

---

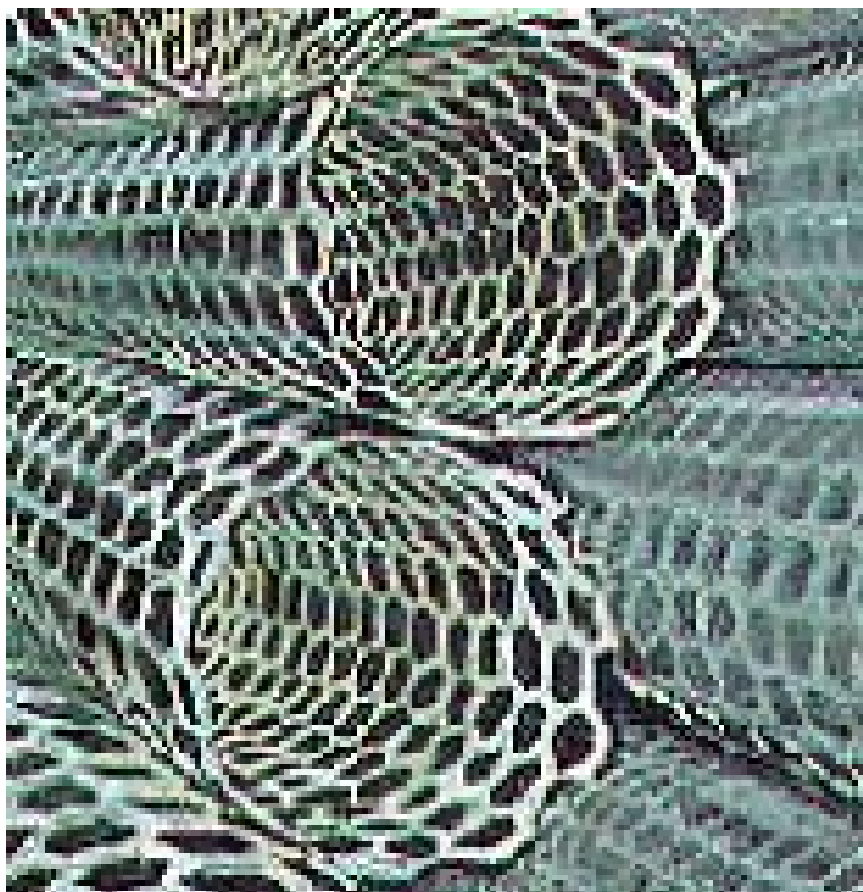
# ◇ TOKSIKOLOGEN ◇

---

*Årgang 16*

*Nr. 2 september 2006*

---



## Innhold:

<b>Leder</b> .....	3
Av Steinar Øvrebø	
<b>På mitt skrivebord</b> .....	4
Av Jørgen Stenersen	
<b>Insulinresistens i humane skjelettmuskelceller i kultur: Gunstige metabolske effekter av omega-3 fettsyrer</b> .....	6
Av Arild Chr. Rustan	
<b>NANOTIDSALDEREN - fremtiden er her – men vet vi nok om den?</b> .....	11
Av Vibeke Ansteinsson	
<b>Nanopartikler – En ny helsefare?</b> .....	12
Av Johan Øvrevik	
<b>Produserte nanopartikler i jord og vann. Mulige økotoksikologiske effekter</b> .....	16
Av Erik Joner	
<b>Nanopartikler i arbeidsmiljø</b> .....	19
Av Heidi Uppstad	
<b>Stemningsrapport fra grillfest i Frognerparken 26/06-06</b> .....	22
Av Vibeke Ansteinsson og Steinar Øvrebø	
<b>Flått og sykdom</b> .....	23
Av Solveig Aamodt	
<b>QUIZ</b> .....	26
Av Marius Gudbrandsen	
<b>Kort oppdatering fra toksmiljøet ved UiO</b> .....	27
<b>Poulssonprisen</b> .....	27
<b>Nylig fullførte cand. scient.- og masteroppgaver fra NTNU</b> .....	28
Genotoksiske effekter i rotspisser av raigras ( <i>Lolium multiflorum</i> ) dyrket i avfallsekspertonert jord.....	28
Induksjon av CYP1A som biomarkør for de organiske miljøgiftene PCB og PAH: Utvikling av en evalueringsstrategi for binære blandinger.....	29
Brominated flame retardants in harbour seals ( <i>Phoca vitulina</i> ), herring gulls ( <i>Larus argenatus</i> ) and Atlantic cod ( <i>Gadus morhua</i> ) from the outer Oslofjord, Norway, with special emphasis on biomagnification.....	30
Brominated flame retardants (BFRs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and thyroid hormones in free-ranging Atlantic cod ( <i>Gadus morhua</i> ).....	31
Bioaccumulation and Biomagnification of Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and Hexabromocyclododecane (HBCD) in an Arctic Marine Food Chain.....	32
Aktivitet av antioksidant-enzymene superoksid dismutase (SOD) og catalase (CAT) i ørret ( <i>Salmo trutta</i> ), eksponert for tungmetaller i sitt naturlige miljø.....	33
Cytochrome P-4501A as a biomarker for the organic environmental pollutants PAH and PCB; development of strategies for evaluation of complex mixtures.....	34
Development of a method for detecting DNA strand breaks caused by metal exposure.....	35
Meitemark ( <i>Eisenia fetida</i> ) som bioindikator for tungmetallforurensning i jord?.....	36

## Leder

*Av Steinar Øvrebø*

Fotball VM og sommaren er over. Fotball VM viste at engasjementet blant nordmenn er på topp når noko interesserar dei. Når ein prøver å samle deltakarar til eit kveldsmøte eller grillfest så blir ein litt missunneleg på det engasjementet folk viser for fotball. Eg står på farten til Eurotox i Cavtat/Dubrovnik i Kroatia som eg håper blir eit godt møte.

Toksikologiseksjonen arrangerte grillkveld i Frognerparken måndag 26 juni og det kom om lag 17 medlemmer frå foreiningane våre. Veret spelte på lag med oss og vi blei oppmuntra til å arrangere grillfest neste år også. To tema med toksikologisk relevans i høve grilling er helsefare ved å ete grilla mat og eventuell forureining ved bruk av grill i tettbygde stork. I år så hadde styret ein diskusjon om bruk av eingangsgrill kontra fellesgrill. På tampen av arrangementet så stilte NSFT leiaren Ketil Hylland med fellesgrill (takk Ketil). Det vil seie at vi tok ansvar for miljøet. Når det gjeld helsefaren så hadde Inger-Lise Steffensen utarbeidd skriftleg rettleiing korleis ein grillar for å redusere helsefaren til eit minimum.

Eit av haustens høgdepunkt for toksikologane blir Poulsson forelesninga som i år skal haldast av Erik Dybing. Som vanleg vil det bli arrangert eit møte i samband med Poulsson forelesninga med tema som høver til forelesninga. Programmet og tidspunkt vil bli kunngjort seinare.

På sumartid må det verke kjølande å tenke på Vintermøtet. Programmet er framleis ikkje ferdig. Toksikologiseksjonen har planer om symposium over temaet risikovurdering, kanskje denne gongen med talarar frå utlandet, sett av tida i januar 2007. Vi trur at risikovurdering er det fellesemnet som famnar flest toksikologar, er toksikologane einige?

Det er under arbeid ei stortingsmelding om helse- og miljøfarlige kjemikalie og miljøvernministeren inviterte i det høvet til eit ope møte 3. mai for å få innspel til meldinga, for meir informasjon sjå MD nettsider:

<http://odin.dep.no/md/norsk/tema/forurensning/miljogifter/022001-230066/dok-bn.html>

Innhaldet i meldinga vil truleg vere av interesse og betydning for mange av medlemmene våre. På dette møtet, sjå MD nettsida over, var representantar for fleire miljøorganisasjonar, partane i arbeidslivet og ekspertar frå tilsyn og statsinstitusjonar tilstades. NSFT som organisasjon var ikkje representert, men Norsk Kjemisk Selskap var derimot representerte. Mange av medlemmene våre deltek via arbeidsplass i høyringar og er med og gjev ekspertråd, men burde vi som organisasjon vere med og gi råd, kome med høyringsråd og vere aktive? Ofte så er det høve til å kome med 'høyringsutalelser' utan invitasjon. Stortingsmeldingar er det nok meir avgrensa uttalerett, men som her kunne vi nok ha bedt om å bli invitert. Skal vi bli meir aktive på dette området?

Fortsett god sommar, eller seinsommar som det nok vert når de les dette. Hald dykk oppdatert og les på <http://nsft.net>

Steinar Øvrebø

Leiar toksikologiseksjonen

– det er framleis mogeleg å kome med kommentarar til oss.

[steinar.ovrebo@stami.no](mailto:steinar.ovrebo@stami.no)

## På mitt skrivebord

Av Jørgen Stenersen

I dag skal jeg for en gang skyld skrive om meitemark. Her har jeg nemlig liggende abstractskatalogen fra "The 8th international symposium on earthworm ecology 4th-9th september", Krakow, Polen. Marius Gudbrandsen, Solveig Aamodt og undertegnede utgjorde den norske delegasjon. Marius og Solveig snekret sammen to flotte postere.

Nå tenker nok alle farmakologene og legene som følger intenst med i Toksikologen at meitemarkøkologi er sære greier som ikke har noe spesielt med toksikologi å gjøre. De har rett i den første antakelsen, men tar skammelig feil i den andre. Det aller meste som nå presenteres har en molekylærbiologisk og immunologisk vinkling, og er av økotoksikologisk, eller generell toksikologisk betydning. Men selvsagt er det stadig interessante innlegg som illustrerer at "Darwin hadde rett" – altså at meitemark har stor betydning for jordkvalitet, for å undertrykke plantepatogene sopp og bakterier osv. Lumbricidologiens 'wonderboy', Clive Edwards, Ohio State University, ga et svært interessant paper om dette tema – til og med ekstrakter fra "vermikompost" hadde en (positiv) hemmende virkning på ulike plantepatogener i mange kulturer.

Her var, som vanlig, mye "nice-to-know"-forskning. Dvs. en del resultater som gir kunnskap vi strengt tatt ikke behøver, men som er greit å vite når vi har den, og som er viktig for å holde forskere aktive i tider mellom de helt store ideer. Noe ny kunnskap overskred "nice-to-know"-nivået: Taxonet *Allobophora chlorotica* har alltid vært oppfattet som en art. Så viser det seg at den røde og den grønne varianten, ikke bare må oppfattes som to arter, men at de innbyrdes må splittes opp i to, slik at vi kanskje har fire arter eller flere. Her har vi altså arter som ser helt like ut og som lever

sammen i samme habitat! De har nok sikkert oppstått på grunn av geografisk isolasjon, og har siden kommet sammen igjen. Riktig arts angivelse er altså avhengig av at man på hvert enkelt individ foretar TGGE-analyse av 12S- gen. Segmenter på 585 basepar av mitokondriell cytokromoksidase av individer innenfor samme fargevariant avslørte at her hadde vi sannsynligvis to arter. (Jeg fant jo noe liknende for artskomplekset *Eisenia fetide/Eisenia andrei* basert på gelektroforese av esteraser i sin tid og fulgte årvåkent med på King et al.s foredrag om dette. (Tenk om dyrestallen blandet rotter og mus i pattedyrtoksikologiske forsøk).

Meitemark må ha et ekstremt effektivt forsvar mot mikroorganismer. Døde mark som ligger i jorda råtner i løpet av et par dager, mens de levende ikke råtner. Forgiftning kan imidlertid føre til at bakparten råtner). Det forskes mye på meitemarkens immunsystem. Har dette betydning utover meitemarkens ve og vel? Iallfall er det verdt å merke seg at små peptider (penta-, og hekso-) som finnes i coelomvæsken, har antimikrobiell effekt. Coelomicyttene i meitemark er lett tilgjengelige og utmerket til mer generelle cellebiologiske og immunologiske studier. Så vidt jeg forstod er immunsystemet konstitutivt, men er både cellulært og humoralt. Meitemark kan folgelig ikke vaksineres, eller bli allergiske.

Marius kunne ha kalt posteren sin: How to train earthworms to tolerate mercury. Han viste bl. annet at kortvarig og suletal eksponering for  $Hg^{++}$  førte til at de tålte mer kvikksølv ved senere behandling. Samtidig viste han at høye eksponeringer får GSH-nivået til å fly i taket. Her har vi opplagt en kandidat som biomarkør (glutationsyntase?). Kanskje kvikksølv derved gjør marken mer motstandsdyktig overfor andre utfordringer som varme/kulde etc. Den økede GSH-konsentrasjonen er ikke direkte assosiert med kvikksølvtoleranse. Denne kan heller skyldes økt tider av metallotionein (som ikke ble bestemt).

Solveig viste at en av acetylcholinesterasene i meitmark ikke fikk tilbake sin aktivitet – hverken ved ny biosyntese eller ved reaktivering. Kolinesterasenivået er derfor en ypperlig biomarkør for fosformidler i jord, og vil kunne påvises lenge etterat selve midlet er forsvunnet. Fenomenet innbyr til studier over hva som skal til for at fosformiddelhemmet kolinesterase nysyntetiseres og/eller reaktiveres. En forskningsgruppe i Avignon, Frankrike jobber med samme sak, Solveig drar nok dit med tid og stunder.

Kineserne gjorde seg meget bemerket og forsøkte å ”shanghaie” neste workshop. Imidlertid ble styringen av dette foreslått overtatt av vitenskapskomiteen til denne denne workshopen. Dette er, tror jeg, første gang de er slik på banen. Noen av bidragene deres var opplagt interessante. Vi lærte om bruk av meitmark i kinesisk medisin. Tørket og knust meitmark har i 2300 år vært et viktig medikament under navnet lidong, som var et stort handelsprodukt ettersom det angivelig skulle hjelpe mot en rekke sykdommer.

## Insulinresistens i humane skjelettmuskelceller i kultur: Gunstige metabolske effekter av omega-3 fettsyrer

Av Arild Chr. Rustan, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

**Hovedmålet** med vår forskning er å studere mekanismer for insulinresistens i human skjelettmuskulatur induisert ved kronisk hyperglykemi/hyperinsulinemi og med ulike typer fettsyrer. Vi undersøker hvordan insulinresistens påvirker glukose- og fettomsetningen i cellene, om dette skyldes eller resulterer i endret genekspressjon av bestemte gener viktige for cellenes energi-omsetning, og hvilke intracellulære signalveier som påvirkes.

### Bakgrunn

Utviklingen av diabetes mellitus er nærmest epidemisk. På verdensbasis har omkring 200 millioner mennesker sykdommen i dag, og det forventes at antallet nesten fordobles innen år 2030. Diabetes defineres som en tilstand hvor karbohydrat- og lipidmetabolismen er utilstrekkelig regulert av insulin. Det omfatter både type 1 og type 2-diabetes, hvorav type 2 er dominerende.

