

Toksikologen

Fagbladet frå toksikologi-seksjonen

Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi



Hausttur med soppanking. Foto av Marie Dahlberg Persson.

Redaksjonens røyst

No er hausten komen, både han og sommaren har budd på mykje skiftande vêr, og mange har kanskje ikkje heilt følt at det har vore ein ordentleg sommar i år. Eg håpar likevel at alle har hatt ein fin ferie, enten han har vore kort eller lang, og at arbeidet no på hausten går radig framover.

Før sommaren bestemte presidenten i USA, Donald Trump, seg for å trekkje USA ut av Paris avtalen, noko som gjorde mange urolege for kva som kom til å hende med reduksjonen av utslepp frå fossilt brensel. Auka utslepp frå fossilt brensel, og då spesielt CO₂ og metangass, har fått stor grad av skuld i det me kallar den globale oppvarminga. Det er diskutert om den globale oppvarminga leier til auka ekstremvêr, noko som USA i det siste dessverre har fått merke. Området har blitt råka av orkanane Irma, Harvey og Jose. Vonleg vil ein gå raskt i gang med reduksjonar av forbrenning av fossilt brensel. For oss som er oppteken av toksikologi er ein ikkje berre uroa for ekstremvêr, men også dei skadelege kjemikala som blir frigitt ved forbrenning av fossilt brensel.

Det er mykje bekymring for fleire av forbindingane som blir produsert som

biprodukt av forbrenning, deriblant dei mykje omtalte poly-aromatiske hydrokarbonane. Luftureining er spesielt eit problem i tettbygde område i kuldeperiodar. Til å ta opp denne problemstillinga har Oddvar Myhre skrive eit innlegg i denne utgåva om korleis trafikk-relatert luftureining kan føre til utviklingsskadar i hjernen hjå barn.

Me har i denne utgåva, i tillegg til innlegget av Oddvar Myhre, fått inn to andre innlegg. Det eine er eit vitskapeleg innlegg av Alexandra I. S. Treimo og Kirsten E. Rakkestad som held fram med temaet frå forgje utgåve, om kjemikal i tannprodukt. Denne gongen tek dei opp dette med silika-nanopartiklar. Det andre innlegget er eit reisebrev av Pernille Kvernland, som saman med to masterstudentar i toksikologi reiste på sommarskule ved Masaryk universitet.

Intervjustafettpinnen gjekk denne gongen vidare til Veerle Jaspers, som fortel om korleis ho enda opp i Noreg, og korleis det har vore å arbeide ved NTNU.

Me vil takka alle for fine innlegg til denne haustutgåva.

Venleg helsing



Thomas Aga Legøy

Redaktør

Innholdsforteikning

Redaksjonen informerer	4
Intervju med Veerle Jaspers	5
Sommerskole om giftige stoffer i miljøet ved Masaryk universitetet (Brno, Tsjekkia)	7
Eksposering for trafikk-relatert luftforurensning tidlig i livet - kan dette medføre utviklingskader i barnets hjerne?	10
Gir siliknanopartikler ulik stressrespons i lunge og hjerne?*	14
Redaksjonen og styret.....	20
Vedtakter for Seksjonen for Toksikologi	21

Redaksjonen informerer

Informasjon om Vintermøtet 2018

Me ynskjer å informera om Vintermøtet i farmakologi og toksikologi 2018 som arrangerast den 25. – 28. januar på Radisson BLU resort i Beitostølen.

Programmet for dette møtet er fortsett under arbeid, og vil bli sendt ut ved ein seinare anledning.

Fristen for innsending av samandrag til frie føredrag og postera er 1. desember 2017. Frist for abstrakt til inviterte foredrag er 5. januar 2018. Informasjon om samandrag finnest her: <http://nsft.net/presentation-av-foredrag-eller-poster>

Påmelding til Vintermøtet opnar den 1. november 2017. Alle deltakara og inviterte føredragshaldarar må fylle ut og sende inn elektronisk påmeldingsskjema. Siste frist for påmelding med lågaste deltakaravgift er 12. desember 2017.

Deltakaravgift ved påmelding t.o.m. 12. desember er kr 900,- for NSFT-medlem, kr 1350,- for vanleg deltakar (ikkje-medlem), kr 400,- for student NSFT-medlem og kr 550,- for student (ikkje-medlem).

Etter 12. desember auker avgifta med kr 300,- for deltakare (medlem/ikkje-medlem) og kr 200,- for studentar.

Meir informasjon finnest på denne nettsida: <http://nsft.net/vintermotet>

Artikkelprisen

På vintermøtet 2018 vil det bli delt ut ein publikasjonspris innan farmakologi og toksikologi.

Alle er velkommen til å nominera artiklar. Nominasjonen, med tittel, forfattar og abstrakt, sendast til nsft@nsft.net innan 1. november 2017.

Artikkelen må vera akseptert for publisering i perioden 1. november 2016 til 31. oktober 2017.



Foto: Sølvi W. Normannsen, Universitetsavisa

Intervju med Veerle Jaspers

**Førsteamanuensis ved
Institutt for biologi ved Norges
teknisk-naturvitenskapelige
universitet (NTNU)**

Hvordan ble toksikologi ditt fagfelt?

Jeg var masterstudent i biologi, retning fysiologi, ved Universitet Antwerpen i Belgia. Det var flere som jobbet med økotoksikologi i dette studie-/forskningsmiljøet og jeg lette etter en spennende og relevant masteroppgave. Jeg valgte å studere kjøttmeis i området rundt et metallsmelteri, en masteroppgave som inneholdt både felt og lab-arbeid. Etter masteren min hadde jeg tenkt til å bli lærer, men veilederen min så mitt potensialet og overbeviste meg om å ta en doktorgrad i biologi/økotoksikologi.

Hva var det som gjorde at du valgte å komme til Norge for å jobbe som forsker?

Etter at jeg hadde blitt ferdig med doktorgraden, fortsatte jeg på samme sted som en post doc. Jeg søkte på en stilling i den samme forskningsgruppen, men på grunn av lite (utenlandsk) erfaring fikk jeg ikke den. Dermed bestemte jeg meg for å lete videre, hos andre universiteter, fordi det var nesten ingen sjanse for at det skulle dukke opp en lignende stilling på instituttet om kort tid. En dag fikk jeg en epost om en stilling som førsteamanuensis i miljøtoksikologi ved NTNU. Jeg hadde aldri vært i Trondheim før, men stillingen

virket så fristende og var akkurat den type jobb som jeg ønsket meg (både forskings og undervisnings messig). Tidligere hadde jeg vært på et forskningsopphold i Tromsø og likte det veldig godt. Etter en prat med mannen min, som hadde besøkt meg i Tromsø, bestemte jeg meg for å søke.

Hvordan ser en typisk arbeidsdag ut for deg?

