



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Helbredseffekter af danske brænderøgspartikler belyst eksperimentelt

Pernille Høgh Danielsen, Peter Møller og Steffen Loft
Institut for Folkesundhedsvidenskab, Københavns Universitet

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSION	7
SAMMENFATNING	7
KONKLUSION	8
SUMMARY AND CONCLUSION	9
SUMMARY	9
CONCLUSION	10
1 INDLEDNING	11
2 PARTIKELOPSAMLING OG KARAKTERISERING	13
3 <i>IN VITRO</i> FORSØG	17
4 <i>IN VITRO</i> RESULTATER OG DISKUSSION	19
5 <i>IN VIVO</i> FORSØG	23
6 <i>IN VIVO</i> RESULTATER OG DISKUSSION	25
7 SAMLET KONKLUSION	27
8 REFERENCER	29
Bilag 1 HELBREDSEFFEKTER AF BRÆNDERØGSPARTIKLER BELYST EKSPERIMENTELT - FORSTUDIE	
Bilag 2 FIGURER TIL KAPITEL 2, <i>IN VITRO</i> FORSØG	
Bilag 3 FIGURER TIL KAPITEL 3, <i>IN VIVO</i> FORSØG	

Forord

Som led i indsatsen over for partikelforureningen fra brændeovne har Miljøstyrelsen igangsat dette projekt hvis formål var at undersøge og karakterisere det toksikologiske potentiale af brænderøgspartikler i relevante kortids eksperimentelle in vitro og in vivo undersøgelser. Formålet har således dels været at afprøve og tilpasse relevante test metoder til vurdering og screening af brænderøgspartikler samt at undersøge de mulige toksikologiske virkningsmekanismer af brænderøgspartiklerne.

Rapporten kan ses som en eksperimentel opfølgning på Miljøprojekt 1235 "Health effects assessment of exposure to particles from wood smoke", hvor omfanget af helbredseffekterne blev vurderet især ud fra de humane data.

Projektet er udført af Institut for Folkesundhedsvidenskab, Københavns Universitet

Projektet har været tilknyttet en følgegruppe bestående af:

Steffen Loft, Institut for Folkesundhedsvidenskab, Københavns Universitet

Keld Alstrup Jensen, Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø

Vibeke Vestergaard Nielsen, Miljøstyrelsen

Poul Bo Larsen (formand), Miljøstyrelsen

København, april 2011

Undersøgelserne og resultaterne samlet i denne rapport og dens bilag er tidligere blevet publiceret som tre artikler i internationale videnskabelige tidsskrifter:

Danielsen, PH et al. (2009). Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell lines, *Mutation Research* 674, 116-122.

Danielsen PH (2010) Oxidative stress, inflammation and DNA damage in rats after intratracheal instillation or oral exposure to ambient air and wood smoke particulate matter, *Toxicological Sciences* 118(2), 574-585. doi:10.1093/toxsci/kfq290-

Danielsen PH (2011). Oxidative Stress, DNA Damage, and Inflammation Induced by Ambient Air and Wood Smoke Particulate Matter in Human A549 and THP-1 Cell Lines. *Chemical Research in Toxicology* 24(2), 168-184. doi: 10.1021/tx100407m

Sammenfatning og konklusion

Sammenfatning

I store dele af verden er afbrænding af træ og anden biomasse en vigtig og betydelig luftforureningskilde. I Danmark er brænderøg en væsentlig kilde til partikulær luftforurening. Danmarks Miljøundersøgelser har tidligere målt partikel niveauet i et beboelsesområde med mange private brændeovne. Disse målinger viste at partikel niveauet var sammenlignelig med niveauet af partikler ved meget trafikerede veje i København. I de fleste epidemiologiske studier har der været fokus på partikler fra trafikken, hvor bidraget fra biomasse/brænderøg i autentiske prøver oftest har været minimalt. Der er derfor begrænset viden om helbredseffekterne kilderne imellem. På det toksikologiske område er der også stadig en begrænset viden om effekterne af brænderøgspartikler. Vi har tidligere fundet at brænderøgspartikler opsamlet fra brændeovnsforsøg i Norge gav mindst samme skade på DNA i celleforsøg, som trafikrelaterede partikler. Formålet med dette forsøg er at undersøge om brænderøgspartikler opsamlet under forskellige betingelser i Danmark forårsager skader på DNA i humane cellelinjer og dyreforsøg. Partiklerne blev opsamlet dels fra røg fra en brændeovn med høj og lav lufttilførsel, dels fra et boligområde i Slagslunde med et højt brændeovnsbrug og dels fra et landområde uden brændeovne. I celleforsøg undersøgte vi dosis-respons sammenhænge for følgende parametre: celletoksicitet målt som laktat dehydrogenase frigivelse, inflammationsrespons og oksidativt stress målt som udtryk af relevante gener, DNA skader målt som strengbrud, formamidopyrimidin DNA glykosylase skader forårsaget af oksidation af guanin, skade på DNA baser ved direkte oksidation eller ved oksidation af lipider målt som etheno-addukter samt bulky DNA addukter forårsaget af binding af store molekyler som polycykliske aromatiske kulbrinter (PAH). I dyreforsøg målte vi de samme markører i rotter efter indgift af en enkelt dosis af de forskellige partikler i lungerne eller via mavetarmkanalen. Fordøjelseskanalen er også en vigtig eksponeringsrute for partiklers systemiske effekter, da partikler dels deponeres i næse og svælg og synkes, og dels synkes efter at blive fjernet fra luftvejene via fimrehår i luftrøret. Endeligt sluges også partikler deponeret på dyrkede fødevarer. Cellekultur forsøgene viser at alle brænderøgspartikler giver oksidativt stress og oksidation af og brud på DNA i dyrkede menneskeceller, som svarer til lungeceller, der er mest udsat for partikler, og i hvide blodlegemer, der er et mål for effekter af partikler i blodcirkulationen, hvor der også var aktivering af inflammation. Derimod var der ikke tegn på lipidmedierede skader eller binding af PAH i celleforsøgene. Dyreforsøget viser at brænderøgspartikler kan inducere DNA skade i form af etheno-addukter medieret af lipidoksidation og øget inflammation i leveren efter eksponering via mavetarmkanalen, hvorimod de ikke gav DNA skader i form af oxideret guanin. Specielt brænderøgspartiklerne opsamlet under forbrænding med lav ilttilførsel gav de fleste effekter og var den eneste partikeltype der gav inflammation og oxidativ stress i lungerne efter eksponering via lungerne.

Konklusion

Vores resultater fra cellekultur studierne indikerer at rene brænderøgspartikler generelt er mere toksiske end baggrundspartikler per masseenhed, mens partikler fra et brændeovnskvarter i Slagslunde giver effekter der kan betegnes som midt imellem effekterne af de rene brænderøgspartikler og baggrundspartiklerne. Dette er i overensstemmelse med at Slagslundepartiklerne netop er en blanding af direkte udledte brændeovns- og regionale baggrundspartikler. Den overordnede konklusion fra dyreforsøget er at specielt eksponering via mavetarmkanalen er vigtig, da vi finder betydeligt flere effekter i leveren efter denne eksponering end i lungerne efter direkte eksponering. Dette er foreneligt med tidligere fund af genotoksiske effekter efter peroral eksponering for dieselpartikler og kulstofbaserede nanopartikler. Det skal dog bemærkes at effekterne af brænderøgspartiklerne var svagere end hvad tidligere er fundet i rotter eksponeret med den samme dosis i mg/kg af dieselpartikler. Der var beskedent respons i lungerne efter eksponering for kun én type af hver af brænderøgs- og Slagslundepartikler i doser der svarer til langvarig eksponering. De samlede resultater fra de udførte *in vivo* undersøgelser har således ikke kunne påvise, at brænderøgspartikler er væsentligt mere toksiske i forhold til partikler generelt og muligvis mindre toksiske end partikler fra trafik mht. effekter på luftveje og hjertekarsystemet. Det er dog for tidligt at drage disse resultater ind i en vurdering af de kroniske effekter og samlet set giver nærværende forsøgsresultater således ikke anledning til justering af den mere overordnede risikovurdering af brændeovns- og trafikpartikler foretaget i Miljøprojekt 1235 (Nielsen et al. 2008).

