
miljø og sundhed

Sundhedsstyrelsens Rådgivende Videnskabelige Udvalg for Miljø og Sundhed

Formidlingsblad 26. årgang, nr. 2, december 2020

Temannummer om nanomaterialer

Læs om

Nanosikkerhed i Danmark – en historie om rettidig omhu

Nanopartikler i arbejdsmiljøet – en risiko for reproduktion?

Nanopartikler og effekter på hjertet

Akutfasereponsets betydning for hjertesygdom

Nanopartikler og kræft

Indhold

Nanosikkerhed i Danmark - en historie om rettidig omhu?.....	3
Nanopartikler i arbejdsmiljøet - en risiko for reproduktion og fosterudvikling?.....	10
Kardiovaskulære helbredseffekter af eksponering for nanopartikler – evidens i mennesker og mekanismer	25
Akutfaseresponssets rolle i nanomateriale-induceret hjerte-kar-sygdom.....	38
Nanopartikler og kræft.....	45
Fra internettet	57
Nanomøder 2021	62

Miljø og sundhed

Bladet henvender sig primært til forskere, beslutningstagere og administratorer, der beskæftiger sig med miljø og sundhed.

Udgives af:

Sundhedsstyrelsens Rådgivende Videnskabelige Udvalg for Miljø og Sundhed

Redaktion:

Ulla Vogel (ansv)
Katrin Vorkamp
Hilde Balling

26. årgang, nr. 2, 2020.

Eftertryk mod kildeangivelse.

ISSN elektronisk 2001-4146
<http://miljoogsundhed.sst.dk/blad/ms2002.pdf>



Året, der gik

Det er vist ikke for meget at sige, at året 2020 har været et meget anderledes år. Hjemmearbejde, virtuelle møder, hold afstand og sprit hænder og ikke noget med udenlandsture.

For bladets vedkommende har Corona også gjort sig gældende. I år udkommer der to numre og ikke tre som i de sidste 25 år. Arbejdet med Corona har krævet mange ressourcer, også blandt bidragyderne til det blå blad.

Men nu er temanummeret om nanomaterialer her. Et flot nummer, der viser hvor langt nanoforskningen i Danmark er nået siden den første spæde start i begyndelsen af nullerne. Og vi får historien med.

Ulla Voget, der var leder af Dansk Center for Nanosikkerhed, giver os den historiske baggrund og et overblik over hvor vi står nu.

De øvrige artikler kommer godt rundt om emnet med bidrag om hjerte-kar-sygdom, kræft og reproduktion. En fornøjelse at læse.

Nu nærmer juleferien sig, og så bliver der tid til at læse om nanomaterialer.

Rigtig god jul til forfatterne og til alle jer læsere.

Hilde Balling

Nanosikkerhed i Danmark - en historie om rettidig omhu?

Af Ulla Vogel, Det Nationale Forskingscenter for Arbejdsmiljø

Nanoteknologi blev lanceret i starten af 00'erne og var årsag til bekymring over mulige helbredseffekter. 20 år senere er vi blevet meget klogere takket været en målrettet indsats fra forskere, myndigheder og ikke mindst arbejdsmarkedets parter. Læs her hvordan.

Nanoteknologi er lidt forsimplet al teknologi, som er afhængigt af, at man nu kan se og manipulere i nano skala målestok, dvs ned til 1/10 000 000 meter.

Nanoteknologi blev i 00'erne lanceret som det nye vækst- og innovationspotentiale, og både DTU, KU og AU satsede på forskning i nanoteknologi på institutterne DTU Nanotech, Nanoscience og iNANO. Også på EU niveau blev der igangsat store innovationsprojekter som fx Graphene Flagship, som flere danske universiteter også deltager i. Nanoteknologien forudsås således at kunne skabe grundlag for ny teknologi og nye produkter, der på afgørende vis vil påvirke samfundet inden for næsten alle områder: Kommunikation, fremstillingsprocesser, nye egenskaber af forbrugerprodukter (f.eks. nye overfladeegenskaber, nye tekstiler mv.), nye muligheder inden for sundhed (nye typer medicin, nye behandlingsmuligheder)*. Nanomaterialer indgår nu i mange forskellige typer produkter og anvendelser.

EU definerer et nanomateriale som følger: 'Et nanomateriale er et naturligt, tilfældigt opstået eller fremstillet materiale, der består af partikler i ubundet tilstand eller som et aggregat eller et agglomerat, og hvor mindst 50 % af partiklerne i den antalsmæssige størrelsesfordeling i en eller flere eksterne dimensioner ligger i

størrelsesintervallet 1-100 nm'. Ordet 'nanomaterialer' er dermed en samlebetegnelse for partikler, fibre, flager mv, hvor mindst en af dimensionerne er i 1-100 nm.

De nye nanomaterialer, herunder kulstof-baserede fibre i nanostørrelse, var dog også årsag til bekymring over potentielle helbredseffekter især i forbindelse med erhvervsmæssig udsættelse for nanopartikler og nanomaterialer (1). Denne bekymring var især forårsaget af miljø- og arbejdsmiljøforskning, der viste, at indånding af partikler fra luftforurening forårsager sygelighed og dødelighed (2,3), og indånding af asbest forårsager især lungekræft og lungehindkræft op til 40 år efter eksponeringen**. Bekymringen var, at nanopartikler i endnu højere grad ville deponeres ned i lungerne ved indånding og have endnu større effekt per masse-enhed, fordi de har en stor overflade i forhold til masse (4).

For at kunne vurdere om udsættelse for nanomaterialer udgør et potentielt helbredsproblem i det ydre miljø og i arbejdsmiljøet har man brug for viden om hvor farlige nanomaterialer er, og om man er udsat for dem. I starten vidste vi meget lidt om farlighed og udbredelse, men er heldigvis siden blevet klogere.

Indenrigs- og Sundhedsministeriets Miljømedicinske Forskningscenter holdt sit første temamøde om 'Nanotechnology and Health' i oktober 2005, hvor professor Håkan Wallin fra Arbejdsmiljøinstituttet fortalte om dansk forskning indenfor nanotoksikologi. Siden da har Miljø og Sundhed jævnligt bragt artikler om forskellige aspekter af nanosikkerhed (5-17).

* [https://sum.dk/~media/Filer%20-%20Publikationer i pdf/2007/Nanoteknolog_Sundhed.pdf](https://sum.dk/~media/Filer%20-%20Publikationer%20i%20pdf/2007/Nanoteknolog_Sundhed.pdf)

**<https://www.cancer.dk/hjaelp-viden/fakta-om-kraeft/aarsager-til-kraeft/asbest/>

Er danskerne udsat for nanomaterialer ?

Det har vist sig at være svært at afdække danskernes eventuelle udsættelse for nanomaterialer, fordi man i begyndelsen ikke skelnede mellem om stoffer var på nanoform eller som større partikler i diverse registre. Derudover har der ikke været foretaget mange målinger af kemisk eksponering i arbejdsmiljøet i de seneste årtier.

Miljøstyrelsen gennemførte i 2012-2015 projektet 'Bedre styr på Nano'* og konkluderede, at forbrugernes mulige udsættelse for tekniske nanomaterialer er begrænset, og at udsættelse for nanomaterialer primært sker i arbejdsmiljøet. Det Nationale Forskingscenter for Arbejdsmiljø (NFA) har gennem arbejdspladsmålinger dokumenteret, at der er eksponering for nanomaterialer på danske arbejdspladser (18-23). Et telesurvey udført af Teknologisk Institut i regi af Dansk Center for Nanosikkerhed viste, at 20 % af de interviewede virksomheder inden for 13 forskellige industrielle brancher og forskning og udvikling rapporterede udsættelse for tekniske og/eller procesgenererede nanomaterialer**. Meget tyder derfor på, at der er udsættelse for både tekniske og procesgenererede nanomaterialer på danske arbejdspladser.

Er nanomaterialer farlige ?

Mange nanopartikler er farligere at indånde end større partikler med samme kemiske sammensætning. Det skyldes dels at de i højere grad deponeres i den dybe ende af lungen, dels at de har en større overflade pr masseenhed og derfor har en større overfladereaktivitet. For eksempel forårsager indånding af titanium dioxid nanopartikler lungekræft i rotter ved en luftkoncentration på 10 mg/m³, mens større titanium dioxid partikler først forårsager kræft i rotter ved en 25 gange højere luftkoncentration (250 mg/m³) (24-27). Vi ved nu, at indånding af nanomaterialer kan øge risikoen for

bl.a. kræft, hjerte-kar-sygdom og fibrose (28). Dette gælder både tekniske nanomaterialer som fx kulstofnanorør og sort og hvid pigment, og procesgenererede nanopartikler som f.eks. dieseludstødningspartikler og svejserøg. Læs artiklerne i dette nummer af Miljø og Sundhed om nanomaterialer og hjerte-kar-sygdom og kræft.

WHO's kræftagentur, IARC, klassificerede allerede i 2015 en specifik type kulstofnanorør som muligvis kræftfremkaldende for mennesker (29). Det tog dermed 25 år fra den første beskrivelse af kulstofnanorør til IARC's klassificering. 25 år kan synes lang tid, men det er utroligt hurtigt i forhold til klassificering af andre stoffer som f.eks. dieseludstødning, som blev klassificeret som kræftfremkaldende af IARC i 2012 (30), mere end 100 år efter at dieselmotoren blev opfundet i 1897.

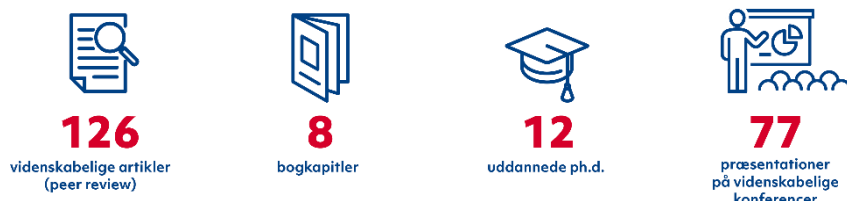
Dansk Center for Nanosikkerhed

Arbejdsmiljøforskningsfonden bevilgede i 2012 forskningsprojektet Dansk Center for Nanosikkerhed, som havde til formål at skabe, indsamle og formidle detaljeret viden om, hvordan arbejderes helbred påvirkes af eksponeringer for teknisk fremstillede og procesgenererede nanopartikler og nanomaterialer, og hvordan helbredsrisici i praksis kan håndteres. Forskningen var fokuseret på nanomaterialer, som bliver brugt i meget store mængder i Danmark, eller som er meget giftige, på alvorlige helbredseffekter som kræft, hjerte-kar-sygdom og effekter på fertilitet og fosterudvikling. Endvidere var fokus rettet mod at klarlægge de biologiske mekanismer bag de skadelige effekter og at finde sammenhænge mellem de fysiske-kemiske egenskaber og de skadelige effekter. Denne viden gør det muligt at overføre viden fra et nanomateriale til andre materialer og kan også bruges i innovation til at designe nye materialer med færre helbredseffekter (safe-by-design).

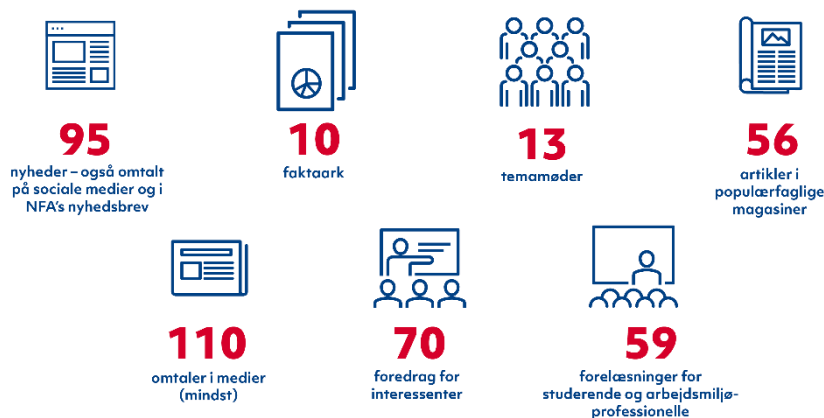
*<https://www2.mst.dk/Udgiv/publikationer/2015/11/978-87-93352-88-9.pdf>

**[file:///C:/Users/B014837/Downloads/Virksomheders%20udfordringer%20og%20informationsbehov%20i%20forbindelse%20med%20h%C3%A5ndtering%20af%20nanomaterialer%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/B014837/Downloads/Virksomheders%20udfordringer%20og%20informationsbehov%20i%20forbindelse%20med%20h%C3%A5ndtering%20af%20nanomaterialer%20(1).pdf)

Videnskabelige aktiviteter



Formidling af viden



Figur 1. Videnskabelige aktiviteter og formidling af viden udført i regi af Dansk Center for Nanosikkerhed. Grafik: Trine Larsen, NFA.

Figur 1 viser en opgørelse af diverse aktiviteter i regi af Dansk Center for Nanosikkerhed.

Fra forskning til arbejdsplads

Dansk Center for Nanosikkerhed har genereret forskning, som er nået helt ud på arbejdspladserne, godt hjulpet af Den Nationale Følgegruppe. Dansk Center for Nanosikkerheds Nationale Følgegruppe omfattede repræsentanter fra Arbejdstilsynet, Miljøstyrelsen, arbejdsmarkedets parter (DA, DI, FH og 3F) samt BAT kartellet og CO Industri, og de repræsenterede dermed de vigtigste interessenter i forhold til arbejdsmiljøet.

Medlemmerne af Den Nationale Følgegruppe medvirkede til, at viden fra Dansk Center for Nanosikkerhed blev implementeret til gavn for danske arbejdspladser. Viden genereret og hjemtaget af Dansk Center for Nanosikkerhed

blev brugt i Arbejdstilsynets vejledning til virksomheder, der arbejder med teknisk fremstillede nanomaterialer (At-vejledning 9.3.1).

Den Nationale Følgegruppe spillede en afgørende rolle i at Arbejds miljørådet tog 'Nanomaterialer og Arbejds miljø' op som et indsatsområde. Arbejds miljørådet udarbejdede en række anbefalinger til sikker håndtering af nanomaterialer på arbejdspladsen (www.amr.dk/nano.aspx) som beskæftigelsesministeren tiltrådte, og som efterfølgende blev realiseret. En af anbefalingerne var, at Produktregisteret blev ændret (ved lov), således at man nu skal registrere, om produkter i Produktregisteret indeholder nanomaterialer. En anden vigtig anbefaling var at lave grænseværdier i arbejdsmiljøet for 3 specifikke nanomaterialer.

En anden stor udfordring er at finde ud af, om et materiale er et nanomateriale, fordi der mangler internationalt anerkendte standardiserede metoder til at karakterisere nanomaterialer. Forskere fra Dansk Center for Nanosikkerhed indgår i OECD og ISO arbejde med at udvikle og validere standardmetoder til karakterisering af nanomaterialer til gavn for industri og forbrugere.

Dansk Center for Nanosikkerhed har forsket i kræftfremkaldende effekter af nanomaterialer, som enten er meget giftige (kulstofnanorør), bruges i meget store mængder (sort og hvid pigment, carbon black og titanium dioxid) eller forekommer som procesgenererede nanopartikler (dieseludstødningspartikler og flyemissionspartikler) (31-41). Denne viden indgår bl.a. i den dokumentation for helbreds-baserede grænseværdier for 3 tekniske nanomaterialer (titaniumdioxid, carbon black nanopartikler, og kulstofnanorør) og dieseludstødningspartikler, som NFA har udarbejdet efter anmodning fra Arbejdstilsynet. Dokumentationen for de 4 helbreds-baserede grænseværdier ligger offentligt tilgængeligt på Folketingets hjemmeside*. De helbredsbase-rede grænseværdier indgår sammen med socio-økonomiske hensyn i Arbejds miljørådets Regeludvalgs forhandlinger om de nye grænseværdier. Nye grænseværdier i arbejdsmiljøet udstedes af beskæftigelsesministeren.

Forskere fra Dansk Center for Nanosikkerhed lavede et biomonitoringsstudie af helbreds-effekten af at køre med diseldrevne tog i forhold til at køre med eldrevne tog, som beskrevet tidligere i Miljø og Sundhed (5,38,39). Efterfølgende besluttede DSB at fremrykke udskiftning af ME-tog**.

Forskere fra Dansk Center for Nanosikkerhed undersøgte farligheden af lufthavnsemissioner i dyremodeller (6,40) og viste, at lufthavnspartikler har sammelige fysiske-kemiske egenskaber og helbredseffekter med dieseludstød-

ningspartikler. Efter offentliggørelse af studiet har CPH Lufthavn iværksat en række initiativer for yderligere reduktion af eksponering af lufthavnsansatte.

Fokus på partikler og støv

Dansk Center for Nanosikkerhed blev afsluttet med udgangen af 2019. Vores vigtigste fund var, at indånding af både tekniske og proces-genererede nanomaterialer udgør en potentiel helbredsrisiko i arbejdsmiljøet, og at de potentielle helbredsskadelige effekter af indånding af partikler også gælder større partikler. Toksikologisk er der ingen forskel på nanopartikler og de partikler, der er lidt større. Der er derfor behov for at forebygge udsættelse for støv og partikler, både i arbejdsmiljøet og i det ydre miljø.

Yderligere oplysninger:

Ulla Vogel ubv@nfa.dk

Referencer

1. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect 2005;113(7):823-839.
2. Pope CA, III, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW, Jr. *Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults*. Am J Respir Crit Care Med 1995;151(3 Pt 1):669-674.
3. Dockery DW, Pope CA, III, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Jr., Speizer FE. *An association between air pollution and mortality in six U.S. cities*. N Engl J Med 1993; 329(24):1753-1759.
4. Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D et al. *Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy*. Part Fibre Toxicol 2005;2:8.:8.

*<https://www.ft.dk/samling/20191/almdel/BEU/bilag/101/index.htm>

**<https://www.information.dk/indland/2019/10/dsbs-gamle-dieseltog-forurener-fire-gange-saa-bilerne-paa-hc-andersens-boulevard>

-
5. Andersen MHG, Saber AT, Frederiksen M, Wils RS, Johannesson S, Fonseca AS, Clausen PA, Roursgaard M, Loeschner K, Koponen IK et al. *Health effects of exposure to diesel exhaust inside Danish passenger trains*. Miljø og Sundhed 2019;25(3):21-32.
 6. Bendtsen KM, Brostrøm A, Koivisto AJ, Koponen IK, Berthing T, Bertram N, Kling IK, Dal Maso M, Kangasniemi O, Poikkimäki M et al. *Karakterisering og toksicitet af lufthavns-partikler*. Miljø og Sundhed 2019;25(3):15-20.
 7. Berthing T, Poulsen SS, Knudsen KB, Jackson P, Mortensen A, Jacobsen NR, Skaug V, Szarek J, Hougaard KS, Wolff H et al. *Kulstofnanorørs fysisk-kemiske egenskaber forudsiger langvarig inflammation i lungerne på mus*. Miljø og Sundhed 2019;25(1):3-10.
 8. Berthing T, Saber AT, Mortensen A, Danielsen PH, Bendtsen KM, Poulsen SS, Hougaard KS, Hadrup N, Jacobsen NR, Vogel U. *Fra forskning i nanomaterialer til forebyggelse på arbejdspladser*. Miljø og Sundhed 2019;25(2):37-42.
 9. Hougaard KS, Berthing T, Poulsen SS, Kling K, Larsen ST, Nørgaard AW, Knudsen KB, Koponen IK, Clausen PA, Jensen KA et al. *Hvor langt er vi nået? Status over forskning i nanosikkerhed*. Miljø og Sundhed 2015;21(3):3-12.
 10. Hougaard KS, Kyjovska ZO, Wallin H, Jackson P, Vogel U. *Nanopartikler arbejdsmiljøet - en risiko for mandlig frugtbarhed?* Miljø og Sundhed 2015;21(2):14-21.
 11. Poulsen SS, Jackson P, Kling K, Knudsen KB, Skaug V, Kyjovska ZO, B.L. T, Clausen PA, Atluri R, T. B et al. *Fysisk-kemiske egenskaber ved kulstofnanorør forudsiger inflammation og DNA-skade i lungerne*. In: Miljø og Sundhed. vol. 22; 2017:3-10.
 12. Poulsen SS, Saber AT, Jacobsen NR, Andersen O, Wallin H, UV. *Kroppens reaktion på lungeeksponering for forskellige typer af kulstofnanorør - et studie i mus*. Miljø og Sundhed 2015; 21(2):30-37.
 13. Saber AT, Lamson JS, Jacobsen NR, Ravn-Haren G, Hougaard KS, Nyendi AN, Wahlberg P, Madsen AM, Jackson P, Wallin H et al. *Akutfaserespons i lungerne - en mulig mekanistisk forklaring på partikelårsaget hjerte-kar-sygdom*. Miljø og Sundhed 2013;19(3):3-11.
 14. Skovmand A, Jensen ACØ, Maurice C, Marchetti F, Lauvås AJ, Koponen IK, Jensen KA, Christensen P, Goericke-Pesch S, Vogel U et al. *Sperm quality and airway exposure to carbon-based particles and nanomaterials*. Miljø og Sundhed 2019;25(1):11-16.
 15. Teknologirådet: *Regulering af miljø- og sundhedsmæssige aspekter ved nanoteknologiske produkter og processer*. In.; 2006.
 16. Vogel U, Jensen KA, Wallin H. *Dansk Center for Nanosikkerhed*. Miljø og Sundhed 2012; 18(2):30-38.
 17. Vogel U, Saber AT, Jacobsen NR, Wallin H. *Øger indånding af (nano)partikler risikoen for hjerte-kar-sygdom?* Miljø og Sundhed 2013; 19(1):3-7.
 18. Kling KI, Levin M, Jensen ACØ, Jensen KA, Koponen IK. *Size-resolved characterization of particles and fibers released during abrasion of fiber-reinforced composite in a workplace influenced by ambient background sources*. Aerosol and Air Quality Research 2016;16(1):11-24.
 19. Koivisto AJ, Jensen AC, Levin M, Kling KI, Maso MD, Nielsen SH, Jensen KA, Koponen IK. *Testing the near field/far field model performance for prediction of particulate matter emissions in a paint factory*. Environ Sci Process Impacts 2014.
 20. Koivisto AJ, Kling KI, Levin M, Fransman W, Gosens I, Cassee FR, Jensen KA. *First order risk assessment for nanoparticle inhalation exposure during injection molding of polypropylene composites and production of tungsten-carbide-cobalt fine powder based upon pulmonary inflammation and surface area dose* [Epub ahead of print]. NanoImpact 2016;6:31-38.
-

-
21. Koponen IK, Koivisto AJ, Jensen KA. *Worker Exposure and High Time-Resolution Analyses of Process-Related Submicrometre Particle Concentrations at Mixing Stations in Two Paint Factories*. *Ann Occup Hyg* 2015.
 22. Levin M, Koponen IK, Jensen KA. *Exposure assessment of four pharmaceutical powders based on dustiness and evaluation of damaged HEPA filters*. *J Occup Environ Hyg* 2014; 11(3):165-177.
 23. Levin M, Witschger O, Bau S, Jankowska E, Koponen IK, Koivisto AJ, Clausen PA, Jensen A, Møllhave K, Asbach C et al. *Can we trust real time measurements of lung deposited surface area concentrations in dust from powder nanomaterials?* *Aerosol and Air Quality Research* 2016;16(5):1105-1117.
 24. Saber AT, Poulsen SS, Hadrup N, Jacobsen NR, Vogel U. *Commentary: the chronic inhalation study in rats for assessing lung cancer risk may be better than its reputation*. *Part Fibre Toxicol* 2019;16(1):44.
 25. Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K. *Chronic Inhalation Exposure of Wistar Rats and 2 Different Strains of Mice to Diesel-Engine Exhaust, Carbon-Black, and Titanium-Dioxide*. *Inhalation Toxicology* 1995;(4):533-556.
 26. Muhle H, Bellmann B, Creutzenberg O, Dasenbrock C, Ernst H, Kilpper R, Mackenzie JC, Morrow P, Mohr U, Takenaka S et al. *Pulmonary Response to Toner Upon Chronic Inhalation Exposure in Rats*. *Fund Appl Toxicol* 1991;17(2):280-299.
 27. Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. *Pulmonary Response of Rats Exposed to Titanium-Dioxide (TiO₂) by Inhalation for 2 Years*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1985;79(2):179-192.
 28. Halappanavar S, van den Brule S, Nymark P, Gate L, Seidel C, Valentino S, Zhernovkov V, Høgh Danielsen P, De Vizcaya A, Wolff H et al. *Adverse outcome pathways as a tool for the design of testing strategies to support the safety assessment of emerging advanced materials at the nanoscale*. *Part Fibre Toxicol* 2020;17(1): 16.
 29. Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ, Lauby-Secretan B, El GF, Bouvard V, Brahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H et al. *Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes*. *Lancet Oncol* 2014;15(13):1427-1428.
 30. IARC: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans VOLUME 105: DIESEL AND GASOLINE ENGINE EXHAUSTS AND SOME NITROARENES*, vol. 105. Lyon, France; 2012.
 31. Knudsen KB, Berthing T, Jackson P, Poulsen SS, Mortensen A, Jacobsen NR, Skaug V, Szarek J, Hougaard KS, Wolff H et al. *Physicochemical predictors of Multi-Walled Carbon Nanotube-induced pulmonary histopathology and toxicity one year after pulmonary deposition of 11 different Multi-Walled Carbon Nanotubes in mice*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2019;124(2):211-227.
 32. Poulsen SS, Jackson P, Kling K, Knudsen KB, Skaug V, Kyjovska ZO, Thomsen BL, Clausen PA, Atluri R, Berthing T et al. *Multi-walled carbon nanotube physicochemical properties predict pulmonary inflammation and genotoxicity*. *Nanotoxicology* 2016;10(9):1263-1275.
 33. Poulsen SS, Saber AT, Williams A, Andersen O, Kobler C, Atluri R, Pozzebon ME, Mucelli SP, Simion M, Rickerby D et al. *MWCNTs of different physicochemical properties cause similar inflammatory responses, but differences in transcriptional and histological markers of fibrosis in mouse lungs*. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;284(1):16-32.
 34. Saber AT, Jacobsen NR, Jackson P, Poulsen SS, Kyjovska ZO, Halappanavar S, Yauk CL, HW, UV. *Particle-induced pulmonary acute phase response may be the causal link between particle inhalation and cardiovascular disease*. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 2014, doi: 10.1002/wnan.1279.
 35. Modrzynska J, Berthing T, Ravn-Haren G, Jacobsen NR, Weydahl IK, Loeschner K, Mortensen A, Saber AT, Vogel U. *Primary genotoxicity in the liver following pulmonary exposure to carbon black nanoparticles in mice*. *Part Fibre Toxicol* 2018;15(1):2.
-

-
36. Saber AT, Mortensen A, Szarek J, Jacobsen NR, Levin M, Koponen IK, Jensen KA, Vogel U, Wallin H. *Toxicity of pristine and paint-embedded TiO₂ nanomaterials*. Hum Exp Toxicol 2019;38(1):11-24.
37. Wallin H, Kyjovska ZO, Poulsen SS, Jacobsen NR, Saber AT, Bengtson S, Jackson P, Vogel U. *Surface modification does not influence the genotoxic and inflammatory effects of TiO₂ nanoparticles after pulmonary exposure by instillation in mice*. Mutagenesis 2017;32(1):47-57.
38. Andersen MHG, Frederiksen M, Saber AT, Wils RS, Fonseca AS, Koponen IK, Johannesson S, Roursgaard M, Loft S, Moller P et al. *Health effects of exposure to diesel exhaust in diesel-powered trains*. Part Fibre Toxicol 2019;16(1):21.
39. Andersen MHG, Johannesson S, Fonseca AS, Clausen PA, Saber AT, Roursgaard M, Loeschner K, Koponen IK, Loft S, Vogel U et al. *Exposure to Air Pollution inside Electric and Diesel-Powered Passenger Trains*. Environ Sci Technol 2019;53(8):4579-4587.
40. Bendtsen KM, Brostrom A, Koivisto AJ, Koponen I, Berthing T, Bertram N, Kling KI, Dal Maso M, Kangasniemi O, Poikkimaki M et al. *Airport emission particles: exposure characterization and toxicity following intratracheal instillation in mice*. Part Fibre Toxicol 2019;16(1):23.
41. Bendtsen KM, Gren L, Malmborg VB, Shukla PC, Tuner M, Essig YJ, Kraus AM, Clausen PA, Berthing T, Loeschner K et al. *Particle characterization and toxicity in C57BL/6 mice following instillation of five different diesel exhaust particles designed to differ in physicochemical properties*. Part Fibre Toxicol 2020;17(1):38.

Nanopartikler i arbejdsmiljøet - en risiko for reproduktion og fosterudvikling?

Af Karin Sørig Hougaard^{*1,2}, Astrid Skovmand^{1,3}, Signe Schmidt Kjølner Hansen¹, Poul Bo Larsen³, Sandra Goericke-Pesch⁴ og Ulla Vogel^{1,5}

Indånding af partikler i arbejdsmiljøet øger risikoen for en række kroniske sygdomme. De seneste 10 års forskning i dyremodeller har vist os, at indånding af partikler kan påvirke også fertilitet og fosterudvikling. Der er dog store huller i viden på området, især mangler der studier med inhalation og af hunlig fertilitet. Det gør det vanskeligt at vurdere om udsættelse for partikler i arbejdsmiljøet kan påvirke reproduktion.

Nanoteknologi er et felt i rivende udvikling, og der udvikles nanomaterialer i tusindvis. Frie partikler udgør det største problem, og de findes hovedsagligt i forbindelse med produktion af de produkter, som indeholder nanomaterialerne. Vi har ingen sikker viden om udbredelse af nanomaterialer i dansk produktion. Fra arbejdspladsmålinger ved vi dog, at der håndteres nanomaterialer på danske arbejdspladser, og at danske arbejdstagere eksponeres for nanomaterialer.

