
Neurotoksikologi

Ole Ladefoged, Grete Østergaard, Henrik Rye Lam, Levnedsmiddelstyrelsen.

Neurotoksikologi er en relativt ny disciplin inden for klassisk toksikologi. Ved Levnedsmiddelstyrelsens Institut for Toksikologi har vi igennem de sidste ti år arbejdet med dette område under den del af Levnedsmiddelstyrelsens arbejde på kemikalieområdet, som udføres for Miljøstyrelsen. Vores indfaldsvinkel har været problemerne i forbindelse med klassifikation og mærkning af kemiske stoffer i EU. Der har været uenighed mellem Danmark og det øvrige EU vedrørende vurderingen af den neurotoksiske effekt af en række organiske opløsningsmidler, idet Danmark har ment, at disse stoffer skulle klassificeres og mærkes med R-sætning 48: *Alvorlig sundhedsfare ved længere tids påvirkning*.

I de senere år er der sket en stor udvikling inden for den neurotoksikologiske metodologi. På Institutet har vi taget en række af disse metoder op og udviklet dem til brug i udforskningen af organiske opløsningsmidlers neurotoksicitet hos rotten. Vi har anvendt immunhistokemiske farvemethoder samt stereologiske og morfometriske målinger på hjernevæv, adfærdstests og omfattende neurokemiske undersøgelser. Effekter af n-hexan og n-hexans metabolit 2,5-hexandion, acetone, isopropanol, toluen og aromatisk og dearomatiseret mineralisk terpentin er blevet undersøgt.

Det blev påvist, at 2,5-hexandion påvirker det perifere nervesystem, og at denne effekt forstærkes ved samtidig dosering med acetone. Ved anvendelse af stereologiske metoder er det dokumenteret, at 2,5-hexandion også har en effekt på centralnervesystemet ved et tab af neuroner på ca. 15 procent. Denne effekt ledsa-

ges af funktionsnedsættelse i form af reduceret indlæringssevne. For isopropanol blev der ikke påvist neurotoksiske effekter ved de i undersøgelsen anvendte metoder.

Toluen forårsager efter længere tids dosering irreversible ændringer i neurotransmitterkoncentrationerne i forskellige hjerneområder. I hippocampus er der endvidere påvist vægtændringer samt en reduktion i neuronantallet. Separate undersøgelser er foretaget for at klarlægge, om eksponering for toluen øger frivillig alkoholindtagelse hos rotter. Undersøgelserne viser, at dette ikke er tilfældet, og at rotter endog nedsætter alkoholindtagelsen, mens eksponeringen for toluen foregår.

Aromatholdig terpentin fremkalder også irreversible ændringer i neurotransmitterkoncentrationerne. Specialundersøgelser af synaptosomfraktionen efter 3 ugers og 6 måneders dosering viste reduceret proteinmængde i denne fraktion ved begge doseringer. Dette betyder muligvis et reduceret antal synapser i hjernen, d.v.s. et reduceret antal neuron-neuron kontaktpunkter. Med aromatholdig terpentin har vi endnu ikke kunnet påvise ændringer ved immunhistokemiske undersøgelser og stereologiske metoder. I samarbejde med Arbejdsmiljøinstituttet er dearomatiseret terpentin ud over ved de før nævnte metoder blevet undersøgt ved elektrofysiologiske metoder. Herved er det fundet, at dearomatiseret terpentin forårsager kroniske skader på hjernens ledningsbaner. To undersøgelser er foretaget i samarbejde med University of California, Irvine, for at belyse virkningsmekanismer for terpentins toksicitet.

Undersøgelserne viste, at en mulig mekanisme for den toksiske effekt kan være dannelse af reaktive oxygenspecies. I samarbejde med det svenske Arbejdsmiljøinstitut har vi foretaget undersøgelser af toksikokinetikken af mineralsk terpentin. I rottens hjerne sker der en opkoncentrering specielt af langkædede alifatiske kulbrinter. Endvidere blev det fundet, at der er visse forskelle i toksikokinetikken af de aromatiske kulbrinter mellem rotte og menneske.