Det finnes ikke en typisk arbeidsdag, fordi alle ser jo forskjellige ut. Noen få ganger er det rolig. Da kan jeg jobbe litt med mine egne saker, men mestparten av tiden er det masse møter eller oppdrag i løpet av en dag. Det kan være møter med master- eller PhD-studenter, møter med forskningsgruppen, ENVITOX gruppen, forskningskomiteet, skype-samtaler med utenlandske kollegaer, osv. I tillegg har jeg undervisning, men det holder jeg ikke på med nå fordi jeg er i 50% mamma permisjon.

Du fikk barn nummer to for ikke så lenge siden, hvordan takler du utfordringen med å kombinere livet som småbarnsmor og en forskerkarriere?

Jeg hadde allerede tidlig i svangerskapet bestemt meg for at jeg skulle komme tilbake i 50% stilling etter 4 måneder (vanlig permisjonstermin i EU). Jeg husket fra det første barnet at det ble kjedelig for meg å sitte hjemme alene med baby og ikke ha noen intellektuelle utfordringer i tillegg. Dessuten kunne jeg ikke forlate mine PhD og masterstudenter i et helt år. Det hadde vært masse styr med jobb om kvelden og helgene hvis jeg skulle bli hjemme med baby 100%. Både jeg og mannen min trives veldig godt med 50/50 ordningen. Jeg har faste dager jeg er på jobb og faste dager jeg blir hjemme og koser meg med Robin. Det er lettere for meg å si nei i en slik situasjon, fordi hvis jeg ikke er på NTNU, så er det ikke mulig å ta oppgaver eller møter den dagen. Det eneste som er en utfordring er mailboksen som fyller seg opp uavhengig av din arbeidsprosent ;)

Hvordan har det vært å arbeide med NTNUs stjerneprogram?

Det har vært en fantastisk erfaring! Jeg har lært så mye om forskningsledelse, søknadsskriving, forskningsstrategier, osv. I tillegg har jeg møtt personer fra hele NTNU som jobber i helt andre forskningsmiljøer, men som har de samme utfordringene. Det har vært veldig lærerikt å dele erfaringer med de andre. Vi er alle litt triste for at stjerneprogrammet går mot slutten nå. Jeg håper at vi kan fortsette å treffe hverandre etter at stjerneprogrammet er slutt. Jeg tror vi kan fortsatt være til hjelp for hverandre.

Hvem ønsker du å gi stafett-pinnen videre til?

Den nye «Onsager fellow» som nettopp har startet i forskningsgruppen vår, Martin Wagner. Han kommer fra Tyskland og studerer effekter av plast og mikroplast. Jeg tror vi kan forvente masse spennende aktivitet fra han!

Sommerskole om giftige stoffer i miljøet ved Masaryk universitetet (Brno, Tsjekkia)

Pernille Kvernland, MSc i Miljøtoksikologi fra NTNU

Det hele startet med at det i begynnelsen av april tikket inn en mail i innboksen min. Denne mailen inneholdt litt informasjon om en sommerskole som skulle holdes ved Masaryk universitetet i Brno, Tsjekkia mot slutten av juni. Brno er den nest største byen i Tsjekkia med over 380 000 innbyggere. Den ligger i regionen Sydmähren sørøst i landet der elvene Svitava og Svratka møtes. Denne sommerskolen arrangeres i regi av The Research Centre for Toxic compounds in the Environment (RECETOX). RECETOX er et uavhengig departement ved fakultetet for forskning ved Masaryk universitetet der de fokuserer på persistente organiske miljøgifter, polare organiske forbindelser og giftige metaller. Masaryk-universitetet er det nest største universitetet i Tsjekkia. Det er oppkalt etter Tomas Masaryk, initiativtakeren til opprettelsen av universitetet og Tsjekkosloviakias første president. Denne sommerskolen er en årlig begivenhet, og i år var det nummer 13 i rekken med organiske forurensninger i det akvatiske miljøet som tema. Sammen med to studievenninner falt valget på at vi hadde lyst til å dra. Vi betalte registreringsavgiften, booket flybilletter og startet så smått å undersøke litt nærmere hva Tsjekkia, og da nærmere bestemt Brno, hadde å tilby. Heldigvis kjente en av oss en lokalperson ved universitetet som kunne gi oss litt tips til hva vi burde se og oppleve mens vi var på besøk.

Sommerskolen gikk intensivt over fem dager, fra mandag 26. juni til fredag 30. juni. Vi valgte dermed å kombinere den

faglige turen med en liten sightseeingtur i Praha den påfølgende helgen.

I og med vi reiste fra ulike steder i Norge ble det til at vi møttes i Praha for så å ta nattbussen sammen til Brno, en reise på ca. 2 ½ timer.



Her har vi endelig funnet fram til bussen som skal ta oss fra Praha til Brno og Masaryk universitetet, hvor sommerskolen holdes. Fra venstre: Pernille Kvernland, Marie Dahlberg Persson og Silje Marie Kristiansen.

Første dag ble brukt til registrering av alle deltakerne, presentasjon av universitetet, de ansatte, og hver enkelt deltaker. Det var alt fra masterstudenter til PhD-studenter og yrkesaktive som deltok på årets sommerskole. Totalt var det 46 deltakere fra hele 17 ulike land, med andre ord en god blanding av mennesker med ulik bakgrunn.

De neste to dagene ble det holdt en rekke foredrag om alt fra vurdering av toksiske effekter, bruk av modellering, globale

fremtredende problemer og hvordan man kan forhindre og kontrollere utslipp av persistente toksiske kjemikalier. Årets hovedtema var passiv prøvetaking i vann, og det ble dermed holdt forelesninger om hvordan man kan bruke passive prøvetakere i forskning, kalibrering av utstyr, ulike typer passive prøvetakere, eksempler fra feltstudier, kvalitetsvurdering og kvalitetskontroll samt utfordringer man kan møte ved bruk av passive prøvetakere. Vi fikk også bli med ut i felt for en praktisk demonstrasjon av ulike typer passive prøvetakere og for en hands-on opplevelse av hvordan man gjør det ved innhenting av prøver og klargjøring og rengjøring før prøvene er klare til å analyseres på lab.