EUs Observatorium for Nanomaterialer (EUON/ECHA) har for nylig udgivet rapporten "A critical review of studies on the reproductive and developmental toxicity of nanomaterials" (1), hvor medarbejdere fra DHI, Afdeling for Miljø og Toksikologi og Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø (NFA) gennemgik den eksisterende viden fra

studier, der har testet tekniske nanomaterialer for deres potentielt skadelige effekter på fertilitet og fosterudvikling.

Rapporten udførte en omhyggelig litteratursøgning, men identificerede ikke studier i mennesker. Der blev i alt identificeret 111 studier i mus og rotter og af 19 forskellige nanomaterialer om sammenhængen mellem udsættelse for nanopartikler og effekter på fertilitet og fosterudvikling. Langt de fleste studier eksponerede dyrene for nanopartikler via kosten. Halvdelen af studierne omhandlede nanotitaniumdioxid og nanosølv, og ca. en tredjedel undersøgte nanozinkoxid, nano-siliciumoxid og kulstofbaserede nanomaterialer. Kun få studier eksponerede dyrene via inhalation, som er den mest relevante eksponeringsvej i arbejdsmiljøet. Der var stort set ingen studier af hunlig fertilitet.

Studierne benyttede en række forskellige forsøgsdesign, eksponeringsmetoder, og effektmål, og ofte var der kun få studier af de enkelte nanomaterialer. Kun sjældent er de samme effektparametre undersøgt for den samme partikel i flere uafhængige studier. Det gør det vanskeligt at drage konklusioner.

Dansk Center for Nanosikkerhed på NFA har bidraget med en række af de studier, der indgik i rapporten. I flere tilfælde har vi haft mulighed for at undersøge den samme partikel for dens effekt i flere uafhængige studier. Gennem disse studier går vi tættere på nanopartikler, hvordan de kan tænkes at påvirke graviditet, fosterudvikling og fertilitet, og på de mulige effekter.

¹ Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø.

² Institut for Folkesundhed, Københavns Universitet.

³ Afdeling for Miljø og Toksikologi, DHI.

⁴ Reproductive Unit of the Clinics, Clinic for Small Animals, University of Veterinary Medicine, Hannover.

⁵ DTU Nanotech, Danmarks Tekniske Universitet.

Effekter af nanopartikler på graviditet og fosterudvikling

Der er endnu ikke udført epidemiologiske studier af påvirkning af graviditet efter udsættelse for tekniske nanopartikler (1). Noget viden findes dog fra epidemiologiske studier, der har fokuseret på utilsigtet eksponering for luftforurening genereret fra trafik og industri, og som for en stor dels vedkommende består af partikler.

Epidemiologiske studier

Der er bedst evidens for en sammenhæng mellem udsættelse for luftforurening og visse negative graviditetsudfald, fx lav fødselsvægt, nedsat vækst af fosteret under graviditeten samt svangerskabsforgiftning (præeklampsi) (2,3). Der genereres imidlertid nye data hele tiden, og noget tyder på, at luftforurening også er associeret til øget risiko for dødfødsel (4) og luftvejssygdomme (5) samt til nervesystemets udvikling og funktion. I en række studier udviste børn født af mødre, som igennem graviditeten blev eksponeret for trafikrelateret eller industriel luftforurening, således forringet motorisk eller kognitiv funktion (6,7). For nylig identificerede et epidemiologisk studie kulpartikler i fostrets del af moderkagen hos gravide kvinder. Jo højere kvinderne var eksponeret for partikulær luftforurening, desto større var koncentrationen af partikler i moderkagen (8). Det er imidlertid vanskeligt direkte at forbinde eksponering for luftforurening med negative reproduktionsudfald i mennesker, idet mange andre faktorer også indvirker på fostrets og barnets udvikling (sociale forhold, ernæring, rygning). Det er også vanskeligt at adskille effekter af prænatal og postnatal eksponering for luftforurening. Sidst, men ikke mindst, så består luftforurening af mange forskellige komponenter (fx store og små partikler, nitroøse gasser, polyaromatiske hydrokarboner (PAH'er), metaller m.v.) og forekommer ofte sammen med trafikstøj, og det kan i den statistiske analyse være svært at identificere hvilke(n) komponent(er), der forårsagede de observerede effekter.

Hvordan kan nanopartikler påvirke graviditet og fosterudvikling?

Reproduktion er en kompliceret biologisk proces. Først dannes æg- og sædceller i hver sin organisme og smelter sammen i zygoten, som deler sig i milliarder af celler, der organiserer sig i en kompleks matrix af forskellige celletyper i organer – i samspil med den gravide kvindes fysiologi. Denne udviklingsproces betyder, at eksponering for partikler kan forstyrre reproduktion forskelligt, alt efter hvornår den finder sted. Partikler kan tænkes at påvirke fostrets udvikling på to fundamentalt forskellige måder, direkte eller indirekte (eller som en kombination af de to).

Direkte påvirkning

Hvis partikler skal påvirke fostrets udvikling direkte, forudsætter det, at nanopartikler passerer fra moderens blod, over moderkagen, til fostret, så partiklerne kan interagere direkte med fostrets væv. Nanopartikler har ofte en høj overfladeaktivitet. Heraf følger en tilbøjelighed til at inducere inflammation og generere reaktive iltmolekyler (ROS), der kan skade cellernes molekyler og dermed funktion. Resultater fra *in vitro* studier viser, at en række forskellige nanomaterialer kan påvirke fostervæv direkte (9,10). En række forskellige nanopartikler har vist sig i stand til at krydse biologiske barrierer, fx fra lunge til blod, over mave-tarmkanalens barriere samt over moderkagen. Partiklers passage af moderkagen afhænger bl.a. af 1) partikelstørrelse, koncentration og overflade; 2) moderens eksponeringsvej og eksponeringens varighed; og 3) tidspunktet i graviditeten (11). Passagen af partikler er dog ofte relativt begrænset. Har moderen indåndet nanopartikler, så skal partiklerne endda passere over to barrierer, før de når frem til fostret: først lungens barriere og derefter moderkagens. Baseret på den viden, vi har i dag, er direkte påvirkning af fostrets væv derfor absolut plausibel.

Tabel 1. Oversigt over musestudier af eksponering i drægtighedsperioden og effekter i afkommet udført under Dansk Center for Nanosikkerhed. Grå farve indikerer at der ikke var effekt og rød farve, at der var effekt af eksponeringen. (-) Ikke undersøgt *Eksponering ved intratrakeal instillation.

Nano-material	Eksponering		Effekt på organsystem i afkom						
	Niveau	Dage i drægtighed	Maternel lunge-inflammation	Drægtighed eller laktation	Genotoksicitet	Nervesystem	Hanlig fertilitet	Immunfunktion	Referencer
Titaniumdioxid NP	42 mg/m ³	8-18 (1 time)					(p=0,057)	-	13-16
Flervægede kulstofnanorør	1*67 µg	0*							17
	1*67 µg	0*				-	-		18-20
Diesel-partikler	18 mg/m ³	7-19 (1 time)	-					-	21-23
Carbon black NP	42 mg/m ³	8-18 (1 time)				-	-	-	24-25
	4*67 µg	7,10, 15,18*					2. Generation	-	14, 24, 26-27
(Printex 90)	5 mg/m ³ 34 mg/m ³	4-18 (0,75 time)			Mangler publicering			-	28-29

Indirekte påvirkning

Ved indirekte påvirkning er konceptet, at nanopartikler interfererer med fostrets udvikling uden direkte kontakt med fostrets væv. Når partikler indåndes, vil en vis andel deponeres dybt i lungen. Her kan de fremkalde oksidativ stress og inflammation med efterfølgende frigivelse af inflammatoriske signalstoffer til blodet, fx cytokiner. Hvis signalstofferne når frem til moderkagen og/eller fostret, kan disse meget bioaktive molekyler potentielt påvirke funktion og udvikling. Det er i flere studier observeret, at celler i moderkagen optager nanopartikler fra blodet. I moderkagen kan partiklerne inducere inflammation og generere reaktive iltmolekyler (ROS), og derved kompromittere moderkagens funktion og dermed fostrets udvikling (12). En række studier har faktisk vist, at dannelsen af blodkar i moderkage kan blive påvirket af nanopartikler af titaniumdioxid (1).

Sidst kan man forestille sig, at kemiske stoffer kan dissociere fra selve partikelmaterialiet (fx sølv), eller fra overfladebehandling eller forureninger af partiklerne, og kan påvirke eller passere moderkagen og på den måde indvirke på fostrets udvikling (10).

Dyrestudier af effekter af nanopartikler på graviditet og afkommets udvikling

Rapporten "A critical review of studies on the reproductive and developmental toxicity of nanomaterials" opsummerer en række studier af nanopartiklers effekt på drægtighed og afkommets udvikling. Dansk Center for Nanosikkerhed på NFA har bidraget med en række af studierne af afkommets sædkvalitet, nervesystem og immunsystem. I flere tilfælde har vi haft mulighed for at gentage studier med den samme partikel for det samme effektmål. Studierne er opsummeret i tabel 1 med hensyn til partikeltype, eksponeringsvej og -niveau, samt de undersøgte organsystemer.

Vi har undersøgt nanopartikler af titaniumdioxid og kulstof, flervægede kulstofnanorør, carbon black-partikler, der ofte bruges som model for kulpartikler i forurenede luft, og partikler fra dieseludstødning. Carbon black har nemlig et minimalt indhold af andre kemiske stoffer, mens partikler i forurenede luft indeholder væsentligt flere stoffer, herunder polyaromatiske hydrocarboner (PAHer). Kulstofnanorør blev i begge studier indgivet via instillation én dag før parring. Vi brugte primært inhalation for titaniumdioxid, carbon black og dieselpartiklerne. Musene blev eksponeret for nanopartikler i en mængde, der nogenlunde svarer til de danske grænseværdier for arbejdsmiljøet. Vi undersøgte stort set altid, om eksponeringen inducerede lungeinflammation i de drægtige mus. Det gjorde den i langt de fleste tilfælde, ligesom vi kunne se, at partiklerne blev længe i musenes lunger.

Drægtighedsparametre og genekspression

Vi undersøgte altid for påvirkning af drægtighed, men ingen af partiklerne påvirkede forløbet af drægtigheds- og dieperioden, hunmusens vægt, drægtighedsperiodens længde, kuldets størrelse eller ungerens fødselsvægt og vækst i dieperioden – bortset fra dieselpartikler. Her vejede ungerne en anelse mindre ved fødslen (ikke-signifikant), men i løbet af laktationsperioden tog unger i dieselgruppen mindre på end i kontrolgruppen, så de vejede signifikant mindre ved fravæning (ca. 10 %) (22). Påvirkning af ungevægt er også set i andre studier af dieselpartikler, men sjældent i inhalationsstudier af ikke-opløselige nanopartikler. Vi spekulerer derfor på, om påvirkning af afkommets vækst skyldes associerede kemikalier i dieselpartiklerne, fx PAHer (10,22).

Vi havde også mulighed for at kortlægge genekspression i levervæv fra 2 dage gammelt afkom efter eksponering for titaniumdioxid- og carbon black partikler i drægtighedsperioden. Afkommets genekspression var påvirket af moderens lungeeksponering for nanopartikler. Overordnet set var der større effekt af moderens eksponering for carbon black end for titaniumdioxid. Dette kan dog også skyldes

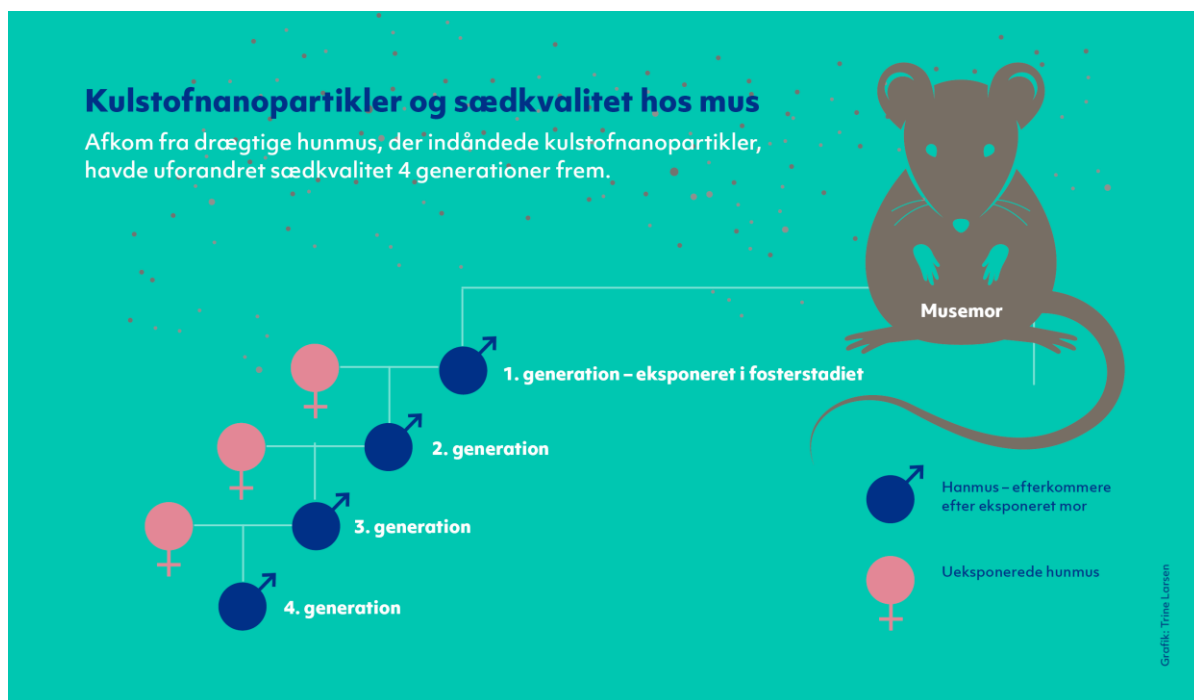
forskelle i eksponeringsvej (hhv. inhalation og instillation). Genekspressionen var desuden mere påvirket af moderens eksponering i det hunlige end det hanlige afkom (15,27).

Effekter på hanlig reproduktion i afkommet

Vi undersøgte, om mors eksponering for alle partikeltyper påvirkede produktionen af sæd hos afkommet ved bl.a. brug af metoden ”Daily sperm production” (14).

Studier af nogle af disse partikler fandt tegn på, at sædproduktionen var lavere hos kønsmodne hanner, hvis mødrene var blevet eksponeret for partikler. Det var fx tilfældet for titaniumdioxid ($p=0.057$) og partikler fra dieseludstødning (22,30).

For kulpartiklen carbon black var sædproduktionen ikke nedsat i afkommet fra de eksponerede hunner. Det var den imidlertid i næste generation, altså ”børnebørnene” (F2-generationen). Ydermere var sædkvaliteten kun nedsat hos de børnebørn, hvis F1-fædre var blevet eksponeret, mens de lå i livmoderen. Børnebørn, hvis F1-mor var blevet eksponeret som foster, viste ingen ændring i forhold til kontrolbørnebørn (14). I mennesker er der evidens for, at mors rygning kan påvirke sædkvalitet hos deres børn (31). Vi var derfor meget interesserede i at følge disse resultater op i et inhalationsforsøg, da det oprindelige forsøg havde benyttet instillation. I det nye studie indåndede hunmusene carbon black (Printex 90) i 45 minutter hver dag, fra før implantation af det befrugtede æg til kort før fødsel. Koncentrationen af carbon black svarede til at musene blev udsat for nanopartikler i hhv. 1 eller 8 timer ved den danske grænseværdi for arbejdsmiljøet, der er $3,5 \text{ mg/m}^3$. For at afdække mulige effekter i fremtidige generationer blev de voksne hanner fra kullet parret med ueksponerede hunmus. Deres unger fik lov at vokse op og blive kønsmodne, og så blev proceduren gentaget til vi havde i alt fire generationer. For det hunlige afkom blev der kun fremavlet til F2-generationen (figur 1).



Figur 1. Design af studie, hvor drægtige mus indåandede carbon black partikler, hvorefter hanlig reproduktion blev undersøgt i fire generationer af unger (Ill: Trine Larsen, NFA).

Hos det hanlige afkom målte vi en række parametre med betydning for reproduktion: daglig sædproduktion, hvor hurtigt sædcellerne bevægede sig og om de så normale ud, blodets indhold af det mandlige kønshormon testosteron, hvor lang tid der gik, før hanmusene gjorde hunmusene drægtige, og hvor mange unger de fik i hvert kuld. Da resultaterne blev gjort op, var der ingen tegn på, at mødrenes indånding havde påvirket reproduktive parametre hos "sønnerne" eller i de efterfølgende generationer (28).

Flervæggede kulstofnanorør blev undersøgt i et studie med et lidt anderledes design. Musemødrene blev nemlig instilleret med en enkelt dosis af kulstofrørene, dagen FØR de blev sat sammen med en kønsmoden han. Hos parrets hanlige afkom blev der ikke fundet effekt af eksponeringen, selvom partiklerne må have induceret inflammation i hunnernes lunger under drægtighedsperioden (17).

Effekten af moderens udsættelse for nanopartikler for afkommets sædkvalitet er undersøgt i få andre studier fra andre forskergrupper. Både intratrakeal instillation af carbon black og subkutan injektion af titaniumdioxid af drægtige mus er vist at påvirke sædkvaliteten i det hanlige F1-afkom. Nogle eksperimentelle studier af dieseludstødning observerer også effekter på afkommets sædproduktion, som måske kan skyldes partikelfractionen. I sidstnævnte studier er det imidlertid svært at adskille effekterne af luftens indhold af partikler fra andre kemikalier og gasser (reviewet i (10,32)).

Sammenholdes vores resultater med andre forskeres er der noget, der tyder på, at mors udsættelse for partikler kan påvirke sædproduktionen hos det hanlige afkom. Resultaterne fra generationsstudiet af carbon black er imidlertid beroligende, fordi det ikke observerede effekter på afkommet ved den gældende grænseværdi for kulstofpartikler. Vi kunne

ikke reproducere fundene fra instillationsstudiet, når mødrene inhalerede kulpartiklerne. Studiet viser derfor, hvor vigtigt det er at gentage studier, så det kan undersøges, hvor robuste resultaterne er.

Effekter på afkommets hjerne

Resultater fra flere af studierne i tabel 1 indikerer, at musemødres indånding af nanopartikler i drægtighedsperioden måske kan påvirke hjernens udvikling. På NFA har vi undersøgt flere typer af nanopartikler. Musemødres indånding af titaniumdioxid var associeret med ændret adfærd i acoustic startle testen, hvor hunnerne udviste højere præpulsinhibering (et mål for hvordan man reagerer på et uventet stimulus), mens begge køn udviste en slags agorafobi (angst for åbne rum) i open field testen (30). Hunligt afkom, hvis moder indåndede dieselpartikler i drægtigheden, var bedre til at finde platformen i adfærdstesten Morris water maze (i spatial reversal learning task) og udviste tendens til øget aktivitet i Open field testen ($p < 0,1$) (22). Vi har desværre kun udført ét studie med hver partikeltype. Nogle studier fra andre forskergrupper har dog også observeret ændret adfærd i afkommet efter prænatal eksponering for disse partikler (1,32).

Carbon black er den partikeltype, der er bedst undersøgt, og hvor en række studier genfinder effekter på samme effektmål. I vores studie af carbon black, hvor musemødre blev instilleret med carbon black partikler fire gange i drægtighedsperioden, så vi mindre ændringer i hunnernes adfærd i open field testen (26). I forbindelse med generationsstudiet (figur 1) fik vi imidlertid mulighed for at se nærmere på afkommets adfærd og hjerne (29). Unger fra drægtige mus, der indåndede carbon black nanopartikler, udviste bl.a. tydelige områder, hvor niveauet af proteinet glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP) var forøget, især i astrocytter (reaktiv astrogliose). Unger fra carbon black-mødre havde desuden et lavere niveau af proteinet parvalbumin i hjernens interneuroner, og antallet af parvalbumin positive interneuroner var reduceret. I open field testen udviste det hunlige afkom øget aktivitet, og

især hannerne var mere aktive i den centrale zone. Museunger, som var udsat for carbon black i fosterlivet, viste altså tegn på langvarig påvirkning af centralnervesystemet (29).

Japanske forskere har tidligere undersøgt effekten af carbon black på hjernens udvikling i en række studier, hvor de gentagne gange har gjort de samme observationer som i studiet ovenfor (1,29). I disse studier blev de drægtige mus dog eksponeret via instillation. Resultaterne fra studiet ovenfor viser altså, at også eksponering via inhalation, som minder mere om forholdene i arbejdsmiljøet, kan inducere disse skader. Reaktiv astrogliose er blandt andet kendt fra patienter med demens og beskadiget hjernevæv, fx efter en blodprop – og andre af resultaterne minder om det, man ser i dyremodeller for visse udviklings sygdomme i hjernen, fx skizofreni. Resultaterne er bekymrende, fordi de samme effekter er observeret i en hel række studier og de kan induceres ved eksponering ved inhalation ved et niveau, der svarer til de danske grænseværdier.

Effekter på afkommets immunsystem

Nanopartikler er gode til at aktivere immunsystemet, således observerede vi signifikant lungeinflammation i stort set alle studierne i tabel 1. Man kunne umiddelbart tænke, at immunaktivering hos den gravide organisme kunne påvirke udviklingen af fostrets immunsystem. Denne potentielle sammenhæng er imidlertid kun undersøgt ganske sporadisk.

Dansk Center for Nanosikkerhed havde mulighed for at undersøge, om moderens udsættelse for kulstofnanorør dagen før hun blev sat sammen med en kønsmoden han kunne påvirke afkommets immunsystem (19). Da ungerne blev ældre undersøgte vi deres tolerance og allergiske respons, ved at udsætte musene for ovalbumin, der er et protein fra æg, som kan give allergi. Resultaterne fra undersøgelsen viste, at produktionen af specifikke antistoffer (IgG1) var undertrykt hos unger fra hunmus, som havde været udsat for kulstofnanorør, mens de var drægtige.

Studiet blev gentaget i to uafhængige replikationer og i afkom med forskellig aldre. Resultaterne virker derfor til at være meget robuste. Fostrets immunsystem kan altså være følsomt for mors udsættelse for partikler under graviditeten, men vidensgrundlaget er endnu meget begrænset på dette område.

Opsummering og konklusion

Samlet set er der en række indikationer på, at prænatal udsættelse for forskellige typer uopløselige nanopartikler kan påvirke afkommets udvikling, herunder hjernen, immunsystemet og hanlig reproduktion. De fleste studier af nanopartikler og fosterudvikling benytter forskellige forsøgsdesign. Kun sjældent er de samme effektparametre undersøgt for den samme partikel i flere uafhængige studier. Det gør det vanskeligt at drage konklusioner.

I Dansk Center for Nanosikkerhed har vi haft mulighed for at undersøge samme effektmål for den samme partikel i flere uafhængige studier. I nogle tilfælde har vi bekræftet tidligere fund. Det gælder fx prænatal udsættelse for flervæggede kulstofnanorør og påvirkning af immunsystemets udvikling, og prænatal udsættelse for carbon black og effekter på ungeres hjerne. I andre tilfælde kunne vi ikke genfinde de samme resultater, når vi (næsten) gentog studierne. Det var fx tilfældet for prænatal eksponering for carbon black og hanlig sædproduktion, og faktisk også for genotoksicitet i afkommet (som ikke er beskrevet nærmere i denne artikel) (24). For genotoksicitet har vi dog væv liggende, så vi kan søge at afkræfte eller bekræfte vores tidligere fund, men dette studie afventer publikation.

Effekter af nanopartikler på reproduktion hos voksne hanner

Der er endnu ikke udført studier af tekniske nanopartikler i arbejdsmiljøet og påvirkning af reproduktion hos arbejdstagere. Nogen viden findes dog fra erhverv og eksponeringer, der er karakteriseret ved høj udsættelse for partikler i nanostørrelse. Der er desuden udført en række eksperimentelle studier i dyremodeller.

Resultater fra epidemiologiske studier

I flere erhverv kan der være høj udsættelse for støv og partikler. I 1988 viste et dansk studie, at stålsvejsere havde nedsat sædkvalitet (33,34). Senere studier viste, at også svejsning på sort jern var relateret til nedsat sædkvalitet (35), og at ufrivillig barnløshed var hyppigere blandt disse svejsere (36), som også fik færre børn, alt andet lige (37). Lignende resultater er fundet i et indisk studie (38). Ikke alle studier af svejsere har dog kunnet bekræfte, at svejsning kan påvirke mandlig fertilitet (33,39,40). Rygning er en anden partikeludløsning eksponering, der nedsætter sædkvaliteten hos mennesker (41). I ét studie var mandlige svejsere længere tid om at opnå graviditet, men kun når de samtidig var rygere (40). Her kunne den samlede højere partikeludsættelse ved samtidig svejsning og rygning tænkes at "drive" effekten. Sidst men ikke mindst er der også epidemiologiske studier, der tyder på, at luftforurening kan interferere med mandlig reproduktion (42).

Hvordan kan nanopartikler påvirke sædkvalitet?

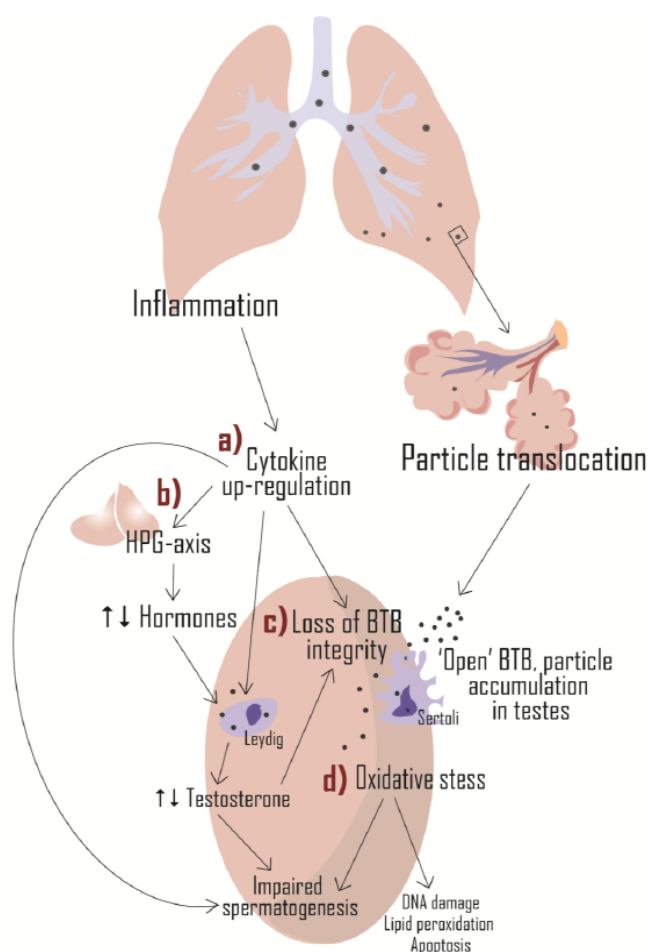
Det er ikke klart, hvordan partikler kan påvirke sædkvalitet, men både indirekte og direkte mekanismer er blevet foreslået. Figur 2 opriidser mulige mekanismer.

Viden fra eksperimentelle studier

En række tekniske nanomaterialer er blevet undersøgt for effekt på hanlig reproduktion efter eksponering via luftvejene. Det gælder fx nanopartikler af jern-, titanium-, silicium- og grafenoxid samt kulpartiklen carbon black. Eksponeringen foregik primært ved at partiklerne blev pustet direkte ned i musenes lunger ved intratrakeal instillation (1,44). Eksponering for siliciumoxid og carbon black er begge vist at påvirke parametre med relevans for hanlig reproduktion i dyremodeller.

Effekter af kulpartikler på hanlig reproduktion

Carbon black er undersøgt i flere studier, der dog får helt forskellige resultater. Et af stu-



Figur 2. Mulige mekanismer for påvirkning af hanlig reproduktion.

Nanopartikler kan sandsynligvis påvirke sædkvalitet både direkte og indirekte. Indirekte effekter: Når partikler indåndes og deponeres i lungerne, begynder immunforsvaret at nedkæmpe og fjerne partiklerne, og det udløser en række alarmsignaler. Alarmsystemet er dog et tveægget sværd, fordi signalmolekylerne – fx cytokiner – kan hensætte kroppen i en tilstand af kronisk inflammation. Cytokiner er afgørende for normal testikelfunktion, dannelse af sædceller og syntese af hormoner. Opregulering af cytokinniveauet i blod og testikler kan derfor forstyrre testikelfunktionen og produktion af sædceller og kønshormoner (a). Inflammatoriske mediatorer kan også forstyrre reguleringen af den hypothalamisk-hypofyseale-gonadale akse (HPG-aksen) og det hormonelle miljø og på den måde påvirke spermatogenesisen (b). Barrieren mellem blod og testes reguleres også af hormoner og cytokiner, så forstyrres ligevægten, kan denne barriere svækkes, så nanopartikler lettere trænger ind i det sædproducerende væv (c). Direkte effekter: Nanopartikler kan vandre fra lungerne over i blodbanen, hvorfra de kan blive transporteret til og måske akkumulere i testiklerne. Det er i hvert tilfælde vist i mus, at inhalerede nanopartikler kan finde vej til testiklerne (43). Her kan de potentielt inducere inflammation, en betændelseslignende tilstand og generere reaktive oxygen species (d), og det er både sædceller og de sædproducerende væv sårbare for. Visse metal- og metaloxidpartikler er desuden delvist opløselige og kan måske øge niveauet af metal i blod og reproduktionsorganer, og på den måde påvirke hanlig reproduktion. (figur og tekst er taget fra (44)).

diene blev udført i af forskere på NFA under Dansk Center for Nanosikkerhed. I forsøget undersøgte vi effekten af flere typer og størrelser af kulpartikler, hvor grupper af voksne af hanmus blev eksponeret for hver sin type nanopartikel:

- Grafenoxid - bruges fx i elektronik
- Flammruss 101 - et sort pigment (farvestof) fx i tryksværte og maling
- Printex 90 - et sort pigment fx i tryksværte og maling
- SRM1650b - en partikel fra diesel-udstødning opsamlet fra en lastvogndmotor

Musene blev eksponeret en gang om ugen i 7 uger via intratrakeal instillation, for 0,1 mg/mus (dog 0,02 mg for grafenoxid). Perioden dækker en hel cyklus for dannelse af sædceller i mus. Det svarer stort set til, at musene tilbragte 8 timer om dagen, 5 dage om ugen ved den danske grænseværdi i arbejdsmiljøet (3,5 mg/m³). Musene blev aflivet efter 8 uger og en række parametre, som fortæller noget om hanlig fertilitet, blev undersøgt (vægte af testikler og bitestikler, antal sædceller, sædcellernes bevægelighed, om sædcellerne så normale ud, samt blodets indhold af det mandlige kønshormon testosteron). Hos mus tager produktionen af sædceller 6-7 uger, så eksponeringen dækkede altså en hel cyklus for dannelse af sædceller. Da resultaterne blev gjort op, var der ingen forskelle i sædkvaliteten hos mus, der havde fået nanopartikler ned i lungerne, og mus, som blot havde fået en smule vand i lungerne eller slet ikke var blevet behandlet (45).