Summary and conclusion

Summary

In major parts of the world combustion of wood and biomass is an important and considerable source of air pollution. In Denmark, wood smoke is a considerable source of particulate matter in the air. The National Environmental Research Institute, Denmark, has previously measured the level of particles in a residential area with many private wood stoves. These measurements showed that the level of particles was comparable with the level of particles at busy roads in Copenhagen. In most epidemiological studies the focus has been on particles generated from traffic and most often the contribution from biomass/wood has been negligible. Because of this, there is limited knowledge about health effects between particle sources and the toxicology of wood smoke particles. We have previously found that Norwegian wood smoke particles collected from a wood stove experiment resulted in at least similar damage levels in DNA from cell cultures, as did traffic generated particles. The aim of this study was to investigate whether wood smoke particles, collected under different conditions in Denmark, causes DNA damage in human cell lines and in an animal model. The particles were collected from four different sources/scenarios: - directly from wood smoke from a wood stove during high or low oxygen combustion, - from a residential area in Slagslunde with many wood stoves, - and from a rural area without contribution from wood stoves. We investigated the dose-response relationships for the following parameters in cell cultures: cell toxicity measured as lactate dehydrogenase release, inflammatory response and oxidative stress expressed by relevant genes, DNA damage measured as strand breaks and oxidation of guanine, oxidation of lipids measured as etheno-adducts, and bulky DNA adducts formed by binding of molecules such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). In animal experiments we investigated the same end points in rats exposed to a single dose of the collected particles in the lungs or in the gastrointestinal tract. The oral exposure route for the systemic effects of particles is highly important, as particles deposited in nose and throat can be swallowed, in addition to particles cleared from the airways by the mucociliary movements. Furthermore particles deposited on crops and food stuffs can also be swallowed. The cell culture experiments shows that wood smoke particles generates oxidative stress and oxidation of and damage to DNA in cultured human cells, such as lung epithelial cells, which are largely exposed to particles, and to white blood cells, which are target for particle effects in the blood circulation, where also inflammation was activated. In contrast there was no lipid-mediated damage or binding of PAH in the cell culture experiments. The animal experiments shows that wood smoke particles can induce etheno-adducts and increase inflammation in the liver after oral exposure, whereas there was no sign of DNA damage in term of oxidized guanine. Especially the wood smoke particle collected during low oxygen combustion resulted in most effects and was the only type which increased inflammation and oxidative stress in the lungs after pulmonary exposure.

Conclusion

The results from the cell culture studies indicates that pure wood smoke particles in general are more toxic than rural background particles per mass unit, whereas particles from Slagslunde gives effects which can be considered as in between the effects of pure wood smoke particles and the background particles. This is in agreement with the fact that the particles from Slagslunde are a mix of directly emitted wood smoke particles and regional background particles. The major conclusion from the animal experiment is that especially the gastrointestinal exposure is important, as we find considerably more effects in the liver after oral exposure than in the lungs after pulmonary exposure. This is in concurrence with previous findings of genotoxic effects after oral exposure to diesel particles and carbon based nanoparticles. It is noticeable that the effects of wood smoke particles was weaker, than what we have previously shown in rats exposed to a similar dose in mg/kg of diesel particles. There was a modest response in the lungs after exposure to only one type of each of wood smoke and Slagslunde particles in doses equivalent to prolonged exposure. The results from the *in vivo* studies have demonstrated that wood smoke particles are not likely to be significantly more toxic compared to particles in general and possibly less toxic than particles from traffic in terms of effects on respiratory and cardiovascular system. It is however too early to draw these results into an assessment of the chronic effects and overall, gives the present results not reason to an adjustment of the more general risk assessment of wood smoke particles made in the Environmental Project 1235 (Nielsen et al. 2008).

1 Indledning

I store dele af verden er afbrænding af biomasse en betydelig luftforureningskilde. I Danmark er brænderøg en væsentlig kilde til partikulær luftforurening, idet det seneste estimat finder at omkring 67 % af det samlede danske udslip af $PM_{2,5}$, der er partikler med en diameterstørrelse under 2,5 mikrometer, stammer fra forbrænding af træ i private boliger (Nielsen et al. 2009). Danmarks Miljøundersøgelser har tidligere målt partikel niveauet i et beboelsesområde med mange private brændeovne. Disse målinger viste at partikel niveauet var sammenlignelig med niveauet af partikler ved meget trafikerede veje i København (Glasius et al. 2006). I de fleste epidemiologiske studier har der været fokus på partikler fra trafikken og bidraget fra biomasse-/brænderøg har oftest været minimalt. Der er derfor begrænset viden om helbredseffekterne kilderne imellem. På trods af denne begrænsede viden er der tilstrækkelig dokumentation for brænderøgs kræftfremkaldende og mutagene effekter i dyremodeller og på baggrund af dette konkluderede en arbejdsgruppe hos The International Agency for Research on Cancer (IARC) at indendørs udsættelse for biomasseafbrænding (især brænde) sandsynligvis er carcinogent for mennesker (Group 2A) (Straif et al. 2006). Ligeledes har undersøgelser vist at indendørs udsættelse for brænderøg er associeret med KOL (Kronisk Obstruktiv Lungesygdom) og cancer i luftvejene (Ramanakumar et al. 2007; Salvi et al. 2009; Sapkota et al. 2008). Der syntes at være belæg for at brændeovnspartikler kan være ligeså skadelige som andre partikeltyper hvilket er konklusionen af et review af risikoen ved brænderøg, der også inddrager skovbrande, indendørs brug af biomasse i 3. verdenslande og toksikologi (Naeher et al. 2007). Tilsvarende er konkluderet i Miljøprojekt 1235, der også omfatter et review af litteraturen vedrørende brænderøgspartiklernes sundhedsskadelige effekter (Nielsen et al. 2008). Her konkluderes endvidere, at brændeovnene samlet set bidrager med et ekstrabidrag på ca. $0,6 \mu\text{g}/\text{m}^3 PM_{2,5}$ som årligt gennemsnit, og at dette ekstrabidrag årligt kan medføre en øget dødelighed på mindst 200 dødsfald (Nielsen et al. 2008).

Partiklers vigtigste virkningsmekanismer i helbredssammenhæng menes at involvere inflammation og oksidativt stress med resulterende skade på biomolekyler og celler (Knaapen et al. 2004; Risom et al. 2005). Oksidativt stress opstår ved dannelse af reaktive iltforbindelser (eng. reactive oxygen species (ROS)) direkte fra partikler på overfladen eller ved opløselige oksidanter eller sekundært ved at stimulere målceller eller inflammationsceller til at producere ROS. DNA er et af de vigtige målmolekyler for oksidativt stress og oxidativ DNA skade, især oksidation af guanin (FPG skader) og DNA strengbrud (SB) menes at være vigtige for udvikling af cancer og måske også i udvikling af åreforkalkning. Der er meget aktive reparations-mekanismer for disse læsioner, eksempelvis reparerer enzymet OGG1 oksideret guanin i DNA. Der er med tiden fundet stor evidens for sådanne effekter forårsaget af partikler fra forbrændingsprocesser i cellekultur forsøg og i forsøgsdyr eksponeret via luftveje eller oralt, herunder blandt andet opregulering af OGG1 og hæmoxygenase 1 (HO-1) som begge er vigtige for forsvaret mod ROS (Danielsen et al. 2008; Dybdahl et al. 2003; Dybdahl et al. 2004; Müller et al. 2004; Risom et al. 2003). De hidtidige toksikologiske undersøgelser i dyremodeller, af brænderøgspartikler inddrager ikke de nuværende hypoteser om effekt af partikler via inflammation og oksidativt stress mekanismer (Knaapen et al. 2004), hvorimod studier baseret på effekter i cellekulturer har vist øgede niveauer af ROS, DNA SB, oksiderede puriner, lipid peroksidation og frigivelse af cytokiner (Karlsson et al. 2006; Kocbach et al. 2008; Leonard et al. 2000; Leonard et al. 2007). Ydermere har vi i et tidligere studie undersøgt oksidativt stress og genotoksicitet i

lungeepitelceller og monocytter forårsaget af brænderøgspartikler i sammenligning med diesel-, gade- og mineralske partikler opsamlet og karakteriseret i Norge (Danielsen et al. 2009)^{*}. Disse studier peger i retning af at brænderøgspartikler resulterer i effekter mindst svarende til hvad vi kan se for trafikrelaterede partikler.