Kun 5-10 % lider av type 1. Ved type 1 diabetes er  $\beta$ -cellene i pancreas (bukspyttkjertelen) destruert på grunn av en autoimmun reaksjon. Pasientene er derfor ikke i stand til å produsere eget insulin, og er helt avhengig av eksogen tilførsel. Type 2-diabetes derimot skyldes en kombinasjon av sviktende insulinproduksjon og mangelfull effekt av insulinet ute i kroppen. Tidlig i utviklingen av type 2-diabetes observeres redusert følsomhet for insulin i skjelettmuskulatur, fettvev og lever. Disse organene responderer ikke lenger som tidligere på normale konsentrasjoner av sirkulerende insulin, dvs. de er blitt insulinresistente. Insulinstimulert glukosetransport og -omsetning blir redusert i skjelettmuskulatur, antilipolytisk effekt av insulin i fettvev går ned og den hemmende effekten som insulin har på glukoseproduksjon i lever reduseres. Følgene blir da hyperglykemi, kompensatorisk hyperinsulinemi og forstyrrelser i blodlipidene (høye triglyserider, redusert HDL-kolesterol). Insulinresistens opptrer på et tidlig stadium i utviklingen av type 2-diabetes, før glukoseintoleranse og  $\beta$ -cellesvikt, og antas å være en avgjørende faktor for utviklingen av sykdommen (Figur 1).

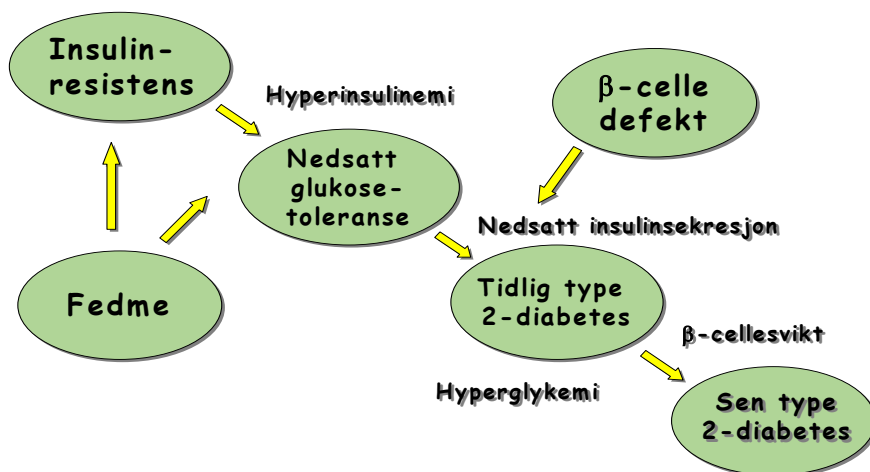


Fig.1

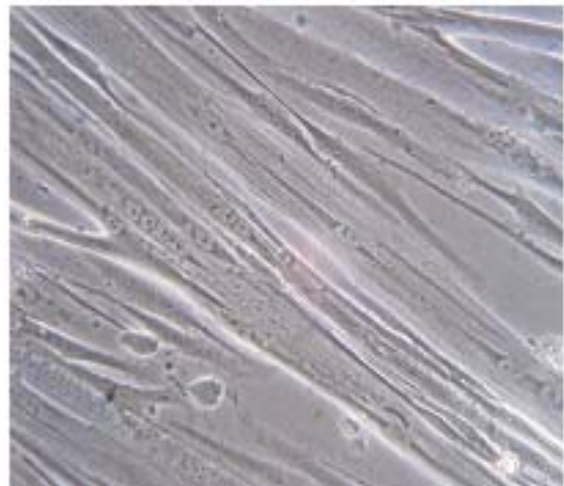
Kompensatorisk hyperinsulinemi oppstår, men etter hvert kan ikke den kompensatoriske insulinproduksjonen veie opp for den underliggende insulinresistensen, slik at glukoseintoleranse og type 2-diabetes manifesteres. Insulinproduksjonen avtar også med tiden, og ved fullt utviklet type 2-diabetes sees både insulinresistens og pankreas  $\beta$ -celle-dysfunksjon. Type 2-diabetes er den vanligste formen for diabetes i den vestlige verden, og det er en sykdom i sterk vekst som bidrar betydelig til sykkelighet og dødelighet i befolkningen. Fedme, lite mosjon, økende alder samt arvelige faktorer disponerer for sykdommen. Ved insulinresistens vil særlig skjelettmusklenes evne til å ta opp glukose som respons på insulin reduseres. Mekanismene som ligger til grunn for redusert glukoseopptak er ikke fullstendig klarlagt, men frie fettsyrer og andre lipider, samt hyperglykemi er foreslått som viktige årsaksfaktorer.

### Skjelettmuskelceller

Vi valgte å etablere humane skjelettmuskelceller i kultur, primært fordi skjelettuskulaturen er helt sentral ved insulinresistens siden >80 % av det insulinstimulerte glukoseopptaket skjer her. Vi har utviklet en metode for dyrking av humane skjelettmuskelceller i kultur ved Farmasøytisk institutt. I hovedtrekk blir myeloblaster (satelittceller) isolert fra muskelbiopsier fra friske frivillige forsøkspersoner. Etter proliferasjonsfasen differensieres myeloblasterne til multinukleære myofibriller. Muskelcellene i denne modellen er godt differensierte, de uttrykker glukosetransportører (GLUT1,3 og 4) og har reseptorer for insulin og insulinlignende vekstfaktor-1 (IGF.1). Insulin stimulerer glukoseopptak, glykogensyntetase-aktivitet, samt pyruvat-dehydrogenaseaktivitet og glukoseoksydasjon i disse cellene. Vi har videre vist at muskelceller fra friske givere kan gjøres insulinresistente ved forbehandling med fettsyrer (palmitin- og oljesyre) eller med høye konsentrasjoner av glukose over en viss tid (Aas et al. 2005, Aas et al.

2006). Insulinresistens måles som nedsatt insulinstimulert deoksyglukoseopptak, glykogensyntese og glukoseoksydasjon. Cellene er derfor egnet som modellsystem for å studere mekanismer ved miljøutviklet insulinresistens og redusert glukosemetabolisme. I tillegg til eksperimentelt induisert insulinresistens, studerer vi skjelettmuskelceller i kultur isolert fra pasienter med type 2-diabetes og/eller fedme. Vi har således etablert et velegnet modellsystem som gjør det lett å isolere enkeltfaktorers effekt på insulinsensitiviteten i muskel. Det ligger selvfølgelig begrensninger i overførbarhet til *in vivo* situasjonen som er mye mer kompleks, men systemet gir oss unike muligheter til å studere molekylære mekanismer og potensielle angrepspunkter for nye legemidler. Fig. 2 viser bilde av humane myotuber, samt noen av de viktigste funn vi hittil har gjort ved bruk av denne cellemodellen.

### Humane skjelettmuskelceller (myotuber)



Ved bruk av denne cellemodellen:

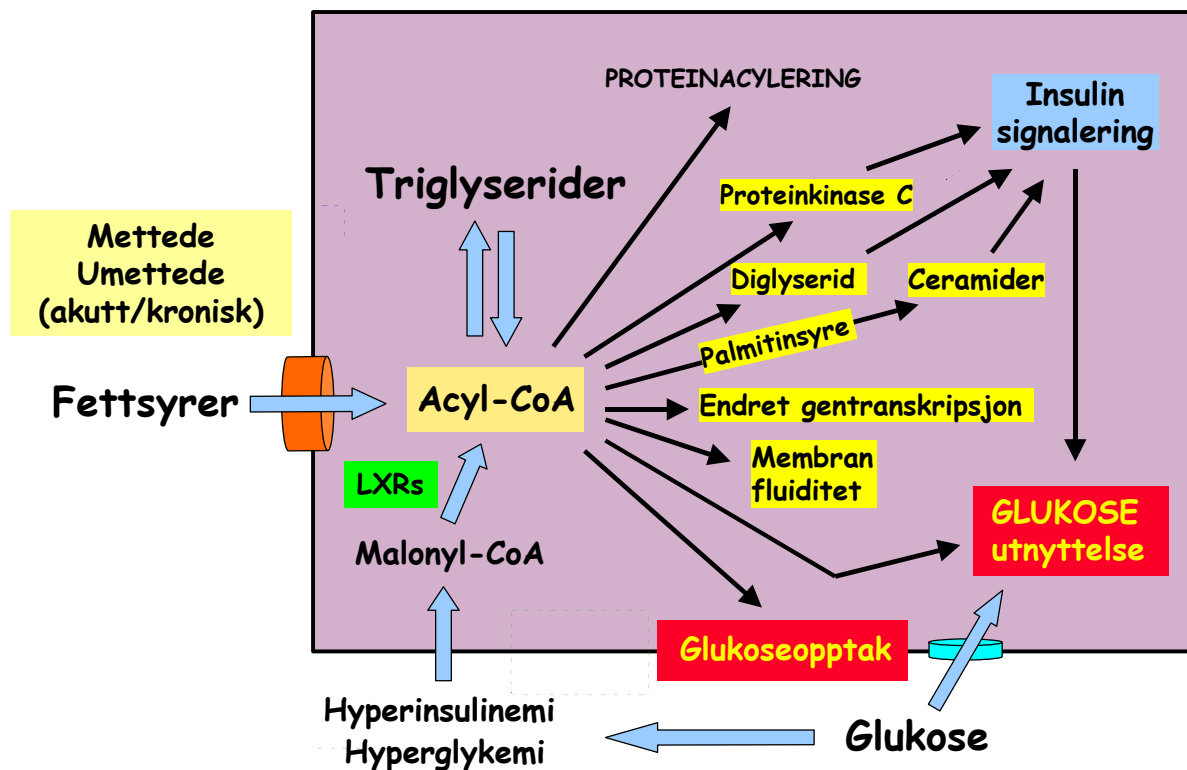
- Har vi vist at kronisk hyperlykemi alene gir redusert glukoseopptak og økt *de novo* lipogenese i skjelettmuskel
- har vi vist at vi kan skille mellom ervervede og genetiske effekter *in vitro* på bl.a. fettsyreoksydasjon som er redusert i celler fra type 2-diabetikere (Gaster et al. Diabetes 2004, 2005)

- Har vi vist at lever X reseptorer (LXRs) er involvert i akkumulering av lipider i humane myotubular og at LXRs kan spille en rolle for patofysiologien ved type 2-diabetes (Kase et al. Diabetes 2005)
- har vi vist at noen fettsyrer kan gi insulinresistens, mens flerumettede fettsyrer (PUFA) har en mer gunstig effekt på glukosemetabolismen (Aas et al. Acta Physiol Scand 2005, J Lipid Res 2006)

**Effekter av fettsyrer og mekanismer for fettsyreindusert insulinresistens**

Frie fettsyrer og andre lipider kan påvirke glukose- og lipidmetabolismen i muskel, og insulins virkning ved å innbygges i cellemembraner, ved å øke cellens innhold av ulike fettsyrederivater (acyl-CoA, diglyserider og triglyserider) (Aas et al. 2005), samt ved å øke fettsyreoksidasjonen og dermed redusere glukoseomsetningen (Fig. 3).

**Fettsyrer, hyperglykemi og utvikling av insulinresistens i skjelettmuskel - mulige mekanismer**





Det har også blitt vist at lipider direkte påvirker insulins signalveier og glykogensyntesen i muskelceller noe som indikerer at insulinresistens i hvert fall

delvis må skyldes effekter på intracellulære signalveier og enzymer. Videre er insulinfølsomhet nært knyttet til grad av umettet-  
het i membranfosfolipider, mer umettede fettsyrer i cellemembranene gir økt insulinfølsomhet. Den eksakte sammenheng mellom fettsyremønster i membranfosfolipider, akkumulering av triglyserider og andre lipider i cellene, samt cellens oksidative kapasitet er ikke særlig godt kjent.

### **Effekter av omega-3 fettsyrer på humane myotuber**

Vi har spesielt studert effekter av langkjedete omega-3 fettsyrer på fettsyreopptak, fettsyreoksidasjon, og lagring og mobilisering av muskeltriglyserider, og hvordan dette parallelt påvirker insulins signalveier og glukosemetabolismen i cellene. Våre data viser at cellene har god respons på insulin, og vi kan indusere betydelig insulinresistens (målt som nedsatt glukosetransport) i cellene når de behandles med en mettet eller monoumettet fettsyre (palmitinsyre eller oljesyre) (Aas et al. 2005). Derimot gir kronisk eksponering av omega-3 fettsyren eikosapentaensyre (EPA) økt glukoseopptak og glukoseoksidasjon i cellene, til tross for økt fettsyreopptak og syntese av cellulære lipider (Aas et al. 2006). Cellenes respons på insulin påvirkes ikke av de metabolske endringene som EPA gir. Våre funn på muskelceller kan således være viktige mhp de gunstige effekter man observerer i mennesker ved økt inntak av omega-3 fettsyrer, spesielt med tanke på type 2-diabetes og metabolsk syndrom.

Vi har også undersøkt metabolske effekter av 3-tiafettsyren tetradecylthioacetic acid (TTA) på muskel, og har funnet at denne fettsyren øker total oksidativ kapasitet i muskelcellene. TTA vil på samme tid redusere triglyseridakkumuleringen og øke glukoseopptaket i cellene, noe som kan

være viktig for lipidsenkende og antidiabetiske effekter av TTA.

### **Regulering av lever-X-reseptorer (LXR) og andre kjernereseptorer**

Dette er et prosjekt med nær tilknytning til "fettsyreprosjektet" da mange effekter fettsyrer og andre lipider skjer via regulering av gentranskripsjon. LXR-reseptorene (LXR) $\alpha$  og LXR $\beta$  er transkripsjonsfaktorer (kjernereseptorer) som er viktige for omsetningen av lipider og kolesterol i organismen. LXR regulerer i første rekke gener som er viktige for lipidlagring (lipogenese) og kolesterolhomeostase (spesielt viktig for revers kolesteroltransport). Kjente endogene LXR-ligander er oksysteroler (kolesterolmetabolitter) som er funnet i en rekke metabolske reaksjonsveier. Det er vist at insulin øker uttrykket av transkripsjonsfaktoren sterol regulatorisk-element bindende-protein-1c (SREBP-1c), at dette er gunstig for glukoseopptaket i muskel og at denne mekanismen er svekket ved type 2-diabetes. LXR-ligander kan også øke uttrykket av SREBP-1c og dermed virke som insulin "sensitizers". På den annen side kan LXR fremme lipidakkumulering (triglyseridsyntese) som muligens over tid vil føre til insulinresistens i muskel. Det er derfor viktig å kunne forstå betydningen av LXR i forhold til både fedme, insulinresistens og type 2-diabetes.

Vi har nylig vist at kronisk LXR-aktivering fører til økt opptak og oksidasjon av glukose og økt opptak og akkumulering av fettsyrer i humane skjelettmuskelceller (Kase et al. 2005). Ved kronisk LXR-aktivering av type 2-diabetiske myotuber er økningen i opptaket av fettsyrer og akkumuleringen av komplekse lipider vesentlig større enn i kontrollceller. Høyere nivåer av intracellulære lipider (særlig av triglyserider) som man ofte finner hos type 2-diabetiske pasienter kan dermed skyldes et endret reaksjonsmønster i LXR-veien. Vi har foreløpig ikke kunnet vise eksakt mekanisme her. Vi studerer for øyeblikket effekter av andre LXR-ligander på muskel energiom-

setning, og på metabolsk fleksibilitet (cellens evne til å skifte mellom fettysreoksidasjon eller glukoseoksidasjon som er redusert ved type 2-diabetes. Vi undersøker samtidig regulering av peroksisom proliferator aktiverte reseptorer (PPARs), og effekter av PPAR $\gamma$ / $\delta$ -ligander (deriblant fettsyren EPA) og LXR-ligander på mitokondriefunksjon, intramuskulær lipidakkumulering og på insulinsensitivitet. Vi vil her utnytte humane intervensjonsstudier i kombinasjon med cellulære mekanistiske studier, hvor vi dyrker muskelceller fra forsøkspersonene. For disse studiene er det etablert ny metodikk for effektivt å måle energisubstratopptak og oksydasjon i cellene vha et høyeffektivt "96-well fuel handling system".

Ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, er foruten undertegnede, professor G. Hege Thoresen og stipendiat Eili Tranheim Kase involvert i dette forskningsprosjektet. Av eksterne samarbeidspartnere på prosjektene bør nevnes førsteamanuensis Vigdis Aas, Avdeling for Helsefag, Høgskolen i Oslo, professor Christian A. Drevon, førsteamanuensis Hilde I. Nebb og stipendiat Andreas Wensaas, Avdeling for ernæringsvitenskap, Universitetet i Oslo, og forsker Michael Gaster, Odense Universitetshospital, Danmark.

#### **Aktuelle referanser**

Aas V, Rokling-Andersen MH, Wensaas AJ, Thoresen GH, Kase ET, Rustan AC (2005)

Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia. *Acta Physiol Scand.* 183: 31-41. Review.

Aas V, Rokling-Andersen MH, Kase ET, Thoresen GH, Rustan AC (2006)

Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells. *J Lipid Res.* 47: 366-74.

Kase ET, Wensaas AJ, Aas V, Højlund K, Levin K, Thoresen GH, Beck-Nielsen H, Rustan AC, Gaster M (2005) Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes* 54: 1108-1115

## **NANOTIDSALDEREN - fremtiden er her – men vet vi nok om den?**

*Av Vibeke Ansteinsson*

**I dette nummeret av Toksikologen har vi valgt å fokusere på ulike sider ved nanopartikler. Nanopartikler og luftforurensning, nanopartikler og økotoksikologi samt nanopartikler i arbeidsmiljøet. Vi ønsker med denne utgaven av Toksikologen og belyse ulike temaer som er knyttet til nanoteknologi og nanotoksikologi**

Ordet nano kommer fra gresk *nanos* som betyr dverg. Nanoteknologi er en term man bruker om teknologi og forskning hvor man opererer i nanoskala, 0,1-100nm. Teknologien er tverrfaglig og omfatter fysikk, kjemi, biologi, molekylærbiologi, medisin, elektronikk og IKT. En økende bevilgnings- og forskningsmessig fokus på nanoteknologi har medført en eksplosjon i utvikling og bruk av nanoteknologiske løsninger i hverdagsprodukter. Nanoteknologi er blant de raskest voksende forskningsområder i det 21. århundret, ved siden av bio- og genteknologi. Nanoteknologien vil ha en enorm innflytelse på samfunnet i fremtiden. Mulighetene er mange og visjonene store, men i kjølevannet av en slik kunnskapen reiser det seg også en rekke viktige etiske spørsmål særlig med hensyn på helse, miljø, biologi- og medisinvitenskapen. Kunnskapen om nanomaterialenes mulige helse- og miljøeffekter er for ufullstendig.

Nanopartikler er bare en liten del av nanovitenskapen. Nanopartikler er en svært generell definisjon og omfatter et stort antall ulike partikkeltyper som varierer i størrelse og sammensetning. *Ultrafine partikler*: kommer fra

menneskeskapt kilder (biprodukt i for eksempel dieseleksos og stekeos) eller fra naturlige kilder (for eksempel fra vulkaner og skogbranner).

*Tradisjonelle nanopartikler*: dannes for eksempel ved termisk bearbeiding av materialer, har vært brukt i flere tiår i kjemisk industri og polymerindustri, har mindre definert størrelse og form enn nye nanopartikler.

*Nye nanopartikler*: partikler som er konstruert ved å bygge med atomer og molekyler for å få materialer med bestemte egenskaper, form og størrelse

Det er knyttet stor bekymring og usikkerhet rundt bruk av nanopartikler, dette er partikler som brukes i alt fra solkrem til tannfyllinger, bildekk og skismøring. Det finnes det svært få resultater som kartlegger hvilke miljøkonsekvenser og økotoksikologiske effekter nanopartikler kan utløse. De få resultatene som finnes antyder at enkelte nanopartikler kan være både mobile, biotilgjengelige og toksiske i miljøet.

Mennesker vil komme i kontakt med disse partikler enten direkte eller via miljøet, hvor partiklene tilslutt *vil* havne. I den forbindelse har man i økende grad blitt oppmerksom på mulige uønskede helseeffekter ved eksponering for nanopartikler.

## Nanopartikler – En ny helsefare?

Av Johan Øvrevik

Avdeling for luftforurensning og støy, Divisjon for miljømedisin, Nasjonalt folkehelseinstitutt.

**Nanopartikler, forbindelser i nanometer størrelse, representerer en overgangsfase mellom faste stoffer og deres molekylære strukturer. Materialer endrer fysiske og kjemiske egenskaper når størrelsen nærmer seg nanoskala, og nanopartikler er derfor av stor vitenskapelig og kommersiell interesse. Nanoskala muliggjør imidlertid også nye toksiske effekter eller mekanismer for effekter, av allerede kjente forbindelser.**

Bruk av nanopartikler innen industri og forskning har økt enormt de siste tiårene, og de mest optimistiske estimatene anslår at nanoteknologien vil overgå den økonomiske betydning av den industrielle revolusjon. Kort oppsummert utgjør nanoteknologi et interdisiplinært fagområde basert på fysikk, kjemi, biologi, molekylærbiologi og materialvitenskap. Nanoteknologien omfatter materialer med minst en dimensjon på 100 nanometer eller mindre, og har sitt utspring fra en stadig pågående trend av "miniatyrisering" innen teknologi. Det virkelig store potensialet til nanoteknologi ligger i at når dimensjonene til et fast materiale blir svært små (nanoskala) vil de fysiske og kjemiske egenskapene til stoffet kunne endres radikalt i forhold til det samme materiale i større form. For eksempel foregår bøyning av kobber ved at 50 nm store grupper av kobberatomer beveges i forhold til hverandre. Kobberpartikler mindre enn 50 nm ansees som superharde materialer som ikke har den plastisiteten som tradisjonelt forbindes med kobber. Dette fenomenet åpner for en rekke nye materialeegenskaper, og muliggjør bruk av "gamle" materialer til en rekke nye formål. Nanovitenskap og -teknologi anses for ti-

den som et ledende innovasjonsfelt, og nanopartikler er allerede i bruk eller forventes å bli brukt innen en lang rekke av ulike produkter inkludert mat, kosmetikk, medisin, klær, elektronikk og lakk.

Den omfattende bruken eller forventede bruken av nanopartikler har også medført en kraftig økning i fokus på mulige toksikologiske egenskaper ved nanopartikler. De mest skeptiske har gått så langt som å advare om at nanopartikler kan bli den nye asbesten, ettersom det er forespeilet en svært omfattende bruk uten at potensiell toksisitet er tiltrekkelig undersøkt. Det er særlig tre hovedbekymringer som er knyttet til nanopartikler:

1. Toksisiteten av partikler synes i stor grad å være omvendt proporsjonal med partikkelstørrelse (dvs. jo mindre jo mer toksisk). Man frykter derfor at svært små mengder nanopartikler, kan være tilstrekkelige til å utløse skadelige helseeffekter.
2. Svært små partikler kan tenkes i større grad å krysse vevsbarrierer. Man frykter derfor at inhalerte nanopartikler i større grad kan nå sekundære organer som hjerte, hjerne, lever, etc. enn større partikler. Bruk av nanoteknologi i ulike sammenhenger åpner dessuten også for nye administrasjonsveier.
3. Ettersom nanomaterialer kan ha fundamentalt forskjellige fysiske og kjemiske egenskaper enn identiske materialer i større form, frykter man også at nanopartikler kan forårsake nye toksiske effekter eller mekanismer for effekter.

Partikkelstørrelse, og korrelerte parametere som antall og overflate, er sentrale for å forstå partiklers toksiske effekter. Størrelse avgjør i stor grad inhalering, deponering og eliminering av partikler. Mindre partikler

Tabell 1. Sammenheng mellom partikkelstørrelse, overflate og partikkelantall ved en gitt vekt-dose av partikler.

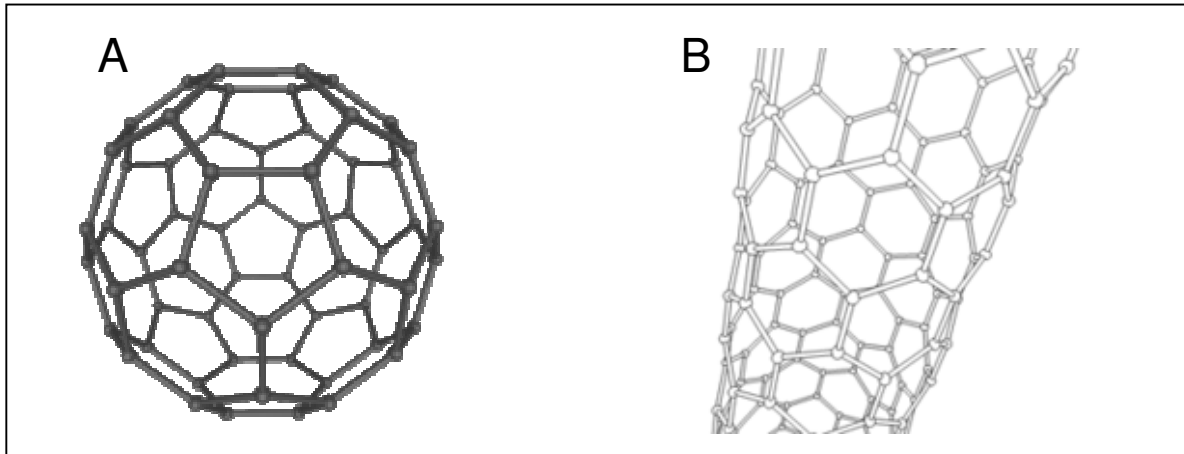
Partikkelstørrelse	Relativ overflate	Relativt antall
10 $\mu\text{m}$	1	1
1,0 $\mu\text{m}$	10	1000
0,1 $\mu\text{m}$	100	1000000

deponeres i større grad i de nedre luftveiene og alveolene. Alveolær deponering antas å være spesielt uheldig, da elimineringen av partikler fra denne regionen går langt seinere enn lengre oppe i luftveiene. Nanopartikler deponeres med betydelig større effektivitet i alveolene, enn større partikler. Et unntak er imidlertid svært små nanopartikler, under 10 nm, som hovedsakelig deponeres i de øvre luftveiene. I tillegg til betydning for deponering, påvirker også størrelsen partiklenes relative toksisitet i kontakt med celler og vev. Generelt synes toksisiteten til uløselige partikler i stor grad å være styrt av partikkeloverflaten. Siden små partikler har et høyere overflate-til-masse ratio enn større partikler, er normalt små partikler langt mer potente ved en gitt vekt-mengde enn store partikler av identisk materiale (tabell 1). Man frykter derfor at svært små mengder nanopartikler kan være tilstrekkelig til å utløse skadelige helseeffekter.

Det er imidlertid verdt å merke seg at denne "overflateeffekten" er mest relevant for sammenlikninger av partikler med identisk sammensetning eller reaktivitet. Flere studier viser at partikler med sammenlignbar størrelse/overflate, men av ulik sammensetning gjerne har ulik toksisitet, og at store partikler av et gitt materiale kan være mer potente enn mindre partikler av annen sammensetning. Dette virker kanskje ikke særlig overraskende, men det er et argument som ofte blir oversett i diskusjonen av nanopartikkeltoksitet. Allikevel er det vist i en rekke studier at relativt lite reaktive og toksiske materialer slik som ren kar-

bon kan forårsake inflammatoriske responser og celledød når de forekommer i nanopartikkelform. Det er imidlertid uklart om dosene som er nødvendig for å oppnå helseskadelige effekter er relevante.

Epidemiologiske studier av helseeffekter ved svevestøveksposering viser en klar sammenheng mellom konsentrasjoner av svevestøv og akutte dødsfall relatert til effekter på hjerte-karsystemet. Mekanismene bak dette er uklare, og flere hypoteser er fremsatt: 1) Betennelsesstoffer (cytokiner, prostaglandiner/leukotriener) fra lungene overføres til blodbanen. 2) Løselige partikkelkomponenter (metaller, pah'er, etc.) kommer over i sirkulasjonssystemet. 3) Transport av partikler over lungevevet og over i blodbanen. Den siste forklaringsmodellen fokuserer hovedsakelig på den ultrafine fraksjonen av partikler i uteluften, som har samme størrelse som industrielle nanopartikler, dvs under 100 nm (ultrafine partikler omtales også ofte som "combustion nanoparticles"). Man frykter derfor også at inhalerte nanopartikler kan transporteres over i blodbanen og nå andre organer som hjerte, lever, osv. Studier med radiomerkede nanopartikler har antydnet at en stor del av partiklene relativt rask transporteres over i sirkulasjonssystemet og deponeres i såkalte sekundære organer. Disse studiene er imidlertid svært omstridte, og nye undersøkelser kan tyde på at de observerte effektene i hovedsaklig skyldtes at radioliganden har løsnet fra partikkelen og vand-



Figur 1. To ulike nanomaterialer av rent karbon. (A)  $C_{60}$  fulleren (Buckminsterfulleren) og (B) enkeltvegget nanotube (SWCNT; singel-walled carbon nanotube). Selv om materialet er det samme, karbon, har de to nanopartiklene svært ulike egenskaper. (Illustrasjoner fra Wikipedia; <http://en.wikipedia.org>)

ret over i blodbanen, mens partiklene forblir i lungene.

Et ganske oppsiktsvekkende funn er at nanopartikler som deponeres i nesen kan bli tatt opp og fraktet til hjernen via axonal transport gjennom luktnerven. Hvorvidt nanopartikler i hjernen har noen patologisk eller klinisk signifikans er foreløpig ikke kjent. Luktnerven ser imidlertid ut til å være relativt effektiv med hensyn til overføring av nanopartikler til sentralnervesystemet, og dette er vist å kunne resultere i inflammatoriske responser i hjernen.

I tillegg til at nanopartikler kan tenkes å krysse biologiske membraner i større grad enn store partikler, innebærer den (planlagte) kommersielle bruken av nanopartikler at "nye" eksponeringsveier for partikler må vurderes. Fine ( $< 2.5 \mu\text{m}$ ) og grove ( $< 10 \mu\text{m}$ ) partikler har hovedsakelig blitt undersøkt for effekter på luftveiene, og for indirekte effekter på hjerte- og karsystemet. Med introduksjon av nanopartikler, spesielt i matvarer, kosmetikk og medisin, må man også ta høyde for opptak via mage/tarm, over hud, og via direkte injeksjoner i vev eller blodbane. Dette øker nødvendigvis antallet vev- og cellyper som kan bli eksponert, noe som igjen åpner for nye ukjente effekter av partikkel eksponering. Dermal eksponering for nanopartikler som

$\text{TiO}_2$  og  $\text{ZnO}$  i solkrem forekommer for eksempel jevnlig, men frisk hud danner en effektiv barriere som normalt hindrer opptak av nanopartikler. Imidlertid kan strekking av huden muliggjøre penetrering av mikrometerstore partikler. Skadd hud kan også gi partikler mulighet til å trenge inn i underhuden og eventuelt bli transportert til lokale lymfeknuter. Opptak gjennom tarm synes foreløpig ikke å representere noe stort problem. Studier av fullerener (figur 1) viser at 98% prosent av partiklene ble transportert ut med avføringen. Til sammenlikning ble 90% av fullerener beholdt i minst en uke etter intravenøs administrering (70% i leveren).