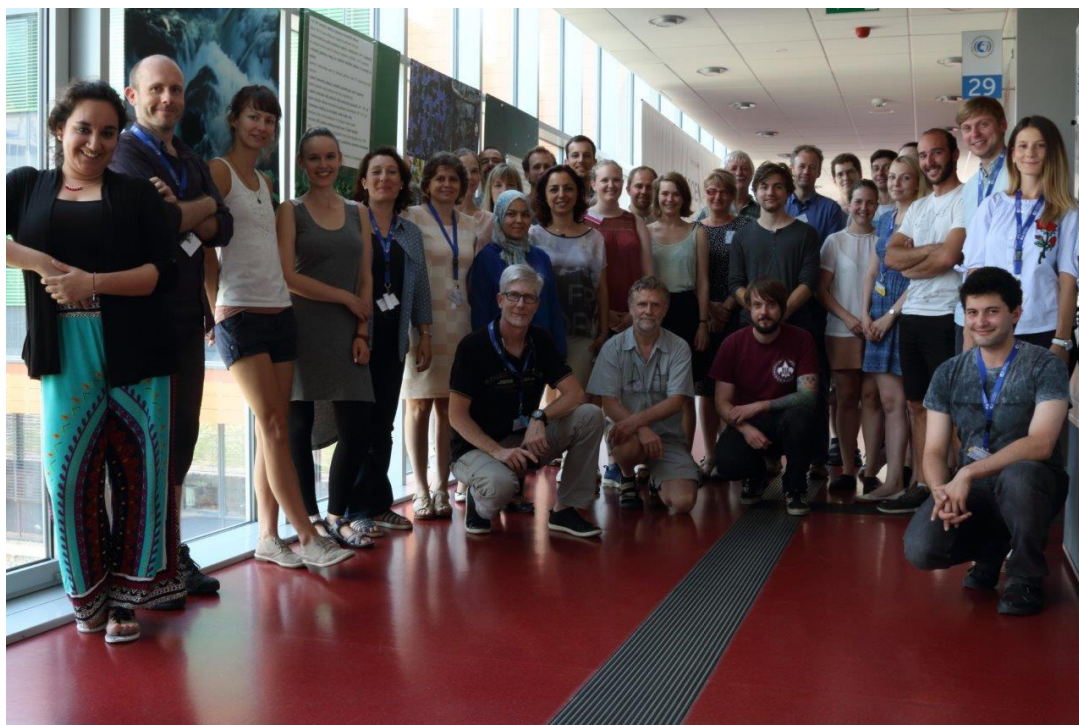
På bildet (t.h.) er en beholder med prøver hentet opp fra under en flytebrygge i den lokale elven i området. Som en kan se har de gjennomskitige prøvene samlet opp en del skitt, dette er uønsket når prøvene skal analyseres videre på lab, og de er derfor nødt å rengjøres uten at en fjerner forbindelsene en ønsker å undersøke. Det ble dermed arrangert en liten konkurranse i å rengjøre prøvene best mulig, med en iskald øl til konkurransens vinner.

I tillegg til det faglige på dagtid, ble det en av ettermiddagene arrangert en tur til Mendel museum, et museum dedikert til genetikkens far Gregor Mendel, med påfølgende middag ved STAROBRNO restaurant og bryggeri.

Nest siste dag ble det arrangert en heldagsutflukt til Košetice meteorologiske observatorie hvor vi fikk et innblikk i hvordan internasjonalt samarbeid om global overvåkning av kjemikalier foregår.

Siste dag fikk vi jobbe med kalkuleringer, samt en større omvisning av selve universitetet og laboratoriene, hvor det blant annet ble demonstrert hvordan en skal behandle prøvetakerne før analyse og den kjemiske analysen som brukes for å ekstrahere de forbindelsene en ser etter i prøvene.





Her er hele gjengen som deltok på årets sommerskole ved Masaryk universitetet i Brno, Tsjekkia. De fleste deltakerene reiste i løpet av fredagen, men vi ble boende på studenthotellet til lørdag morgen og tok bussen tilbake til Praha for en helg med shopping og sightseeing i den vakre hovedstaden, som også er landets største by. Siden 1992 har byens gamle sentrum stått på UNESCOs liste over verdens

kulturarv – den er virkelig verdt å ta turen innom.

Dersom du vil nærmere undersøke RECETOX og/eller RECETOX sin sommerskole, ta en tur innom nettsiden deres: <http://www.recetox.muni.cz/index-en.php>

Eksponering for trafikk-relatert luftforurensning tidlig i livet - kan dette medføre utviklingskader i barnets hjerne?

Oddvar Myhre, toksikolog og forsker ved Nasjonalt folkehelseinstitutt

Luftforurensning er en kompleks blanding av partikler (PM), gasser, spormetaller og adsorberte organiske forurensninger som hovedsakelig stammer fra antropogene kilder. Trafikk-relatert luftforurensning er den viktigste bidragsyteren til luftforurensning i mange byer, og ut ifra et folkehelseperspektiv er diesel eksos (DE) utslipp den viktigste komponenten (Ghio et al. 2012). DE inneholder mer enn 40 toksiske luftforurensningskomponenter og er hovedutslippskilde til PM i tettbygde strøk. Disse partiklene kan deles inn i fine partikler (PM_{2.5}) og ultrafine (UFPM; <100 nm). PM_{2.5} og UFPM er rapportert å gå over i blodbanen og distribueres til ulike organer etter inhalasjon, inkludert til hjernen (Genc et al. 2012; Oberdorster et al. 2002). Selv om partikulær luftforurensningsnivåer er lavere i skandinaviske land sammenlignet med sentral og sør Europa, skjer det med jevne mellomrom, særlig på vinterstid, at luftkvalitetskriteriene overskrides. Bildet nedenfor er fra et VG oppslag sist vinter, hvor ti ulike steder i Norge overskred de helse-baserte grenseverdiene på PM₁₀.



Helsefarlig luft ti steder i Norge – Oslo Ap krever tiltak



EPSOS L.O. Ekspos for bilutslipp i Oslo i morgensmøtet. Bildet er tatt i januar i år. FOTO: BERTH ROALD, NTB SCANPIX

Innbyggerne i mange land i sør og øst Asia er ofte eksponert for høye verdier av PM ($\geq 100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) (Brook et al. 2010; Van Donkelaar et al. 2015). PM luftforurensning er den ledende miljøbetingede risikofaktoren for sykdom og død i Europa (Hanninen et al. 2014) og i Norge (NIPH 2016). Barn er antatt å være blant de mest sårbare ved eksponering for luftforurensning grunnet rask vekst og utvikling, umoden blod-hjernebarriere, høyere absorpsjonsrate og lave effektivitet i metabolisme/detoksifisering av fremmedstoffer enn voksne.

Blandt stoffene som er adsorbent til PM, er polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) av særlig bekymring. Miljønivåene av PAH dannes ved ufullstendig forbrenning. International Agency for Research on Cancer (IARC) har klassifisert flere PAH som kjente, mulige eller sannsynlig kreftframkallende i mennesker (gruppe 1, 2A eller 2B). Det som er særlig interessant er at flere nye studier tyder på at nevroutviklingseffekter oppstår tidligere og ved lavere konsentrasjoner enn kreft (Chepelev et al. 2015) som er det primære endepunktet for risikovurdering av PAH, og vi mener at ytterligere forskning er viktig for å støtte opp om bedre risikovurdering av PAH. Disse stoffene er rapportert å passere fra mors blod under svangerskapet til fosteret (Zhang et al. 2017), og kan potensielt forårsake alvorlige helseeffekter hvis disse konsentrasjonene blir for høye. Andre har vist at PAH kan krysse blod-hjernebarrieren i forsøksdyr (Grova et al. 2011) hvor de kan forårsake patofysiologiske forandringer slik som tap

