

**REDIGERET AF UFFE MIDTGÅRD,  
LEIF SIMONSEN OG LISBETH E. KNUDSEN**

**BASISBOG**

# **TOKSIKOLOGI I ARBEJDSMILJØET**

**BIND II**



REDIGERET AF UFFE MIDTGÅRD,  
LEIF SIMONSEN OG LISBETH E. KNUDSEN

**BASISBOG**

# TOKSIKOLOGI I ARBEJDSMILJØET

**BIND II**

ARBEJDSMILJØINSTITUTTET  
KØBENHAVN 1999

Basisbog: Toksikologi i  
arbejdsmiljøet  
bind II  
Redaktion: Uffe Midtgård,  
Leif Simonsen og Lisbeth E.  
Knudsen

Grafisk tilrettelægning  
og tegninger: art Grafik  
Omslag: art Grafik  
Tryk: Repro & Tryk A/S

ISBN: 87-7904-031-4  
København 1999

Arbejdsmiljøinstituttet  
Lersø Parkallé 105  
2100 København Ø

Tlf: (+45) 3916 5200  
Fax: (+45) 3916 5201  
e-post: [ami@ami.dk](mailto:ami@ami.dk)  
hjemmeside: [www.ami.dk](http://www.ami.dk)

Arbejdsmiljøinstituttet (AMI) har udgivet basisbøger inden for områderne metodeevaluering og kvalitetsstyring, arbejdsmedicin, arbejdsfysiologi, teknisk arbejdshygiejne og risikovurdering. Med det foreliggende tobindsværk har AMI suppleret denne basisbogserie med en lærebog om toksikologi i arbejdsmiljøet, og umiddelbart herefter følger et værk om kemikalier og produkter i arbejdsmiljøet.

I AMI's første basisbog i arbejdsmedicin indgik der også kapitler om effekter af kemiske stoffer som beskrivelse af risikofaktorer i arbejdsmiljøet. Da dette værk efterhånden er mere end 15 år gammelt, har vi fundet det på sin plads at udgive et selvstændigt værk om toksikologi.

Som nævnt i indledningen (bind I) er arbejdsmiljøtoksikologi et meget bredt felt med berøringsflader til mange andre discipliner inden for sundhed og arbejdsmiljø. De medtagne emner er udvalgt efter en indledende høringsrunde både blandt specialister inden for feltet og blandt brugere af AMI's publikationer. Dette betyder, at der er kapitler, som ikke direkte er omfattet af den klassiske toksikologi, men snarere er eksempler på anvendt toksikologi.

Indholdsmæssigt ligger værket tæt op ad basisbog i arbejdsmedicin, og et vist overlap mellem de to værker har ikke kunnet undgås. I flere tilfælde vil man endvidere bemærke, at der i udstrakt grad er henvist til basisbogen i arbejdsmedicin.

Målgruppen for basisbogen er den brede gruppe af arbejdsmiljøprofessionelle, som i forbindelse med deres arbejde har brug for et dansk opslagsværk som en første indgang til toksikologi og vurdering af mulige toksiske effekter.

Det er endvidere vores håb, at udvalgte kapitler kan tjene som undervisningsmateriale i forbindelse med kurser inden for toksikologi og beslægtede områder.

Kapitlerne er forfattet af specialister fra en række forskningsinstitutioner, universiteter, myndigheder, arbejdsmedicinske klinikker og private firmaer samt fra AMI's egen medarbejderstab. Redaktionsgruppen skal hermed benytte lejligheden til at takke alle bidragyderne for deres indsats i skrivefasen og den store tålmodighed, de har udvist i redaktions- og layoutfasen. Uden deres velvilje var værket næppe blevet til.

Redaktionsgruppen

Uffe Midtgård   Leif Simonsen   Lisbeth E. Knudsen<sup>1</sup>  
Arbejdsmiljøinstituttet, København

<sup>1</sup> Nu ansat i Lægemiddelstyrelsen

Toksikologi i arbejdsmiljøet - Bind II omfatter hovedeffektområderne genotoksikologi, kræft, reproduktionstoksikologi, immunotoksikologi, allergi, neurotoksikologi samt hormoner og stress.

Kapitel 1	Genotoksikologi	10
	12	Det arvelige materiale
	27	Tests til påvisning af genotoksiske stoffer
	45	Vurdering af testresultater
	51	Målinger af genetiske skader i arbejdsmiljøet
	55	Begrænsninger ved nuværende testsystemer/testprotokoller og fremtidige perspektiver
	57	Lovgivning
	60	Litteratur
Kapitel 2	Kræft og kræftfremkaldende stoffer	64
	65	Arbejdsmiljø kontra miljø
	68	Mekanismer i kræftudvikling
	83	Risikofaktorer og forebyggelse af kræft
	87	Danske regler for omgang med carcinogener
	93	Brancher sat i fokus af Arbejdstilsynet
	95	Udviklingstendenser
	96	Litteratur
Kapitel 3	Reproduktionstoksikologi	100
	101	Hyppighed af reproduktionsskader
	102	Udviklingsstadier og reproduktionsskader
	110	Kinetik og mekanismer
	115	Metoder til påvisning af reproduktionsskadende effekter
	128	Kemiske stoffer med reproduktionsskadende effekter
	133	Udviklingstendenser
	136	Appendiks: Gruppeinddeling af reproduktionsskadende stoffer i arbejdsmiljøet
	142	Litteratur
Kapitel 4	Immuntoksikologi	146
	147	Immunsystemets opbygning og funktion
	157	Det immuntoksikologiske testpanel
	161	Immunsuppressive påvirkninger i arbejdsmiljøet
	162	Immunstimulation
	167	Litteratur

Kapitel 5	Allergi og allergifremkaldende stoffer	172
	174 Forekomst og omfang	
	176 Inddeling af overfølsomhed og mekanismer for allergi	
	188 Diagnosticering af allergi	
	191 Testmetoder for allergener	
	196 Kriterier for allergi	
	198 Vigtigste allergener generelt og arbejdsmiljørelevante allergener	
	200 Forebyggelse	
	202 Relevant lovgivning	
	202 Litteratur	
Kapitel 6	Neurotoksikologi	206
	207 Nervesystemets struktur og funktion	
	223 Neurotoksicitet	
	225 Mekanismer for neurotoksicitet	
	228 Kriterier for neurotoksicitet	
	229 Påvisning af neurotoksicitet	
	238 Neurotoksiske stoffer i arbejdsmiljøet	
	249 Udviklingstendenser	
	251 Litteratur	
Kapitel 7	Hormoner og stress	254
	255 Effekter af stress på fysiologiske processer	
	257 Samspil mellem påvirkninger fra stressorer og effekter	
	258 Målbare effekter af stresspåvirkninger. Udvalgte metaboliske markører i enkelte undersøgelser	
	269 Stress og andre fysiologiske processer	
	270 Stress og markører for immunsystemet	
	272 Oxidativt stress	
	272 Prøvetagningsstrategi	
	275 Udviklingstendenser	
	276 Litteratur	
	278 Stikordsregister	

## **BIND I**

Toksikologi i arbejdsmiljøet - Bind I omfatter toksikologiske grundprincipper og mekanismer samt metoder til undersøgelse af toksiske effekter. Derudover indgår der kapitler om individuel følsomhed, biomarkører, toksikologi i relation til grænseværdier samt en oversigt over håndbogslitteratur, videncentre og databaser omhandlende toksikologi.

- Kapitel 1 Toksikolog, cand.pharm.,  
Ph.D.  
Mona-Lise Binderup  
Institut for Fødevarerikkerhed og Toksikologi  
Veterinær- og Fødevare-  
direktoratet  
og  
Seniorforsker, cand.scient.,  
Ph.D.  
Lisbeth E. Knudsen  
Medicinsk afdeling  
Lægemiddelstyrelsen
- Kapitel 2 Seniorforsker, phil. Dr.  
Håkan Wallin  
Afd. for kemisk arbejds-  
miljø, Arbejdsmiljøinstituttet,  
Seniorforsker, cand.scient.,  
Ph.D.  
Lisbeth E. Knudsen  
Medicinsk afdeling  
Lægemiddelstyrelsen,  
Seniorforsker, cand.scient.,  
Ph.D.  
Ulla Vogel  
Afd. for kemisk arbejdsmiljø  
Arbejdsmiljøinstituttet  
og  
Cand.scient.  
Peter Møller  
Afd. for Miljø- og Arbejds-  
medicin, Institut for Folke-  
sundhedsvidenskab
- Kapitel 3 Seniorforsker, cand.scient.,  
Ph.D.  
Ulla Hass  
Afd. for kemisk arbejds-  
miljø, Arbejdsmiljøinstituttet  
og  
Dyrlæge  
Ernst V. Hansen  
Afdeling for almen toksiko-  
logi  
Fødevaredirektoratet
- Kapitel 4 Forskningschef, cand.scient.,  
dr.med.vet.  
Otto M. Poulsen  
Direktionen,  
Seniorforsker, dr.pharm.  
Gunnar Damgård Nielsen,  
Mikrobiologisk afdeling  
og  
Ph.D.-studerende, cand.scient.  
Leila Allermann  
Mikrobiologisk afdeling,  
Arbejdsmiljøinstituttet
- Kapitel 5 Forskningschef, cand.scient.,  
dr.med.vet.  
Otto M. Poulsen  
Direktionen,  
Seniorforsker, cand.scient.,  
Ph.D.  
Mari-Ann Flyvholm  
Mikrobiologisk afdeling  
og  
Seniorforsker, cand.scient.,  
Ph.D.  
Jesper Kristiansen,  
Referencelaboratoriet,  
Arbejdsmiljøinstituttet
- Kapitel 6 Seniorforsker, lic.scient.  
Leif Simonsen  
Afdeling for kemisk arbejds-  
miljø,  
Seniorforsker,  
cand.med.vet., Ph.D.  
Søren Peter Lund  
Afdeling for kemisk arbejds-  
miljø,  
Arbejdsmiljøinstituttet  
og  
Dr. med.  
Peter Arlien-Søborg  
Neurologisk afdeling  
Rigshospitalet
- Kapitel 7 Seniorforsker, cand.pharm.,  
Ph.D.  
Åse Marie Hansen  
Referencelaboratoriet,  
Forsker, cand.scient. Ph.D.  
Anne Helene Garde,  
Referencelaboratoriet,  
Forskningsleder, cand.scient.  
et dr.med.  
Jytte Molin Christensen  
Referencelaboratoriet  
Arbejdsmiljøinstituttet  
og  
Seniorforsker, cand.scient.,  
Ph.D.  
Lisbeth E. Knudsen  
Medicinsk afdeling  
Lægemiddelstyrelsen







KAPITEL 1

# Genotoksikologi

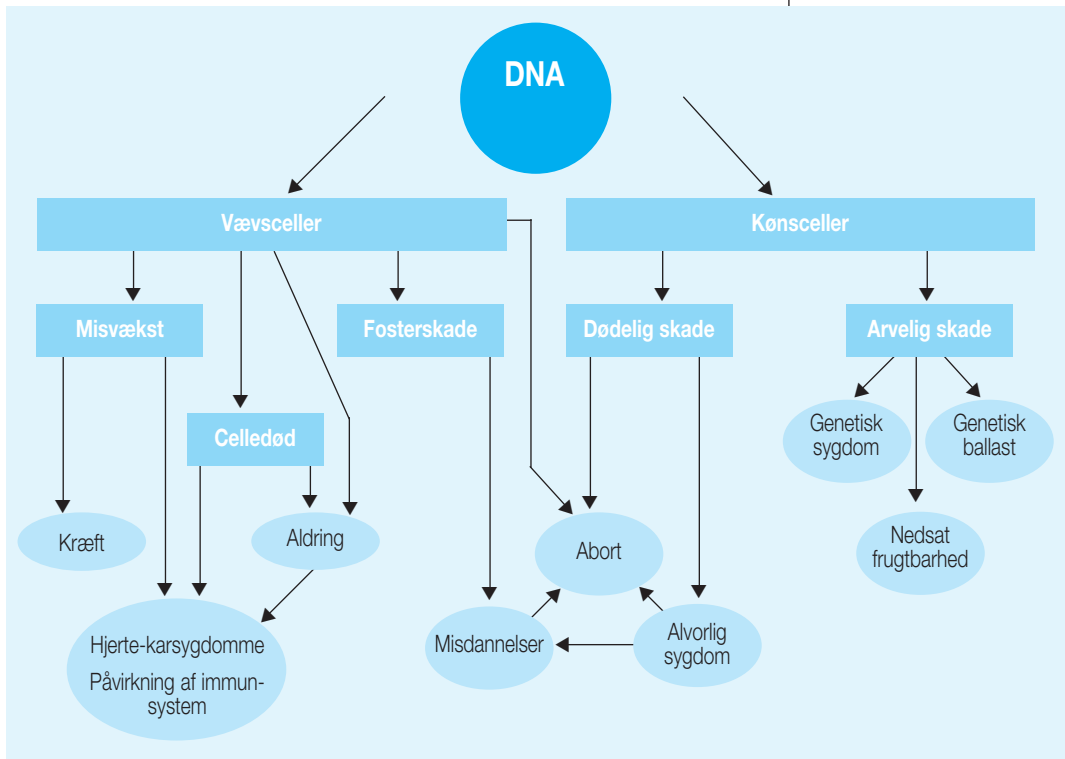
*Mona-Lise Binderup  
Lisbeth E. Knudsen*

# Genotoksikologi

Skader på arveanlæggene (DNA) som følge af udsættelse for fremmedstoffer kan medføre flere alvorlige sygdomme. I den genetiske toksikologi undersøges kemiske stoffer (og fysiske faktorer) for evne til at beskadige arveanlæggene. Hvis skader på DNA ikke reparerer korrekt, og inden DNA-strengen aflæses eller kopieres, kan DNA-sekvensen ændres permanent, og der opstår en mutation. Genotoksicitet defineres derfor normalt som evnen til at beskadige arveanlæggene og ændre DNA-sekvensen. En mutations skadevirkninger afhænger af det gen og det væv, som påvirkes. Skader på somatiske celler (vævsceller) kan medføre en øget risiko for kræft og sandsynligvis også hjerte-karsygdomme og i nogle tilfælde skader på immunsystemet. Skader på kønsceller kan medføre aborter, nedsat frugtbarhed, misdannelser og arvelige sygdomme. Fig. 1.1 viser en skematisk oversigt over mulige udfald af skader på DNA.

Genetisk toksikologi er en forholdsvis ny videnskab, idet den første undersøgelse om strålings-inducerede mutationer i *Drosophila* bananfluer blev publiceret i slutningen af tyverne. Efter anden verdenskrig blev det første arbejde om kemisk inducerede mutationer, som følge af anvendelse af sennepsgas som krigsgas, publiceret.

Det primære formål med genotoksicitetstestning er at identificere stoffer, som kan inducere arvelige genetiske effekter, men da det blev klart, at der var en tæt sammenhæng mellem genotoksiske stoffer og kræft, tog udviklingen af genotoksicitetstests for alvor fart mhp også at kunne identificere potentielt kræftfremkaldende stoffer. Siden begyndelsen af 1970'erne er der udviklet mere end 100 genotoksicitetstests både in vitro, hvor der anvendes forskellige celletyper (bakterier, svampe og mam-male celler), og in vivo på forsøgsdyr. Testene identificerer forskellige genetiske skader (fx punktmutationer og kromosomafvi-



gelse). Kun få af disse tests er så velvaliderede, at de kan anvendes som standard screeningstests, og for disse tests er der udarbejdet internationale guidelines. Disse velvaliderede genotoksicitetstests har gennem de seneste ca 20 år haft en væsentlig plads i risikovurderingen af kemiske stoffer, og der er opstillet teststrategier for genotoksicitetstestning af fx nye industrikemikalier, lægemidler, pesticider, tilsætningsstoffer til levnedsmidler, kosmetik og stoffer til emballage beregnet til at komme i kontakt med levnedsmidler.

De seneste års fremskridt inden for rekombinante DNA-teknikker og teknologier til fremstilling af transgene dyr har medført en voldsom udvikling af nye testsystemer til påvisning af forandringer på det molekylære niveau og for genmutationer *in vivo*. Da mange af de eksisterende testsystemer allerede anses for at være pålidelige til påvisning af mutagene stoffer, afhænger de nye metoders succes af, om de er bedre til at identificere kræftfremkaldende stoffer.

Der skelnes i litteraturen skarpt mellem genotoksiske og non-genotoksiske eller mutagene og non-mutagene stoffer. Et genotoksisk stof er mutagent, hvis det er direkte genotoksisk, mens indirekte genotoksiske stoffer kan virke ved at forstyrre DNA-

Figur 1.1. Mulige udfald af skader på DNA i vævs-celler og køns-celler.

reparation, cellevækst eller celledeling. Et non-mutagent stof kan virke kræftfremkaldende gennem mekanismer som: hæmning af kommunikation mellem celler i de såkaldte gap-junctions, ændret genekspression, ændret signaloverførsel, ufuldstændig apoptose, forceret cellevækst, immunosuppression og forstyrrelser i det endokrine system.

I de senere år er man især blevet opmærksom på skader på gener, som kan føre til udvikling af kræft. Den hurtige udvikling inden for den molekylære genetiske teknik har bl.a. ført til identifikationen af gener, som medvirker til at regulere cellers vækst og udvikling (tumorsuppressor-gener og protoonkogener). Hvis disse gener beskadiges, kan det resultere i, at der opstår kræftceller.

I dette kapitel beskrives opbygningen af det arvelige materiale, skader på det arvelige materiale og konsekvenser af dette (kræft og reproduktionsskader), nogle af de mest anvendte genotoksicitetstests gennemgås, og der omtales genetisk monitoring, lovgivningen inden for området samt forventninger til den fremtidige udvikling inden for genetisk toksikologi.

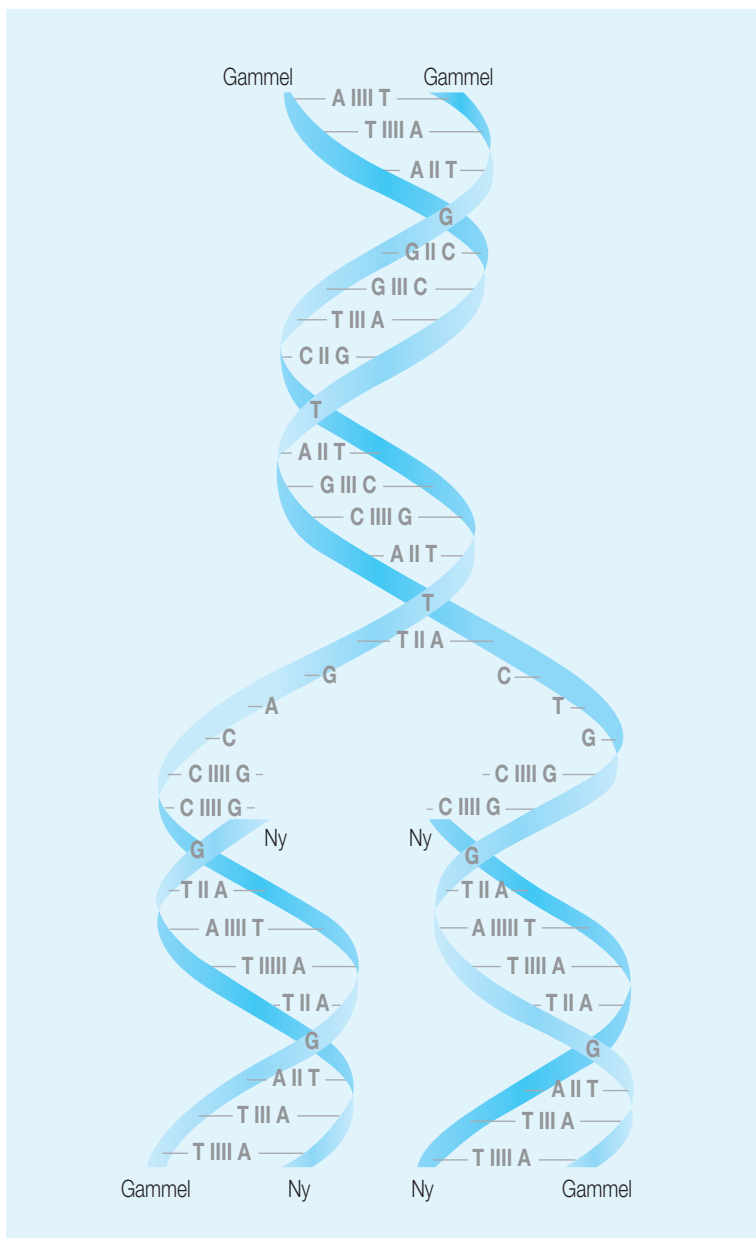
## Det arvelige materiale

### Opbygning og strukturering af det arvelige materiale

Det arvelige materiale består i alle levende organismer af DNA. Grundstrukturen er skitseret i fig. 1.2. DNA består af to lange kæder af sukkerphosphat, hvorpå der er hæftet fire forskellige sidegrupper (baser): adenin (A), thymin (T), guanin (G) og cytosin (C).

De to DNA-kæder er bundet sammen vha brintbindinger mellem sidegrupperne på en sådan måde, at adenin (A) altid ligger over for thymin (T) og tilsvarende for guanin (G) og cytosin (C), som skitseret i fig. 1.2. De to strenge besidder herved en nøjagtig information om hinanden. Dette muliggør en nøjagtig dannelse af to identiske DNA-molekyler ved alle delinger, således at alle organismens celler kan få samme indhold af arveligt materiale. DNA-molekylerne koder for en række livsvigtige stoffer, proteiner, i cellerne. Det er rækkefølgen af de fire baser (den genetiske kode), der bestemmer, hvilken information der ligger i DNA, idet tre på hinanden følgende baser koder for en bestemt aminosyre i et protein (fx et enzym). Mellem højere- og laverestående organismer er der dog forskel på mængden og struktu-

Figur 1.2. Grundstrukturen af DNA.

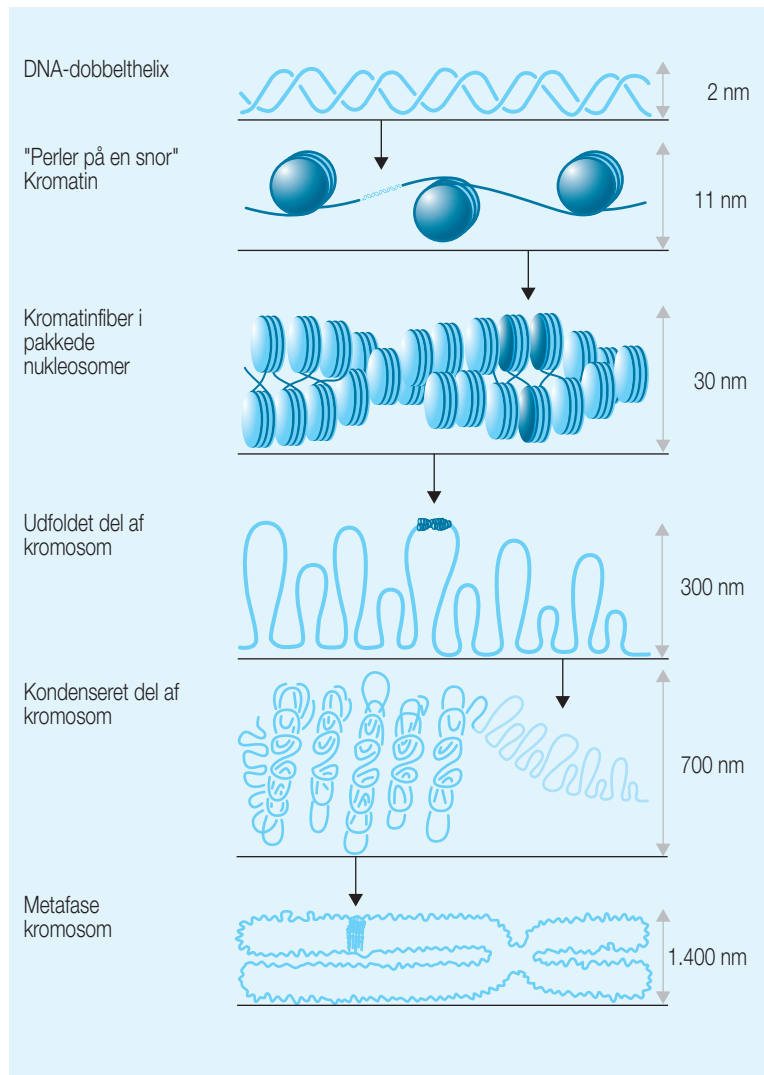


ren af DNA. Primitive celler som fx bakterier har et enkelt cirkulært DNA-molekyle, som koder for ca 5.000 forskellige proteiner. Hos højerestående organismer som fx pattedyr og mennesker er DNA organiseret i kromosomer. Der kan dannes ca 1.000 gange flere proteiner ud fra menneske-DNA end ud fra bakterie-DNA.

Menneskets arvemateriale er fordelt på  $2 \times 23$  forskellige kromosomer, som findes i cellekernerne. Desuden findes der en lille mængde arvemateriale uden for cellekernen, nemlig i cellernes mitokondrier. Kun en lille procentdel af cellernes DNA er organiseret i gener, og mindre end 3% af DNA-mængden transkriberes (oversættes til proteiner). Funktionen af resten af arvematerialet er kun delvist kendt - det medvirker til opbygningen

af kromosomstrukturen og indeholder bl.a. gentagne *DNA-sekvenser* (rækkefølge af baser). Menneskets samlede arvemateriale, *genom*, er opbygget af ca  $10^{10}$  *basepar*, som *forkoder* op til 50-100.000 forskellige *proteiner* i de i alt ca 200 forskellige cellyper. I vævscellerne forekommer kromosomerne i par (23 som anført), hvoraf det ene udgøres af kønskromosomerne (to X-kromosomer hos kvinder, et X- og et Y-kromosom hos mænd) og de 22 øvrige af de såkaldte *autosomer*. Generne forekommer således også i par, såkaldte *allele gener*. Er de to allele områder ens, er personen *homozygot* mht genet, hvorimod en person med to forskellige gener kaldes *heterozygot*. I kønscellerne findes arvematerialet i enkeltudgave. En persons (organismes) *genotype* er defineret ved informationerne i generne. Produkterne fra generne bestemmer personens (organismens) organismes *fænotype* (fremtoning). Organiseringen af arvematerialet i *DNA-dobbelthelix*, der indgår i generne, som igen indgår i kromosomerne i cellerne, er vist i fig. 1.3.

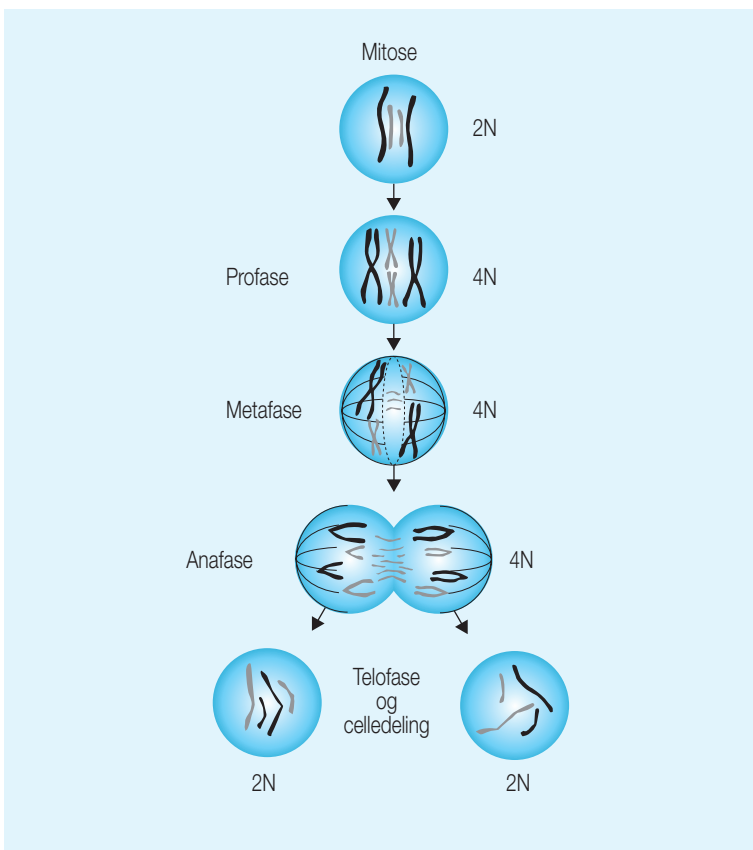
Figur 1.3. Organisering af arvematerialet.



Cellevyklus i mammale somatiske celler kan inddeles i følgende faser: interfasen, som består af G1, S og G2, og mitosen (celledelingsfasen), som kan inddeles i profase, prometafase, metafase, anafase, telofase og celledeling (jf fig. 1.4).

I S-fasen foregår DNA-replikationen, og i M-fasen (mitosen eller celledelingsfasen) deles og adskilles kromosomerne som en del af celledelingen, og der dannes to identiske datterceller.

Længden af cellevyklus varierer meget mellem forskellige celletyper. G1-fasen er den mest variable. I G1-fasen kan celler overgå til en G0-fase, hvor der ikke foregår nogen celledeling, enten pga skadelige påvirkninger eller pga en differentiering til en celletype, som ikke deler sig (fx perifere lymfocytter). I G0, G1, S og G2 er kromosomerne ukondenserede og kan ikke ses i mikroskop. I mitosens profase begynder kromosomerne at kondensere, og kun i metafasen er de synlige som adskilte kromosomer. I anafasen deler de sig i to grupper, og i telofasen trækkes kromosomer, som har en intakt centromér, fra hinanden vha tenapparatet.



Figur 1.4. Faser i celledelingen (mitosen). N angiver antal kromosomsæt. For overskuelighedens skyld er der kun vist to kromosompar.



## Skader på det arvelige materiale

Under celledelingen sker der en meget nøjagtig overførsel af det arvelige materiale til dattercellen. DNA-strengene splittes op, og der syntetiseres to nøjagtige kopier ud fra de gamle strenge ved nøjagtig baseparring (DNA-replikation). Indimellem kan der dog ske fejl enten spontant (fejlæsning) eller som følge af påvirkning med kemiske stoffer eller stråling.

### *Biologiske barrierer*

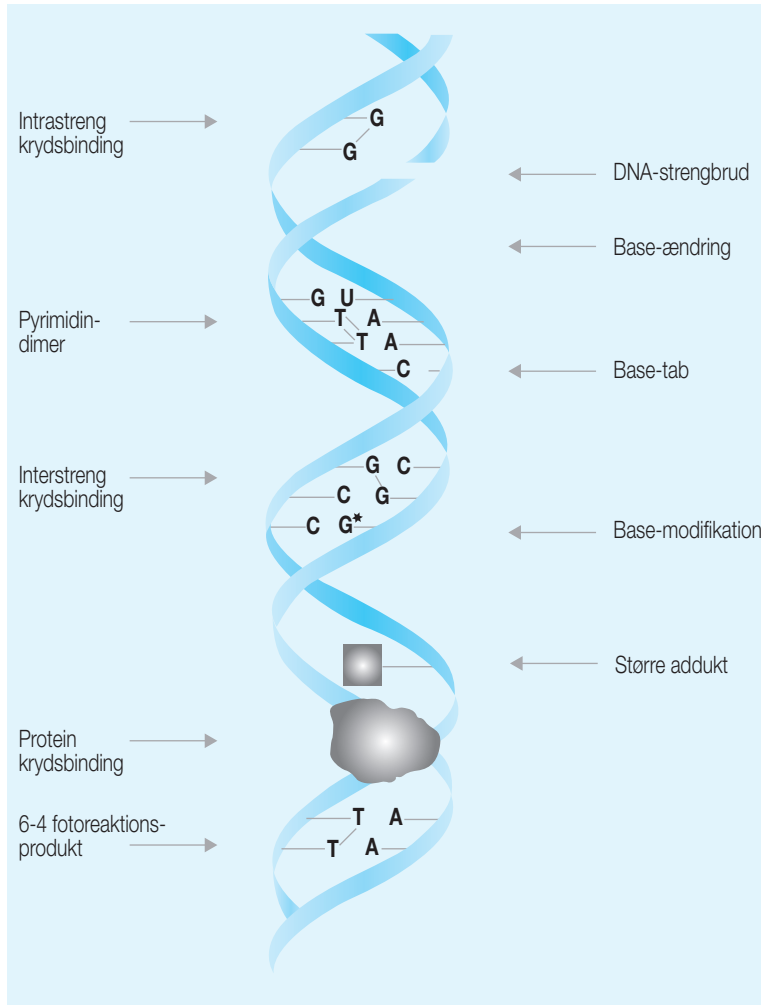
En første forudsætning for, at ydre påvirkninger kan medføre genetiske skader, er, at stofferne når frem til DNA i en aktiv form. Derfor er stoffernes absorption, fordeling i organismen og evne til at passere biologiske barrierer en væsentlig del af en risikovurdering.

### *Primære DNA-skader*

Genotoksicitet defineres som evnen til at beskadige DNA og ændre sekvensen eller strukturen af DNA. Fig. 1.5 viser en skematisk oversigt over forskellige typer *primære* DNA-skader forårsaget af kemiske stoffer eller stråling. Primære DNA-skader omfatter bl.a. DNA-addukter, inter- eller intrastreng krydsbindinger, base-modifikationer (fx deaminering eller alkylering) eller tab af baser (depurinering eller depyrimidering) og enkelt- eller dobbeltstrengt DNA-brud. Disse primære skader er en direkte effekt af kemiske stoffer eller stråling på DNA. Fx kan ioniserende stråling forårsage enkelt- eller dobbeltstrengt DNA-brud. DNA-strengbrud kan dog også opstå i forbindelse med reparation af andre DNA-skader. UV-stråling kan forårsage dannelse af pyrimidin-dimerer (binding mellem fx to nabotyminer på samme DNA-streng) eller krydsbinding mellem DNA og protein. Nogle kemiske stoffer kan reagere med DNA, enten direkte eller efter en metabolisk omdannelse til reaktive forbindelser (jf nedenstående afsnit) og danne DNA-addukter. Det gælder fx visse polyaromatiske hydrocarboner (PAH). Base-modifikationer kan opstå efter reaktion med alkylende stoffer, som er en stor gruppe af elektrofile forbindelser (der reagerer kemisk ved at optage elektroner) (jf fig. 1.6). Disse stoffer kan reagere med nukleofile centre (som afgiver elektroner i en kemisk reaktion) i organiske makromolekyler, fx DNA. Ring-O og -N atomerne i DNA-baserne er nukleofile centre. Generelt er ring-N atomerne mere nukleofile end ring-O atomerne, med N<sup>7</sup> i guanin og N<sup>3</sup> i adenin som de mest reaktive. Alkylende stoffer med to reaktive grupper, fx kvælstof og svovlsennepsgasser, mitomycin og cisplatin kan danne intrastreng-krydsbindinger ved at reagere med to baser i samme streng eller interstreng-krydsbindinger,

hvis reaktionen sker mellem to baser, som sidder på hver sin streng.

Visse kemiske stoffer og stråling kan også indirekte give anledning til base-modifikationer ved dannelse af reaktive iltradikaler, fx hydroxyl radikal ( $\cdot\text{OH}$ ), hvorved der bl.a. dannes 8-hydroxyguanin.



Figur 1.5. Oversigt over primære DNA-skader. DNA-addukter, inter- og intrastreng krydsbindinger, base-modifikationer (fx deaminering eller alkylering), tab af baser (depurering eller depyrimidering) og enkelt- eller dobbeltstrengt DNA-brud. (Fra Bohr et al., 1989).

### *Metabolisk aktivering af genotoksiske stoffer*

#### *Direkte virkende kemiske stoffer*

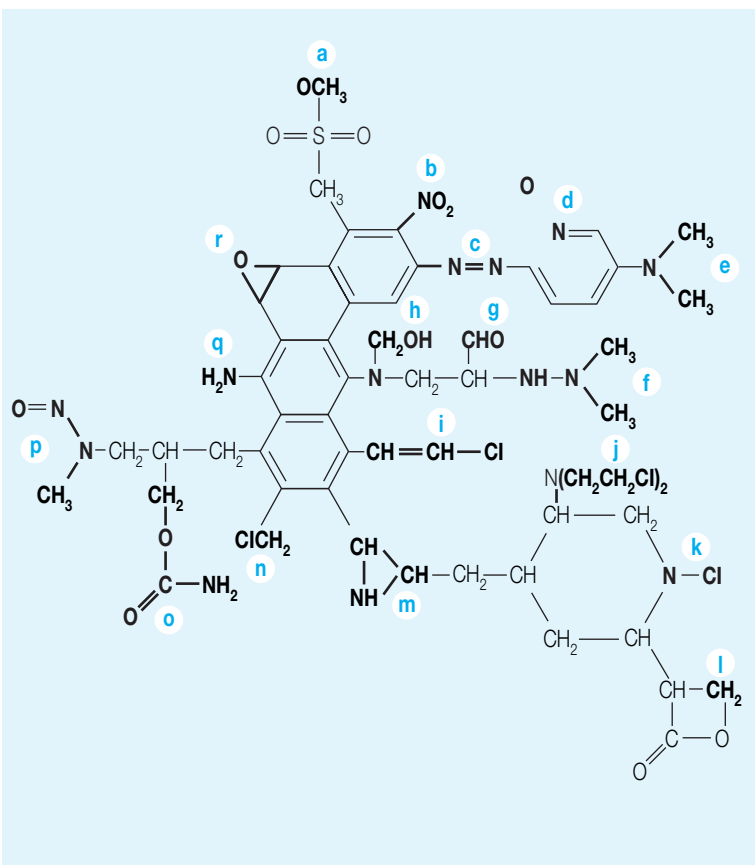
*Direkte* virkende genotoksiske forbindelser er en gruppe meget reaktive kemikalier, som kan reagere med DNA og andre makromolekyler uden en metabolisk omdannelse. Disse stoffer er alle

mere eller mindre elektrofile og omfatter bl.a. epoxider, aromatiske nitroforbindelser, laktoner og aromatiske N-oxider. I fig. 1.6 er vist et tænkt molekyle, som indeholder en lang række elektrofile grupper.

Figur 1.6. De væsentligste strukturelle enheder (markeret med fed), der betegnes som mistænkelige kemiske strukturer (elektrofile centre).

De elektrofile centre er:

- a. alkyl ester af fosphon syre eller sulfon syre
  - b. aromatisk nitro gruppe
  - c. aromatisk azo gruppe, ikke som sådan, men pga mulig reduktion til aromatisk amin
  - d. aromatisk ring N-oxid
  - e. aromatisk mono- og dialkyl amino gruppe
  - f. alkyl hydrazin
  - g. alkyl aldehyd
  - h. N-methylol derivat
  - i. monohaloalkan
  - j. N og S sennepsgasser (β-haloethyl)
  - k. N-kloramin
  - l. propiolakton og propionsulton
  - m. aromatiske og alifatiske aziridinyl derivater
  - n. aromatisk og alifatisk substituerede primære alkylhalider
  - o. derivater af uretan (carbamater)
  - p. alkyl N-nitrosaminer
  - q. aromatiske aminer, deres N-hydroxy derivater og afledede estre
  - r. alifatiske og aromatiske epoxider.
- (Fra Ashby, 1991)



#### Indirekte virkende kemiske stoffer

Andre stoffer kræver metabolisk omdannelse, før de er genotoksiske. Disse stoffer kaldes *indirekte* virkende genotoksiske stoffer, og det inaktive molekyle kaldes et promutagen eller procarcinogen. Disse stoffer er ofte relativt apolære (og derfor ikke-reaktive kemiske forbindelser), men efter omdannelse vha specifikke cellulære enzymesystemer til elektrofile forbindelser er de ofte potente mutagener/carcinogener.

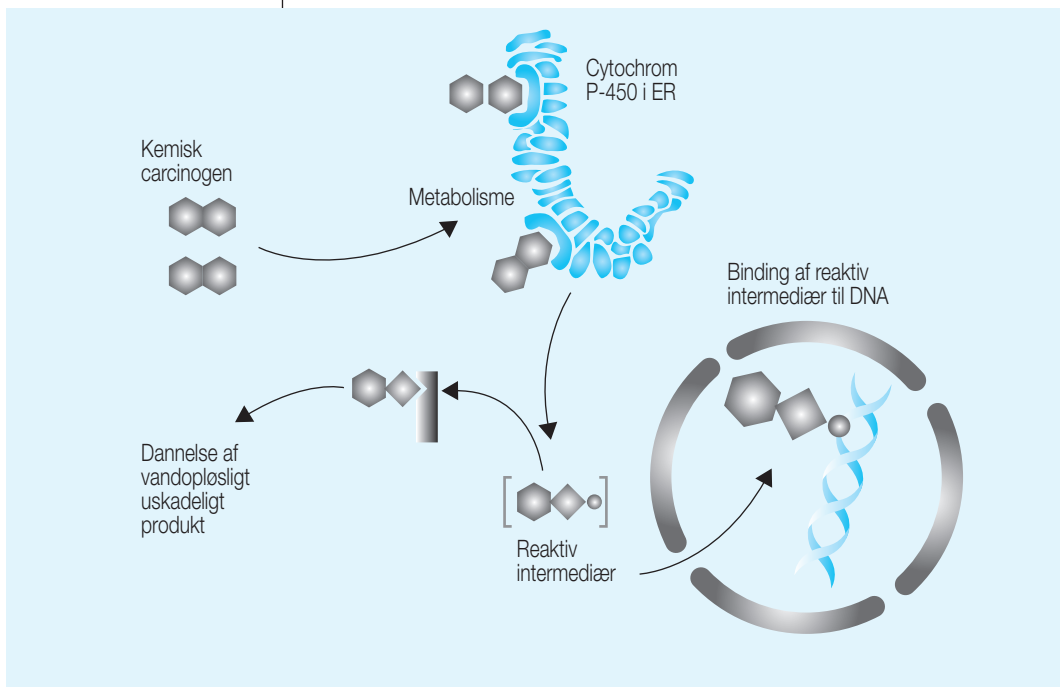
Den genetiske funktion af de aktive enzymesystemer er at beskytte cellen/organismen mod en *cytotoksisk* effekt ved at omdanne potentielt toksiske apolære stoffer til vandopløselige forbindelser, som nemmere udskilles. Denne "beskyttelsesforan-

staltning” resulterer dog undertiden i dannelselse af reaktive elektrofile forbindelser, som kan reagere med cellens makromolekyler, fx DNA. Et af de mest velundersøgte af disse aktiverende enzymesystemer er et enzymkompleks, som overvejende findes på den cytoplasmatiske membran (det endoplasmatiske retikulum). Dette enzymesystem indeholder forskellige oxygenaser, som ved at overføre et iltatom til relativt apolære forbindelser omdanner disse til mere vandopløselige forbindelser. Enzymkomplekset kaldes oftest cytochrom P-450 pga den stærke absorbans ved 450 nm. En række forskellige cytochrom P-450 enzymer (isozymer) indgår i enzymkomplekset, og disse isozymer har forskellig specificitet for forskellige stofgrupper, fx aktiveres polyaromatiske hydrocarboner (PAH) af cytochrom P-450 1A1. Fig. 1.7 viser den metaboliske aktivering af en PAH. Det oxidative produkt dannet vha cytochrom P-450 systemet kan blive yderligere metaboliseret (fx ved hydroxylering eller epoxidering eller ved konjugering med fx glukoronid syre). Også andre enzymer er involveret i aktiveringen af genotoksiske kemikalier som fx acetyltransferaser (NAT og OAT), glutathion-S-transferase (GST). Evnen til at metabolisere promutagener/procarcinogener til ultimative mutagener/carcinogener er under genetisk kontrol. Individuel følsomhed for eksponering for forskellige carcinogener kan bl.a. skyldes polymorfi (forskellige former/aktivitet af fx et enzym) af et eller flere af de aktiverende enzymer.

Et højt niveau af metabolisk aktivitet kan induceres i dyr og mennesker af stoffer, som stimulerer dannelsen af specifikke enzymer. Dette forhold udnyttes bl.a. for at øge aktiviteten af det metaboliske aktiveringssystem (S9), som anvendes i forbindelse med in vitro genotoksicitetstestning (nærmere omtalt under *Salmonella*/mammal mikrosomtesten). Stoffer som phenobarbital, 3-methylcholantren og blandinger af polychlorerede biphenyler, hvoraf Aroclor 1254 er den mest anvendte, inducerer forskellige former af cytochrom P-450 systemet. Hos mennesker kan en samtidig eksponering for flere stoffer betyde, at et eller flere stoffer inducerer aktiverende eller deaktiverende enzymer, hvilket kan medføre en aktivering eller deaktivering af andre stoffer. Fx inducerer cigaretrøg en høj aktivitet af flere forskellige cytochrom P-450 enzymer.

### *Reparation af skader på det genetiske materiale*

En ændring af DNA vil ikke altid føre til en mutation, idet de fleste skader repareres (2 i fig. 1.8). I alle levende celler findes enzymesystemer, som er i stand til at “læse korrektur” på nydannet DNA og rette eventuelle skader. Der findes mindst fire forskellige repair-systemer, som reparerer forskellige DNA-skader, mere eller mindre nøjagtigt. To repair-systemer (foto reaktivering

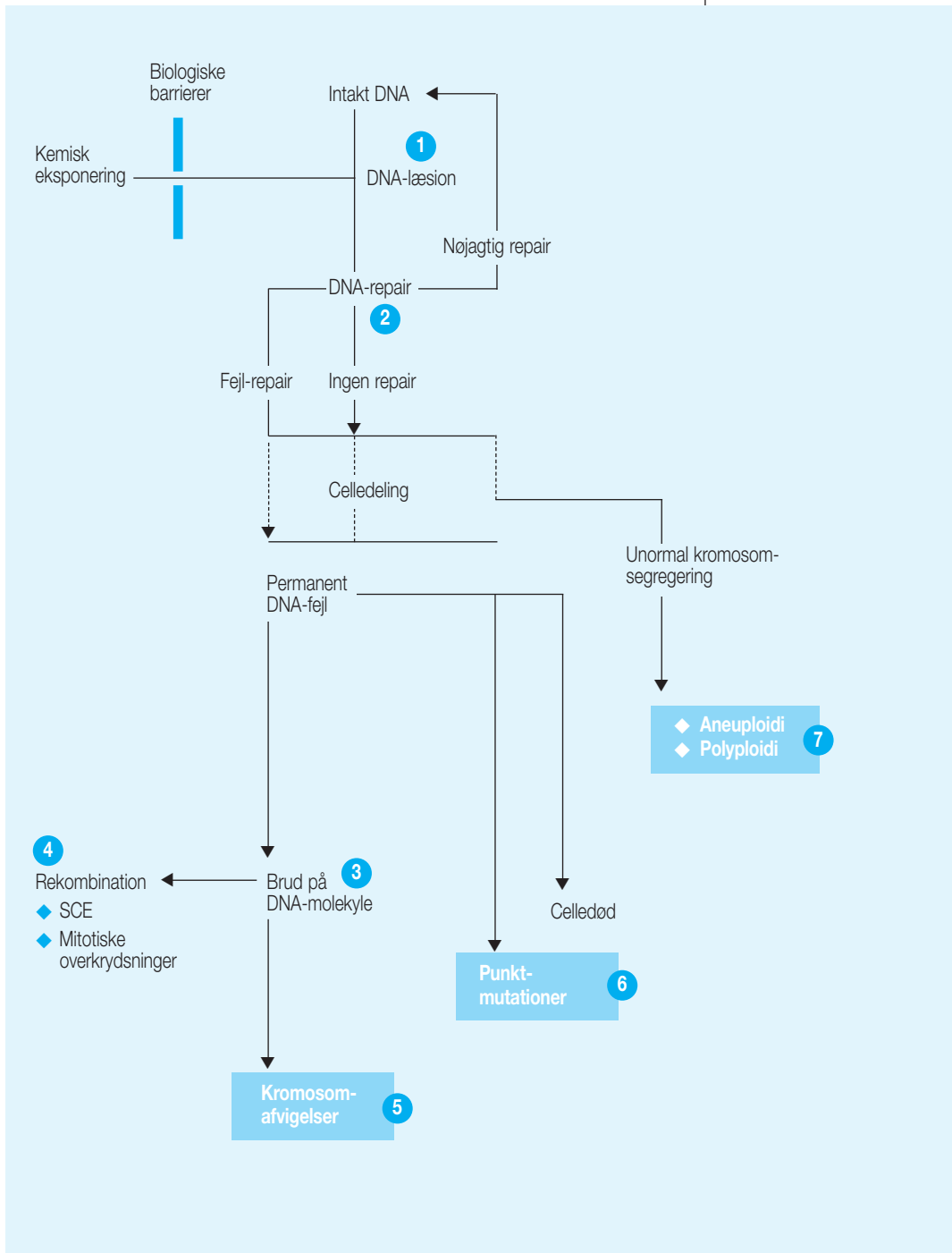


Figur 1.7. Skematisk oversigt over den metaboliske aktivering af en apolær polycyklisk forbindelse af cytochrom P-450 systemet i en typisk mammal celle ved at danne reaktive intermediære, som kan binde sig til nukleofile centre i DNA. ER, det endoplasmatiske retikulum. (Fra Friedberg, 1995).

og excision repair), der reparerer skader stort set fejlfrit, er altid til stede i cellerne. Systemerne kan dog overbelastes, hvis der er mange skader at reparere, fx hvis cellerne har været udsat for høje koncentrationer af mutagener, eller ved øget celleproliferation. I sådanne tilfælde induceres andre repair-systemer, hvor fejlfrekvensen er langt større (post replication repair og SOS repair (i bakterier)). Derfor vil en nedbringelse af koncentrationen af mutagene stoffer nedsætte risikoen for, at der opstår mutationer og de deraf følgende sygdomme. Ændringer i DNA-repair-systemet kan også føre til øget risiko for kræftudvikling. Betydningen af mangler i reparationsystemerne illustreres ved, at nogle sjældne arvelige sygdomme, som er karakteriserede ved en defekt i excision repair-systemet, medfører en større risiko for udvikling af kræft og kromosomale ændringer. Dette gælder fx patienter med Xeroderma pigmentosum, som har en forøget risiko for hudkræft, når de udsættes for UV-lys fra solen. Andre arvelige sygdomme som Blooms syndrom, Fanconi's anæmi og Ataxia teleangiectasia medfører øget risiko for andre cancerformer og for kromosomafvigelse, hvilket sandsynligvis også er associeret med nedsat repair-kapacitet.

### *Forskellige genetiske endepunkter (DNA-skader)*

Hvis skader på DNA (1 i fig. 1.8) ikke reparerer korrekt og i tide



Figur 1.8. Skematisk oversigt over forskellige genetiske endepunkter.

(2 i fig. 1.8), kan dette føre til celledød eller en permanent DNA-skade. En permanent ændring af DNA, som overføres til næste generation/dattercelle, kaldes en *mutation*. En mutation kan variere i karakter og omfang (størrelse) og kan groft inddeles i:

*Punkt-mutationer (6 i fig. 1.8)*

Små ændringer af DNA, som omfatter et eller nogle få basepar. Ændringerne kan være ombytning af et basepar med et andet (basepar-substitution), eller det kan være en deletion eller addition af et eller nogle få basepar, hvorved læserammen forskydes (frame shift mutationer).

*Kromosomale mutationer (5 i fig. 1.8)*

Større strukturelle ændringer af kromosomerne, som kan iagttages i mikroskop. Disse ændringer er omtalt senere i kapitlet.

*Genom-mutationer (7 i fig. 1.8)*

Herved forstås ændringer i antallet af kromosomer. Numeriske kromosomafvigelser kan opstå under celledelingen i mitosen og meiosen, hvor komplicerede processer normalt sikrer, at datterceller får tilført det samme genetiske materiale. Hvis der sker en fejl i denne adskillelse for et eller flere kromosomer under celledelingen, vil cellerne få et unormalt kromosomsæt, dvs enten flere eller færre kromosomer end normalt, og cellerne kan blive polyploide eller aneuploide. Ved polyploidi er kromosomtallet et multiplum af det haploide kromosomtallet (fx  $3n$ ). Ved aneuploidi er der et for meget eller et for lidt af et eller flere kromosomer ( $2n + 1 =$  trisomi) ( $2n - 1 =$  monosomi). Stoffer, der inducerer aneuploidi, kaldes *aneugener*.

*Rekombinationer (4 i fig. 1.8)*

I diploide celler, herunder menneske- og pattedyrceller, kommer en mutation kun til udtryk, hvis den er dominant, eller hvis cellen er homoallel for den recessive mutation. Diploide celler kan undergå genetiske ændringer, som resulterer i, at den recessive mutation bliver udtrykt. Disse ændringer kan opstå ved udveksling af DNA mellem homologe kromosomer. Rekombination kan enten være reciprok (overkrydsninger) og resultere i "ombytning" af store stykker af de homologe kromosomer, eller den kan være non reciprok ("gene conversion") og resultere i udskiftning af et mindre stykke DNA (ca 350 basepar i mammale celler og op til 10 kilobaser i *Saccharomyces cerevisiae* i en homolog DNA-streng med et tilsvarende stykke DNA fra en ikke-søsterhomolog streng, men ombytningen er ikke reciprok. Disse genetiske ændringer er ikke egentlige mutationer, men som det

omtales senere, er de yderst relevante i forbindelse med bl.a. kræftudvikling.

DNA-ændringer, mutationer og rekombinationer, kan forekomme både i kønsceller og i somatiske celler (kropsceller).

Mutationer i *kønsceller* (eller evt i den tidlige embryogenese) kan føre til sterilitet, aborter, dødfødsler, misdannelser eller arvelige sygdomme.

Neoplasier, herunder kræft, er de mest alvorlige effekter af mutationer i *somatiske* celler, men ældningsfænomener menes også at hænge sammen med mutationer i somatiske celler.

## Konsekvenser af genetiske skader

### *Kræft*

Da kræft er detaljeret beskrevet i et andet kapitel, vil kun sammenhængen mellem genotoksicitet og carcinogenicitet blive omtalt i dette kapitel, ligesom sammenhængen mellem genotoksiske og non-genotoksiske carcinogener vil blive kort beskrevet.

Mange gener, som er involveret i den neoplastiske transformation, koder for proteiner, der er involveret i at regulere celleproliferation, enten positivt ved at hjælpe og promotere vækst, eller negativt ved at stoppe progression gennem cellecyklus.

Genprodukterne af de såkaldte onkogener promoterer proliferation. Et onkogen er et ændret gen, hvis normale cellulære makker kaldes et protoonkogen. Genprodukter af tumorsuppressor-gener hæmmer proliferation. Forandringer, som inaktiverer disse gener, kan således også accelerere neoplastisk transformation. Ud over at påvirke celleproliferation menes onkogener og tumorsuppressor-gener at have betydning for apoptosis, programmeret celledød. Hæmning af apoptosis kan være årsag til, at visse maligne tumorer vokser.

Cellulære ændringer kan induceres af såvel fysiske som kemiske påvirkninger, og som det er omtalt i kapitlet om kræft, kan udviklingen af kræft indeles i minimum tre trin: initiering, promotion og progression. Det er dog vanskeligt at definere et kemisk carcinogen som enten initiator eller promotor, da nogle initiatorer også har promotoreffekt (fuldstændige carcinogener), og nogle promotorer kan inducere mutationer sekundært til promotorvirkningen. En anden måske mere brugbar inddeling af carcinogenerne er i genotoksiske og non-genotoksiske (epigenetiske) carcinogener.

### *Genotoksiske carcinogener, mulige molekytlære mål og forskellige genetiske ændringer*

Ændringer i arvematerialet, som fører til ændret ekspresion eller



funktion af gener, der er involveret i regulering og proliferation og differentiering, er vigtige i carcinogenesen. Protoonkogener og tumorsuppressor-gener er to sådanne klasser af gener.

Protoonkogener og tumorsuppressor-gener er normale cellulære gener, som, når de gennem mutationer aktiveres til onkogener, eller tumorsuppressor-gener inaktiveres, ændrer reguleringen af vækst og differentiering. Meget simplificeret medfører aktivering af protoonkogener, at celler føres gennem celledelingscyclus, mens tumorsuppressor-gener har den modsatte effekt og hæmmer celleproliferationen og fremmer celledifferentiering.

Mutationer i protoonkogener er dominante. Mange onkogener er blevet identificeret pga deres tilstedeværelse i transformerende retrovirus eller ved deres tilknytning til kromosomale abnormiteter. Nogle af de bedst undersøgte onkogener er *ras* og *myc*.

Protoonkogener kan aktiveres gennem en række forskellige genetiske ændringer. Nogle af disse ændringer medfører, at der dannes større mængde protein, fx:

- ◆ Punktmutationer i det regulerende område (promotoren)
- ◆ Translokationer, der medfører, at protoonkogenet flyttes til en mere aktiv promotor
- ◆ Amplifikationer, hvorved der dannes flere kopier af protoonkogenet
- ◆ Mutationer, som øger stabiliteten af protoonkogenets m-RNA.

Selvom gærtests for mitotisk rekombination og "gene conversion" blev introduceret på et tidligt stadium i udviklingen af den genetiske toksikologi, er det først inden for de seneste år, det er blevet klart, at disse genetiske ændringer spiller en meget væsentlig rolle i forbindelse med bl.a. kræftudvikling og aktivering af protoonkogener. Mitotisk rekombination kan resultere i synlige kromosomforandringer som amplifikationer og translokationer, men kan også være mindre ændringer ("gene conversion").

Translokationer af protoonkogener er ofte beskrevet i forbindelse med leukæmi og lymphomaer, men ses også i tumørvæv. Amplifikationer ses ofte i forbindelse med humane brystcarcinomaer, fx er der konstateret 2-15 gange amplifikationer af *c-myc* i 38 ud af 121 humane brysttumorer.

Genetiske ændringer, som inaktiverer tumorsuppressor-gener, kan også føre til tab af kontrol af proliferative og differentieringsprocesser og øge sandsynligheden for neoplastisk transformation. I modsætning til onkogene ændringer i protoonkogener er mutationer i tumorsuppressor-gener oftest recessive. De bedst undersøgte tumorsuppressor-gener er *RB-1* og *p53*-genet. *Rb*-genet er associeret med retinoblastom, en arvelig børnecancer. I arvelige kræfttilfælde opstår der flere tumorer, og sygdommen

udvikles tidligere end i ikke-arvelige tilfælde. Dette tyder på, at der skal mindst to genetiske ændringer til for at udvikle kræft. I de arvelige kræfttilfælde er den ene genetiske ændring overført via kønscellerne. I prædisponerede individer med en kønscellemutation, som inaktiverer et allel af Rb-genet, udvikles kræft ved tab eller inaktivering af den resterende genfunktion.

Flere mekanismer kan føre til tab af et funktionelt heterozygot *Rb-1* allel. Det gælder fx punktmutationer, små deletioner, "gene conversion", mitotisk rekombination og malsegregering eller non disjunction (forkert adskillelse af kromosomerne under celledelingen).

Mutationer i *p53*-genet er den mest almindelige genetiske læsion associeret med kræft i mennesker. Mennesker, som arveligt kun har en funktionel kopi af genet, er prædisponerede til at udvikle cancer (fx Li-Fraumeni syndrom). *p53* menes at fungere ved at standse proliferationen af celler med beskadiget DNA, således at disse celler når at blive repareret før deling. Tab eller inaktivering af *p53* tillader ikke kun proliferation af initierede celler, men giver også yderligere mutationer, når beskadiget DNA replikeres, og bidrager herved til den genomiske instabilitet, som er karakteristisk for cancerceller.

En mulig mekanisme bag funktionelt tab af et heterozygot suppressor-gen kan være kromosomal malsegregering.

Det er estimeret, at 5-10% af alle brystcancer tilfælde er arvelige. Den hyppigste cytogenetiske afvigelse i brysttumorer er aneuploidi.

Det har været lettere at identificere protoonkogener end tumorsuppressor-gener, hvorfor mange flere former af førstnævnte kendes (ca 60), mens der er ca 15 kendte eller mistænkte tumorsuppressor-gener. Det multiple tumorsuppressor-gen (MTS-1), som koder for cellecyclus-regulerende protein, p16, og BRCA1, impliceret i visse humane tumorer, er for nylig blevet beskrevet, og det er sandsynligt, at flere gener af denne type vil blive identificeret snart.

Mange observationer tyder på, at en enkelt ændring ikke er tilstrækkelig til at konvertere en normal celle til en malign celle, og det synes indlysende, at udvikling af neoplastisk sygdom involverer tab eller inaktivering af multiple tumorsuppressor-gener, eller aktivering af protoonkogener, eller en kombination heraf, gennem hele den carcinogene proces. Det er ligeledes muligt og sikkert sandsynligt, at der herudover findes andre targets, som er vigtige for den neoplastiske transformation. Genetiske ændringer forekommer såvel i initieringsfasen som i progressionsfasen, hvorimod ændringerne i promotionsfasen overvejende er epigenetiske.

*Epigenetiske (non-genotoksiske) carcinogener*

Arvelige forandringer, som ikke er genetiske, dvs skyldes ændringer i DNA-sekvenser eller mutationer, kaldes epigenetiske. Et non-mutagent stof kan virke kræftfremkaldende gennem mekanismer som hæmning af kommunikation mellem celler i de såkaldte gap junctions, ændret genekspression, ændret signaloverførsel, ufuldstændig apoptose, forceret cellevækst som følge af cytotoxicitet eller hormonelle effekter, immunsuppression og forstyrrelser i det endokrine system. Det er også muligt, at mutationer kan være resultatet af interaktion mellem kemikalier med andre mål end DNA, eksempelvis reducerer manganion nøjagtigheden af DNA-polymerase. Celledeling er essentiel for at konvertere en DNA-skade til en mutation og for udvælgelse af celler med ændret fænotype.

Hvis en initierende begivenhed er sket i en celle, vil klonal ekspansion også øge sandsynligheden for yderligere genetiske eller epigenetiske ændringer, hvorfor stoffer, der inducerer celledeling, kan influere på hvert stadium i processen. Disse forhold vil blive nærmere beskrevet under kapitlet om kræft.

*Genetiske skader på kønsceller*

Kønscellemutationer er arvelige og genetiske ændringer, der kan overføres til afkommet. USEPA (1986) guidelines for risikovurdering af mutagenicitet var primært rettet mod den arvelige mutagene risiko, selvom studiet af kønscellemutationer er et snævert område inden for den genetiske toksikologi. Alle somatiske cellemutagener er potentielt også kønscellemutagener, og muligheden for, at disse stoffer skal påvirke kønscellerne, afhænger af stoffernes evne til at passere blod-kønscelle barrieren, og kønscellernes replikative stadier. Det ser ud til, at de mandlige kønsceller er mere følsomme for kønscellemutagener end de kvindelige, som er hvilende. Mange kemoterapeutika er blevet identificeret som kønscellemutagener i gnavere. Humane kønscellemutagener er imidlertid meget svære at identificere, idet gendefekte kønsceller er mindre overlevelsesdygtige, og tidlige spontane aborter kan være en følge af grove genetiske defekter.

Nedsat fertilitet - og i alvorligere tilfælde sterilitet - kan bl.a. opstå ved genetiske skader på mandens sædceller. DBCP (dibromochloropropan), som er mutagent og clastogent, er et typisk eksempel på dette, det samme gælder for en række cytostatika.

Strukturelle kromosomafvigelser udgør en stor del af de genetiske skader hos mennesker og ses både hos levendefødte børn og blandt spontane aborter. Ca 5% af alle levendefødte børn har kromosomafvigelser, mens omkring 50% af spontane aborter har et unormalt kromosomsæt. Af arvelige sygdomme, som skyldes

kromosomafvigelse, kan bl.a. nævnes Bloom's syndrom, Werners syndrom og Kostmann's agranulocytosis. Kromosomafvigelser er desuden hyppige ved en række arvelige sygdomme, som medfører forøget kræfthyppighed, fx Xeroderma pigmentosum, Fanconi's anæmi, og Ataxia teleangiectasia.

Genom-mutationer (arvelige ændringer af kromosomtallet) forekommer også relativt hyppigt. Aneuploidier, som dannes under meiosen (kønscelledannelsen) eller tidlig embryogenese, giver så store genetiske ændringer, at de fleste er fatale. 33-50% af alle spontane aborter og 5-7% af alle levendefødte børn har et unormalt kromosomtallet. Kun trisomier af mindre autosomer og kønskromosomer kan overleve. Flere arvelige sygdomme skyldes sådanne trisomier, fx Klinefelter's (XXY), Down's (trisomi 21), Edward's (trisomi 18) og Patau's syndrom (trisomi 13).

## Tests til påvisning af genotoksiske stoffer

Baggrunden for at anvende genotoksicitetstests til at screene for carcinogene stoffer er bl.a. den somatiske mutationsteori, som angiver, at kræft udvikles ved klonal proliferation fra en somatisk celle, som er transformeret (initieret) ved modifikation af DNA-basesekvensen. Som nævnt under kapitlet om kræft er det en almindelig opfattelse, at kræft er en flertrinsproces, som består af minimum tre trin: *initiering*, *promotion* og *progression*, hvor der indgår genotoksiske skader såvel i initieringsfasen som i progressionsfasen, hvorimod ændringerne i promotionsfasen formodes at være non-genotoksiske.

Begejstringen for genotoksicitetstests, in vitro såvel som in vivo, var stor, da det viste sig, at der var en meget god korrelation mellem genotoksiske stoffer og stoffer, som var carcinogene i dyreforsøg. Det var herved muligt vha korttidstests at screene for carcinogene stoffer, som ellers krævede langvarige studier i dyreforsøg.

Der findes en række velvaliderede tests til påvisning af genotoksiske/mutagene stoffer, fx beskrevet i OECD guidelines. Tabel 1.1 viser en oversigt over de mest almindelige genotoksicitetstests med angivelse af genetisk endepunkt. Nogle in vivo tests er specielt beregnet til at påvise stoffer, som er kønscellemutagener, det gælder fx dominant letal testen, arvelig translokations testen og specifik lokus testen. Til disse tests skal der dog anvendes et meget stort antal dyr, hvorfor de kun er meget lidt anvendt.

I det følgende afsnit beskrives de mest anvendte af de i tabel 1.1 nævnte tests.

Tabel 1.1. Skematisk oversigt over de mest anvendte genotoksicitetstests.

Tests til bestemmelse af punktmutationer
<i>Salmonella typhimurium</i> tilbagemutationstest
<i>Escherichia coli</i> tilbagemutationstest
Punktmutationer af mammae celler in vitro
<i>Drosophila</i> sex-bunden recessiv letal test
Punktmutation i <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Muse spot test
Tests til bestemmelse af kromosomalafvigelser
In vitro cytogenetisk test
In vivo cytogenetisk test
Micronucleus test
Dominant letal test
Arvelig translokations-test
Mammal kønscelle cytogenetisk test
Tests til bestemmelse af effekter på DNA
DNA-skader og -reparation, unscheduled DNA-syntese (UDS)
Mitotisk rekombination i <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
In vitro søsterkromatidudvekslings-test (SCE)

## Tests til påvisning af punktmutationer i bakterier

Et gen er den simpleste funktionelle enhed i et DNA-molekyle. Punktmutationer er ændringer i DNA-basesekvensen i et gen, og kan som nævnt enten være basepar eller frameshift mutationer. "Missense" mutationer er mutationer, som medfører, at der indsættes en forkert aminosyre i det protein, som genet koder for, hvilket kan føre til en ændret eller nedsat funktion af det pågældende protein. Ved en "nonsens" mutation indsættes et stop kodon i et gen, hvorved proteinsyntesen afsluttes for tidligt, hvilket normalt fører til et fuldstændigt tab af genproduktets normale funktion. Fremadmutationer fører til tab af et genprodukts normale funktion, mens genproduktets normale funktion genoprettes ved tilbagemutationer.

De mest anvendte tests til påvisning af punktmutationer er tilbagemutationstests i *Salmonella typhimurium* og *Escherichia coli*. Disse bakterietests har den fordel, at de er forholdsvis nemme og hurtige at udføre.

### *Salmonella/mikrosom testen (Ames test)*

Ames test blev udviklet i slutningen af 1960'erne, og de første egentlige teststammer blev beskrevet i 1971. Siden er testen taget

i anvendelse af en lang række laboratorier i såvel forskningsøjemed som til rutinetestning af kemiske stoffer for mutagen effekt. Selvom der gennem de sidste 10-20 år er udviklet en lang række nye genotoksicitetstests, er Ames test stadig den mest anvendte og den bedst validerede test til screening af kemiske stoffer og komplekse blandinger for mutagen effekt. I løbet af de sidste 10-20 år har testen gennemgået en række forbedringer, hvorved følsomheden er øget, og disse forbedringer har også været medvirkende til at belyse molekylære mekanismer i mutagenesen. Ændringerne af teststammerne vil blive beskrevet senere i dette kapitel.

Der er udarbejdet internationale guidelines for udførelsen af Ames test, bl.a. OECD og EU guidelines. Nogle lande har desuden nationale guidelines (fx England, Japan og Canada). Testen indgår som "kernen" i en række forskellige test-strategier for genotoksicitetstestning af fx nye industrikemikalier, lægemidler, pesticider, til sætningsstoffer til levnedsmidler, kosmetik og stoffer til emballage beregnet til at komme i kontakt med levnedsmidler (jf afsnittet om lovgivning). Testen har endvidere været meget anvendt i forbindelse med testning af komplekse blandinger for indhold af mutagene stoffer. Det gælder fx i forbindelse med testning af miljøforurenninger i luft, jord eller vand. Testen har også været anvendt til at undersøge human urin, som en indikation på en eksponering for mutagene stoffer. Endelig har testen været anvendt til at undersøge plastmateriale til levnedsmidler for indhold/afgivelse af mutagene stoffer.

Den genetiske baggrund for Ames test er gennemgået nedenfor:

#### *Histidin-mutationen*

Ames test er en bakterietest, hvori der indgår forskellige mutanter af vildtypen *Salmonella typhimurium* LT2. Alle disse mutanter mangler evnen til at syntetisere histidin pga en mutation i et af generne i histidin-operonet. De kan derfor kun vokse i et medie, der indeholder histidin. Siden testen blev udviklet, har den gennemgået en række justeringer, og der er kommet flere stammer til, mens andre er gledet i baggrunden.

Testen kan påvise kemiske stoffer, der giver anledning til punktmutationer (baseparsubstitutioner eller frameshift mutationer). Når bakterierne udsættes for et sådant stof, kan nogle af dem mutere tilbage til vildtypen, hvorved evnen til at syntetisere histidin genvindes. Tabel 1.2 viser en oversigt over histidin-mutationerne i de mest anvendte *Salmonella*-stammer.

#### *Metabolisk aktivering (S9-mix)*

Som nævnt tidligere bliver mange kemiske stoffer først genotoksiske efter en metabolisk aktivering. Bakterier besidder ikke de

Mutation	Stamme	Mutationstype	Reverteres af
His G428	TA102	w/t CAG-AGC-AAG-CAA-GAG-CTG-	Baseparsubstitutioner. Alle mulige transitions og transversions. Extragene suppressorer. Små deletioner (-3,-6)
	TA104	mutant CAG-AGC-AAG-TAA (ochre)	
His G46	TA100	w/t GTG-GTG-GA T-CTC-GGT-ATT-	Baseparsubstitutioner Extragene suppressorer
	TA1535	mutant -CCC-	
	TA100 NR		
	TA100/1, 8DNP <sub>6</sub>		
	YG1026		
YG1029			
His G6610	TA97	w/t GTC-A <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CC-CC</span> -T-GAA-A* TC-GCC	Frameshift mutation
		mutant GTC-ACA- <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CCC-CCC</span> -TGA (opal)	
His G3052	TA98	w/t GAC-ACC-G <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CC-C</span> GG-CAG-GCC-CTG-AGC	Frameshift mutation
	TA1538	mutant GAC-ACC-G <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CC</span> -GGC-AGG-CCC-TGA (opal)	
	TA98 NR		
	TA98/1, 8DNP <sub>6</sub>		
	YG1021		
YG1024			
His G3076	TA1537	w/t frekvens ikke kendt.	Frameshift mutation
		mutant formodes at være +1 nær CCC.	

A\*: 6-methyldeoxyadenosin

Tabel 1.2. Oversigt over mutationer i histidin-operonet i de mest anvendte *Salmonella*-stammer. w/t = vildtype. Som det fremgår af tabellen, er nogle af stammerne, fx TA100 og TA1535, baseparsubstitutions mutanter, mens andre er frameshift mutanter, fx TA97, TA98 og TA1537. I modsætning til alle øvrige stammer, som har et GC basepar på mutationsstedet, har TA102 og TA104 et AT basepar på mutationsstedet, som gør disse (nyere) stammer følsomme for nogle kemiske stoffer, som ikke kunne påvises med de "gamle" stammer.

samme enzymssystemer som mammale celler, bl.a. ikke cytochrom P-450 systemet, som overvejende findes i leveren hos pattedyr og mennesker. For at påvise effekten af denne type stoffer er det derfor nødvendigt at tilsætte disse enzymer. Oftest anvendes et rottelever-homogenat, som er centrifugeret ved 9.000 g. Supernatanten, der indeholder det endoplasmatiske reticulum og mikrosomer med enzymer, opløselige enzymer og endogene cofaktorer, kaldes S9. Til forsøg anvendes S9-mix, der ud over S9 indeholder cofaktorer (NADP og glucose-6-phosphat), forskellige salte og vand. Også andet væv og andre dyrearter kan anvendes.

#### Andre mutationer

Ud over histidin-mutationen har bakterierne andre mutationer, som tjener til at forøge testens følsomhed. Tabel 1.3 viser en skematisk oversigt over disse stammer.

Stamme	DNA-repair	Plasmid	Nitroreduktase
TA102	+	pKM101 og pAQ	
TA104	uvrB	pKM101	
TA100	uvrB	pKM101	
TA1535	uvrB	-	
TA100 NR	uvrB	pKM101	-nitroreduktase
TA100/1,8DNP	uvrB	pKM101	-O-acetyltransferase
YG1026	uvrB	pKM101	++nitroreduktase
YG1029	uvrB	pKM101	++O-acetyltransferase
TA97	uvrB	pKM101	
TA98	uvrB	pKM101	
TA1538	uvrB	-	
TA98 NR	uvrB	pKM101	-nitroreduktase
TA98/1,8DNP	uvrB	pKM	-O-acetyltransferase
YG1021	uvrB	pKM101	++nitroreduktase
YG1024	uvrB	pKM101	++O-acetyltransferase
TA1537	uvrB	-	

-: mangler det pågældende enzym

++: overproduktion af det pågældende enzym

*rfa*-mutationen er en mutation, som gør, at lipopolysaccharid-barrieren er delvis ødelagt, så cellerne er mere permeable for større molekyler. Alle teststammerne i tabel 1.2 og tabel 1.3 har denne mutation.

*uvrB* er en deletion i et af de gener, der koder for excision repair-systemet. Eliminationen af det "fejlfrie" DNA-repair-system øger sensitiviteten for mange mutagener. *uvrB*-deletionen omfatter også et tab af biogenet, hvilket giver krav for biotin. TA102 er *uvrB*<sup>+</sup> og er i stand til at reparere via excission repair. Denne stamme anvendes bl.a. til at påvise stoffer, som danner DNA-krydsbindinger, en DNA-skade som er letal, hvis den ikke reparerer af excission repair.

Plasmidet *pKM101* øger den spontane og den inducerede mutationsrate, formentlig ved at fremme SOS repair ("error prone repair"), idet plasmidet indeholder gener, som er associeret med SOS repair. SOS repair induceres ved DNA-skader, som stopper DNA-replikationen, fx "bulky" addukter. Sådanne fejl reparerer normalt af den mere nøjagtige excision repair, men i teststammer, som mangler denne repair mekanisme, reparerer fejlene af SOS-systemet. Teststammer, som indeholder dette plasmid (jf tabel 1.3), har en større følsomhed for en række mutagener. *pKM101* indeholder desuden et gen, som giver ampicillin-resistens, hvilket gør det nemt rutinemæssigt at teste stam-

Tabel 1.3. Oversigt over "andre mutationer" i nogle *Salmonella typhimurium*-stammer.



merne for evt tab af plasmidet (R-faktor). Ampicillin-resistensen har i øvrigt ingen relevans for testen. Mutationen i histidin-genet i TA102 sidder på flere plasmider ("multicopy" af pAQ1). Disse plasmider indeholder også gener, der giver tetracyclin-resistens.

*Nitroreduktase "underproducerende" og "overproducerende" stammer:* *Salmonella* bakterier indeholder forskellige nitroreduktaser (NR) og O-acetyltransferase (NAT/OAT). Nitroreduktaser deltager i aktiveringen af mange aromatiske nitroforbindelser og aromatiske aminer. Der er udviklet stammer af TA98 og TA100, som mangler de "klassiske" nitroreduktaser: TA98NR og TA100NR. Der er desuden udviklet stammer med overproduktion af "klassisk" nitroreduktase ved at klonе enzym-genet i et plasmid og overføre det til TA98 (YG1021) og TA100 (YG1026). På samme måde er der udviklet stammer med overproduktion af O-acetyltransferase. TA98 svarer til YG1024 og TA100 til YG1029. *S. typhimurium* med *humane metaboliske enzymer*:

Vha rekombinant DNA-teknik er det nu også lykkedes at udvikle *S. typhimurium*-stammer med indsatte gener, som udtrykker humane metaboliske enzymer. Dette har den store fordel, at metabolismen foregår endogent (i cellen), og reaktive metabolitter har derfor større mulighed for at reagere med DNA. Desuden kan forskellige humane enzymeres betydning for den metaboliske aktivering af forskellige kemiske stoffer undersøges.

#### *Specifikke ændringer i DNA-repair*

Endelig er der udviklet stammer, som er specielt følsomme for alkylende stoffer (inducerer ofte O<sup>6</sup> alkylguanin, hvorved der fejlagtigt indsættes en thyminbase). I disse stammer, som er konstrueret ud fra TA1535, er de metyltransferaser, som normalt reparerer disse skader, inaktiveret, og disse stammer er specielt følsomme for alkylende stoffer.

Stoffer, som inducerer oxidative DNA-skader, danner ofte 8-hydroxyguanin, som parrer med adenin. Disse skader repareres normalt af 8-hydroxyguanin endonuklease. TA1975 og TA102, som mangler dette gen, har en meget stor følsomhed over for stoffer, som inducerer oxidative skader.

#### *E. coli WP2 (uvrA) (pKM101)*

Der findes en serie af *E. coli* WP2 stammer, som har en base-parsubstitution i tryptofan operonet, hvorfor den kræver tryptofan for at vokse. Ligesom *S. typhimurium* TA102 har disse *E. coli*-mutanter et AT basepar på det kritiske mutationsted. Der findes en stamme, som ikke er i stand til at reparere via excission repair-systemet (uvrA-), og denne stamme er derfor mere følsom over for visse fysiske og kemisk inducerede DNA-skader. Stammen, som kan reparere via excission repair, er ligesom *S.*

*typhimurium* TA102 følsom for visse krydsbindende stoffer. pKM101 øger følsomheden for de fleste mutagener, som beskrevet under Ames test.

#### *Anvendte teststammer*

Til en standard bakterie mutagentest anvendes et batteri af forskellige teststammer med forskellig følsomhed for forskellige kemiske stoffer.

Tidligere anbefalede Ames som standard at anvende stammerne: TA100 og TA1535, som er muteret ved baseparsubstitution, og frameshift mutanterne TA1538, TA98 og TA1537.

Senere har Ames anbefalet som standard at anvende stammerne TA100 og TA102 til påvisning af baseparsubstitutioner, og frameshift mutanterne TA97a og TA98 i stedet for 1537 og TA1538.

I forslaget til den nye OECD guideline for punktmutationer i bakterier, hvor to guidelines for punktmutationer i bakterier *S. typhimurium* (471) og *E. coli* (472) slås sammen til én bakterie tilbagemutationstest, anbefales følgende stammer anvendt: *S. typhimurium* TA1535, TA1537 eller TA97 eller TA97a, TA98, TA100 og *E. coli* WP2 uvrA eller *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) eller *S. typhimurium* TA102. En standard bakterie mutagentest udføres som en pladeindstøbningsmetode eller som en præinkubationstest, som er en lettere modifikation af førstnævnte.

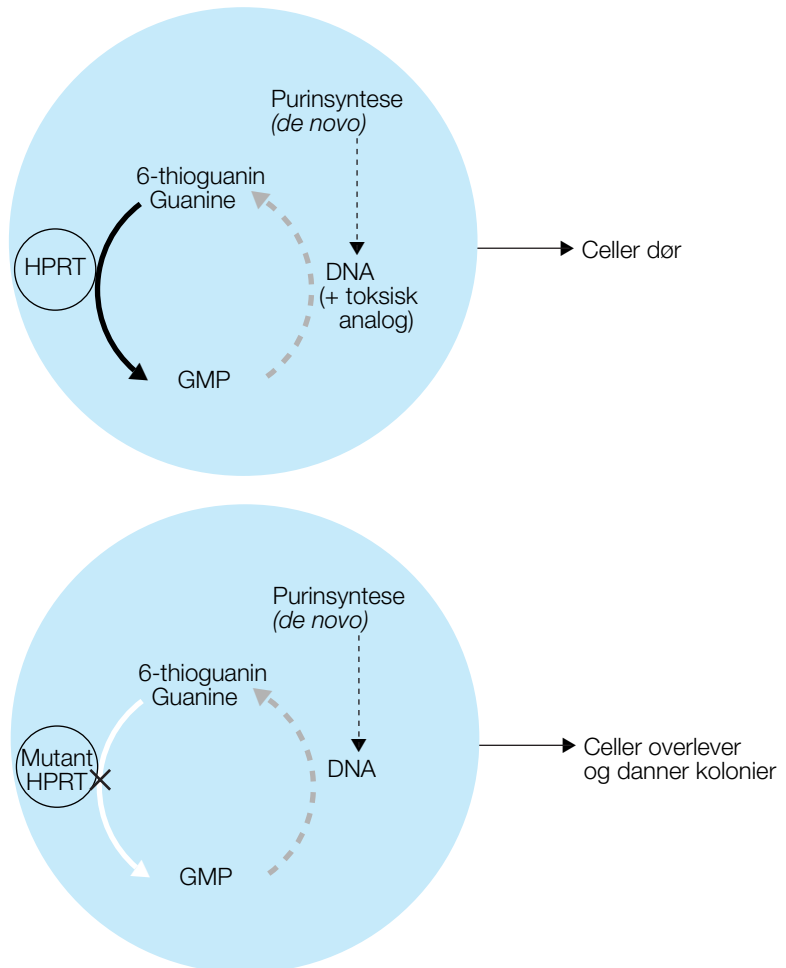
## Tests til påvisning af punktmutationer i mammale celler

### *HPRT-testen*

Punktmutationer kan påvises i testsystemer, som muliggør sortering af celler med skader i et gen fra celler uden disse skader. HPRT-genet, som koder for et enzym, der indgår i omdannelsen af guanin til mononukleotidet GMP (DNA-byggesten), anvendes ofte til påvisning af punktmutationer i mammale celler (fig. 1.9.). I normale celler med intakt HPRT-gen er purinbase-analogen, 6-thioguanin, cytotoxisk, idet denne også kan omdannes til nukleotider af det enzym, som HPRT-genet koder for. Herved går DNA-replikationen i stå, og cellerne dør. Celler med skader i HPRT-genet udviser resistens over for 6-thioguanin, idet GMP dannes via en anden syntesvej (de novo). Celler med skader i HPRT vil derfor kunne opformeres ved dyrkning i medie med 6-thioguanin, og mutationer kan kortlægges i HPRT-genet.

HPRT-mutationsekspressionen måles umiddelbart efter 5-14 dages dyrkning af cellerne i et medie med 6-thioguanin (selektivt medie), som kun lader de muterede celler overleve. Antallet af mutanter scores, efter udpladning, som antal kolonier. Parallelt med mutagenicitetsbestemmelsen gennemføres en bestemmelse

Figur 1.9. HPRT katalyserer omdannelsen af frie puriner (guanin) til mononucleosidet (GMP). GMP har en væsentlig rolle med feedback kontrol på nysyntesen af GMP. Normale celler vil dø efter inkorporering af det toksiske 6-thioguaninholdige mononucleosid i DNA, idet DNA-replikationen stoppes. HPRT-deficiente celler er resistente over for 6-thioguanin og overlever, idet GMP nu fås fra *de novo* syntesen.



af cellernes evne til at danne kolonier i normalt medie, dvs overlevelsen. Der opnås derfor såvel et mål for cellers overlevelse C som for mutationsfrekvensen M.

- ◆ C = gennemsnitlige antal kolonier i normalt medie/ totale antal celler sat til mediet
- ◆ M = gennemsnitlige antal kolonier i selektivt medie (mutanter)/ totale antal celler i det selektive medie.

Normalt udtrykkes antallet af muterede celler i forhold til antal overlevende celler (M/C), og denne størrelse ligger i humane lymfocytter på ca  $10^{-6}$ .

### *Muse-lymfom testen*

I denne test måles mutationer på gen- og kromosomniveau i

thymidinkinase- (TK-) lokus, som fører til funktionsfald eller -bortfald af enzymet.

Ikke-muterede celler indeholder aktivt thymidinkinase, der er involveret i cellernes biosyntese af DNA-precursorer via phosphorylering af thymidin, der anvendes som byggesten i DNA. DNA-basen thymin dannes normalt via de novo syntese. Eksponering for pyrimidinanalogerne 5-bromodeoxyuridin, fluoro-deoxyuridin eller trifluorithymidin fører til phosphorylering med TK og indbygning i DNA med efterfølgende celledød. Mutationer i TK-lokus, som resulterer i inaktiv thymidinkinase, fører til resistens af de muterede celler over for pyrimidinanalogerne, idet disse celler kun får thymin fra de novo syntese.

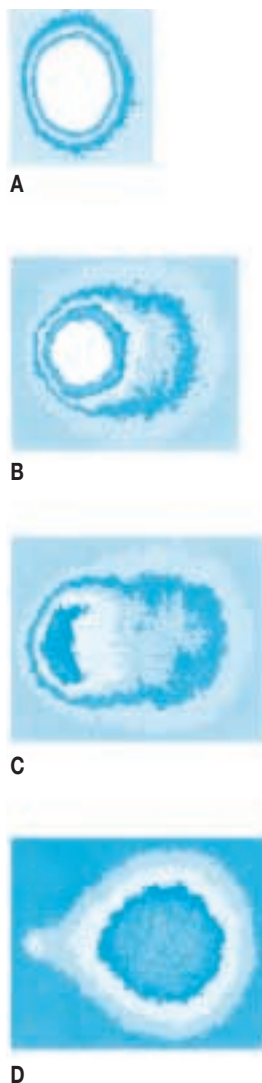
TK-lokus findes på et autosomt kromosom, hvorfor hemi- eller heterozygot mouse lymphoma celler anvendes. Cellerne dyrkes i suspensionskultur tilsat testsubstansen og med eller uden metabolisk aktivering (S9-mix). Fordoblingstiden er kort (9-10 timer), og cellerne udsættes for teststoffet i denne periode, hvorefter der skiftes medie med pyrimidinanalog, og efter ca 2 uger scores antallet af muterede kolonier. Anvendes trifluorothymidin som selektionsstof, giver mange teststoffer et bifasisk respons i form af små kolonier med langsomt voksende mutanter (kromosomal og/eller punktmutationer) og større kolonier med hurtigt voksende mutanter (især genmutationer). I opgørelser af mutationsfrekvenser bør både små og store kolonier medtages.

### *KOMET assay*

Komet-metoden er en ny metode, der er udviklet som en hurtig screenings-test inden for den genetiske toksikologi. Metoden anvendes ved in vitro forsøg på cellekulturer og i mindre grad på celler fra forsøgsdyr. Ved biomonitoringsstudier har metoden har også fundet anvendelse som screeningsmetode.

Celler støbes ind i en agarose-gel, og cellemembranen ødelægges, og proteiner nedbrydes ved lysering. Herved fjernes cytosolære proteiner, mens DNA forbliver i gelen. Det tilbageværende DNA behandles alkalisk (alternativt neutralt), og gelen udsættes for et elektrisk felt, elektroforese. Ved en efterfølgende farvning af DNA med fluorescerende farvestof kan DNA visualiseres i fluorescens-mikroskop. Celler med skader på DNA ligner kometer i mikroskopet, hvorimod ubeskadiget DNA bevarer sin struktur og har et kugleformet udseende. Komet-metoden detekterer strengbrud i DNA. Under neutrale elektroforese betingelser måles dobbelt strengbrud, mens der ved alkaliske betingelser detekteres alle former for direkte strengbrud og DNA-skader, der konverteres til strengbrud (såkaldte alkali-labile skader og strengbrud forårsaget af DNA-reparationsmekanismer).

Metoden har været anvendt til at analysere stoffer, der forårs-



Figur 1.10. DNA-skader i lymfocytter fra menneske målt ved Comet-metoden. Tail Moment (TM) angiver graden af disintegration af DNA. A: ubeskadiget DNA (TM = 0,02), B: let beskadiget DNA (TM = 19,1), C: svært beskadiget DNA (TM = 58,4), D: multifragmenteret DNA (TM = 137). (Figur venligst stillet til rådighed af Peter Møller, Arbejds-miljøinstituttet).

ger direkte strengbrud (fx gammastråling og hydrogen peroxid), mens genotoksiske stoffer, der ikke direkte forårsager strengbrud, men fx stabile addukter eller crosslinks, først kan detekteres, når skaden er omdannet til strengbrud. Dette sker ved en høj pH-værdi (>13). Reparationsmekanismer i cellerne fjerner DNA-skaderne ved at fjerne det stykke DNA-streng, hvori DNA-skaden sidder, hvorved der opstår kortvarige brud på DNA-strengen, som kan detekteres.

Metoden giver ikke information om typen af DNA-skader, og i biomoniteringsstudier ses en klar årstidsvariation. Dertil kommer, at der er store forskelle mellem laboratorier. Gennem standardisering af laboratorieproceduren og gentagne analyser af prøver fra de samme personer er det muligt at sammenligne niveauer af skader. Nyere undersøgelser har vist, at det individuelle niveau af skader holder sig konstant enten højt eller lavt.

## Tests til bestemmelse af kromosomale mutationer

Det har længe været kendt, at ioniserende stråling og kemiske stoffer kan medføre kromosomskader (kromosomafvigelser). Kemiske stoffer, som kan give strukturelle kromosomafvigelser, kaldes klastogener. Klastogener kan fx være stoffer, som danner større DNA-addukter. Bruddet sker sandsynligvis under reparationen af DNA-skaden.

Som nævnt tidligere gennemløber celler i vækst forskellige veldefinerede faser. Cellers følsomhed for klastogener er forskellig i de forskellige faser. Hvilken skade der opstår i en behandlet/eksponeret celle, afhænger dels af kemikaliet, men også af, hvilken fase af celleyklus cellen er i, når den behandles/eksponeres.

Ioniserende stråling inducerer kromosomtypeafvigelser i G0- og G1-fasen; disse aberrationer forekommer i det samme lokus af begge kromatider og omfatter terminale deletioner, minutes eller interstitielle deletioner, acentriske ringe, centriske ringe, inversioner, reciprokke translokationer og polycentriske aberrationer. I S inducerer ioniserende stråling kromosom- og kromatidtypeafvigelser og i G2 kromatidtypeaberrationer. Kromatidtypeaberrationer findes ofte kun i det ene kromatid. De mest almindelige kromatidtypeaberrationer er kromatid og isokromatid gaps, kromatid brud og interchanges. Betydningen af kromatid og isokromatid gaps er endnu ikke kendt, men de opfattes generelt ikke som egentlige DNA-skader.

Kromosomafvigelser kan karakteriseres som stabile eller ustabile afhængigt af, om de kan bestå efter flere celledelinger. Ustabile aberrationer består af dicentriske kromosomer, ringe,

Strukturelle kromosomforandringer omfattende et enkelt kromosom ("intrachanges")							
Normal	Kromatid gap	Kromosom gap	Kromosom brud	Interstitiel deletion	Ring-kromosom	Acentrisk ring	Pericentrisk inversion

Strukturelle kromosomforandringer omfattende flere kromosomer ("interchanges")		
Normal	Dicentrisk kromosom med acentrisk fragment	Reciprok translokation

Figur 1.11. Oversigt over nogle af de almindligste kromosomafvigelser.

acentriske fragmenter og andre asymmetriske rearrangementer. Disse ændringer vil ofte føre til celledød. Antallet af de ustabile ændringer vil derfor falde med tiden.

Kemiske klastogener kan inddeles i 4 grupper:

1. Inhibitorer af DNA-repair som fx koffein.
2. Nogle sjældent forekommende kemikalier, som inhiberer DNA-syntesen, giver en høj frekvens af gaps (akromatiske læsioner), hvis celler behandles i G2 eller S-fasen.
3. Kemikalier, som giver alle typer kromatidafvigelser, men kun hvis eksponeringen foregår i G1 eller tidlig S-fase. De fleste kemiske klastogener hører til denne gruppe, bl.a. alkylende stoffer og nitrosoforbindelser.
4. Nogle få kemiske stoffer, der opfører sig som ioniserende stråling mht klastogen effekt. Disse kaldes radiomimetika og omfatter bl.a. et antibiotikum, streptonigrin.

