bromerte flammehemmerne HBCD og DE-71 hemmet vesikkelopptaket av glutamat signifikant sterkere enn MeHg gjorde alene. HBCD var den individuelt mest potente forbindelsen som ble testet i dette oppsettet, og hadde en IC₂₀-verdi på $6.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$. Det er derfor ikke overraskende at denne ga den sterkeste blandingseffekten med

MeHg. Denne stoffblandingen hadde også synergistisk effekt ved lave konsentrasjoner i forsøksoppsettet med isoeffektive blandinger.

DE-71 hadde derimot ingen effekt individuelt i konsentrasjoner opp til 40 μM , men potenserte allikevel effekten av en lav konsentrasjon MeHg. Dette indikerer at DE-71 har evnen til å gi en synergistisk interaksjon med lave konsentrasjoner MeHg på vesikkelopptak av glutamat. Den forsterkede effekten sett på av MeHg i blanding med HBCD kan skyldes at disse forbindelsene hemmer glutamatopptaket gjennom flere mekanismer. Dette er en vanlig bakenforliggende mekanisme ved additive og synergistiske interaksjoner (DVFA, 2003). Effekten av MeHg i blanding med DE-71 er imidlertid ikke mulig å forklare ut fra denne mekanismen, da DE-71 ikke hadde noen effekt på glutamatopptaket individuelt. En mulig mekanisme kan være at lipofile forbindelser som DE-71-blandingen kan interferere med vesikkelmembranen og endre membranfluiditeten, slik at effekten av MeHg øker.

4.4.2 Effekter av isoeffektive blandinger av PCB, BFR og MeHg på vesikkelopptak av glutamat og dopamin

Denne studien hadde som formål å undersøke effekter av binære blandinger mellom stoffer som alle er aktive hemmere av glutamat- og dopaminopptak i vesikler. Blandingene ble testet over et større effektområde og effektene analysert i henhold de to ledende modellene for interaksjonseffekter; Bliss' uavhengighetsmodell, og Loewes additivitetsmodell. MeHg, TBBPA og HBCD ble valgt til studiene av effekter på glutamatopptak, mens blandinger av MeHg, A1254 og HBCD ble valgt til studiene på dopaminopptak. Alle de isoeffektive blandningene ga signifikant hemming av transmitteropptaket i vesikler. Blandingseffektene karakter varierte en del med effektnivå, noe som er en vanlig egenskap for denne typen blandinger (Berenbaum, 1989; Köneman and Pieters, 1996). De to modellene, Bliss' uavhengighetsmodell og Loewes additivitetsmodell, ga i hovedsak sammenfallende resultater.

Den isoeffektive blandingen av TBBPA og HBCD ga en synergistisk effekt på glutamatopptak i vesikler i etter begge interaksjonsmodellene. Tilsvarende blanding av MeHg og TBBPA hadde en additiv effekt på opptaket. Også denne effekten ble bekreftet av begge interaksjonsmodellene. Blandingen av MeHg og HBCD viste en trend mot en synergistisk interaksjon i den lavere halvdelen av konsentrasjonsintervallet i henhold til begge interaksjonsmodellene. Loewes modell kom her til kort for å karakterisere effekten i høye konsentrasjoner, da verken HBCD individuelt eller blandingen ga mer enn ~70% hemming av glutamatopptaket. Bliss' modell viste imidlertid en antagonistisk interaksjon i det øvre konsentrasjonsområdet.

Blandingen mellom A1254 og HBCD ga etter begge interaksjonsmodellene, en additiv effekt på dopaminopptaket i vesikler i de lavere konsentrasjonene. Bliss uavhengighetsmodell viste at denne effekten ved økende konsentrasjoner gikk over i en antagonistisk effekt. Loewes additivitetsmodell kom til kort for beskrive den antagonistiske interaksjonen observert i det høyere konsentrasjonsområdet.

Blandingene av MeHg med A1254 og HBCD viste relativt like effektforløp (fig.3.22 og 3.24). Begge blandingene ga en synergistisk effekt på dopaminopptaket i lave konsentrasjoner. Bliss' modell viste at blandingseffekten gikk over i en betydelig antagonistisk effekt i konsentrasjoner over $\sim 1.5 \times IC_{20}$ -verdiene. Også for disse blandingene kom Loewes additivitetsmodell til kort for å beskrive den antagonistiske effekten av disse blandingene på dopaminopptaket i det høyere konsentrasjonsområdet. Disse resultatene viser at A1254, HBCD og MeHg har evnen til å betydelig motvirke hverandres effekt på vesikkelopptak av dopamin i høye doser. Den samme trenden ble også sett for effekter av blandinger av MeHg med TBBPA og HBCD på glutamatopptak nevnt ovenfor, men var langt mindre uttalt enn for dopaminopptaket.

MeHg hadde alene en lik effekt på vesikkelopptaket av både glutamat og dopamin, slik at de antagonistiske effektene i disse blandingsforsøkene er forårsaket av tilstedeværelsen av de halogenerte forbindelsene.

I tilfeller der to stoffer virker på samme mål, som transportørsetet eller V-ATPasen i vesikler i dette tilfellet, er det vanlig at disse i blanding ikke gir en additiv effekt, men at resultatet blir synergi eller antagonisme. Dette skyldes konkurranse om binding til målproteinet/proteinene mellom de to stoffene. Synergi er oftest utfallet dersom de to forbindelsene utøver sin effekt gjennom ulike mekanismer, som for eksempel ved å interagere med ulike steder på samme protein, eller med to målproteiner som har effekt på samme endepunkt (her V-ATPasen og transportøren). Antagonisme på den annen side er ofte resultat av konkurranse mellom de to stoffene om binding til samme setet. En slik kompetitiv antagonisme er analogt til konkurransen mellom en kompetitiv hemmer med en ligand om binding til en reseptor eller transportør. Sterk antagonisme kan skyldes at stoffet med lavest effekt enten har høyest affinitet eller foreligger i høyest konsentrasjon, og vil føre til at det mest aktive stoffet blir utkonkurrert (DVFA, 2003).

I blandingsregimet brukt i disse kombinasjonsforsøkene er sannsynligvis dette tilfellet. Blandingene er konstruert med basis i stoffenes individuelle effekter, justert for potens, slik at blandingsforholdet ved økende konsentrasjon, hele veien er proporsjonalt med forholdet mellom de individuelle IC_{20} -konsentrasjonene. Da MeHg var suverent den mest potente hemmeren av både glutamat- og dopaminopptak i vesikler, foreligger den også i lavest konsentrasjoner i de ulike blandingene. Som det går frem av tabellene 2.2 til 2.5, er forholdet mellom de molare konsentrasjonene i blandingene av MeHg med TBBPA og HBCD brukt i forsøkene på glutamatopptak henholdsvis 1:4 og 1:3,5. Tilsvarende er det molare konsentrasjonsforhold i blandingene av MeHg med A1254 og HBCD brukt i forsøkene på dopaminopptak, henholdsvis 1:5 og 1:2,55.

HBCD oppnådde individuelt en maksimal effekt på ~50% hemming av både glutamat- og dopaminopptaket, mens A1254 hadde en maksimal effekt på ~40% hemming av dopaminopptaket. Det innebærer at de har tilnærmet like god hemmingsevne av dopaminopptaket i høye konsentrasjoner. Blandingene mellom disse viste et effekttak tilsvarende deres maksimale individuelle effekt. Selv om den

predikerte effekten av blandingen tilsier en antagonistisk effekt, er det mulig at denne effekten skyldes at begge stoffene hemmer opptaket gjennom en mekanisme som kun gir en slik delvis hemming.

Deres maksimale individuelle effekt stemmer også godt overens med de maksimale effektene sett for blandingene av disse stoffene med MeHg. Da både A1254 og HBCD i blandinger med MeHg foreligger i høyest konsentrasjon, er det mulig at det nettopp foreligger en slik kompetitiv antagonisme der MeHg blir utkonkurrert, og det er den individuelle effekten av A1254 eller HBCD som gjør seg gjeldende.