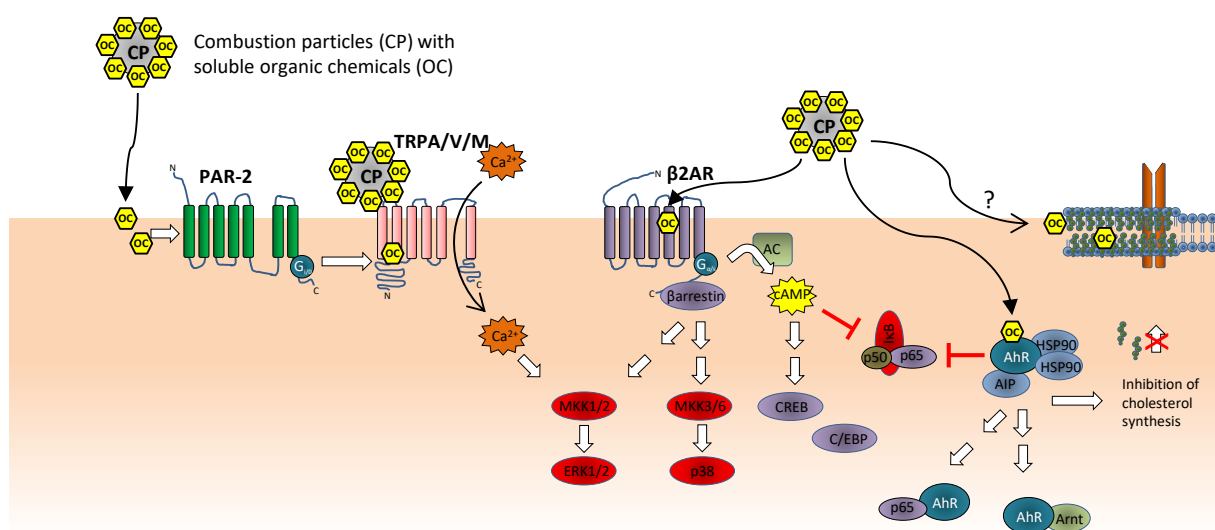
av nevronal aktivitet og synaptisk plastisitet (Chepelev et al. 2015) og celledød (Dutta et al. 2010). Videre er det rapportert at eksponering av PAH under svangerskapet og etter fødsel i rotter viser negative effekter på hjerneutvikling, og atferdsforandringer (Patel et al. 2016; Li et al. 2012).

Figuren nederst på siden viser en forenklet framstilling av cellulære mekanismer for effekter fra PM og adsorberte organiske forbindelser (OC) på partikkeloverflaten (Øvrevik et al. 2015).

Luftforurensningskomponenter kan muligens medføre irreversible utviklingssykdommer i barnet. ADHD er den vanligste nevrou utviklingssykdommen og er rapportert å ramme 5-10% av barn globalt (Polanczyk et al. 2007). Insidensen av diagnostisert ADHD har økt i den vestlige verden siden 1980-årene, og eksponering for luftforurensning tidlig i livet er foreslått å være en årsak til dette. Studier i Mexico City har vist økt nivå av nevroinflammatoriske markører i hjernen til barn eksponert for høye nivåer av luftforurensning, i tillegg til kognitive svekkelser (Calderon-Garciduenas et al. 2011; 2013). I et prospektivt humant studie av Harris et al. (2015) fant de at hvis man bodde nært sterkt trafikkert vei under

svangerskapet påvirket dette skoleprestasjonen hos barna. Noen få studier indikerer mer spesifikt assosiasjoner mellom trafikk-relatert forurensning og prevalens av ADHD. I et tverrsnittsbefolkningsstudie fant Siddique et al. (2011) assosiasjon mellom luftforurensning og atferdsproblemer hos indiske barn, hvor assosiasjonen var størst mellom PM og prevalens av ADHD. Videre fant Chiu et al. (2013) en assosiasjon mellom “black carbon” eksponering og oppmerksomhets problemer hos barn, og eksponering for elementær karbon var assosiert med hyperaktivitet i barn (Newman et al. 2013). I et annet studie på skolebarn ble det funnet en assosiasjon mellom trafikk-relatert eksponering og økt atferdsproblemer (Forns et al. 2016).

Disse epidemiologiske studiene er i hovedsak tverrsnittstudier, hvor det er vanskelig å bevise årsaker til sykdomsutvikling. Forskerne på vårt institutt mener derfor at det er meget viktig å støtte opp slike assosiasjonsfunn med mekanistiske studier i celler og dyr for å underbygge årsakssammenhenger. Det er noen eksperimentelle studier som støtter disse assosiasjonene i befolkningsstudiene. For eksempel viste eksponering for DE under graviditet svekket motorisk aktivitet, koordinasjon og endret atferd i mus (Yokota



Figur hentet fra Øvrevik et al. (2015). *Biomolecules* 2015, **5**, 1399-1440 som viser en forenklet framstilling av cellulære mekanismer for effekter fra PM og adsorberte organiske forbindelser (OC) på partikkeloverflaten.

et al, 2009), og tidlig eksponering for PM etter fødsel medførte atferdsendringer og kortidshukommelsessvikt i mus (Allen et al. 2013; 2014). Flere mekanismer er foreslått av oss og andre som forklaring på mulig utvikling av ADHD etter eksponering for trafikk-relatert luftforurensning. Dette omfatter i korthet oksidativt stress (Ceylan et al. 2012), inflammasjon (Donev & Thome 2010), i tillegg til forstyrrelser av dopamin og noradrenalin signalering (Heyer & Meredith 2017). Verdt å merke seg er at behandling som blokkerer dopamin og noradrenalin re-opptak i nevronale synapser er vist å redusere ADHD symptomer (Sharma & Couture 2014). Dysregulering av nevrotofiske faktorer (Tsai 2017) og thyroid hormoner under kritiske perioder i nevroutviklingen er også vist å være nøkkelmekanismer for utvikling av ADHD.

Av særlig interesse for vår forskning på PAH de senere årene har vært påvirkning og forstyrrelse av β -adrenerg signalering via interaksjon med β_2 -adrenerg reseptorer (AR) samt human Ah reseptor påvirkning som igjen forstyrrer P450 enzym aktivitet samt nedstrøms kalsium signalering i cellene (Mayati et al. 2012; 2015). Under embryoutvikling er disse signaleringssystemene veldig sentrale for normal fosterutvikling. Hos voksne vil desensitiseringsmekanismer beskytte mot β_2 AR overstimulasjon, men fosteret mangler denne negative feed-back under en periode i utviklingen og vi tror da at fosteret kan være ekstra påvirkelig for PAH eksponering (Pitzer et al. 2001). Denne hypotesen støttes av studier som viser at β_2 -agonister brukt under svangerskapet kan øke forekomst av f. eks. nevroutviklings sykdommer, forsinket språkutvikling, kognitiv svikt, og nedsatt skoleprestasjon hos barn (Hadders-Algra et al 1986; Croen et al. 2011).