Interessen for at kunne påvise en evt mutagen og carcinogen effekt af kemiske stoffer i mennesker er stigende, og en lang række tests er under udvikling. Der findes dog kun relativt få veletablerede tests til påvisning af kemiske stoffers klastogene effekt. Specielt tre metoder har fundet anvendelse:

Kromosomafvigelses-analyser (eller CA-testen), Mikrokernetesten (MK) og Søsterkromatidudvekslinger (SCE). Disse tests anvendes også til genetisk monitorering.

### *Kromosomafvigelses-analyse*

Kromosomafvigelser er ændringer af kromosomstrukturen, som kan iagttages i et lysmikroskop. Alle ovennævnte og de i fig. 1.11 viste ændringer kan forekomme, men er kun synlige i metafasen.

Strukturelle kromosomafvigelser skyldes brud på DNA-dobbelt-helixen. Dobbeltstrengt brud, som fx kan forårsages af ioniserende stråling og S-fase uafhængige kemikalier, fx bleomycin, fører direkte til strukturelle kromosomafvigelser. Afhængigt af, i hvilken cellecyklusfase der opstår dobbeltstrengt brud, kan skaden føre til såvel kromosom- (fra G1) som til kromatidtype- (fra G2) afvigelser.

Alle andre primære læsioner kræver en transformation til dobbeltstrengt brud gennem DNA-replikation og/eller repair-processer.

De fleste kemiske mutagener er S-fase afhængige og fører ikke direkte til dobbeltstrengt brud. De primære læsioner transformeres i S-fasen, og de ændringer, der kan ses i metafasen, er næsten altid af kromatidtypen. De fleste kromosomafvigelser er letale, da der mistes genetisk materiale. Ikke-letale afvigelser er fx reciprokke translokationer, hvor der "kun" rokeres rundt på det genetiske materiale. Kromosomale rearrangementer opstår, hvis de brudte kromosomer "hæftes" sammen på en anderledes måde. Translokationer skyldes ombytninger mellem forskellige ikke-homologe kromosomer.

Der findes velbeskrevne testprotokoller for såvel in vitro som in vivo kromosomafvigelses-tests.

Som testsystemer til at påvise kromosomaskader i mammale celler in vitro kan anvendes flere forskellige celler: perifere leukocytter fra dyr eller mennesker eller andet væv fra biopsier eller etablerede cellelinier, fx HeLa-celler. De mest anvendte er: perifere humane lymfocytter og fibroblaster, fibroblaster fra mus og rotter og Chinese hamster ovarie (CHO) celler.

I en in vivo test kan såvel det kemiske stof som dets metabolitter undersøges i forskellige væv, fx knoglemarv, milt, spermatogonier, spermatoocytter, oocytter og tidlige embryoceller. I dyreforsøg anvendes oftest knoglemarv fra gravere.

### *Mikrokernetesten*

Mikrokernetesten er en mere uspecifik test end kromosomafvigelses-analyser til påvisning af kromosomale ændringer. Testen kan påvise både klastogener og nogle tengifte. Mikrokernerne kan opstå af to grunde:

1. Ved kromosom- eller kromatidbrud vil der dannes kromatin uden centromer. Da centromeren er nødvendig for adskillelsen af kromosomerne under celledelingen, vil de acentriske fragmenter blive efterladt i den ene dattercelle i anafasen under celledelingen, hvor de kan blive indlemmet i selve cellekernen, eller danne selvstændige små kerner, mikrokerner.
2. Ved påvirkning med tengifte under mitosen. Hvis tenapparatet ikke fungerer, kan der dannes mikrokerner med hele kromosomer. Eksempler på tengifte er cytostatikapræparaterne, vinkblastin og vinkristin samt stofferne colchicin og colcimid.

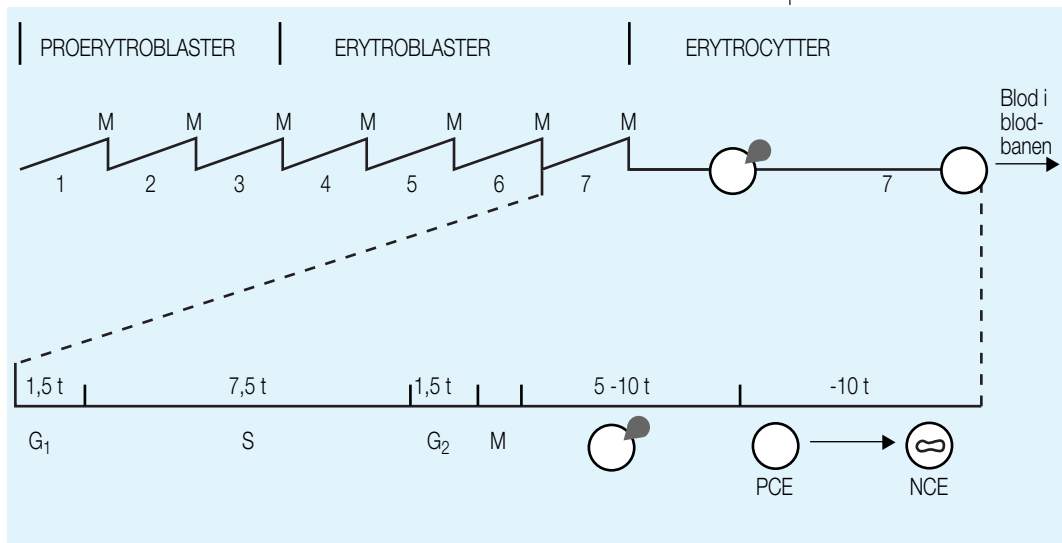
Teoretisk set kan alle mammale testorganismer og alt væv, som deler sig, anvendes til mikrokernetesten, men bestemte forhold ved røde blodlegemer (erythrocytter) gør, at knoglemarv er det mest foretrukne væv, og ofte referes til denne test som "mikrokernetesten". Musen er den mest foretrukne dyreart, men rotter, kinesiske hamstere og aber er også blevet anvendt. I forslag til nye OECD guidelines er det også muligt at anvende perifere lymfocytter.

#### *Den polykromatiske erythrocyt- (PCE-) test*

Mikrokerner kan som nævnt opstå i alle vævsceller, som deler sig, men de findes nemmest i celler uden cellekerne. Unge erythrocytter er de eneste mammale celler, der mangler cellekerne, hvorfor de er de mest foretrukne. Fig. 1.12 viser skematisk dannelsen af PCE'er i museknoglemarv.

De forskellige stadier af erythrocytter kan skelnes ved specielle farveteknikker. Farver man celler fra knoglemarv med May-

Figur 1.12. Museerythrocytter gennemgår 6-7 celledelinger med en celledelingscyklus på omkring 10 timer. Ca 6 timer efter sidste mitose udskydes cellekernen fra erytroblasten. De dannede polychromatiske erythrocytter (PCE) bliver i knoglemarven yderligere 12-24 timer. Herefter forsvinder de over i den perifere blodbane, hvor de efter 12-24 timer modnes til normochromatiske erythrocytter (NCE'er), hvor også ribosomer og RNA er udskilt, og NCE'er indeholder stort set kun hæmoglobin. Muse-NCE'er har en levetid på ca en måned. (Fra Venitt, 1984).





Grüenwald og Giemsa, vil erythroblaster farves blå-grå pga cellekernen, PCE'er med ribosomer og RNA farves blålige eller rødlig med blåt netværk, mens NCE'er bliver orange-røde. Mikrokernerne vil være af samme farve som cellekerner, de er oftest runde, men kan også være ovale eller halvmåneformede. Der er oftest kun én mikrokjerne, i enkelte tilfælde dog to til tre.

Mikrokerner dannes ikke i celler, som ikke deler sig. Meget toksiske stoffer kan give en så kraftig inhibering af mitosen i knoglemarven, at der kun dannes meget få PCE'er. Nogen inhibering af mitosen er ønskelig da det kan anvendes som en indikation på, at stoffet eller metabolitter heraf har påvirket knoglemarven. En for kraftig inhibering skal derimod undgås, da antallet af PCE'er bliver for lavt til at påvise en effekt (mikrokerner), samtidig med at de eksisterende PCE'er kan være atypiske. Forholdet mellem PCE'er og NCE'er, der normalt er 0,4-0,5, kan anvendes som et mål for en cytotoxisk påvirkning af knoglemarven. PCE:NCE forholdet bør ikke være under 0,05.

#### *Mikrokerner i humane lymfocytter in vitro og in vivo*

Kromosomskader (fragmenter og efterladte kromosomer) kan påvises i humane lymfocytter som mikrokerner såvel in vitro som in vivo (genetisk monitoring). Der har været stigende interesse for lymfocyt mikrokernetesten de seneste år som human biomonitorings-test til påvisning af klastogene og aneugene stoffer.

Mikrokerner bliver først udtrykt efter én celledeling. Humane perifere blodlymfocytter (pbl'er) er i  $G_0$ -stadiet, hvorfor det er nødvendigt at tilsætte stoffer, som stimulerer til celledeling (mitogene stoffer), (som ved CA- og SCE-testen). I modsætning til andre cytogenetiske tests anvendes interfase celler i MK-testen. Disse er nemmere at score i et stort antal på relativt kort tid. Lymfocytter fra forskellige individer responderer ret forskelligt på mitogenstimulering, således at andelen af celler, der deler sig, er forskellig fra individ til individ. Andelen af celler, der deler sig, kan også være forskellig i forskellige kulturer fra samme individ pga forskellige forsøgsomstændigheder. Da man ikke kan se forskel på celler i interfase, som har delt sig en eller flere gange, og celler, som ikke har delt sig, er der udviklet en metode, hvor cytokinesen blokeres med cytokalasin-B (cyt-B). Herved sker der en ophobning af celler, hvor cellekernen har delt sig én gang, men cytoplasma forbliver udelt. Disse celler fremstår som store binukleære celler. Mikrokerner tælles kun i disse celler.

*Påvisning af aneugene stoffer.* Da mikrokerner kan indeholde såvel kromosomfragmenter som efterladte kromosomer (aneuploide celler), er det ønskeligt at kunne skelne mellem klastogene og aneugene stoffer. Der har været foreslået forskellige metoder til en sådan analyse: forskelle i mikrokerners størrelse,

mængden af DNA i cellekernen, tilstedeværelse af centrisk kromatin i mikrokerner og endelig kvalitativ analyse af tilstedeværelse af kinetochorer i mikrokerner. Sidstnævnte metode er en immunofluorescens-farvning. Denne metode er baseret på, at antistoffer i serum fra patienter med scleroderma CREST syndrom binder specifikt til kinetochor proteiner.

Der findes velbeskrevne testprotokoller for mikrokernetesten såvel *in vitro* som *in vivo*, fx OECD guidelines. Da MN-testen er betydeligt nemmere at udføre end CA-testen, ikke kræver den samme grad af træning og kan automatiseres, overvejes den indført i *in vitro* screeningsprogrammer til erstatning af CA.

### *Søsterkromatidudvekslinger (SCE)*

En anden veletableret metode til at påvise kemiske stoffers klastogene effekt i mammale celler er SCE, som kan udføres *in vitro* (med og uden metabolisk aktivering) og *in vivo* på flere forskellige celletyper.

*In vivo* har knoglemarv været det foretrukne væv i dyreforsøg. De mest anvendte dyrearter er mus, rotter og hamstere. Når det drejer sig om mennesker, anvendes oftest perifere blod-lymfocytter (pbl'er). Andet væv kan også anvendes, fx milt, spermatogonier, lever, føtalt væv, lungemakrofager og tarmepitelceller. Der er ofte set vævsspecifikke forskelle i SCE-induktion, fx med cyclophosphamid.

*In vitro* er nogle af de mest anvendte celler: CHO-celler, humane diploide fibroblaster og humane perifere blod-lymfocytter.

Ved SCE forstås symmetriske udvekslinger af arvemateriale mellem søsterkromatider i nyligt replicerede DNA-molekyler af tilsyneladende homologe loci. Udvekslingerne involverer brud på 4 DNA-strengene (2 dobbelthelixer), en ombytning af disse strengene mellem kromatider i det samme kromosom og en sammenføjning af DNA-strengene på deres nye plads. Adskillige undersøgelser viser, at SCE kan induceres i dyre- og menneskeceller *in vitro* og *in vivo* af en lang række kendte mutagener og carcinogener, men der findes endnu ingen tilfredsstillende forklaring på mekanismerne bag SCE. SCE's karakter af en rekombinationsproces antyder dog, at der er tale om DNA-reparation. SCE er et S-fase afhængigt fænomen, og DNA-replikationen er en forudsætning for dannelsen af SCE'er. Frekvensen af SCE'er indikerer muligvis graden af repair i S-fasen.

Flere undersøgelser tyder på, at CA og SCE induceres af forskellige typer DNA-læsioner. Den væsentligste læsion, der fører til CA, er dobbeltstrengt brud, som enten induceres direkte af ioniserende stråling eller radiomimetika eller efter repair af andre DNA-skader (fx addukter) og replikation i S-fasen. CA kan induceres i alle faser af cellecyklussen. SCE kan derimod kun inducere-

res under replikationen i S-fasen og er relativt ufølsom for ioniserende stråling og radiomimetika. Efter en eksponering med disse agenser ses der kun en svag stigning i S-fasen. SCE ser ud til at stamme fra addukter, der ikke reparerer af excission repair.

Søsterkromatidudvekslinger kan gøres synlige i lysmikroskop ved at lade celler vokse i to (evt én) celleyklus i et medie indeholdende en thymidin analog, 5-bromdeoxyuridine (BrdU) (in vitro), eller ved at injicere BrdU eller implantere en BrdU tablet i forsøgsdyret, hvor BrdU vil være til stede i to (eller én) celleyklus (in vivo). Ved genetisk monitorings-tests behandles pcl'er efter blodprøvetagning. Når mammale celler gennemgår en celleyklus i tilstedeværelse af BrdU, vil en DNA-streng i hvert datterkromatid være substitueret med BrdU. Efter to replikationer indeholder det ene kromatid én substitueret DNA-streng, mens søsterkromatidet indeholder to substituerede DNA-streng. Ved farvning med et fluorescerende farvestof efterfulgt af Giemsa farvning kan eventuelle udvekslinger (SCE) ses i lysmikroskop, idet dobbelt substituerede DNA-streng fremtræder lysere end enkelt substituerede og usubstituerede DNA-streng (fig. 1.13)

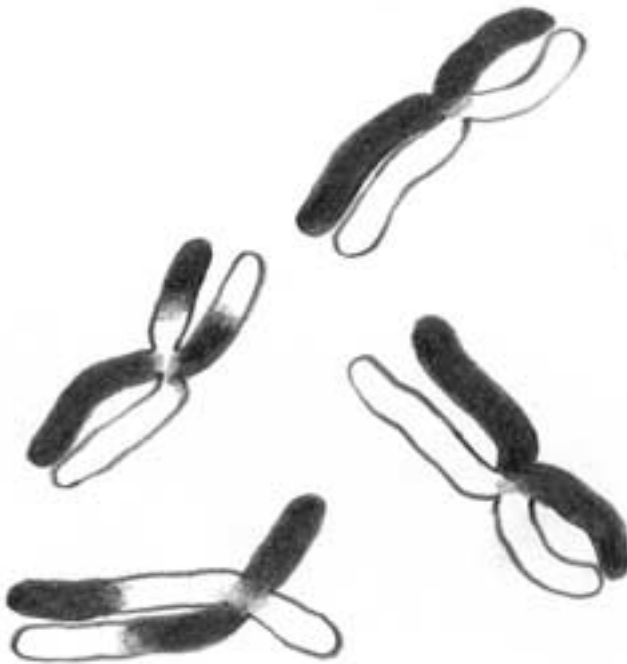
## Tests til påvisning af kønscellemutagen

### *Dominant letal-test i gnavere*

Dominant letal-testen er en in vivo test til at bestemme genetiske skader på kønscellerne. En dominant letal mutation er letal for det individ, som bærer mutationen, selvom mutationen kun forekommer i det ene allel (heterozygot). En dominant letal mutation, som induceres i en kønscelle (æg eller sædcelle), medfører ikke en dysfunktion af kønscellen, men er letal til det befrugtede æg eller det voksende embryo. Det defekte embryo implanteres ikke eller dør hurtigt efter implantationen. Hos mennesker vil resultatet være en tidlig abort, men hos gnavere persisterer implantatet som en "cellemasse" i hele drægtighedsperioden. Dominant letal effekt kan bestemmes ved at eksponere enten hanner eller hunner, oftest er det dog hannerne, der eksponeres. Hanrotter eller -mus parres med hunner med et bestemt tidsinterval mellem parringerne, for at undersøge følsomheden i forskellige kønscellestadier. Efter et bestemt tidsinterval aflives de drægtige hunner, og uterus undersøges for implantater og levende og døde embryoer. En positiv effekt ses som en forøgelse i antallet af døde implantater i testgruppen i forhold til kontrolgruppen. Dominant letal effekt betragtes generelt som resultatet af strukturelle eller numeriske kromosomafvigelse, men punktmutationer og toksisk effekt kan ikke udelukkes.

Da der er en dårlig korrelation mellem denne test og carcino-

Figur 1.13. Søsterkromatid-udvekslinger (SCE) i metafase. Pilene indikerer SCE.



gen effekt i dyreforsøg, anvendes dominant letal ikke som en screeningstest for carcinogen effekt. Testen har dog været anbefalet for at verificere, om en kromosomskadende effekt i fx knoglemarven også kan påvises på kønscelleniveau.

#### *Arvelig translokations-test*

I muse-arvelig translokations-testen bestemmes strukturelle og numeriske kromosomafvigelser i mammale celler i førstegenerations-afkommet. De kromosomafvigelser, der specifikt påvises, er translokationer (mellem kromosomer), og hvis hunnerne i afkommet også inkluderes i undersøgelsen, kan X-kromosomtab i F1 generationen påvises.

For at teste for arvelig translokation gives teststoffet til kønsmodne hanner. Herefter parres hver han med to eller tre hunner, hvorefter hunnerne anbringes hver for sig. Medmindre der undersøges for X-kromosomtab, anvendes kun F1 hannerne videre i undersøgelsen. Når F1 hannerne er kønsmodne, parres 300-500 hanner pr dosis hver med 3 hunner for at teste fertiliteten. Arvelig translokation påvises som nedsat fertilitet (kuld stør-

relse af F2 generationen) og bekræftes ved cytogenetisk analyse af meiotiske celler fra F1 hanner. XO hunner (X-kromosomtab) påvises som ændringen i kønsratioen fra 1:1 af hanner i forhold til hunner til 1:2 og bekræftes ved at undersøge mitotiske knoglemarvsceller for tilstedeværelse af 39 kromosomer i stedet for 40. Da testen er meget ressourcekrævende, og da der skal anvendes et meget stort antal dyr, er den ikke egnet til rutinescreening af kemiske stoffer.

## Tests til påvisning af repair af primære DNA-skader

### *Unscheduled DNA-synthesis*

DNA-reparation kan måles in vitro og in vivo ved en række forskellige metoder. Ideelt set skal reparationen sættes i relation til den skade på DNA, som skal repareres. Forholdet vil udtrykke DNA-reparationskapaciteten. Det er imidlertid sjældent muligt at opnå et eksakt mål for skaden, hvorfor man tit må nøjes med reparationsaktiviteten, udtrykt i mængde inkorporeret base (radioaktivitet) pr mængde DNA eller pr antal celler. Der findes forskellige metoder til bestemmelse af DNA-reparation, hvor UDS (Unscheduled DNA-Syntese) er den hidtil mest anvendte.

UDS er et mål for reparation af DNA-skader i celler, som udsættes for genotoksiske påvirkninger. UDS måles på leverceller og hvide blodlegemer som mængden af radioaktivt mærket thymidin (byggesten for DNA), der inkorporeres i DNA efter skaden.

### *Metodens princip ved anvendelse af lymfocytter*

Frisk helblod tappes i hepariniserede glas, og lymfocytter isoleres. Celletallet bestemmes, og cellerne inkuberes med et DNA-skadende agens, fx N-acetoxy-2-acetyl-aminoflouren (NAAAF) eller Dimethylsulfat (DMS). Herved bindes stoffet til DNA. Såfremt det er muligt at medtage inkubationer med det DNA-skadende agens i radioaktivt mærket form (fx  $^3\text{H}$ -mærket), kan DNA-bindingen kvantificeres som fx  $^3\text{H}$ -aktivitet pr mg DNA i oprenset DNA. NAAAF-bindingen giver anledning til "long patch DNA-strand breaks", som vil repareres af cellens repair-systemer. Evnen til at reparere de inducerede skader (UDS) måles ved inkorporering af  $^3\text{H}$ -Thymidin i DNA. For at minimere replikation af DNA i forbindelse med celledeling inkuberes med høj koncentration af hydroxyurea i mediet. UDS kvantificeres som  $^3\text{H}$ -aktivitet pr mg DNA i oprenset DNA. Da cellerne har en baggrundsinkorporering af thymidin, uafhængig af udsættelse for DNA-skadende agenser, måles denne baggrund parallelt og fratrækkes det endelige resultat.

UDS indgår som standardtest i batterier til genotoksicitetstest-

ning af fx nye lægemidler. Her anvendes ofte leverceller fra dyr doseret med stoffet, som undersøges (in vivo), eller hepatocytter (in vitro). UDS kvantificeres ved fotografisk måling af radioaktivitet, der er bundet i celle-DNA, typisk i form af sortfarvning på fotografiet af celler med UDS-aktivitet, mens celler uden UDS-aktivitet ikke farves. Ved optælling i præparater fra behandlede og ubehandlede væv kan antal af granulater sammenlignes, og forhøjede antal i behandlede væv tages som udtryk for DNA-skade og reparation.

## Vurdering af testresultater

### Positive/negative resultater

Ved afprøvning af et stof i flere genotoksicitetstests (in vivo eller in vitro) vil man hyppigt opnå modstridende resultater. Man vil derfor ofte få en diskussion om "falsk positive" og "falsk negative" resultater og overvejelser om, hvorvidt et positivt resultat i en given test (specielt ved in vitro tests i ikke-humane celler) er relevant for mennesker.

Forskelle i resultater kan bl.a. skyldes, at forskellige tests kan have forskellige genetiske endepunkter. Testenes følsomhed kan være forskellig, og deres sensitivitet og specificitet for forskellige kemiske stofgrupper kan være forskellig.

Ved et falsk positivt resultat forstås strengt taget et positivt udfald i en given test med et stof, som ikke er genotoksisk i den pågældende test. Ved et falsk negativt resultat forstås tilsvarende et negativt resultat i en given test af et stof, som er genotoksisk. Ofte anvendes dog betegnelsen "falsk positiv" om et stof, som er positivt i en genotoksicitetstest, men negativt i en carcinogenicitetstest i forsøgsdyr, og "falsk negativ" tilsvarende om et stof, der er negativt i en genotoksicitetstest, men positivt i en carcinogenicitetstest i forsøgsdyr. Carcinogenicitetstesten er her "reference test" for genotoksicitetstesten. Begrænsninger ved at ekstrapolere mellem to meget forskellige genetiske tests, samt begreberne "sensitivitet" og "specificitet", vil blive diskuteret nærmere i nedenstående afsnit.

### Falsk negative og falsk positive testresultater

Der kan være forskellige årsager til, at man opnår et "falsk nega-

tivt/falsk positivt resultat” i genotoksicitetstests. Disse kan inddeles i biologiske, tekniske og statistiske årsager. Nedenstående afsnit gælder dels generelt for genotoksicitetstests, dels specielt Ames test.

### *Biologiske årsager*

#### *Falsk negative resultater*

1. *Forkert genetisk eller non genetisk endepunkt.* Det undersøgte stof giver anledning til en anden genetisk ændring end den, der testes for. Fx kan kun de genotoksiske stoffer, som giver punktmutationer, påvises i Ames test. Det er derfor også nødvendigt at afprøve et stof i andre komplementære tests, med andre genetiske endepunkter. Herudover kan testen ikke “fange” de non-genotoksiske carcinogener, fx promotorer, steroider og antimetabolitter. Mange halogenerede forbindelser er ikke elektrofile og menes heller ikke at være initiatorer; det samme gælder flere uorganiske forbindelser, flere af disse er også meget tungt opløselige og har derfor en lav biotilgængelighed.

2. *Mangelfuld metabolisk aktivering.* Dette kan forekomme i såvel in vivo (vævsspecifik eller artsspecifik metabolisk aktivering) som in vitro. Da mange stoffer først bliver aktive i organismen ved metabolisk omdannelse, er det vigtigt, at man anvender det rette aktiveringssystem. Nedenstående eksempler illustrerer dette:

- ◆ Rottelevermikrosomer, som indgår i S9, indeholder cyt. P450 enzymsystemet. Der findes mange forskellige P450 isozymer, og sammensætningen varierer fra væv til væv og mellem dyrearter/mennesker. Endvidere kan forskellige P450 isozymer induceres af forskellige kemiske forbindelser. Eksempelvis aktiveres Carbon Black af Aroclorinduceret rottelever, men ikke af phenobarbitalinduceret lever. I en standard Ames test anvendes som regel Aroclorinduceret rottelever, da Aroclor menes at inducere det bredeste spektrum af P450 isozymer.
- ◆ Koncentrationen af S9 pr plade er i mange tilfælde kritisk for, hvor kraftig en mutagen effekt man opnår. Både for store og for små mængder kan ændre resultatet drastisk, dette gælder fx ved aktivering af cyclophosphamid og benzo(a)pyren.
- ◆ Omdannelsen af kemiske stoffer til reaktive forbindelser foregår ikke kun i leveren, nogle stoffer omdannes under anaerobe forhold i tarmen af tarmbakterier. Et typisk eksempel er aromatiske azoforbindelser, hvoraf nogle er cancerogene i dyreforsøg.

3. *Vævs-specifikke stoffer*. I in vivo tests kan et falsk negativt resultat skyldes, at man har undersøgt det forkerte væv (vævs-specifikke stoffer). Fx er levercarcinogenet diethylnitrosamin negativt i en mikronukleustest udført på knoglemarven, mens stoffet er positivt i en levermikrokernetest.

4. *Toksiske stoffer*. Et falsk negativt resultat kan også opnås, hvis det testede stof er toksisk over for testorganismen (fx antibiotika).

#### *Falsk positive resultater*

1. *Det pågældende stof kan ikke nå frem til DNA i mennesker, enten fordi:*

- ◆ det ikke absorberes,
- ◆ det ikke kan optages i menneskeceller,
- ◆ det er så reaktivt, at det når at reagere med andre molekyler, inden det når DNA, eller
- ◆ det "detoksificeres".

2. *Metabolismen i mennesker er anderledes end i testsystemet.*

3. *Referencetesten" er utilstrækkelig.* Referencetesten fanger ikke alle "sandt positive" stoffer.

#### *Tekniske årsager*

##### *Falsk negative testresultater*

Når et stof afprøves i en given test, er det nødvendigt at følge bestemte forskrifter for at få pålidelige og reproducerbare resultater. For mange genotoksicitetstests er der derfor opstillet guidelines for, hvordan standardtests bør udføres.

Pga teststoffernes variation i kemisk struktur og reaktivitet er disse testprotokoller, specielt for in vitro tests, i virkeligheden kompromiser. De er "konstrueret" til at give "næsten optimale" forsøgsbetingelser for de fleste kemiske stoffer. I nogle tilfælde kan det dog være nødvendigt at fravige standardtestprotokollen og udnytte den viden, man har om stoffernes biologiske og fysisk/kemiske egenskaber, for at undgå falsk negative resultater. Nogle stoffer falder negativt ud i en Ames test, fordi de er så letflygtige, at de forsvinder fra agarpladerne. Dette gælder fx alkylhaliderne, som bedst påvises i en eksikator (gælder stoffer med et kogepunkt op til 175°C).

##### *Falsk positive testresultater*

Som nævnt under "falsk negative" resultater er det både væ-



sentligt at følge standardiserede testprotokoller, men også at udnytte den viden, man har om de enkelte stoffers biologiske og fysisk/kemiske egenskaber, for at undgå falsk positive resultater. De tekniske årsager, der kan resultere i falsk positive resultater, afhænger naturligvis også her af den enkelte test.

Tekniske årsager til, at et testresultat kan falde ud som falsk positivt i Ames test:

- ◆ Hvis det testede stof ikke er sterilt, vil vækst af "fremmede" bakterier kunne tolkes som et positivt resultat i Ames test. Derfor bør den bakteriologiske renhed af stoffet altid sikres.
- ◆ Da testen er meget følsom, vil selv små mængder forurening af teststoffet med andre mutagene stoffer kunne påvises.
- ◆ Stoffer, som er toksiske, vil kunne slå nogle af bakterierne ihjel. Den frigjorte histidinmængde vil kunne give vækst af nogle af de overlevende ikke reverterede celler, hvilket kan tolkes som et positivt resultat. Toksiske stoffer vil oftest kunne afsløres, ved at baggrundsvæksten bliver "uhomogen".

Af ovenstående kan konkluderes, at standardtesten ikke altid er god nok til at påvise mutagene stoffer. Det er også nødvendigt at udnytte viden om stoffernes fysisk/kemiske og biologiske egenskaber til at tilrettelægge optimale forsøgsbetingelser.

### *Statistiske årsager*

Når resultaterne af en genotoksicitetstest skal vurderes, involverer dette også en statistisk analyse af testresultaterne.

Når det rent statistisk skal afgøres, om et stof er genotoksisk eller ej, handler det om at teste hypoteser, nul hypotesen ( $H_0$ ). Vha statistiske tests afgøres, om man vil betragte stoffet som genotoksisk (forkaste  $H_0$ ) eller som negativt i den pågældende test (accept af  $H_0$ ). Pga tilfældig variation vil der dog altid være en vis sandsynlighed for, at en falsk hypotese accepteres.

### Sensitivitet, specificitet og forudsigelsesværdi

Når man skal vurdere en tests værdi som screeningstest for en bestemt effekt, fx kræft, anvendes ofte begreber som sensitivitet, specificitet og forudsigelsesværdi. Disse begreber kan defineres som:

- ◆ Sensitivitet = procentdel positive i testen ud af alle "sandt positive" kemikalier.

- ◆ Specificitet = procentdel negative i testen ud af alle "sandt negative" kemikalier.
- ◆ Forudsigelsesværdi (predictive value) (positiv eller negativ) = procentdelen "sandt positiv" ("sandt negativ") ud af det totale antal positive (negative) i testen.

Af ovenstående definitioner fremgår, at værdierne afhænger af, hvad der defineres som "sandt positiv" og "sandt negativ".

Begreberne sensitivitet og specificitet anvendes oftest i relation til en korttids mutagentests evne til at forudsige carcinogeniteten af en ukendt kemisk forbindelse, og til at udvælge tests til testbatterier med høj sensitivitet og specificitet til screening for carcinogene stoffer.

Det primære formål med genotoksicitetstestning er at kunne forudsige, om et givent stof er genotoksisk i mennesker. Den sande positive mængde af sådanne kemiske stoffer kendes imidlertid ikke. Når en genotoksicitetstests sensitivitet og specificitet beregnes, sker dette derfor ofte i forhold til kendte carcinogene stoffer, påvist enten ved dyreforsøg eller ved epidemiologiske undersøgelser. Da det kun er få stoffer, som er vist at være humancarcinogener, er langt de fleste kendte carcinogene stoffer påvist ved dyreforsøg. Ved evaluering af genotoksicitetstests er der således tale om to korrelationer: mellem resultater fra mutagentests og dyreforsøg og mellem dyreforsøg og humanepidemiologiske undersøgelser.

Der er flere problemer forbundet med at anvende stoffer, der er påvist carcinogene i forsøgsdyr, som referencemængde for "sandt positiv" stoffer:

- ◆ De stoffer, som er påvist carcinogene i dyreforsøg, er kun en delmængde af den reelle sande mængde, og kræft er ikke den eneste sygdom, som kan forårsages af genotoksiske stoffer.
- ◆ Antallet af kendte carcinogener i forsøgsdyr vokser, efterhånden som flere stoffer testes i tilstrækkeligt velgennemførte dyreforsøg. Stoffer, som tidligere blev betragtet som falsk positive i mutagentests, kan ændre status til sandt positive.
- ◆ Der er ikke sikker viden om, i hvilket omfang stoffer, der er carcinogene i forsøgsdyr, også er det i mennesker, ligesom det heller ikke er sikkert, at et stof, som er negativt i forsøgsdyr, også er det i mennesker. Enkelte problemer ved denne korrelation er påpeget i de nedenstående afsnit.
- ◆ Da der anvendes forholdsvis få dyr, er dyreforsøg ikke så følsomme. Dyreforsøg er kun i stand til at afsløre en rimelig stor forøgelse af cancerraten i forhold til spontanraten.
- ◆ Kræft er en flertrinsproces, og pga forsøgsdesignet er carcinogenicitetstests i dyr sandsynligvis bedst til at påvise

fuldstændige carcinogener. Potente initiatorer, som er svage promotorer, er svage carcinogener i dyreforsøg. Fx giver initiatoren trans-4-acetylaminostilben kun brystkræft i rotter ved samtidig udsættelse for diethylstilboestrol.

- ◆ For at kompensere for de forholdsvis få dyr i en carcinogenicitetstest gives teststofferne i høje doser. Promotorer (ikke genotoksiske), som gives i høje doser i hele dyrets levetid, vil evt kunne fremme en kræftudvikling ved at øge celleproliferation af spontant initierede celler, eller DNA-skader kan opstå sekundært til øget cellevækst (manglende reparation af spontant initierede DNA-skader).
- ◆ En carcinogenicitetstest i dyr, hvor dyrene udsættes for et bestemt stof, svarer dårligt til den reelle situation for mennesker, som udsættes for en blanding af mange forskellige initiatorer og promotorer.
- ◆ Nogle carcinogener er såvel arts- som vævsspecifikke, dette gælder især for de non-genotoksiske carcinogener. Dyreforsøg er muligvis ikke gode nok til at vurdere kræft-risikoen for mennesker for denne type stoffer, da der vil være mulighed for såvel "falsk positive" som "falsk negative".
- ◆ Metabolismen er forskellig for nogle stoffer i forskellige dyrearter, hvilket også vil give mulighed for såvel "falsk positive" som "falsk negative".

Som et kuriosum kan nævnes, at forudsigelsesværdien af en musecancerstest i forhold til rotter kun er 64%, og for rotter i forhold til mus 69%. Hvis man formoder, at forudsigelsesværdien mellem gnavere og ikke-gnavere er af samme størrelsesorden som mellem mus og rotter, vil mange sande carcinogener blive tabt ved kun at teste i mus og rotter. Et stort antal "falsk positive" genotoksiske stoffer vil muligvis blive sandt positive, hvis man undersøger stoffer i flere dyrearter.

Det er derfor højst sandsynligt, at den viden, vi har i dag om kemisk carcinogenese, ikke giver os nogen sikkerhed for, at et genotoksisk stof, som ikke giver tumorer i gnavere, er mindre farligt for mennesker end et non-genotoksisk stof, som giver tumorer i forsøgsdyr, men kun ved massive doser.

# Målinger af genetiske skader i arbejdsmiljøet

## Metoder til genetisk monitorering

I løbet af de sidste ti år har opmærksomheden været rettet mod genetiske markører, dvs sporstoffer eller ændringer i blod, urin og væv, som kan angive, om der er mulighed for, at der er sket skader på det genetiske materiale. Individuelle faktorer som optagelse, omdannelse og udskillelse afspejles i de genetiske markører.

Målinger af genetiske markører, som er tegn på skader eller sygdom, gennemføres ved undersøgelser på celler eller væv med DNA. Typisk anvendes hvide blodceller, men hudceller og celler fra væv kan også anvendes. Der er ofte tale om såkaldt surrogatvæv, dvs væv, der ligner det væv, som den kritiske effekt kan ses i. Hvis denne måleaktivitet retter sig mod at påvise skader på eller anvender genetisk materiale, bruges betegnelsen genetisk monitorering.

Resultaterne af monitorering kan også give ny videnskabelig viden og bidrage til en kritisk vurdering af de metoder, man anvender.

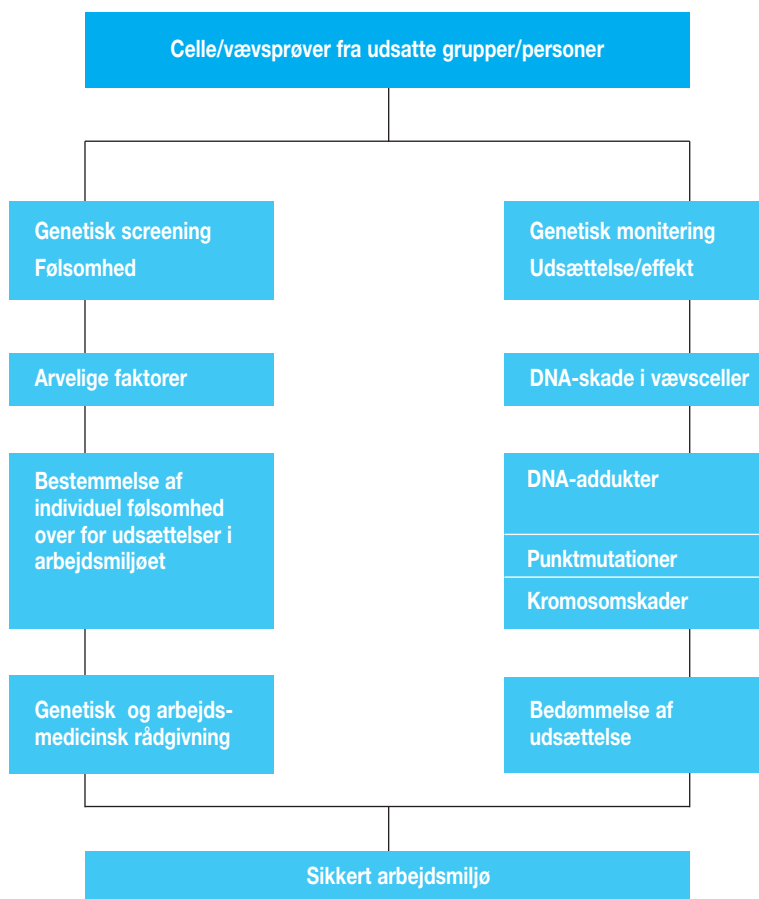
Genetisk monitorering har været gennemført i flere forskningsprojekter i Danmark (bl.a. vedrørende laboranter, sygeplejersker, opløsningsmiddel-udsatte, rustfrit stål-svejsere, væksthushgartnere, støberiarbejdere, korn- og foderstofarbejdere, buschauffører, postbude, DSB-ansatte; se litteraturlisten). Undersøgelsesresultaterne fra disse studier er anvendt til forbedring af arbejdsmiljøet og som dokumentation for nødvendigheden af en evt nedsættelse af grænseværdier. Resultaterne har ikke kunnet omsættes i en risikoanalyse for de enkelte deltagere i undersøgelsen. Tilrettelæggelsen af forskningsprojekterne har fulgt de retningslinier, som fastsættes af de regionale videnskabetiske komiteer.

Gentagne målinger af udsættelse for genotoksiske stoffer forekommer kun i meget få tilfælde, fx ved overvågning af kromosomafvigelse hos personer, der udsættes for radioaktivitet. Sådanne målinger bliver ikke foretaget i Danmark, men bl.a. i en række andre europæiske lande. Målingerne bruges til at kontrollere udsættelsen og overføre personer med skader over et vist niveau til andet arbejde.

### *Cytogenetiske tests for skader på kromosomer og DNA-reparation*

Skader på kromosomer, målt ved de såkaldte cytogenetiske tests,

Figur 1.14. Genetisk monitoring og genetisk screening i arbejdsmiljøet.



anses for at være prædiktive i forhold til udvikling af kræft og andre sygdomme, som illustreret i figur 1.1 og tabel 1.4, som viser eksempler på påvirkninger, der har givet øget antal skader i cytogenetiske tests og er mistænkt for at være kræftfremkaldende.

Som tidligere nævnt findes der tre forskellige metoder til cytogenetisk bestemmelse: kromosomafvigelse (CA), søsterkromatidudvekslinger (SCE) og mikrokerner (MN), som alle bygger på, at skader induceret i kromosomerne er synlige i celler fastholdt i delingsfasen (metafasen).

CA analyseres i metafaser fra 100-200 celler, som har været gennem to celledelinger og undersøges i mikroskop mhp bestemmelse af, om der er sket brud på kromosomerne, udvekslinger mellem kromosomerne eller ringdannelse, såkaldte struk-

Eksposering	Kromosomskade	Kræftisiko
Lægemidler		
Cytostatika	CA,SCE	Sekundære cancere
Paracetamol	CA	Under mistanke
Stråling		
Røntgen	CA	Hud m.m.
Radioaktivitet	CA	Hud, knoglemarv m.m.
Kemikalier		
Ethylenoxid	CA,SCE,MN	Leukæmi
Benzen	CA	Leukæmi
Arbejds miljø		
Svejsning	CA,SCE	Lunge
Forbrænding	CA	Lunge og blære
Trafik	CA	Lunge
Livsstil		
Tobaksrygning	CA,SCE	Lunge og blære
Alkohol	?	Lever
Aflatoxin		Lever

Tabel 1.4. Kendte sammenhænge mellem forhøjede frekvenser af kromosomskader og kræftisiko (IARC).

turelle kromosomændringer. Fig. 1.11 viser de forskellige typer af skader, som kan tælles i mikroskop. Almindeligst forekommende er gaps (ca 1%), typisk forhøjet ved rygning, mens brud og udvekslinger ses sjældnere. Dicentriske kromosomer er især sat i forbindelse med udsættelse for stråling. Typiske vesteuropæiske niveauer for kromosomskader er 0-5% celler med skader, mens der ved strålingsulykker som Tjernobyl og Hiroshima er set langt højere niveauer. Skaderne er permanente, hvis de rammer stamceller, men vil forsvinde fra blodceller i cirkulation i takt med disse cellers udskiftning. Der ses derfor et fald hos personer (og i eksperimentelle systemer) med tiden efter eksposeringen. Inden for de senere år er det blevet muligt med elektronisk hjælp at opsøge metafaser og bestemme, hvilke kromosomer der er skader i. Således er analysetiden nedsat betydeligt fra flere dage til timer, og nøjagtigheden er øget. Det er derfor i dag realistisk at gennemføre målinger fra flere personer om dagen. I valideringsstudiet af prædiktiv værdi af høj CA hos arbejdsmiljøeksponerede personer har høj CA sammenhæng med øget kræfthyppighed.

SCE måles også i celler, der er stoppet i metafasen efter to celledelinger. Før første celledeling er kromosomerne dyrket i et

medie med 5-Bromuracil, der inkorporeres i DNA og farver kromosomerne. Sker der overkrydsninger i 2. celledeling, som foregår uden 5-Bromuracil, vil dette vise sig i form af harlekinnønster i kromosomerne, idet kun halvdelen af kromosomet farves ved 2. celledeling. Øget SCE er sat i forbindelse med en række genotoksiske eksponeringer in vitro, men mekanismen bag SCE er uafklaret, hvorfor den anvendes sjældnere end CA. I valideringsstudiet af prædiktiv værdi af høj SCE hos arbejdsmiljøeksponerede personer har høj SCE ingen sammenhæng med øget kræfthyppeghed.

MN måles direkte i erythrocytter eller i lymfocytter, som har gennemgået celledeling. Der analyseres for små kromosomrester i cellerne (mikrokerner), hvis tilstedeværelse sættes i relation til genotoksiske påvirkning. I studier af befolkningsgrupper skal der tages hensyn til, at kvinder har højere niveauer af MN, sammenlignet med mænd.

### Prædiktivitet

For at gennemføre studier af den prædiktive værdi af de ovennævnte tre cytogenetiske tests gennemførte en nordisk arbejdsgruppe et studie af sammenhængen mellem høje værdier af endepunkter i de tre cytogenetiske tests og risiko for kræftudvikling. For at tage højde for analysevariationen mellem laboratorierne blev alle analyseværdier trikonomiseret i høj, middel og lav, og det blev i 1993 og 1997 analyseret, om der var højere kræfthyppeghed i gruppen med høj CA, gruppen med høj SCE og gruppen med høj MN. Kun for CA var der en sammenhæng mellem høj CA og øget kræfthyppeghed, som var statistisk signifikant både i 1993 og 1997. Fra 1995 blev den nordiske gruppe europæisk, idet en sammenlignelig italiensk studiepopulation indgik i studiet. Også for denne gruppe var risikoen størst ved høje CA-niveauer (se tabel 1.5).

CA-frekvens	Nordisk*			Italiensk#		
	Antal	SIR	95% CI	Antal	SMR	95%CI
Lav	23	0,78	0,50-1,18	15	0,83	0,46-1,37
Middel	22	0,81	0,52-1,25	20	1,16	0,71-1,80
Høj	46	1,53	1,13-2,05	29	2,01	1,35-2,89

CA frekvens: Lav, 1-33% percentil; Middel 33-66% percentil; Høj 67-100% percentil

\*Cancer morbiditet er udregnet på data fra 5.123 personer med 24.275 personår

#Cancer mortalitet er udregnet på data fra 1.573 personer med 19.552 personår

Tabel 1.5. Sammenhæng mellem niveau af kromosomafvigelse og risiko for kræft.

# Begrænsninger ved nuværende testsystemer/testprotokoller og fremtidige perspektiver

## Testsystemerne

Den store datamængde, såvel i genotoksicitetstests som i carcinogenicitetstests, og den efterhånden større viden om de molekylære mekanismer bag kræftudviklingen, peger på begrænsningerne i de genotoksicitetstests, der anvendes i dag. Dette skyldes bl.a., at kræft består af mange trin, hvor både genetiske og epigenetiske ændringer er vigtige, og disse processer er langt mere komplicerede end først antaget. Genotoksicitetstests kan ifølge sagens natur kun påvise genotoksiske carcinogener, og de epigenetiske carcinogener, som udgør en meget stor del af dyrecarcinogener, er med til at formindske sensitiviteten af genotoksicitetstests. Herudover involverer kræftudviklingen stort set alle tænkelige genetiske ændringer og ikke kun de få (oftest punktmutationer og kromosomafvigelse), som påvises i standard genotoksicitetstests. Fx burde tests til påvisning af genetiske ændringer som rekombination og genom-mutationer (aneuploidi) indgå i testbatterier til undersøgelse for genotoksisk effekt.

Der findes kun relativt få validerede tests til påvisning af rekombinogene effekter (fx *Saccharomyces cerevisiae* D7), mens der endnu ikke findes validerede tests til påvisning af genommutationer. Mikrokernetesten kan påvise nogle, men sandsynligvis ikke alle aneugene stoffer. En ny lovende teknik inden for dette område er en speciel teknik kaldet FISH (Fluorescens in situ hybridization). Vha specifikke fluorescerende prober er det muligt at identificere individuelle kromosomer i interfaseceller, hvorved ændringer i kromosomtal, fx aneuploidi, kan påvises. Teknikken er også anvendt til at identificere nogle rekombinogene hændelser som amplifikationer og translokationer. Det er også muligt at identificere dele af kromosomer, som stofferne især er aktive over for (bl.a. hot spots). Med denne teknik har det bl.a. været muligt at måle et aldersbetinget - og evt belastningsbetinget fald - i repetitive sekvenser på DNA-strengen.

Et væsentligt problem ved in vivo tests til påvisning af genetiske effekter i somatiske celler er, at de overvejende begrænser sig til påvisning af cytogenetiske effekter (fx CA, MN og SCE) i knoglemarven eller til påvisning af UDS i leveren. Dette udelukker muligheden for påvisning af effekter i andre organer (vævs-



specificitet), fx vil specielt reaktive kemiske forbindelser som alkylerende stoffer ikke nå knoglemarven i tilstrækkeligt høje koncentrationer til at udøve en effekt. Der er således et behov for guideline tests til påvisning af genotoksisk effekt i andre organer, fx lokale effekter i øvre mave-tarmkanal, på hud eller i åndedrætsorganer afhængigt af administrationsvejen for det pågældende kemikalie.

Der er ingen validerede metoder til påvisning af punktmutationer i somatiske celler *in vivo*.

Genetisk toksikologi er et område, som er under kraftig udvikling, og man må formode, at nyere og måske bedre tests vil blive føjet til listen over "guideline tests" inden for en overskuelig årrække, det gælder fx tests i transgene dyr og KOMET assay. Med disse tests er der åbnet mulighed for at påvise vævsspecifikke genotoksiske stoffer, ligesom tests i transgene dyr giver mulighed for påvisning af punktmutationer *in vivo*.

Der er endvidere udviklet transgene mus, som udtrykker skader i onkogenet H-ras. Der findes transgene mus, som er følsomme for p53 mutationer, og endelig er der udviklet musestammer, som er følsomme over for stoffer, som repareres med excisions-repair (XPA).

De tests, der oftest anvendes til at undersøge for genotoksisk effekt på kønsceller, er dominant letal test og mammal kønscelle cytogenetisk test. Disse tests påviser overvejende kromosomale effekter. Arvelig translokations-test og specifik lokus-test kræver så mange dyr, at testene ikke kan anvendes til rutinetestning. Der er derfor et behov for guideline tests til påvisning af genetiske effekter på kønscellerne (fx SCE, UDS eller DNA-addukter). Meget tyder dog på, at kønscellemutagener kan påvises som mutagener i somatisk celletest, og at stoffer, som ikke er mutagene i somatiske celler, heller ikke vil være det i kønsceller. Endnu ved man dog ikke, om der findes specifikke typer af mutagener (fx aneugener), som overvejende er aktive under kønscelledelingen (meiosen), der afviger fra celledelingen i somatiske celler (mitosen).

På *in vitro* området ser det ud til, at det i fremtiden vil være muligt at konstruere stammer specielt designet til bestemte, potentielt genotoksiske stofgrupper, hvorved der er åbnet mulighed for at studere metabolisme samt de molekylære mekanismer bag mutagenesen af disse stoffer.

Der findes ikke internationalt accepterede guidelines for test af stoffer for *non-mutagene epigenetiske effekter*.

En nordisk ekspertgruppe har udgivet en rapport herom, hvor det konstateres: Data om non-mutagene effekter i kræftprocessen er normalt ikke tilgængelige ved godkendelses- og registreringsprocedurer for kemikalier. Det er indlysende, at data om

non-mutagene stoffers carcinogene virkning får stigende betydning. Sådanne data er af særlig betydning ved regulering af stoffer med positivt carcinogent potentiale hos forsøgsdyr, men uden evidens for mutagen aktivitet. Tilstedeværelsen af den type af data vil lette evaluering og klassifikation af stoffer. Der er endvidere det problem, at den stigende effektive screening af mutagene stoffer udelukker disse af markedet, således at de carcinogener, som findes i miljø og arbejdsmiljø fremover, i stigende grad vil være de non-mutagene.

Rapporten peger på nogle typer af metoder, der vil kunne anvendes i vurdering af evidens for non-mutagen carcinogen aktivitet:

In vitro celletransformation, gap-junktion intercellulær kommunikation, tumorpromotion via protein phosphatase hæmmere, signal pathways som mulige mål for non-mutagene carcinogener, ændret genekspression i carcinogenese, betydningen af peroxisom proliferation og mitogenese.

## Testprotokoller

De gældende testprotokoller er ofte for stramme. Der burde åbnes større mulighed for at tage højde for de enkelte kemiske stoffers fysisk/kemiske egenskaber, fx opløselighed, flygtighed og pH-afhængighed, ligesom også viden om biologiske egenskaber som fx metabolisme og toksicitet burde indgå.

I de nyeste guidelines inden for lægemiddelområdet (fra 1996 og 1998) er antallet af standardtests i testbatteriet skåret ned fra 4 til 3 (jf afsnit om lovgivning). Til gengæld er teststrategien gjort mere fleksibel, idet der er åbnet mulighed for modifikationer af testprotokollerne, så der tages højde for stoffernes fysisk/kemiske og biologiske egenskaber. Desuden er der tilfælde, hvor der kan stilles krav om yderligere testning, fx hvis det drejer sig om et nyt lægemiddel med en ny kemisk struktur, hvis genetiske effekter man ikke kender.

## Lovgivning

Det er nu et krav, at alle nye kemikalier (fx lægemidler, industrikemikalier, tilsætningsstoffer til levnedsmidler, bekæmpelsesmidler og stoffer, der skal anvendes til plastemballage til levnedsmidler) skal undersøges i forskellige genotoksicitetstests, før de må anvendes. Forskellige teststrategier, hvori der indgår flere

genotoksicitetstests med forskellige genetiske endepunkter, er opstillet for disse stoffer.

Der er to principielt forskellige teststrategier:

- ◆ flertrinstestning
- ◆ testbatterier.

## Flertrinstestning

Denne teststrategi blev foreslået af Bridges i 1974 og er baseret på, at kravet til testning skal baseres på graden af human eksponering. Princippet i denne teststrategi er, at der udføres en indledende screening i in vitro tests, oftest bakterietests (Ames og/eller *E. coli*), og en test for kromosomaberrationer i mammale celler. Afhængigt af udfaldet i disse indledende tests og anvendelsesgraden af det pågældende kemikalie udføres yderligere testning in vitro eller in vivo. Der er en vis fleksibilitet i denne teststrategi, idet det ikke nøjagtigt foreskrives, hvilke tests der skal udføres på de enkelte trin. Princippet i denne teststrategi er at begrænse antallet af tests og antallet af dyr mest muligt. Flertrinstestning er specielt egnet til testning af et stort antal stoffer, fx nye industrikemikalier. Siden 1967 har der været krav om mærkning af kemiske stoffer, inkl. mutagener (EU direktiv 67/548/EEC). I den 6. ændring af direktivet (79/831/EEC) blev der indført en test- og notifikationsprocedure for nye stoffer markedsført i EU efter 18.9.1981. Den gældende teststrategi (18. ændring af EU direktiv 67/548/EEC) fremgår af omstående boks.

## Testbatterier

Batteristrategien anvendes til testning af lægemidler, pesticider, tilsætningsstoffer til fødevarer og til testning af stoffer, der skal anvendes til emballage beregnet til kontakt med levnedsmidler. Der anvendes et batteri af 3-4 tests, som alle skal udføres uafhængigt af resultatet i de øvrige tests.

Inden for lægemiddelområdet er der krav om mindst to in vitro tests på såvel bakterier som på mammale celler, samt en in vivo test:

- ◆ en test til gen- (punkt-) mutationer i bakterier
- ◆ en in vitro test for kromosomskader i mammale celler eller en in vitro mouse lymphoma tk test
- ◆ en in vivo test for kromosomal skade i bloddannende celler fra gnaver.

*CEC, 1993 Teststrategi*

A. Hvis et nyt kemikalie tænkes markedsført i en mængde på 0,1-1 ton pr år, skal der normalt udføres en bakterie mutagen test, medmindre stoffet er toksisk over for bakterier. I dette tilfælde udføres alternativ in vitro test. Hvis resultatet er positivt, udføres en in vivo test til påvisning af kromosomafvigelse, fx mikronukleus test.

B. Hvis stoffet markedsføres i en mængde på 1-10 tons pr år (niveau 0), udføres to tests ("basis sæt"): 1) En bakterie tilbagemutations test (*Salmonella typhimurium* eller *E. coli*) med og uden metabolisk aktivering og 2) en test for kromosomafvigelser i mammale celler in vitro med og uden metabolisk aktivering eller MN eller CA i knoglemarvsceller in vivo. Bakterietesten udføres før testning i mammale celler. Er testen negativ, udføres test for kromosomafvigelser (CA) i mammale celler, er testen positiv, udføres test for punktmutationer i mammale celler (fx muse lymfoma) eller alternativt både punktmutationer (hprt) og CA. Hvis testen(e) i mammale celler er positiv(e), skal der straks udføres testning i CA eller MN på knoglemarvsceller in vivo. Hvis sidstnævnte test(s) er negativ(e), kan in vivo testning dog udskydes afhængigt af graden af human eksponering (indtil 10 tons og kontrolleret anvendelse). Hvis stoffet er positivt i den første in vivo test, mærkes stoffet efter gældende regler. Hvis stoffet er negativt, men positivt i in vitro CA test, udføres yderligere in vivo test i et andet somatisk væv. Ved positivt udfald betragtes stoffet som et in vivo mutagen og mærkes herefter. Ved anvendelse på 100 tons og derover testes evt også for genotoksisk effekt på kønsceller.

C. Hvis stoffet anvendes i en mængde på mere end 100 tons pr år, kræves 4 tests: 1+2) to tests fra "basissættet", 3) test for punktmutationer i mammale celler og 4) CA test in vivo eller in vitro. Ved en anvendelse på 10-100 tons vurderes, om der bør kræves 4 tests.

D. Ved en anvendelse på mere end 1.000 tons pr år kræves langtids-dyreforsøg for carcinogen effekt.

## Arbejds miljø

Inden for arbejdsmiljø er der ikke nogen nedfældede krav til testing af stoffer, før de tages i anvendelse på arbejdspladserne. Men er stofferne nye på markedet, gælder reglerne fastsat for alle nye stoffer. Ved fastsættelse af grænseværdier inddrages viden om genotoksiske effekter både fra in vitro undersøgelser og genetiske monitoringsstudier. Skader på kromosomer har således været anvendt som argument for nedsættelse af grænseværdier for stoffer som benzen, styren, cytostatika samt ved svejsning i rustfrit stål.

## Litteratur

- Ashby J, Tennant RW. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutation Res.* 1991;257:229-306.
- Autrup H, Dragsted L. Overview of tumor promoters and test systems to identify promoters. *Nordisk Ministerråd Nord* 1987:25.
- Albertini RJ, Nicklas JA, O'Neill JP. Somatic cell gene mutations in humans: Biomarkers of genotoxicity. *Env Health Perspec* 1993;101 (Suppl 3):193-201.
- Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Mut Res* 1973;70:782-786.
- Ashby J, Paton D. The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures. *Mut Res* 1993;286:3-74.
- Binderup M-L. Kræftfremkaldende kemiske stoffers virkemåde. I: Adelhardt M, Binderup M-L, Sørensen K, Jensen J. Kræftfremkaldende stoffer og materialer. Del A. Arbejdstilsynet, 1989;11-16.
- Binderup ML. Mutagentests og deres anvendelse. Metronidazol og kobolt som eksempel. PhD-afhandling. Veterinær- og Fødevarerdirektoratet, 1999.
- Bohr VA, Evans MK, Fornace AJ. Biology of Disease. DNA-repair and its pathogenic implications. *Lab Invest* 1989;61:143-161.
- Bridges BA. Are somatic mutations involved in atherosclerosis. *Mut Res* 1987;182:301-302.
- Bridges BA. Genetic toxicology at the cross road - personal view on the deployment of short term tests for predicting carcinogenicity. *Mut Res* 1988; 205:25-31.

- CEC: A testing strategy for the assessment of the mutagenic potential of new substances. Commission of the European Communities (Document XI/449/91-rev5,1993).
- Dellarco VL, Mavournin KH, Tice R. Aneuploidy and health risk assessment: Current status and future directions. *Environ Mutagen* 1985;7:405-424.
- European Commission. Methods and testing strategies for evaluating the genotoxic properties of chemicals. Report EUR 15945. 1995.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C., 1995.
- Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Brøgger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C and the European study group on cytogenetic biomarkers and health. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: A report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH). *Cancer Res* 1998;58:4117-4121.
- Hauge JG. Hvordan gene virker. Grunntrekk i molekylær biologi. Engers boktrykkeri Otta, Norge. 1996.
- Hellman B. Introduktion til genetisk toksikologi. Et underlag för bedömning av kemikaliers genotoxicitet. Rapport fra kemikalieinspektionen 1988;11. Stockholm.
- Hemminki K, Sorsa M, Vainio H. Genetic risks caused by occupational chemicals. *Scand J Work Environ Health*. 1979;5:307-327.
- Husum B. Mutagenicity of inhalation anaesthetics studied by sister chromatid exchange in lymphocytes of patients and personnel (Thesis). Lægeforeningens Forlag, København 1987.
- ICH Guideline S2B: Genotoxicity: A standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals (CPMP/ICH174/95).
- IPCS: Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. *Environmental Health Criteria* 51, WHO 1995.
- Knudsen LE, Boisen T, Christensen JM, Jelnes JE, Jensen GE, Jensen JC, Lundgren K, Lundsteen C, Pedersen B, Wassermann K, Wilhardt P, Wulf HC, Zebitz U. Biomonitoring of genotoxic exposure among stainless steel welders. *Mutation Research* 1992; 279: 129-143.
- Knudsen LE. Vurdering af "unscheduled" DNA-syntese (UDS) i lymfocytter som mål for genotoksisk eksponering. Afprøvning og validering af udvalgt metode til biologisk måling af og screening for genotoksisk eksponering hos arbejdsmiljøudsatte. Ph.D.-afhandling. Arbejdsmiljøinstituttet, 1992.
- Knudsen LE, Sorsa M. Human biological monitoring of occupational genotoxic exposures. *Pharmacology and Toxicology Suppl* 1: 86-92, 1993.
- Knudsen LE, Norppa H, Gamborg MO, Nielsen PS, Okkels H, Soll-Johanning H, Raffn E, Järventaus H, Autrup H.

- Chromosomal aberrations induced by urban air pollution in humans: influence of DNA Repair and Polymorphisms of Glutathione S-transferase M1 and N-Acetyltransferase 2.
- Lander F. Pesticider og tidlige helbredseffekter. Arbejdsmiljøfondet. København, 1993.
- Lander F, Knudsen LE, Gamborg MO, Jarventaus H, Norrpa H. Chromosomal Aberrations in pesticide-exposed green house workers.
- Møller P, Wallin H, Knudsen LE. Comet metoden: En ny metode til hurtig påvisning af DNA-strengbrud. *Dansk Kemi* 1996;2:14-16.
- Nielsen T, Jørgensen HE, Larsen JC, Poulsen M. City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: Occurrence, sources and health effects. *Sci Tot Env* 1996; 189/190:41-49.
- Nordic study group on the health risk of Chromosome damage. A Nordic data base on somatic chromosome damage in humans. *Mutation Research* 1990;241: 325-337.
- Nordic Council of Ministers: Non-mutagenic carcinogens: mechanisms and test methods. *TemaNord* 1997:601.
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Introduction to the OECD Guidelines on genetic toxicology testing and guidance on the selection and application of assays.
- Olsen LS, Nielsen LR, Nexø BA, Wassermann K. Somatic mutation detection in human biomonitoring. *Pharmacology and Toxicology* 1996; 78:364-373.
- Ramel C, Cederberg H, Magnusson J, Vogen E, Natarajan AT, Mullender LH, Nivard JM, Parry JM, Leyson A, Comendador MA, Sierra LM, Ferreiro JA, Consuegra S. Somatic recombination, gene amplification and cancer. *Mut Res* 1996;353:85-107.
- Rasmussen K, Sabroe S, Wohlert M, Ingerslev HJ, Kappel B, Nielsen J. A genotoxic study of metal workers exposed to trichloroethylene. Sperm parameters and chromosome aberrations in lymphocytes. *Int Arch Occup Environ Health* 1988; 60: 419-423.
- Shelby MD. Human germ cell mutagens. *Environ Mol Mutagen* 1994;23:30-34.
- Venitt S, Crofton-Sleigh, Forster R. Bacterial mutation assays using reverser mutation. In press.
- Venitt S, Parry JM. Mutagenicity testing. A practical approach. IRL Press. Oxford, 1984.
- Wohlert M, Nielsen J, Johansson M. Cytogenetisk og arbejdsmedicinsk undersøgelse af 28 laboranter fra et forskningslaboratorium. *Ugeskr Læger* 1986; 148: 478-481.
- Wulf HC. Monitoring of genotoxic exposure of humans by the sister chromatid exchange test (Thesis). Lægeforeningens Forlag, København 1989.

## KAPITEL 2

# Kræft og kræft- fremkaldende stoffer

*Håkan Wallin  
Lisbeth E. Knudsen  
Ulla Vogel  
Peter Møller*



# Kræft og kræftfremkaldende stoffer

Kræft forårsaget af påvirkninger i arbejdet har været kendt i flere århundreder, og inden for de seneste årtier er der dokumenteret flere og flere eksempler på sammenhæng mellem udsættelse og kræftudvikling. Fx er der sammenhæng mellem udsættelse for opløsningsmidlet benzen, der findes i benzin, og leukæmi. Et andet eksempel er, at til trods for, at asbest har været forbudt en tid, ses der stadig en stigning i antallet af personer, der diagnosticeres med mesotheliom, lungehindekræft, forårsaget af asbestindånding. Personer, der arbejder eller opholder sig i trafikerede bymiljøer, udsættes i højere grad for forbrændingsprodukter fra biler, og der er stigende bekymring for, at disse personer har en forøget risiko for lungekræft.

Vi ved stadig mere om mekanismerne bag kræftudvikling, og metoderne til at detektere personers udsættelse for kræftfremkaldende stoffer raffineres. Der er en øget indsigt i personers forskellige følsomhed over for påvirkning af kræftfremkaldende stoffer. Den afhænger af genetiske faktorer, almen helbredstilstand, livsstil, alder og kost. Samfundets målsætning er at opnå bedst mulig beskyttelse mod arbejdsbetinget kræft, hvilket i praksis indebærer nul udsættelse for kræftfremkaldende påvirkninger. Dette er imidlertid ikke altid muligt, hvorfor der i praksis skal ske en vurdering af, hvilke niveauer for udsættelse der anses for acceptable. Der er derfor fastsat grænseværdier for nogle kræftfremkaldende stoffer, og der findes instrukser i Arbejdstilsynets bekendtgørelser for, hvordan mange kræftfremkaldende stoffer skal håndteres, og hvordan arbejdsprocesserne designes optimalt for at minimere udsættelse.

Internationalt arbejdes der på fælles anerkendelse af, hvilke stoffer der må anses for at være kræftfremkaldende. Det indebærer bl.a. vurdering af resultater fra dyreforsøg og epidemiologiske studier. Der arbejdes også på en fælles model for, hvorle-

des man kan skelne de mere potente kræftfremkaldende stoffer fra de mindre farlige stoffer.

I Danmark er foretaget flere opgørelser over arbejdsbetinget kræft, og erhverv som chauffører, kokke og kemisk arbejde er bl.a. sat i fokus. Der pågår studier af risikoen for aktuel udsættelse i flere berørte brancher, og disse studier prøver at inddrage markører for tidlig udsættelse for de kræftfremkaldende stoffer mhp en intervention over for skadelige påvirkninger. Hos buschauffører er der således fundet et øget niveau af DNA-skader, der kan være forårsaget af kræftfremkaldende stoffer, der findes i udstødning fra biler. Svejsere, der arbejder med rustfrit stål, er udsat for målbare koncentrationer af kræftfremkaldende metaller, og der er mistanke om, at trykkere ansat i den grafiske industri er udsat for kræftfremkaldende stoffer.

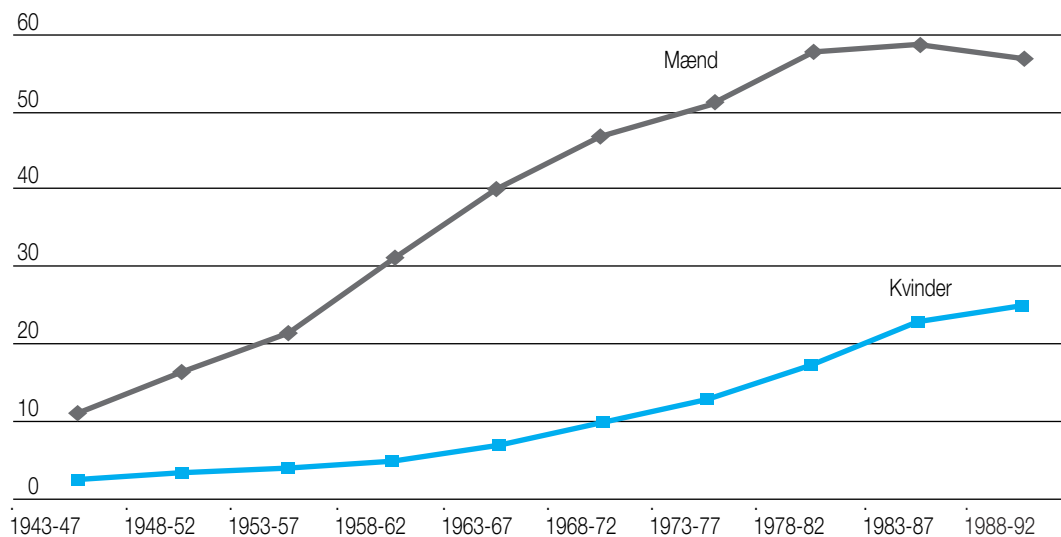
## Arbejds miljø kontra miljø

Kræft er den næsthyppigste dødsårsag i Danmark. Størstedelen af kræfttilfældene antages at være forårsaget af udsættelser for kemiske stoffer, komplekse blandinger, stråling og infektioner. Danmark har verdens ældste nationale register over kræfttilfælde i befolkningen. Hvis man studerer forekomsten af cancertilfælde fra 1943, da Cancerregistret blev etableret, ses, at forekomsten af en given kræftform kan ændres meget med tiden. Kun en del af variationen kan forklares ved bedre registrering og ændrede kliniske diagnoser og rutiner. Blandt de mest bemærkelsesværdige ændringer er en stærkt øget forekomst af lunge-, tyktarms- og brystkræft (fig. 2.1-2.3). Men der findes også nogle glædelige tendenser. Eksempelvis var mavekræft sandsynligvis den mest almindelige dødelige kræftform omkring år 1900. Siden da er forekomsten mindsket kraftigt, og mavekræft er i dag en ret sjælden kræftform (fig. 2.2).

Sammenligner man forskellige lande og kontinenter, ses en meget stor variation i forekomsten af forskellige kræftformer. Fx er leverkræft en af de mest almindelige dødelige kræftformer globalt set, men i den vestlige del af verden er denne kræftform relativt sjælden. Ved at undersøge forandringen i kræftforekomst hos befolkningsgrupper, der er emigreret til andre lande, kan man vise, at miljøfaktorer påvirker kræftforekomsten kraftigt. På basis af migrationsstudier og andre data har man beregnet, at 70-90% af alle kræfttilfælde kan forklares med miljøfaktorer. Man kender en del af de miljøfaktorer, der har øget forekomsten af kræft i den danske befolkning. Tobaksrygning kan fx forklare ca

## Lungekræft

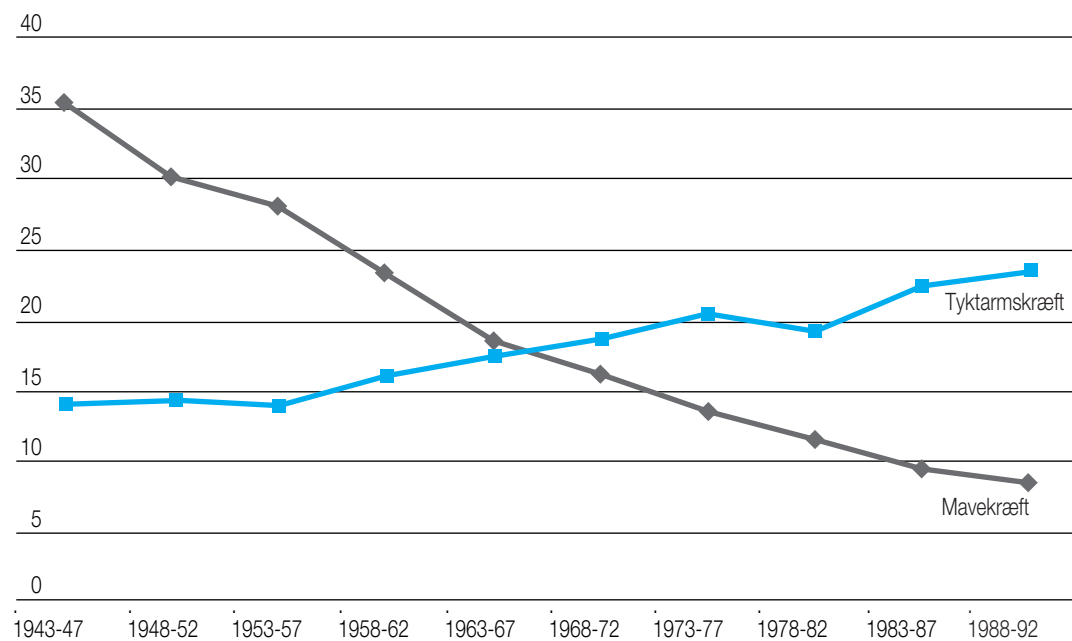
Tilfælde pr 100.000 pr år



Figur 2.1. Forekomst af lungekræft i Danmark siden 1943. (Ifølge HH Storm, Kræftens bekæmpelse, og "Cancer incidence in Denmark 1994", Sundhedsstatistikken 1997:7, Sundhedsstyrelsen, København 1997).

## Mave- og tyktarmskræft

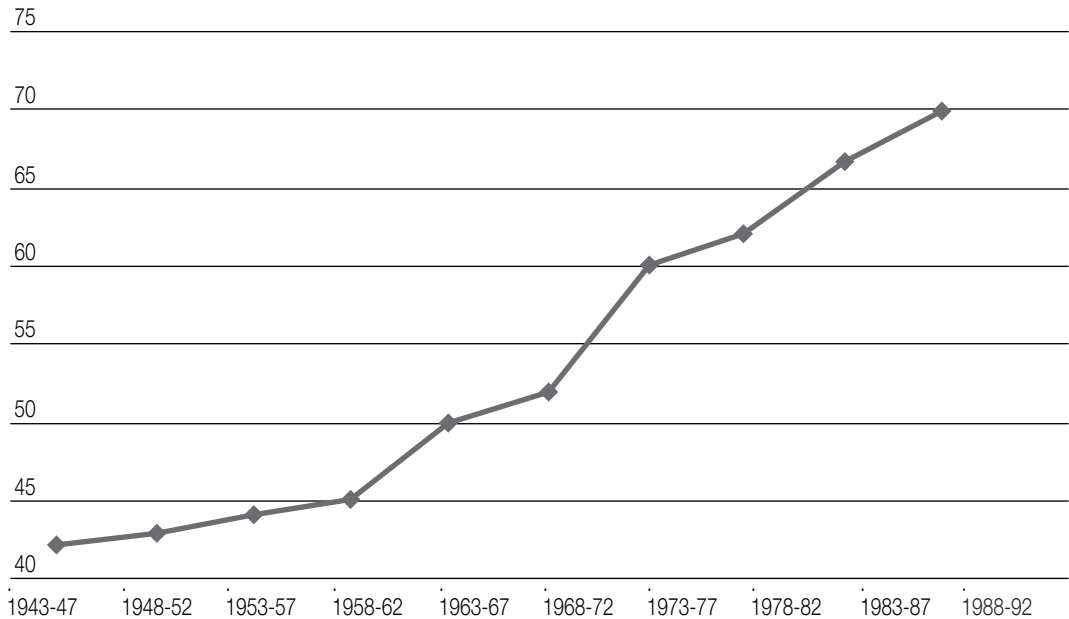
Tilfælde pr 100.000 pr år



Figur 2.2. Forekomst af mave- og tyktarmskræft i Danmark siden 1943. (Ifølge HH Storm, Kræftens bekæmpelse, og "Cancer incidence in Denmark 1994", Sundhedsstatistikken 1997:7, Sundhedsstyrelsen, København 1997).

## Brystkræft hos kvinder

Tilfælde pr 100.000 pr år



ni ud af ti tilfælde af lungekræft, og udsættelse for sollys kan forklare en stor andel af hudkræfttilfældene.

Danske studier har vist, at der er en betydelig variation i kræftforekomst mellem forskellige erhverv. Fx har faglærte arbejdere dobbelt så stor risiko for lungekræft som funktionærer, når man ser bort fra virkningen af tobaksrygning.

For nogle veldokumenterede påvirkninger er det muligt at beregne, hvilken betydning de har for kræft. Det er for nylig beregnet, at ca 2% af alle kræfttilfælde i Danmark skyldes eksponering for veldokumenterede påvirkninger i arbejdsmiljøet. Der findes dog mange mindre veldokumenterede påvirkninger, for hvilke der er usikkerhed om farligheden og størrelsen af eksponeringen. Det reelle antal arbejdsbetingede kræftlidelser må derfor antages at være større. Således beregner Arbejdstilsynet, at 4-5% af kræfttilfældene kan skyldes arbejdsmiljøpåvirkninger. Dette vil indebære, at 1.100-1.400 personer i Danmark om året rammes af kræft, der kan forklares med udsættelse for kræftfremkaldende stoffer i arbejdsmiljøet.

Kræfttilfælde, som mistænkes for at være arbejdsbetingede, skal anmeldes til Arbejdstilsynet og evt Arbejdsskadestyrelsen. Det totale antal kræfttilfælde, der er anmeldt til Arbejdstilsynet, har i perioden 1985-94 varieret mellem 164 og 275 tilfælde om året. Da reglerne foreskriver, at anmeldelse skal ske, når der er mistanke om, at sygdommen kan være arbejdsbetinget, kan man forestille sig, at der burde være en betydelig overrapportering. To danske undersøgelser fra de senere år tyder dog på en ca

Figur 2.3. Forekomst af brystkræft i Danmark siden 1943. (Ifølge HH Storm, Kræftens bekæmpelse, og "Cancer incidence in Denmark 1994", Sundhedsstatistikken 1997:7, Sundhedsstyrelsen, København 1997).

50% underrapportering af adenocarcinomer i næsehulen, der er meget stærkt associerede til eksponering for træstøv og for mesotheliomer, der oftest forekommer hos asbesteksponerede. For kræftformer, som har en svagere association til arbejdsseksponering, vil rapporteringen formodentlig være endnu dårligere. Det er beregnet, at 12% af lungekræfttilfældene i Norden ville kunne undgås, hvis farlige eksponeringer i arbejdet blev fjernet. Meget få af disse tilfælde er rapporterede som arbejdsbetinget kræft.

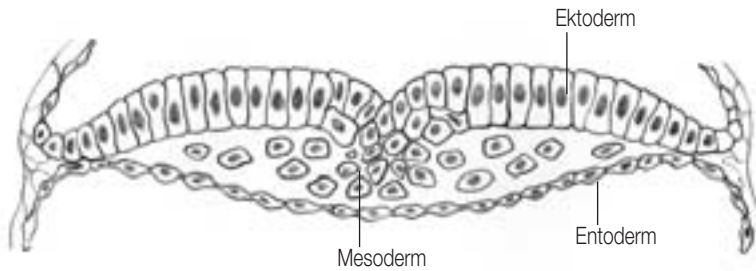
Man kan konkludere, at vi oftest ikke kender årsagen til, at man får kræft, og at vi stadig mangler viden om risikofaktorer for mange kræftformer. Den positive side af dette er, at hvis det er muligt at identificere disse risikofaktorer og reducere eller helt eliminere dem, vil dette have betydelige helbredsmæssige og samfundsøkonomiske konsekvenser.

## Mekanismer i kræftudvikling

### Definitioner og karakterisering af kræft

Cancer er det latinske ord for kræft, og carcinogenese betyder udvikling af kræft. Afgrænsede faste områder af kræftvækst kaldes tumorer, men dette ord omfatter ikke kun kræftvæv i strikt medicinsk terminologi. En tumor kan fx også være en vækst, der er forårsaget af infektion. Kræft kan også forekomme med uklar vævsafgrænsning, som fx ved leukæmi. Et klarere defineret synonym for kræft er neoplasi. En neoplasme er kendetegnet ved, at cellerne er ændret irreversibelt, og ved at cellevæksten i det store hele er autonom og fortsætter, efter at den stimulus, der forårsagede den, er borte. Neoplasier, der stammer fra muskel-, ben- eller bindevævsceller (celler fra det mesodermale kimcellelag), kaldes sarkomer (fig 2.4). Andre neoplasier (fra ekto- og endodermale kimcellelag) kaldes i regel carcinomer. Et adenocarcinom indeholder kirtelstrukturer.

Kræft er en sygdom, i hvilken en population af celler i et dyr eller menneske er ramt af irreversible genetiske forandringer i et eller flere af de systemer, der regulerer celledeling, differentiering, intercellulær koordinering eller genomisk integritet. Kræft karakteriseres ved ukontrolleret vækst af celler, der i varierende grad ligner de oprindelige celler (fig. 2.5). Flere forskellige genetiske forandringer er nødvendige for udvikling af kræft, og disse finder sted trinvis, i mange tilfælde sker kræftudviklingen over flere årtier. Til trods for, at der er en hurtig udvikling i vores

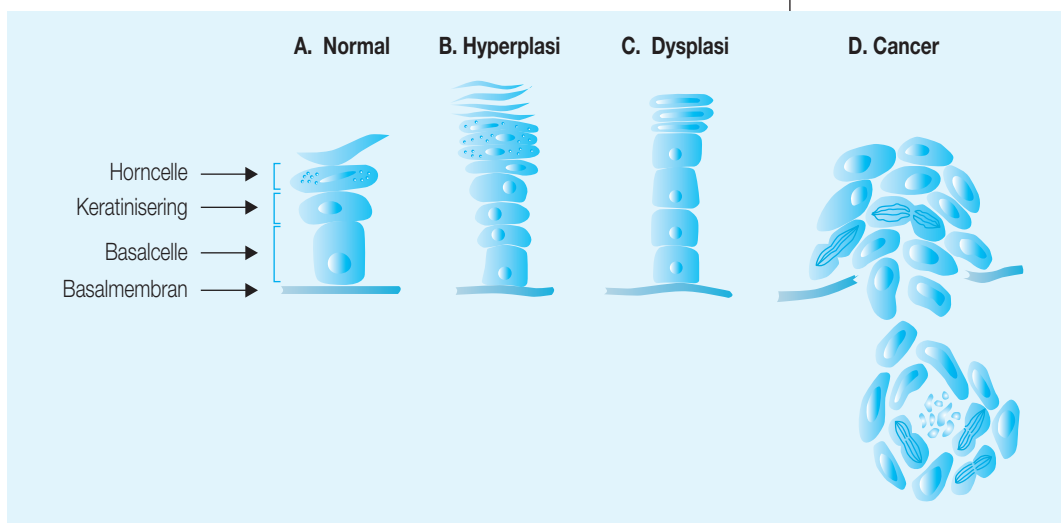


Figur 2.4. Seksten dage efter befrugtningen består det menneskelige embryo af tre cellelag. Alle organer i menneskekroppen har deres oprindelse i et af disse cellelag. Fra entodermen opstår mave-tarmkanalen og andre indre organer. Fra mesodermen stammer knogler, muskler, blodkar og bindevæv, og fra ektodermen stammer huden og nervesystemet. Carcinom er kræft, som opstår i organer, der stammer fra entoderm og ektoderm, og sarkom opstår i organer, der stammer fra det mesodermale cellelag.

viden om, hvad der adskiller kræftceller fra normale celler, er det vanskeligt at lave en simpel fysiologisk eller biokemisk definition af kræft. Man bruger derfor beskrivende definitioner. De basale biologiske egenskaber ved kræft er:

- ◆ øget celledelingshastighed i forhold til celler i det normale væv
- ◆ et progressivt tab af de specialiserede cellefunktioner, der findes i det oprindelige væv
- ◆ tab af den intercellulære koordinering, fx at celledeling ikke hæmmes ved kontakt til andre celler, eller at cellerne ikke mere reagerer på hormoner og vækstfaktorer
- ◆ at tumorcellen ved celledeling altid giver ophav til nye tumorceller.

Figur 2.5. Udvikling af kræft i hud. A: I normal overhud sidder stamcellerne pænt ordnede på basalmembranen, og celledelingen er afbalanceret mod afstødningen af keratiniserede hornceller. B: Hyperplasi er forøgelse af antallet af celler i vævet. C: Dysplasi er en forandring af størrelsen, formen og organisationen af cellerne i vævet. D: Ved kræft ses både hyperplasi og dysplasi, flere celler deler sig, de taber deres specialisering og hæmmes ikke ved kontakt med andre celler. Invasiv pladeepitelkræft vokser gennem basalcellemembranen ind i underhuden. (Modificeret fra: Arbeit JM, Transgenic models of epidermal neoplasia and multi-stage carcinogenesis, i: Ed. Leigh IM, Newton Bishop JA, Kripke, Skin Cancer, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, N.Y., USA, 1996, pp 7-35).



Hvor tydeligt disse karakteristika fremtræder, varierer fra kræftform til kræftform og kan ligeledes ændres under udviklingen af kræft. Fx varierer graden af bevarelse af vævsspecifik differentiering stærkt mellem forskellige tumorer, og der findes faktisk nogle enestående omstændigheder, hvor kræftceller kan restituere til tilsyneladende normalt væv.

Selvom øget cellevekst er et af kendetegnene ved kræft, varierer celledelingshastigheden mellem forskellige kræftformer, og der findes endda eksempler på tumorer, som vokser langsomt i flere årtier uden at forårsage helbredsmæssige problemer. Den øgede celledelingshastighed skyldes ikke en kortere doublingtid for de enkelte celler, men at en større andel af cellerne deler sig. Heri indgår et cellulært maskineri, der kan styre cellen til selvmord, apoptose, der kan udløses som resultat af signaler fra det omgivende væv eller ved omfattende genetisk skade. Mange data indikerer nu, at den styringsmekanisme, der initierer apoptose, er defekt ved kræft, og at dette er et vigtigt bidrag til tumorvækst.

Tumorceller afviger i varierende grad fra det normale væv. Godartede, benigne, tumorer er afgrænsede fra det omgivende væv, ofte med en bindevævshinde, og cellerne ligner som regel det normale væv og vokser langsomt. Ondartede, maligne, tumorer invaderer derimod det omgivende væv, de kan ofte metastasere (sprede sig) til andre væv, og cellerne er lavt differentierede og hurtigtvoksende. En ondartet tumor kan også defineres ved, at den vokser ubegrænset og til sidst dræber værten.

Et carcinogen (eller cancerogen) er et stof, stråling, virus etc, der øger forekomsten af kræft hos eksponerede mennesker eller dyr i forhold til en kontrolgruppe (tabel 2.1).

Tabel 2.1. Risikofaktorer for kræftudvikling. (Fra Vainio, 1993).

Kategori	Eksempel
Genetisk prædisponering	Xeroderma pigmentosum
Hormoner	Østrogener
Kemikalier	Benzen
Industriprocesser	Gummiindustri
Hormoner	Østrogenbehandling
Ioniserende stråling	Terapeutisk røntgenbehandling
Ikke-ioniserende stråling	UV-behandling
Virus	Hepatitis B virus
Livsstil	Tobaksrygning
Kost	Overdreven kalorieindtagelse
Medicinering	Cytostatika
Socio-økonomiske forhold	Lav socialklasse/arbejdsløshed

## Kemiske carcinogener - et historisk tilbageblik

Den første viden om kemiske carcinogener stammer fra arbejdspladser og erhverv, hvor der var daglig kontakt med kræftfremkaldende stoffer. En årsagssammenhæng mellem kræft og et specifikt stof blev beskrevet for første gang i 1775 af den engelske læge Percival Pott, der beskrev, at hudkræft i scrotum forekom hos en række mænd, der havde været skorstensfejere. Pott konkluderede, helt korrekt, at årsagen var eksponering for sod, og foreslog også forebyggende tiltag. Gennem det følgende århundrede blev industrielle eksponeringer, fx skæreolier og anilinfarver, peget på som årsag til forekomst af kræft blandt arbejdere.

I 1915 lykkedes det de to japanske forskere Yamagawa og Ichikawa at fremkalde hudkræft hos kaniner, der var blevet penslet med kultjære på huden. Dette var indledningen til eksperimenter, hvor blandinger af stoffer og enkelte stoffer kunne testes. Ved lignende dyreforsøg lykkedes det i 1930 engelske forskere at vise, at enkelte polyaromatiske kulbrinter, der findes i kultjære, var kræftfremkaldende. I midten af fyrrerne kendte man en række stoffer, der var kræftfremkaldende hos dyr. På dette tidspunkt eksisterede en lang række brogede teorier om, hvordan disse stoffer virker, og hvad stofferne havde fælles. På samme tid eksperimenterede ægtefællerne Miller ved McArdle Institute of Cancer Research i Wisconsin med et kræftfremkaldende farvestof, butter yellow. De fandt, at stoffet farvede leveren på rotter, og at stoffet var bundet irreversibelt i leveren. Det viste sig kort tid efter, at de fleste kræftfremkaldende stoffer skal metaboliseres af enzymer i kroppen, og at det er de dannede reaktive, elektrophile metabolitter, der binder sig til proteiner, DNA og andre makromolekyler.

Efter opdagelsen af, at arvematerialet er DNA, kunne man snart konkludere, at det kritiske mål for kemiske carcinogener var DNA-molekylet. Tidligt i dette århundrede udsatte forskere og læger sig for ioniserende stråling som egne forsøgspersoner, eller når de testede deres udstyr. Mange af disse udviklede siden hudkræft på hud, der havde været eksponeret. Dertil kom, at udstyret var dårligt afskærmet, og mange af de første røntgenlæger fik senere leukæmi. Begrebet mutation stammer fra den klassiske genetik, og her blev ioniserende stråling brugt tidligt til fremstilling af nye genetiske varianter. I 1960-70 sammenføjedes på elegant vis viden om genetik, strålingsbiologi, kliniske observationer og eksperimentelle studier af kræftfremkaldende stoffer og kræftfremkaldende virus til en helstøbt model.



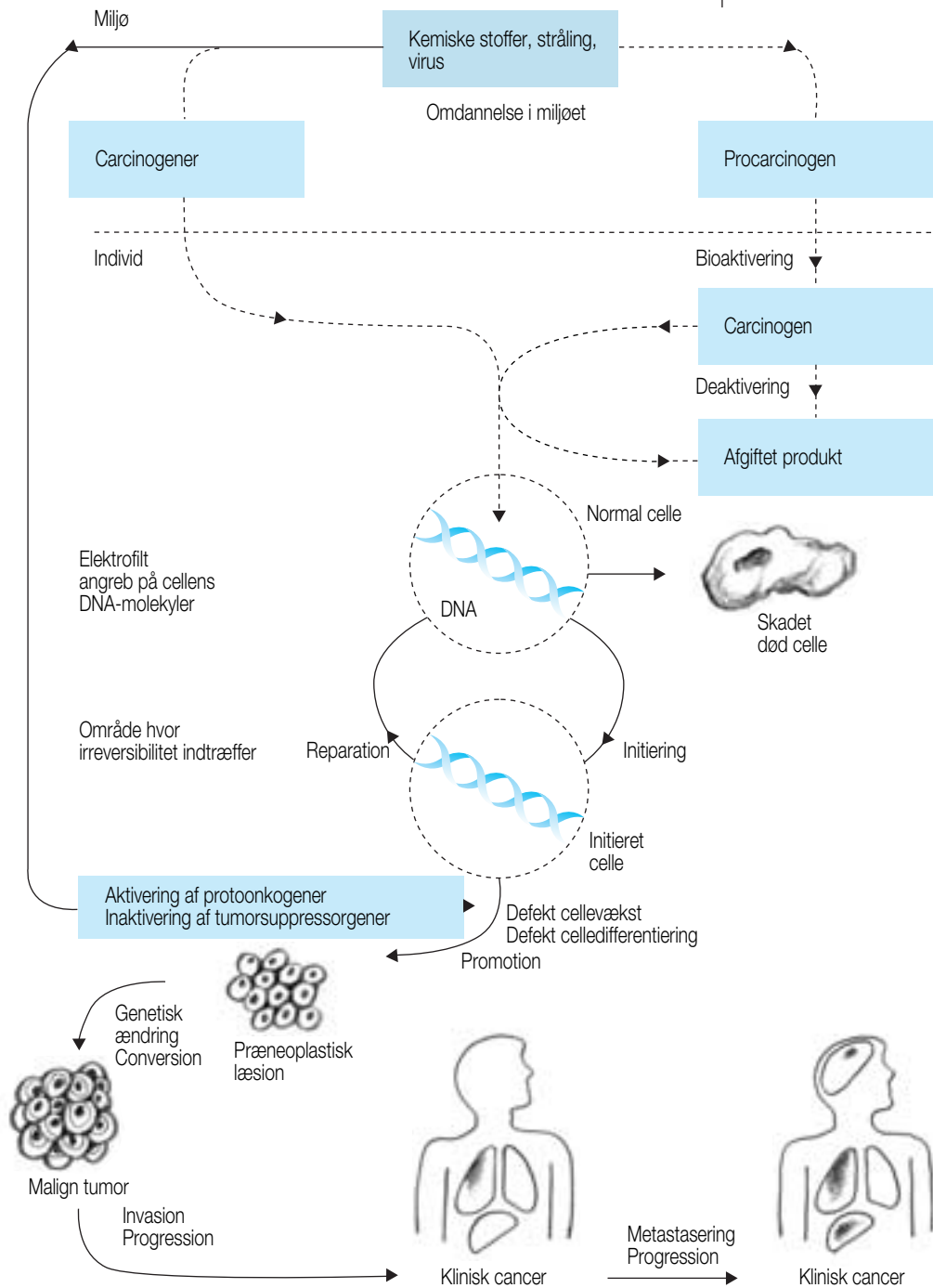
Tabel 2.2. Almindelige målorganer for velbeskrevne kræftfremkaldende stoffer. (Efter Vainio, 1993).