Årsaken til at en tilsvarende antagonistisk effekt ikke er tilfellet med blandingen av MeHg og TBBPA på glutamatopptaket kan skyldes at TBBPA individuelt ikke har et tilsvarende effekttak, men hemmer glutamatopptaket ned til svært lave nivåer. En utkonkurrering av MeHg om interaksjon med vesikkelproteiner, vil allikevel gi en betydelig hemming av glutamatopptaket.

Resultatene fra disse blandingsforsøkene støtter opp under teorien om at MeHg hemmer opptak av både glutamat- og dopamin i vesikler, delvis gjennom en kompetitiv mekanisme.

4.5 Implikasjoner av interferens med transport av neurotransmittere i vesikler

Et hemmet opptak av neurotransmittere i vesikler vil kunne innvirke på den neurologiske funksjonen på flere måter. En redusert akkumulering av neurotransmittere i vesikler vil resultere i redusert frigjøring ved nervøs transmisjon, som igjen gir redusert eksitasjon eller depresjon av postsynaptiske celler. Videre vil det kunne gi en akkumulering av frie neurotransmittere i cytoplasma. Økte nivåer fritt cytoplasmisk dopamin er kjent å virke nevrotoksisk gjennom oksidasjon til reaktive metabolitter, gi ROS-dannelse, samt hemme mitokondriefunksjonen. En ubalanse av funksjonen mellom DAT og VMAT-2 er derfor antatt å ha betydning for dopaminindusert nevrotoksisitet og degenerering av dopaminerge celler (Miller et al.,

1999). For glutamatindusert toksisitet er derimot økte ekstracellulære nivåer av størst betydning, da det kan virke eksitotoksisk på astrocytter og glutamaterge nevroner. De ulike transmittersystemene i hjernen er gjensidig influert av hverandre, slik at en lokalisert effekt vil kunne ha ringvirkninger over større deler av CNS.

4.6 Vurdering av interaksjonsmodellene

Grenseverdier for akseptabel eksponering av stoffer er generelt satt ut fra enkeltstoffenes egenskaper, og mulige interaksjonseffekter tas sjeldent hensyn til. Dersom et stoff foreligger i konsentrasjoner under sin grenseverdi, er det ansett som risikofritt. I en studie av Silva et al. (2002) er det imidlertid vist at en blanding av 8 stoffer med svak østrogen virkning, der komponentene var til stede i konsentrasjoner under sine respektable NOEL-verdier, ga en betydelig effekt i et østrogen reporter assay (YES) i gjær (Silva et al., 2002). Dette viser at effekter av stoffer som foreligger i konsentrasjoner under deres NOEL-verdier, allikevel kan adderes opp og gi en effekt. Kartlegging av effekter av de utallige stoffblandingene, og mulige blandingsforhold av disse, er en uoverkommelig oppgave. Det er imidlertid her verdien av modeller for predikering av blandingseffekter kommer inn i bildet.

Modellene Bliss uavhengighetsmodell og Loewes additivitetsmodell har begge vunnet aksept i miljøer som driver forskning på blandingseffekter. De har begge sine fordeler og ulemper, men det er ikke fastsatt kriterier for hvilken som bør velges i ulike situasjoner (Kortenkamp and Altenburger, 1998).

Bliss' modell er basert på summering av individuelle effekter, og er den foretrukne modellen innen kjemoterapi. Den er av mange regnet for å være best egnet til å predikere kombinasjonseffekter der komponentene virker på ulike mål, eller er funksjonelt uavhengige av hverandre. Loewes modell er på sin side basert på konsentrasjonsaddisjon, og foretrekkes ofte innen akvatisk toksikologi. Den er regnet for å gi best prediksjon av blandingseffekter der komponentene virker på samme mål,

eller har lik virkning (Kortenkamp and Altenburger, 1998; Köneman and Pieters, 1996).

I enkelte situasjoner vil de to modellene kunne gi motstridende resultater (Silva et al., 2002). Siden de bakenforliggende mekanismene for effektene av de studerte stoffene på vesikler ikke er kjent, ble det valgt å bruke begge modellene for å se hvilken som ga best overensstemmelse med de observerte effektene. Loewes modell er imidlertid den mest brukte, og er validert for blandinger av stoffer uavhengig av mekanismer (Berenbaum, 1989), og ble derfor lagt forholdsvis mye vekt på.

Benyttet på våre forsøk har modellene i stor grad gitt overensstemmende resultater. Det ble valgt å bruke Loewes modell til å beregne interaksjonsindekser for blandingseffektene. Denne bruken viste seg imidlertid å ha svakheten at den kom til kort for å beskrive interaksjonene som forelå i doseområder der både ett av enkeltstoffene og blandingen manglet effekt. Modellene var derfor ikke sammenlignbare i disse situasjonene. Det er imidlertid viktig å påpeke at det kan være vanskelig å trekke bastant slutninger om hvor reelle disse interaksjonseffektene er, men at resultatene er diskutert i forhold til de to interaksjonsmodellene.

4.7 Konklusjon

Vi har i denne studien vist at MeHg, PCB og de bromerte flammehemmerne TBBPA, HBCD og DE-71 i blandinger med hverandre kan gi interaksjonseffekter på transport av neurotransmittere i vesikler. Trenden fra disse blandingsforsøkene gikk mot additive eller synergistiske effekter i det lave doseområdet, mens effektene ofte var antagonistiske i høye doser. Siden mennesker normalt er eksponert for relativt lave konsentrasjoner av disse miljøgiftene, er effekter i lavdoseområdet derfor mer toksikologisk relevant.

Muligheten for synergieffekter mellom toksiske stoffer er selvsagt av stor bekymring. Det er allikevel viktig å ikke undervurdere betydningen av additive effekter.

Kildeliste

- Abe, T., T. Haga, and M. Kurokawa. 1975. Blockage of axoplasmic transport and depolymerisation of reassembled microtubules by methyl mercury. *Brain research*. 86:504-508.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th.ed. Garland Science.
- Amin-Zaki, L., S. Elhassani, M.A. Majeed, T.W. Clarkson, R.A. Doherty, M.R. Greenwood, and T. Giovanoli-Jakubczak. 1976. Perinatal methylmercury poisoning in Iraq. *Am J Dis Child*. 130:1070-6.
- Andersen, P., Holmqvis.B, and Voorhoev.Pe. 1966. Entorhinal Activation of Dentate Granule Cells. *Acta Physiologica Scandinavica*. 66:448-&.
- Arai, H., G. Terres, S. Pink, and M. Forgac. 1988. Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem*. 263:8796-802.
- Aschner, M., C. Yao, J.W. Allen, and K.H. Tan. 2000. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochemistry international*. 37:199-206.
- Bakir, F., S.F. Damluji, L. Amin-Zaki, M. Murtadha, A. Khalidi, N.Y. al-Rawi, S. Tikriti, H.I. Dahahir, T.W. Clarkson, J.C. Smith, and R.A. Doherty. 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*. 181:230-241.
- Ballatori, N., and T.W. Clarkson. 1985. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundamental and applied toxicology*. 5:816-831.
- Bemis, J.C., and R.F. Seegal. 1999. Polychlorinated biphenyls and methylmercury act synergistically to reduce rat brain dopamine content in vitro. *Environ Health Perspect*. 107:879-85.
- Bemis, J.C., and R.F. Seegal. 2000. Polychlorinated biphenyls and methylmercury alter intracellular calcium concentrations in rat cerebellar granule cells. *Neurotoxicology*. 21:1123-34.
- Ben-Shachar, D., R. Zuk, and Y. Glinka. 1995. Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *Journal of neurochemistry*. 64:718-723.
- Berenbaum, M.C. 1989. What is synergy? *Pharmacol Rev*. 41:93-141.
- Birnbaum, L., and D.F. Staskal. 2004. Brominated Flameretardants: Cause for Concern? *Environ Health Perspect*. 112:9-17.
- Bliss, C.I. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol*. 26:585-615.