Oppsummert ser det ut til at flere nye epidemiologiske studier kan peke i retning av at eksponering for luftforurensning tidlig i livet kan medføre utviklingsforstyrrelser og ADHD i barn, men bevisbyrden er

foreløpig ikke tilstrekkelig ved eksponering som vi har i norske byer. Flere godt designede befolkningsstudier, mekanistiske studier i avanserte *in vitro* modeller for nevroutvikling og dyreforsøk er nødvendig for å utføre et tilstrekkelig risikovurdering.

Referanser

- Allen** et al. (2013) *Environmental health perspectives*. **121**, 32-8.
- Allen** et al. (2014) *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. **140**, 160-78.
- Brook** et al. (2010) Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association, *Circulation*. **121**, 2331-78.
- Calderon-Garciduenas** et al. (2011) *Brain and cognition*. **77**, 345-55.
- Calderon-Garciduenas** et al. (2013) *Frontiers in neuroscience*. **7**, 183.
- Ceylan** et al. (2012) *Psychiatry and clinical neurosciences*. **66**, 220-6.
- Chepelev** et al. (2015) *Mutat Res-Rev Mutat*. **764**, 64-89.
- Chiu** et al. (2013) *Environmental health perspectives*. **121**, 859-64.
- Donev & Thome** (2010) *Attention deficit and hyperactivity disorders*. **2**, 257-66.
- van Donkelaar** et al. (2015) *Environmental health perspectives*. **123**, 135-43.
- Forns** et al. (2016) *Environmental health perspectives*. **124**, 529-35.
- Genc** et al. (2012) *J Toxicol*. **2012**, 782462.
- Ghio** et al. (2012) *Current opinion in pulmonary medicine*. **18**, 144-50.
- Grova** et al. (2011) *Chem Res Toxicol*. **24**, 1653-67.
- Hanninen O.** et al. (2014) *Environ Health Perspect* **122**, 439-46.
- Harris** et al. (2015) *Environmental health perspectives*. **123**, 1072-8.
- Heyer & Meredith** (2017) *Neurotoxicology*. **58**, 23-41.
- Li** et al. (2012) *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. **125**, 233-47.

- Mayati** et al. (2012) *The Journal of biological chemistry*. **287**, 4041-52.
- Mayati** et al. (2014) *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. **28**, 1153-7.
- Newman** et al. (2013) *Environmental health perspectives*. **121**, 731-6.
- NIPH** (2016) Sykdomsbyrde i Norge (GBD 2013).
- Oberdorster** & Utell (2002) *Environmental health perspectives*. **110**, A440-1.
- Patel** et al. (2016) *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. **50**, 7-15.
- Pitzer** et al. (2001) *Child Psychiatry Hum Dev*. **31**, 165-82.
- Polanczyk** et al. (2007) *The American journal of psychiatry*. **164**, 942-8.
- Sharma** & Couture (2014) *The Annals of pharmacotherapy*. **48**, 209-25.
- Siddique** et al. (2011) *European journal of pediatrics*. **170**, 923-9.
- Tsai** (2017) *Cytokine & growth factor reviews*. **34**, 35-41.
- Yokota** et al. (2009) *Neuroscience letters*. **449**, 38-41.
- Zhang** et al. (2017) *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. **222**, 267-275.
- Øvrevik** et al. (2015). *Biomolecules* 2015, **5**, 1399-1440.

Gir silikananopartikler ulik stressrespons i lunge og hjerne?*

Alexandra I. S Treimo¹ og Kirsten E. Rakkestad²

¹ Masterstudent i toksikologi ved Universitetet i Oslo og Nordisk institutt for odontologiske materialer (NIOM)

² Ph.d., gjesteforsker ved NIOM

Nanotoksikologi, studien av toksisiteten til nanopartikler, er viktig for å forstå helseeffektene av eksponering for atmosfærisk ultrafine partikler, det vi kaller “naturlige” nanopartikler. Samtidig er det viktig for å sikre tryggest mulig bruk av produserte nanopartikler. Denne artikkelen er en introduksjon til et prosjekt der vi studerer silikananopartiklers (SiNP) evne til å indusere oksidativt stress i tre ulike mammalske cellelinjer, det vil si celler fra pattedyr. Ved å benytte den samme typen partikler av samme størrelse, og ellers mest mulig like eksponeringsbetingelser for de tre celletypene, håper vi å kunne si noe om i hvor stor grad selve cellemodellen påvirker resultatene i nanotoksikologiske studier. Vi finner indikasjoner på oksidativt stress etter eksponering for 10 nm SiNP i alle de tre cellelinjene, men i ulik grad og ved ulike endepunkter.

Silikananopartikler

Nanopartikler er små, konstruerte partikler mindre enn 100 nanometer i minst én dimensjon (Feng et al., 2015). I dette prosjektet ønsker vi å undersøke partikler som kan frigjøres fra tannmaterialer, for eksempel fra fyllinger, implantater og munnskyllevann. For å undersøke dette har vi benyttet SiNP med en størrelse på 10 nm.

Ulike typer nanopartikler benyttes for å gi et materiale ønskede egenskaper, som eksempelvis ønsket viskositet i nanokompositt. Silika i hydrert form brukes for eksempel som slipemiddel i tannkremer for å fjerne plakk. Ved stadig økt bruk av denne typen tilsetninger, eksponeres både tannteknikere, tannleger, tannpleiere og pasienter i større grad enn tidligere. Eksponeringen kan skje både ved inhalering, svelging og absorpsjon i munnhulen eller via slimhinnene.

Oksidativt stress

Atomer består av en kjerne med en eller flere bundne elektroner. Disse elektronene trives aller best i par. Elektroner som ikke er i par («single») vil alltid prøve å skaffe seg en partner. Når et atom, molekyl eller ion har bundet til seg et ikke-paret (valens) elektron kalles det et fritt radikal. Disse frie radikalene er ustabile, eller det vi kaller svært reaktive. Reaktive oksygenforbindelser (ROS; «reactive oxygen species») er en samlebetegnelse på frie radikaler og andre reaktive forbindelser som inneholder oksygen. Disse forbindelsene kan skade viktige strukturelle og funksjonelle strukturer i cellene slik som lipidmembraner, proteiner, DNA og RNA. Dette kalles oksidativ skade. Alle

mammalske celler har etablerte forsvarssystemer mot slike oksidative skader. Dersom disse forsvarssystemene ikke virker som de skal, eller de ikke er effektive nok, vil de oksidative skadene kunne akkumuleres. Dette kalles oksidativt stress. Forsvarssystemene består typisk av elementer som enten kan forebygge dannelsen av ROS, som kan nøytralisere eller fjerne ROS (disse kaller vi antioksidanter), som kan reparere oksidativ skade eller fjerne molekyler med oksidativ skade.