Et japansk studie fra 2009 viste noget helt andet. Også her blev partiklerne instilleret i lungerne på voksne hanmus, dog en gang ugentligt i 10 uger, også for 0,1 mg/mus. Eksponeringen dækkede altså rigeligt en hel cyklus for dannelse af sædceller. De eksponerede hanner producerede væsentligt færre sædceller og havde skader i testikelvævet. Det gjorde ingen forskel for sædproduktionen, om partiklerne var 14 nm (Printex 90), 56 nm eller 96 nm (Flammruss 101) i diameter (46).

Hvordan kan vi forklare, at to næsten helt ens studier viser så forskellige resultater? Måske er forklaringen, at studierne alligevel ikke er helt ens, når man går dem grundigt igennem. Studierne bruger fx forskellige musestammer (NMRI vs. ICR), antal instillationer (syv vs. ti instillationer), tidspunkt for aflivning (6-8 dage efter den sidste instillation vs. 24 time efter), og som forberedelse til instillation blev partiklerne opslemmet i forskellig type væske (nanopure vand vs. saltvand med 0.05 % Tween 80). Især det sidste kan have haft betydning. Tween indeholder molekyler, der er både lipo- og hydrofile, og er vist at øge permeabiliteten af membraner, så måske har Tween øget biotilgængeligheden af kulpartiklerne i testiklerne (45,46).

Resultaterne fra NFA er i dog tråd med resultater fra lignende studier. I NFAs studie svarer den samlede dosis over hele forsøget til ca. 18 mg/kg legemsvægt. I et studie i rotter forårsagede luftvejseksponering for 18 mg/kg legemsvægt af opsamlede luftforureningspartikler (PM_{2.5}) ingen ændringer i antallet af sædceller eller testiklernes mikroskopiske struktur. Da eksponeringen blev øget (til 54 og 162 mg/kg legemsvægt) faldt antallet af sædceller, og strukturen af testiklerne var beskadiget. Det kunne tyde på, at hanlig sædproduktion er følsom over for udsættelse for partikler via luftvejene, men at eksponeringen skal nå over et vist niveau, før det sker.

Effekter af titaniumdioxid partikler på hanlig reproduktion

For nogle partikler er der observeret effekter, når partiklerne gives via andre eksponeringsveje end luftvejene. Det gælder fx nanopartikler af titaniumdioxid. På NFA eksponerede forskere under Dansk Center for Nanosikkerhed grupper af voksne hanmus for hver sin type partikel:

- Nanotitaniumdioxid - bruges fx i maling og kosmetik (ca. 100 nm i diameter)
- Mikro-kvarts – krystallinsk siliciumoxid, findes fx i en lang række byggematerialer fremstillet af fx sand (ca. 255 nm i diameter)

Musene blev eksponeret næsten som i studiet af de fire kulpartikler beskrevet ovenfor, dvs. en gang om ugen i 7 uger via intratrakeal instillation. Den egentlig dosis var 0,063 mg/mus og svarede stort set til, at musene tilbragte 8 timer om dagen, 5 dage om ugen ved den danske grænseværdi for titanium (6 mg Ti/m³). Musene blev aflivet efter 8 uger, testikler og bitestikler blev vejet og sædproduktion og blodets indhold af testosteron blev målt. Igen var der ikke forskelle i de undersøgte parametre hos mus, der havde fået enten titaniumdioxid eller kvartspartikler ned i luftvejene og musene i kontrolgruppen (47).

Til sammenligning fandt et studie, at 21 nm titaniumdioxidpartikler nedsatte sædproduktionen, når partiklerne blev givet til rotter ved intravenøs injektion, en gang ugentligt i fire uger. Den samlede dosis var 200 mg/kg legemsvægt (48). Til sammenligning var den akkumulerede dosis 17 mg/kg legemsvægt i studiet fra NFA, men den direkte eksponering af testiklerne har været væsentlig mindre, for kun en mindre fraktion af titaniumdioxidpartiklerne (og en endnu mindre fraktion af de større kvartspartikler) ville forventes at passere fra lungerne til blodet. Måske er sagen også her, at titaniumdioxid kan påvirke sædproduktion, men kun når dosis når over et vist niveau.

Effekter af siliciumoxid på hanlig reproduktion

Effekten af amorfe siliciumoxid nanopartikler er undersøgt i et enkelt studie. Koncentrationen af sædceller og deres bevægelse var nedsat, andelen af abnorme sædceller forøget, og det sædproducerende væv var skadet hos voksne hanmus efter instillation af 2 mg SiO₂/kg (0,1 mg/mus/instillation), hver 3. dag i alt 15 gange. Efter en måned kunne effekterne ikke længere ses (49). I NFAs studie af kvarts beskrevet ovenfor blev der ikke observeret effekter af kvartspartikler på de undersøgte parametre. Kvartspartikler består også af siliciumoxid, der dog har en anden krystalstruktur end i de amorfe partikler. Kvartspartiklerne var desuden relativt store (255 nm) sammenlignet med nanopartikler af amorft siliciumoxid (58 nm),

hvorfor vi kun ville forvente meget begrænset translokation fra lunger til blod (47).

Effekter af svejserøg på hanlig reproduktion

Det blev beskrevet ovenfor, at fund i epidemiologiske studier indikerer, at svejsning kan påvirke reproduktion hos mænd. Sammenhængen mellem svejsning og sædkvalitet støttes af dyrestudier. I et studie var antallet af sædceller nedsat, når svejsepartikler blev deponeret i lungerne på voksne rotter (fra hhv. elektrode-, FCAW- (Flux Cored Arc Welding) og MIG-svejsning i sort stål). Der var også indikationer på histologiske ændringer i testiklerne, men der blev ikke udført en egentlig analyse heraf (50).

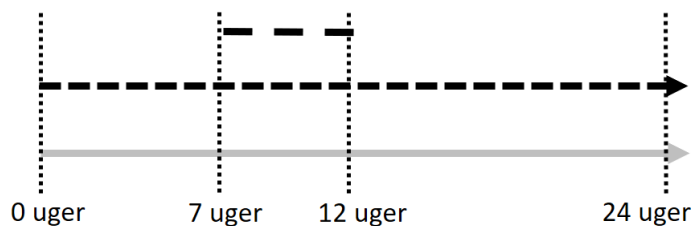
Under Dansk Center for Nanosikkerhed udførte NFA et studie af svejserøg og sædkvalitet. Vi brugte væv fra et stort studie udført på National Institute of Occupational Health i USA (figur 3). Voksne hanrotter blev udsat for svejserøg og usund kost, alene og i kombination. Rotterne indåndede svejserøg 3 timer/dag, 4 dage/uge, i 5 uger (51,52). Svejserøgen blev genereret ved at en automatisk robotarm MIG-svejsede i tre timer med en rustfri stålelektrode på sort jern. Svejsepartiklerne bestod af jern (52.7 %), krom (16.7 %), mangan (24.3 %), nikkel (5.8 %) og kobber (0.4 %) (12,53). Baseret på svejsepartiklernes sammensætning og at eksponeringen varede 12 timer/uge, svarer dette til en ”grænseværdi” på 1 mg/m³ ved beregning af den procesbetingede grænseværdi (54), altså nogenlunde på niveau med de danske grænseværdier for svejserøg (55). Kontrol dyr indåndede ren luft. Fodring med usund kost begyndte ved hjemkomst af dyrene og fortsatte i hele studiet. Den usunde kost var designet til at afspejle kostvaner i vestlige lande med meget og mættet fedt og højt indhold af sukker. Kontrol dyr fik standardfoder med kun 6 % fedt og højt fiberindhold (12,53). Studiet blev udført i både Brown Norway og Sprague-Dawley rotter.

EKSPONERINGER

Svejseserøg (5 uger)

Fed kost (24 uger)

Ren luft (24 uger)
= kontrolgruppe



UNDERSØGELSER:

Reproduktion: Vægt og histologi af testikler, daglig sædproduktion

Mekanismer: Lungeinflammation, kønshormoner (inkl. testosteron) i plasma

Figur 3. Design af studie af svejseserøg og sædkvalitet. Hanrotter indåndede svejsepartikler i 5 uger. Eksponering for usund kost dækkede hele forsøgsperioden. Halvdelen af dyrene blev aflivet efter svejseeksponeringen, 12 uger inde i studiet, den anden halvdel efter 24 uger, for at se om påvirkede parametre var normaliseret. Væv og organer blev indsamlet til analyse af hanlig reproduktion.

Voksne Sprague-Dawley-rotter, der indåndede svejseserøg, producerede færre sædceller og deres testikler vejede mindre. Efter 12 uger var effekterne ikke længere statistisk signifikante (12). Brown Norway-rotterne var tilsyneladende mindre sensitive – her var produktionen af sædceller kun nedsat i den gruppe, der også spiste usund kost. Kun den usunde kost påvirkede niveauet af testosteron i blod (12). Tilsammen tyder resultaterne på, at svejseserøg kan påvirke hanlig fertilitet, men det kunne have været ønskeligt, om studierne havde udført en grundig analyse af testiklerne under mikroskop (51,52).

Effekter af nanopartikler på reproduktion hos voksne hunner

Der er kun udført ganske få studier af nanopartiklers påvirkning af hunlig reproduktion (1), heraf to studier af flervæggede kulstofnanorør på NFA. I det første studie blev

hunmus instilleret en gang med kulstofnanorør dagen før de blev sat sammen med en kønsmoden han. Derefter fik parret lov til at gå sammen, indtil vægten af hunnen indikerede, at hun var drægtig. Da ungerne blev født, registrerede vi fødselsdagen. Resultatet viste, at de eksponerede hunmus i gennemsnit fødte 5 dage senere end kontrolmusene. Da drægtigheds-længden er relativt konstant hos mus, måtte de altså have været længere om at blive drægtige (17). Dette fund fik os til at overveje, om kulstofnanorør påvirker ægløsningen hos hunmus. Vi designede derfor et studie, der undersøgte længden af den reproduktive cyklus hos mus (svarer nogenlunde til menstruationscyklus hos mennesker). Vi benyttede samme eksponering som i det tidligere studie. I forsøget blev musenes kønscyklus forlænget i den periode, hvor de fik deponeret kulstofnanorør i lungerne. Den efterfølgende kønscyklus blev til gengæld kortere end hos kontrolhunnerne. Vi kunne ikke afdække årsagen til, at kulstof-

nanorør påvirkede kønscyklus hos musene. Kulstofnanorørene inducerede kraftig inflammation i musenes lunger, hvilket kan påvirke styringen af kønshormoner og muligvis ægløsning, og her er den hunlige cyklus meget følsom. Hos andre dyrearter er inflammation nemlig vist at forhindre ægløsning i den forlængede kønscyklus, så måske får mus sværere ved at blive drægtige efter at de har været udsat for nanorørene. I samme studie blev hunmus også instilleret en gang med kulstofnanorør og sat sammen med en kønsmoden han dagen efter. I dette studie fødte kontrol og eksponerede hunmus imidlertid nogenlunde samtidigt, så der var ikke tegn på, at eksponerede hunner var længere om at blive drægtige (18).

Opsummering og konklusion, reproduktion hos voksne dyr

Samlet set er der indikationer på, at partikler kan påvirke sædproduktion, men der er ikke konsensus mellem alle studier. Svejsepartikler ser dog ud til at påvirke sædproduktion, og det ved eksponeringer tæt ved den danske grænseværdi.

Resultater fra to studier af kulstofnanorør indikerer desuden, at partiklerne kan interferere med hunlig reproduktion. Her er det samlede vidensgrundlag imidlertid yderst begrænset (og det på verdensplan), og yderligere studier er meget ønskede.

Samlet konklusion

Dansk Center for Nanosikkerhed har bidraget betydeligt til den samlede viden om nanopartiklers påvirkning af fosterudvikling og fertilitet. Samlet set tyder resultaterne på, at udsættelse for forskellige typer af nanopartikler kan påvirke fosterudvikling og barnets udvikling, herunder især udvikling af hjernen og immunsystemet. Endvidere tyder forskningen på, at især svejserøg kan påvirke mænds fertilitet. Der ser også ud til at der for nogle effekter er noget overlap mellem fund i studier af partikeleksponering hos mennesker og i dyremodellerne, men en afdækning heraf

kræver en mere detaljeret analyse, der rækker ud over denne artikel. Helt klart er det dog, at forskningen peger på et behov for flere og gentagne studier for at identificere robuste effekter og for at kunne fastslå robuste sammenhænge mellem eksponering og dosis og effekt af eksponering for nanopartikler.

Her kunne det være relevant at følge anbefalingerne fra rapporten "A critical review of studies on the reproductive and developmental toxicity of nanomaterials", udgivet af EUs Observatorium for Nanomaterialer under ECHA (1) (se ramme).

Anbefalinger til fremtidig testning af nanopartikler for reproduktionstoksicitet (1)

- Anvend grundig og standardiseret karakterisering af nanomaterialet og eksponeringen for at afdække de vigtigste determinanter for toksicitet.
- Undersøg nanopartikler parallelt med større partikler for at få viden om betydningen af partikelstørrelse for forskelle i toksicitet (eller andre relevante fysisk-kemiske parametre, såsom partikelform).
- Forøg fokus på eksponering via luftvejene
- Øg fokus på kvindelig fertilitet og parametre med betydning for reproduktion
- Vælg meningsfulde eksponeringsperioder og tag herunder i betragtning, at passage over moderkagen sandsynligvis varierer betydeligt i løbet af graviditeten.
- Følg op på tidligere studier, hvis resultater giver anledning til bekymring, for at afklare om fundene er robuste.
- Benyt så vidt muligt accepterede guidelines for undersøgelse af reproduktionstoksicitet, fx fra OECD, selv om det ikke er muligt at følge guidelinien til fulde. Er de ikke allerede inkluderet, så medtag parametre hvor tidligere studier giver anledning til bekymring.
- Undersøg passage af partikler over "barrierer" (blod-testikel-barrieren, placenta) med anvendelse af meget følsomme metoder til undersøgelse af partikler i vævet.
- Identificer underliggende mekanismer for toksicitet for at lette gruppering af nanomaterialer i forhold til reproduktionstoksicitet. Opstår effekterne via direkte eller indirekte mekanismer?
- Koordiner testning mellem forskningsinstitutioner (fx i større testprogrammer) for at opnå en mere systematisk tilgang til testningen

Denne artikels udarbejdelse er støttet af NFAs forskningsprogram FFIKA (Fornyset fokus på forskning i kemisk Arbejds miljø), og mange af studierne fra NFA er udført under Dansk Center for Nanosikkerhed 1 og 2.

Yderligere oplysninger:

Karin Sørig Hougaard ksh@nfa.dk

Litteratur

1. Larsen PB, Mørck TA, Andersen DN, Hougaard KS. *A critical review of studies on the reproductive and developmental toxicity of nanomaterials*. Helsinki, Finland: 2020.
2. Pedersen M, Stayner L, Slama R, Sorensen M, Figueras F, Nieuwenhuijsen MJ et al. *Ambient air pollution and pregnancy-induced hypertensive disorders: a systematic review and meta-analysis*. *Hypertension* 2014 9/2014;64:494-500.
3. Gehring U, Tamburic L, Sbihi H, Davies HW, Brauer M. *Impact of noise and air pollution on pregnancy outcomes*. *Epidemiology* 2014 5/2014;25:351-358.
4. Kihal-Talantikite W, Marchetta GP, Deguen S. *Infant Mortality Related to NO2 and PM Exposure: Systematic Review and Meta-Analysis*. *Int J Environ Res Public Health* 2020 Apr 11;17.
5. Hehua Z, Qing C, Shanyan G, Qijun W, Yuhong Z. *The impact of prenatal exposure to air pollution on childhood wheezing and asthma: A systematic review*. *Environ Res*.2017 Nov;159:519-530.
6. Suades-Gonzalez E, Gascon M, Guxens M, Sunyer J. *Air Pollution and Neuropsychological Development: A Review of the Latest Evidence*. *Endocrinology* 2015 10/2015;156:3473-3482.
7. Clifford A, Lang L, Chen R, Anstey KJ, Seaton A. *Exposure to air pollution and cognitive functioning across the life course--A systematic literature review*. *Environ Res* 2016 5/2016; 147:383-398.
8. Bove H, Bongaerts E, Slenders E, Bijmens EM, Saenen ND, Gyselaers W et al. *Ambient black carbon particles reach the fetal side of human placenta*. *Nat Commun* 2019 Sep 17;10:3866.
9. Dugershaw BB, Aengenheister L, Hansen SSK, Hougaard KS, Buerki-Thurnherr T. *Recent insights on indirect mechanisms in developmental toxicity of nanomaterials*. *Part Fibre Toxicol* 2020 Jul 11;17:31.
10. Hougaard KS, Campagnolo L, Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Valentino S et al. *A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles*. *Reprod Toxicol* 2015 8/15/2015;56:118-140.
11. Pietroiusti A, Campagnolo L, Fadeel B. *Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers*. *Small* 2013 5/27/2013;9:1557-1572.
12. Skovmand A, Erdely A, Antonini JM, Nurkiewicz TR, Shoeb M, Eye T et al. *Inhalation of welding fumes reduced sperm counts and high fat diet reduced testosterone levels; differential effects in Sprague Dawley and Brown Norway rats*. *Part Fibre Toxicol* 2020 Jan 10;17:2.
13. Hougaard KS, Jackson P, Jensen KA, Saber AT, Vogel U, Wallin H. *Carbon nano-tubes: Effects on gestation and reproduction*. *Reprod Toxicol* 2010 2010;30:239.
14. Kyjovska ZO, Boisen AM, Jackson P, Wallin H, Vogel U, Hougaard KS. *Daily sperm production: Application in studies of prenatal exposure to nanoparticles in mice*. *Reprod Toxicol* 2013 1/4/2013;36:88-97.
15. Jackson P, Halappanavar S, Hougaard KS, Williams A, Madsen AM, Lamson JS et al. *Maternal inhalation of surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan) in C57BL/6 mice: effects in prenatally exposed offspring on hepatic DNA damage and gene expression*. *Nanotoxicology* 2013 2013;7:85-96.
16. Boisen AM, Shipley T, Jackson P, Hougaard KS, Wallin H, Yauk CL et al. *NanoTiO(2) (UV-Titan) does not induce ESTR mutations in the germline of prenatally exposed female mice*. *Part Fibre Toxicol* 2012 2012;9:19.
17. Hougaard KS, Jackson P, Kyjovska ZO, Birkedal RK, De Temmerman PJ, Brunelli A et al. *Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice*. *Reprod Toxicol* 2013 11/2013;41:86-97.

-
18. Johansson HKL, Hansen JS, Elfving B, Lund SP, Kyjovska ZO, Loft S et al. *Airway exposure to multi-walled carbon nanotubes disrupts the female reproductive cycle without affecting pregnancy outcomes in mice*. Part Fibre Toxicol 2017 5/30/2017;14:17.
 19. Hansen JS, Rosengren TS, Johansson HKL, Barfod KK, Larsen ST, Sorli JB et al. *Pre-conceptional exposure to multiwalled carbon nanotubes suppresses antibody production in mouse offspring*. Nanotoxicology 2020 Jun;14:711-724.
 20. Barfod KK, Vrankx K, Mirsepasi-Lauridsen HC, Hansen JS, Hougaard KS, Larsen ST et al. *The Murine Lung Microbiome Changes During Lung Inflammation and Intranasal Vancomycin Treatment*. Open Microbiol J 2015;9:167-179.
 21. Hemmingsen JG, Hougaard KS, Talsness C, Wellejus A, Loft S, Wallin H et al. *Prenatal exposure to diesel exhaust particles and effect on the male reproductive system in mice*. Toxicology 2009 7/23/2009;264:61-68.
 22. Hougaard KS, Jensen KA, Nordly P, Taxvig C, Vogel U, Saber AT et al. *Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice*. Part Fibre Toxicol 2008 3/11/2008;5:3:3.
 23. Ritz C, Ruminski W, Hougaard KS, Wallin H, Vogel U, Yauk CL. *Germline mutation rates in mice following in utero exposure to diesel exhaust particles by maternal inhalation*. Mutat Res 2011 7/1/2011;712:55-58.
 24. Jackson P, Hougaard KS, Boisen AM, Jacobsen NR, Jensen KA, Moller P et al. *Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: Effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring*. Nanotoxicology 2012 2012;6:484-500.
 25. Boisen AM, Shipley T, Jackson P, Wallin H, Nellemann C, Vogel U et al. *In utero exposure to nanosized carbon black (Printex90) does not induce tandem repeat mutations in female murine germ cells*. Reprod Toxicol 2013 11/2013;41:45-48.
 26. Jackson P, Vogel U, Wallin H, Hougaard KS. *Prenatal Exposure to Carbon Black (Printex 90): Effects on Sexual Development and Neuro-function*. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2011 6/23/2011;109:434-437.
 27. Jackson P, Hougaard KS, Vogel U, Wu D, Casavant L, Williams A et al. *Exposure of pregnant mice to carbon black by intratracheal instillation: Toxicogenomic effects in dams and offspring*. Mutat Res 2012 2012;745:73-83.
 28. Skovmand A, Jensen ACO, Maurice C, Marchetti F, Lauvas AJ, Koponen IK et al. *Effects of maternal inhalation of carbon black nanoparticles on reproductive and fertility parameters in a four-generation study of male mice*. Part Fibre Toxicol 2019 Mar 18;16:13.
 29. Umezawa M, Onoda A, Korshunova I, Jensen ACO, Koponen IK, Jensen KA et al. *Maternal inhalation of carbon black nanoparticles induces neurodevelopmental changes in mouse offspring*. Part Fibre Toxicol 2018 Sep 10; 15:36.
 30. Hougaard KS, Jackson P, Jensen KA, Sloth JJ, Loschner K, Larsen EH et al. *Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice*. Part Fibre Toxicol 2010 6/14/2010;7:16:16.
 31. Hakonsen LB, Ernst A, Ramlau-Hansen CH. *Maternal cigarette smoking during pregnancy and reproductive health in children: a review of epidemiological studies*. Asian J Androl 2014 Jan-Feb;16:39-49.
 32. Ema M, Naya M, Horimoto M, Kato H. *Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals*. Reprod Toxicol 2013 12/2013;42:1-17.
 33. Mortensen JT. *Risk for reduced sperm quality among metal workers, with special reference to welders*. Scand J Work Environ Health 1988 2/1988;14:27-30.
 34. Bonde JP. *Semen quality and sex hormones among mild steel and stainless steel welders: a cross sectional study*. Br J Ind Med 1990 8/1990;47:508-514.
-

-
35. Bonde JP. *Semen quality and sex hormones among mild steel and stainless steel welders: a cross sectional study.* Br J Ind Med 1990 Aug;47:508-514.
36. Bonde JP. *Subfertility in relation to welding. A case referent study among male welders.* Dan Med Bull 1990 2/1990;37:105-108.
37. Bonde JP, Hansen KS, Levine RJ. *Fertility among Danish male welders.* Scand J Work Environ Health 1990 10/1990;16:315-322.
38. Danadevi K, Rozati R, Reddy PP, Grover P. *Semen quality of Indian welders occupationally exposed to nickel and chromium.* Reprod Toxicol 2003 Jul-Aug;17:451-456.
39. Hjollund NH, Bonde JP, Jensen TK, Henriksen TB, Kolstad HA, Ernst E et al. *A follow-up study of male exposure to welding and time to pregnancy.* Reprod Toxicol 1998 1/1998;12:29-37.
40. Hjollund NH, Bonde JP, Jensen TK, Ernst E, Henriksen TB, Kolstad HA et al. *Semen quality and sex hormones with reference to metal welding.* Reprod Toxicol 1998 3/1998;12:91-95.
41. Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. *Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen.* European urology 2016 Oct;70:635-645.
42. Jurewicz J, Dziewirska E, Radwan M, Hanke W. *Air pollution from natural and anthropic sources and male fertility.* Reprod Biol Endocrinol. 2018 Dec 23;16:109.
43. Kwon JT, Hwang SK, Jin H, Kim DS, Minai-Tehrani A, Yoon HJ et al. *Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice.* J Occup Health 2008 2008;50:1-6.
44. Skovmand A. *Pulmonary exposure to nanoparticles and effects on the male reproductive system: a study of sperm quality.* Copenhagen: University of Copenhagen; 2019.
45. Skovmand A, Jacobsen LA, Christensen P, Vogel U, Sorig HK, Goericke-Pesch S. *Pulmonary exposure to carbonaceous nanomaterials and sperm quality.* Part Fibre Toxicol 2018 1/31/2018;15:10.
46. Yoshida S, Hiyoshi K, Ichinose T, Takano H, Oshio S, Sugawara I et al. *Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice.* Int J Androl 2009 8/2009;32:337-342.
47. Lauvas AJ, Skovmand A, Poulsen MS, Kyjovska ZO, Roursgaard M, Goericke-Pesch S et al. *Airway exposure to TiO2 nanoparticles and quartz and effects on sperm counts and testosterone levels in male mice.* Reprod Toxicol 2019 Dec;90:134-140.
48. Meena R, Kajal K, R P. *Cytotoxic and genotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles in testicular cells of male wistar rat.* Appl Biochem Biotechnol 2015 Jan;175:825-840.
49. Zhang J, Ren L, Zou Y, Zhang L, Wei J, Li Y et al. *Silica nanoparticles induce start inhibition of meiosis and cell cycle arrest via down-regulating meiotic relevant factors.* Toxicol Res (Camb) 2016 Sep 1;5:1453-1464.
50. Krajnak K, Sriram K, Johnson C, Roberts JR, Mercer R, Miller GR et al. *Effects of pulmonary exposure to chemically-distinct welding fumes on neuroendocrine markers of toxicity.* J Toxicol Environ Health A 2017;80:301-314.
51. European Medicines Agency. *ICH S5 (R3) guideline on reproductive toxicology: detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals.* Step 2b. 2017.
52. OECD. *OECD Guideline for testing of chemicals. Combined repeated Dose Toxicity with the reproduction/developmental toxicity screening test.* [C(2016)103]. OECD/OCDE 422 Adopted: 29 July 2016: OECD; 2016.
53. Antonini JM, Kodali V, Shoeb M, Kashon M, Roach KA, Boyce G et al. *Effect of a High-Fat Diet and Occupational Exposure in Different Rat Strains on Lung and Systemic Responses: Examination of the Exposome in an Animal Model.* Toxicol Sci 2020 Mar 1;174:100-111.
54. Arbejdstilsynet. *Grænseværdier for stoffer og materialer.* At-vejledning C.0.1. København: Arbejdstilsynet; 2007.
55. *Bekendtgørelse om grænseværdier for stoffer og materialer.* Arbejdstilsynets bekendtgørelse nr. 507 af 17. maj 2011 med senere ændringer - ikke autoriseret sammenskrivning. 2011. Report No.
-

Kardiovaskulære helbredseffekter af eksponering for nanopartikler – evidens i mennesker og mekanismer

Af Peter Møller¹, Regitze Sølling Wils¹, Claudia Andrea Torero Gutierrez^{1,2}, Maria Helena Guerra Andersen², Rebecca Harnung Scholten¹, Martin Roursgaard¹

Introduktion

Der er en veletableret sammenhæng i epidemiologiske studier mellem eksponering for luftforureningspartikler og forøget risiko for at dø af iskæmisk hjertesygdom, herunder blodprop i hjertet og hjernen (1,2). Det er ikke alene mangeårig eksponering for luftforurening, der er forbundet med øget dødelighed af hjerte-kar-sygdomme, men epidemiologiske studier har også vist, at en pludselig forværring i luftforurening medfører en akut stigning i den kardiovaskulære mortalitet, særligt hos ældre og individer med eksisterende hjertesygdom (3). Eksponering for nanopartikler kan på nogle områder sammenlignes med eksponering for ultrafine luftforureningspartikler. Nanopartikler er mindre end 100 nm i diameter, hvilket er det samme som ultrafine partikler. Der er dog nogle helt afgørende forskelle mellem nanopartikler og luftforurening, der gør, at nanopartikler bør vurderes selvstændigt. Nanopartikler defineres som et menneskeskabt materiale med et teknisk formål, hvorimod ultrafine partikler er en kompleks blanding af kemiske stoffer, som dannes ved kondensation af halvflygtige organiske forbindelser og bi-produkter fra forbrænding af brændstof.

