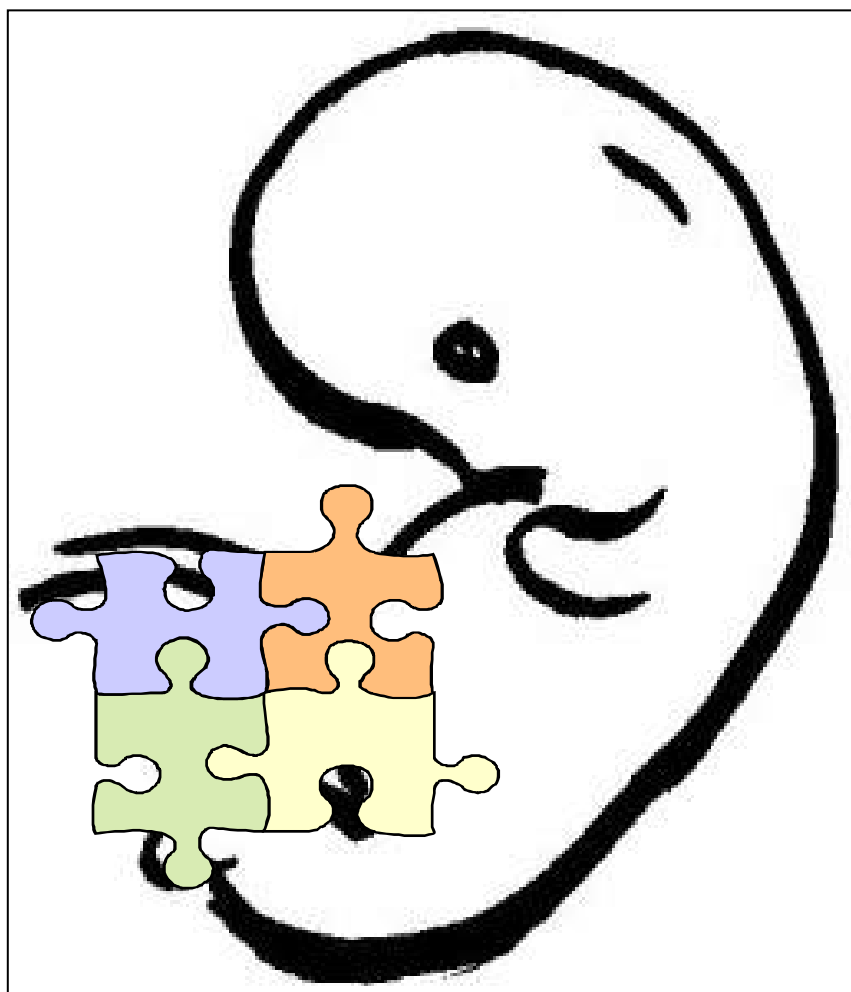


# Icke akuta effekter - Slutrapport från en förstudie

Per Leffler





# Icke akuta effekter - Slutrapport från en förstudie



<b>Utgivare</b> FOI - Totalförsvarets forskningsinstitut NBC-skydd 901 82 Umeå	<b>Rapportnummer, ISRN</b> FOI-R--1014--SE	<b>Klassificering</b> Användarrapport
	<b>Forskningsområde</b> 3. Skydd mot NBC och andra farliga ämnen	
	<b>Månad, år</b> November 2005	<b>Projektnummer</b> E4813
	<b>Delområde</b> 35 Miljöfrågor	
	<b>Delområde 2</b>	
<b>Författare/redaktör</b> Per Leffler	<b>Projektledare</b> Christina Edlund	
	<b>Godkänd av</b>	
	<b>Uppdragsgivare/kundbeteckning</b>	
	<b>Tekniskt och/eller vetenskapligt ansvarig</b>	
<b>Rapportens titel</b> Icke akuta effekter - Slutrapport från en förstudie		
<b>Sammanfattning</b> <p>Svensk personal i försvarsmakten verkar numera i situationer som motsvarar 'stridens efterfas'. Detta innebär en förändrad och vidgad hotbild med avseende på möjliga exponeringar. Fokus för skadespektrum förflyttas därför från klassiska akuteffekter (död m.m.) mot icke-akuta effekter. De icke-akuta skadeeffekter som riskeras omfattar mutationer, tumörer, fortplantnings- och hormonstörningar, immunförsvarsstörningar samt funktionsstörningar i nervsystem och utsöndringssystem karakteriserade av latenstider omfattande månader till år före symptomdebut. En rad frågor aktualiseras vars svar måste sökas genom riktad forskning. Dessa frågor är:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vilka icke-akuta effekter är relevanta för totalförsvaret?</li> <li>• Vilka exponeringskombinationer är av betydelse för icke-akuta effekter?</li> <li>• Vilka mekanismer genererar icke-akuta effekter?</li> <li>• Vilka mätmetoder finns för icke-akuta effekter?</li> <li>• Vilka tolkningstekniker är lämpliga för data om icke-akuta effekter?</li> </ul> <p>Företrädesvis söks svaren genom en blandning av interna FOI-projekt och genom forskning i nätverk där kunskaper från den civila sektorns universitet och myndigheter anpassas till totalförsvarets behov. På kort sikt kan projektet dels bidra till ökad förståelse om vilka exponeringsfaktorer (NBC-agens) som är möjliga orsaker till icke-akuta effekter i relevanta exponeringsmiljöer, dels ge ledtrådar till vilka krigs- och katastrofzoner som är särskilt farliga med avseende på sådana exponeringsfaktorer. På lång sikt kan projektet generera forskningsprojekt angående anpassat tekniskt och/eller medicinskt skydd.</p>		
<b>Nyckelord</b> NBC-agens, mutation, tumör, fortplantningsstörning, hormonstörning, nervstörning, immunstörning		
<b>Övriga bibliografiska uppgifter</b>	<b>Språk</b> Svenska	
<b>ISSN</b> 1650-1942	<b>Antal sidor:</b> 40 s.	
<b>Distribution enligt missiv</b>	<b>Pris:</b> Enligt prislista	

<b>Issuing organization</b> FOI – Swedish Defence Research Agency NBC-skydd 901 82 Umeå	<b>Report number, ISRN</b> FOI-R--1014--SE	<b>Report type</b> User report
	<b>Programme Areas</b> 3. NBC Defence and other hazardous substances	
	<b>Month year</b> November 2005	<b>Project No.</b> E4813
	<b>Subcategories</b> 35 Environmental Studies	
	<b>Subcategories 2</b>	
<b>Author/s (editor/s)</b> Per Leffler	<b>Project manager</b> Christina Edlund	
	<b>Approved by</b>	
	<b>Sponsoring agency</b>	
	<b>Scientifically and technically responsible</b>	
<b>Report title (In translation)</b> Non acute effects - Report from a prestudy		
<b>Abstract</b> <p>Swedish military personnel are today mainly involved in situations corresponding to the aftermath of battles. This means an extended threat concerning possible exposures to all NBC-agents, not only warfare agents. Hence, the focus will shift from classical acute effects (eg trauma and death) towards non-acute effects. These comprise mutation, tumour, disturbances in reproductive, immune defence, hormonal, nerv, and excretory functions. A line of questions arises that can be answered by directed and focussed reasearch:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Which non-acute effects are relevant for the Swedish defence?</li> <li>• Which combined exposures to agents are significant for non-acute effects?</li> <li>• Which mechanisms are involved in the generation of non-acute effects?</li> <li>• Which measuments are applicable for non-acute effects?</li> <li>• Which methods for interpretation are suitable for non-acute effects?</li> </ul> <p>Preferably these questions can be answered by FOI directed research in cooperation with civilian institutions. In the short term the project can partly increase the understanding of which NBC-agents that are possible causes to non-acute effects and partly give clues to what zones of war or catastrophe that are particularly hazardous. In the long term new contributions to medical and protection protection can be generated.</p>		
<b>Keywords</b> NBC-agents, mutation, tumour, reproductive disorder, hormonal disorder, nerv disorder, immune disorder		
<b>Further bibliographic information</b>	<b>Language</b> Swedish	
<b>ISSN</b> 1650-1942	<b>Pages</b> 40 p.	
	<b>Price acc. to pricelist</b>	

## Innehåll

1	Introduktion .....	7
1.1	Syfte.....	8
2	Områdesöversikt.....	9
2.1	Icke akuta effekter = Kritiska effekter .....	9
2.2	Enkelexponeringar – Irak-epidemin metyl-Hg.....	9
2.3	Kombinationsexponeringar - The Persian Gulf War syndrome .....	10
2.4	Tidiga och fördröjda effekter .....	11
2.5	Kritiska icke-akuta effekter i katastrofzoner .....	12
3	Kritiska forskningsområden.....	13
3.1	Samverkans effekter - effektbiomarkörer.....	13
3.2	Tumöreffekter – genotoxicitet, karcinogenicitet .....	13
3.3	Fortplantningsstörningar och hormonstörningar .....	14
3.4	Immunförsvarsstörningar .....	14
3.5	Fördröjda nervstörningar.....	14
3.6	Metodologiska plattformar.....	15
3.6.1	Mikromatristekniker.....	15
3.6.2	Cellkulturer .....	16
3.6.3	Organismmodeller.....	16
3.6.4	Biokompatibla extrakt.....	16
3.6.5	Fälttoxikologi .....	16
3.7	'Tiered system' för fältprov .....	18
4	Slutsatser och förslag till projektsatsningar.....	21
5	Tack till medarbetare .....	23
6	Referenser.....	25
	Bilaga 1. Utveckling av 'tiered system' för toxikologisk riskbedömning. Utkast. <i>Bo Lilliehöök</i> .....	27
	Bilaga 2. Fördröjd neurotoxicitet orsakad av organofosfater – översikt av mekanistiska förklaringsmodeller till icke-akut nervtoxicitet (OPIDN). <i>Rune Berglind, Per Leffler och Susanne Lundberg</i> .....	31





# 1 Introduktion

Det traditionella krigets akuta fas är striden eller den s.k. 'duellfasen'. Denna duellfas förknippas med användning av konventionella vapen samt NBC-vapen. Duellen är idag en ytterst ovanlig förekomst i svenska försvarets normala verksamhet. Istället har svensk personal i ökande grad kommit att delta i situationer som motsvarar 'stridens efterfas' vilket innebär en förändrad och vidgad hotbild med avseende på möjliga exponeringar och skadespektrum. Det är således inte längre främst en fråga om intensiva vapeninsatser eller direkta exponeringar för NBC-vapen i aktiv strid. Den dominerande hotbilden är snarare den blandexponering som uppstår från en förstörd infrastruktur i ett sönderfallande samhälle. Scenariot visar på en avsevärd breddning av begreppet NBC till att omfatta okontrollerade emissioner av ofullständigt identifierade kemikalier från industri, kvardröjande reminiscenser av NBC-vapen i låga halter, samt skyddsmedel mot NBC-vapen som soldaten intar själv eller blivit preparerad med före tjänstgöring. Typiska situationer när detta berör svensk personal är vid internationella uppdrag som till exempel fredsbevarande uppdrag och humanitära hjälpinsatser, något som berörts i en tidigare FOI-rapport<sup>1</sup>.

Det kommande nätbaserade försvaret uttrycker ett sådant vidgat NBC-begrepp för situationer av nationell kris där försvarsmakten förutsätts kunna vara civila myndigheter behjälpliga. I FOI-rapporten 'Förstudie NBC-ledningssystem,'<sup>2</sup> definieras NBC-begreppet på ett uppenbart nytt sätt:

## "2.1 NBC

NBC = nukleär, biologisk, kemisk.

### NBC omfattar:

1. Skydd mot NBC-vapen
2. Skydd mot avsiktlig utspridning
  - a. Radioaktiva ämnen
  - b. Smittämnen
  - c. Giftiga kemikalier
  - d. Toxiner
3. Skydd mot oavsiktlig utspridning ex följdverkan av tidigare händelse, olycka eller naturligt höga nivåer av NBC-ämnen som innebär ohälsa för människor."

Denna definition öppnar för resonemang om forskning som rör nya agens vid sidan om NBC-vapen, och med inriktningen mot andra typer av hälsoeffekter än de akuta. Den föreliggande förstudiens projektnamn har därför varit 'Icke akuta effekter' vilket i principiell mening ska ses som en motpol till tidigare forskning om 'Akuta effekter'.

I praktisk mening innebär detta också att ny metodik är nödvändig att etablera eftersom de icke-akuta effekter som kan uppkomma, förväntas gälla s.k. lågdoseffekter och längre tids exponering (subkronisk-kronisk), samt fördröjda effekter på grund av en latenstid för skadans uppkomst. I sådana situationer kan effekter av subtilt slag uppkomma, något som är ytterligt svårt att studera med befintliga tekniker avpassade för höga doseringar. Subtila

<sup>1</sup> Karlsson et al. 2001. NBC-frågor vid internationella operationer. Skydd mot C-stridsmedel och giftiga kemikalier. Rekommendationer.