Den kanskje viktigste problemstillingen man står ovenfor er hvorvidt potensielle skadelige effekter av nanopartikler kan forstås ut fra "klassisk partikkeltoksikologi", eller om utviklingen av en ny toksikologisk vitenskap er nødvendig. På grunn av sin størrelse befinner nanopartikler seg i en slags overgangsfase mellom individuelle atomer eller molekyler, og deres korresponderende faste materiale. Dette kan modifisere de fysiske og kjemiske egenskapene til materialet, noe som utnyttes bevisst innen nanoteknologi. Imidlertid kan nettopp disse endrede egenskapene tenkes å

påvirke materialenes interaksjoner med biologiske vev, og generere skadelige effekter som ikke ellers ville vært mulige med samme materiale i større form. Hvorvidt dette faktisk er tilfellet er ennå uklart. Man vet imidlertid at partikler av ulike størrelse tas opp av cellene ved ulike mekanismer, og at den intracellulære lokaliseringen av partikler varierer. Enkelte nanopartikler er vist å lokaliseres til mitokondriene og forstyrre elektrontransportkjeden som kan føre til økt frigjøring av superoksidradikaler, eller påvirke permeabilitets transisjonsporten og føre til frigjøring av pro-apoptotiske faktorer.

Kunnskapen om nanopartiklers toksisitet er fremdeles svært begrenset. Det foreligger ingen rapporter om klinisk relevante toksiske effekter av nanopartikler. Dermed er det for tidlig å konkludere om hva slags helserisiko nanomaterialer representerer. Per i dag foreligger det også svært få komparative studier som kan si noe om ulike nanopartiklers relative toksisitet sammenliknet med nanopartikler med annen sammensetning eller form, eller med større partikler med kjent toksisitet (f.eks. kvarts og asbest). I tillegg gjenstår det å avklare hvorvidt nanomaterialer faktisk kan introdusere nye skadelige effekter, og om nanomaterialer fremviser endrede toksiske egenskaper sammenliknet med identiske materialer i større form. På grunn av det store omfanget av nanopartikler i bruk eller under utvikling, må man imidlertid kunne si at det er en fortjent oppmerksomhet denne stoffgruppen nå får blant toksikologer.

### **Anbefalt litteratur:**

Borm, P. J., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R. P., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdorster, E., 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC, Part Fibre. Toxicol. 3, 11.

Brown, D. M., Wilson, M. R., MacNee, W., Stone, V., Donaldson, K., 2001. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines, Toxicol Appl Pharmacol. 175, 191-199.

Donaldson, K. Stone, V., 2003. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles, Ann Ist Super Sanita. 39, 405-410.

Elder, A., Gelein, R., Silva, V., Feikert, T., Opanashuk, L., Carter, J., Potter, R., Maynard, A., Ito, Y., Finkelstein, J., Oberdorster, G., 2006. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system, Environ. Health Perspect. 114, 1172-1178.

Kurath, M. Maasen, S., 2006. Toxicology as a nanoscience?--disciplinary identities reconsidered, Part Fibre. Toxicol. 3, 6.

Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel, Science. 311, 622-627.

## **Produserte nanopartikler i jord og vann. Mulige økotoksikologiske effekter**

*Av Erik Joner, seniorforsker ved Bioforsk Jord og Miljø*

**Som for alle andre produkter som omgir oss er det klart at både råstoffer og produkter som springer ut fra ulike typer nanoteknologi i varierende grad vil ende opp i avfall, jord, vann og sedimenter. Dette åpner for muligheten av at man får en ny type miljøforurensning som vi foreløpig ikke kan se omfanget eller betydningen av.**

I utgangpunktet er det frie, produserte nanopartikler som har gitt opphav til bekymring på miljøsidene, fordi disse har fysiske og kjemiske egenskaper som gjør at de oppfører seg annerledes enn tilsvarende stoffer med større volum. Ved at et stoff deles opp i stadig mindre partikler vil for det første den spesifikke overflaten (forholdet mellom overflateareal og volum) øke dramatisk, samtidig som overflateegenskapene i seg selv kan endres idet van der Waals krefter, kvanteeffekter m.m. begynner å få betydning for hvordan de oppfører seg. For eksempel er gull inert og brukes derfor bl.a. i tannfyllinger, mens nanopartikler av gull vil være red/oks-reaktive og kan ha høy affinitet til proteiner og andre biologiske molekyler. Likeledes bruker vi for eksempel bestikk av sølv uten å ha betenkeligheter med å stikke det i munnen. Men nanopartikler av sølv er giftige og brukes i dag allerede til produkter som selvrensende vinduer og til behandling av baderomsglass, båtskrog m.m. pga. sine anti-mikrobielle egenskaper. Hva som så skjer med disse produktene når de slites av og ender opp i jord og vann er det foreløpig ingen som vet.

I avisene har vi kunnet lese om nanomaterialer som brukes i ski, golfkøller, tennisracketter o.l., og det pågår i dag en intens

forskning for å kunne utnytte karbonnanorør som konstruksjonsmateriale i framtidige produkter. Slike nanorør har en lav vekt og en svært høy bruddstyrke som vil kunne gi store vektbesparelser eller øket styrke i produkter der de inngår. Nanorør har i HMS-sammenheng blitt sett på som en ny form for asbest, idet det er snakk om lange, tynne fibre som man har vist at kan opptas gjennom lungene i testorganismer og sågar krysse cellevegger og -membraner. Kuleformede karbonpartikler med tilsvarende sammensetning (fulleren) kan også krysse barrieren mellom blodstrømmen og hjernen. Hvor stor risiko slike partikler kan utgjøre vil igjen avhenge av i hvor stor grad de opptrer som frie partikler, noe som i begrenset grad er tilfelle i produktene der de inngår eller tenkes å inngå. For f.eks. å inngå som materialer der nanorørens styrkeegenskaper utnyttes, støpes disse nemlig inn i en polymer som en armering. Brekker man f.eks. en golfkølle vil kanskje noen nanorør eksponeres i bruddflaten, men hvis armeringen fungerer som den skal vil nanorørene forbli innstøpt i bruddflatene og slipper ikke ut i miljøet. Problemet med nanorør til denne typen formål er at man ennå ikke klarer å forankre dem tilstrekkelig godt i polymeren til at de fungerer som armering. De blir rett og slett ikke brukket, men revet ut av polymeren i en bruddflate og stikkende ut av den andre (med fare for å løsne og komme ut i miljøet). Dette er da også grunnen til at nanorør ikke reelt kan utnyttes til å forsterke materialer med dagens teknologi, og de nevnte produktene nyter i praksis ikke godt av andre egenskaper enn at merkelappen "nano" tillater å skru opp prisen noen hakk.

En egenskap ved en rekke produserte nanopartikler er at de har en tendens til å aggregere. På denne måten vil de ikke opptre som frie partikler uten at man gjør noe for å dispergere dem. Dette kan dreie seg om oppløsning (suspensjon) vha. løsemidler eller surfaktanter. I økotoksikologisk sammenheng er det selvsagt viktig at man tes-



ter effekten av et stoff i en form der de giftige egenskapene ved stoffet er størst (i dette tilfellet som frie partikler), forutsatt at vi anser det som sannsynlig at stoffet kan opptre på tilsvarende form i naturen. I tillegg er det viktig å teste effekten av et stoff under fysiske og kjemiske betingelser som er så like som mulig de betingelsene som testorganismen lever under i sitt naturlige økosystem. Altså må f.eks. giftighet for jordboende organismer, muslinger og fisk testes i hhv. jord, sedimenter og vann. Men hvis man nå har problemer med å blande nanopartikler i vann (om de er hydrofobe), eller å sikre at nanopartikler opptre som enkeltpartikler og ikke aggregater i jord, så kan man feilaktig komme til å konkludere at disse partiklene ikke utgjør noen fare fordi man aldri har klart å bringe sin testorganisme i kontakt med frie nanopartikler. Dette hadde jo ikke vært noe problem om ikke det var fordi overflateegenskapene til en rekke nanopartikler kan modifiseres under produksjonen, og siden modifiseres igjen i et gitt miljø. Slike overflatemodifikasjoner kan skje kjemisk (funksjonalisering), ved å "coate" partikler med andre stoffer, eller ved å hekte på et molekyl som ikke hindrer en utstrakt eksponering av partikkelens overflate. Så blir spørsmålet hvilke toksiske egenskaper slike partikler har når de er intakte og når de så evt. modifiseres av det miljøet de slipper ut i.

Nanopartikler omfatter et stort utvalg materialer som hver kan ha en rekke anvendelser. Ut over nanorør og andre karbonbaserte partikler (fullerener) er det et stort spekter metalliske partikler som kan gi grunn til bekymring i miljøsammenheng. Metaller er i utgangspunktet ofte giftigere enn grafitt (utgangsmaterialet i nanorør), kjeramiske partikler og halvledere fordi de er mer elektrokjemisk aktive. Mange av anvendelsene til metalliske nanopartikler er da også knyttet til deres sterke evne til å inngå i redoks-prosesser eller redusere aktiveringsenergien i kjemiske prosesser (katalyse). En kategori av nanopartikler er tiltenkt å inngå i tilsetningsstoffer for bensin

og diesel for å bedre forbrenningen (katalysatorer). Bileksos bidrar allerede i dag med store mengder helseskadelig partikkelutslipp, men partiklene er hovedsaklig i størrelsesorden 1-10 mikrometer, og altså langt større enn nanopartikler. Slike utslipp inneholder også betydelige mengder katalysatormetaller (Pt, Pd, Rh) som slites av bilkatalysatorer, men disse finner man i dag som større partikler, og de gjenfinnes hovedsakelig i jord et par meter fra veibanen. Helse- og miljømessige konsekvenser av spredning av potente redoks-aktive nanopartikler til luft, jord og vann er en av problemstillingene som bør undersøkes nærmere før slik teknologi tas i bruk i stort omfang.

I jord og sedimenter finnes det i utgangspunktet enorme mengder naturlige nanopartikler i form av kolloider (jern- og aluminiumsoksider/-hydroksider, oppløst organisk materiale m.m.) i tillegg til leirmineraler og kondensert organisk materiale. Dette materialet har i likhet med nanopartikler en svært høy spesifikk overflate (ett gram leire kan f.eks. ha et overflateareal på opp til 800 m<sup>2</sup>) og denne overflaten bærer på en rekke elektrokjemiske ladninger som gir jord og sedimenter en stor adsorpsjonskapasitet. Dette drar vi nytte av i mange miljøsammenhenger ved at denne bufferkapasiteten sørger for at svært lite av det vi slipper ut av forurensninger i miljøet havner i grunnvannet eller forblir oppløst i frie vannmasser. Så spørsmålet er i hvilken grad ganske små mengder produserte nanopartikler kan ha noen negative effekter i et miljø som i utgangspunktet er så rikt på liknende partikler av naturlig opphav.

Risikoanalyser består i å sammenstille en konsekvensvurdering og en sannsynlighetsvurdering. En mulig konsekvens av utslipp av enkelte typer nanopartikler til jord og sedimenter vil kunne være at de katalyserer nedbryting av stabilt organisk materiale, slik at et av Jordas største karbonlagre slipper ut store mengder CO<sub>2</sub> til atmosfæren (hvis karboninnholdet i jord

globalt sett reduseres med 1%, tilsvarer dette en økning i atmosfærisk CO<sub>2</sub> på 2%, eller fem ganger så mye som dagens globale utslipp fra fossilt brensel). Dette vil selvsagt kunne få store miljøkonsekvenser. Sannsynligheten for at utslipp av produserte nanopartikler vil føre til en så betydelig mineralisering av stabilt organisk materiale i jord er likevel liten. Derfor vurderes også risikoen for at nanopartikler kan føre til klimaendringer som relativt liten. Men usikkerhetene i begge de underliggende vurderingene er stor, og skulle det vise seg at man har gjort feil i begge vurderingene og at feilene trekker i same retning, vil man kunne se at risikoen plutselig blir betydelig høyere.

Når man vurderer muligheten for negative miljøeffekter av produserte nanopartikler må man se disse i forhold til de positive miljøeffektene man kan få ved bruk av nanoteknologi og være forsiktige med å stemple hele dette heterogene teknologi-området som potensielt farlig. For det første er det et stort antall applikasjoner innen nanoteknologi som ikke involverer frie partikler. Dessuten vil trolig nanoteknologi føre til store miljøbesparelser innen energi, renseteknologi, transportsektoren, material utvikling, osv. Noen anvendelser vil likevel kunne ha negative miljøkonsekvenser, og det bør være i nanoteknologiens egen interesse å få vurdert disse for å unngå et negativt stempel som kan påvirke en rekke andre anvendelser som klart vil være positive for miljøet.

Bioforsk Jord og Miljø undersøker nå, i samarbeid med UMB og Kjemisk institutt, UiO, en del grunnleggende aspekter ved spredning av nanopartikler til jord og vann, og vil gå videre med dette arbeidet ved å foreta økotoksikologiske undersøkelser og risikovurderinger. I motsetning til forskning på helsemessige konsekvenser av nanopartikler som har kommet i gang for flere år siden, er miljøkonsekvenser av nanopartikler et helt nytt forskningsområde, også internasjonalt. Dessverre lider begge

disse forskningsområdene av at de prioriteres lavt sammenliknet med forskning på utvikling og anvendelse av nanoteknologi. I USA har en fast prosentandel av forskningsmidlene til nanoteknologi de siste årene blitt øremerket helse- og miljøaspekter. Et tilsvarende forslag ser beklagelig nok ikke ut til å ha fått gjennomslag i den nye nasjonale strategien for nanovitenskap og nanoteknologi som vil bli lagt fram av Forskningsrådet om kort tid. Temaet er likevel tatt med, og det er håp om et man også her til lands vil gå inn for å bygge opp en forskningsbasert kompetanse på dette området, på samme måte som man har støttet enkelte prosjekter som omhandler helsemessige eller etiske aspekter ved nanoteknologi.