I denne artikel beskriver vi mekanismerne for udvikling af hjerte-kar-sygdom ved eksponering for nanopartikler. Relevante studier fra luftforureningspartikler eller dieseludstødningspartikler inddrages i tilfælde, hvor litteraturen på nanopartikler er mangelfuld. Vi

fokuserer på studier, der har undersøgt rene kulstofpartikler, men også studier der omfatter kulstofnanorør og titaniumdioxid (TiO₂). Det er disse nanopartikler, som har været genstand for de fleste undersøgelser om risikoen for hjerte-kar-sygdomme. Kulstofpartikler og TiO₂ anvendes som farvestoffer og produceres både som nanopartikler, men også som blandingsprodukter af partikler med forskellig størrelse (betegnes typisk som *bulk* materiale). Vi har kun inkluderet studier, der undersøger disse materialer som nanopartikler. Kulstof nanorør er fibre, men defineres som nanomaterialer fordi de på den korte led er mindre end 100 nm. De er kendetegnet ved at være lette materialer med stor mekanisk styrke, samt andre unikke egenskaber. De anvendes til for eksempel byggematerialer, elektronik og overfladecoatings.

Der findes endnu ikke epidemiologiske studier på nanopartikel-eksponerede mennesker. Der er dog flere studier på arbejdere i industrier til produktion af sort farvestof (carbon black) og hvidt farvestof (TiO₂). Tre epidemiologiske studier på carbon black-eksponerede arbejdere har ikke indikeret øget risiko for hjerte-kar-sygdom (4). Epidemiologiske studier af arbejdere fra TiO₂-producerende virksomheder har heller ikke vist nogen sammenhæng mellem eksponering og øget risiko for hjerte-kar-sygdom (5-7). Det skal dog bemærkes, at disse studier omfatter arbejdere, som har været eksponeret for *bulk* materialet (dvs. materiale i både nanostørrelse og større partikler), og den personlige eksponering for nanopartikler af carbon black og TiO₂ er utilstrækkeligt undersøgt i studierne. På nuværende tidspunkt er man derfor nødt til at anvende andre undersøgelsesmetoder end epidemiologiske studier,

¹ Institut for Folkesundhedsvidenskab, Afdeling for Miljø og Sundhed, Københavns Universitet.

² Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø

hvis man skal vurdere, om eksponering for nanopartikler forårsager hjerte-kar-sygdomme hos mennesker. Toksikologiske undersøgelser på dyr er derfor i øjeblikket den vigtigste kilde til at vurdere faren for hjerte-kar-sygdomme hos mennesker ved eksponering for nanopartikler. Forsøgsdyrene bliver enten eksponeret ved inhalation af en aerosol af nanopartikler eller ved at nanopartiklerne sprøjtes direkte ned i de nedre luftveje (i denne artikel benævnt som *instillation*, om end der er forskellige metoder til at applicere nanopartikler direkte i de nedre luftveje). Det er mere biologisk relevant at eksponere forsøgsdyr ved inhalation end instillation i luftrøret, men inhalationsforsøg er teknisk set vanskeligere og omkostningstunge. Instillationsforsøg har også den fordel, at den deponerede dosis af partiklerne er velkendt, og det er derfor nemt at sammenligne det toksikologiske respons af forskellige nanopartikler.

Typer af hjerte-kar-sygdom

Den overordnede definition på hjerte-kar-sygdom er ifølge Sundhedsstyrelsen ”*lidelser i hjerte og/eller kar, der ofte skyldes åreforkalkning, men som også kan være delvist arvelige eller betinget af andre årsager*”. (www.sst.dk/da/viden/hjertesygdom).

WHO's seneste klassifikation af sygdomme inkluderer flere diagnoser, som er relevante i forhold til helbredsrisici ved eksponering for nanopartikler: blodtryksforhøjelse, iskæmiske hjertesygdomme (herunder angina pectoris), akut myokardieinfarkt, komplikationer i efterløbet af akut myokardieinfarkt, andre former for akut iskæmisk hjertesygdom, kronisk iskæmisk hjertesygdom, blodprop i lunge, hjerneinfarkt, okklusioner og stenoser af præcerebrale arterier uden hjerneinfarkt, okklusioner og stenoser af cerebrale arterier uden hjerneinfarkt og åreforkalkning. (<https://icd.who.int/browse10/2016/en>).

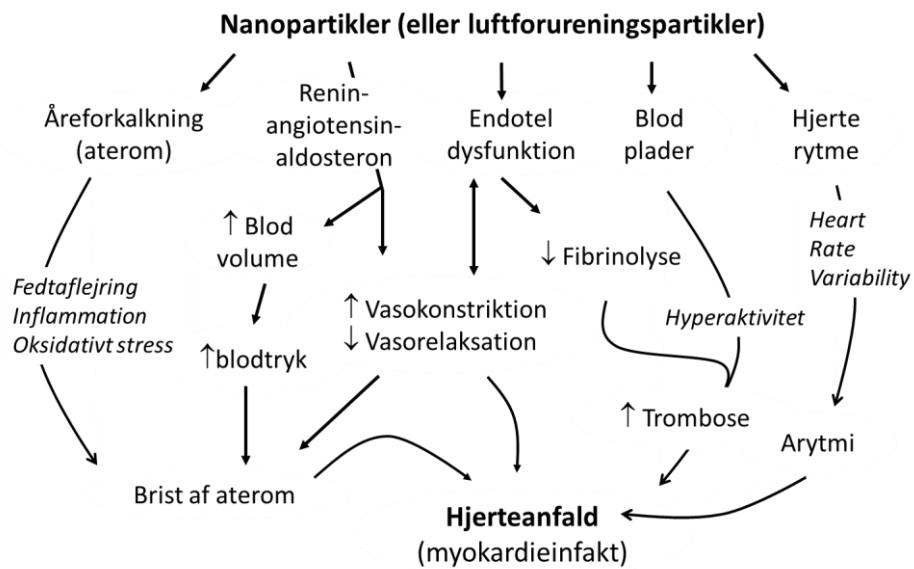
Hjerte-kar-sygdomme er således en lang række tilstande, der både omfatter hjertesygdom, men også sygdomme knyttet til øvrige kar, herunder blodpropper i kar, der forsyner andre organer.

Hjernens blodforsyning er speciel kritisk eftersom neuronerne er meget sårbare overfor nedsat iltforsyning. Ved tilstande, hvor hjertets pumpefunktion er kompromitteret, fx som konsekvens af iskæmisk hjertesygdom, kan der ske sekundær påvirkning af øvrige organer.

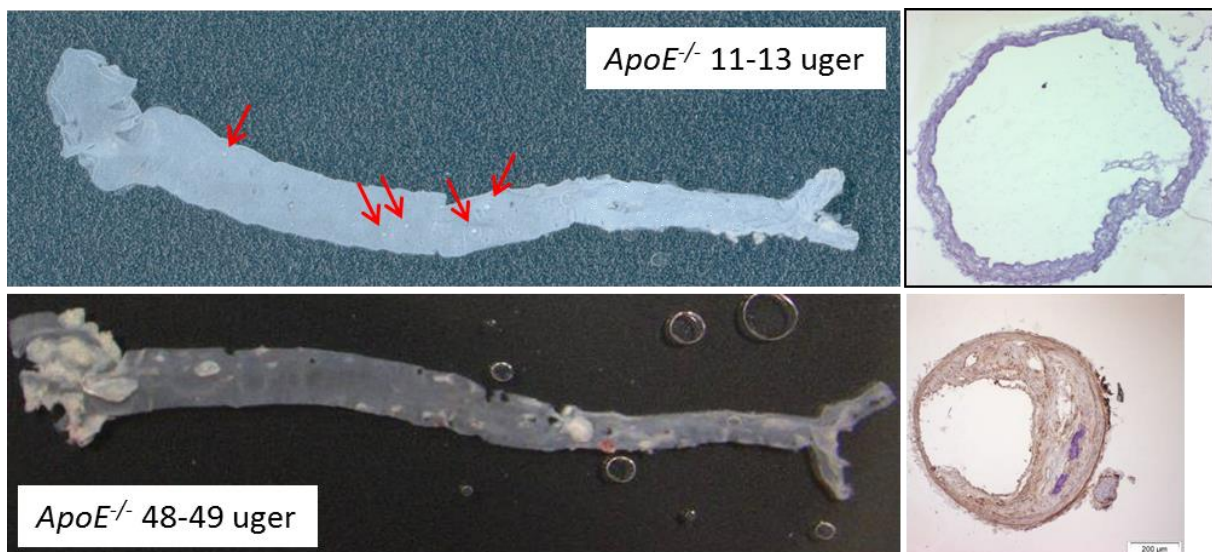
Mekanismer for udvikling af hjerte-kar-sygdom

Ved hjerte-kar sygdom er kroppens evne til at transportere den rette mængde blod nedsat. Den nedsatte blodforsyning i forhold til et vævs behov kaldes iskæmi og er kendetegnet ved stofskifteforandringer pga den manglende forsyning med ilt og næringsstoffer. Langt de fleste tilfælde af iskæmi er forårsaget af blodpropper. Figur 1 viser sammenhængen mellem eksponering for nanopartikler og udvikling af hjerteanfald. Der er i høj grad tale om kombinerede effekter af flere forskellige mekanismer, som i sidste ende ses som klinisk debut af et hjerteanfald.

Iskæmiske sygdomme opstår på baggrund af åreforkalkning, fordi fedtstoffer og andet materiale ophobes i afgrænsede områder i arterierne (kaldet *ateromer*). Dette forårsager en gradvis forsnævring af blodkarret. Figur 2 viser åreforkalkning med dertil hørende indsnævring af karrets lumen i mus, der er disponeret for udvikling af aterosklerose (dyslipidemiske apolipoprotein E knockout mus). Endotelceller udgør det inderste lag i blodkarrene og har vigtige funktioner i forhold til regulering af blodgennemstrømningen. Derudover forhindrer endotelcellerne spontan dannelse af blodpropper samt at medvirke til rekruttering af immunforsvarets celler til det underliggende væv i forbindelse med infektioner eller vævsskader. Det er i forbindelse med disse funktioner, at monocytter, der er en del af immunsystemets celler, fanges i blodkarvæggen og udvikler sig til fedtspisende skumceller (*foam cells* på engelsk). Disse skumceller vokser, og lumen i blodkarret formindskes derved. I starten af åreforkalkningsprocessen dannes en bindevævsskappe under endotelcellerne, som stabiliserer aterosklerosen, men senere i forløbet bliver kappen svagere. Til sidst kan den bryde og den



Figur 1. Sammenhæng mellem eksponering for nanopartikler og udvikling af hjerteanfald.



Figur 2. Eksempler på åreforkalkning i aorta (venstre) og den første arterieforgrening af aorta (højre) i dyslipidemiske apolipoprotein E knockout mus. Åreforkalkning ses som hvide områder i aorta eller forsnævringen af lumen. Unge mus har kun få områder med åreforkalkning (øverste panel, pilene viser små områder med åreforkalkning), mens der senere er udtalt åreforkalkning i specielt aortaroden (venstre del af blodkarret) og den første forgrening af aorta (højre billeder, tværsnit af karret). Billederne er tidligere publiceret (8,9).

efterfølgende koagulation af blodet lukker for blodgennemstrømningen. Alternativt kan dele af en blodprop rives løs (kaldet *emboli*) og føres med blodstrømmen til mindre kar, fx i lungerne, hvor passagen bliver så snæver, at blodkarret lukkes.

Åreforkalkning i partikeleksponerede mennesker og forsøgsdyr

Der findes ikke studier på mennesker, der direkte har vist en sammenhæng mellem eksponering for nanopartikler og åreforkalkning. Derimod er der flere epidemiologiske studier, som har vist, at partikulær luftforurening forværrer åreforkalkningen (10-13). Dyreeksperimentelle modelsystemer har været anvendt i toksikologiske studier til at undersøge mekanismerne for udviklingen af åreforkalkning ved partikeleksponering og til at vurdere, om partikler har forskellig potens. Normale laboratoriedyr, som mus og rotter, udvikler ikke åreforkalkning. Man anvender derfor næsten altid knockout mus, der har dyslipidæmi (fx apolipoprotein E knockout mus) eller specielt avlede kaniner, der udvikler åreforkalkning. Figur 3 viser udviklingen af åreforkalkning i dyslipidemiske apolipoprotein E knockout mus. Unge apoE mus har stort set ikke åreforkalkning, men udvikler dette spontant på normal kost med stigende alder. Åreforkalkningen accelereres dog yderligere ved indtagelse af fedtholdig kost.

Figur 4 viser resultaterne fra forskellige undersøgelser af partiklers effekt på åreforkalkning i dyslipidemiske apolipoprotein E knockout mus (9,14-18). Samme figur viser også effekterne af luftforureningspartikler, dieseludstødningspartikler og nanopartikler (carbon black, TiO₂, kulstof nanorør, C₆₀ fullereener, nikkeldihydroxid, ceriumdioxid, silicium-baserede nanopartikler og quantum dots), som er baseret på et litteraturstudium (19). Overordnet set viser meta-analysen, at nanopartiklers evne til at forårsage åreforkalkning ligger mellem luftforureningspartikler (mest potente) og dieseludstødningspartikler (mindst potente). Det skal dog nævnes, at dette er gennemsnitsforskelle,

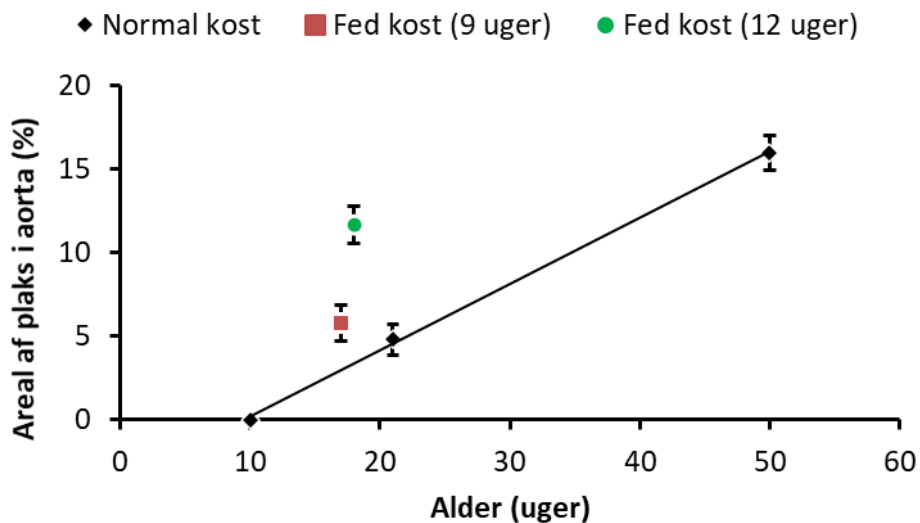
og der er ikke standardiseret for forskelle i eksponeringen mellem studierne. De reelle forskelle kan sammenlignes med den aldersbetingede forskel i dyslipidemiske apoE knockout mus (jf. figur 4). Eksponeringen for luftforureningspartikler, nanopartikler og dieseludstødningspartikler har forårsaget en stigning i åreforkalkning svarende til den, man ser i løbet af henholdsvis 5, 2 og 1 uger hos dyslipidemiske apoE knockout mus på normal kost.

Dysfunktion af endotelceller

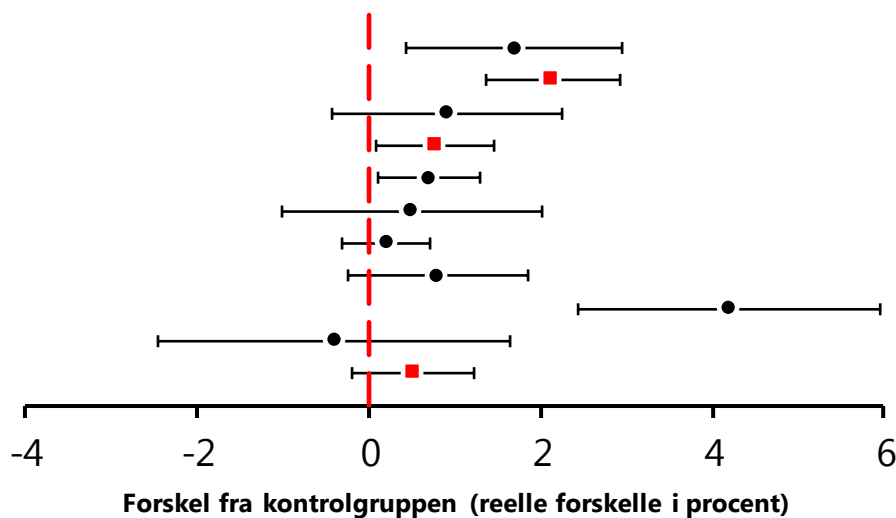
Endotelet er det inderste lag af celler i blodårerne. Endotelcellerne er involveret i opretholdelsen af den vaskulære homeostase, som omfatter kontrollen med tonus af blodkarrene, blodets flydeevne (eller koagulation) og inflammation (20). Lumen i blodkarrene reguleres ved frisætning af forskellige vasoaktive stoffer, som enten kontraherer eller udvider blodkarrene. Et fuldt funktionelt endotel er kendetegnet ved at have en hæmmende effekt på inflammation og celledeling i blodkarvæggen samt at hindre uhensigtsmæssig trombedannelse. Ved dysfunktion af endotelcellerne ses forandret vasomotorfunktion, øget tendens til at danne blodpropper (eller nedsat tendens til at opløse blodpropper), proinflammatorisk respons og stimulering af celledeling i blodkarvæggen (medvirkende årsag til remodelering af arterierne).

Vasomotor dysfunktion

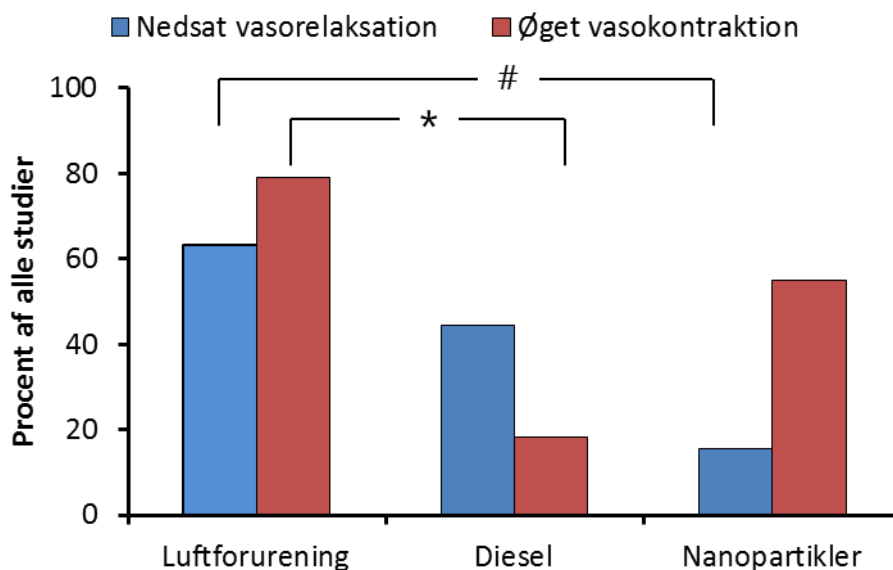
Vasomotorfunktionen undersøges ved at stimulere blodkarrene til at udvide (vasorelaksation) eller trække sig sammen (vasokontraktion) som følge af eksponering for vasoaktive stoffer eller fysisk påvirkning. Der findes ingen humane studier af vasomotorfunktionen efter eksponering for "virkelige" nanopartikler, men der findes en undersøgelse af ultrafine kulstofpartikler (21). Personerne inhalerede i to timer ultrafine kulstofpartikler igennem en maske, samtidig med at de havde fire perioder med fysisk aktivitet på en kondicykel i 15 min. Resultaterne viste en forbigående øget vaso-



Figur 3. Areal af åreforkalkning (plaks) i aorta i dyslipidemiske apolipoprotein E knockout mus på normal eller fedtholdig kost. Data stammer fra forskellige studier af partiklers effekt på udvikling af åreforkalkning (9,14-16).



Figur 4. Sammenhæng mellem lungemæssig eksponering for partikler og åreforkalkning. Resultaterne fra forskellige studier er vist på y-aksen. X-aksen viser den reelle forskel (dvs. procent af aorta med plaks) mellem gruppen af partikeleksponerede dyr og kontrolgruppen. Resultaterne fra en meta-analyse (røde firkanter) er omregnet fra en standardiseret gennemsnitsforskelle til den reelle forskel (dvs. procent af aorta som har plaks) mellem eksponerede og ikke-eksponerede dyr (19). Resultaterne på flervæggede kulstof nanorør (MWCNT) er baseret på to forskellige studier, hvoraf det ene undersøgte effekten umiddelbart efter sidste eksponering og fire uger efter (MWCNT/recovery). Resultaterne er publicerede i tidligere studier (9, 14-18).



Figur 5. Lungemæssig eksponering for partikler og vasomotor dysfunktion i forsøgsdyr. Grafen viser antallet af studier (i procent) der har vist nedsat vasorelaksation eller øget vasokontraktion. Der er i alt 55 og 41 studier, som har undersøgt henholdsvis vasorelaksation og vasokontraktion. Data er publiceret i en oversigtsartikel (22). # $P < 0,01$ ($\chi^2 = 11,7$), * $P < 0,05$ ($\chi^2 = 7,2$).

motorfunktion 3,5 timer efter eksponering for ultrafine kulstofpartikler, mens der var uforandret vasomotorfunktion umiddelbart efter eksponeringen og på senere tidspunkter (21 og 45 timer efter eksponeringen). Effekten kan muligvis bero på, at partikeleksponeringen hæmmede en øget vasomotorfunktion efter den fysiske aktivitet (21). Observationen er dog forskellig fra andre kontrollerede eksponeringsstudier på mennesker, udsat for luftforureningspartikler og dieseludstødningspartikler, hvor det er vist, at arteriernes evne til at udvide sig reduceres (19). Der findes til gengæld talrige dyrestudier, hvor vasomotorfunktionen i forbindelse med eksponering for luftforureningspartikler, dieseludstødningspartikler eller nanopartikler er blevet undersøgt. Derfor har det været muligt at sammenligne i antallet af studier med positive fund om end det ikke er muligt at sammenligne størrelsesforskelle i responset, fordi studierne har anvendt forskellige metoder. Figur 5 viser en oversigt over studier, som har undersøgt vasomotor dysfunktion i dyreeksperimentelle undersøgelser (22).

Færre studier har vist nedsat vasorelaksation efter eksponering med nanopartikler i forhold til luftforureningspartikler, mens nogenlunde lige så stor procentdel af studierne på luftforureningspartikler og nanopartikler har vist forøget vasokontraktion. Selv små doser, som ikke forårsager inflammation i lungerne, forårsager en ændring af vasomotor funktionen. Resultaterne af dyrestudierne er ikke entydige, men man kan konkludere, at eksponering for de tre nævnte typer partikler påvirker vasomotorfunktionen i retning af nedsat vasorelaksation og øget vasokontraktion. Hos mennesker vil en sådan situation med nedsat vasorelaksation og øget vasokontraktion kunne forøge blodtrykket og hjertet belastes, fordi det skal pumpe imod en større karmodstand.

Dannelse og opløsning af tromber

En trombe er en fast masse bestående af blodplader, fibrin og tilstødende røde blodlegemer. Tromber dannes som led i det normale blod-

koagulationssystem ved beskadigelse af blodkarrene for at undgå lækage af blod til det omgivne væv eller kroppens overflader. Dannelsen af denne blodprop har til formål at stoppe blødningen, indtil skaden er repareret og blodproppen kan opløses (dvs. fibrinolyse). Indenfor ganske kort tid efter en beskadigelse af et blodkar binder aktiverede blodplader til karvæggen og danner en overflade, hvorpå koagulationsfaktorerne binder, og igennem en kaskade af faktorer omdannes prothrombin til thrombin, der resulterer i dannelsen af en blodkoagel af fibrin. Efter sårheling nedbrydes fibrin (fibrinolyse) ved, at plasminogenaktivator, som er frigjort fra endotelcellerne, binder til fibrin og omdanner plasminogen til plasmin, som nedbryder fibrinen (23).

Disposition til udvikling af tromber kan skyldes flere faktorer, men blandt de vigtigste er endothelcelle dysfunktion. Endothelcellerne spiller en vigtig rolle i opretholdelsen af en adækvat balance mellem dannelse og opløsning af blodpropper. Dysfunktion af endotelceller nedsætter evnen til at opløse dannede blodpropper (fibrinolyse). Sideløbende er der større tendens til at danne blodpropper på grund af aktivering af blodplader i blodet. Nettoresultatet bliver, at balancen mellem dannelse og opløsning af blodpropper forrykkes mod en øget tendens til blodpropdannelse (trombose), hvilket bliver specielt problematisk, hvis der opstår brud på blodkarret. Blodpladerne aktiveres, fordi disse brud blotlægger den underliggende bindevævs-kappe. Dysfunktion af endotelcellerne kan opstå i alle blodkar, men ses oftest ved forgreninger eller bøjninger i det arterielle kredsløb, da det tryk, som blodet udøver på endotelcellerne, er nedsat netop disse steder. Det er også de samme steder, hvor der opstår åreforkalkning.

Eksposering for luftforureningspartikler påvirker flere af disse processer i retning af et pro-trombotisk miljø i blodet på mennesker (24). Det er også vist, at instillation af luftforureningspartikler direkte i lungerne på mus forkortede koagulationstiden for blod fra hale-

venen (25). Der er dog væsentligt større usikkerhed om effekten af nanopartikler. Forsøg på rotter har vist, at inhalation af carbon black ikke havde nogen effekt på aktiviteten af blodplader (26). Et andet studie på rotter fandt heller ikke konsistente fund på forskellige biomarkører for en pro-trombotisk tilstand efter inhalation af ultrafine kulstofpartikler (27). Derimod har instillation af kulstof nanorør i lungerne været forbundet med aktivering af blodplader og et generelt pro-trombotisk respons på en induceret skade i en halspulsåre (28).

Hjertefunktion, blodtryk og renin-angiotensin-aldosteron systemet

Et komplekst samspil af fysiologiske systemer varetager regulation af blodtrykket, hvoraf nogle systemer kan aktiveres øjeblikkeligt (fx det sympatiske nervesystem), imens andre systemer aktiveres langsommere (fx renin-angiotensin-aldosteron-aksen og vasopressin frigives fra hypofysebaglappen). Der er ligeledes forskelle i varigheden af et givent respons. Man kan derfor forvente, at eksponeringen for nanopartikler vil have både en kortvarig (akut) og langvarig (kronisk) effekt på blodtrykket. Der er relativt mange epidemiologiske undersøgelser, som har vist en positiv sammenhæng mellem koncentrationen af luftforureningspartikler og blodtryksniveauer. En meta-analyse af disse studier har vist, at det systoliske og diastoliske blodtryk stiger med henholdsvis 1,4 og 0,9 mmHg per 10 µg/m³-stigning i koncentrationen af luftforureningspartikler, som er mindre end 2,5 µm i aerodynamisk diameter (29). Et studie på rotter har vist at en kortvarig eksponering (5 timer) for kulstof nanorør resulterede i en signifikant øgning af både diastolisk og systolisk blodtryk i selve eksponeringsperioden (30). Blodtrykket vedblev at være svagt forhøjet 1 døgn efter eksponeringen (dog ikke statistisk signifikant sammenlignet med kontrolgruppen), mens det 7 dage efter eksponeringen var normaliseret set i forhold til kontrolgruppen (29). Samme undersøgelse viste også, at hjertets pumpefunktion hos de eksponerede

rotter var nedsat, når de blev behandlet med dobutamin, som øger hjertets kontraktilitet og slagvolumen ved aktivering af beta-1-adrenerge receptorer (30). Resultaterne tyder på, at eksponering for kulstofnanorør påvirker hjertet, fordi det skal yde et større arbejde pga. det forøgede blodtryk, samtidig med at den maksimale kapacitet bliver nedsat.

Renin-angiotensin-aldosteron systemet er et ”langsomt” hormonsystem, der har til formål at regulere blodtrykket. Hvis blodtrykket falder, så registreres en nedsat blodtilstrømning af specialiserede celler i nyrerne, hvorved der sker en frigivelse af renin. Renin omdanner angiotensinogen (dannes i leveren) til angiotensin I, som omdannes til angiotensin II af angiotensin-converting enzyme (ACE) på endotelceller i specielt lungerne. Angiotensin II forårsager vasokontraktion og stimulerer cellerne i binyrebarken til at frigive aldosteron, der øger re-absorptionen af vand og natrium i nyrerne. Herved øges mængden af blod, som sammen med en øget vaskulær modstand, øger blodtrykket. Der er vist en positiv association mellem koncentrationen af forureningspartikler i luften og størrelsen af blodtrykket samt niveau af ACE i serum hos mennesker (31). Dyreeksperimentelle studier har vist, at 8 ugers eksponering for luftforureningspartikler resulterede i en øgning af blodtrykket samt en øgning af angiotensin II-receptorer og ACE i lunger, hjerte og nyrer hos rotter (32,33). Et andet studie har vist, at inhalation af ultrafine kulstofpartikler ligeledes øgede både blodtrykket og aktiviteten af renin-angiotensin systemet (34). Resultaterne på nanopartikler er stadigvæk sparsomme, om end der er vist, at instillation af kulstofnanorør forøgede koncentrationen af ACE i blodet hos rotter, som er specielt avlet til spontant at udvikle hypertension (35).