<sup>2</sup> FOI, 2002. Förstudie NBC-ledningssystem. FOI-R--483--SE. Bilaga 2, sida 2.

effekter uttrycks vanligen som ett diffust svar på det makroskopiska planet, och som kaskadsvar på det molekylära planet<sup>3</sup>, vilket kräver högupplösande tekniker på gennivå, proteinnivå, enzymnivå, metabolismnivå. Med nyare s.k. mikromatristekniker erhålls just sådana högupplösande svar om typiskt ca 200-30000 biologiska effekter som kan studeras parallellt och samtidigt.

## 1.1 Syfte

I det nya behovsfält som beskrivits ovan tecknar föreliggande rapport en forskningsroll för Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI) avseende förväntade icke-akuta förgiftningseffekter hos svensk personal i totalförsvarets tjänst. Projektets mål har varit att försöka besvara följande frågor:

- Vilka icke-akuta effekter är relevanta för totalförsvaret?
- Vilka exponeringskombinationer är av betydelse för icke-akuta effekter?
- Vilka möjliga toxikologiska mekanismer genererar icke-akuta effekter?
- Vilka mätmetoder finns för icke-akuta effekter?
- Vilka tolkningstekniker är lämpliga för data om icke-akuta effekter?

Företrädesvis söks svaren genom en blandning av interna FOI-projekt och genom forskning i nätverk där kunskaper från den civila sektorns universitet och myndigheter anpassas till totalförsvarets behov.

---

<sup>3</sup> Kaskadsvar = påverkan av en målmolekyl eller målorgan som ger upphov till multipla reaktioner

## 2 Områdesöversikt

Temat 'icke-akuta effekter' utgör en komplettering till tidigare forskningsfokus 'akuta effekter'. Forskningen om akuta effekter har kretsat kring nervgifter, hudskadande gifter samt andningsobstruerande gifter, alla med skadeeffekter som resulterar i död eller kraftig prestationssänkning. En generell existerande definition på 'icke-akuta-effekter' saknas och skissas därför i det följande i relation till den riskbedömningsmetodik som används inom miljömedicinsk toxikologisk vetenskap, nämligen dos-respons sambanden (se till exempel sammanställning i WHO, 1994)<sup>4</sup>.

I enkla exponeringssituationer, med idealt sett en enda påverkande kemisk förorening, kan den *statistiska sannolikheten för ohälsa* (= *riskmåttet för en typ av biologisk skada*) utläsas ur ett sådant samband, med relativt sett stor precision. Detta utgör således ett *äkta 'riskmått'* där såväl riskkällan som korresponderande effekters utfall (=respons) kvantifieras i en population, något som kännetecknar en *kvantitativ riskanalys*. Ett exempel på detta ges nedan baserat på data från en till metylkvicksilverexponering relaterad epidemi i Irak 1972.

Komplexa exponeringssituationer är betydligt svårare att analysera och metodik har utvecklats för kontrollerade begränsade studier av läkemedelsinteraktioner med endast ett fåtal komponenter åt gången. Utifrån verkliga situationer har studier också genomförts efter kraftiga förenklingar till kontrollerade försök. Ett exempel på när detta kommit till användning rör det s.k. 'Persian Gulf Syndrome', vilket berörs nedan.

### 2.1 Icke akuta effekter = Kritiska effekter

Konceptet 'dos-respons samband' används för att kvantifiera den procentuella risken för skada/ohälsa i befolkningen och beskriver samtidigt hela spektrat av effekter vid exponeringssituationer och dessa effekters respons (% förekomst) i relation till relevant exponeringsdos. De icke-akuta effekterna uppkommer i det lägre dosregistret. Den preventiva strategin, för att motverka uppkomst av skadeeffekter, är att fastställa den 'kritiska effekten' för exponeringssituationen, vilket är den effekt som uppträder vid lägst dos eller vävnadskoncentration.

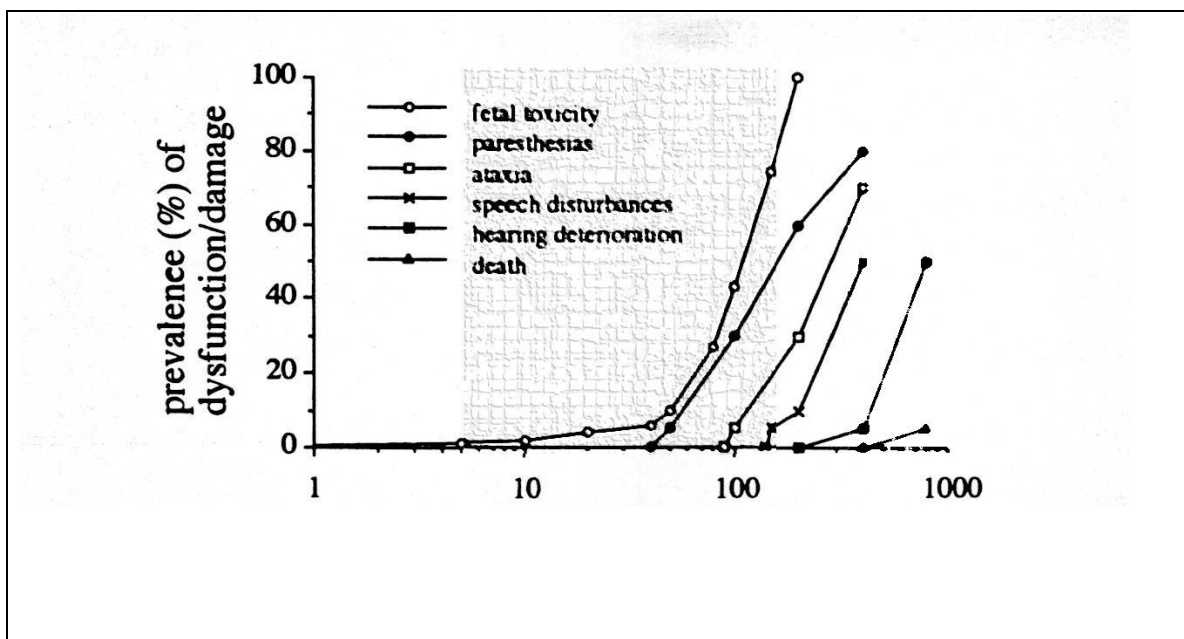
### 2.2 Enkelexponeringar – Irak-epidemin metyl-Hg

Illustrativa dos-respons samband har kunnat upprättas vid ett mindre antal epidemier och exemplifieras nedan i figur 1 för enkelexponering av metylkvicksilver (metylHg) i den s.k. Irak-epidemin, omfattande ett utbrott år 1971-1972 där pesticidbehandlat utsäde användes direkt som föda efter brödbak (Bakir et al, 1973)<sup>5</sup>. Poängen ligger i att hela skadespektrat här presenteras i samma dos-respons diagram. Halten i hårprover speglade intern dos. Effekterna diagnosticerades av specialistutbildad personal. Grafen i figur 1 ger en bra överblick och möjlighet att urskilja gränser mellan effekttyper där de akuta exponeringseffekterna generellt sett återfinns vid de högsta doserna med död som värsta effekt, medan de icke-akuta effekterna återfinns vid de lägsta doserna med förgiftningar av foster

<sup>4</sup> WHO, 1994. Biological monitoring of metals.

<sup>5</sup> Bakir et al, 1973. Methylmercury poisoning in Iraq.

som exempel. Gränsen mellan icke-akuta respektive akuta effekter är här något otydlig men extremfallen är tydliga: förekomsten av akuteffekter hos vuxna (död) återfinns här vid höga koncentrationer i hår (ca 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) och icke-akuta effekter av irreversibelt slag (CNS-symptom, försenad gångutveckling) hos avkomman vid avsevärt lägre dos hos exponerade gravida kvinnor (ca 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).



**Figur 1.** Prevalens (% risk) av effektsymptom vid olika koncentrationer av metylkvicksilver i hår (WHO, 1994)

### 2.3 Kombinationsexponeringar - The Persian Gulf War syndrome

Kombinationsexponering kan principiellt vara av två slag: kontrollerad och begränsad till ett fåtal agens (2-3 agens) eller okontrollerad och omfattande multipla agens (>3). Kontrollerad kombinationsexponering kan t.ex. gälla premedicineringar inför en operativ insats och innebär att interaktionseffekter också kan riskbedömas på ett sätt som exemplifieras nedan för 'Persian Gulf War Syndrome'. Multipel kombinationsexponering sker okontrollerat i fält och även om tekniska skyddsmedel kan begränsa exponering för många agens, blir *biotillgängligheten* för agens avgörande för de verkliga exponeringarna. Ny modelleringsmetodik erbjuder möjligheter att prediktera biotillgänglighet för kemiska agens utifrån kemisk sorption, speciering mm, vilket studeras bl.a. inom FOI förstudien 'NBC i mark och vatten'<sup>6</sup>.

Gulf-kriget resulterade i ett stort antal diffusa 'icke-akuta-effekter' vilket utgör ett bra exempel på i vilket sammanhang dessa effekter har relevans. Bland 697 000 soldater från USA, England och Canada har registrerats ca 30 000 fall med symptom som kronisk

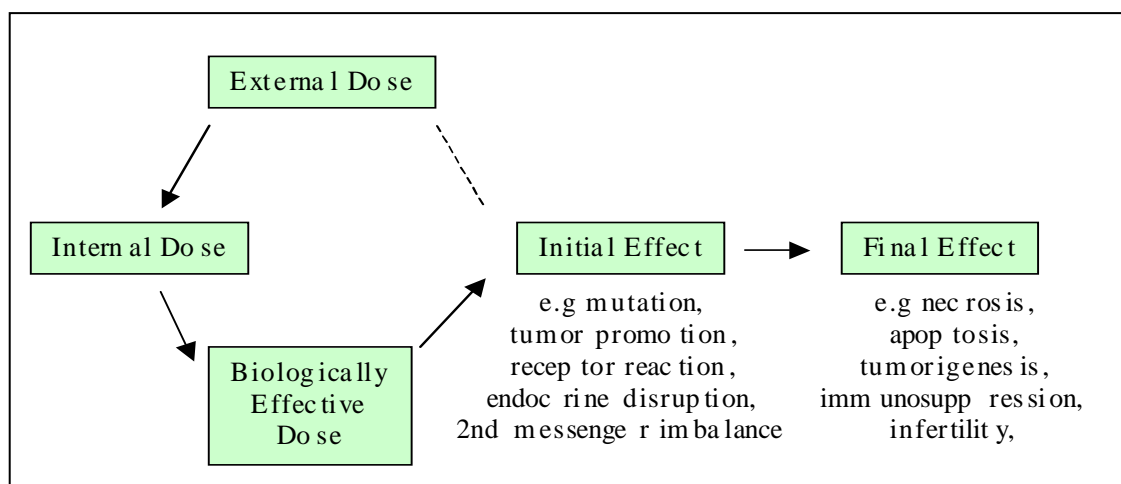
<sup>6</sup> Berglind, Waleij, Burman, Tjärnhage, Sjöström, Forsman. 2003. Förstudie – NBC I mark och vatten. Transport, exponering, biotillgänglighet. FOI-R--1073--SE.

trötthet, smärta i muskler och leder, ataxi, utslag, huvudvärk, glömska, irritabilitet och koncentrationssvårigheter. Bland övriga nationaliteter (Saudi, Frankrike, Egypten, Syrien, Marocko) saknades dessa symptom vilket lett till hypotesen att de drabbade soldaterna preparerats på samma olämpliga sätt. En granskning (Abou-Donia et al, 1996)<sup>7</sup> visade att den drabbade gruppen preparerats med följande tre kemikalier: pyridostigmin bromid (PB; motmedel mot nervgas), dietyltoluamid (DEET; insektsrepellent) och klorpyrifos (KPF; insekticid) vilka i olika kombinationer testades i en experimentell studie på höns med hypotesen att effekten av PB förstärktes av DEET och KPF. Resultaten visade på en additiv eller synergistisk effekt på locomotor funktion, verifierat med histopatologi, vilket också kunde associeras med tre enzymssystem: butyrylkolinesteras i plasma (PBchE), acetylkolinesteras i hjärna (BAChE), 'neurotoxicity target esterase' (NTE) i hjärna (Abou-Donia et al, 1996). Dessa fynd om mekanismen för utveckling av skada, visar på en möjlig förklaringsmodell för effekten och ger även ett visst underlag för en kvalitativ riskanalys för människa, men inte för en kvantitativ riskanalys.