Nanopartikler og oksidativt stress

Det er velkjent og godt dokumentert at ulike partikler, både nanopartikler og større partikler (PM; particular matter) kan gi oksidativt stress (Khalili Fard et al., 2015; Peixoto et al., 2017). Effekten av partikkeleksponering vil imidlertid variere med ulike partikkelstørrelser, konsentrasjon, materialet partiklene er laget av og partiklenes form og overflate. Effekten vil dessuten variere etter hva slags organer og celletyper som eksponeres.

ROS dannes som et resultat av normal oksidativ metabolisme i cellene. Slik naturlig generert ROS blir tatt hånd om av cellenes eget antioksidantforsvar. Men ved ulike tilstander som sykdom, eksponering for stråling, miljøgifter eller alkohol kan vi få en økt generering av ROS. Økt ROS-generering er også en av de mest rapporterte toksiske effektene av nanopartikkeleksponering (Khalili Fard et al., 2015). Nanopartiklene kan enten generere ROS i seg selv, slik det har vært vist for større partikler (Risom et al., 2005), samtidig som de kan medføre ROS-generering som en del av en cellulær respons til partiklene.

Siden nanopartiklene er så små ser vi for oss at de kan påvirke cellene på mange ulike måter. De kan binde seg til proteiner både på utsiden og innsiden av cellemembranen, eller de kan påvirke selve membranstrukturen. Nanopartikler kan altså indusere oksidativt stress i celler både via partikkelgenerert ROS, via interaksjon med cellenes naturlige systemer for normal oksidativ metabolisme, og ved å påvirke cellenes antioksidantforsvar.

Cellelinjer

Partikkeleksponering skjer for en stor del via inhalasjon. Det har derfor vært vanlig å benytte epitellungeceller til studier av PM-eksponering og til å studere effekter av nanopartikler. De minste partiklene er imidlertid så små at de kan gå over i blodbanen og også krysse blod-hjernebarrieren. Vi har derfor valgt å studere effekter av nanopartikler både i to ulike lungecellelinjer, og i en nevron-lignende cellemodell. Vi har tre mål med dette:

1. Vi ønsker å finne ut i hvilken grad funn fra lungeceller, som altså er de som er mest studert, er overførbare til celler fra andre organer
2. Vi ønsker å finne ut om to lungecellelinjer med et relativt likt utgangspunkt, der den ene har fått endret deler av forsvarssystemet sitt mot oksidative skader, responderer ulikt på eksponering for nanopartikler
3. Vi ønsker å finne ut om nanopartikler har skadelige effekter på nerveceller

De to lungecellelinjene vi har valgt er A549-celler og BEAS-2B-celler. Disse er begge humane epitelceller, men henholdsvis alveolære kreftceller og

normale bronkiolære celler. A549-celler har dessuten en mutasjon som gjør at aktiviteten til proteinet NRF2 ikke fungerer som normalt. NRF2 er viktig i cellens antioksidantforsvar. Ved å sammenligne effekter i disse to cellelinjene kan vi derfor få en indikasjon på om, eller i hvilken grad, de nanopartiklene vi studerer påvirker nrf2-signalveien i lungeceller. Den tredje cellelinjen vi har benyttet er PC12-celler. Disse cellene stammer fra en kreftcellelinje hentet fra rottebinyre. Cellelinjen er godt studert, og viser seg å ha nervronliknende egenskaper ved at de uttrykker reseptorer for en del vekstfaktorer, som for eksempel NGF (nerve growth factor).

Det er særlig viktig å undersøke om nanopartikler kan ha skadelige effekter på nervesystemet både fordi dette vil være svært alvorlig i seg selv, blant annet i utviklingen av ulike nevrologiske lidelser, men også fordi det kan spille en rolle i andre typer lidelser som for eksempel hjertelidelser.

Hvordan måler vi oksidativt stress?

Cellekulturene dyrkes i cellekulturflasker i medium med serum. Deretter splittes de og sås ut på celledyrkeplater. Vi har forsøkt å la cellene stå i 24 timer med serum i mediet og 24 timer serumfritt før eksponering (gjelder ikke BEAS-2B). Det har vist seg at beste metode er å la cellene gå serumfritt i 24 timer før eksponering. Nanopartiklene løses deretter i serumfritt medium for å unngå at partiklene klumper seg, og cellene eksponeres i 3, 6 eller 24 timer.

Vi har sett på morfologiske endringer ved bruk av lysmikroskop.

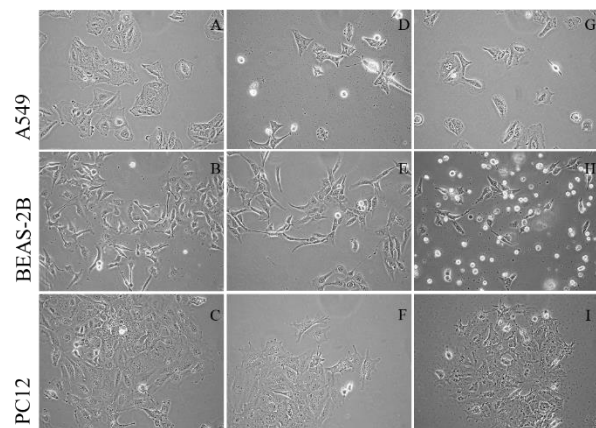
Proben 2',7',dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) ble benyttet som

ROS indikator. Analysene ble gjort i flow cytometer.

Hemeoksiginase (HO) er et mikrosomalt enzym som katalyserer oksidasjonen av heme til antioksidantmolekyler. HO består av to homologe isoenzymer (HO-1 og HO-2). HO-1 induseres ved en rekke stimuli, blant annet av oksidativt stress, som er det vi har undersøkt. Forhøyede nivåer av HO-1 antas å være knyttet til et cellulært forsvar mot oksidativt stress, ettersom økt nivå av HO genererer mer antioksidanter (Kikuchi et al., 2005). Nivåene av HO-1 ble målt ved Western blotting.

Resultater og diskusjon

De tre cellelinjene vi har studert har i utgangspunktet nokså ulik morfologi, men de morfologiske endringene vi ser ved eksponering for SiNP er likevel ganske like



Figur 1: Morfologi. BEAS-2B, A549 og PC-12 celler eksponert for SiNP10 i 6 timer. Bildene er tatt med lysmikroskop, 20X forstørrelse, og viser et representativt utvalg av cellene. A-C: kontroll med serum i mediet, D-F: kontroll med serumfritt medium, G-I: eksponerte celler, konsentrasjon 12,5 µg/mL. Eksponering er gjort i serumfritt medium for å unngå aggregering av partiklene.