-
- Bogen, I.L., J.L. Boulland, E. Mariussen, M.S. Wright, F. Fonnum, H.T. Kao, and S.I. Walaas. 2006. Absence of synapsin I and II is accompanied by decreases in vesicular transport of specific neurotransmitters. *J Neurochem.* 96:1458-66.
- Borgå, K., H. Wolkers, J.U. Skaare, H. Hop, D.C. Muir, and G.W. Gabrielsen. 2005. Bioaccumulation of PCBs in Arctic seabirds: influence of dietary exposure and congener biotransformation. *Environmental pollution.* 134:397-409.
- Bright, D.A., W.T. Dushenko, S.L. Grundy, and K.J. Reimer. 1995. Effects of local and distant contaminant sources: polychlorinated biphenyls and other organochlorines in bottom-dwelling animals from an Arctic estuary. *The Science of the total environment.* 160-161:265-283.
- BSEF. 2000. An introduction to Bromine Brussels: Bromine Science and Environmental forum. *Industrial information paper.*
- Budtz-Jørgensen, E., N. Keiding, P. Grandjean, and R.F. White. 1999. Methylmercury neurotoxicity independent of PCB exposure. *Environmental health perspectives.* 107:A236-A237.
- Castoldi, A.F., T. Coccini, and L. Manzo. 2003. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. *Rev Environ Health.* 18:19-31.
- Cernichiari, E., R. Brewer, G.J. Myers, D.O. Marsh, L.W. Lapham, C. Cox, C.F. Shamlaye, M. Berlin, P.W. Davidson, and T.W. Clarkson. 1995. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. *Neurotoxicology.* 16:705-710.
- Chiueh, C.C., H. Miyake, and M.T. Peng. 1993. Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism. *Advances in neurology.* 60:251-258.
- Choi, B.H. 1989. The effects of methylmercury on the developing brain. *Progress in neurobiology.* 32:447-470.
- Clarkson, T.W. 2002. The three modern faces of mercury. *Environmental health perspectives.* 110 Suppl 1:11-23.
- Claassen, C.D. 2001. Casarett & Doull's Toxicology- The Basic Science of Poisons McGraw Hill.
- Danbolt, N.C. 2001. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology.* 65:1-105.
- Darvill, T., E. Lonky, J. Reihman, P. Stewart, and J. Pagano. 2000. Prenatal exposure to PCBs and infant performance on the fagan test of infant intelligence. *Neurotoxicology.* 21:1029-1038.
- De Boer, J., C.R. Allchin, B.N. Zegers, and J.P. Boon. 2002. HBCD and TBBPA in Sewage Sludge, Sediments and Biota, Including Interlaboratory Study. C033/02. *Brussels: Bromine Science and Environmental Forum.*

-
- de Wit, C.A. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*. 46:583-624.
- Dutczak, W.J., T.W. Clarkson, and N. Ballatori. 1991. Biliary-hepatic recycling of a xenobiotic: gallbladder absorption of methyl mercury. *American journal of physiology*. 260:G873-G880.
- DVFA. 2003. Combined Actions and Interactions of Chemicals in Mixtures. The Toxicological Effects of Exposure to Mixtures of Industrial and Environmental Chemicals. . *Fødevarerapport, Miljøstyrelsen*. 1st.ed.
- Eggleton, J., and K.V. Thomas. 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment international*. 30:973-980.
- Elliot, T.R. 1905. The action of adrenalin. *J.Physiol*. 32:401-467.
- Erickson, J.D., J.M. Masserano, E.M. Barnes, J.A. Ruth, and N. Weiner. 1990. Chloride ion increases [3H]dopamine accumulation by synaptic vesicles purified from rat striatum: inhibition by thiocyanate ion. *Brain Res*. 516:155-60.
- Eriksson, P., and A. Fredriksson. 1998. Neurotoxic effects in adult mice neonatally exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl or 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl. Changes in brain nicotinic receptors and behaviour. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 5:17-27.
- Eriksson, P., H. Viberg, M. Fischer, M. Wallin, and A. Fredriksson. 2002a. A comparison on developmental neurotoxic effect of hexabromocyclododecane, 2,2',4,4',5,5'-pentabromodiphenylether. *Organohalogen Compounds*. 57:389-392.
- Eriksson, P., H. Viberg, E. Jakobsson, O. Orn, and A. Fredriksson. 2002b. A brominated flame retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenylether: uptake, retention, and induction of neurobehavioral alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development. *Toxicol. Sci*. 57:98-103.
- Fangstrom, B., A. Strid, P. Grandjean, P. Weihe, and A. Bergman. 2005. A retrospective study of PBDEs and PCBs in human milk from the Faroe Islands. *Environ Health*. 4:12.
- Ferrara, R., B. Mazzolai, E. Lanzillotta, E. Nucaro, and N. Pirrone. 2000. Volcanoes as emission sources of atmospheric mercury in the Mediterranean basin. *The Science of the total environment*. 259:115-121.
- Finn, J.P., and R.H. Edwards. 1997. Individual residues contribute to multiple differences in ligand recognition between vesicular monoamine transporters 1 and 2. *The Journal of biological chemistry*. 272:16301-16307.
- Fjeld, F., J. Knutzen, M.E. Brevik, M. Schlaback, T. Skotvold, R.A. Borgen, and L.M. Wiborg. 2001. Halogenerte organiske miljøgifter og kvikksølv i norsk ferkvannsfisk, 1995-1999. *Norsk institutt for vannforskning (NIVA) Rapport 827/01*.

-
- Fonnum, F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of neurochemistry*. 42:1-11.
- Fonnum, F. 1998. Excitotoxicity in the brain. *Arch Toxicol Suppl*. 20:387-95.
- Fykse, E.M., and F. Fonnum. 1988. Uptake of gamma-aminobutyric acid by a synaptic vesicle fraction isolated from rat brain. *J Neurochem*. 50:1237-42.
- Gilbert, M.E., W.R. Mundy, and K.M. Crofton. 2000. Spatial Learning and Long-Term Potentiation in the Dentate Gyrus of the Hippocampus in Animals Developmentally Exposed to Aroclor 1254. *Toxicological sciences*. 57:102-111.
- Grandjean, P., P.J. Jørgensen, and P. Weihe. 1994. Human Milk as a Source of Methylmercury Exposure in Infants. *Environmental health perspectives*. 102:74-77.
- Grandjean, P., P. Weihe, V.W. Burse, L.L. Needham, E. Storr-Hansen, B. Heinzow, F. Debes, K. Murata, H. Simonsen, P. Ellefsen, E. Budtz-Jørgensen, N. Keiding, and R.F. White. 2001. Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicology and teratology*. 23:305-317.
- Grecko, W., H.D. Unkelback, G. Pösch, J.J. Sühnel, M. Kundi, and W. Bödecker. 1992. Consensus on concepts and terminology for combined action assessment: The Saariseikä agreement. *Archives of complex environmental studies*. 4:65-69.
- Guo, Y.L., G.H. Lambert, C.C. Hsu, and M.M. Hsu. 2004. Yucheng: health effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Int Arch Occup Environ Health*. 77:153-8.
- Hakk, H., G. Larsen, A. Bergman, and U. Orn. 2000. Metabolism, excretion and distribution of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in conventional and bile-duct cannulated rats. *Xenobiotica*. 30:881-90.
- Hakk, H., and R.J. Letcher. 2003. Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants--a review. *Environ Int*. 29:801-28.
- Harada, M. 1995. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical reviews in toxicology*. 25:1-24.
- Hastings, T.G., D.A. Lewis, and M.J. Zigmond. 1996. Reactive dopamine metabolites and neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 387:97-106.
- Hsu, S.T., C.I. Ma, S.K. Hsu, S.S. Wu, N.H. Hsu, and C.C. Yeh. 1984. Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan. *Am J Ind Med*. 5:71-9.
- Hussain, R.J., J. Gyori, A.P. DeCaprio, and D.O. Carpenter. 2000. In vivo and in vitro exposure to PCB 153 reduces long-term potentiation. *Environmental health perspectives*. 108:827-831.