Forandret hjerterytme

Hjerterytmen ændrer sig hele tiden for at opfylde organernes behov for ilt og næringsstoffer. En nedsat hjerterytmevariation (*heart rate variability* på engelsk) indikerer, at hjertet har nedsat evne til at finjustere blodfor-

syningen i forhold til kroppens behov. Hjerterytmen undersøges ved at måle de elektriske impulser i et elektrokardiogram. Traditionelt opdeles elektrokardiogrammet i data som beskriver variationen i tidsperioden mellem hjertets slag (tidsdomæne) og frekvensen af hjerteslag (frekvensdomæne). Disse oplysninger bruges til at undersøge den underliggende årsag til hjerterytmeforstyrrelsen.

Der er lavet et lille studie om hjerterytmevariation på fire arbejdere, som håndterede partikulært TiO₂ i deres arbejdsprocesser (36). Dette viste, at eksponering for partikulært TiO₂ medførte ændring af en enkelt parameter af betydning for hjerterytmevariationen, mens flere andre betydende parametre var uændrede (36). Der er derfor usikkerhed om observationen af forandret hjerterytmevariation, og det skal bemærkes, at der ikke var en egentlig kontrolgruppe af ikke-eksponerede arbejdere, og der heller ikke blev korrigeret for den fysiske arbejdsintensitet. Kontrollerede undersøgelser på mennesker har ikke indikeret, at inhalation af ultrafine kulstofpartikler forårsagede konsistente forandringer i hjerterytmevariationen hos hverken raske mennesker eller patienter med type 2 diabetes (37-39). Dyreeksperimentelle studier har vist nedsat hjerterytmevariation hos spontant hypertensive rotter efter inhalation af ultrafine kulstofpartikler (34), mens der ikke var nogen effekt i normale vildtype rotter (40). Der var dog ikke entydig nedsat hjerterytmevariation i spontant hypertensive rotter ved instillation af ultrafine carbon black partikler i lungerne (41). Forsøg på mus har vist nedsat hjerterytmevariation i to forskellige stammer ved inhalation af carbon black (42). Samme effekt blev fundet ved instillation direkte i lungerne med carbon black hos mus (43). Inhalation af TiO₂ forårsagede en forkortet periode i hjertets diastole, som er den fase hvor hjertet afslappes og fyldes med blod (44). Derimod var der uforandret hjerterytmevariation i spontant hypertensive rotter efter gentagne instillationer med TiO₂ i lungerne, en gang per uge i 7 uger, om end eksponeringen forårsagede fibrotiske forandringer i hjertet (45). De dyreeksperimen-

telle studier antyder, at hjerterytmevariationen kan blive påvirket ved eksponering for nanopartikler.

”Missing link” mellem lungemæssig eksponering for partikler og kardiovaskulære effekter

En forudsætning for, at inhalation af partikler fører til effekter i blodbanen, er, at partiklerne når kredsløbet, eller at der frigives aktive stoffer fra lungerne, som kan forårsage systemiske forandringer. Hvor stor en del af de deponerede partikler i lungerne der translokere til blodet afhænger af typen af partikler, men det er sandsynligvis mellem 0,00001 og 1 % af den deponerede dosis (46). Det er vist, at inhalation af meget små nanopartikler (<5 nm) genfindes i områder af kredsløbet med inflammatoriske områder som fx åreforkalkningsplaks (47). Det er dog stadigvæk uklart, om koncentrationen af nanopartikler er stor nok til reelt at påvirke endotelcellerne eller åreforkalkningsprocessen. En anden hypotese til at forklare mekanismen for partikelinduceret hjerte-kar-sygdom er, at deponeringen i lungerne forårsager oksidativt stress og inflammation, hvorved aktive mediatorer overføres til blodet. Hypotesen har sin oprindelse i en artikel, som blev publiceret i 1995 og beskrev mediatorerne som faktorer, der forårsager ”akut påvirkning af blodets koagulation og andre mediatorer” (oversat fra engelsk) (48). Mediatorerne blev senere specificeret som cytokiner, koagulationsfaktorer og oksideret lav-densitet-lipoproteiner (49). Partikelinduceret oksidativt stress og inflammation antages at være vigtige mekanismer for dysfunktionen af endotelceller, åreforkalkning og forøget trombosetendens (50). Hypotesen betegnes typisk som ”spill-over” effekten fra lungerne til systemiske effekter og er generelt accepteret som en vigtig mekanisme for partikel-induceret hjerte-kar-sygdom (51). Det er dog bemærkelsesværdigt, at en systematisk gennemgang af studier om luftforurening har vist, at plasmaniveauer af cytokiner og akutfaseproteiner kun var forhøjet med 1,07-fold (95 % konfidensinterval: 1,06 – 1,51) i mennesker og 1,28-fold (95 % konfidensinterval: 1,10 – 1,71)

i dyr (52). Til sammenligning defineres kronisk systemisk inflammation (engelsk ”chronic low-grade inflammation”) som en 2-fold stigning i plasmaniveauer af cytokiner eller akutfase proteiner. En meta-analyse af studier på lungemæssig eksponering for luftforureningspartikler, dieseludstødningspartikler og nanopartikler har ikke vist klar sammenhæng mellem positive testresultater i form af vasomotordysfunktion og åreforkalkning i dyreforsøg og plasmaniveauer af inflammationsmarkører i blodet (19).

Da det endnu ikke er lykkedes fuldstændigt at kortlægge mekanismerne bag de kardiovaskulære konsekvenser af partikeleksponering, er en ny tilgang til emnet opstået. Ved at isolere serum/plasma fra eksponerede dyr og efterfølgende undersøge, hvordan det påvirker celler eller blodkar fra ikke-eksponerede dyr *ex vivo*, kan man undersøge serum/plasma-bioaktiviteten som en helhed. I princippet kan bioaktiviteten af serum/plasma opstå som følge af kombinationseffekter (eller cocktaileffekter) af forskellige farlige mediatorer i blodet på baggrund af additiv, synergetisk eller endog antagonistisk interaktion mellem forskellige mediatorer. Eksempler på denne tilgang til at undersøge sammenhængen mellem lungemæssig eksponering for dieseludstødningspartikler og nanopartikler er publiceret inden for de sidste par år. Studierne underbygger antagelsen om en samlet kombinationseffekt af mediatorer og viser, at serum/plasma forårsager aktivering af endotelceller eller påvirker vasomotor funktionen af arterier *ex vivo* (18,53,54). Disse studier kan måske være en mere succesfuld tilgang til at finde de mediatorer som kobler lokale effekter i lungerne til systemiske effekter i form af forandringer i blodet (koagulation), vasomotordysfunktion, åreforkalkning og regulering af blodtrykket.

Afslutning

Mange studier har vist, at luftforureningspartikler, dieseludstødningspartikler og nanopartikler forårsager vasomotordysfunktion og åreforkalkning i dyr. Der er også overensstemmelse mellem observationer på vaso-

motordysfunktion og progression af åreforkalkning i dyreeksperimentelle undersøgelser og mennesker efter lungemæssig eksponering for luftforureningspartikler og dieseludstødningspartikler. Det er derfor muligt at antage, at observationerne på vasomotordysfunktion og progression af åreforkalkning i forsøgsdyr kan generaliseres til mennesker. Nanopartikler er dog ikke en homogen gruppe af materialer, og studierne har i nogen grad fokuseret på bestemte typer af nanopartikler, som netop kunne have effekt på hjerte-kar-systemet. Nanopartiklers påvirkning af koagulationsprocessen, reguleringen af blodtrykket og hjerterytmevariationen er utilstrækkeligt undersøgt, om end de tilgængelige data og analogislutning til luftforureningspartikler og dieseludstødningspartikler indikerer, at nanopartikler også kan påvirke disse vaskulære funktioner i kroppen.

Det er relativt nemt at undersøge, om specifikke typer af partikler forårsager vasomotorisk dysfunktion, åreforkalkning, hyperaktivitet af koagulationssystemet eller forandret hjerterytme, hvorimod det er en væsentlig større arbejdsbyrde at undersøge de mekanismer, der ligger til grund for partikelinduceret hjerte-kar-sygdom. Der er behov for at udvide fokusområdet fra klassiske risikofaktorer som fx inflammationsmarkører i blodet til andre årsagsfaktorer, herunder mere komplekse modeller som bioaktiviteten af multiple mediatorer i blodet. Afdækning af virkningsmekanismerne kan anvendes som løftestang til at udvikle screeningsmetoder til fareidentifikation af partikler, som kan påvirke risikoen for hjerte-kar-sygdom.

Yderligere oplysninger:

Peter Møller

pemo@sund.ku.dk

Referencer

1. Hoek G, Krishnan RM, Beelen R, Peters A, Ostro B, Brunekreef B, Kaufman JD. *Long-term air pollution exposure and cardio-respiratory mortality: a review*. Environ Health 2013;12:43.
2. Scheers H, Jacobs L, Casas L, Nemery B, Nawrot TS. *Long-term exposure to particulate matter air pollution is a risk factor for stroke: meta-analytical evidence*. Stroke 2015;46:3058-3066.
3. Brook RD, Rajagopalan S, Pope III CA, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA, Peters A, Siscovick D, Smith SC Jr, Whitsel L, Kaufman JD. *Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association*. Circulation 2010;121:2331-2378.
4. Morfeld P, Mundt KA, Dell LD, Sorahan T, McCunney RJ. *Meta-analysis of cardiac mortality in three cohorts of carbon black production workers*. Int J Environ Res Public Health 2016;13:302.
5. Boffetta P, Soutar A, Cherrie JW, Granath F, Andersen A, Anttila A, Blettner M, Gaborieau V, Klug SJ, Langard S, Luce D, Merletti F, Miller B, Mirabelli D, Pukkala E, Adami HO, Weiderpass E. *Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe*. Cancer Causes Control 2004;15:697-706.
6. Fryzek JP, Chadda B, Marano D, White K, Schweitzer S, McLaughlin JK, Blot WJ. *A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States*. J Occup Environ Med 2003;45:400-409.
7. Ellis ED, Watkins JP, Tankersley WG, Phillips JA, Girardi DJ. *Occupational exposure and mortality among workers at three titanium dioxide plants*. Am J Ind Med 2013;56:282-291.
8. Hansen CS, Sheykhzade M, Møller P, Folkmann JK, Amtorp O, Jonassen T, Loft S. *Diesel exhaust particles induce endothelial dysfunction in apoE^{-/-} mice*. Toxicol Appl Pharmacol 2007;219:24-32.
9. Vesterdal LK, Folkmann JK, Jacobsen NR, Sheykhzade M, Wallin H, Loft S, Møller P. *Pulmonary exposure to carbon black nanoparticles and vascular effects*. Part Fibre Toxicol 2010;7:33.

-
10. Wang M, Hou ZH, Xu H, Liu Y, Budoff MJ, Szpiro AA, Kaufman JD, Vedal S, Lu B. *Association of estimated long-term exposure to air pollution and traffic proximity with a marker for coronary atherosclerosis in a nationwide study in China.* JAMA Netw Open 2019;2:e196553.
 11. Zhang S, Wolf K, Breitner S, Kronenberg F, Stafoggia M, Peters A, Schneider A. *Long-term effects of air pollution on ankle-brachial index.* Environ Int 2018;118:17-25.
 12. Duan C, Talbott E, Brooks M, Park SK, Broadwin R, Matthews K, Barinas-Mitchell E. *Five-year exposure to PM_{2.5} and ozone and subclinical atherosclerosis in late midlife women: The Study of Women's Health Across the Nation.* Int J Hyg Environ Health 2019;222:168-176.
 13. Kaufman JD, Adar SD, Barr RG, Budoff M, Burke GL, Curl CL, Daviglius ML, Diez Roux AV, Gassett AJ, Jacobs DR Jr, Kronmal R, Larson TV, Navas-Acien A, Olives C, Sampson PD, Sheppard L, Siscovick DS, Stein JH, Szpiro AA, Watson KE. *Association between air pollution and coronary artery calcification within six metropolitan areas in the USA (the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Air Pollution): a longitudinal cohort study.* Lancet 2016;388:696-704.
 14. Mikkelsen L, Sheykhzade M, Jensen KA, Saber AT, Jacobsen NR, Vogel U, Wallin H, Loft S, Møller P. *Modest effect on plaque progression and vasodilatory function in atherosclerosis-prone mice exposed to nanosized TiO₂.* Part Fibre Toxicol 2011;8:32.
 15. Cao Y, Jacobsen NR, Danielsen PH, Lenz AG, Støger T, Loft S, Wallin H, Roursgaard M, Mikkelsen L, Møller P. *Vascular effects of multi-walled carbon nanotubes in dyslipidemic ApoE^{-/-} mice and cultured endothelial cells.* Toxicol Sci 2014;138:104-116.
 16. Damiao Gouveia AC, Skovman A, Jensen A, Koponen IK, Loft S, Roursgaard M, Møller P. *Telomere shortening and aortic plaque progression in Apolipoprotein E knockout mice after pulmonary exposure to candle light combustion particles.* Mutagenesis 2018;33:253-261.
 17. Christophersen DV, Jacobsen NR, Andersen MH, Connell SP, Barfod KK, Thomsen MB, Miller MR, Duffin R, Lykkesfeldt J, Vogel U, Wallin H, Loft S, Roursgaard M, Møller P. *Cardiovascular health effects of oral and pulmonary exposure to multi-walled carbon nanotubes in ApoE-deficient mice.* Toxicology 2016;371:29-40.
 18. Christophersen DV, Jacobsen NR, Jensen DM, Kermandizadeh A, Sheykhzade M, Loft S, Vogel U, Wallin H, Møller P. *Inflammation and vascular effects after repeated intratracheal instillations of carbon black and lipopoly-saccharide.* PLoS One 2016;11: e0160731.
 19. Møller P, Christophersen DV, Jacobsen NR, Skovmand A, Gouveia AC, Andersen MH, Kermandizadeh A, Jensen DM, Danielsen PH, Roursgaard M, Jantzen K, Loft S. *Atherosclerosis and vasomotor dysfunction in arteries of animals after exposure to combustion-derived particulate matter or nanomaterials.* Crit Rev Toxicol 2016;46:437-476.
 20. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. *The clinical implications of endothelial dysfunction.* J Am Coll Cardiol 2003;42:1149-1160.
 21. Shah AP, Pietropaoli AP, Frasier LM, Speers DM, Chalupa DC, Delehanty JM, Huang LS, Utell MJ, Frampton MW. *Effect of inhaled carbon ultrafine particles on reactive hyperemia in healthy human subjects.* Environ Health Perspect 2008;116:375-380.
 22. Møller P, Mikkelsen L, Vesterdal LK, Folkmann JK, Forchhammer L, Roursgaard M, Danielsen PH, Loft S. *Hazard identification of particulate matter on vasomotor dysfunction and progression of atherosclerosis.* Crit Rev Toxicol 2011;41:339-368.
 23. Yau JW, Teoh H, Verma S. *Endothelial cell control of thrombosis.* BMC Cardiovasc Disord 2015;15:130.
 24. Robertson S, Miller MR. *Ambient air pollution and thrombosis.* Part Fibre Toxicol 2018;15:1.
 25. Cascio WE, Cozzi E, Hazarika S, Devlin RB, Henriksen RA, Lust RM, Van Scott MR, Wingard CJ. *Cardiac and vascular changes in mice after exposure to ultrafine particulate matter.* Inhal Toxicol 2007;19 Suppl 1:67-73.
-

-
26. Kim JK, Kang MG, Cho HW, Han JH, Chung YH, Rim KT, Yang JS, Kim H, Lee MY. *Effect of nano-sized carbon black particles on lung and circulatory system by inhalation exposure in rats.* Saf Health Work 2011;2:282-289.
27. Elder AC, Gelein R, Azadniv M, Frampton M, Finkelstein J, Oberdorster G. *Systemic effects of inhaled ultrafine particles in two compromised, aged rat strains.* Inhal Toxicol 2004;16:461-471.
28. Nemmar A, Hoet PH, Vandervoort P, Dinsdale D, Nemery B, Hoylaerts MF. *Enhanced peripheral thrombogenicity after lung inflammation is mediated by platelet-leukocyte activation: role of P-selectin.* J Thromb Haemost 2007;5:1217-26.
29. Liang R, Zhang B, Zhao X, Ruan Y, Lian H, Fan Z. *Effect of exposure to PM2.5 on blood pressure: a systematic review and meta-analysis.* J Hypertens 2014;32:2130-2140.
30. Zheng W, McKinney W, Kashon ML, Pan D, Castranova V, Kan H. *The effects of inhaled multi-walled carbon nanotubes on blood pressure and cardiac function.* Nanoscale Res Lett 2018;13:189.
31. Wang C, Chen R, Cai J, Shi J, Yang C, Tse LA, Li H, Lin Z, Meng X, Liu C, Niu Y, Xia Y, Zhao Z, Kan H. *Personal exposure to fine particulate matter and blood pressure: A role of angiotensin converting enzyme and its DNA methylation.* Environ Int 2016;94:661-666.
32. Aztatzi-Aguilar OG, Uribe-Ramirez M, Arias-Montano JA, Barbier O, De Vizcaya-Ruiz A. *Acute and subchronic exposure to air particulate matter induces expression of angiotensin and bradykinin-related genes in the lungs and heart: Angiotensin-II type-I receptor as a molecular target of particulate matter exposure.* Part Fibre Toxicol 2015;12:17.
33. Aztatzi-Aguilar OG, Uribe-Ramirez M, Narvaez-Morales J, De Vizcaya-Ruiz A, Barbier O. *Early kidney damage induced by subchronic exposure to PM2.5 in rats.* Part Fibre Toxicol 2016;13:68.
34. Upadhyay S, Stoeger T, Harder V, Thomas RF, Schladweiler MC, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Karg E, Reitmeir P, Bader M, Stampfl A, Kodavanti UP, Schulz H. *Exposure to ultrafine carbon particles at levels below detectable pulmonary inflammation affects cardiovascular performance in spontaneously hypertensive rats.* Part Fibre Toxicol 2008;5:19.
35. Ge C, Meng L, Xu L, Bai R, Du J, Zhang L, Li Y, Chang Y, Zhao Y, Chen C. *Acute pulmonary and moderate cardiovascular responses of spontaneously hypertensive rats after exposure to single-wall carbon nanotubes.* Nanotoxicology 2012;6:526-42.
36. Ichihara S, Li W, Omura S, Fujtani Y, Liu Y, Wang Q, Hiraku Y, Hisanaga N, Wakai K, Ding X, Kobayashi T, Ichihara G. *Exposure assessment and heart rate variability monitoring in workers handling titanium dioxide particles: a pilot study.* J Nanopart Res 2016;18:52.
37. Zareba W, Couderc JP, Oberdorster G, Chalupa D, Cox C, Huang LS, Peters A, Utell MJ, Frampton MW. *ECG parameters and exposure to carbon ultrafine particles in young healthy subjects.* Inhal Toxicol 2009;21:223-233.
38. Vora R, Zareba W, Utell MJ, Pietropaoli AP, Chalupa D, Little EL, Oakes D, Bausch J, Wiltshire J, Frampton MW. *Inhalation of ultrafine carbon particles alters heart rate and heart rate variability in people with type 2 diabetes.* Part Fibre Toxicol 2014;11:31.
39. Heusser K, Tank J, Holz O, May M, Brinkmann J, Engeli S, Diedrich A, Framke T, Koch A, Grosshennig A, Jan Danser AH, Sweep FCGJ, Schindler C, Schwarz K, Krug N, Jordan J, Hohlfeld JM. *Ultrafine particles and ozone perturb norepinephrine clearance rather than centrally generated sympathetic activity in humans.* Sci Rep 2019;9:3641.
40. Kim H, Oh SJ, Kwak HC, Kim JK, Lim CH, Yang JS, Park K, Kim SK, Lee MY. *The impact of intratracheally instilled carbon black on the cardiovascular system of rats: elevation of blood homocysteine and hyperactivity of platelets.* J Toxicol Environ Health A 2012;75:1471-1483.
-

-
41. Chang CC, Hwang JS, Chan CC, Cheng TJ. *Interaction effects of ultrafine carbon black with iron and nickel on heart rate variability in spontaneously hypertensive rats.* Environ Health Perspect 2007;115:1012-1017.
42. Tankersley CG, Bierman A, Rabold R. *Variation in heart rate regulation and the effects of particle exposure in inbred mice.* Inhal Toxicol 2007;19:621-629.
43. Jia X, Hao Y, Guo X. *Ultrafine carbon black disturbs heart rate variability in mice.* Toxicol Lett 2012;211:274-280.
44. Nichols CE, Shepherd DL, Hathaway QA, Durr AJ, Thapa D, Abukabda A, Yi J, Nurkiewicz TR, Hollander JM. *Reactive oxygen species damage drives cardiac and mitochondrial dysfunction following acute nano-titanium dioxide inhalation exposure.* Nanotoxicology 2018;12:32-48.
45. Rossi S, Savi M, Mazzola M, Pinelli S, Alinovi R, Gennaccaro L, Pagliaro A, Meraviglia V, Galetti M, Lozano-Garcia O, Rossini A, Frati C, Falco A, Quaini F, Bocchi L, Stilli D, Lucas S, Goldoni M, Macchi E, Mutti A, Miragoli M. *Subchronic exposure to titanium dioxide nanoparticles modifies cardiac structure and performance in spontaneously hypertensive rats.* Part Fibre Toxicol 2019;16:25.
46. Kermanizadeh A, Balharry D, Wallin H, Loft S, Møller P. *Nanomaterial translocation-the biokinetics, tissue accumulation, toxicity and fate of materials in secondary organs-a review.* Crit Rev Toxicol 2015;45:837-872.
47. Miller MR, Raftis JB, Langrish JP, McLean SG, Samutrtai P, Connell SP, Wilson S, Vesey AT, Fokkens PHB, Boere AJF, Krystek P, Campbell CJ, Hadoke PWF, Donaldson K, Cassee FR, Newby DE, Duffin R, Mills NL. *Inhaled nanoparticles accumulate at sites of vascular disease.* ACS Nano 2017;11:4542-4552.
48. Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. *Particulate air pollution and acute health effects.* Lancet 1995;345:176-178.
49. Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W. *Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms.* Environ Health Perspect 2001;109 Suppl 4:523-527.
50. Donaldson K, Mills N, MacNee W, Robinson S, Newby D. *Role of inflammation in cardiopulmonary health effects of PM.* Toxicol Appl Pharmacol 2005;207:483-488.
51. Stone V, Miller MR, Clift MJD, Elder A, Mills NL, Møller P, Schins RPF, Vogel U, Kreyling WG, Alstrup JK, Kuhlbusch TAJ, Schwarze PE, Hoet P, Pietroiusti A, De Vizcaya-Ruiz A, Baeza-Squiban A, Teixeira JP, Tran CL, Cassee FR. *Nanomaterials versus ambient ultrafine particles: an opportunity to exchange toxicology knowledge.* Environ Health Perspect 2017;125:106002.
52. Møller P, Danielsen PH, Karotki DG, Jantzen K, Roursgaard M, Klingberg H, Jensen DM, Christophersen DV, Hemmingsen JG, Cao Y, Loft S. *Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles.* Mutat Res 2014;762:133-166.
53. Thompson LC, Shannahan JH, Perez CM, Haykal-Coates N, King C, Hazari MS, Brown JM, Farraj AK. *Early proteome shift and serum bioactivity precede diesel exhaust-induced impairment of cardiovascular recovery in spontaneously hypertensive rats.* Sci Rep 2019;9:6885.
54. Mostovenko E, Young T, Muldoon PP, Bishop L, Canal CG, Vucetic A, Zeidler-Erdely PC, Erdely A, Campen MJ, Ottens AK. *Nanoparticle exposure driven circulating bioactive peptidome causes systemic inflammation and vascular dysfunction.* Part Fibre Toxicol 2019;16:20.
-

Akutfaseresponsets rolle i nanomateriale-induceret hjerte-kar-sygdom

Af Sarah Søs Poulsen¹, Niels Hadrup¹, Anne Thoustrup Saber¹, Nicklas Raun Jacobsen¹, Ulla Vogel^{1,2}

Indånding af partikler er associeret med øget sygelighed og dødelighed. Den største bidrager til dette er hjerte-kar-sygdomme. Forskning i nanomaterialers toksicitet efter indånding har vist, at et lungemedieret akutfaserespons kunne spille en afgørende faktor i sygdomsmekanismerne bag partikel-induceret hjerte-kar-sygdomme. Vi vil i denne artikel dykke ned i denne mekanisme.

Introduktion

Sammenhæng mellem partikulær luftforurening og dødelighed er blevet beskrevet i flere studier (1-3). Et af de mest kendte studier beskrev ændringerne i partikelniveau, sygelighed og dødelighed efter et forbud mod indendørs afbrænding af kul i husholdninger i Dublin i 1991 (4). Forbuddet reducerede mængden af sort røg med 0,036 mg/m³ (70 %), hvilket resulterede i et fald i dødeligheden med 75 per 100.000 personår. Af disse stod hjerte-kar-sygdomme for 77 % af den reducerede dødelighed. Dette viser, at partikeleksponering påvirker hjerte-kar-systemet og øger risikoen for sygdomme, herunder åreforkalkning.

Den mest relevante eksponeringsvej for luftbårne partikler i mennesker er ved indånding. Nanopartikler eller nanomaterialer har større overfladeareal per masseenhed end større partikler og har derfor potentiale for at være mere reaktive. Deres størrelse gør også, at de trænger dybere ned i lungen end større partikler, og da der er flere partikler per masseenhed, så vil flere nanopartikler nå alveolerne i større partikler. Disse egenskaber gør, at nano-

materialer potentielt er mere toksiske end større materialer med samme kemiske sammensætning. Vi har det sidste årti arbejdet med at kortlægge farligheden af forskellige nanomaterialer. Til dette har vi brugt forsøgsdyr, da vi ikke etisk kan forsvare at udsætte mennesker for nanomaterialer i kontrollerede studier. Derudover er nanomaterialeproduktion forholdsvist nyt, og derfor findes der kun meget få studier med menneskelig eksponering. Fordelen ved dyreforsøg er også, at man kan analysere mange vævstyper, som man ikke kan få fra frivillige forsøgspersoner.

Mus blev eksponeret via luftvejene for nanomaterialer opblandet i en suspension. Vi valgte forskellige, eksponeringsrelevante doser og undersøgte mange forskelligartede nanomaterialer. Dette var fx kulpartikler i nano-størrelse (nano-CB), nanostørrelse TiO₂ partikler, kulstofnanorør (MWCNT) og flere typer af grafen. Musene blev aflivet efter forskellige tidsintervaller (1-28/90 dage), og blod og organer blev undersøgt for forandringer. En metode, som vi brugte til at undersøge nanomaterialers toksiske potentiale, var microarrays (5-9). Med microarray teknikken kan man måle alle ændringer i transkriptomet efter eksponering. Transkriptomet er den komplette samling af RNA fra fx en organisme, en specifik type væv eller en celletype. I dette projekt blev lunge- og levervæv analyseret, hvilket muliggør identifikation af mekanismer, biomarkører eller gensignaturer for nanomaterialernes toksicitet i disse væv. Det giver et meget omfattende billede af hvilke processer, der påvirkes af nanomaterialeksponeringen. Efterfølgende undersøgte de biomarkører, der havde relation til de identificerede mekanismer.

¹ Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø

² DTU Health

Saa som centralt gen

Generelt udløste lungeeksponeringerne for de meget forskelligartede nanomaterialer sammenlignelige ændringer i lungen, hvor inflammation og akutfaserespons var de processer, der var mest påvirket (5-9). Det mest udtrykte gen på tværs af alle nanomateriale-eksponeringer var akutfaseresponsgenet serum amyloid A3 (Saa3). Dette var et vedvarende respons, da vi fandt Saa3 signifikant udtrykt 28 dage efter eksponeringen (10). Vi så også en klar dosis-afhængighed, således at både foldforøgelsen af Saa3 og antallet af signifikant udtrykte akutfase responsgener steg med stigende dosis (tabel 1).