Tilsammen giver disse undersøgelser baggrund for at konkludere, at der kræves specielle forsøgsdesign og teknikker til undersøgelse af neurotoksiske effekter af organiske opløsningsmidler, og at man ved anvendelse af guidelineforsøg, hvori der anvendes standardiseret eksponering og undersøgelsesteknik, ikke kan forvente at være i stand til at påvise markante neurotoksiske effekter af organiske opløsningsmidler hos rotten.

I EU klassifikations- og mærkningssystemet er det netop resultaterne af guidelineforsøg, som der primært lægges vægt på. På trods af at der findes stærk human evidens, har det ikke været muligt at opnå enighed om klassificeringen. En anden årsag til uenigheden er forskelligheder med hensyn til, hvor strengt man fortolker kriterierne for tildeling af R48 *Alvorlig sundhedsfare ved længere tids påvirkning*, som er den eneste relevante risikosætning for kroniske hjerneskader, da der ikke findes en mærkning for neurotoksicitet.

Miljøstyrelsen og Institutet for Toksikologi besluttede derfor at udarbejde et dokument om neurotoksikologi omfattende definition, kriterier og metoder, hvori diskussionen om klassifikation og mærkning tages op i detaljer (Miljøprojekt nr. 282, 1995). Formålet var at belyse, hvorvidt de eksisterende kriterier sikrer et tilstrækkeligt beskyttelsesniveau af befolkningen. Dokumentet konkluderer, at EU-systemet ikke kan tage højde for forbigående effekter på nervesystemet. EU's kriterier for R48 vil ikke være opfyldt for en række kendte neurotoksiske stoffer, hvis disse blot blev underkastet

guidelineforsøg. I dokumentet gives sluttelig et forslag til en ny kategorisering af neurotoksiske stoffer baseret på stoffernes iboende egenskaber.

Udvalg af videnskabelige publikationer fra tiårsperioden

Korbo L, Pakkenberg B, Ladefoged O, Arlien-Søborg P. Evaluation of cerebral atrophy in rats following long-term exposure to toluene by stereological methods. Abstract 1st Meeting of the International Neurotoxicology Association, Holland, May 1987.

Larsen J-J, Ladefoged O, Lam HR. Potentiating effect of acetone on 2,5-hexanedione-induced injuries to nerves and testes. 1st Meeting of the International Neurotoxicology Association, Holland, May 1987.

Møller A, Strange P, Arlien-Søborg P, Ladefoged O, Gundersen HJG. Total number and mean-size of rat cortical neurons in animals exposed to neurotoxic agents. Abstract 2nd Meeting of the International Neurotoxicology Association 1989:64.

Ladefoged O. The influence of the partial inverse benzodiazepine agonist RO15-4513 on toluene induced sleeping time in mice. Abstract 2nd Meeting of the International Neurotoxicology Association 1989:134.

Ladefoged O, Hass U, Simonsen L. Neurophysiological and behavioural effects of combined exposure to 2,5-hexanedione and acetone or ethanol in rats. *Pharmacol Toxicol* 1989;65:372-375.

Korbo L, Pakkenberg B, Ladefoged O, Gundersen HJG, Arlien-Søborg P, Pakkenberg H. An efficient method for estimating the total number of neurons in rat brain cortex. *J Neuroscience Methods* 1990;31:93-100.

Ladefoged O, Kjær V, Larsen J-J. Effect of toluene on ethanol preference in rats. *Pharmacol Toxicol* 1990;67:302-306.

Ladefoged O, Strange P, Møller A, Lam HR, Østergaard G, Larsen J-J, Arlien-Søborg P. Irreversible effects in rats of toluene (inhalation) exposure for six months. *Pharmacol Toxicol* 1991;68:384-390.

Lam HR, Larsen J-J, Ladefoged O, Møller A, Strange P, Arlien-Søborg P. Effect of 2,5-hexanedione alone and in combination with acetone on rat behavior brain swelling reaction and synaptosomal function. *Neurotoxicol Teratol* 1991;13:407-412.

Strange P, Møller A, Ladefoged O, Lam HR, Arlien-Søborg P. Total number and mean cell volume of neocortical neurons in rats exposed to 2,5-hexanedione and 2,5-hexanedione plus acetone. *Neurotoxicol Teratol* 1991;13:401-406.