-
- Jacobson, J.L., and S.W. Jacobson. 1988. New methodologies for assessing the effects of prenatal exposure on cognitive function in children children. John Riley and sons, New York.
- Jacobson, J.L., and S.W. Jacobson. 1996. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N.England J Med.* 335:783-789.
- Johnson, R.G.J.S. 1987. PROTON PUMPS AND CHEMIOSMOTIC COUPLING AS A GENERALIZED MECHANISM FOR NEUROTRANSMITTER AND HORMONE TRANSPORT. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 493:162-177.
- Kashimoto, T., H. Miyata, S. Kunita, T.C. Tung, S.T. Hsu, K.J. Chang, S.Y. Tang, G. Ohi, J. Nakagawa, and S. Yamamoto. 1981. Role of polychlorinated dibenzofuran in yusho (PCB poisoning). *Arch Environ Health.* 36:321-6.
- Kimbrough, R.D. 1987. Human health effects og polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs). *Ann. Rev. Pharmacol. and Toxicol.* 27:87-111.
- Kociba, R.J., D.G. Keyes, J.E. Beyer, R.M. Carreon, C.E. Wade, D.A. Dittenber, R.P. Kalnins, L.E. Frauson, C.N. Park, S.D. Barnard, R.A. Hummel, and C.G. Humiston. 1978. Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 46:279-303.
- Kortenkamp, A., and R. Altenburger. 1998. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: a reevaluation using the method of isoboles. *Sci Total Environ.* 221:59-73.
- Kuratsune, M., T. Yoshimura, J. Matsuzaka, and A. Yamaguchi. 1971. Yusho, a poisoning caused by rice oil contaminated with polychlorinated biphenyls. *HSMHA Health Rep.* 86:1083-91.
- Kurland, L.L.T., S.S.N. Faro, and H.H. Siedler. 1960. Minamata disease. The outbreak of a neurologic disorder in Minamata, Japan, and its relationship to the ingestion of seafood contaminated by mercuric compounds. *World neurology.* 1:370-395.
- Köneman, W.H., and M.N. Pieters. 1996. Confusion in concepts in mixture toxicology. *Food and Chemical Toxicology.* 34:1025-1031.
- Lipton, S.A., and P.A. Rosenberg. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England journal of medicine.* 330:613-622.
- Loewe, S., and H. Muischnek. 1926. Über kombinationswirkungen. Hilfsmittel der Fragestellung. *Arch. Pharmacol.* 103:313-326.
- Malenka, R.C., and M.F. Bear. 2004. LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron.* 44:5-21.
- Mariussen, E., P.L. Andersson, M. Tysklind, and F. Fonnum. 2001. Effect of polychlorinated biphenyls on the uptake of dopamine into rat brain synaptic vesicles: a structure-activity study. *Toxicol Appl Pharmacol.* 175:176-83.

- Mariussen, E., and F. Fonnum. 2001. The effect of polychlorinated biphenyls on the high affinity uptake of the neurotransmitters, dopamine, serotonin, glutamate and GABA, into rat brain synaptosomes. *Toxicology*. 159:11-21.
- Mariussen, E., and F. Fonnum. 2003. The effect of brominated flame retardants on neurotransmitter uptake into rat brain synaptosomes and vesicles. *Neurochem Int*. 43:533-42.
- Mariussen, E., and F. Fonnum. 2006. Neurochemical Targets and Behavioral Effects of Organohalogen Compounds: An Update. *Crit Rev Toxicol*. 36:253-289.
- Mariussen, E., J. Mørch Andersen, and F. Fonnum. 1999. The effect of polychlorinated biphenyls on the uptake of dopamine and other neurotransmitters into rat brain synaptic vesicles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 161:274-82.
- Masson, J., C. Sagné, M. Hamon, and S. El Mestikawy. 1999. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacological reviews*. 51:439-464.
- Maycox, P.R., T. Deckwerth, J.W. Hell, and R. Jahn. 1988. Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *The Journal of biological chemistry*. 263:15423-15428.
- Meerts, I.A., J.J. van Zanden, E.A. Luijckx, I. van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman, and A. Brouwer. 2000. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicological sciences*. 56:95-104.
- Miller, G.W., R.R. Gainetdinov, A.I. Levey, and M.G. Caron. 1999. Dopamine transporters and neuronal injury. *Trends in pharmacological sciences*. 20:424-429.
- Mottet, N.K., M.E. Vahter, J.S. Charleston, and L.T. Friberg. 1997. Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. *Metal ions in biological systems*. 34:371-403.
- Naito, S., and T. Ueda. 1985. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *Journal of neurochemistry*. 44:99-109.
- Norenberg, M.D., and A. Martinez-Hernandez. 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain research*. 161:303-310.
- Nriagu, J.O., W.C. Pfeiffer, O. Malm, C.M. Magalhaes de Souza, and G. Mierle. 1992. Mercury pollution in Brazil. *Nature*. 356:389-389.
- Ottersen, O.P., N. Zhang, and F. Walberg. 1992. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience*. 46:519-534.
- Pascussi, J.M., S. Gerbal-Chaloin, L. Drocourt, E. Assenat, D. Larrey, L. Pichard-Garcia, M.J. Vilarem, and P. Maurel. 2004. Cross-talk between xenobiotic detoxication and other signalling pathways: clinical and toxicological consequences. *Xenobiotica*. 34:633-64.

-
- Patandin, S., C.I. Lanting, P.G. Mulder, E.R. Boersma, P.J. Sauer, and N. Weisglas-Kuperus. 1999. Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *The Journal of pediatrics*. 134:33-41.
- Payne, J., N. Rajapakse, M. Wilkins, and A. Kortenkamp. 2000. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environmental health perspectives*. 108:983-987.
- Pollitt, F. 1999. Polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Regul Toxicol Pharmacol*. 30:S63-8.
- Porciuncula, L.O., J.B. Rocha, R.G. Tavares, G. Ghisleni, M. Reis, and D.O. Souza. 2003. Methylmercury inhibits glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain. *Neuroreport*. 14:577-80.
- Puopolo, K., M. Szczekan, R. Magner, and M. Forgac. 1992. The 40-kDa subunit enhances but is not required for activity of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem*. 267:5171-6.
- Pösch, G., P. Dittrich, R.J. Rieffenstein, W. Lenk, and A. Schuster. 1990. Evaluation of experimental combined toxicity by use of dose-frequency curves: Comparison with theoretical additivity as well as independence. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 68:1338-1345.
- Reistad, T., F. Fonnum, and E. Mariussen. 2006. Neurotoxicity of the pentabrominated diphenyl ether mixture, DE-71, and hexabromocyclododecane (HBCD) in rat cerebellar granule cells in vitro. *Archives of toxicology*.
- Reistad, T., and E. Mariussen. 2005. A commercial mixture of the brominated flame retardant pentabrominated diphenyl ether (DE-71) induces respiratory burst in human neutrophil granulocytes in vitro. *Toxicol Sci*. 87:57-65.
- Reistad, T., E. Mariussen, and F. Fonnum. 2002. The effect of brominated flame-retardants on cell death and free radical formation in cerebellar granule cells. *Organohalogen Compounds*. 57:391-394.
- Reistad, T., E. Mariussen, and F. Fonnum. 2005. The effect of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol-A, on free radical formation in human neutrophil granulocytes: the involvement of the MAP kinase pathway and protein kinase C. *Toxicol Sci*. 83:89-100.
- Reith, M.E., C. Xu, and N.H. Chen. 1997. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol*. 324:1-10.
- Roegge, C.S., and S.L. Schantz. 2006. Motor function following developmental exposure to PCBs and/or MEHG. *Neurotoxicology and teratology*. 28:260-277.