Målorgan	Carcinogener
Lunge	Asbest, arsen og arsenforbindelser, bis(chloromethyl)ether, chloromethylmethylether, Chrom (VI) forbindelser, sennepsgas Nikkelforbindelser Mineralfibre, fx asbest Tobaksrygning
Blære	4-aminobiphenyl, benzidin, chlornaphazine, cyclophosphamid, tobaksrygning
Bloddannende system	Benzen, chlorambucil, methyl.CCNU, cyclophosphamid, melphalan, myleran, ioniserende stråling
Hud	Arsen og arsenforbindelser, tjærestoffer, mineralolier, sod, UV-lys, ioniserende stråling
Lever	Alkoholholdige drikkevarer, aflatoxiner, hepatitis B og C virus, vinylchlorid

## Den genetiske model for carcinogenese

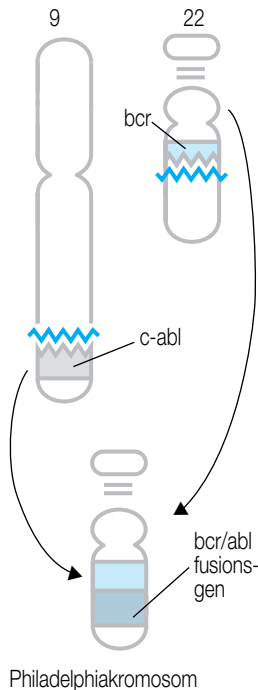
Udviklingen af en malign kræft sker ofte over flere identificerbare trin (fig. 2.6). Denne multitrinskarakter er i overensstemmelse med, at kræftudviklingen er et resultat af en række fænotypiske forandringer, der ofte kan henføres til genetiske forandringer, mutationer i kritiske kræftgener. De genetiske forandringer, der driver carcinogenesen, rammer kræftgener, der giver den forandrede celle vækstfordele. Onkogener er gener, der aktiveres, ved at deres proteinprodukter findes i højere koncentration eller i en mere aktiv form. Tumorsuppressorgener er gener, der bremser kræftudvikling, og ved mutation af dem minskes mængden af deres protein, eller der produceres inaktive proteiner. I nogle tilfælde er det rationelt at tale om andre kategorier af kræftgener, fx metastasegener, der bremser spredning af kræft. Nogle DNA-reparationsgener er så vigtige for at vedligeholde den genetiske kode, at inaktivering af disse ændrer mutationshastigheden i cellen dramatisk, hvilket hurtigt smitter af på kræftudviklingen. Vi vil her uddybe de forskellige trin i kræftudvikling: *initiering*, den proces der leder til dannelse af celler med mutationer, der disponerer til kræft, *promotion*, en specifik vækststimulering af de initierede celler, *progression*, der indebærer, at en godartet svulst bliver ondartet. Desuden vil vi diskutere betydningen af *toksicitet* og *immunosuppression*.

I 95% af alle tilfælde af kronisk myeloid leukæmi er der sket en ændring af to af kromosomerne i kræftcellerne, idet en del af kromosom 9 er blevet overført til kromosom 22. Denne forandring, kaldet et Philadelphia-kromosom, udgør et eksempel på de



Figur 2.6. Kræftudvikling er en flertrinsproces. (Omtegnet fra Holmberg et al., 1979 og Shields & Harris, 1991. Fra "Genetiske målinger i arbejdsmiljøet").

Figur 2.7. Philadelphia-kromosomet, der opstår ved en omlejring af kromosomerne 9 og 22, er almindeligt ved kronisk myeloid leukæmi.



kromosomale forandringer, der kan observeres ved kræftsygdomme. I fusionspunktet på Philadelphiakromosomet er genet *c-abl* fra kromosom 9 blevet sat sammen med genet *bcr* (fig. 2.7). De fejlagtigt forenede *c-abl* og *bcr* regioner danner et abnormt protein, der har en meget høj enzymaktivitet, og det abnorme protein påvirker reguleringen af cellevæksten. I dette eksempel er onkogenet *bcr/abl* blevet aktiveret ved overførsel af *c-abl* til en anden plads i genomet.

Man kender i dag ca et halvt hundrede onkogener. Mange af disse blev først identificeret i kræftfremkaldende virus. I disse virus kan den kræftfremkaldende effekt lokaliseres til et eller flere gener, og effekten kan overføres ved infektion. Disse onkogener fra virus har oftest stor lighed med lignende gener fra værtscellen, og man mener, at viruset under evolutionen har opsamlet en kopi af det normale gen fra værtscellen.

Fx er onkogenet *ras* identificeret som det virale gen, der forårsager sarkomer i rotter. Mennesket har tre homologe *ras*-gener, og i mange humane tumorer er et af de humane *ras*-gener aktiveret pga en punktmutation, dvs en ændring af en DNA-base til en anden. Punktmutationer opstår typisk, hvor DNA'et er blevet beskadiget af kræftfremkaldende stoffer eller stråling. Ras-proteinet er en central budbringer i en signalkæde, der overfører signaler, fx vækststimuli, fra receptorer på overfladen af cellen til cellekernen og DNA'et. Ras-proteinet eksisterer i to former, en aktiv og en inaktiv. Ved stimulering overgår det fra den inaktive form til den aktive. En mutation i en af tre aminosyrer i ras-proteinet ændrer det, således at proteinet er fanget i den aktive form, og cellen modtager således en konstant stimulation.

Tumorsuppressorgener er måske endnu vigtigere for udviklingen af kræft end onkogener. Disse genes proteinprodukter bremser kræftudviklingen. Hvis disse gener inaktiveres, så proteinet funktion forsvinder eller nedsættes, fremmer det kræftudvikling. Eftersom vi har to sæt kromosomer, kræves det, at begge kopier af tumorsuppressorgenerne inaktiveres. Man kender ca tyve tumorsuppressorgener, og mange af disse er associerede til sjældne arvelige dispositioner for kræft.

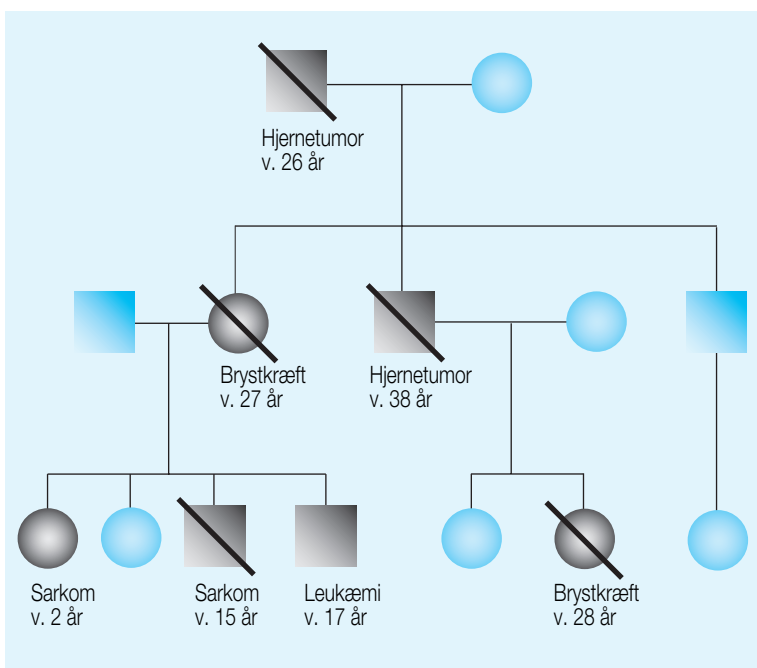
Et eksempel er *p53* tumorsuppressorgenet, som er muteret på det ene af de to kromosomer, i familier med Li-Fraumeni syndromet (fig. 2.8). Li-Fraumeni syndromet er en meget sjælden dominant arvelig prædisposition for sarkomer hos børn, brystkræft hos kvinder og flere andre kræftformer. Kræftforekomsten blandt disse børn er ca 100 gange forhøjet, og ved 60-års alderen har praktisk taget alle med Li-fraumeni syndromet udviklet kræft. Hos de fleste undersøgte personer med Li-Fraumeni syndromet har man fundet, at de har arvet en kopi af *p53* genet med en mutation, der har forandret en eller flere af de 393 aminosyrer i

p53 proteinet. Den anden kopi af p53 genet er derimod stadig intakt.

Vi akkumulerer mutationer i vore gener gennem hele livet, fordi vi udsættes for mutagene stoffer og stråling, men også fordi der kan opstå fejl under den normale celledeling. Vi har derfor tusindvis af inaktiverede tumorsuppressorgener i de forskellige celler i hele kroppen, men da vi har to kopier af tumorsuppressorgenerne, er sandsynligheden for, at begge kopier inaktiveres i én celle, meget lille. Hos personer, der har arvet en defekt og en funktionel kopi af et tumorsuppressorgen, kræves det kun, at den funktionelle kopi bliver inaktiveret i en enkelt celle, for at cellen udvikler sig til en tumor. Sandsynligheden for, at dette sker hos en person med Li-Fraumeni syndromet, er næsten 100%.

Mutationer i p53 genet optræder ikke kun i Li-Fraumeni syndromet. I ca halvdelen af tilfældene i de mest almindelige kræftformer er p53 genet muteret, såsom tarmkræft, lungekræft og brystkræft. Der er fundet mutationer i p53 i stort set alle kræftformer, og i dag er beskrevet ca 5.000 forskellige mutationer, der alle har inaktiveret p53 i humane tumorer. I disse tumorer er nok begge kopierne af genet *inaktiverede*.

I cellen virker p53 ved at regulere celledelingscyklus. Ved kunstigt at inaktivere p53 i mus har man etableret transgene muse-

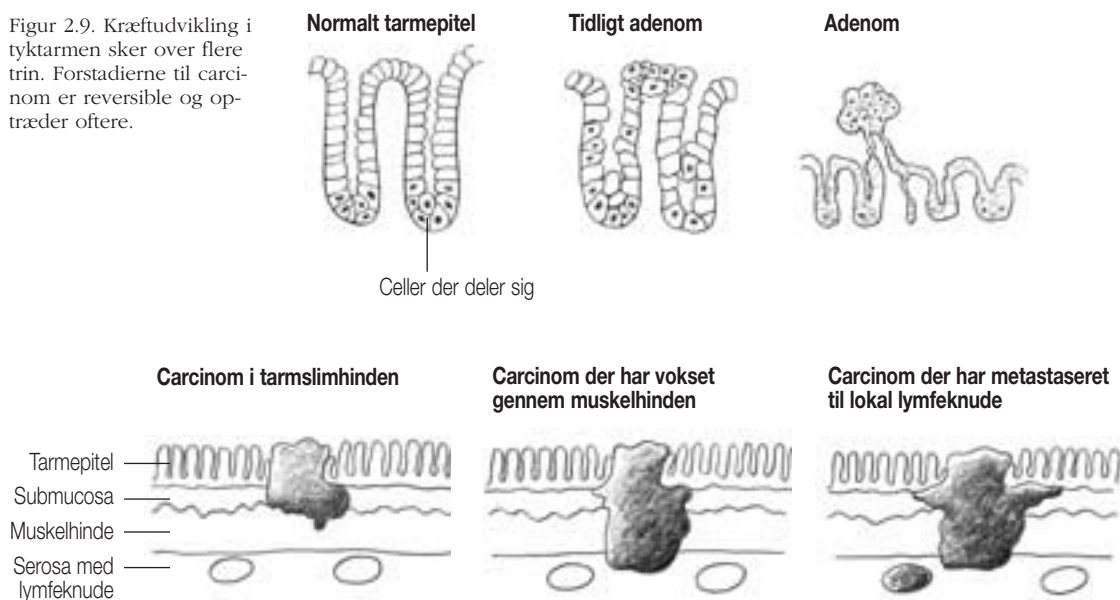


Figur 2.8. Nedarvning af prædisposition for kræft i en Li-Fraumeni familie gennem tre generationer. Personer, der var ramt af kræft, havde arvet et p53 gen med en mutation.

- Kvinde uden kræft
- Kvinde m. kræft
- / Kvinde m. kræft, død
- Mand uden kræft
- Mand m. kræft
- / Mand m. kræft, død

stammer, der mangler den ene eller begge kopier af p53 genen. Disse mus udvikler sig tilsyneladende normalt, men har en stor overhyppighed af tumorer. Til trods for, at p53 proteinet medvirker centralt i reguleringen af celledeling, har det tydeligvis ingen vital betydning for organismen, undtagen at forhindre tumorvækst. p53 kan derfor anses for prototypen for et tumorsuppressorgen.

Figur 2.9. Kræftudvikling i tyktarmen sker over flere trin. Forstadierne til carcinom er reversible og optræder oftere.



#### *Fearon-Vogelstein modellen*

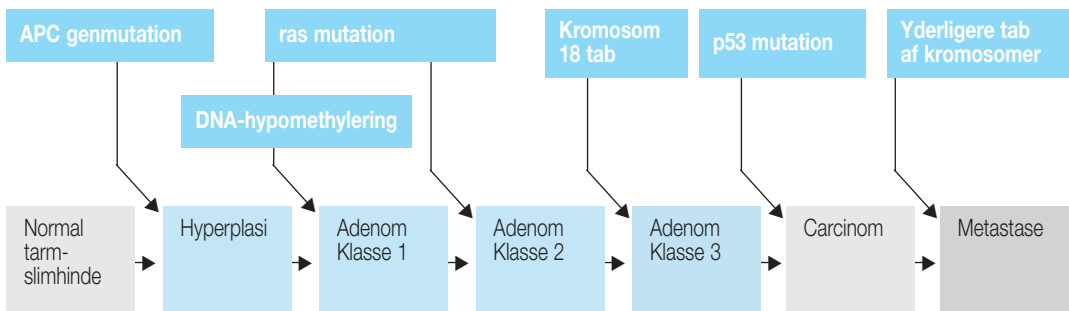
Tyktarmskræft er en af de kræftformer, hvor man kan iagttage en udvikling af det normale tarmepitel over flere forstadier til en fuldt udviklet ondartet kræft, der hurtigt metastaseres til lever og andre organer, og som har en dårlig overlevelsesprognose.

Denne udvikling sker over flere år, måske flere årtier. Det første trin anses for at være et hyperplastisk epitel, dvs et område i tarmen med øget celledeling (fig. 2.9). Disse områder omdannes til adenomer, små godartede polypper, der kan forsvinde igen.

Adenomet kan også udvikle sig, blive større og gradvis vise flere tegn på cancer. Den ondartede tyktarmskræft, et adenocarcinom, kan være ganske lille, og inden det er trængt igennem basalmembranen, kan et kirurgisk indgreb helbrede de fleste tilfælde.

Fearon og Vogelstein undersøgte kirurgiske præparater fra tyktarmstumorer i alle stadier og analyserede genetiske forandringer

i disse. De fandt, at mutationer akkumuleres gradvist over tid. Små adenomer har kun én eller få genetiske forandringer. De genetiske forandringer optræder oftest i samme rækkefølge, men der findes undtagelser. Et *ras*-gen, *K-ras*, bliver aktiveret ved mutationer halvvejs under kræftudviklingen, mens inaktivering af p53 genet ved mutationer oftest optræder sent i forløbet (fig. 2.10). Siden Fearon og Vogelsteins rapport er flere gener blevet identificeret. Nogle af dem muteres tidligt og andre sent i kræftudviklingen. I nogle få andre kræftformer kan man i dag også tegne et modsvarende billede over udviklingshistorie og den genetiske udvikling af kræft. For disse kræftformer finder dels nogle af de samme gener muteret, men man finder, at nogle gener kun muteres i nogle væv. I hudtumorer er p53 mutationer også meget almindelige, men i stedet for at optræde sent i udviklingen som ved tyktarmskræft, optræder mutationerne tidligt i udviklingen af hudkræft. Nogle gener, der findes muterede i tyktarmskræft, er aldrig muterede i hudkræft, og der er nogle gener, man kun finder muteret i hudkræft. Fearon-Vogelstein modellen har haft stor betydning ved at visualisere og sammenføje vores viden om kræft. Den forklarer delvis et længe eksisterende postulat, at kræft er en flertrinsproces betinget af flere hændelser, der øger sandsynligheden for, at cellen udvikles til kræft.

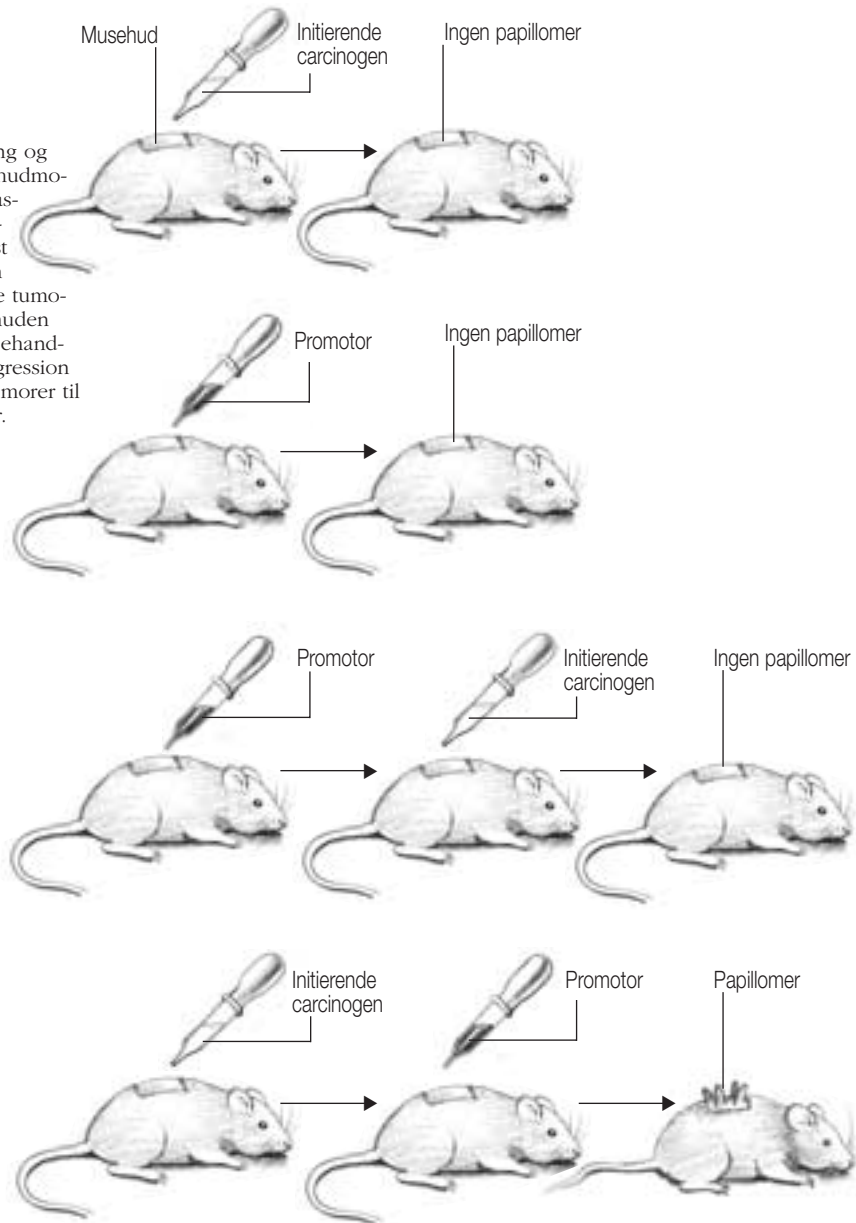


Figur 2.10. Mutationer i tumorsuppressorgener og onkogener under kræftudvikling i tyktarm. Disse forandringer optræder oftest i den viste sekvens, men rækkefølgen kan variere. (Modifieret fra Science 1989, 246, 1386-88).

## Initiering

Dyreforsøg i fyrrerne gjorde det klart, at to forskellige mekanismer, initiering og promotion, er involverede i kræftudviklingen (fig. 2.12). Begreberne initiering og promotion stammer fra observationer fra eksperimenter med dannelse af hudkræft hos

Figur 2.11. Initiering og promotion i musehudmodel. Kun ved at påsmøre det initierende carcinogen først og promotor siden udvikles godartede tumorer, papillomer, i huden hos mus. Fortsat behandling medfører progression af de godartede tumorer til ondartede tumorer.



mus, der udsættes for forskellige stoffer. Initiering var oprindeligt defineret ud fra, at musene var blevet penslet på huden med en dosis af et kræftfremkaldende stof, der var så lav, at den ikke forårsagede kræft hos musene. Musehuden betragtedes som værende initieret, fordi efterfølgende pensling med et andet stof, en promotor, der ikke i sig selv virker kræftfremkaldende, bevirkede stor forekomst af papillomer, en godartet form for hudkræft hos gnavere (fig. 2.11). Rækkefølgen, med hvilken de to typer

stoffer påføres huden, er meget vigtig, og ingen eller meget få tumorer dannes, hvis det promoverende stof pensles på musene før det initierende stof. Effekten af det initierede stof er irreversibel, da promotorer kan fremkalde hudkræft, selvom der går lang tid mellem behandling med initiator og promotor.

Stoffer, der virker initierende, reagerer med DNA og forandrer det kemisk. Det kan fx være kemiske stoffer, der binder sig til DNA, radioaktiv stråling, der kemisk forandrer DNA, eller virus, der kan integreres i DNA'et og forandrer reguleringen af omkringliggende gener eller permanent udtrykker virus-onkogenen. Vi udsættes hver dag for et meget stort antal af sådanne DNA-skader, og cellen har en række forsvarsmekanismer, der genkender og reparerer disse skader. Disse systemer er så væsentlige, at medfødte defekter i reparationssystemerne medfører en stærkt forøget risiko for kræft. På trods af DNA-reparationssystemerne vil der altid være tilfælde, hvor en DNA-skade ikke genkendes, eller hvor den repareres forkert, således at der opstår en mutation. Intitiering betyder altså, at der er opstået mutationer i kritiske gener. Dette har overført cellen til et stadium, hvor den potentielt kan udvikles til en kræftcelle ved yderligere stimuli.

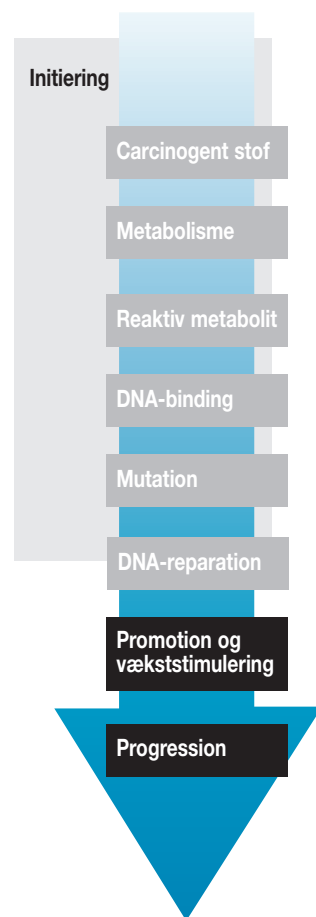
Langt de fleste af de kendte kræftfremkaldende stoffer kan ikke i sig selv reagere med DNA. De skal først omdannes til reaktive metabolitter i kroppen. De mange enzymer, der medvirker i dannelsen af reaktive metabolitter, er paradoksalt nok dem, der normalt nedbryder giftige fremmedstoffer. Disse enzymer findes i høje koncentrationer i lever og tarm, men også i varierende mængde i alle organer. Man betragter normalt aktiveringen af kræftfremkaldende stoffer som en del af initieringen, fordi det er dannelsen af reaktive metabolitter, der er central ved virkningen af mange kemiske carcinogener.

Ved risikobedømmelse af mutagene stoffer plejer man at antage, at der ikke er et tærskelniveau for stoffer, der er mutagene. Det indebærer, at der ikke eksisterer et niveau, under hvilket en eksponering er ufarlig. Dette baseres på, at et enkelt stofmolekyle i princippet er nok til at initiere én celle, og at én enkelt celle kan udvikles til kræft. Det er svært at bevise eksperimentelt, at denne antagelse er korrekt. Dette spørgsmål har dog stor betydning for afgørelser om grænseværdier og tolerabel risiko og har derfor været intensivt diskuteret i mange år.

## Promotion

Mens initiering kan forklares ved en klart afgrænset mekanisme (fig. 2.12), er promotion beskrevet ved de eksperimentelle karakteristika. Promotion defineres ofte som den proces, hvor

Figur 2.12. Flertrinnskræftudvikling.





initierede celler deler sig klonalt til synlig kræft. Med klonalt menes, at alle cellerne i en tumor er udviklet fra en enkelt initieret modercelle. Denne proces involverer en eller flere ikke-genetiske faktorer, der specifikt påvirker væksten af den initierede celle. Slutproduktet af promotion i den klassiske musehud-model er oftest godartet kræft. Promotion er også velundersøgt i lever hos gnave. Man har korreleret flere biokemiske og cellulære mekanismer til promotion. Fx mindsker mange promotor-stoffer den intercellulære kommunikationen via kanaler, der kaldes for gap junctions, og mange binder til protein kinase C og stimulerer ved denne signaloverførsel i cellen.

## Progression

Godartet kræft kan, ved en eller flere genetiske forandringer, overgå til ondartet kræft. Denne proces kaldes progression. Progression af kræft observeres ikke bare i dyreeksperimenter, men ses dagligt af de læger, der behandler kræft. En tumor, der gennemgår progression, viser øget vækst ind i det omkringliggende væv (invasion), spredning til andre organer (metastasi), en øget autonomi, ved fx at stimulere blodforsyning til tumoren eller ikke mere at reagere på hormoner, og viser en dårligere respons på kræftbehandling. Under progression akkumulerer cellerne yderligere mutationer i kræftgener, der opstår abnorme kromosomer, og ofte sker der store forandringer af både det totale antal kromosomer og antallet af enkelte kromosomer. Dette indikerer, at mutationer er afgørende for progression, og dette understøttes af, at progression kan fremkaldes i forsøgsdyr ved behandling med stoffer, der fremkalder mutationer.

## Immunosuppression

Kræft kan i nogle tilfælde være forårsaget af et nedsat immunforsvar. De tydeligste eksempler findes hos transplantationspatienter, hvis immunforsvar inaktiveres af immunosuppressiv medicin for at undgå afstødning af det nye organ. Non-Hodgkins lymfom optræder med ca 50 gange overhyppighed og meget kort inkubationstid hos især nyretransplantationspatienter, men også hos patienter, der har fået nyt hjerte, lever eller knoglemarv. Man har fundet ud af, at forekomsten af denne form hænger sammen med behandlingen af transplantationspatienter med immunosuppressiv medicin som azatioprin og cyclosporin.

Den usædvanligt korte latenstid, jævnført med andre kræftfremkaldende stoffer, ofte under 6 måneder, skyldes, at kræften

er forårsaget af en præeksisterende virusinfektion af patienten med Epstein-Barr virus. Infektionen har været holdt nede af patientens immunsystem og er først blevet reaktiveret, efter at patientens immunsystem er blevet svækket af den immunosuppressive medicin.

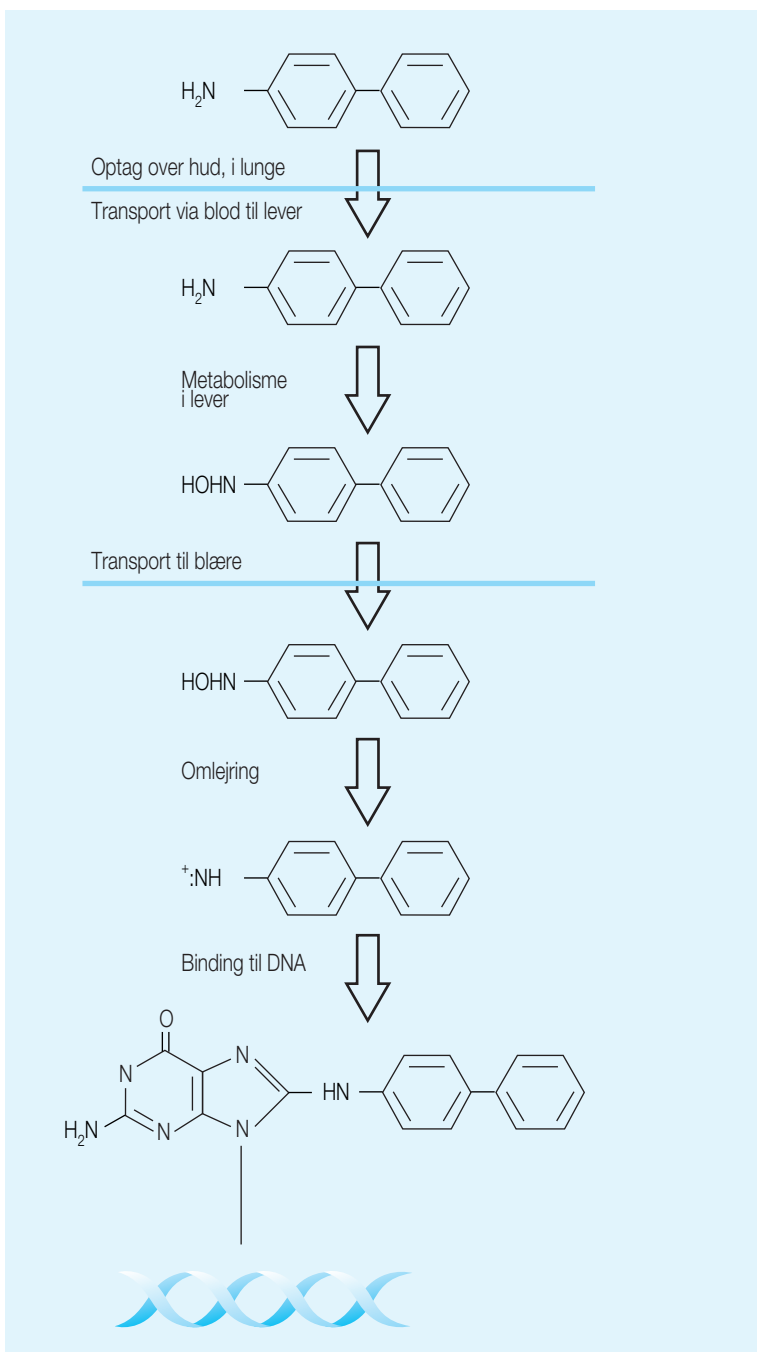
Man har også fundet en øget forekomst af hudkræft hos transplantationspatienter, og dette skyldes ligeledes en præeksisterende virus, i dette tilfælde human papillomavirus (HPV), der bryder ud, mens immunforsvaret er inaktiveret med immunosuppressiv medicin. Også andre virus-medierede kræftformer har en øget forekomst hos transplantationspatienter. Der er generelt fundet en overhyppighed af de virus-medierede kræftformer hos andre personer med nedsat immunforsvar, dvs personer, der er blevet behandlet med immunosuppressiv medicin af andre grunde, og hos personer med enten medfødte immundefekter eller med fx AIDS.

## Toksicitet

Kemiske forbindelser kan også virke kræftfremkaldende ved at fremkalde øget celledeling (virke mitogent). Mitogene stoffer virker ofte meget vævsspecifikt og er bedst beskrevet for levervæv, dels fordi mange fremmedstoffer omsættes og nedbrydes i leveren, der derfor er målorganet for stoffernes carcinogene virkning, og dels fordi leverceller regenereres naturligt, hvis en del af leveren fjernes operationelt eller ved celledød.

Mitogene stoffer kan virke carcinogene, fordi øget celledeling og dermed følgende øget DNA-syntese giver øget mutationsfrekvens. Dette skyldes, at DNA-reparationsmaskineriet har mindre tid mellem hver celledeling til at reparere de fejl i DNA-sekvensen, der opstår under DNA-replikation. Samspillet mellem øget celledeling og mutagene forbindelser bliver tydeligere, hvis et stof i lave doser kun virker mutagent, mens det i høje doser også inducerer øget celledeling. Et sådant stof vil, hvis det gives i høje doser, virke meget kræftfremkaldende, fordi de skader, der påføres DNA'et, ikke bliver repareret, mens den samme forbindelse givet i lave doser ikke virker kræftfremkaldende, fordi de påførte DNA-skader kan blive repareret igen i tide.

Hvis en kemisk forbindelse er giftig for cellerne (virker cytotoxisk) og derfor inducerer celledød, kan den ligeledes virke kræftfremkaldende, fordi det kan medføre regenerativ vækst. Dette sker især i leveren, hvor leveren også vil regenereres, hvis man operativt fjerner en del af leveren. Under regenerationen kan der ske mutationer, og den øgede celledeling kan især fremme vækst af præ-neoplastiske celler.



Figur 2.13. 4-aminobiphenyl blev brugt i store mængder ved gummifremstilling i USA i årene 1935-55. I begyndelsen af 1950'erne viste det sig, at 4-aminobiphenyl inducerer kræft i hunde og rotter. I 1955 blev man klar over, at ud af 171 arbejdere, der havde været i kontakt med 4-aminobiphenyl, havde 17 udviklet blærekræft. Dette lader til at have ledt til et hurtigt stop for produktionen i USA. Opfølgning af større grupper af arbejdere viste en meget stærk kobling af blærekræft hos eksponerede arbejdere. Stoffet findes også i tobaksrøg, og dette har sandsynligvis betydning for en øget risiko for blærekræft blandt rygere. 4-aminobiphenyl optages ved indånding eller absorberes hurtigt ved hudkontakt. Stoffet transporteres via blod og omdannes hovedsageligt i leveren. Omdannelsen, den metaboliske aktivering, sker ved cytochrom P450 enzymer i leveren. En betydelig del af 4-aminobiphenyl omdannes til 4-hydroxaminobiphenyl, der spontant kan omløjres til en yderst reaktiv forbindelse, som hurtigt reagerer med DNA. 4-hydroxaminobiphenyl er dog så stabil, at stoffet cirkulerer i hele kroppen. Det kan optages over blærevæggen, og udskillelse til urin og gentagen cirkulation af hydroxaminobiphenyl over blæreslimhinden gør, at stoffet virker ganske specifikt i blæren.

## Risikofaktorer og forebyggelse af kræft

Spektret af tiltag til forebyggelse af kræft kan opdeles i folkesundhedstiltag og klinisk forebyggelse. Grænsen mellem, hvad der er klinisk, og hvad der er folkesundhedstiltag, er dog flydende.

Med klinisk intervention forstås bestræbelser på at detektere kræft tidligt eller at detektere forstadier til kræft. Tidlig indsættelse af behandling har meget stor betydning for flere kræftformer. I Danmark gennemføres store befolkningsundersøgelser rettet mod tidlig diagnose af kræft og forstadier til kræft, fokuserede på livmoderhalskræft, tyktarmskræft og nogle andre kræftformer. Disse har som formål at observere forandringer i væv eller sigter mod at måle biokemiske forandringer i blod, afføring eller andre kropsvæsker.

For alle kræftformer findes en del patienter med unormalt mange slægtninge, som også har haft kræft. Mange gange skyldes dette genetisk prædisposition for kræft. I lighed med p53 mutationer i Li-Fraumeni familier kan disse prædispositioner ofte forklares med mutationer i onkogener og tumorsuppressorgener. Derfor udfoldes der store bestræbelser for at vurdere betydningen af at identificere de følsomme individer og for klinisk at følge dem for tidligt at detektere kræft. Fx er det muligt at detektere mutationer i tumorsuppressorgener hos individer i familier med genetisk prædisposition for brystkræft eller tyktarmskræft og forudsige, hvilke af dem der har øget risiko.

	Påvirkning	Arbejds miljø	Arbejd stager
Påvisning af fare for kræftpåvirkning	◆		
Grænseværdi-fastsættelse	◆	◆	◆
Substitution og forbud	◆	◆	
Teknisk kontrol		◆	
Personlig beskyttelse		◆	◆
Målinger i arbejdsmiljøet	◆	◆	
Måling i blod, urin eller andre biologiske materialer	◆		◆
Helbredsovervågning			◆
Medicinsk forebyggelse			◆
Medicinsk behandling			◆
Overvågning af sygdom			◆
Overvågning af udsættelse	◆	◆	◆
Tilsyn	◆	◆	◆
Uddannelse af arbejdsgiver og arbejdstager		◆	◆

Tabel 2.3. Forebyggelsesstrategier rettet mod kemikalier/påvirkning, arbejdsmiljø eller person. (Modifieret fra: Proposed national strategies for the prevention of labor related diseases and injuries, ASPH, NIOSH 1986).

Det fremstår tydeligt, at vores viden om risikofaktorer er ufuldstændig. En vigtig del i forebyggelse er derfor indhentning af mere viden om fare og risiko i forbindelse med miljøfaktorer. Kræft udvikles over lang tid, og mennesker kan eksponeres for kræftfarer i lave niveauer over flere årtier eller for meget høje niveauer i korte tidsperioder, i ekstreme tilfælde ved en enkelt eksponering. Dette giver store problemer med at identificere årsagssammenhæng, og som beskrevet nedenfor stoler vi derfor på en række forskellige metoder til at beskrive virkeligheden.

### Anekdotiske observationer

Viden om mange af de mest velkendte kræftfremkaldende udsættelser stammer fra anekdotiske observationer af ophobninger af kræfttilfælde blandt arbejdere eller andre eksponerede grupper. Disse observationer var ikke baserede på moderne videnskabelig metodik med krav om kontrolmetoder og statistisk verifikation. Det er dog vigtigt at lære af historien, at en nysgerig og vågen indstilling har haft, og stadig har, stor betydning for vores vidensbasis. Det er derfor ønskeligt, at læger, som kommer i kontakt med patienter med kræft, spørger om tidligere eksponeringer i arbejdet og i livet i almindelighed, og registrerer informationen i journalen. For at identificere følsomhed over for kræft er det også vigtigt, at kræft blandt slægtninge registreres i journalen.

### Epidemiologiske undersøgelser

Cancerepidemiologien har gennemgået en meget stærk udvikling i omfang og metodik de sidste tyve til tredive år og udgør en hjørnesten i vores forståelse af kræfttrisikable eksponeringer. Specielt i Danmark foregår cancerepidemiologisk forskning af meget høj kvalitet. Dette beror til dels på, at vi længe har haft en effektiv registrering af kræftforekomsten i befolkningen, at vi har meget gode muligheder for at bruge mange forskellige offentlige og private registre, og at befolkningen og virksomheder oftest er velvilligt indstillet over for at deltage i undersøgelser. Til trods for, at epidemiologien er meget vigtig for at forstå betydningen af mistænkte og kendte kræftfarer, mener mange dog, at den ikke har levet op til forventningerne om at identificere ukendte kræftfarer. Årsagerne ligger i vanskeligheder med at koble kræft i befolkningen til udsættelser lang tid tilbage, at definere de relevante tidsvinduer, at vurdere eksponering, samt at personer udsættes for mange eksponeringer samtidig fra miljø, kost og fritid.

Samspillet af faktorer bag ved kræftudvikling er ofte sammensat. I nogle tilfælde ved vi, at flere faktorer skal spille sammen i en bestemt rækkefølge. Flere faktorer i miljøet kan indgå i en interaktion, og undertiden kan kombinationer af udsættelser og individuel følsomhed samvirke. Når den biologiske mekanisme bag kræftudviklingen blot er en lille smule mere indviklet end en simpel årsags-virknings-sammenhæng, er epidemiologien ikke særligt effektiv.

## Dyreforsøg

Ved siden af epidemiologien har langtidsstudier af dyr været den anden vigtige hjørnesteen i beskrivelsen af stoffers kræftfremkaldende egenskaber. Rationalet for at gennemføre dyreforsøg er, at stoffer, der er kræftfarlige for mennesker, forårsager kræft hos dyr. Heldigvis er det oftest sådan. Stort set alle stoffer, der vides at forårsage kræft hos mennesker, er også kræftfremkaldende hos dyr, når de er undersøgt under tilfredsstillende betingelser. Sædvanligvis anvendes mus og rotter. Behandlingen med stoffet skal efterligne den relevante eksponering af mennesker, fx ved hudpåsmøring eller ved inhalation. Varigheden af studierne er normalt 1½-2 år for mus og 2 år for rotter - eller hele livet. Man bruger altid en ubehandlet kontrolgruppe, og ofte eksponeres i forskellige doser og med ca 50 dyr af hvert køn ved hver dosis. Der findes internationale standarder for gennemførelse af dyreforsøg, fx fastsat af OECD.

En ikke ubetydelig del af de testede nye stoffer på markedet er kræftfremkaldende. I det største forsøgsprogram, US National Toxicology Program (tidligere US National Cancer Institute Bioassay Testing program), har man evalueret over 400 stoffers kræftfremkaldende effekt i forsøgsdyr. Over halvdelen af disse stoffer var kræftfremkaldende. Blandt disse fandt man også, uventet, nogle kemikalier, der bliver produceret i meget store mængder.

Dette er foruroligende, eftersom (1) de fleste stoffer ikke er testet (2) eksponeringer for flere stoffer kan være både additive og multiplikative (3) det antages, at der ikke er nogen tærskelværdi, under hvilken de fleste kræftfremkaldende stoffer er uvirksomme.

Ved tolkning af dyreforsøg bliver man nødt til at tage hensyn til, at dyr og mennesker har forskellig følsomhed. Man kan her inddrage information om virkningsmekanismen, og om der findes viden om forskel mellem dyr og mennesker. Dyrene er oftest udsat for meget stor eksponering i forhold til mennesker, ofte eksponeres dyrene op til maksimalt tolererbar dosis. Ved bedømmelse af risikoen for mennesker bliver man nødt til at tage

stilling til, hvordan dosis/respons kurven ser ud i området under doserne, hvor dyrene var eksponerede. Som omtalt findes der grund til at antage, at initierende kræftfremkaldende stoffer ikke har en nedre tærskelværdi, under hvilken ingen effekt forventes. Ikke-genotoksiske stoffer antages derimod have en nedre grænse for carcinogenicitet, fordi der skal en vis dosis til for at få en mitogen eller cytotoxisk effekt af et stof. Varigheden af eksponeringen vil også være afgørende for, om et stof er kræftfremkaldende.

## Korttidstests

Dyreforsøg er meget kostbare, og det er ikke realistisk at tro, at mere end en meget lille del af alle de stoffer, vi omgås med, vil blive testet i langtids-dyreforsøg. Siden midten af 1970'erne er der udviklet en lang række in vitro og korttidstests, hvor stoffer kan testes - ikke for at fremkalde kræft, men for andre effekter, som er associerede til kræftudvikling. Fx er det muligt i laboratoriet at måle stoffers evne til at beskadige DNA, forårsage mutationer, inducere DNA-reparation eller danne kromosomskader. Dette kan foregå med enzymer og DNA, i bakterier, i isolerede pattedyrsceller, i dyr eller tilmed i celle- og vævsprøver fra mennesker. Det er også muligt at måle nogle tidlige kræftrelaterede forandringer i væv i forsøgsdyr, som optræder tidligere og hyppigere. Der findes også testsystemer for at teste promoverende stoffer. Der redegøres for kortidstestene i kapitlet om genotoksikologi.

## Struktur-aktivitetsrelationer

Blandt de kræftfremkaldende og mutagene stoffer findes grupper af stoffer med kemisk sammenlignelige strukturer. På basis af viden om, hvordan stofferne virker, kan man med varierende grad af præcision forudsige, hvordan stoffer med en lignende struktur kan virke. Man kan også med hjælp af computer mere systematisk analysere forhold mellem kemiske strukturer og deres biologiske aktivitet, og lade en computer konstruere algoritmer for struktur-aktivitetsrelationer. Med disse algoritmer kan man forudsige kemiske stoffers kræftfremkaldende effekt. Dette fungerer også med varierende præcision, afhængigt af stofgruppe.

## Kemoprævention

Vi kender et stort antal stoffer og fødevarer, der mindsker forekomsten af kræft hos dyr og mennesker. Fx er der stor bevisbyr-

de for, at indtagelse af grønsager og frugt mindsker forekomsten af mange kræftformer. Med kemoprævention menes indtagelse af stoffer, fx vitaminer, for at forebygge sygdom. Der er stor international aktivitet mht forskning inden for dette område, og en lang række enkeltstoffer, blandinger og fødevarer testes i kontrollerede epidemiologiske studier for at undersøge, om de mindsker kræftforekomst og dødelighed.

## Information om risikofaktorer

Kommunikation om risikofaktorer til befolkningen og uddannelse er centrale i forbyggelsesarbejdet. For risikofaktorer i arbejdslivet findes procedurer for risikokommunikation. Responserne på arbejdspladserne er oftest meget god og leder til effektiv reduktion af farlige eksponeringer. For risikofaktorer i føden, tobaksrygning eller andre såkaldte livsstilsfaktorer kan det diskuteres, hvor stort gennemslag information har. Der er en vis skepsis i befolkningen over for "kræftalarm", idet der har været mange tilfælde heraf i løbet af 70'erne og 80'erne. Dette kan være et problem, når man vil fange befolkningens opmærksomhed.

## Danske regler for omgang med carcinogener

Mange lande regulerer brugen af kræftfremkaldende stoffer. I Danmark udgiver Arbejdstilsynet en liste over stoffer, der anses for at være kræftfremkaldende. På denne liste er optaget stoffer, der af EU og WHO's kræftforskningscenter (International Agency for Research on Cancer, IARC) anses for at være kræftfremkaldende hos mennesker. Nogle stoffer er optaget på listen efter den af Arbejdstilsynet tilknyttede varslingsprocedure. I 1996 var der ca 500 stoffer på listen.

I Arbejdstilsynets bekendtgørelser findes der anvisninger om foranstaltninger til forebyggelse af kræfttrisikoen ved arbejde med kræftfremkaldende stoffer og materialer, og i Miljøministeriets bekendtgørelser findes der instruktioner om klassificering, emballering, mærkning, salg og opbevaring af kræftfremkaldende stoffer og produkter.

Listning af stoffer som kræftfremkaldende er i mange tilfælde en meget effektiv måde at undgå eksponering på. Disse stoffer



skal mærkes som kræftfremkaldende, og dette har en stor psykologisk effekt på dem, der håndterer stoffet. Der også krav om, at stoffet om muligt skal erstattes med et mindre farligt stof. Ofte leder listning til restriktioner for, hvordan stoffet håndteres, og i sidste ende kan håndtering af stoffer forbydes. I sådanne tilfælde, hvor der findes erstatningsstoffer, er det ofte rimeligt enkelt at beskytte arbejderne. I andre tilfælde, fx for asbest, har listningen indebåret store samfundsomkostninger, idet der fulgte strenge krav til håndteringen af asbest. Der er også en bekymring over, at listning af et stof kan lede til, at et stof erstattes med et andet farligt stof, der bare ikke er så godt undersøgt.

## IARC-listen

Ligesom mange andre lande læner Danmark sig stærkt op ad vurderinger foretaget af internationale institutioner vedr. bedømmelsen af kræftfare.

IARC giver ikke anbefalinger mht regulering, men udgiver monografier med dokumentation til brug for bl.a. nationale og internationale myndigheders risikovurdering og lovgivning vedr. kræfttrisci i arbejdsmiljø, ydre miljø m.m. IARC har evalueret over 800 stoffer og inddeler dem i 5 grupper:

1. Stoffer, der er kræftfremkaldende hos mennesker.
- 2A. Stoffer, der sandsynligvis er kræftfremkaldende hos mennesker.
- 2B. Stoffer, der muligvis er kræftfremkaldende hos mennesker.
3. Stoffer, der ikke er klassificerbare mht kræftfremkaldende effekt hos mennesker.
4. Stoffer, der sandsynligvis *ikke* er kræftfremkaldende hos mennesker.

IARC klassificerer løbende stoffer for evidens for kræftfremkaldende effekt. Kriterierne for, at et stof er kræftfremkaldende, bygger udelukkende på evidens:

“1” Stoffet tilhører gruppe 1, hvor der er tilstrækkeligt datagrundlag for carcinogenitet hos mennesker ved epidemiologiske undersøgelser med klar årsagssammenhæng. Skævhed i undersøgelsesmateriale, forvekslinger og tilfældigheder er udelukket. Ofte er der flere uafhængige undersøgelser, som viser sammenhængen. I nogle tilfælde har en reduktion af udsættelsen medført en formindsket kræfthyppighed.

“2” Stoffet tilhører gruppe 2, som er sandsynlige carcinogener i mennesker. For specielt gruppe “2A” er der i det mindste begrænset datagrundlag for carcinogenitet i mennesker. Dette indebærer, at en årsagsammenhæng er sandsynlig, men at alternative forklaringer ikke helt er udelukket. Kombination af tilstrækkeligt datagrundlag i laboratoriedyr og utilstrækkelige data i mennesker betyder sædvanligvis klassificering i gruppe “2B”.  
Utilstrækkelige data betyder

- ◆ at der enten er for få relevante data, eller
- ◆ at de foreliggende undersøgelser, som viser en mulig sammenhæng, ikke udelukker andre forklaringer, eller
- ◆ at undersøgelserne ikke viser tegn på carcinogenitet.

“3” Stoffet tilhører gruppe 3, som er stoffer, stofgrupper og industriprocesser samt erhvervsmæssig udsættelse, som ikke kan klassificeres mht carcinogenitet hos mennesker, bl.a. pga mangel på data. I nogle tilfælde er stoffer overført fra gruppe 3 til 2B eller fra gruppe 2B til 2A pga effekter i kortidstests.

Dette betyder

- ◆ at de data, der tyder på en carcinogen effekt, kun omfatter en enkelt dyreart, dyrestamme eller eksperiment, eller
- ◆ at der ved eksperimentet er anvendt utilstrækkelige dosis-niveauer, utilstrækkelig eksponeringstid eller opfølgningsperiode, eller et utilstrækkeligt antal dyr. Desuden kan dyrene have en for ringe overlevelse, eller rapporteringen kan være mangelfuld, eller
- ◆ at de typer svulster, der optræder, ofte forekommer spontant i dyrestammen og ikke i alle tilfælde kan klassificeres som ondartede på baggrund af histologiske kriterier.

“4” stoffer, for hvilke der er tilstrækkeligt datagrundlag for fravær af carcinogenitet i laboratoriedyr. Dette betyder,

- ◆ at der ikke er påvist en forøget hyppighed af ondartede tumorer, og
- ◆ at der ikke findes data, der antyder en kræftfremkaldende effekt hos mennesker, og
- ◆ at dyreforsøg entydigt viser fravær af kræftfremkaldende effekt, og
- ◆ at dette er stærkt og entydigt understøttet af en lang række andre data.

Som følge af, at IARC tidligt begyndte med sine bedømmelser, og pga de strikte videnskabelige kriterier og procedurer er IARC-bedømmelser meget respekterede, og IARC har etableret sig som en ledende international autoritet inden for bedømmelsen af fareidentificering for carcinogener. Til forskel fra regerin-

ger tager IARC heller ikke ind sin bedømmelse, hvorvidt der eksisterer eksponeringer for mennesker, og hvilken risiko disse eksponeringer indebærer. I tabel 2.4 er en liste over de stoffer og eksponeringer, som IARC i begyndelsen af 1997 klassificerede som humancarcinogener (gruppe 1). Det bør fremhæves, at disse er kun de stoffer og eksponeringer, hvor der findes tydelige data på, at de har forårsaget kræft hos en gruppe mennesker. At stoffer ikke står i gruppe 1, indebærer ikke i sig selv, at de er mindre potente humancarcinogener, eller at der ikke findes betydningsfuld eksponering af mennesker.

Det er tankevækkende at se nærmere på denne liste. Hvis man ser på, hvilke eksponeringsscenerier der ligger til grund eller havde størst betydning for, at et stof bedømmes som værende humancarcinogent, finder man, at ca halvdelen (39/74) af eksponeringerne fandt sted i arbejdsmiljøet. Her finder man klassiske carcinogener som asbest, sod, tjærestoffer og aromatiske aminer. Der findes også dårligt kortlagte eksponeringer i forbindelse med fremstilling og reparation af fodtøj og fremstilling af aluminium og møbler. Andre eksempler er ansættelse i gummiindustrien eller som maler.

Næsten en fjerdedel (19/74) af stofferne er medicin eller behandlingsformer. De fleste af stofferne falder inden for to grupper. Den ene gruppe er cytostatika, der bruges til behandling af kræft, og den anden er immunosuppressive stoffer, der primært anvendes ved organtransplantation. Disse bruges altså i behandlingen af livstruende sygdomme, og kræfttrisikoen er kendt og afvejet mod de terapeutiske fordele. I gruppe 1 findes også en række hormoner og hormonlignende stoffer. Det hænger sammen med, at specielt østrogenbehandlinger, som tidligere har været meget brugt, gav en noget forhøjet risiko for kræft. Dette kan måske siges helt eller delvis at opvejes af, at disse behandlinger minskede risikoen for kræft i andre organer.

Ni af eksponeringerne er infektioner med virus, bakterier eller parasitter. Her kan nævnes infektion med bakterien *Helicobacter pylori*, der blev opdaget for få år siden, og som er vist at være den måske vigtigste risikofaktor for mavekræft. Humant papilloma virus har også for kort tid siden vist sig at være den vigtigste årsag til livmoderhalskræft (cervixcancer) hos kvinder. Andre væsentlige virus er hepatitis virus C og D, der er vigtigste årsager til leverkræft.

De få resterende eksponeringer er ting, vi spiser, eller som vi ofte selv vælger at udsætte os for, det vi kalder for livsstilsfaktorer. Det er fx alkohol, tobaksprodukter og sollys. Kun nogle få carcinogener findes eller forekommer væsentligt i madvarer. Det ene af disse er aflatoksiner, der globalt set er et af de vigtigste stoffer på listen, da kontamination af fødevarer med

IARC's liste	
Aflatoksiner, naturligt forekommende	Opisthorchis viverrini
4-Aminobiphenyl	Sekvens p-piller
Arsen og arsenforbindelser	Radon og -nedfaldsprodukter
Asbest	Schistosoma haematobium (infektion med)
Azathioprin	Siliciumdioxid krystallinsk (respirabel)
Benzen	Sollys
Benzidin	Talkum med asbest i form af fibre
Beryllium og berylliumforbindelser	Tamoxifen
N,N-Bis(2-chloroethyl)-2-naphthylamin (Chlornaphazin)	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-para-dioxin
Bis(chloromethyl)ether og chloromethyl methyl ether (teknisk kvalitet)	Thiotepa
1,4-Butanediol diethanesulfonat (Busulphan; Myleran)	Treosulphan
Cadmium og cadmiumforbindelser	Vinylchlorid
Chlorambucil	Alkoholiske drikkevarer
1-(2-Chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea (Methyl-CCNU; Semustine)	Smertestillende midler med phenacetin
Chrom[VI]forbindelser	Betel-skrå med tobak
Cyclosporin	Stenkulstjærebeleg
Cyclophosphamid	Stenkulstjæreprodukter
Diethylstilbøstrol	Råolier, ubehandlet eller mildt behandlet
Erionitfibre	Saltet fisk
Ethylenoxid	Skiferolie
Helicobacter pylori (infektion med)	Sod
Hepatitis B virus (kronisk infektion med)	Tobak (skrå, snus)
Hepatitis C virus (kronisk infektion med)	Tobaksrøg
HIV virus type 1 (infektion med)	Træstøv
Human papillomavirus type 16	Fremstilling af aluminium
Human papillomavirus type 18	Fremstilling af auramin
Human T-cell lymphotropic virus type I	Fremstilling og reparation af støvler og sko
Melphalan	Fremstilling af bygas fra stenkul
8-Methoxypsoralen og UV-bestråling	Fremstilling af koks
MOPP og anden kombineret kemoterapi, inkl. alkylende forbindelser	Møbelfremstilling
Sennepsgas, Bis(2-chloroethyl)sulfid	Radoneksponering ved hematitgrubedrift (underjordisk)
2-Naphthylamin	Jern- og stålsmede
Nikkelforbindelser	Fremstilling af isopropanol ved stærk sur proces
Østrogen, behandling med	Fremstilling af magenta
Østrogener, ikke steroide	Beskæftigelse som maler
Østrogen, steroid	Gummiindustri
	Stærke uorganiske syretåger der indholder svovlsyre (arbejdsudsættelse for)

Tabel 2.4. IARC's liste.

aflatoksiner er et stort problem i dele af den Tredje Verden. Aflatoksiner produceres af svampe ved dårlig opbevaring af majs og andre fødevarer og er sandsynligvis en meget vigtig risikofaktor for leverkræft.

Det antages, at eksponeringer via føden er den vigtigste miljøfaktor for forekomst af kræft også i vores befolkning. Til trods for, at over halvdelen af IARC's humancarcinogener er klassificerede på grundlag af eksponeringer i arbejdsmiljøet, antages det, at kun en lille andel af samtlige kræfttilfælde kan forklares af disse. Det er vigtigt, at viden om en kræftfremkaldende effekt af et stof oftest hurtigt fører til fjernelse af stoffet eller i hvert fald til kraftig reduktion af eksponeringen. Eksponeringerne for mange af de arbejdsrelevante stofferne på IARC's liste, også for nogle lægemidler, er derfor historiske og forekommer ikke eller næsten ikke mere.

Også de 19 lægemidler og behandlinger, der er klassificeret som humancarcinogene, har en relativt ringe betydning for den totale forekomst af kræft i befolkningen. Dette illustrerer, at hvis vi udelukkende ser på data om kræftfremkaldende effekt hos mennesker, er der risiko for, at vi overser de fleste kræftfremkaldende eksponeringer.

## Registrering af kræftfremkaldende stoffer

Kræftrisikable stoffer og produkter på det danske marked registreres løbende i Produktregistret, der er et fællesregister for Arbejdstilsynet og Miljøstyrelsen. En kortlægning i 1989 viste, at 127 af 240 stoffer og stofgrupper, der var på kræftlisten i 1989, forekom i Danmark. Den totale mængde importerede og fremstillede kræftrisikable stoffer i 1989 var ca 225.000 tons.

Stoffer optages kun på grænseværdilistens kræftliste (liste over stoffer, der anses for at være kræftfremkaldende), hvis der er etableret omfattende dokumentation for at antage kræftrisiko hos mennesker (IARC, Miljøstyrelsen, AT's varslingsystem). Det er derfor formentlig langt fra alle kræftfremkaldende stoffer, der er optaget på listen. Systematiske målinger af udsættelser for kræftfremkaldende stoffer i det danske arbejdsmiljø foretages ikke.

## Brancher sat i fokus af Arbejdstilsynet

Branchebillederne fra 1995, bl.a. udarbejdet på baggrund af Arbejdstilsynets kemikalieforbrugsundersøgelse, beskriver udbredelsen af farlige stoffer i brancher. For de kræftfremkaldende stoffer er følgende brancher i fokus mhp en forebyggelsesindsats:

- ◆ metal- og stålværker, støberier og el- og varmegærker
- ◆ jern og metalindustri
- ◆ autoreparation mv
- ◆ bygge og anlæg
- ◆ kemisk industri
- ◆ anden almen industri.

### Metal- og stålværker samt støberier og el- og varmegærker samt jern og metalindustri

Inden for metal- og stålværker samt støberier er kræft et væsentligt arbejdsmiljøproblem. Det drejer sig om udsættelser for metaller som bly, cadmium, mangan, chrom og nikkel bl.a. ved svejsning, samt stoffer som formaldehyd, dichlormethan, kvarts, blyforbindelser, hydrazin, polycykliske aromatiske hydrocarboner, asbest, benzen og flyveaske. I jern- og metalvareindustrien er der tillige udsættelser for isocyanater (TDI og MDI) og blødgørere (fx EHP).

I 1987 gennemførte Arbejds miljøinstituttet og en række andre forskningsinstitutioner undersøgelser af rustfrit stålsvejseres udsættelser for kræftfremkaldende påvirkninger. Hovedkonklusionen af projektet var en forhøjet chrombelastning og en forhøjet frekvens af kromosomskader hos svejsere, der var mest belastet med elektrodsvæjsning. Resultaterne pegede på en forhøjet risiko for kræft. Danske og europæiske epidemiologiske undersøgelser har siden dokumenteret en forhøjet kræft risiko hos svejsere.

Disse studier dannede bl.a. basis for interventioner på lokale arbejdssteder og nedsættelser af grænseværdier.

I undersøgelser af støberier har man fundet betydelig udsættelse for polycykliske aromatiske hydrocarboner.

### Autoreparation mv

Ifølge branchebilledet forekommer eksponeringer for blychromat, siliciumdioxid og cadmiumsulfid. Dertil kommer, at motor-

benzin pga benzenindholdet anses for at være kræftfremkaldende. Også udstødningsgas fra benzin- og dieseldrevne motorer indeholder kræftfremkaldende stoffer. Branchebilledet domineres af ansatte på små værksteder, og kræft anses ikke for et væsentligt arbejdsmiljøproblem, til forskel fra hjerneskader og hudsygdomme.

## Bygge og anlæg

Branchen omfatter ca 150.000 beskæftigede på ca 23.000 arbejdssteder. Kemiske belastninger anses for at være et væsentligt arbejdsmiljøproblem både i form af udsættelser for stoffer fra materialer: formaldehyd, blychromat, dichlormethan og siliciumdioxid, og ved udsættelser i forbindelse med arbejdsprocesser som nedrivning og reparation, sandblæsning, isoleringsarbejde samt arbejde på forurenede grunde. Der foreligger ikke oplysninger om antallet af udsatte for kræftfremkaldende stoffer, men da der anvendes store mængder kræftfremkaldende stoffer, vurderes det at være et væsentligt arbejdsmiljøproblem for bygge- og anlægsområdet. Der er gennemført vurderinger af udsættelser for en række kræftfremkaldende fordampelige opløsningsmidler, bl.a. formaldehyd, og foretaget risikovurdering.

## Kemisk industri

Branchebilledet for den kemiske industri omfatter 49.000 personer, hvoraf knap en femtedel er tilknyttet medicinalindustrien. Branchen omfatter derudover bl.a. farve/lak- og olieprodukter, basisplastfremstilling og bådebyggeri. De væsentligste arbejdsmiljøbelastninger er kemiske belastninger, ulykker og bevægeapparatbelastninger. Ifølge kræftkortlægningsundersøgelserne udgjorde forbruget af kræftfremkaldende stoffer i den kemiske industri i 1991 ca 88% af det samlede forbrug af kræftfremkaldende stoffer i alle brancher. Der peges bl.a. på stoffer som stenkulstjære (asfaltindustri), formaldehyd (farve/lak), blychromat (farve/lak), isocyanater (plast) og dichlormethan (farve/lak, plast, medicinal og asfalt).

Internationalt er der stor bevågenhed omkring asfalthåndtering, specielt bitumens kræftfremkaldende effekt. Danske studier har vist øget kræftforekomst hos asfaltarbejdere. Det diskuteres, om bitumen har bidraget til denne øgede hyppighed.

## Anden almen industri

Branchebilledet beskriver områder som råstofudvinding, fremstil-

ling af papir m.m., sten-, ler- og glasindustri, fremstilling af instrumenter samt optisk og fotografisk udstyr tilligemed anden fremstillingsvirksomhed. Udsættelse for kræftfremkaldende stoffer betragtes som en væsentlig arbejdsmiljøpåvirkning. Forbruget af kvarts er selvfølgelig stort sammenlignet med forbrug af i alt 54 forskellige andre kræftfremkaldende stoffer. Branchen omfatter fremstilling af stenuld m.m.

## Udviklingstendenser

Næsten 30% af dødeligheden i de industrielle lande skyldes kræft. I det seneste århundrede er der sket en rivende udvikling af det industrielle samfund. Hvert år introduceres mange nye stoffer, der ikke er testede, på markedet. Som følge af dette bliver tusindvis af naturligt forekommende og syntetiske stoffer sluppet ud i det ydre og indre miljø. Kun en lille del af disse stoffer er blevet testet ordentligt for toksiske effekter på menneske og miljø.

Arbejdsbetinget kræft er således et problemområde, vi må være opmærksomme på også i fremtiden, til trods for at man gradvis forsøger at få eksponeringer elimineret eller mindsket. Derfor er det vigtigt at fastholde aktiviteter, som afslører kræftfremkaldende effekt af såvel eksisterende som nye stoffer og påvirkninger. Her slår de traditionelle epidemiologiske studier ikke til, idet følsomheden af disse studier ikke er tilstrækkelig til at detektere effekter. Dertil kommer, at personer udsættes for et væld af kemiske påvirkninger, hvorfor det er vanskeligt at udpege entydige årsager.

Der er stor forskel i personers følsomhed over for kræftfremkaldende udsættelser. Bestemmelse af stoffers kræftfremkaldende potentiale udføres i dag ved gennemførelse af dyreeksperimentelle undersøgelser af stoffers kræftfremkaldende effekt, suppleret med undersøgelser i isolerede cellesystemer (in vitro test). Udviklingen formodes at dreje derhen, hvor in vitro test og struktur-aktivitetsovervejelser vedr. stoffers potentielle kræftfremkaldende egenskaber har en stor plads, og dyreforsøgene søges optimeret, og kun de nødvendige foretages.

Potensen af forskellige kræftfremkaldende stoffer varierer over 100.000 gange i forsøgsdyr. Nogle stoffer er exceptionelt potente, fx forårsager polychlorerede dibenzodioxiner kræft hos rotte ved tilførsel af 10 nanogram pr dag, mens andre stoffer skal indtages som en betydelig del af føden hele livet. Der er derfor behov for en stor international aktivitet til udpegning af de mere potente kræftfremkaldende stoffer. Hvorvidt der fastsættes grænseværdier



for stofferne, kan afhænge af, om et stof er genotoksisk eller ikke. Meget tyder på en differentiering i kravene til sikkerhed omkring kræftfremkaldende stoffer, og at en række stoffer vil være helt forbudt, mens brugen af andre vil blive reguleret med sikkerhedsforskrifter og grænseværdier.

Overvågningen af udsatte erhvervsgrupper formodes også at fortsætte, bl.a. i form af fokuserede måleprogrammer i udsatte brancher. Der er aktiviteter i transportsektoren (buschauffører), i den grafiske industri og asfaltindustrien samt autoværkstederne. Anvendelsen af metoder inden for den nye disciplin molekylær epidemiologi må forudses, og det er her vigtigt, at målemetoderne valideres ikke bare ved eksponering, men også ved kræftsylgelighed.

Et andet område, som vil komme i søgelyset, er blandingseksponering og betydningen af eksponering for flere stoffer.

Betydningen af forebyggelse anerkendes af de fleste, men der er kun beskedne ressourcer på området. Den lave helbredelsesprocent for nogle kræftsygdomme, fx lungecancer, hvor højst 10% af patienterne overlever mere end 5 år, taler for at lægge stor vægt på forebyggelse frem for på behandlingsforbedrende indsats. De samfundsressourcer, der satses på øget viden om kræftfarer og forebyggelse, er meget små sammenlignet med, hvad behandling af kræft koster. For at ikke tale om de totale samfundsomkostninger og sociale konsekvenser for kræftsygdomsramte. Det kan formentlig betale sig at investere i forebyggelse selv over for eksponeringer, der forekommer relativt sjældent.

En forebyggelsesindsats kan omfatte såvel sanering af forbrug som minimering af udsættelse og evt anden intervention (arbejdsprocesser, personlige beskyttelsestiltag, personers livsstil) over for særligt udsatte grupper. Det er væsentligt, at tiltag evalueres, fx ved målinger af eksponering og af tidlige biologiske effekter før og efter en forebyggelsesindsats.

## Litteratur

- Arbejdstilsynet: Branchebilleder. Arbejdstilsynet, København.  
Arbejdstilsynets bekendtgørelse nr. 300 af 12. maj 1993 om foranstaltninger til forebyggelse af kræftrisikoen ved arbejde med stoffer og materialer m.v. København: Arbejdstilsynet, 1993.  
At-anvisning nr. 3.1.0.2 af december 1996: Grænseværdier for stoffer og materialer. Bilag 3.6 Liste over stoffer og processer, der anses for at være kræftfremkaldende. København: Arbejdstilsynet, 1996.  
Autrup H, Dragsted L. Overview of tumor promoters and test

- systems to identify promoters. Nordisk Ministerråd Nord 1987:25.
- Bradlow H, Osborne MP, Veronesi U. Cancer Prevention, Annals of the New York Academy of Sciences, 768. New York: New York Academy of Sciences, 1995.
- Brandorff NP, Hansen L, Nielsen KM, Knudsen LE, Thoustrup Saber A, Wallin H. Kritisk gennemgang af den danske liste over stoffer der anses for at være kræftfremkaldende, og sammenligning med andre nationale og internationale kræftlister. / Forslag til inddeling efter styrke af de arbejdsmiljørelevante stoffer. Arbejdstilsynet og Arbejdsmiljøinstituttet, 1998.
- Dreyer L, Andersen A, Pukkala E. Occupation, Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica 1997, 105, Suppl 76, 68-82.
- Huff J. Mechanisms, chemical carcinogenesis, and risk assessment: cell proliferation and cancer, Am. J. Ind. Med. 1995; 27:293-300.
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs volumes 142. Supplement 7. Lyon: WHO, 1987.
- International Expert Panel on Carcinogen Risk Assessment. The use of mechanistic data in the risk assessments of ten chemicals: An introduction to the chemicals specific reviews. Pharmacol. Ther. 1996; 71:1-5.
- IPCS: Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. Environmental Health Criteria 51, WHO, 1995.
- Klassen CD. Casarett & Doulls Toxicology. The Basic Science of poisons, 5th edition. New York: McGraw-Hill Inc. 1996.
- Maltoni C, Selivoff IJ. Living in a Chemical World, Occupational and Environmental Significance of Industrial Chemicals. Annals of the New York Academy of Sciences, Vol 534, New York: New York Academy of Sciences, 1988.
- Nordisk Ministerråd: Potency ranking of carcinogenic substances. Miljørapport 4E. 1995. Nordisk Ministerråd.
- Nordic Council of Ministers: Non-mutagenic carcinogens: mechanisms and test methods. TemaNord 1997:601.
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Introduction to the OECD Guidelines on genetic toxicology testing and guidance on the selection and application of assays. Paris: OECD Publications.
- Olsen JH. Arbejdsbetinget kræft. In: Andersen I (ed). Arbejdsmedicin, bind II. København: Arbejdsmiljøinstituttet, 1994.
- Vainio H. Carcinogenesis and its Prevention. In: Neill HS. Occupational Toxicology. New York: Taylor and Francis 1993.

Vanio H, Magee P, McGregor D, McMichael AJ. Mechanisms of Carcinogenesis. In: Risk Identification. Lyon: International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1992.

KAPITEL 3

# Reproduktions- toksikologi

*Ulla Hass  
Ernst V. Hansen*

# Reproduktionstoksikologi

Reproduktionsskader omfatter ændringer, der nedsætter evnen til at få sundt og levedygtigt afkom. Hos mennesker er skader på reproduktionsevnen derfor både knyttet til påvirkning af den gravide kvinde, fosteret og det nyfødte barn samt til mænds og kvinders evne til nu og i fremtidige generationer at kunne få levedygtige og sunde børn.

Det har været kendt længe, at udsættelse for visse kemiske stoffer kan betyde en øget risiko for fosterskader eller nedsat forplantningsevne. Lægemidlet Thalidomid var i slutningen af 50'erne årsag til, at tusindvis af børn blev født med alvorlige misdannelser, og bekæmpelsesmidlet dibromchlorpropan (DBCP) medførte i 70'erne dårlig sædkvalitet og nedsat evne til at få børn hos mænd, der arbejdede med midlet. Inden for de sidste ti år er det vist, at udsættelse af gravide for bl.a. bly, organisk kviksølv, alkohol og PCB under nervesystemets udvikling kan medføre neuropsykologiske udviklingsforstyrrelser og nedsat indlæringsevne hos børn.

Undersøgelser af mænds sædkvalitet peger på, at der er sket en forringelse siden 30'erne. Årsagen kendes ikke, men en hypotese er, at det kan skyldes udsættelse for kemiske stoffer med hormonlignende virkning.

I forbindelse med, at kvinders andel af arbejdsstyrken er øget betydeligt, må man oftere og oftere tage stilling til, om faktorer i arbejdsmiljøet kan have indflydelse på muligheden for at få sunde børn. Adskillige befolkningsundersøgelser viser en sammenhæng mellem bestemte typer af arbejdsmiljø og en øget forekomst af fosterskader, såsom misdannelser, aborter og nedsat fødselsvægt.

I takt med den stigende industrialisering af samfundet er der indført en lang række kemiske stoffer i arbejdsmiljøet og ydre miljø. Det skønnes, at der anvendes omkring 10.000 kemiske

stoffer i Danmark. Det er således væsentligt at vurdere, om nogle af disse kemiske stoffer kan være en del af årsagen til de reproduktionsskader, der forekommer i befolkningen.

## Hyppighed af reproduktionsskader

Det skønnes, at 15-20% af alle danske par har problemer med at få de børn, de ønsker sig, dvs at deres fertilitet regnes som nedsat. For ca 10% lykkes det aldrig, det vil sige, at de er ufrivilligt barnløse.

Undersøgelser peger som nævnt på, at der siden 1930'erne er sket et fald i mænds sædkvalitet. Ved en samlet analyse af 61 tidligere studier, der omfatter i alt 14.947 mænd undersøgt i perioden fra 1938 til 1990, blev der således fundet et generelt fald i sædcellekonzentration fra 113 mio/ml til 66 mio/ml. Nyere undersøgelser fra bl.a. Frankrig og Skotland peger i samme retning, mens undersøgelser i Finland og Danmark ikke umiddelbart har fundet samme tendens. Det vides ikke, om de observerede fald i sædkvalitet er så store, at det har medført et generelt fald i mændenes frugtbarhed, og årsagerne er ikke afklarede. Som allerede nævnt er en hypotese, at det kan skyldes udsættelse for kemiske stoffer med østrogen/hormonlignende virkninger.

Misdannelsesregistret angiver, at 11% af alle erkendte graviditeter ender med en spontan abort. Tidlige aborter, fx før 4. uge, bliver ofte ikke registrerede, fordi de sker så tidligt, at de opfattes som en forsinket menstruation. Man mener derfor, at aborthyppigheden er væsentligt højere end 11%, og nogle anslår, at op mod 70% af alle befrugtede æg ender som spontane aborter.

I tabel 3.1 vises hyppigheden af forskellige typer fosterskader. Da der til stadighed sker en forbedring af diagnosemulighederne og indberetningssystemerne, bl.a. gennem det arbejde, der er udført i Misdannelsesregistret, kan det være misvisende umiddelbart at sammenligne tallene i tabel 3.1 med data fra fx 1950'erne. Det vides derfor ikke, om der generelt er tidsmæssige ændringer i forekomsten af fosterskader.

I de seneste årtier er der rapporteret en stigning i hyppigheden af testikelkræft, der kan være induceret i fostertilstanden. Forekomsten af andre abnormiteter i de mandlige kønsorganer er muligvis også forøget, således rapporteres der fra flere europæiske lande om et stigende antal drenge født med forkert udmundning af urinrør (hypospadi) og en tilsyneladende stigning i antallet af drenge med manglende nedstigning af testiklerne i pungen.

Tabel 3.1. Hyppighed af forskellige typer fosterskader. (Data fra 1989).

	Hyppighed	Ca antal/år*
Misdannelser ved fødsel	1,3 %	780
Lav fødselsvægt (under 2.500 g)	5,5 %	3.300
Neonatal død (inden dag 28)	0,5 %	300
Død inden for 1. leveår	0,8 %	480
Udviklingsforstyrrelser	2-10 %	1.200-6.000
Børnecancer	0,2 %	120
Mutationer i kønsceller	ukendt	ukendt

\* Baseret på 60.000 fødsler pr år.

Det er vanskeligt at angive hyppigheden af udviklingsforstyrrelser hos børn, bl.a. fordi der ikke er en central registrering af sådanne effekter i Danmark. I USA er det blevet estimeret, at 15-20% af alle børn har en eller anden form for funktionel forstyrrelse, og at en del af disse kan være opstået under fosterudviklingen. Syndromet MBD/DAMP (Deficits in Attention, Motor and Perception), der i USA kaldes ADHD (Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder) er en samlet betegnelse for vanskeligheder hos børn med forstyrrelser i hjernens måde at arbejde på. Det er et af de hyppigst forekommende syndromer og er karakteriseret ved bl.a. hyperaktivitet, nedsat koncentrationsevne, indlæringsproblemer og impulsiv adfærd. I en svensk befolkningsundersøgelse er det vist, at syndromet forekommer hos 5-7% under skolealderen, og at symptomerne hyppigere ses hos drenge end hos piger. Syndromet synes at være i stigning, men det er vanskeligt at afgøre, om det skyldes bedre diagnosticering eller en reelt øget forekomst. I USA skønnes det, at 5-6% af alle skoledrenge får medicin for netop dette syndrom. Fra udenlandske data vides det, at mental retardering og omfattende hjerneskader er sjældnere, men forekommer hos omkring 1-2% af fødte børn.

## Udviklingsstadier og reproduktionsskader

Reproduktionsforløbet er en kompliceret proces, og der er mange vigtige forudsætninger for normal frugtbarhed og normal udvikling af fosteret. Nogle af de væsentligste elementer er dannelsen af kønsceller, den hormonelle regulering af forplantning

og graviditet samt selve fosterudviklingen fra befrugtet æg til kønsmodent individ. De reproduktionsskader, der opstår, afhænger af, hvornår i udviklingen påvirkningen er sket. I tabel 3.2 gives en oversigt over udviklingsstadier i reproduktionsforløbet hos mennesker samt de reproduktionsskader, der kan opstå i de forskellige stadier.

Udviklingsstadier	Reproduktionsskader
Kønsceller og hormonal regulering Hele voksenlivet	Menstruationsforstyrrelser Nedsat frugtbarhed Sterilitet Aborter Misdannelser Kræft i barnealder Testikelkræft
Befrugtning og implantation Uge 1 - uge 2	Manglende befrugtning Ingen eller forkert placeret implantation Tidlig spontan abort
Den embryonale periode Uge 3 - uge 8	Spontan abort Misdannelser Fosterdød Kræft i barnealder
Fosterperioden Uge 9 - fødsel	Lav fødselsvægt For tidlig fødsel Spontan abort Spædbarnsdød Mindre misdannelser Udviklingsforstyrrelser Kræft i barnealder
Dieperioden Fødsel - ???	Udviklingsforstyrrelser

Tabel 3.2. Oversigt over udviklingsstadier og eventuelle reproduktionsskader hos mennesker.

## Dannelse af sædceller (spermatogenesisen)

Stamceller til mandens sædceller anlægges tidligt i fostertilstanden, og antallet er normalt nogenlunde konstant livet igennem (fig. 3.1). Dannelse af sædceller ud fra stamcellerne starter ca i 12-års alderen og fortsætter resten af livet. Ved dannelsen af



sædceller er der en hyppig celledelingsaktivitet, idet der dannes ca 100 mio sædceller hver dag. Når sædcellerne har gennemgået delingsfaserne, sker der en differentiering og modning af sædcellerne dels i testikelrørene, dels i bitestiklerne. En skadelig påvirkning af stamceller kan medføre, at nogle eller alle stamceller dør. Dette forårsager nedsat hhv ophørt sædcelleproduktion.

Et nedsat antal af de celler i testiklerne, der støtter sædcelledannelsen, dvs Sertolicellerne, kan resultere i, at færre kønsceller kan udvikles til sædceller. Dannelsen af Sertolicellerne sker hos dregebarnet i fostertilstanden og i den tidlige barndom fra 0 til 1/2 år samt i puberteten, hvor der dog fortrinsvis forekommer en modning af cellerne. Da Sertoliceller kun kan være funktionsdygtige over for ca 10-15 kønsceller ad gangen, er antallet af disse afgørende for antallet af modne og funktionsdygtige sædceller, der kan produceres hos det kønsmodne individ.

Antallet, morfologien og bevægeligheden af sædcellerne, som sendes ud af testiklen og bliver lagret i bitestiklen indtil ejakulationstidspunktet, kan påvirkes af hormoner. Især to hormoner, der udskilles fra hypofysen i hjernen, FSH og LH, har været genstand for megen opmærksomhed bl.a. i forbindelse med dannelsen og modning af Sertolicellerne. FSH stimulerer dannelsen af Sertoliceller hos fosteret og umiddelbart efter fødslen, mens mangel på FSH hæmmer dannelsen. Differentieringen, altså modningen af Sertoliceller, er tilsyneladende også afhængig af FSH, idet man under differentieringen finder receptorer for FSH på Sertolicellerne. Hormonet LH har formodentlig en mere indirekte effekt på Sertolicellerne og spermatogenesis, idet LH bidrager til dannelsen af det mandlige kønshormon, testosteron, som sammen med FSH stimulerer modningen af Sertolicellerne. Man har desuden fundet, at andre hormoner end kønshormoner, som fx skjoldbruskkirtelhormon (thyreoideahormon), også kan være af væsentlig betydning i denne fase, da mangel på skjoldbruskkirtelhormon synes at udsætte modningstidspunktet for Sertolicellerne.

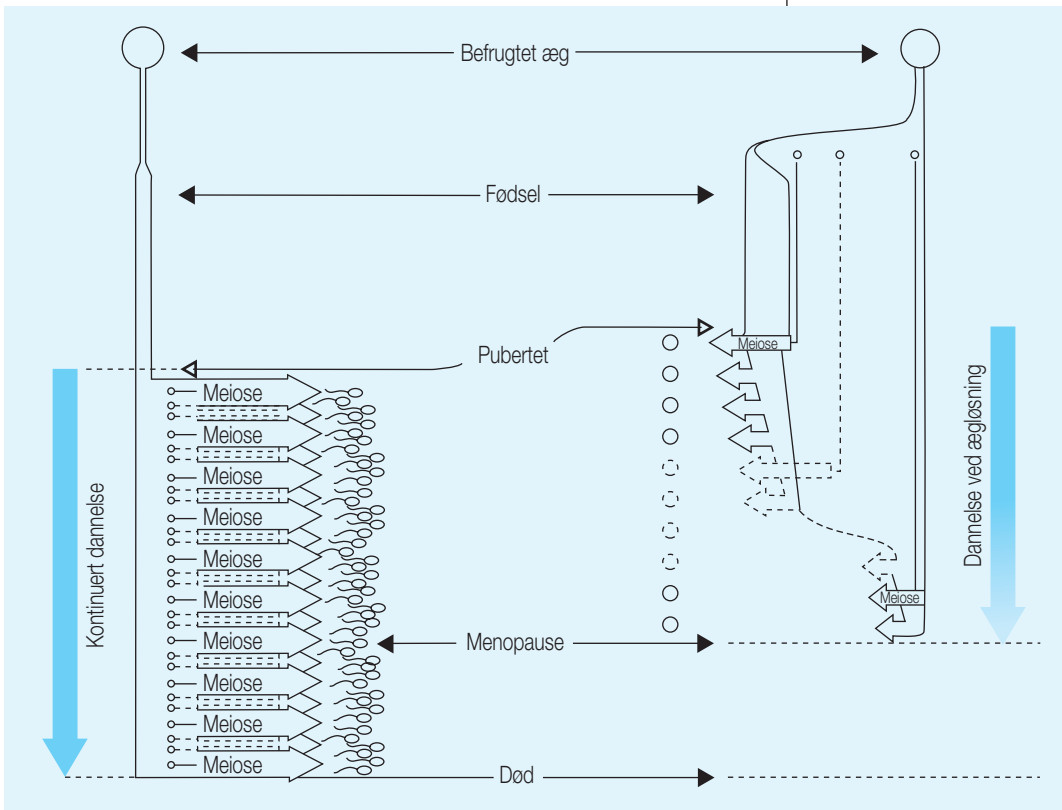
Den mandlige reproduktionsevne antages derfor at kunne påvirkes i fostertilstanden og den tidlige barndom, hvor der sker den kraftige stigning i antallet af Sertoliceller. Det antages, at hormoner eller stoffer, der går ind og efterligner hormoners effekt, kan have en indflydelse på dannelsen af Sertoliceller, fx ved at hæmme FSH og LH sekretionen.

I de sidste år har man været meget opmærksom på sådanne stoffer i miljøet. Fx har nonylphenol udvist en østrogenlignende effekt, men også visse PCB-typer, der bl.a. påvirker niveauet af thyreoideahormoner i kroppen, mistænkes for at have en hormonlignende effekt, der påvirker sædproduktion.

Skadelig påvirkning af produktion og modning af sædceller

kan føre til mindre bevægelighed og/eller nedsat levedygtighed hos sædcellerne og til øget antal af sædceller med unormal form. Kun morfologisk normale sædceller, som bevæger sig optimalt, kan nå ægget og befrugte dette. Så ethvert stof med direkte eller indirekte skadelig effekt på disse parametre kan påvirke fertiliteten. Hvis der ikke er sket skader på stamcellerne, som sædcellerne dannes fra, eller på støttecellerne, vil sædcelledannelsen kunne normaliseres i løbet af ca 3 måneder, hvis vel at mærke udsættelsen for den skadelige påvirkning ophører.

Figur 3.1. Dannelse af sædceller (spermatogenese) og ægceller (oogenese).



## Dannelse af ægceller (oogenesen)

Stamceller til kvindens ægceller anlægges tidligt i fostertilstanden (fig. 3.1). Ud fra stamcellerne dannes i løbet af den første halvdel af fostertilværelsen alle forstadier til ægceller (oocytter). Det største antal oocytter (ca 6 mio) nås midt i fosterperioden. Herfra og frem til fødslen sker der et udtalt henfald af oocytter. Kun ca

1 mio oocytter er til stede ved fødslen, og henfaldet af oocytter fortsætter efter fødslen. Ved puberteten er antallet faldet til ca 40.000. Kun ca 400 oocytter færdigmodnes og bliver befrugtningedygtige æg. Når alle oocytter er opbrugt, indtræder overgangsalderen (menopausen).

Ud fra oocytterne dannes æg ved meiose (kønsceledeling). Den første meiotiske deling påbegyndes omkring fødselstidspunktet. Celledelingsprocessen går herefter i stå indtil puberteten. Som optakt til ægløsning afsluttes den første meiotiske deling. Den anden meiotiske deling påbegyndes efter ægløsningen og afsluttes først efter befrugtningen.

En skadelig påvirkning af ægceller kan medføre, at de dør, eller at det genetiske materiale skades. Dette vil evt kunne ses som manglende ægløsning, en for tidligt indtrådt menopause (overgangsalder), spontan abort eller skader på fosteret.

En skade på ægceller er alvorlig, da der ikke efter fødslen dannes nye ægceller. Principielt kan defekter på ægceller videregives til arvematerialet i kommende generationer.

## Den hormonale kontrol af forplantningen

Kønshormoner påvirker hos både mand og kvinde lysten til samleje (libido) og evnen til at gennemføre samleje (potens). Hos kvinden er menstruationscyklus og dermed ægløsning hormonalt kontrolleret, og hos manden er sædcelleproduktionen hormonalt kontrolleret.

En skadelig påvirkning af kønshormonbalancen kan medføre nedsat befrugtningsevne, ændret sædcelleproduktion, manglende ægløsning, menstruationsforstyrrelser eller manglende evne til at gennemføre graviditet. Da kønshormonbalancen har betydning for kønsdifferentieringen hos fosteret, kan skadelige påvirkninger på kønshormonbalancen også påvirke denne parameter.

## Fosterskader, hvor skaden er opstået inden befrugtningen

En række skader opstået i æg- eller sædcelle kan give sig udtryk i fosterskader, som ses efter befrugtningen og evt først efter fødslen. Fejl i fordelingen af arvemateriale, hele kromosomer eller stykker af kromosomer, til enten æg- eller sædceller kan give sig udslag i syndromer som fx Down's syndrom (mongolisme), hvor cellerne indeholder et ekstra kromosom nr. 21, Klinefelter's syndrom, der optræder hos mænd med et eller flere overtallige X-kromosomer, og Turner's syndrom, der forekommer hos kvinder med kun ét X-kromosom.

Der kan også ske mindre fejl ved udvekslingen af genetisk materiale i dannelsen af æg- eller sædcelle, således at et kromosom enten har fået et stykke tilføjet (en duplikation), mangler et stykke (en deletion) eller har fået et stykke ændret (en mutation). I nogle tilfælde kan befrugtede æg med disse mangler udvikle sig til et barn, der fødes multihandicappet.

I de fleste tilfælde vil befrugtede æg med kromosomfejl af denne eller anden type resultere i en spontan abort. Flere undersøgelser viser, at man oftere finder kromosomfejl i celler fra spontane aborter end i celler fra nyfødte. Det er tillige fundet i et enkelt studie, at procenten af unormalt formede sædceller i gennemsnit er højere hos mænd, hvis partner for nylig har haft en spontan abort, end hos mænd, hvis partner har gennemført en normal graviditet.

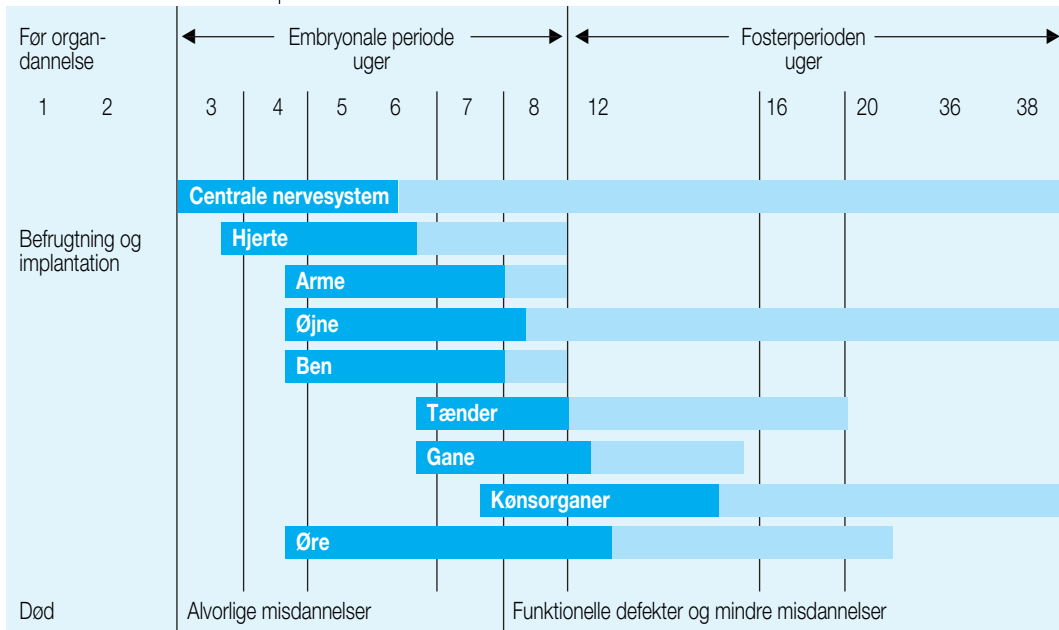
## Fosterudviklingen

Ønsker et par at få et barn, tyder undersøgelser på, at der er ca 23% sandsynlighed for, at det vil lykkes at gennemføre en graviditet opnået under en given menstruationscyklus. I de tre til fire uger, der går, fra ægget er blevet befrugtet, til man normalt konstaterer graviditeten, er der stor sandsynlighed for, at det befrugtede æg går tabt. Årsagerne hertil er stort set ukendte. Fejl i den hormonale kontrol af graviditeten, manglende eller forkert fasthæftning af ægget i livmoderen (implantation) og kromosomfejl kan være forklaring på det observerede store tab af befrugtede æg frem til ca 4. uge af graviditeten. Har graviditeten nået 4. uge, er sandsynligheden for at gennemføre graviditeten meget højere (ca 89%), idet hyppigheden af spontane aborter efter uge 4 er på ca 11%.

I fig. 3.2 er vist de kritiske perioder i fosterudviklingen for et udvalg af organer, og nederst i figuren angives de mest sandsynlige skader i de forskellige perioder.

## Tiden fra befrugtning til ægget sætter sig fast i livmoderen (uge 1 - uge 2)

Fra ægget er blevet befrugtet i æggelederen, til det sidder fast (er implanteret) i livmoderen, går der ca 7 dage. Ved implantationen er ægget en kugle af ens (udifferentierede) celler (en blastula). I nogle tilfælde sætter det befrugtede æg sig fast uden for livmoderen, fx i en af æggeledeerne. En sådan graviditet kan ikke gennemføres og kan medføre problemer med senere at blive gravid, hvis passagen gennem æggelederen forringes.



■ Mørk grøn angiver særligt følsomme perioder

Figur 3.2. Oversigt over kritiske perioder i fosterudviklingen for et udvalg af organer.

En påvirkning af kvinden i de første to uger efter befrugtningen kan medføre ændringer, som gør, at det befrugtede æg ikke kan fasthæftes. Dette medfører, at det befrugtede æg forsvinder senest med den efterfølgende menstruation. Skadelige påvirkninger frem til blastulastadiet kan også føre til celledød. Er celledøden af mindre omfang, kan de døde celler blive erstattet helt eller delvist af nye celler, men dør der for mange celler, går blastulaen til grunde. Sådanne meget tidlige spontane aborter vil normalt ikke opdages af kvinden, men måske opleves som en uregelmæssig og/eller ekstra smertefuld menstruation.

### Den embryonale periode (uge 3 - uge 8)

I dette tidsrum deler blastula sig, og der dannes tre cellelag kaldet ektoderm, mesoderm og entoderm. Ud fra disse cellelag påbegyndes dannelsen af de forskellige organer (organogenesen) ved en intensiv celledeling og specialisering af cellerne. Pga de mange celledelinger er denne periode følsom over for skadelige påvirkninger. Fordi organerne er under dannelse, ses især effekter som tydelige strukturelle misdannelser.

Skadelig påvirkning i den embryonale periode kan således

føre til alvorlige strukturelle misdannelser, som fx set ved Thalidomid, og kan evt føre til tidlig spontan abort. En sådan abort kan registreres af kvinden og vil i tilfælde af komplikationer medføre indlæggelse.

### Fosterperioden (fra uge 9 til fødslen)

I denne periode sker der en yderligere specialisering af cellerne og vækst af organerne, samtidig med at fosteret vokser. En række organer (centralnervesystem, ører, øjne, tænder og ydre kønsorganer) er langt fra færdigudviklede ved begyndelsen af fosterperioden. For centralnervesystem, øjne og ydre kønsorganer fortsætter differentieringen igennem hele fosterperioden.