Denne undersøgelse fokuserer på eksperimentel vurdering af effekter af brænderøgspartikler i form af oksidativt stress og inflammation som er centrale mekanismer for effekter på lunger og hjertekarsystemet og oksidativ stress forårsaget DNA skade, som er særligt relevant for kræftisiko. Forsøgene er udført med cellekulturer fra mennesker, der reflekterer lungeceller og inflammationsceller, involveret i både lunge- og hjertekareffekter og i forsøgsdyr hvor eksponering både via luftveje og mavetarmkanal indgår. Partikler til forsøgene er dels opsamlet fra en brændeovn under forskellige forbrændingsbetingelser og dels fra udeluften i et område med og et uden mange aktive brændeovne.

^{*} Se bilag 1 vedrørende dette forstudie

2 Partikelopsamling og karakterisering

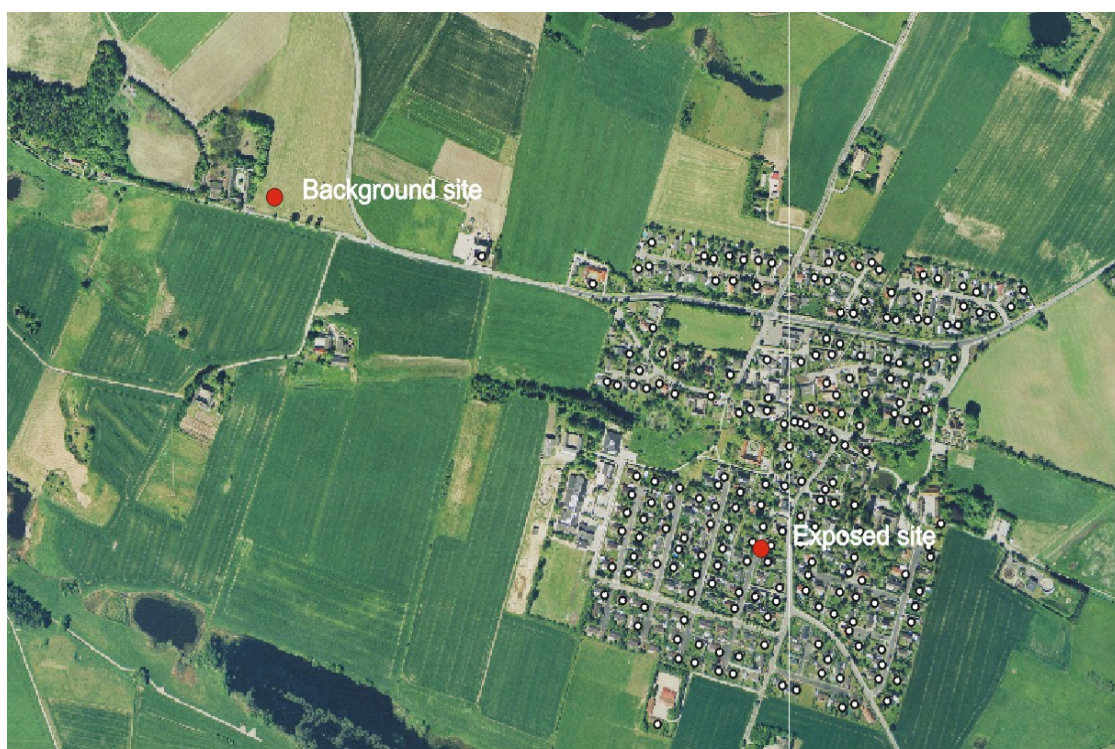
Partikler blev opsamlet om vinteren fra udeluften midt i Slagslunde, der er en by med ca. 350 huse hvoraf de 200 har en brændeovn (AAWS). Som reference materiale blev der samtidigt opsamlet partikler fra luften i et tyndtbeboet område 500 meter vest for byen (AARU), se figur 1. Ydermere blev der opsamlet partikler fra forbrænding af bøg i en brændeovn opstillet i forbindelse med et eksponeringsstudie på Århus Universitet. Forbrændingen foregik under to forhold, enten ved en høj (HOWS) eller en lav ilttilførsel (LOWS). Partiklerne blev opsamlet med en elektrostatiske højvolumen samler, der har den fordel at den kan samle større mængder (mg) af partikler end ved hjælp af traditionelle opsamlingsmetoder (Sharma et al. 2007). Opsamlingen foregik med maksimal effektivitet for partikler med en størrelse på mellem 0,2 og 0,8 mikrometer. Partiklerne fra Slagslunde blev opsamlet fra udeluften i løbet af en kold periode med stille vejr på 14 dage i januar 2007. Den lange opsamlingsperiode kan muligvis have indflydelse på partiklernes kemiske sammensætning som vist ved nedbrydning af benzo(a)pyren (Sharma et al. 2007). De rene brænderøgspartikler blev opsamlet i løbet af 2 timer for LOWS og 4 timer for HOWS.

Partiklerne blev grundigt karakteriseret med hensyn til størrelse, indhold af metaller og organiske forbindelser, se tabel 1. I store træk viste karakteriseringen at partikler opsamlet direkte fra brænderøg (HOWS og LOWS), generelt var mindre i størrelse, indeholdt mere PAH og mindre metal end partiklerne opsamlet fra udeluften. Størrelsesfordelingen af partiklerne blev målt med dynamic light scattering (DLS); en metode hvor partiklernes Brownske bevægelser i en vandig opløsning (cellemedie) kan relateres til deres størrelse. Disse DLS målinger blev også udført på filtreret materiale for at detektere mindre partikler som større partikler i opløsningen eventuelt kunne skygge for. Af metaller udgjorde især jern og zink en væsentlig del af den samlede mængde, over 90% for AAWS, HOWS og LOWS og 72% for AARU, der i modsætning til de andre partikeltyper også indeholdt en større mængde af kobber. Samtidigt blev det verificeret at partiklerne fra Slagslunde rent faktisk indeholdt partikler fra brænderøg. Dette blev gjort ved at undersøge indholdet af levoglucosan, der er et derivat fra cellulose forbrænding. Ydermere målte vi de reaktive iltforbindelser (eng. reactive oxygen species (ROS)) med electron spin resonance (ESR) spektroskopi, hvilket viste at HOWS og AARU producerer hydroxyl radikaler og superoxid anioner i samme grad, når det måles med spin-trapping. Derimod producerer AAWS langt mindre ROS og LOWS nærmest ingenting sammenlignet med kontrollen på $2,54E+06$. ESR viste interessant nok også et ukendt ESR signal i HOWS, hvilket sandsynligvis kan tilskrives et carbon-centreret radikal. Endotoksin niveauerne blev målt med et gel clot *Limulus Amoebocyte Lysate assay* og er angivet i tabellen som den laveste partikel koncentration med positiv effekt.

Tabel 1.