- Safe, S.H. 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol.* 21:51-87.
- Safe, S.H. 1992. Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. *Environmental health perspectives.* 100:259-268.
- Safe, S.H. 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Critical reviews in toxicology.* 24:87-149.
- Safe, S.H. 2001. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicology letters.* 120.
- Sager, P.R. 1988. Selectivity of methyl mercury effects on cytoskeleton and mitotic progression in cultured cells. *Toxicology and applied pharmacology.* 94:473-486.
- Sager, P.R., R.A. Doherty, and J.B. Olmsted. 1983. Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and in vitro. *Experimental cell research.* 146:127-137.
- Schantz, S.L. 1996. Developmental neurotoxicity of PCBs in humans: what do we know and where do we go from here? *Neurotoxicology and teratology.* 18:217-27; discussion 229.
- Schantz, S.L., D.M. Gasior, E. Polverejan, R.J. McCaffrey, A.M. Sweeney, H.E. Humphrey, and J.C. Gardiner. 2001. Impairments of memory and learning in older adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish. *Environ Health Perspect.* 109:605-11.
- Schantz, S.L., J.J. Widholm, and D.C. Rice. 2003. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environmental health perspectives.* 111:357-576.
- Seegal, R.F. 1996a. Can epidemiological studies discern subtle neurological effects due to perinatal exposure to PCBs? *Neurotoxicol Teratol.* 18:251-4; discussion 271-6.
- Seegal, R.F. 1996b. Epidemiological and laboratory evidence of PCB-induced neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol.* 26:709-37.
- Seegal, R.F., B. Bush, and K.O. Brosch. 1991a. Comparison of effects of Aroclors 1016 and 1260 on non-human primate catecholamine function. *Toxicology.* 66:145-63.
- Seegal, R.F., B. Bush, and K.O. Brosch. 1991b. Sub-chronic exposure of the adult rat to Aroclor 1254 yields regionally-specific changes in central dopaminergic function. *Neurotoxicology.* 12:55-65.
- Seegal, R.F., B. Bush, and K.O. Brosch. 1994. Decreases in dopamine concentrations in adult, non-human primate brain persist following removal from polychlorinated biphenyls. *Toxicology.* 86:71-87.

-
- Seegal, R.F., B. Bush, and W. Shain. 1990. Lightly chlorinated ortho-substituted PCB congeners decrease dopamine in nonhuman primate brain and in tissue culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 106:136-44.
- Siegel, J.G., W.B. Agranoff, K.S. Fisher, W.R. Albers, and M.D. Uhler. 1999. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects 6th.ed. lippincott Williams & Wilkins.
- Silva, E., N. Rajapakse, and A. Kortenkamp. 2002. Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol.* 36:1751-6.
- Sjödin, A., D.G. Patterson, and A. Bergman. 2003. A review on human exposure to brominated flame retardants--particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environment international.* 29:829-839.
- Stenersen, J. 2002. Gifter. Yrkeslitteratur.
- Sühnel, J. 1990. Evaluation of synergism or antagonism for the combined action of antiviral agents. *Antiviral research.* 13:23-39.
- Sühnel, J. 1998. Parallel dose-response curves in combination experiments. *Bulletin of mathematical biology.* 60:197-213.
- Szymanska, J.A., A. Sapota, and B. Fryndrych. 2001. The disposition and metabolism of tetrabromobisphenol-A after a single i.p. dose in rat. *Chemosphere.* 45:693-700.
- Sällström, U., A. Kierkegaard, C.C.A. De Wit, and B. Jansson. 1998. Polybrominated diphenylethers and hexabromosylododecan in sediments and fish from a swedish river. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:1065-1072.
- Teng, L., P.A. Crooks, and L.P. Dwoskin. 1998. Lobeline displaces [3H]dihydratetabenazine binding and releases [3H]dopamine from rat striatal synaptic vesicles: comparison with d-amphetamine. *J Neurochem.* 71:258-65.
- Tilson, H.A., J.L. Jacobson, and W.J. Rogan. 1990. Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system: cross-species comparisons. *Neurotoxicology and teratology.* 12:239-248.
- Tilson, H.A., and P.R. Kodavanti. 1998. The neurotoxicity of polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicology.* 19:517-525.
- Trotti, D., S. Nussberger, A. Volterra, and M.A. Hediger. 1997a. Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1. *The European journal of neuroscience.* 9:2207-2212.
- Trotti, D., B.L. Rizzini, D. Rossi, O. Haugeto, G. Racagni, N.C. Danbolt, and A. Volterra. 1997b. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *The European journal of neuroscience.* 9:1236-1243.

- Van den Berg, M., L. Birnbaum, A.T. Bosveld, B. Brunstrom, P. Cook, M. Feeley, J.P. Giesy, A. Hanberg, R. Hasegawa, S.W. Kennedy, T. Kubiak, J.C. Larsen, F.X. van Leeuwen, A.K. Liem, C. Nolt, R.E. Peterson, L. Poellinger, S. Safe, D. Schrenk, D. Tillitt, M. Tysklind, M. Younes, F. Waern, and T. Zacharewski. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect.* 106:775-92.
- Van den Berg, M., R.E. Peterson, and D. Schrenk. 2000. Human risk assessment and TEFs. *Food Addit Contam.* 17:347-58.
- Viberg, H., A. Fredriksson, and P. Eriksson. 2002. Neonatal exposure to the brominated flameretardant 2,2',4,4',5-pentabromodiphenylether causes altered susceptibility in the cholinergic transmitter system in the adult mouse. *Toxicol Sci.* 67:104-107.
- Volz, R.F., R.F. Hanson, and R.F. Fleckenstein. 2006. Kinetic analysis of developmental changes in vesicular monoamine transporter-2 function. *Synapse.* 60:474-477.
- vom Saal, F.S., and W.V. Welshons. 2006. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environmental research.* 100:50-76.
- Walkowiak, J., J.A. Wiener, A. Fastabend, B. Heinzow, U. Krämer, E. Schmidt, H.J. Steingrüber, S. Wundram, and G. Winneke. 2001. Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and quality of the home environment: effects on psychodevelopment in early childhood. *The lancet.* 358:1602-1607.
- Weihe, P., P. Grandjean, F. Debes, and R. White. 1996. Health implications for Faroe islanders of heavy metals and PCBs from pilot whales. *The Science of the total environment.* 186:141-148.
- Winneke, G., A. Bucholski, B. Heinzow, U. Krämer, E. Schmidt, J. Walkowiak, J.A. Wiener, and H.J. Steingrüber. 1998. Developmental neurotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBS): cognitive and psychomotor functions in 7-month old children. *Toxicology letters.* 102-103:423-428.
- Zhang, J., M. Myers, and M. Forgac. 1992. Characterization of the V0 domain of the coated vesicle (H⁺)-ATPase. *J Biol Chem.* 267:9773-8.
- Zoeller, T.R., A.L. Dowling, C.T. Herzig, E.A. Iannacone, K.J. Gauger, and R. Bansal. 2002. Thyroid hormone, brain development, and the environment. *Environmental health perspectives.* 110 Suppl 3:355-361.

THE EFFECTS OF DIFFERENT COMBINATIONS OF BROMINATED FLAME RETARDANTS, POLYCHLORINATED BIPHENYLS AND METHYLMERCURY ON NEUROTRANSMITTER UPTAKE IN SYNAPTOSOMES AND SYNAPTIC VESICLES *IN VITRO*

Andersen IS^{1*}, Haugstad, K^{1*}, Fonnum F¹, Mariussen E²

¹ University of Oslo, Institute for Basic Medicine, P.O. Box 1112 Blindern N-0317 Oslo, Norway,

²Norwegian Institute for Air Research, P.O. Box 100, N-2027 Kjeller, Norway. *Andersen and Haugstad have contributed equally to the manuscript.

Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and brominated flame retardants (BFRs) are both lipophilic compounds, resistant to biological decomposition and shown to accumulate in higher trophic levels through the food chain. Intensive research has established that PCBs are neurotoxic and may affect cognitive and motor functions.¹ Methylmercury (MeHg) is another bioaccumulative pollutant well known for its neurotoxic effects.^{2,3,4} Large predatory fish are particularly shown to accumulate high levels of MeHg which usually appears in combination with organohalogen compounds. This is of particular concern for people with a high consumption of fish due to their chronic exposure to high levels of these contaminants. Recent research has revealed that children developmentally exposed to low levels of PCB and/or MeHg display poorer performances on neurobehavioral tests.³ It has been a major challenge in these studies to identify the causative agents. However, there is evidence that interactive effects between the environmental pollutants contribute to the total effect³.