## 2.4 Tidiga och fördröjda effekter

Icke-akuta respektive akuta effekter uppvisar ofta en temporal uppdelning på grund av en latenstid mellan initial effekt (attack på molekylärt mål) och slutlig effekt (se figur 2 nedan). Detta har gett upphov till en utvecklad teoribildning kring dosbegreppet eftersom 'interna dosmått' ofta givit betydligt bättre korrelation till studerade effekter<sup>8</sup>. Ett exempel är de kvicksilverhalter i hår som användes vid analys av Iraq-epidemin, istället för det mindre precisa dosmått som erhöles från intagsberäkning av metyl-Hg via brödförtäring.

Termen 'biologiskt effektiv dos' syftar på den halt av aktiv substans som nått det toxikologiskt intressanta molekylära/cellulära målet t.ex. receptor, mutationsfokus, målcell etc. Ett och samma toxiska ämne eller blandning av ämnen kan därvid ha flera olika mål och ge både akuteffekter respektive kroniska effekter efter reaktion med biomolekylära mål som reagerar med kort respektive lång latenstid. Symptombilden blir därmed än mer komplex när exponeringssituationen gäller låga doser och efterföljande kaskadsvär.



<sup>7</sup> Abou-Donia et al, 1996. Increased neurotoxicity following concurrent exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and chlorpyrifos.

<sup>8</sup> Vainio H. 1985. Current trends in the biological monitoring of exposure to carcinogens.

**Figur 2.** Relationerna mellan olika dosmått och initial respektive slutlig effekt (modifierad från Vainio, 1985).

## **2.5 Kritiska icke-akuta effekter i katastrofzoner**

Inte mycket är känt om vilka icke-akuta effekter som personalen kan uppvisa. En rimlig forskningsansats måste därför utgå från vad som speglas i fackpress<sup>9</sup>, från den uttalade oro för olika sjukdomstyper som framkommit i intervjuer i dagspress med berörd personal<sup>10</sup>, samt från kvalificerade gissningar. Följande 'icke-akuta' hälsoeffekter bedöms för närvarande relaterade till lågdosexponeringar av en lång rad kemiska, biologiska, fysikaliska agens:

- Tumörer
- Fortplantningsstörningar
- Immunförsvarsstörningar
- Nervstörningar
- Hormonstörningar
- Njurskador
- Leverskador
- Lungskador

Denna listning är naturligtvis osäker och det borde genomföras en studie där listan underbyggs ordentligt t.ex. genom en systematisk genomgång av utlandsstationerade soldaters journaler. Försvarsmaktens (FM) personal omfattas av en femårig repatrieringsperiod under vilken FM har att utreda att en tidigare anställd inte drabbats av skada under utlandstjänstgöring<sup>11</sup>. Det faktaunderlag som idag står till buds är en noggrann, konventionell läkarundersökning vilken normalt ska kunna avslöja akuta exponeringseffekter med stöd av klinisk kemisk/fysiologisk undersökningsmetodik. För de icke-akuta hälsoeffekter som här adresseras, saknas emellertid ofta en fördjupad metodik för karakterisering av exponering och denna måste skräddarsys i relation till de exponeringar som kan förekomma. Den riskbedömning som idag görs med avseende på möjliga exponeringar i stationeringsområdet, är därför sannolikt grundad på sporadiska exponeringsdata som korrelerar till akuteffekter, och sannolikt inte till data om kombinationsexponeringar.

---

<sup>9</sup> Jousseineau och Lewensohn. 2001. Ej visat att utarmat uran har negativa hälsoeffekter.

<sup>10</sup> Wallin B. 2001. Intervju med Kosovo-soldaten Robert Karlsson, Täfteå.

<sup>11</sup> Karlsson et al. 2001. NBC-frågor vid internationella operationer. Skydd mot C-stridsmedel och giftiga kemikalier. Rekommendationer.

### 3 Kritiska forskningsområden

Det generella målet för kommande forskning inom området icke-akuta effekter bör vara att förbereda avdelningen NBC-skydd på att kunna bedöma sannolikheten för de effekter som listats ovan. I det följande görs en genomgång av de olika områden som angivits ovan i en indelning som bedöms passa forskningsorganisationen.

#### 3.1 Samverkans effekter - effektbiomarkörer

Målet med området 'samverkans effekter' är att kombinera biomarkörer för effekt på ett sätt som kan användas för utvärdering av autentiska exponeringssituationer. Flera effektbiomarkörer är i dag kända på gennivå eller proteinnivå med koppling till den civila världens vanliga kemikalieexponeringar. Potentialen att finna lämpliga biomarkörer med koppling till försvarsrelaterade kemikalieexponeringar, är sannolikt mycket god med hjälp av de nya bioteknologiska plattformarna t.ex. cDNA-chip, proteinchip.

Den blandade exponeringssituationen i fältmiljön är idag ofta okänd i detalj och därför föremål för utredningsarbete inom bl.a. förstudien 'NBC i mark och vatten'. När kvalitativt skilda agens är identifierade från exponeringstillbud i fält t.ex. pyridostigmin bromid (PB) 'Gulf-kriget', nervgasen VX 'Dugway proving ground'<sup>12</sup>, kan en fördjupningsfas, exponeringsförsök påbörjas avgränsade till dessa kända agens eller till väl definierade modellsubstanser. I en senare fas, när kvantitativa data om agens preciserats i autentiska exponeringsmiljöer, kan mer autentiska exponeringsförsök konstrueras enligt multivariat design teknik.

#### 3.2 Tumöreffekter – genotoxicitet, karcinogenicitet

Testning av karcinogena och mutagena ämnen har utförts tidigare vid FOI NBC-skydd (FOATOX) men har inte förekommit sedan 1990-talets början. Ett samarbete med partners som EC JRC-IHCP/ECVAM<sup>13</sup> (Dr. Pärt, Dr. Sabbioni) och KI-IMM<sup>14</sup> (Prof. Grafström) samt Stockholms Universitet, GMT<sup>15</sup> (Prof. Jenssen) kan ge projektet taktiska fördelar av snabb start inom ett område där t.ex. ECVAM uteslutande använder cellkulturer för test av karcinogenicitet och tumorigenicitet<sup>16</sup>. FOI's bidrag kan här bl.a. vara verifierande djurförsök. Den metodplattform som utarbetats inom FOI-projektet 'Toxikometri' kan dessutom erbjuda viktiga pusselbitar i mekanistiska förklaringsmodeller för tumör-cellsutveckling.

---

<sup>12</sup> Van Kampen, KR. 1969. Organic phosphate poisoning of sheep in Skull Vally, Utah.

<sup>13</sup> EC JRC-IHCP/ECVAM: European Commission Joint Research Centre - Institute of Health and Consumer Protection/European Centre of the Validation of Alternative Methods, Ispra, Italien.

<sup>14</sup> Karolinska Institutet – Institutet för MiljöMedicin, Stockholm

<sup>15</sup> Stockholms Universitet, Institutionen för Genetik Mikrobiologi Toxikologi, Stockholm

<sup>16</sup> Mazzotti et al. 2001. In vitro setting of dose-effect relationships of 32 metal compounds in the Balb/3T3 cell line, as a basis for predicting their carcinogenic potential.

### **3.3 Fortplantningsstörningar och hormonstörningar**

Störningar i människans fortplantningsfunktion är ofta förknippade med störd utveckling av könsceller. Det molekylärbiologiska spelet bakom detta involverar könshormoner och dess receptorer samt miljöföroreningar, något som står i fokus i projekt som drivs av professor Gunnar Selstam (Molekylärbiologi, Umeå universitet) med flera publikationer inom området<sup>17 18</sup>. Förstudien 'Icke-akuta effekter' har här byggt upp kontakter som kan utgöra bas för ett långtgående samarbete inom området 'Fortplantningsstörningar och hormonstörningar'. FOI's roll blir att dels bidra med metoder för toxikogenomik och proteomik, dels att bistå med utvalda exponeringsmatriser, relevanta för totalförsvarets personal.

### **3.4 Immunförsvarsstörningar**

Immunotoxikologi är ett förhållandevis nytt forskningsområde rent vetenskapligt och har vuxit fram ur de landvinningar som gjorts inom immunologi, tumörbiologi och AIDS. WHO<sup>19</sup> omnämner två huvudsakliga inriktningar - immunosuppression respektive immunostimulering. En konsekvens av immunosuppression är ökad infektionskänslighet och svår immunosuppression inkluderar infektioner från ett brett register mikrober (bakterier, virus, svamp, parasiter). En annan konsekvens är ökad cancerbenägenhet till följd av sänkt immunologisk patrullering (eng. surveillance). Konsekvensen av immunostimulering förknippas med effekter från ett aktiverat immunförsvar t.ex. ökad överkänslighet, förvärrande av underliggande sjukdomar inklusive allergier, samt hämning av enzymatiska omvandlingsreaktioner (cytokromP450-systemet) i lever. Som relevanta immunotoxiska kemikalieklasser anges i litteraturen, pesticider, metaller (t.ex. tungmetaller, tennorganiska ämnen) halogenerade eller polycykliska aromatiska kolväten (t.ex. dioxiner, PCB)<sup>16, 20</sup>.

NBC-skydd har etablerat en stark nisch inom området 'inflammationsforskning' vilket relaterar starkt till immunostimulering. En satsning på området immunosuppression skulle ge en värdefull utveckling mot den fullständiga kunskapsbas som rimligtvis motsvarar totalförsvarets behov. Denna inriktning kan för närvarande inte ses inom andra forskningsorganisationer varför en satsning inom NBC-skydd förefaller logisk.

### **3.5 Fördröjda nervstörningar**

Förstudien har innehållit en litteraturgenomgång av sena/fördröjda nerveffekter efter exponering för organofosfatföreningar (OP). Ett utkast till review-rapport återfinns i bilaga 2. Tidigare forskning inom FOI har förtjänstfullt klarlagt de akuta effekterna av OP

---

<sup>17</sup> Gunnarsson et al. 2003. Cadmium-induced decrement of the LH receptor expression and cAMP levels in the testis of rats. *Toxicology* 183: 57-63.

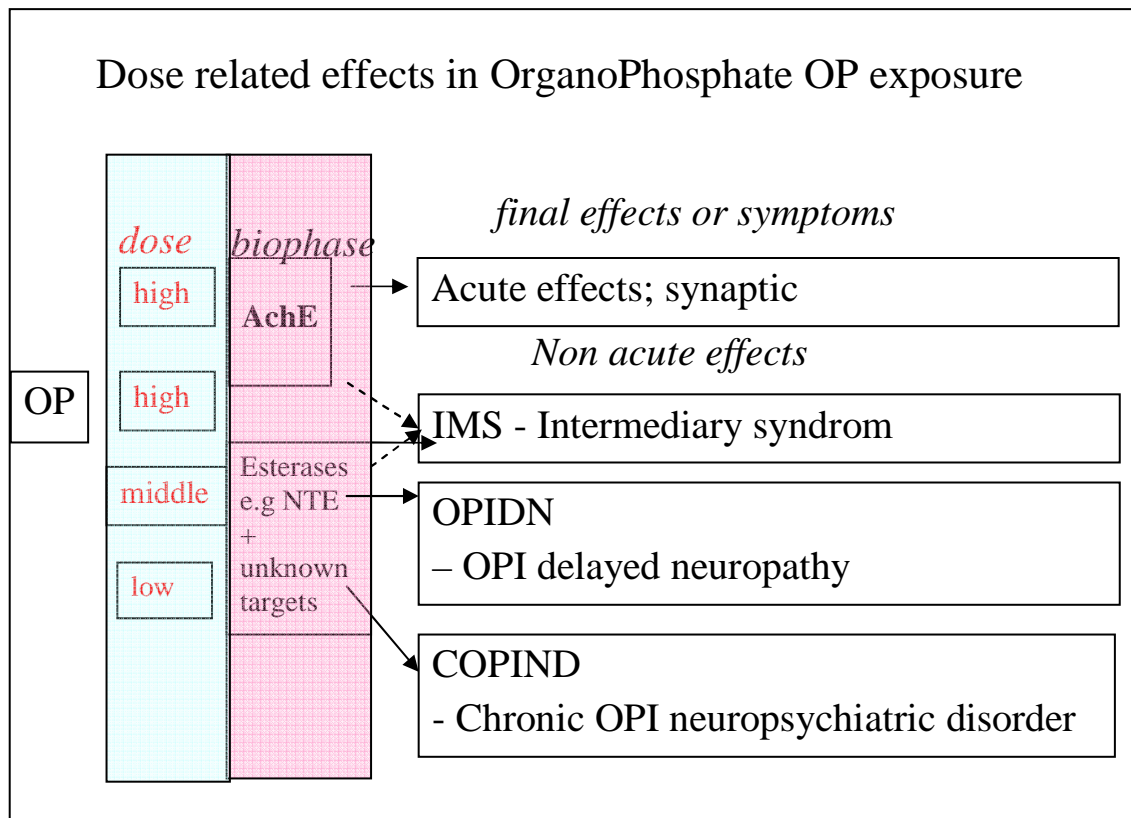
<sup>18</sup> Bjurulf E, Selstam G. Rat luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression and luteolysis: inhibition by prostaglandin F2 alpha.