En skadelig påvirkning i denne periode kan resultere i mindre misdannelser, funktionelle forstyrrelser og/eller lav fødselsvægt. Er påvirkningen meget massiv, kan resultatet blive en sen spontan abort eller dødfødsel med indlæggelse til følge.

### Påvirkninger under graviditeten, hvor effekten først ses under opvæksten

En påvirkning under graviditeten kan give sig udslag i effekter, der først viser sig under barnets opvækst, fx ved at barnet vokser langsommere, er forsinket i sin udvikling eller har funktionelle forstyrrelser af fx nervesystemet. Forsinket udvikling af nervesystemet kan bl.a. afsløres ved studier af udviklingen af reflekser, taleevne mv hos barnet, mens funktionelle forstyrrelser i nervesystemet kan vise sig fx som forringet indlæringsevne, hyperaktivitet og nedsat koncentrationsevne. Påvirkning af fosteret kan også resultere i udvikling af kræft i barneårene eller i varige skader på barnets arvemateriale.

### Påvirkning af barnet via moderen i ammeperioden

Visse reproduktionsskadelige stoffer som fx polychlorede biphenyler (PCB), dioxiner, visse bekæmpelsesmidler, cadmium, bly og kviksølv udskilles med modermælken. For PCB og lignende fedtopløselige, svært nedbrydelige stoffer er hovedudskilelsesvejen netop gennem modermælken. Koncentrationen af disse skadelige stoffer i modermælk er normalt lav og uden konstaterbar effekt på barnet, men hvis moderen er eller har været eksponeret i større omfang, kan stoffernes giftighed medføre, at det diende barns vækst eller udvikling påvirkes.

## Kinetik og mekanismer

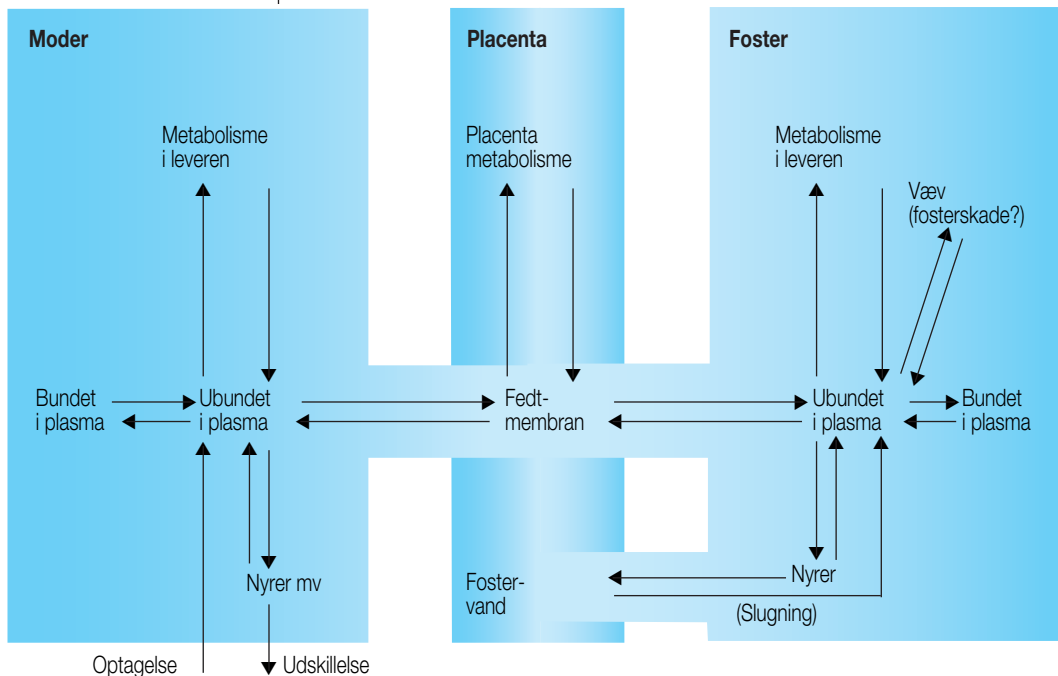
I vurderingen af, om kemiske stoffer forårsager reproduktions-skader, indgår, ud over selve effekterne, to væsentlige problemstillinger:

- ◆ Toksikokinetiske overvejelser, der omhandler alle parametre vedrørende organismens "behandling" af det kemiske stof, såsom stoffets optagelse, fordeling, metabolisk omdannelse samt udskillelse, dvs alle de faktorer, der indvirker på stoffets koncentration på virkningsstedet.
- ◆ Toksikodynamiske overvejelser, som vedrører, hvilke typer af interaktion der foregår mellem det kemiske stof og dets virkningssted, dvs stoffets virkningsmekanisme.

### Kinetiske forhold under graviditet

De toksikokinetiske forhold inden for fosterskadeområdet er væsentligt anderledes end inden for den øvrige toksikologi, fordi der indgår to organismer: moderen og fosteret. Transporten af et kemisk stof mellem moder, placenta (moderkage) og foster er illustreret i fig. 3.3.

Figur 3.3. Transport af kemiske stoffer mellem moder, placenta (moderkage) og foster.



Toksikokinetikken hos moderen kan have væsentlig indflydelse på de koncentrationer af et kemisk stof, der når fosteret. I det følgende belyses enkelte faktorer, der specielt vedrører toksikokinetikken hos den gravide kvinde, mens der for en indføring i generel toksikokinetik henvises til bind I (kapitel 2) og almindelige lærebøger.

Under en graviditet øges pulsen, hjertets minutvolumen stiger fra ca 4 liter til 5,5 liter, og især sidst i graviditeten sker en forøgelse i den mængde luft, der indåndes/udåndes pr minut fra det normale 7,5 liter pr minut til maksimalt 11 liter pr minut. Alle disse forhold kan medvirke til en øget optagelse af kemiske stoffer ved eksponering for disse i gas- eller aerosolform (dvs indånding).

Nogle kemiske stoffer kan bindes til et protein i blodet (plasma-albumin), og denne binding kan mindske transporten fra blodet til kroppens organer. Under graviditet falder albuminkoncentrationen i blodet til under to tredjedele af det normale. En mindsket binding af det kemiske stof til albumin øger muligheden for, at stoffet kan transporteres over moderkagen til fosteret.

Under graviditet opbygges ofte fedtdepoter mhp den senere amning. Dette betyder, at fedtopløselige kemiske stoffer, som fx PCB, i højere grad vil kunne akkumuleres i kroppen.

Transporten af kemiske stoffer fra moderens blod til fosteret foregår hovedsagelig gennem moderkagen. Som vist på fig. 3.3 kan der også forekomme udskillelse af kemiske stoffer i fostervand, der herefter sluges af barnet, men betydningen af dette er meget lidt udforsket. Tidligere blev moderkagen opfattet som en barriere (placenta-barrieren) for transporten af kemiske stoffer fra moderens blod til fosterets kredsløb, men dette er ikke korrekt. Med undtagelse af forbindelser med meget stor molekylvægt eller forbindelser, som er stærkt elektronegative eller -positive, kan næsten alle kemiske stoffer passere over moderkagen.

Kemiske stoffer kan passere moderkagen ved flere forskellige processer, men for de fleste fremmedstoffer foregår transporten ved simpel diffusion. Generelt virker moderkagen som en fedtmembran, dvs graden af kemiske stoffers passage afhænger især af stoffets molvægt, koncentrationsgradient, fedtopløselighed og ioniseringsgrad. For en stofgruppe som fx organiske opløsningsmidler betyder dette, at deres transport over moderkagen stort set afhænger af koncentrationsgradienten og foregår uhindret.

Ved kemiske stoffers passage af moderkagen kan der ske en metabolisering (biotransformation), der kan have væsentlig betydning i forbindelse med omdannelse af kemiske stoffer til mere farlige metabolitter. For langt de fleste stoffer spiller dette imidlertid en mindre rolle i forhold til de andre parametre, der påvirker transporten over moderkagen. Biotransformationen i



moderkagen kan dog øges betydeligt, hvis moderen har været udsat for enzyminducerende stoffer som fx dioxin eller PAH'ere.

Koncentrationen af et kemisk stof i fosteret afhænger af omdannelseshastigheden hos moder og foster. Hvis moderen omdanner et kemisk stof meget hurtigt i leveren, vil det kun være relativt små mængder, der får mulighed for at passere uomdannet over moderkagen til fosteret. Dette gælder dog ikke, hvis stoffet optages ved indånding, fordi en del af blodet fra lungerne når moderkagen, inden det passerer leveren. I så fald, eller hvis stoffet kun omdannes langsomt, kan koncentrationen i fosterets blod blive den samme som i moderens.

Fosterets evne til at omdanne fremmedstoffer optræder først sent i graviditeten og er relativt lille, hvorfor dette stort set ikke påvirker koncentrationen i fosterets blod. Hvis det er det uomdannede kemiske stof, der har en effekt på fosteret, vil fosterets manglende evne til omdannelse af fremmedstoffer øge farligheden for fosteret, mens det omvendt vil kunne mindske farligheden for fosteret, hvis det er stoffets omdannelsesprodukter, der kan forårsage effekten.

## Mekanismer

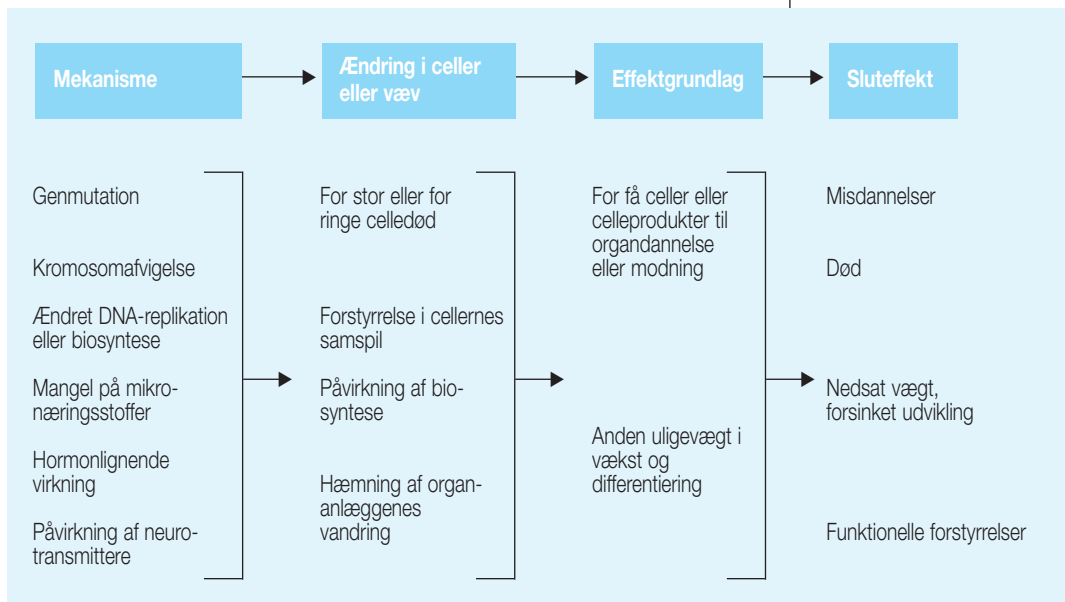
Den nuværende viden om, hvorledes kemiske stoffer kan forårsage fosterskader, er begrænset, selvom man inden for de senere år har fået mere og mere detaljeret viden om nogle enkelte udvalgte kemiske stoffer og deres mekanismer. Nogle af de væsentligste grunde til, at man ikke har et klart overblik over, hvordan fosterskader opstår, er:

- ◆ Den viden, man har om mekanismerne bag den naturlige fosterudvikling, er begrænset, hvilket gør det vanskeligt af undersøge mekanismerne bag unormal udvikling.
- ◆ Fosterskader er mange forskellige effekter, såsom udviklingsdefekter og toksiske effekter på organer under udvikling og modning, og fosterskader omfatter derfor lige så mange forskellige effekter som hele resten af toksikologien - bare yderligere kompliceret af, at organismen er under udvikling.

Der har tidligere været en tendens til at arbejde ud fra, at fosterskadende stoffer blev transporteret over moderkagen og derefter påvirkede fosterets vækst og differentiering, men mange nyere undersøgelser fremhæver betydningen af, at modermoderkage-foster udgør en enhed, og at effekter på denne enhed kan medføre fosterskader. Som eksempel kan nævnes rygning, der kan nedsætte blodgennemstrømningen i moderkage-

gen og dermed bevirke forringet næringstilførsel til fosteret.

I litteraturen kan findes eksempler på en række mekanismer, hvorved kemiske stoffer kan påvirke et udviklende foster og dermed medføre en unormal udvikling eller funktion. Ændringerne er ikke umiddelbart synlige, men foregår på cellulært eller molekylært niveau. For at blive synlige må de foreslåede mekanismer føre til yderligere ændringer i celler eller væv, der til sidst fører til en fosterskade. I fig. 3.4 er givet en oversigt med nogle eksempler, og i det følgende omtales nogle af disse nærmere.



*Genmutationer* og *kromosomafvigelser* kan forekomme enten i kønscellerne eller i kropscellerne. Det er blevet anslået, at 20-30% af medfødte misdannelser hos mennesker er arveligt betingede og forekommer alene eller hovedsageligt pga mutationer i kønsceller. Mutationerne kan være foregået for flere generationer siden og først komme til udtryk senere. Kromosomafvigelser i kønscellerne, som fx tre i stedet for to eksemplarer af kromosom 21 (Downs syndrom), er årsag til ca 3% af medfødte misdannelser.

Mutationer i kropsceller hos fosteret nedarves ikke til kommende generationer. Sådanne mutationer i et foster i et tidligt stadium kan teoretisk påvirke tilstrækkelig mange celler til, at der kan opstå en strukturel eller funktionel defekt. Det skal dog nævnes, at mutationer er relativt sjældne, og at virkningsmekanismen bag fosterskadende stoffer, der også er mutagene, generelt kan skyldes, at disse stoffer er meget kemisk reaktive og

Figur 3.4. Eksempler på mekanismer bag fosterskader.

dermed kan påvirke både arveanlæg og vigtige makromolekyler i cellerne.

Biokemiske ændringer i cellerne kan påvirke *DNA's replikation* og *transskription* eller RNA's translation (*proteinsyntesen*) uden at forårsage arvelige ændringer i DNA. Stoffer, der påvirker fx DNA's transskription, kan forårsage misdannelser, mens dette har været vanskeligt at påvise for stoffer, der forstyrrer proteinsyntesen. Dette skyldes ikke, at denne proces ikke er væsentlig for fosterudviklingen, men tværtimod, at en reduktion i proteinsyntesen vil påvirke alle fosterets celler og derfor sandsynligvis medføre, at fosteret dør.

*Mangel på mikronæringsstoffer*, der er nødvendige for fosterudviklingen, vil oftest skyldes ændrede forhold hos moderen eller ændrede transportforhold over moderkagen. Som eksempel på det første kan nævnes, at visse kemiske stoffer virker som kompleksbindere, dvs at de binder mikronæringsstoffer som fx zink, således at den frie koncentration i blodet bliver lavere. Dette kan medføre fosterskader, uden at påvirkningen af moderen er af væsentlig betydning. Mangel på næringsstoffer kan også opstå hos fosteret pga tilstedeværelse af stoffer, der ligner fx vitaminer, aminosyrer o.a. Disse kan indgå i fosterets biosyntese i stedet for de normale næringsstoffer, men kan sjældent fungere helt tilsvarende, hvorfor de kan føre til fejludvikling eller fosterets død. Ændringer i transporten over moderkagen kan enten være direkte eller ske via ændringer i blodgennemstrømningen. Fx tyder undersøgelser på, at methylkviksølv kan ændre den aktive transport af aminosyrer over moderkagen uden at ændre blodgennemstrømningen, mens blyacetat kan reducere blodgennemstrømningen i moderkagen.

Mekanismen bag en række fosterskader kan også være, at kemiske stoffer pga lighed med fx hormoner eller neurotransmittere (signalstoffer i nervesystemet) påvirker receptorer på cellerne. Det kan betyde, at det normale signalsystem mellem cellerne og organerne i kroppen forstyrres, og kan føre til fejludvikling. Som eksempel kan nævnes, at påvirkning med kemiske stoffer, der ligner det kvindelige kønshormon (østrogen), kan tænkes at påvirke reguleringen af overordnede hormoner i hypofysen, hvis virkninger undertrykkes ved stor østrogenpåvirkning. Dette kan lede til hæmmet udvikling af fx støttecellerne til det sæddannende væv i testiklerne (Sertolicellerne) i fostertilstanden, og dermed hæmmet sædproduktion senere i livet. Kønshormoner har også betydning for kønsdifferentieringen og for fosterhjernens udvikling, og undersøgelser af visse kemiske stoffer med hormonlignende virkning, som fx PCB og DDT, har da også vist effekter på fosterhjernens udvikling.

## Metoder til påvisning af reproduktions-skadende effekter

Der findes mange forskellige metoder, der kan anvendes til at belyse, om kemiske stoffer kan forårsage reproduktionsskader. Disse omtales i det følgende, og metodernes fordele og ulemper gennemgås.

### Befolkningsundersøgelser

Den reproduktionsskadende effekt af kemiske stoffer kan som andre toksiske effekter undersøges ved epidemiologiske studier (se bind I, kapitel 5).

Det kan være vanskeligt at anvende enkelte erkendte tilfælde af reproduktionsskader (cases) til at udrede årsagen, fordi visse reproduktionsskader som fx aborter forekommer hyppigt, og de reproduktionsskadende effekter afhænger af, hvornår i reproduktionsforløbet påvirkningen er sket. Enkelte årsager til reproduktionsskader er dog blevet opdaget pga. ophobninger af let erkendelige reproduktionsskader. Som eksempler kan nævnes lægers iagttagelse af et øget antal medfødte misdannelser efter en epidemi af røde hunde samt opdagelsen af lægemidlet Thalidomids effekter på fosterudviklingen. I 1977 blev en gruppe mandlige arbejdere opmærksomme på, at de havde et fælles problem, nemlig at de ikke fik nogen børn. De satte dette i forbindelse med udsættelse for bekæmpelsesmidlet dibromchlorpropan (DBCP) på deres arbejde, og senere undersøgelser bekræftede denne sammenhæng.

*Beskrivende befolkningsundersøgelser* (deskriptiv epidemiologi), hvor effektregistre sammenkolbes med eksponeringsregistre, kan give en oversigt over fordelingen af reproduktionsskader i forskellige erhvervsgrupper, hyppigheden af reproduktionsskaders afhængighed af årstal eller omfanget af befolkningens udsættelse for reproduktionsskadende stoffer. Det kan være vanskeligt at opdage stigninger i forekomst af fx sjældne misdannelser vha registre, fordi misdannelserne registreres samlet i hovedgrupper. Som eksempel kan nævnes Thalidomid, hvor den øgede hyppighed af børn født med mangelfuld udvikling af arme og ben ikke blev bemærket i registreringer, fordi denne ellers sjældne form for misdannelse blev registreret sammen med andre former for misdannelser af arme og ben.

*Analytiske befolkningsundersøgelser* planlægges mhp afprøvning af en hypotese om en sammenhæng mellem en ekspone-

ring og effekt. Hypoteserne opstilles ofte ud fra en mistanke om sammenhæng, der fx kan stamme fra dyreeksperimentelle undersøgelser, fra cases eller fra en beskrivende befolkningsundersøgelse.

I en *kohorteundersøgelse* tages udgangspunkt i en gruppe af befolkningen, der er udsat for det kemiske stof, man har mistanke til, samt en kontrolgruppe, der ikke er udsat. De to grupper sammenlignes mht forekomsten af reproduktionsskader, og det analyseres, om der er en statistisk signifikant overhyppighed i den udsatte gruppe. I en *case-control undersøgelse* sammenlignes udsættelsen for et mistænkt kemisk stof i en gruppe af cases, dvs personer med en erkendt reproduktionsskade, med en gruppe af kontrolpersoner, og det analyseres, om der i gruppen af cases er en overhyppighed af personer udsat for det mistænkte stof. Ved valg af kontrolgruppe er det vigtigt, at denne gruppe ikke er udsat for andre reproduktionsskadende faktorer, der kan sløre billedet. Velkendte forhold, der kan påvirke reproduktionen, inddrages derfor normalt i analysen, såsom tobaksrygning, socialklasse, medicinindtagelse, alder mv.

Ved såvel kohorte- som case-control undersøgelser er det muligt at belyse, om der fx i bestemte erhvervs- eller branche-grupper er en øget hyppighed af reproduktionsskader. I en arbejdssituation er mennesker sjældent udsat for kun et enkelt kemisk stof. Der er næsten altid tale om blandingseksposering med udsættelse for såvel kemiske stoffer som fysiske, psykiske og biologiske faktorer. Det betyder, at man kan få viden om et erhverv, en arbejdsproces e.l., men sjældent om et enkelt stof. Der findes dog befolkningsundersøgelser, der udpeger bestemte kemiske stoffer, som fx bly, organisk kviksølv og PCB, som reproduktionsskadende. Andre undersøgelser tyder på, at kemiske stofgrupper som organiske opløsningsmidler, anæstesisgasser og visse typer bekæmpelsesmidler er potentielt reproduktionsskadende.

De fleste former for reproduktionsskader kan undersøges i befolkningsundersøgelser, men effekter, der viser sig lang tid efter udsættelsen for et kemisk stof, er vanskelige at relatere til udsættelsen. Der er dog enkelte tilfælde, hvor dette er lykkedes. Som eksempel kan nævnes lægemidlet diethylstilbestrol, hvor udsættelse i fostertilstanden bl.a. kan medføre, at pigebørn udvikler kræft i skeden i puberteten, dvs omkring 12-15 år efter udsættelsen. Grunden til, at denne sammenhæng blev påvist, er, at kræftformen er meget sjælden. Havde det været en relativt almindeligt forekommende kræftform, er det tvivlsomt, om sammenhængen var blevet erkendt.

Medfødte effekter på nervesystemet kan også være vanskelige at belyse i befolkningsundersøgelser. Disse effekter vil måske

først komme til udtryk mange år efter fødslen, fx som koncentrationsbesvær og nedsat indlæringssevne. Derudover er sådanne effekter påvirkelige af barnets sociale miljø, og kun alvorlige tilfælde vil blive opdaget. Som eksempel kan nævnes det føtale alkoholsyndrom, hvor børnene bl.a. er mentalt retarderede som følge af et stort alkoholforbrug hos moderen under graviditeten. En mindre udsættelse kan tænkes at medføre en mindre tydelig, men alligevel væsentlig, påvirkning af hjernens funktion. Hvis dette er tilfældet, vil det være vanskeligt at påvise hos mennesker.

## Dyreeksperimentelle undersøgelser

Eksperimentelle undersøgelser af kemiske stoffer kan foretages, før stofferne tages i brug af mennesker, eller før de har nogen videre udbredelse i arbejdsmiljøet. Det væsentligste argument for at udføre dyreeksperimentelle undersøgelser af kemiske stoffers effekter er således at forebygge reproduktionsskader hos mennesker.

Der er en række forskellige metoder, der anvendes ved undersøgelser for reproduktionsskadende effekter. For en del af disse er der test guidelines, dvs internationalt accepterede vejledende retningslinier for udførelsen af forsøgene. De forsøgstyper, der omtales nærmere i tabel 3.3, er udvalgt, fordi de anvendes hyppigt, og resultaterne indgår som en væsentlig del ved vurderingen af kemiske stoffers reproduktionsskadende effekter.

Tabel 3.3.  
Dyreeksperimentelle undersøgelser.

Test	Dosering	Effekt mål	Guidelines og anvendelse
Generationsforsøg	Tre eller flere dosisniveauer, kontinuert over en eller flere generationer	Fertilitet hos hanner og hunner Sæd kvalitet hos hanner og kønshormoncyklus hos hunner Præ-, peri- og postnatale effekter på æg, foster og afkom	Guideline fra OECD (revideres pt) Anvendes til testning af kemiske stoffer i EU
Teratogenforsøg	Tre eller flere dosisniveauer, i organdannelsesperioden eller hele fosterudviklingen	Resorptioner Fosterets vækst Morfologiske variationer og misdannelser	Guideline fra OECD (revideres pt) Anvendes til testning af kemiske stoffer i EU
Undersøgelse for medfødte nerveskader	Tre eller flere dosisniveauer, fra implantation af afkom til fravæning	Fødsel og drægtighedslængde Fysisk og funktionel modning af afkom Effekter på nervesystemets udvikling	Guideline for lægemidler Detaljeret guideline fra US-EPA, OECD guideline under udarbejdelse
Screeningstest for reproduktionsskader	Mindst tre dosisniveauer fra 2 uger før parring indtil dag 4 postnatale	Akutte effekter på fertilitet hos hanner og hunner Fødsel og drægtighedslængde Foster og afkoms vækst og overlevelse til dag 5	OECD guideline. Anvendes til testning af 'gamle' stoffer, der bruges i store mængder (High Production Volume Chemicals) Begrænset følsomhed pga færre dyr

### *Generationsforsøg*

Der er udgivet retningslinier for udførelse af generationsforsøg af bl.a. OECD, Food and Drug Administration (FDA) i USA samt EU.

I generationsforsøg doseres både han- og hundyr før parringen, i hele drægtighedsperioden og efter fødslen indtil fravæning af ungerne. I flergenerationsforsøg fortsætter udsættelsen af dyrene og deres afkom i flere generationer. Der undersøges for effekter på fertilitet, parring, befrugtning, fosterudvikling, fødsel, diegivning samt ungeres opvækst og udvikling.

Flergenerationsforsøg giver et overblik over, om der forekommer reproduktionsskadelige effekter i løbet af hele reproduktionscyklus, men er ressourcekrævende.

Nogle fosterskader, såsom dødfødsel og medfødte misdannelser, kan vanskeligt opdages i generationsforsøg. Dette skyldes, at de almindeligt anvendte forsøgsdyr (små gnavere) normalt æder dødfødte eller alvorligt misdannede unger lige efter fødslen. Hvis det kun er enkelte unger, der er misdannede eller dødfødte, vil reduktionen i antallet af unger pr kuld være lille i forhold til den almindelige variation i kuldstørrelse, og effekten opdages derfor ikke.

OECD's generationsforsøg er i disse år ved at blive revideret, således at der tilføjes undersøgelser af påvirkning af sædkvalitet hos hanner og kønshormoncyklus (østruscyklus) hos hunner. For hannernes vedkommende udtages sæd fra bitestiklerne efter aflivning af dyrene, og sædcellernes form, antal og bevægelse undersøges. Begrundelsen for at tilføje undersøgelser af sædkvaliteten er, at undersøgelser har vist, at selv en markant påvirkning af antallet af sædceller hos det normalt anvendte forsøgsdyr (rotten) ikke påvirker fertiliteten. Der er ikke en helt klar sammenhæng mellem sædkvaliteten og muligheden for at få sundt afkom, men undersøgelser af mennesker tyder på, at nedsat sædkvalitet kan have sammenhæng med nedsat evne til at opnå befrugtning.

### *Teratogenforsøg*

Der findes accepterede guidelines for udførelse af teratogenforsøg fra OECD, FDA og EU.

I teratogenforsøg udsættes drægtige dyr for det stof, der skal undersøges, i den periode, hvor organerne dannes, fordi fosteret er mest følsomt for fremkaldelse af misdannelser i denne periode (se fig. 3.2). Da fosterskader kan opstå under hele fosterudviklingen, anbefales det ofte at udvide udsættelsen af dyrene til hele drægtighedsperioden. OECD's teratogenforsøg er for tiden ved at blive revideret, bl.a. således at doseringsperioden udvides til at omfatte hele perioden før fødslen.

Dagen før dyrene forventes at føde, aflives de, og fostrene undersøges. Der registreres antallet af fostre, hvor mange der er levende og døde, fostrenes vægt samt forekomst af synlige misdannelser hos fostrene. De gule legemer i æggestokkene tælles som et udtryk for, hvor mange æg der er løsnet, og antallet af resorptioner (døde, tilbagedannede fostre) registreres. Ud fra tallene beregnes præimplantationstabet, dvs hvor mange af de befrugtede æg der ikke har sat sig fast i livmoderen, samt postimplantationstabet, dvs hvor mange af de æg, der har sat sig fast i livmoderen, der ikke udvikles til levedygtige fostre.

Efter aflivning af fostrene præpareres halvdelen, så de bliver gennemsigtige, dernæst farves skelettet, og det undersøges, om der forekommer forsinket udvikling, variationer eller misdannelser ved skelettet. Den anden halvdel af fostrene undersøges for forsinket udvikling, variationer og misdannelser i de indre organer enten som serielle snit af fosteret eller ved dissektion under en stereolup.

Testen er især udviklet efter Thalidomid-katastrofen og lægger derfor stor vægt på strukturelle misdannelser. Den giver dog også oplysning om andre vigtige parametre, nemlig om fosterudviklingen er forsinket, og om, hvor mange af de befrugtede æg der udvikles til levedygtige fostre.

Funktionelle forandringer hos fosteret og fosterskader, der først viser sig under individets opvækst, kan ikke opdages i teratogenforsøg.

#### *Undersøgelse for effekter, der viser sig efter fødslen, især medfødte nerveskader*

Der findes overordnede retningslinier for udførelse af sådanne forsøg på lægemidler bl.a. i EU og i Japan, mens OECD er i gang med at udvikle en detaljeret guideline for undersøgelser af kemiske stoffer for medfødte nerveskader.

Drægtige dyr udsættes for det stof, der skal undersøges, i drægtighedsperioden og evt også i diegivningsperioden. Når doseringen fortsættes i diegivningsperioden, skyldes det, at hjernens udvikling hos gnavere ved fødslen kun svarer til hjernens udvikling hos et menneskefoster på ca 6 måneder. Hjernens udvikling fortsætter efter fødslen indtil 2-års alderen hos mennesker og indtil fravæningstidspunktet hos gnavere. Ud over at give oplysninger om udskillelse i mælken er dosering i dieperioden således nødvendig for at belyse effekter på hjernens udvikling.

Der registreres antallet af unger, disses vækst og fysiske udvikling samt udføres adfærdsundersøgelser. Funktionelle forandringer, der er opstået i fostertilstanden, kan under ungerens opvækst vise sig som nedsat vækst, øget dødelighed eller ændret adfærd.



Tabel 3.4. Effektmål i dyre-eksperimentelle undersøgelser for medfødte nerveskader. (OECD 1996).

Effektmål	Før fravæning	Efter fravæning	Unge voksne
Vægt og fysisk udvikling	Vægt	Vægt og kønsmodning	Vægt
Udvikling af reflekser	Mindst to gange ligeligt fordelt over perioden		
Motorisk aktivitet (inklusive habituering)	+	+	+
Motorisk funktion	(+)	+	
Sansefunktion		(+)	+
Indlæring og hukommelse		+	+

Der er ikke udarbejdet detaljerede retningslinier for, hvilke adfærdsundersøgelser der bør udføres, men i den kommende OECD guideline skal afkommets motoriske udvikling, sansefunktion, aktivitetsniveau samt indlæring og hukommelse undersøges (se tabel 3.4). Derudover skal der foretages histopatologiske undersøgelser af især nervesystemet ved eksponeringens ophør og ved forsøgets afslutning.

I nogle undersøgelser undersøges tillige for neurokemiske ændringer i hjernen.

#### *Korttids in vivo test*

I OECD er der i 90'erne blevet udviklet en guideline for en screeningstest for reproduktionsskader, dvs en test, der er hurtigere og mindre ressourcekrævende end de hidtige tests. Testen blev oprindeligt udviklet specielt til testning af 'gamle' kemiske stoffer, der bruges i store mængder, men hvor der ikke findes undersøgelser for reproduktionsskadende effekter, men er nu accepteret i OECD som screeningstest for kemiske stoffer generelt.

Formålet med testen er at få et indtryk af, om et kemisk stof kan påvirke forplantningsevne eller fosterudvikling, og den højeste dosis skal derfor medføre en tydelig effekt på voksne dyr. Doseringen af dyrene startes 2 uger før parring og fortsætter indtil dag 4 efter ungerens fødsel. Det registreres, om der er akutte effekter på hanner og hunners fertilitet, på fødselsforløb og drægtighedslængde samt på fostrenes og afkommets vækst og overlevelse indtil dag 5 efter fødslen.

Antallet af forsøgsdyr er under halvdelen af dem, der anvendes i de øvrige OECD tests, og testen er derfor heller ikke tænkt som et alternativ eller en erstatning for de eksisterende guideliner for generationsforsøg og teratogenforsøg. Hvis der findes effekter i testen, kan resultaterne anvendes til indledende farlighedsvurdering og til planlægning af yderligere testning.

Resultaterne af en test, der ikke viser effekter, har en begræn-

set værdi sammenlignet med generationsforsøg og teratogenforsøg, fordi testen anvender færre dyr pr gruppe og dermed har en lavere følsomhed, doseringsperioden er kortere, og antallet af effektmål er begrænset.

#### *Undersøgelser vedr. stoffer med hormonlignende virkning*

De senere års debat vedr. reproduktionsskader som følge af udsættelse for stoffer med mistænkt hormonlignende virkning har betydet, at man for tiden er i gang med at vurdere, om de ovennævnte forsøgstyper, hvor der er OECD test guidelines, kan påvise sådanne stoffers effekter, eller om det er nødvendigt at udvikle særlige tests på området.

Generationsforsøget kan give en del væsentlige informationer, når revisionen er gennemført, dvs når der tilføjes undersøgelser af sædkvalitet og kønshormoncyklus. Derudover er det foreslået at supplere med målinger af kønshormoner i blod, yderligere undersøgelser af kønsorganer samt mere detaljerede undersøgelser af afkommet, men følsomheden af de forskellige parametre skal undersøges yderligere.

Undersøgelser for medfødte nerveskader kan også give relevante oplysninger, fordi man her kan undersøge, om der forekommer ændringer i kønsspecifik adfærd, og om hjernens udvikling er påvirket.

Man har siden 20'erne anvendt Allen-Doisy-test og uterus test som to klassiske østrogen bioassays, dvs de viser effekt, hvis stoffet har en østrogenlignende virkning. Stoffet med østrogen effekt forårsager dels prolifering og forhorning af slimhindecellerne i skeden, dels en øget vægt af livmoderen (uterus) pga en høj mitoseaktivitet. Der anvendes til de to forsøg unge dyr, der ikke er kønsmodne, eller kastrerede hunmus eller rotter, som mangler den naturlige østrogenproduktion. Vha disse to modeller kan det undersøges, om stoffer har østrogen- eller anti-østrogenlignende effekt.

#### *Andre forsøgstyper*

Indikation på reproduktionsskadende effekt kan også fås fra forsøgstyper, der ikke direkte er udviklet til dette formål. I 28-dages forsøg, dvs forsøg hvor voksne dyr udsættes i 28 dage for et kemisk stof, kan der fx opdages effekter på kønsorganerne.

Viden om et stofs kræftfremkaldende effekt er væsentlig, da en del kræftfremkaldende stoffer tillige er reproduktionsskadende, formentlig fordi de er meget reaktive stoffer. Hvis stoffet kan transporteres over moderkagen i væsentlige mængder, er der grundlag for at mistænke stoffet for at være et transplacentalt carcinogen, dvs det vil kunne fremkalde kræft hos fostre. En del stoffer, der er påvist at være kræftfremkaldende, medfører kræft

ved udsættelse for en lavere dosis, når udsættelsen for stoffet sker under fosterudviklingen, end hvis den sker hos voksne dyr.

Undersøgelser over stoffers kinetik giver oplysninger om kemiske stoffers optagelse, fordeling, omsætning og udskillelse. Hvis der ved sådanne undersøgelser vises, at et kemisk stof transporteres over moderkagen til fosteret i væsentlige mængder, må man forvente, at stoffet kan forårsage samme effekter på fosteret som på voksne dyr. Dette er bl.a. en grund til, at organiske opløsningsmidler mistænkes generelt for at kunne forårsage skader på fostres nervesystem.

## Vurdering af dyreeksperimentelle undersøgelser

En væsentlig fordel ved dyreeksperimentelle undersøgelser er, at udsættelsen af dyrene foregår under kontrollerede forhold. Efter et velgennemført dyreforsøg kan man vurdere, om udsættelse for det undersøgte stof har medført en øget forekomst af *reproduktions-skader i den undersøgte dyreart*.

Ved vurderingen af et dyreforsøg skal forsøgets følsomhed indtages. Følsomheden afhænger bl.a. af det anvendte antal dyr. I teratogenforsøg anbefales det at have mindst 20 dyr i hver gruppe. Med dette antal dyr kan der kun påvises store forøgelser (ca 10 gange) i hyppigheden af misdannelser. For at øge et teratogenforsøgs følsomhed er det derfor vigtigt at se på andre typer af fosterskader, fx forsinket udvikling, aborter/resorptioner og lav fødselsvægt.

Ud over at sammenligne den doserede gruppe med kontrolgruppen sammenlignes i nogle forsøg også med en såkaldt "historisk kontrol", dvs den samlede viden fra tidligere kontrolgrupper af samme dyrestamme på ens eget laboratorium, hvilket kan give et bedre grundlag for at vurdere de fundne effekter. Fx kan en lille, men signifikant øgning i antallet af resorptioner i en doseret gruppe skyldes, at kontrolgruppen har et usædvanligt lavt antal resorptioner i forhold til alle tidligere kontrolgrupper i samme dyrestamme i samme tidsperiode. I et sådant tilfælde peger forsøgsresultaterne ikke på en fosterskadende virkning. Omvendt kan man ikke anvende den højeste værdi, der er set i den "historiske kontrol" over en længere tidsperiode, som baggrund for at vurdere en funden effekt.

Betydningen af fosterskader ved doser, der påvirker moderdyret, er en hyppig årsag til diskussion, fordi en del skader på fostre kan opstå pga toksiske effekter på moderdyret. Hvilke skader der ses, afhænger af dyrearten - fx udvikler rottefostre ofte ekstra ribben, mens musefostre ofte får ganespalte. Dette kan ikke tages som et udtryk for, at stoffet hos mennesker vil

give de samme effekter. I nogle artikler ses helt bort fra effekter på fosteret, hvis der er fundet effekter på moderdyret - i andre nævnes effekter på moderdyret slet ikke. Det bedste er selvfølgelig at angive det fundne, fx 'stoffet har forårsaget misdannelser ved doser, der også forårsagede lidt nedsat vægtstigning hos moderdyret'. Vurderingen af effektens betydning for mennesker afhænger derefter af, om effekten på fosteret er forårsaget af effekten på moderen, og af, hvilken eksponering mennesker udsættes for.

Ved vurdering af resorptioner, når der samtidig er effekt på moderdyrets vægtstigning, er det væsentligt at inddrage i vurderingen, at moderdyret får en mindre tilvækst under drægtigheden, når nogle af afkommet er blevet til resorptioner (døde) og derfor ikke vejer nær så meget som et fuldt udviklet afkom. I disse tilfælde behøver den mindre tilvækst hos moderen ikke at være årsagen til, at ungerne dør - det kan være lige omvendt.

Når resultaterne fra dyreforsøg skal anvendes til at vurdere muligheden for effekter på mennesker, må man ekstrapolere fra dyreforsøg til mennesker.

Der er stor biologisk lighed mellem mennesker og forsøgsdyr mht den hormonelle regulering af forplantningen og kønscelledannelsen. Ved en sammenligning af resultater fra dyreforsøg med de oplysninger, der findes om kemiske stoffers effekter på menneskets forplantningsevne, ses en relativt god sammenhæng. Dette gælder fx ved undersøgelse af effekter på menstruationscyklus, hvor det er vist, at stoffer, der er mistænkt for at påvirke menstruationscyklus hos kvinder, påvirker de tilsvarende biologiske processer hos gnavere og aber. Ligeledes ser det ud til, at stoffer, der kan påvirke sædkvaliteten hos dyr, ofte har en tilsvarende effekt på mænd. Et eksempel på dette er bekæmpelsesmidlet Dibromchlorpropan, hvis effekter (testikelsvind og nedsat frugtbarhed) er observeret i dyreforsøg og hos mænd.

Fosterudviklingen hos mennesker og forsøgsdyr følger generelt det samme grundlæggende skema, og der er fundet god sammenhæng mellem de stoffer, der forårsager fosterskadende effekter på mennesker og på forsøgsdyr. Der er foretaget flest sammenligninger mht misdannelser, fordi det er det område, hvor der er mest viden. Medfødte nerveskader er et relativt nyere område, men også her er det fundet, at de stoffer, der har forårsaget effekter på mennesker, medfører lignende effekter på forsøgsdyr.

Generelt er vurderingen af anvendeligheden af dyreforsøg til at forudsige reproduktionsskadende effekter på mennesker, at *effekter i velgennemførte dyreforsøg peger på, at der er risiko for effekter på mennesker, medmindre grundige undersøgelser viser, at mekanismen i dyreforsøget ikke er relevant for mennesker.*

I dyreforsøg anvendes ofte relativt høje doser, og det kan være vanskeligt at vurdere betydningen af effekter set ved doser langt højere end de, der er relevante for mennesker. Der er dog foretaget en del sammenligninger af de doser, der forårsager fosterskader hos hhv dyr og mennesker, og disse tyder på, at *menne-sket er er mere følsomt end de anvendte forsøgsdyr*.

## In vitro tests

Ved in vitro tests forstås i denne sammenhæng tests baseret på celler, væv, organer eller fostre, der ikke vokser i den levende organisme, men dyrkes i forskellige medier.

Da dyreforsøg er ressourcekrævende, og man ønsker at reducere anvendelsen af forsøgsdyr, arbejdes der på at udvikle in vitro tests inden for reproduktionstoksikologien. De tænkes anvendt på lignende måde, som fx Ames test anvendes inden for kræftområdet, dvs til screening og prioritering af stoffer til undersøgelse i dyreforsøg.

Der findes en lang række forskellige in vitro tests inden for området reproduktionstoksikologi, men udviklingen har i mange år været koncentreret om at finde in vitro tests, der kan undersøge for fosterskadende virkning. I de senere år er der dog også sket en intensivning af udviklingen af tests, der kan anvendes til at undersøge, om stoffer har hormonlignende virkning.

### *In vitro tests for fosterskadende virkning*

Inden for dette område er der udviklet en lang række forskellige testsystemer, hvor fx en vævskultur eller fosterkultur doseres med det stof, der skal undersøges (se tabel 3.5). I embryokulturtesten doseres i en del af den periode, hvor organerne dannes, fordi det er den mest følsomme periode mht strukturelle misdannelser. Embryonernes vækst, udvikling og misdannelseshyppighed vurderes og registreres.

Der er ikke udarbejdet guidelines for udførelse af in vitro tests, men enkelte tests er meget gennemarbejdede i de laboratorier, der udfører dem.

Hvis det i fremtiden kan vises, at der er god overensstemmelse mellem resultater fra disse in vitro tests og dyreforsøg/humane data, ville sådanne in vitro tests kunne anvendes til screening af kemiske stoffer for fosterskadende effekter. For tiden er der dog ikke fundet god sammenhæng, hvilket formentlig skyldes, at fosterskader kan opstå ved mange forskellige mekanismer, og at in vitro tests, til forskel fra forsøg med drægtige dyr, kun kan belyse enkelte sider af den komplekse proces, der ligger til grund for fosterets udvikling i livmoderen.

Test	Testsystem og procedure	Effekt mål	Anvendelse
<b>Foster (whole embryo) kulturer</b>			
Postimplantation whole embryo culture	Pattedyrfostre (normalt rotter), udvikling af foster fra tidligt stadium	Død, misdannelser, vækstretardering, differentiering	Screening, mekanismestudier
Præimplantation embryo culture	Præimplantation pattedyrfostre (rotter eller mus), udvikling af intakt embryon fra to-celle stadium eller blastocyst stadium	Død, celledelinger, kromosomanomalier	Mekanismestudier, genetiske analyser
CHEST (Chick Embryo Toxicity Screening Test)	Kyllingeembryoner, morfologisk udvikling af tidlige (CHEST I) eller mere avancerede stadier (CHEST II) af intakte embryoner	Død, misdannelser, vækstretardering	Mekanismestudier, screening
FETAX	Frøembryoner ( <i>Xenopus laevis</i> ), udvikling fra blastula til embryon	Død, misdannelser, vækstretardering	Mekanismestudier, screening
<i>Hydra</i>	Dissocierede voksne <i>Hydra</i> celler, reorganisering og differentiering af celler	Dannelse af normal voksen <i>Hydra</i>	Mekanismestudier, screening
<i>Drosophila</i>	Bananfluelarve, udvikling i intakt system	Død, misdannelser, vækstretardering	Mekanismestudier, screening
<b>Organkulturer</b>			
Limb bud cultures	Kultur med embryonale/føtale lemmeanlæg fra museembryoner	Misdannelser, differentiering, vækstretardering	Mekanismestudier
<b>Primære kulturer af fosterceller</b>			
Chick embryo neural crest and limb bud	Celler fra nerve- og lemmeanlæg fra kyllinger, histologisk differentiering og syntese af proteoglycan	Celledifferentiering, vækstretardering	Screening
Micromass culture	Celler fra midthjerne og lemmeanlæg fra rottefostre	Celledifferentiering, vækstretardering	Screening
Chick embryo neural retina cell culture	Kultur af kyllingeembryoners neurale retina celler, dannelse af aggregater af celler	Celledifferentiering, vækstretardering	Mekanismestudier
<i>Drosophila</i> neuroblasts and myoblasts	Neuro- og myoblast celler fra <i>Drosophila</i> , cellulær differentiering af neuro- og myoblast celler fra fostre	Celledifferentiering og toksicitet	Screening
<b>Etablerede cellelinier</b>			
MOT (Mouse ovarian tumor)	Celler fra tumor i museovarier, måling af evne til at fastgøre sig	Fasthæftning, vækstretardering	Screening
HEMP	Humane embryonale palatal mesenchym celler, celleproliferation	Cellevækst	Screening
Neuroblastoma cell differentiation	Muse neuroblastoma celler, differentiering af celler til neuroner	Cellevækst og differentiering	Screening

### *In vitro* metoder til detektering af hormoneffekter

I de senere år er der fokuseret mere og mere på de mulige sundhedsskadelige effekter, som kan forårsages af østrogenlignende stoffer i miljøet og i kosten. Der er yderligere opstillet den hypotese, at ikke alene østrogenlignende, men også andro-

Tabel 3.5. Oversigt over *in vitro* teratogen tests. (Ud fra Jakobsen og Wiger, 1994).

genlignende stoffer og AH (aryl hydrocarbon) receptor agonister kan være involverede i det faldende sædtal og andre reproduktions-skader hos manden. Alt dette har medført udvikling af mekanisme-baserede in vitro assays, som er i stand til at detektere kemikalier med hormonlignende virkning.

*Østrogen receptor assays (MCF7 celle proliferations assay)* er baseret på brystcancer-celler, hvis vækst er afhængig af østrogen-er eller østrogenlignende stoffer. Cellevæksten kan undersøges på mange forskellige måder, fx kan der måles optagelse af radioaktivt materiale i det nydannende DNA, eller cellerne kan tælles. Fordelen ved dette assay er, at det er relativt nemt at etablere, ulempen er, at også stoffer med andre virkningsmekanismer (mitogene stoffer, som fx vækstfaktorer), der ikke virker via østrogen-receptoren, kan være i stand til at påvirke væksten af cellerne.

Ud over at måle selve væksten af MCF7 cellerne, er andre endepunkter for østrogen-aktivitet blevet anvendt, fx østrogen- og progesteron-receptorniveauer og induktion af proteinet pS2.

Et alternativt og meget følsomt østrogen-assay bygger på gær-celler, hvor et positivt respons i dette assay måles som et farveskift, der kan måles spektrofotometrisk. Fordelen ved dette assay er, at det er nemt og relativt hurtigt at udføre, det har dog den ulempe, at det ikke er baseret på humane celler.

*Androgen receptor assays.* På nuværende tidspunkt er der begrænsede muligheder for at screene for androgene effekter. Den metode, der er blevet anvendt til detektering af de få antiandrogene, der er fundet til dato, bygger på en pattedyrcellelinie, hvor et positivt respons kan måles som en øget lysmængde. Metoden er meget sensitiv, men ikke specielt nem at etablere. For øjeblikket arbejdes der på at udvikle en mere stabil metode, der må forudses på længere sigt at blive den foretrukne.

Analogt med østrogen-assayet baseret på gær-celler er der udviklet et tilsvarende androgen receptor assay, men dette assay har dog ikke fundet bred anvendelse.

#### *Aryl hydrocarbon (AH) receptor assay*

Aromatiske hydrocarboner som polychlorerede biphenyler, dioxiner og polyaromatiske hydrocarboner binder til og aktiverer en bestemt receptor, der findes i de fleste celler (AH-receptoren). Det menes, at denne receptor er involveret i de reproduktions-skadende effekter, som nogle af de aromatiske hydrocarboner besidder, og at det derfor er relevant at screene miljøfremmede stoffer for deres evne til at aktivere denne receptor. Rotte-, muse- eller de humane celler, som bruges i dette Chemically Activated Luciferase Expression assay (CALUX), er blevet transfekteret med et plasmid indeholdende et luciferase reporter gen

forudgået af adskillige dioxin respons-elementer, til hvilke receptor-ligand kompleks binder. Cellerne i dette assay udtrykker konstitutivt den cytosoliske AH-receptor. Stigningen i luciferase aktivitet er således et mål for stoffets evne til at binde til AH-receptoren.

Der er stadig meget at afklare omkring samspillet mellem kemiske stoffer og reproduktionssystemet, og efterhånden som der opnås mere information, vil der formentlig udvikles andre in vitro assays, der sigter mod at undersøge kemikalier, der påvirker andre trin i reproduktionsprocessen eller har andre virkningsmekanismer end de ovennævnte anvendte assays.

## Anvendelse af in vitro tests

In vitro tests er velegnede til at undersøge, om stoffer har en bestemt virkningsmekanisme, der er relevant for reproduktionsskadende effekter, og in vitro undersøgelser kan således give oplysninger, der kan supplere fx epidemiologiske undersøgelser og dyreforsøg.

Anvendelse af in vitro tests til screening af kemiske stoffer, dvs en hurtig test for, om stofferne er reproduktionsskadende eller ej, forudsætter imidlertid, at der er en eller meget få fælles mekanismer bag reproduktionsskadende effekter, hvilket som tidligere nævnt ikke er tilfældet (se afsnit om mekanismer). Derudover kan der i kroppen ske omdannelse af stofferne, så fx et stof, der i en cellekultur har østrogenre lignende virkning, omdannes i kroppen til et stof uden virkning og omvendt. Dette betyder, at in vitro tests ikke kan anvendes til at forudsige virkningen i den levende organisme med sikkerhed, hvorfor det er nødvendigt at anvende dyreforsøg eller epidemiologiske studier til at afgøre, om et kemisk stof er reproduktionsskadende.

## Analogislutninger

Analogislutninger betyder, at man drager konklusioner om fx virkningsmekanismen af et stof ud fra dets lighed med andre stoffer. Som lighed mellem stofferne tænkes oftest på, at stofferne har stort set samme fysisk-kemiske egenskaber eller kemiske struktur.

Som eksempel på stoffer med næsten samme fysisk-kemiske egenskaber kan nævnes en række organiske opløsningsmidler (toluen, xylen, styren). Disse stoffer er letflygtige og meget fedtopløselige. Det ser ud til, at de stoffer i gruppen, der er under-



søgt, kan passere moderkagen samt forårsage reproduktionsskader. Ud fra analogislutninger kan lignende organiske opløsningsmidler, fx trimethylbenzen, mistænkes for at kunne have tilsvarende effekt.

Hvis ligheden mere præcist går på stoffets kemiske struktur, kaldes det struktur-aktivitet-analyse. Dette kan pege på stoffer, der ud fra deres kemiske struktur må mistænkes for at kunne have reproduktionsskadende effekt.

Som et eksempel på stoffer med samme virkningsmekanisme kan nævnes stoffer, der er kompleksbindere. Det vides, at nogle af disse stoffer kan medføre fosterskader, og det formodes, at mekanismen er, at stofferne binder mikronæringsstoffer, der er nødvendige for fosterudviklingen. Det er nærliggende at antage, at andre kompleksbindere, der på lignende måde binder mikronæringsstoffer, kan forårsage fosterskader.

Analogislutninger kan således anvendes til at udpege kemiske stoffer som potentielt reproduktionsskadende. En afklaring af, om stoffet er reproduktionsskadende, vil kræve undersøgelser af stoffet i dyreforsøg eller gennemførelse af befolkningsundersøgelser.

## Kemiske stoffer med reproduktionsskadende effekter

### EU-kriterier for vurdering af kemiske stoffer

Ved kriterier forstås den viden, der er nødvendig for at anse et kemisk stof for at have effekt. Indtil for relativt få år siden fandtes kun internationalt accepterede kriterier for, om stoffer kunne forårsage misdannelser, men inden for de sidste 10 år er der blevet udarbejdet kriterier for reproduktionsskadende effekt.

I EU er der i 1993 i forbindelse med klassificering og mærkning af farlige kemiske stoffer og produkter blevet udarbejdet kriterier for kategorisering af reproduktionsskadende stoffer i tre kategorier. Effekterne omfatter:

- ◆ Skadelige virkninger på forplantningsevne såsom libido (lyst), seksualadfærd, spermatogenese/oogenese, hormonaktivitet og fysiologiske reaktioner, som kan gribe ind i forplantningsevnen, selve forplantningen eller udviklingen af de befrugtede æg indtil og inklusive implantationen.

- ◆ Skader på afkommet (udviklingstoksicitet), der inkluderer både virkninger, der forårsages eller viser sig før fødslen, og virkninger, som først kommer til udtryk efter fødslen. Effekterne omfatter embryotoksiske/føtotoksiske virkninger som reduceret legemsvægt, retarderet vækst/udvikling, organotoksicitet, dødsfald, aborter, strukturelle defekter (teratogene effekter), funktionelle effekter, peri- og postnatale defekter samt hæmmet postnatal mental eller fysisk udvikling frem til og inklusive normal pubertetsudvikling.

Inddelingen i de tre kategorier fremgår af tabel 3.6, der også viser den mærkning, stofferne skal have på etiketten. Mærkningen er ens for stofferne i kategori 1 og 2, dvs at stoffer, hvad enten de er vist reproduktionsskadende hos mennesker eller hos forsøgsdyr, i praksis behandles ens.

Tabel 3.6. EU-kriterier for klassificering af kemiske stoffer som reproduktionsskadende.

Kategorier	Omfatter kemiske stoffer, hvor der er	Opdeling	Mærkning og risikosætninger
Kategori 1		Stoffer, der vides at forringe menneskers forplantningsevne	T, "Giftig", R60 Kan skade forplantningsevnen
		Stoffer, der vides at forårsage skader på afkommet hos mennesker	T, "Giftig", R61 Kan skade barnet under graviditeten
Kategori 2		Stoffer, der bør anses for at forringe menneskers forplantningsevne	T, "Giftig", R60 Kan skade forplantningsevnen
		Stoffer, der bør anses for at forårsage skader på afkommet hos mennesker	T, "Giftig", R61 Kan skade barnet under graviditeten
Kategori 3		Stoffer, der giver anledning til betænkelighed mht menneskers forplantningsevne	Xn, "Sundhedsskadelig", R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
		Stoffer, der giver anledning til betænkelighed mht skader på afkommet hos mennesker	Xn, "Sundhedsskadelig", R63 Mulighed for skade på barnet under graviditeten

I tabel 3.7 vises de kemiske stoffer, der er klassificerede som reproduktionsskadende i EU i 1997. En række stoffer er foreslået klassificerede og behandles for tiden, bl.a. har Danmark foreslået, at toluen skal klassificeres som fosterskadende på baggrund af flere dyreforsøg, der har vist, at inhalation af toluen kan forårsage nedsat fødselsvægt, og enkelte forsøg, der har vist, at toluen kan påvirke hjernens udvikling og medføre nedsat indlæringssevne.

I EU's kriterier indgår ikke potensvurdering, dvs vurdering af størrelsen af den dosis, der skal til for at fremkalde reproduktionsskader, bortset fra at det nævnes, at formålet er at klassificere stoffer, der har effekt ved normal håndtering og brug.

Tabel 3.7. Klassificerede reproduktionsskadende kemiske stoffer i EU (1997). (Udtræk ved J. Niimela fra Bekendtgørelse af listen over farlige stoffer, Miljøstyrelsen 1997).

CAS-nr.	Stofnavn	Risikosætninger, reproduktionsskader*
- -0	Salte og estre af Dinoseb	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
- -0	Salte og estre af Dinoterb	R61 Kan skade barnet under graviditeten
- -0	Blyforbindelser med undtagelse af dem, der er nævnt andre steder	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
- -0	Bly alkylter	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
50-32-8	Benzo(a)pyren	R60 Kan skade forplantningsevnen R61 Kan skade barnet under graviditeten
75-15-0	Carbon disulphid	R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen R63 Mulighed for skade på barnet under graviditeten
81-81-2	Warfarin	R61 Kan skade barnet under graviditeten
88-85-7	Dinoseb	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
96-12-8	1,2-dibromo-3-chloropropan	R60 Kan skade forplantningsevnen
96-45-7	Ethylen thiourea	R61 Kan skade barnet under graviditeten
98-95-3	Nitrobenzen	R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
109-86-4	2-methoxyethanol	R60 Kan skade forplantningsevnen
110-49-6	Methylglycol acetat	R60 Kan skade forplantningsevnen R61 Kan skade barnet under graviditeten
110-80-5	2-ethoxyethanol	R60 Kan skade forplantningsevnen R61 Kan skade barnet under graviditeten
111-15-9	Ethylglycol acetat	R60 Kan skade forplantningsevnen R61 Kan skade barnet under graviditeten
301-04-2	Bly di(acetat)	R61 Kan skade barent under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
485-31-4	Binapacryl	R61 Kan skade barnet under graviditeten
592-62-1	Methyl azoxy methyl acetat	R61 Kan skade barnet under graviditeten
630-08-0	Carbon monoxid	R61 Kan skade barnet under graviditeten
1335-32-6	Bly acetat	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
1344-37-2	C.I. Pigment Yellow 34	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
1420-07-1	Dinoterb	R61 Kan skade barnet under graviditeten
1689-83-4	Ioxynil	R63 Mulighed for skade på barnet under graviditeten

Fortsættes næste side

CAS-nr.	Stofnavn	Risikosætninger, reproduktionsskader*
1689-84-5	Bromoxynil	R63 Mulighed for skade på barnet under graviditeten
1689-99-2	Bromoxynil octanoat	R63 Mulighed for skade på barnet under graviditeten
1836-75-5	Nitrofen	R61 Kan skade barnet under graviditeten
2385-85-5	Mirex	R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen R63 Mulighed for skade på barnet under graviditeten
2508-74-6	Bly hexafluorosilicat	R61 Kan skade barnet under graviditeten
3861-47-0	loxynil octanoate	R63 Mulighed for skade på barnet under graviditeten
7446-27-7	Tribly bis(orthophosphat)	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
7758-97-6	Bly chromat	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
7784-40-9	Bly hydrogen arsenat	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
12656-85-8	C.I. Pigment Red 104	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
13424-46-9	Bly azid	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
13463-39-3	Nikkel tetracarbonyl	R61 Kan skade barnet under graviditeten
15245-44-0	Bly styphnat	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
17570-76-2	Bly(II) methanesulphonat	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
25808-74-6	Bly hexafluorosilicat	R61 Kan skade barnet under graviditeten R62 Mulighed for skade på forplantningsevnen
80397-97-9	2-ethylhexyl 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenylmethylthioac	R61 Kan skade barnet under graviditeten

\* Stofferne er i mange tilfælde også mærkede for andre typer toksiske effekter

## Reproduktionsskadende kemiske stoffer i arbejdsmiljøet

Arbejdsmiljøinstituttet har i 1991 i projektrapporten "Reproduktionsskadende kemiske stoffer i arbejdsmiljøet" vurderet en række kemiske stoffers reproduktionsskadende effekt. Dette arbejde foregik, før de nye EU-kriterier for reproduktionsskadende effekter var blevet opstillet, og der blev derfor anvendt følgende kriterier til vurdering af, om stofferne havde effekt:

*Gruppe 1.* Stoffet anses for reproduktionsskadende,

- ◆ hvis der er påvist reproduktionsskader i befolkningsundersøgelser, eller

- ◆ hvis der er påvist reproduktionsskader i mindst to dyrearter, eller
- ◆ hvis der er påvist reproduktionsskader i en dyreart og en enkeltstående befolkningsundersøgelse.

*Gruppe 2.* Stoffet anses for mistænkt reproduktionsskadende,

- ◆ hvis der er påvist reproduktionsskader i en dyreart, eller
- ◆ hvis der er påvist reproduktionsskader i en enkeltstående befolkningsundersøgelse.

Overordnet set ligner disse kriterier de senere EU-kriterier, idet gruppe 1 svarer til EU's kategori 1 og 2, og gruppe 2 til EU's kategori 3.

Projektets formål var at udarbejde en liste over reproduktionsskadende kemiske stoffer samt at kortlægge, hvor disse stoffer anvendes eller forekommer i det danske arbejdsmiljø. For at få et mål for farligheden af de reproduktionsskadende stoffer blev disses styrke (potens) bedømt ved at sammenligne den dosis, der giver effekt, med en fast dosis samt med grænseværdien, hvor en sådan foreligger. En sådan potensvurdering indgår, som nævnt ovenfor, ikke i EU's kriterier.

Det er en langvarig proces med mange faser at udarbejde en liste over reproduktionsskadende stoffer. I sagens natur er det et arbejde, der burde foregå løbende, fordi der til stadighed foretages nye undersøgelser af stoffer, og nye stoffer kommer til. Den liste, der er præsenteret i AMI's rapport, er derfor heller ikke en endelig liste.

Den indledende vurdering af stofferne blev foretaget på baggrund af oplysninger i en række oversigtsværker. I en del tilfælde havde to værker forskellig vurdering af den samme undersøgelse. I disse tilfælde blev der søgt yderligere oplysninger i de øvrige oversigtsværker, og hvis dette ikke var tilstrækkeligt, blev der hjemkaldt originallitteratur. Stoffer, der syntes mindre relevante, fx fordi de tilsyneladende ikke anvendes i Danmark, blev blot placeret i den gruppe af stoffer, der pt ikke kan vurderes (gruppe 3).

Der blev overvejet endnu en gruppe, nemlig gruppen af stoffer, der sandsynligvis ikke er reproduktionsskadende. Denne gruppe blev dog ikke oprettet, fordi meget få eller ingen stoffer er undersøgt tilstrækkeligt til at udelukke alle de forskellige typer af reproduktionsskadende effekter, der kan forekomme.

De nærmere detaljer ved gruppeinddelingen samt de kemiske stoffer, der blev placeret i gruppe 1, 2 og 3, er vist i et appendiks til dette kapitel.

For de kemiske stoffer og stofgrupper, der blev placeret i

gruppe 1 eller 2, og hvor dosisniveauet blev betegnet som lavt eller middel, blev der foretaget en række opgørelser, der bl.a. viste, at

- ◆ de hyppigst forekommende stoftyper var organiske opløsningsmidler og bekæmpelsesmidler
- ◆ der var hyppigere undersøgt for fosterskadende effekt end for forplantningsskadende effekter
- ◆ for de stoffer, der var undersøgt både for effekter på fosteret og på forplantningsevnen, forekom den fosterskadende effekt ved den laveste dosis for størstepartens vedkommende.

## Udviklingstendenser

Reproduktionstoksikologien har gennemgået en stor udvikling siden slutningen af 50'erne, hvor lægemidlet Thalidomid var årsag til, at tusindvis af børn blev født med misdannelser. Fokus er gradvist blevet udvidet fra lægemidler og misdannelser til også at omfatte kemiske stoffer i miljø og arbejdsmiljø og deres effekter på fx sædkvalitet og nervesystemets udvikling hos det ufødte barn. Sideløbende hermed er der sket en udvikling og standardisering af de dyreeksperimentelle metoder, der kan anvendes i forbindelse med risikovurdering af kemiske stoffer. Der har også, især i 80'erne, været arbejdet på at udvikle in vitro tests til screening for reproduktionsskadende effekter, men den generelle holdning nu er, at in vitro tests ikke kan anvendes til at forudsige virkningen på den levende organisme med sikkerhed.

En væsentligt udfordring for tiden og formentlig i mange år fremover er effekter af kemiske stoffer med *hormonlignende virkning*. Der er mistanke om, at sådanne stoffer kan være medvirkende årsag til nedsat sædkvalitet, øget hyppighed af brystkræft, adfærdsændringer hos børn og en lang række andre reproduktionstoksiske effekter hos mennesker og dyr i naturen. Inden for OECD Test Guideline er man allerede i fuld gang med overvejelser om, hvilke effekter man kan vise i de eksisterende guidelines, og hvilke nye tests der er behov for.

Kemiske stoffer med hormonlignende virkninger kan påvirke de normale reguleringsmekanismer i kroppen og kan derfor formentlig have effekter ved meget lave dosisniveauer. Der er også tegn på, at dosis-effekt sammenhængen for sådanne stoffer kan være forskellig fra det, man normalt forudsætter for kemiske stoffer. Man regner normalt med, at en stigende dosis

medfører øget risiko for en effekt, og at der er en tærskelværdi, hvorunder der ikke er risiko for effekt. For stoffer med hormonlignende virkning er der tegn på, at påvirkninger, der i størrelsesorden kun er lidt højere end det fysiologisk normale, kan medføre effekter, mens større påvirkninger ikke har tilsvarende effekter, fordi kroppens feed-back mekanismer bliver aktiverede. Hvis dette viser sig at være rigtigt, er det en kolossal udfordring til samfundets håndtering af miljøfremmede kemiske stoffer.

En anden væsentlig udfordring i fremtiden er undersøgelser af *kombinationseffekter* af fx kemiske stoffer, fysiske påvirkninger og psykosociale belastninger. Vurderinger af reproduktionsskadende effekter baseres for tiden i det væsentligste på undersøgelser af én påvirkning ad gangen, men undersøgelser tyder på, at effekterne af reproduktionsskadende stoffer kan øges, hvis organismen samtidig er udsat for fx andre kemiske stoffer eller en stresspåvirkning. Metodeudviklingen og risikovurderingen i de kommende år kan derfor forventes at inddrage undersøgelser af kombinationseffekter, så man i fremtiden kan få mulighed for at vurdere risikoen for reproduktionsskadende effekter som følge af menneskers komplekse udsættelse for mange forskellige typer påvirkninger i arbejdsmiljøet og det ydre miljø.

# Appendiks

---



# Appendiks

## Gruppeinddeling af reproduktions- skadende stoffer i arbejdsmiljøet (fra Hass et al. 1991)

### Gruppeinddeling

*Gruppe 1L. Anses for reproduktionsskadende ved lavt dosisniveau*  
*Evidens: Der er påvist reproduktionsskadende effekt i befolk-*

Tabel A1.

Dosisniveau						
		Lavt	Middel	Højt		
Evidens		1L	1M	1H	Meget	
		2L	2M	2H	Begrænset	
			3		Uitstrækkelig	

ningsundersøgelser, i mindst to dyrearter eller i en dyreart plus en enkeltstående befolkningsundersøgelse.

*Dosisniveau:* Mindre end 20 mg/kg eller mindre end 5 gange grænseværdien.

*Gruppe 1M. Anses for reproduktionsskadende ved middel dosisniveau*

*Evidens:* Der er påvist reproduktionsskadende effekt i befolkningsundersøgelser, mindst to dyrearter eller i en dyreart plus en enkeltstående befolkningsundersøgelse.

*Dosisniveau:* Mellem 20 og 200 mg/kg eller mellem 5 gange grænseværdien og 10 gange grænseværdien.

*Gruppe 1H. Anses for reproduktionsskadende ved højt dosisniveau*

*Evidens:* Der er påvist reproduktionsskadende effekt i befolkningsundersøgelser, i mindst to dyrearter eller i en dyreart plus en enkeltstående befolkningsundersøgelse.

*Dosisniveau:* Højere end 200 mg/kg og over 10 gange grænseværdien.

*Gruppe 2L. Mistænkt reproduktionsskadende ved lavt dosisniveau*

*Evidens:* Der er påvist reproduktionsskadende effekt i en dyreart eller en enkeltstående befolkningsundersøgelse.

*Dosisniveau:* Mindre end 20 mg/kg eller mindre end 5 gange grænseværdien.

*Gruppe 2M. Mistænkt reproduktionsskadende ved middel dosisniveau*

*Evidens:* Der er påvist reproduktionsskadende effekt i en dyreart eller en enkeltstående befolkningsundersøgelse.

*Dosisniveau:* Mellem 20 og 200 mg/kg eller mellem 5 gange grænseværdien og 10 gange grænseværdien.

*Gruppe 2H. Mistænkt reproduktionsskadende ved højt dosisniveau*

*Evidens:* Der er påvist reproduktionsskadende effekt i en dyreart eller en enkeltstående befolkningsundersøgelse.

*Dosisniveau:* Højere end 200 mg/kg og over 10 gange grænseværdien.

*Gruppe 3. Kan ikke vurderes mbt reproduktionsskadede effekt*  
*Evidens:* Der har været utilstrækkelige undersøgelser til indplacering i gruppe 1 eller 2.

Tabel A.2. Reproduktions-skadende kemiske stoffer i arbejdsmiljøet. (Fra Hass et al., 1991).

*Liste over reproduktionsskadede stoffer*

Gruppe 1L			
Anses for reproduktionsskadede ved lavt dosisniveau			
Stofnavn	CAS-nr.	Stofnavn	CAS-nr.
Acrylamid	79-06-1	Epichlorhydrin	106-89-8
Aldrin	309-00-2	Estradiol, beta	50-28-2
Alkyl-alkylsulfonater	-	*Ethanol	64-17-5
Aminopterin	54-62-6	Ethylendibromid	106-93-4
Arsenat, natrium	7631-89-2	Ethylenoxid	75-21-8
Arsenpentoxid	1303-28-2	Ethylnitrosourea	759-73-9
Benzen	71-43-2	Hexachlorbenzen	118-74-1
Benzo-a-pyren	50-32-8	Kepon	143-50-0
Bly (metallisk og salte)	-	Kviksølv, alkylforbindelser	-
Bly (organisk)	-	Kviksølv, letopløselige salte	-
Busulfan	55-98-1	Kviksølv, metallisk	7439-97-6
Cadmium og cadmiumforbindelser	7440-43-9 (mfl)	Lindan	58-89-9
Carbondisulfid	75-15-0	Methodretaxat	59-05-2
Carbonmonoxid	630-08-0	Methylglycol	109-86-4
Chloroform	67-66-3	Nikkelforbindelser	-
Chloropren	126-99-8	Pentachlorphenol	87-86-5
Chrom, hexavalent	-	Polybromerede biphenyler	59536-65-1
Cyclophosphamid	50-18-0	Polychlorerede biphenyler	1336-36-3
DDT	50-29-3	Selen og selenforbindelser	7782-49-2 (mfl)
Dibromchlorpropan	96-12-8	Thalidomid	50-35-1
Dichlorvos	62-73-7	*Toluen	108-88-3
Dieldrin	60-57-1	Urethan	51-79-6
Diethylstilbestrol	56-53-1	Vinylchlorid	75-01-4
Dimethoat	60-51-5	Vinylidenchlorid	75-35-4
Dinoseb	88-85-7	Warfarin	81-81-2
Endrin	72-20-8		

\* Dosisniveau er middel eller højt, men lavere end 5 x grænseværdien (1989).

Gruppe 1M		Anses for reproduktionsskade ved middel dosisniveau	
Stofnavn	CAS-nr.	Stofnavn	CAS-nr.
Benomyl	17804-35-2	Halothan	151-67-7
Boraks/borsyre (5H <sub>2</sub> O)	11130-12-4 (mfl)	N-Methyl-formamid	123-39-7
Carbendazim	10605-21-7	Styren	100-42-5
Dichlorphenoxyeddikesyre, 2,4-	94-75-7	Tetrachlorethen	127-18-4
Diethylhexylphthalat	117-81-7	Thiram	137-26-8
Dinitrogenoxid	10024-97-2	Trichlorfon	52-68-6
Disulfiram	97-77-8	Trichlorphenoxyeddikesyre, 2,4,5-	93-76-5
Ethylglycol	110-80-5	*Xylen	1330-20-7

\* Dosisniveau er middel eller højt, men lavere end 5x grænseværdien (1989).

Gruppe 1H		Anses for reproduktionsskade ved højt dosisniveau	
Stofnavn	CAS-nr.	Stofnavn	CAS-nr.
Acrylonitril	107-13-1	Mangan og	
Beryllium	7440-41-7	manganforbindelser	7439-96-5 (mfl)
Carbondioxid	124-38-9	N-Methylacetamid	79-16-3
Dimethylacetamid	127-19-5	Propylenoxid	75-56-9
Hydroxyurin stof	127-07-1	Tellur	13494-80-9
Iod	7553-56-2	Trichlorethen	79-01-6
Kobbersulfat	7758-98-7	Triethylamin	121-44-8
Lithium og lithiumforbindelser	554-13-2	Trimethylphosphat	512-56-1

Gruppe 2L		Mistænkt reproduktionsskade ved lavt dosisniveau	
Stofnavn	CAS-nr.	Stofnavn	CAS-nr.
Arsenit, natrium	7784-46-5	Mitomycin	50-07-7
Arsentrioxid	1327-53-3	Nitrogendioxid	10102-44-0
Demeton (blanding)	8065-48-3	Ozon	10028-15-6
Diazinon	333-41-5	Parathion	56-38-2
Dicofol	115-32-2	Phthalophos	732-11-6
Endosulfan	115-29-7	Thallium og thalliumforbindelser	7440-28-0 (mfl)
Methylparathion	298-00-0	Tin, trialkylforbindelser	-

Gruppe 2M		Mistænkt reproduktionsskadende ved middel dosisniveau	
Stofnavn	CAS-nr.	Stofnavn	CAS-nr.
Acetaldehyd	75-07-0	Formamid	75-12-7
Aminophenol,4-	123-30-8	Hydroquinon	123-31-9
Captan	133-06-2	Maneb	12427-38-2
Carbaryl	63-25-2	Methylchlorid	74-87-3
Chlormegatchlorid	999-81-5	Methylethylketon	78-93-3
Cyclohexanol	108-93-0	Methylmethacrylat	80-62-6
*Dichlormethan	75-09-2	Motorbenzin	-
Dimethyl-formamid, N,N	68-12-2	N-Methylpyrrolidon	872-50-4
EDTA	60-00-4	*Terpentin, mineralsk	8052-41-3 (mfl)
Folpet	133-07-3	Tetrachlorphenol, 2,3,4,6-	58-90-2 (mfl)

\* Dosisniveau er højt, men mindre end 10 x grænseværdien (1989).

Gruppe 2H		Mistænkt reproduktionsskadende ved højt dosisniveau	
Stofnavn	CAS-nr.	Stofnavn	CAS-nr.
Acrolein	107-02-8	Isodecylmethacrylat	29964-84-9
Acrylsyre	79-10-7	Linuron	330-55-2
Butadien, 1,3-	106-99-0	Mancozeb	8018-01-7
Butylmethacrylat	97-88-1	Methoxyfluran	76-38-0
Chlorodifluoromethan	75-45-6	Monochlormonofluormethan (uspec.)	-
Dibutylphthalat	84-74-2	Naphtylamin	134-32-7
Dichlormonofluoromethan	75-43-4	Natriumbenzoat	532-32-1
Dimethylaminoazobenzen	60-11-7	Natriumnitrit	7632-00-0
Diuron	330-54-1	Phenol	108-95-2
DMMP	756-79-6	Propineb	9016-72-2
Ethylacrylat	140-88-5	Tetrachlormethan	56-23-5
Ethylmethacrylat	97-63-2	Trichlorethan, 1,1,1-	71-55-6
Fluor og fluorforbindelser	7782-41-4 (mfl)	Vanadium og vanadiumforbindelser	1314-62-1 (mfl)
Hexanon	591-78-6	Zineb	12122-67-7
Indiumnitrat	13770-61-1		
Isobutylmethacrylat	97-86-9		

Gruppe 3		Kemiske stoffer med utilstrækkelig evidens	
Stofnavn	CAS-nr.	Stofnavn	CAS-nr.
Anilin og salte	62-53-3 (mfl)	Formaldehyd	50-00-0
Bidrin	141-66-2	Fumarsyre	110-17-8
Biphenyl	92-52-4	Hydrogenfluorid	7664-39-3
Butylchlorid, n-	109-69-3	Industribenzin	-
Butylglycol	111-76-2	Mineralolie	-
Captafol	2425-06-1	Norea	2163-79-3
Chromforbindelser (andre)	-	Paraquat (dichlorid)	1910-42-5
Dichlordifluormethan	75-71-8	Petroleum, lugtfri	-
Dichlorethan, 1,2-	107-06-2	Phenantrolin, 1,10-	66-71-7
Dichlorethan, 1,1-	75-34-3	Phthalsyreanhydrid	85-44-9
Dichlorisobutylene	594-37-6	Svovldioxid	7446-09-5
Dichlortetrafluorethan	76-14-2 (mfl)	Telodrin	297-78-9
Dimethylsulfoxid	67-68-5	Toluen-2,4-diisocyanat	584-84-9 (mfl)
Dinitrophenol	25550-58-7 (mfl)	Toluidin, o-	95-53-4 (mfl)
Dioxan	123-91-1	Trichlorbenzen, 1,2,4-	120-82-1 (mfl)
Diquat (dibromid)	85-00-7	Yttrium og -chlorid	10361-92-9 (mfl)
Fenthion	55-38-9	Zinkchlorid	7646-85-7

## Litteratur

- Arbejdstilsynet. Arbejdsmiljø og sunde børn. Baggrund og dokumentation for Arbejdstilsynets indsats 1993-94. Arbejdstilsynet, København 1993.
- Astrup-Jensen A. Environmental and occupational chemicals. In: Bennett PN (ed). *Drugs and human lactation*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1988: 551-73.
- Bekendtgørelse om klassificering, emballering, mærkning, salg og opbevaring af farlige kemiske stoffer og produkter. Miljøministeriets bekendtgørelse nr. 662 af 14. oktober 1987.
- Barlow SM, Sullivan FM. *Reproductive hazards of industrial chemicals*. London: Academic Press, 1982.
- Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Has the fertility of Danish men declined through the years in terms of semen quality? A comparison of semen qualities between 1952 and 1972. *Int J Fertil* 1983; 28: 91-5.
- European Community. Classification, packaging and labelling of dangerous substances in the European union. January 1997: Annex V, Part B - Methods for the determination of toxicity. Annex VI, side 440-447 - Classification on the basis of specific effects on human health.
- Furuhjelm M, Jonson B, Lagergren CG. The quality of human semen in spontaneous abortion. *Int J Fertil* 1962; 7: 17-21.
- Hass U, Hansen EV, Olsen JH. Toxicokinetics and toxicodynamics. In: *Embryofœtal damage and chemical substances*. National Food Agency of Denmark, 1989, pp 7077.
- Hass U, Hansen EV, Meyer O. In vitro methods for detecting embryo/foetotoxic effects. In: *Embryofœtal damage and chemical substances*. National Food Agency of Denmark, 1989 pp 9297.
- Hass U, Jakobsen BM, Brandorff NP, Jelnes JE and Petersen SH. *Reproduktionsskadelige kemiske stoffer i arbejdsmiljøet*. AMI-rapport 35/1991. Arbejdsmiljøinstituttet, København 1991.
- Hass U, Brandorff NP, Brunborg G, Ekström T, Hansen EV, Jakobsen BM, Jelnes JE, Taskinen T, Wiger R. *Occupational reproductive toxicity: Methods and testing strategies for hazard assessment of workplace chemicals*. Nordic Council of Ministers and National Institute of Occupational Health, Denmark. Copenhagen 1994.
- Hass U. Developmental neurotoxicity study. *TemaNord* 1997, 524, 34-37.
- Jacobsen BM, Wiger R. In vitro techniques in teratology. Side 37-43 i Hass U, Brandorff NP, Brunborg G, Ekström T, Hansen EV, Jakobsen BM, Jelnes JE, Taskinen T, Wiger R (eds). *Occupational reproductive toxicity: Methods and testing strategies for hazard assessment of workplace chemicals*. Nordic Council of Ministers and National Institute of Occupational Health, Denmark. Copenhagen 1994.

- tional reproductive toxicity: Methods and testing strategies for hazard assessment of workplace chemicals. Nordic Council of Ministers and National Institute of Occupational Health, Denmark, Copenhagen 1994.
- Miljøstyrelsen, Miljø- og Energiministeriet. Bekendtgørelse af listen over farlige stoffer. 1997.
- Nisbet ICT, Karch NJ. Chemical hazards to human reproduction. New Jersey: Noyes Data Corporation, 1983.
- NN. Fosterskader og kemiske stoffer. Redegørelse fra en arbejdsgruppe. Søborg: Levnedsmiddelstyrelsen, 1986.
- NN. Medicinsk fødsels- og misdannelsesstatistik 1986. Vitalstatistik I: 23. København: Sundhedsstyrelsen, 1988.
- OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects.
- 414 "Teratogenicity" (1981).
- 415 "One generation reproduction toxicity study" (1983).
- 416 "Two generation reproduction toxicity study" (1983).
- OECD. Report of the OECD consultation meeting on developmental neurotoxicity. Copenhagen, Denmark, June 17-18th., 1996.
- Olsen JH, Hansen EV, Hass U. The human reproductive cycle and comparisons between human beings and the common types of experimental animals. In: Embryofoetal damage and chemical substances. National Food Agency of Denmark, 1989, pp 54-67.
- Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 5th edition. London: Williams & Wilkins, 1985.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean et al. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Miljøstyrelsen, 1995, Miljøprojekt 290.
- U.S. Food and Drug Administration. Advisory Committee on Protocols for Safety Evaluations: Panel on Reproduction Report on Reproduction Studies in Safety Evaluation of Food Additives and Pesticide Residues. Toxicol Appl Pharmacol 1970; 16: 264-96.
- Zielhuis RL, Stijkel A, Verberk MM, van de Poel-Bot M. Health risks to female workers in occupational exposure to chemical agents. Berlin: Springer-Verlag, 1984.





KAPITEL 4

# Immuntoksikologi

*Otto Melchior Poulsen  
Gunnar Damgård  
Nielsen  
Leila Allermann  
Hansen*

# Immuntoksikologi

Et velfungerende immunforsvar spiller en essentiel rolle ved beskyttelse mod infektionssygdomme, kræft og allergi. Påvirkninger, der skader immunsystemet eller ændrer dets måde at fungere på, kan føre til alvorlige lidelser, enten som følge af overfølsomhed (allergi) eller som følge af et svækket immunforsvar, der ikke effektivt kan nedkæmpe fx infektionssygdomme.

En lang række forskellige påvirkninger i arbejdsmiljøet vides at kunne påvirke immunforsvaret i negativ retning. Som videnskabelig disciplin omhandler immuntoksikologien stoffers evne til at inducere skadelige ændringer i immunforsvaret. Sådanne ændringer kan være

- ◆ allergi
- ◆ immunsuppression
- ◆ immunstimulation.

Inden for de seneste årtier er allergiske luftvejslidelser steget voldsomt i den vestlige verden, og hudallergi er ligeledes et hyppigt forekommende fænomen i arbejdsmiljø-mæssig sammenhæng. Selvom allergi kan betragtes som en deldisciplin af immuntoksikologien, har vi valgt at tilegne et selvstændigt kapitel til dette effektområde. I det følgende gives en kortfattet introduktion til immunsystemets bestanddele og funktion, samt en gennemgang af undersøgelser, der gennemføres i immuntoksikologisk testning på forsøgsdyr (in vivo) eller på isolerede celler (in vitro). Sidst i kapitlet nævnes supplerende litteratur, som særligt interesserede kan have glæde af at læse.

## Immunsystemets opbygning og funktion

Immunsystemets funktion er overordnet at kunne skelne og eliminere fremmede organismer, celler og kemiske stoffer, der er trængt ind i kroppen. De tre helt centrale egenskaber ved immunsystemet er hukommelse (memory), specificitet og evnen til at skelne mellem "selv" og "fremmed".

Det er nødvendigt, at immunsystemet effektivt kan håndtere en række vidt forskellige fremmede påvirkninger, der kan forekomme overalt i kroppen, fx fremkomst af kræftceller og -svulster, infektioner med parasitter, bakterier og vira, og skadelige kemiske påvirkninger.

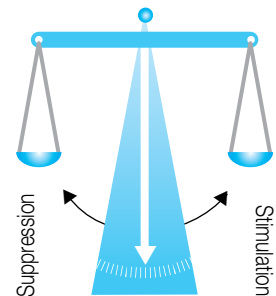
For at kunne fungere tilfredsstillende må det aktive immunsystem nødvendigvis have et stort destruktivt potentiale. Det indebærer en risiko for, at aktivering af immunsystemet også kan føre til en betydelig ødelæggelse af kroppens eget væv. Et særligt træk ved immunsystemet er derfor det meget store antal kontrolmekanismer, der skal sikre, at immunreaktioner kun foregår lokalt, hvor den fremmede påvirkning sker, samt at reaktionernes styrke og varighed er balanceret (fig. 4.1).

Immunsystemet udgøres af en række forskellige celletyper i forskellige organer og væv samt signal- og effektormolekyler, der frigøres til og virker i det ekstracellulære miljø. Der foregår til stadighed et kompliceret, integreret samspil mellem immunsystemets forskellige celler, hvilket sikrer, at bekæmpelsen af den fremmede påvirkning bliver målrettet (specifik) og effektiv. Det er ikke muligt her at give en detaljeret gennemgang af alle immunsystemets delreaktioner og kontrolmekanismer. I det følgende lægges hovedvægten på de forhold, der i særlig grad indgår i immuntoksikologiske tests.

Et grundlæggende træk ved immunsystemet er, at det genkender og reagerer på fremmede rumlige overfladestrukturer på molekyler, de såkaldte antigendeterminanter. Begrebet antigen anvendes oftest om et fremmedlegeme (bakterie, virus, allergen mv) med et stort antal forskellige antigendeterminanter på sin overflade.

### Immunsystemets celler og deres funktion

Immunsystemet omfatter en lang række celletyper, der i modnet tilstand udviser distinkte forskelle i deres funktion. Fig. 4.2 viser, at de forskellige celler udspringer fra en fælles stamcelle, der dannes i knoglemarven hos voksne. Ud over de nævnte celler

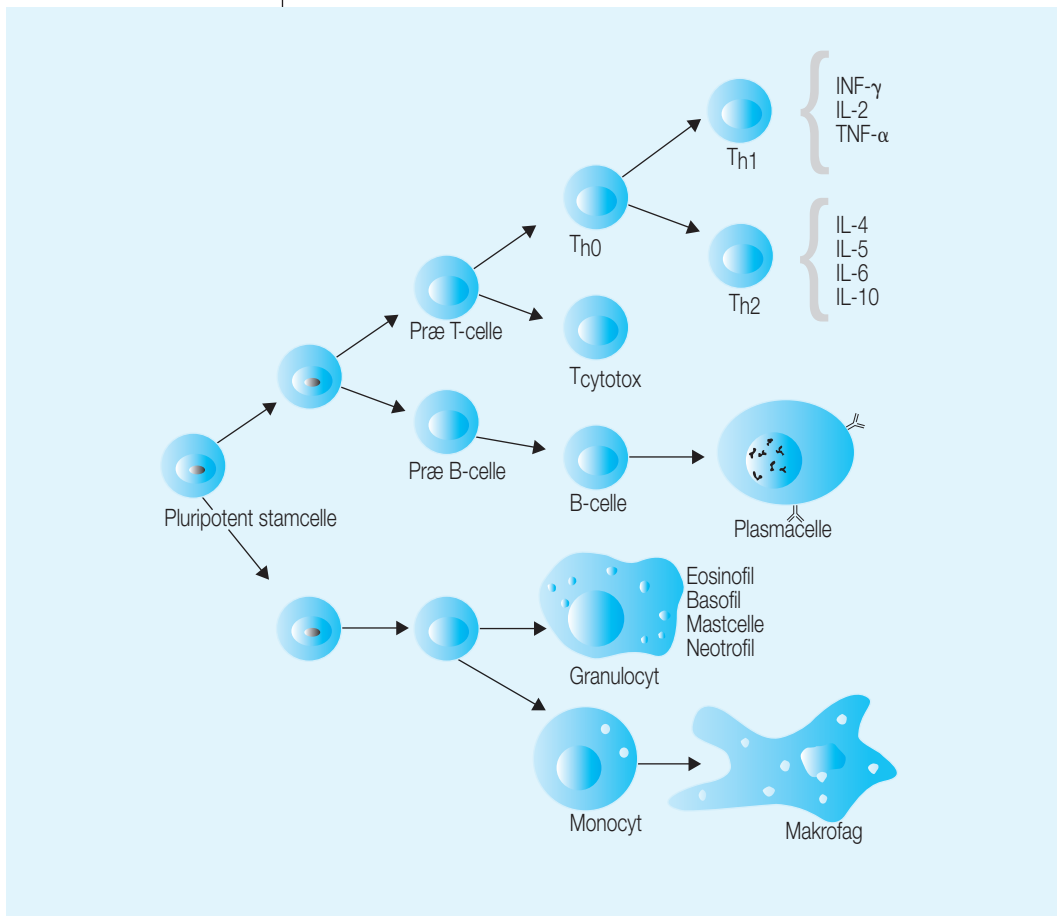


Figur 4.1. Immunsystemets naturlige balance kan forskydes i begge retninger. Ved nedsat aktivitet (immunsuppression) har kroppen svært ved at bekæmpe infektioner. Ved en stærkt øget aktivitet (immunstimulation) kan allergiske eller autoimmune sygdomme forekomme.

giver stamcellerne også ophav til blodplader og røde blodlegemer. Tabel 4.1 giver nogle karakteristika for de vigtigste celler i immunsystemet.

Lymfocytterne (T- og B-celler) står for immunsystemets specificitet og hukommelse, og T-celler står centralt både i normale immunreaktioner og i allergiske reaktioner. I praksis aktiveres immunsystemet næsten aldrig ved en direkte kontakt mellem frie antigener og T-celler. I stedet gør immunsystemet brug af antigenpræsenterende celler (AP-celler), der som ordet siger har til opgave at optage og præsentere fremmede stoffer for de andre celler i immunsystemet, især T-celler. Herved sikres, at reaktionerne foregår lokalt og kontrolleret. Samspillet mellem antigenpræsenterende celler og T-celler udgør således en særlig central akse i immunsystemet.

Figur 4.2. Immunsystemets celler udspringer fra en fælles stamcelle.



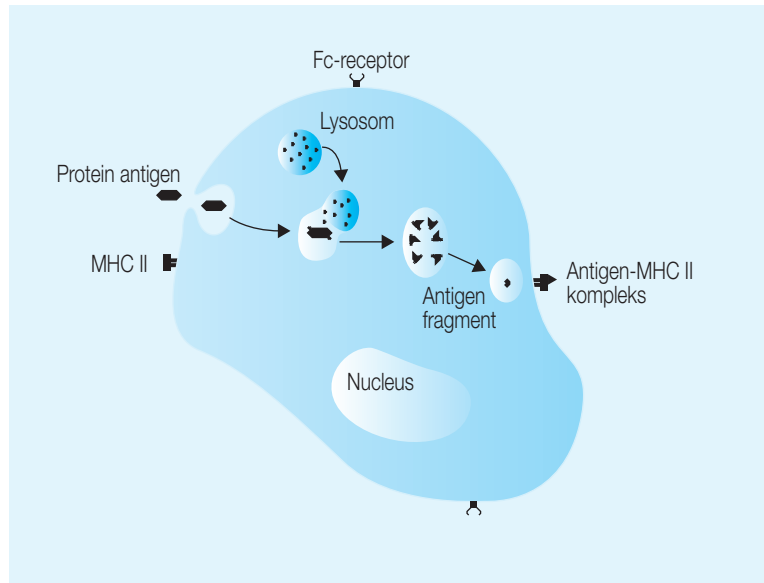
Celletype	Funktion
<b>Antigen-præsenterende celler (AP-celler)</b>	Optager fremmedlegemer (fx allergener) og præsenterer fragmenter af disse sammen med MHC klasse II molekyler på cellens overflade. Antigenpræsentation er centralt i immunsystemets hukommelse og reaktion mod indtrængende fremmedlegemer. Disse cellers evne til at optage og destruere fremmedlegemer er også en vigtig del af immunsystemets forsvar.
Monocytter	Umodne makrofager. Monocytter findes i knoglemarv og i blodet. I blodet udgør monocytter ca 5% af de hvide blodlegemer.
Makrofager	Findes i alle væv og udgør et centralt element i de tidlige immunreaktioner på indtrængende fremmedlegemer.
Langerhans celler	Makrofaglignende celler i huden. Vandrer til lymfeknuder og differentierer til dendritceller.
Dendritceller	Makrofaglignende celler i milt og lymfeknuder. I modsætning til makrofager og Langerhans celler, der først skal aktiveres, er dendritceller parat til at indgå i de immunologiske reaktioner, fordi dendritcellerne har de nødvendige overfladeproteiner til stede.
<b>T-lymfocytter</b>	Findes især i lymfevæv og i blodet (50-70% af de hvide blodlegemer). Ved stimulering (fx fra AP-celler) frigør T-lymfocytter signalstoffer, der regulerer immunsystemet: tiltrækker og aktiverer effektorceller, stimulerer modning af monocytter til makrofager, stimulerer B-celler til antistofdannelse mv. T-lymfocytter står for immunsystemets hukommelse, specifikt og skelen mellem "selv" og "fremmed".
T-hjælper celler	Udtrykker overfladeproteiner CD4.
T-h1-celler	Danner bl.a. signalstofferne IL-2 og INF- $\alpha$ , der selektivt stimulerer det celledierede immunforsvar og undertrykker IgE-medierede allergireaktioner.
T-h2-celler	Danner bl.a. signalstoffet IL-4, der stimulerer B-celler til at danne de antistoffer (IgE og IgG1), der indgår i allergiske reaktioner. Endvidere IL-5 og IL-10.
T-Cytotox celler	Udtrykker overfladeproteiner CD8. Ved aktivering danner disse celler bl.a. en række destruktive enzymer, der er særligt vigtige i nedkæmpningen af kræftceller og celler, der er inficeret med virus.
<b>B-lymfocytter</b>	B-lymfocytter udgør 5-15% af blodets hvide blodlegemer. Efter specifik stimulering aktiveres en klon af B-celler til at danne antigenspecifikke antistoffer.
<b>Granulocytter</b>	Effektorceller med et stort antal vesikler (granulae), der indeholder forskellige signalstoffer og destruktive enzymer. Ved aktivering tømmes disse granulae ud af cellen.
Mastceller og basofile	Har IgE-receptor på overfladen og er de centrale effektorceller i IgE-medieret allergi (fx høfeber og astma). Endvidere spiller disse celler en central rolle ved bekæmpelse af parasitinfektioner. Ved aktivering frigøres bl.a. vasoaktive aminer (fx histamin), der i astma er ansvarlig for sammentrækning af bronkierne. Andre signalstoffer tiltrækker fx eosinofile og neutrofile granulocytter. Mastceller findes i alle organer, overvejende i bindevæv langs blodkar, lymfekar og nerver. Basofile granulocytter findes i blodet (ca 1% af de hvide blodlegemer).
Eosinofile og neutrofile	Findes overvejende i blodet (3-5%). Tiltrækkes af signalstoffer og vandrer ind i væv, hvor der foregår en lokal immunreaktion. Ved IgE-medieret allergi tiltrækkes eosinofile granulocytter i stort antal. Disse er ansvarlige for senreaktioner i astma.

