

## Bioassays voor neuroactieve stoffen in water

*Astrid Reus, Tessa Pronk, Thomas ter Laak & Milou Dingemans (KWR)*

**Wereldwijd worden steeds meer stoffen met mogelijk nadelige effecten op het zenuwstelsel in het oppervlaktewater gevonden. Toch worden er nauwelijks testen toegepast voor effectmetingen van de chemische waterkwaliteit op het gebied van neurotoxiciteit. Voor de watersector zijn testmethoden die gebruik maken van menselijke of dierlijke zenuwcellen en modelorganismen (bioassays) in principe beschikbaar. De modellen en technieken die geschikt zijn voor toepassing worden in dit artikel besproken. Aanbevolen wordt om de ontwikkelingen op het gebied van bioassays voor neuroactieve stoffen nauwlettend te volgen. Deze kennis draagt bij aan het toekomstig implementeren van neurotoxiciteitstesten voor waterkwaliteitsmonitoring.**

Wanneer blootstelling aan een stof – bijvoorbeeld via voeding of milieu – het functioneren van het zenuwstelsel op enige manier verandert, is er sprake van neurotoxiciteit. Vooral tijdens de (vroeg) ontwikkeling zijn mens en dier hier gevoelig voor. In het aquatisch milieu worden verschillende stoffen gevonden die een effect kunnen hebben op het functioneren van het zenuwstelsel, zoals gewasbeschermingsmiddelen, geneesmiddelen en (afval van) (illegale) genotsmiddelen. Om de aanwezigheid en effecten van dergelijke stoffen aan te tonen en de eventuele nadelige gezondheidseffecten te interpreteren, worden steeds meer effectgerichte testmethoden ontwikkeld, zogeheten bioassays. Deze maken gebruik van menselijke of dierlijke zenuwcellen en modelorganismen. Hoewel er wereldwijd steeds meer neuroactieve stoffen in het aquatisch milieu worden aangetroffen, zijn er nauwelijks standaardtesten voor effectmetingen op het gebied van neurotoxiciteit beschikbaar. Daarom is er een literatuuronderzoek uitgevoerd naar de op dit moment beschikbare bioassays voor neuroactieve stoffen, waarbij er vooral gekeken is in welke mate deze testen toepasbaar zijn voor de watersector.

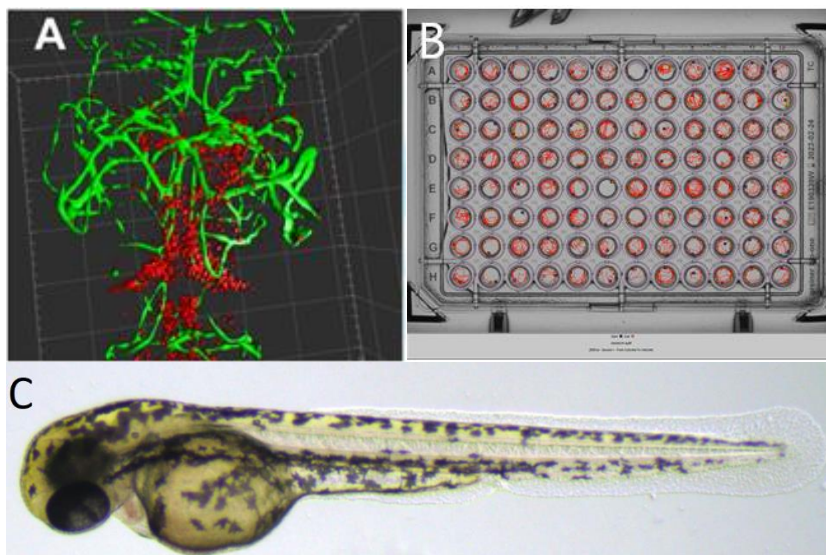
Van een aantal van de stoffen die door gebruik en lozingen in het oppervlaktewater terecht komen, is bekend dat ze de functie van het zenuwstelsel negatief kunnen beïnvloeden [1], [2], [3], [4]. Aangezien ongeveer 40 procent van het Nederlandse en 50 procent van het Vlaamse drinkwater wordt gemaakt uit (geïnfiltreerd) oppervlaktewater, is kennis over mogelijk nadelige effecten van neuroactieve stoffen op de kwaliteit van bronnen voor drinkwater essentieel. Daarnaast moeten nadelige effecten van dergelijke stoffen op de aanwezige flora en fauna in het aquatisch milieu worden vermeden [5].