Materiale	AARU	AAWS	HOWS	LOWS
Total mængde opsamlet (mg)	115	129	58	1594
DLS size peaks (nm) i RPMI uden 0,8 µm filtrering	342, 1281, 4800	1281, 4800	164, 955	122, 459
med 0,8 µm filtrering	295	68, 220	≤	≤
DLS size peaks (nm) i F12 uden 0,8 µm filtrering	342	164, 531	122, 342	220, 825
med 0,8 µm filtrering	190	190	68, 295	≤
Levoglucosan (µg/mg)	2,82	43,9	39,9	56,2
Mannosan (µg/mg)	<0,2	5,15	0,28	1,96
PAH (ng/mg)	499	281	3267	1252
Opløselige metaller (ng/mg)	6870	3718	2517	2665
ESR ROS (a.u.)	5,18E+07	1,52E+07	6,13E+07	3,04E+06
Endotoksin	2.5 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	100 µg/ml

≤ Kunne ikke detekteres, AARU: partikler opsamlet 500 m vest for Slagslunde, AAWS: partikler opsamlet midt i Slagslunde, HOWS: brænderøgspartikler opsamlet under forbrænding med høj ilttilførsel, LOWS: partikler opsamlet under lav ilttilførsel, DLS: Dynamic Light Scattering, RPMI: cellemiddel til THP-1 cellelinie, F12: cellemiddel til A549 cellelinie, PAH: polycykliske aromatiske kulbrinter, ESR: electron spin resonance, ROS: reaktive iltforbindelser.



Figur 1. De to partikelopsamlingssteder i henholdsvis Slagslunde by (Exposed site; AAWS) og 500 meter uden for byen (Background site; AARU). Hver hvid prik repræsenterer et hus med brændeovn.

3 *In vitro* forsøg

Vi har i dette studie gennemført *in vitro* forsøg til at belyse toksiciteten af partikler opsamlet i relation til brændeovne i Danmark. Resultaterne fra disse cellekultur forsøg med danske partikler og vil i det følgende blive beskrevet indgående, mens detailfigurer til forsøgene kan ses i bilag 2. Til sammenligning har vi tidligere rapporteret oksidativt stress og genotoksicitet i cellekulturer forårsaget af brænderøgspartikler opsamlet og karakteriseret i Norge. Disse resultater er rapporteret i bilag 1 samt efterfølgende publiceret i Danielsen et *al.* (2009).

Formålet med cellekultur studierne er at sammenligne fri radikaldannelse og oksidativt stress, geno- og cytotoxiciteten samt inflammatorisk potentiale mellem brænderøgspartikler med høj og lav ilttilførsel og partikler fra udeluften i et område med eller uden aktive brændeovne i to forskellige cellelinier; A549 som er en lungeepithel cellelinie og THP-1 som er en monocyt cellelinie.

I *in vitro* forsøgene, se figur 2, blev der målt:

Celle toksicitet ved hjælp af lactate dehydrogenase (LDH)-assay. En stigning i antallet af døde eller membranskadede celler øger LDH aktiviteten i assayet.

DNA SB og FPG skader målt ved hjælp af comet metoden. Især FPG skaderne menes vigtige for udvikling af cancer, da denne type af DNA skader kan give mutationer, hvis de ikke bliver repareret af kroppens egne forsvarsmekanismer.

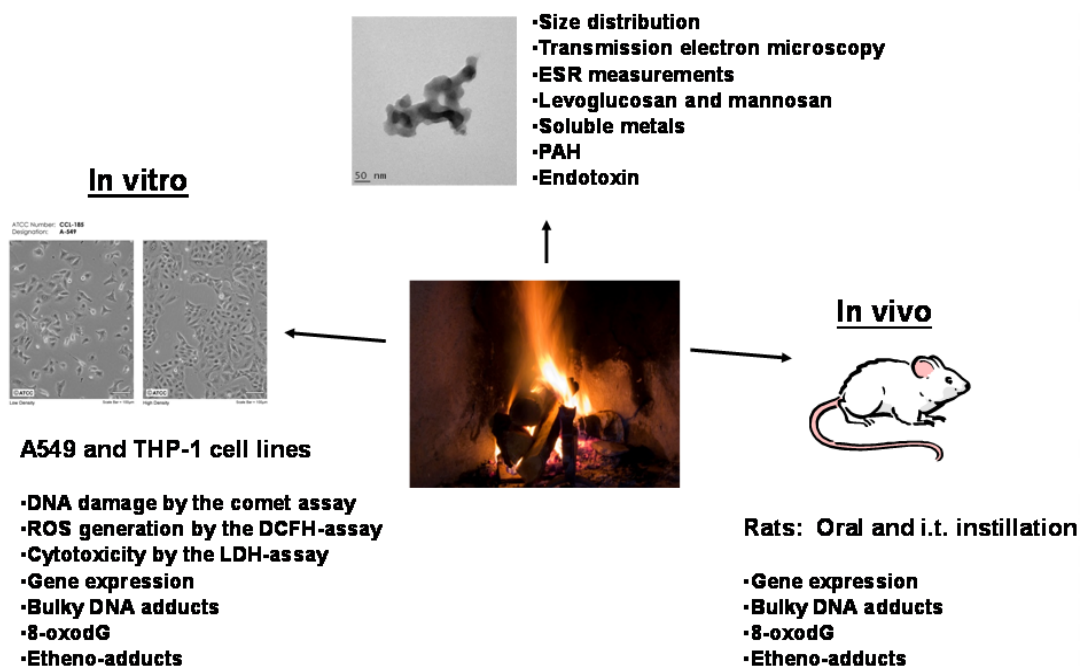
Oksidativ stress målt som ROS med fluorescerende probe (DCFH) og ESR i Maastricht i Holland. ROS kan reagere med biomolekyler, som DNA og lipider, og derved direkte eller indirekte give oksidative skader, såsom de nedenfor nævnte 8-oxodG og etheno-addukter.

Genekspression af inflammatoriske gener, DNA reparationsgenet OGG1 samt oksidativt stress response genet HO-1, målt med RT-PCR. Udover OGG1-enzymet som reparerer 8-oxodG skader i DNA, og HO-1 der spiller en rolle i forsvaret mod ROS, måler vi en række inflammatoriske gener, fordi partikler har vist at kunne aktivere inflammatoriske celler til at danne ROS. Inflammation og oksidativt stress er centrale i lunge- og hjertekareffekter af partikler.

DNA base modifikation i form af oksidation af guanin (8-oxodG) og lipid peroxidations deriverede etheno-addukter på guanin og adenin målt ved HPLC-MS/MS i Grenoble i Frankrig. Disse DNA skader er mutagene, såfremt de ikke repareres og udtrykker således kræftisiko og lipidoksidationsprodukterne også en mulig mekanisme i hjertekarsygdom, hvor LDL skal oksideres for at kunne indgå i udviklingen atheroslerose.

Bulky DNA addukter blev målt med ³²P-post-labelling på Århus Universitet. Især eksponering for kemiske stoffer som PAH menes at kunne resultere i denne type af DNA skader, der kan være carcinogene.

Particle characteristics



Figur 2. Oversigt over de målte end points i partikelmaterialet, i de to forskellige celle linjer og i rotte lever- og lungevæv efter udsættelse for partikler via to forskellige eksponeringsveje.

4 *In vitro* resultater og diskussion

4.1. Celle toksicitet:

Der blev målt under 6 % LDH frigivelse til celle mediet fra celler eksponeret 24 timer med de forskellige partikler, sammenlignet med en maksimal LDH frigivelse på 100%. Data blev analyseret med den non-parametriske Kruskal-Wallis test og en Tukey-type multiple comparison test. Det kan konkluderes at partikel suspensionerne ikke er signifikant toksiske i de anvendte doser på maksimalt 100 µg/ml.

4.2. DNA skader og ROS produktion:

Vi anvender comet metoden til at måle DNA skader i cellerne efter de er eksponeret med partikler. Efter eksponering støbes cellerne ind i agarose, hvorefter de lyses og placeres i et elektroforesekar indeholdende en opløsning med en høj saltkoncentration og detergent. Under den efterfølgende elektroforese vandrer DNA mod anoden, betinget af antallet af strengbrud. Cellerne indstøbt i agarose kan også behandles med specifikke enzymer, som her formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG), der skærer DNA ved oksiderede puriner.