<sup>19</sup> WHO. 1996. Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals. EHC 180. IPCS, WHO, Geneve.

<sup>20</sup> Van Loveren et al. 2000. Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals. *Toxicol Lett* 15:112-113; 319-24.



av C-vapentyp (t.ex. soman, tabun m.fl.). Liknande OP-substanser återfinns i gruppen pesticider och flera forskargrupper har försökt finna ett samband i OP-toxicitet mellan kemikalieklasserna. Litteraturgenomgången speglar en möjlig kategorisering av olika nämnda syndrom i relation till extern exponeringsdos, något som gör kategoriseringen osäker. Indelningen i kategorier framgår av figur 3. Av de syndrom som skissas i figur 3 är OPIDN (organophosphate induced delayed neuropathy) och COPIND (chronic organophosphate induced neuropsychiatric disorder) särskilt intressanta som manifestationer av icke-akuta nervtoxiska effekter. Eftersom så lite är känt om orsakssambanden för OPIDN och COPIND föreslås syndromen bli föremål för en toxikologisk hotanalys.



**Figur 3.** Olika kategorier av OP-relaterade effektsyndrom i relation till extern dos.

### 3.6 Metodologiska plattformar

Flera metodologiska plattformar har nämnts ovan som grund för de olika inriktningarna. Dessa innebär i flera avseenden nya tekniker och är i flera fall en förutsättning för satsningarna, varför en kortare beskrivning följer av de viktigaste.

#### 3.6.1 Mikromatristekniker

Som metodologisk plattform bedöms s.k. mikromatris-chip (cDNA-chip samt protein-chip) vara lämpliga för studium av icke-akuta effekter liksom för etablerandet av nya biomarkörer för effekt på t.ex. gennivå, proteinnivå. Såväl RNA som proteiner kan relativt enkelt isoleras från cellkulturer, försöksdjur eller från människa för senare analys på mikromatrischip. Datamängderna kan sedan analyseras i relation till biologiskt tillgänglig dos med hjälp av multivariat statistik.

Inom ramen för FOI-strat projektet 'Toxikometri' har mus-cDNA-chip med gott resultat etablerats och prövats i kontrollerade exponeringsförsök i kulturer av musceller (L929). Motsvarande försök baserat på human-cDNA-chip och human cellkultur är under planering. DNA-chip erhålls från forskningsnoder inom Wallenberg Consortium North (Anders Sjöstedt, klinisk bakteriologi, Umeå universitet; Peter Nilsson, bioteknik, KTH, Stockholm). Protein-chip-tekniken är under etablering inom projektet 'Nya hot' vid FOI NBC-skydd och är av stort intresse även för projekten 'Toxikometri' och 'Icke-akuta effekter'.

### 3.6.2 Cellkulturer

Cellodling är inget nytt men en ökad användning av cellkulturer som modellsystem kan förutses inom projektområdet. Ett antal cellinjer är f.n tillgängliga för experimentell toxicitetsanalys och övrig toxikologisk forskning (L929 muscell; HepG2 human levercell; Leydigceller m.fl.). En särskild uppställning cellkulturer (s.k. DRAG-test; Detection of Repairable Adducts by Growth inhibition)<sup>21</sup> avses etableras vid institutionen för hotbedömning, NBC-skydd, vilket ger möjligheter att studera genotoxicitet i extra av miljöprover. Vid sidan av dessa cellinjer finns även metodik etablerad vid avdelningen för odling i primärkultur av blodceller och lungmakrofager.

### 3.6.3 Organismmodeller

Djurmodeller för inflammationsforskning i lunga finns tillgängliga för implementering i immunotoxikologiska studier. För konventionell fortplantningstoxikologisk testning enligt OECD, är flera evertebratmodeller tillgängliga (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Nitocra spinipes*). *Daphnia magna* är på grund av sin storlek en möjlig modellkandidat till embryotoxikologisk forskning. Projektet 'Toxikometri' undersöker därför möjligheterna för studier av genuttryck på vattenloppa med de nya molekylärbiologiska teknikerna.

### 3.6.4 Biokompatibla extrakt

Den nya 'fälttoxikologiska inriktningen' baseras på prover tagna i autentisk fältmiljö vilka upparbetas för direkt undersökning i olika toxikologiska testsystem. De extraktionsmetoder som används för kemisk analys av lipofila föreningar (med opolära lösningsmedel t.ex. toluen), är här ej lämpliga eftersom biomodellerna (t.ex. cellkulturer) påverkas starkt. För extraktion i vatten av sådana prover används för närvarande s.k. trycksatt vätskeextraktion (pressurised liquid extraction, PLE) vilket åstadkoms i ett automatiserat extraktionsinstrument (Dionex ASE<sup>22</sup>) med lägre extraktionsutbyte av lipofila ämnen, men med god reproducerbarhet och kapacitet (26 prover kapacitet per laddning). Arbete med att öka extraktionsutbytet av lipofila ämnen pågår inom projektet 'EU-projektet MCN'.

### 3.6.5 Fälttoxikologi

Förstudien har följt utvecklingen av provtagningsstrategier av kemiskt förorenade områden inom ramen för FOI-projekten 'Miljökonsekvensanalyser' och 'EU-projektet Marksaneringscentrum Norr'. Syftet har varit att anpassa provtagningen för en effekt-baserad riskbedömning med direkt avläsning av toxicitet i proverna, som komplement till

---

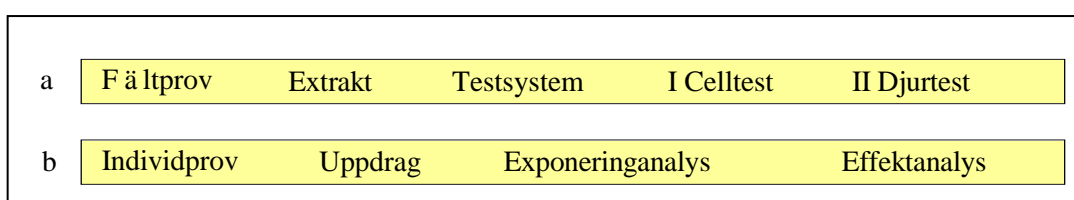
<sup>21</sup> Helleday, Johansson, Jenssen. 2001. The DRAG test: an assay for detection of genotoxic damage. ATLA, 29:233-41.

<sup>22</sup> Placering på institutionen för hotbedömning, toxikologilab

traditionell riskbedömning där bedömningen görs genom jämförelse av aktuella kemikaliehalter med gränsvärden härledda från laboratoriestudier.

Med den nya toxikologins metodik som bas finns de tekniska förutsättningarna för en sådan ansats där prover undersöks tagna direkt i riskmiljöer som ska riskbedömas. Sådana prover tagna med en genomtänkt strategis kan testas före inträde i exponeringsmiljöer med prediktionsinriktade toxicitetstester. Kompletterande och verifierande studier kan göras genom prover från individer med misstänkt exponering efter genomfört uppdrag i exponeringsmiljöer. Två huvudsakliga undersökningsstrategier skissas i figur 4.

Fältprovtagning (a) utförs enligt genomtänkta strategier som ger prover för direkt toxicitetsmätning. Fältprov från mark, luftburet damm, sediment, vatten, tas enligt strategi som representerar utbredningen av ett förorenat område. Dessa prover extraheras genom trycksatt vattenextraktion (t.ex. Dionex ASE) vilket ger biokompatibla extrakt vilka direkt kan blandas i odlingsmedium för t.ex. cellkultur m.m.



**Figur 4.** Två möjliga designalternativ för kvalitativ och kvantitativ riskanalys av exponering i fält.

Ett stegvis (tiered) system för undersökning av allmän toxicitet samt specifika icke-akuta effekter. Individprov (b) tas som ett referensprov i blodvävnad (vanligen) före operativt uppdrag i möjliga exponeringszoner. Efter genomfört operativt uppdrag genomförs exponeringsanalys på ett sätt som överensstämmer med internationell praxis för biologisk övervakning t.ex. i blod, urin, hår, fettväv, svett mm. Effektanalys utförs genom en jämförelse av biomarkörer för effekt i referensprov och effektprov. Traditionella biomarkörer erhålls i enlighet med litteraturen och nya biomarkörer erhålls från mikromatrisstudier (DNA-chip, protein-chip).

Strategin för fältprov har omsatts i praktisk metodik som provats med bra resultat inom några externa uppdrag (t.ex. 'MusköTox' och 'Hansson Pyrotech'). Vad gäller de genomförda uppdragen så har resultaten accepterats och presenterats i internationella sammanhang (SETAC konferens 2001; Bioavailability konferens 2003, China 2003), något som klart visar att forskargruppen behärskar metodiken väl för upparbetning av biokompatibla extrakt från fältprover ifrån relevanta miljöer, följt av toxicitetsmätningar på laboratorium<sup>23 24 25</sup>.

<sup>23</sup> Ragnvaldsson D., Leffler P.E. 2001. Cytotoxicity guided risk estimation of polluted soils. Poster at the SETAC Conference in Madrid, May 6-10, 2001

<sup>24</sup> Ragnvaldsson, Berglind, Leffler. 2003. Ecotoxicological Risk Analysis of Soil Polluted by Pyrotechnical Activities. Abstract at the 2nd International Workshop on Bioavailability of Soil Pollutant and Risk Assessment, February 2-7, 2003, Monte Verita, Ascona, Switzerland. FOI-S--1106--SE.

<sup>25</sup> Leffler, P. 2003. Toxicity based risk analysis of metal contaminated land. Abstract to the International Symposium on "Health impact of Cadmium exposure and its prevention in China", Nov 17-19, Shanghai, China. FOI-S--1080--SE

### 3.7 'Tiered system' för fältprov

Som möjlig metodologisk lösning på komplexitetsproblemet vid 'icke-akuta effekter', har 'stegvisa testsystem'<sup>26 27 28</sup> (eng 'tiered systems') för en lång rad toxiska effekter, lanserats av myndigheter och forskargrupper. Syftet är att beskriva effekterna sorterat och att beskriva orsakssambanden samt bedöma befolkningens förgiftningsrisker för existerande och nya kemikalieprodukter. Denna testverksamhet ses traditionellt framförallt som en säkerhetsåtgärd innan nya kemikalieprodukter släpps ut på marknaden.

Kemiska produkter som säljs på marknaden idag är redan spridda i människans närhet, i ekosystemens olika matriser (t.ex. mark, vatten, växter, djur, livsmedel), och till olika grad av biotillgänglighet för människa och övriga organismer. Detta gäller även för många försvarsrelaterade kemiska ämnen (t.ex. explosivämnen, C-vapen) som förorenat markområden som t.ex. disponeras av försvarsmakten. Argument finns därför för tillämpning av liknande metodik för direkt testning av toxiciteten i dessa miljömatriker. Europaunionens nya direktiv<sup>29</sup> för toxicitetstestning av nya och existerande kemikalier, föreskriver en EU-gemensam testmetodik som FOI bör kunna etablera i tillämpliga delar. EU-direktivet är emellertid så pass nytt att dess nya möjligheter och begränsningar ej helt kunnat utvärderas för verksamheten vid FOI.

Förstudien har översiktligt diskuterat hur ett stegvist toxikologiskt testsystem skulle kunna utformas för att passa verksamheten vid FOI vilket dokumenterats i bilaga 1. Resonemanget bygger på ett utkast från den danska miljöstyrelsen<sup>30</sup> och omfattar tre nivåer vilket kan ses i figur 5 nedan.

I figur 6 nedan skissas en utveckling av detta 'tiered system' avpassat för ett 'okänt fältprov' från relevant exponeringsmiljö. En serie prover krävs för att täcka ett geografiskt område. Varje prov testas genom ett batteri av stegvisa toxicitetsmodeller ordnade så att undersökningen stoppas om toxicitet inte kan visas i något steg. Den multivariata prediktionsmodell som genereras från 'indata' kan valideras mot från egna djurförsök, litteraturoppgifter eller epidemiologiska data, bl.a. genom s.k. QSAR (kvalitativa/kvantitativa strukturaktivitet samband). Prediktionsstyrkan beror av kvalitén i indata, och en fördel med testsystemets sekvensuppbyggnad är att svaga deltester kan bytas ut mot starkare moduler, med påföljd att prediktiva styrkan förbättras.

---

<sup>26</sup> Worth and Balls. 2002. Alternative methods for chemical testing: Current status and future prospects.

<sup>27</sup> WHO. 1996. Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals. Sid 153-159.

<sup>28</sup> Van Loveren et al. 1998. Risk assessment and immunotoxicology.