There is growing knowledge of the effects of single compounds, but little is known about their effects in combination. Environmental contaminants always appear in mixtures and even though the levels of the individual compounds imply no adverse effects, the combination effects may be toxic. The possibility of additive and synergistic effects between many pollutants is of concern and normally, risk assessment does not take this into account. There are many possibilities for interactions between neurotoxicants due to the complex hierarchical structure of the nervous system.⁵ Reports have shown that interaction is a real phenomenon and not just a theoretical possibility.^{5,6,7} Especially toxic metals have been considered to display a high interaction potential.⁸

Recently, Bemis and Seegal⁹ suggested that a combination of MeHg and PCBs synergistically reduce dopamine levels in rat striatal slices. It is known that MeHg, PCBs and some BFRs exert neurotoxic effects through their influence on neurotransmitter transport.^{1,10} The aim of this study was to elucidate possible effects of combinations of these three classes of substances on dopamine and glutamate uptake in rat brain preparations. To characterize the type of interaction in this system, we used the method of isoboles, based on the theories of Löewe and Muischnek.¹¹

Materials and Methods

Preparation of synaptosomes

Rat brain synaptosomes were prepared from male Wistar rats (150-200g) as described previously.¹² The brains were homogenised (~5% w/v) in 0.32 M sucrose and centrifuged for 10 min (1000g). The supernatant was then mixed with 1.3 M sucrose to obtain a 0.8 M suspension to remove myelin on further centrifugation. The supernatant was centrifuged for 30 min (20 000g) to get a crude synaptosomal pellet (P2). The synaptosomal pellet was gently resuspended in 0.32 M sucrose and used within 6 hours.

Preparation of synaptic vesicles

Rat brain vesicles were isolated by a method recently described in detail.¹³ The brains were homogenised (~5% w/v) in 0.32 M sucrose and centrifuged for 10 min (1000g). The supernatant was centrifuged for 30 min (20 000g) to get a crude synaptosomal pellet (P2), which was subjected to hypotonic shock by resuspension in distilled water. The suspension was centrifuged for 30 min (20 000g). The supernatant was added 0.1 M potassium tartrate in 25 mM HEPES (final concentration) and then centrifuged for 1h (100 000g). The pellet was resuspended in 0.32 M sucrose.

Assay for uptake of glutamate and dopamine into synaptosomes and synaptic vesicles

High affinity uptake of dopamine and glutamate was determined as described previously.¹² Synaptosomes (10-15 µg protein/ml) were preincubated at 25°C for 15 min, in absence or presence of the described chemicals in Tris-Krebs buffer. Likewise, vesicles (1.2 mg protein/ml) were preincubated at 30°C in HEPES-buffer containing 2 mM Mg²⁺. The synaptosomal uptake was initiated by adding substrate containing approximately 20 nM ³H-glutamate (0.5 µCi), while the vesicles were added substrate containing approximately 170 nM ³H-dopamine (0.5 µCi) with 2 µM ATP. Synaptosomes and vesicles were incubated for 3 min in a final volume of 500 µl and 300 µl, respectively. The reaction was terminated by addition of ice-cold 0.15 M NaCl or 0.15 M KCl, respectively, and harvested onto Millipore Hawp filters (diam 25 mm and 0.45 µm pore size). The filters were dissolved in 4 ml Filter Count (Packard) and counted for retained radioactivity in a liquid scintillation spectrophotometer (Tricarb-300)

Interaction assay

The method of isoboles is, opposed to several other widely used methods, proven to be valid for any binary mixture, independent of the form and slope of their individual dose-response curves.¹⁴ To evaluate the type of interaction, we chose Loewe additivity as a null reference model.¹⁵ From the dose-response curves for the single compounds, we selected a suitable effect level (IC 20 or IC 25). We then made binary mixtures with a concentration ratio of the two compounds equivalent to their individual IC values. The combined effect of these toxin pairs, were tested in three different mixture ratios and illustrated in isobole diagrams. To elucidate the relationship between the effect of the mixtures and the single compounds, we compared the IC-values of the binary mixtures with the additivity line given by the single compounds. The additivity line describes the theoretical additive effect of an infinite number of different binary mixtures and is based on a defined effect level (e.g. IC) of the single compounds. We also tested the same combinations, using Bliss additivity^{14,15} as a null reference model. The data (not shown) showed a similar trend.

Results and Discussion

There is limited information about the effects of mixtures of environmental contaminants and concerns are raised if exposure to these will exert stronger effects than expected by the individual compounds.⁴ Table 1 shows that the PCB mixture A1254, the single congener PCB 153, the commercial mixture of pentabrominated diphenyl ether DE-71, hexabromocyclododecan (HBCD) and MeHg inhibit uptake of dopamine and glutamate in vesicles and synaptosomes respectively. To our knowledge, this is the first study showing that MeHg inhibits uptake of dopamine in synaptic vesicles. This data may contribute to the available information about the neurotoxicity of this compound.

Table 1. Calculated IC 20 and IC 25 values for the inhibition of dopamine* and glutamate** uptake in rat brain synaptic vesicles and synaptosomes, respectively. Data are given in µM ± SEM.

	MeHg	A1254	PCB153	HBCD	DE-71
Vesicles* (IC 20)	2.0 ± 0.06	10.7 ± 1.2	-	5.1 ± 1.6	-
Synaptosomes** (IC 25)	0.16 ± 0.02	2.5 ± 0.2	6.9 ± 0.1	0.52 ± 0.08	1.79 ± 0.6

A challenge in evaluating combined effects, is to make a proper selection of compounds of interest. In environmental samples today, the dominating pollutants are PCBs and MeHg. In general, the environmental levels of BFRs are 10-100 times lower than those of PCBs. However, recent reports have shown that environmental levels of BFRs are increasing and are therefore of special interest regarding their contribution to the toxic effects in combination with other pollutants. In this study we have investigated the effect of binary mixtures of MeHg, A1254, PCB153, HBCD and the pentaBDE mixture DE-71. Since the relative amount of each compound may influence the effect,¹⁴ each binary mixture was tested in three different mixture ratios. To be able to plot the effect of each mixture in isobole diagrams, a dose-response curve was made for each mixture, followed by an IC20 or IC25 value calculation.

The interpretation of isoboles is under debate. However, if each effect-point lie in the vicinity of the predicted additivity line, the mixture is regarded as additive. If the points fall beneath the additivity line, it

suggests a trend towards a possible synergistic effect. Alternatively, if the points fall above the additivity line, it is a trend towards an antagonistic effect. In general the expected outcome when studying mixture effects on a similar end-point, is additivity.¹⁵ Deviation from additivity determines whether the effect is synergistic or antagonistic and may indicate that the two chemicals act through different mechanisms.

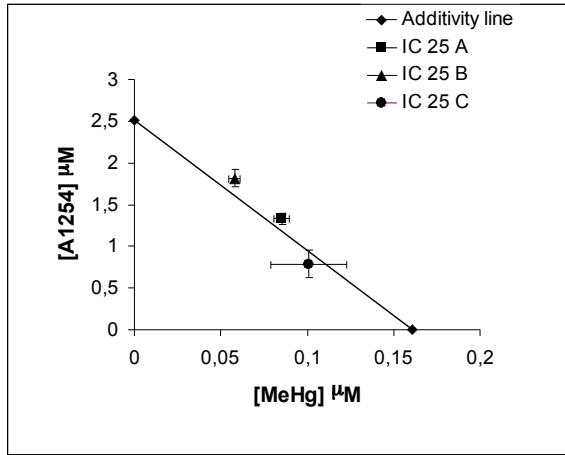


Fig 1 a) Isobole showing the relationship between isoeffective doses of A1254 (IC 25 = 2.5 μM) and MeHg (IC 25 = 0.16 μM) on ^3H -glutamate uptake in synaptosomes. Each point represents the IC 25 value of the binary mixture in three different proportions \pm SEM.