## Nanopartikler i arbeidsmiljø

*Av Heidi Uppstad*

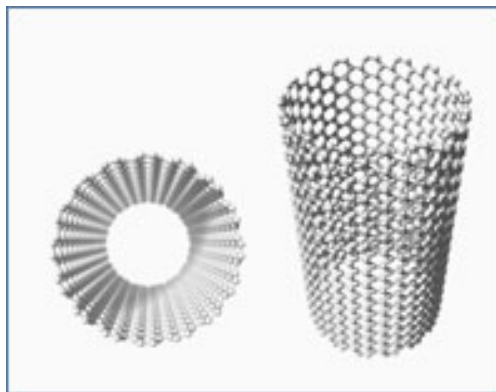
**Eksponering for nanopartikler er ikke et nytt fenomen, verken med tanke på generell luftforurensing eller i arbeidsmiljøssammenheng. Den industrielle revolusjon brakte på banen en rekke prosesser som genererer partikler i nanoskala, i hovedsak som forurensing. Arbeidsoperasjoner som krever høye temperaturer slik som smelting og bearbeiding av metaller, danner store mengder nanopartikler. Det genereres altså nanopartikler som et uønsket biprodukt, men det dannes også nanopartikler som har vist seg å ha stor nytteverdi. Disse omtales gjerne som ikke-designede nanomaterialer og omfatter bl. a amorft silisiumdioksid og manganoksid.**

Amorft silisiumdioksid dannes under reduksjon av kvarts for produksjon av silisium og ferrosilisiumlegeringer. Dette består av sfæriske partikler med diameter 120-150 nm som tilsettes betong for å øke styrke og elastisitet. Elkem ASA produserer intet mindre enn 100000 tonn amorft silisiumdioksid årlig.

Norge er globalt en viktig produsent av manganlegeringer, med produksjon ved smelteverk i Kvinesdal, Porsgrunn og Sauda. Manganoksid er sammensatt av ultrafine partikler med en median størrelse lik 200 nm som dannes ved produksjon av manganlegeringer. Dette biproduktet har funnet anvendelse i fremstilling av keramikk og som fargestoff i murstein. I Norge produseres om lag 10000 tonn årlig.

Slike tradisjonelle materialer, samt uønskede ultrafine partiklene som dannes i termiske prosesser utgjør hovedkilden for nanopartikler i norsk arbeidsliv. I tillegg finnes en tredje type som er i ferd med å bli en mulig bidragsyter. I den senere tid har nemlig produksjon av spesialdesignende nanomaterialer startet opp også her til

lands. Det er foreløpig karbonnanorør som lages. Produksjonen omfatter noen få kilo i året, og finner sted ved IFEs laboratorier (Institutt for energiteknikk) på Kjeller. Karbonnanorør er en viktig byggestein innen nanoteknologi.



*Nanorør produsert av n-TEC ved IFEs laboratorier.*

*Kilde: <http://www.n-tec.no>*

Kliniske og eksperimentelle studier indikerer at liten størrelse og stort overflateareal samt evnen til å generere reaktive oksygenspecier spiller en rolle i nanopartiklers evne til å indusere lungeskade. Når partikkelstørrelsen av et stoff minker ser det ut til at toksisiteten i det respiratoriske system øker. En liten størrelse bidrar til at flere atomer relativt sett befinner seg på overflaten av partikkelen, og dette kan bidra til å øke dens toksisitet.

Det er begrenset viten om helseeffekter av spesialdesignede nanomaterialer, og man frykter at de kan ha ukjente egenskaper. Forskjellen mellom de nye og de tradisjonelle nanopartiklene trenger nødvendigvis ikke å være så stor, men ettersom bruken av nanomaterialer øker i omfang blir det viktig undersøke toksisiteten til slike materialer. Så lenge slik informasjon og spesifikke helseeffekter av spesialdesignede nanopartikler er ukjent vil tiltak som begrenser eksponeringen være viktig (føre var prinsippet).

Direktør ved Statens arbeidsmiljøinstitutt Trygve Eklund uttaler i *Arbeid og Helse* nr. 2, 2005 at når det gjelder eventuelle helseeffekter for arbeidstakere som eksponeres for nye nanopartikler, kan man se på det som en forlengelse av det man allerede vet om ultrafine partikler samt legge til grunn forskningen som STAMI har gjort på forekomst av ultrafine partikler i arbeidslivet. Videre sier han at det i dag ikke er nok underlagsmateriale til å sette i gang egne studier av helseeffekter som følge av eksponering for nye nanopartikler.

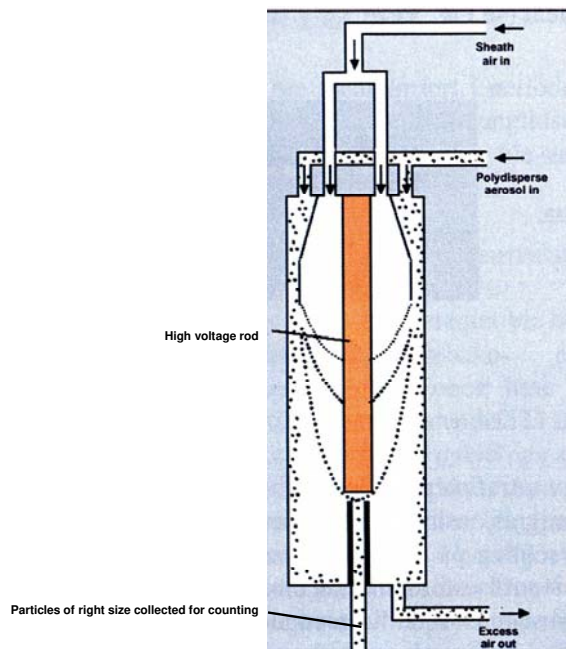
Uorganisk gruppe ved Statens arbeidsmiljøinstitutt har under ledelse av Yngvar Thomassen undersøkt forekomst av ultrafine partikler i industrien. De har overvåket ulike arbeidsprosesser og målt luftkonsentrasjon og størrelse på partiklene. Gruppen har blant annet overvåket arbeidsoperasjoner ved Hydro Aluminium på Karmøy der det i forbindelse med anodeskift ble påvist en betydelig andel luftbårne nanopartikler med ulik morfologisk struktur. De vil fortsette dette arbeidet og har i den anledning gått til anskaffelse av et Scanning Mobility Partikkelspektrometer (SMPS) som skal hjelpe dem i kartleggingen. Dette instrumentet kombinerer partikkelstørrelsesklassifisering (partikler med mobilitetsdiameter mellom 10 nm og 470 nm) og telling, og skal benyttes til å måle konsentrasjon av ulike nanopartikler i arbeidsmiljøet.

Hilde Notø er forsker ved Uorganisk gruppe (STAMI) og deltar selv aktivt i prøvetaking og måling av nanopartikler. Jeg stilte Hilde noen spørsmål omkring det nye instrumentet.

*-Kan du fortelle oss hvordan instrumentet måler mobilitetsdiameter og luftkonsentrasjon av nanopartikler?*

-Ja, i enkle trekk kan prosessen beskrives ved at luften føres inn i instrumentet og partiklene lades ved hjelp av en kryptonkilde. Deretter føres de gjennom et kon-

sentrisk rør med en elektrisk ladet stav i midten. På bakgrunn av ladning og mobilitetsdiameter vil partiklene deflekteres i ulik grad og derved separeres ved å variere spenningen over den elektrisk ladede staven. Denne fraksjonen av nanopartikler (med samme størrelse) føres inn i en mettet butanolatmosfære hvor de vokser i omfang, og kan dermed detekteres og telles ved laser og lysspredning.



*-Hvor ønsker dere å utføre målinger?*

-Vi ønsker å foreta målinger i alle industrier hvor det foregår såkalt "varmt arbeid". Dette omfatter eksempelvis smelteverk- og sementindustri hvor man finner arbeidsoperasjoner som utføres ved temperaturer mellom 900 – 1400 °C.

*-Har dere utført målinger allerede?*

-Vi har benyttet instrumentet på verkstedet her på STAMI i forbindelse med bruk av ulike sveiseteknikker. Vi observerte at mengden partikler i de ulike delene av størrelsesspekteret varierte avhengig av hvilken sveiseteknikk som ble benyttet.

Hilde forteller videre at de vil gå i gang med målinger i industrien utover høsten,

og at Norcems sementfabrikk i Brevik i Telemark er den første de vil besøke.

Kilder:

”Ultrafine Particles at industrial work-places”. Kuhlbusch.T, BIA-Report 7/2003e.

Personlig kommentar fra Yngvar Thomasen, gruppeleder Uorganisk gruppe v/ STAMI

”Toxic potential of materials at the nanolevel”. Nel et al. 2006, Science.

“Nanoteknologi: Effekter av nye nanopartikler på arbeidstakernes helse”. Torheim. N, Arbeid og helse nr 2, 2005.

## Stemningsrapport fra grillfest i Frognerparken 26/06-06

*Fotograf: Steinar Øvrebø*

*Skribent: Vibeke Ansteinsson*

Grillfest med toksikologiseksjonen i NSFT er blitt en velkommen tradisjon. I år var det Frognerparken som sto for tur. Været var godt og varmt selv om vi kunne ha ønsket oss litt mer sol. Men man kan jo ikke klage når både oppmøtet og stemningen var på topp.



*Trivelig stemning! Magne Refsnes, Jørn Holme og Oddvar Myhre med pilsen i hånden, mens Vibeke Thrane tar seg av grillingen.*



*Grillkunnskapene i orden for toksikologijentene, f.v, Vibeke Thrane, Birgitte Paulsen, Kirsten Rakkestad og Elisabeth Mona*



*Slukking av grill, noe som viste seg å være litt vanskelig for en gjeng med toksikologer.*



*Oppbruddsstemming!*



*Noen holder alltid ut litt lengre enn andre. Kirsten Rakkestad, Magne Refsnes, Julie Haaland, Vibeke Thrane, Savie Vibeke Ansteinsson og fotograf Steinar Øvrebø*

## Flått og sykdom

Av Solveig Aamodt

**Skaumann, stygging, skogtroll, krekse, stakkar, skogbjørn... alle navnene til tross er ikke flåttene noe kjært barn. De siste årene har det vært en økning i både flåttforekomst og sykdomsutvikling som følger av dette. På Hitra og Bolærne er det harde diskusjoner om å utrydde hjortebestandene for å få bukt med problemet. Hvordan lever egentlig flåttene, og hvorfor forårsaker de sykdom hos enkelte av sine ofre?**

Først noen fakta: Det finnes åtte arter flått i Norge, alle tilhører familien Ixodidae. De er mest tallrike på sørlandet, men finnes helt opp til Brønnøysund i Nordland. Det vanligste av disse små edderkoppdyrene er skogflått, *Ixodes ricinus*, og andre vanlige arter er fuglefjellflått, husflått, museflått og pinnsvinflått. Kun de to førstnevnte vites å forårsake sykdom, ihvertfall i vår del av verden.

Flåttene gjennomgår livsstadiene egg, larve, nymfe og voksen, og inntak av blod er nødvendig for overgang til neste fase. Eggene klekkes om våren, og larvene søker en vert som kan forsyne dem med blod. Etter tilstrekkelig inntak transformeres de til nymfer, som neste vår transformeres til voksne individer hvis de får nok næring. Flåttene setter seg høyt oppe på et gresstrå og hopper på et forbipasserende dyr, hvor den forblir i noen dager, til den er mett og faller av. En mett flått er så full av blod at den ikke klarer å gå.

Heldigvis er ikke alle flåtter sykdomsbærere. De mest aggressive er nymfene, hvorav ca. en tredel er vektorer, og kun omkring 5 % av de som blir bitt av vektorer utvikler symptomer. Allikevel kan det være en svært ubehagelig sykdom for de par-tre hundre menneskene som rammes hvert år, og tallet er økende. Flåttene kan forårsake

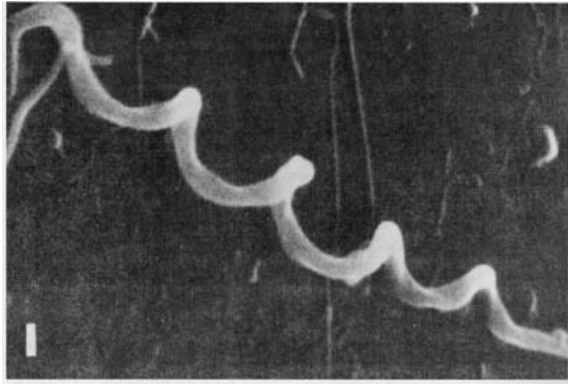
både bakterie- og virusinfeksjon, førstnevnte er mest vanlig. Bakteriesykdommen heter **borreliose** (eng. Lyme disease, etter første epidemiske utbrudd i USA, i byen Lyme i 1975) og skyldes at bakterien *Borrelia burgdorferi* overføres fra flåttene til offeret. Det er i fylkene langs den sørlige kysten flest blir rammet, men også i Møre og Romsdal er det en del tilfeller. Det første tilfellet i Norge ble registrert i 1955.



*Hannflått* ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org))

Akutte symptomer på borreliose (vanligvis innen 2 uker etter infeksjon) er utslett, feber, trøtthet, hodepine, leddsmerter, hals-sårhet og ansiktsslammelser. Utslettet (*erythema migrans*) er ofte karakteristisk rundt og lett å se. Borreliose kan på dette tidlige stadiet behandles med penicillin.

Kroniske symptomer (etter måneder) er trøtthet, myalgi, leddsmerter, overfølsomme nerver (følelse av kløe, stikk, brenning), skjelvinger, synsforstyrrelser, dårlig balanse, panikkanfall, depresjon, hukommelsestap, sovevansker, hallusinasjoner, høy puls, kvalme og svekkelse av immunsystemet. Grunnet de mange neurologiske symptomene forveksles av og til borreliose med f.eks. multippel sklerose eller fibromyalgi. Behandling kan bestå av sterkere antibiotika over lengre tid, men det er uenighet omkring effektiviteten av dette (se lenger ned).



*Spiroketen Borrelia burgdorferi* (Dr. Russell C. Johnson/*The Yale Journal of Biology and Medicine*)

*Erythema migrans* er altså kroppens første reaksjon på bakterien. Denne inflammasjonsreaksjonen skyldes først og fremst aktivering av **Toll-lignende reseptorer (TLR)**, som ligner *Drosophila*-proteinet Toll, navngitt etter det tyske ordet for 'gal'. TLR har stor innvirkning på immunsystemet. De gjenkjenner patogener, og kan sette igang kaskader som igjen gir ulike immunresponser, f.eks. cytokin- eller interferonproduksjon, fagocytose eller apoptose. *B. burgdorferi*-lipoproteiner (OspA) fører til en aktivering og oppregulering av TLR 1, 2 og 4. En studie fra Cassiani-Ignoni *et al.* (2006) viser imidlertid at denne responsen er fraværende i nevroner, noe som muligens kan forklare nervesystemets sårbarhet i borreliose. Mangel på immunresponser kan gjøre sentralnervesystemet til et behagelig sted å være for bakteriene. Makrofager og dendrittiske celler i *erythema migrans*-området rett etter infeksjon har svært høye nivåer av TLR, noe som kan tyde på at infeksjonen forsøkes avgrenset og bekjempet før den sprer seg videre. Kinjo *et al.* (2004) viser dessuten at et diacylglycerol-glykolipid fra bakterien aktiverer NKT-celler og dermed også flere immunresponser. Det er fortsatt stor uklarhet rundt akkurat hvilke immunresponser *B. burgdorferi* aktiverer, og det er mulig den kan endre immunsystemet til sin fordel og bruke dette til å spre seg videre. Cabral *et al.* (2006) fant at *B. burgdorferi*-mediert TLR 2-oppregulering fører til en nedregu-

lering av TLR 5 – altså er bildet komplisert. Kinjo *et al.* spekulerer i om lengde og sammensetning av acylkjeden i diacylglycerolglykolipidet kan være en viktig faktor for immunpatogenisiteten når det gjelder NKT-aktivering.