<sup>29</sup> <http://europa.eu.int/comm/enterprise/chemicals/chempol/whitepaper/reach.htm> 2003-05-27

<sup>30</sup> [http://www.mst.dk/udgiv/publications/2001/87-7944-694-9/html/kap01\\_eng.htm](http://www.mst.dk/udgiv/publications/2001/87-7944-694-9/html/kap01_eng.htm)

**Nivå 1**

Toxdata från befintliga databaser

Epidemiologiska data

Identifiering av möjliga toxiska ämnen genom struktur-aktivitets samband (QSAR).

T.ex med programmet TOPCAT som använder "Quantitative Structure Toxicity Relationship" modeller för att uppskatta hälsoskadande effekter.

**Nivå 2**

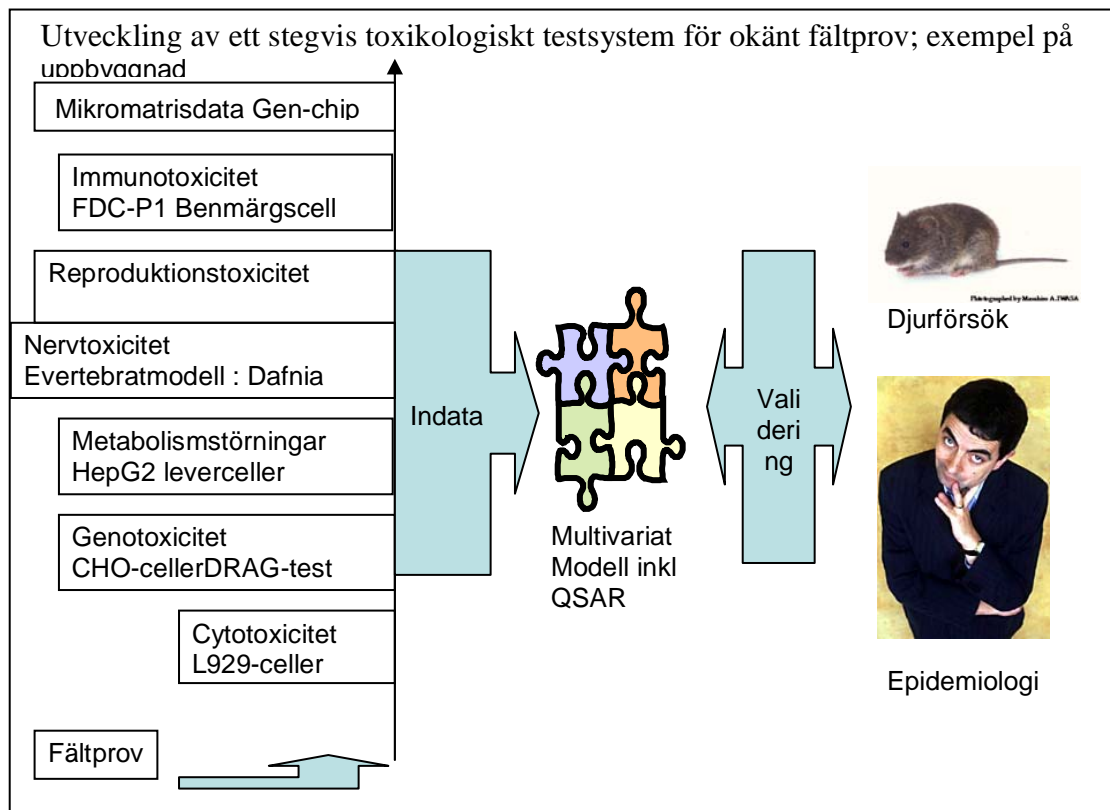
Enkla celltester

Tester på lägre stående djur

**Nivå 3**

Komplexa celltester

Djurtester

**Figur 5.** Nivåer i ett tänkt 'tiered' system från den danska miljöstyrelsen.**Figur 6.** Utveckling av ett 'Tiered system' för okänt fältprov; exempel på uppbyggnad



## 4 Slutsatser och förslag till projektsatsningar

Slutsatserna från föreliggande projekt är att:

- Icke-akuta effekter är otillräckligt kartlagda bland svenska soldater i nationell eller internationell tjänst.
- Icke-akuta effekter av sannolikt stor betydelse för verksamheten finns inom områdena: samverkans effekter, tumöreffekter/genotoxicitet, hormonfortplantningseffekter, immunförsvarseffekter, fördröjda nerveffekter.
- Icke-akuta effekter i många fall är möjliga att förutsäga utifrån relativt enkla toxicitetstester på prover tagna i autentisk exponeringsmiljö.
- De exponeringskombinationer som genererar Icke-akuta effekter är endast delvis identifierade från laboratorieförsök eller epidemiologiska studier.
- De mekanismer som genererar Icke-akuta effekter är delvis kända från laboratorieförsök på försöksdjur eller cellkulturer.
- De nya plattformar för mätning av Icke-akut-toxikologiska 'endpoints' är lovande och under utveckling inom forskningsområden som designade cellkulturer (jmf DRAG-test, Leydig-cell-test, toxikogenomik (gen-chip från evertebrater, mus, råtta, människa).
- Multivariat data analys (s.k. MVDA) erbjuder ett nytt kraftfullt tolkningsverktyg för de stora mängder data som underbygger komplexa förklaringsmodeller till förgiftningseffekter.

Vunna kunskaper inom dessa områden kan ge vägledning om råd till placering av Campus-områden i fält, placering av poster, hantering av exponeringsfaror i grupperingar och poster, hantering av exponeringsfaror via matvaror och dryck under tjänstgöring och fritid.

Föreliggande förstudie föreslår projektsatsningar inom de områden som angivits som angelägna enligt ovan med försvarsdepartementet/Försvarsmakten som finansiär/kund. I det följande ges synpunkter på hur detta kan åstadkommas dels genom egen forskning, dels i nätverk genom samarbete med externa forskargrupper inom vissa områden.

Det spektrum av icke-akuta effekter som är kritiska för människa ligger sannolikt inom områdena genotoxicitet, karcinogenicitet, immunotoxicitet, hormon- och fortplantningsstörningar, nerv- och beteendestörningar samt funktionsstörningar i njure, lever, lunga. Effekter inom dessa områden återfinns *nästan alltid* vid de lägsta kända doser som ger skador på biologiska system men inget av områdena har hittills visats vara det mest känsliga. Därför är det riskfyllt att koncentrera forskningsresurserna till ett enda av dessa områden om alla frågeställningarna från FM och exponerad personal skall kunna besvaras. En systematisk kunskapsuppbyggnad i nätverk där FOI ingår naturligt är därför att föredra om kunskapsbredden ska kunna upprätthållas.

Tabell 1 visar ett förslag till vilka forskningsområden som kan vara föremål för samarbete i nätverk samt vilka områden som kan utgöra grund för FOI's egna projekt.

**Tabell 1.** Forskningsområden och möjliga samarbetspartners samt egna satsningar

<b>Forskningsområde</b>	<b>Samarbete i nätverk</b>	<b>FOI projekt</b>
Samverkans effekter		'Nytt projekt'
Tumöreffekter/Genotoxicitet	IHCP/ECVAM (Dr Pärt/Dr Sabbioni); KI-IMM (Prof Grafström); SU, GMT (Prof Jenssen)	
Hormon/fortplantningsstörningar	Umeå universitet (Prof Selstam, Prof Tysklind)	
Immunförsvarsstörningar		'Nytt projekt' 'C-medicin (Bucht)'
Fördröjda nervstörningar		'Nytt projekt'
Stegvis testsystem för fältprov		'Nytt projekt'



## 5 Tack till medarbetare

Ett stort tack riktas till följande medarbetare för kreativa och kritiska bidrag under arbetets gång: Rune Berglind, Anders Bucht, David Gunnarsson, Åsa Gustafsson, Ann Göransson-Nyberg, Daniel Johansson, Mona Koch, Bo Koch, Pär Larsson, Roland Larsson, Bo Lilliehöök, Susanne Lundberg, Daniel Ragnvaldsson, Gunnar Selstam, Daniela Stricklin, Kerstin Svensson, Per Wikström, Lars Värngård. Ett särskilt tack riktas till Jan Sjöström som granskat manus och kommit med värdefulla synpunkter.



## 6 Referenser

- Abou-Donia M, Wilmarth K, Abdel-Rahman A, Jensen K, Oehme F, Kurt T. 1996. Increased neurotoxicity following concurrent exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and chlorpyrifos. *Fundamental and applied toxicology*, 34:201-222.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res* Aug;463(2):111-72
- Bakir F, Damluji F, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, Al-Rawi N Y, Tikriti S, Dhahir H I, Clarkson T W, Smith J C, Doherty R A. 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 181:230-241
- Berglind, Waleij, Burman, Tjärnhage, Sjöström, Forsman. 2003. Förstudie – NBC I mark och vaatten. Transport, exponering, biotillgänglighet. FOI-R—1073—SE.
- FOI, 2002. Förstudie NBC-ledningssystem. *FOI-R—483—SE*. Bilaga 2, sida 2.
- Gunnarsson D, Nordberg G, Lundgren P, Selstam G. 2003. Cadmium-induced decrement of the LH receptor expression and cAMP levels in the testis of rats. *Toxicology* 183:57-63.
- Helleday, Johansson, Jenssen. 2001. The DRAG test: an assay for detection of genotoxic damage. *ATLA*, 29:233-41.
- Karlsson B, Liljedahl B, Melin L, Olofsson G, Persson S-Å. 2001. NBC-frågor vid internationella operationer. Skydd mot C-stridsmedel och giftiga kemikalier. Rekommendationer. FOA-R--00-01776-865--SE.
- Leffler, P. 2003. Toxicity based risk analysis of metal contaminated land. Abstract to the International Symposium on "Health impact of Cadmium exposure and its prevention in China", Nov 17-19, Shanghai, China. FOI-S--1080--SE
- Mazzotti F, Sabbioni E, Ponti J, Ghiani M, Fortaner S, Rossi G. 2001. In vitro setting of dose-effect relationships of 32 metal compounds in the Balb/3T3 cell line, as a basis for predicting their carcinogenic potential. *ATLA* 30:209-17
- Ragnvaldsson D., Leffler P.E. 2001. Cytotoxicity guided risk estimation of polluted soils. Poster at the SETAC Conference in Madrid, May 6-10, 2001
- Ragnvaldsson, Berglind, Leffler. 2003. Ecotoxicological Risk Analysis of Soil Polluted by Pyrotechnical Activities. Abstract at the 2nd International Workshop on Bioavailability of Soil Pollutant and Risk Assessment, February 2-7, 2003, Monte Verita, Ascona, Switzerland. FOI-S--1106--SE.
- Sandström Björn, Nygren Ulrika. 2001. Urannivåer i urinen hos svensk personal som arbetat eller avser att arbeta i den svenska KFOR-styrkan I. (FOI-R--0165--SE)

FOI-R--1014--SE

Sandström Björn. 2002. Urannivåer i urinen hos svensk personal som arbetat eller avser att arbeta i den svenska KFOR-styrkan i Kosovo II. (FOI-R--0581--SE)

Vainio H. 1985. Current trends in the biological monitoring of exposure to carcinogens. *Scand J Work Environ Health* 11:1-6

Wallin Bertil. 2001-01-17. "Visst känns det lite oroligt" samt "Låg cancerrisk med utarmat uran". *Västerbottens-Kuriren* Sidan 22.

Van Kampen, KR., James, LF., Rasmussen, J., Huffaker, RH., Fawcett, MO. 1969. Organic phosphate poisoning of sheep in Skull Vally, Utah. *Journal of the American Veterinary Medical Association, (J.A.V.M.A.)* 154,(6),623-630

Van Loveren H, Ross PS, Osterhaus AD, Vos JG. 2000. Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals. *Toxicol Lett* 15:112-113; 319-24.

Van Loveren H, De Jong WH, Vandebriel RJ, Vos JG, Garssen J. 1998. Risk assessment and immunotoxicology. *Toxicol Lett* 102-103:261-5

Worth A, Balls M. 2002. ECVAM. Alternative methods for chemical testing: Current status and future prospects. *ATLA, Vol 30:1-125, Supplement 1.*

WHO, 1994. Biological monitoring of metals. *IPCS*

WHO. 1996. Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals. EHC 180. *IPCS, WHO, Geneve.*

## Utveckling av 'tiered system' för toxikologisk riskbedömning. Utkast

### **Bo Lilliehöök**

**Motiv:** Relativt pålitliga och enkla system för att kunna testa ett stort antal substanser eller blandningar efterfrågas av alla som har eller känner ansvar för hälso- och miljöfrågor.

Skadeeffekter som bedöms viktigast av 'Danish EPA'.