Denne markante stigning i ekspresionen af Saa3 fangede vores interesse af flere grunde. Saa3 tilhører serum amyloid A familien. Mennesker har to inducerbare SAA isoformer

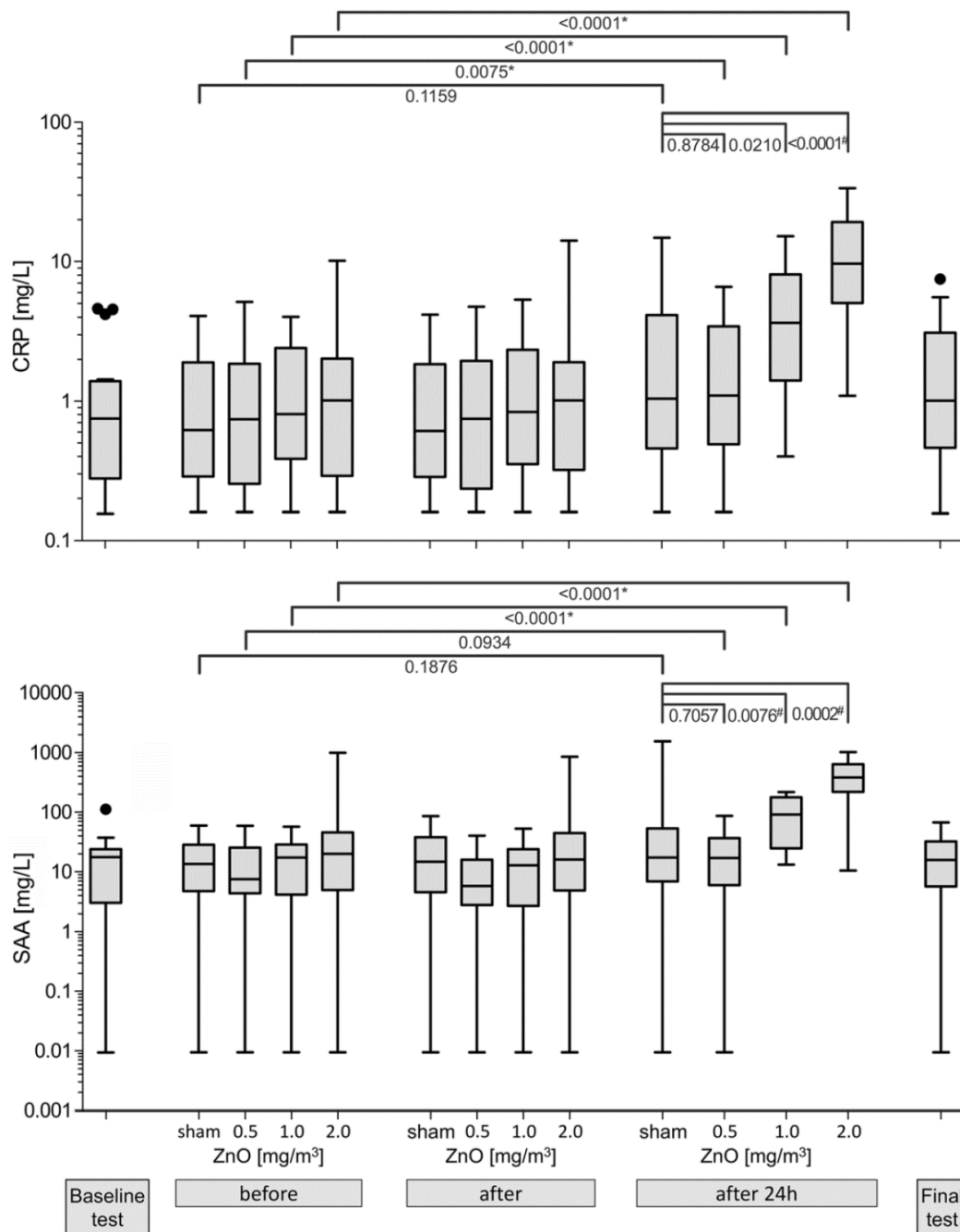
(SAA1 og SAA2), hvorimod mus udtrykker tre isoformer (Saa1, Saa2 og Saa3)(11). I litteraturen er der generelt konsensus om, at disse proteiner primært bliver udtrykt i leveren. Da vi undersøgte levertranskriptomet så vi, at Saa isoformerne rigtigt nok bliver udtrykt her, men responset i lungen er meget større og varer længere. Faktisk var genekspresionen af Saa isoformerne i leveren tilbage på normalniveau allerede 3 dage efter eksponering. Derudover så vi også at hvor Saa3 var det mest udtrykte gen i lungen, så var Saa1 det mest udtrykte gen i leveren. Vi fandt ligeledes en signifikant korrelation mellem Saa3 mRNA niveauer og en signifikant og vedvarende stigning i SAA3 protein i blodet på musene. Det indikerer, at SAA3-proteinet i blodet kunne stamme fra lungen og ikke fra leveren.

Tabel 1. Differential ekspresion af akutfaserespons gener og Saa3 i mus efter eksponering for forskellige nanomaterialer på forskellige tidspunkter (10).

Dage efter eksponering	1			3			28		
	18 µg	54 µg	162 µg	18 µg	54 µg	162 µg	18 µg	54 µg	162 µg
TiO ₂ nanopartikler									
Antal AFR gener	0	5	10	3	1	3	1	2	3
Fold forøgelse af Saa3 mRNA	1,8	87	368	1,1	2,6	19	1	1,8	5,5
Carbon black nanopartikler									
Antal AFR gener	0	7	10	0	0	4	0	0	2
Fold forøgelse af Saa3 mRNA	63	237	294	8,3	24	51	1,1	5	22
Multi-walled carbon nanotubes									
Antal AFR gener	5	5	10	IB	IB	IB	IB	1	IB
Fold forøgelse af Saa3 mRNA	52	151	95	39	152	612	7,9	29	88

IB: Ikke bestemt. AFR: Akutfaserespons. Antal AFR gener er bestemt med DNA microarray. Følgende gener blev identificeret som AFR gen: *Acadm*, *Ahsg*, *Angptl4*, *Apex1*, *Cd163*, *Creb3l3*, *Crp*, *Csf3*, *Epo*, *Esrra*, *F2*, *F8*, *Fgf21*, *Fn2*, *Hamp*, *Hnf4a*, *Hp*, *Il1rn*, *Il22*, *Il6*, *Il6st*, *Ins2*, *Itih4*, *Lbp*, *Lcn2*, *Mrgpra3*, *Nr1h4*, *Nr5a2*, *Orm1*, *Orm2*, *Prlr*, *Reg3a*, *Reg3b*, *Reg3g*, *Rela*, *Sepp1*, *Serpina1b*, *Serpina3n*, *Serpinf2*, *Sigirr*, *Sim2*, *Smad3*, *Stat3*, *Stat5b*, *Sult2a1*, *Saa1*, *Saa2*, *Saa3*, *Saa4*, *Saal3*, *Tsc2* og *Vimp*. Gener med en foldændring på $\pm 1,5$ og en p-værdi $\leq 0,05$ blev taget i betragtning.

Foldforøgelse af Saa3 mRNA niveauer blev bestemt med qRT-PCR. Saa3 niveauer blev normaliseret til 18S niveauer.



Figur 1. Dosisafhængigt akutfaserespons i frivillige 24 timer efter eksponering for ZnO nanopartikler i 4 timer. 16 frivillige blev eksponeret for ZnO nanopartikler i 0, 0,5, 1 eller 2 mg/m³ i 4 timer på forskellige tidspunkter. Øverst: C-reative protein (CRP). Nederst: Serum amyloid A (SAA). Blodniveauer af CRP og SAA blev bestemt før, lige efter og 24 timer efter eksponeringen, samt før den første og efter den sidste eksponering. *statistisk signifikant forskelligt (Bonferroni). Fra (13).

Partikelmedieret SAA forøgelse hos mennesker

Et nyligt publiceret humant studie bekræftede den sammenhæng mellem nanomateriale-eksponering og øgede blodniveauer af SAA, som vi havde fundet i mus (12). De viste, at indånding af ZnO partikler i nanostørrelse inducerede dosisafhængigt akutfaserespons i mennesker. Der deltog 16 frivillige i studiet, og de blev eksponeret for 0, 0,5, 1 eller 2 mg/m³ ZnO nanopartikler i 4 timer på 2 forskellige dage med 2 ugers mellemrum. Dagen efter eksponeringen blev niveauerne af forskellige blodproteiner målt, herunder akutfaseresponsproteinerne SAA og CRP. CRP niveauet var statistisk signifikant forøget ved 2 mg/m³, hvorimod SAA niveauet var dosisafhængigt forøget ved 1 og 2 mg/m³. No-effect-level (NOEL) blev bestemt til 0,5 mg/m³ (figur 1) (12). Det er værd at notere, at eksponeringsniveauerne i dette studie er noget under grænseværdierne for ZnO i det danske arbejdsmiljø (5 mg/m³ ZnO, svarende til 4 mg/m³ Zn).

Hvad betyder forhøjede SAA niveauer for organismen?

Effekten af forhøjede SAA blodniveauer er blevet undersøgt i transgene Apoe^{-/-} mus. Mus med høj produktion af SAA1, havde mere åreforkalkning end mus med en normal produktion af SAA1 (14). Lignende sammenhæng blev senere påvist i et andet studie, hvor overekspression af SAA3 protein accelererede åreforkalkning (15). Samme studie viste også, at mus, der havde fået alle deres *Saa* gener deaktiveret, havde signifikant mindre åreforkalkning end mus med et fungerende *Saa3* gen (15). Dette fremhæver, at overproduktion af SAA proteiner, både enkeltvist og sammen, fører til øget risiko for hjerte-kar-sygdom.

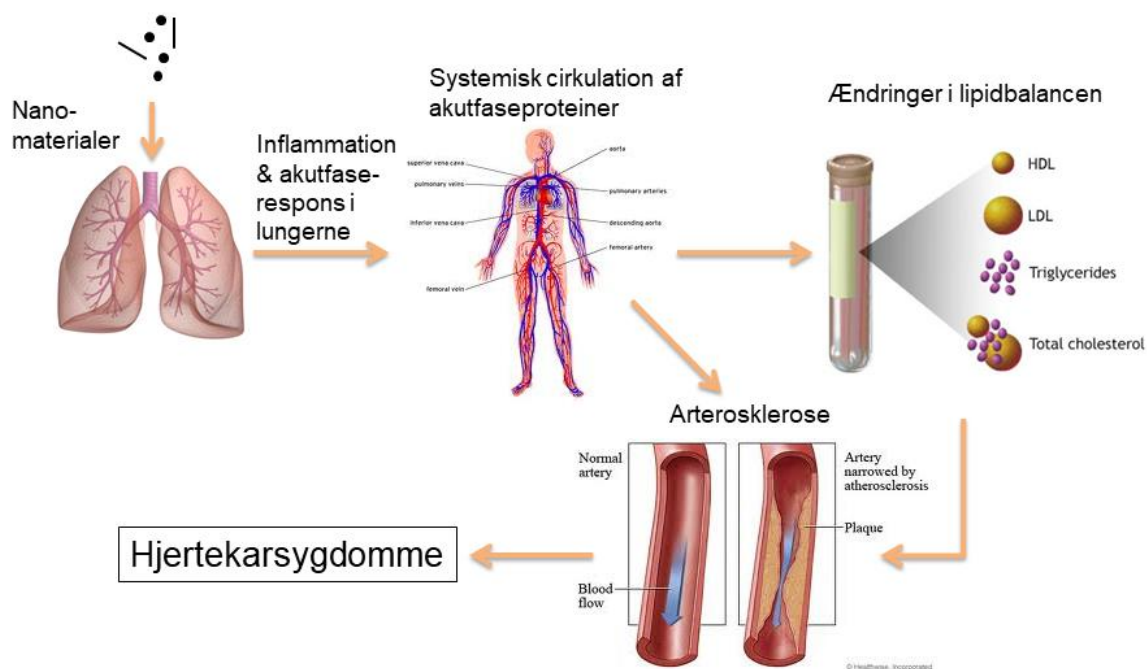
Hos mennesker er SAA protein i blodet, sammen med c-reaktive protein (CRP), blevet identificeret som en risikofaktor for hjerte-kar-sygdom i prospektive, epidemiologiske studier (16, 17). Her blev det vist at SAA og CRP baselineniveauer kunne forudsige øget risiko

for hjerte-kar-sygdomme som blodpropper og slagtilfælde, således at en 5-fold øgning i SAA niveauer var associeret med en 3-fold øget risiko (16). Så desto mere SAA protein i blodet, desto højere risiko for hjerte-kar-sygdom.

Mulig mekanisme

SAA er et akutfaseresponsprotein. Akutfaseresponsen er defineret som en systemisk reaktion på akutte og kroniske inflammatoriske tilstande, fx bakterielle infektioner, vævsbeskadigelse og vævsdød (18). Akutfaseresponsen består af en række serumproteiner, hvis niveauer i blodbanen stiger eller falder mindst 25 % ved betændelsestilstande. Af disse ses den største stigning hos proteinerne SAA og CRP, hvis niveauer kan være op til 1.000 gange forøget i blodet. SAA-proteinerne tiltrækker neutrofile celler (19, 20). Dette observerede vi ligeledes i vores studier, hvor vi fandt en sammenhæng mellem influx af neutrofile celler i lungen og *Saa3* mRNA niveauer i lungen (21). Men derudover kan SAAproteiner også modificere lipoproteinerne i blodet, specielt high-density lipoprotein (HDL) (22, 23). Dette mindsker HDLs evne til at fjerne kolesterol fra blodvæggen og fra organerne, hvorved kolesterol ophobes. Her vil det være op til makrofager, som er kroppens primære 'ædeceller' eller 'skraldemandsceller', at forsøge at fjerne dette. Forsøg har vist, at makrofager kan blive omdannet til 'skumceller', hvis de bliver udsat for SAA-protein og for HDL, som indeholder SAA (24). Skumceller er en primær komponent i de plaks, som dannes på indersiden af blodkarrene i forbindelse med åreforkalkning. Det betyder at SAA fremmer dannelsen af plaks, og dermed åreforkalkning.

På grund af SAAs evne til at modificere HDL har vi også undersøgt, om lipidbalancen i musenes blod bliver påvirket af lungeeksponering for nanomaterialer. Vi observerede både forøget low-density lipoprotein (LDL) og kolesterolniveauer i blodplasmaet efter eksponering for MWCNTs og nano-CB (5, 7). Lignende ændringer i lipidbalancen og akut-



Figur 2. Eksponering i lungerne for nanomaterialer inducerer et stærkt lungeakutfaserespons. Dette fører til systemisk cirkulation af akutfaseproteiner, hvilket fører til ændringer i lipidbalancen, navnlig forøgede niveauer af kolesterol og LDL. Forøgede niveauer af akutfaseproteiner, kolesterol og LDL i blodet er alle risikofaktorer for åreforkalkning og heraf hjertekarsygdomme.

faseresponsproteiner efter lungeeksponering for andre typer af MWCNTs er blevet beskrevet i et andet studie i hanmus (12). Forøgede niveauer af LDL og kolesterol i blodbanen er risikofaktorer for udvikling af hjertekar-sygdomme.

SAA og CRP som biomarkører for partikel eksponering

CRP bliver på nuværende tidspunkt brugt som biomarkør til screening for systemisk inflammation (25), og der findes allerede sensitive og pålidelige assays til måling af CRP og SAA (26). Men brugen af disse som biomarkører for hjerte-kar-sygdomme vanskeliggøres af, at niveauerne af SAA og CRP bliver påvirket af mange forskellige faktorer som body mass index, rygning, kronisk inflammation, brugt af anti-inflammatorisk medicin og infektioner (18, 27, 28). Som før nævnt, så kan SAA og CRP niveauer i blodet stige 1000-fold ved bakterielle infektioner (18), hvorimod

inhalation af ZnO i arbejdsrelaterede relevante doser resulterede i en 10-fold stigning (12). Stigningen ved partikulær luftforurening er sandsynligvis endnu mindre. Faktisk viste et studie, der associerede luftforureningsmodeller fra satellitbilleder og CRP niveauer i 30.034 deltagere, at 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ stigning i $\text{PM}_{2.5}$ var associeret med en 1,31 % stigning i CRP efter justering for andre faktorer (29). Selvom stigningen kan have stor betydning for risikoen for at udvikle hjerte-kar-sygdomme, så kan så lille en stigning være svær at opdage i arbejdsrelaterede biomonitoreringsstudier, hvor inter-individuel variation i basalniveauer af CRP og SAA kan være stor (27, 30, 31).

Fra partikeleksponering til åreforkalkning

Vores studier viser, at lungeeksponering for nanomaterialer fører til en stærk opregulering af *Saa* generne, specielt *Saa3*, i lungerne (figur 2). Dette fører til øgede niveauer af SAA protein i blodbanen. Forøget SAA protein i blodet

efter partikeleksponering er ligeledes bevist i forsøg med mennesker. Ud over dets immunmodulerende effekter så påvirker SAA lipid balancen ved at mindske HDLs evne til at fjerne kolesterol og omdanne makrofager til skumceller. Sandsynligvist som følge heraf stiger mængden af kolesterol og LDL i blodbanen. Alle disse ændringer accelererer dannelsen af plaks i blodårerne, hvilket kan føre til årefolkalkning og hjerte-kar-sygdomme (figur 2). Nanomaterialer har, med deres store overfladeareal og evne til at nå alvenerne, potentiale til at påvirke denne proces i meget større grad end større materialer af samme kemiske komposition.

Yderligere oplysninger:

Sarah Søs Poulsen

spo@nrcwe.dk

For mere information: “Acute Phase Response as a Biological Mechanism-of-Action of (Nano)particle-Induced Cardiovascular Disease”, som er tilgængelig på Pubmed. DOI: 10.1002/sml.201907476.

Referencer

1. Dockery DW, Pope CA, III, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME et al. *An association between air pollution and mortality in six U.S. cities.* N Engl J Med 1993;329(24):1753-9.
2. Pope CA, III, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D et al. *Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease.* Circulation 2004;109(1):71-7.
3. Pope CA, III, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE et al. *Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults.* Am J Respir Crit Care Med 1995;151(3 Pt 1):669-74.
4. Clancy L, Goodman P, Sinclair H, Dockery DW. *Effect of air-pollution control on death rates in Dublin, Ireland: an intervention study.* Lancet 2002;360(9341):1210-4.
5. Poulsen SS, Saber AT, Mortensen A, Szarek J, Wu D, Williams A et al. *Changes in cholesterol homeostasis and acute phase response link pulmonary exposure to multi-walled carbon nanotubes to risk of cardiovascular disease.* Toxicol Appl Pharmacol 2015;283(3):210-22.
6. Poulsen SS, Saber AT, Williams A, Andersen O, Kobler C, Atluri R et al. *MWCNTs of different physicochemical properties cause similar inflammatory responses, but differences in transcriptional and histological markers of fibrosis in mouse lungs.* Toxicol Appl Pharmacol 2015;284(1):16-32.
7. Bourdon JA, Halappanavar S, Saber AT, Jacobsen NR, Williams A, Wallin H et al. *Hepatic and pulmonary toxicogenomic profiles in mice intratracheally instilled with carbon black nanoparticles reveal pulmonary inflammation, acute phase response, and alterations in lipid homeostasis.* Toxicol Sci 2012;127(2):474-84.
8. Husain M, Saber AT, Guo C, Jacobsen NR, Jensen KA, Yauk CL et al. *Pulmonary instillation of low doses of titanium dioxide nanoparticles in mice leads to particle retention and gene expression changes in the absence of inflammation.* Toxicol Appl Pharmacol 2013; 269(3):250-62.
9. Nikota J, Williams A, Yauk CL, Wallin H, Vogel U, Halappanavar S. *Meta-analysis of transcriptomic responses as a means to identify pulmonary disease outcomes for engineered nanomaterials.* Part Fibre Toxicol 2016;13(1): 25.
10. Saber AT, Jacobsen NR, Jackson P, Poulsen SS, Kyjovska ZO, Halappanavar S et al. *Particle-induced pulmonary acute phase response may be the causal link between particle inhalation and cardiovascular disease.* Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 2014;6(6):517-31.
11. Sack GH. *Serum amyloid A - a review.* Mol Med 2018;24.
12. Monse C, Hagemeyer O, Raulf M, Jettkant B, van Kampen V, Kendzia B et al. *Concentration-dependent systemic response after inhalation of nano-sized zinc oxide particles in human volunteers.* Part Fibre Toxicol 2018;15(1):8.

-
13. Hadrup N, Zhernovkov V, Jacobsen NR, Voss C, Strunz M, Ansari M et al. *Acute Phase Response as a Biological Mechanism-of-Action of (Nano)particle-Induced Cardiovascular Disease*. *Small* 2020;16(21).
 14. Dong Z, Wu T, Qin W, An C, Wang Z, Zhang M et al. *Serum amyloid A directly accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Mol Med* 2011;17(11-12):1357-64.
 15. Thompson JC, Wilson PG, Shridas P, Ji A, de Beer M, de Beer FC et al. *Serum amyloid A3 is pro-atherogenic*. *Atherosclerosis* 2018;268:32-5.
 16. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. *C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women*. *N Engl J Med* 2000;342(12):836-43.
 17. Elliott P, Chambers JC, Zhang W, Clarke R, Hopewell JC, Peden JF et al. *Genetic Loci associated with C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease*. *JAMA* 2009;302(1):37-48.
 18. Gabay C, Kushner I. *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. *N Engl J Med* 1999;340(6):448-54.
 19. Liang TS, Wang JM, Murphy PM, Gao JL. *Serum amyloid A is a chemotactic agonist at FPR2, a low-affinity N-formylpeptide receptor on mouse neutrophils*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270(2):331-5.
 20. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL et al. *Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes*. *J Exp Med* 1994;180(1):203-9.
 21. Saber AT, Lamson JS, Jacobsen NR, Ravn-Haren G, Hougaard KS, Nyendi AN et al. *Particle-induced pulmonary acute phase response correlates with neutrophil influx linking inhaled particles and cardiovascular risk*. *PLoS One* 2013;8(7):e69020.
 22. Cabana VG, Lukens JR, Rice KS, Hawkins TJ, Getz GS. *HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease*. *J Lipid Res* 1996;37(12):2662-74.
 23. Cabana VG, Reardon CA, Wei B, Lukens JR, Getz GS. *SAA-only HDL formed during the acute phase response in apoA-I+/+ and apoA-I-/- mice*. *J Lipid Res* 1999;40(6):1090-103.
 24. Lee HY, Kim SD, Baek SH, Choi JH, Cho KH, Zabel BA et al. *Serum amyloid A stimulates macrophage foam cell formation via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 upregulation*. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;433(1):18-23.
 25. Zakyntinos E, Pappa N. *Inflammatory biomarkers in coronary artery disease*. *J Cardiol* 2009;53(3):317-33.
 26. Madsen AM, Thilising T, Blum J, Garde AH, Vogel U. *Occupational exposure levels of bioaerosol components are associated with serum levels of the acute phase protein Serum Amyloid A in greenhouse workers*. *Environ Health-Glob* 2016;15.
 27. Jylhava J, Haarala A, Eklund C, Pertovaara M, Kahonen M, Hutri-Kahonen N et al. *Serum amyloid A is independently associated with metabolic risk factors but not with early atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study*. *J Intern Med* 2009;266(3):286-95.
 28. Hadrup N, Mielzynska-Svach D, Kozłowska A, Campisi M, Pavanello S, Vogel U. *Association between a urinary biomarker for exposure to PAH and blood level of the acute phase protein serum amyloid A in coke oven workers*. *Environ Health-Glob* 2019;18(1).
 29. Zhang ZL, Chang LY, Lau AKH, Chan TC, Chuang YC, Chan J et al. *Satellite-based estimates of long-term exposure to fine particulate matter are associated with C-reactive protein in 30034 Taiwanese adults*. *Int J Epidemiol* 2017;46(4):1126-36.
 30. Andersen MHG, Frederiksen M, Saber AT, Wils RS, Fonseca AS, Koponen IK et al. *Health effects of exposure to diesel exhaust in diesel-powered trains*. *Part Fibre Toxicol* 2019;16.
 31. Andersen MHG, Saber AT, Pedersen PB, Loft S, Hansen AM, Koponen IK et al. *Cardiovascular health effects following exposure of human volunteers during fire extinction exercises*. *Environ Health-Glob* 2017;16.
-

Nanopartikler og kræft

Af Pernille Høgh Danielsen¹, Nicklas Raun Jacobsen¹, Sarah Søs Poulsen¹, Peter Møller² og Ulla Vogel¹

Introduktion

Det har længe været antaget, at indånding af nogle nanomaterialer er forbundet med forøget risiko for kræft. Formodningen er specielt baseret på observationer fra arbejdsmiljøet, hvor respirabelt kvartsstøv (lungekræft), svejserøg (lungekræft) og asbest (lungekræft og lungehindekræft) er klassiske anderkendte karcinogener.

Verdenssundhedsorganisationens Internationale Agentur for Kræftforskning (IARC) spiller en fremtrædende rolle ved klassifikation af kemikalier eller andre stoffers kræftfremkaldende egenskab hos mennesker. Kort beskrevet vil observationer om forøget kræftforekomst hos mennesker resultere i en klassifikation som Gruppe 1 karcinogen, hvis metodemæssige fejl i de epidemiologiske studier kan udelukkes. Evalueringer, som udelukkende er baseret på forsøgsdyr, kan opnå en klassifikation som sandsynligvis (Gruppe 2A) eller muligvis (Gruppe 2B) kræftfremkaldende. Stoffer eller eksponeringer, hvor der ikke er tilstrækkelig evidens for kræftfremkaldende effekt hos mennesker eller dyr, klassificeres som Gruppe 3. Mekanistiske undersøgelser kan anvendes til at opgradere eller nedgradere klassifikationen ud fra viden om, at den kræftfremkaldende effekt kan forventes at forekomme hos mennesker.

IARC har tidligere vurderet den kræftfremkaldende egenskab af partikler såsom respirabelt kulstof (carbon black (CB)) og titaniumdioxid (TiO₂) og fibre som fx asbest. Tabel 1

viser eksempler på IARCs klassifikation af forskellige partikler og fibre, som mennesker udsættes for i arbejdsmiljøet, hjemmemiljøet eller det ydre miljø. Det er specielt bemærkelsesværdigt, at IARC ved flere lejligheder har vurderet de kræftfremkaldende egenskaber for mennesker for materialer som fx CB eller asbest. Det var dog først i 2014, at IARC vurderede den kræftfremkaldende effekt af et nanomateriale i monografien ”*Some Nanomaterials and Some Fibres*” (1). Nanomaterialer er her defineret som bevidst fremstillede eller designede produkter med specifikke egenskaber i tilknytning til deres størrelse, form, overfladeegenskaber eller kemi. Selve monografien blev offentliggjort i 2017 og indeholder en noget pauver konklusion, idet kun én type af kulstofnanorør (MWCNT-7) blev klassificeret som muligvis kræftfremkaldende for mennesker (2).

Den specifikke type kulstofnanorør (MWCNT-7) har samme klassifikation som CB og TiO₂, der begge er muligt kræftfremkaldende for mennesker (gruppe 2B). Der er dog den forskel, at klassifikationen af kulstofnanorør udelukkende er baseret på dyreeksperimentelle studier, mens epidemiologiske undersøgelser på CB- og TiO₂-eksponerede arbejdere ikke har fundet tilstrækkelig evidens for forøget risiko for kræft (3), om end begge er kræftfremkaldende hos rotter ved lungeeksponering (4,5). De epidemiologiske studier har dog alle en række vigtige svagheder, bl.a. at der ikke er information om partikelstørrelse (er der eksponering for nanopartikler?), endsige ændringer i partikelstørrelse over tid. Andre eksponeringer som fx fibre (asbest, erionit fibre, fluoro-edinite fibre) og partikulær luftforurening i udendørsmiljøet, indendørsmiljøet (biomasseforbrændingsprodukter), dieseludstødning (partikler) eller arbejdsmiljøet (træstøv) er tydeligere

¹ Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø

² Afdeling for Miljø og Sundhed, Institut for Folkesundhedsvidenskab, Københavns Universitet

Tabel 1. Eksempler på partikler, fibre og komplekse blandinger med partikler (fx luftforurening) og støv, som IARC har undersøgt for kræftfremkaldende egenskaber.

Type	IARC gruppe	Årstal (monografi volumen) for klassifikationen
Asbest ^a	1	1973 (2), 1977 (14), 1989 (Suppl. 7), 2012 (100C)
Carbon black	2B	1973 (3), 1984 (33), 1987 (Suppl. 7), 2010 (93)
Kvartsstøv ^b	1	1983 (31), 1987 (42), 1987 (Suppl. 7), 1999 (73), 2012 (100C)
Talkumstøv	3	1987 (42), 1987 (Suppl. 7)
Erionite fibre	1	1987 (42), 1987 (Suppl. 7), 2012 (100C)
Mineraluld ^c	3	1988 (43), 2002 (81)
Dieseludstødning	1	1989 (46), 2014 (105)
Titaniumdioxid	2B	1989 (47), 2010 (93)
Træstøv	1	1995 (62), 2012 (100C)
Kobolt/tungsten karbid	2A	2006 (86)
Biomasseforbrænding	2A	2010 (95)
Udendørsluftforurening	1	2016 (109)
Flour-edenite fibre	1	2017 (111)
Kulstofnanorør ^d	2B	2017 (111)

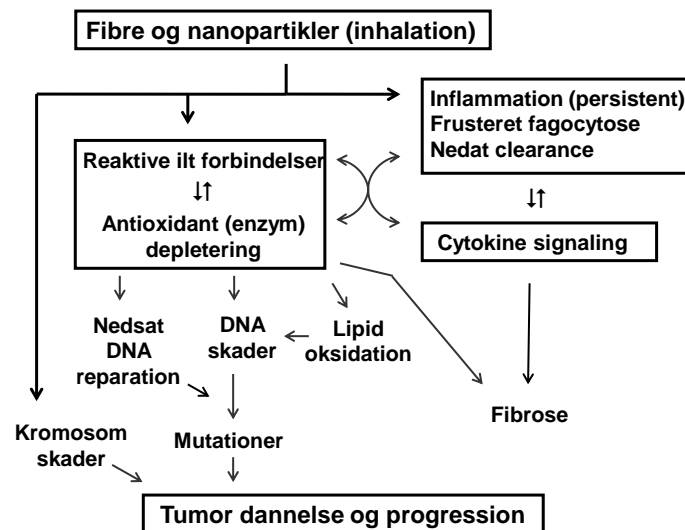
^aSeneste vurdering omfatter alle former for asbest som kræftfremkaldende for mennesker (chrysotile, crocidolite, amosite, tremolite, actinolite, and anthophyllite). ^bInkluderer kristobalit og krystalinsk silica. ^cMineraluld (herunder stenuld og glasuld, som bruges til isolering) er klassificeret som gruppe 3, mens andre syntetiske fibre, som kun anvendes i specielle formål, er klassificeret i gruppe 2B. ^dKlassifikationen gruppe 2B omfatter kun MWCNT-7. Andre kulstofnanorør end MWCNT-7 er kategoriseret i gruppe 3.

associeret til en eller flere kræftformer i epidemiologiske undersøgelser. Eksponeringen for nanomaterialer er stadig relativt ny, og epidemiologiske undersøgelser af lungekræft eller lungehindekræft kræver mange års opfølgning. Derfor har meget af forskningen om nanomaterialers kræftfremkaldende egenskaber fokuseret på at undersøge virkningsmekanismerne for partikel- og fiberinduceret skade på kroppens celler og herunder afklare hvilke fysiske og kemiske egenskaber, som spiller en afgørende rolle for disse virkningsmekanismer.