Den intracellulære produktion af ROS måler vi ved hjælp af en fluorescerende probe kaldet DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetat). Cellerne behandles med inaktiv DCFH, der passerer cellemembranen, hvorefter proben bliver hydrolyseret af intracellulære esteraser til en form (DCFH) der kan fluorescere ved reaktion med ROS. Dette kan måles real-time og kontinuert i et fluorometer. Resultaterne her, er dog aflæst efter 3 timer.

Den lavest effektive dosis (lowest effect level), hvor partiklerne giver statistisk signifikant forhøjede niveauer af DNA skade og DCFH ROS produktion er vist i nedenstående tabel 1 for A549 cellerne og tabel 2 for THP-1 cellerne. Cellerne blev eksponeret med partikler i 3 timer med doserne 2,5, 25 og 100 µg/ml for måling af DNA skade og med doserne 1,56; 3,13;6,25; 12,25; 25 og 50 µg/ml for måling af DCFH ROS produktion. Data blev analyseret med nested ANOVA analyse og med post-hoc least significant difference tests. Statistisk signifikante effekter blev accepteret for et 5% niveau. Tabel 2-4 og figur 2 angiver den laveste koncentration, hvor der var signifikante effekter. Da der er mange målemetoder, som udtrykker forskellige dele af respons, kan enkelte forskelle mellem forskellige partikler ikke tages som sikkert udtryk for forskelle i potens. Det samlede billede med inddragelse af alle metoderne og de fulde dosis-responsforløb som er gengivet i bilag 2 er nødvendige for mere sikre konklusioner.

Tabel 2: A549 celler; Laveste dosis ($\mu\text{g/ml}$) med signifikant forhøjet DNA skade og ROS produktion, $P < 0,05$.

Sample	Strengbrud ^a	FPG skader ^a	DCFH ROS ^a
AARU	2,5	IS	50
AAWS	100	25	50
HOWS	25	2,5 ^b	6,25
LOWS	25	IS ^b	6,25

^a Hvis ikke andet anført giver alle doserne, over den i tabellen givne, signifikant forhøjede niveauer i forhold til kontrollen.

^b På grund af mætning af comet assayet, kunne der ikke måles FPG skader ved doser højere end 2,5 $\mu\text{g/ml}$ for HOWS og LOWS.
IS: Ingen signifikante effekter, $P > 0,05$.

Tabel 3: THP-1 celler; Laveste dosis ($\mu\text{g/ml}$) med signifikant forhøjet DNA skade og DCFH ROS produktion, $P < 0,05$.

Sample	Strengbrud ^a	FPG skader ^a	DCFH ROS ^a
AARU	100	100	50
AAWS	25	25	50
HOWS	25	25	IS
LOWS	100	25	50

^a Hvis ikke andet anført giver alle doserne, over den i tabellen givne, signifikant forhøjede niveauer i forhold til kontrollen.

IS: Ingen signifikante effekter, $P > 0,05$.

4.3. Genekspression:

Cellerne blev eksponeret med partikler i 3 timer med doserne 2,5, 25 og 100 $\mu\text{g/ml}$. Resultaterne viste at kun THP-1 cellerne opregulerede deres genekspression efter partikeleksponering. Se tabel 4 for lavest effektive dosis og bilag 2 for dosis-respons forhold. De pro-inflammatoriske gener MCP-1, IL-8 og TNF- og stress-respons genen HO-1 var opreguleret. IL-8 og HO-1 mRNA var signifikant øget af alle partikeltyper, men ved de laveste doser især af AAWS og AARU, dog sådan at det maksimale respons ikke var så højt som for HOWS. MCP-1 og TNF- mRNA blev signifikant øget af AAWS og LOWS ved lave doser på enten 2,5 eller 25 $\mu\text{g/ml}$, men uden tydelige dosis-respons forhold.

Tabel 4: THP-1 celler; Laveste dosis ($\mu\text{g/ml}$) med signifikant forhøjet genekspression, $P < 0,05$.

Sample	MCP-1	TNF-	HO-1 ^a	OGG1	IL-8 ^a
AARU	IS	IS	25	IS	25
AAWS	25 ^b	25 ^b	25	IS	2,5
HOWS	IS	IS	25	IS	100
LOWS	25 ^b	2,5, 25 ^b	100	IS	IS

^aAlle doserne, over den i tabellen givne, giver signifikant forhøjede niveauer i forhold til kontrollen.

^bKun de givne doser giver signifikant forhøjede niveauer i forhold til kontrollen.

IS: Ingen signifikante effekter.

4.4. Baseoksidation:

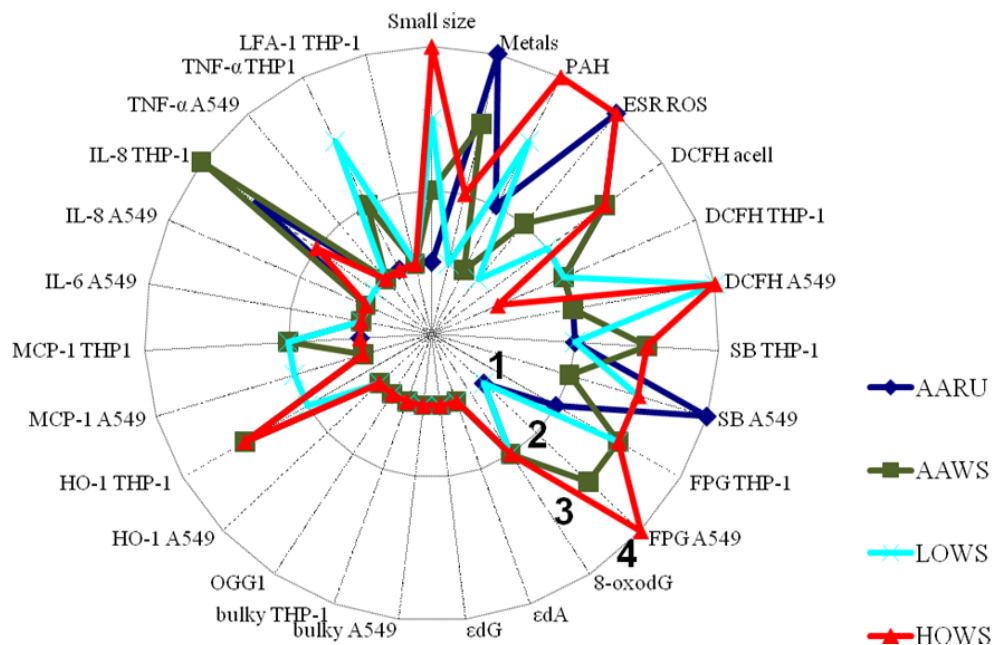
Cellerne blev eksponeret med partikler i 3 timer med doserne 2,5, 25 og 100 $\mu\text{g/ml}$. Der var ingen øgede niveauer af etheno-addukter i cellerne. 8-oxodG var signifikant øget i A549 cellerne hvis effekterne af alle de forskellige partikler ved 100 $\mu\text{g/ml}$ blev samlet i den statistiske model.

4.5. Bulky DNA addukter:

Cellerne blev eksponeret med partikler i 24 timer med doserne 2,5, 25 og 100 $\mu\text{g/ml}$. Der var ingen øgede niveauer af bulky DNA addukter i cellerne.

4.6. Samlede *in vitro* resultater:

Resultaterne fra disse forsøg er sammen med karakteriseringsresultaterne samlet i den nedenstående figur. Detailfigurer, der viser testdata er angivet i bilag 2. For karakteriseringsresultaterne (small size, metals, PAH, ESR ROS) er effekterne mellem partiklerne angivet en værdi mellem 1 og 4. For alle andre markører er "ingen forskel fra kontrollen" angivet med 1, 2-4 betyder signifikant forskel fra kontrollen ved en høj, medium og lav eksponeringsdosis. Dvs. jo mere yderligt i cirklen ligger jo mindre koncentration skal der til et signifikant respons. Samlet set dækker HOWS og LOWS det største areal især i retning af DNA skade og oxidativt stress. Respons i retning af inflammation, især med IL-8 produktion fra AARU og AAWS kunne være delvist knyttet til at de som udendørspartikler uvægerligt har et vist indhold af endotoksin.