[http://www.mst.dk/udgiv/publications/2001/87-7944-694-9/html/kap01\\_eng.htm](http://www.mst.dk/udgiv/publications/2001/87-7944-694-9/html/kap01_eng.htm)

- Akut toxicitet. "Farligt att svälja"
- Sensitisering vid hudkontakt. Ger eksem/allergi
- Mutagenicitet.
- Carcingenicitet
- Skador på aqvatisk miljö.
- Immunsystemskador
- Påverkan på nervutveckling
- Endokrin påverkan

Nivåer av ett tiered system:

#### **Nivå 1**

Toxdata från befintliga databaser

Epidemiologiska data

Identifiering av möjliga toxiska ämnen genom struktur-aktivitetssamband (QSAR). T.ex med programmet TOPCAT som använder "Quantitative Structure Toxicity Relationship" modeller för att uppskatta hälsoskadande effekter.

#### **Nivå 2**

Enkla celltester

Tester på lägre stående djur

#### **Nivå 3**

Komplexa celltester

Djurtester

### **Möjliga enklare testsystem i nivå 2-studier (vi bör fokusera på denna nivå)**

I alla studier *in vitro* måste begränsningar av metabolisk aktivering uppmärksammas.

Exponeringsväg är väsentlig för metabolisk aktivering *in vivo*. Missad metabolisk aktivering ger falska svar.

## Bilaga 1

Utvärdering av kemikaliers farlighet utifrån *in vitro* studier måste även diskutera doseringens inverkan på cellsvar och inkludera farmakokinetiska studier.

Akut toxicitet. "Farligt att svälja"

Se MEIC (Multicentre Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity) studien som är ett internationellt program för att utvärdera om *in vitro* tester kan användas för att testa om ämnen är akuttoxiska.

Sensitisering vid hudkontakt. Ger eksem/allergi

Eventuellt kan dendritiska celler/cellinjer användas för screening.

Mutagenicitet.

Mest använd är bakterietesten Ames Test. *In vitro* micronucleus assay.

Carcinogenicitet

Tester som kombinerar mutagenicitet och promotion. Metabolisk aktivering väsentlig!

Skador på aqvatisk miljö.

Batteri av OECD-tester på vertebrater (Dafnia, Ceriodafnia, Nitocra), alg (Selenastrum) m.fl.

Immunsystemskador

Svårt med *in vitro* metoder eftersom olika cellpopulationer i så hög grad påverkar varandra. Farligast är benmärgsdepression. Anger screening av toxicitet mot benmärgsceller som en viktig test.

Påverkan på nervutveckling

Beskrivning av *vitro*tester finns på:

<http://altweb.jhsph.edu/~altweb/publications/ECVAM/ecvam03.htm>

**Table I: Pre-normative and Pre-validation Studies in Progress**

Study (contact)	<i>In vitro</i> models	Endpoints
CellTox/FRAME/ ECITTS/ECVAM (Atterwill)	Three-tiered hierarchical screen	Cytotoxicity and cell-specific effects (neural versus glial)
BRIDGE/BIOTECH/ BIOMED (EU)	Mechanistic	Developmental and neurotoxicological
US EPA (Veronesi)	Neuroblastoma cell lines	Organophosphate-directed neurotoxic esterase inhibition
Zurich (Bruinink)	Chick brain and retina primary monolayer and reaggregate cultures	Neural cell-specific markers
NeuroSearch, Denmark (Drejer)	Primary central nervous system cultures and PC12 cell lines	Biomarkers for membrane potential, Ca <sup>2+</sup> and cytotoxicity

ECITTS = ERGATT/CFN integrated toxicity testing scheme; EPA = Environmental Protection Agency.

Endokrin påverkan

*In vitro* tester som omfattar cellinjer med AR eller ER receptorer. Metabolisk aktivering väsentlig! Två lägre vertebrater har föreslagits av US EPA. *Phimephales promelas* för korttids reproduktionstest och *Xenopus laevis* för metamorphosis assay.

**Djurtester som ersätts med celltester**

Huskadande (korrosiva) ämnen. Djurtester ersätts med tester som EpiDerm eller EPISKIN Som använder 3D-celldlingsmodeller med rekonstruerat epidermis.

Ögonskadande ämnen.

Flera *in vitro*-metoder finns under utveckling eller validering, som "Fluorescein leakage assay", "EpiOcular assay", "Neutral Red Release assay" och "Irritection system".

FOI-R--1014--SE

Bilaga 1



# Fördröjd neurotoxicitet orsakad av organofosfater – översikt av mekanistiska förklaringsmodeller till icke- akut nervtoxicitet (OPIDN)

Lägesrapport och förslag till forskningsinriktning av  
Rune Berglind, Per Leffler och Susanne Lundberg

Inst. för Hotbedömning

*"Disease is very old and nothing about it has changed. It is we who change as we learn to recognize what was formerly imperceptible."*

*J. M. Charcot*

## 1. Inledning

Inom toxikologin är det mycket viktigt att skilja mellan effekter av giftiga ämnen vid (högdos-) akutexponering och vid (lågdos-) långtidsexponering (akut resp. kronisk exponering). I de flesta fall uttrycks effekterna vid förgiftning mycket olika. Vid akutexponering är det substansens effekt på organismens överlevnad inom kort tidsrymd (24 timmar till 14 dagar) och uppkomst av skador på olika organ som studeras under denna tid. Vid kronisk exponering eller lågdosexponering är det störningar på fysiologiska förlopp (enzymreglering, tumöruppkomst, tillväxt, organfunktion etc.) hos det exponerade djuret som studeras. Observationstiden (= Exponeringstiden) är mer än 10 % av djurets normala livslängd.

### *Olika stadier av långtidseffekter orsakade av OP-föreningar*

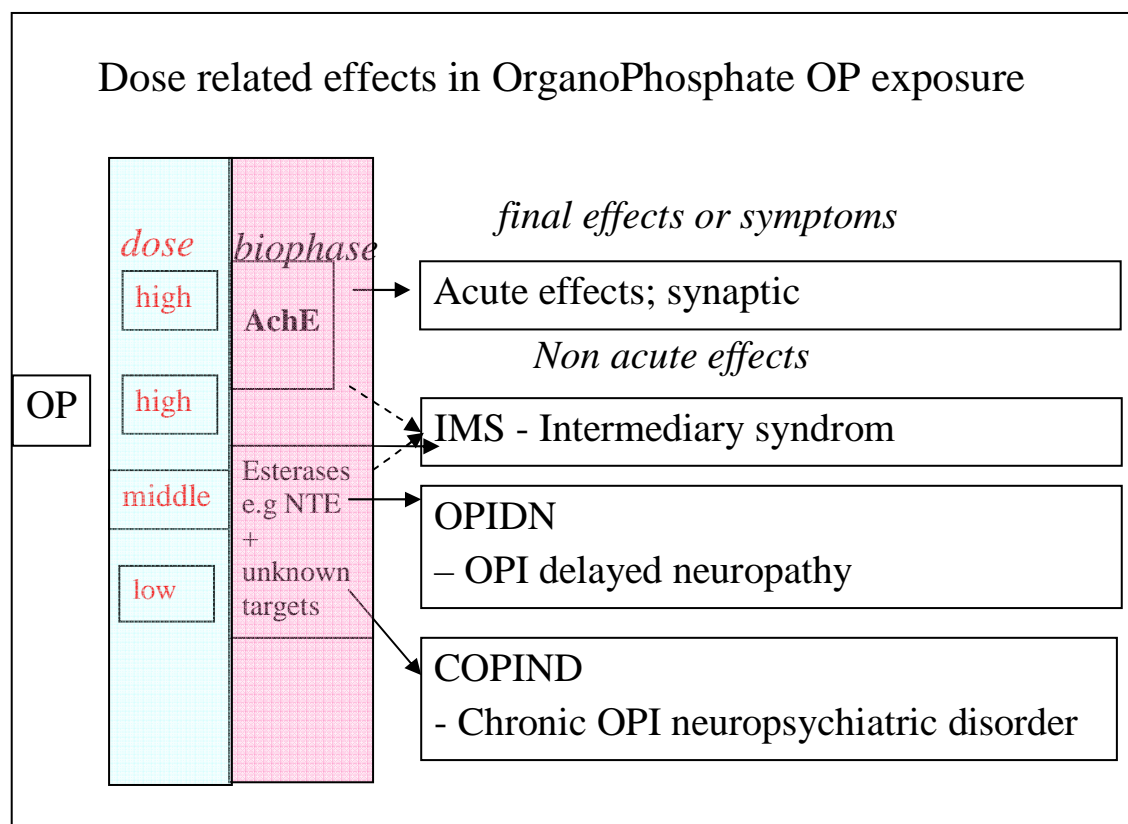
Efter exponering för organiska fosforföreningar (OP) uppkommer i vissa fall skador på nervsystemet lång tid (dagar till veckor) efter exponeringstillfället. När man mer noggrant började undersöka organofosfaters toxikologi med avseende på långtidseffekter användes primärt höga doser och exponeringen var vid ett tillfälle. I ett stort antal dagsaktuella studier används fortfarande detta tillvägagångssätt. De långtidseffekter som tillskrivs dessa föreningar har därför undantagslöst föregåtts av en akut effekt (inhibering av acetylkolinesteras).

Effekter av organiska fosforföreningar vid sidan av den akuta effekten har dock diskuterats i litteraturen sedan årtionden (Johnson, 1984; Lotti, 1992; Jamal, 1997). I försök att kategorisera dessa alternativa effekter (sammanfattas i figur nedan) har de kallats intermediära syndrom, OPIDN (Organophosphorous induced delayed neuropathy) och även på senare år COPIND (Chronic Organic Phosphate Induced Neuropsychiatric Disorder). Inget av dessa syndrom orsakas av alla organofosforföreningar, och det finns inte i något fall en fullständig korrelation mellan akut förgiftning och det efterföljande syndromet. Vanligen har det intermediära syndromet om det uppträder föregåtts av en akut effektfas, och uppstår 1-3 dagar efter exponering. Syndromet exemplifieras av bland annat paralytisk och försvagad nackmuskulatur som dock är övergående; de allra flesta har tillfrisknat efter 2-3 veckor.

I denna rapport avser vi att fokusera på OPIDN och symptom och förlopp beskrivs därför i mer detalj nedan.

Det framhålls dessutom i litteraturen att skador som kan upptäckas som kliniska symtom även kan uppstå vid doser som underskrider de som ger kolinerga symtom. Dessa skador är till skillnad från de förra kroniska, och omfattar uteslutande psykologiska effekter. Ett flertal djurstudier har visat att doser som inte ger kolinerga symtom förorsakar störningar på bl.a. leverfunktionen och beteendet (Ray and Richards, 2001). För att särskilja detta från övriga alternativa effekter har benämningen COPIND föreslagits. Symptomen är distinkta från dem som observeras vid exempelvis OPIDN, och har ibland observerats även där en akut effekt förekommit.

Resonemanget kring de epidemiologiska undersökningar som existerar vad gäller lågdosexponeringar försväras av att det ofta är svårt att identifiera vad individerna exponerats för vid sidan av OP-föreningar, samt att de bedömningsverktyg som används ofta är för trubbiga för att upptäcka de subtila förändringar som tros uppstå vid COPIND.



#### *Andra substanser kan ge liknande effekter*

Ett flertal olika föreningar utöver organiska fosforföreningar kan ge distala morfologiska förändringar i axonerna.  $\gamma$ -Diketon (Lehning et al, 2000), deltametrin (Calore et al, 2000), alkohol (Putzke et al, 1998), metylkvicksilver (Castoldy et al, 2001) and akrylamid (Lehning et al, 1998) är alla exempel på föreningar som ger upphov till förändringar i neural vävnad. Alkohol och metylkvicksilver påverkar i första hand CNS medan deltametrin,  $\gamma$ -diketon och akrylamid ger effekt i perifera delar av axonerna. Till en del är orsakssambanden mellan exponering och effekt klarlagda för substanserna. Både biokemiska och morfologiska förändringar i axonen och dess myelinskida har observerats i samband med exponering för dessa kemikalier.

### *OPIDN - symptom och histologiska förändringar*

Tiden mellan exponering och initiala symptom varierar mellan 6 dagar och 3 veckor beroende på exponering och substans, dvs effekten uppstår efter det att de kolinerga symptomen avklingat. Symptomen vid OPIDN är nedsatt rörelseförmåga, balanssvårigheter som kan övergå i paralyt (Cherniack, 1988). Effekten är endast till en del reversibel och tillfrisknandet går långsamt (Jortner et al, 1989). Doser som krävs för att generera OPIDN bedöms (av de flesta) befinna sig i det område där kolinerga symptom uppstår, men inte sällan orsakas OPIDN av organofosforföreningar som inte är effektiva acetylkolinesterasinhibitorer. Observerade strukturella förändringar i nervvävnad (läs axoner) i samband med exponering för OP är bl.a. svullna axoner och förtunnade av myelinskidor. I axonerna är cytoskelettet (neurofilament) till en del nedbrutet och organeller som mitokondrier är förändrade (Jortner 2000; Choudhary, et al 2000). Histologiskt karakteriseras förloppet av degenerering av axonen och myelinskidan (Lapadula et al, 1985). Analys av perifera nervsystemet från höna som exponerats för en OP visar bl.a. på degenerering av myelinskidan och av axonen och som beskrivs som "dying back" neuropati (Ecobochon and Joy, 1994).