Lam HR, Ladefoged O, Larsen J-L. Effects of three weeks and six months inhalation exposures to white spirit on rat synaptosomal functions. Third Meeting of The International Neurotoxicology Association Salsomaggiore 1991:129.

Lam HR, Löf A, Ladefoged O. Brain concentrations of white spirit components and neurotransmitters following a three week inhalation exposure of rats. *Pharmacology & Toxicology*. 1992;70:394-396.

Pilegaard K, Ladefoged O. Densitometric measurement of GFAP in dorsal hippocampus of rats dosed in drinking water with 2-propanol for three month. Abstract at 7th Int Symp Quantitative Pathology. Oct 1992.

Østergaard G, Lam HR, Ladefoged O, Arlien-Søborg P. Age related effects in rats of white spirit inhalation exposure for six months. *Pharmacology & Toxicology* 1993;72:34-39.

Korbo L, Andersen BB, Ladefoged O, Møller A. Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Research* 1993;609:262-268.

Pilegaard K, Ladefoged O. Toxic effects in rats of twelve weeks dosing of 2-propanol, and neurotoxicity measured by densitometric measurements of glial fibrillary acidic protein in the dorsal hippocampus. In *Vivo* 1993;7:325-330.

Korbo L, Ladefoged O, Lam HR, Østergaard G, Arlien-Søborg P, West M. Total number of neurons in hippocampus in rats exposed to toluene compared to a control group. Abstract. 4th Meeting of the International Neurotoxicology Association. Elsinore, Denmark, June, 1993.

Pilegaard K, Ladefoged O. Unbiased stereological methods for estimation of the total number of astrocytes and the volume of glial fibrillary acidic protei (GFAP) in the molecular layer of the dentate gyrus of rat. Abstract. 4th Meeting of the International Neurotoxicology Association. Elsinor, Denmark, June, 1993.

Lam HR, Østergaard G, Guo S X, Ladefoged O, Bondy SC. Three weeks' exposure of rats to dearomatized white spirit modifies indices of oxidative stress in brain, kidney, and liver. *Biochemical Pharmacology* 1993;47:651-657.

Ladefoged O, Roswall K, Larsen J-J. Acetone potentiation and influence on the reversibility of 2,5-hexanedione neurotoxicity studied with behavioural and morphometric methods in rats. *Pharmacology & Toxicology* 1994;74: 294-299.

Lund SP, Simonsen L, Hass U, Ladefoged O, Lam HR, Østergaard G. Dearomatized white spirit inhalation exposure causes long-lasting neurophysiological changes i rats. *Neurotoxicol Teratol*, accepted 1995.

Steensgaard A, Østergaard G, Jensen C, Lam HR, Topp S, Ladefoged O, Arlien-Søborg P, Henriksen O. Effect on the content of n-acetylaspartate, total creatine, choline containing compounds, and lactate in the hippocampus of rats exposed to aromatic white spirit for three weeks measured by nmr spectroscopy. In press, 1996. Hvor?

Lam HR, Østergaard G, Ladefoged O. Three weeks' and six months' exposure to aromatic white spirit affect synaptosomal neurochemistry in rats. In press, *Toxicol Lett* 1995.

Bondy SC, Lam HR, Østergaard G, Guo S X, Ladefoged O. Changes in markers of oxidative status in brain, liver and kidney of young and aged rats following exposure to aromatic white spirit. *Arch Toxicol* vol 69, pp 410-414. 1995.

Pilegaard K, Ladefoged O. Number of GFAP-positive astrocytes in three groups of male Wistar rats of different age. Abstract 8th Int Symposium on Diagnostic Quantitative Pathology. Amsterdam, 1994 p.137.

Pilegaard K, Ladefoged O. Total number of astrocytes in the molecular layer of dentate gyrus of rats at different age. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. In press, 1995.

Ladefoged O, Lam HR, Østergaard G, Nielsen E, Arlien-Søborg P. Neurotoxicology. Review of definition, methodology and criteria. Miljøprojekt nr. 282, 1995, 1-110.