Voor de toelating van stoffen uit de chemische, farmaceutische en voedingsindustrie kan neurotoxiciteit volgens richtlijnen van de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OECD) alleen worden onderzocht in dierexperimenten, omdat methoden die gebruik maken van alternatieve modelorganismen of -cellen nog niet wettelijk geaccepteerd zijn [6]. Dierstudies zijn echter tijdrovend en kostbaar en er zijn ethische bezwaren mee gemoeid (er zijn vaak veel dieren nodig). Bovendien geven de onderzochte effecten op het gedrag geen gedetailleerde kennis van het mechanisme van het onderliggende effect. Om deze redenen gaat er momenteel veel aandacht uit naar de ontwikkeling van methoden die gebruik maken van cellen en van alternatieve modelorganismen, die niet onder de strenge wetgeving rond dierproeven vallen.

### Nederlands onderzoek met bioassays

In het algemeen wordt in bioassays onderscheid gemaakt tussen *in vivo* (op levende organismen), *ex vivo* (op organen die eerder uit levende organismen zijn gehaald) en *in vitro* (gekweekte cellen, organen, of delen daarvan). *In vitro*-bioassays voor neurotoxiciteit maken gebruik van menselijke of dierlijke zenuwcellen. Dit kunnen primaire cellen zijn die direct vanaf een weefsel in kweek worden gebracht, stamcellen die in staat zijn om in een ander celtype te veranderen, of cellijnen die een verandering hebben ondergaan waardoor ze doorlopend in kweek kunnen worden gehouden. In Nederland zijn een paar onderzoeksgroepen en kennisinstituten op dit gebied werkzaam. De onderzoeksgroep Neurotoxicologie van het Institute for Risk Assessment Sciences van de Universiteit Utrecht [7] doet onderzoek naar verschillende cellijnen, primaire hersencellen en menselijke neuronen uit stamcellen die blootgesteld worden aan bijvoorbeeld gewasbeschermingsmiddelen of (illegale) genotsmiddelen. De effecten op verschillende cellulaire mechanismen die een rol spelen in het zenuwstelsel worden onderzocht door calciumsignalen en elektrische activiteit te meten. Door het gebruik van zogenoemde micro-elektrode-arrays kunnen experimenten worden uitgevoerd met netwerken van zenuwcellen die onderling elektrische pulsen kunnen doorgeven [4], [8], [9],[10], [11]. Verstoring van deze mechanismen is een aanwijzing voor neurotoxiciteit.

Bioassays die gebruik maken van intacte organismen in verschillende levensfasen (*in vivo*-testen) zijn een aanvulling op de specifieke *in vitro*-bioassays. Door de complexiteit van dergelijke organismen zijn er voor veel chemische stoffen mogelijkheden (aangrijpingspunten) om aan cellen te binden en deze te activeren of uit te schakelen. Twee veel gebruikte alternatieve modelorganismen zijn rondwormen (nematoden) en embryo's van zebrafissen, die beide niet onder de regelgeving van proefdieren vallen. De onderzoeksafdeling Environment and Health van de Vrije Universiteit (VU-E&H) [12] en het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) [13] doen onderzoek met zebrafissen (afbeelding 1C). Visembryo's worden blootgesteld aan watermonsters en individuele stoffen, zoals gewasbeschermingsmiddelen. Of watermonsters of (mengsels van) chemische stoffen een mogelijk nadelig effect hebben op het zenuwstelsel kan worden vastgesteld door het bestuderen van veranderingen in het bewegingspatroon van de visembryo's (afbeelding 1B). Er wordt verder gelet op de activiteit van enzymen die betrokken zijn bij het doorgeven van zenuwpulsen. Daarnaast worden de vissen na toevoegen van een weefselspecifieke kleuring (afbeelding 1A) visueel beoordeeld. De zebra-vis heeft een dubbele waarde, omdat de meetresultaten relevant kunnen zijn voor zowel het ecosysteem als voor de mens. De zebra-vis is geschikt voor het bestuderen van aangeboren afwijkingen en voor gedragsstudies, is redelijk kosteneffectief en heeft een redelijk korte doorlooptijd. Een nadeel van het gebruik van zowel modelorganismen als dierlijke cellijnen is dat er geen menselijke cellen of weefsels worden gebruikt, wat de vertaling van de resultaten naar mogelijke nadelige gezondheidseffecten voor de mens moeilijker maakt.