### *OPIDN - Potentiella målmolekyler för OP-föreningar*

De mycket varierande symptomtyper som finns beskrivna i litteraturen samt det tydliga sambandet mellan struktur och funktion (exempelvis leder exponering för långt ifrån alla OP-föreningar till OPIDN) som observeras i samband med alla de ovan beskrivna tillstånden indikerar att det finns ett stort antal proteiner eller andra biomolekyler som reagerar med OP-föreningar eller deras hydrolytprodukter. Att effekter observeras även vid intermediär eller låg exponering antyder att dessa proteiner är "känsligare" än acetylkolinesteras. Detta kan vara en konsekvens av en högre affinitet för OP-föreningen, eller att dess funktion drastiskt påverkas även om endast en liten del av dess totalmängd är inhiberat av OP-föreningen. I vilken grad de varierande symptomen som beskrivits ovan också innebär att olika biomolekyler har påverkats är inte heller klarlagt. Det är frestande att anta att så är fallet, men den kunskap vi har om livets komplexitet ger nog ändå vid handen att en mängd proteiner eller andra biomolekyler är inblandade i dessa processer, och att det snarare är olika kombinationer av effekter på molekylär nivå som genererar olika symptom.

Under senare hälften av 80-talet fanns en stark tilltro till att OPIDN kunde kopplas till graden av inhibering och åldring för enzymet NTE (Neuropathy Target Esterase) (Johnson, 1990). Klassificering av organofosfater gjordes baserat på ett så kallat "hen-test" där graden av NTE inhibering och åldring fick avgöra om substansen var OPIDN-inducerande eller inte. Detta ifrågasattes starkt i början på 90-talet, och det faktum att vissa NTE-inhibitorer inte orsakade OPIDN liknande symptom avförde NTE som varades den målmolekyl som förmedlade OPIDN (Lotti *et al.* 1993). Sedermera fastslogs också att det finns OP-föreningar som ger OPIDN, utan att för den skull inhibera NTE (Abdel-Rahman *et al.* 1997).

Andra proteiner som föreslagits interagera med OP-föreningar är naturligt nog andra esteraser, carboxylaser eller hydrolaser dvs enzymer som agerar via aminosyran serin i aktiva ytan (Quistad *et al.* 2000; Richards *et al.* 2000; Maxwell och Brecht, 2001). Det faktum att förbehandling med PMSF, en serinhydrolas inhiberande förening, motverkar effekten av OPIDN indikerar också att ett protein med liknande funktion är inblandat (Lotti *et al.* 1993). Det är dessutom fastställt att vissa organofosfater interagerar med en eller flera olika subtyper av muskarinlika receptorer (Bomser och Casida, 2001; Huff *et*

## Bilaga 2

al. 1994). Effekter på intracellulära signalsystem, främst det som är kopplat till cykliskt AMP har konstaterats, men om denna effekt uppstår genom direkt interaktion med molekyler som deltar i denna signalkaskad, eller som en indirekt effekt av interaktioner med receptorer är inte klarlagt (Huff *et al.* 1994; Song *et al.* 1997). Att identifiera de effekter som uppstår och säkerställa relevansen hos de effekter man hittar är ett svårt och mycket komplext arbete och litteraturen är på grund av detta också inte entydig vad gäller vilka enzymer som är väsentliga i detta sammanhang.

*Förstudiens omfattning*

Det är viktigt att komma ihåg att undersökningar av enzymaktiviteter e.t.c. i perifera nerver från OP-exponerade djur inte enbart representerar axonens reaktion på OP utan även reaktioner i associerade celler som Schwannceller och/eller ytterligare celler i nervskidan. Betydelsen av dessa strukturers reaktion för uppkomst av OPIDP har inte undersökts. Det intrikata samspelet mellan neuroner och dess stödceller belyses nedan, samt ges förslag till hur detta kan sammankopplas med de effekter som observeras vid exempelvis OPIDN.

Biokemiska undersökningar har visat på en ökning av  $Ca^{2+}$ /calmodulinberoende proteinkinaser fosforylering av  $\alpha$ - och  $\beta$ -tubulin vilket leder till fragmentering av tubulin (Piao *et al.* 2003; Jortner, 2000). Dessa processer, och det som är känt kring bakomliggande faktorer beskrivs också nedan.

Denna förstudie fokuserar således på två huvudområden där organiska fosforföreningar kan interagera och kunna ge upphov till OPIDN vid lågdosexponering under lång tid:

1. Interaktionen mellan axon och Schwann cell
2. Orsakssamband bakom fragmentering av cytoskelettet

Vidare behandlas vilken relevans denna kunskap och fortsatt forskning inom området bedöms ha för FOI NBC-skydd. Avslutningsvis ges några förslag till fortsatt forskningsinriktning.

## 2. Interaktionen mellan axon och Schwann cell

En nerv är utifrån och in uppbyggd av tre ”lager”. Ytterst ligger en bindvävsskida (*epineurium*) vars roll är att hålla samman nerven i ett paket. Inunder denna bindvävsskida finns ett mellanskikt av celler (cellular tube (eng.), *perineurium*). Skiktet utgörs av platta celler som hålls samman med *tight junctions* och är en selektiv barriär mot yttvärlden, blod-hjärnbarriären. Innanför detta cellskikt finns axon-Schwanncell enheterna inbäddade i ett kollagenrikt matrix, *endoneurium*. För att hålla samman detta komplex av celler krävs ett intrikat samspel mellan de olika celltyperna (Jessen and Mirsky, 1999). Ett exempel på interaktionen är den mellan axon och Schwanncell (SC) och distributionen av kalium ( $K^+$ ) och natrium ( $Na^+$ ) kanalerna längs axonen och fosforyleringen av neurofilamenten. Regleringen av distributionen av jonkanalerna sker dels medelst en signalsubstans som utsöndras av SC dels genom interaktion mellan axonens jonkanaler och receptorer på ytan hos SC. För att överleva behöver Schwanska celler ”överlevnadssignaler”, vilka dels utsöndras av axonen ( $\beta$ -neuregulin) dels av cellen själv, s.k. autocrina ämnen (Mirsky *et al.* 2002). Det ömsesidiga beroendet av varandra för funktion och överlevnad visas även av att axonen behöver signaler från SC, såsom neutropin-3 (NT-3) och andra neurotrofiska tillväxtfaktorer (Hansen *et al.*, 2001). Hos möss (*trembler mouse*) som har ett defekt myelinprotein, PMP22, är perifera axoner ojämnt och sparsamt myelinerade. Hos

dessa möss är de partier av axonerna som saknar SC tunna, har hög neurofilamentdensitet och fosforyleringen av dessa filament är reducerad. Dessutom går den långsamma axonala transporten långsammare än normalt. SC utsöndrar även ett signalprotein, Derset Hedgehog (DHH), vilket är vitalt för bildandet och bibehållandet av perineurium (Jessen and Mirsky, 1999).

Irreversibel inhibering av acetylkolinesteras (AChE) och andra esteraser med organiska fosforföreningar, inducerar tillväxt i ändarna av motorneuronerna. Lokal inhibering av AChE utefter en nerv följs efter några dagar av en demyelinisering av axonavsnittet, proliferation (aktivering) av SC och bildandet av tillväxtzoner på axonen. Gjorda undersökningar av AChE och har inte avslöjat mekanismen bakom dess negativa inverkan på ”knoppning” eller tillväxt av axoner. Emellertid, det är klart att mogna men inte prolifererade SC har en negativ inverkan på tillväxten av axoner (Alvarez et al, 2000).

Det är således klart att för bildandet av en perifer nerv (axon, SC, perineurium och epineurium) och för upprätthållandet av nervens funktion måste cellerna i vävnaden samarbeta. Störs detta samarbete störs nervens funktion vilket kan leda till skador som i västa fall är irreversibla. Indikationer på att AChE och andra esteraser kan utgöra en viktig ledtråd för denna balans finns. Det AChE som i detta fall är av betydelse är det enzym som finns i SC och som interagerar med axonen.

### **3. Orsakssamband bakom fragmentering av cytoskelettet**

För att illustrera komplexiteten i det hittills mest studerade händelseförloppet, OPIDN, så har en forskargrupp under 10-15 år försökt identifiera vilka intracellulära proteiner som påverkas av organofosforföreningar. De mesta av slutsatserna är dragna mot bakgrund av modellsubstanten DFP (diisopropylfosforofluoridate), men liknande effekter har även observerats när sarin använts (Damodaran *et al.* 2002).

Vid OPIDN är ett av de första symptomen som uppstår på cellulär nivå att motorendplattorna på axonen svullnar, och detta följs av att axonen delvis degenererar. Det har fastslagits att påverkan sker på många av de proteiner (cytoskelett-associerade proteiner) som deltar i de strukturer som ger cellen dess form, samt bland annat deltar i funktioner som transport av de strukturella proteinerna själva samt andra biomolekyler utmed axonen. Cellens inre kan ses som ett tjockt gitter av trådar som vid en närmare anblick är cellens motorvägar. Stannar dessa av upphör också cellen att fungera. Vad man observerat är att många av dessa proteiner (exempelvis tubulin, neurofilament och mikrotubuli-associerade proteiner) är mer fosforylerade i en OP-behandlad cell, eller när dessa extraherats från OP-behandlade djur (Abou-donia, 1993). Denna fosforylering leder i sin tur till att proteinerna som måste interagera med varandra för att bilda de nödvändiga cellstrukturerna stöts ifrån varandra, och funktionen störs därmed (Gupta *et al.* 1997; Gupta och Abou-Donia, 1999). De proteiner som bistår med denna post-translationella modifiering benämns kinaser, och i detta fall har två sådana (Ca<sup>2+</sup>/CaM kinas II och protein kinas A) visat förhöjda nivåer i samband med OP-förgiftning och föreslås därför vara inblandade (Gupta och Abou-Donia, 1999; Gupta och Abou-Donia, 2001).

Aktiviteten av dessa kinaser styrs i sin tur via transkriptionsfaktorer, och även där har man identifierat specifika transkriptionsfaktorer som är inblandade; c-jun, c-fos och CREB (Damodaran *et al.* 2002; Damodaran *et al.* 2000; Gupta *et al.* 2000). Dessa samverkar på

## Bilaga 2

ett komplicerat sätt med varandra och med de ovannämnda kinaserna för att i slutändan åstadkomma en ökad fosforyleringsgrad av cytoskelettproteinerna.

Två signalsubstanser har i andra, ej relaterade studier visat sig styra dessa transkriptionsfaktorer;  $Ca^{2+}$  och cykliskt AMP. Dessa två signalsubstanser är, trots denna långa historia, även dom så kallade "secondary messengers", dvs den egentliga målmolekylen befinner sig någon annanstans. Det finns ett samband mellan några av de kandidater (bland annat muskarinlika receptorer) som föreslås interagera med organofosforföreningar och de signalkaskader som involverar cykliskt AMP (Song *et al.* 1997). Det finns även ett samband mellan förhöjda acetylkolinkoncentrationer och intracellulära cAMP-nivåer som bör beaktas. Intressant i sammanhanget är också att man nyligen identifierat ett enzym, acylpeptid hydrolas som är åtskilligt känsligare för vissa OP-föreningar än acetylcholinesteras. Denna klass av enzymer har som funktion att modifiera peptider, men dess exakta funktion i det här sammanhanget är inte klarlagd. Det har föreslagits att enzymet deltar i processning av neurotransmittorer (Richards *et al.* 2000).

Som framgår pågår en hel del arbete som syftar till att utreda de intracellulära förloppen på molekylärnivå, men de faktorer som startar förloppet är fortfarande inte kända. Fortsatta studier bör fokusera på att finna de primära faktorerna.

#### 4. Relevans för FOI NBC-skydd

Det finns anledning till en generell vidgning av begreppet "effekter av kemiska stridsmedel", som bör beaktas vid all forskning som rör kemiska stridsmedel, eller substanser relaterade till dessa. Nedan exemplifieras detta med tre "användningsområden" för OP-föreningar där långtidseffekter enligt vår uppfattning bör utredas; angrepp med kemiska stridsmedel, motmedelsbehandling mot OP-föreningar och utvärdering av similiämnen.