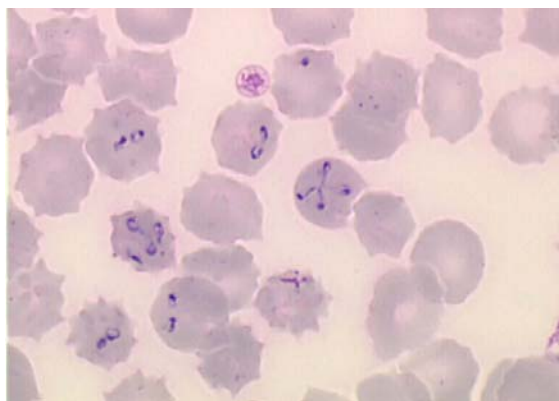
Av og til sprer infeksjonen seg videre og rammer sentralnervesystemet (10-20 % av smittetilfellene) i ulik grad. Borreliose har, pga. mulig tilstedeværelse i hjernen etter behandling og kronisk skade på nervesystemet, blitt brukt som mulig delforklaring på flere nevrologiske lidelser, bl.a. alzheimer (Miklossy *et al.* 2004).

*B. burgdorferi* kan eksistere både i spiral (normal) og cystisk form (som sferoplast). Flere forskere spekulerer i om sferoplastene kan være årsaken i tilfeller av mislykket antibiotikabehandling og tilbakevendende sykdom. Sferoplastene kan være vanskeligere å uskadeliggjøre med antibiotika, og dessuten å oppdage med antistofftester, i og med at overflateproteinene ikke er de samme som på bakteriens spirale form. Mange har forøkt å forstå bakteriens sterke patogene evner, og Dr. Ray Stricker forklarer litt av det slik i en populærvitenskapelig artikkel om borreliose: “[...] the structure of *Borrelia* is quite interesting because it has 21 plasmids and plasmids are these extra chromosomal strands of DNA that are kind of the early response mechanism for bacteria. So if a bacterium wants to do something very quickly, if it has a plasmid, the plasmid can make a protein very quickly to do things like avoid the immune system or enter cells or do whatever the bacteria needs to do to survive. 21 plasmids is three times more than any other known bacteria.” Fjerning av plasmidene gir en redusert evne til å infisere laboratoriedyr.

Flått kan også bære med seg en annen, men langt sjeldnere bakteriesykdom, nemlig anaplasmose (tidligere kalt ehrlichiose). Det første tilfellet i Norge ble registrert i 1998, og kun noen få tilfeller har fore-



kommet etter dette. En sjelden virussykdom en håndfull nordmenn har opplevd, som også ble registrert i Norge først i 1998, er skogflåttbåren hjernebetennelse eller **skogflåttencefalitt**. I Skandinavia er sykdommen endemisk i områdene rundt Østersjøen, her er 0,1-4,5 % av skogflåttene bærere. I Norge har viruset stort sett holdt seg på Tromøya utenfor Arendal.



*Babesia-parasitten i røde blodceller. Virussykdommen den fører med seg, skogflåttbåren encefalitt, har en del fellestrekk med malaria (www.med. univ-angers.fr).*

I motsetning til borreliose er det ingen lett synlige symptomer på skogflåttencefalitt. Symptomene varierer fra person til person, og inntreffer fra noen dager til flere uker etter infeksjon. Disse første symptomene inkluderer hodepine, muskelsmerter, kvalme og feber. Etter en tid kommer i ca. 30 % av tilfellene en mer alvorlig nevrologisk fase som inkluderer høyere feber, kraftigere hodepine og muskelsmerter, sterkere kvalme, sløvhets, forvirring, overfølsomhet og lammelser. Nevrologiske senskader forekommer hos 10-20 % av pasientene, og dødeligheten er ca. 1 %.

Viruset overføres via parasitten *Babesia*, og er et flavivirus som det finnes to karakteriserte varianter av, et østlig (russisk) og et sentraleuropeisk, hvorav førstnevnte forårsaker et mer alvorlig sykdomsforløp.

Personlig tror ikke undertegnede det er noen grunn til hysteri, men det er lurt å være oppmerksom. Nå går det mot en flåttfattig årstid, men til neste vår/sommer:

sjekk om det sitter flått på kroppen, spesielt områder med tynn hud, etter å ha vært i skogen eller ligget i gresset. Fjernes de innen 24 timer (det "mest korrekte" nå er å ta tak rundt flåttkroppen, gjerne med pinsett for å komme så langt inn mot huden som mulig, dra den rett ut og desinfiser området etterpå), er smittefaren lav. Flåttens spytt inneholder et bedøvelsesmiddel, derfor kjenner man ikke alltid at den biter seg fast.



*Der hvor hjorten trives, trives flåttene også. Voksne hunnflåtter går stort sett bare på store dyr, og da er hjorten et godt valg. Enkelte hjortebestanders fremtid står dermed på spill nå som flåttene formerer seg som aldri før.*

### Referanser

- [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)
- [www.fhi.no](http://www.fhi.no)
- [www.helsenett.no](http://www.helsenett.no)
- [www.lymediseaseaction.org.uk/conference/t\\_2004\\_3\\_1.htm](http://www.lymediseaseaction.org.uk/conference/t_2004_3_1.htm)
- Cabral ES et al., J Infect Dis. 2006, 193(6):849-59
- Cassiani-Ingoni R et al., J Neuropathol Exp Neurol. 2006, 65(6):540-8
- Miklossy et al., J Alzheimers Dis. 2004, 6(6):639-49
- Nanagara R et al., Hum Patol 1996, 27(10):1025-34
- Qiu WG et al., Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101(39):14150-5
- Skarpaas T et al., Tidsskr Nor Lægeforen 2002, 122:30-2
- Straubinger RK et al., J Clin Microbiol 1997, 35(1):111-6
- WHO faktaark om TBE (tick borne encephalitis)



## QUIZ

Hvilken gift?



<b>10 poeng</b>	Giften omsettes til 1-aminocyclopropanol, som er stoffet som har den velkjente effekten.
<b>8 poeng</b>	Symptomer er hodepine, brekninger, kvalme, brystsmertter og "a sense of impending doom"
<b>6 poeng</b>	Latenstid er ca 2 - 3 timer og virkningen kan vare opptil 5 dager.
<b>4 poeng</b>	Giftvirkningen henger nøye sammen med inntak av andre stoffer, og har høyere sannsynlighet for å gi symptomer i helgene.
<b>3 poeng</b>	Svært usannsynlig at små barn vil merke noe til symptomene.
<b>2 poeng</b>	Giften finnes i grå blekksopp
<b>1 poeng</b>	Det latinske navnet på grå blekksopp er <i>Coprinus atramentarius</i>

*Av Marius Gudbrandsen*

## Kort oppdatering fra toksmiljøet ved UiO

BIO4500- Generell toksikologi og BIO4505- Eksperimentell toksikologi er høstens toksikologikurs ved Universitetet i Oslo. BIO4500 hadde oppstart 23.08.06 med 40 påmeldte kandidater både fra Biologisk institutt og Institutt for molekylærbiovitenskap. Blant de påmeldte finnes både bachelor- og masterstudenter. BIO4505 har oppstart senere i semesteret med 9 påmeldte. Steinar Øvrebø, Jørgen Stenersen og Kjetil Hylland er hovedansvarlige for begge kursene.

## Poulssonprisen

16. november skal det holdes Poulssonforelesning og utdeling av P.E. Poulssons minnemedalje i auditoriet på Mattilsynet (hovedbygg). Adressen er Ullevålsveien 76, Adamstuen.



*P.E Poulssons minnemedalje*

## Nylig fullførte cand. scient.- og masteroppgaver fra NTNU

### Genotoksiske effekter i rotspisser av raigras (*Lolium multiflorum*) dyrket i avfallsekspontert jord

Av Siv Grete Bjervamo

Veileder: Åse Krøkje (IBI, NTNU)

#### Sammendrag

Den årlige tilførselen av organisk avfall til norsk landbruksjord er for liten til å forårsake akutte toksiske effekter. Det er likevel stor usikkerhet om langtidseffekten ved bruk av organisk avfall i Norge, og i 1996 ble det ved Senter for jordfaglig miljøforskning (Jordforsk) satt i gang et utendørs langtidsstudie hvor man såg på hvilken virkning organisk avfall har på opptak av tungmetaller, plantevekst og mikrobiologi. Stabilitet og forekomst av organiske miljøgifter i jorda ble også studert. Jord ble tilført tre ulike typer organisk avfall i to mengder, tilsvarende maksimal lovlig tilført mengde (2 tonn pr. daa pr. 10 år) og 10 ganger denne mengden, som er en mengde som det etter dagens forskrifter er tillatt å tilføre over en 100 års periode. Det ble også satt i gang en tilleggsstudie hvor metallsalter av Cu, Zn og Cd ble tilført jordkassene i mengder tilsvarende 2, 20 og 200 ganger den øverste tillatte konsentrasjonen i avløpslam.

Denne cand.scient.-oppgaven er en del av det ovenfor nevnte studiet, og hensikten var å finne ut om jord (sandig lettleire) tilført organisk avfall og metallsalter inneholder toksiske forbindelser som er tilgjengelig for opptak i røtter av raigras (*Lolium multiflorum*) slik at genotoksiske effekter i røtter kan registreres. Videre ønsket man å se om det var en eventuell sammenheng mellom genotoksisk respons og type og mengde organisk avfall tilført, inn-

hold av Cu, Zn og Cd og andre miljøgifter i planten.

Røtter av raigras dyrket i de ulike jordkassene ble samlet inn høsten 2001, og ved hjelp av "squash"-metode ble det laget preparater av meristemregionen i rotspissene. Preparatene ble analysert i lysmikroskop, hvor mitotisk indeks, antall celler i deling i de ulike delingsfasene, skadefrekvens, ulike typer skader og prosent klebrighet ble registrert. I tillegg ble det foretatt makroskopiske observasjoner av røttene.

Røtter eksponert for den høyeste konsentrasjonen av metallsalter var svært deformerte, og det ble ikke funnet en metode som gav egnet "squashing" av rotspisser fra denne testbetingelsen. Ut fra makroskopiske observasjoner og resultater fra Jordforsk, som viste at plantematerialet fra tidligere avlinger inneholdt svært høye konsentrasjoner av tungmetaller samt at planteavlingen var redusert, kan det konkluderes at tilførsel av tungmetallkonsentrasjoner som tilsvarer 200 ganger den øverste tillatte konsentrasjonen i avløpslam har medført toksisitet i røtter av raigras.

Resultatene fra kromosomaberrasjonsanalysen indikerer ikke at tilførsel i konsentrasjoner tilsvarende 2 og 20 tonn organisk avfall pr. daa pr. 10 år eller tilførsel av laveste konsentrasjon av metallsalter, medfører genotoksiske effekter i rotspisser av raigras. Rotmaterialet fra disse testbetingelsene viser ingen tendens til redusert mitotisk indeks eller økt forekomst av kromosomaberrasjoner, og røttene hadde ingen unormal form. Dette er i samsvar med resultatene fra Jordforsk, som viste at opptaket av tungmetaller i planter som vokste i disse eksponerte jordkassene var på samme nivå som opptaket i plantene fra tilhørende referansekasser. Det ble registrert høyest skadefrekvens i rotmaterialet eksponert for tungmetallsalter i konsentrasjoner tilsvarende 20 ganger den øverste tillatte konsentrasjonen i avløpslam, men økningen

var ikke signifikant forskjellig fra skadefrekvensen i rotmaterialet fra referansekassen. Det ble heller ikke registrert økt forekomst av celler med klebrige kromosomer eller en redusert mitotisk indeks for rotmaterialet fra denne testbetingelsen. På grunn av den kraftige toksiske effekten hos røtter eksponert for den høyeste konsentrasjonen av metallsalter var det ikke nok materiale til å se en sammenheng mellom tungmetallkonsentrasjon og toksisk effekt.

Det ble registrert skader i celler i både metafase og anafase. Skadetyper funnet i metafase var fritt kromosom, spredte kromosomer, uspesifisert spindeeffekt og klebrige kromosomer. Skadetyper funnet i anafase var fritt kromosom og dannelsen av bro.

Konklusjonen fra denne oppgaven er i samsvar med en av hovedkonklusjonene fra Linjordet og Amundsen; ”Gjennom de undersøkelser som er utført i årene etter tilførsel av organisk avfall (4 år), er det ikke registrert negative effekter på plantevekst og mikroorganismer i jord”. Dette tyder på at bruk av norsk organisk avfall på lang sikt ikke representerer en trussel i forhold til jordkvalitet, jordas produktivitet, matvarekvalitet og helse. Derfor er organisk avfall ressurser vi kan utnytte positivt ved gjenbruk.

### **Induksjon av CYP1A som biomarkør for de organiske miljøgiftene PCB og PAH: Utvikling av en evalueringsstrategi for binære blandinger**

Av: Liv Sjøfteland

Veileder: Åse Krøkje (IBI, NTNU)

#### **Sammendrag**

Høye konsentrasjoner av persistente organiske miljøgifter er målt i naturmiljøet. PCB og PAH-forbindelser er eksempler på slike forbindelser. De fysiokjemiske egenskapene til disse miljøgiftene gjør at de har evne til å bioakkumulere og biomagnifisere

i næringskjeder, samt at de har global distribusjon. PCB og PAH er videre blitt knyttet til en rekke toksiske effekter observert i naturmiljøet. Miljøgifter kan forekomme i komplekse blandinger, hvor ulike forbindelser kan interagere synergistisk og antagonistisk med hverandre, og dette kan påvirke miljøgifters toksiske effekt. Kjemiske analyser av miljøgifter har tradisjonelt blitt benyttet til å monitorere naturmiljøet. Siden slike analyser bare sier noe om tilstedeværelsen av forbindelser, kan ikke de kjemiske analysene anvendes til å vurdere biologisk effekt av miljøgifter eller til å detektere kombinerte effekter av forbindelser i blandinger. Som et alternativ til de kjemiske analysene er derfor biomarkører blitt utviklet til bruk i miljøundersøkelser og monitorering. Biomarkører har et stort potensiale i biomonitorering fordi de tar hensyn til miljøgiftenes biotilgjengelighet, og biomarkørene kan gi et integrert mål på kombinerte effekter av forbindelser i en blanding. Induksjon av CYP1A er et eksempel på en biomarkør som kan benyttes til å undersøke mulige interaksjoner mellom miljøgifter i blandinger av dioksin og dioksinliknende forbindelser. Disse forbindelsene induserer CYP1A via en felles induksjonsmekanisme. På grunn av at de foreliggende metodene til å evaluere interaksjoner mellom av dioksin og dioksinliknende forbindelser er mangelfulle, er det behov for å utvikle nye evalueringsstrategier for slike blandinger.