Afbeelding 1. A: voorbeeld van de toepassing van een fluorescente kleuring van bloedvaten (groen) en specifieke (GABAerge) neuronen (rood) in het ontwikkelende brein [RIVM, publicatie in voorbereiding]; B: voorbeeld van beweegpatroonanalyse voor het meten van gedragsveranderingen in zebrafisembryo's. Zichtbaar zijn de multi-wellplaat (een kunststof plaat met daarin een groot aantal buisjes oftewel "wells") en het als rode lijnen weergegeven visueel geregistreerde beweegpatroon van het embryo in de well [RIVM, publicatie in voorbereiding]; C: lichtmicroscopisch beeld van een drie dagen oud zebrafisembryo [VU-E&H]

Mogelijk nadelige effecten voor de mens kunnen ook gericht worden onderzocht met behulp van specifieke *in vitro*-bioassays met menselijke of dierlijke cellijnen. Deze bioassays zijn doorgaans behoorlijk gevoelig en hebben een relatief korte doorlooptijd, maar ze omvatten steeds één specifiek neurologisch eindpunt (target). Een micro-elektrode-array kan worden toegepast om effecten gevonden in zebrafissen en specifieke *in vitro*-assays te vertalen naar de mens. Dergelijke testen hebben een redelijk korte doorlooptijd, er zijn meerdere aangrijpingspunten aanwezig, effecten zijn soms gemakkelijk te interpreteren en het testsysteem is geschikt voor het bestuderen van nadelige effecten in de ontwikkeling. Micro-elektrode-arrays zijn echter erg kostbaar als er menselijke stamcellen worden gebruikt en ze kennen ook een brede variëteit aan minder gemakkelijk te interpreteren effecten. Een beperking van zowel *in vitro*-bioassays als micro-elektrode arrays ten opzichte van *in vivo*-bioassays is dat stofwisselingsprocessen, zoals opname, verspreiding, omzetting en uitscheiding, niet plaatsvinden.

### 'Omics'-methoden

Onderzoek met micro-elektrode-arrays en visuele beoordeling van effecten in modelorganismen vereisen specialistische expertise en zijn doorgaans niet geschikt voor high-throughput (korte doorlooptijd, grote capaciteit). Onderzoek naar chemische of biologische indicatoren, zoals toegepast in zogeheten 'omics'-technieken, is dat wel. Voorbeelden van omics-technieken zijn transcriptomics (het meten van veranderingen in genexpressie oftewel transcripten), proteomics (het meten van eiwitten, zoals enzymen) en metabolomics (het meten van omzettingsproducten oftewel metabolieten, zoals hormonen). Deze meetgegevens geven inzicht in welke effecten er plaatsvinden en welke cellulaire mechanismen hierbij meer of minder actief zijn [14], [15]. Dergelijke technieken kunnen worden gebruikt voor onderzoek naar elke vorm van toxiciteit, waaronder neurotoxiciteit [16],