Tabel 4.1. Immunsystemets celler.

### Antigenpræsenterende celler (AP-celler)

En AP-celle optager det indtrængende antigen (fx en bakterie eller en spore fra skimmelsvampe). Inde i cellen nedbrydes antigenet til korte peptidstykker, der hver svarer til en enkelt antigen-determinant. Hvert peptidstykke præsenteres på AP-cellens overflade indbygget i MHC-II-overfladeprotein (MHC = Major Histocompatibility Complex) (se fig. 4.3).

Figur 4.3. Den antigenpræsenterende celle (fx en makrofag) optager et protein (antigenet), ved at cellemembranen poser ind (fagocytose), til antigenet ligger i en vesikel i cellens indre. Antigenet nedbrydes, ved at vesiklen smelter sammen med lysosomer, der indeholder proteinsplaltende enzymer. Antigen-determinanten bygges ind i MHC II overfladeprotein i takt med, at dette dannes. Den ny antigen-MHC II complex præsenteres på overfladen, der tillige har en række andre vigtige strukturer, fx Fc-receptorer, der binder til antistoffer af IgG og IgM typen.



Aktivering af en T-celle sker først, når overfladeproteiner på T-cellen genkender og bindes til det tætte kompleks af "selv" (MHC) og "fremmed" (antigen-determinant) på AP-cellens overflade. Efter præsentation af en antigen-determinant på overfladen kan AP-celler aktivere T-celler lokalt eller vandre til det drænnende lymfevæv, hvor aktiveringen af T-cellerne så vil foregå.

AP-celler har flere vigtige fællestræk. De præsenterer MHC klasse II på deres overflade, og de har evnen til at optage (fagocyttere) antigener og nedbryde dem intracellulært. Denne egenskab udgør en vigtig del af det uspecifikke immunforsvar, der straks sættes ind over for antigener, som kroppen ikke har været udsat for tidligere. AP-celler har imidlertid også Fc-receptorer på deres overflade. Fc-receptorerne gør det muligt at binde og optage visse antistoffer (IgG eller IgM), der har genkendt og bundet et antigen til sig. Hvis kroppen således allerede har antistoffer mod det indtrængende antigen, vil AP-cellernes optagelse og præsentation af antigenet blive forstærket.

De vigtigste AP-celler er makrofager, der findes i alle organer,

især i bindevævet i tilknytning til blodkar og på slimhinder, Langerhans celler i huden og dendritceller i lymfeorganer og -væv.

### *T-hjælper celler*

Immunsystemets hukommelse, specificitet og evne til at skelne "selv" fra "fremmed" er især knyttet til modne T-celler, der i måneder til år cirkulerer mellem blodbanen og lymfesystemet.

T-cellerne bærer en række forskellige overfladeproteiner, der styrer T-cellernes specificitet, funktion og samspil med andre celler i immunsystemet. Vigtige overfladereceptorer er fx de antigenspecifikke receptorer og receptorer for MHC klasse II.

### *Immunsystemets hukommelse*

Hver enkelt moden lymfocyt (B- eller T-celle) er specifik for en bestemt antigendeterminant, og i hver enkelt person kan de modne lymfocytter tilsammen reagere på flere millioner forskellige antigendeterminanter. Den store diversitet opstår ved rearrangement i de gener, der koder for det antigenbindende område på de antigenspecifikke receptorer. På denne måde kan relativt få gener give ophav til et næsten uendeligt stort antal receptorer med forskellig specificitet.

En populær "nøgle og lås" model kan anskueliggøre, hvordan de antigenspecifikke receptorer fungerer. Den rumlige struktur af antigendeterminanten, "nøglen", omklamres fra alle sider af receptoren, "låsen". Hvis "nøglen" passer tilstrækkeligt godt i "låsen", aktiveres lymfocytten.

Når et antigen trænger ind i kroppen for første gang og præsenteres for en T-celle med netop denne specificitet, vil T-cellen aktiveres og stimuleres til deling og differentiering. Den immunologiske reaktion er svag ved den første kontakt med et nyt antigen, men denne kontakt fører til et forøget antal T-celler, der alle har den samme specificitet over for antigenet. Den selektive forøgelse af en klon af lymfocytter danner baggrund for immunsystemets hukommelse. Den engelske betegnelse "memory cells" (T-memory celler og B-memory celler) anvendes ofte til at udtrykke, at kroppen har et særligt beredskab gennem et forøget antal specifikke, men inaktive lymfocytter. Ved en senere kontakt med det samme antigen vil det forøgede antal specifikke lymfocytter gøre kroppen i stand til at reagere med et hurtigere og mere aggressivt immunrespons.

### *Immunsystemets skelnen mellem "selv" og "fremmed"*

Ved den førnævnte reorganisering af den genetiske kode kan der opstå lymfocytter, der specifikt vil reagere mod kroppens egne proteiner ("selv").

Immunsystemet har indbygget komplicerede og endnu ikke



helt forståede selektive mekanismer, der sikrer, at sådanne "selv"-destruktive lymfocytter dør og fjernes. Dette foregår i forbindelse med T-cellernes modning i brislen (thymus). B-cellerne styres indirekte gennem T-celleafhængige aktiveringsmekanismer.

Som nævnt tidligere aktiveres T-lymfocytter ved at genkende et kompleks mellem MHC og antigendeterminant på AP-cellers overflade. AP-celler har tendens til ikke at præsentere kroppens egne proteiner i sådanne komplekser. Herved opnås således en yderligere beskyttelse mod autoimmune reaktioner.

En teori for, hvordan autoimmune sygdomme (fx sclerose og rheumatoid arthritis) kan opstå, er, at nogle af kroppens egne proteiner danner et kompleks med et fremmed stof (fx en virus). Den antigenpræsenterende celle vil optage og nedbryde dette kompleks, hvilket indebærer en lille risiko for, at en af kroppens egne antigendeterminanter præsenteres.

#### *Subpopulationer af T-hjælper celler*

T-hjælper celler udtrykker overfladeproteinet CD4, der genkender MHC klasse II på andre celler i immunsystemet. T-hjælper celler spiller en vigtig rolle både i den klonale aktivering af andre T-memory celler og i den T-celleafhængige aktivering af B-celler. T-hjælper celler kan opdeles i to subpopulationer (se fig. 4.2).

T-h1-celler er karakteriseret ved bl.a. at danne signalstofferne Interleukin 2 (IL-2), interferon-alfa (INF- $\alpha$ ) og lymfotoxin (LT). Disse signalstoffer stimulerer selektivt det celle-medierede immunforsvar (fx ved kontaktallergi) og undertrykker de IgE-medierede reaktioner (fx ved allergisk astma). Betegnelsen celle-medieret immunitet anvendes om det immunforsvar, der især gør brug af cytotoxiske T-celler (se tabel 4.1).

T-h2-celler danner bl.a. signalstofferne Interleukin 4 (IL-4) og Interleukin 10 (IL-10), der er vigtige faktorer i stimulering af B-celler til produktion af de antistoffer, der indgår i allergiske reaktioner (IgG1 og IgE). Betegnelsen IgE-medieret allergi anvendes om de allergireaktioner, hvor IgE-antistoffer spiller en central rolle.

Balancen mellem celle-medieret og IgE-medieret allergi styres således ved en selektiv stimulering af T-h1- og T-h2-celler efter kontakt med antigenet. Den selektive stimulering er stærkt afhængig af, i hvilket organ kontakten med antigenet foregår. Lungs slimhinderne i luftvejene vil en lokal IL-4 produktion, sikkert fra mast celler og basofile granulocytter, skifte differentieringen i retning af T-h2-celler. I huden vil en lokal dannelse af IL-12 fra makrofager og Langerhans celler stimulere T-h0-celler til at danne INF- $\alpha$ , der stimulerer differentiering af T-h1-celler.

### B-celler

Modne B-celler (plasmaceller) er karakteriseret ved deres evne til at danne og udskille antigenspecifikke antistoffer (immunglobuliner, Ig). Hver B-celle vil alene danne antistoffer med specificitet over for en bestemt antigendeterminant. I lighed med T-celler opstår den store diversitet i specificiteten ved rearrangement af den genetiske kode. Ligeledes foregår klonal aktivering på samme måde som for T-celler.

I modsætning til T-celler, der alene modnes i brislen, kan B-lymfocytter modnes i en række forskellige lymfeorganer, fx i knoglemarven, i milten og i det slimhindeassocierede lymfæv. De modne plasmaceller har en relativt kort levetid sammenlignet med modne T-celler.

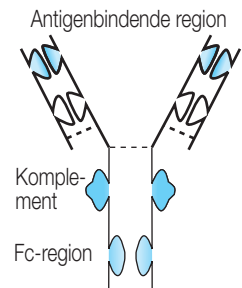
B-celler har i lighed med T-celler antigenspecifikke overfladereceptorer. B-cellernes receptorer har samme specificitet som de antistoffer, cellerne danner og udskiller efter aktivering. Aktivering og differentiering til modne, antistofproducerende plasmaceller sker oftest ved direkte kontakt med antigen-aktiverede T-hjælper celler eller gennem stimulering med ekstracellulære signalstoffer (lymfokiner) fra aktiverede T-h2-celler.

### De forskellige antistofklasser og deres funktion

Alle antistoffer er proteiner, der populært sagt har form som en gaffelgren opbygget af to korte og to lange peptidkæder. Det antigenbindende område findes for enden af hver gaffelgren, så hvert antistofmolekyle har to identiske antigenbindende områder (fig. 4.4). Antistofferne kan opdeles i fem overordnede klasser, der udviser markante forskelle i funktion og fordeling i kroppen. Tabel 4.2 summerer de vigtigste egenskaber ved de forskellige antistofklasser.

Som det ses af tabel 4.2, findes antistoffer overvejende i det ekstracellulære miljø i blodplasma (humoralt). Dannelse af specifikke IgM- og IgG-antistoffer fx mod en bestemt bakterieinfektion betegnes humoral immunitet.

Fig. 4.5 skitserer, hvordan dannelse af antistoffer forløber som resultat af gentagne udsættelser for et antigen. Antigen-specifikt IgM og IgG dannes især, når T-h1-celler stimulerer B-lymfocytterne, mens IgE dannes som følge af en stimulering af B-cellerne fra T-h2-celler. I forløb svarer dannelse af IgE til IgG, men den dannede mængde af IgE er meget lavere. IgM står for den tidlige bekæmpelse af en infektion. Ved gentagen udsættelse vil IgG blive stadig mere dominerende.

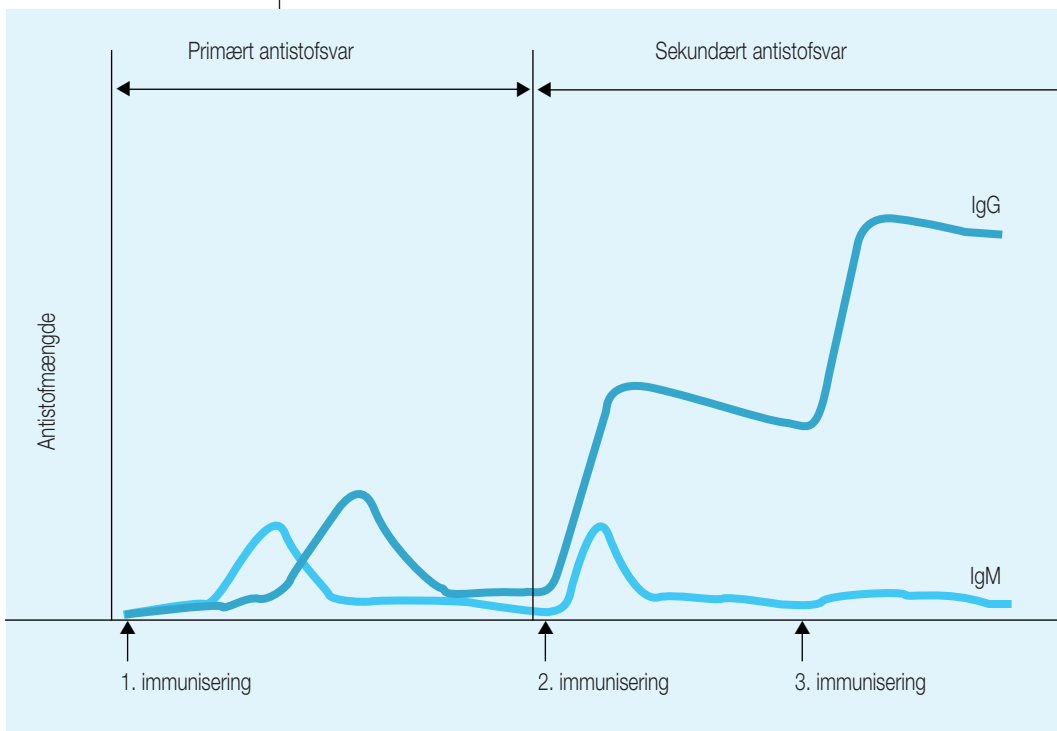


Figur 4.4. Schematisk tegning af et IgG-antistof. Hvert antistofmolekyle har to identiske antigenbindende områder, og antistoffer kan derfor krydsbindes til allergener med flere antigen-determinanter, således at der dannes store komplekser, der til sidst kan udfælde. Ved krydsbinding til et antigen aktiveres en region, der binder og aktiverer komplementsystemet (se afsnit om allergisk alveolit i kapitlet Allergi og allergifremkaldende stoffer). Fc-regionen indgår i antistoffets binding til overfladen af fx makrofager.

Antistof	Lokalisering	Funktion	Betydning i allergi
IgA 15-20%	I plasma og på slimhinder	Hæmmer indtrængning af bakterier og vira. Stimulerer ikke fagocytose. Aktiverer ikke komplementsystemet.	Ingen
IgD < 1%	På B-cellers overflade	Ukendt	Ingen
IgE < 1%	I plasma. På overflade af mastceller og basofile granulocytter	Bekæmper parasitinfektioner ved at aktivere mastceller og basofile granulocytter	IgE-medieret allergi, fx høfeber og allergisk astma
IgG 75-80% Opdeles i 4 subklasser: IgG1 til IgG4	I plasma	Inaktiverer toksiner. Bekæmper infektioner ved at stimulere fagocytose og ved at aktivere komplementsystemet.	Allergisk alveolitis
IgM 10%	I plasma som pentamer. Monomer er vigtig antigen-specifik receptor på B-celler	Tidlige forsvar mod infektioner. Stimulerer fagocytose og aktiverer komplementsystemet	Ingen

Tabel 4.2. De forskellige antistofklasser, deres lokalisering, funktion og betydning mht allergi.

Procenterne angiver antistofklassens relative andel af den totale antistofmængde i blodplasma



Figur 4.5. Ved den første kontakt med antigenet dannes hurtigt relativt små mængder IgM-antistoffer, der indgår i det primære immunforsvar mod fx infektioner. IgG-antistoffer dannes med en noget lavere hastighed. Ved en senere kontakt med antigenet vil T- og B-memory celler sikre et hurtigt og kraftigt sekundært antistofsvær, der helt domineres af IgG-antistoffer.

## Komplementsystemet

Komplementsystemet er et system af mere end 20 forskellige proteiner, der normalt findes som inaktive enzymer i blodplasma. Systemet aktiveres som en kaskade, hvor aktivering af det første enzym hurtigt fører til aktivering af det næste osv, indtil der dannes et "membrane attack" kompleks på overfladen af celler, der opfattes som fremmede (bakterier, virusinficerede celler eller kræftceller). Dette kompleks skaber et hul i cellens membran, hvilket er en særdeles effektiv måde at dræbe fremmede celler på. Endvidere dannes signalstoffer som et resultat af komplementaktivering. Disse signalstoffer tiltrækker makrofager og granulocytter, der således kan deltage i angrebet på de fremmede celler. Almindeligvis aktiveres komplementsystemet af antigen-antistofkomplekser. Kun antistoffer af IgG- eller IgM-typen kan aktivere komplementsystemet.

## Den inflammatoriske reaktion

Den inflammatoriske reaktion er en betegnelse for det hændelsesforløb, der fører til bekæmpelse af et fremmedlegeme (antigen) i kroppen. På dansk ses betegnelsen "betændelsesreaktion" anvendt. Denne betegnelse kan give det fejlagtige indtryk, at reaktionen er skadelig, hvilket kun sjældent er tilfældet.

Det er vigtigt at bemærke, at den inflammatoriske reaktion både kan være uspecifikt og specifikt rettet mod fremmedlegemet. I reaktionen er den vigtigste forskel, at den specifikke reaktion forløber hurtigere og med større styrke, men uanset om reaktionen er uspecifik eller specifik, kan den inflammatoriske reaktion opdeles i tre faser:

### *Genkendelse af fremmedlegemet og mobilisering af immunsystemet*

Lokalt i vævet registrerer især AP-celler (makrofager og dendritceller), at et fremmedlegeme er trængt ind. Disse celler sætter det indledende angreb ind. I forbindelse hermed

- ◆ frigør AP-cellerne en lang række forskellige signalstoffer såsom kemotaktiske stoffer, der tiltrækker andre celler i immunsystemet (fx NK-celler, neutrofile granulocytter mv), og vasoaktive stoffer, der øger blodtilstrømningen til vævet og gør det lettere for de tiltrukne celler at trænge igennem blodkarrenes væg
- ◆ præsenteres antigen på AP-cellernes overflade, hvorved T- og B-memory celler aktiveres.

Hvis der i vævet allerede findes specifikke antistoffer af IgM- eller IgG-typen, vil disse bindes til fremmedlegemet. Dette fører til

- ◆ immobilisering af fremmedlegemet (dvs en bevægelig bakterie får vanskeligere ved at bevæge sig)
- ◆ forstærket optagelse af fremmedlegemet i makrofager og andre celler, der på deres overflade har receptorer for antistoffernes fc-del
- ◆ aktivering af komplementsystemet, der dels skaber et destruktivt enzymkompleks og dels frigør kemotaktiske og vasoaktive stoffer.

Resultatet af denne fase er således, at blodgennemstrømningen af vævet stiger, samt at væske og celler trænger ind i vævet fra blodet, hvilket kan ses som rødme og hævelse af huden eller af slimhinder i næse og hals.

Denne fase kan forløbe meget hurtigt (få minutter til få timer) i tilfælde af en IgE-medieret allergisk reaktion, der er karakteriseret af en massiv frigørelse af signalstoffer (kemotaktiske og vasoaktive) fra aktiverede mastceller og basofile granulocytter. I den celle-medierede immunreaktion bygger denne fase typisk op i styrke i løbet af et par dage.

### *Bekæmpelse af fremmedlegemet*

I denne fase udsættes fremmedlegemet for et mangesidigt, massivt angreb fra immunsystemets forskellige celler. Nogle celler (fx makrofager og neutrofile granulocytter mv) kan fagocyttere fremmedlegemet, der herefter destrueres inde i cellerne. Andre celler (fx eosinofile granulocytter og NK-celler) frigør destruktive enzymer og stoffer (fx peroxider og frie radikaler), når de kommer tæt på fremmedlegemet. Antistoffer og komplementfaktorer, der trænger ind i vævet fra blodet, kan føre til aktivering af komplementsystemet og skabelse af det destruktive 'membrane attack' enzymkompleks.

Denne fase resulterer som oftest i, at fremmedlegemet elimineres og bortskaffes. Som regel accelererer denne fase, idet aktiverede celler, der har kontakt med og angriber fremmedlegemet, også frigør kemotaktiske stoffer, der mobiliserer flere hvide blodlegemer. For det blotte øje viser dette sig ved, at der i centrum af reaktionsområdet (det betændte område) ses hvidt puds, fx omkring en splint i fingeren.

### *Opheling*

Det kan ikke undgås, at immunsystemets frigørelse af destruktive enzymer og stoffer også fører til lokale skader på omkringliggende væv. I ophelingsfasen vil immunsystemets celler fjerne døde

vævsceller og cellerester samt omløje bindevæv, således at styrken af arvæv gradvist øges. Afhængigt af omfanget af skader på vævet kan denne fase vare fra få dage op til flere måneder. I denne periode vil vævet lokalt have et forøget indhold især af makrofager.

Det skal bemærkes, at den inflammatoriske reaktion også kan startes af en lokal vævsskade, fx som følge af et slag. Den biologiske funktion er her, at der lokalt er behov for at mobilisere de celler i immunsystemet, der deltager i bortskaffelse af kroppens egne døde celler og i omløring af bindevæv. Ved et slag ødelægges en del celler, og herved frigøres de signalstoffer, der starter den inflammatoriske reaktion. Forløbet er således også ved slag en tidlig fase med rødme og hævelse, der indtræder hurtigt efter slaget.

## Det immuntoksikologiske testpanel

I den immuntoksikologiske prøvning af et kemisk stof gennemføres rutinemæssigt en række tests, der skal afklare, om stoffet har effekter på immunforsvaret. Generelt finder der ikke anerkendte internationale standarder for immuntoksikologisk prøvning af kemiske stoffer. OECD er for nærværende i gang med at udvide guideline 407 (14-dages og 28-dages test i gnavere) og guideline 408 (90-dages test) til også at omfatte yderligere immuntoksikologiske undersøgelser, hvis de histologiske undersøgelser viser ændringer i immunsystemets organer (knoglemarv, milt, brissel og lymfeknuder). Endvidere findes der fx i USA og Japan standarder for, hvilken test der skal anvendes, samt for, hvordan disse tests skal udføres.

Overordnet omhandler disse tests, der udføres på forsøgsdyr, følgende facetter af immunsystemets funktion:

- ◆ immunpatologi
- ◆ celle-medieret immunitet
- ◆ humoral (antistofafhængig) immunitet
- ◆ modstandsdygtighed over for infektioner og cancer.

### Immunpatologi

Grove mål for en immunpatologisk effekt kan opnås ved at veje de centrale lymfeorganer: milt, brissel (thymus) og lymfeknuder.

Vægten af organerne (justeret for forskelle i kropsvægt) sammenlignes for grupper af dyr, der er blevet udsat for teststoffet, og kontroldyr, der ikke er blevet udsat. En signifikant ændring i vægt af milten og/eller brisen tages som udtryk for, at stoffet kan føre til fejlfunktion af immunsystemet.

For at opnå yderligere information om karakteren af denne fejlfunktion gennemføres histologiske undersøgelser af lymfeorganerne. En forstørret milt kan opstå, hvis teststoffet inducerer en massiv antistofdannelse. I dette tilfælde ses mange vækstcentre, hvor B-celler differentierer til antistofdannende plasmaceller. Ved immunsuppression af antistofproduktion ses ofte en formindsket milt, og antallet af vækstcentre er lavt. Hvis stoffet i stedet fører til celle-medieret immunitet, vil lymfeknuderne vise en betydelig vægtforøgelse.

Yderligere oplysninger opnås også ved at differentialtælle antallet af forskellige celletyper i blodet eller i lymfeorganer og væv. Forskellige farvemetoder kan anvendes til forskellige celletyper, hvilket bl.a. afspejles i navngivningen af granulocytter, hvor eosinofile, basofile og neutrofile refererer til forskellige histologiske farvemetoder.

Inden for de seneste år er det blevet muligt at identificere forskellige typer af celler i immunsystemet, herunder de forskellige subpopulationer af T-celler, ud fra specifikke forskelle i cellernes overfladeproteiner. I disse specifikke undersøgelser anvendes immunhistologi, hvor farvningen af de forskellige celler sker vha specifikke fluorescerende antistoffer, der bindes til udvalgte overfladeproteiner. Til avancerede analyser fx af blodceller er der blevet udviklet et automatiseret udstyr (FAC), hvor specifikke antistoffer mod overfladeproteiner anvendes til samtidig tælling og sortering af celler fra immunsystemet.

Fig. 4.2 viser, hvordan immunsystemets forskellige celler udspringer fra fælles stamceller i knoglemarven. En immuntoksisk effekt på stamcellerne vil kunne føre til nedsat modstanddygtighed over for infektionssygdomme og kræft. Der er derfor blevet udviklet *in vitro* metoder, der kan anvendes til at undersøge celledelingsaktiviteten af forstadier til T-celler, B-celler og granulocytter. I disse undersøgelser udtages knoglemarv fra dyr, der har været udsat for teststoffet (og kontroldyr). Forstadier til T-celler, B-celler eller granulocytter isoleres og overføres til et dyrkningsmedie, der understøtter deres vækst og deling. *In vivo* gennemføres disse tests, ved at knoglemarven overføres fra dyr, der har været udsat for teststoffet, til dyr, der har fået deres eget immunsystem fuldstændigt undertrykt, fx ved bestråling (recipientdyr). Ved en sådan knoglemarvstransplantation med velfungerende stamceller vil recipientdyrene efter en passende vækstperiode udvikle et normalt immunsystem. I testen undersøges, om

immunsystemet fungerer normalt eller svækket, som udtryk for, at teststofferne har skadet stamcellerne i knoglemarven.

Mange giftstoffer virker især på celler, der hyppigt deler sig, og immunsystemets stamceller vil derfor være følsomme over for de fleste cytotoxiske (cellegiftige) stoffer. Test for cytotoxicitet er derfor et groft, men vigtigt effektmål. Nogle farvestoffer kan her anvendes til at vise, om cellerne er metabolsk aktive og dermed levende. Fx omdannes det gule tetrazoliumsalt ved cellernes stofskifte til et rødt formazamprodukt, der kan måles spektrofotometrisk. Tryptanblå er et stort molekyle, der passivt kan passere cellernes membran. Levende celler bruger energi på aktivt at pumpe dette farvestof ud igen. I mikroskop fremstår levende celler derfor ufarvede (eller svagt farvede), mens døde eller døende celler bliver farvet mørkeblå.

## Celle-medieret immunitet

Celle-medieret immunitet spiller en central rolle i bekæmpelsen af virusinfektioner og kræftsvulster, samt ved afstødning af transplantater, der ikke er vævsforenelige.

Celle-medieret immunitet undersøges let ved en 'skin graft test', hvor afstødningen af et stykke transplanteret, vævsuforenelig hud undersøges i dyr, der er blevet behandlet med teststoffet, og placebobehandlede kontroldyr.

I nogle tests udnyttes, at T-celler kan stimuleres til deling og proliferering, når de udsættes for såkaldte mitogene stoffer, fx Phyto-hemagglutinin (PHA) eller Concanavalin A (Con A). Efter at forsøgsdyrene er blevet udsat for teststoffet, udtages en blodprøve, T-celler isoleres og stimuleres med PHA eller Con A. En nedsat deling - sammenlignet med kontrolgruppen - tages som udtryk for en immunsuppressiv virkning af teststoffet på den celle-medierede immunitet. Som alternativ til PHA eller Con A kan specifikke kontaktallergener anvendes. I dette tilfælde svarer testen i princippet til den lymfocyt-proliferations-test, der er beskrevet i kapitlet Allergi og allergifremkaldende stoffer.

Inden for de senere år er mere avancerede tests blevet udviklet. Disse tests baseres på undersøgelser af det dannede cytokinmønster, hvilket kan give vigtige informationer om, hvorvidt teststoffet i særlig grad har virkning på T-h1- eller T-h2-celleresponse. Sådanne tests har særlig betydning i tilknytning til allergi (se kapitlet Allergi og allergifremkaldende stoffer).

En særlig test er Kimbers lokale lymfeknudetest i mus, der nu anbefales i OECD Test Guideline 406 til prædiktiv, præliminær screening af kontaktallergener. Testen tager udgangspunkt i de mekanismer, der i dag menes at kunne forklare udvikling af



kontaktallergi. Hvis et kontaktallergen påføres huden, vil det lokalt optages af antigen-præsenterende Langerhans celler, der vil vandre til de drænende lymfeknuder og her aktivere T-celler, så der opstår en klon af antigen-specifikke T-memory celler. I testen påføres teststoffet på huden. Herefter aflives musen, og de lokale lymfeknuder tages ud. Deling af celler i lymfeknuden (klonal aktivering) måles med højfølsomme teknikker.

## Humoral (antistofafhængig) immunitet

Antistofafhængig immunitet, der er baseret på klonal aktivering af B-celler og dannelse af specifikke antistoffer, har afgørende betydning i bekæmpelsen af mange bakterieinfektioner.

Antistofproduktion er i de fleste tilfælde T-celleafhængig, idet signaler fra T-hjælper celler er nødvendige for, at B-cellerne kan modne til antistofproducerende plasmaceller. En klassisk metode til at teste, om et stof indvirker på den T-celleafhængige antistofdannelse, er at undersøge den sekundære antistofdannelse (IgG) mod røde blodlegemer fra får (Sheep Red Blood Cells, SRBC), der indsprøjtes gentagne gange i forsøgsdyret (se fig. 4.5). Hvis de dyr, der er blevet udsat for teststoffet, viser en lavere produktion af antistoffer mod SRBC end dyrene i kontrolgruppen, tages dette som udtryk for immunsuppression af den T-celleafhængige antistofproduktion. Tilstedeværelse af antistoffer mod SRBC undersøges let ved en hæmagglutinationstest, hvor en serumprøve fra et testdyr (serumprøve varmebehandles ved 560°C for at inaktivere komplementsystemet) blandes med SRBC i en mikrotiterbakke med spidsbundede brønde. Antistofferne vil krydsbinde SRBC, der som et netværk udfælder på hele brøndens sider. Hvis der ikke er antistoffer til stede, vil SRBC synke til bunds. Set oppefra er en negativ prøve altså en lille, mørkerød prik, mens en positiv prøve er lysebrun og fylder hele brøndens diameter. I dag anvendes ofte mere højfølsomme immunkemiske teknikker, fx immunelektroforetiske metoder eller ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), idet SRBC erstattes med et opløseligt testantigen (fx bovin serum albumin eller ægalbumin), der er mere velegnet i disse teknikker.

I enkelte tilfælde, fx antistofdannelse mod lipopolysaccharid (komponent i gram-negative bakteriers ydre cellemembran), er den primære antistofproduktion (IgM) uafhængig af T-celler. Ved at anvende lipopolysaccharid i stedet for SRBC og undersøge for den primære antistofproduktion (IgM) er det således muligt selektivt at teste, om et stof indvirker på den T-celleafhængige antistofproduktion.

## Modstandsdygtighed over for infektioner og cancer

Hvis et stof har immunmodulerende egenskaber (enten immun-suppression eller immunstimulation), kan dette føre til en ændret modstandsdygtighed over for infektioner eller over for cancer.

Dette forhold testes ved under definerede forhold at belaste dyr, der har været udsat for teststoffet (og en kontrolgruppe), med en infektion.

Bakterier som *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* og *Staphylococcus aureus* bekæmper i vid udstrækning gennem produktion af specifikke antistoffer (IgG), der bindes til bakteriernes overflade og aktiverer komplementsystemet, således at det bakteriedræbende 'membran attack complex' dannes. Endvidere vil makrofager bindes til antistoffernes Fc-region og optage og destruere bakterierne. Ved at inficere med sådanne bakterier undersøges den antistof-afhængige modstandsdygtighed over for infektioner.

I immunsystemets bekæmpelse af virus (fx influenza eller herpes) eller transplantable kræftceller spiller cytotoxiske T-celler en central rolle. Ved at anvende denne type infektion undersøges således den celle-medierede modstandsdygtighed over for infektioner.

## Immunsuppressive påvirkninger i arbejdsmiljøet

Langt de fleste immuntoksikologiske undersøgelser har søgt at afklare, om et teststof har immunsuppressive egenskaber.

Inden for den medicinske behandling kendes en række eksempler på immunsuppressive stoffer, fx corticosteroider. Disse finder anvendelse i behandling af allergiske lidelser, gigt, sclerose mv, samt for at forhindre, at et transplanteret organ ud-stødes.

Mange giftstoffer virker især på celler, der hyppigt deler sig, og immunsystemets stamceller vil derfor være følsomme over for de fleste cytotoxiske (cellegiftige) stoffer. Dette er et velkendt problem i kræftbehandling med cytostatika eller stråleterapi. Behandlingen har til formål at dræbe kræftceller, der hurtigt deler sig. Men samtidig rammes immunsystemets stamceller, således at patientens immunapparat sættes helt eller delvist ud af funktion. Behandlingen har således flere negative effekter, hvor nedsat modstandsdygtighed over for infektioner samt nedsat evne til selv at bekæmpe kræftsvulsten har særlig stor betydning. For at

begrænse disse negative effekter søger kræftforskningen stadig efter nye medikamenter og behandlingsformer, der mere selektivt rammer kræftcellerne uden at påvirke immunsystemet.

Tabel 4.3 indeholder en liste over udvalgte arbejdsmiljørelevante stoffer med immunsuppressive egenskaber. Eksemplerne i tabellen viser, at et række forskellige stoffer, der kan findes i arbejdsmiljøet og indeklimaet, har immunsuppressive egenskaber. Den immunsuppressive virkning vil, hvis eksponeringen er tilstrækkelig høj, forstærke effekten af infektioner i fx luftvejene. Der findes imidlertid kun begrænset viden om arbejdsbetingede infektionssygdomme, der rammer store grupper af arbejdstagere. Opmærksomheden har især været rettet mod øget infektionsrisiko på hospitaler, skoler/børneinstitutioner, kloakarbejde o.l., hvor udsættelsen for infektiøse mikroorganismer i perioder kan være høj. Selv for disse job mangler der systematiske undersøgelser af betydningen af udsættelse for immunsuppressive stoffer. Rygning vides dog at øge risikoen for luftvejsinfektioner, og polycykliske aromatiske hydrocarboner (PAH), ozon og nitrose gasser er bestanddele i tobaksrøg.

## Immunstimulation

### Immunstimulerende påvirkninger i arbejdsmiljøet

I modsætning til immunsuppression har immunstimulation indtil for nylig haft ringe bevågenhed i immuntoksikologien. Interessen for immunstimulation er imidlertid steget kraftigt som en del af den forskning, der søger forklaringer på, at hyppigheden af IgE-medieret allergi er stærkt stigende i den vestlige verden.

I tilknytning til vaccination har det længe været kendt, at antistofproduktionen forstærkes, når allergenet gives sammen med aluminiumhydroxid, der virker som adjuvans. Tilsvarende kan det celle-medierede immunforsvar forstærkes ved brug af Freund's Komplette Adjuvans, der dog pga risiko for komplikationer ikke anvendes på mennesker. Ligeledes er det velkendt, at andre stoffer, fx saponiner, olie-vandemulsioner, endotoksin, muramyl dipeptid mv kan forstærke sensibiliseringen af immunsystemet enten gennem uspecifikke eller specifikke mekanismer.

Uspecifikke mekanismer kan fx være en simpel depoteffekt, der sikrer, at allergenet frigøres langsomt og derfor stimulerer immunsystemet gennem længere tid. En anden mulighed er, at den kemiske påvirkning forøger den biologiske tilgængelighed af

Stof	Virkemåde
<b>Aromatiske forbindelser</b>	
Benzen	Cytotoksisk på stamceller i knoglemarv → Nedsat cellemedieret og humoral immunitet og nedsat modstandsdygtighed over for infektioner
Halogenerede aromatiske hydrocarboner (fx PCB, PBB)	Cytotoksisk med reduktion i størrelse af primære og sekundære lymfeorganer → Nedsat humoral immunitet
Polycykliske aromatiske hydrocarboner (PAH)	Suppression af humoral immunitet, mens celle-medieret immunitet kun påvirkes svagt
<b>Luftforureninger</b>	
Ozon Nitrose gasser (NO <sub>x</sub> )	Nedsat fagocytotisk og bakteriedræbende aktivitet af makrofager i lungerne → Øget følsomhed over for luftvejsinfektioner
<b>Metaller</b>	
Bly og cadmium	Suppression af humoral og celle-medieret immunitet og nedsat modstandsdygtighed over for infektioner
Methyl kviksølv	Suppression af primært og sekundært antistofsvær (humoral immunitet)
Organiske tinforbindelser	Reduceret cellemedieret immunitet → Nedsat afstødning af transplanteret hud og nedsat cellemedieret allergi

allergener. Opmærksomhed på denne mekanisme er særlig stor for hudkontakt, hvor kemiske påvirkninger nedbryder hudbarrieren og dermed gør det lettere for et kontaktallergen at trænge ind i huden. En tredje mulig uspecifik mekanisme er knyttet til lokal vævsirritation, hvor inflammatoriske reaktioner startes enten som følge af lokale vævsødelæggelser eller som følge af, at celler i epitelet (fx lungeepitelceller i luftvejene eller keratinocytter i huden) frigør signalstoffer som reaktion på udsættelse for lokalt irriterende stoffer.

Mere specifikke mekanismer er knyttet til, at den kemiske påvirkning har en direkte effekt på centrale celler i immunsystemet, fx AP-celler. Endotoksin, der stammer fra cellemembranen af gramnegative bakterier, virker således immunstimulerende, ved at celler i immunsystemet, fx makrofager, har specifikke receptorer for endotoksin på deres overflade. Ved kontakt med endotoksin vil makrofager således stimuleres til at frigøre signalstoffer, der aktiverer resten af immunsystemet. Herunder tilkaldes T-celler. Hvis der samtidig med udsættelse for endotoksin også sker en udsættelse for allergener, hvilket ofte mere er reglen end undtagelsen ved udsættelse for organisk støv, kan endotoksin derfor bevirke, at der er flere T-celler til stede til at reagere med det indtrængende allergen. Det har for nylig vist sig, at nogle plastblødgørere (phthalater) virker immunstimulerende i dyrekperimentelle undersøgelser, og der er i denne sammenhæng blevet fremsat den interessante hypotese, at phthalater kan virke

Tabel 4.3. Udvalgte immunsuppressive stoffer i arbejdsmiljøet.

immunstimulerende ved deres lighed med visse centrale signalstoffer (prostaglandiner). Tabel 4.4 giver eksempler på udvalgte immunstimulerende påvirkninger i arbejdsmiljøet.

Der foreligger kun sparsomme undersøgelser af, om immunstimulerende stoffer i arbejdsmiljøet forstærker udvikling af allergi. Epidemiologiske befolkningsundersøgelser har vist, at udsættelse for partikulære luftforureninger kan føre til en forøget hyppighed af astma, og meget tyder nu på, at dette også er tilfældet for dieselpartikler. Endvidere har kontrollerede provokationsforsøg vist, at endotoksin kan udløse luftvejsreaktioner hos astmatiske personer ved langt lavere koncentrationer end hos personer, der ikke har astma. En enkelt undersøgelse af arbejdstagere ved en fransk fabrik, der fremstiller vaskepulver, viste, at udsættelse for detergenter (overfladeaktive stoffer) øgede den specifikke antistofproduktion mod subtilisin, der er et kendt, stærkt allergen (se kapitlet om allergi og allergifremkaldende stoffer). Danske undersøgelser tyder på, at rengøringsassistenter har en overhyppighed af såvel hudproblemer som luftvejs-symptomer. En endnu ikke undersøgt hypotese er her, at overhyppigheden af luftvejs-symptomer kan skyldes en arbejdsbetinget udsættelse for overfladeaktive stoffer.

Som det fremgår af kapitlet om Allergi og allergifremkaldende stoffer, har hyppigheden af IgE-medierede allergiske sygdomme vist en dramatisk stigning i hele den vestlige verden inden for de sidste årtier. Denne stigning er ikke forårsaget af, at der er kommet nye allergener til, eller at udsættelsen for kendte allergener er steget. Meget tyder nu på, at udsættelse for uspecifikke, immunstimulerende påvirkninger mobiliserer og klargør de centrale celler i immunsystemet, således at det i højere grad vil reagere med et T-h2 respons og dermed udvikling af en IgE-medieret allergi.

## Testmetoder for immunstimulation

Der findes endnu ingen generelt accepterede standardmetoder til test for kemiske stoffer og produkters immunstimulerende effekter. Imidlertid er der både internationalt og i Danmark en stærkt stigende interesse for, at der udvikles sådanne metoder. I det følgende redegøres derfor kort for den retning, som forskningen på dette område tager.

### *In vitro testmetoder*

Meget tyder nu på, at en uspecifik, lokal stimulering af immunsystemet til produktion af proinflammatoriske signalstoffer (cytokiner), der mobiliserer og klargør de centrale celler i immunsystemet,

Stof	Virkemåde mv.
<b>Luftforureninger</b>	
Dieselpartikler	Vist at forstærke den specifikke IgE-produktion i forsøgsdyr. Dieselpartikler kan inducere IL-1 frigørelse fra makrofager in vitro.
Partikulære luftforureninger (svovl), black smoke, PAH'er, PM10 etc)	Epidemiologiske undersøgelser viser en højere hyppighed af astma. Virkningen er måske gennem irritative skader på luftvejsepitelet.
<b>Mikrobielle komponenter</b>	
Endotoksin	Vist at forstærke den specifikke IgE-produktion i forsøgsdyr. Mekanisme sikkert gennem specifikke endotoksinreceptorer på immunkompetente celler.
Enterotoksin fra <i>E.coli</i>	Forstærker antistofdannelse mod modelallergen (ægalbumin) i dyreforsøg. Mekanisme er ukendt.
Koleratoksin	Forøger produktion af IgA, IgM, IgG og IgE. Opregulerer T-h2 respons og fremmer måske også antigenpræsentationen.
<b>Overfladeaktive stoffer</b>	
Sapponin	Fremmer den specifikke produktion af IgE og IgG ved oral indgift. Virker måske ved at øge passagen af unedbrudt allergen hen over tarmen.
Detergent matrix (basisblanding til vaskepulver)	Øger det specifikke IgE-antistofsvær over for subtilisin (et proteinspaltende enzym, der bl.a. anvendes i rengøringsmidler). Ukendt mekanisme.
SDBS (detergent)	Øger den specifikke produktion af hæmagglutinerende antistoffer (IgG og IgM). Virker måske ved at øge optagelsen af allergen.
SDS (detergent)	Øger den specifikke IgE-produktion i mus og stimulerer lungeepitelceller til at producere IL-8. Mekanisme ukendt.

kan have stor betydning for senere udvikling af en specifik allergi. Forskningen på dette område har fokus på at udvikle testmetoder på isolerede celler, hvor især dannelsen af signalstoffer tages som udtryk for, at det testede stof har proinflammatoriske og/eller allergene egenskaber. Tabel 4.5 summerer udvalgte eksempler på sådanne testmetoder.

På hudområdet skal især fremhæves test på keratinocytter. Keratinocytter udgør et sammenhængende netværk af celler i huden, og et indtrængende kemisk stof kan ikke undgå at komme i kontakt med en keratinocyt. Adskillige studier har vist, at aktivering af keratinocytter har stor betydning ved udvikling af irritativt og allergisk kontakteksem. Keratinocytter er lette at dyrke og udgør derfor et attraktivt testsystem til at screene kemiske stoffer for deres potentiale til at påvirke hudens immunsystem. Måling af de proinflammatoriske cytokiner IL-6 og TNF- $\alpha$  efter stimulation med et kemisk teststof tages som udtryk for, at teststoffet kan stimulere immunsystemet uspecifikt. Hvis keratinocytterne derimod producerer interferon- $\gamma$ , kan det tages som udtryk for, at teststoffet kan forskyde immunsystemet i retning af allergisk kontakteksem (T-h1 respons).

Tilsvarende test for uspecifik effekt på immunsystemet i lungerne

Tabel 4.4. Udvalgte immunstimulerende stoffer i arbejdsmiljøet.

kan udføres på isolerede lungeepitelceller, hvor cellelinien A549 er den foretrukne. Denne cellelinie kan producere det proinflammatoriske cytokin IL-8, men cellelinien danner ikke cytokiner, der i sig selv kan forskyde immunsystemets balance i retning af T-h1 eller T-h2 respons, og metoden kan derfor ikke anvendes til at bedømme, om det testede stof især vil stimulere udvikling af en IgE-medieret allergi eller en celle-medieret allergi.

In vitro metoder til at teste for, om et kemisk stof stimulerer udvikling af en IgE-medieret allergi eller en celle-medieret allergi, baseres på mere centrale celler i immunsystemet, fx antigen-præsenterende celler. Det undersøges her, om udsættelse for det testede stof fører til, at cellerne frigør cytokiner og overfladeproteiner, der forskyder immunsystemets balance i retning af et T-h1 respons (celle-medieret allergi, fx kontaktallergi), eller et T-h2 respons (IgE-medieret allergi, fx nældefeber, høfeber, allergisk astma). Et problem ved disse tests er, at det ofte ikke er muligt at dyrke de relevante antigen-præsenterende celler in vitro gennem længere tid. Løsningen har været at anvende udvalgte kræftcellelinier (myelomceller), der er isoleret fra patienter med lymfekræft. Sådanne celler er ofte lettere at dyrke, og mange cellelinier har bevaret udtalte ligheder med antigen-præsenterende celler, bl.a. evnen til at producere en række forskellige cytokiner. I undersøgelser af luftvejsallergener er den makrofagliggende cellelinie U937 ofte anvendt. Ved test af et kemisk teststof vil det producerede mønster af cytokiner være et mål for, om stoffet potentielt er et kontaktallergen (der dannes INF- $\gamma$  typisk for et T-h1 respons) eller et luftvejsallergen (der dannes IL-4, IL-5 og IL-10 typisk for et T-h2 respons).

### *Dyreeksperimentelle testmetoder for kemiske stoffers adjuvanseffekt*

Disse testmetoder svarer i princippet til de metoder, der anvendes til at teste for kemiske stoffer og produkters allergene egenskaber. Kapitlet om Allergi og allergifremkaldende stoffer giver en nærmere redegørelse for disse testmetoder.

Når der skal testes for kemiske stoffers adjuvante egenskaber mht at stimulere dannelse af specifikke IgE-antistoffer, anvendes et kendt allergen (fx ægalbumin), og testen har til mål at undersøge, om det testede stof, der gives i kombination med allergenet, fører til en større produktion af specifikke IgE-antistoffer, end hvis allergenet gives alene. Ofte anvendes også som positiv kontrol en kendt stærk adjuvans (fx aluminiumhydroxid), og styrken af adjuvanseffekten af det testede stof kan således sammenlignes med en kendt reference.

I disse metoder er sensibiliseringsvejen afgørende. I en simpel

Celletype	Eksempler	Signalstof mv	
Humane epitelceller	Lungeepitelceller ◆ A549 ◆ 9HTEo-	IL-6, IL-8 ICAM-1	
	Primære lungeepitelceller	ICAM-1	
	Bronkiale epitelceller ◆ BET-1A	IL-8	
	Primære nasale epitelceller	Proliferation	
	Tyktarm epitelceller ◆ T80 ◆ Caco-2 ◆ HT-29 ◆ SW620	IL-8 IL-8 IL-8 IL-8	
	Urinveje epitelceller ◆ A498 ◆ J82	IL-6, IL-8 IL-1, IL-6, IL-8	
	Adenom cellelinie ◆ HeLa	IL-6	
	Keratinnocytter	IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$	
	Humane monocytter	Lymfom cellelinier ◆ U937 ◆ THP-1 ◆ HL-60	IL-1, IL-6, TNF IL-1, IL-6, IL-8, TNF IL-6
		Primære mononukleære celler	IL-1, IL-6, IL-8, TNF
Primære mastceller		IL-4	

Tabel 4.5. Eksempler på in vitro cellemetoder for pro-inflammatoriske og allergene egenskaber.

screeningstest, der er baseret på en standardiseret lavdosis sensibiliseringsmetode i mus, gives teststoffet og allergenet ved subkutan injektion. Herved fås et mål for den systemiske adjuvans-effekt, men det er vanskeligt at fortolke, om en tilsvarende adjuvans-effekt vil opstå fx ved inhalation af teststoffet. Flere forskningsgrupper arbejder derfor med at udvikle testmetoder, hvor adjuvans-effekt undersøges fx i etablerede inhalationsmodeller for allergi.

## Litteratur

Brooks BO, Aldrich FD, Utter GM, DeBroy JA, Schimke RD. Immune Responses to Pollutant Mixtures from Indoor Sources. In Sources of Indoor Air Contaminants - Characterizing, Emissions and Health Impacts (Eds. Tucker WG, Leaderer BP, Molhave L, Cain WS). Ann New York Acad. Sci. Vol. 641.



- Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Third Edition. 1986.
- International Programme on Chemical Safety - IPCS.  
Environmental Health Criteria Document (EHC) No. 180 on Principles and methods for assessing Direct Immunotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
- International Programme on Chemical Safety - IPCS.  
Environmental Health Criteria Document (EHC) on Scientific Principles and Methods for Assessing Allergic Hypersensitization Associated with Exposure to Chemicals. First draft February 1997.
- Knoth Clausen S. Mulig adjuvant effekt af det anioniske detergent sodium-dodecyl-benzen-sulfonat (SDBS). Specialrapport. Københavns Universitet 1997.
- Luster MI, Portier C, Pait DG, White KL, Gennings CJr, Munson AE, Rosenthal GJ. Risk assessment in immunotoxicology I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fundam. Appl. Toxicol.* 10: 2-19 (1992).
- Luster MI, Portier C, Pait DG, Rosenthal GJ, Germolec DR, Corsini E, Blaylock BL, Pollock P, Kouchi Y, Craig W, White KL, Munson AE, Comment CE. Risk assessment in immunotoxicology II. Relationships between immune and host resistance tests. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21: 71-82 (1993).
- OECD Guideline for Testing of chemicals 406. Skin sensitisation. Adopted by the Council 17th July 1992.
- OECD Guideline for Testing of chemicals 407. Repeated Dose Oral Toxicity - rodent: 28-day and 14-day Study. Adopted by the Council 12th May 1981.
- OECD Test Guideline Programme ENV/MC/CHEM/TG(98)6.  
Immunotoxicity testing: Possible future work.
- US Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.7800. Immunotoxicity "Public draft".
- Yakuji Nippo, LTD. Japanese Guidelines for non-clinical studies of drugs manual 1995. Editorial supervision by Pharmaceutical and Cosmetical Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, Japanese Ministry of Health and Welfare.





KAPITEL 5

# Allergi og allergi- fremkaldende stoffer

*Otto Melchior  
Poulsen  
Mari-Ann Flyvholm  
Jesper Kristiansen*

# Allergi og allergi- fremkaldende stoffer

Allergi kan opfattes som en ubalanceret kraftig og skadelig immunologisk reaktion på fremmede påvirkninger, der normalt er relativt harmløse og bekæmpes lokalt med svage reaktioner. Det er vigtigt at bemærke, at de allergiske reaktioner ikke i mekanisme adskiller sig fra de immunologiske reaktioner, der normalt yder immunitet og beskyttelse, fx mod infektioner. Et basalt kendskab til immunsystemets opbygning og funktion danner basis for forståelsen af de forskellige allergiske reaktioner. Det foregående kapitel om immuntoksikologi giver en introduktion til immunsystemets bestanddele og deres funktion. Endvidere omhandler førnævnte kapitel eksempler på stoffer, der virker generelt dæmpende på immunsystemet (immunsuppression), samt stoffer, der kan forstærke udvikling af allergi (immunstimulation) uden selv at være allergener.

Inden for allergiområdet skelner man mellem en række forskellige sygdomme i luftveje, lunger og øjnenes slimhinder (tabel 5.1), samt i huden (tabel 5.2). Som det fremgår af tabel 5.1 og 5.2, kan disse sygdomme være både allergisk og ikke-allergisk betingede, hvilket vanskeliggør både epidemiologiske undersøgelser og den kliniske udredning.

Inden for de seneste årtier er allergiske luftvejslidelser steget voldsomt i den vestlige verden. Selvom det langt fra er alle tilfælde af luftvejsallergi, der skyldes arbejdsmiljøet, må allergikere generelt betragtes som en specielt følsom gruppe. Hvis relevante allergener er til stede i arbejdsmiljøet (fx husstøvmider eller kattehår), vil en allergiker reagere selv ved meget lave doser. Endvidere kan visse allergiske lidelser spille en rolle ved udvikling af arbejdsbetingede lidelser. Op mod 15-20% af børn og unge har eller har haft astma, høfeber eller andre symptomer på allergi. Denne gruppe vil have behov for større beskyttelse, når de debuterer på arbejdsmarkedet.

Hovedparten af de arbejdsbetingede hudlidelser er kontakteksem, og arbejdsbetingede hudlidelser er de tredjehyppigst anmeldte og de hyppigst anerkendte erhvervsbetingede lidelser i Danmark med ca. 1.700 anmeldelser pr. år i perioden 1994-96. Også for de arbejdsbetingede hudlidelsers vedkommende rammer problemet især yngre mennesker.

Mhp. at sikre en effektiv forebyggelse af luftvejs- og kontaktallergi er det nødvendigt at have toksikologisk viden om, hvorvidt stoffer er allergifremkaldende eller på anden måde kan påvirke immunsystemet i uheldig retning.

Som nævnt i foregående kapitel kan test for stoffers allergifremkaldende egenskaber opfattes som en deldisciplin af immuntoksikologien. Imidlertid udgør allergi et så omfattende problem, at et selvstændigt kapitel herom er på sin plads. I det følgende gives en kortfattet introduktion til mekanismerne bag allergi, hvordan allergifremkaldende stoffer testes, samt eksempler på vigtige luftvejs- og kontaktallergener. Kapitlet berører kun arbejdsbetingede allergiske lidelser meget overfladisk. Dette emne er grundigt dækket i Basisbog i Arbejdsmedicin. Sidst i kapitlet nævnes supplerende litteratur, som særligt interesserede kan have glæde af at læse.

Tabel 5.1. Hyperreaktivitetssygdomme i øvre og nedre luftveje samt øjnenes slimhinder.

Sygdom	Mekanisme
Astma (astma bronchiale)	Mastceller i bronkieslimhinden aktiveres til at frigøre histamin og andre biologisk aktive stoffer, der fører til en forsnævring af bronkierne og hæmmed vejrtrækning.
<i>Allergisk astma</i>	Specifikke IgE-antistoffer (fx mod pollen, husstøvmider, dyrehår, svampesporer etc) sensibiliserer mastcellerne.
<i>Ikke-allergisk astma</i>	Uspecifik hyperreaktivitet i bronkierne (reagerer fx på kulde, fysisk anstrengelse mv).
Rhinitis (høfeber)	Mastceller i slimhinden i øvre luftveje og næse aktiveres til at frigøre histamin og andre biologisk aktive stoffer, der bl.a. fører til, at slimhinderne hæver (tilstoppet næse).
<i>Allergisk rhinitis (allergisk snue)</i>	Specifikke IgE-antistoffer mod allergener sensibiliserer mastcellerne.
<i>Ikke-allergisk rhinitis (helårssnue)</i>	Uspecifik hyperreaktivitet i slimhinderne
Conjunctivitis (rindende øjne)	Mastceller i slimhinder i øjnene aktiveres til at frigøre histamin og andre biologisk aktive stoffer, der bl.a. fører til øget produktion af tårevæske, røde øjne mv.
<i>Allergisk conjunctivitis</i>	Specifikke IgE-antistoffer mod allergener sensibiliserer mastcellerne.
<i>Ikke-allergisk conjunctivitis</i>	Uspecifik hyperreaktivitet i øjnens slimhinder
Alveolitis (pneumonitis)	Aktivering af komplementsystem og makrofager i alveolerne. Herved frigøres biologisk aktive stoffer, der fører til influenzalignende symptomer (feber, hovedpine, muskelsmerter) og nedsat lungefunktion.
<i>Allergisk alveolitis (tærskerlunge mv)</i>	Specifikke antistoffer af IgG- eller IgM-klassen danner komplekser med et indtrængende allergen (fx sporer fra mikroorganismer) i alveolerne. Disse komplekser aktiverer komplementsystemet og makrofager.
<i>Ikke-allergisk alveolitis (toksisk alveolitis)</i>	Uspecifik aktivering af makrofager (fx ved indånding af endotoksin fra gramnegative bakterier)

Sygdom	Mekanisme
Eksem (kontaktseksem)	Fællesbetegnelse for en række forskellige hudlidelser. Patologiske ændringer i huden med symptomer som tørhed, rødme, kløe, revnedannelser, væksebærer, sår.
<i>Allergisk kontaktseksem = kontakt dermatitis (kontaktallergi)</i>	Specifikke T-celler i huden reagerer på et kontaktallergen (fx nikkel) og aktiverer makrofager, der frigør enzymer, som fører til en lokal vævsødelæggelse.
<i>Ikke-allergisk eksem = irritativt eksem</i>	T-celler (og makrofager) i huden reagerer uspecifikt på en hudirriterende påvirkning.
Atopisk eksem (atopisk dermatitis, børneeksem, prurigo Besnier)	Arveligt betinget eksem med sår, der ofte sidder i albuehuler eller knæhaser. Eksemet er uspecifikt, men atopiske personer har en unormal stor produktion af IgE-antistoffer.
Urticaria (nældefeber)	Mastceller i huden aktiveres til at frigøre histamin og andre biologisk aktive stoffer, der fører til en straksreaktion med hævelse, rødme og kløe.
<i>Allergisk nældefeber</i>	Specifikke IgE-antistoffer mod allergener sensibiliserer mastcellerne.
<i>Ikke-allergisk nældefeber</i>	Uspecifik hyperreaktivitet i huden, der reagerer på temperaturforandringer, mekaniske påvirkninger mv.

Tabel 5.2. Hyperreaktivitetssygdomme i huden.

## Forekomst og omfang

En del undersøgelser tyder på, at der er sket en reel stigning i hyppigheden af allergiske lidelser inden for de seneste årtier. Den generelle hyppighed af allergi i befolkningen omfatter en lang række sygdomme og symptomer, som også inkluderer arbejdsbetingede eller arbejdsforværrede lidelser. Præcist hvor stor en andel af disse lidelser der skyldes arbejdsmiljøet, er svært at vurdere, da anmeldelser af erhvervsbetingede allergiske lidelser af forskellige årsager kun kan forventes at udgøre "toppen af isbjerget".

Befolkningsundersøgelser af *voksne danskere* i 1990 og 1994 viste, at 28% af de undersøgte havde positive reaktioner over for et eller flere inhalationsallergener. 14-15% angav at have haft høfeber (allergisk snue), og ca 5% havde haft astma på et eller andet tidspunkt. 15% havde en eller flere kontaktallergiske reaktioner, og ca 20% angav at have haft håndeksem.

Ved atopi forstås, at personen pga en arvelig defekt i immunsystemets regulering danner mere end normalt af antistoffer af IgE-typen, der er centrale fx i allergisk astma og høfeber. Atopiske børn har ofte et karakteristisk atopisk eksem. I dag har ca 15% af en fødselsårgang (før skolealderen) atopisk eksem, hvor det i 1960'erne kun ramte ca 3% af børnene. 90% af de

børn, der udvikler atopisk eksem, får det før skolealderen, og 10-15% har det stadig i voksenalderen.

Atopi er en velkendt risikofaktor for udvikling af allergiske luftvejslidelser, og atopiske personer udvikler oftere allergisk astma og høfeber. Endvidere viser atopiske personer ofte en øget følsomhed i lungerne, når de udsættes for kemiske stoffer, der ikke i sig selv er allergene. Således er atopiske personer fx mere følsomme ved indånding af endotoksin (lipopolysaccharid fra gramnegative bakteriers cellevæg) end normale personer.

Mht hudlidelser øger atopi generelt ikke risikoen for at udvikle en kontaktallergi, men atopisk eksem fordobler risikoen for udvikling af irritativt håndeksem, og erhvervsmæssig udsættelse for irritative hudpåvirkninger fordobler yderligere risikoen.

Hudsygdomme er de tredjehyppigst anmeldte og de hyppigst anerkendte erhvervsbetingede lidelser i Danmark med ca 1.700 anmeldelser pr. år i perioden 1994-96. Erhvervsbetingede hudlidelser rammer i modsætning til andre erhvervsbetingede lidelser især yngre mennesker. Hovedparten af de arbejdsbetingede hudlidelser er kontakteksem. Irritativt eksem er noget hyppigere end allergisk eksem, men andelen varierer fra undersøgelse til undersøgelse, fordi diagnosen irritativt eksem bl.a. baseres på, at der ikke har kunnet påvises en relevant allergi. Hertil kommer, at et eksisterende irritativt eksem øger risikoen for udvikling af kontaktallergi, da allergener lettere trænger gennem en beskadiget hudbarriere.

Biologiske og kemiske hudbelastninger er hyppige i en række brancher, fx hotel og restauration, nærings- og nydelsesmiddelindustrien, rengøringsvirksomheder, social- og sundhedsområdet, frisører samt elektronikindustri (jf At's branchebilleder). Da det som nævnt især er yngre mennesker, der rammes af erhvervsbetingede hudlidelser, fører disse ofte til behov for omskoling eller erhvervsskift.

Mange undersøgelser tyder nu på, at luftvejsirritation kan have betydning for udvikling af allergi. Opmærksomheden har især været rettet mod cigaretrøg, dieseludstødning, ozon, formaldehyd, nitrøse gasser og inhalerbare partikler. Kapitlet om immunotoksikologi giver en mere udførlig gennemgang af dette emne. Luftvejsirritation kan forekomme i de fleste brancher, fx jern- og metalindustri, træ- og møbelindustri, kemisk industri og rengøringsvirksomheder. Omkring 1/3 af Arbejdstilsynets grænseværdier er fastsat på baggrund af luftvejsirritation.

Luftvejsallergi forekommer i mange brancher, fx engroshandel, rengøringsvirksomheder samt nærings- og nydelsesmiddelindustrien, og anmeldelser af erhvervsbetingede allergiske luftvejslidelser omfatter en række forskellige lidelser, hvoraf astma, bronkitis og høfeber er de hyppigste. Samlet var der ca 450 anmeld-



dels pr år i perioden 1994-96. Luftvejsallergi medfører ofte tab af erhvervsevne.

## Inddeling af overfølsomhed og mekanismer for allergi

Lærebøger har ofte anvendt Gell og Coombs nu klassiske inddeling af immunologiske overfølsomhedsreaktioner i fire basale typer (type I til type IV). Denne inddeling er summeret i tabel 5.3. I forhold til allergi er inddelingen imidlertid ikke optimal. Ofte vil en allergisk person både have symptomer på type I (IgE-medieret overfølsomhed) og type IV (celle-medieret overfølsomhed). Type II, der især er knyttet til reaktioner over for transplantater, har derimod ingen betydning ved allergi.

Et grundliggende træk ved immunsystemet er, at det genkender og reagerer på fremmede rumlige overfladestrukturer på molekyler, de såkaldte antigendeterminanter. Begrebet antigen anvendes oftest om et fremmedlegeme (bakterie, virus, allergen mv) med et stort antal forskellige antigendeterminanter på sin overfalde. Ved luftvejsallergi er der oftest tale om proteiner eller proteinfragmenter (peptider). Andre og væsentlig mindre kemiske stoffer, såkaldte haptener, kan imidlertid også virke som anti-

Type	Eksempel	Mekanisme
<b>Type I</b> Anafylaksi	Astma, høfeber, nædefeber	Når et allergen bindes til specifikke antistoffer af IgE-typen på overfladen af mastceller eller basofile granulocytter, frigør cellerne biologisk aktive stoffer (mediatorer), der udløser symptomerne.
<b>Type II</b> Antistofafhængig cytotoksisk hypersensitivitet	Hæmolytisk anæmi, afstødning af transplantater	Antistoffer af IgG- eller IgM-typen bindes til overfladen af cellen (fx blodcelle), der destrueres af komplementsystemet, af "killer" celler eller af makrofager, der kan optage celler mærket med IgG eller IgM.
<b>Type III</b> Komplement- medieret hypersensitivitet	Glomerular nephritis, serumsyge, tærskerlunge	Antigen-antistofkomplekser udfældes og deponeres i vævet, hvor kompleksene aktiverer komplementsystemet, således at de dannede, destruktive enzymer fører til lokale vævsskader.
<b>Type IV</b> Cellemedieret (forsinket) hypersensitivitet	Kontaktallergi, tuberkulose	Sensibiliserede T-celler genkender allergenet og aktiverer makrofager, der frigør destruktive enzymer, som giver lokale vævsskader.

Tabel 5.3. Gell og Coombs klassiske inddeling af overfølsomhedsreaktioner.

gener. Dette sker, ved at haptenet bindes til et af kroppens egne proteiner, således at den rumlige struktur af haptent-proteinkomplekset opfattes som fremmed. Haptener har særlig stor betydning i kontaktallergi.

## Kontaktallergi (allergisk kontakteksem)

Ved kontaktallergi forstås her en specifik, celle-medieret allergi-reaktion i huden, hvor symptomerne opstår 12-72 timer efter udsættelse for allergen (type IV i Gell og Coombs inddeling). T-h1-celler spiller en central rolle ved kontaktallergi. I modsætning hertil opstår symptomer på nældefeber, der er en IgE-medieret allergireaktion, inden for den første time efter udsættelse for allergenet. Nældefeber vil blive gennemgået i afsnittet om høfeber og allergisk astma.

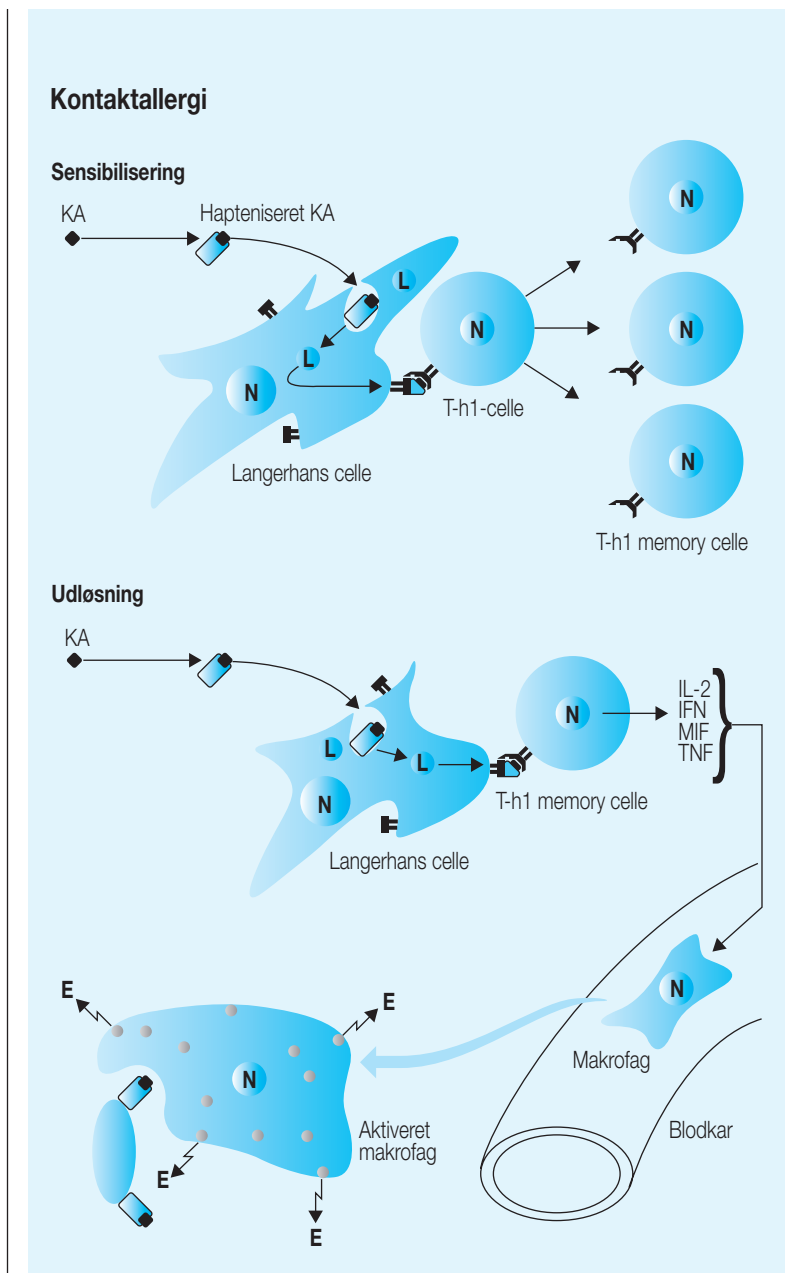
### *Sensibilisering og udløsning af kontaktallergi*

De fleste kontaktallergener er små, kemisk reaktive stoffer, der virker som haptener. Efter indtrængning i huden vil disse stoffer reagere med (og bindes covalent til) proteiner i det øverste hudlag (epidermis) (fig. 5.1). Det dannede kompleks mellem kontaktallergen og protein (hapteneret protein) opfattes af kroppen som fremmed. Langerhans celler, der danner et sammenhængende netværk af antigenpræsenterende celler i epidermis, vil optage og nedbryde det haptenerede protein. Nedbrydningsprodukter med haptenet bliver indbygget i MHC II overfladeprotein og præsenteres på cellens overflade.

De Langerhans celler, der nu har haptent-MHC II på overfladen, vandrer fra epidermis til de dybereliggende lymfekar og videre til de drænende lymfeknuder, hvor aktiveringen af T-lymfocytter foregår. Her vil de få T-h1-celler, der gennem en stokastisk tilfældig proces har opnået specifik bindingsaffinitet for haptent-MHC II komplekset, bindes til dette kompleks på de Langerhanske celler. Herved aktiveres T-h1-cellerne, der deler sig, således at en klon af T-memory celler opstår. Disse nye T-h1 memory celler forlader lymfeknuden og fordeles i blodbanen og lymfekarrene, således at kroppens indhold af specifikke T-h1-celler nu forøges 10-100 gange. Det foregående kapitel redegør nærmere for, hvordan den store mangfoldighed i immunsystemets specificitet kan opstå gennem rearrangement af den genetiske kode i få gener.

Ved en gentagne udsættelse for kontaktallergen vil T-h1 memory celler i huden genkende haptent-MHC komplekset, der præsenteres på overfladen af Langerhans celler i epidermis. T-h1-cellerne stimuleres herved til at danne og frigøre en række

## Kontaktallergi



Figur 5.1. Sensibilisering og udløsning af kontaktallergi.

Et kontaktallergen (KA) er som oftest et mindre molekyle, der virker som et hapten. Dvs at kontaktallergenet bindes til et af kroppens egne proteiner, og det er dette hapten-proteinkompleks, der virker som et allergen. Det haptenserede KA optages af en antigenpræsenterende Langerhans celle i huden, og intracellulært spaltes hapten-proteinkomplekset til mindre fragmenter under indvirkning af enzymer i lysosomer (L). Fragmenter, der indeholder KA, bliver præsenteret på overfladen af Langerhans cellen sammen med MHC II overfladeprotein. Enkelte T-hjælper celler (T-h1) vil via overfladeproteiner med specifik bindingsaffinitet bindes til det samlede kompleks af MHC II og KA.

Denne binding fører til en aktivering af T-h1-cellen, der deler sig, således at en klon af T-h1 memory celler opstår. Tilstedeværelse af KA specifikke T-h1-celler i blod og lymfekirtler er således et udtryk for, at personen er sensibiliseret. Ved en efterfølgende udsættelse for KA udløses symptomer på kontaktallergi, ved at T-h1 memory celler i stort antal aktiveres af Langerhans celler. De aktiverede T-h1-celler frigør signalstoffer (bl.a. interleukin-2 (IL-2), interferon (INF), Migrations Inhibition factor (MIF), Tumor Necrotic Factor (TNF)), der tiltrækker og aktiverer makrofager, der herefter angriber og gennem frigørelse af destruktive enzymer (E) bortskaffer KA og de celler, som KA sidder på. Makrofagernes angreb fører til lokale vævsskader og inflammatoriske reaktioner, der giver de kliniske symptomer på kontaktallergi.

forskellige signalstoffer (cytokiner), der samlet tiltrækker og aktiverer en række forskellige celler i immunsystemet, fx cytotoxicke T-celler, NK-celler og makrofager, således at disse celler får et forøget indhold af destruktive enzymer. Specielt makrofager spiller en stor rolle i udvikling af symptomer på kontaktallergi. Når makrofager sætter et lokalt angreb ind på celler, der bærer fremmede determinanter på deres overflade, vil en del af de destruktive enzymer lække ud af makrofagerne og føre til en lokal vævsødelæggelse.

Denne vævsødelæggelse giver ophav til de klassiske symptomer på kontaktallergi: rødme og væskeblærer. Hvis der ikke sker yderligere udsættelse for kontaktallergenet, vil vævsødelæggelsen ophøre og ophele i løbet af ca 7 dage. Hvis der derimod sker en fortsat udsættelse for lave koncentrationer af kontaktallergenet, vil en kronisk inflammation (betændelsesreaktion) udvikle sig i huden, og symptomerne vil skifte til et kronisk eksem med revnedannelse, fortykkelse af huden og afskalning. Kapitlet om immuntoksikologi gør nærmere rede for de forskellige faser i den inflammatoriske proces.

### *Dosis-respons ved udvikling af kontaktallergi*

I modsætning til luftvejsallergi er dosis-respons sammenhænge for udvikling af kontaktallergi ganske godt afklaret for en række af de mest almindelige kontaktallergener, fx nikkel, chromat og visse konserveringsmidler. For cementarbejdere synes der at være sammenhæng mellem koncentrationen af hexavalent chromat i den anvendte cement og hyppigheden af kontaktallergi over for chromat.

Koncentrationen har afgørende betydning for udvikling af kontaktallergi, idet udsættelse for en høj allergenkonzentration på et mindre hudområde giver større risiko for udvikling af kontaktallergi end en lav koncentration på en større del af kroppen. Generelt er den allergenkonzentration, der skal til for at udvikle en kontaktallergi (sensibilisering), højere end den koncentration, der kan provokere en allergisk reaktion hos en i forvejen sensibiliseret person.

Der er påvist arvelig disposition for udvikling af kontaktallergi, men i praksis er det miljøfaktorer som udsættelse for kontaktallergener, der har betydning for det enkelte individs risiko for udvikling af kontaktallergi og for hyppigheden af kontaktallergi i befolkningen.

Atopisk eksem øger ikke risikoen for udvikling af kontakteksem. Men da det øger risikoen for udvikling af irriterende eksem, som beskadiger hudbarrieren og dermed øger indtrængningen af allergener, kan det indirekte have betydning.

### *Irritation og kontaktallergi*

Ved udvikling af et arbejdsbetinget eksem har personen ofte været udsat for både hudirriterende og allergene stoffer, og det kan i praksis være vanskeligt at skelne mellem et irritativt og et allergisk kontakteksem.

En forudsætning for, at et allergisk kontakteksem kan udvikles, er, at hudbarrieren er skadet, således at kontaktallergenet kan trænge ind. Skader på hudbarrieren kan forårsages af hudirriterende stoffer, fx detergenter i rengøringsmidler, eller ved vådt arbejde. I mange situationer vil en tilstand af hudirritation således gå forud for udvikling af en egentlig kontaktallergi.

### Høfeber og allergisk astma

Nældefeber, høfeber og allergisk astma er alle IgE-medierede allergiske lidelser (Type I i Gell og Coombs inddeling). Antistoffer af IgE-typen spiller en særlig rolle i denne type allergi, hvor symptomerne oftest opstår hurtigt (minutter til timer) efter udsættelse for allergenet, der i dette tilfælde næsten altid er fremmede proteiner. Nældefeber, høfeber og allergisk astma adskiller sig alene ved det organ, som allergireaktionen foregår i. Ved nældefeber (urticaria) ses rødme, hævelse og kløe i huden, ved høfeber foregår reaktionen i slimhinden i næsen og de øvre luftveje (rhinitis) eller i øjnene (conjunktivitis), mens allergisk astma er karakteriseret ved betændelsesreaktioner (inflammation) i luftvejenes slimhinder og en sammentrækning af lungernes bronkier.

### *Sensibilisering og udløsning af høfeber og allergisk astma*

Allergenet optages, nedbrydes og præsenteres på overfladen af makrofager eller dendritceller, der er de vigtigste antigenpræsenterende celler i slimhinder og lunger. Sensibilisering og udløsning af høfeber og allergisk astma omfatter adskillige trin, hvoraf de vigtigste er vist i fig. 5.2. Som beskrevet mere detaljeret i det foregående kapitel kan immunsystemet gennem en tilfældig proces, hvor koden i få gener rearrangeres, skabe T- og B-celler med specificitet over for millioner af forskellige allergener. Ved den første kontakt med et nyt allergen vil de få T-h2- og B-celler, der er specifikke over for antigen-MHC II kompleks på overfladen af antigenpræsenterende celler, bindes til dette kompleks. Herved aktiveres T-h2-cellen, der stimulerer B-cellen til deling og dannelse af en klon af B-memory celler, der alle har specificitet for den pågældende antigendeterminant. I dette forløb vil kun få B-celler differentiere til IgE-producerende plasma-celler, og mængden af dannet allergenspecifikt IgE vil ikke være

stor nok til at kunne udløse egentlige symptomer.

Ved en efterfølgende kontakt vil T-h2-celler nu stimulere B-memory celler til en massiv differentiering til plasmaceller, der danner og frigør allergenspecifikt IgE til blodets plasma.

Mastceller og basofile granulocytter er vigtige effektorceller i høfeber og allergisk astma. Begge disse celletyper er kendetegnet ved i deres indre at have et stort antal små vesikler (granulae), der indeholder en række forskellige signalstoffer, herunder vasoaktive aminer (fx histamin). Mastceller findes overalt i kroppen, overvejende i bindevæv langs de små blodkar, lymfekar, nerver og kirtler. De er mest hyppige i huden, luftvejene og tarmvæggen. Basofile granulocytter udgør ca 1% af blodets hvide blodlegemer og har en relativt kort levetid.

Mastceller og basofile granulocytter har overfladereceptorer for IgE. Disse celler bliver således "armeret" ved at binde det dannede, allergenspecifikke IgE til deres overflade. Ved senere kontakt vil allergenet blive bundet til IgE på cellens overflade. Denne binding af allergenet vil aktivere cellen til at tømme sine granulae ud i det omgivende extracellulære miljø. Herved frigøres de enzymer og signalstoffer (fx histamin og andre vasoaktive stoffer), som udløser det tidlige respons (30 til 60 minutter efter udsættelse for allergenet) i allergisk astma og høfeber.

Mastceller frigør imidlertid også signalstoffer, der tiltrækker neutrofile og eosinofile granulocytter. De eosinofile granulocytter er ansvarlige for det forsinkede respons, der starter 4-8 timer efter udsættelse for allergenet. De eosinofile granulocytter frigør en række enzymer og andre biologisk aktive komponenter, der fører til inflammatoriske reaktioner ("betændelsesreaktioner"), skader på lungeepitelet, længerevarende luftvejsobstruktion og hyperreaktive luftveje.

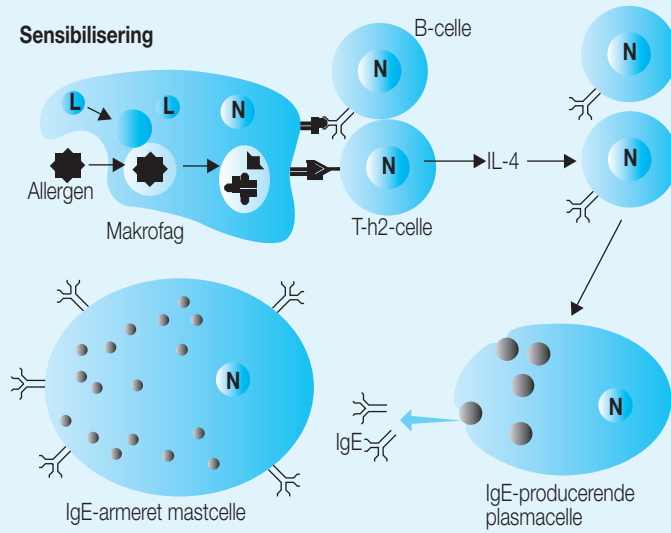
### *Dosis-respons ved udvikling af høfeber og allergisk astma*

Den eksisterende viden om dosis-respons ved udvikling af høfeber og allergisk astma er begrænset. Meget tyder dog på, at den dosis, der skal til for at sensibilisere en person, er langt større end den dosis, der kan udløse en astmareaktion hos personer, der allerede er allergiske over for allergenet. Udvikling af allergi over for et givent allergen kan altså undgås, hvis eksponeringen kan holdes på niveau med den dosis, der udløser astma hos allergiske personer.

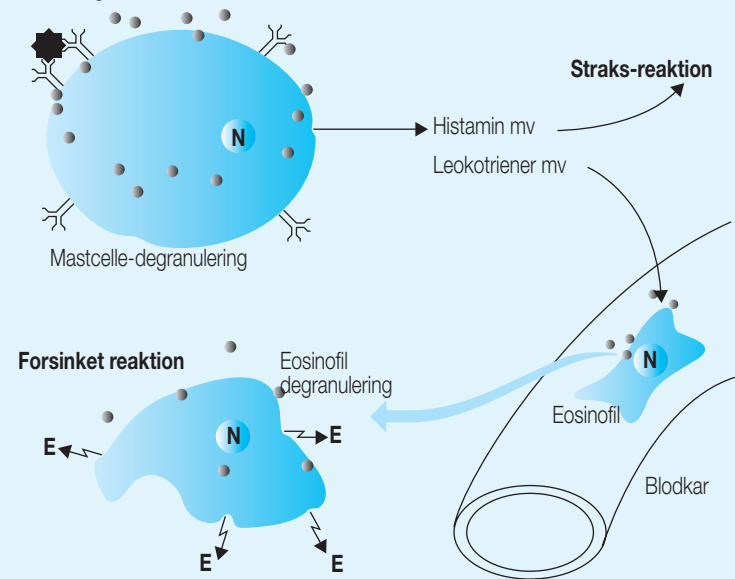
Basisbog i Arbejdsmedicin (bind III) giver i omfattende tabeller en oversigt over de vigtigste allergener, der kan føre til arbejdsbetinget astma. Tabel 5.4 (s.184) giver derfor kun udvalgte eksempler på allergener, hvor der findes viden om dosis-respons i forhold til erhvervs-mæssig eksponering.

## Astma

### Sensibilisering



### Udløsning



Figur 5.2. Sensibilisering og udløsning af høfeber og allergisk astma.

Et allergen, der kan udløse IgE-medieret allergi (fx astma), er som oftest et større protein, der bærer et stort antal antigendeterminanter. Allergenet optages af en antigenpræsenterende celle (makrofag), fx i luftvejenes slimhinder, og intracellulært spaltes allergenet i mindre fragmenter (antigendeterminanter) under indvirkning af enzymer i lysosomer (L). Disse fragmenter bliver præsenteret på overfladen af makrofagen sammen med MHC II overfladeprotein. Enkelte T-hjælper celler (T-h2) og B-celler vil via overfladeproteiner med specifik bindingsaffinitet bindes til det samlede kompleks af MHC II og antigendeterminant. Denne binding fører til en aktivering af T-h2-cellen, der igen stimulerer B-cellen til at dele sig, således at en klon af B-memory celler opstår. Ved en senere kontakt med allergenet vil Th-2-cells dannelse af signalstoffer stimulere B-memory celler til at modnes til plasmaceller, og signalstoffet interleukin-4 (IL-4) fra T-h2-cellerne vil stimulere plasmacellerne til en selektiv produktion af specifikke antistoffer af IgE-typen. Disse IgE-antistoffer vil bindes til overfladen af mastceller, der findes i bindevævet, fx i luftvejene. Når en person har tilstrækkeligt mange mastceller, der er armeret med IgE-antistoffer med specificitet over for allergenet, er personen sensibiliseret og kan derfor reagere med allergisymptomer ved den næste udsættelse for allergenet. Når dette sker, krydsbindes allergenet til IgE-antistoffer på mastcellens overflade. Herved aktiveres mastcellen, og den frigør en række signalstoffer, der fører til udløsning af allergisymptomer. Således vil histamin og andre stoffer udløse den karakteristiske straks-reaktion, hvor symptomer (fx åndedrætsbesvær, rindende øjne og næse, nyseanfald mv) indtræder få minutter efter udsættelse for allergenet. Andre signalstoffer tiltrækker eosinofile granulocytter fra blodbanen og aktiverer disse celler. De eosinofile granulocytter frigør signalstoffer og enzymer, der er ansvarlige for den forsinkede reaktion i IgE-medieret allergi (4-8 timer).

Fra epidemiologiske undersøgelser er der opnået viden om størrelsesordenen af allergiudløsende doser. Blandt bagere er allergi over for melstøv hyppigt forekommende. Et af de vigtigste allergener er her  $\alpha$ -amylase. En udtalt dosis-respons er blevet påvist især for bagere med atopi, hvor lidt over én procent af bagerne viste specifik sensibilisering i hud-priktest ved et eksponeringsniveau på ca  $0,7 \text{ ng/m}^3$  (laveste eksponeringsgruppe). Ved eksponeringsniveau på ca  $1,3 \text{ ng/m}^3$  (mellemste eksponeringsgruppe) var ca 13% af bagerne sensibiliserede, og ved høje eksponeringsniveauer ( $18 \text{ ng/m}^3$ ) var mere end 30% sensibiliserede.

Subtilisin er et andet eksempel på et teknisk vigtigt enzym, der kan være årsag til allergisk astma. Subtilisin er et proteinedbrydende enzym, der dannes af bakterien *Bacillus subtilis*.

Dyreforsøg og epidemiologiske undersøgelser har vist, at subtilisin er et stærkt allergen, og den danske loftværdi for erhvervs-mæssig eksponering for subtilisin er så lav som  $60 \text{ ng/m}^3$ .

Et af de stærkeste forsøgsallergener er Rat n1 aeroallergen, der stammer fra urin fra rotter, og som er den specifikke årsag til mange tilfælde af allergi over for forsøgsdyr. Kontrollerede provokationsforsøg på personer, der har en IgE-medieret astma over for Rat n1 aeroallergen, har vist, at astmareaktioner kan udløses ned til ca  $10 \text{ ng/m}^3$ .

IgE-medieret allergi over for husstøvmider er vidt udbredt i



Allergen	Dosis-respons og danske grænseværdier
<b>Lavmolekylære allergener (&lt; 1.000 Da)</b>	Mekanismen er ofte ikke IgE-medieret
Syreanhydrider	Ofte IgE-medieret
<i>Eddikesyreanhydrid</i>	Loftværdi er 20 mg/m <sup>3</sup>
<i>Trimellitisyreanhydrid</i>	Loftværdi er 0,04 mg/m <sup>3</sup>
<i>Phthalsyreanhydrid</i>	Grænseværdi er 1 mg/m <sup>3</sup>
Isocyanater	Ofte ikke IgE-medieret
<i>Hexamethylendiisocyanat (HDI)</i>	Grænseværdi er 0,005 ppm
<i>3-Isocyanatomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexylisocyanat (IPDI)</i>	Grænseværdi er 0,005 ppm
<i>Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat</i>	Grænseværdi er 0,005 ppm
<i>Methylenbis(4-cyclohexylisocyanat)</i>	Grænseværdi er 0,005 ppm
<i>1,5-Naphthalendiisocyanat (NDI)</i>	Grænseværdi er 0,005 ppm
<i>2,4-/2,6-Toluendiisocyanat (TDI)</i>	Grænseværdi er 0,005 ppm
<i>2,2,4-/2,4,4-trimethylhexamethylen-1,6-diisocyanat (TMDI)</i>	Grænseværdi er 0,005 ppm
Platinsalte	IgE-medieret astma. Grænseværdi er 0,002 mg/m <sup>3</sup>
<b>Højmolekylære allergener (&gt; 1.000 Da)</b>	IgE-medieret allergi
Melstøv ( $\alpha$ -amylase)	Der findes ingen grænseværdi. Sensibilisering forekommer selv ved arbejdsbetinget eksponering på ca 1 ng/m <sup>3</sup> .
Forsøgsdyrallergener	Rat n1 allergen er et stærkt allergen, der findes i urin hos rotter. Der findes ingen grænseværdi. Hos allergiske personer kan astmareaktioner udløses ned til ca 10 ng/m <sup>3</sup> .
Subtilisin	Subtilisin er et proteinspaltende enzym, der dannes af bakterien <i>Bacillus subtilis</i> . Loftværdi er 0,00006 mg/m <sup>3</sup> (60 ng/m <sup>3</sup> ).

Tabel 5.4. Eksempler på vigtige luftvejsallergener i arbejdsmiljøet.

Grænseværdi angiver stoffets tidsvægtede gennemsnitskoncentration for en 8-timers arbejdsdag. Ved loftværdi forstås en værdi, som på intet tidspunkt må overskrides (måleteknisk tillades en måleperiode på 15 min.). Loftværdier anvendes især om stoffer, der virker uhyre hurtigt, fx stoffer, der kan udløse IgE-medierede allergireaktioner.

den danske befolkning. I flere epidemiologiske undersøgelser er husstøv blevet indsamlet fx ved støvsugning af personernes senge, og andelen af husstøvmider i støvet er herefter blevet sammenholdt med tilstedeværelse af symptomer på astma. I disse undersøgelser er tærskelværdien for sensibilisering fastlagt til ca 2 ng/g husstøv.

“Krydsallergi” beskriver det forhold, at en person med en IgE-medieret allergi kan reagere mod en række beslægtede allergener. I kapitlet om immuntoksikologi omtales en “lås og nøgle” model som forklaring på, hvordan antistoffers specificitet virker.

Ifølge denne model kan en antigendeterminant opfattes som en nøgle (altså en bestemt tredimensionel kemisk struktur), der passer ned i en lås (antistoffets antigenbindende region). Ud fra denne model kan krydsallergi opfattes som en række forskellige nøgler, der alle har så store ligheder, at de kan komme ind i låsen og fæstne sig. Eksempler på krydsallergi er fx allergikere, der har astma over for birkepollen, og som ved krydsreaktion også kan reagere over for nødder i fx chokolade. I arbejdsmiljøet ses krydsreaktioner ved astma over for forskellige syreanhydrider, og i forhold til kontaktallergi forekommer krydsreaktion fx mellem forskellige aminhærdere.

### *Forhold, der kan påvirke sensibiliseringen*

Høfeber og allergisk astma rammer i særlig grad personer, der har en arveligt betinget overfølsomhed. Risikoen for at udvikle allergisk astma er forøget, hvis personens forældre eller søskende har allergisk astma eller en anden IgE-medieret allergi. Hos mange af disse personer giver den arveligt betingede overfølsomhed sig udtryk i, at personerne har højere koncentrationer af IgE i blodet end normalt (atopi).

En del nyere undersøgelser tyder på, at visse virusinfektioner hos spædbørn kan forskyde immunsystemets balance i retning af IgE-produktion (T-h2 respons). Endvidere kan forskellige miljøpåvirkninger (fx passiv rygning, udsættelse for sodpartikler fra dieseludstødning, svovldioxid, nitrose gasser, ozon, endotoksin mv) forskyde balancen.

Kemiske stoffer benævnes adjuvans, hvis de er i stand til at stimulere og forstærke dele af immunsystemets respons. Foregående kapitel om immunotoksikologi giver en nærmere redegørelse for, hvordan forskellige former for adjuvans menes at virke.