Figur 3. Radarplot over de samlede resultater in vitro.

4.7. Diskussion:

Vi fandt en rimelig sammenhæng mellem partikelmaterialernes evne til at producere ROS, oxidative DNA skader og øge genekspressionen af oxidativt stress og til dels inflammationsmarkører i cellekulturerne. Derimod fandt vi ingen øgede niveauer af etheno- og bulky DNA addukter.

Vi fandt at partiklerne fra Slagslunde, indeholdende et væsentligt bidrag fra brænderøg, dannede mere dosis-afhængigt ROS og DNA skade end baggrundspartiklerne opsamlet fra et område uden brændeovne. Vores resultater indikerer at rene brænderøgspartikler (HOWS og LOWS) er mere toksiske end baggrundspartikler per masseenhed, specielt relateret til oxidativ stress-associeret skade, mens partikler fra Slagslunde giver effekter der kan betegnes som midt imellem effekterne af de rene brænderøgspartikler og baggrundspartiklerne. Dette er i overensstemmelse med at Slagslundepartiklerne netop er en blanding af direkte udledte brændeovns-partikler og regionale baggrundspartikler. Udendørs-partiklerne har til gengæld muligvis mere inflammatorisk potentiale som følge af indhold af endotoksin. I relation til vores tidligere undersøgelser af brænderøgspartikler indsamlet fra en skorsten på en norsk brændeovn var effekterne på DNA skade tilsvarende til de her indsamlede brænderøgspartikler (bilag 1).

5 *In vivo* forsøg

Tidligere forsøg har vist at rotter der har fået en enkelt oral dosis af dieselpartikler (SRM2975) havde forhøjet DNA skades niveau i colon (tyktarm), lever og lunger, og induktion af gener der er involveret i reparation af DNA skader (Danielsen et al. 2008). Det samme er vist i lunge- og levervæv fra rotter, der har fået en enkelt oral dosis af single walled carbon nanotubes og rene fullerener som C₆₀ partikler (Folkmann et al. 2009). Ved eksponering via luftveje ved inhalation eller instillation med dieselpartikler er der også fundet DNA skade, men doserne har typisk været højere end det som fremkalder organskader ved peroral eksponering (Møller et al. 2010; Risom et al. 2005). I dette forsøg undersøges om en enkelt dosis af udeluftspartikler med højt (AAWS) eller lavt brænderøgsbidrag (AARU) fra Slagslunde og uden for Slagslunde, rene brænderøgspartikler med høj (HOWS) eller lav lufttilførsel (LOWS) og carbon black (CB) som benchmark forårsager samme effekter, som der er observeret for de andre partikeltyper. De fire partikeltyper er de samme som er undersøgt *in vitro*. Tillige hermed sammenligner vi for første gang effekterne ved en enkelt dosis givet peroralt og via luftvejene som intratracheal instillation. Den perorale rute må antages at særdeles vigtig for brænderøg hvor kilderne typisk er spredt og tæt på afgrøder. Brænderøgspartikler må således i vidt omfang deponeres på afgrøderne, hvorved mennesker kan eksponeres peroralt, men hidtil er dette ikke indgået i risikovurdering af partikelemissioner. Det er således for nyligt anført i en amerikansk risikovurderingsmodel at den perorale indirekte eksponering via afgrøder har større betydning for kræfttrisikoen (toksiciteten) af en lang række partikelbundne persistente stoffer end direkte inhalation, især når kilden er tæt på og selv når der tages hensyn til stærkere dosis-respons ved inhalation end ved peroral eksponering (Pratt et al. 2009).

6 *In vivo* resultater og diskussion

Rotter eksponeres enten i mavetarmkanalen ved oral sonde (gavage) (n=60) eller i lungerne (pulmonært) ved dosering i luftrøret (intratrachealt instillation, i.t.) (n=60) med en dosis på 0,64 mg/kg i 24 timer, hvorefter følgende parametre, der også er undersøgt i *in vitro* studiet, blev målt på lever- og lungevæv:

DNA base modifikation i form af oksidation af guanin (8-oxodG) og lipid peroxidations deriverede etheno-addukter på guanin og adenin målt ved HPLC-MS/MS i Grenoble i Frankrig. Disse DNA-skader er mutagene, såfremt de ikke repareres og udtrykker således kræftisiko og lipidoksidationsprodukterne også en mulig mekanisme i hjertekarsygdom, hvor LDL skal oksideres for at kunne indgå i udviklingen af atheroslerose

Genekspression af de inflammatoriske gener *MCP-1* og *MIP-2*, DNA reparationsgenet OGG1 samt oksidativt stress response genet HO-1, målt med RT-PCR. Udover OGG1-enzymet som reparerer 8-oxodG skaden i DNA, og HO-1 der spiller en rolle i forsvaret mod ROS, måler vi en række inflammatoriske gener, fordi partikler har vist at kunne aktivere inflammatoriske celler til at danne ROS. Inflammation og oksidativt stress er centrale i lunge og hjertekareffekter af partikler.

Bulky DNA addukter blev målt med ³²P-post-labelling på Århus Universitet. Især eksponering for kemiske stoffer som PAH menes at kunne resulterer i denne type af DNA skader, der kan være carcinogene.

6.1. Resultater:

Resultaterne er samlet i den nedenstående tabel der viser de signifikante effekter i form af forøget niveau. Data blev analyseret med en tre-faktor ANOVA med post-hoc Fisher least statistical difference test, P<0,05. Det samlede datasæt er publiceret i (Danielsen et al. 2010), mens detailfigurer fra forsøgene er samlet i bilag 3.

	Lever i.t.	Lever oral	Lunge i.t.	Lunge oral
AARU		<i>MCP-1</i>		
AAWS		dG		<i>MIP-2</i>
HOWS		<i>MCP-1</i>		
LOWS		dG, <i>MCP-1</i> , <i>HO-1</i> , <i>OGG1</i>	<i>MIP-2</i> , <i>MCP-1</i> , <i>HO-1</i>	
CB		8-oxodG, dG, dA, <i>MCP-1</i>		

6.2. Diskussion

Med hensyn til inflammation fandt vi, at især den orale eksponeringsrute resulterede i øget genekspression af det pro-inflammatoriske cytokin MCP-1 i leveren. MCP-1 var ligeledes med MIP-2 også opreguleret i lungerne ved i.t. instillation, men kun efter eksponering med brænderøgspartikler fra forbrænding med et lavt ilt-niveau. Vi har ikke i de tidligere studier med oral eksponering undersøgt ændringer i inflammationsmarkører. Vi fandt oxidative DNA skader i form af 8-oxodG i leveren efter oral eksponering, men kun efter CB eksponering, hvorimod niveauet af etheno-addukter også var øget med PM opsamlet i Slagslunde og med brænderøgspartikler fra forbrænding med lavt ilt-niveau. Disse etheno-addukter er ligesom 8-oxodG pro-carcinogene, da de kan danne mutationer i tilfælde af at de ikke bliver repareret af cellernes forsvarssystemer.

Et af disse forsvarssystemer er DNA reparationsproteinet OGG1, der fjerner 8-oxodG fra DNAet. I dette studie er det kun brænderøgspartikler fra forbrænding med lavt ilt niveau, der er i stand til at øge **OGG1** mRNA ekspressionen i leveren efter den orale eksponering. Ligeledes er også **HO-1**, der er involveret i cellernes antioksidante forsvar, øget både i leveren efter oral eksponering og i lungerne efter instillation. Disse forsvarseffekter har vi tidligere set både i lever og lunger i rotter oralt eksponeret med dieselpartikler og C₆₀ nanopartikler (Danielsen et al. 2008; Folkmann et al. 2009). I modsætning til disse tidligere studier, fandt vi i dette studie ikke 8-oxodG i lungerne og kun CB gav 8-oxodG i leveren.