Virkningsmekanismer for kræftudvikling ved udsættelse for nanopartikler og fibre

De årsager, som ligger til grund for kræftudvikling ved udsættelse for fibre og nanopartikler, kan opdeles i ikke-genetiske (inflammation, oksidativt stress, vævsskade og regeneration) og genetiske (DNA-beskadigelse) virkninger. Figur 1 viser de gængse hypoteser for, hvordan fibre og nanopartikler kan

forårsage kræft. Udviklingen af oksidativt stress og inflammation antages at være vigtige virkningsmekanismer igennem hele processen fra udsættelsen til den kliniske observation af tumorer. Eftersom oksidativt stress kan forårsage inflammation og vice versa, er det overordnede billede, at nanomateriale-eksponerede celler har et pro-oxidant og pro-inflammatorisk miljø (6). Desuden er eksponeringstiden afgørende for kræftets risiko, idet kun vedvarende inflammation (og oksidativt stress) forårsager vævsskade og efterfølgende regeneration (eller fibrose (7)). Således er biopersistente partikler og fibre mere farlige i forhold til kræftudvikling end let nedbrydelige nanomaterialer. Et eksempel på let nedbrydelige materialer, der ikke forårsager lungekræft, er glasuld og stenuld, som anvendes til isolering (8). Ved tilstrækkelig høj udsættelse for biopersistente materialer overbebyrdes de biologiske systemer, som fjerner fremmedstofferne, og der sker en gradvis ophobning af fibre eller partikler i lungerne.



Figur 1. Udvikling af kræft ved eksponering for nanomaterialer. Disse materialer forårsager oxidativt stress, som er en ubalance, hvor niveauet af reaktive iltforbindelser overstiger kapaciteten af det antioksidante forsvarssystem. Ligeledes kan udsættelse for nanomaterialer forårsage inflammation. Dette pro-oxidante og pro-inflammatoriske miljø i lungevævet eller cellerne kan forårsage oxidation af DNA, lipider og proteiner. DNA-skaderne kan forårsage blivende forandringer som mutationer og kromosomforandringer, om end sidstnævnte også kan dannes ved direkte beskadigelse af det mitotiske apparat i cellerne. Disse forandringer anses for at være begyndelsesstadiet af kræftudviklingen.

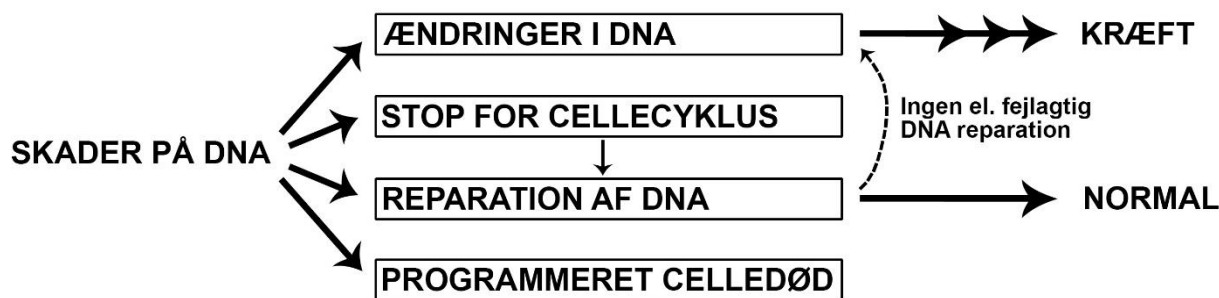
Det pro-oxidante og pro-inflammatoriske miljø i cellerne forårsager DNA-skader, mutationer og strukturelle kromosomforandringer. Derudover kan kulstofnanorør forårsage aneuploidy (dvs. forandret antal kromosomer) og specielt polyploidy (dvs. øget antal kromosomer) ved direkte at forstyrre det cellulære mitotiske apparat, herunder mikrotubuli og centrosomer (9). Generelt vil et pro-oxidant og pro-inflammatorisk miljø i cellerne fremme udviklingen af forandrede celler til tumorer, hvilket er en proces, som for lungekræft og lungehindekræft tager flere årtier hos mennesker.

Carbon black & kræft

CB er en vigtig gruppe af fint sort pulver, som benyttes i en lang række produkter. Blandt de vigtigste er forstærkning af gummiprodukter som bildæk samt farvning af materialer (via maling, toner eller printerblæk). Yderligere til sættes CB visse produkter på grund af dets

elektrisk ledende eller UV- beskyttende egenskaber. CB er med en årlig produktion på over 10 millioner tons en af de helt store industrielle kemikalier (3) og det mest brugte nanomateriale i verden.

CB er tidligere blevet benyttet i forskningsprojekter som en negativ partikelkontrol, da man troede, at CB var uden effekt (10), hvilket formodentligt har været med til maskere dele af de effekter, som andre partikler har. Under studier med en specifik CB kaldet Printex 90 blev vi på NFA opmærksomme på, at CB kan forårsage toksikologiske effekter i sig selv (11,12). Siden har flere projekter, blandt andet på NFA, fokuseret på at afdække mekanismerne bag de observerede biologiske effekter. Dette har vist, at CBER generelt har en meget stor overflade (~30-500 m²/g), producerer store mængder af reaktive iltforbindelser og indeholder meget få urenheder (metaller og tjærestoffer (PAHer)) (13,14,15,16). Blandt undtagelserne er eksempelvis Sterling V med et



Figur 2. Schematisk illustration over cellernes mulige respons ved skader på DNA. Flere ændringer i DNA i samme celle kan føre til kræft (frit efter figur af Schins og Hei (30)).

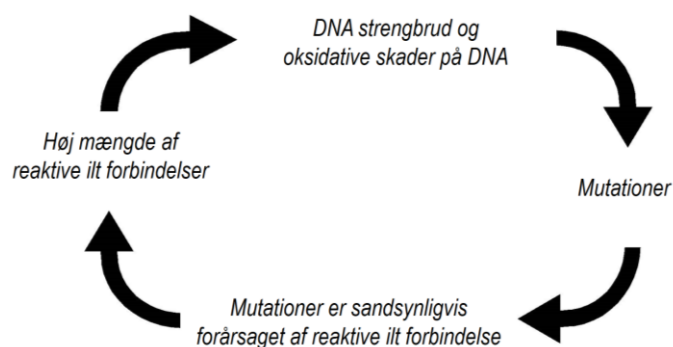
PAH-indhold, der minder om dieselpartiklers (17) og Printex XE2B med et endnu større overfladeareal på over 1000 m²/g.

Generelt har vi observeret, at Printex 90 forårsager inflammation og skader på DNA (DNA-strengbrud). Dette er fundet i en lang række forskellige forsøg både i cellekulturer (11, 16, 18, 19, 20, 21) og i dyr efter inhalation af Printex 90 eller deponeret i lungen (kaldet intratrakeal instillation) (13, 33, 23, 24, 25, 26, 27, 28). Ved dyreforsøg er DNA-skader observeret både i celler, som kan skylles ud af lungen (eks. makrofager og neutrofile celler), i selve lungevævet og i leveren. De fleste af disse forsøg er udført i mus ved doser på 18-162 µg deponeret i lungen svarende til 1-9 dages arbejds eksponering ved den danske grænseværdi (3,5 mg/m³). Det er dog værd at bemærke, at der for Printex 90 er foretaget et lavdosisforsøg, hvor 0,67, 2 og 6 µg blev deponeret i lungen på mus (22). Her blev der observeret DNA-skader både kort efter eksponeringen (1 og 3 dage), men også længere tid efter eksponeringen (28 dage). Den laveste af disse doser svarer til ~20 minutters eksponering ved den danske grænseværdi. Da der kun blev observeret en kortvarig og relativt begrænset inflammation, må skaderne være forårsaget af partiklernes evne til i sig selv at producere skadelige forbindelser. Tilsvarende gør sig gældende ved DNA-skader observeret i leveren. Et studie fra Dansk Center for Nanosikkerhed viste, at 3 forskellige nano-

materialer (TiO₂, CeO₂ og Printex 90) alle forårsagede inflammation i lungen, og at en mindre del af partikler kunne flytte sig til leveren. Af de tre materialer var det dog kun Printex 90, som producerede store mængder reaktive iltforbindelser og forårsagede DNA-skader i leveren (29). Resultaterne tyder dermed på, at CB forårsager genotoksicitet via partikel-inducerede reaktive iltforbindelser og dermed uden tærskel-effekt. Denne information er vigtig i forhold til helbreds baserede grænseværdier i arbejdsmiljøet.

Det er vigtigt at notere, at tests for skader på DNA (eksempelvis comet-assay) giver et øjebliksbillede af skadesniveauet. Langt de fleste DNA-skader, som CB forårsager, vil blive repareret af forskellige mekanismer i cellerne, hvorefter cellen kan fortsætte på normal vis; kun få DNA-skader fører til ændret arvemateriale (DNA-mutationer) og videre til kræft (figur 2).

For at dokumentere om nogle af skaderne på DNA forårsaget af Printex 90 kunne føre til ændringer i DNA (mutationer) og dermed en retning imod kræft, eksponerede vi en cellelinje fra lungeoverfladen på mus i længere tid (~1 måned). I cellerne fandt vi, at udsættelse for Printex 90 resulterede i øget antal mutationer (11). Stigningen i mutationer var på et niveau lignende det, som dieselpartikler gav ved tilsvarende forsøg (20). En efterfølgende gensekventering (aflæsning af den genetiske



Figur 3. Sammenhængen mellem reaktive iltforbindelser produceret af Printex 90 og mutationer. En lignende årsagssammenhæng forventes for alle partikler, som forårsager høj produktion af reaktive iltforbindelser.

kode) viste, at Printex 90-eksponeringen medførte en stigning i ændringer i DNA (udskiftning af DNA-baser), som er tæt forbundet med DNA-reaktioner med reaktive iltforbindelser (eks. 8-oxo-dG). Herudover medførte Printex 90-eksponeringen også, at både kortere og længere DNA-sekvenser blev helt fjernet. Dette skyldes sandsynligvis, at partiklerne forstyrrer det system, som kopierer DNA ved celledelinger (19).

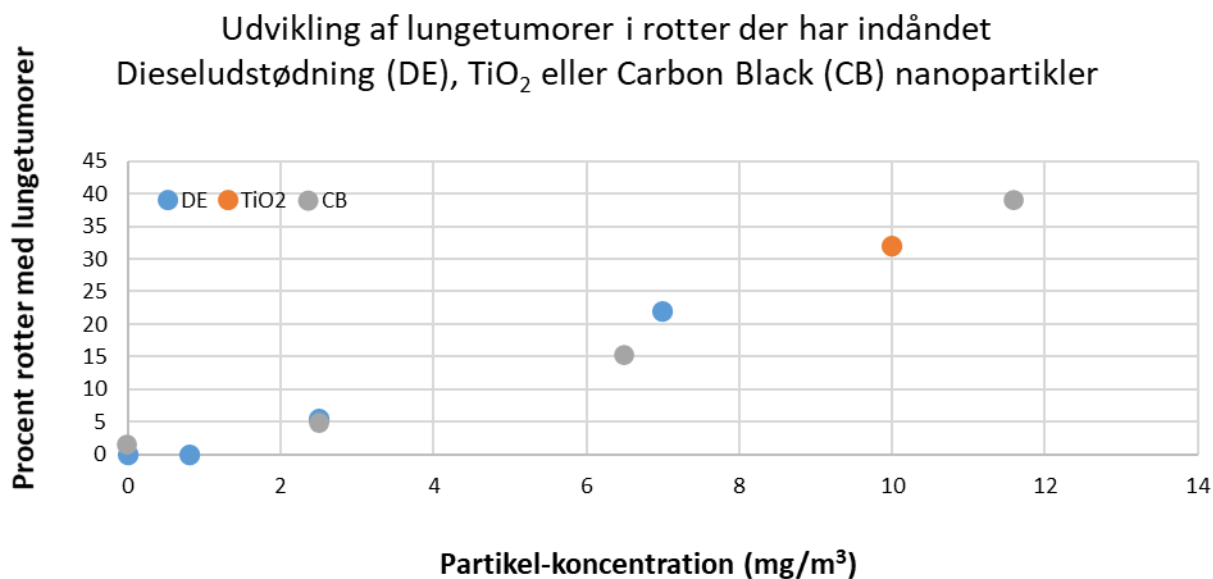
Gennem de sidste 15 år har vi på NFA og andre steder i verden foretaget meget forskning i CB og særligt Printex 90. Resultaterne passer godt sammen og giver et indtryk af en ring, der er sluttet. CB producerer en høj mængde af reaktive iltforbindelser. Eksponering fører til et pro-oxidant og pro-inflammatorisk miljø i lungen. Længerevarende eksponering fører til forskellige DNA-skader, hvoraf nogle inkorporeres i DNA som mutationer. Mutationer som ved nærmere analyse er forårsaget af DNA-interaktioner med reaktive iltforbindelser. Mutationer er den primære årsag til udvikling af kræft, og baseret på ovenstående betegner vi CB som kræftfremkaldende.

Dieselpartikler & kræft

Dieseludstødning består af 1) forbrændingspartikler bestående af en kulstofkerne med forskellige PAH'er og metaller på overfladen og 2) en gas/dampfase indeholdende flygtige

organiske forbindelser, nitrogenoxider og carbonoxider. Størstedelen af dieselpartiklerne er i nanostørrelse ved udledningen (31, 32). Arbejdere kan udsættes for dieseludstødning på deres arbejdspladser (33, 34, 35), men også den generelle befolkning udsættes for lavere mængder via udendørsluften, hvilket gør dieselpartikler til en potentiel helbredsfare for rigtig mange mennesker. Udsættelse for dieseludstødning er associeret med alvorlige helbredseffekter hos mennesker såsom lungesygdomme (36, 37), hjerte-kar-sygdom (38, 39) og lungekræft (40). Lungeinflammation og lungekræft vurderes til at være de kritiske helbredseffekter (41). IARC klassificerede i 2014 dieseludstødning som et gruppe 1 karcinogen med tilstrækkelig videnskabelig evidens fra dyrestudier og epidemiologiske undersøgelser (42). IARC konkluderede, at dette var gældende for komplet dieseludstødning, for dieselpartikler isoleret set og for ekstraktioner af dieselpartikler (dvs. den organiske fraktion), men derimod ikke for gasfasen af dieseludstødning (dvs. uden partikler). Det betyder at den kræftfremkaldende effekt antageligvis drives af partiklerne (42).

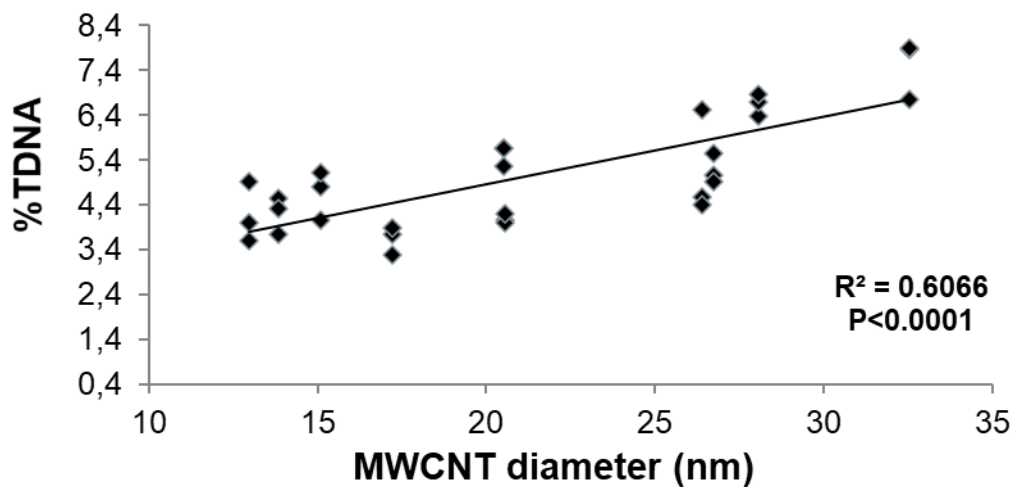
Ligesom for de tekniske nanomaterialer er virkningsmekanismerne for dieselpartikler relateret til øget inflammation, produktion af reaktive iltforbindelser, oxidativt stress og genotoksicitet (43). Den væsentligste forskel mellem CB nanopartikler og dieselpartikler er



Figur 4. Dieseludstødning, TiO₂ og CB nanopartikler har meget ens kræftfremkaldende potentiale i rotter. Heinrich et al (1995) (4) udførte et stort 2-årigt dyreforsøg hvor rotter indåndede diesel udstødning, TiO₂ (P25) eller CB (Printex 90) nanopartikler. Mauderly et al. (1994) (5) udførte ligeledes et 2-årigt forsøg hvor rotter indåndede dieseludstødning og CB (Elftex-12 furnace black). Både dieseludstødning, CB og TiO₂ nanopartikler forårsagede udvikling af lungetumorer i rotter. Som det ses af figuren, ligger de 3 partikeltyper på samme dosis-responskurve, hvilket tyder på, at de har ens kræftfremkaldende potentiale. TiO₂ nanopartiklerne (P25) inducerede lungekræft i 32 % af rotterne ved 10 mg/m³, hvilket svarer til den nuværende danske grænseværdi for TiO₂ på 6 mg/m³ Ti.

sidstnævntes indhold af PAH og metaller. Derudover giver CB nanopartikler en langt højere produktion af reaktive iltforbindelser end dieselpartikler i eksperimentelle forsøg både med og uden celler, hvilket blandt andet kan tilskrives CB nanopartiklernes lille størrelse og deraf store overfladeareal (20). Studier i celler (11, 20) såvel som rotter (44, 45) har vist, at dieselpartikler er lige så mutagene som CB nanopartikler, hvorimod rotter ikke får lungekræft efter indånding af filteret dieseludstødning, hvor partiklerne er filteret fra (46). Imidlertid har celleforsøg vist, at CB nanopartikler primært giver basetransversioner af typen G:C→T:A, G:C→C:G og A:T→T:A i DNA'et (19), hvilket er forskelligt fra den primært forekommende transversion G:C→A:T ved eksponering med dieseludstødning (47). Herudover viser dyrestudier med mus omkring det samme niveau af DNA-skade i lungevæv efter udsættelse for tilsvarende doser af henholdsvis CB nanopartikler og

dieselpartikler (13, 23). Dette indikerer at dannelsen af oksidative DNA-skader (pga. reaktive iltforbindelser) er en betydende faktor for mutageniteten af CB nanopartiklerne, i modsætning til dieselpartiklerne, hvor andre mekanismer såsom PAH-inducerede DNA-addukter sandsynligvis spiller ind (20). I et nyligt studie fra Dansk Center for Nanosikkerhed 2 blev effekten af indånding af dieseludstødning undersøgt i 29 forsøgspersoner siddende som passagerer (6 timer per forsøgsdag) i et dieseldrevet tog, hvilket blev sammenlignet med effekten af indånding af luften i et elektrisk drevet tog på en tilsvarende forsøgsdag (35). Tre dages udsættelse for dieseludstødning i et dieseldrevet tog var associeret med nedsat lungefunktion og systemiske effekter i form af øgede niveauer af DNA-strengbrud i blodcellerne, hvorimod der ikke fandtes øgede niveauer af oksidative DNA-skader i blodcellene (35).



Figur 5. Sammenhæng mellem diameter af kulstofnanorør og DNA-skade målt som %DNA i comet-assay. Mus blev eksponeret for kulstofnanorør ved lunge-deponering, og DNA-skade blev målt i lungevævet efter 28 dages eksponering. Niveaulet af DNA-skade stiger med stigende diameter. Det skyldes sandsynligvis, at kulstofnanorør er stivere og mere nåle-lignende jo flere lag de indeholder og dermed jo tykkere de er.

IARC konkluderer i deres evaluering, at mekanismerne for kræftudvikling forårsaget af dieseludstødning er komplekse, og at en enkelt mekanisme sandsynligvis ikke dominerer (42). Mange eksperimentelle studier har undersøgt betydningen af nanopartiklers fysiske og kemiske egenskaber for deres farlighed, da dette er vigtigt for eksempelvis at kunne forudsige de tekniske nanopartiklers toksicitet, inden de sættes i produktion (såkaldt "safe-by-design"). Forekomsten af PAH'er og metaller afhænger både af forbrændingsforholdene (fx. motortypen og effektiviteten af forbrændingen) såvel som dieseltypen (fx ved tilsætning af vegetabiliske olier og/eller animalsk fedt). Et nyligt dyrestudie med mus fra Dansk Center for Nanosikkerhed 2 havde til formål at undersøge betydningen af dieselpartiklers fysiske og kemiske egenskaber i forhold til forekomsten af lungeinflammation og DNA-skade i lunge- og levervæv (48). Forsøget viste, at partiklernes overfladeareal, mængden af kulstof og PAH modsvarede niveaulet af inflammatoriske (neutrofile) celler i lungerne målt 24 timer efter at musene fik en enkelt dosis dieselpartikler i lungerne (48). Derudover modsvarede produktionen af reaktive iltforbindelser (uden

celler) niveauerne af genotoksicitet (målt som DNA-skade) i lunge- og levervæv henholdsvis 28 og 90 dage efter en eksponering, hvorimod PAH ikke korrelerede med DNA-skader (48).

NFA har efter ønske fra Arbejdstilsynet for nyligt udarbejdet et forslag til en helbreds-baseret grænseværdi for dieselpartikler <https://www.ft.dk/samling/2019/almde/BEU/bilag/101/index.htm>. Arbejdsgruppen fra NFA konkluderede, at dieselpartikler inducerer mutagenicitet og kræft via en ikke-tærskelmekanisme. I rapporten blev der anvendt forskellige metoder til beregning af lungekræftisiko ud fra enten en meta-analyse af epidemiologiske undersøgelser af sammenhængen mellem udsættelse for udstødning fra dieselmotorer og lungekræft (39, 49) eller ud fra kroniske inhalationsstudier i rotter (4, 50). Forslagene til en grænseværdi for dieseludstødningspartikler er pt under behandling i arbejdsmiljøsystemet.

I beregningerne af lungekræftisiko kan man sammenligne de helbreds-baserede risikoestimer, man får ved brug af dyreforsøg med risikoestimer fra epidemiologiske studier (51). Det er meget vigtig viden, netop fordi vi

endnu ikke har gode epidemiologiske studier med alle de nye tekniske nanomaterialer, og fordi en sådan viden kan bruges til at forebygge eksponering for kræftfremkaldende nanomaterialer i arbejdsmiljøet. Sammenligningen mellem risikoestimerer baseret på dyreforsøg og epidemiologiske studier viste, at risikoestimererne var nogenlunde ens, og at dyreforsøgene ikke overestimerede risikoen for lungekræft (51).

Kulstofnanorør & kræft

Kulstofnanorør er fibre eller rør, der er 1-100 nanometer i diameter, mens de kan være fra få nanometer til mange mikrometer i længden. De kan være kemisk modificerede på overfladen og indeholde varierende typer og mængder af urenheder - typisk metaloxider fra synteseprocessen. Det er derfor en gruppe af tekniske nanomaterialer med meget varierende fysisk-kemiske egenskaber. Overordnet set er kulstofnanorør lange fibre i nanostørrelse og dette har gennem årene vakt betydelig bekymring, fordi de derved ligner asbest og følgelig mistænkes for at være kræftfremkaldende på samme måde.

Som nævnt i introduktionen blev én specifik type af kulstofnanorør (MWCNT-7) klassificeret som muligvis kræftfremkaldende for mennesker af IARC i 2017 (2). IARCs evaluering er baseret på eksperimentelle studier i celler og dyr, da der på daværende tidspunkt og heller ikke på nuværende, ikke fandtes data om toksicitet i mennesker eller epidemiologiske studier. IARC konkluderede i deres rapport, at der er stærk evidens for, at kulstofnanorør kan resultere i kræftudvikling i menneskeceller ved en genotoksisk mekanisme, da der i cellekulturer og dyrestudier er fundet forøgede niveauer af DNA-skade, mutationer, mikrokerner og kromosomændringer. Efter IARC-evalueringen har et 2-års inhalationsstudie vist, at MWCNT-7 (også kaldet Mitsui-7) forårsager lungekræft hos rotter efter indånding selv ved relativt lave doser (52).

Ligesom for andre typer af nanomaterialer har mange eksperimentelle studier haft til formål at undersøge betydningen af kulstofnanorørs fysiske og kemiske egenskaber for deres farlighed. I et dyrestudie fra Dansk Center for Nanosikkerhed blev mus eksponeret for 10 forskellige typer af kulstofnanorør via lunge-deponering, og resultaterne viste tydeligt, at der var forskel i kulstofnanorørenes evne til at forårsage lungeinflammation og DNA-skade (53). Dog blev der ikke fundet en dosis-respons sammenhæng for DNA-skade. Ved hjælp af multipel regressionsanalyse blev betydningen af de forskellige fysisk-kemiske egenskaber undersøgt, og man fandt, at niveauet af DNA-skade korrelerede med diameteren på kulstofnanorør, mens forøgelse af overfladeareal korrelerede med mindre DNA-skade. Dette skyldtes sandsynligvis sammenhængen mellem overfladeareal og diameter, hvor en større diameter medfører et mindre overfladeareal.

<http://miljoogsundhed.sst.dk/blad/ms1602.pdf>.

Dette er i overensstemmelse med at undersøgelser har vist, at de tykke og lange kulstofnanorør er kræftfremkaldende i rotter (1, 52, 54, 55). Derimod var en meget tynd, kort og mere krøllet type af kulstofnanorør ikke kræftfremkaldende i et 2-årigt rottestudie, hvor kulstofnanorørene blev deponeret i bughulen (56), mens både lange, lige og tykke kulstofnanorør samt tyndere og mere buede kulstofnanorør også har vist sig at være kræftfremkaldende i rotter efter deponering i bughulen (55). Til trods for dette og andre lignende eksperimentelle studier er der ikke fundet en klar sammenhæng mellem genotoksicitet, kræftudvikling og de fysisk-kemiske egenskaber for kulstofnanorør.

NFA har, ligesom for CB og dieselpartikler, for nyligt udarbejdet et forslag til en helhedsbaseret grænseværdi for kulstofnanorør. Arbejdsgruppen fra NFA konkluderede, at på baggrund af en manglende dosis-afhængighed for genotoksicitet og en stadig uklar virkningsmekanisme måtte man anse kulstofnanorør-induceret kræft som en ikke-tærskelleffekt ud

fra et forsigtighedsprincip. I rapporten blev der anvendt et 2-års kronisk inhalationsstudie i rotter til beregningerne af lungekræftisiko (52). Forslagene til en grænseværdi for kulstofnanorør er pt under behandling i arbejdsmiljøsystemet.

Konklusion

Internationalt set har der været fokus på de mulige kræftfremkaldende effekter af nanomaterialer siden introduktionen af nanoteknologi som innovationspotentiale ved årtusindskiftet. Dansk Center for Nanosikkerhed har fokuseret på nanomaterialer med stort forbrug som fx. CB og TiO₂ samt på nanomaterialer, som potentielt er meget skadelige som kulstofnanorør. Dansk Center for Nanosikkerhed har bidraget med viden om virkningsmekanismer, sammenhængen mellem de fysisk-kemiske egenskaber og helbredsskadelige effekter og viden, der har indgået i den dokumentation for helbedsbaserede grænseværdier for kulstofnanorør, CB og TiO₂ nanopartikler, som NFA har udarbejdet til Arbejdstilsynet.

Yderligere oplysninger:
Pernille Høgh Danielsen
ped@nfa.dk

Referencer

1. Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V et al. *Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes*. *Lancet Oncol* 2014;15 13:1427-8; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25499275>.
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Some nanomaterials and some fibres*. Vol. 111. WHO; International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2017.
3. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Carbon black, titanium dioxide, and talc*. Vol. 93. WHO; International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2010.
4. Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellmann B, Koch W et al. *Chronic inhalation exposure of wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide*. *Inhal Toxicol* 1995;7:533-56.
5. Mauderly JL, Snipes MB, Barr EB, Belinsky SA, Bond JA, Brooks AL et al. *Pulmonary toxicity of inhaled diesel exhaust and carbon black in chronically exposed rats. Part I: Neoplastic and nonneoplastic lung lesions*. *Res Rep Health Eff Inst* 1994; 68 Pt 1:1-75; discussion 7-97. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7530965>
6. Møller P, Danielsen PH, Jantzen K, Roursgaard M, Loft S. *Oxidatively damaged DNA in animals exposed to particles*. *Crit Rev Toxicol* 2013;432:96-118;. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23346980>
7. Halappanavar S, Ede JD, Shatkin JA, Krug HF. *A systematic process for identifying key events for advancing the development of nanomaterial relevant adverse outcome pathways*. *Nanoimpact* 2019;15.
8. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Man-made vitreous fibres*. Vol. 81. WHO; International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2002.
9. Sargent LM, Hubbs AF, Young SH, Kashon ML, Dinu CZ, Salisbury JL et al. *Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption*. *Mutat Res* 2012;745 1-2:28-37. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178868>
10. Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. *Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation*. *Toxicol Sci* 2004;77 1:126-34; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514958>
11. Jacobsen NR, Saber AT, White P, Møller P, Pojana G, Vogel U et al. *Increased mutant frequency by carbon black, but not quartz, in the lacZ and cII transgenes of muta mouse lung epithelial cells*. *Environ Mol Mutagen* 2007;48 6:451-61.