## Allergisk alveolit

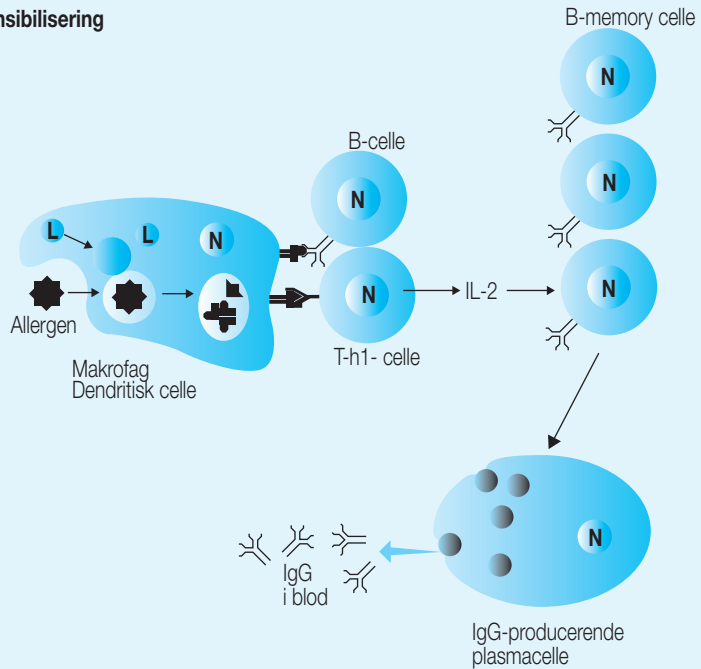
Erhvervsbetinget allergisk alveolit er kendt fra arbejdsmiljøer med en meget høj udsættelse for antigener, fx sporer fra skimmelsvampe eller aktinomyceater (tærskerlunge, dueopdrætterlunge, kompostarbejdersyndrom etc).

### *Sensibilisering og udløsning af allergisk alveolitis*

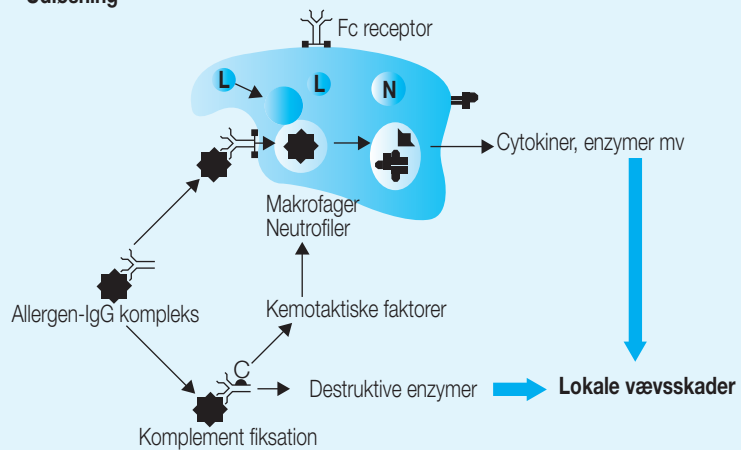
Fig. 5.3 viser skematisk forløbet af sensibilisering og udløsning af symptomer på allergisk alveolitis. Sensibiliseringen sker ved, at personen udsættes for høje koncentrationer af et allergen (typisk et højmolekylært protein). I dette tilfælde fører sensibiliseringen til dannelse af allergenspecifikke IgG-antistoffer. Kontrollen af antistofdannelsen er, i modsætning til dannelse af IgE-antistoffer,

## Allergisk alveolitis

### Sensibilisering



### Udløsning



Figur 5.3. Sensibilisering og udløsning af allergisk alveolitis.

**Sensibilisering.** Et allergen, der kan udløse allergisk alveolitis, er som oftest et større protein, der bærer et stort antal antigendeterminanter. Allergenet optages af en antigenpræsenterende celle (makrofag) fx i luftvejenes slimhinder, og intracellulært spaltes allergenet i mindre fragmenter (antigendeterminanter) under indvirkning af enzymer i lysosomer (L). Disse fragmenter bliver præsenteret på overfladen af makrofagen sammen med MHC II overfladeprotein. Enkelte T-hjælper celler (T-h1) og B-celler vil via overfladeproteiner med specifik bindingsaffinitet bindes til det samlede kompleks af MHC II og antigendeterminant. Denne binding fører til en aktivering af T-h1-cellen, der igen stimulerer B-cellen til at dele sig, således at en klon af B-memory celler opstår. Ved en senere kontakt med allergenet vil Th-1-cellens dannelse af signalstoffer stimulere B-memory celler til at modnes til plasmaceller, og signalstoffet interleukin-2 (IL-2) fra T-h1-cellerne vil stimulere plasmacellerne til en selektiv, omfattende produktion af specifikke antistoffer af IgG-typen. IgG-antistoffer er den dominerende type antistoffer i blodet og overgår langt den mængde IgE-antistoffer, der dannes i forbindelse med udvikling af IgE-medieret allergi. Når en person har tilstrækkeligt mange allergenspecifikke IgG-antistoffer i blodet, er personen sensibiliseret og kan derfor reagere med symptomer på allergisk alveolitis ved den næste massive udsættelse for allergenet.

**Udløsning.** Når en sensibiliseret person udsættes for høje koncentrationer af allergenet, vil allergenet trænge ind i vævet og evt blodbanen. Her krydsbindes allergenet til IgG-antistoffer og danner immunkomplekser i blodbanen eller lokalt i slimhinden i luftvejene. Disse immunkomplekser aktiverer komplementsystemet, og der dannes destruktive enzymer og signalstoffer, der tiltrækker og aktiverer makrofager og neutrofile granulocytter, der ligeledes frigør destruktive enzymer og signalstoffer, således at en inflammatorisk reaktion (betændelsesreaktion) og dermed kliniske symptomer indtræder.

underlagt T-h1-celler, og der dannes langt større mængder IgG end IgE. De forskellige antistofklasser og deres dannelse er beskrevet i foregående kapitel.

Når en person er blevet sensibiliseret og dermed har allergenspecifikke IgG-antistoffer i blodet, vil en efterfølgende massiv udsættelse for allergenet føre til, at store mængder allergen trænger ind i vævet og evt blodbanen, hvor det bindes og danner immunkomplekser med IgG-antistoffer. De dannede antigen-antistofkomplekser aktiverer komplementsystemet (se foregående kapitel). Herved sker en lokal dannelse af destruktive enzymer og makrofager, og granulocytter tiltrækkes og aktiveres, hvilket fører til en inflammatorisk reaktion (betændelsesreaktion) i lungerne.

### *Dosis-respons ved udvikling af allergisk alveolitis*

Dannelse af specifikke IgG-antistoffer, der har central betydning i udvikling af allergisk alveolitis, kræver udsættelse for relativt høje koncentrationer af allergen. Symptomer på allergisk alveolitis udløses gennem dannelse af immunkomplekser, hvor de specifikke IgG-antistoffer krydsbindes til allergenet. Dette kræver meget høje koncentrationer af allergen, og allergisk alveolitis forekommer derfor i arbejdsmiljøer med massiv udsættelse for

allergener. Således udløses symptomer på tærskerlunge ved udsættelse for  $10^9$ - $10^{10}$  sporer/ $m^3$ , mens symptomer på astma i træindustrien til sammenligning kan udløses ved 1.000 gange lavere udsættelse ( $10^6$  sporer/ $m^3$ ).

### *Forhold, der kan påvirke sensibiliseringen*

Arveligt betingede faktorer spiller ikke en væsentlig rolle ved udvikling (sensibilisering) af allergisk alveolitis, og alle personer er potentielt i risikogruppe, hvis de udsættes for tilstrækkeligt høje koncentrationer af allergen. Dog vil personer med hyperreaktive lunger være mere følsomme mht udløsning af symptomer. En samtidig udsættelse for stoffer, der irriterer luftvejene, kan derfor spille en rolle.

## Diagnosticering af allergi

Stort set alle tests, der anvendes klinisk til at diagnosticere allergi, er baseret på in vivo provokation med potentielle allergener. For at få en sikker diagnose er det vigtigt, at testene er standardiserede og udføres af trænede personer.

### In vivo test for kontaktallergi

Lukket lappetest er en anerkendt og vidt udbredt standardmetode til diagnosticering af kontaktallergi. Teststoffet anbringes i et passende solvent (normalt vaseline) og i passende koncentration på huden (underarm eller ryg) og indelukkes under plaster i 48 timer (se tabel 5.5). Herefter fjernes plasteret, og hudreaktioner (rødme, blæredannelse mv) scores efter 24 timer, dvs på tredjedagen efter påføringen, og igen på syvendagedagen. I testen anvendes standardserier af kontaktallergener i koncentrationer, der erfaringsmæssigt vides at udløse tydelige allergireaktioner hos sensibiliserede personer. Lappetesten kan også anvendes til at teste produkter (fx creme o.l.), der mistænkes for at være årsag til kontaktallergi hos patienten. I enkelte undersøgelser er lappetesten også blevet anvendt i studier af dosis-effekt sammenhænge, og dette har givet værdifuld viden om forskelle i personers følsomhed og om tærskelværdier for forskellige kontaktallergener mht at udløse allergiske reaktioner i huden.

	Allergen	Konc.	Vehikel
1	Kalium dichromat	0,5	Pet
2	Neomycin sulfat	20	Pet
3	Thiuran mix	1	Pet
4	p-phenylendiamin base	1	Pet
5	Cobalt chlorid (CoCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O)	1	Pet
6	Benzocain	5	Pet
7	Formaldehyd	1	Aq
8	Kolofonium	20	Pet
9	Clioquinol	5	Pet
10	Balsam fra Peru	25	Pet
11	N-Isopropyl-N'-phenyl-p-phenylendiamin (IPPD)	0,1	Pet
12	Lanolin	30	Pet
13	Mercapto mix	2	Pet
14	Epoxy resin	1	Pet
15	Paraben mix	16	Pet
16	p-tert-butylphenol-formaldehyd (BPF) resin	1	Pet
17	Fragrance mix (parfumestoffer)	8	Pet
18	Quaternium 15 (Dowicil 200)	1	Pet
19	Nikkelsulfat (NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	5	Pet
20	Cl+Me-isothiazolinon	0,01	Aq
21	Mercaptobenzothiazol (MBT)	2	Pet
22	Primin	0,01	Pet

Tabel 5.5. Allergener i den Europæiske Standardserie til anvendelse i lappetest.

Vehikler: pet = vaseline; aq = vand

## In vitro test for kontaktallergi

Lappetesten er standardværktøjet for klinisk diagnosticering af kontaktallergi. Der findes tests, som kan udføres in vitro, men med en enkelt undtagelse har ingen af dem opnået status som et klinisk alternativ til lappetesten. In vitro testene er baseret på, at patienter med kontaktallergi alle har aktiverede allergenspecifikke T-celler i blodet. Disse specifikke T-celler kan, i modsætning til ikke-sensibiliserede T-celler, stimuleres med allergenet in vitro, hvorved de deler sig eller udskiller cytokiner af betydning for det kontaktallergiske respons. Begge dele kan bruges som et mål for patientens overfølsomhed.

*Lymfocyt-proliferations-test* (LTT) har opnået en vis grad af udbredelse og er det eneste in vitro assay, som er standard ved diagnosticering af en specifik kontaktallergi, nemlig kronisk

beryllium-sensibilisering af luftvejene. Princippet i LTT er, at lymfocytter isoleres fra en blodprøve, hvorefter de inkuberes med eller uden allergenet. Efter inkubationsperiodens ophør måles, hvor meget cellerne har delt sig, hvilket normalt gøres ved at måle inkorporeringen af tritium-mærket thymidin i cellernes arvemateriale.

Andre in vitro tests er *migration inhibition test*, hvor lymfocytters frigivelse af "migration inhibition factors" bruges til at vurdere patientens overfølsomhed, og *leucoyte procoagulant activity assay*, som er baseret på, at fibrinudfældelse (et trin i blodkoagulation) er et konsistent træk ved kontaktallergi. Procoagulant-aktiviteten måles ved forskellen i koagulerings tid af plasma inkuberet med celler med og uden allergenet.

Den væsentligste ulempe ved de nævnte in vitro tests er manglen på standardisering, fx mht isolering af cellerne, måden hvorpå cellerne stimuleres med allergenet og mht diagnostiske kriterier. Sammenligninger mellem lappetest og LTT på patienter med kontaktallergi over for nikkel har vist, at LTT havde høj sensitivitet, men mindre god specificitet (dvs et relativt stort antal falske positive). Samme konklusioner har man nået til for patienter med hhv kontaktallergi over for guld og kviksølv.

## Test for luftvejsallergi

I den kliniske diagnostik har to standardmetoder særlig stor udbredelse.

IgE-medieret allergi er kendetegnet ved, at patienten har specifikke IgE-antistoffer mod allergenet. I en blodprøve måles koncentrationen af specifikt IgE-antistof mod en standardserie af ekstrakter af de mest almindeligt forekommende allergener (fx husstøvmide, kat, hest, forskellige slags pollen, forskellige slags skimmelsvampesporer mv). I disse målinger anvendes højfølsomme immunkemiske teknikker (fx Radio Allergo Sorbent Test - RAST). Nogle undersøgelser har inddraget måling af specifikt IgE-antistof i forsøg på at identificere nye allergener fx i arbejdsmiljøet. Sådanne undersøgelser har givet værdifuld viden om, hvorvidt nye allergener i arbejdsmiljøet har ført til sensibilisering af en del af arbejderne. Det skal dog bemærkes, at resultatet af sådanne tests i høj grad er afhængigt af kvaliteten af det allergenekstrakt, der anvendes. Ofte vil brug af et dårligt allergenekstrakt føre til, at der ikke kan påvises specifikke IgE-antistoffer.

Det er ikke altid muligt at påvise specifikke IgE-antistoffer i blodet hos personer med symptomer på IgE-medieret allergi. En mulighed kan være, at IgE-antistofferne helt overvejende

findes lokalt i vævet bundet til mastcellernes overflade. Hud-priktest anvendes derfor rutinemæssigt. Ved hud-priktest lægges en lille prøve af allergenekstrakt ind i huden. Hvis personen er sensibiliseret, vil der lokalt i huden udløses et T-h2 respons, således at der inden for den første time opstår en insektstiklignende reaktion med ødem, rødme og kløe.

Disse to standardmetoder til screening for allergi giver ikke information om, hvordan personen vil reagere over for allergenerne ved inhalation. I enkelte undersøgelser har man derfor også udført inhalationsforsøg (lungeprovokation) på mennesker, hvor allergiske reaktioner påvises med lungefunktionsmålinger og ved at undersøge, om sensitiviteten over for metacholin er steget. Disse undersøgelser har givet vigtig viden om dosis-effekt sammenhænge ved udløsning af allergisk astma fx blandt bagere, der er allergiske over for  $\alpha$ -amylase i mel.

## Testmetoder for allergener

På allergiområdet er formålet med metoder til farevurdering primært at fastslå, om et kemisk stof eller produkt kan virke som et allergen. Udgangspunktet er, at hvis et kemisk stof/produkt kan give en specifik allergireaktion i testmetoden, så er der også en potentiel risiko for, at det vil kunne virke som et allergen hos mennesker. Med disse metoder tilstræbes at opnå den stærkest mulige allergireaktion, men samtidig skal det være muligt at ekstrapolere fra resultaterne i testmetoden til allergirisiko hos mennesker.

### In vitro modeller

De standardmetoder, der anbefales af fx OECD, er alle baseret på test i forsøgsdyr. Disse metoder er imidlertid ganske kostbare og i nogle sammenhænge også etisk problematiske. Der er derfor stor interesse for at få udviklet mere simple in vitro screeningsmetoder, hvor testen udføres på isolerede celler. Det skal fremhæves, at der endnu ikke er udviklet generelt accepterede in vitro testmetoder, der kan erstatte tests i forsøgsdyr.

#### *Testmetoder for kemiske stoffers proinflammatoriske (betændelsesskabende) potentiale*

Meget tyder nu på, at en uspecifik, lokal stimulering af immunsystemet til produktion af proinflammatoriske cytokiner, der



mobiliserer og klargør de centrale celler i immunsystemet, kan have stor betydning for senere udvikling af en specifik allergi. Det foregående kapitel om immuntoksikologi gennemgår flere vigtige in vitro metoder til at teste kemiske stoffer for uspecifikke, immuntoksiske egenskaber (fx irritation eller celledrab).

På hudområdet skal især fremhæves test på keratinocytter (overhudsceller). Keratinocytter udgør et sammenhængende netværk af celler i huden, og et indtrængende kemisk stof kan ikke undgå at komme i kontakt med en keratinocyt. Adskillige studier har vist, at aktivering af keratinocytter har stor betydning ved udvikling af irritativt og allergisk kontakteksem.

Keratinocytter er lette at dyrke og udgør derfor et attraktivt test-system til at screene kemiske stoffer for deres potentiale til at påvirke hudens immunsystem. Måling af de proinflammatoriske cytokiner IL-6 og TNF- $\alpha$  efter stimulation med et kemisk teststof tages som udtryk for, at teststoffet kan stimulere immunsystemet uspecifikt. Hvis keratinocytterne derimod producerer interferon- $\gamma$ , kan det tages som udtryk for, at teststoffet kan forskyde immunsystemet i retning af allergisk kontakteksem (T-h1 respons).

Tilsvarende test for uspecifik effekt på immunsystemet i lungerne kan udføres på isolerede lungeepitelceller, hvor cellelinien A549 er den foretrukne. Denne cellelinie kan producere det proinflammatoriske cytokin IL-8, men cellelinien danner ikke cytokiner, der i sig selv kan forskyde immunsystemets balance i retning af T-h1 eller T-h2 respons.

### *Testmetoder for allergifremkaldende egenskaber af kemiske stoffer*

Disse in vitro metoder til test for allergifremkaldende egenskaber er alle baseret på en specifik stimulation af centrale celler i immunsystemet, fx antigen-præsenterende celler, således at de frigør cytokiner og overfladeproteiner, der forskyder immunsystemets balance i retning af et T-h1 respons (cellemedieret allergi, fx kontaktallergi), eller et T-h2 respons (IgE-medieret allergi, fx nældefeber, høfeber, allergisk astma).

Et problem ved disse tests er, at det ofte ikke er muligt at dyrke de relevante antigen-præsenterende celler in vitro gennem længere tid. En løsning har været at anvende udvalgte kræftcellelinier (myeloma-celler), der er isoleret fra patienter med lymfekræft. Sådanne celler er ofte lettere at dyrke, og mange cellelinier har bevaret udtalte ligheder med antigen-præsenterende celler, bl.a. evnen til at producere en række forskellige cytokiner. I undersøgelser af luftvejsallergener er den makrofaglignende cellelinie U937 ofte anvendt. Ved test af et kemisk teststof vil det producerede mønster af cytokiner være et mål for, om stoffet potentielt er et kontaktallergen (der dannes INF- $\gamma$  typisk for et

T-h1 respons) eller et luftvejsallergen (der dannes IL-4, IL-5 og IL-10 typisk for et T-h2 respons). Andre cellelinier vil have større lighed med antigen-præsenterende celler i huden (Langerhans celler) eller i tarmvæggen.

## Dyremodeller

Den videnskabelige litteratur giver eksempler på et stort antal forskellige dyremodeller til test af allergener eller til undersøgelser af basale mekanismer i udvikling af allergi. Dette afsnit vil især have fokus på de modeller, der anbefales af OECD eller af anden autoritativ myndighed.

### *Dyremodeller til test for kontaktallergener*

Standardiserede, generelt accepterede dyremodeller til test af kontaktallergener har længe været tilgængelige, og en intensiv brug af sådanne modeller har ydet et væsentligt bidrag til, at listen over anerkendte kontaktallergener i dag omfatter mere end 3.700 kemiske stoffer og produkter.

Siden Draize test (for hudirritation) oprindeligt blev introduceret, har marsvin været det foretrukne forsøgsdyr i disse modeller. I Draize test injiceres teststoffet i huden på marsvin gentagne gange for at inducere en sensibilisering og senere udløsning af en allergisk reaktion i huden. Det største problem ved testen er, at det ofte kun er en mindre andel af dyrene, der bliver sensibiliserede. Testen kræver derfor mange dyr og megen tid for at give et pålideligt resultat. Mange senere modifikationer af Draize test har alle haft til formål at hæve testens følsomhed, især ved at hæve sensibiliseringsraten.

Den mest anerkendte og udbredte model i dag er "Guinea Pig Maximization Test" (GPMT), hvor sensibilisering opnås ved at injicere teststoffet i huden sammen med Freund's komplette adjuvans. Allergiske reaktioner i huden udløses ved en lukket lappe-test, hvor teststoffet påføres hudoverfladen. Den anvendte koncentration af teststof vælges, så den ligger lidt under den koncentration, der kan give hudirritation. Ved maksimering ("maximization") forstås altså, at der først gennemføres et forsøg, hvor tærskelkoncentrationen for hudirritation bestemmes. Den prædiktive værdi af GPMT er blevet vist i mange sammenhænge. Det er generelt accepteret, at et stof, der virker som et kontaktallergen i GPMT, også vil være et potentielt kontaktallergen hos mennesker. Det skal dog bemærkes, at GPMT ikke altid kan anvendes til en potensvurdering af forskellige kontaktallergener. Et stærkt kontaktallergen i GPMT vil ikke nødvendigvis være et stærkt allergen hos mennesker.

Inden for det sidste årti er Kimbers lokale lymfeknudetest i mus blevet valideret i meget omfattende studier, og denne test anbefales nu i OECD Test Guideline 406 til prædiktiv, præliminær screening af kontaktallergener. Testen tager udgangspunkt i de mekanismer, der i dag menes at kunne forklare udvikling af kontaktallergi. Hvis et kontaktallergen påføres huden, vil det lokalt optages af antigen-præsenterende Langerhans celler, der vil vandre til de drænende lymfeknuder og her aktivere T-celler, så der opstår en klon af antigen-specifikke T-memory celler. I testen påføres teststoffet på huden. Herefter aflives musen, og de lokale lymfeknuder tages ud. Deling af celler i lymfeknuden (klonal aktivering) måles med højfølsomme teknikker. Metoden menes effektivt at kunne skelne mellem hudirriterende og kontaktallergene stoffer.

### *Dyremodeller for luftvejsallergi*

I modsætning til dyremodeller for kontaktallergi har der ikke været international konsensus om, hvilke dyremodeller der er mest valide til screening og farevurdering af luftvejsallergener. Som følge heraf er listen over kendte luftvejsallergener kort sammenlignet med listen over kontaktallergener. Hvilket dog også kan tilskrives, at der ikke er udført rutinemæssig lungeprovokationstest for luftvejsallergi i samme omfang, som det er tilfældet for kontaktallergi (lappetestning).

Den videnskabelige litteratur indeholder et stort antal forskellige forslag til modeller, der adskiller sig ved

- ◆ valg af forsøgsdyr (marsvin, mus og rotter anvendes mest)
- ◆ valg af eksponeringsrute ved sensibilisering og udløsning af allergiske reaktioner, fx injektion i eller under huden, injektion i luftrøret (tracheal instillation) eller inhalation af en aerosol af allergen
- ◆ brug af adjuvans til at forstærke sensibiliseringen.

I praksis kan man skelne mellem to typer af dyremodeller:

### *Dyremodeller for sensibilisering*

Dannelse af specifikke IgE-antistoffer mod allergenet og aktivering af mastceller og/eller basofile granulocytter er centrale mekanismer i allergisk astma (og andre IgE-medierede allergireaktioner), og det centrale element i disse dyremodeller er den specifikke produktion af IgE-antistoffer mod allergenet. I starten af 70'erne blev det vist, at specifik IgE-produktion kan induceres hos mus og rotter, hvis allergenet i lav koncentration (ca 1 µg) injiceres under huden sammen med aluminiumhydroxid, der anvendes som adjuvans. Det specifikke IgE-respons forstærkes

ved 10-14 dage senere at gentage injektionen af allergen i lav dosis (ca 0,1 µg). Denne lavdosis-sensibiliseringsmetode i mus anbefales som standardmetode af det japanske sundhedsministerium. Efter sensibilisering aflives musene, og de dannede specifikke IgE-antistoffer måles i serum enten vha immunkemiske teknikker eller vha en hudtest i rotter (passiv kutan anafylaksitest), der vides at være specifik for IgE fra mus. I farevurdering af allergener går man ud fra, at hvis et kemisk stof kan føre til dannelse af specifikke IgE-antistoffer ved lavdosis-sensibilisering i mus, så vil stoffet også være et potentielt allergen for mennesker.

En svaghed ved modellen er, at den ikke giver mulighed for en potensvurdering i forhold til de eksponeringsveje, der er relevante for udvikling af allergi hos mennesker. Modellen giver således ikke information om, hvordan og med hvilken styrke det testede allergen hos mennesker vil indgå i allergireaktioner i mave-tarmsystemet (levnedsmiddelallergi), IgE-medierede reaktioner i huden (nældefeber) eller reaktioner i slimhinder i øvre luftveje (høfeber) og nedre luftveje (allergisk astma). Modellen har således overvejende værdi som en kvalitativ screeningsmetode.

### *Dyremodeller for udløsning af astma*

Efter sensibilisering vil marsvin normalt reagere med en meget kraftig sammentrækning af bronkierne, når allergenet inhaleres. I modsætning hertil er det ofte svært at udløse stærke luftvejsreaktioner i mus og rotter, der mere har tendens til at reagere systemisk, fx med sammentrækning af blodkar overalt i kroppen. Dette er baggrunden for, at marsvin traditionelt har været det foretrukne forsøgsdyr i undersøgelser af, om et kemisk stof/produkt ved inhalation kan udløse astmalignende reaktioner.

Inden for de senere år har der været stigende opmærksomhed på at kunne måle inflammation (betændelsesreaktioner) i lungerne (bronkierne), fordi disse reaktioner som nævnt tidligere er karakteristiske for astma. Mus er mht måling af de relevante signalstoffer (cytokiner) og overfladeproteiner på immunsystemets celler langt bedre karakteriseret end marsvin, og de meget store ligheder mellem mus og mennesker er nu særdeles veldokumenterede. Endvidere har den teknologiske udvikling i udstyr til lungefunktionsmåling og i avancerede computerprogrammer til kompliceret databehandling ført til, at det nu er muligt at skelne mellem forskellige typer af reaktioner i øvre og nedre luftveje hos mus. Der er derfor en tendens til, at inhalationsmodeller baseret på mus vinder stadig større international tilslutning. Disse moderne dyremodeller åbner mulighed for både at sensibilisere og udløse astmareaktioner ved inhalation af allergener, og

det er endvidere muligt at skelne mellem, om reaktionerne er allergisk eller toksisk betingede. Der er forventning om, at inhalationsmodeller på mus i fremtiden vil give vigtig viden om forskellige luftvejsallergeners styrke og virkemåde.

## Struktur-aktivitetsmodeller for kemiske stoffers allergifremkaldende egenskaber

Der findes i dag omkring 3.000 kemiske stoffer, der med sikkerhed ud fra dyreeksperimentelle undersøgelser samt ud fra kliniske erfaringer kan klassificeres som kontaktallergener. Dette store antal stoffer har muliggjort udvikling af struktur-aktivitetsmodeller for kontaktallergener, og man er nu så langt inden for dette område, at struktur-aktivitetsmodellerne med rimelig sikkerhed kan forudse kontaktallergene egenskaber for nogle grupper af stoffer.

I modsætning hertil kan der i dag kun klassificeres omkring 250 kemiske stoffer, der kan give IgE-medieret allergi. Udvikling af struktur-aktivitetsmodeller på dette område er derfor stadig i den indledende fase, og der vil sikkert gå en årrække, før pålidelige modeller er udviklet.

## Kriterier for allergi

Identifikation af stoffer, der kan forårsage hud- og luftvejsallergi, er et vigtigt led i forebyggelsen af allergi. Kriterier for en sådan "Hazard identification" er etableret i EU-regi, som i Danmark udmøntes i Miljøstyrelsens (MST) bekendtgørelser.

Allergene stoffer eller produkter klassificeres med faresymbolet Xn (sundhedsskadeligt) og risikosætning "R42 - Kan give overfølsomhed ved indånding" eller faresymbolet Xi (lokalirriterende) og risikosætningen "R43 - Kan give overfølsomhed ved kontakt med huden".

Luftvejsallergener klassificeres med R42 "Kan give overfølsomhed ved indånding", hvis der er evidens for, at stofferne eller produkterne kan forårsage specifik overfølsomhed ved indånding, eller på grundlag af positive resultater i dyreforsøg. Endvidere klassificeres isocyanater, medmindre der er evidens for, at stoffet ikke forårsager overfølsomhed ved indånding.

Tilsvarende klassificeres hudallergener med R43 "Kan give overfølsomhed ved kontakt med huden", hvis praktiske erfaringer viser, at stofferne og produkterne forårsager overfølsomhed

hos et betydeligt antal personer ved hudkontakt, eller på grundlag af positive resultater i dyreforsøg.

En ekspertgruppe under WHO har udarbejdet en konsensusrapport med kriterier for identifikation og klassificering af betydelende kontaktallergener og stoffer, der forårsager specifik overfølsomhed i luftvejene. Disse kriterier anvender en systematik svarende til IARC's kriterier for kræftfremkaldende stoffer. Både hudallergener og stoffer, der kan forårsage specifik overfølsomhed i luftvejene, inddeles i fire klasser. Klassificeringen sker på basis af de oplysninger, der foreligger om stoffet (evidens). Der kan anvendes human evidens, evidens fra dyr og anden evidens. Afhængigt af, om den foreliggende evidens er tilstrækkelig, begrænset eller utilstrækkelig, klassificeres stofferne som anført i tabel 5.6.

Klassificering	Kontaktallergener	Luftvejsallergener (specifik overfølsomhed i luftvejene)
Klasse I	Betydende kontaktallergen	Forårsager specifik overfølsomhed i luftvejene
Klasse II	Sandsynligvis et betydende kontaktallergen	Forårsager sandsynligvis specifik overfølsomhed i luftvejene
Klasse III	Kan ikke klassificeres	Kan ikke klassificeres
Klasse IV	Ikke et betydende kontaktallergen	Forårsager ikke specifik overfølsomhed i luftvejene

Tabel 5.6. WHO-kriterier for identifikation og klassificering af betydelende kontaktallergener og stoffer, der forårsager specifik overfølsomhed i luftvejene.

## Allergilister

Kriterier for allergener kan danne basis for at udarbejde lister over allergener. De kriterier for allergener, der i praksis finder anvendelse i dag, er EU-kriterierne, som er grundlaget for listen over farlige stoffer (MST/EU), hvor en række stoffer er optaget som luftvejsallergener (R42) eller hudallergener (R43). Der er dog tale om "minimumslist", dels pga det indbyggede krav om væsentlighed (forårsager overfølsomhed hos et betydeligt antal personer), og dels fordi det kræver forhandling i EU, før et stof optages på listen med R42 og/eller R43.

Stoflister baseret på klassificering med R42 eller R43 har været anvendt som "allergiliste", fx i forbindelse med Arbejdstilsynets indsats i 1991 og 92 over for stoffer og materialer, der kan give allergi eller irritation af hud og luftveje. I undersøgelser med fokus på KRAN-stoffer (kræft, reproduktionsskader, allergi og nerveskader) er det oftest stoffer klassificeret med R42 og/eller

R43, der indgår som allergener.

Ved anvendelse af lister over allergener er det væsentlig at kende kriterier samt det datagrundlag, der ligger bag optagelse af stoffer på listen. Hvis der ikke er tale om veldefinerede kriterier, må der som minimum stilles krav om litteraturhenvisninger, så baggrundsdata kan vurderes.

## Vigtigste allergener generelt og arbejdsmiljørelevante allergener

Ved gennemgang af den videnskabelige litteratur kan der findes flere tusinde stoffer, som kan forårsage kontaktallergi, og hundredvis af stoffer, som kan forårsage luftvejsallergi. I praksis er det dog et noget mindre antal stoffer, der forårsager de fleste tilfælde af allergi.

### Vigtige kontaktallergener

De fleste kontaktallergier forårsages af en gruppe på omkring 100 stoffer, hvoraf de hyppigste tilhører stofgrupperne metaller, konserveringsmidler, parfumestoffer, gummikemikalier, lægemidler, planter samt epoxy og akrylater. De kontaktallergener, der hyppigst forårsager kontaktallergi hos eksempelvis patienter, indgår i den Europæiske Standardserie, som hudlæger på dermatologiske afdelinger anvender ved lappetestning, se tabel 5.5.

Væsentlige kontaktallergener i relation til erhvervsmæssig udsættelse er listet i tabel 5.7. De vigtigste stoffer og produkttyper i forbindelse med erhvervsbetingede kontaktallergier er metaller, resiner, køle-smøremidler, kosmetik, hudplejemidler og lægemidler.

### Væsentlige luftvejsallergener

Som nævnt tidligere giver Basisbog i arbejdsmedicin (bind III) en detaljeret liste over de væsentligste luftvejsallergener i forhold til arbejdsmiljøet i Danmark. Nogle af de mest fremtrædende grupper af allergener er tillige nævnt i tabel 5.4.

Som det fremgår af tabel 5.4, kan arbejdsbetinget luftvejsallergi forårsages af lavmolekylære stoffer, der fungerer som et haptent.

Allergener	Kilder til udsættelse
Akrylater	Lim; dentalprodukter; knoglecement; UV-hærdende lakker
Aminer	Hærdere til epoxy
Chromat	Læder; pigmenter; farvestoffer; cement
Epoxy resiner	Lim; maling; elektrisk isolering
Formaldehyd	Desinfektionsmidler; konserveringsmidler; laboratoriekemikalier; formaldehydresiner
Formaldehydresiner	Lim; maling; lak; imprægnerede tekstiler og papir; trykfarver
Formaldehydfrigivende stoffer	Konserveringsmidler; køle-smøremidler; maling; lim
Gummikemikalier	Gummihandsker; gummislanger, etc
Isocyanater	Lim; maling; udfyldningsmidler; polyurethanskum
Kobolt	Maling; lak
Kolofonium	Lim; dentalprodukter; papir; loddemidler, etc
Konserveringsmidler	Vandbaserede produkter: køle-smøremidler; maling; lim; rengøringsmidler; kosmetik; polermidler; hudplejemidler; procesvand, etc
Lægemedler	Sundhedssektoren, dyrlæger
Nikkel	Mønter; forniklede genstande; kontamineret olie, etc
Paraphenylendiamin	Hårfarver
Plastik/resiner	Lim; maling; udfyldningsmidler; emballage, etc

Tabel 5.7. Væsentlige kontaktallergener i relation til erhvervsmæssig udsættelse.

Det skal bemærkes, at den allergiske reaktion over for lavmolekylære stoffer ikke altid er IgE-medieret. Således spiller IgE ingen rolle i allergireaktioner over for isocyanater, mens luftvejsallergi over for platinsalte er IgE-medieret. Ved allergitest (eller diagnose af allergi) af lavmolekylære stoffer er det derfor ikke tilstrækkeligt at måle dannelse af specifikke IgE-antistoffer.

Den danske grænseværdi for platinsalte er  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Ved denne værdi forekommer sensibilisering og udløsning af astma-reaktioner hos mange af de eksponerede personer. Grænsen for sensibilisering ligger måske så lavt som  $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Stoflister baseret på klassificering med R42 og/eller R43 har været anvendt som "allergiliste", fx i forbindelse med Arbejdstilsynets indsats i 1991 og 1992 over for stoffer og materialer, der kan give udløsning af astmareaktioner hos mange af de eksponerede personer.

De højmolekylære luftvejsallergener er typisk proteiner, og mekanismen ved allergisk astma er altid IgE-medieret. Potentielt kan allergisk astma opstå i alle arbejdsmiljøer, hvor der forekommer en væsentlig udsættelse for proteinallergener.



## Forebyggelse

Ved forebyggelse af erhvervsbetingede allergiske lidelser skelnes mellem primær og sekundær forebyggelse. Primær forebyggelse sætter ind over for udviklingen af allergi (sensibilisering), hvor sekundær forebyggelse drejer sig om at undgå, at personer, der har udviklet en allergi, får allergiske symptomer. I begge tilfælde er viden om udsættelse for allergener et vigtigt led i indsatsen, som grundlæggende går ud på at undgå udsættelse i en form og intensitet, der kan forårsage ny sensibilisering, eller undgå/reducere fortsat udsættelse, der kan fremprovokere allergiske symptomer hos sensibiliserede personer.

Hvilken fremgangsmåde der er hensigtsmæssig ved regulering af udsættelsen, afhænger af, hvilke allergener der er tale om samt deres forekomst i miljøet. Hyppigt forekommende stoffer, med udbredt anvendelse i arbejdsmiljøet og hos forbrugerne, bør reguleres via lovgivningen enten i form af koncentrationsbegrænsninger eller ved krav om substitution. Stoffer, der anvendes mere afgrænset (fx i få, veldefinerede arbejdsprocesser), kan kontrolleres ved indkapsling, ventilation, uddannelse af de ansatte eller ved anvendelse af personlige beskyttelsesmidler (handsker, åndedrætsværn etc).

### Primær forebyggelse

Et vigtigt led i den primære forebyggelse er regulering af udsættelse for allergener. Fx har der siden starten af 1980'erne været krav om begrænsning af indholdet af vandopløseligt chromat i cement samt mærkning med den tidsperiode, hvor chromatreduktionen er effektiv. Denne regulering har bevirket, at hyppigheden af chromat-kontaktallergi forårsaget af cement er faldet væsentligt.

Nikkel, som forekommer meget udbredt, giver meget hyppigt anledning til allergi, når huden kommer i kontakt med genstande, der afgiver nikkel. I starten af 1990'erne blev der indført en begrænsning af nikkelafrigivelsen fra genstande beregnet til hudkontakt. Denne regulering, der dog ikke gælder i arbejdsmiljøet, er senere indført i EU-regi.

Erhvervsmæssig anvendelse af epoxyharpikser og isocyanater er underlagt en række restriktioner. Hensigten med disse er at undgå stofferne, hvis de kan erstattes af mindre farlige stoffer, eller uddanne de personer, der arbejder med stofferne, og dermed undgå, at anvendelsen fører til udvikling af allergi.

Den baggrundsviden, der skal til for at iværksætte reguleringer

af allergener, stammer ofte fra grundig udredning af en række enkelte cases eller ophobninger af cases. Fra kontaktallergi er der eksempler på, at en sådan udredning har vist, at det egentlige allergen ikke var det oprindeligt mistænkte stof, men følgestoffer eller omdannelsesprodukter fra en uhensigtsmæssig produktionsmetode eller efterbehandling af de færdige produkter. I sådanne tilfælde er problemerne blevet løst ved at ændre produktionspraksis.

Der findes i dag grænseværdier for den erhvervsmæssige udsættelse for nogle af de vigtigste lavmolekylære luftvejsallergener, fx isocyanater, syreanhydrider og platinsalte (se tabel 5.4). For proteinallergener findes der generelt ikke egentlige grænseværdier. En undtagelse er subtilisin (et proteinnedbrydende enzym, der bl.a. anvendes i vaskepulver), der har en fastlagt dansk loftværdi på 60 ng/m<sup>3</sup>, der ikke må overskrides selv kortvarigt. Ved arbejde med forsøgsdyr har opmærksomheden især været rettet mod meget stærke allergener, der findes i urin fra rotter. Her søger man ved anvendelse af effektiv ventilation og brug af personlige værnemidler at reducere eksponeringen mest muligt. Endvidere sikrer slusesystemer i kombination med tøjskift, at lokaler uden for forsøgsdyrsfaciliteterne ikke forurenes med allergener.

## Sekundær forebyggelse

En del af de metoder, der indgår i den primære forebyggelse, har også effekt i den sekundære forebyggelse.

I den kliniske udredning af allergisk kontakteksem er det af afgørende betydning at kunne vælge de relevante teststoffer til lappetestning ud fra en vurdering af patienternes udsættelse i forbindelse med erhverv, hobbies etc. Efterfølgende er det lige så vigtigt at kunne tolke relevansen af de positive reaktioner. Der skelnes mellem aktuelle, tidligere eller irrelevante lappetestreaktioner.

Eksponeringsoplysninger er af fundamental betydning - både at finde den primære kilde til udsættelse og fortolkning af relevansen. Hertil kommer forebyggelse af fortsat eksponering, dels fra den oprindelige kilde og dels fra alternative kilder. Fx forekommer de samme kontaktallergener ofte som konserveringsmidler i både rengøringsmidler og i hudplejemidler, og ofte skal forebyggelse samtidig rettes mod at undgå udsættelse på arbejdet og i privatlivet.

Proteinallergener som fx rat n1 allergen fra rotters urin, subtilisin og  $\alpha$ -amylase er så stærke allergener, at det ofte ikke i praksis er muligt at reducere udsættelse i arbejdsmiljøet til et niveau,

der ikke kan udløse allergiske astmasymptomer hos sensibiliserede personer. Personer, der udvikler allergi mod sådanne stærke allergener, vil derfor ofte være nødt til at forlade erhvervet.

## Relevant lovgivning

Mærkning af kemiske produkter reguleres af Miljøstyrelsens bekendtgørelser, som er baseret på EU-regler. Produkter, der indeholder allergener i koncentrationer over 1% (10.000 ppm), skal deklareres og mærkes: for kontaktallergener med symbolet lokalirriterende (Xi) og risikosætning R43 "Kan give overfølsomhed ved kontakt med huden"; for luftvejsallergener med symbolet sundhedsskadeligt (Xn) og risikosætning R42 "Kan give overfølsomhed ved indånding".

Derudover skal det bemærkes, at Arbejdstilsynet stiller krav om brugsanvisninger for produkter, der er faremærket, jf MST's regler.

## Litteratur

- Agner T, Andersen KE, Avnstorpe C, Bergmann SL, Halkier-Sørensen L, Kaaber K, Menné T, Thestrup-Pedersen K, Thormann J, Veien N. Reference program om kontakteksem. Udarbejdet for Dansk Dermatologisk Selskab af Den Danske Kontaktdermatitisgruppe. *Ugeskr Laeger* 1997; 159 Suppl 6: 17.
- Agner T, Menné T, Andersen KE, Halkier-Sørensen L, Thestrup-Pedersen K, Veien NK, Flyvholm M-A, Nørgaard L, Andersen BH. Forebyggelse af kontakteksemer. Forebyggelse og sundhedsfremme 1998/12, København: Sundhedsstyrelsen, 1998.
- Bach B, Dahl R, Dahl S, Iversen M, Sherson D, Sigsgaard T, Taudorf E, Thomsen G. Erhvervsastma. Retningslinier for diagnosticering. En konsensusrapport, Vanløse: Nationalforeningen til bekæmpelse af Lungesygdomme, 1996.
- Constant SL, Bottomly K. Induction of TH1 and TH2 CD4+ cell responses: The alternative approaches. *Ann. Rev. Immunol.* 1997; 15: 297-322.
- Bendixen G (red.). Basal og klinisk immunologi. FADL's Forlag. 1987.
- Bruynzeel DP, Andersen KE, Camarasa JG, Lachapelle JM, Menné T, White IR. The European standard series. *Contact Dermatitis* 1995; 33: 145-148.

- Burkholter D, Schiffer P. The epidemiology of atopic diseases in Europe A review. *Allergy and Clinical Immunology News* 1995; 7: 113-125.
- Cederbrant K, Hultman P, Marcusson JA, Tibbling L. In vitro lymphocyte proliferation as compared to patch test using gold, palladium and nickel. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112: 212-217.
- Chan-Yeung M, Malo JL. Aetiological agents in occupational asthma. *Eur Respir J* 1994; 7: 346-371.
- de la Hoz RE, Young RO, Pedersen DH. Exposure to potential occupational asthmogens: prevalence data from the National Occupational Exposure Survey. *Am J Ind Med* 1997; 31: 195-201.
- Flyvholm MA, Bakke JV, Wahlberg JE, Nordman H, Schnuch A, Burge PS, Andersen KE, Sarlo K, Menné T, Knudsen BB, Tobiassen LS. Criteria for classification of skin- and airway sensitizing substances in the work and general environment, Copenhagen: WHO, 1997.
- Halkier-Sørensen L, Thestrup-Pedersen K, Petersen BH. Anmeldte og anerkendte arbejdsbetingede hudsygdomme i Danmark. København: Industriens Forlag, 1994.
- Jensen SP, Lassen J, Lerche A. Vejledende oversigt over officielt anerkendte allergener i Norden og Tyskland. Kompendium 2. Indsats 1991-92. Hud og luftveje, København: Arbejdstilsynet, 1991.
- Kjøller M, Rasmussen NKr, Keiding L, Petersen HChr, Nielsen GA. Sundhed og sygelighed i Danmark 1994 og udviklingen siden 1987. København: DIKE, 1995.
- Lachapelle JM, Ale SI, Freeman S, Frosch PJ, Goh CL, Hannuksela M, Hayakawa R, Maibach HI, Wahlberg JE. Proposal for a revised international standard series of patch tests. *Contact Dermatitis* 1997; 36: 121-123.
- Nielsen NH. Allergi i en dansk voksen befolkning - belyst ved priktestning med inhalationsallergener. Ph.D.-afhandling, København: Københavns Universitet, 1993.
- OECD Guidelines for testing of chemicals. Adopted by the Council on 17th July 1992. Skin sensitization, OECD, 1992.
- Rycroft RJG, Menné T, Frosch PJ (eds). *Textbook of Contact Dermatitis*. 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin 1995.
- Seiler HG, Sigel A, Sigel H (eds). *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York 1994.
- Vos JG, Younes M, Smith E (eds). *Allergic hypersensitivities induced by chemicals. Recommendations for prevention*. Boca Raton: CRC Press, 1995.
- Wennergren G. Impact of viral infection on bronchial hyperresponsiveness. *Pediatr Allergy Immunol* 1996; 7(suppl 9):10-13.

Yakuji Nippo, LTD. Japanese Guidelines for non-clinical studies of drugs manual 1995. Editorial supervision by Pharmaceutical and Cosmetical Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, Japanese Ministry of Health and Welfare.

KAPITEL 6

# Neurotoksikologi

*Leif Simonsen  
Søren Peter Lund  
Peter Arlien-Søborg*

# Neurotoksikologi

Neurotoksikologi er en relativt ung gren inden for toksikologien, der beskæftiger sig med stoffer, som har skadelige effekter på menneskets nervesystem. Studier af disse stoffer kan fx have til formål blot at identificere tilstedeværelsen af et stof som årsag til forekomst af erhvervsmæssige lidelser, fx hexan som årsag til udbrud af omfattende nervehenfald (polyneuropati) blandt fodtøjsarbejdere. Det endelige mål for neurotoksikologien er imidlertid, ideelt set, at få bedre mulighed for at forebygge sygdom og lidelser forbundet med skader på nervesystemet og at kortlægge mekanismerne bag de toksiske effekter for derefter at opnå større viden om nervesystemets funktion.

Inden for arbejdsmiljøforskningen fik neurotoksikologien en central plads i begyndelsen af 80'erne i forbindelse med opdagelsen af de organiske opløsningsmidlers kroniske effekter på nervesystemet. En redefinerende af livskvalitet, der inkluderer mental sundhed og psykologiske faktorer i arbejdslivet, såvel som subkliniske tegn på toksiske lidelser har betydet nye udfordringer, og det har bevirket, at neurotoksikologi nu er en etableret disciplin inden for arbejdsmiljøforskningen. Den omfatter en beskrivelse af stoffers neurotoksiske potens og virkemekanisme i modelsystemer og udvikling og anvendelse af biokemiske, elektrofysiologiske og adfærdsbaserede metoder til beskrivelse af den neurotoksiske effekt ved stoffer, der forekommer i arbejdsmiljøet. Desuden omfatter neurotoksikologi anvendelsen af neurologiske undersøgelser og psykometriske tests i klinikken og i forbindelse med epidemiologiske undersøgelser.

Alle dele af kroppen kan skades af toksiske stoffer, men nervesystemet er meget ofte særlig følsomt, som det beskrives nedenfor. Mange stoffer kan forstyrre nervesystemets normale aktivitet. Nogle giver effekter, som opstår næsten straks og

varer i adskillige timer, fx alkohol eller dampe fra en beholder med organiske opløsningsmidler. Andre effekter fremkommer måske først efter gentagen udsættelse for stofferne i uger eller år, fx regelmæssig indånding af n-hexan-dampe eller blystøv i arbejdsmiljøet. Nogle stoffer kan fremkalde permanente skader på nervesystemet efter en enkelt dosering, fx visse organophosphatpesticider og metalforbindinger som trimethyltin. Neurotoksiske stoffer bidrager antagelig desuden til udviklingen af visse neurodegenerative og psykiatriske lidelser, det præcise omfang af bidraget er imidlertid ukendt.

## Nervesystemets struktur og funktion

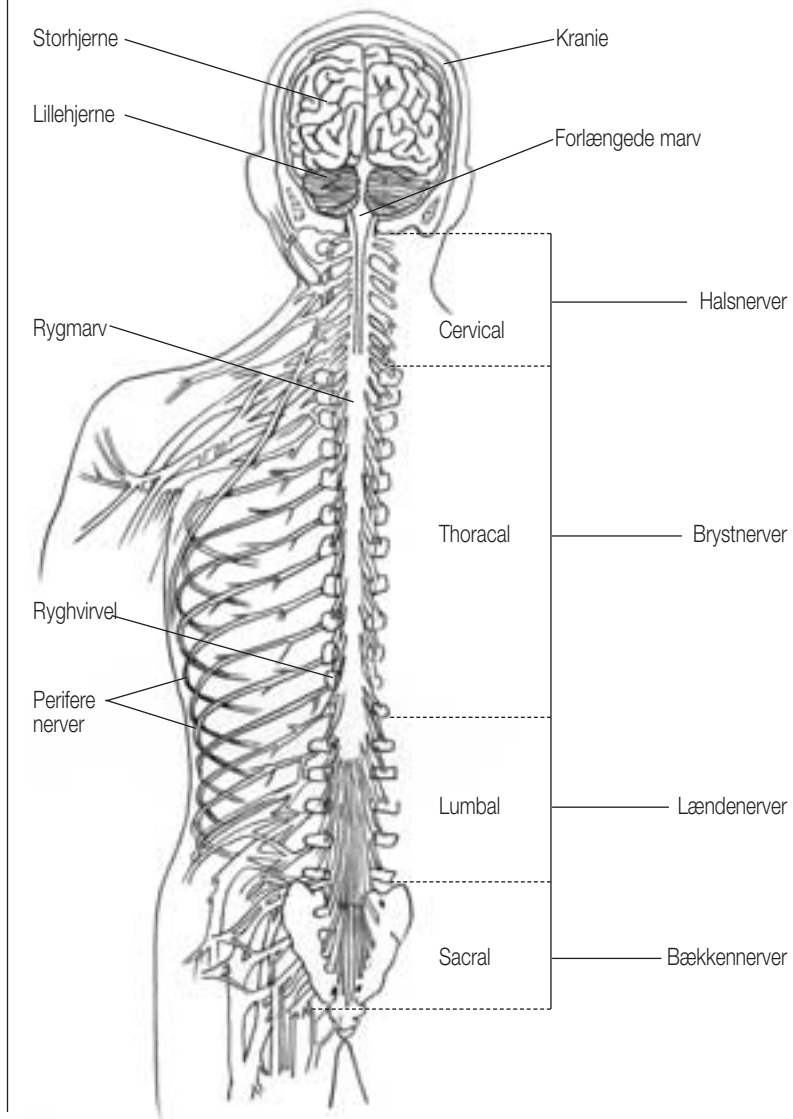
Nervesystemet er et komplekst organ, der er udbredt til det meste af kroppen. Centralnervesystemet (CNS) omfatter storhjerne, lillehjerne, hjernestamme og rygmarg, der er grundigt beskyttet af kraniet og hvirvelsøjleknogler. Centralnervesystemet har et meget højt basalstofskifte og kræver således en rigelig uafbrudt blodforsyning. Fra CNS løber nerver ud til stort set alle dele af kroppen. Disse nerver udgør det perifere nervesystem (PNS), der varetager transmissionen af elektriske signaler til og fra kroppens øvrige organer, fx muskler, kirtler og sansorganer (fig. 6.1). Nervesystemet styrer utallige funktioner i kroppen, bl.a. bevægelser, tankevirksomhed, syn, hørelse og tale, såvel som hjertefunktionen, respirationen samt andre fysiologiske processer.

### Cellernes opbygning og funktion

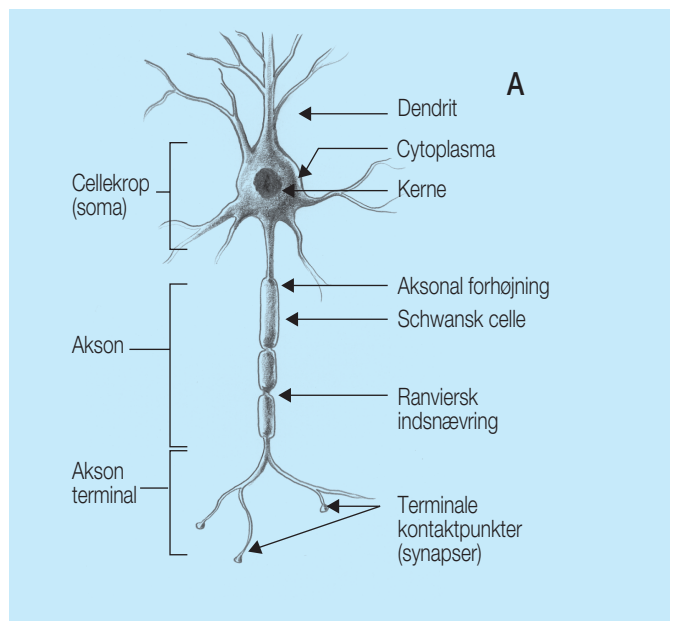
Nervesystemet er opbygget af mere end 10 mia celler. Der findes to hovedtyper af celler i nervesystemet, neuroner og glia. Neuroner har mange af de samme strukturer og funktioner som andre celler. De har fx cellekerne og mitokondrier, samt proteinsyntese og energistofskifte. Men neuroner er derudover specialiseret til at generere og lede elektriske signaler, og selvom de kan have meget forskelligt udseende, har de fire funktionelle dele fælles. Det er en input komponent, en integrerende del, en impulsledende del, samt en output komponent. Et typisk motorneuron (fig. 6.2) består af dendritter, der modtager signaler fra andre neuroner, cellekroppen (soma), hvor signalerne behandles, og nye impulser genereres, og nerveudløber (aksonet), der sender nerveimpulser videre til andre celler. I de



Figur 6.1. Menneskets nervesystem. Nervesystemet ses bagfra med angivelse af de vigtigste strukturer: storhjerne (cerebrum), lillehjernen (cerebellum), ryghvirvel (medulla spinalis), den forlængede marv (medulla oblongata), samt de perifere nerver, der modtager signaler fra sanseceller og via centralnervesystemet sender dem videre til muskler og kirtler.



Figur 6.2. Et 'standard'-neurons anatomi (A), cytologi (B) og funktion (C). Anatomisk ses dendritter som fine forgrenede udløbere fra cellekroppen. Aksonet med Schwanske celler og Ranvierske indsnøringer samt den terminale del af aksonet med kontaktpunkter (synapser). De cytologiske strukturer omfatter bl.a. mitokondrier, cellekerne, endoplasmatisk retikulum og det aksonale transportsystems mikrotubuli samt transmitterholdige vesikler i den præsynaptiske del af cellen. Funktionelt varetager receptorer på dendritterne omsætningen af kemiske påvirkninger til elektriske synapsepotentialer. Cellekroppen integrerer synapsepotentialerne fra dendritterne og initierer aktionspotentialer, der fra den aksonale forhøjning sendes via aksonet til synapsen, hvor det frigør kemiske transmitterstoffer.



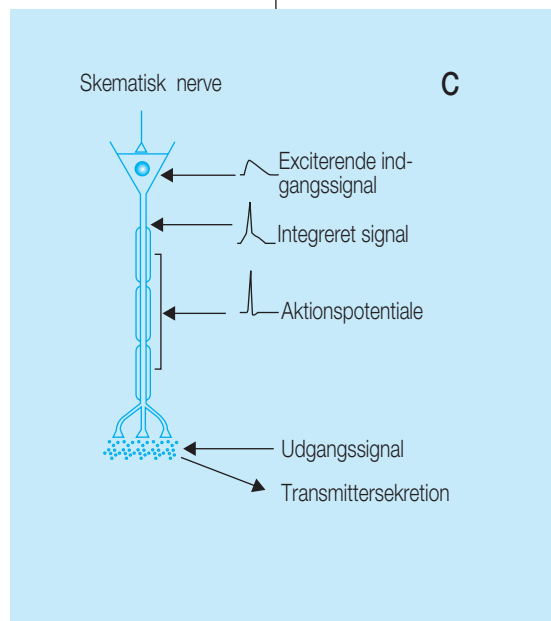
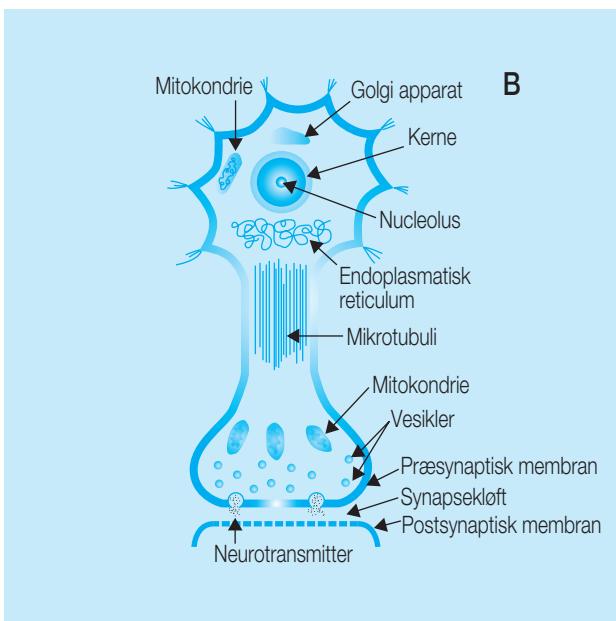
specialiserede endeknopper frigør de elektriske signaler kemiske budbringerstoffer (transmittere), som kan stimulere andre neuroners dendritter eller kirtler og muskelceller. Forbindelsen mellem nerveceller, og mellem nerveceller og effektorceller, betegnes synapse og omfatter den præsynaptiske del med transmitter-vesikler, synapsekløften og den postsynaptiske del med receptorer for transmitterne. Neuroner er udviklingsmæssigt højt specialiserede celler og er normalt ikke i stand til at dele sig som andre celler i kroppen, et forhold der gør nervesystemet særligt sårbart for bl.a. toksiske påvirkninger.

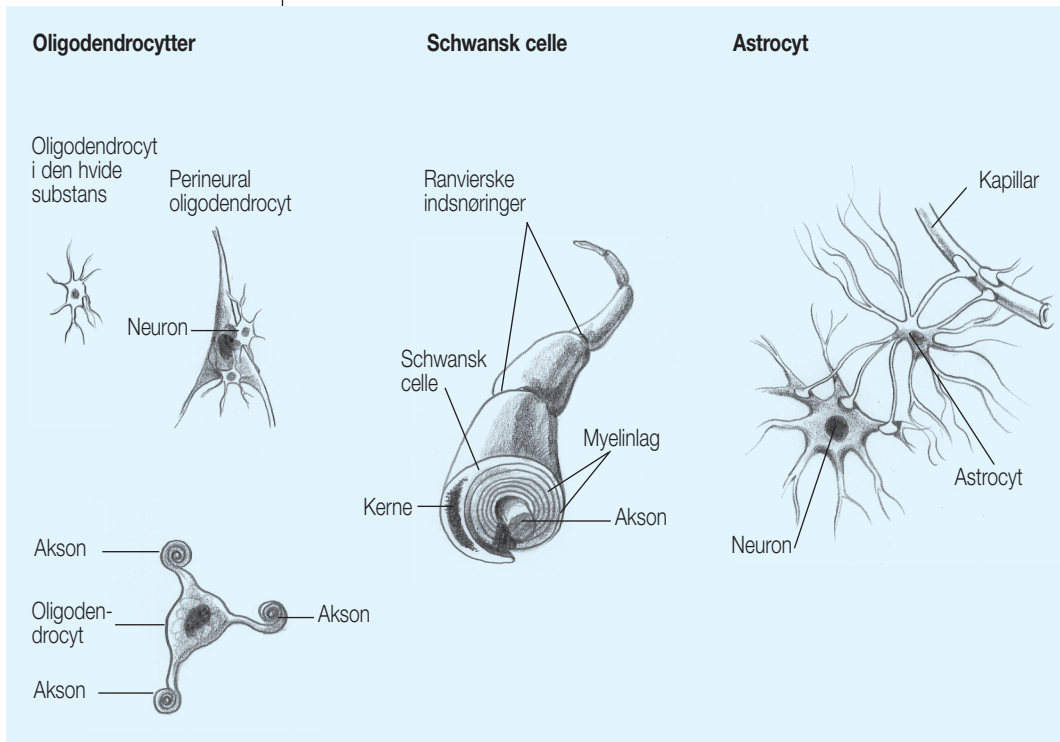
Gliaceller er den anden store gruppe af celler, som findes i nervesystemet (fig. 6.3). I modsætning til neuroner, der normalt ikke kan dele sig, er gliaceller i stand til at regenerere ved celledeling. Derimod deltager de ikke direkte i nerveimpuls-ledningen. Der er mindst fem gange flere gliaceller end neuroner, og deres primære opgave er at forsyne og understøtte neuronerne. Der findes to hovedtyper af gliaceller, makroglia og mikroglia. Makroglia omfatter astrocytter, oligodendrocytter og Schwanske celler.

Astrocytterne varetager bl.a. vedligeholdelsen af den væske, der bader neuronerne og er en integreret del af blod-hjerne barrieren, som sikrer et konstant miljø for CNS og udelukker mange især polære og ladede stoffer.

Oligodendrocytternes udløbere omslutter i CNS neuronernes aksoner med myelin, der er et fedtrigt materiale, som øger hastigheden og effektiviteten af nerveledningen. I PNS varetages denne funktion af de Schwanske celler.

Mikroglia dannes fra makrofager. De fungerer som fagocytter og spiller en betydningsfuld rolle som 'skraldemænd' i forbindelse med skader på nervesystemet og ved sygdom.



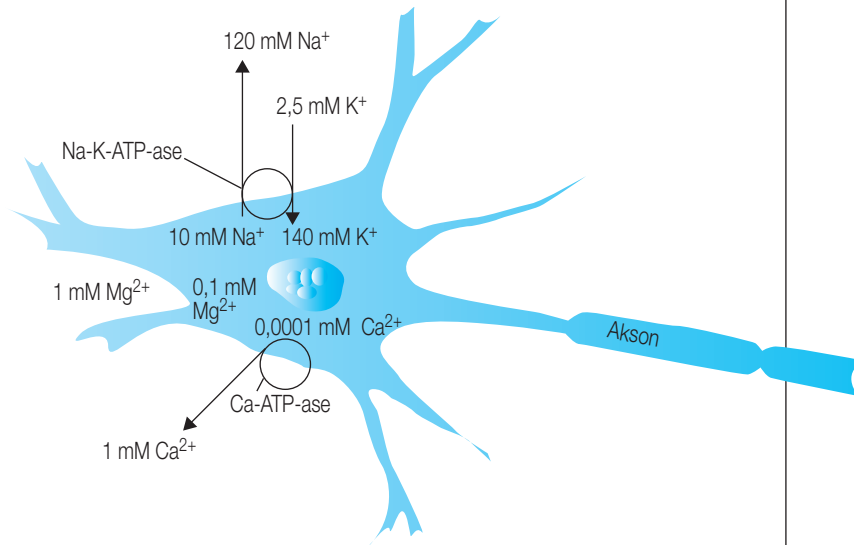


Figur 6.3. Hovedtyper af gliaceller i nervesystemet. Astrocyt og oligodendrocytter fra centralnervesystemet og Schwansk celle fra det perifere nervesystem. (Modifieret fra: Principles of Neural Science. Ed. E.R. Kandel, J.H. Swartz & T.M. Jessell).

## Membranpotentialer og elektrisk ledning

Neuroner opretholder et elektrisk potentiale (membranpotential) i forhold til omgivelserne på ca -90 mV. Membranpotentialet opstår som følge af en aktiv energikrævende transport af ioner over neuronmembranen. Denne transport varetages af et specialiseret enzym i cellemembranen, natrium-kalium-ATP-asen. Energien kommer fra spaltning af ATP og bevirker, at natriumioner ( $\text{Na}^+$ ) pumpes ud af cellen og kaliumioner ( $\text{K}^+$ ) ind. Transporten medfører en ulige fordeling af ioner over neuronmembranen. På fig. 6.4 er fordelingen af de vigtigste ioner over neuronmembranen angivet. Sammenholdes denne fordeling med neuronmembranens permeabilitet for disse ioner (neuronmembranen er i hvile ca 10 gange mere permeabel for  $\text{K}^+$  end for  $\text{Na}^+$ ), kan hvilepotentialet bestemmes ved Nernst ligning. Nernst ligningen beregner det potentielle, 'ligevægtpotentialet' (E), der kan modsvare en ulige fordeling af ioner over en permeabel membran:

$$E = (RT/F) \times \ln(C_o/C_i) \quad (1)$$



Figur 6.4. Fordelingen af de vigtigste ioner over neuronmembranen. Natriumkalium-pumpen er et enzym der er indlejret i cellemembranen. Det virker som en Na-K-ATP-ase, et enzym, der spalter ATP under tilstedeværelse af Na<sup>+</sup> og K<sup>+</sup>. Det pumper herved, imod en betydelig koncentrationsgradient, Na<sup>+</sup> ud af og K<sup>+</sup> ind i cellen. Herved opstår de angivne ulige ionfordelinger. Reguleringen af den meget lave intracellulære Ca<sup>2+</sup>-koncentration er essentiel for en lang række processer, hvor Ca<sup>2+</sup> virker som aktivator. Mange forskellige mekanismer er involveret i reguleringen af Ca<sup>2+</sup>, bl.a. en Ca-ATP-ase, men derudover er også en Na-Ca-udvekslingsmekanisme, mitokondrierne og det endoplasmatiske retikulum involveret. Et sammenbrud af calciumreguleringen ses ofte under neurotoksiske forløb.

hvor R = gaskonstanten, T = den absolutte temperatur, F = Faradays tal, C<sub>o</sub> og C<sub>i</sub> er koncentrationen af den aktuelle ion på hver side af membranen.

Vægtes dette udtryk for E med permeabiliteten for natrium- og kaliumionerne, fås følgende ligning for membranpotentialet:

$$V_m = (RT/F) \times \ln((K_o + bNa_o)/(K_i + bNa_i)) \quad (2)$$

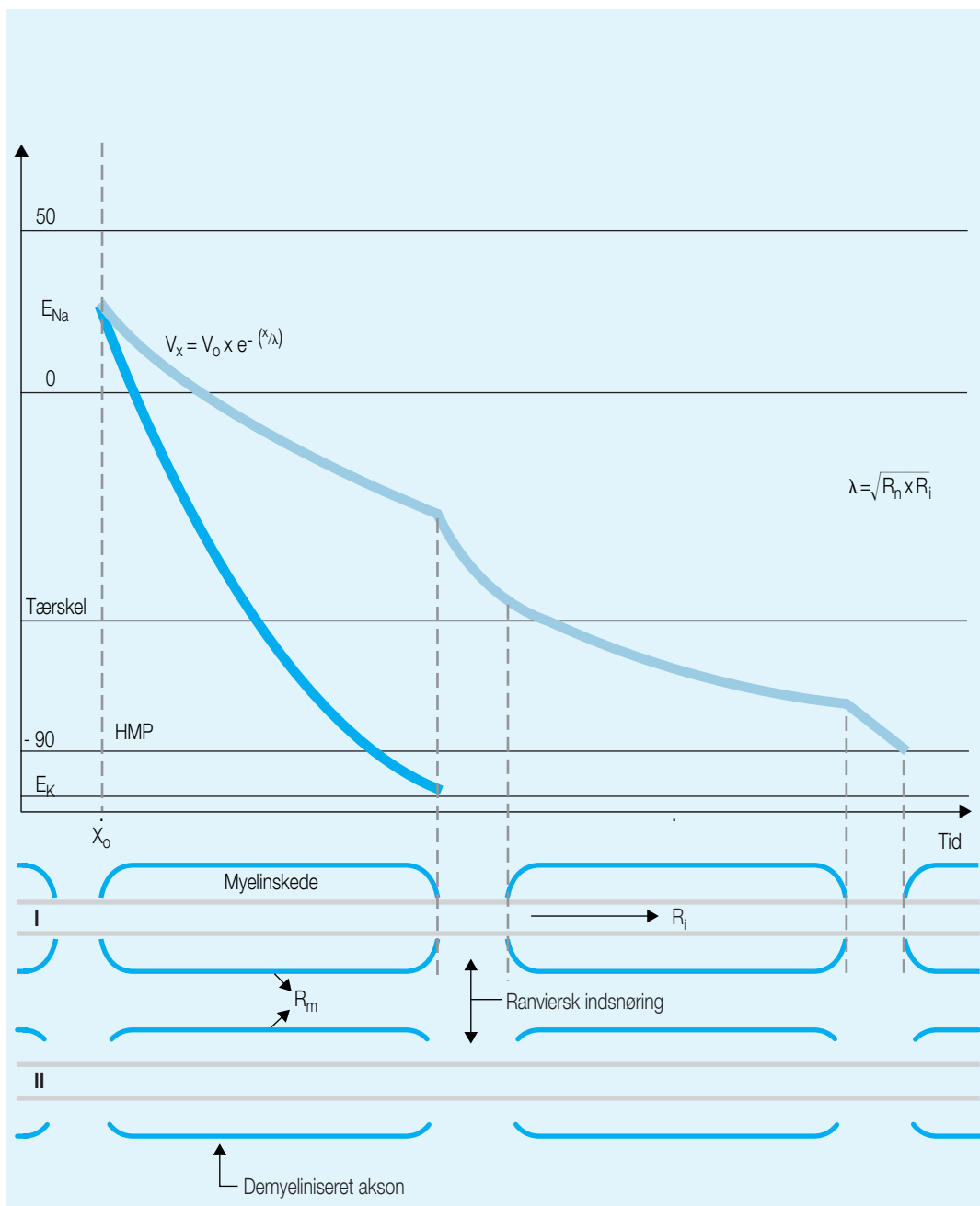
hvor Na<sub>o</sub> og Na<sub>i</sub> samt K<sub>o</sub> og K<sub>i</sub> er koncentrationen af natrium- og kaliumioner ekstra- og intracellulært, b = permeabilitets-forholdet pNa/pK, ca 0,01 i hvile.

Det unikke ved neuroner er, at de kan generere og lede elektriske impulser, aktionspotentialer, over relativt store afstande med hastigheder på op til 100 msek<sup>-1</sup>. En lang række specialiserede proteiner, hvoraf nogle virker som ionkanaler, er indlejrede i neuronernes cellemembraner. Permeabiliteten for disse ionkanaler kan påvirkes af såvel elektriske potentialer som af kemiske stoffer, neurotransmittere. Aksonet er en lang tynd udløber fra resten af neuronet (fig. 6.2). Det kan betragtes som et langt væskefyldt rør. Et sådant rør kan passivt lede elektrisk strøm,

men ikke særlig effektivt. En lille elektrisk impuls, som påføres neuronet, henfalder eksponentielt med afstanden og dør hurtigt ud (fig. 6.5). Hvis impulsen imidlertid er tilstrækkelig stor, over tærskelværdien, aktiveres de potentialfølsomme natriumkanaler, og gennem en positiv feedback mekanisme øges membranens permeabilitet for natriumioner eksplosivt. Permeabilitetsforholdet  $p_{Na}/p_K$  ændres fra ca 0,01 til 10. Natriumioner strømmer herved ind i cellen, og membranpotentialet ændres på under et msec fra ca -90 mV til ca +20 mV. Natriumkanalerne er af en sådan natur, at de uafhængigt af potentialet over membranen efter få msec atter når den oprindelige lave permeabilitet for  $Na^+$ . I få msec efter en aktivering kan natriumkanalerne ikke aktiveres på ny (refraktærtiden). Samtidig med at membranpotentialet stiger mod positive værdier, aktiveres en anden type kanaler, de potentialfølsomme kaliumkanaler, og kaliumioner strømmer ud af cellen. Herved bliver membranpotentialet atter negativt og undertiden mere negativt end under hvile, fordi kaliumkanalerne er langsommere til at ændre permeabilitet end natriumkanalerne, således at forholdet  $p_{Na}/p_K$  umiddelbart efter et aktionspotentiale er mindre end under hvile. Kaliumkanalerne lukker først, når membranpotentialet atter er nær hvileværdien. Forløbet af  $V_m$ ,  $p_{Na}$  og  $p_K$  under et aktionspotentiale er vist på fig 6.6. Aktionspotentialer er normalt tilstrækkeligt til, at det kan aktivere nye kanaler længere fremme på aksonet ved den næste Ranvierske indsnøring, og herved udbreder potentialeforløbet sig springvist frem til synapsen (fig. 6.5).

Når aktionspotentialer når frem til den præsynaptiske membran, aktiveres en ny type kanaler i denne. Det er de potentialfølsomme calciumkanaler, og herved strømmer calciumioner ind i cellen, hvor de aktiverer frigivelsen af vesikler med indhold af neurotransmittere. I nervesystemet findes et begrænset antal lavmolekylære transmittersubstanser og mange neuroaktive peptider, hvoraf flere vides at fungere som neurotransmittere (se tabel 6.1).

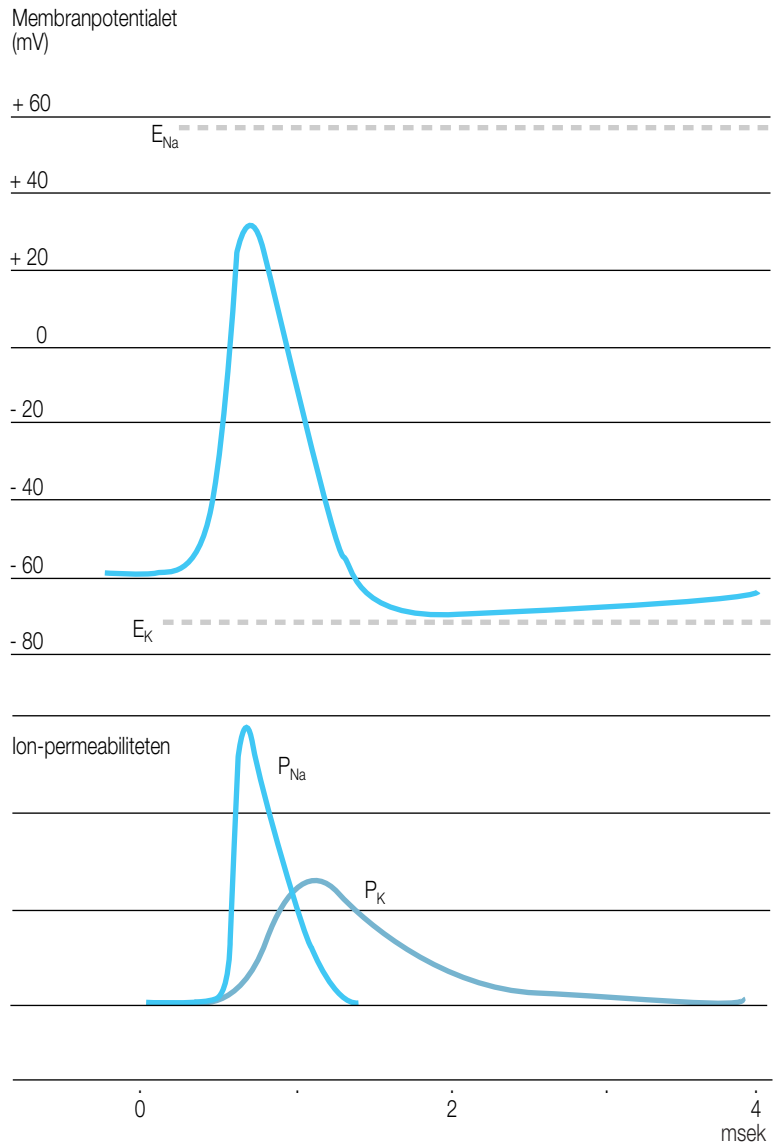
De frigivne transmittermolekyler bindes til receptorer på de efterfølgende neuroners dendritter, og herved aktiveres receptorerne. Der findes en lang række transmittersensitive receptorer, hvis aktivering kan have forskellige konsekvenser for neuronet. Der kan være tale om aktivering af ionkanaler, hvis åbning resulterer i et synapsepotentiale. Ionkanalerne kan være exciterende, således at synapsepotentialet bringer membranpotentialet mod tærskelværdien, eller de kan være inhiberende, så de fjerner membranpotentialet fra tærskelværdien. Desuden findes receptorer, som regulerer intracellulære biokemiske processer. De centrale elektrofysiologiske processer under en synapsestransmission er vist skematisk på fig. 6.2.



Figur 6.5. Potentialeforløbet  $V_x$  som funktion af afstanden fra et aktionspotentiale i et normalt akson (I) og i et demyeliniseret akson (II). Jo længere fra stimuleringsstedet  $X_0$  der registreres, des mindre er det potentiale, der måles. Henfaldet afhænger af forholdet mellem membranmodstanden  $R_m$  og modstanden i cytoplasmaet  $R_i$  og ekstracellulærvæsken  $R_o$ .  $\lambda^2 = R_m / (R_o + R_i)$ .  $\lambda$  er den længde, over hvilken spændingen er faldet til  $1/e$  (36,8%) af den oprindelige værdi. Hvor der er en stor membranmodstand, fx hvor aksonet er isoleret med myelin, falder potentialet langsommere.

Uden for de Ranvierske indsnøringer, under myelinskederne, på aksonet findes ingen Na-kanaler, så for at et aktionspotentiale kan udbredes i en myeliniseret nerve, skal det være så stort, at det fra én Ranviersk indsnøring kan depolarisere membranpotentialet til over tærskelværdien i den følgende indsnøring (I).

En række toksiske stoffer fremkalder en demyelinisering af aksonerne, hvorved myelinskederne henfalder (II). Herved falder membranmodstanden og dermed tillige længdekonstanten  $\lambda$ . Det betyder, at aksonspotentialet blokeres, fordi det ikke længere kan nå at excitere de potentialfølsomme kanaler i den efterfølgende Ranvierske indsnøring.



Figur 6.6. Forløbet af  $V_m$ ,  $p_{Na}$  og  $p_K$  under et aktionspotentiale.  $E_{Na}$  og  $E_K$  angiver ligevægtspotentialerne for hhv natrium og kalium, dvs de potentialer, der teoretisk kan måles, hvis membranen kun er permeabel for denne ene ion. Forløbet af  $V_m$  er resultatet af de varierende permeabiliteter for  $Na^+$  og  $K^+$ , som sammenholdt med ligevægtspotentialerne giver et membranpotentialeforløb som beskrevet af formel (1).

Tabel 6.1. Liste over neurotransmittere og neuroaktive peptider.

Stof	Virkested og funktion*
<b>Neurotransmittere</b>	
γ-Aminosmørsyre (GABA)	Inhibition, i storhjernens bark
Glutaminsyre	Excitatorisk virkning på motorneuroner
Acetylcholin	Excitatorisk virkning på neuromuskulær synapse
Dopamin	Substantia nigra, hypothalamus
Serotonin	Neuroner i hjerne og rygmarv
Noradrenalin	Det autonome nervesystems sympatiske del
<b>Peptider</b>	
Bradykinin	Aktivering af hudens smertereceptorer ved vævsskader
Substans P	Hjerne og sensoriske nerver, fremkalder udvidelse af arterioler
Oxytocin	Regulerer mælkefrigivelsen ved amning
Vasopressin	Regulerer nyrenes vandudskillelse

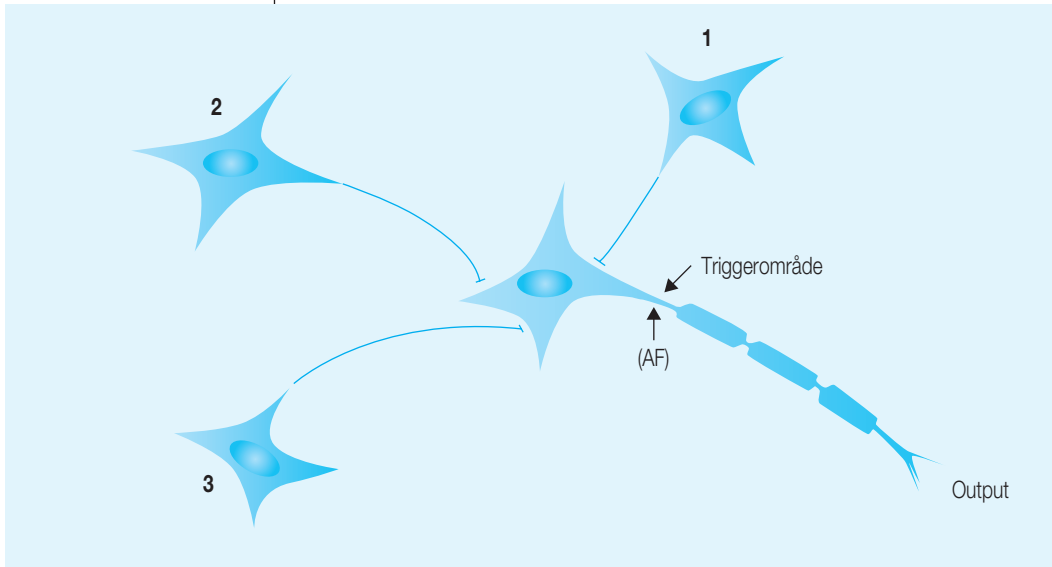
\*) Her er tale om eksempler, en neurotransmitter kan findes i mange typer neuroner forskellige steder i nervesystemet og have forskellig effekt på de efterfølgende celler; nogle neurotransmittere optræder desuden som hormoner, der stimulerer kirtler og væv.

Et neuron kan modtage signaler fra mange (op til 1.000) andre neuroner. I det modtagne neuron sker der en temporal og spatial addition af de indkomne elektriske signaler. Et synapsepotentiale tæt på den aksonale forhøjning, der virker som triggerområde, har således større vægt end et, der opstår i en fjern dendrit. Og synapsepotentialer, der kommer samtidig, har større samlet værdi end en serie, der er tidsmæssigt adskilt. Desuden kan eventuelle biokemiske processer, der reguleres af transmitterfølsomme receptorer, modificere de elektriske forandringer. Det samlede resultat manifesterer sig i den hyppighed, hvormed neuronet sender aktionspotentialer videre gennem aksonet til andre neuroner.

Neuroner kan som nævnt stå i forbindelse med mange hundrede andre neuroner, og hvert neuron vil således udgøre en avanceret regneenhed i et komplekst netværk. Såvel potentiale- og transmitterstyring som biokemiske ændringer af ionkanalerne har betydning for de svar, der kommer fra et sådant netværk. Fig. 6.7 giver en simpel illustration af princippet bag et neurons funktion som signalbehandlingsenhed - grundlaget for al hjerneaktivitet.

De her beskrevne forhold omkring nervecellernes struktur og funktion er også årsagen til deres særlige sårbarhed over for toksiske påvirkninger. Opretholdelsen af iongradienter over cellemembranen og den elektriske aktivitet er meget energikrævende, og hjernen er derfor sårbar over for stoffer, der kan bremse energiforsyningen et hvilket som helst sted i kæden fra indånding af luft, optagelse og transport af ilt i blodet til generering af energi i respirationskæden.





Figur 6.7. Nervecellen som regneenhed. En nervecelle, der modtager inhiberende impulser fra celle 3 og exciterende impulser fra celle 1 og 2, afsender et aktionspotentiale, når tærskelværdien ved den aksonale forhøjning (AF) overskrides. Hvornår dette sker, afhænger af de indkomne signalers hyppighed og afstand fra AF. I tabellen er der angivet nogle tænkte kombinationsmuligheder.

Betegnelsen	Input	Output
Excitation	2	0
Excitation	1	+
Inhibition	3	0
Temporal summation	2+2	+
Temporal inhibition	3+1	0
Temporal inhibition	3 +1	1
Spatial summation	3+2+2	0

Et andet træk ved nervecellerne er deres store overflade. De mange udløbere, dendritterne og aksonet med forskellige receptorer er oplagte mål for mange toksiske stoffer.

Syntesen af transmittorer i aksonets terminaler er afhængig af den aksonale transport, som er baseret på et transportsystem, der består af neurofibriller i hele aksonets længde fra cellekroppen til terminalerne. Dette system er ligeledes meget sårbart, og mange stoffer kan skade det, så nerveudløberne henfalder.

## Centralnervesystemet

Centralnervesystemet (CNS) omfatter som nævnt storhjerne, lillehjerne, hjernestamme og rygmarv. Disse strukturer er grundigt beskyttet af kraniet og hvirvelsøjleknogler. Hjernen ligger i kraniet og er desuden beskyttet af hjernehindere.

Under fosterets udvikling ses tydeligt en tredeling af hjernen. Det er forhjernen, som bliver til storhjernens bark og basale ganglier, midthjernen, som bl.a. bliver til synshøjen (tectum), hjernestilkene, den sorte substans (substantia nigra) og den røde kerne (nucleus ruber) samt baghjernen som bliver til lillehjernen og hjernestammen. Storhjernen består af en grå substans, der ligger som et lag på hele hjernens overflade, og en hvid substans, der udgør det indre af storhjernen. Den grå substans indeholder nervecellernes dendritter og cellekroppe. Den hvide substans indeholder nerveaksonerne med de isolerende Schwanske celleskeder, der består af fedt og giver den hvide farve. Storhjernen varetager funktioner som opfattelse af sanseindtryk, tankevirk-somhed og overordnet styring af vores bevægelser. Lillehjernen indeholder centret for balance, som modtager signaler fra lige-vægtsorganet i det indre øre og udsender impulser, der holder kroppen i ligevægt. Rygmarven går fra hjernens bund gennem et hul i nakkebenet. Det øverste stykke, den forlængede marv, indeholder centre, der autonomt regulerer vejtrækning og hjer-teslag. Fra rygmarven udgår en forreste (ventral) og en bagerste (dorsal) nerverod.

## Det perifere nervesystem

Det perifere nervesystem omfatter motoriske, sensoriske og auto-nome neuroner. Funktionelt er grænserne i nervesystemet dog anderledes flydende, idet de motoriske neuroner fx har deres cellekroppe placeret i rygmarvens grå substans. Neurotoksikolo-gisk set udgør det perifere nervesystem et system, der er speci-fikt sårbart over for visse toksiske stoffer, men som samtidig er i stand til at regenerere. Funktionelt starter de perifere nervebaner med en sansecelle, fx de lysfølsomme celler, stavene og tappene i nethinden, eller hårcellerne i det indre øre, og ender ved et organ, fx en muskel eller en kirtel. Patellarrefleksen er et klas-sisk eksempel på en funktionel nervebane i det perifere system.

## Det autonome nervesystem

Det autonome nervesystem er for det meste ikke underlagt vil-jens kontrol, men regulerer automatisk en række fysiologiske processer, såsom den glatte muskulatur, hjertemusklens og kirtel-funktioner. En kæde af ganglier, "grænsestrengen", på hver side af rygsøjlen udgør den centrale del af det autonome nervesy-stem. Grænsestrengens ganglier styres fra centralnervesystemet og sender nervebunder til en lang række af kroppens organer.

Nervebundterne sender signaler fra CNS, som regulerer organernes funktion. Traditionelt skelner man mellem det sympatiske system, hvis vigtigste transmitterstof er noradrenalin, og det parasympatiske system, der har acetylcholin som transmitterstof. Det sympatiske system går gennem grænsestrengens ganglier, mens det parasympatiske systems ganglier ligger tæt på de enkelte organer. Funktionelt varetager det sympatiske system stimulering af aktiviteten af de innerverede organer, mens det parasympatiske dæmper aktiviteten.

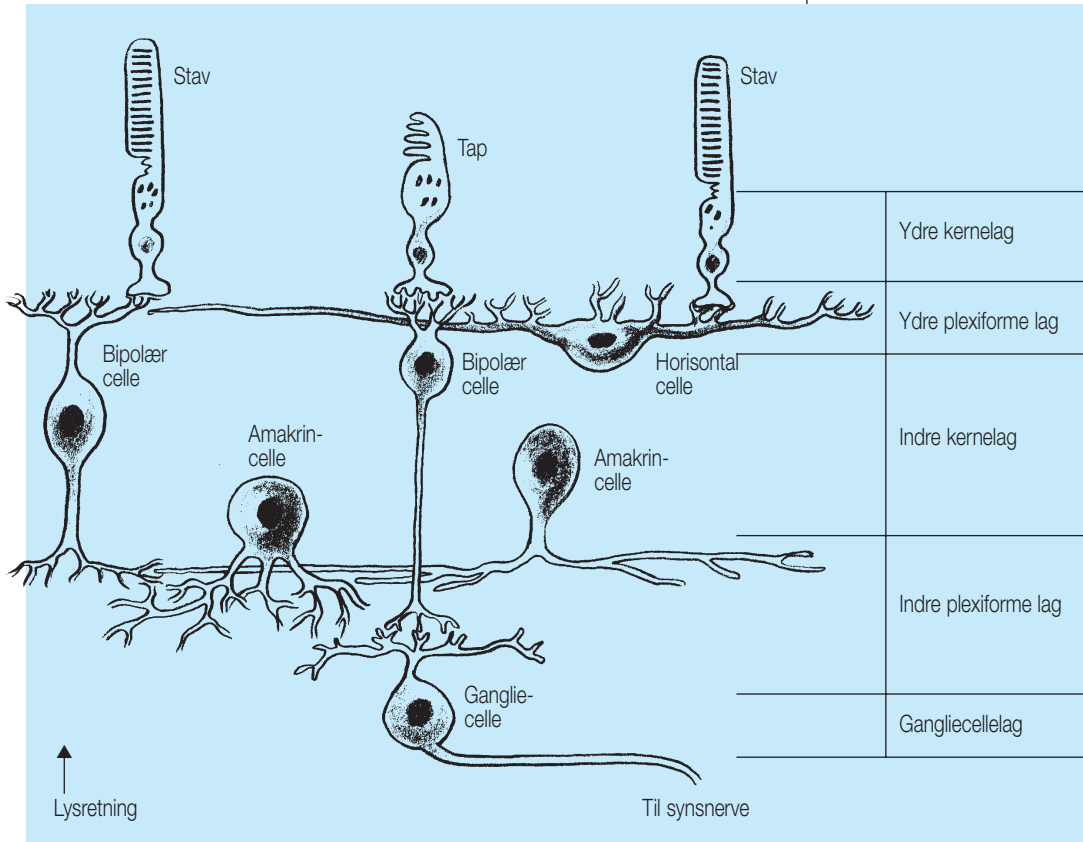
## Sanseorganerne og nervesystemet

Sansernes funktion er at oversætte forskellige fysiske og kemiske energiformer til elektriske potentialer. Den neurale del af sanseorganerne omfatter fx nethindens stav- og tapceller, det indre øres hårceller, næseslimhindens lugteceller, smagsløgenes smagsceller og hudens nerveender, der hver især er specialiseret til at registrere forskellige følelser. Hver af disse neurale dele i sanseorganerne er specialiseret til at reagere på en specifik energiform. Energien omsættes af sansecellen til et elektrisk signal, sansepotentialet, der rummer oplysninger om den modtagne energis art, karakter og intensitet. Signalerne videresendes til specielle dele af CNS, hvor de analyseres nærmere.

### *Nethinden*

Omsætningen af lys til nerveimpulser varetages af nethindens sanseceller, der består af lysfølsomme nerveceller, stave og tappe. I nethinden findes desuden bipolære nerveceller, ganglieceller og amakrinceller (fig. 6.8). Et enkelt lyskvant kan danne et sansepotentiale. Synspigmentet (rhodopsin i stavene) opfanger fotonen, hvorved der frigøres  $\text{Ca}^{2+}$ , som mindsker membranens gennemtrængelighed for  $\text{Na}^+$ . Herved opstår et negativt sansepotentiale, hvis størrelse er proportionalt med antallet af absorberede fotoner. Sansepotentialet ledes via de bipolære celler til gangliecellerne, hvor der dannes aktionspotentialer, som via synsnerven sendes til hjernen.

De andre lysfølsomme nerveceller, tappene, indeholder tre forskellige pigmenter med forskellig følsomhed for lysets bølgelængde, og herved muliggøres farvesyn. I aktionspotentialernes hyppighed og fordeling på de enkelte nerveudløbere ligger informationer om synsindtrykkets intensitet, størrelse, farve, form og bevægelse. Udviklingsmæssigt er nethindens nerveceller en del af hjernen og som sådan interessant i toksikologiske sammenhænge, da påvirkninger af nervecellerne i retina relativt let kan måles med elektrofysiologiske metoder. På forsøgsdyr som



rotter er det fx muligt med kontaktlinseelektroder at registrere elektoretinogrammer (ERG, fig. 6.12A), der i øvrigt har mange lighedstræk med de ERG'er, der på lignende måde kan registreres hos mennesker. En række stoffer påvirker cellerne i nethinden og dermed forløbet af ERG'et. Det drejer sig bl.a. om organiske opløsningsmidler, tungmetaller og visse lægemidler, se tabel 6.2.