[17], [18]. Chemische en biologische indicatoren zijn relatief eenvoudig te analyseren. De kwantitatieve interpretatie van relevante effecten van complexe mengsels in omics-metingen voor de menselijke gezondheid en het milieu is echter nog een grote uitdaging, net als bij andere technieken [19]. Zo moet aan de hand van een vergelijking van de gemeten waarden met databases worden vastgesteld welke cellulaire mechanismen er volgens de omics-bioassay tot uiting komen. Daarnaast zijn de keuze van het testsysteem en de blootstellingstijd belangrijk voor de interpretatie van de resultaten. Bij toepassing van omics-technieken in *in vitro*-bioassays is de uitkomst beperkter dan bij gebruik van een organisme. Anderzijds kunnen resultaten die verkregen zijn met levende organismen te ingewikkeld zijn voor een goede interpretatie. Waterkwaliteitsmonitoring met omics-technieken specifiek voor neurotoxiciteit is dan ook nog niet ver ontwikkeld. Er is op dit moment geen standaard op omics gebaseerd testsysteem (combinatie van een biologisch testsysteem en een methode) voor het duiden van effecten van neuroactieve stoffen in watermonsters.

### **Meerdere bioassays nodig**

Neurotoxiciteit is een complex proces, dat moeilijk in te schatten is met één simpele bioassay. Een getrapte teststrategie, waarin verschillende bioassays gecombineerd worden, is noodzakelijk om mogelijk nadelige gezondheidseffecten op het zenuwstelsel te kunnen duiden. Hierbij kan onderscheid gemaakt worden tussen bio-analytische tools (bioassays om blootstelling in te schatten) en bioassays voor integrale risicobeoordeling (het inschatten van nadelige gezondheidseffecten voor de mens).

Om gebruikt te kunnen worden voor waterkwaliteitsmonitoring is het nodig dat bioanalytische testen bestaan uit relatief simpele modellen, die kosteneffectief en voldoende snel uitgevoerd kunnen worden, zoals bioassays die gebruik maken van dierlijke of menselijke cellen en cellijnen. Bioassays voor integrale risicobeoordeling kunnen meer geavanceerde modellen zijn, die gebruikt worden voor verder onderzoek na prioritering op basis van de resultaten van de bio-analytische screening, bijvoorbeeld embryonale stamcellen en zebrovissen. Als meetmethode kunnen complexere en kostbaardere technieken als omics worden gebruikt, maar eenvoudige en kosteneffectieve technieken in een complex testsysteem kunnen ook volstaan.

Naast het onderscheid tussen bioanalytische testen en bioassays voor integrale risicobeoordeling kan er ook onderscheid gemaakt worden tussen bekende en onbekende (groepen van) stoffen. Stofgroepen waarvan bekend is dat ze bij mensen neurotoxiciteit veroorzaken, zoals organofosfaten, antidepressiva, oestrogenen en (illegale) genotsmiddelen, kunnen bij uitstek gemeten worden met testen die gevoelige aangrijpingspunten hebben. Wanneer het om bekende individuele stoffen gaat, bieden chemische analyse en risicobeoordeling op basis van beschikbare gegevens of een vergelijking met soortgelijke stoffen (read-across) ook uitkomst. Wanneer het onbekend is welke stoffen een watermonster bevat, of wanneer het niet bekend is of de (groepen van) stoffen neurotoxiciteit veroorzaken, kunnen meer geavanceerde modellen ingezet worden, zoals de zebroviss of micro-elektrode-arrays.

### **Conclusie en toekomst**

Verkennd onderzoek naar verschillende bioassays voor neuroactieve stoffen laat zien dat neurotoxiciteitstesten *in vitro* of in alternatieve modelorganismen toepasbaar zijn in de watersector (zie tabel 1). Welke modellen en technieken nu en in de toekomst het meest geschikt en