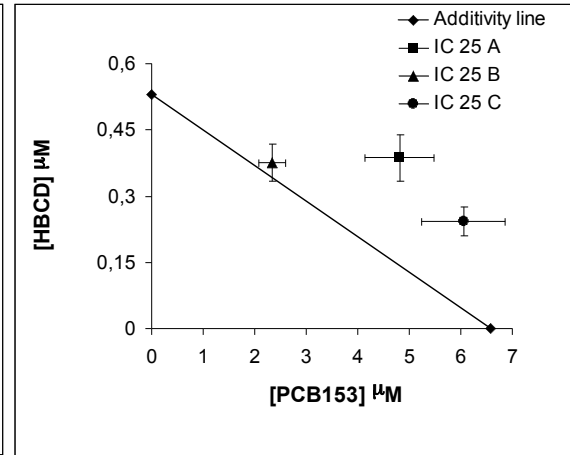


Fig 1 b) Isobole showing the relationship between isoeffective doses of PCB153 (IC 25 = 6.9 μM) and HBCD (IC 25 = 0.52 μM) on ^3H -glutamate uptake in synaptosomes. Each point represents the IC 25 value of the binary mixture in three different proportions \pm SEM.

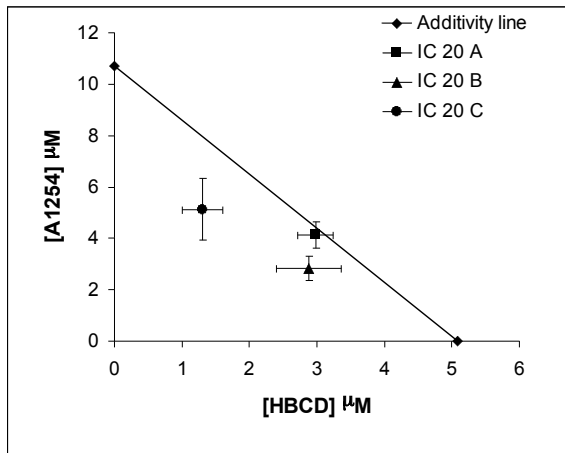


Fig 2 a) Isobole showing the relationship between isoeffective doses of A1254 (IC 20 = 10.7 μM) and HBCD (IC 20 = 5.1 μM) on ^3H -dopamine uptake in synaptic vesicles. Each point represents the IC 25 value of the binary mixture in three different proportions \pm SEM.

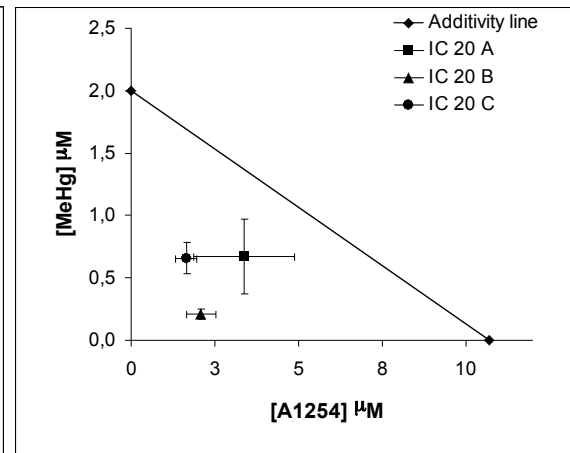


Fig 2 b) Isobole showing the relationship between isoeffective doses of MeHg (IC 20 = 2.0 μM) and A1254 (IC 20 = 10.7 μM) on ^3H -dopamine uptake in synaptic vesicles. Each point represents the IC 25 value of the binary mixture in three different proportions \pm SEM.

In fig 1 the effects of two binary mixtures of MeHg/A1254 and A1254/HBCD on glutamate uptake in synaptosomes is shown. The effect shows a clear additive trend. All points lie in the vicinity of the predicted additivity line suggesting that each compound contributes equally to the total effect. Although less clear, the effect between PCB153 and HBCD (Fig.1b) also indicates an additive trend, with points B and C deviating towards a less-than-additive effect.

The effect on vesicular uptake of dopamine showed a different pattern. Two of the three mixtures of A1254 and HBCD (point A and C) indicated a combined effect that suggests a trend towards a more than additive effect, whereas point B lies at the additivity line indicating additive effect (Fig 2a). A more complex pattern was observed in vesicles when A1254 was mixed with MeHg. A trend towards synergy was revealed, which is similar to what Bemis and Seegal⁹ reported in rat striatal slices. However, the interpretations of these results are complex due to their different individual effects on neurotransmitter uptake. At low concentrations the effect appears synergistic, whereas at higher concentrations, the effect appears antagonistic (data not shown). This is a phenomenon previously described by Berenbaum¹⁴, and emphasizes the complex nature of mixture effects, even when studying only binary mixtures.

In this study, we mainly discovered additive effects, but we also got results indicating synergistic interactions. Even though synergism is the main concern this should not take attention away from the importance of additive effects.. It is demonstrated that a mixture of xenoestrogens with the individual constituents present in levels well below their individual NOEC levels, produce a significant effect due to additive effects alone.⁷ The fact that these three groups of compounds investigated in this report may elicit interactive effects on systems in the brain is therefore of great importance.

References

1. Mariussen E, Fonnum F. Crit. Rev. Toxicol. 2006;36:253
2. Gochfeld M. Ecotoxicol Environ Saf. 2003;56:174
3. Schantz SL, Widholm JJ, Rice DC. Environ Health Perspect. 2003;111:357
4. Roegge CS, Schantz SL. Neurotoxicol Teratol. 2006;28:260.
5. The Danish Veterinary and Food Administration. FødevareRapport 2003; 12:1
6. Eriksson P, Fischer C, Fredriksson A. Organohalogen compounds 2003;61: 81
7. Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A Environ Sci Technol. 2002 15;36: 1751
8. Klaassen C.D.[ed] 2001 6th. Ed. McGraw-Hill
9. Bemis JC, Seegal RF. Environ Health Perspect. 1999;107:879
10. Brookes N., Toxicology 1992;76:245
11. Loewe S. Muischnek, H. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 1926;114:313
12. Mariussen E, Fonnum F. Neurochem Int. 2003;43:533
13. Bogen IL, Boulland JL, Mariussen E, Wright MS, Fonnum F, Kao HT, Walaas SI. J Neurochem. 2006 96:1458
14. Berenbaum MC. Pharmacol Rev. 1989;41:93
15. Greco W, Unkelbach HD, Pösch G, Sühnel J, Kundi M, Bödker W. Arch. Compl. Env. Stud. 1992;4:65

Andersen IS^{1*}, Haugstad, K^{1*}, Fonnum F¹, Mariussen E²

¹ University of Oslo, Institute for Basic Medicine, P.O. Box 1112 Blindern N-0317 Oslo, Norway, ² Norwegian Institute for Air Research (NILU), P.O. Box 100, N-2027 Kjeller, Norway. *Andersen and Haugstad have contributed equally to the manuscript.

Introduction

The environmental toxicants polychlorinated biphenyls (PCBs), brominated flame retardants (BFRs) and methylmercury (MeHg) often appear in mixtures. Even though the levels of the individual compounds implies no adverse effects, the combinatorial effects may be toxic¹. The possibility of additive and synergistic effects between many pollutants is of concern and normally, risk assessment does not take this into account. It is known that MeHg, PCBs and some BFRs exert neurotoxic effects through their influence on neurotransmitter transport^{2,3} (Fig 1). The aim of this study was to elucidate possible effects of combinations of these three classes of substances on dopamine and glutamate uptake in rat brain preparations.

Materials and Methods

Preparation of synaptosomes and synaptic vesicles

Rat brain synaptosomes and synaptic vesicles were prepared from male Wistar rats as described in detail previously^{5,6}. Assay for uptake of glutamate and dopamine into synaptosomes and synaptic vesicles

High affinity uptake of dopamine and glutamate in synaptosomes and vesicles was determined by standard procedure in Tris-Krebs buffer and Hepes-buffer, respectively, as described previously^{5,6}.