I denne oppgaven ble metoden for immunologisk deteksjon av CYP1A videreutviklet for anvendelse *in vitro* med rottehepatoma-cellelinjen H4IIE, samt at metoden ble tilpasset anvendelse av forsøksdesign. Konsentrasjon/effekt-kurvene til PAH og PCB-forbindelser ble bestemt ved immunologisk deteksjon av CYP1A i H4IIE-celler eksponert for naturmiljørelevante konsentrasjoner. Videre ble forekomst av mulige interaksjoner mellom PAH og PCB-forbindelser detektert ved hjelp av eksperimentelle forsøksdesign, multivariate dataanalyser (PLS) og modellering.

Kvantifisering av CYP1A-protein er blitt vist å være en sensitiv biomarkør for eksponering for naturmiljørelevante konsentrasjoner av PAH og PCB. H4IIE-celler eksponert for B(a)P og PCB77 medførte en konsentrasjonsavhengig økning i CYP1A-induksjonen til H4IIE-celler. PCB138 viste en lav induksjon ved lave konsentrasjoner for deretter å øke konsentrasjonsavhengig ved høye konsentrasjoner. Tiltærmet ingen CYP1A-induksjon ble observert for PCB153. Analysene av de to binære responsflatedesignene med B(a)P og PCB77 samt B(a)P og PCB138 indikerer at det forekommer en synergistisk interaksjon mellom forbindelsene ved lave konsentrasjoner og antagonistisk interaksjon ved høye konsentrasjoner. Anvendelse av induksjon av CYP1A-protein i rottehepatoma-cellelinjen H4IIE, samt bruk av responsflatedesign, PLS og modellering, er vist å være en velegnet måte å evaluere kombinerte effekter av forbindelser i blandinger.

**Brominated flame retardants in harbour seals (*Phoca vitulina*), herring gulls (*Larus argenatus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the outer Oslofjord, Norway, with special emphasis on biomagnification.**

*Av: Hege Gaustad*

*Veileder: Bjørn Munro Jenssen (IBI, NTNU)*

**Sammendrag**

Brominated flame retardants (BFRs) have been produced and used for preventing fire in more than twenty years, and these chemicals are now found in wildlife. The chemical structure resemblance to another more thoroughly studied group of chemicals, polychlorinated biphenyls (PCBs) is striking; the BFRs are environmentally

stable, persistent and hydrophobic substances and have shown to bioaccumulate and biomagnify. Thus, predatory birds and mammals at high trophic levels in the marine food chain are particularly exposed to high concentrations of BFRs.

Atlantic cod (*Gadus morhua*), harbour seal (*Phoca vitulina*) and herring gull (*Larus argenatus*) from the outer Oslofjord in Norway, were analysed for concentrations of eight brominated diphenyl ethers (BDEs) (BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183, -209) and hexabromocyclododecane (HBCD) using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Intra- and interspecies comparisons of BFR concentrations and –patterns were conducted, as well as calculations of biomagnification factors (BMFs). All BFRs were detected in all species, except for BDE-209, which was only detected in herring gull. The concentrations of all detected compounds except for BDE-28 were significantly higher in both harbour seal and herring gull as compared to Atlantic cod, and significant differences in BFR patterns were found between the three species. The Atlantic cod had a pattern that was dominated by a high relative contribution of the lower brominated compounds, whereas harbour seals and herring gulls showed a high relative contribution of the higher brominated compounds. Intraspecies comparisons in harbour seal showed differences related to age in both BFR concentration- and BFR pattern. Furthermore, a negative correlation between blubber thickness and BFR concentration was found in male harbour seals. The herring gulls showed concentration differences between the sexes, and variations in BFR patterns were related to age. No intraspecies differences in concentrations or patterns were found in Atlantic cod. BMF calculations showed biomagnification of all compounds except for BDE-28 from Atlantic cod to its two predator species. From Atlantic cod to harbour seal, BDE-153 and BDE-99 were the congeners showing the greatest biomag-

nification, and from Atlantic cod to herring gull the biomagnification of BDE-209 (concentrations in Atlantic cod were based on half detection limits), -99 and -153 were high. The main difference between herring gull and harbour seal was a high biomagnification of the highest brominated congeners, BDE-183 and -209, in herring gull.

This study shows that concentrations well above detection limits of most PBDE congeners and HBCD are found in Atlantic cod, harbour seal and herring gull from the outer Oslo fjord. Furthermore, the study shows that BFRs do biomagnify. Relatively high concentrations of BDE-209 found in herring gull show that this congener in spite of its large molecular size is bioavailable and have entered the food chain.

*This project has in part been financed by the FIRE (Flame retardant Integrated Risk assessment for Endocrine disruption) project (Contract No: QLT4-CT-2002-00596). It has been completed with the cooperation of the Norwegian School of Veterinary Science (NVH) and the Veterinary Institute (VI).*

### **Brominated flame retardants (BFRs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and thyroid hormones in free-ranging Atlantic cod (*Gadus morhua*)**

*Av: Jenny Bytingsvik*

*Veileder: Bjørn Munro Jensen*

Brominated flame retardants (BFRs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) are known as endocrine disrupting chemicals and subsequently have the potential to exert harmful effects on all biological organization levels. The hypothalamus-pituitary-thyroid axis is one of the endocrine systems which may be affected by these

chemicals. BFRs and PCBs may act directly on the thyroid hormone (TH) receptors, on the synthesis-, transport- and/or the metabolism of these hormones. THs in vertebrates are essential to normal cellular and somatic development, early growth, behaviour, metamorphosis, immune functions, metabolism and reproduction.

The aim of this study was to examine if exposure to contaminants like BFRs and PCBs may alter the TH homeostasis in free-ranging Atlantic cod (*Gadus morhua*). Furthermore, the possible confounding influence of biometric variables (body mass, length, liver mass, liver ratio, condition factor) and lipid percent on feasible relationships between the contaminants and the TH variables were considered. The study was conducted by measuring levels of BFRs, PCBs and THs in two feral populations of cod, of which Froan (64°N) ( $N_{\text{total}} = 14$ ) located in mid-Norway is regarded as a relatively clean environment, whereas Hvaler (58°N) ( $N_{\text{total}} = 16$ ) located in outer Oslo-fjord is regarded as a more contaminated environment.

The BFRs and PCBs measured in liver tissue were HBCD, BDE-28, -47, -100, -154 ( $\Sigma$ BFRs: Froan; 25.8 - 152.4 ng g<sup>-1</sup> l.w. and Hvaler; 42.7 - 232.0 ng g<sup>-1</sup> l.w.), PCB-28, -52, -101, -118, -138, -153 and -180 ( $\Sigma$ PCBs: Froan; 98.8 - 764.4 ng g<sup>-1</sup> l.w. and Hvaler; 485.8 - 3321.2 ng g<sup>-1</sup> l.w.). The BFRs and PCBs were measured using Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Gas Chromatography/Electron Capture Detector, respectively. Plasma samples were analysed for TT<sub>3</sub> ( $\Sigma$ TT<sub>3</sub>: Froan; 8.9 - 15.3 nmol L<sup>-1</sup> and Hvaler; 5.8 - 30.6 nmol L<sup>-1</sup>) and FT<sub>3</sub> ( $\Sigma$ FT<sub>3</sub>: Froan; 8.0 - 13.1 pmol L<sup>-1</sup> and Hvaler; 7.8 - 22.8 pmol L<sup>-1</sup>) using Radio Immuno Assay.

Relationships were found between the levels of BFRs, PCBs and the TT<sub>3</sub> concentration and FT<sub>3</sub>/TT<sub>3</sub> ratio in immature female Atlantic cod from Froan and Hvaler. Hence, it is concluded that BFRs and PCBs

may interfere with the TH status in free-ranging Atlantic cod. The variation in  $TT_3$  in cod from Froan was mainly explained by PCB congeners (BDE-154, PCB-118, -138, -153, -180 and  $\Sigma$ PCBs), whereas PCB-180 were the strongest determinant. Regarding cod from Hvaler, only BFR congeners explained the variation in  $TT_3$  (BDE-28, -47, -154,  $\Sigma$ PBDEs, HBCD and  $\Sigma$ BFRs), whereas BDE-28 were the strongest determinant. All the mentioned contaminants correlated negatively with the  $TT_3$  variable. The  $FT_3/TT_3$  ratio in cod from both populations was explained by all the contaminants, except for PCB-118 in cod from Hvaler, and all the determinants correlated positively with the  $FT_3/TT_3$  ratio. This shows that the  $FT_3/TT_3$  ratio is a more sensitive index than  $TT_3$  and may possibly be used as a biomarker for POPs in cod. The bioactive TH variable  $FT_3$  did not seem to be affected by the measured contaminants in any of the populations. Thereby it is concluded that it is the bound  $T_3$  which is affected by the BFRs and/or PCBs.

The relationships between the POPs and the TH variables changed radically after introducing biometric variables and lipid percent into the analysis, except for the relationships related to the  $TT_3$  concentration in cod from Froan. This shows that including or excluding these variables from the analyses may affect the achieved results significantly. BDE-28 which was the strongest determinants for  $TT_3$  in cod from Hvaler was no longer of significant importance, whereas BDE-100 became the strongest determinant together with body mass. BDE-100 also distinguished in the results related to the  $FT_3/TT_3$  ratio.

Even though the documented relationships between BFRs, PCBs and the TH variables  $TT_3$  and  $FT_3/TT_3$  ratio not serve as a direct cause and effect evidence, they indicate that there is a link between the TH concentration and the exposure to BFRs and PCBs

in the already threatened populations of Atlantic cod.

### **Bioaccumulation and Biomagnification of Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and Hexabromocyclododecane (HBCD) in an Arctic Marine Food Chain**

Av: Maria Pettersvik Salmer

Veileder: Bjørn Munro Jenssen (IBI, NTNU)

#### **Sammendrag**

Food web magnification of brominated flame retardants (BFRs) (i.e. polybrominated diphenyl ethers [BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183 and -209] and hexabromocyclododecane) was investigated in an arctic marine food chain consisting of the zooplankton species; *Calanus glacialis*, *Thysanoessa inermis*, *Themisto libellula* and *Gammarus wilkitzkii*, polar cod (*Boreogadus saida*), ringed seal (*Phoca hispida*) and polar bear (*Ursus maritimus*). BDE-47 and BDE-99 were found in low concentrations even in the lowest trophic levels of zooplankton. An increasing number of BFRs were detected with increasing trophic levels, and concentrations of most compounds were found to biomagnify in the investigated food chain. However, this was not found in the polar bear at the highest trophic level, where only BDE-153 and BDE-209 were found to increase in concentration as compared to the ringed seal.

When comparing the use of lipid weight concentrations (LWCs) and whole body concentrations (WBCs) to assess biomagnification factors (BMFs), the use of WBCs seemed to yield the more realistic BMFs. This is probably because BMFs derived from LWCs seem to be confounded by the large variability in lipid content among the species.



This study shows that concentrations of BFRs have reached measurable amounts even in the lowest trophic levels of the polar bear food chain. The BFRs were also found to biomagnify in the Arctic marine food chain, although the polar bear seems, to a large extent, to be able to metabolise and biodegrade most BFRs ( $C. glacialis \leq T. inermis \leq T. libellula < G. wilkitzkii <$  polar cod << ringed seal >> polar bear).

### **Aktivitet av antioksidant-enzymene superoksid dismutase (SOD) og catalase (CAT) i ørret (*Salmo trutta*), eksponert for tungmetaller i sitt naturlige miljø**

Av Svein Rømma

Veiledere: Rolf A. Andersen og Bjørn Henrik Hansen (IBI, NTNU)

#### **Sammendrag**

Tungmetallforurensning er et problem i flere norske vassdrag, og spesielt i elver i tilknytning til gruvevirksomhet. Akvatiske organismer kan være særlig utsatt for tungmetalleksponering siden de har begrenset mulighet til å unngå forurensede områder. I ørret kan tungmetaller gi reaktive oksygenforbindelser (ROS) som kan skade viktige biomolekyler, som DNA, proteiner og fettsyrer. En av de farligste ROS som dannes i biologiske system, er superoksid ( $O_2^{\bullet}$ ), som kan omdannes av enzymet superoksid dismutase (SOD) til hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ). Dette stoffet har også egenskaper som en fri radikal, men kan detoksifiseres av catalase (CAT) til vann og oksygen. I denne oppgaven ble spektrofotometriske metoder brukt for å måle aktivitetsnivået til disse antioksidant-enzymene. Målingene ble utført på gjelle-, lever- og nyrevev i ørret som ble overført fra et uforurenset vassdrag til en elv som var forurenset med kadmium (Cd) og sink (Zn) og til en elv med kobber (Cu). Tungmetallmålinger av gjellevev og vannprøver

ble utført ved hjelp av ICP-MS (inductive coupled plasma-mass spectrometry) og målinger av totalt protein i vevshomogenatene ble utført ved hjelp av Bradford-metoden. Fisk fra de tre undersøkte elvene hadde likt baseline-nivå for enzymaktivitet, men endringer ble påvist under 15 dager med eksponering etter overflytting til et annet metallmiljø. Fisk som ble eksponert for Cd og Zn, fikk økt aktivitet av CAT i gjelle, og av SOD i lever og nyre. Det ble funnet redusert aktivitet av CAT i lever. For fisken som ble eksponert for Cu, ble det påvist økt aktivitet av CAT i nyre og av SOD i lever. Her var det nedsatt aktivitet av SOD i nyre.

I vevene hvor det ble påvist økte aktiviteter av CAT og SOD, tyder det på at ROS har blitt dannet som følge av tungmetalleksponering. Men ROS-genereringen kan også skyldes andre forhold, siden det ikke ble funnet klare sammenhenger mellom akkumulert metall i fiskene og enzymaktivitetsnivå. Nedsatte enzymaktiviteter tilskrives inhibisjonsmekanismer av ubestemt art eller direkte inaktivering på grunn av tungmetaller.

Totalt sett tyder resultatene på at CAT og SOD er mer viktig ved fiskenes forsvar mot ROS ved korttidsakklimering enn ved kronisk eksponering for tungmetallene Cd/Zn og Cu.

**Effekter av BDE-47 (2,2',4,4'tetra bromodifenyl eter), BPA (bosfenol A) og DAP (diallyl ftalat) på steroidhormoner til juvenil piggvar (*Scophthalmus maximus*)**

Av Inger Beate Tyrhaug

Veileder: Bjørn Munro Jenssen (IBI, NTNU)

Sammendrag

Akvatiske økosystemer er ofte i søkelyset når det gjelder forurensing, da det er der mesteparten av de fleste forurensende utslippene ender opp. I de siste 40 årene har bruken av pesticider og industrielle kjemikalier forstyrret organismers endokrine system. Flatfisk som gyter i kystsonen vil være en spesiell egnet art i overvåking av toksisitet som kan ha effekt på reproduksjonen. Dette studiet er en del av et større EU-prosjekt, BEEP ("Biological Effects of Environmental Pollutants in Marine Coastal Ecosystems"). Prosjektets målsetting er å utvikle kjennskap til biomarkører i marine organismer som blir eksponert for miljøgifter. Juvenile piggvarhanner (*Scophthalmus maximus*) eksponert for BDE-47, BPA og DAP viste ingen forskjell i plasmakonsentrasjonen av testosteron (T) eller østradiol-17- $\beta$  (E<sub>2</sub>). Derimot ble det funnet en positiv korrelasjon mellom hepatosomatisk indeks (HSI) og plasmakonsentrasjonen E<sub>2</sub> uavhengig av eksponeringsgruppe. Videre ble det funnet signifikant større lever i både BPA- og DAP-gruppen, og en signifikant større kondisjonsfaktor (K) i DAP-gruppen sammenlignet med kontrollgruppen. Disse resultatene viser at man ikke alene kan bruke plasmakonsentrasjoner av T eller E<sub>2</sub> som biomarkør for disse kjemikaliene hos juvenile piggvarhanner.