Det är inte osannolikt att det vid ett eventuellt angrepp med kemiska stridsmedel kommer att åtminstone i vissa områden förekomma exponeringsnivåer som ger upphov till de syndrom som beskrivs i denna rapport. I synnerhet icke-statliga operationer (exempelvis terroristangrepp) tenderar att genomföras på ett sådant sätt att mängden skadade tillsammans med individer som inte uppvisar akuta symptom överskrider mängden avlidna. De icke-akuta effekter som senare kan uppstå kan för de iblandade vara både kroniska och plågsamma. Av denna anledning är det väsentligt att utreda vilka kemiska stridsmedel som bör beaktas ur detta perspektiv, och att i möjligaste mån försöka förstå orsakssambanden.

På senare år har studier av det så kallade "Gulf-krigssyndromet" visat att det vid sidan av klassiska kemiska stridsmedel finns anledning att utreda de bieffekter som kan uppstå dels vid motmedelsbehandling och dels vid behandling med bekämpningsmedel mot insekter. Gulf-kriget resulterade i ett stort antal diffusa 'icke-akuta-effekter' vilket utgör ett bra exempel på i vilket sammanhang dessa effekter har relevans. Bland 697000 soldater från USA, England och Canada har registrerats ca 30000 fall med symptom som kronisk trötthet, smärta i muskler och leder, ataxi, utslag, huvudvärk, glömska, irritabilitet och koncentrationssvårigheter. Bland övriga nationaliteter (Saudi, Frankrike, Egypten, Syrien, Marocko) saknades dessa symptom vilket lett till hypotesen att de drabbade soldaterna preparerats på samma olämpliga sätt. En granskning (Abou-Donia *et al.* 1996) visade att den drabbade gruppen preparerats med följande tre kemikalier: pyridostigmin bromid (PB; motmedel mot nervgas), (diteyltoluamid (DEET; insektsrepellent) och klorpyrifos

(KPF; insekticid) vilka i olika kombinationer testades i en experimentell studie på höns med hypotesen att effekten av PB förstärktes av DEET och KPF. Resultaten visade på en additiv eller synergistisk effekt på locomotor funktion, verifierat med histopatologi, vilket också kunde associeras med tre enzymssystem: butyrylkolinesteras i plasma (PBchE), acetylkolinesteras i hjärna (BAChE), 'neurotoxicity target esterase' (NTE) i hjärna (Abou-Donia et al, 1996). Dessa fynd om mekanismen för utveckling av skada, visar på en möjlig förklaringsmodell för effekten och ger även ett visst underlag för en kvalitativ riskanalys för människa, men inte för en kvantitativ riskanalys.

Eventuella skadef effekter hos lämpliga similiämnen för kemiska stridsmedel utvärderas vanligen uteslutande baserat på dess förmåga att inhibera acetylkolinesteras. Det finns onekligen anledning att i detta avseende även ta hänsyn till alternativa skadef effekter orsakade av andra målmolekyler än acetylkolinesteras.

## 5. Förslag till fortsatta studier

1. En cell/vävnadsmodell bör sättas upp, där samspelet mellan nervceller och dess stödceller kan studeras. Denna ska användas för att identifiera tillförlitliga biomarkörer och för att studera orsakssamband. Förändringar i genuttryck och proteinprofil studeras med DNACHIP och proteinchip (SELDI).
2. Det bör vidare utredas vilken eller vilka substanser som bör användas som modellsubstanser i syfte att studera orsakssamband. Valet ska vara baserat på relevans för totalförsvaret och dokumenterade långtidseffekter. En preliminär bedömning är att VX kan vara en lämplig substans att studera i detta sammanhang, men det är möjligt att den behöver kompletteras med en mer etablerad modellsubstans (till exempel diisopropylphosphorofluoridate (DFP)) för att säkerställa identifiering av biomarkörer
3. Relevanta organofosfatföreningar och deras möjliga nedbrytningsprodukter (ur perspektiv aktuellt hot, aktuellt motmedel eller aktuellt similiämne) bör i de fall det inte redan gjorts, utvärderas ur perspektivet icke-akuta effekter med hjälp av identifierade biomarkörer.

## 6. Referenser

Abdel-Rahman, AA., Jansen, KF., Farr, CH., Abou-Donia, MB. 1997 Daily treatment of tiphenylphosphine (TPP) produces organophosphorus induced delayed neurotoxicity (OPIDN). Abstract presented at annual SOT meeting.

Abou-Donia, MB. 1993. The cytoskeleton as a target for organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity (OPIDN). *Chem. Biol. Interact.* 87,383-393

Alvarez, J., Giuditta, A., Koenig, E. 2000. Protein synthesis in axons and terminals: significance for maintenance, plasticity and regulation of phenotype. With a critique of slow transport theory. *Prog. Neurobiol.* 62, 1-62

Bomser, JA., Casida, JE. 2001. Diethylphosphorylation of rat cardiac M2 muscarinic receptor by chlorpyrifos oxon in vitro. *Toxicol. Lett.* 119,21-26

Calore, EE., Cavaliere, MJ., Puga, FR., Calore, NMP., da Rosa, AR., Weg, R., de Souza Dias, S., Paes dos Santos, R. 2000. Histologic peripheral nerve changes in rats induced by deltamethrin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 82-86

Castoldy, AF., Coccini, T., Ceccatelli, S., Manzo, L. 2001, Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res. Bull.* 55(2), 197-203

Cherniack, MG., 1988. Toxicological screening for organophosphorus-induced delayed neurotoxicity: Complications in toxicity testing. *Neuro Toxicology*, 9(2), 249-272

Choudhary, S., Joshi, K., Gill, KD. 2001. Possible role of enhanced microtubule phosphorylation in dichlorvos induced delayed neurotoxicity in rat. *Brain Res.* 897, 60 – 70

Damodaran, TV., Abdel-Rahman, A., Abou-Donia, MB. 2000. Early differential induction of C-jun in the central nervous system of hens treated with diisopropylphosphorofluoridate (DFP), *Nerurochem. Res.*, 25(12),1579-1586

Damodaran, TV., Abdel-Rahman, A., Suliman, HB., Abou-Donia, MB. 2002. Early differential elevation and persistence of phosphorylated cAMP-response element binding protein (p-CREB) in the central nervous system of hens treated with diisopropyl phosphorofluoridate, an OPIDN-causing compound. *Neurochem. Res.*, 27(3),183-193

Damodaran, TV., Mecklai, AA., Abou-Donia, MB. 2002. Sarin causes altered time course of mRNA. Expression of alpha tubulin in the central nervous system of rats *Neruchem. Res.* 27(3),177-181

Ecobochon, D J., Joy, R M., *Pesticides and Neurological Diseases*, 2<sup>nd</sup> edition, CRC press Inc., 1994

Gupta, RP., Abdel-Rahman, A., Wilmarth, KW., Abou-donia, MB. 1997. Alteration in neurofilament axonal transport in the sciatic nerve of the diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-treated hens. *Biochem. Pharm.* 53,1799-1806

Gupta, RP., Abou-donia, MB.1999. Tau phosphorylation by diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-treated hen brain supernatant inhibits its binding with microtubules: Role of Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II in tau phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 365(2), 268-278

Gupta, RP., Damodaran, TV., Abou-donia, MB. 2000. C-fos mRNA induction in the central and peripheral nervous systems of diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-treated hens. *Neurochem. Res.* 25(3),327-334

Gupta, RP., Abou-donia, MB. 2001. Enhanced activity and level of protein kinase A in the spinal cord supernatant of diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-treated hens. Distribution of protein kinases and phosphatases in spinal cord subcellular fractions. *Mol and Cell. Biochem.* 220,15-23

Hansen, MR., Vijapurkar, U., Koland, JG., Green, SH., 2001. Reciprocal signaling between spiral ganglion neurons and Schwann cells involves neuregulin and neurotrophins. *Hearing res.* 161, 87-98

Huff, RA., Corcoran, JJ., Anderson, JK., Abou-Donia MB. 1994. Chlorpyrifos oxon binds directly to muscarinic receptors and inhibits cAMP accumulation in rat striatum *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289(1),329-335



- Jamal, GA. 1997. Neruological syndromes of organophosphorus compounds. Adverse drug react. Toxicol. Rev. 16(3), 133-170
- Jessen, KR., Mirsky, R. 1999. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. Trends Neurosci. 22, 402-410
- Johnson, MK. 1990. Contemporary issues in toxicology: Organophosphates and delayed neuropathy – I NTE alive and well? Toxicol. Appl. Pharmacol. 102, 385-399
- Johnson, MK. 1990. Organophosphates and delayed neuropathy – is NTE alive and well? Toxicol. Appl. Pharmacol. 102, 385-399
- Jortner, BS. 2000. Mechanisms of toxic injury in the peripheral nervous system: Neuropathologic considerations. Toxicol. Pathol. 28(1), 54-69
- Jortner, BS., Shell, L., El-Fawal, H., Ehrich, M. 1989. Myelinated nerve fiber regeneratino following organophosphorus ester-induced delayed neuropathy. NeuroToxicology, 10, 717-276
- Lapadula, DM., Patton, SE., Campebell, GA., Abou-Donia, MB., 1985. Characterization of delayed neurotoxicity in the mouse folowing chronic oral administration of tri-o-cresyl phosphate. Toxicol. Appl. Pharmac. 79, 83-90
- Lehning, EJ., Jortner, BS., Fox, JH., Arezzo, JC., Kitano, T., LoPachin, RM. 2000.  $\gamma$ -Diketon peripheral neuropathy. I. Quantitative morphmetric analysis of axonal atrophy and swelling. Toxicol. Appl. Pharmacol. 165, 127-140
- Lehning, EJ., Persaud, A., Dyer, KR., Jortner, BS., LoPachin, RM. 1998. Biochemical and morphlogic characterization of acrylamide periperal neuropathy. Toxicol. Appl. Pharmacol. 151, 211-221
- Lotti, M. 1992. The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. CRC Crit. Rev. Toxicol 21,465-487
- Lotti, M., Moretto, A., Capodicasa, E., Bertolazzi, M., Peraica, M., Scapellato, ML. 1993. Interactions between neuropathy target esterase and its inhibitors and the development of polyneruropathy Toxicol. Appl. Pharmacol. 122, 165-171
- Maxwell, DM., Brecht, KM. 2001. Carboxylesterase: Specificity and spontaneous reactivation of an endogenous scavenger for organophosphorus compounds. J. Appl. Toxicol. 21,S103-S107
- Mirsky, R., Jessen, KR., Brennan, A., Parkinson, D., Dong, Z., Meier, C., Paramantier, E., Lawson, D. 2002, Schwann cells as regulators of nerve development. J. Physiol. Paris, 96, 17-24
- Ray, DE., Richards, PG. 2001, The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. Toxicol. Lett. 120, 343-451
- Piao, F., Yamauchi, T., Ma, N. 2003. The effect of cacitol as calcium tonic on delayed neurotoxicity induced by organophosphorus compounds. Toxicology Letters, in press, pp 1-7

Bilaga 2

Putzke, J., de Beum, R., Schreiber, R., de Vry, J., Tölle, TR., Zieglänsberger, W., Spanagel, R. 1998. Long-term alcohol self-administration and alcohol withdrawal differentially modulate microtubule-associated protein 2 (MAP2) gene expression in the rat brain. *Molecular Brain Res.* 62, 196-205

Quistad, GB., Casida, JE. 2000. Sensitivity of blood clotting factors and digestive enzymes to inhibition by organophosphorus pesticides. *J. Biochem. Toxicol.* 14(1),51-56

Ray, DE., Richards, PG. 2001. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicol. Lett.* 120,343-351

Richards, PG., Johnson, MK., Ray, DE. 2000. Identification of acylpeptide hydrolase as a sensitive site for reaction with organophosphorus compounds and a potential target for cognitive enhancing drugs *mol. Pharmacol.* 58,577-583

Song, X. Seidler, FK., Saleh, JL., Zhang, J., Padilla, S., Slotkin TA. 1997. Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: Targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145,158-174



FOI är en huvudsakligen uppdragsfinansierad myndighet under Försvarsdepartementet. Kärnverksamheten är forskning, metod- och teknikutveckling till nytta för försvar och säkerhet. Organisationen har cirka 1350 anställda varav ungefär 950 är forskare. Detta gör organisationen till Sveriges största forskningsinstitut. FOI ger kunderna tillgång till ledande expertis inom ett stort antal tillämpningsområden såsom säkerhetspolitiska studier och analyser inom försvar och säkerhet, bedömningen av olika typer av hot, system för ledning och hantering av kriser, skydd mot hantering av farliga ämnen, IT-säkerhet och nya sensorers möjligheter.



FOI  
Totalförsvarets forskningsinstitut  
NBC-skydd  
901 82 Umeå

Tel: 090-10 66 00  
Fax: 090-10 68 00

[www.foi.se](http://www.foi.se)