Etheno-addukter er ikke tidligere undersøgt i forbindelse med eksponering for partikler; men de er potentielt meget interessante, idet de menes at blive dannet ved lipidperoxidation og hidtil er beskrevet ved kroniske inflammationstilstande både hos mennesker og i dyremodeller, hvor de menes at være væsentlige for kræftudvikling knyttet til inflammationen. En vigtig mekanisme for partiklers virkninger er netop inflammation. Den overordnede konklusion fra dette studie er at den gastrointestinale eksponering af partikler fjernet fra luftvejene via de mucociliære bevægelser og slugt (eller partikler på dyrkede fødevarer) er vigtig, da vi finder betydeligt flere effekter i leveren efter oral eksponering end i lungerne efter pulmonær eksponering. Dette er helt foreneligt med tidligere fund af genotoksiske effekter efter peroral eksponering for dieselpartikler og tekniske kulstofbaserede nanopartikler. Det skal dog bemærkes at effekterne af brænderøgspartiklerne i form af DNA skade i leveren 24 timer efter en enkelt dosis var svagere end efter den samme dosis i mg/kg af dieselpartikler. Der var beskedent respons i lungerne efter eksponering for kun én type af hver af brænderøgs- og Slagslundepartikler i doser der svarer til langvarig eksponering. Baseret på sammenligning med de tidligere studier med dieselpartikler og C₆₀ nanopartikler tyder de samlede resultater således ikke på, at brænderøgspartikler er mere toksiske i forhold til andre partikler og muligvis mindre toksiske end partikler fra trafik mht. effekter på luftveje og hjertekarsystemet. Der er et klart forbehold i at dette dyreforsøg kun omfatter en enkelt dosering på de udvalgte effektmarkører og langvarig eksponering kan således meget vel have andre effekter.

7 Samlet konklusion

In vitro undersøgelser af såvel partikler opsamlet fra både en norsk og en dansk brændeovn, herunder med varierende lufttilførsel, som partikler opsamlet i udeluft med nær maksimal brændeovnspåvirkning er toksiske med effekter i form af oksidativt stress, inflammation og DNA skade. Brændeovnspartiklerne er her mindst lige så toksiske som forskellige trafikgenererede partikler og højt indhold af organiske forbindelser er vigtigt i den sammenhæng. Tilsvarende effekter kan ses ved ***in vivo*** eksponering, især peroralt, i rotter, men her synes dieselpartikler at være mere potente per massenhed end brændeovnspartikler med hensyn til DNA skade og oksidativt stress. Samlet er der kvalitativt set overensstemmelse mellem ***in vitro*** og ***in vivo*** forsøg mht. at brændeovnspartikler ligesom andre partikler kan forårsage oksidativt stress, DNA skade og inflammation; men kvantitativt set er der mindre forskelle mellem ***in vivo*** og ***in vitro*** i rækkefølgen af henholdsvis dosis-respons og koncentrations-effekt sammenhænge mellem de forskellige partikler. I risikovurdering vil man i den forbindelse lægge mest vægt på dosis-responsammenhænge undersøgt ***in vivo***.

De hidtil mindre erkendte effekter af peroral eksponering for partikler, som også kan foregå via forurenede afgrøder bør i fremtiden tænkes ind i farevurdering af brændeovnspartikler, da der må formodes at være betydelig eksponering via nærhed mellem emissioner og afgrøder. Der mangler dog langtidseksponeringsforsøg med partikler med fx tumorer som udfald eller befolkningsundersøgelser for at kunne estimere risiko udover de enkelte indholdsstoffer i partiklerne. Der var beskedent respons i lungerne efter eksponering med kun én type af hver af brænderøgs- og Slagslundepartiklerne i doser der svarer til langvarig eksponering. De samlede resultater tyder således ikke på, at brænderøgspartikler er mere toksiske i forhold til andre partikler med hensyn til effekter på luftveje og hjertekarsystemet, i forhold til de brugte effekt markører. Der er et klart forbehold i at, dette dyreforsøg kun omfatter en enkelt dosering af partikler med observation efter 24 timer og en enkelt 3-24 timers eksponering i cellekulturforsøgene, ligesom ikke alle mekanismer, især langvarige er belyst. Langvarig og kronisk eksponering kan således have effekter, som ikke kan afsløres med de indgående metoder.

De samlede resultater fra de udførte ***in vivo*** undersøgelser har således ikke kunne påvise, at brænderøgspartikler er (væsentligt) mere toksiske i forhold til partikler generelt, men måske mindre toksiske end partikler fra trafik mht. effekter på luftveje og hjertekarsystemet. Det er dog for tidligt at drage disse resultater ind i en vurdering af de kroniske effekter og samlet set giver nærværende forsøgsresultater således ikke anledning til justering af den mere overordnede risikovurdering af brændeovnspartikler foretaget i Miljøprojekt 1235 (Nielsen et al. 2008).

8 Referencer

- Danielsen, P. H., Loft, S., Jacobsen, N. R., Jensen, K. A., Autrup, H., Ravanat, J. L., Wallin, H., and Møller, P. Oxidative stress, inflammation and DNA damage in rats after intratracheal instillation or oral exposure to ambient air and wood smoke particulate matter, *Toxicol.Sci.* 2010) doi:10.1093/toxsci/kfq290-
- Danielsen, P. H., Loft, S., Kocbach, A., Schwarze, P. E., and Møller, P. Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell lines, *Mutat.Res.* 674 (2009) 116-122.
- Danielsen, P. H., Risom, L., Wallin, H., Autrup, H., Vogel, U., Loft, S., and Møller, P. DNA damage in rats after a single oral exposure to diesel exhaust particles, *Mutat.Res.* 637 (2008) 49-55.
- Dybdahl, M., Risom, L., Bornholdt, J., Autrup, H., Loft, S., and Wallin, H. Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo, *Mutat.Res.* 562 (2004) 119-131.
- Dybdahl, M., Risom, L., Møller, P., Autrup, H., Wallin, H., Vogel, U., Bornholdt, J., Daneshvar, B., Dragsted, L. O., Weimann, A., Poulsen, H. E., and Loft, S. DNA adduct formation and oxidative stress in colon and liver of Big Blue rats after dietary exposure to diesel particles, *Carcinogenesis* 24 (2003) 1759-1766.
- Folkmann, J. K., Risom, L., Jacobsen, N. R., Wallin, H., Loft, S., and Møller, P. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes, *Environ.Health Perspect.* 117 (2009) 703-708.
- Glasius, M., Ketzler, M., Wählin, P., Jensen, B., Mønster, J, Berkowicz, R., and Palmgren, F. Impact of wood combustion on particle levels in a residential area in Denmark, *Atmospheric Environment* 40 (2006) 7115-7124.
- Karlsson, H. L., Ljungman, A. G., Lindbom, J., and Möller, L. Comparison of genotoxic and inflammatory effects of particles generated by wood combustion, a road simulator and collected from street and subway, *Toxicol.Lett.* 165 (2006) 203-211.
- Knaapen, A. M., Borm, P. J., Albrecht, C., and Schins, R. P. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms, *Int.J.Cancer* 109 (2004) 799-809.
- Kocbach, A., Namork, E., and Schwarze, P. E. Pro-inflammatory potential of wood smoke and traffic-derived particles in a monocytic cell line, *Toxicology* 247 (2008) 123-132.
- Leonard, S. S., Castranova, V., Chen, B. T., Schwegler-Berry, D., Hoover, M., Piacitelli, C., and Gaughan, D. M. Particle size-dependent radical generation from wildland fire smoke, *Toxicology* 236 (2007) 103-113.
- Leonard, S. S., Wang, S., Shi, X., Jordan, B. S., Castranova, V., and Dubick, M. A. Wood smoke particles generate free radicals and cause lipid peroxidation, DNA damage, NFkappaB activation and TNF-alpha release in macrophages, *Toxicology* 150 (2000) 147-157.
- Møller, P., Jacobsen, N. R., Folkmann, J. K., Danielsen, P. H., Mikkelsen, L., Hemmingsen, J. G., Vesterdal, L. K., Forchhammer, L., Wallin, H., and Loft, S. Role of oxidative damage in toxicity of particulates, *Free Radic.Res.* 44 (2010) 1-46.