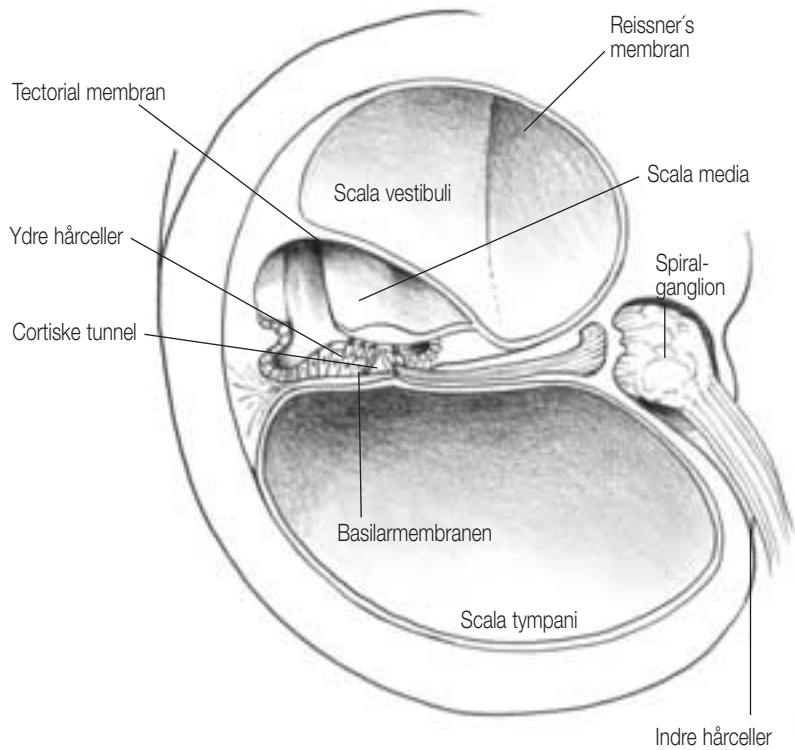
### Det indre øre

Omsætningen af lyd til nerveimpulser er knyttet til hårcellerne i sneglen (cochlea), hvor der findes en række indre hårceller og tre rækker ydre hårceller (fig. 6.9A). Det er de indre hårceller, der omsætter lydets mekaniske svingninger til nerveimpulser og således i princippet fungerer som det indre øres mikrofon. De ydre hårceller har afgørende betydning for filtrering og forstærkning af lydsvingningerne til de indre hårceller. Ved udsættelse for støj eller visse kemiske stoffer er det de ydre hårceller, der først skades og forsvinder.

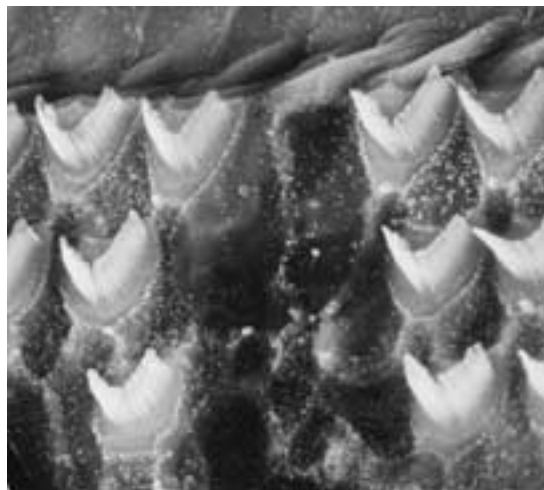
Figur 6.8. Nethindens forskellige celletyper. Lyset skal først trænge igennem lagene med neuroner, før det når stavene og tappene, som er de lysfølsomme celler. Stavene står for nattesynet, mens tappene varetager farvesynet.

Figur 6.9. Det indre øre.  
 (A) Opbygningen af sneglen i det indre øre.  
 Hårcellerne på basilarmembranen omsætter lyden til nerveimpulser, der ledes via spiralgangliet til hjernen.  
 (B) Elektronmikroskopi af tolueneksponerede hårceller fra en rotte. Bemærk de manglende hårceller. De elektronmikroskopiske undersøgelser er foretaget af læge, Ph.D. Klaus Qvortrup, Medicinsk Anatomisk Institut, KU.

A



B



Tabel 6.2. Stoffer, der påvirker synet og hørelsen.

Stof	Virkested og virkning	
	Synet	Hørelsen
<b>Organiske opløsningsmidler:</b> Toluen, xylene, carbendisulfid, n-hexan	Nedsat farvesyn	Øget høretærskel
<b>Tungmetaller:</b> Bly, kviksølv, thallium	Nedsat farvesyn, natteblindhed, indsnævret synsfelt (Hg)	Nedsat hørelse, skade på hørenerven
<b>Pesticider:</b> Hexachlorophen Methylbromid	Forandringer i retina Synsforstyrrelser	-
<b>Lægemidler:</b> Salicylsyre Dihydro-Streptomycin Disulfiram	- - Sløret syn og nedsat farvesyn	Midlertidigt høretab, høretab

Hørelsen er generelt meget følsom for giftige stoffer, og en lang række kemiske stoffer kan være årsag til høreskade, tabel 6.2. Listen omfatter bl.a. lægemidler, tungmetaller og organiske opløsningsmidler.

Den første direkte påvisning af opløsningsmidler som årsag til høreskade stammer fra amerikanske undersøgelser af organiske opløsningsmidlers toksiske effekter på nervesystemet hos rotter. Ved undersøgelsen blev der anvendt en test baseret på en betinget refleks i forbindelse med lydstimulering; dyrene reagerede mindre eller slet ikke på lydstimulering efter udsættelse for toluen. Ved en nærmere undersøgelse af deres hørelse fandt man en permanent hørenedsættelse i et begrænset frekvensområde, nemlig 8-20 kHz, samt at dette var forbundet med et tab af hårceller i det indre øre.

Ved elektronmikroskopiske undersøgelser kan der påvises et gradvist tab af hårceller ved stigende dosering for toluen. Samtidig har man først kunnet registrere en ændring i høretærsklen ved et relativt stort tab af hårceller. Af de tre ydre rækker hårceller tabes først cellerne i den yderste række, og ved stigende dosering breder tabet sig pletvis til de to inderste rækker. Øges doseringen yderligere, breder tabet sig også til den indre række hårceller, og hørelsen tabes helt for de frekvenser (toner), der er knyttet til dette område af sneglen (fig. 6.9B).

Tabet af ydre hårceller synes at være forbundet med en nedsat frekvensaktivitet, dvs en nedsat evne til at skelne nærtliggende toner. Et tilsvarende fænomen kaldet 'loudness recruit-

ment' kendes fra mennesker, der efter en høreskade generes mere af støj og dertil også får problemer med at fokusere hørelsen i forbindelse med baggrundstøj.

Der er ikke noget klart billede af opløsningsmidler som årsag til høreskade hos mennesker. Enkeltstående beskrivelser af patienter med tegn på høreskade efter udsættelse for organiske opløsningsmidler har været publiceret fra midten af 60'erne, men egentlig dokumentation for fænomenet er først dukket op hen mod slutningen af 1980'erne.

At udsættelse for opløsningsmidler kan medføre tab af hørelse er stadig en relativt ukendt og derfor upåagtet fare. Da udsættelse for opløsningsmidler også kan øge risikoen for høreskade ved udsættelse for støj, er der grund til at være opmærksom på denne fare. Et ikke uvæsentligt problem i denne sammenhæng er muligheden for en øget risiko for høreskade ikke blot ved samtidig udsættelse for opløsningsmidler og støj, men også hvor udsættelse for opløsningsmidler efterfølges af udsættelse for støj. Dette kan betyde, at udsættelse for høje lydtryk i et længere tidsrum efter arbejdstids ophør kan medføre en forøget risiko for høreskade, eksempelvis under diskoteksbesøg, koncerter, etc.

## Blod-hjerne barrieren

Nervesystemet og i særdeleshed centralnervesystemet er af overordentlig stor betydning for organismens overlevelse. Dette kan bl.a. udledes af, hvorledes det er beskyttet mod fysisk overlast af skelettets knogler, kraniet og ryghvirvlerne (fig. 6.1).

En række forhold ved nervesystemets struktur og funktion adskiller det fra andre organer og gør det særligt sårbart over for kemiske påvirkninger:

- ◆ Visse områder af nervesystemet mangler blod-hjerne barrieren og er direkte eksponeret for stoffer i blodet, og nogle stoffer krydser let blod-hjerne barrieren.
- ◆ Nervecellernes særlige struktur med lange udløbere og dermed stor overflade gør dem særligt sårbare for kemiske påvirkninger.
- ◆ Nervesystemets funktion er afhængig af en hårfin elektrokemisk balance, som utallige steder og på mange måder kan forstyrres af toksiske stoffer.
- ◆ Selv små forandringer i en nervebanes struktur eller funktion kan have store adfærdsmæssige konsekvenser.
- ◆ Normalt kan døde nerveceller ikke regenereres, så skader, der fører til celledød, er permanente.
- ◆ Et fremadskridende tab af nerveceller og funktionskapacitet finder sted i livets anden halvdel. Skader kan derfor forværres med alderen.

I toksikologisk sammenhæng er der en anden beskyttende struktur, som har større betydning. Det er blod-hjerne barrieren. Det er en tæt hinde af celler mellem blodet og nervesystemets celler. Tætheden fremkommer, ved at cellerne, der udgør barrieren, er sammenhæftet med nogle særlige strukturer, "tight junctions", der afskærmer intercellulærrummet, således at de stoffer, der føres med blodet, ikke umiddelbart kan nå nervecellerne.

Blod-hjerne barrieren er især effektiv over for større vandopløselige og ioniserede molekyler, mens lipofile stoffer, som fx organiske opløsningsmidler, relativt let trænger gennem barrieren.

Blod-hjerne barrieren er ikke lige tæt overalt, og hos børn er den flere steder endnu ikke fuldt udviklet. Det er forhold, som kan have betydning for et stofs transport fra blodet til nervesystemet og dermed for dets neurotoksicitet. Det gælder for bly, der er mere toksisk hos børn end hos voksne, fordi det kan trænge gennem den ufuldkomne barriere.

## Neurotoksicitet

Et stof betegnes neurotoksisk, når det kan fremkalde skadelige forandringer i et individs nervesystem eller sanseorganer. Forandringerne kan finde sted forskellige steder i nervesystemet, fx skader n-hexan primært de perifere neuroners udløbere, mens petidin derivatet 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) skader de dopaminproducerende celler i *substantia nigra*. Der kan være tale om såvel strukturelle (makroskopiske eller mikroskopiske) som om funktionelle (adfærdsmæssige og psykologiske) forandringer. Der findes mange forskellige neurotoksiske stoffer. Naturligt forekommende toksiner - neurotoksiner - produceret af planter eller dyr, fx psilosybin fra nøgenhat, eller Tetrodotoksin (TTX) fra kuglefisk, udgør en stor gruppe af stoffer, der især anvendes i laboratorier, som værktøjer til belysning af fysiologiske og biokemiske funktioner. Stoffer, der er produceret af mennesker med det formål at være neurotoksiske (pesticider og nervegasser) eller at have en tilsigtet effekt på nervesystemet (psykofarmaka), udgør ligeledes en betydelig del af de neurotoksiske stoffer. Desuden findes en række kemikalier til forskellige formål, som desværre også er neurotoksiske, fx carbondisulfid, n-hexan og toluen. Der er stor forskel på de enkelte stoffers potens og dosis-effekt relationer. Ofte er neurotoksiner dødelige i meget små mængder, fx er TTX fra den japanske kug-



Tabel 6.3. Hovedgrupper af neurotoksiske stoffer.

Gruppe	Karakteristika	Eksempler
Neurotoksiner	Naturligt forekommende stoffer fra planter og dyr	Tetrodotoksin, saxitoksin, $\beta$ -bungarotoksin
Neurofarmaka	Stoffer fremstillet til medicinsk brug	Benzodiazepin, methotrexat
Pesticider	Stoffer fremstillet til skadedyrsbekæmpelse	Organofosfater, organochlorider, pyrethroider
Industrikemikalier	Stoffer anvendt i industriproduktionen	Carbondisulfid, n-hexan, acrylamid, styren
Metaller	Naturligt forekommende mineraler og metaller	Mangan, thallium, bly, kviksølv
Krigsgasser	Stoffer fremstillet til krigsbrug	Tabun, sarin, soman

Tabel 6.4. Neurologiske og adfærdsmæssige effekter af eksponering for neurotoksiske stoffer. (Modificeret fra W.K. Anger, 1986).

<b>Generelle effekter</b>
Appetittab, hovedpine, depression, svimmelhed, tørst
<b>Sensoriske effekter</b>
Forringet farvesyn, natteblindhed, nedsat lugt og lydfølsomhed, susen for ørerne, tinnitus, ligevægtsforstyrrelser, svimmelhed, smerter, føleforstyrrelser, prikkende følelser i huden, lammelser, kuldsår
<b>Motoriske effekter</b>
Kramper, svækkelse, pareser, rystelser, trækninger, tab af koordination, refleksabnormaliteter
<b>Kognitive effekter</b>
Koncentrationsbesvær, træthed, hukommelsesproblemer, forvirring, indlærings- og talebesvær, mental svækkelse, manglende initiativ, delirium, hallucinationer
<b>Effekter på sindsstemning og personlighed</b>
Søvnforstyrrelser, pirrelighed, depression, ængstelse, øget irritabilitet, delirium, hallucinationer, rastløshed, nervøsitet, nedsat libido, anspændthed

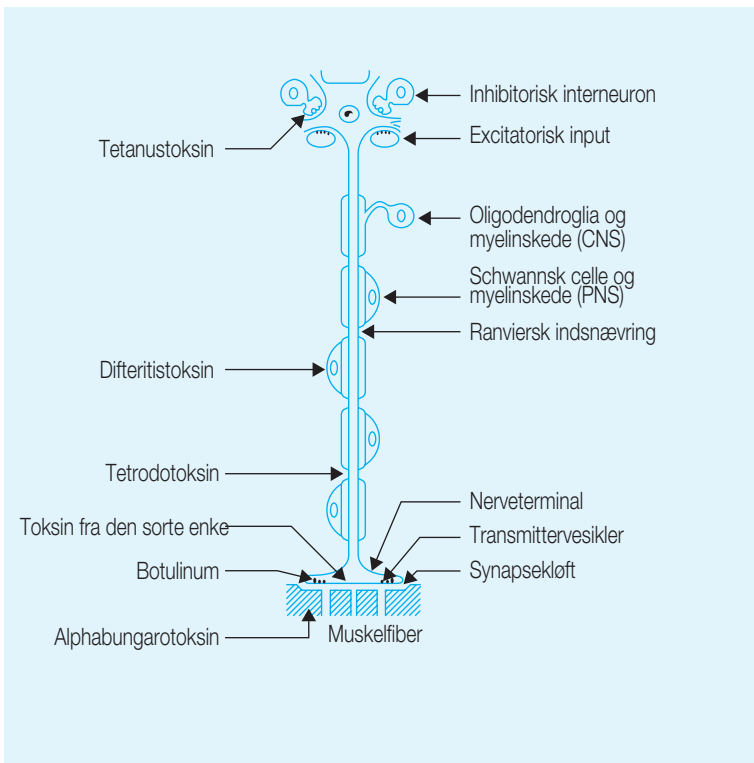
lefisk dødeligt i doser på 0,001 mg/kg. Derimod måles letal dosis for fx ethanol i promille (3-5 g/kg). Nogle stoffer er nødvendige i meget lave koncentrationer som essentielle mineraler, men er toksiske i højere koncentrationer, fx zink og vitamin A. Mange toksiske stoffer har desuden flere virkesteder, og nervesystemet er ikke altid det primære organ, dvs det organ der skades ved de laveste koncentrationer af stoffet.

## Mekanismer for neurotoksicitet

Neurotoksiske stoffer kan fremkalde et bredt spektrum af neurologiske symptomer, tabel 6.4. Selvom det kliniske billede i forbindelse med forgiftningerne i mange tilfælde er velbeskrevet, er det sjældent, at de bagvedliggende cellulære mekanismer er kendt. Nogle neurotoksiske stoffer påvirker specifikke hjerneområder, celletyper eller cellefunktioner. Andre stoffer har antagelig en mere generel og uspecifik effekt på nervesystemet.

Blandt de naturligt forekommende toksiner, som er resultatet af en langvarig naturlig selektion, findes nogle af de mest potente neurotoksiner og nogle af de bedst belyste eksempler på specifikt virkende neurotoksiske stoffer. Tetrodotoksin (TTX) virker ved en specifik binding til de potentialfølsomme natriumkanaler i de Ranvierske indsnøringer, og herved blokeres nerveimpulsledningen i aksonet.

Andre naturlige toksiner har lignende specifikke virkesteder (se fig. 6.10). Det er karakteristisk for disse stoffer, at de virker i meget lave koncentrationer fra nanomolær til mikromolær, og at de reagerer specifikt med vitale strukturer i nervecellerne såsom



Figur 6.10. Receptormedieret toksicitet. Fordeling af receptorer og virkesteder på neuronet for forskellige neurotoksiske stoffer.

Tabel 6.5. Eksempler på neurotoksiske mekanismer.

Stof	Virkested	Mekanisme
Tetrodotoksin	De Ranvierske indsnøringer	Blokering af Na <sup>+</sup> -kanalerne
Organophosphat	Neuro-muskulære synapser	Hæmning af acetylcholinesterasen
Pyrethroider	Aksonet (nerveudløberne)	Blokering af Na <sup>+</sup> -kanalerne
Hexan	De perifere nerveudløbere	Blokering af den aksonale transport
Toluen	Det indre øre	Beskadigelse af de lydfølsomme hårceller
Carbonmonoxid	De røde blodlegemer	Blokerer ilttransporten
Cyanid	Mitochondrierne	Blokerer respirationskædens enzymer
Bly, metallisk og organisk	Nervecellemembranen og mitokondrier	Påvirker ionbalancer og enzymaktiviteter

receptorer, enzymer eller ionkanaler. I den anden ende af spektret findes stoffer, der virker generelt og mere eller mindre uspecifikt, fx lipofile stoffer (organiske opløsningsmidler), som bl.a. influerer med lipofile dele i nervecellen og dermed giver et bredt generelt symptombillede. Disse stoffer virker narkotisk i mM koncentrationer, mens de ved lavere koncentrationer bl.a. fremkalder hovedpine, svimmelhed og hukommelsesforstyrrelse.

### Receptor-medieret toksicitet

Receptor-medieret toksicitet er bedst kendt fra naturligt forekommende toksiner, men en række pesticider og neurofarmaka virker ligeledes via specifikke receptorer på det enkelte neuron, fig. 6.10. De acetylcholinesterase-hæmmende organophosphater virker gennem en specifik hæmning af enzymet acetylcholinesterase, og herved ophobes neurotransmitteren acetylcholin i synapsekløften med overstimulation, kramper og åndedrætslamelser til følge.

### Det aksonale transportsystem

Det aksonale transportsystem beskrevet tidligere er særlig sårbart for en række industrikemikalier. Tabel 6.6 viser stoffer, som på forskellig vis skader det aksonale transportsystem. Svigter transportsystemet, bevirker det ofte, at nerveudløberene degenererer. Herved opstår først følelseløshed i hænder og fødder samt i alvorligere tilfælde svigtende motorik.

Stof	Symptomer
n-Hexan	Symmetrisk sensorisk og distal motorneuropati
Methyl n-butylketon	Symmetrisk sensorisk og distal motorneuropati
Acrylamid	Tab af følelsen i fingrene fulgt af svækkelse i benene
Carbondisulfid	Perifer motorisk og sensorisk neuropati med nedsat nerveledningshastighed
Tri-o-cresyl fosphat	Central-perifer distal neuropati, degeneration af motorneuroner

Tabel 6.6. Stoffer, der lammer det aksonale transport-system.

## Energistofskifte og mitokondrier

Alle nerveceller opretholder konstant et membranpotentiale på ca -90 mV. Dette er meget energiforbrugende, og det betyder, at selv kortvarige afbrydelser af energitilførslen til nervesystemet kan få uoprettelige konsekvenser. Stoffer, der blokerer ilttilførslen eller respirationskæden i mitokondrierne vil således - indirekte- være neurotoksiske.

Stof	Virkemekanisme
Carbonmonoxid	Blokerer blodets ilttransport
Cyanid	Blokerer respirationskædens enzymer
Pikrinsyre	Afkobler respirationskædens produktion af ATP
MPTP <sup>1)</sup>	Blokerer respirationskædens enzymer
Methylkviksølv	Skader mitokondrier og forstyrrer glycolysen

Tabel 6.7. Stoffer, der blokerer forskellige trin i energistofskiftet.

1) 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

## Lipofile strukturer

Nervecellens funktion er betinget af et samspil mellem lipid-membranerne og de deri indlejrede proteinmolekyler. Disse strukturer varetager en række funktioner som receptorer, enzymer, ionpumper og ionkanaler. Den narkotiske effekt af lipofile stoffer, organiske opløsningsmidler og narkotiske gasser skyldes deres mere eller mindre uspecifikke binding til lipofile steder på nervecellemembranen, enten i selve membranen eller i lipofile områder af de indlejrede proteinmolekyler, fig. 6.11. Denne antagelse er underbygget af sammenhænge mellem dosis-effekt og lipofilitet, udtrykt som logaritmen til octanol-vand fordelingskoefficienten ( $\log P_{o,w}$ ), for en række organiske opløsningsmidler, tabel 6.8. Sammenhængen er imidlertid ikke lineær, men snarere parabolisk. Dette skyldes antagelig fordelingsmæssige forhold.

Tabel 6.8. Sammenhængen mellem effekt-dosis og lipofilitet, udtrykt som  $\log P_{o,w}$  for en række organiske opløsningsmidler. (Fra R. Jeppson 1975).

Stof	$\log P$	AD100 <sup>1)</sup> (mmol/kg)	LD <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (mmol/kg)
Ethylether	0,77	10,90	13,5
Propylether	2,03	2,02	2,0
Pentylether	4,03	1,98	1,0
Heptylether	6,03	7,40	2,2
Octylether	7,03	15,40	4,9

1) Anæstetisk dosis; 2) Toksisk dosis. Efter intravenøs indgift hos 60 mus for hvert stof.

## Kriterier for neurotoksicitet

Neurotoksicitet viser sig med stigende dosis ofte som tiltagende symptomer og effekter, der afhænger af stoffets natur, af dosis, af varighed af eksponeringen samt af den eksponeredes individuelle følsomhed. Symptomernes og effekternes alvor og den betydning, de tillægges i forbindelse med risikovurderinger, øges med stigende niveau fra 1 til 6 i tabel 6.9. Kortvarig eller lavdosis-eksponering for et neurotoksisk stof kan resultere i subjektive symptomer såsom hovedpine og svimmelhed, men effekten er sædvanligvis reversibel. Med stigende dosis kan det samme stof fremkalde neurologiske forandringer og evt irreversible morfologiske forandringer.

Tabel 6.9. Forskellige tegn på neurotoksicitet. Rækkefølgen på listen repræsenterer aftagende styrke i forbindelse med vurdering af neurotoksicitet. (Fra Simonsen et al., 1994).

Niveau	Effekt	Eksempler
6	Morfologiske forandringer	Morfologiske forandringer inkluderer celledød og aksonhenfald såvel som subcellulære morfologiske forandringer.
5	Neurologiske forandringer	Neurologiske forandringer omfatter abnormale fund under neurologiske undersøgelser på enkeltindivider.
4	Fysiologiske/-adfærdsmæssige forandringer	Fysiologiske/adfærdsmæssige forandringer indbefatter eksperimentelle fund hos dyr og mennesker såsom ændringer i EEG, eller ændringer i psykologiske og adfærdsmæssige tests.
3	Biokemiske forandringer	Biokemiske forandringer er ændringer i relevante biokemiske parametre (fx transmitterniveauer), og GFA-protein <sup>1)</sup> mængden.
2	Irreversible, subjektive symptomer	Subjektive symptomer uden tegn på abnormiteter i neurologiske, psykologiske eller andre kliniske undersøgelser.
1	Reversible, subjektive symptomer	Subjektive symptomer uden tegn på abnormiteter i neurologiske, psykologiske eller andre kliniske undersøgelser.

1) GFA-protein er en markør for gliacellød eller enzymaktivitet

Hvor store forandringer der skal til, for at man kan tale om neurotoksicitet, er et kontroversielt emne og er altid i sidste ende resultatet af en subjektiv vurdering. En nordisk ekspertgruppe har fremsat følgende forslag til definition:

Neurotoksicitet er evnen til at fremkalde skadelige forandringer i nervesystemets struktur og funktion. Et kemisk stof betragtes som neurotoksisk, hvis det er i stand til at fremkalde blivende, konsistente, funktionelle eller strukturelle forandringer i nervesystemet og sansorganer, hvilket er opfyldt, hvis der er vel-dokumenterede effekter på niveau (3), 4, 5 eller 6 i tabel 6.9.

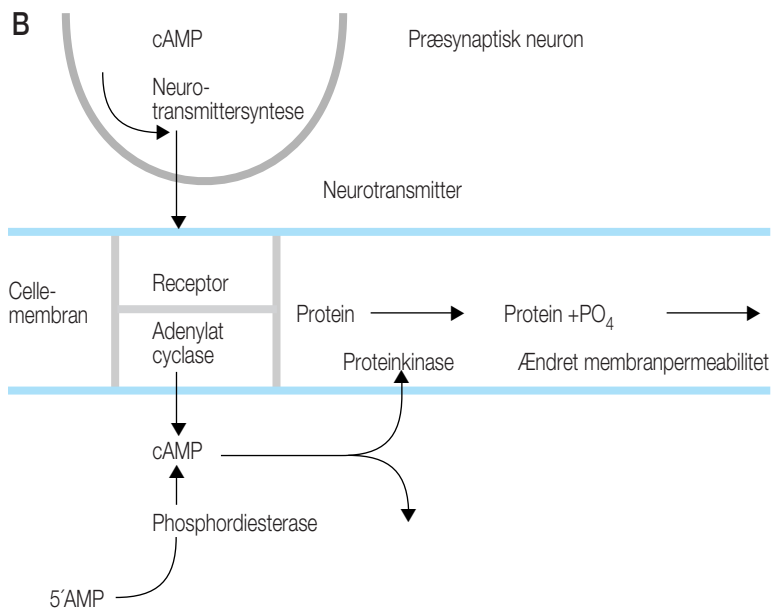
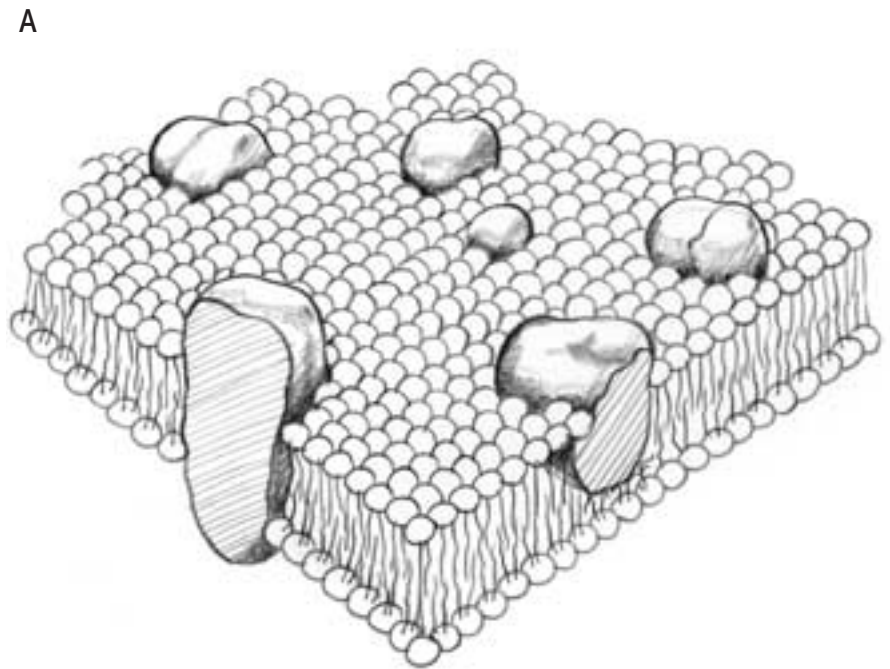
Disse niveauer repræsenterer den betydning, de forskellige tegn på neurotoksicitet kan tillægges.

## Påvisning af neurotoksicitet

Neurotoksiske stoffer kan have mange eller få virkesteder. Der kan være tale om generelle uspecifikke effekter på lipofile områder i hele nervesystemet, som tilfældet er med hovedparten af de organiske opløsningsmidler. Eller stofferne kan virke på særlige receptorer eller andre afgrænsede strukturer i nervecellerne (fig. 6.10 og 6.11). Effekterne kan også være knyttet til specielle områder i nervesystemet, fx virker n-hexan og acrylamid overvejende på de perifere neuroner, mens en række opløsningsmidler primært er ototoksiske, og stoffet MPTP skader de dopaminerge celler i substantia nigra hos primater, men ikke i nær så udpræget grad hos gnavere. Det er derfor vigtigt, at det overvejes grundigt, hvilke testmetoder der skal anvendes, når et stofs neurotoksicitet skal belyses.

Den teststrategi, der anvendes til påvisning af effekten af neurotoksiske stoffer, skal således være afstemt efter situationen. Til en første screening for effekt kræves helt andre egenskaber af de anvendte testmetoder, end hvis der ønskes en nøjere belysning af bagvedliggende mekanismer. I forslag til OECD-guidelines for neurotoksicitets-tests foreslås en trinvis teststrategi, hvor første trin omfatter et bredt sensitivt testbatteri baseret på adfærdstests: "Functional Observation Battery" (FOB). Det er antagelsen bag denne strategi, at hvis et stof er neurotoksisk, vil det, givet til forsøgsdyr i betydelige doser over kort tid, afspejle sig på en eller anden måde i dyrets adfærd, fordi denne er resultatet af den samlede aktivitet i nervesystemet. Hvis adfærdstesten er

Figur 6.11. Membranbundne enzymer. (A) Model af en neuronmembran med indlejrede proteiner, der kan have forskellige funktioner, fx ionpumper, potentialfølsomme ionkanaler, samt enzymer for cellulære processer. (B) Skitse over nogle af de membranrelaterede biokemiske processer, der påvirkes af toluen og andre organiske opløsningsmidler. En ubalance i disse processer vil kunne forklare en del af de symptomer, der er set hos personer med 'malersyndromet'.



positiv, foretages yderligere tests ved gentagne eksponeringer med metoder, der skønnes relevante på baggrund af de foreliggende data. Dette er nødvendigt, fordi der kan være tale om et falsk positivt udslag som følge af effekter på andre organer. Desuden er der mange gange behov for en nøjere beskrivelse af de effekter, stoffet fremkalder, end den, der kan opnås ved FOB eller tilsvarende brede tests.

## Metoder og fremgangsmåder

Metoder til påvisning af toksiske effekter på nervesystemet kan inddeles efter de strukturer og funktioner i nervesystemet, de søger at belyse. Man får således fire hovedtyper af metoder:

- ◆ metoder baseret på analyse af nervesystemets struktur (neuropatologiske metoder)
- ◆ metoder baseret på måling af nervesystemets elektriske aktivitet (neurofysiologiske metoder)
- ◆ metoder baseret på analyse af kemiske processer i nervesystemet (neurokemiske metoder)
- ◆ metoder baseret på analyse af nervesystemets "output", adfærds-tests og psykologiske tests.

Og endelig den kliniske undersøgelse, som omfatter:

- ◆ neurologiske undersøgelser
- ◆ afbildning af CNS gennem bl.a. MR-, SPECT- eller PET-scanning
- ◆ psykometriske tests
- ◆ electrodiagnostik.

Disse metoder finder i varierende grad anvendelse i forskellige typer forsøg:

- ◆ Undersøgelser, hvori mennesker indgår, omfatter overvejende epidemiologiske studier, hvor grupper med forskellig eksponeringshistorie sammenlignes, samt cases, hvor uheld og lignende beskrives og registreres. I begge tilfælde kan en række af undersøgelsesmetoder tages i anvendelse, der kan fx være tale om MR- eller PET-scanning af hjernen, forskellige neurofysiologiske undersøgelser samt psykologiske tests.
- ◆ Forsøg med dyr omfattende adfærdsstudier, biokemiske analyser, fysiologiske målinger og patologiske eller morfologiske undersøgelser på dyr, der er eksponeret eksperimentelt for et givet stof.



- ◆ In vitro forsøg baseret på brugen af cellekulturer eller isolerede fraktioner af celler.

Inden for hvert hovedområde af metoder findes utallige specialiserede og forfinede teknikker, som det her fører for vidt at komme ind på i detaljer. Nedenstående oversigt er derfor ikke dækkende, men er et forsøg på at give et indtryk af de utallige metoder og avancerede teknikker, der i dag er til rådighed, når nervesystemets struktur og funktion skal undersøges.

## Neuropatologiske metoder

Neuropatologi er en disciplin, hvor celler og væv undersøges vha optiske instrumenter (mikroskoper) for at beskrive læsioner og forandringer. For at øge den optiske kvalitet anvendes en række forskellige farveteknikker. Det anvendte farvestof binder sig til eller reagerer med bestemte cellekomponenter, så disse bedre kan skelnes.

Kombinationsmulighederne af instrumentering og farveteknikker inden for neuropatologien er utallige. Her nævnes blot nogle få klassiske eksempler. Undersøgelse af større hjerneområder og nervebaner inddrager især metoder, der farver nucleinsyre med Nissel farvning eller hæmatoxylin-farve. Desuden anvendes sølvfarvning af aksoner og i stigende omfang tracerteknikker og immunokemiske metoder til farvning af specielle cellepopulationer. Morfologiske skader på enkeltneuroner kan også påvises med en række forskellige farveteknikker, bl.a. Golgi metoden, der fremhæver nervecellernes dendritter. Intracellulær injektion af tracere (radioaktive stoffer) åbner mulighed for farvning af udvalgte enkeltneuroners forgreninger. Endelig kan anvendelse af immunokemiske metoder give detaljer om neuroner, som besidder specifikke antigener.

## Neurofysiologiske metoder

Der findes i denne kategori en række metoder og teknikker, der er baseret på en registrering og analyse af de elektriske signaler, nervesystemet genererer. Fælles for disse er, at man vha særlige elektroder registrerer de strømme og potentialer, der er knyttet til aktivitet i nervesystemet. Registreringen kan foretages fra det intakte nervesystem med store overfladeelektroder og vil så omfatte den samlede aktivitet fra mange nerveceller (elektroencephalografi (EEG) og evoked potentials (EVP)), eller med nålelektroder, der registrerer den elektriske aktivitet i et mere

afgrænset område. Aktiviteten fra enkeltceller i vævssnit eller celtekulturer kan registreres med mikroelektroder (Patch-clamp). De registrerede signaler forstærkes, filtreres, lagres og analyseres vha digital teknik. En direkte undersøgelse af nervesystemets funktion er mulig ved anvendelse af forskellige elektrofysiologiske teknikker.

### *Elektroencephalografi og Evoked Potentials*

Elektroencephalografi (EEG) består af en registrering af den elektriske aktivitet fra hjernen med elektroder anbragt på kraniet. Signalerne, der registreres, er en kompliceret sum fra de mange celler, der ligger tættest ved elektroden, idet signalerne fra aktive nerveceller forplanter sig i den omgivende væske og falder i styrke med afstanden. Det samlede signal, der registreres af elektroden, kan være ganske svagt, uden udsving, hvis de nærliggende neuroner er passive, eller aktive uden synkroni. Hvis neuronerne udsender synkrone signaler, fås store udsving. Dette forhold udnyttes i registreringen af 'evoked potentials' (EVP), hvor man frembringer synkrone signaler i CNS ved at stimulere forskellige perifere nervebaner. Man kan fx stimulere med lyd, lys eller elektrisk strøm ('auditiv-', 'flash-' eller 'pattern reversed-' og 'somatosensoric-evoked potentials'). Registreres signalerne fra lydstimulering med en elektrode på nakken, fås hjernestammeaudiometri, hvor de elektriske signaler i øret og hørenerven registreres (se fig. 6.12). Ved at anvende en kontaktlinseelektrode på øjet er det muligt at registrere nethindens respons på lys, elektroretinografi (ERG).

Måling af sensorisk stimulerede potentialer er metoder, der de seneste år har vundet stor udbredelse inden for toksikologien. Hermed åbnes mulighed for at analysere større funktionelle enheder i nervesystemet og at følge forandringer over tid, idet målingerne kan foretages uden invasive indgreb. Måling af fx visuelt stimulerede potentialer foretages, ved at den elektriske aktivitet, der opstår i den visuelle cortex som følge af visuel stimulation, registreres med overfladeelektroder. Stimuleringen kan foretages med passende visuelle stimuli, fx lysglimt eller skiftende geometriske mønstre på en tv-skærm. Frekvensen af stimuleringen synkroniseres med registreringen, og for at mindske den elektriske støj midles et passende antal registreringer.

### *Patch-clamp*

Brugen af glasmikropipetter til registrering af enkeltcellers elektriske aktivitet har de seneste 50 år givet mange informationer om nervesystemets funktion. Mikroelektroder er i princippet små glasmikropipetter med spidsdiametre på under 0,1  $\mu\text{m}$ , fyldt med koncentreret KCl, der via en sølv-sølvchlorid elektrode står

i forbindelse med en DC-forstærker. Anbragt i en mikromanipulator er det muligt at føre en sådan mikroelektrode ind gennem nervecellemembranen i en lang række nervepræparater, fx udpræparerede sneglehjerner, skiver af rottehjerner som holdes i live i fysiologisk saltvand, eller nervecellekulturer. Med udviklingen af den elegante Patch-clamp teknik er det desuden blevet muligt at måle den ionstrøm, der løber igennem spændingsfølsomme og transmitterstyrede kanaler i cellemembranen. Dette har givet farmakologer og toksikologer en helt enestående mulighed for at studere neuroaktive stoffers effekt på de enkelte ionkanaler.

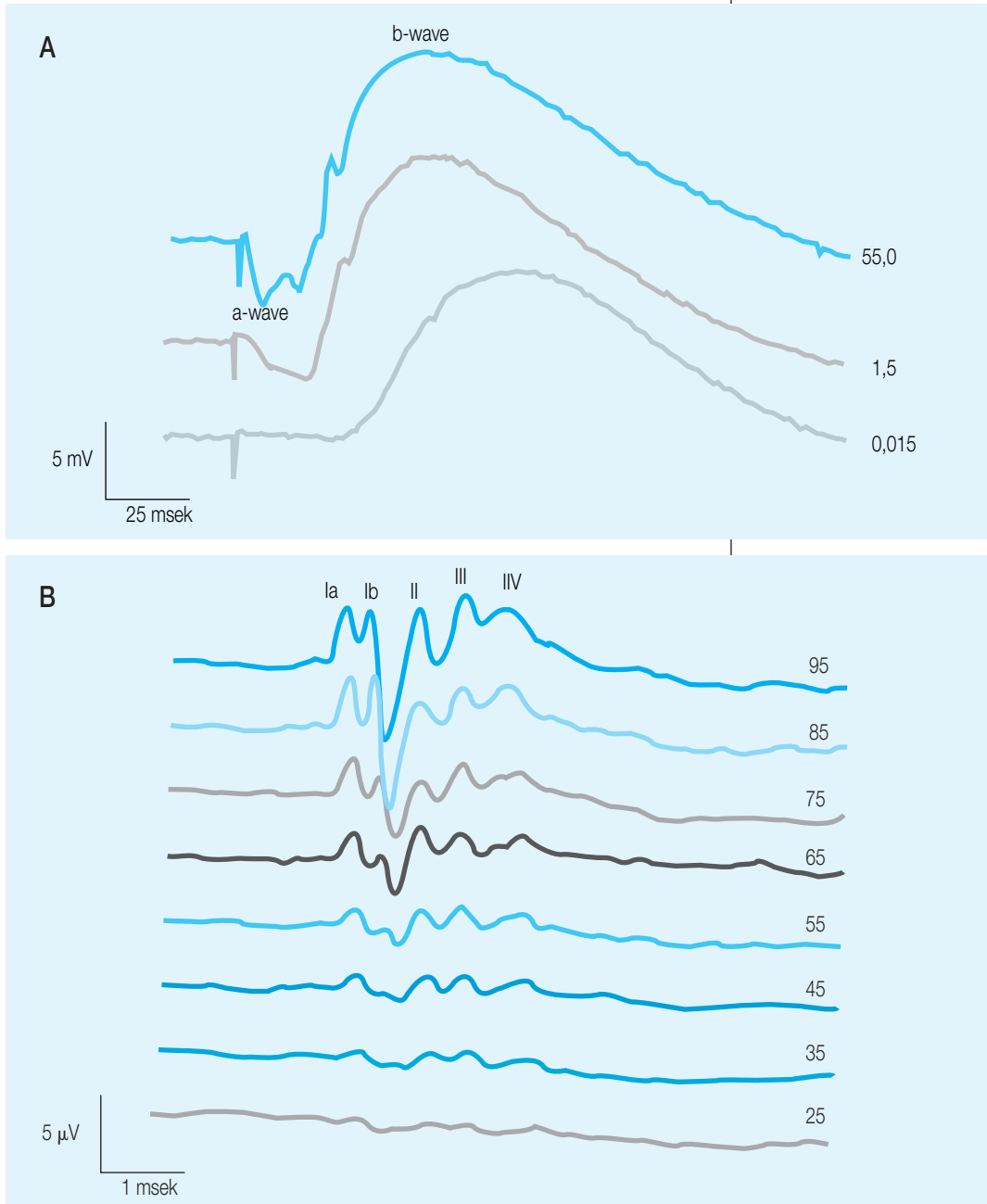
### Neurokemiske metoder og biomolekylære metoder

Der findes i dag utallige biokemiske analysemetoder, som kan give værdifulde oplysninger om nervesystemets funktion, om toksiske skader og om de bagvedliggende mekanismer. Ud over de generelle biokemiske metoder til bestemmelse af cellulær toksicitet er der udviklet en række specifikke neurokemiske metoder, hvoraf nogle få, for at illustrere principperne, skal nævnes her. Analyse af mængden af neurotransmittere i nervevæv kan udføres med HPLC på udvalgte hjerneafsnit, som efter homogenisering er oprenset ved centrifugering og filtrering. Sådanne analyser kan give oplysninger om ændringer i neurotransmitter-niveauet i forskellige hjerneområder. Neuroreceptorer kan bestemmes med analyser baseret på, at en kendt specifik radioaktivt mærket ligand bindes til receptoren. Bestemmelse af "Glial fibrillary acid protein" (GFAP) med immunokemiske metoder (ELISA) anvendes rutinemæssigt som markør for neurotoksin-induceret celledød.

### Adfærdsbaserede metoder

Funktionelle eller strukturelle skader i nervesystemet manifesterer sig ofte som synlige symptomer. Disse kan påvises med forskellige metoder. I forbindelse med dyreforsøg taler man om adfærdstest. Hos mennesker kortlægges skader i nervesystemet ved en neurologisk undersøgelse.

Adfærdsmetoder spænder fra iagttagelse af dyret i dets bur til sofistikerede indlærings- og hukommelsesforsøg i forskellige labyrinter. 'Functional Observational Battery' (FOB) er betegnelsen for et sæt simple iagttagelser og adfærdstests, der anbefales som en første sensitiv screening for neurotoksicitet. FOB omfatter: beskrivelse af dyrets generelle fremtoning, iagttagelse af



Figur 6.12. Elektrofysiologiske målinger. (A) Elektoretinogram (ERG) målt med kontaktlinseelektrode på rotte. Tallene ved hver kurve angiver flash-intensiteten i  $\text{cds/m}^2$ . (B) Lydstimuleret hjernerrespons, Auditory brain response (ABR), målt på en rotte. Signalet er frembragt med en kortvarig tone på 16 kHz af varierende styrke, fra 25-95 dB. Høretærsklen, den laveste lydstyrke der giver genkendelige signaler, er her 25 dB.

autonome tegn, reaktion, koordination, muskeltonus og aktivitetsniveau. Det amerikanske miljø-agentur U.S. EPA har i 1985 udarbejdet retningslinier for udførelsen af FOB samt en automatisk registrering af aktivitet. En anden adfærds-baseret metode, som åbner mulighed for undersøgelse af forskellige former for indlæring og hukommelse, er Morris Water Maze. I denne test skal rotter svømmende i et rundt bassin finde en lille platform, hvis overflade netop er under vand og dermed usynlig for rotten. Man kan bl.a. undersøge, hvor hurtigt dyret lærer at finde platformen, hvor godt det kan orientere sig i rummet mv. Dyrets svømmerute og svømmetid kan måles med video og computerteknik.

## Klinisk neurotoksikologi

Ofte er kemiske stoffers neurotoksicitet blevet beskrevet første gang i klinikken, hvor en undersøgelse af symptomer sammenholdt med oplysninger om eksponering i forbindelse med arbejdet, fritidsinteresser eller spisevaner i mange tilfælde har afsløret sammenhænge mellem eksponering for stoffer og symptomer fra nervesystemet.

Det første skridt i afdækning af sådanne sammenhænge er den neurologiske undersøgelse. Denne vil ofte blive suppleret med specifikke elektrofysiologiske og neuropsykologiske tests samt forskellige former for billedmæssig scanning, for at nå frem til en sikker diagnose. Oplysningerne fra disse undersøgelser sammenholdes med biologiske markører og eksponeringsdata for at se, om der er tale om en reel sammenhæng mellem eksponering og symptomer.

### *Neurologisk undersøgelse*

Den neurologiske undersøgelse er en systematisk undersøgelse af personens evne til at kommunikere, opfatte, følge anvisninger, løse problemer, udføre bevægelser og opfatte forskellige sanserindtryk. Symptombeskrivelsen er det centrale i den neurologiske undersøgelse. Derudover testes senerereflekser, kræfter, følesans og kontrol af de finere bevægelser samt balancefunktionen. Afvigelser fra kendte normale værdier betragtes som neurologiske symptomer. Svækkelser i de undersøgte funktioner stammer ofte fra skader på celler i nervesystemet; årsagen til disse skader kan være erhvervmæssig eksponering for neurotoksiske stoffer, men kan også skyldes neurologiske sygdomme. Det er derfor vigtigt, at undersøgelsen omfatter en afdækning af mulige årsager til symptomerne. Hovedpine kan fx skyldes eksponering for kulilte, bly eller zink, men årsagen kan også være muskelspæn-

dinge, eller en tumor i hjernen. For at afklare sådanne tvivls- spørgsmål kan supplerende undersøgelser ofte være påkrævet (se følgende afsnit).

Når undersøgelsen er afsluttet, gives en samlet konklusion af, om der er sket en skade på hjernen, og i bekræftende fald, hvad denne skade kan skyldes. Herefter må det besluttes, om det er forsvarligt, at den pågældende fortsætter med det nuværende arbejde eller må skifte job til giftfrit arbejde, eller om den pågældende evt skal førtidspensioneres. Hvis man er i tvivl om undersøgelsesresultaterne, bør disse gentages efter ca et år.

### *Elektrodiagnostik*

Elektrodiagnostik omfatter måling af nerveledningshastigheder for såvel motoriske som sensoriske nerver, samt måling af de innerverede musklers respons. Sådanne målinger kan give oplysning om omfang, udbredelse og arten af de neuropatier, som ofte ses ved toksiske påvirkninger, men som også kan skyldes andre årsager, fx diabetes. Ved brug af nåleelektroder er det desuden muligt mere detaljeret at analysere forløbet af denervation i fx muskler.

Elektroencefalografiske undersøgelser (EEG) kan bruges til at afsløre, om hjernens spontane elektriske impulser er unormale, som det fx er tilfældet ved epilepsi eller demens.

Analyse af sensorisk stimulerede potentialer kan også anvendes i forbindelse med en udvidet neurologisk undersøgelse. Der er tale om de samme teknikker som ved målinger på forsøgsdyr: 'auditiv-', 'flash-' eller 'pattern reversed-' samt 'somatosensory-evoked potentials'. Undersøgelserne giver oplysninger om de forskellige sansesbaners funktionstilstand.

### *Afbildning af nervesystemet*

Neurologen har i dag en række muligheder, når der er behov for afbildning af hjernens udseende og funktion. Røntgenundersøgelse af hjernen med CT-skanning eller undersøgelser med magnetisk resonans-afbildning (MRI) giver informationer om hjernens morfologi og kan afsløre blodpropper, blødninger i hjernen, skrumpning af denne eller eventuelle misdannelser.

Oplysninger om hjernens funktion kan delvis opnås ved undersøgelse af hjernens blodgennemstrømning (ved SPECT-scanning). Denne undersøgelse giver oplysning om evt blokering for blodstrømmen til hjernen, men kan også sige noget om hjernens stofskifteprocesser. Dette skyldes, at hjernen selv regulerer, hvor meget blod der skal sluses ud til de enkelte hjerneafsnit alt efter behovet. Jo højere stofskiftet er, des mere blod sendes ind i de pågældende områder. Størrelsen af de enkelte hjerneafsnits blodgennemstrømning kan afbildes med farver, således at hvid,

rød eller gul repræsenterer høj gennemstrømning, mens grøn og blå viser, at gennemstrømningen er lav.

Positron emissions tomografi (PET-scanning) kan give værdifulde informationer om metabolismen og selve iltforbruget i de enkelte hjerneafsnit, der ligeledes kan afbildes efter en bestemt farveskala.

Disse metoder har vist sig værdifulde i forbindelse med diagnosticering af neurologiske sygdomme som fx sklerose, men erfaringen viser, at de ofte er utilstrækkelige til at påvise årsagen til neurotoksiske symptomer. Ofte ses ingen afvigelse fra normalen på trods af klager over forringet funktion fra patienten. PET-scanning bruges i øvrigt stadig overvejende til videnskabelige undersøgelser og ikke til rutineudredninger.

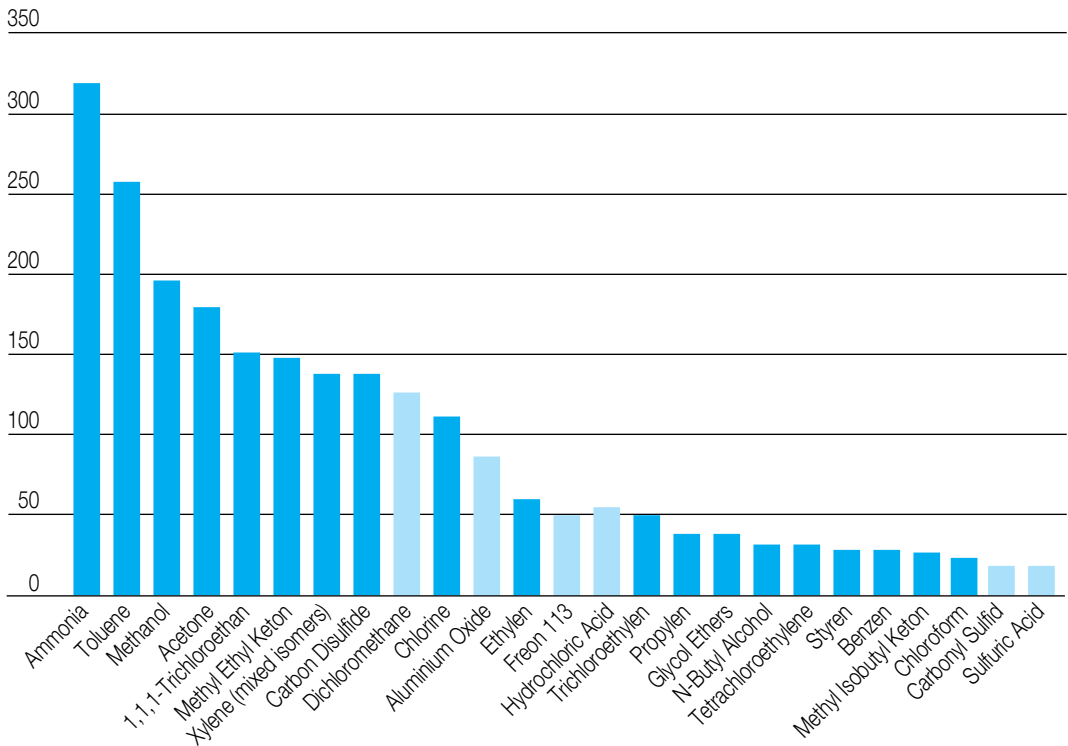
### *Neuropsykologisk undersøgelse*

Den mest almindelige undersøgelsesmetode til at afsløre noget om hjernens funktion, især intellektuelt og kognitivt, er den neuropsykologiske undersøgelse. Her testes en række forskellige mentale funktioner som hukommelse, indlæring, koncentrations-evne, abstraktion og billedopfattelse. I dag findes PC-baserede systemer, hvormed neuropsykologiske tests kan udføres og registreres. Hvis personen klarer sig dårligere end forventet ud fra den pågældendes skolegang, uddannelsesniveau og alder, taler man om en reduktion i funktionerne. Hvis flere forskellige hjernefunktioner er forringede, er der tale om en generel intellektuel reduktion. Denne reduktion gradueres i let, middelsvær og svær. Det springende punkt ved vurderingen er at fastlægge, hvad det forventede "normal"-niveau skulle være og dermed også, hvor meget funktionen er forringet i forhold hertil.

## Neurotoksiske stoffer i arbejdsmiljøet

Siden 1930'erne har verden oplevet en række tragiske uheld med neurotoksiske stoffer. I nogle tilfælde har disse uheld kostet hundreder af menneskeliv og invalideret endnu flere. Her kan nævnes: forekomst af tri-orto-cresyl phosphat i et alkoholisk bryg i USA i 30'erne; udledning af kviksølv i Minamata bugten i Japan i 50'erne, hvor de lokale beboere, som levede af fisk fra bugten, blev forgiftet; i 1971 anvendtes kviksølvbejdset korn til brød i Irak, mere end 5.000 blev alvorligt forgiftede, og 450 døde på hospital; et uidentificeret stof i spiseolie dræber 500 og skader 20.000 i Spanien i 1981. Langt den overvejende del af de stoffer, der udledes til miljøet i USA i dag, er neurotoksiske (fig. 6.13).

Kemikaliemængde  
(x 10<sup>6</sup> pounds)



I det danske Produktregister er der registreret ca. 35.000 stoffer, og hvert år kommer der nye til. Eftersom kun få af disse er testet for, om de kan skade nervesystemet, findes der ikke nogen præcise opgørelser over antallet af neurotoksiske stoffer, der anvendes på danske, eller for den sags skyld på andre arbejdspladser. Der er imidlertid foretaget en række estimater på grundlag af forskellige delmængder af industrikemikalier. Et estimat anslår, at fra 3-5% af alle industrikemikalier - undtaget pesticider - er neurotoksiske. Et andet estimat baseret på stoffer med en arbejdshygiejnisk grænseværdi når frem til, at 28% udviser neurotoksisk effekt. Der skulle således findes mellem 900 og 8.000 neurotoksiske stoffer på det danske arbejdsmarked.

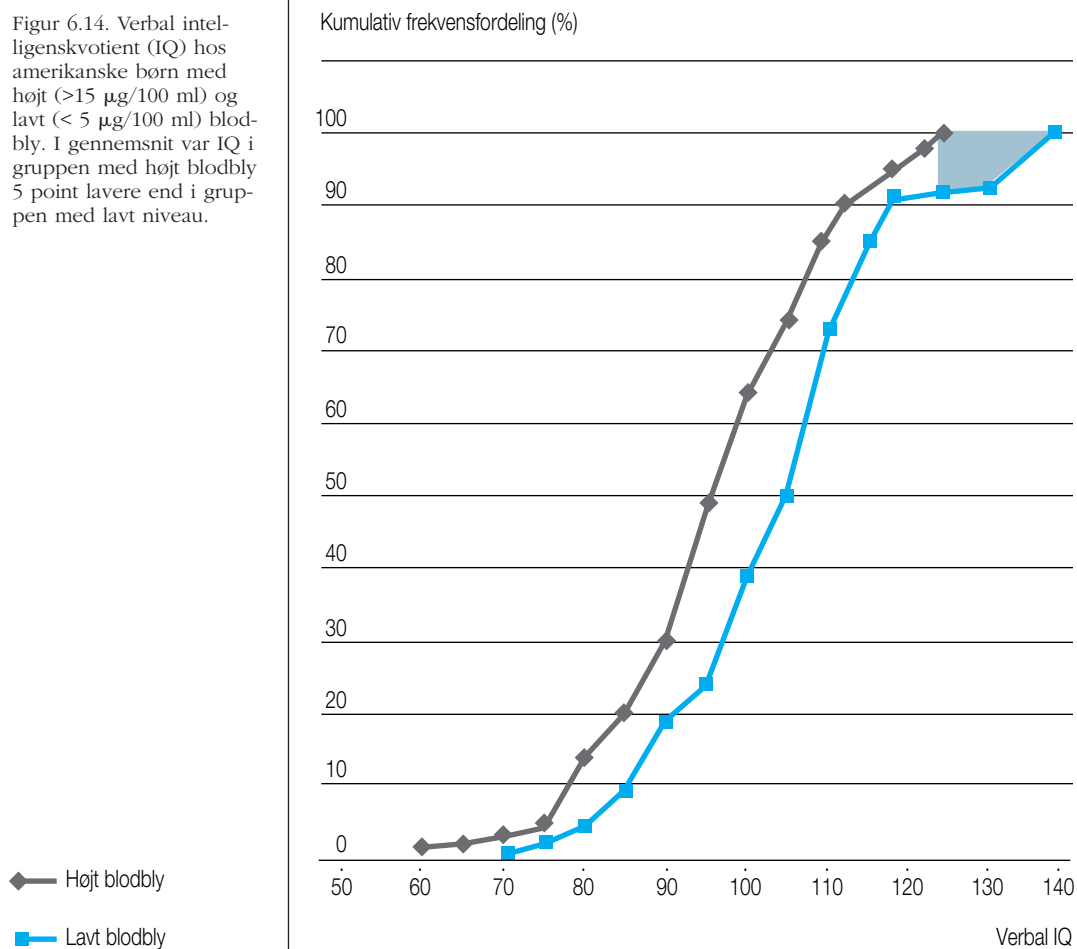
Konsekvenserne af skader på nervesystemet kan være mangfoldige (tabel 6.4). De mange store uheld med mange døde og invaliderede vækker offentlighedens opmærksomhed, men den snigende effekt, der "blot" viser sig som svagt nedsat intelligens, er måske den farligste på længere sigt. Der er påvist en reduktion af intelligenskvotienten (IQ) på 5 point som følge af blyeksponering i grupper af amerikanske børn (fig. 6.14). I arbejdsmil-

Figur 6.13. Opgørelse over mængden af kemikalier der udledes til miljøet i USA 1987. Blandt de 25 øverste er 19 neurotoksiske stoffer. (Omtaget fra Neurotoxicity U.S. Congress, Office of Technology Assessment).

■ neurotoksisk  
■ ikke neurotoksisk



Figur 6.14. Verbal intelligenskvotient (IQ) hos amerikanske børn med højt (>15 µg/100 ml) og lavt (< 5 µg/100 ml) blodbly. I gennemsnit var IQ i gruppen med højt blodbly 5 point lavere end i gruppen med lavt niveau.



jøet vil der, når der ses bort fra egentlige uheld og ulykker, være tale om langsomme snigende påvirkninger, som det ofte kan være vanskeligt at påvise. Det er derfor vigtigt, at de stoffer, der anvendes, er behørigt undersøgt mht sundhedsskadelige effekter. De mange neurotoksiske stoffer, som forekommer i arbejdsmiljøet, kan inddeles i følgende grupper:

- ◆ gasser
- ◆ metaller
- ◆ monomerer
- ◆ organiske opløsningsmidler
- ◆ pesticider
- ◆ psykofarmaka
- ◆ naturlige toksiner.

## Gasser

Et bredt spektrum af stoffer med vidt forskellig kemisk struktur forekommer ved stuetemperatur som gasser og har vist sig at være neurotoksiske (se tabel 6.10). Nogle af disse er ekstremt toksiske selv i meget små doser og har været anvendt som krigsgasser (phosgen og cyanid). For andre kræves højere koncentrationer over længere tid for at give symptomer, fx carbondioxid. Nogle anvendes til narkose, fx nitrogenoxid, og andre er vidt udbredte i industrien og i produkter til desinfektion, fx formaldehyd. Nogle af gasserne kan fremkalde irreversible forandringer i nervesystemet efter gentagne udsættelser for lave koncentrationer, andre fremkalder antagelig kun akutte symptomer. Eksponering i små rum uden ventilation er særlig farlig, eftersom nogle af gasserne er uden lugt, fx carbonmonoxid. Som det fremgår af tabel 6.10, er nogle af gasserne vigtige i den industrielle produktion, mens andre er biprodukter fra processer, fx CO og CO<sub>2</sub>, som ofte forekommer i fx miner, stålværker og garageanlæg, men som også kan forekomme i private hjem eller institutioner med utilstrækkelig ventilation.

Tabel 6.10. Oversigt over neurotoksiske gasser.

Stof	Eksponeringskilde	Virksomheder i risiko	Effektprofil
Carbondioxid; CO <sub>2</sub>	Svejsning; gæring; fremstilling, lagring og brug af tøris	Metalindustri; minedrift; bryggerier	M: Udvidelse af blodkar A: Hovedpine; åndenød; tab af bevidsthed K: Antagelig ingen
Carbonmonoxid; CO	Bilreparation; svejsning; metalstøbere; chauffører; brandmænd	Støberier; minedrift; transportindustri	M: Fortrængning af ilt fra blodet A: Hovedpine; sløvhed; tab af bevidsthed K: Encephalopati
Hydrogensulfid; H <sub>2</sub> S	Desinfektion af drivhuse; fiskere; fiskelosning	Landbrug; fiskeri; industri	M: Blokering af den oxidative metabolisme A: Tab af bevidsthed K: Encephalopati
Cyanid; HCN	Elektrosvejsning; galvanisk overfladebehandling med nikkel, kobber og sølv; desinfektion af skibe, fødevarer og jord i drivhuse	Metalindustri; kemisk industri; minedrift; gasværker	M: Blokering af respirationskædens enzymer A: Åndenød; blodtryksfald; kramper; tab af bevidsthed; død K: Encephalopati; ataksi; neuropati
Nitrogenoxid; N <sub>2</sub> O	Under anvendelse som anæstesiemiddel	Hospitaler (narkose); tandlæger; jordemødre	M: Forandringer i nervecellemembranen; degeneration af nerveceller efter langvarig påvirkning A: Kådhed; døsighed; tab af bevidsthed K: Følelsesløshed i fingre og tæer; reduceret koordination; encephalopati

M: Mekanisme; A: Akutte symptomer; K: Kroniske symptomer; Neuropati: Henfald af motoriske og sensoriske nervefibre; Encephalopati: Hjerneskader som følge af generel forstyrrelse af hjernen; Ataksi: Manglende koordinering af bevægelser.

### *Carbonmonoxid*

Carbonmonooxid fremkommer bl.a. ved forbrænding af kulstof uden tilstrækkelig tilgang af ilt. Biludstødning fra biler uden katalysatorer er en stor kilde til carbonmonoxid (CO). Carbonmonoxid er en farveløs og lugtløs gas. Grænseværdien for CO er 25 ppm. CO bindes stærkt til blodets hæmoglobin og danner COHb, hvorved blodets evne til at transportere ilt nedsættes. 5-10% COHb i blodet er tilstrækkeligt til, at der kan måles effekter i form af nedsat reaktionstid og evne til at løse forskellige psykologiske tests. 5-10% COHb kan fremkomme ved indånding af ca 30 ppm CO. Virkningen på nervesystemet af lave CO-niveauer er indirekte og skyldes blodets nedsatte evne til at transportere ilt til centralnervesystemet. CNS har et meget stort iltbehov, fordi nervecellerne konstant udfører et stort arbejde med at opretholde spændingsforskelle over cellemembranen. Spændingsforskellen opretholdes, som tidligere nævnt, ved en aktiv iontransport, som kræver energi (ATP) og dermed ilt. Den energi, hjernen bruger, svarer ca til den energi, en 50 watt pære bruger. Fra en række cases med kortvarige høje eksponeringer for CO er der rapporteret om senvirkninger i form af hukommelsesforstyrrelser og personlighedsforandringer.

## Metaller

Blandt metallerne findes en række, som er neurotoksiske, fx bly, mangan og kviksølv, og nogle, der er essentielle i lave koncentrationer, men neurotoksiske i højere, fx zink. Metaller findes i naturen i lave koncentrationer, men i specielle industrier anvendes de i store mængder (se tabel 6.11). Således kan deres anvendelse give anledning til sundhedsrisici for de ansatte. Derudover kan der findes betydelige mængder af metaller i spildevandet fra sådanne industrier med risiko for miljøforgiftninger til følge. Ofte optages metallerne i fødekæden og vil akkumuleres i de sidste led, fx kan organiske kviksølvforbindelser i fisk udgøre en sundhedstrussel for forbrugerne.

Giftigheden og den måde, hvorpå metallerne optræder i kroppen, afhænger af den kemiske struktur. Rene metaller kan optages ved inhalation af dampe (kviksølv) og små partikler (bly). Organiske metalforbindelser, fx tetraethylbly, optages hovedsageligt ved hudkontakt. Belastningen med metal afspejles til en vis grad af koncentrationen i blod eller urin, hvilket er grundlaget for biologisk monitoring. I forbindelse med behandling må det tages i betragtning, at især bly frigives meget langsomt fra knoglerne.

### *Mangan*

Mangan er et metal, som forekommer i mange legeringer.

Stof	Eksponeringskilde	Virksomheder i risiko	Effektprofil
Bly	Metalstøbning; lodning; slibning; glasering	Støberier; minedrift; akkumulatorfabrikker; skibsværfter; glasværker, pottemager- og keramikværksteder	M: Svækkelse af den oxidative metabolisme i nerveceller og glia A: Bughulesmerter; hovedpine; encephalopati; kramper K: Encephalopati, polyneuropati bl.a. "drop-hand"
Kviksølv	Elektrolyse; elektriske instrumenter (manometre; termometre; batterier; elektriske pærer etc); amalgam	Chlor alkali fabrikker; minedrift; elektronik; tandlæger; polymerproduktion; paper og pulp industri	M: Svækkelser flere steder i nervecellerne. A: Lungeinflammation; hovedpine; taleforstyrrelse K: Inflammation af gummer; appetittab; encephalopati; rystelser; irritabilitet
Mangan	Støberier; bearbejdning af stål; svejsning; tørbatterier	Minedrift; stål- og aluminiumproduktion; batteri-produktion; kemisk industri	M: Ændringer i dopamin og catecholamin i hjernen A: Forstemthed K: Hjernelidelser, fx parkinsonisme; psykoser; appetittløshed; hovedpine; svaghed
Aluminium	Metallurgi; slibning; polering; svejsning	Metalindustri	M: Ukendt K: Mulighed for hjerneskade

M: Mekanisme; A: Akutte symptomer; K: Kroniske symptomer; Neuropati: Henfald af motoriske og sensoriske nerve-fibre; Encephalopati: Hjerneskader som følge af forstyrrelse af hjernen.

Tabel 6.11. Oversigt over neurotoksiske metaller.

Erhvervsmæssig udsættelse for mangan finder især sted i miner og i metalstøberier. Grænseværdien for mangan er 0,2 mg/m<sup>3</sup>. Røg og støv af mangan optages via lungerne eller lugteepitelets nerveender. De første symptomer på manganforgiftning, "Manganese madness", psykomotoriske forstyrrelser, emotionel ustabilitet og hallucinationer, er påvist efter ned til 6 måneders eksponering for mangan i koncentrationer på lidt over grænseværdien. Senere kan symptomerne udvikle sig til vanskelighed med tale og koordineret bevægelse samt en jokkende gang. Nogle af symptomerne, som kan minde om dem, der optræder ved Parkinsons' syge, kan behandles med L-DOPA. Dette peger på, at mangan griber forstyrrende ind i dopaminbalancen i substantia nigra. Længerevarende udsættelse for mangan i lave koncentrationer synes at kunne give en række noget mildere og uspecifikke neuropsykiatriske symptomer. Det drejer sig om massiv træthed, nedsat hukommelse og koncentrationsevne, muskelstivhed og smerter.

## Monomerer

Monomerer udgør en stor heterogen gruppe af reaktive stoffer, som anvendes til kemiske synteser og produktion af polymerer, resiner og plastik. Monomererne omfatter stoffer som p-chlorobenzen, 1,2,4-trichlorbenzen, styren, vinyltoluen, acrylamid, phenoler,

$\epsilon$ -caprolactam,  $\gamma$ -aminobutyrolactam. Nogle af de mest udbredte neurotoksiske monomerer og deres effekter på nervesystemet er listet i tabel 6.12. Erhvervsmæssig udsættelse for neurotoksiske monomerer kan finde sted i virksomheder, der fremstiller, transporter og anvender de nævnte stoffer og produkter. Desuden under håndtering af polymerer med restindhold af monomerer og under støbning på bådværfter, ved tunnelarbejder og i tandklinikker. Monomerer kan optages ved inhalation, fx carbondisulfid og styren, eller ved hudkontakt, fx acrylamid. Monomerer er som nævnt en heterogen gruppe stoffer, hvilket også afspejles i deres virkemekanismer og de tilknyttede symptomer (tabel 6.12).

### Acrylamid

Acrylamid er et hvidt krystallinsk stof med et smeltepunkt på 84°C og en molekylvægt på 71,8:



Acrylamid er opløseligt i vand og kemisk meget reaktivt. Dets dobbeltbinding kan reagere med thiole samt hydroxy- og aminogrupper. Udsættelse for acrylamid ved hudkontakt eller indånding fremkalder efter en vis tid, der er afhængig af påvirkningens art, symptomer på perifer og central polyneuropati i form af muskelsvækkelse og følelseløshed i hænder og fødder. Dyreforsøg har bekræftet, at acrylamid fremkalder skader i CNS (Purkinji-cellerne) i motoriske og sensoriske nerveterminaler og i rygmarvens gangliaceller.

Tabel 6.12. Oversigt over neurotoksiske monomerer.

Stof	Eksponeringskilde	Virksomheder i risiko	Effektprofil
Acrylamid	Produktion af polymerer; boreoperationer	Polymerproduktion; tunnelboring	M: Bl.a. reduceret aksonal transport K: Polyneuropati; svimmelhed; skælven og ataksi
Acrylonitril	Laboratoriearbejde; polymer- og gummiproduktion	Polymer- og gummiproduktion; kemisk syntese	A: Hyperexcitabilitet; spytafsondring; opkastning; blåfarvning af huden; ataksi; åndenød
Carbondisulfid	Produktion af gummi, viskose og rayon	Gummi-, viskose- og rayonindustri	M: Antagelig reduceret aksonal transport og nedsat enzymaktivitet K: Perifer neuropati; encephalopati; hovedpine; svimmelhed; mave-tarmbesvær
Styren	Produktion af glasfiberplast; monomerfremstilling og -transport; brug af styrenholdige resiner	Kemisk industri; glasfiber- og polymerindustri	M: Ukendt. A: CNS-depression; hovedpine K: Polyneuropati; encephalopati; høretab
Vinyltoulen	Produktion af resiner og insekticider.	Kemisk industri og polymerindustri	K: Polyneuropati; nedsat nerveledningshastighed i motorneuroner

M: Mekanisme; A: Akutte symptomer; K: Kroniske symptomer; Neuropati: Nedsat funktion i perifere motoriske og sensoriske nervefibre; Encephalopati: Hjerneskader som følge af generel forstyrrelse af hjernen; Ataksi: Manglende koordinering af bevægelser.

## Organiske opløsningsmidler

Organiske opløsningsmidler er en fælles betegnelse for en stor gruppe lipofile stoffer, der, i varierende grad, er i stand til at opløse fedt, olie, voks, resiner, gummi, asfalt, cellulose-filamenter og plastmaterialer. De er generelt flygtige væsker med kogepunkter på under 250°C. Pga deres fedtopløselighed fordeles de i kroppen til fedtrige organer. Således findes de højeste koncentrationer efter opløsningsmiddeleksponering i fedtvæv, benmarv, lever og hjerne. Fordelingsforholdet octanol/vand for et opløsningsmiddel indikerer, om der kan forventes høje koncentrationer i nervesystemets lipidmembraner.

Den toksiske mekanisme kendes endnu ikke, men adskillige muligheder har været i fokus: hæmning af vigtige metaboliske enzymer knyttet til glukosestofskifte, reduceret energiproduktion i mitochondrierne, ændringer i neuronmembranen og forstyrrelse af ionkanalerne, hæmning af den aksonale transport. Der er antagelig tale om, at de organiske opløsningsmidler gennem binding til lipofile områder på nervecellerne forstyrrer en række forskellige processer. Denne antagelse underbygges af sammenhængen mellem fedtopløselighed og biologisk effekt (tabel 6.8).

Store grupper af ansatte i en bred vifte af industrier udsættes dagligt for organiske opløsningsmidler (tabel 6.13). I Danmark er forbruget af organiske opløsningsmidler, og især eksponeringen, faldet i en række virksomheder som følge af tekniske og hygiejniske forbedringer samt substitution. Det gælder malere, grafisk industri og metalindustrien. I andre erhverv er eksponeringsmønstret ændret, mens det totale forbrug stort set er uændret. Trichloroethylen er fx blevet substitueret med 1,1,1-trichloroethan i metalindustrien.

Organiske opløsningsmidler er dog stadig et arbejdsmiljøproblem på mange arbejdspladser. Risiko for sundhedseffekter er særlig stor, når man arbejder i små rum med ringe ventilation og høj temperatur. Fysisk aktivitet øger optagelsen.

### *Toluen*

Toluen er et "klassisk" organisk opløsningsmiddel, som bl.a. findes i trykfarver, maling, lakker og lime og anvendes hyppigt som rensmiddel for farver o.l. Grænseværdien for toluen er i Danmark 25 ppm. Toluen har et relativt højt damptryk og fordampes således let, så den ovenfor nævnte anvendelse fører let til udsættelse for koncentrationer i indåndingsluften på over grænseværdien. Toluen optages gennem huden og over lungerne og ophobes i kroppens fedt pga toluens høje fedtopløselighed. Udsættelse for toluen i stigende koncentrationer fra 50 ppm og op til 1.000 ppm fører akut til hovedpine, kvalme og svim-

Stof	Eksponeringskilde	Industrier i risiko	Mekanisme og effektprofil
<b>Chlorerede hydrocarboner:</b>			
Trichlorethylen (TRI); 1,1,1-Trichlorethan; Tetrachlorethylen	Affedtning; rensning; maling; trykning; anæstesi (TRI)	Metalindustri; grafisk industri; elektronik- industri; renserier; narkosepersonale (TRI)	M: Ukendt A: Prænarkotiske symptomer, K: Hjerneskade; polyneuropati; beskadigelse af Trigeminus høretab (TRI)
Methylenchlorid	Ekstraktion, malingsfjerning	Fødevareindustri; malere; grafisk industri	M: Metabolisering til CO A: Prænarkotiske symptomer, koma K: Hjerneskade
Methylchlorid	Køleskabsproduktion	Køleindustri; gummiindustri; plastindustri	M: Ukendt A: Prænarkotiske symptomer; tab af bevidsthed; død K: Hjerneskade
Toluen	Trykning; rensning; affedtning; maling	Grafisk industri; elektronikindustri	M: Ukendt A: Prænarkotiske symptomer K: Hjerneskade; polyneuropati høretab; synsforstyrrelser
Xylen	Trykning; kemisk syntese; maling; histolaboratorier	Grafisk industri; plastindustri; histolaboratorier	M: Ukendt A: Prænarkotiske symptomer K: Hjerneskade; synsforstyrrelser; høretab
Styren	Polymerisation; glasfiberarbejde	Plastindustri; glasfiberproduktion	M: Ukendt A: Prænarkotiske symptomer K: Hjerneskade; polyneuropati; høretab
<b>Hexacarboner:</b>			
n-hexan; methyl butyl keton (MBK); methyl ethyl keton (MEK)	Limning; trykning; plastcoating; maling; ekstraktion	Fodtøjsindustri; grafisk industri; malere; laboratorier	M: Forstyrrelser af den aksonale transport A: Prænarkotiske symptomer K: Polyneuropati; hjerneskade
<b>Forskellige opløsningsmidler:</b>			
Freon 113	Produktion og reparation af køleanlæg; renserier; affedtning	Køleindustri; metalindustri; elektronikindustri; renserier	M: Ukendt A: Milde prænarkotiske symptomer K: Hjerneskade
Diethylether; halothan	Narkoselæger og sygeplejersker	Hospitaler; klinikker	M: Ukendt A: Prænarkotiske symptomer K: Hjerneskade
Carbondisulfid	se monomerer	se monomerer	
<b>Blandinger:</b>			
Terpentin; cellulosefortynder; petroleum	Maling; rensning; affedtning; trykning; imprægnering	Metalindustri; grafisk industri; træindustri	M: Ukendt A: Prænarkotiske symptomer K: Hjerneskade

Tabel 6.13. Oversigt over organiske opløsningsmidler.

melhed. En række epidemiologiske undersøgelser af malere og andre, der har været erhvervsmæssigt udsat for toluendampe, tyder på, at langvarig udsættelse for toluen i koncentrationer fra

ca 25 ppm kan fremkalde varige funktionsforstyrrelser i CNS. Disse viser sig som nedsat hukommelse, irritabilitet, depressioner samt nedsat IQ (nedsat evne til at løse psykologiske tests).

#### *n-Hexan*

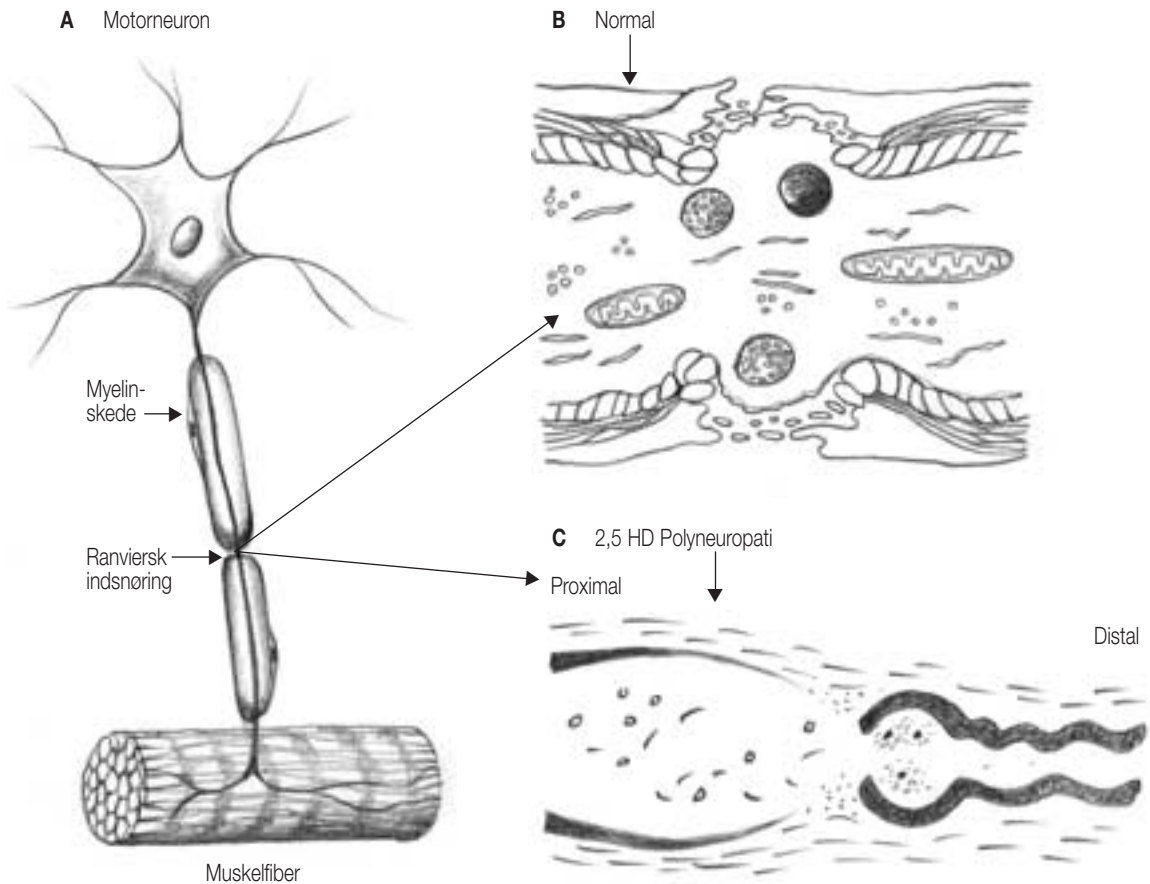
n-Hexan er et organisk opløsningsmiddel, der bl.a. finder anvendelse i lime. Grænseværdien for n-Hexan er 50 ppm. Ved gentagne længerevarende udsættelse for 50 ppm n-Hexan eller højere koncentrationer i indåndingsluften opstår følgende symptomer, som tiltager i sværhed ved øget eksponering: prikkende fornemmelse i fingre og tær, nedsat følelse i fingre og tær, nedsat muskelkraft i fingre og tær. Symptomerne breder sig efterhånden op ad armene til skuldrene og op ad benene til lårene. Tilsvarende kemiske forbindelser, fx pentan og heptan, kan ikke fremkalde lignende symptomer. Undersøgelser har vist, at det er n-hexan metabolitten 2,5-hexandione (2,5-HD), der fremkalder de beskrevne symptomer. Symptomerne opstår, ved at 2,5-HD griber forstyrrende ind i de perifere nervecellers transport af stoffer fra cellekroppen og ud til udløberen (aksonet). Aksonet kan være op til 1 meter langt (se fig. 6.15). Når transporten stopper, henfalder aksonet, og det kan ikke længere lede de elektriske nervesignaler, som overfører følelse og stimulerer muskelkraft.

## Pesticider

Pesticider anvendes som en fællesbetegnelse for stoffer, der er produceret mhp at udrydde ukrudt og skadedyr. Betegnelsen omfatter insekticider, fungicider, rodenticider, desinfektionsmidler og herbicider. Organophosphater, carbamater og organochlor-pesticider tillige med pyrethroider, chlorophenoxy-herbicider og organo-metalforbindelser anvendt som svampemidler har neurotoksiske egenskaber (tabel 6.13).

Erhvervsmæssig udsættelse for pesticider er hovedsageligt knyttet til landbrugsarbejde såsom behandling af afgrøder og arbejde med behandlede afgrøder, men skadedyrsbekæmpere, pesticidproducenter, jernbanearbejdere, såvel som drivhus- og skovarbejdere løber en betydelig risiko for at blive eksponeret for neurotoksiske pesticider. Børn, som i visse lande udgør en betydelig del af arbejdsstyrken i landdistrikterne, er særlig sårbar, fordi deres nervesystem endnu ikke er fuldt udviklet. Pesticidernes akutte effekter er generelt kendt og velbeskrevet. Blivende effekter efter gentagne eksponering eller efter eksponeering for en enkelt høj dosis ses ofte (tabel 6.14), hvorimod der hersker usikkerhed om betydningen af gentagne lavdosis-påvirkninger.





Figur 6.15. Illustration af et perifert motorneuron (A) med en normal Ranviersk indsnøring (B). Toksisk effekt af 2,5-HD (C) medfører, at aksonet svulmer op ved de Ranvierske indsnøringer, og at myelinskeden henfalder.

### Parathion

Parathion er et blandt mange bekæmpelsesmidler, det tilhører gruppen organophosphater. Grænseværdien for parathion er 0,1 mg/m<sup>3</sup>. Den lave grænseværdi afspejler, at dette stof griber ind på et centralt sted i nervesystemet. Gennem en hæmning af enzymet cholinesterase får det signaloverførslen ved de synapser, der anvender acetylcholin, til at gå 'amok'. Symptomerne på akut forgiftning omfatter øget sputsekretion, små pupiller, ufrivillig vandladning, muskelkramper og svækkelse. Døden indtræder sædvanligvis som følge af lammelse af åndedrættet. Nogle organophosphater kan desuden efter en enkelt kraftig påvirkning fremkalde forsinket toksicitet, der optræder som lammelser nogle uger efter påvirkningen.

Stof	Eksponeringskilde	Virksomheder i risiko	Effektprofil
<b>Organophosfater:</b>			
Beomyl; Demethon; Dichlorvos; Ethyl parathion; Mevinphos; Phosfolan; Terbufos; Malathion	Håndtering; arbejde med sprøjtede afgrøder	Landbrug; skovbrug; gartneri	M: Acetyl cholinesterase hæmning A: Hyperaktivitet; neuromuskulære lammelser; synsforstyrrelser; åndedrætsbesvær; hvileløshed; svaghed; opkastning; krampes
<b>Carbamater:</b>			
Aldicarb; Carbaryl; Carbofuran; Propoxur			M: Forsinket neurotoksicitet aksonopati K: Polyneuropati; følelsesløshed og snurren i fødderne; muskelsvækkelse; sensorisk forstyrrelse; lammelser
<b>Organochlor:</b>			
Aldrin; Dieldrin; DDT; Endrin; Heptachlor; Lindane Methoxychlor; Mirex; Toxaphene	som ovenfor	som ovenfor	A: Irritabilitet; ængstelse; sløvhed; hovedpine; forvirring; svimmelhed; svækkelse; ataksi; rystelser; krampe; koma K: Encephalopati
Pyrethroider	som ovenfor	som ovenfor	M: Ændring af natriumstrømmen over nervecellemembranerne A: Forøget excitation; rystelser; krampes
2,4-D	som ovenfor	Landbrug	K: Polyneuropati
Triethyltinhydroxid	Overfladebehandling; håndtering af behandlet træ	Træindustri; byggeindustri	A: Hovedpine; svækkelse; lammelse; synsforstyrrelser K: Polyneuropati; CNS-symptomer.
Methylbromid	Desinfektion	Gartnerier	M: Ukendt A: Syns- og taleforstyrrelser; delirium; krampe K: Encephalopati

M: Mekanisme; A: Akutte symptomer; K: Kroniske symptomer; Polyneuropati: Nedsat funktion i perifere motoriske og sensoriske nervefibre; Encephalopati: Hjerneskader som følge af generel forstyrrelse af hjernen; Ataksi: Manglende koordinering af bevægelser; Aksonopati: Degeneration af nervecelleudløber.

Tabel 6.14. Oversigt over neurotoksiske pesticider.

## Udviklingstendenser

### *Forekomst af neurodegenerative lidelser*

Undersøgelser i USA har vist, at en række neurodegenerative lidelser er i fremgang i befolkningen; årsagen til dette er endnu ikke klarlagt, men visse kemiske stoffer er under mistanke.

### *MPTP og Parkinsons syge*

MPTP er forkortelsen for 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropy-

ridine, et stof som kan dannes under fremstilling af syntetisk heroin. Det opsigtsvækkende ved denne forbindelse er, at det i løbet af 5 til 15 dage kan fremkalde symptomer identiske med Parkinsons syge, en sygdom som normalt først udvikles sent i livet, og som udvikles over en årrække. Symptomerne er karakteriseret ved tremor og mangel på muskelkontrol og skyldes henfald af dopaminproducerende neuroner i substantia nigra, et område dybt i den centrale del af hjernen. Sammenhængen mellem MPTP og Parkinsons syge har øget forståelsen af denne lidelse, men også åbnet for opstilling af hypoteser om, at udsættelse for visse miljøgifte kan være hel eller delvis årsag til stigningen i de neurodegenerative lidelser.

Der er således tegn på, at udsættelse for visse neurotoksiske stoffer i selv lave koncentrationer kan have alvorlige konsekvenser for nervesystemets funktion og levetid, især hvis påvirkningen finder sted over længere tid. Sådanne påvirkninger kan forekomme på arbejdet, gennem forureninger i indeklimaet eller fra miljøet i øvrigt - vand, luft og mad.

#### *Kombinationseffekter*

Flere epidemiologiske undersøgelser har påvist en sammenhæng mellem udsættelse for organiske opløsningsmidler og tab af hørelse, og forskere fra NIOSH (det amerikanske arbejdsmiljøinstitut) har i tidsskriftet *The Lancet* advaret mod faren for høretab ved udsættelse for opløsningsmidler som toluen. Endvidere er der blevet påvist en synergistisk effekt ved samtidig udsættelse for toluen og støj.

En sådan sammenhæng tyder på et samspil af toksiske effekter i både nervesystemet og det indre øre. Ud fra et forebyggelses-synspunkt er det især vigtigt at få viden om, hvordan eksponering for opløsningsmidler og udsættelse for støj virker synergistisk i udvikling af høretab. En hypotese er, at celler med høj energiomsætning, fx hårceller i øret og visse centre i hjernen, kan exciteres ved udsættelse for opløsningsmidler, således at tærsklen for støjinducerede skader på celler sænkes. Det er vigtigt at få klarhed over, hvor længe denne sænkning af tærsklen varer set i forhold til forskellige koncentrationer af opløsningsmiddeleksponering. Endvidere er det vigtigt at få viden om mekanismer bag et skift fra reversibel til permanent høretab som følge af eksponering for opløsningsmidler og støj.

## Litteratur

- Anger WK. Workplace exposures. In: Annau Z (ed). Neurobehavioral Toxicology. Jons Hopkins University Press, Baltimore, 1986, pp 331-347.
- Arlie-Søborg P. Solvent neurotoxicity. CRC Press, 1992.
- Bøgeskov J, Falkenberg H, Hansen NS, Heinrich T, Jensen GS, Nielsen SE, Petersen JB. Hjernen; fra neuron til bevidsthed. Nucleus, 1997.
- Chang LW, Slikker W. Neurotoxicology: Approaches and Methods. Academic Press, San Diego, 1995.
- Clarkson TW. Metal toxicity in the central nervous system. Environ Health Perspect 1987; 75:59-64.
- Ecobichon DJ, Joy RM. Pesticides and neurological diseases, Boston, CRC Press, Inc., 1991.
- Lippmann M. Review. Lead and human health: Background and recent findings. Environ Res 1990; 51:1-24.
- O'Donoghue JL. Neurotoxicity of industrial and commercial chemicals. Volume I & II, Florida, CRC Press, Inc, 1985.
- Simonsen L, Johnsen H, Lund SP, Matikainen E, Midtgård U, Wennberg A. Evaluation of neurotoxicity data: A methodological approach to classification of neurotoxic chemicals. Scand J Work Environ Health 1994;20:1-12.
- Spencer PS, Schaumburg HH. Experimental and clinical neurotoxicology. Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1980.
- U.S. Congress, Office of Technology Assessment, Neurotoxicity: Identifying and controlling Poisons of Nervous System, OTA-BA-436 (Washington, DC. U.S. Government Printing Office, April 1990).
- Valciukas JA. Foundations of Environmental and Occupational Neurotoxicology. Van Nostrand Reinhold, New York, 1991.
- WHO. Principles and methods of evaluating the toxicity of chemicals. Part 1 and 2. (Environmental Health Criteria Series No. 6, Part 1 and 2), World Health Organisation, Geneva, 1978.



## KAPITEL 7

# Hormoner og stress

*Åse Marie Hansen  
Anne Helene Garde  
Jytte Molin  
Christensen  
Lisbeth E. Knudsen*

# Hormoner og stress

En række undersøgelser har vist, at psykosociale påvirkninger og/eller bevægeapparattbelastninger kan føre til ændringer i hormonkoncentrationer i blod, urin og spyt. Det er hensigtsmæssigt i forbindelse med korterevarende stresspåvirkninger, hvor der kræves en aktivering af kroppens beredskab gennem det sympatiske nervesystem: hjerteslagsrytmen og blodtrykket stiger, blodsukker mobiliseres fra glykogendepoter i leveren og transporteres med blodet til den arbejdende tværstribede muskulatur, samtidig hæmmes blodtilførslen til indvolde og hud. En langvarig aktivering af det sympatiske nervesystem som følge af længevarende stress er derimod skadeligt, idet kroppen har brug for genopbygning. Den hormonelle status er i mange tilfælde afgørende for, hvilken effekt et fremmed stof har på organismen. Her kan afgiftningsenzymmer spille en rolle. Enzymer som superperoxid dismutase og katalase indgår i reguleringen af hydrogenperoxid, som via nedbrydning af reaktive oxygenmolekyler forårsager uoprettelige vævsskader og en reduktion af reservekapaciteten.

Hormoner er kemiske signalsubstanser, som koordinerer aktiviteten af de forskellige celler i multicellulære organismer (endokrine system). Hormoner syntetiseres i specialiserede væv (kirtler), secerneres direkte i blodstrømmen og transporteres til deres virkningssted, hvor de virker ved specifikt at ændre aktiviteten i specielle celler og væv (målceller). Hormoner har til hovedrolle at kontrollere og regulere reproduktion, vækst og udvikling, vedligeholdelse af det indre miljø samt produktion, udnyttelse og oplagring af energi. De tre væsentligste ekstracellulære kommunikationssystemer er det endokrine system, nervesystemet og immunsystemet. De tre systemer kommunikerer ekstensivt og har virkningsmekanismer med mange fælles træk.

Ved akut stress aktiveres endokrinologiske eller adfærdsmæssi-

ge mekanismer i individet for at neutralisere effekten af eller for at tilpasse sig en stressor. Formålet med denne stressreaktion er at genoprette ligevægten (homeostasen) i individet. Så længe individet er i stand til at opretholde homeostasen, vil kroppens normale status være etableret.

Ved kronisk stress kan individet ikke eliminere den pågældende stressor eller tilpasse sig den. Basalt set er kronisk stress karakteriseret ved, at nogle biokemiske processer aktiveres, og andre deaktiveres, således at den endokrine balance forskydes. Denne tilstand menes at kunne medvirke til udvikling af bl.a. hjerte-karsygdomme, allergi, kræft og hjerneskader.