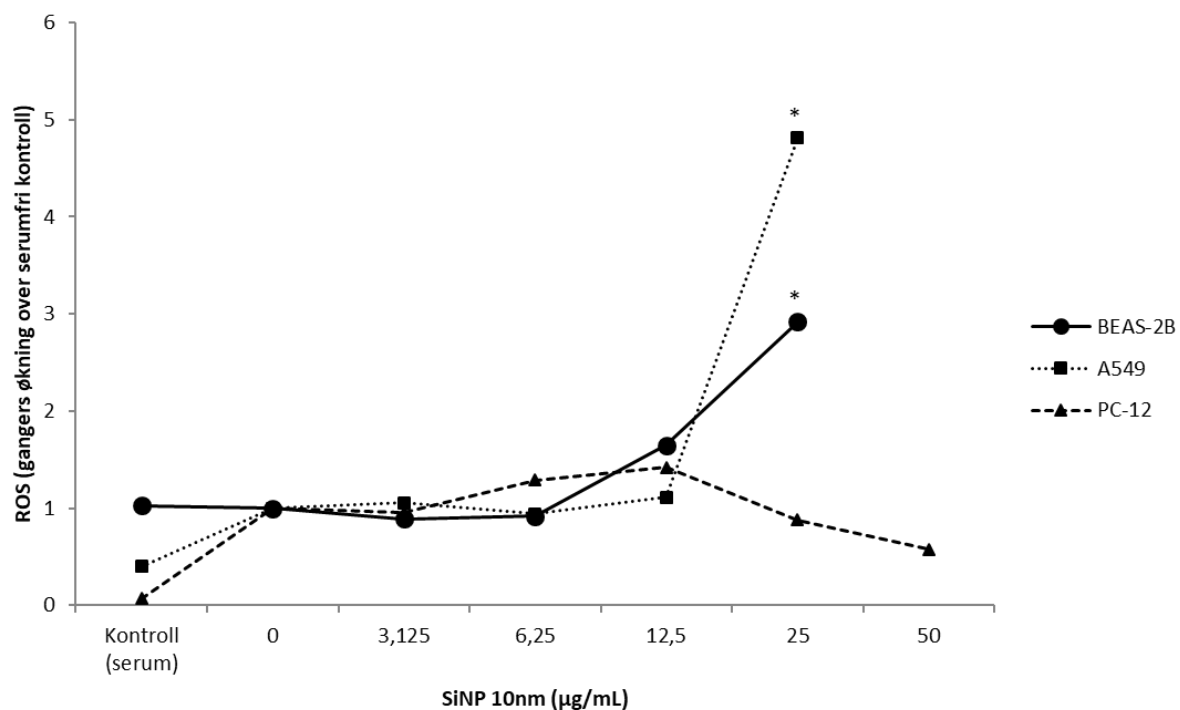
(se figur 1). Felles for alle cellelinjene er dessuten at de første endringene skjer ganske raskt, dvs. etter omtrent 2-3 timer. Det vi da ser er først og fremst

vakuoledannelse. Andre studier har vist at både A549 celler og andre celletyper tar opp nanopartikler ved hjelp av makropinocytose, slik at det dannes «multivesicular bodies» (Nowak et al., 2014; Oh & Park, 2014). Nowak og medarbeidere fant også at silikananopartiklene induiserte autofagi i A549-celler, og påviste dannelsen av autofagosomer. Som det fremgår av bildene i figur 1 kan vi se en viss grad av vakuoledannelse også i kontrollcellene som ikke er eksponert for partikler, men som er serumdepriverte. Serum inneholder en rekke ulike faktorer som er viktig for normal cellevekst, og serumdeprivasjon er kjent å kunne føre til apoptotisk celledød. Med vanlig lysmikroskopi er det ikke mulig å si noe sikkert om hva disse vakuolene er, men det ser altså ut til at det delvis er knyttet til en generell stressrespons, men at det samtidig er en mer spesifikk effekt av partikkeleksponeringen siden det er

betydelig mer vakuoledannelse i cellene som er eksponert.

Når cellene blir eksponert over lengre tid, 2-3 døgn, i kombinasjon med serumdeprivasjon, vil en stor andel av cellene dø. Blant de cellene som overlever ser vi imidlertid en annen form for morfologiendring. Cellene får da en utstrakt, «pinneaktig» form. Dette er også noe som er felles for de tre cellelinjene. Dette kan tyde på at silikananopartiklene påvirker cytoskjelettet. Vi er derfor nå i gang med å se nærmere på effekten av silikananopartikler på PC-12-cellenes evne til å differensiere og danne utløpere. Som tidligere nevnt kan nanopartikler binde seg til ulike proteiner, og effekter på cytoskjelettproteiner vil derfor også være viktig i videre studier.

Figur 2 viser ROS-dannelse i de tre cellelinjene. Vi ser her at begge de to



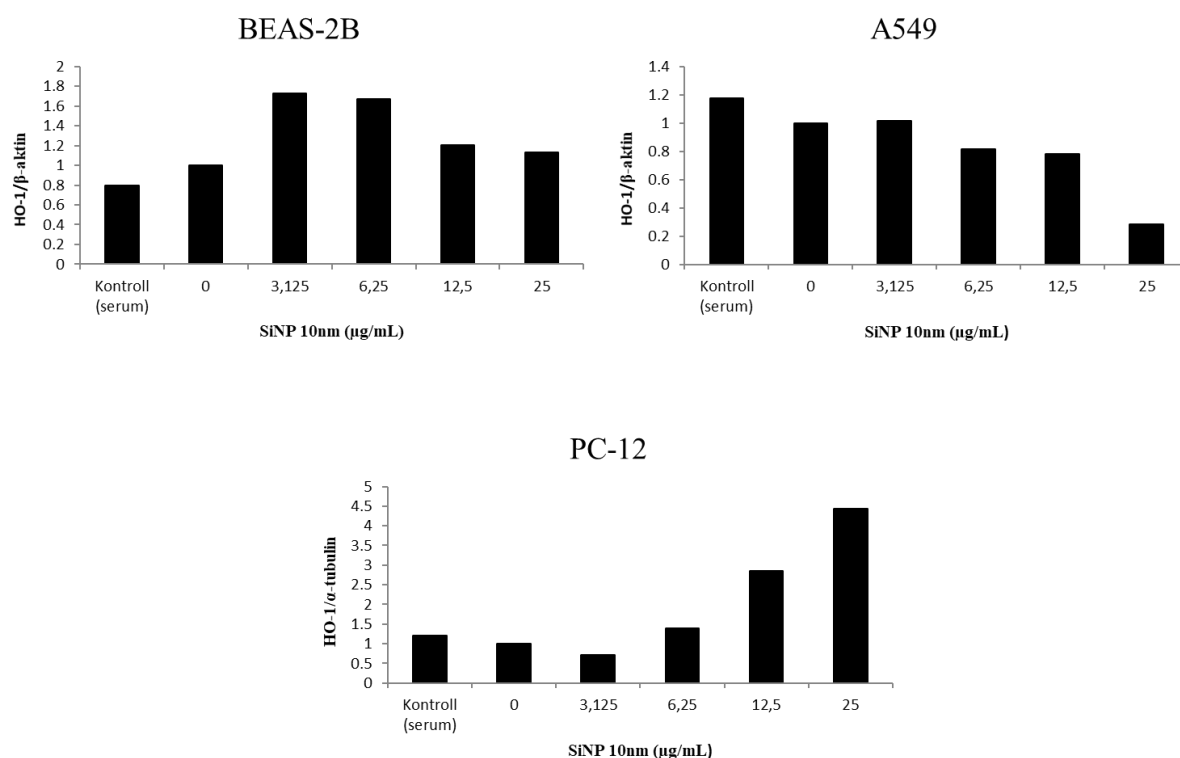
Figur 2: ROS-frigjøring i tre ulike cellelinjer. BEAS-2B, A549 og PC-12 celler eksponert for SiNP10 i 3 timer. Eksponering er gjort i serumfritt medium for å unngå aggregering av partiklene. Stjerne indikerer signifikant forskjell fra serumfri kontroll (0 µg/mL), $P < 0.05$, $n = 3-5$