Löewe additivity model

To characterize the type of interaction in this system, we used the method of isoboles, based on the theories of Löewe and Muischnek⁷. The method is valid for any binary mixture, independent of the form and slope of their individual dose-response curves⁸. Mixtures showing Löewe additivity, can be described by equation (Eq 1)⁸. D_1 and D_2 are the doses of the individual compounds giving a defined effect alone; d_1 and d_2 are the doses giving the same defined effect in mixture. From the dose-response curves for the single compounds, we selected a suitable effect level (IC₂₀ or IC₂₅). We then made binary mixtures with a concentration ratio of the two compounds equivalent to their individual IC values.

$$\frac{d_1}{D_1} + \frac{d_2}{D_2} = 1$$

Eq 1

Bliss independence model

The same interaction system was also tested with the method of Bliss⁹. This method uses theories from the field of probability describing the null reference model for non-interactive combined effect by equation (Eq 2). fa_1 , fa_2 and $fa_{1,2}$ are the fractions of the total effect for the substances a and b, and a combination of these, respectively.

$$fa_{12} = fa_1 + fa_2 - fa_1 fa_2$$

Eq 2

Results and Discussion

Table 1. Calculated IC₂₀ and IC₂₅ values for the inhibition of dopamine* and glutamate** uptake in rat brain synaptic vesicles and synaptosomes, respectively. Data are given in $\mu\text{M} \pm \text{SEM}$.

	MeHg	A1254	PCB153	HBCD
Vesicles* (IC 20)	2.1 ± 0.1	10.7 ± 1.2	13.6 ± 3.7	5.2 ± 1.1
Synaptosomes** (IC 25)	0.16 ± 0.02	2.5 ± 0.2	6.9 ± 0.1	0.52 ± 0.08

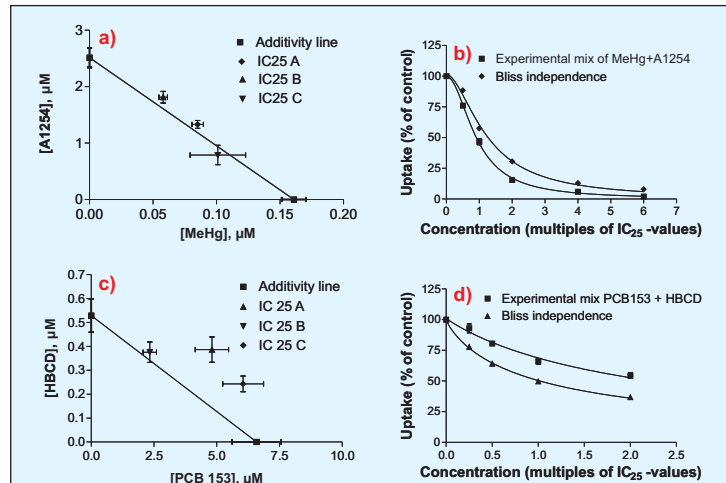


Fig 2 Mixture effects on 3H-Glutamate uptake in synaptosomes. Graph a) and b) shows the relationship between MeHg and A1254 based on the method of Löewe and the method of Bliss, respectively. Graph c) and d) shows the relationship between PCB153 and HBCD based on the method of Löewe and the method of Bliss, respectively. All points represented as mean \pm SEM, $n > 3$

Both the Loewe additivity model and the Bliss independence model suggest that MeHg and A1254 act in an additive manner on inhibition of synaptosomal re-uptake of glutamate (Fig 2 a/b). For PCB153 and HBCD both models suggest a trend towards a weak antagonistic effect (Fig 2 c/d).

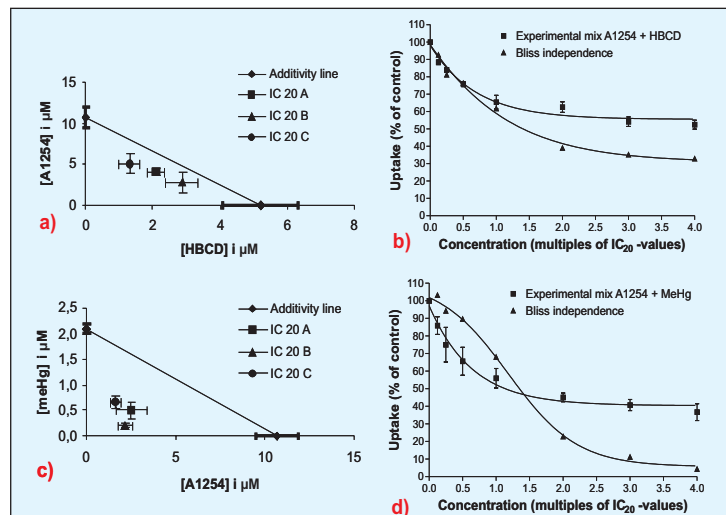


Fig 3 Mixture effects on 3H-dopamine uptake in synaptic vesicles. Graph a) and b) shows the relationship between HBCD and A1254 based on the method of Löewe and the method of Bliss, respectively. Graph c) and d) shows the relationship between A1254 and MeHg based on the method of Löewe and the method of Bliss, respectively. All points represented as mean \pm SEM, $n > 3$

Both the Loewe additivity model and the Bliss independence model suggest that low concentrations of HBCD and A1254 act in an additive manner on inhibition of vesicular re-uptake of dopamine (Fig 3 a/b). For higher concentrations of HBCD and A1254 the Bliss model suggest a trend towards a weak antagonistic effect (Fig 3 b). Both the Loewe model and Bliss model suggest that low concentrations of A1254 and MeHg act in a synergistic manner (Fig 3 c/d). For high concentrations of A1254 and MeHg the Bliss model suggest a trend towards an antagonistic effect (Fig 3 d).

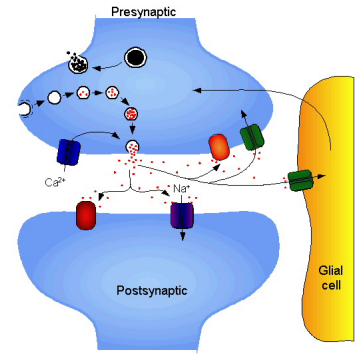


Fig. 1. Nervous stimulus open and trigger exocytosis of neurotransmitters from small synaptic vesicles. Released neurotransmitters is stopped by re-uptake or by degradation. Inside the nerve terminal the neurotransmitters are taken up and stored in synaptic vesicles by carrier proteins 4.

Conclusion

- Selected organohalogenes and MeHg inhibit uptake of dopamine and glutamate in vesicles and synaptosomes respectively
- To our knowledge, this is the first study showing that MeHg inhibits uptake of dopamine in synaptic vesicles
- The three groups of the major environmental toxicants investigated may elicit interactive effects, even synergism
- Interactive effects was dependent on concentration level and ratio of selected chemicals
- Loewe additivity model and Bliss independence model gave corresponding results
- Even though synergism is the main concern, this should not take attention away from the importance of additive effects

References

- 1 The Danish Veterinary and Food Administration. FødevareRapport 2003; 12:1
- 2 Mariussen E, Fonnum F. Crit. Rev. Toxicol. 2006;36:253
- 3 Gochfeld M. Ecotoxicol Environ Saf. 2003;56:174
- 4 Masson J, Sagné C, Hamon M, El Mestikawy S. Pharmacol Rev 1999;51:439
- 5 Mariussen E, Fonnum F. Neurochem Int. 2003;43:533
- 6 Bogen IL, Boulland JL, Mariussen E, Wright MS, Fonnum F, Kao HT, Walaas SI. J Neurochem. 2006;96:1458
- 7 Loewe S, Muischnek, H. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 1926;114:313
- 8 Berenbaum MC. Pharmacol Rev. 1989;41:93
- 9 Bliss CI. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. Ann Appl Biol. 26:585