Det er væsentligt at skelne mellem på den ene side stress, som en individtilstand, og på den anden side en stressor (en belastning), som fx monotont tempoarbejde, der kan være årsag til stresstilstanden. En stressor er en ydre påvirkning eller belastning (psykisk/fysisk), som overstiger individets personlige evner og derved fremkalder en stressreaktion.

For at undersøge effekten af en stressor er det væsentligt at skelne mellem akut og kronisk stress. Akut fysiologisk stress er kendetegnet ved en stigning i urinudskillelsen af adrenalin, noradrenalin og kortisol, også kaldet de akutte stresshormoner.

Psykologisk stress er en individtilstand, der er kendetegnet ved anspændthed (arousal) og ulyst.

I dette kapitel vil udvalgte hormoner eller metaboliske slutprodukter blive gennemgået fysiologisk sammen med eksponering fra udvalgte stressorer. En biomarkør er her defineret som en biologisk indikator for de ændringer i organismen, som påvirkninger forårsager.

## Effekter af stress på fysiologiske processer

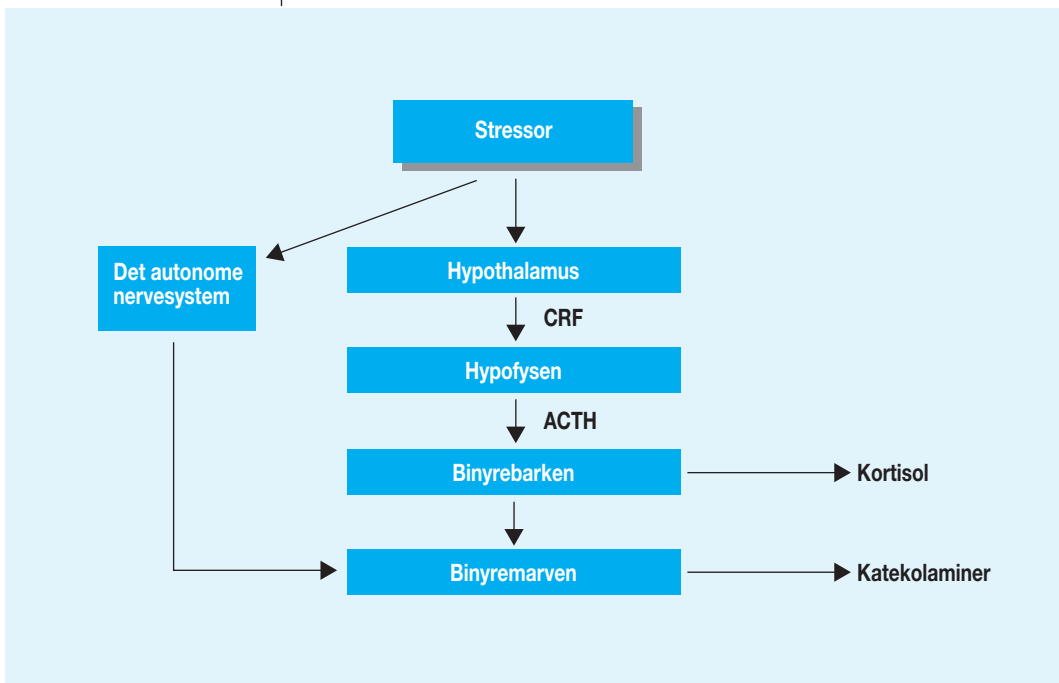
Det kan være hensigtsmæssigt at opdele de biokemiske processer i kroppen i kataboliske og anaboliske processer. Generelt er kataboliske processer nedbrydende, således at der frigøres energi, mens anaboliske processer er opbyggende. Processerne reguleres bl.a. af hormoner. Katekolaminer (adrenalin, noradrenalin, dopamin), kortisol, hæmoglobin-A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>), kolesterol og betaendorfin relaterer sig til de kataboliske processer, mens dehydroepiandrosteron, testosteron og østradiol er anaboliske steroide, som har betydning for muskelopbygningen og hermed relaterer



sig til anaboliske processer. Nedenfor er angivet eksempler på biomarkører opdelt efter, hvilke biokemiske processer de er knyttet til:

- ◆ markører for kataboliske processer: *adrenalin*, *noradrenalin*, *kortisol*, *HbA<sub>1c</sub>*, *kolesterol* og *beta-endorfin*
- ◆ markører for anaboliske processer: *dehydroepiandrosteron-sulfat*, *testosteron*, *somatotropin* og *østrogen*
- ◆ markører for andre fysiologiske processer: *thyroxin*, *prolaktin* og *melatonin*
- ◆ markører for påvirkninger af immunsystemet: *akutfaseproteiner*, *cytokiner*, *heat-shock-proteiner* og *immunglobulin-A*
- ◆ markør for oxidative skader: *8-hydroxydeoxyguanosine*.

Stressorer kan påvirke hypothalamus - hypofyse - binyrebark (HPA-aksen) og det autonome nervesystem (se fig 7.1). Frigivelse af adrenalin fra kromaffincellerne i binyremarven og frigivelse af glukokorticoider (fx kortisol) fra binyrebarken er to essentielle neuroendokrine respons. Adrenalin og kortisol stimulerer bugspytkirtlen til frigivelse af glukagon og omdannelse til glucose.



Figur 7.1. Diagram over effekter af stressorer på HPA-aksen og det autonome nervesystem.

Frigivelse af kortisol hæmmer desuden en række signalsubstanser, der er nødvendige for immunsystemets funktion. Blandt disse er prostaglandiner, tumor nekrosis faktor, plasminogen-aktivatører og forskellige cytokiner. Aktivering af binyrebarksteroidhormonerne reflekterer en aktivering af hypothalamus, der stimulerer hypofyseforlappen til frigørelse af ACTH (adrenokortikotrop hormon) og ADH (anti-diuretisk hormon). I hypofysen frigøres også det luteiniserende hormon (LH), der styrer progesteron- og testosteronproduktionen.

Da forskellige biokemiske processer indgår i et komplekst samspil, kan effekten af en stressor ofte måles ved ændringer i koncentrationer af hormoner eller markører for andre metaboliske processer i individet.

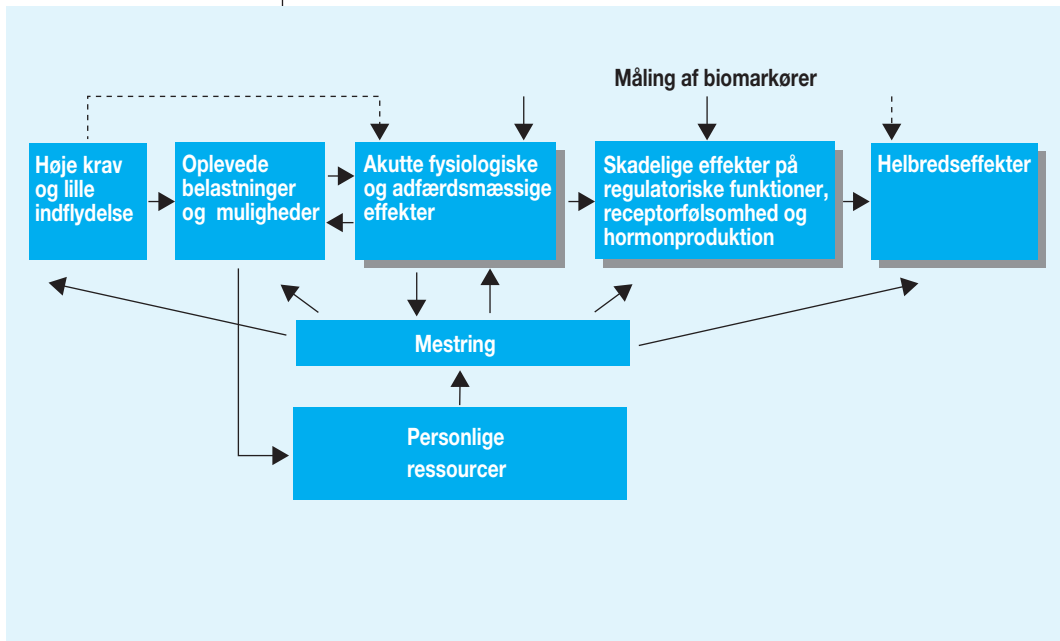
## Samspil mellem påvirkninger fra stressorer og effekter

Krav og påvirkninger i arbejdsmiljøet indgår i et komplekst samspil, der påvirker helbredet. Et krav om at udføre, regulere og/eller styre en arbejdshandling er ikke i sig selv belastende. Hvorvidt kravet bliver til en belastning, afhænger bl.a. af,

- ◆ om der er forhindringer eller manglende ressourcer til at imødekomme kravet
- ◆ om kravet er et overkrav, dvs overstiger individets kapacitet.

Et enkelt krav kan være et overkrav ved at kræve stor anstrengelse, eller gentagelse af krav kan samlet blive et overkrav, både bevægelsesmæssigt og mentalt, fx er det anstrengende at koncentrere sig om det samme i lang tid.

Fig. 7.2 viser en model for samspillet mellem påvirkning, ressourcer og effekter. Modellen har syv elementer: arbejdsmiljøets krav/påvirkninger, oplevet arbejdsmiljø, umiddelbare effekter, langsigtede helbredsvirkninger, mestringsmåder, individuelle ressourcer og social støtte. Nogle indgår i vekselvirkninger med hinanden. Det antages, at de umiddelbare (akutte og subakutte) effekter virker tilbage på oplevelsen af arbejdsmiljøets krav/påvirkninger, fx kan smerte føre til beslutning om handling til bedre at klare belastningerne. Umiddelbare effekter opdeles i *akutte fysiologiske effekter*, fx hormonale ændringer, samt *adfærdsmæssige effekter*, fx øget anvendelse af stimulerende midler, ulykker og sygefravær.



Figur 7.2. Samspil mellem påvirkning, ressourcer og effekter.

Langtidseffekter opdeles i effekter på regulatoriske funktioner, receptorfølsomhed og hormonproduktion. Langtidseffekter vil medføre, at det endokrinologiske system er i en kronisk aktivt-tilstand for at genoprette homeostasen.

## Målbare effekter af stresspåvirkninger. Udvalgte metaboliske markører i enkelte undersøgelser

### Stress og kataboliske processer

Adrenalin, noradrenalin og kortisol er eksempler på biomarkører for kataboliske processer. Andre metaboliske stoffer som glukeret hæmoglobin, kolesterol og beta-endorfin vil kunne anvendes som biomarkører for kataboliske processer, idet de er energikilder eller reflekterer glucosefrigørelsen fra depoter i individet (tabel 7.1).

Fysiologisk rolle	Biomarkør	Biologisk medie	Eksponering	Effekt
Kataboliske processer	Katekolaminer	Blod, urin	Korttidsstress	↑
	Kortisol	Blod, urin og spyt	Korttidsstress Længerevarende stress	↑ ↓
	Hæmoglobin A <sub>1c</sub>	Blod	Længerevarende stress	↑
	Kolesterol og triglycerider	Blod	Længerevarende stress	↑
Anaboliske processer	Testosteron og østrogen	Blod	Korttidsstress Længerevarende stress	↓ ↑↓
	DHEA-S	Blod og urin	Længerevarende stress	?
	Somatotropin	Blod og urin	Korttidsstress	?
Andre metaboliske processer	Thyroxin	Blod	Korttidsstress	↑
	Prolaktin	Blod	Korttidsstress Aktiv coping Passiv coping Længerevarende stress	↓ ↑ ↑ ?
	Melatonin	Blod og urin	Korttidsstress	↑
	β-endorfin	Blod	Korttidsstress	?
	Immunsystemet	Immunoglobuliner	Blod og spyt	For blod længerevarende stress
	Akutfaseproteiner, cytoleukiner og heat shock proteiner	Blod	Korttidsstress	?
Oxidative damage	8-hydroxydeoxyguanosin	Urin	Længerevarende stress	?

Tabel 7.1. Oversigt over biomarkør-respons på korttids- og længerevarende stress.

### Adrenalin og noradrenalin

Disse stoffer udskilles fra binyremarven og føres via blodet til leveren. Adrenalin stimulerer nedbrydning af glykogen til glucose og regulerer herved blodsukkerkoncentrationen. Adrenalin stimulerer også nedbrydning af glykogen i musklerne til mælkesyre. I forbindelse med en forestående akut belastende situation vil øget katekolaminfrigørelse føre til mobilisering af ressourcer til at kunne klare situationen. Noradrenalin fungerer som neurotransmitter i det sympatiske nervesystem.

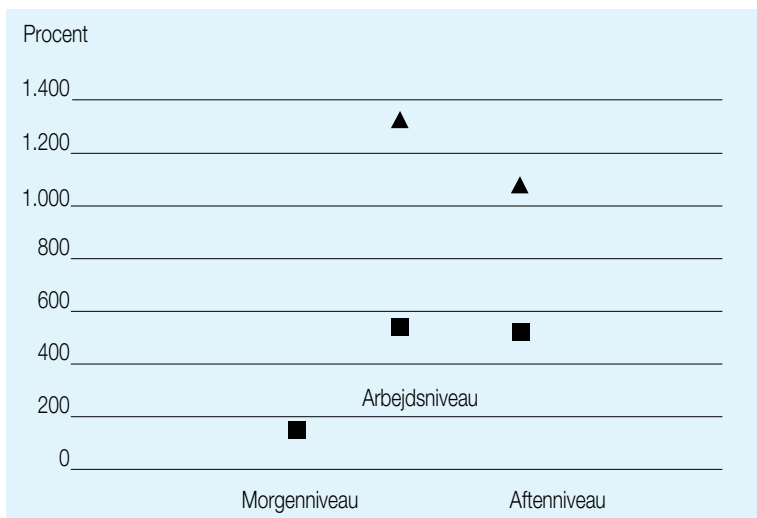
Katekolaminer udskilles via urinen frit eller bundet til sulfat. Normalt udskilles mindre end 0,2 µmol adrenalin hhv 0,6 µmol noradrenalin pr døgn. Mænd udviser højere plasma-adrenalin-niveauer end kvinder. Betydningen heraf er ukendt. Udskillelse af adrenalin og noradrenalin stiger med alderen hos i øvrigt raske

personer, hvilket bl.a. skyldes langtidseffekt af rygning på kredsløbet. Hos fysisk trænedede personer kan ses meget høje plasmakatekolaminkoncentrationer ved maksimal fysisk udfoldelse. Plasmanoradrenalin-koncentrationen i hvile hos trænedede personer i forhold til ikke-trænedede personer er ikke væsentlig ændret. Derimod ses højere plasmaadrenalin-koncentrationer hos trænedede personer i hvile end hos utrænedede personer. Endvidere tyder kredsløbsundersøgelser på, at blodtryksstigningen ved psykisk stress er mindre hos trænedede end hos fysisk utrænedede personer. Psykisk stress vil ofte være ledsaget af puls- og blodtryksstigning, karsammentrækning i perifere organer og i hud, en øget muskelgennemstrømning og stigning i plasmakatekolaminniveauet. Den blodtryksstigning, man ser, skyldes ikke direkte stigningen i plasmaadrenalin, men derimod aktivering af de sympatiske nerver til forskellige organer, herunder hjertet og binyrer. Noradrenalin-koncentrationen i underarmens veneblod afspejler noradrenalins neurotransmitterfunktion og især muskelsympatikusaktiviteten. Muskelsympatikusaktiviteten spiller en afgørende rolle for blodtryksregulationen ved stillingsændringer, fysisk arbejde, fødeindtagelse mv.

Der ses en betydelig døgnvariation i både plasma- og urinniveau, fra laveste værdi om morgenen, stigende over arbejdsdagen og faldende til lidt over morgenniveauet om aftenen. Denne døgnvariation har stor praktisk betydning for prøvetagningstidspunkt, og mange inden for arbejdsmiljøovervågning arbejder derfor med opsamling af urinprøver over 24 timer, eller opsamling af døgnurin. Den biologiske halveringstid for katekolaminer i blod er mindre end 2 minutter, hvilket gør brugen af plasmakatekolaminniveauet uegnet til vurdering af en eksponering over en arbejdsdag.

Adrenalin- og noradrenalinmålinger i urin kan anvendes på flere måder. Målte niveauer på en arbejdsdag kan sammenlignes med en fridag eller på gruppebasis mellem udvalgte grupper. Målingerne kan også relateres til stigning i koncentrationen i forhold til en basisværdi, fx morgenværdien, og sammenlignes med en tilsvarende stigning på en fridag eller på gruppeniveau i forhold til en kontrolgruppe. Endvidere kan man se på forskellen mellem arbejdsniveau og afteniveau i forhold til tilsvarende prøvetagningstidspunkter på en fridag.

Fig. 7.3 er et eksempel på, hvordan resultater kan evalueres. I dette eksempel er to hold af renovationsarbejdere, bestående af hver tre personer, fulgt i 4 arbejdsdage. Det ene hold indsamler affald i områder med affaldscontainere, og det andet hold indsamler affald i områder med affaldsspande. Den gennemsnitlige koncentration af adrenalin (standardiseret med kreatinin) i morgenerinen (før kl. 6.00) er brugt som basisniveau og sat til 100%.



Figur 7.3. Stigning i adrenalin i urin ved indsamling af affald.

- ▲ Indsamling af containere
- Indsamling af spande

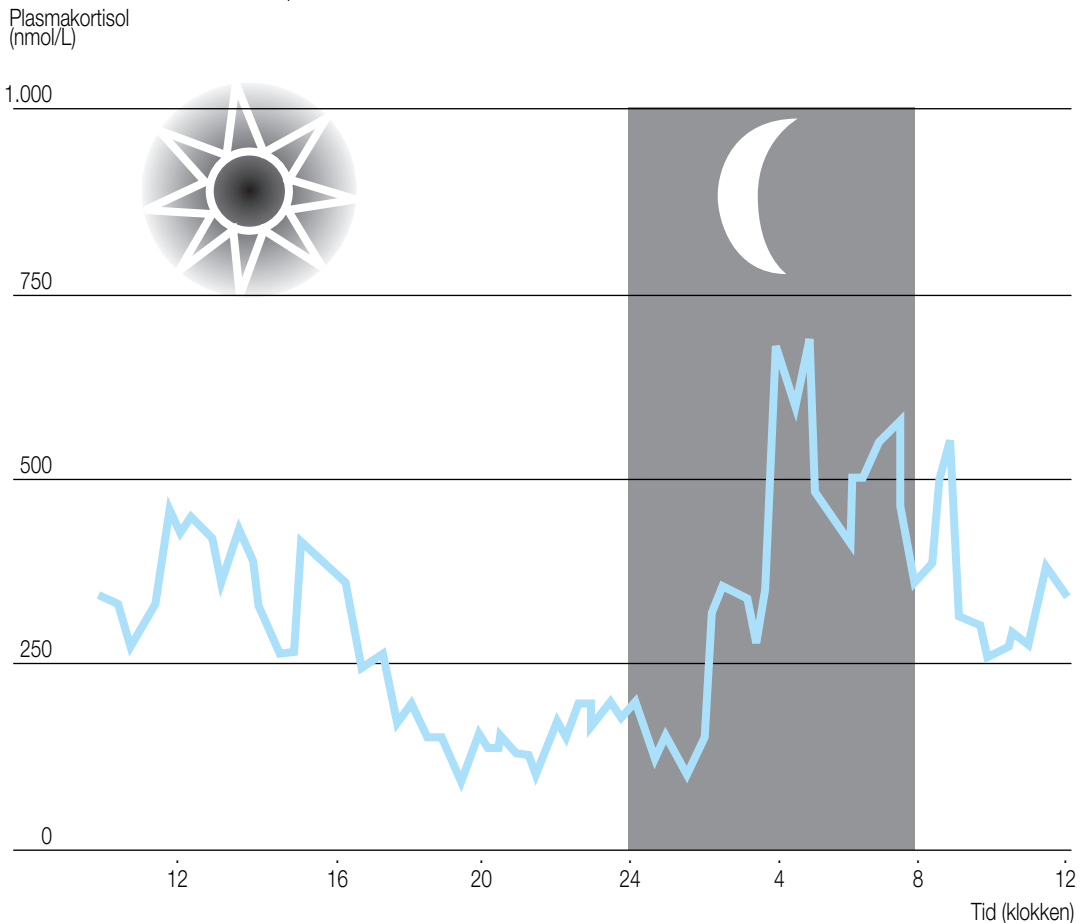
Arbejdsniveauet (fra kl. 6 til kl. 14.00) er beregnet som den gennemsnitlige stigning i katekolaminniveauet i arbejdstiden. Aftenniveauet (fra kl. 19 til kl. 24.00) er beregnet som den gennemsnitlige stigning fra morgenniveauet til aftenniveauet.

Figuren viser, at ved indsamling af containere er den gennemsnitlige katekolaminkoncentration (arbejdsniveauet og aftenniveauet) i urin dobbelt så høj som ved indsamling af spande.

### Kortisol

Kortisol er et steroid, der dannes i binyrebarken under indflydelse af ACTH. ACTH reguleres af CRF. Når kortisol i blod stiger, hæmmes frigørelsen af ACTH og CRF (negativ feedback). Kortisol spiller først og fremmest en rolle i kulhydrat-, protein- og fedtstofskiftet og mindsker kapillærpermeabiliteten. Kortisol har endvidere en anti-inflammatorisk virkning ved fx at dæmpe alle betændelsesreaktioner. Over længere tid vil kortisol reducere vævenes forsvarsmekanismer over for infektioner og forsinke sårheling.

Kortisol udviser en betydelig døgnvariation, idet koncentrationen er højest ved opvågning og herefter jævnt faldende i løbet af dagen (fig. 7.4). Over denne døgnrytme findes 6-8 sekretoriske perioder med uregelmæssig frekvens og amplitude (nogle mener, der er 15 sekretoriske perioder). Kortisol findes dels proteinbundet og dels "frit" non-proteinbundet i plasma og urin.

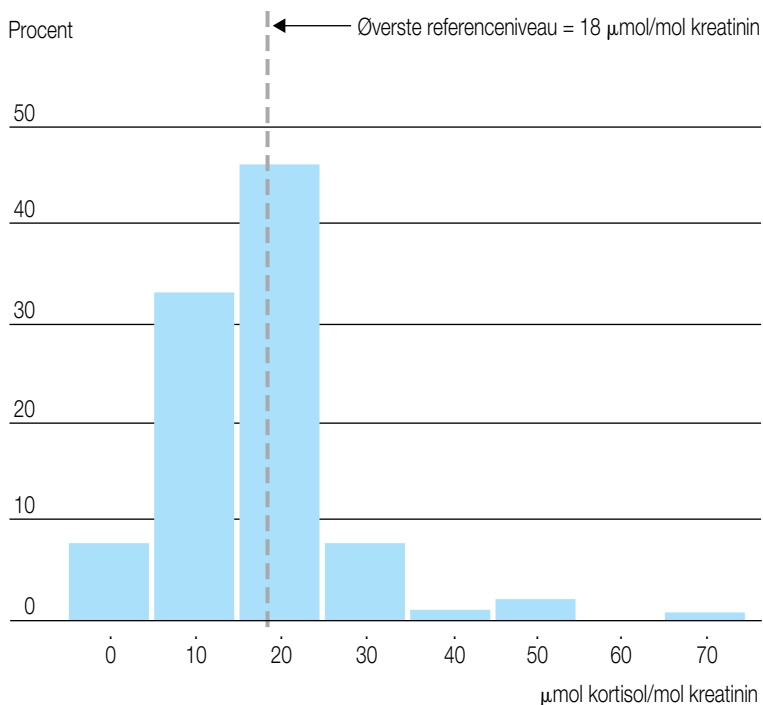


Figur 7.4. Døgnvariation for kortisol i plasma. (Medicinsk kompendium, 1994).

Kun den frie del er aktiv. Det frie kortisol i plasma er i diffusionslignevægt med kortisol i ekstracellulærfasen og er derfor et udtryk for kortisolaktiviteten i organismen. Alder og køn spiller ingen praktisk rolle for koncentrationen af kortisol.

Psykisk stress medfører en stigning i plasmakortisol. Det er dog karakteristisk, at stigningen er langsommere end stigningen i plasmaadrenalin, og der kræves større stimulering. Den biologiske betydning af en øget kortisolsekretion i "stresssituationer" er ikke fuldt afklaret. Hovedvirkningen synes at bestå i en sikring af glucoseproduktionen i organismen, specielt til hjernen, samtidig med at det inflammatoriske respons holdes på et for organismen acceptabelt niveau.

Halveringstiden for kortisol i plasma er 80 minutter. Pga den



Figur 7.5. Kortisol i urin hos 99 syersker.

korte halveringstid og døgnvariationen (herunder de sekretoriske perioder) kan det være vanskeligt at fortolke resultater af kortisolmålinger i plasma. Et bedre mål for udsættelse for stressorer i arbejdsmiljøet er kortisolkoncentrationen i urin. Fig. 7.5 viser et eksempel på kortisoludskillelsen i urin hos en gruppe syersker. Kortisoludskillelsen er beregnet i  $\mu\text{mol/mol}$  kreatinin, som den gennemsnitlige udskillelse over 24 timer. De målte koncentrationer er sammenlignet med referenceniveauet hos voksne (28-276 nmol/døgn), omregnet til  $\mu\text{mol/mol}$  kreatinin. Det er antaget, at et individ i gennemsnit udskiller 1,5 L urin og 10 mmol/L kreatinin. Ca 40% af syerskerne ligger over det øverste referenceniveau. Tidligere studier har vist, at lav kontrol over eget arbejde medfører en stigning i kortisolniveauet.

Kortisol i spyt har også været relateret til andre effektmål, fx forhøjet blodtryk og hjertefrekvens. Der er fundet signifikant højere niveauer hos personer med forhøjet blodtryk og hjertefrekvens i forhold til en kontrolgruppe, hvilket kunne indikere, at spytkortisol kan anvendes som markør for længerevarende påvirkninger.



*HbA<sub>1c</sub>*

Vedvarende forhøjet blodglucose medfører øget glykering af peptider og proteiner, bl.a. hæmoglobin. Af de glykerede hæmoglobinfraktioner foretrækkes at måle HbA<sub>1c</sub>, idet koncentration af HbA<sub>1c</sub> ikke hos normale individer er afhængig af alderen. HbA<sub>1c</sub> i blod anvendes bl.a. som et mål for ændringer af glucosemetabolismen i diabetespatienter og kan derfor anvendes til screening af diabetes mellitus. HbA<sub>1c</sub> benyttes som et meget præcist mål for den tidsvægtede blodglucosekoncentration for de forudgående 6-8 uger. HbA<sub>1c</sub> udtrykkes i procent af den totale hæmoglobinmængde. Referenceintervallet for HbA<sub>1c</sub> i blod er 3,4-6,1% af total hæmoglobin. HbA<sub>1c</sub> har en halveringstid i blodet, der svarer til hæmoglobinet's halveringstid, dvs ca 120 dage. I forbindelse med måling af HbA<sub>1c</sub> skal man være opmærksom på forskelle i mønstre af hæmoglobinfraktioner hos forskellige etniske grupper.

En stresspåvirkning vil, som følge af stimulering af hypofysen, binyrerne via ACTH og bugspytkirtlen via adrenalin, øge frigivelsen af glukagon og hermed øge koncentrationen af glucose (fig. 7.1). En langvarig udsættelse for en stressor vil derfor kunne måles i den gennemsnitlige blodglucosekoncentration. Flere undersøgelser peger på, at niveauet af HbA<sub>1c</sub> i blod stiger ved øget psykisk arbejdsbelastning. Til vurdering af HbA<sub>1c</sub> måleresultater sammenlignes måleresultater almindeligvis med kontrolmålinger på det samme individ.

*Plasmalipider, kolesterol og triglycerider*

Disse har ligeledes været anvendt i arbejdsmiljøundersøgelser af forskellige stressorer. Kolesterol og triglycerider kan indtages med føden, men produceres primært i organismen. Størstedelen af kolesterol, ca 2/3, findes i plasma som LDL- (lav-densitetslipoprotein) kolesterol og ca 1/3 som HDL- (høj-densitetslipoprotein) kolesterol. Kolesterol er et essentielt mellemprodukt for steroidhormonerne, fx testosteron og østradiol samt for D-vitamin dannelsen i huden. Koncentrationen af totalcholesterol varierer ikke med omstændighederne for prøvetagningen.

Det er velkendt, at forhøjet LDL-kolesterolniveau over lang tid kan give åreforkalkning. Referenceniveau for LDL-kolesterol er for mænd/kvinder i alderen 20-40 år omkring 1,7-4,9/1,5-4,5 mmol/L og i alderen 40-60 år 2,3-5,3/1,9-5,4 mmol/L. Referenceniveau for HDL-kolesterol er for mænd/kvinder i alderen 20-40 år 0,8-1,4/0,8-1,7 mmol/L og i alderen 40-60 år 0,7-1,6/0,8-1,9. Plasmakolesterolniveauet stiger svagt med alderen, og mænd udviser lidt lavere niveauer end kvinder.

Plasmakolesterolniveauerne er i et ældre studie fulgt hos 39 skatte- og selskabsrevisorer i 5 måneder. Der var signifikant

højere plasmakolesterolniveau i perioder med stor arbejdsbelastning for begge grupper. For selskabsrevisorer var januar og april præget af stor arbejdsbelastning, mens juni var præget af moderat arbejdsbelastning. Skatterevisorer havde den mest belastede arbejdsperiode i april. Der blev samtidig observeret stigende blodkoagulationstid for begge grupper i april. Dette fund er dog ikke bekræftet i nyere studier.

### *Beta-endorfin*

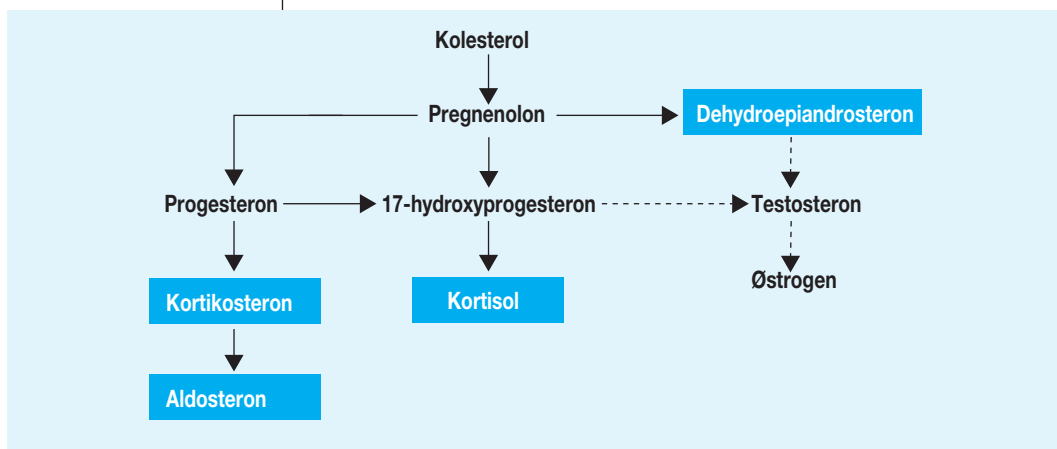
Beta-endorfin er et peptid-hormon, der secernerer fra hypofyseforlappen. Beta-endorfin stammer fra samme forstadium som ACTH, der regulerer kortisolsekretionen. Syntesevejen er dog forskellig. Nogle undersøgelser viser en sammenhæng mellem ACTH og beta-endorfin, andre undersøgelser viser ingen sammenhæng. Beta-endorfin virker smertehæmmende ved at hindre smerteimpulserne i at nå de smerteopfattende centre i centralnervesystemet.

Forhøjede koncentrationer af beta-endorfin øger fedtnedbrydning og reducerer herved forbrug af glucose og muskelglykogen. Beta-endorfin aktiverer immunsystemet, fx antistofproducerende celler, men undertrykker produktionen af IgG. Beta-endorfin og ACTH stiger under hårdt fysisk arbejde (> 60% VO<sub>2</sub>max) og top-er, kort tid efter at påvirkningen er ophørt. Der findes ikke i øjeblikket følsomme og pålidelige analysemetoder til måling af beta-endorfin i blod i normalområdet. Beta-endorfinudskillelsen i centralnervesystemet er væsentlig større. Det er dog ikke i arbejdspladsundersøgelser muligt at indsamle prøver fra cerebrospinalvæsken.

## Stress og anaboliske processer

Ved anaboliske processer dannes i individet større molekyler ud fra mindre molekyler. Disse større molekyler anvendes på celledniveau som opbyggende elementer eller til at udføre specielle funktioner. Hormoner, som initierer disse anaboliske processer, kaldes anaboliske hormoner. Nogle hormoner omdannes til andre mere aktive hormoner, mens andre blot inaktiveres i forbindelse med en signaloverførsel. Mange af disse hormoner er anaboliske steroider. Steroid henviser til kerneelementet i hormonerne. Alle naturligt forekommende steroidhormoner er dannet ud fra kolesterol (fig 7.6).

Syntese og sekretion af fx dehydroepiandrosteron (DHEA), testosteron og østrogen er medieret af ACTH (se fig. 7.1), koncentrationen af mineral-ioner og næringsstoffer, der omgiver den endokrine celle, og af et effekthormon dannet af de underordne-



Figur 7.6. Dannelse af steroidhormoner ud fra kolesterol.

de kirtler. Effekthormoner kan fx regulere sekretionen af andre hormoner.

Anaboliske steroider bruges af nogle idrætsfolk for at øge muskelmassen og muskelstyrken. Østrogen har dog kun en svag anabolisk effekt og øger kun mængden af fedtvæv. Testosteron og østrogen cirkulerer delvis bundet til et transportprotein, seksualhormon-bindende protein, hvor niveauet er afgørende for den frie fraktion. Alle østrogener dannes via enzymatisk omdannelse af androgener, fx er delta-4 androstendion et forstadium til testosteron, men kan omdannes til østrogen vha enzymet aromatase.

#### DHEA

DHEA er et steroidhormon, der fortrinsvis produceres i binyrerne (80-90%) og til dels i testiklerne (10-20%). DHEA secerneret fra binyrerne som det vandopløselige og kemisk mere stabile dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S). DHEA-S findes i 300-500 gange højere koncentration end DHEA. DHEA-S er inaktivt og anvendes som lager for DHEA. DHEA har en direkte indflydelse på lipidsyntesen og immunsystemet samt en indirekte effekt ved at indgå i syntesen af kønshormonerne testosteron og østrogen.

DHEA er på den ene side et anabolisk steroid og må derfor forventes at relatere til fysisk stress, men samtidig syntetiseres DHEA i binyrebarken, der også udskiller adrenalin og kortisol, og kan derfor forventes at være relateret til en psykisk påvirkning. DHEA udskilles via nyrerne som DHEA, DHEA-glucuronid, androsteron og DHEA-S. Der er betydelig køns- og aldersvariation. Niveau af plasma DHEA-S hos mænd i alderen 20-40/40-60 år er 3,0-12,0/1,0-10,0  $\mu\text{mol/L}$  og hos kvinder før/efter menopause 1,2-9,5/0,5-4,5  $\mu\text{mol/L}$ . Plasma DHEA-S falder med alderen.

DHEA og DHEA-S udviser kun lille døgnvariation med en ringe stigning i morgentimerne. Halveringstiden for DHEA-S i serum er 8-11 timer og for DHEA 30-60 minutter.

Undersøgelser tyder på, at nedsat koncentration af DHEA-S er relateret til forhøjet blodtryk og risiko for hjerte-karsygdomme. DHEA-S er derfor en interessant biomarkør at måle i forbindelse med arbejdspladsundersøgelser, hvor risikoen for hjerte-karsygdomme ønskes belyst.

#### *Testosteron og østrogen*

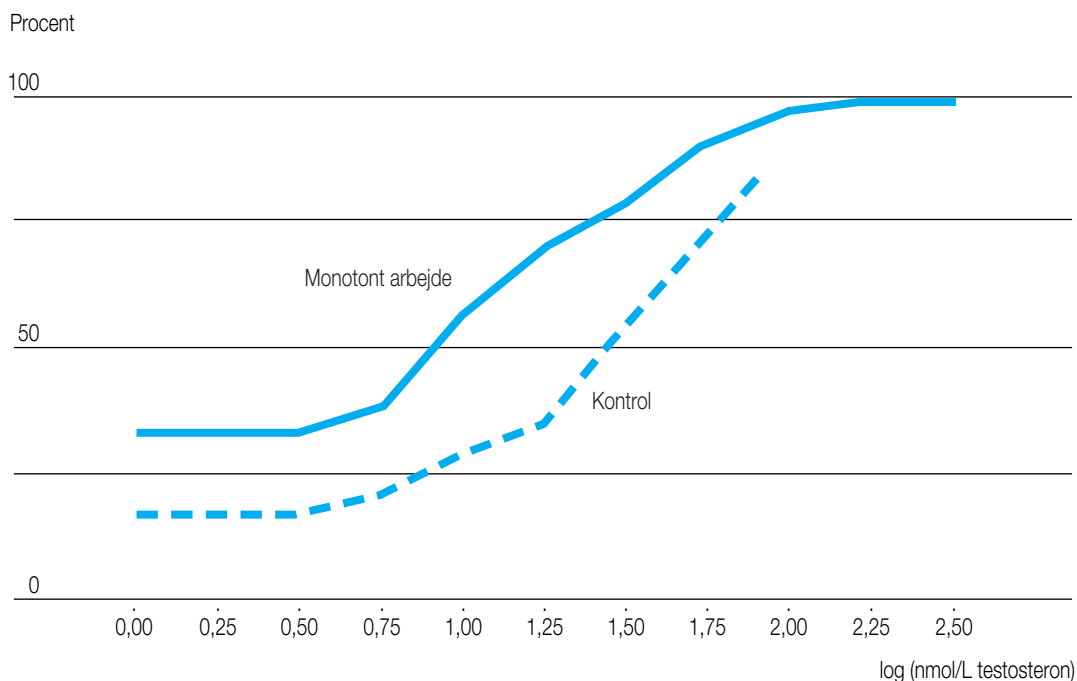
Testosteron og østrogen er kønshormoner med anaboliske effekter. De dannes i hhv testikler og æggestokke samt binyrebarken og perifert i forskellige væv ud fra forskellige forstadier. Dannelsen og sekretionen af testosteron stimuleres af luteiniserende hormon (LH) (fig. 7.1), og testosteron deltager i sin egen regulering ved et negativt feedback på hypofysens produktion og udskillelse af LH.

Mænd har ca 10 gange højere koncentration af testosteron i serum end kvinder. Koncentrationen af frit testosteron er stærkt afhængig af alderen og er for prøver taget mellem kl. 8 og kl. 10, 220-530 pmol/L for mænd og < 14,5 pmol/L for kvinder. Hos kvinder ses forhøjet testosteron ved bl.a. menstruationsforstyrrelser og infertilitet. For både kvinder og mænd falder østrogen med alderen, mest hos kvinder. Koncentrationen af østrogen varierer med menstruationscyklus.

Døgnvariation af testosteronkoncentrationen er ikke af praktisk betydning i relation til prøvetagning, dog er den let forhøjet i de tidlige morgentimer. Serumøstrogen vil være mindre egnet at måle i forbindelse med stressorer i arbejdsmiljøet pga af den store biologiske variation i forhold til menstruationscyklus og dermed store usikkerhed ved prøvetagningen. Ved at anvende testosteron som biomarkør er det derimod lettere at planlægge et måleforløb. Det kan dog være et problem at finde egnede analysemetoder, der er følsomme nok til at måle testosteron i serum hos kvinder.

En påvirkning fra en stressor medfører fald i LH og follikelstimulerende hormon, og dermed lavere niveauer af anaboliske hormoner. I en undersøgelse af intervention på forskellige kontorarbejdspladser fandtes signifikant stigning i testosteron hos den gruppe, der arbejdede positivt og aktivt med organisationsændringerne, sammenlignet med de passive grupper. De højeste niveauer af testosteron blev fundet hos kvinder, der rapporterede god egenindflydelse på eget arbejde. Endvidere viser tidligere undersøgelser lavere serum testosteronniveauer ved vedvarende fysisk træning. Hos en gruppe kvinder, der arbejdede ved processer med monotont arbejde og lav fysisk belastning,

blev fundet et signifikant lavere testosteronniveau i forhold til en gruppe kvinder, der ikke havde monotont arbejde (fig. 7.7). Dette kunne forklares ved, at lav fysisk belastning mobiliserer energi og nedsætter metabolismen med lavere serum testosteron til følge.

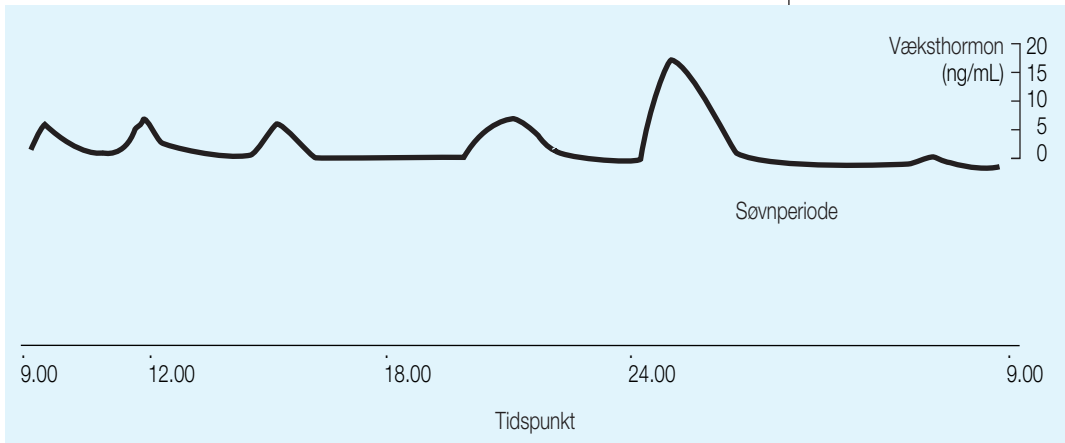


Figur 7.7. Frekvensfordeling af to jobgrupper mht testosteronkoncentrationen i serum.

#### *Somatotropin (væksthormon)*

Somatotropin dannes i hypofyseforlappen og kontrolleres primært af to hormoner fra hypothalamus, et hormon, der hæmmer, og et hormon, der stimulerer sekretionen. Med et system, der både hæmmer og stimulerer, vil niveauet af somatotropin til ethvert tidspunkt reflektere den relative grad af både stimulering og hæmning. Somatotropin udskilles fortrinsvis om natten (400-1000 pmol/L). Hos ikke-stressede personer, der spiser normalt, vil meget lidt væksthormon blive udskilt i løbet af dagen (fig. 7.8). Somatotropin fremmer vækst af knoglevæv, bruskvæv og bindevæv.

Somatotropin er sparsomt undersøgt i forbindelse med arbejdsbetingede stressorer. En tidligere undersøgelse viser ingen korrelation mellem væksthormon i plasma og antal sygdomsperioder. Ved kortvarig psykisk påvirkning i laboratorieforsøg er der vist en stigning i serum somatotropin.



Figur 7.8. Udskillelse af væksthormon i urin i forhold til tidspunkt på døgnet.

## Stress og andre fysiologiske processer

### *Thyroxin*

Thyroxin produceres i skjoldbruskkirtlen og er nødvendigt for almindelig vækst og udvikling. Thyroxin ( $T_4$ ) stimulerer via trijodthyronin ( $T_3$ ) (tilsammen thyreoidea-hormoner) iltforbruget i de fleste celler i kroppen og regulerer fedt- og kulhydratmetabolismen. Skjoldbruskkirtlen oplagrer, i modsætning til andre kirtler, store mængder af hormoner bundet til et stort protein (thyroglobulin). Sekretionen er styret af thyreoideastimulerende hormon (TSH) via en feedbackmekanisme fra hypofyseforlappen. Den foregår ved en enzymatisk frigørelse af  $T_4$  og  $T_3$  til blodet. Referenceintervallet for  $T_4$  hos voksne er 60-140 nmol/L serum.

Ved udsættelse for en stressor øges frigørelsen af TSH og dermed også frigørelsen af  $T_4$ . Der er dog enkelte resultater, der viser, at thyroxin i blod også kan falde, når individet er udsat for stressorer i arbejdsmiljøet.

### *Prolaktin*

Prolaktin dannes i hypofyseforlappen og stimulerer vækst og sekretion i andre kirtler. Prolaktin virker på flere organer, men stimulerer primært mælkekirtlerne. Middelværdien hos mænd er ca 35% lavere end hos kvinder (0,07-0,45 IU/L serum for mænd og 0,07-0,63 IU/L for kvinder, højest i den præmenopausale periode). Under graviditet ses stigende værdier op til 10 gange den normale koncentration. Koncentrationen af serum prolaktin udviser en udtalt døgnvariation med de højeste værdier 2-3 timer før opvågning. Hypothalamus har en hæmmende virkning på sekretionen.

Undersøgelser har vist, at individer, der passivt tilpassede sig en stressor, havde et højere niveau af prolaktin end under normale forhold. Derimod viste det sig, at individer, der aktivt tilpassede sig en stressor, havde uændrede og endda lavere niveauer af prolaktin i serum.

### *Melatonin*

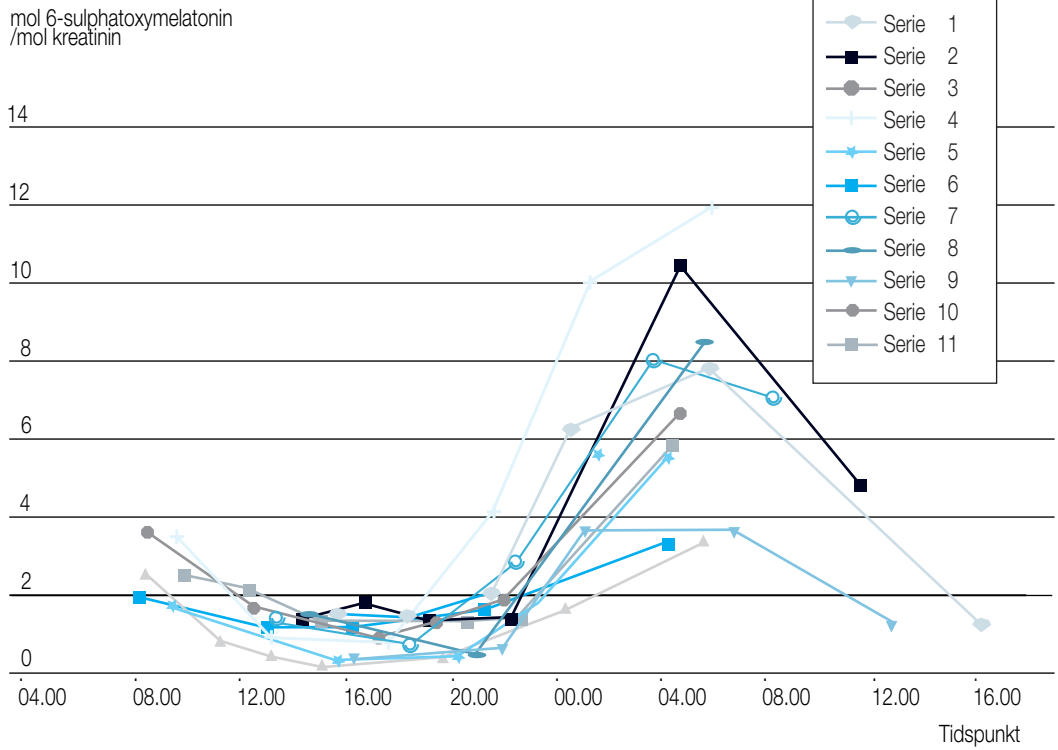
Melatonin biosyntetiseres og sekreteres i koglekirtlen (fig. 7.1) via en rytmisk døgnvariation med det højeste niveau i såvel spyt som plasma mellem kl. 24.00 og 6.00. Koglekirtlen er et lille organ, der ligger oven over hypothalamus i hjernen, og som oversætter fundamentale miljøinformationer, såsom dag- eller årstidsvariationer af lysintensitet og temperatur, til signaler, der modulerer nervesystemet. Noradrenalin øger aktiviteten af det enzym, der katalyserer melatoninindannelsen og på den måde sekretionen af serotonin. Melatonin er involveret i reguleringen af enzymatiske og ikke-enzymatiske reaktioner, der katalyserer elektronoverførsel i de naturligt forekommende radikaler. Melatonin har vist sig at være op til 5 gange bedre til at neutralisere OH-radikalet end vitamin E. Mere end 85% secerneret melatonin nedbrydes i leveren og udskilles i urinen som 6-sulfatoxymelatonin. Hos voksne mennesker har koncentrationer af 6-sulfatoxymelatonin vist sig at være et mere robust mål for koncentrationen af melatonin i plasma. Døgnudskillelse af 6-sulfatoxymelatonin i urin er vist i fig. 7.9. Der ses ingen kønsvariation hos voksne mennesker.

Lys undertrykker sekretionen af melatonin, og denne undertrykkelse er afhængig af lysets intensitet (fig. 7.10). Det ville være interessant at undersøge udskillelsen af melatonin i forhold til skifteholdsarbejde, hvor netop lysforholdene er forskellige, samtidig med at døgnrytmen er forskubbet.

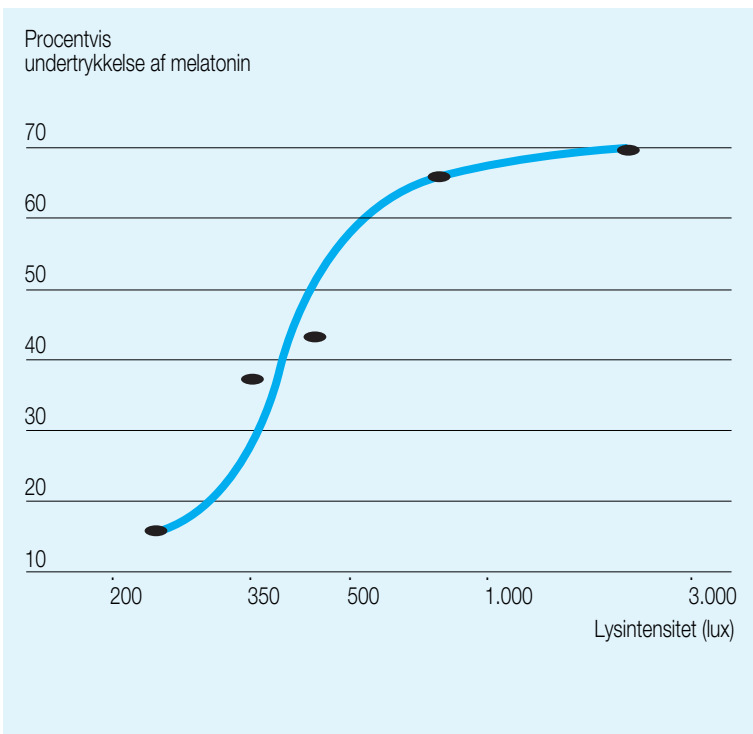
## Stress og markører for immunsystemet

Akutfaseproteiner er proteiner, hvis koncentration i plasma forøges med mere end 25% som følge af en inflammatorisk reaktion. Ændring i akut-fase-responset ses 6-24 timer efter stimulering. Akutfaseproteiner, som bl.a. omfatter fibrinogen og antithrombin III, dannes i leveren og secernerer i blodbanen.

Immunsystemet producerer cytokiner og andre 'humorale' faktorer for at beskytte organismen mod inflammatoriske stoffer, mikrobiel påvirkning og andre skader, fx cancer. Cytokiner dannes bl.a. i T- og B-celler, fibroblaster, makrofager og epitel-



Figur 7.9. Døgnprofil for udskillelse af melatonin målt som udskillelse pr time i urin af metabolitten 6-sulfatoxymelatonin.



Figur 7.10. Undertrykkelsen i procent af melatonin som funktion af lysintensiteten. (McIntyre et al., 1989).



celler. De fungerer som signalstoffer mellem celler. De fleste cytokiner er multifunktionelle. Interleukiner (IL) hører til gruppen af cytokiner. IL-6 er fx involveret i B- og T-celledifferentiering, makrofagdifferentiering og akutfaseproteinsyntese. IL-6 er nævnt i forbindelse med stress som følge af operation eller feber hos rotter. IL-6 stiger, når adrenalin og kortikosteron stiger.

Målinger af interleukiner er vanskelige at fortolke i forbindelse med undersøgelser af effekter af stressorer i arbejdsmiljøet, idet de især frigøres i forbindelse med infektioner og andre påvirkninger af immunsystemet.

## Oxidativt stress

Fysisk og psykisk påvirkning har en effekt på DNA, idet antallet af oxidative skader øges. Dette kan fx være en følge af øget dannelse af reaktive oxygenmolekyler (ROS) dannet ved cellernes stofskifte samt ved oxidation af fremmedstoffer og arachidonsyre. ROS kan ligeledes dannes ved kraftig celleaktivitet samt metabolisme af hormoner som adrenalin og noradrenalin. Som forsvar mod de oxidative angreb har cellerne meget høj aktivitet af antioxidative enzymer, som kan inaktivere ROS. Aktiviteten af de antioxidative enzymer hos det enkelte individ er betinget af en række arvelige faktorer, af kostens indhold af specielt svovlholdige forbindelser og eksponering fra fx rygning samt påvirkninger fra arbejdsmiljøet af kemisk, biologisk og mikrobiologisk art. Et eksempel på en markør for oxidativt stress er 8-hydroxydeoxyguanosin målt i urin.

## Prøvetagningsstrategi

Ved anvendelse af biomarkører som effektmarkører for eksponering for en eller flere stressorer i arbejdsmiljøet i et biomonitoringsmåleprogram er der en række forudsætninger, der skal være opfyldt eller undersøgt:

- ◆ Biomarkørerne skal kunne måles i egnet biologisk prøvemateriale.
- ◆ Analysemetoderne skal være følsomme, specifikke, reproducerbare og robuste.

- ◆ Biomarkørerne skal kunne relateres til påvirkning fra stressorer (psykiske og/eller fysiske).
- ◆ Niveauer af biomarkørerne skal kunne tolkes mhp helbredsrisiko ved fx langtidsstudier.

En række faktorer kan bidrage til variation i respons, når der måles i biologisk materiale:

- ◆ Individuer reagerer forskelligt på stressorer, hvilket bl.a. giver anledning til forskellige hormonrespons.
- ◆ Nogle hormoner produceres i flere organer i kroppen, fx produceres testosteron både i testikler og binyrebarken. Endvidere dannes en del testosteron perifert, dvs lokalt i forskellige væv ud fra forstadier (precursors) til testosteron, fx dehydroepiandrosteron.

Den målestrategi, der anvendes, kan være mere eller mindre robust over for konfoundere. En række konfoundere, fx køn, rygning og kost, vil man være i stand til at udelukke ved at matche med en egnet kontrolgruppe. Endvidere kan der være aldersmæssige og sygdomsrelaterede forskelle, fx er HbA<sub>1c</sub> højere hos ældre og hos individer med diabetes. Der er generelt meget store individuelle forskelle i hormonniveauer i urin og blod. Hvis man undersøger ændringer, kan det derfor være en fordel at anvende individet som sin egen kontrol i stedet for en kontrolgruppe.

## Prøvemateriale

De ovenfor nævnte biomarkører kan måles i forskellige biologiske medier: blod, urin og sput. I tabel 7.1 er nævnt, hvilke medier der tidligere har været anvendt til måling af de i dette kapitel nævnte hormoner og metaboliske stoffer.

## Analysemetoder

I tabel 7.2 er givet en oversigt over, hvilke analysemetoder der er tilgængelige til måling af de omtalte hormoner eller metaboliske stoffer.

For at kunne bruge analyseresultater er det nødvendigt, at kvaliteten af målemetoderne er dokumenteret. Grundlæggende må man stille tre krav til dokumentationen: dokumentation af analysemetoden (dvs beskrivelse af måleproceduren), dokumentation af analysemetodens ydeevne, samt dokumentation af kvalitets-

Komponent/analysemetode		Højtryksvæske-kromatografisk metode	Radioimmun assay	Enzym assay
Katekolaminer	serum	X <sup>a</sup>	X <sup>a</sup>	
	urin	X <sup>a</sup>	X <sup>a</sup>	
Kortisol	serum		X	
	spyt		X <sup>b</sup>	
	urin		X	
HbA <sub>1c</sub>	fuldblod	X		
Kolesterol og triglycerider	plasma			X
	serum			X
Testosteron	serum		X	
Østrogen	serum		X	
DHEA-S	serum			X
	urin			X
Somatropin	plasma			X <sup>a</sup>
	urin			X <sup>a</sup>
Thyroxin	serum		X	
Prolaktion	serum		X	
Melatonin	serum		X	
	urin		X	
Beta-endorfin	plasma		X <sup>a</sup>	
Immunoglobuliner	serum			X
	spyt			X

a Kræver speciel behandling ved prøvetagning

b Kræver særlig ekstraktion

Tabel 7.2. Hormoner og principper for analysemetoder i biologiske medier.

kontrollen, som er udført under selve målingen. Alle tre former for dokumentation er vigtig, og manglende dokumentation kan føre til, at tilliden til et analyseresultat svækkes, og i værste fald at resultatet er ubrugeligt. De samme principper gælder også for metoder til prøvetagning.

## Konfoundere

Alders- og kønsvariation er omtalt under de enkelte afsnit. Her opsummeres alders- og kønsvariation for de omtalte hormoner og metaboliske stoffer. Biomarkører, hvor alderen spiller en stor rolle, er katekolaminer, HbA<sub>1c</sub>, DHEA og østrogen. Hos mænd ses højere niveauer af både DHEA og testosteron i serum end hos kvinder. Sekretionen af katekolaminer er også højere hos

mænd. En anden vigtig konfounder er forskelle mellem etniske grupper, som er påvist for HbA<sub>1c</sub>.

Effekter fra konfoundere kan man forsøge at kontrollere for med egnede kontrolgrupper eller ved at anvende individet som sin egen kontrol. Egnede statistikprogrammer kan endvidere medtage konfoundere i de statistiske modeller for derved at kontrollere for effekt af konfoundere.

Døgnvariationen i de forskellige biomarkører skal der tages højde for ved prøvetagning, enten ved at opsamle prøver under standardiserede forhold, eller ved at opsamle prøver over hele døgn.

## Biologiske monitoringsprogrammer

Dette kapitel har forsøgt at give en status over måling af hormoner i forbindelse med påvirkninger fra stressorer. Ved biologisk monitoring er der mulighed for at vurdere den faktiske ændring i metaboliske processer som følge af en påvirkning - "den indre belastning". Ved start af biologiske monitoringsprogrammer bør en række krav opfyldes. Prøvetagning skal være uden risiko og ulemper for de undersøgte. Dette kriterium er opfyldt, når det drejer sig om analyser fra blod, spyt og urin. Prøvetagningsstrategi og analysemetode skal være dokumenteret. Biologiske variationer skal foreligge eller indgå som en del af undersøgelsen ved fx at indgå i prøvetagningsstrategien. Afslutningsvis skal det bemærkes, at for at måleresultater fra biologisk monitoring i arbejdsmiljøet kan tolkes mhp helbredsrisiko, sundhedsfremmende og sygdomsforebyggende indsats, er det nødvendigt med et snævert samarbejde.

## Udviklingstendenser

En række fysiologiske processer aktiveres, andre deaktiveres, og nogle ændres ikke ved stresspåvirkning. Det er derfor ikke muligt at udpege én biomarkør for fysiologiske effekter af stresspåvirkninger, men snarere en række ændringer i forskellige hormonkoncentrationer. Der arbejdes i den internationale litteratur med risiko for helbredsskader ved aktivering af kataboliske processer og deaktivering af anaboliske processer igennem længere tid. Anvendelse af multivariat dataanalyse (kemometri) kunne i fremtiden indgå som et vigtigt redskab til tolkning af biomarkørdata i forhold til spørgeskemadata. Der er behov for at vali-

dere udvalgte biomarkører og mønstre heraf i relation til helbredseffekter af samtidige kemiske, ergonomiske og psykosociale påvirkninger og samspilseffekter heraf, samt belyse effekter af arbejdsmiljøets påvirkning på aldringsprocessen.

## Litteratur

- Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *The FASEB Journal* 1990;4:2860-2867.
- Cerami A. Inflammatory cytokines. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1992;62(1):S3-S10.
- Clot P, Tabone M, Aricò S, Albano E. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut* 1994;35:1637-1643.
- Delbende C, Delarue C, Lefebvre H, et al. Glucocorticoids, transmitters and stress. *British Journal of Psychiatry* 1992;160 suppl 15:24-34.
- Frankenhaeuser M. The sympathetic-adrenal and pituitary-adrenal response to challenge: Comparison between sexes. In: Dembroski TM, Schmidt TH, Blümchen G (eds). *Behavioral bases of coronary heart disease*. New York: Karger, 1983:91-105.
- Friedman M, Rosenman RH, Carroll V. Changes in the serum cholesterol and blood clotting time in men subjected to cyclic variation of occupational stress. *Circulation* 1958;18:852-861.
- Ganong WF. *Review of medical physiology*, 12th ed. Los Altos, California: LANGE Medical Publications, 1983:1-654.
- Goth A. *Medical pharmacology*, 9th ed. Saint Louis: C.V. Mosby Company, 1978:1-766.
- Kristensen TS. Cardiovascular diseases and the work environment. *Scand J Work Environ Health* 1989;15:165-179.
- Kushner I. The acute phase response: An overview. *Methods Enzymol* 1988;163:373-382.
- Lehninger AL. *Principles of biochemistry*, New York: Worth, 1982:1-1011.
- Loft S, Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K, Poulsen HE. 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA-damage. *J Tox Environ Health* 1993;40:391-404.
- Lorentzen I, Bendixen G, Hansen NE. *Medicinsk kompendium*, 14th ed. København: Nyt Nordisk Forlag Arnold Busk, 1994:1-2908.

- Meikle AW, Daynes RA, Araneo BA. Adrenal androgen secretion and biologic effects. *New Aspects of Adrenal Cortical Disease* 1993;381-400.
- Morley JE. Neuropeptide Y: A new stress Hormone? In: Weiner H, Florin I, Murison R, Hellhammer D (eds). *Frontiers of stress Research*. Hans Huber Publishers, 1993.
- Netterstrøm B. Psykosocial arbejdsbelastning og iskæmisk hjertesygdom. København: Lægeforeningens Forlag, 1993:5-19.
- Rose RM, Jenkins CD, Hurst M, Kreger BE, Barrett J, Hall RP. Endocrine activity in air traffic controllers at work. III. Relationship to physical and psychiatric morbidity. *Psychoneuroendocrinology* 1982;7:125-134.
- Skov T, Andersen JH, Bach E, et al. Projekt om forskning og intervention i monotont arbejde [Project on Research and Intervention in Monotonous work]. 1994;(Abstract).
- Theorell T. Prolactin - A hormone that mirrors passiveness in crisis situations. *Integrative Physiological and Behavioral Science* 1992;27(1):32-38.
- van Gool J, van Vugt H, Helle M, Aarden LA. The relation among stress, adrenalin, interleukin 6 and acute phase proteins in rat. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1990;57:200-210.
- Vejledning, Medicinsk Laboratorium A.S., 8th ed. København: Medi-Lab, 1994:1-127.
- Ørhede E, Nord-Larsen M, Burr H, Nielsen J. Lønmodtagernes arbejdsmiljø 1990. Arbejdsmiljøfondet, København, 1992.

# Stikord - bind I - II

## A

Absorption I:28, 58  
 - peroral I:35  
 - pulmonal I:30  
 Absorptionsfraktion I:36, 61  
 Absorptionshastighed I:35  
 Absorption, dermal I:28  
 Acetylators, slow I:49  
 - rapid I:49  
 ACGIH I:221  
 Acrylamid II:244  
 Acrylonitril II:244  
 Adaption I:24  
 Additiv effekt I:25  
 Adfærdsmæssige effekter II:257  
 ADI-værdier I:95  
 Adjuvans-effekt II:166  
 Adrenalin II:259  
 Affinitet I:19  
 Aflivning I:80  
 Agonist I:19  
 Akkumulation I:17  
 Akson II:211  
 Aksonal transport II:216  
 Aksonet (nerveudløber) II:207  
 Aktionspotentialer II:209, 211  
 Aktiv transport I:28  
 Aktivering, metabolisk II:46  
 Akut stress II:254  
 Akut toksicitet I:81  
 Alder I:24, 50  
 Alfa-1-antirypsin I:197, 198, 200, 206  
 Allergi I:168, 185, 200, 204, II:146, 172  
 - kriterier for II:197  
 Allergilister II:197  
 Allergisk alveolit II:185  
 Allergisk astma II:180  
 Allergisk kontaktestem II:177  
 Aluminium II:243  
 Ames test II:28

Amning I:57  
 Anaboliske processer II:255  
 Analogislutninger II:127  
 Analysemetoder I:173  
 Androgen receptor assay II:126  
 Anekdotiske observationer II:84  
 Aneugene stoffer II:40  
 Antagonisme I:25  
 Antagonist I:20  
 Antigenpræsenterende celler (AP-celler) II:150  
 Antistoffer I:169  
 Antistofklasser II:153  
 Arbejdsbelastning I:156  
 Arbejdsdygtighed I:204  
 Arbejdsmedicin I:183  
 Arbejdsmiljørådet I:220  
 Arbejdstilsynet I:220, II:92  
 Artsvariation I:49  
 Art-til-art sammenligning I:123  
 Arveanlæg (DNA) II:10  
 Arveligt materiale II:12  
 Aryl hydrocarbon (AH) receptor assay II:126  
 Astma I:169, 204, II:195  
 Atopi II:174  
 ATP I:112  
 AUC I:62

## B

Bakterietests II:28  
 Barrierer, biologiske II:16  
 B-celler II:153  
 Befolkningsundersøgelser, analytiske II:115  
 - beskrivende II:115  
 Beta-endorfin II:265  
 Bevægeapparatbelastninger I:166  
 BIAS I:128, 134  
 - andre former I:137  
 Bias-minimering I:142

Bilæz udskillelse I:52  
 Bindende grænseværdier I:222  
 Bioaktivering I:48  
 Biologisk halveringstid I:60, 63, 172  
 Biologisk monitoring I:157  
 Biologiske barrierer II:16  
 Biologiske grænseværdier (BLV) I:177, 218, 242  
 Biologiske membraner I:25  
 Biomarkører I:156, 202  
 Biomedicinske forskningsprojekter I:204  
 Biotilgængelighed "F" I:62  
 Biotilgængelighed I:64  
 Biotransformation I:44, 172  
 Blandinger I:235  
 Blod I:169  
 Blodglucose II:264  
 Blod-hjerne barriere I:42  
 Bly I:179, II:223, 242  
 Blærecancer I:161  
 Branchebillede II:93  
 Brodie-Gillettes kasse-model I:36  
 Brystkræft I:208, II:67  
 BST-centre I:269

## C

Calciumkanaler II:212  
 CAM, den chorioallantoide membran I:117  
 CAM-test I:118  
 Cancerepidemiologi II:84  
 Cancerregistret II:65  
 Carbamater II:246, 248  
 Carbondioxid II:241  
 Carbondisulfid II:244  
 Carbonmonoxid II:241, 242

- Carcinogenese II:72  
 Carcinogenese, kemisk II:50  
 Carcinogener, kemiske I:238, II:71  
 Case-referent undersøgelse I:139  
 CAS-nummer I:249  
 Cellebeskadigelse I:111  
 Cellefunktion I:104  
 Celle-medieret immunitet II:157, 159  
 Cellemembran I:25  
 Celler, slimproducerende I:31  
 Cellecycklus II:15  
 Celletoksicitet I:121  
 Cellulosefortynder II:246  
 Central kompartiment (blod) I:58  
 Centralnervesystem (CNS) I:161  
 Cerebrale symptomer I:145  
 Cholinesterase I:162  
 Chow-foder I:79  
 Chrom I:170  
 Cisplatin I:181  
 Clearance, den totale I:60, 63  
 - den renale I:60  
 CORROSITEX™ test I:110  
 CT-skanning II:237  
 Cyanid II:241  
 CYP 450-varianter I:195  
 CYP1A1 I:195  
 CYP2D6 II:196  
 CYP2E1 I:195  
 Cystostatika I:181  
 Cyt.P450-system I:56  
 Cytochrom P450-system I:47  
 Cytogenetisk test II:51  
 Cytokrom P-450-enzym I:195  
 Cytotoksisk effekt II:18
- D**  
 Danske regler II:87  
 Data fra dyreforsøg I:233  
 Data, humane I:232
- Databaser I:251  
 Databaseværter I:255  
 Datakilder I:250  
 Datasøgning I:249  
 Dehydroepiandrosteron (DHEA) II:265  
 Demyelinisering II:213  
 Dendritter II:207  
 Dermal absorption I:28  
 Dermis I:28  
 Det enterohepatiske kredsløb I:53  
 DHEA II:266  
 Dietary Restriction (DR) I:80  
 Diethylether, halothan II:246  
 Diffusion I:26, 57  
 Diffusionshastighed I:27  
 Dimethylsulfoxid (DMSO) I:30  
 DNA I:112  
 DNA-addukter I:159, 163, II:16  
 DNA-analyse I:207  
 DNA-molekyler II:12  
 DNA-repair II:32  
 DNA-reparation I:198  
 DNA-reparationsaktivitet I:164  
 DNA-reparationsmekanismer I:199  
 DNA-sekvens II:10, 14  
 DNA-skade I:163  
 DNA-skader, primære II:16  
 DNA-syntese (UDS) I:164  
 DNA-syntese II:81  
 DNA-teknikker II:11, 32  
 Dokumentation I:234  
 Dominant letal-test II:42  
 Dopamin I:162  
 Dosering I:80  
 Dosering, gentagen (kronisk) I:85  
 - gentagen (subkronisk) I:85  
 Dosis I:61  
 Dosis-effekt I:202  
 Dosis-effekt relationer I:177  
 Dosis-respons II:181  
 Dosis-respons relation I:20
- Dynamisk ligevægt I:66  
 Dyr, kimfri I:77  
 Dyreart I:74  
 Dyreeksperimentelle testmetoder II:166  
 Dyreeksperimentelle undersøgelser II:117, 122  
 Dyreetiske hensyn I:71  
 Dyreforsøg I:233, II:85  
 - lov om I:94  
 Dyremodeller I:72, II:193  
 Dyrestamme I:74
- E**  
 ECVAM I:93  
 EF-direktiv I:183  
 Effekt I:28  
 Effekt, "first pack" I:62  
 Effekt, lokal I:17  
 - organspecifik I:18  
 - systematisk I:18  
 Effekter, genotoksiske I:102  
 Effekter, non-mutagene II:56  
 Effektmodifikation I:128, 131, 132  
 Eksperimentel toksikologi I:13  
 Eksponering, akut I:16  
 - kronisk I:16  
 - subakut I:16  
 - subkronisk I:16  
 Eksponeringskontrol I:183  
 Eksponeringsmarkører I:159, 162  
 Eksponeringsscenerier II:90  
 Eksponeringsveje I:17  
 Eksponeringsvurderinger I:14  
 Ekstrapolation I:69  
 Electro Encephalografi (EEG) II:233  
 Elektoretinogrammer II:219  
 Elimination I:44  
 Embryonale periode, den II:108



- Endepunkter, genetiske II:20
- Endoplasmatisk retikulum I:45
- En-kompartiment model I:58
- Enzymer, metaboliserende I:194
- Enzymhæmning I:51
- Enzyminduktion I:51
- Enzymsystemer, mikrosomale I:44
- Epidemiologi, analytisk I:128
- toksikologisk I:128
- Epidemiologiske undersøgelser II:84
- Epidermis I:28
- Ernæringstilstand I:50
- Etik I:203
- Etisk debat I:206
- Etisk spørgsmål I:191
- Etiske overvejelser I:182
- Etnisk/genetisk variation I:49
- EU-kriterier II:128
- EU-regi I:183
- Evoked potentials (EVP) II:233
- Extensive Metabolizers (EM) I:196
- EYTEX™ test I:109
- F**
- Faglige foreninger I:269
- Fagocytose I:33
- Fagtidsskrifter I:266
- Faktorer, fysiologiske I:50
- ydre I:50
- Falsk negative testresultater II:45
- Falsk positive testresultater II:45
- Farlighedsvurderinger I:14
- Fase 1 metabolisme I:194
- Fase 2 metabolisme I:194
- Fase I reaktion I:46, 47
- Fase II reaktion I:46, 47
- Fearon-Vogelstein modellen II:76
- Fedtvæv I:171
- Fertilitet II:26, 101
- Fibroblaster I:119
- Ficks lov I:26
- Filtration I:54
- Fimrehår I:31
- First pass effekt I:62
- Flertrinstestning II:58
- Foder (fodring) I:78
- Fodring (foder) I:78
- Forbrændingsprodukter I:159
- Fordelingsforhold I:33, 35, 44
- Fordelingsforhold blod/luft I:57
- Fordelingsforhold organ/blod I:57
- Fordelingskoefficient I:108
- Fordelingsrum, det tilsyneladende  $V_d$  I:38
- Fordelingsrum I:37, 61
- Forebyggelse, primær II:200
- sekundær II:201
- Forebyggelsesstrategier II:83
- Forplantning II:106
- Forskningsbiblioteker I:268
- Forsvarsmekanismer II:79
- Forsøgsallergener II:183
- Forsøgsdyrarter I:87
- Forudsigelsesmodel I:107
- Forudsigelsesværdi II:48
- Fosterperiode II:109
- Fosterskader I:88, II:100, 106
- Fostertilstand II:104
- Fostervand I:43
- Fototoksicitet I:122
- Fremmedlegemer II:156
- Freon 113 II:246
- Fri fraktion I:37, 42, 55
- Frit væsdepot I:37
- Frie radikaler I:52
- Functional Observational Battery (FOB) II:229
- Fyldningsgrad I:35
- Fysiologisk model I:40
- Fysiologiske effekter, akutte II:257
- Fysiologiske faktorer I:24, 50
- Fysiologiske forhold I:77
- Fænotype I:161, 183
- Føde I:175
- Følsomhed I:160
- individuel I:190
- øget I:192
- Følsomhedsgener I:193
- G**
- Gasser (dampe) I:31, 33
- Gasser, metaboliserbare I:35
- Generationsforsøg II:118
- Genernes rolle I:200
- Genetisk materiale II:19
- Genetisk monitoring II:12, 51
- Genetisk screening I:191, 206
- Genetisk test I:208
- Genetisk variation I:23
- Genetiske dispositioner I:192
- Genetiske endepunkter II:20
- Genetiske forhold I:23
- Genetiske skader II:22, 26
- Genetiske tests I:200
- Genetiske ændringer II:24
- Genmutationer II:11, 113
- Genotoksicitet I:89, II:10
- Genotoksiske effekter I:102
- Genotoksiske kemikalier II:17
- Genotype I:161
- Giftinformation I:260
- Giftlære I:10
- Gliaceller II:209
- Glial fibrillary acid protein (GFAP) II:234
- GLP I:92
- Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6Pdh) I:190
- Glutathion S-transferaser

(GST) I:196  
 Glutathionkobling I:48  
 Glutathion I:52  
 Grænsestreng II:217  
 Grænseværdier I:212  
 - bindende I:222  
 - biologiske I:177, 218, 228, 242  
 - definition af I:216  
 - hygiejniske (HGV) I:215  
 - i EU I:222  
 - pragmatiske/bindende I:225  
 - retningsgivende (indikative) I:222  
 - sundhedsbaserede I:225  
 GV (grænseværdi) I:216  
 Gærtests II:24

## H

Halveringstid, biologisk I:60, 63, 172  
 Handskemateriale I:29  
 Handsker I:29  
 HbA<sub>1c</sub> II:264  
 Helbredsrisiko I:157  
 Helbredstest I:190, 204  
 Henderson-Hasselbach ligning I:27, 55  
 Henles slynge I:56  
 Hepatitis virus II:90  
 Hexacarboner II:246  
 Histidin-mutation II:29  
 Hjerte-kar lidelser I:200  
 Homeostase II:255  
 Hormoneffekter II:125  
 Hormoner I:167, 185  
 HPRT-test II:33  
 HTD (Highest Tolerated Dose) I:114  
 Hudirritation I:84  
 Hudkræft II:69  
 Hudnotation I:240  
 Hudoptagelse I:228  
 Humane data I:232  
 Humoral (antistofafhængig) immunitet II:157, 160  
 Husstøvmider II:183  
 Hvilepotentiale II:210

Hydrogenperoxid I:51  
 Hydrogensulfid II:241  
 Hydroxylradikal I:51  
 Hygiejniske grænseværdier ((HGV) I:215  
 Hæmaglobin I:164  
 Hæmatoxylen-farve II:231  
 Høfeber II:180  
 Hørelse II:219  
 Høreskade II:222  
 Håndbøger, opslagsværker mv I:261  
 Hårceller II:219

## I

IARC-liste II:88  
 Iltforbindelser, reaktive I:51  
 Immunforsvar II:146  
 Immunpatologi II:157  
 Immunsuppressive påvirkninger II:161  
 Immunstimulation II:146, 162  
 - testmetoder for II:164  
 Immunsuppression II:80, 146  
 Immunsuppressive stoffer II:163  
 Immunsystemet II:147, 270  
 In vitro forsøg I:102  
 In vitro systemer I:105  
 In vitro tests II:124  
 In vitro toksikologi I:102  
 In vivo forsøg I:106  
 In vivo respons I:105  
 In vivo tests, korttids II:120  
 Incidens I:130  
 Incidensanalyse I:131  
 Incidensrate, den kumulative I:130  
 Indavl I:75, 76  
 Indeklimaproblemer I:167  
 Industrikemikalier II:224  
 Inflammatorisk reaktion II:155  
 Informationsbias I:136  
 Initering II:77

Interaktioner I:24  
 International Labour Organisation (ILO) I:217  
 Internet I:256  
 Ionkanaler II:211  
 Ion-trapping I:27  
 Irritation II:180

## K

Kaliumkanaler II:212  
 Kataboliske processer II:255  
 Kemikalier, genotoksiske II:17  
 Kemiservice I:260  
 Kemisk carcinogenese II:50  
 Kemiske carcinogener I:238, II:71  
 Kemiske klastogener II:37  
 Kemoprævention II:86  
 Keratinocytter I:119  
 Key-documents I:226  
 Kimfri dyr I:77  
 Kinetiske forhold II:110  
 Klassificering I:95  
 Klastogener, kemiske II:37  
 Klinefelter's syndrom II:106  
 Klinisk toksikologi I:11  
 Knoglevæv I:42  
 Kohorteundersøgelse I:140, II:116  
 Kolesterol II:264  
 Komet assay II:35  
 Kompartiment I:38  
 Kompetitiv I:20  
 Kompetitiv hæmning I:55  
 Kompleksbinder I:36  
 Komplementsystem II:155  
 Konfounder I:128, 133  
 Konsulentvirksomheder I:268  
 Kontaktallergener, vigtige II:198  
 Kontaktallergi I:84, II:178

- sensibilisering II:177
  - udløsning II:177
  - Kontaktseksem II:173
  - Kontraktilitet I:103
  - Kortisol II:261
  - Korttidforsøg II:86
  - Kortidsgrænseværdi (STEL) I:235
  - definition af I:235
  - Kredsløb, det enterohepatiske I:53
  - systemisk I:62
  - Krigsgasser II:224
  - Kriteriedokumenter I:226
  - Kriterier for allergi II:196
  - Kromosomafvigelsesanalyse II:38
  - Kromosomafvigelser I:90, 185, II:26, 36, 113
  - numeriske II:42
  - strukturelle II:42
  - Kromosomale mutationer II:36
  - Kromosomfejl II:107
  - Kromosomskader I:197, II:53
  - Kronisk stress II:255
  - Krydsallergi II:184
  - Kræft I:87, 185
  - Kræft, forebyggelse af II:83
  - Kræftformer I:200
  - Kræftfremkaldende stoffer, registrering af II:92
  - Kræftgener I:164
  - Kræfthyppighed I:160
  - Kræftudvikling II:64, 68
  - Kvalitetskontrol I:93
  - Kvalitetsudvalg, videnskabeligt I:219
  - Kviksølv II:242
  - Kønscellemutagen II:42
  - Kønshormonbalance II:106
- L**
- Laboratorieundersøgelser I:233
  - Lappetest II:188
  - LC<sub>50</sub> I:20, 82
  - LD<sub>50</sub> I:20, 82, 114, 115
  - Letal-test, dominant II:42
  - Ligevægt, dynamisk I:66
  - Lillehjerne II:216
  - Lipidopløselighed I:27
  - Lipofile substanser I:36
  - Livstidsprævalens I:129
  - LOAEL (lowest observed adverse effect level) I:22
  - LOEL (lowest observed effect level) I:22
  - Loftsværdier I:218
  - Lokal effekt I:17, 28
  - Loudness recruitment II:221
  - Lovgivning II:57, 202
  - Lovgivning og etik I:203
  - Lovgivningskrav I:156
  - Luftmålinger I:181
  - Luftvejsallergi II:175, 190
  - Luftvejssensibiliserende stoffer I:239
  - Luftvejssensibilisering I:240
  - Lungekræft II:66
  - Lungesyntomer I:198
  - Lymfocyt-proliferationstest (LTT) II:189
  - Lymfocytter II:44, 148
- M**
- MAK I:221
  - Makroglia II:209
  - Maksimaleffekt I:19
  - Mangan I:163, 184, II:242
  - Manganeksponering I:176, 181
  - Markører I:203
  - MAS-værdi I:108
  - Mave- og tyktarmskræft II:66
  - Maximum Tolerated Dose (MTD) I:88
  - Melatonin II:270
  - Membraner, biologiske I:25
  - Metaboliserende enzymer I:194
  - Metabolisering (biotransformation) II:111
  - Metaboliseringsreaktion, toksisk I:51
  - Metabolisk aktivering I:106, II:46
  - Metabolisk aktivering (S9-mix) II:29
  - Metabolisme I:103, 170, 197
  - Metabolitter, reaktive I:47
  - Metaleksponering I:182
  - Metaller II:224
  - Methylenchlorid II:246
  - Middelpasmakonzentration I:65
  - Mikrobiologisk status I:76
  - Mikroglia II:209
  - Mikrokerner II:40
  - Mikrokernetest II:38
  - Mikrosomale enzymsystemer I:44
  - Miljøpåvirkning I:193
  - Miljøstyrelsen II:92
  - Misdannelsesregistret II:101
  - Modellering I:180
  - Modstandsdygtighed II:157, 161
  - Molekylærepidemiologiske undersøgelser I:202
  - Monitering, biologisk I:157
  - genetisk II:12, II:51
  - Moniteringsprogrammer I:183
  - Monogene sygdomme I:192, 207
  - Morris Water Maze II:236
  - Motilitet I:35
  - MPTP II:223, 249
  - MTT-test I:116
  - Muse-lymfom test II:34
  - Mutagener I:239
  - Mutationer, punkt- II:28
  - Myndigheder og sektorforskningsinstitutter I:268
  - Målefejl I:173
  - Måleresultater, fortolkning af I:182
  - Målestrategi I:157

**N**

N-acetyltransferase (NAT) I:196  
 Na-K-ATP-ase II:211  
 Natrium-kalium-ATP-ase II:210  
 Natriumkanaler II:212, 225  
 Nefronet I:54  
 Nernst ligning II:210  
 Nerveskader, medfødte II:119  
 Nervesystem, perifere (PNS) I:161  
 Neurofarmaka II:224  
 Neurofibriller II:216  
 Neurologisk undersøgelse II:236  
 Nerveledningshastighed II:236  
 Neurologiske symptomer II:224  
 Neuroner II:207  
 Neurotoksicitet I:89, 162, II:228  
 Neurotoksicitetstest II:229  
 Neurotoksin II:224  
 Neurotransmittere I:103, II:215  
 N-hexan II:223  
 Nissel farvning II:232  
 Nitrogenoxid II:241  
 NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) I:22, 70  
 NOEL (No Observed Effect Level) I:22  
 Nonkompetitiv I:20  
 Non-mutagene effekter II:56  
 Noradrenalin II:259  
 NRU-test (neutralrødt optagelsestest) I:115

**O**

Observationer, anekdotiske II:84  
 Odds ratio (OD) I:132  
 OECD-guidelines I:90, II:27

Offentlige institutioner I:268  
 Oogenese (ægceller) II:105  
 Opheling II:156  
 Opslagsværker, håndbøger mv I:261  
 Opstaldning I:80  
 Optagelseshastighed I:35  
 Organochlor II:249  
 Organspecificitet I:18  
 Organophosphater II:247, 249  
 Ostwalds koefficient I:34  
 Overfølsomhed II:176  
 Oxidativt stress I:52, 164 II:272

**P**

Pacth-Clamp II:233  
 Papilskader I:55  
 Parasympatiske system II:218  
 Partialtryk I:34, 43  
 Partikler I:31  
 Passiv rygning I:167  
 PCA "mønstergenkendelse" I:180  
 PCR-teknik I:200  
 Perifert kompartiment (muskler, fedtvæv, knogler etc) I:58  
 Perifere nervesystem I:161  
 Peroral absorption I:35  
 Personlighedstype I:166  
 Pesticider I:162, 185, II:224  
 Petroleum II:246  
 pH I:35  
 Philadelphia kromosomer II:74  
 Placenta I:43  
 Placenta-barriere II:111  
 Plasmaalbumin I:42  
 Plasmalipider II:264  
 Plasmaproteinbinding I:41  
 Plastbase I:250  
 Poor Metabolisers (PM) I:196  
 Populationsundersøgel-

ser I:174  
 Positive/negative resultater II:45  
 Positron emissions tomografi (PET-skanning) II:238  
 Potentiering I:25  
 Primære DNA-skader II:16  
 Primærurin I:55  
 Probitberegning I:22  
 Produktdata, kontoret for II:92  
 Produktregistret II:92  
 Progression II:80  
 Prolaktin I:163, II:269  
 Promotion II:79  
 Proteinbinding I:55  
 Prædiktivitet II:54  
 Prævalens I:129  
 Prævalensproportions ratio (PPR) I:132  
 Prøvemateriale I:169  
 Prøvetagningsstrategi I:171  
 Prøvetagningstidspunkt I:172  
 Psykisk arbejdsmiljø I:166  
 Psykosociale påvirkninger I:166  
 Pulmonal absorption I:30  
 Pulmonal udskillelse I:57  
 Punktmutationer I:90, II:28  
 Pyrethroider II:247, 249  
 Påvirkninger i arbejdsmiljøet, immunsuppressive II:162  
 - psykosociale I:166

**Q**

QSAR I:18, 121  
 QSAR-system I:109

**R**

Ranviersk indsnøring II:213, 225, 248

- Reabsorption I:55  
 Receptorer I:19, II:212  
 Referencegrupper I:174  
 Referencegrænser I:176  
 Referenceværdier, biologiske I:175  
 Registerkrav I:205  
 Registrering af kræftfremkaldende stoffer II:92  
 Relativ risiko I:132  
 Renal elimination I:54  
 Reparationssystemer I:159  
 Reproducerbarhed I:203  
 Reproduktion I:88  
 Reproduktionsskader II:100  
 Reproduktionstoksikologi I:238  
 Revisionsudvalg I:220  
 Risiko ratio (RR) I:132  
 Risiko, relativ I:132  
 Risikofaktorer I:131, II:87  
 Risikogrupper I:202  
 Risikovurdering I:81, 94  
 Rossums formel I:64  
 Rygevaner I:203  
 Rygmarv II:217  
 Rygning, passiv I:167
- S**
- Safety toxology I:12  
 Samtykke I:205  
 Samtykke, indhentelse af I:205  
 Sansepotentiale II:218  
 Scientific Expert Group (SEG) I:222  
 SCOEL (Scientific Committee for Occupational Exposure Limits) I:220, 222  
 Screening, genetisk I:191, 206  
 - toksikologisk I:248  
 Sekretion I:55  
 Selektionsbias I:134  
 Sektorforskningsinstitutioner og myndigheder I:268  
 Selektiv toksicitet I:18  
 Semisyntetisk foder I:79
- Sensitivitet I:138  
 Short Term Exposure Limits (STEL) I:217  
 Signalbehandlingsenhed II:215  
 Sikkerhedstoksikologi I:12  
 Skader, genetiske II:22, 26  
 Slimproducerende celler I:31  
 Soma (cellekrop) II:207  
 Somatotropin (væksthormon) II:268  
 SOS repair (error prone repair) II:31  
 Specificitet I:138  
 SPECT-skanning II:237  
 Spermatogenese II:103  
 SPF-status (Specificeret Patogen Fri) I:77  
 Sporbarhed I:173  
 Standardforskrifter I:93  
 Stave II:218  
 Steady state niveau I:64, 65  
 Sterilitet II:26  
 Størhjerne II:216  
 Stress, akut II:255  
 - kronisk II:255  
 - oxidativt I:52, 164  
 II:272  
 Stressor II:255  
 Stresspåvirkninger I:166  
 Struktur-aktivitet (QSAR) I:18  
 Struktur-aktivitetsmodeller II:196  
 Struktur-aktivitetsrelationer II:86  
 Styren II:243, 244, 246  
 Substanser, lipofile I:36  
 SUBTEC-program I:250  
 Sundhedsrelateret grænseværdi I:216  
 Sundhedsstatus I:50  
 Sundhedstilstand I:172  
 Superoxid I:51  
 Sygdomme, arvelige I:198  
 - monogene I:192, 207  
 Sygdomshistorie I:200  
 Sygdomsrisiko I:180  
 Sygdomsudvikling I:202  
 Sympatiske system II:218
- Symptomer, neurologiske II:224  
 Synapse II:209  
 Synapsepotentiale II:212  
 Synergisme I:25  
 Syntetisk foder I:79  
 Systemisk effekt I:18, 28  
 Systemisk kredsløb I:62  
 Sædkvalitet II:100  
 Søsterkromatidudvekslinger (SCE) II:41  
 Sårbarhedsgener I:205
- T**
- Tappe II:218  
 TDI-værdier I:95  
 Tensionsligevægt I:34  
 Teratogenforsøg II:118  
 Terodotoksin II:223  
 Terpentin II:246  
 Synergisme I:25  
 Testbatterier II:58  
 Testmetoder, alternative I:94  
 Testosteron II:267  
 Testprotokoller II:57  
 Testresultater, vurdering af II:45  
 Teststammer II:33  
 Testsystemer II:55  
 Tetradotoksin II:225  
 T-hjælper celler II:151  
 Thyroxin II:269  
 Tight Junctions II:223  
 Tillægsrisiko I:141  
 Tobaksrøg I:167  
 To-kompartiment I:62  
 To-kompartiment model I:58  
 Toksicitet II:81  
 - akut I:81  
 Toksikodynamiske modeller I:106  
 Toksikologisk screening I:248  
 Toksikologiske oplysninger I:248  
 2,4-D II:249  
 Toluén II:245  
 Tolerance I:24  
 Transgene dyremodeller I:76  
 Translokation-test II:43

Transmitter II:209  
 Transport, aksonal II:216  
 Trichloroethylen (TRD);  
 1,1,1-Trichloroethan;  
 Tetrachloroethylen  
 II:245, 246  
 Triethyltinhydroxid  
 II:249  
 Triglycerider II:264  
 Tumorsuppressor-  
 generne II:75  
 Tværsnitsundersøgelse  
 I:139  
 TWA (Time Weighted  
 Average) I:217  
 Tærskelværdi II:216

## U

Udskillelse, hud, hår,  
 snyt og sved I:58  
 - biliær I:52  
 - mælk I:57  
 - pulmonal I:57  
 Udviklingsforstyrrelser  
 II:102  
 Udviklingsstadier II:102  
 Udåndingsluft I:170  
 Ultrarapid Metabolizers  
 (UM) I:196  
 Undersøgelser, molekyl-  
 læreepidemiologiske  
 I:202  
 Universitetsinstitutter  
 I:268  
 Unscheduled DNA-syn-  
 thesis II:44  
 Urin I:170  
 Usikkerhedsfaktorer  
 I:236  
 UV-A-bestråling I:120  
 UV-stråling I:122

## V

Valideringsprogram I:104  
 Valideringsundersøgelser  
 I:107  
 Variation, etnisk/genetisk  
 I:49  
 Vaskularisering I:40

Videncentre I:259  
 Videnskabsetisk selvde-  
 klaration I:204  
 Vigtige kontaktallergener  
 II:198  
 Vinyltoulen II:243, 244  
 Væksthormon  
 (Somatotropin) II:268  
 Væv, fedtholdigt I:40  
 Vævsprøver, banker I:205

## W

WEB-steder, centrale  
 I:256  
 WHO-kriterier II:197

## X

Xylen II:246

## Y

Ydre faktorer I:50

## Æ

Ægceller (oogenese)  
 II:105  
 Ændringer, genetiske  
 II:24

## Ø

Øjenirritation I:83, 168  
 Østrogen II:267  
 Østrogen receptor assay  
 (MCF7 celle proliferati-  
 ons assay) II:126

## Å

Åndedrætsværn I:157


**Basisbog i  
Toksikologi i arbejdsmiljøet  
Bind I-II**

Toksikologi i arbejdsmiljøet - Bind I omfatter toksikologiske grundprincipper og mekanismer samt metoder til undersøgelse af toksiske effekter. Derudover indgår der kapitler om individuel følsomhed, biomarkører, toksikologi i relation til grænseværdier samt en oversigt over håndbogslitteratur, videncentre og databaser omhandlende toksikologi.

Toksikologi i arbejdsmiljøet - Bind II omfatter hovedeffektområderne genotoksikologi, kræft, reproduktionstoksikologi, immuntoksikologi, allergi, neurotoksikologi samt hormoner og stress.



**ami**

 arbejdsmiljøinstituttet