kosteneffectief zijn, moet op basis van aanknopingspunten uit dit verkennend onderzoek nog verder worden onderzocht. Onderzoek naar complexe mengsels met lage concentraties van verontreinigingen, zoals vaak het geval is voor watermonsters, vraagt om een hele andere aanpak dan onderzoek naar individuele stoffen. Praktisch gezien is het mogelijk om watermonsters in bioassays voor neuroactieve stoffen te bestuderen, maar de interpretatie van resultaten kan een uitdaging zijn, zeker als het gaat om uitspraken over mogelijk nadelige effecten voor de gezondheid. Om de waarschijnlijkheid van het optreden van nadelige gezondheidseffecten te kunnen inschatten, kan het uitkomst bieden om gebruik te maken van een getrapte teststrategie, waarin verschillende methoden met elkaar worden gecombineerd. Voor het toelaten van dergelijke testmethoden in de chemische, farmaceutische en voedingsindustrie zijn veel ontwikkelingen in de wet- en regelgeving gaande. Ook specifiek voor het testen van de waterkwaliteit wordt steeds meer gebruik gemaakt van effectgerichte methoden. Aanbevolen wordt om deze ontwikkelingen te blijven volgen. Voortgaand kan verder worden ingezoomd op verschillende modellen en technieken. Te denken valt aan het bepalen van een werkingsmechanisme, de noodzaak voor specifieke expertise of apparatuur, kosten en doorlooptijd. Kennis over deze eigenschappen draagt bij aan het ontwikkelen van een getrapte teststrategie en het implementeren van neurotoxiciteitstesten in waterkwaliteitsmonitoring.

Tabel 1. Overzicht van neurotoxiciteitstesten die toepasbaar zijn voor de watersector

Modellsysteem	Voordelen	Nadelen	Toepasbaarheid in de watersector
<b>Specifieke <i>in vitro</i>-bioassays</b>	Specifieke aangrijpingspunten, kosteneffectief, korte doorlooptijd, relatief gemakkelijk te interpreteren	Effecten op andere mechanismen en processen worden niet gedetecteerd, gebruik van dierlijke cellijn bemoeilijkt vertaling naar de mens, gebruik van humane cellijn is kostbaar, stofwisselingsprocessen zijn afwezig	Ja, voor screeningsdoeleinden of voor specifieke vragen
<b>Micro-elektrode-arrays</b>	Meerdere aangrijpingspunten, redelijke korte doorlooptijd	Interpretatie vergt specialistische kennis, gebruik van dierlijke cellijn bemoeilijkt vertaling naar de mens, gebruik van humane cellijn is kostbaar, stofwisselingsprocessen zijn afwezig	Ja, als brug tussen specifieke <i>in vitro</i> -bioassay en alternatief modelorganisme
<b>Bioassays in alternatieve modelorganismen (bv. zebra vis)</b>	Meerdere aangrijpingspunten, stofwisselingsprocessen aanwezig, redelijk kosteneffectief, relatief korte doorlooptijd	Vertaling naar de mens kan lastig zijn	Ja, voor vervolgonderzoek of als het niet bekend is welke stoffen het watermonster bevat
<b>Omics-technieken (bv. transcriptomics)</b>	Meerdere aangrijpingspunten, vergelijking van het complete genoom mogelijk, kan een kostenbesparing opleveren	Effecten zijn niet gemakkelijk te kwantificeren en te interpreteren, relatief kostbaar	Mogelijk, moet voor neurotoxiciteit nog verder worden onderzocht

Deze bijdrage is tot stand gekomen dankzij het collectieve onderzoeksprogramma van de Nederlands-Vlaamse drinkwaterbedrijven (BTO). De auteurs danken Jessica Legradi (VU), Harm Heusinkveld (RIVM), Nynke Kramer (UU) en Remco Westerink (UU), Ron van der Oost (Waternet) en Tineke van der Velden-Slootweg (HWL) voor hun bijdragen aan deze publicatie.



Het volledige rapport is te vinden via <https://library.kwrwater.nl/publication/61197212/>.