**Cytochrome P-4501A as a biomarker for the organic environmental pollutants PAH and PCB;**

**development of strategies for evaluation of complex mixtures**

Av: Maria Steinnes Jensen

Veileder: Åse Krøkje (IBI, NTNU)

Sammendrag

Pollutants are found as complex mixtures in the environment. Compounds in mixtures can sometimes interact, and result in a higher or lower effect than after single component exposure. It is important to have knowledge about how pollutants behave in mixtures in order to improve hazard identification and risk assessment.

High concentrations of organic pollutants, like polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB), and heavy metals, like cadmium (Cd), are found in the environment. PAH, PCB and Cd can bioaccumulate, and these pollutants are associated with toxic effects. Biomarkers are suited in monitoring the environment because they reflect the total exposure condition for an organism, and they can detect early biological effects that can indicate future damage to individuals and populations. CYP1A induction has been used as a biomarker of exposure to dioxin-like chemicals, and has been proven to be a sensitive and specific biomarker. Some compounds can act by inhibiting CYP1A induction. Cd can induce oxidative stress and affect proteins. CYP1A inducing compounds may also interact. For the usage of CYP1A as a biomarker, it is advantageous to develop strategies that consider interactions in pollutant mixtures in the environment, and to use *in vitro* experiments with cell lines to study the mechanism behind potential interactions. The aim of this study was to develop strategies for evaluation of complex mixtures in the environment by studying CYP1A induction *in vitro* after exposure to simple mixtures of the organic pollutants PCB and PAH, and the heavy metal Cd.

The MTT-assay was performed to determine the highest Cd concentration that is not cytotoxic in the cell line used; the rat hepatoma cell line H4IIE. The Western blot immunodetection method was used to quantify CYP1A protein after exposure to environmentally relevant concentrations of the PAH compound benzo[a]pyrene (BaP), the PCB congener PCB77, and ternary mixtures of BaP, PCB77 and Cd. A "central composite face centered" (CCF) experimental design, together with modelling and analyzing of the results by a multivariable data analysis (projection to latent structures, PLS), was used in this study to achieve a cost and time effective performance of the experiment with ternary mixtures, and to optimize the design and modelling for studying possible interactions between the components.

MTT-assay is shown to be a suitable method for evaluation of Cd cytotoxicity in H4IIE cells. Cd concentrations from approximately 0,7  $\mu\text{M}$  was found to affect the survival of H4IIE cells. Quantification of CYP1A proteins is shown to be a sensitive biomarker for exposure to environmentally relevant concentrations of planar PAH and PCB. In H4IIE cells exposed to BaP, and PCB77, a mean concentration dependent increase in CYP1A induction up to 5  $\mu\text{M}$  was observed. Analysis of response surface models for the ternary mixtures gave an indication of antagonistic interactions between BaP and PCB77, and a possible inhibitory effect of Cd on PCB77-induced CYP1A. Utilization of CYP1A induction by immunological detection of CYP1A proteins in the rat hepatoma cell line H4IIE, and application of response surface design and PLS, is shown to be a suitable strategy for evaluation of combined effects in pollutant mixtures.

Financial support was obtained by the Norwegian Ministry of Foreign Affairs organized by Centre for International University Cooperation (SIU) via the project

"ENLINO master program-network" (project CCP 03/02).

## **Development of a method for detecting DNA strand breaks caused by metal exposure**

*Av: Renate Haldrud*

*Veileder: Åse Krøkje (IBI, NTNU)*

### **Sammendrag**

Toxic effects caused by heavy metal exposure can possibly lead to an impaired health status in organisms living in polluted areas. The course of events from a xenobiotic reaching its site of action to the induced damage becoming visible at an organismal level is long and complicated. At this stage, initiation of countermeasures may be too late. Development of methods for detecting physical or chemical changes in an organism at early stages of effect is therefore important. Xenobiotics like heavy metals exist in nature as a mixture of different compounds. Knowledge about how these xenobiotics interact in the context of effect will help determine the actual risk facing organisms inhabiting polluted areas.

DNA strand breakage is one of many possible toxic effects that may arise following heavy metal exposure. DNA double strand breaks are a serious form of genetic damage. In addition to cancer development, DNA damage can also be associated with toxic endpoints such as enzymatic changes, metabolic disturbances, accelerated ageing, increased development of diseases, and a diminished ability for reproduction, adaptation and survival. In addition, induction of damage in germ cells may increase the mutational load of the population. Several techniques for analysing DNA damage exist. In this thesis, a technique involving *in situ* lysing of cellular material prior to agarose gel electrophoresis is used to analyse

the occurrence of DNA double strand breaks. The purpose of *in situ* lysis is to minimize the incidence of introducing methodologically induced damage to the DNA.

The purpose of this master thesis was to evaluate agarose gel electrophoresis as a method for detecting DNA double strand breaks in different types of tissues exposed to the heavy metals copper, cadmium and zinc. This was done to assess the use of this technique as a possible biomarker of heavy metal-induced effects. The cell line H4IIE exposed to heavy metals *in vitro*, and blood, liver, gill and kidney from Brown trout (*Salmo trutta*) exposed to heavy metals from mining polluted rivers *in vivo* were analysed.

Exposure to high concentrations of copper and cadmium in combination caused a significant increase ( $p < 0,05$ ) in the number of strand breaks in the H4IIE cells. This effect was cancelled when the cells were exposed to high concentrations of copper and cadmium in combination with zinc. In this exposure, the number of DNA double strand breaks were significantly higher ( $p < 0,001$ ) than the control values. Environmentally relevant concentrations of the metals cadmium, copper and zinc did not appear to cause an elevated level of DNA strand breaks in the *in vitro* exposed H4IIE cell line.

The results showed that agarose gel electrophoresis is a reproducible technique for analysing DNA double strand breaks in the H4IIE cells exposed *in vitro*.

The access to test material (blood, liver, gill and kidney) from Brown trout exposed to heavy metals *in vivo* was limited. The quality of the blood samples from Brown trout was generally poor. This makes it impossible to draw any conclusions concerning the application of the method on these types of tissues.

Financial support was obtained by the Norwegian Ministry of Foreign Affairs organized by Centre for International University Cooperation (SIU) via the project "ENLINO master program-network" (project CCP 03/02).

## **Meitemark (*Eisenia fetida*) som bioindikator for tungmetallforurensning i jord?**

Av: Irene Karoliussen

Veileder: Rolf A. Andersen (IBI, NTNU)

### Sammendrag

The purpose of this thesis was to investigate earthworm (*Eisenia fetida*) susceptibility to metal intoxication and whether the earthworms are suitable biomarkers for metal pollution. Earthworms are particularly important cultivators in the soil environment, in addition to being prey for about 200 different predators (Edwards, 1998).

Metals accumulated in earthworms, could be passed over to plants and animals higher up in the food chain, ultimately leading to a potential risk for humans. It is therefore of obvious reasons important to monitor the soil and its inhabitants. In that way any necessary initiative to prevent injury to the environment, humans included, should be implemented.

Earthworms (*Eisenia fetida*) were exposed to Cd in two well established tests, the contact paper test (48 hours) and the artificial soil test (7 and 14 days), both tests according to the OECD guidelines no.207. The worms were exposed to a series of concentrations, ranging from 0,01 mg Cd/ml to 1,0 mg Cd/ml. The artificial soil test also included temperature as a variable. One group of worms was exposed to processed sludge and waste from gardens for 14 days

at different temperatures.  $LC_{50}$  was found to be ca. 0,75 mg Cd/ml in the contact paper test. The artificial soil test showed a mortality rate that varied between 0 % mortality in worms kept at 5°C (irrespective of concentration) to 100 % mortality for the group kept in 30°C at the highest concentration. There was therefore no sound basis to define  $LC_{50}$  in the artificial soil test.

All tests, except the artificial soil test (7 days) proved an accumulation of Cd, and induction of the two proteins metallothionein (MT) and catalase. The contact paper test indicated that both proteins shared the same threshold dose, at a concentration of 0,01 mg Cd/ml. The artificial soil test showed a threshold at 0,5 mg Cd/g soil for MT induction, while catalase had a threshold at 0,1 mg Cd/g soil. Worms exposed to sludge and waste from gardens showed a significantly changed induction of both MT and catalase, although the levels were only one third of the levels found in the artificial soil test.

Temperature influenced both mortality and induction of MT and catalase. The highest accumulation of Cd was found for high (30°C) temperatures. The high temperature interacting together with the Cd dose gave an additive effect, causing both a raise in the mortality rate and a restrain in the MT and catalase induction. The accumulation of metals was less at low temperatures (5°C) and the MT and catalase levels were either increased or unaltered. Worms kept in sludge, had a lower induction of both MT and catalase at 5°C, but increased induction for both proteins at 20°C. It seems reasonable to believe that the metabolic system of the earthworm *Eisenia fetida* functions best at temperatures between 10-20 °C.

Despite the fact that I did not find a close dose – response relationship, the worms exposed to metals did express statistically significant changes in the MT and catalase

activity. These changes were connected to the concentration of the metal, where lower concentrations led to a significantly increase of the induction, while higher toxic concentrations led to a significantly inhibition of the induction. The induction pattern for these to proteins can therefore be used to discriminate between exposures and toxic effect. Proof for exposure could function as early warnings, and this early warning could be important in order to prevent later injuries. On these grounds it could be concluded that both proteins can be useful as biomarkers in monitoring the environment.

**Svar på Quiz:**

Koprin

## Vedtekter

§ 1 - Seksjon for Toksikologi er en spesialseksjon underlagt Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi (NSFT) (§ 3 Lov for NSFT). Seksjonen har som formål å være forum for foredrag og debatter i emner tilknyttet human- og økotoksikologi. I tillegg skal seksjonen fremme sosialt samvær og skape et kontaktnett mellom de med toksikologisk interesse. Seksjonen vil legge vekt på å drive opplysningsvirksomhet for allmennheten om effekten av fremmedstoffer på miljø og helse.

§ 2 - Som medlem av Seksjon for Toksikologi kan opptas ordinære medlemmer i Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi som er beskjeftiget med toksikologi.

§ 3 - Styret for seksjonen skal totalt bestå av 6 hovedmedlemmer og 3 varamedlemmer. De 6 hovedmedlemmene skal inkludere formann, sekretær, økonomiansvarlig og 3 styremedlemmer. Styremedlemmene velges normalt for en periode av 2 år, og det er ikke ønskelig at mere enn halyparten av styret stiller til valg samtidig. Styret bør reflektere medlemsmassen, og skal fortrinnsvis bestå av representanter med både økotoksikologisk og humantoksikologisk bakgrunn. Videre bør både undervisningsmiljøene, forskningsmiljøene og forvaltningsinstitusjonene være representert i styret. Varamedlemmene har møterett på alle styremøter. Styret er beslutningsdyktig når alle hovedmedlemmer er innkalt og minst 2/3 har møtt opp. Styret utpeker sin representant til styret i NSFT.

*De tre vararepresentantene skal tiltre på møter dersom ordinære medlemmer melder forfall.*

§ 4 - Årsmøtet er seksjonens høyeste myndighet og avholdes i forkant av NSFT's generalforsamling. Hvert medlem som personlig møter på årsmøtet har én stemme. Årsmøtet velger representanter til styret og redaksjonsmedlemmer til "Toksikologen". Valg avgjøres ved simpelt flertall. Ved flere kandidater holdes valget skriftlig, og relativt flertall avgjør.

Tidspunkt for årsmøte fastsettes av styret, og medlemmene varsles senest 1 mnd. før fastsatt dato. Styret setter frist for når forslag til årsmøtet må være styret i hende. Innkallingen sendes fra styret senest 14 dager før årsmøtet.

*Ekstraordinært årsmøte kan innkalles dersom 1/3 av medlemmene eller et flertall i styret krever det.*

§ 5 - Valgkomiteen skal ha tre medlemmer som velges av årsmøtet hvert år. Valgkomiteen kommer med innstilling til valg av styremedlemmer, valgkomitémedlemmer og redaksjonsmedlemmer i "Toksikologen".

§ 6 - "Toksikologen" skal ha minst 4 redaksjonsmedlemmer. Redaksjonsmedlemmene bør fortrinnsvis sitte i to år før gjenvalg. "Toksikologen" bør komme ut to ganger per semester. Foreningens vedtekter og referat fra seksjonens møter skal alltid stå i "Toksikologen".

§ 7 - Forslag om vedtektsendringer må være styret i hende innen dagsorden for årsmøte utsendes. Forslag til endringer sendes medlemmene sammen med dagsorden. Behandling av forslag til vedtektsendringer må skje iht §7 i NSFTs lover.-

# NSFT

N O R S K S E L S K A P F O R F A R M A K O L O G I O G T O K S I K O L O G I

---

**Toksikologen** utgis av Toksikologiseksjonen  
i Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi

**I redaksjonen:**

Marius Gudbrandsen  
[mariug@bio.uio.no](mailto:mariug@bio.uio.no)

Solveig Aamodt  
[solveia@student.matnat.uio.no](mailto:solveia@student.matnat.uio.no)

Vibeke Ansteinsson  
[VEA@niom.no](mailto:VEA@niom.no)

Heidi Uppstad  
[hup@stami.no](mailto:hup@stami.no)

Jørgen Stenersen  
[jorgen.stenersen@bio.uio.no](mailto:jorgen.stenersen@bio.uio.no)

**Kontingentsatser i Toksikologisk  
Seksjon, NSFT (pr. år, 2004 satser):**

Studenter: 50,-  
Arbeidende medlemmer: 250,-  
Innbetales til:  
Bankkontonr.: 9235 19 50538  
NSFT v/Ane Gedde-Dahl

**Styret i Toksikologiseksjonen i NSFT:**

**Leder**

Steinar Øvrebø  
[steinar.ovrebo@bio.uio.no](mailto:steinar.ovrebo@bio.uio.no)

**Styremedlemmer:**

Inger-Lise Steffensen  
[Inger-lise.steffensen@fhi.no](mailto:Inger-lise.steffensen@fhi.no)

Vibeke Thrane  
[Vibeke.Thrane@shdir.no](mailto:Vibeke.Thrane@shdir.no)

Oddvar Myhre  
[oddvar.myhre@GE.com](mailto:oddvar.myhre@GE.com)

Line Sverdrup  
[Line.sverdrup@dnv.com](mailto:Line.sverdrup@dnv.com)

Julie Tesdal Håland  
[tesdal@yahoo.no](mailto:tesdal@yahoo.no)

Roger Holten  
[postmottak@mattilsynet.no](mailto:postmottak@mattilsynet.no)

**Styrets varamedlemmer:**

Åse Krøkje  
[ase.krokje@bio.ntnu.no](mailto:ase.krokje@bio.ntnu.no)

Edgar Riverdal  
[edgar.rivedal@labmed.uio.no](mailto:edgar.rivedal@labmed.uio.no)

Anders Goksøyr

Hege Stubberud