-
12. Jacobsen NR, Møller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S et al. *Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice*. Part Fibre Toxicol 2009;6:2; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19138394>
 13. Saber AT, Bornholdt J, Dybdahl M, Sharma AK, Loft S, Vogel U et al. *Tumor necrosis factor is not required for particle-induced genotoxicity and pulmonary inflammation*. Arch Toxicol 2005;79 3:177-82. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15798890>
 14. Høgsberg T, Jacobsen NR, Clausen PA, Serup J. *Black tattoo inks induce reactive oxygen species production correlating with aggregation of pigment nanoparticles and product brand but not with the polycyclic aromatic hydrocarbon content*. Exp Dermatol 2013;22, 7:464-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800057>.
 15. Jacobsen NR, Clausen PA. *Carbon black nanoparticles and other problematic constituents of black ink and their potential to harm tattooed humans*. Curr Probl Dermatol. 2015;48:170-5; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25833640>
 16. Jacobsen NR, Pojana G, White P, Møller P, Cohn CA, Korsholm KS et al. *Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade markMouse lung epithelial cells*. Environ Mol Mutagen 2008;49 6:476-87. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18618583>
 17. Borm PJ, Cakmak G, Jermann E, Weishaupt C, Kempers P, van Schooten FJ et al. *Formation of PAH-DNA adducts after in vivo and vitro exposure of rats and lung cells to different commercial carbon blacks*. Toxicol Appl Pharmacol 2005; 205 2: 157-67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893543>
 18. Bengtson S, Kling K, Madsen AM, Noergaard AW, Jacobsen NR, Clausen PA et al. *No cytotoxicity or genotoxicity of graphene and graphene oxide in murine lung epithelial FE1 cells in vitro*. Environ Mol Mutagen 2016;57 6:469-82; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189646>
 19. Jacobsen NR, White PA, Gingerich J, Møller P, Saber AT, Douglas GR et al. *Mutation spectrum in FE1-MUTA(TM) Mouse lung epithelial cells exposed to nanoparticulate carbon black*. Environ Mol Mutagen 2011;52, 4:331-7 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20963790>
 20. Jacobsen NR, Moller P, Cohn CA, Loft S, Vogel U, Wallin H. *Diesel exhaust particles are mutagenic in FE1-MutaMouse lung epithelial cells*. Mutat Res 2008;641, 1-2:54-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18423769>
 21. Jackson P, Kling K, Jensen KA, Clausen PA, Madsen AM, Wallin H et al. *Characterization of genotoxic response to 15 multiwalled carbon nanotubes with variable physicochemical properties including surface functionalizations in the FE1-Muta(TM) mouse lung epithelial cell line*. Environ Mol Mutagen 2015;56 2:183-203; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25393212>
 22. Kyjovska ZO, Jacobsen NR, Saber AT, Bengtson S, Jackson P, Wallin H et al. *DNA damage following pulmonary exposure by instillation to low doses of carbon black (Printex 90) nanoparticles in mice*. Environ Mol Mutagen 2015;56, 1:41-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25042074>
 23. Kyjovska ZO, Jacobsen NR, Saber AT, Bengtson S, Jackson P, Wallin H et al. *DNA strand breaks, acute phase response and inflammation following pulmonary exposure by instillation to the diesel exhaust particle NIST1650b in mice*. Mutagenesis 2015;30 4:499-507. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25771385>
 24. Bengtson S, Knudsen KB, Kyjovska ZO, Berthing T, Skaug V, Levin M et al. *Differences in inflammation and acute phase response but similar genotoxicity in mice following pulmonary exposure to graphene oxide and reduced graphene oxide*. Plos One. 2017;12 6:e0178355. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28570647>
 25. Hadrup N, Bengtson S, Jacobsen NR, Jackson P, Nocun M, Saber AT et al. *Influence of dispersion medium on nanomaterial-induced pulmonary inflammation and DNA strand breaks: investigation of carbon black, carbon nanotubes and three titanium dioxide nanoparticles*. Mutagenesis 2017;32 6:581-9.. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29301028>
 26. Bourdon JA, Saber AT, Jacobsen NR, Jensen KA, Madsen AM, Lamson JS et al. *Carbon black nanoparticle instillation induces sustained inflammation and genotoxicity in mouse lung and liver*. Part Fibre Toxicol 2012;9:5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300514>
-

-
27. Husain M, Kyjovska ZO, Bourdon-Lacombe J, Saber AT, Jensen KA, Jacobsen NR et al. *Carbon black nanoparticles induce biphasic gene expression changes associated with inflammatory responses in the lungs of C57BL/6 mice following a single intratracheal instillation.* *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;289 3:573-88;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26551751>
 28. Saber AT, Jacobsen NR, Mortensen A, Szarek J, Jackson P, Madsen AM et al. *Nanotitanium dioxide toxicity in mouse lung is reduced in sanding dust from paint.* *Part Fibre Toxicol* 2012;9:4;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300483>
 29. Modrzyńska J, Berthing T, Ravn-Haren G, Jacobsen NR, Weydahl IK, Loeschner K et al. *Primary genotoxicity in the liver following pulmonary exposure to carbon black nanoparticles in mice.* *Part Fibre Toxicol* 2018;15 1:2;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29298701>
 30. *Particle Toxicology*, edited by Ken Donaldson and Paul Borm. 1st edn: CRC Press, 2006. ISBN-13: 978-0849350924, ISBN-10: 0849350921.
 31. Wihersaari H, Pirjola L, Karjalainen P, Saukko E, Kuuluvainen H, Kulmala K et al. *Particulate emissions of a modern diesel passenger car under laboratory and real-world transient driving conditions.* *Environ Pollut* 2020;265 Pt B:114948;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32554088>
 32. Rönkkö T, Timonen H. *Overview of Sources and Characteristics of Nanoparticles in Urban Traffic-Influenced Areas.* *J Alzheimers Dis.* 2019;72 1:15-28.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31561356>
 33. Pronk A, Coble J, Stewart PA. *Occupational exposure to diesel engine exhaust: a literature review.* *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2009;19 5:443-57;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19277070>
 34. Andersen MHG, Johannesson S, Fonseca AS, Clausen PA, Saber AT, Roursgaard M et al. *Exposure to Air Pollution inside Electric and Diesel-Powered Passenger Trains.* *Environ Sci Technol* 2019;53 8:4579-87,
[/ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30917278](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30917278)
 35. Andersen MHG, Frederiksen M, Saber AT, Wils RS, Fonseca AS, Koponen IK et al. *Health effects of exposure to diesel exhaust in diesel-powered trains.* *Part Fibre Toxicol* 2019;16 1:21;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31182122>
 36. Munoz X, Barreiro E, Bustamante V, Lopez-Campos JL, Gonzalez-Barcala FJ, Cruz MJ. *Diesel exhausts particles: Their role in increasing the incidence of asthma. Reviewing the evidence of a causal link.* *Sci Total Environ.* 2019;652:1129-38;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30586799>
 37. Ferguson JM, Costello S, Elser H, Neophytou AM, Picciotto S, Silverman DT et al. *Chronic obstructive pulmonary disease mortality: The Diesel Exhaust in Miners Study (DEMS).* *Environ Res* 2020;180:108876
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31711661>
 38. Saber AT, Jacobsen NR, Jackson P, Poulsen SS, Kyjovska ZO, Halappanavar S et al. *Particle-induced pulmonary acute phase response may be the causal link between particle inhalation and cardiovascular disease.* *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2014;6 6:517-31;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24920450>
 39. Vermeulen R, Silverman DT, Garshick E, Vlaanderen J, Portengen L, Steenland K. *Exposure-response estimates for diesel engine exhaust and lung cancer mortality based on data from three occupational cohorts.* *Environ Health Perspect* 2014;122 2:172-7;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24273233>
 40. Silverman DT. *Diesel exhaust causes lung cancer: now what?* *Occup Environ Med.* 2017;74 4:233-4.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28069968>
 41. Taxell P, Santonen T. *Diesel Engine Exhaust: Basis for Occupational Exposure Limit Value.* *Toxicol Sci* 2017;158 2:243-51;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28637328>
 42. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Diesel and gasoline engine exhaust and some nitroarenes.* Vol.105. WHO; International Agency for Research on Cancer, Lyon, France 2014.
-

-
43. Steiner S, Bisig C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. *Diesel exhaust: current knowledge of adverse effects and underlying cellular mechanisms*. Arch Toxicol 2016;90 7:1541-53;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27165416>
44. Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Pepelko W, Baggs RB et al. *Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black*. Toxicol Appl Pharmacol 1996;136 2:372-80.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8619246>
45. Sato H, Sone H, Sagai M, Suzuki KT, Aoki Y. *Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust*. Carcinogenesis 2000;21 4:653-61,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753200>
46. Brightwell J, Fouillet X, Cassano-Zoppi AL, Bernstein D, Crawley F, Duchosal F et al. *Tumours of the respiratory tract in rats and hamsters following chronic inhalation of engine exhaust emissions*. J Appl Toxicol. 1989;9 1:23-31;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466883>
47. Hashimoto AH, Amanuma K, Hiyoshi K, Sugawara Y, Goto S, Yanagisawa R et al. *Mutations in the lungs of gpt delta transgenic mice following inhalation of diesel exhaust*. Environ Mol Mutagen. 2007;48 8:682-93;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17896790>
48. Bendtsen KM, Gren L, Malmborg VB, Shukla PC, Tuner M, Essig YJ et al. *Particle characterization and toxicity in C57BL/6 mice following instillation of five different diesel exhaust particles designed to differ in physicochemical properties*. Part Fibre Toxicol 2020;17 1:38.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32771016>
49. Vermeulen R, Portengen L, Silverman DT, Garshick E, Steenland K. *Meta-analysis of lung cancer risk from exposure to diesel exhaust: vermeulen et Al. Respond*. Environ Health Perspect. 2014;122 9:A230-1.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25181539>
50. Brightwell J, Fouillet X, Cassano-Zoppi AL, Gatz R, Duchosal F. *Neoplastic and functional changes in rodents after chronic inhalation of engine exhaust emissions*. Dev Toxicol Environ Sci. 1986;13:471-85.
51. Saber AT, Poulsen SS, Hadrup N, Jacobsen NR, Vogel U. *Commentary: the chronic inhalation study in rats for assessing lung cancer risk may be better than its reputation*. Part Fibre Toxicol. 2019;16 1:44.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31752898>
52. Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T et al. *Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats*. Part Fibre Toxicol. 2016;13 1:53.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27737701>
53. Poulsen SS, Jackson P, Kling K, Knudsen KB, Skaug V, Kyjovska ZO et al. *Multi-walled carbon nanotube physicochemical properties predict pulmonary inflammation and genotoxicity*. Nanotoxicology 2016;10 9:1263-75;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27323647>
54. Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S et al. *Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors*. Cancer Sci. 2016;107 7:924-35.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27098557>
55. Rittinghausen S, Hackbarth A, Creutzenberg O, Ernst H, Heinrich U, Leonhardt A et al. *The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats*. Part Fibre Toxicol 2014;11:59;.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410479>
56. Muller J, Delos M, Panin N, Rabolli V, Huaux F, Lison D. *Absence of carcinogenic response to multiwall carbon nanotubes in a 2-year bioassay in the peritoneal cavity of the rat*. Toxicol Sci 2009;110 2:442-8-
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429663>
-

Fra internettet – open access artikler og PMC artikler 2015-2020

2015

Jie Dong, Qiang Ma. *Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity*. *Nanotoxicology* 2015;9:5:658-676. PMC artikel.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25676622/>

Nelson Durán, Camila P Silveira, Marcela Durán, Diego Stéfani T Martinez. *Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review*. *Review J Nanobiotechnology* 2015;13:55.
<https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-015-0114-4>

Fadri Gottschalk, Carsten Lassen, Jesper Kjoelholm, Frans Christensen, Bernd Nowack. *Modeling Flows and Concentrations of Nine Engineered Nanomaterials in the Danish Environment*. *Int J Environ Res Public Health* 2015,12(5),5581-5602.
<https://www.mdpi.com/1660-4601/12/5/5581/htm>

Mainul Husain, Zdenka O. Kyjovska, Julie Bourdon-Lacombe, Anne T. Saber, Keld A. Jensen, Nicklas R. Jacobsen, Andrew Williams, Håkan Wallin, Sabina Halappanavar, Ulla Vogel, Carole L. Yauka. *Carbon black nanoparticles induce biphasic gene expression changes associated with inflammatory responses in the lungs of C57BL/6 mice following a single intratracheal instillation*. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;289(3):573–588.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103116/>

Mainul Husain, Dongmei Wu, Anne T. Saber, Nathalie Decan, Nicklas R. Jacobsen, Andrew Williams, Carole L. Yauk, Hakan Wallin, Ulla Vogel, Sabina Halappanavar. *Intratracheally instilled titanium dioxide nanoparticles translocate to heart and liver and activate complement cascade in the heart of C57BL/6 mice*. *Nanotoxicology* 2015;9(8):1013-1022.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25993494/>

Phoebe A. Stapleton, Cody E. Nichols, Jinghai Yi, Carroll R. McBride, Valerie C. Minarchick, Danielle L. Shepherd, John M. Hollander & Timothy R. Nurkiewicz. *Microvascular and mitochondrial dysfunction in the female F1 generation after gestational TiO2 nanoparticle exposure*. *Nanotoxicology* 2015;9(8):941-951. PMC artikel.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25475392/>

Ratna Tantra, Ceyda Oksel, Tomasz Puzyn, Jian Wang, Kenneth N. Robinson, Xue Z. Wang, Cai Y. Ma & Terry Wilkins. *Nano(Q)SAR: Challenges, pitfalls and perspectives*. *Nanotoxicology* 2015;9(5): 636-642. Accepted version.
<http://eprints.whiterose.ac.uk/93093/1/Nano-%28Q%29SAR.pdf>

2016

Mohammad Charehsaz, Karin Sørig Hougaard, Hande Sipahi, Asiye Işın Doğan Ekici, Çiğdem Kaspar, Mustafa Culha, Ülkü Ündeğer Bucurgat, Ahmet Aydın. *Effects of developmental exposure to silver in ionic and nanoparticle form: A study in rats*. *Daru* 2016;24:24. PMC artikel.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5053214/>

Alessandra Gallo, Raffaele Boni, Isabella Buttino & Elisabetta Tosti (2016). *Spermiotoxicity of nickel nanoparticles in the marine invertebrate Cionaintestinalis (ascidians)*. *Nanotoxicology* 2016;10(8): 1096-1104. PMC artikel.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27080039/>

Jie Dong , Qiang Ma. *Myofibroblasts and lung fibrosis induced by carbon nanotube exposure*. *Review Part Fibre Toxicol* 2016 ;13(1):60.

<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-016-0172-2>.

Søren T. Larsen, Petra Jackson, Steen S. Poulsen, Marcus Levin, Keld A. Jensen, Håkan Wallin, Gunnar D. Nielsen, Ismo K. Koponen. *Airway irritation, inflammation, and toxicity in mice following inhalation of metal oxide nanoparticles*. *Nanotoxicology* 2016;10(9):1254-1262. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5020351/>

Laura L Maurer, Xinyu Yang, Adam J Schindler, Ross K Taggart, Chuanjia Jiang, Heileen Hsu-Kim, David R Sherwood, Joel N Meyer. *Intracellular trafficking pathways in silver nanoparticle uptake and toxicity in Caenorhabditis elegans*. *Nanotoxicology* 2016;10(7):831-5. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4864179/>

Paul A. Schulte, Ivo Iavicoli, Jorma H. Rantanen, Dirk Dahmann, Sergio Iavicoli, Rüdiger Pipke, Irina Guseva Canu, Fabio Boccuni, Maximo Ricci, Maria Letizia Polci, Enrico Sabbioni, Antonio Pietrojusti & Elvio Mantovani. *Assessing the protection of the nanomaterial workforce*. *Nanotoxicology* 2016; 10(7):1013-1019. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4928025/>

2017

Carlos Angelé-Martínez, Khanh Van T Nguyen, Fathima S Ameer, Jeffrey N Anker, Julia L Brumaghim. *Reactive oxygen species generation by copper(II) oxide nanoparticles determined by DNA damage assays and EPR spectroscopy*. *Nanotoxicology* 2017;11(2):278-288. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5494152/>

W Kyle Mandler, Timothy R Nurkiewicz, Dale W Porter, I Mark Olfert. *Thrombospondin-1 mediates multi-walled carbon nanotube induced impairment of arteriolar dilation*. *Nanotoxicology* 2017;11(1): 112-122. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5290593/>

Aleksandra Radtke, Adrian Topolski, Tomasz Jędrzejewski, Wiesław Kozak, Beata Sadowska, Marzena Więckowska-Szakiel, Magdalena Szubka, Ewa Talik, Lars Pleth Nielsen, Piotr Piszczek. *The Bioactivity and Photocatalytic Properties of Titania Nanotube Coatings Produced with the Use of the Low-Potential Anodization of Ti6Al4V Alloy Surface*. *Nanomaterials* 2017;7(8):197.

<https://www.mdpi.com/2079-4991/7/8/197>

2018

Yi-Hsien Cheng, Jim E Riviere, Nancy A Monteiro-Riviere, Zhoumeng Lin. *Probabilistic risk assessment of gold nanoparticles after intravenous administration by integrating in vitro and in vivo toxicity with physiologically based pharmacokinetic modeling*. *Nanotoxicology* 2018;12(5):453-469. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6051695/>

Jie Dong, Qiang Ma. *Type 2 Immune Mechanisms in Carbon Nanotube-Induced Lung Fibrosis*. Review Front Immunol 2018;9:1120.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29872441/>

Ditte Marie Jensen, Daniel Vest Christophersen, Majid Sheykhzade, Gry Freja kovsted, Jens Lykkesfeldt, Rasmus Münter, Martin Roursgaard, Steffen Loft, Peter Møller. *Vasomotor function in rat arteries after ex vivo and intragastric exposure to food-grade titanium dioxide and vegetable carbon particles*. Part Fibre Toxicol 2018; 15,12 .

<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-018-0248-2>

Justyna Modrzynska, Trine Berthing, Gitte Ravn-Haren, Nicklas Raun Jacobsen, Ingrid Konow Weydahl, Katrin Loeschner, Alicja Mortensen, Anne Thoustrup Saber & Ulla Vogel. *Primary genotoxicity in the liver following pulmonary exposure to carbon black nanoparticles in mice*. Part Fibre Toxicol 2018; 15: 2.

<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-017-0238-9>

PA Schulte, ED Kuempel, NM Drew. *Characterizing risk assessments for the development of occupational exposure limits for engineered nanomaterials*. Review Regul Toxicol Pharmacol 2018; 95:207-219.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29574195/>

Astrid Skovmand, Anna Jacobsen Lauvås, Preben Christensen, Ulla Vogel, Karin Sørig Hougaard, Sandra Goericke-Pesch. *Pulmonary exposure to carbonaceous nanomaterials and sperm quality*. Part Fibre Toxicol 2018;15: 10.

<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-018-0242-8>

Masakazu Umezawa, Atsuto Onoda, Irina Korshunova, Alexander C. Ø. Jensen, Ismo K. Koponen, Keld A. Jensen, Konstantin Khodosevich, Ulla Vogel, Karin S. Hougaard. *Maternal inhalation of carbon black nanoparticles induces neurodevelopmental changes in mouse offspring*. Part Fibre Toxicol 2018;15: 36..

<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-018-0272-2>

Krishna Prasad Vadalasetty, Charlotte Lauridsen, Ricarda Margarete Engberg, Radhika Vadalasetty, Marta Kutwin, André Chwalibog, Ewa Sawosz. *Influence of silver nanoparticles on growth and health of broiler chickens after infection with Campylobacter jejuni*. BMC Veterinary Research 2018;14: 1.

<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-017-1323-x>

Guanghong Zeng, Kai Dirscherl, Jørgen Garnæs. *Toward Accurate Quantitative Elasticity Mapping of Rigid Nanomaterials by Atomic Force Microscopy: Effect of Acquisition Frequency, Loading Force, and Tip Geometry*. Nanomaterials (Basel) 2018;8(8):616.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6116254/>

2019

Jie Dong & Qiang Ma. *Integration of inflammation, fibrosis, and cancer induced by carbon nanotubes*. Nanotoxicology 2019;13:9:1244-1274. PMC artikler.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6803058/>

Quincy A Hathaway, Andrya J Durr, Danielle L Shepherd, Mark V Pinti, Ashley N Brandebura, Cody E Nichols, Amina Kunovac, William T Goldsmith, Sherri A Friend, Alaeddin B Abukabda, Garrett K Fink, Timothy R Nurkiewicz, John M Hollander. *miRNA-378a as a key regulator of cardiovascular health following engineered nanomaterial inhalation exposure*. *Nanotoxicology* 2019;13(5):644-663. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6629495/>

Andrij Holian, Raymond F Hamilton Jr, Zhequion Wu, Sanghamitra Deb, Kevin L Trout, Zhiqian Wang, Rohit Bhargava, Somenath Mitra. *Lung deposition patterns of MWCNT vary with degree of carboxylation*. *Nanotoxicology* 2019;13(2):143-159. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6629495/>

Ali Kermanizadeh, Trine Berthing, Ewa Guzniczak, Melanie Wheeldon, Graeme Whyte, Ulla Vogel, Wolfgang Moritz, Vicki Stone. *Assessment of nanomaterial-induced hepatotoxicity using a 3D human primary multi-cellular microtissue exposed repeatedly over 21 days - the suitability of the in vitro system as an in vivo surrogate*. *Part Fibre Toxicol* 2019;16(1):42.

<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-019-0326-0>

Ekaterina Mostovenko, Tamara Young, Pretal P Muldoon, Lindsey Bishop, Christopher G Canal, Aleksandar Vucetic, Patti C Zeidler-Erdely, Aaron Erdely, Matthew J Campen, Andrew K Ottens. *Nanoparticle exposure driven circulating bioactive peptidome causes systemic inflammation and vascular dysfunction*. *Part Fibre Toxicol* 2019;16(1):20.

<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-019-0304-6>

Katherine A Roach, Aleksandr B Stefaniak, Jenny R Roberts. *Metal nanomaterials: Immune effects and implications of physicochemical properties on sensitization, elicitation, and exacerbation of allergic disease*. *Review J Immunotoxicol* 2019;16(1):87-124. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6649684/>

Ryan J Snyder, Kirsten C Verhein, Heather L Vellers, Adam B Burkholder, Stavros Garantziotis, Steven R Kleeberger. *Multi-walled carbon nanotubes upregulate mitochondrial gene expression and trigger mitochondrial dysfunction in primary human bronchial epithelial cells*. *Nanotoxicology* 2019; 13(10):1344-1361. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6879797/>

2020

Ramazan Akçan, Halit Canberk Aydoğan, Mahmut Şerif Yıldırım, Burak Taştekin, Necdet Sağlam. *Nanotoxicity; a challenge for future medicine*. *Turk J Med Sci* 2020;50(4):1180-1196. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7379444/>

Alex P Carll, Renata Salatini, Sandra V Pirela, Yun Wang, Zhengzhi Xie, Pawel Lorkiewicz, Nazratan Naeem, Yong Qian, Vincent Castranova, John J Godleski, Philip Demokritou. *Inhalation of printer-emitted particles impairs cardiac conduction, hemodynamics, and autonomic regulation and induces arrhythmia and electrical remodeling in rats*. *Part Fibre Toxicol* 2020;17(1):7.

<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-019-0335-z>

Irini Furxhi, Finbarr Murphy. *Predicting In Vitro Neurotoxicity Induced by Nanoparticles Using Machine Learning*. *Int J Mol Sci* 2020;21(15):5280.

<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5280/htm>

Sangiliyandi Gurunathan, Muniyandi Jeyaraj, Hyeonwoo La, Hyunjin Yoo, Youngsok Choi, Jeong Tae Do, Chankyu Park, Jin-Hoi Kim, Kwonho Hong. *Anisotropic Platinum Nanoparticle-Induced Cytotoxicity, Apoptosis, Inflammatory Response, and Transcriptomic and Molecular Pathways in Human Acute Monocytic Leukemia Cells*. *Int J Mol Sci* 2020;21(2):440.

<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/440/htm>

Sabina Halappanavar, Sybille van den Brule, Penny Nymark, Laurent Gaté, Carole Seidel, Sarah Valentino, Vadim Zhernovkov, Pernille Høgh Danielsen, Andrea De Vizcaya, Henrik Wolff, Tobias Stöger, Andrey Boyadziev, Sarah Søs Poulsen, Jorid Birkelund Sørli, Ulla Vogel. *Adverse outcome pathways as a tool for the design of testing strategies to support the safety assessment of emerging advanced materials at the nanoscale*. *Review Part Fibre Toxicol* 2020;17(1):16.

<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-020-00344-4>

Christina Isaxon, Karin Lovén, Linus Ludvigsson, Sudhakar Sivakumar, Anders Gudmundsson, Maria E Messing, Joakim Pagels, Maria Hedmer. *Workplace Emissions and Exposures During Semiconductor Nanowire Production, Post-production, and Maintenance Work*. *Ann Work Expo Health* 2020;64(1):38-54. PMC artikel.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6935015/>

Sivakumar Murugadoss, Frederic Brassinne, Noham Sebaihi, Jasmine Petry, Stevan M Cokic, Kirsten L Van Landuyt, Lode Godderis, Jan Mast, Dominique Lison, Peter H Hoet, Sybille van den Brule. *Agglomeration of titanium dioxide nanoparticles increases toxicological responses in vitro and in vivo*. *Part Fibre Toxicol* 2020;17(1):10.

<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-020-00341-7>

Daina Romeo, Beatrice Salieri, Roland Hischier, Bernd Nowack, Peter Wick. *An integrated pathway based on in vitro data for the human hazard assessment of nanomaterials*. *Environ Int* 2020;137:105505.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412019338474?via%3Dihub>

Pavel Rossner Jr, Kristyna Vrbova, Andrea Rossnerova, Tana Zavodna, Alena Milcova, Jiri Klema, Zbynek Vecera, Pavel Mikuska, Pavel Coufalik, Lukas Capka, Kamil Krumal, Bohumil Docekal, Vladimir Holan, Miroslav Machala, Jan Topinka. *Gene Expression and Epigenetic Changes in Mice Following Inhalation of Copper(II) Oxide Nanoparticles*. *Nanomaterials (Basel)* 2020;10(3):550.

<https://www.mdpi.com/2079-4991/10/3/550/htm>

Ravikumar B Shinde, Murugan Veerapandian, Ajeet Kaushik, Pandiaraj Manickam. *State-of-Art Bio-Assay Systems and Electrochemical Approaches for Nanotoxicity Assessment*. *Review Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:325.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00325/full>

Luigi Vimercati, Domenica Cavone, Antonio Caputi, Luigi De Maria, Michele Tria, Ermelinda Prato, Giovanni Maria Ferri. *Nanoparticles: An Experimental Study of Zinc Nanoparticles Toxicity on Marine Crustaceans. General Overview on the Health Implications in Humans*. *Front Public Health* 2020;8:192.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2020.00192/full>

Qiong Wang, Qiqi Wang, Ziyue Zhao, David B Alexander, Dahai Zhao, Jiegou Xu, Hiroyuki Tsuda. *Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes*. *Review J Toxicol Pathol* 2020;33(3):145-151.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/tox/33/3/33_2019-0075/_article

Yuan-Hua Wu, Sheng-Yow Ho, Bour-Jr Wang, Ying-Jan Wang. *The Recent Progress in Nanotoxicology and Nanosafety from the Point of View of Both Toxicology and Ecotoxicology*. Editorial Int J Mol Sci 2020;21(12):4209.

<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/12/4209/htm>

Aleksandra Zielińska, Beatriz Costa, Maria V Ferreira, Diogo Miguéis, Jéssica M S Louros, Alessandra Durazzo, Massimo Lucarini, Piotr Eder, Marco V Chaud, Margreet Morsink, Niels Willemen, Patrícia Severino, Antonello Santini, Eliana B Souto. *Nanotoxicology and Nanosafety: Safety-By-Design and Testing at a Glance Review*. Int J Environ Res Public Health 2020;17(13):4657.

<https://www.mdpi.com/1660-4601/17/13/4657/htm>

Kommende møder i 2021

7.-8. januar: ICNM 2021: 15. International Conference on Nanoscale Materials, Tokyo, Japan.

<https://waset.org/nanoscale-materials-conference-in-january-2021-in-tokyo>

21.-22. januar: ICNTN 2021: 15. International Conference on Nanotoxicology and Toxicity of Nanomaterials Amsterdam, Netherlands.

<https://waset.org/nanotoxicology-and-toxicity-of-nanomaterials-conference-in-january-2021-in-amsterdam>

22.-23. marts: 24th World Nanotechnology Congress, Abu Dhabi, UAE.

<https://nanotechnologycongress.conferenceseries.com/events-list/nanotoxicology>

20.-22. april: NanoTox 2021. 10th International Conference on Nanotoxicology, Edinburgh, Scotland.

<https://10times.com/nanotox-edinburgh>

28.-29. april: 33rd Nano Congress for Future Advancements, London, UK.

<https://nanocongress.nanotechconferences.org/events-list/nano-toxicology>

21.-22. maj: 18th Nanotechnology and Nano Medicine, Osaka, Japan.

<https://nanomedicine.healthconferences.org/>

14.-18. juni: International Conference on Nanotechnology for Renewable Materials, Helsinki, Finland.

<https://conference.tappinano.org/>

17.-18. juni: 2nd World Nano Intellectuals Congress

<https://nanointellecets.peersalleyconferences.com/>

28.-30. juli: 21st edition IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO 2021), Montreal, Canada.

<https://2021.ieeenano.org/>

Ny portal

skal styrke risikovurderingen af tekniske nanomaterialer på arbejdspladserne.

<http://www.nanoriskgov-portal.org/Public/Index>

Skriv til **miljø og sundhed**

skriv om forskningsresultater

skriv til synspunkt

skriv et mødereferat

send nye rapporter

husk også kalenderen

Ring, skriv eller send en e-mail til:

Hilde Balling
Sundhedsstyrelsen
Islands Brygge 67
2300 København S
tlf. 72 22 74 00, lokal 77 76
e-mail hib@sst.dk

<http://miljoogsundhed.sst.dk>

også hvis du bare har en god idé!