## Referenties

1. Kools, S.A.E., Loon, A.H., Sjerps, R.M.A., Rosenthal, L.P.M. (2019). *De kwaliteit van bronnen van drinkwater in Nederland*. KWR rapport 2019, KWR 2017.072
2. Dingemans, M.M. et al. (2016). 'Chronic 14-day exposure to insecticides or methylmercury modulates neuronal activity in primary rat cortical cultures'. *Neurotoxicology* 2016, 57: 194-202.
3. Hondebrink, L., Zwartsen, A., Westerink, R.H.S. (2018). 'Effect fingerprinting of new psychoactive substances (NPS): What can we learn from in vitro data?' *Pharmacol Ther.* 2018, 182:193-224.
4. Leeuw, V.C. de et al. (2019). 'Differential effects of fluoxetine and venlafaxine in the neural embryonic stem cell test (ESTn) revealed by a cell lineage map'. *Neurotoxicology*. 2019, 76:1-9.
5. Legradi, J.B. et al. (2018). 'An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment'. *Environ Sci Eur.* 2018, 30(1): 46.
6. Bal-Price, A. et al. (2018). 'Recommendation on test readiness criteria for new approach methods in toxicology: Exemplified for developmental neurotoxicity'. *ALTEX*. 2018, 35(3):306-352.
7. [www.neurotoxicology.nl](http://www.neurotoxicology.nl)
8. Heusinkveld, H.J., Vliet, A.C. van, Nijssen, P.C., Westerink, R.H. (2016). 'In vitro neurotoxic hazard characterisation of dinitrophenolic herbicides'. *Toxicol Lett.* 2016, 252:62-69.
9. Heusinkveld, H.J., Westerink, R.H.S. (2017). 'Comparison of different in vitro cell models for the assessment of pesticide-induced dopaminergic neurotoxicity'. *Toxicol In Vitro*. 2017, 45(Pt 1):81-88.
10. Zwartsen, A., Hondebrink, L., Westerink, R.H. (2019). 'Changes in neuronal activity in rat primary cortical cultures induced by illicit drugs and new psychoactive substances (NPS) following prolonged exposure and washout to mimic human exposure scenarios'. *Neurotoxicology* 2019a 74:28-39.
11. Zwartsen, A. et al. (2019). 'Differential effects of psychoactive substances on human wildtype and polymorphic T356M dopamine transporters (DAT)'. *Toxicology*. 2019b 15;422:69-75.
12. <https://science.vu.nl/en/research/environment-and-health/research-topics/mechanism-of-toxicity/index.aspx>
13. [www.rivm.nl/rivm/organisatie/centrum-gezondheidsbescherming](http://www.rivm.nl/rivm/organisatie/centrum-gezondheidsbescherming)
14. Berninger, J.P. et al. (2014). (2014). 'Using Transcriptomic Tools to Evaluate Biological Effects Across Effluent Gradients at a Diverse Set of Study Sites in Minnesota'. *USA Environ. Sci. Technol.* 2014, 48:(4) 2404–2412.
15. Xia, P. et al. (2017). 'Benchmarking Water Quality from Wastewater to Drinking Waters Using Reduced Transcriptome of Human Cells'. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51(16): 9318–9326.
16. Karri, V. et al. (2018). 'Differential protein expression of hippocampal cells associated with heavy metals (Pb, As, and MeHg) neurotoxicity: Deepening into the molecular mechanism of neurodegenerative diseases'. *J. Proteomics*. 2018, 187:106-125.
17. Martyniuk, C.J., Popesku, J.T., Chown, B., Denslow, N.D., Trudeau, V.L. (2012). 'Quantitative proteomics in teleost fish: insights and challenges for neuroendocrine and neurotoxicology research'. *Gen Comp Endocrinol.* 2012, 176(3):314-320.
18. Schultz, L. et al. (2012). 'Evaluation of drug-induced neurotoxicity based on metabolomics, proteomics and electrical activity measurements in complementary CNS in vitro models'. *Toxicol In Vitro* 2015, 30 (1 Pt A): 138-165.

19. Altenburger, R., Scholz, S., Schmitt-Jansen, M., Busch, W., Escher, B.I. (2012). 'Mixture Toxicity Revisited from a Toxicogenomic Perspective'. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46(5): 2508–2522.