lungecellelinjene gir signifikant økt ROS ved den høyeste konsentrasjonen vi testet (25 $\mu\text{g/mL}$), mens det ikke var noen signifikant økning i PC-12 celler. Her er det altså en klar forskjell på lungeceller og andre celler. Som ved de morfologiske endringene ser vi imidlertid at serumdeprivasjon i seg selv gir en effekt, her i form av økt ROS-dannelse.

I egne, tidligere publiserte data har vi vist at serumdeprivasjon av PC-12-celler gir reduserte nivåer av den endogene antioksidanten glutation, samtidig som promotoren for det proteinet som regulerer glutationsyntesen, GCL, aktiveres (Rakkestad et al., 2014). En mulig forklaring er derfor at serumdeprivasjonen i seg selv setter i gang antioksidantforsvaret i disse cellene slik at ROS fra partiklene blir eliminert eller nøytralisert.

SiNP gir størst relativ økning i ROS i A549-cellene, sammenliknet med de to andre celletypene vi har studert. Ved de høyeste konsentrasjonene av SiNP ser vi imidlertid også en reduksjon i HO-1 etter 24 timer (se figur 3). Som nevnt har disse cellene en mutasjon som påvirker NRF2-signalveien. Dette kan forklare denne reduksjonen, når vi samtidig ser indikasjoner på induisert HO-1 i BEAS-2B.

I PC-12-cellene ser det ut til at uttrykket av HO-1 øker ved de høyeste konsentrasjonene etter 24 timers eksponering, til tross for at vi ikke kunne se noen økning i ROS-nivået etter 3 timer. Dette indikerer at antioksidantforsvaret blir aktivert, ikke bare som følge av serumdeprivasjon, men også som følge av selve partikkeleksponeringen, og at SiNP inducerer oksidativt stress i disse cellene.



Figur 3: Uttrykk av Hemeoxygenase-1 i tre ulike cellelinjer eksponert for økende konsentrasjoner av SiNP. Alle cellelinjene er eksponert i 24 timer. Eksponering er gjort i serumfritt medium for å unngå aggregering av partiklene. Mengden uttrykt protein er vist i forhold til serumfri kontroll (0 $\mu\text{g/mL}$). n=1-3

Vi ser altså at silikananopartikler med en størrelse på 10 nm gir ulike effekter i lungeceller og de nevronliknende cellene PC-12. Resultatene indikerer at nevroner har et bedre forsvar mot nanopartikkelindusert oksidativt stress enn lungeceller i et *in vitro* modellsystem der cellene eksponeres under serumfrie betingelser. Vi ser også at det er forskjeller i responsen på økte ROS-nivåer mellom to humane, epiteliale cellelinjer. Til tross for samme eksponering og like betingelser vil altså resultatene variere avhengig av modellsystemet.

Vi jobber nå videre med å kartlegge flere tidspunkter for å få et bedre bilde av forløpet av de effektene vi her har vist, samtidig som vi ser på videre effekter som differensiering og celledød. Vi ser også på andre proteiner i NRF2 signalveiene, og på effekter av tilførte antioksidanter som vitamin C og E.

*Artikkelen er basert på foredraget med tittelen ”Induserer silikananopartikler oksidativt stress via ulike mekanismer i ulike mammalske cellelinjer?” som ble holdt under NSFT Vintermøte 2017. Alle data er upubliserte og inngår i pågående masterstudier og prosjekter, og må derfor betraktes som foreløpige data.

Referanser:

- Feng, X., Chen, A., Zhang, Y., Wang, J., Shao, L., & Wei, L. (2015). Application of dental nanomaterials: potential toxicity to the central nervous system. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 3547-3565. doi:10.2147/IJN.S79892
- Khalili Fard, J., Jafari, S., & Eghbal, M. A. (2015). A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(4), 447-454. doi:10.15171/apb.2015.061
- Nowak, J. S., Mehn, D., Nativo, P., García, C. P., Gioria, S., Ojea-Jiménez, I., . . . Rossi, F. (2014). Silica nanoparticle uptake induces survival mechanism in A549 cells by the activation of autophagy but not apoptosis. *Toxicology Letters*, 224(1), 84-92. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.003>
- Oh, N., & Park, J.-H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9(Suppl 1), 51-63. doi:10.2147/IJN.S26592
- Peixoto, M. S., de Oliveira Galvão, M. F., & Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2017). Cell death pathways of particulate matter toxicity. *Chemosphere*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.076>
- Rakkestad, K. E., Sørvik, I. B., Øverby, G. R., Debernard, K. A. B., Mathisen, G. H., & Paulsen, R. E. (2014). 17 α -Estradiol down-regulates glutathione synthesis in serum deprived PC-12 cells. *Free Radical Research*, 48(10), 1170-1178. doi:10.3109/10715762.2014.930455
- Risom, L., Møller, P., & Loft, S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 592(1-2), 119-137. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012>

I redaksjonen

Gunhild Rogne Halland

gunhildrognehalland@gmail.com

Pernille Kvernland

pernille@tussa.com

Thomas Aga Legøy (Redaktør)

tholeg92@gmail.com

Iselin Rynning

iselin.rynning@stami.no

Marie Persson

marie.persson@hotmail.com

Styret i Toksikologiseksjonen

Leier:

Hubert Dirven

hubert.dirven@fhi.no

Styremedlemmer

Yke Arnoldussen

Vidar Berg

Dag Marcus Eide

Gunnar Sundstøl Eriksen

Merete Grung

Marit Nost Hegseth

Odd Andre Karlsen

Gry Koller

Nina Landvik (Varamedlem)

Vedtekter for Seksjonen for Toksikologi

§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 halvparten av styret stiller til valg samtidig. Styret bør reflektere medlemsmassen, og skal fortrinnsvis bestå av representanter med både økotoksikologisk og human-toksikologisk bakgrunn. Videre bør både undervisningsmiljøene, forskningsmiljøene og forvaltnings-institusjonene 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, valgkomité-medlemmer 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 aktiviteter i styret skal gjengis 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.