- Müller, A. K., Farombi, E. O., Møller, P., Autrup, H. N., Vogel, U., Wallin, H., Dragsted, L. O., Loft, S., and Binderup, M. L. DNA damage in lung after oral exposure to diesel exhaust particles in Big Blue rats, *Mutat.Res.* 550 (2004) 123-132.
- Naeher, L. P., Brauer, M., Lipsett, M., Zelikoff, J. T., Simpson, C. D., Koenig, J. Q., and Smith, K. R. Woodsmoke health effects: a review, *Inhal.Toxicol.* 19 (2007) 67-106.
- Nielsen, E., Dybdahl, M., and Larsen, P. B. Health effects assessment of exposure to particles from wood smoke, Environmental Project No. 1235, <http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2008/978-87-7052-769-9/pdf/978-87-7052-770-5.pdf>, 2008)
- Nielsen, M, Nielsen, O.-K., Plejdrup, M., and Hjelgaard, K Danish Emission Inventories for Stationary Combustion Plants. Inventories until year 2007. National Environmental Research Institute, Aarhus University, Denmark. 216 pp. - NERI Technical Report no. 744. <http://www.dmu.dk/Pub/FR744.pdf>, 2009)
- Pratt, G. C. and Dymond, M. Multipathway screening factors for assessing risks from ingestion exposures to air pollutants, *J.Air Waste Manag.Assoc.* 59 (2009) 419-429.
- Ramanakumar, A. V., Parent, M. E., and Siemiatycki, J. Risk of lung cancer from residential heating and cooking fuels in Montreal, Canada, *Am.J.Epidemiol.* 165 (2007) 634-642.
- Risom, L., Dybdahl, M., Bornholdt, J., Vogel, U., Wallin, H., Møller, P., and Loft, S. Oxidative DNA damage and defence gene expression in the mouse lung after short-term exposure to diesel exhaust particles by inhalation, *Carcinogenesis* 24 (2003) 1847-1852.
- Risom, L., Møller, P., and Loft, S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution, *Mutat.Res.* 592 (2005) 119-137.
- Salvi, S. S. and Barnes, P. J. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers, *Lancet* 374 (2009) 733-743.
- Sapkota, A., Gajalakshmi, V., Jetly, D. H., Roychowdhury, S., Dikshit, R. P., Brennan, P., Hashibe, M., and Boffetta, P. Indoor air pollution from solid fuels and risk of hypopharyngeal/laryngeal and lung cancers: a multicentric case-control study from India, *Int.J.Epidemiol.* 37 (2008) 321-328.
- Sharma, A. K., Wallin, H., and Jensen, K. A. High volume electrostatic field-sampler for collection of fine particle bulk samples, *Atmospheric Environment* 41 (2007) 369-381.
- Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El, Ghissassi F., and Cogliano, V. Carcinogenicity of household solid fuel combustion and of high-temperature frying, *Lancet Oncol.* 7 (2006) 977-978.

Bilag 1

Helbredseffekter af brænderøgspartikler belyst eksperimentelt - forstudie -

Pernille Høgh Danielsen, Peter Møller og Steffen Loft
Institut for Folkesundhedsvidenskab, Københavns Universitet

Indhold

SAMMENFATNING OG KONKLUSION	3
SUMMARY AND CONCLUSION	4
1 INDLEDNING	5
1.1. Baggrund	5
1.2. Partikelegenskaber.....	5
1.3. Epidemiologisk viden om partikler	5
1.4. Toksikologisk viden om partikler.....	6
1.5. Partikel eksponering og biomarkører hos mennesker.....	7
2 FORMÅLET MED DENNE UNDERSØGELSE	8
3 ANALYSEMETODER	8
3.1. Partikelmateriale.....	8
3.2. Karakterisering af opsamlede partikler.....	8
3.3. Cellekulturer	9
3.4. DNA skader	9
3.5. Celle toksicitet.....	11
3.6. Statistisk analyse	11
4 RESULTATER OG DISKUSSION	11
5 KONKLUSION.....	13
6 REFERENCER.....	14

Sammenfatning og konklusion

I store dele af verden er afbrænding af biomasse en vigtig og betydelig luftforureningskilde. I Danmark er brænderøg en væsentlig kilde til partikulær luftforurening. Danmarks Miljøundersøgelser har tidligere målt partikel niveauet i et beboelsesområde med mange private brændeovne. Disse målinger viste at partikel niveauet var sammenlignelig med niveauet af partikler ved meget trafikerede veje i København. I de fleste epidemiologiske studier har der været fokus på partikler fra trafikken og bidraget fra biomasse/brænderøg har oftest været minimalt. Der er derfor begrænset viden om helbredseffekterne kilderne imellem.

På det toksikologiske område er der begrænset viden om brænderøgspartikler og formålet med dette forsøg er at undersøge om brænderøgspartikler forårsager skader på DNA (arvematerialet) i humane cellelinier, og hvordan niveauet af disse potentielle DNA skader er sammenholdt med andre typer af partikler, deriblandt trafikgenererede partikler. Vi undersøger dosis-respons sammenhænge for følgende parametre: celle toksicitet, målt som laktat dehydrogenase (LDH) frigivelse, DNA skader målt som streng brud (SB) og formamidopyrimidin DNA glykosylase (FPG) skader.

Forsøget viser at brænderøgspartikler giver DNA skader både i form af SB og FPG skader i dyrkede menneskeceller, som svarer til lungeceller, der er mest udsat for partikler, og til hvide blodlegemer, der er et mål for effekter af partikler i blodcirkulationen. Til sammenligning med de andre partikler anvendt i dette forsøg ser det ud som om brænderøgspartikler giver et betydeligt større respons i form af FPG skader. Sammenligningen med trafikgenererede partikler i dette biologiske system er vigtig, da vi har vist at denne type DNA skader er sensitive mål for systemiske effekter af partikler fra trafikskilder hos mennesker.

Konklusion

Sammenfattende kan det konkluderes, at hvis brænderøgspartikler deponeres i og optages fra lungerne på samme måde som trafikgenererede partikler, kan vi ud fra vores resultater forvente mindst samme helbredseffekter. Denne viden om brænderøgspartiklers toksiske virkninger i forhold til trafikgenererede partikler er således vigtig, da der er behov for at ekstrapolere epidemiologiske data som grundlag for en mulig regulering.

Summary and conclusion

Summary

In major parts of the world combustion of biomass is an important and considerable source of air pollution. In Denmark, wood smoke is a considerable source of particulate matter in the air. The National Environmental Research Institute, Denmark, has previously measured the level of particles in a residential area with many private wood stoves. These measurements showed that the level of particles was comparable with the level of particles at busy roads in Copenhagen. In most epidemiological studies the focus has been on particles generated from traffic and most often the contribution from biomass/wood has been negligible. Because of this, there is limited knowledge about health effects between particle sources. In the toxicological area there is limited knowledge about wood smoke particles and the aim of this study is to investigate whether wood smoke particles causes DNA damage in human cell lines and how the level of these potential DNA damages are compared to other types of particles, including traffic-generated particles. We investigate the dose-response relationships for the following parameters: cell toxicity, measured as lactate dehydrogenase (LDH) release and DNA damage, measured as strand breaks (SB) and formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) sites.

The results shows that wood smoke particles generate DNA damage in terms of both SB and FPG sites in human cell lines, such as lung epithelial cells, which are largely exposed to particles and to white blood cells, which are the target for particle effects in the blood circulation. Compared to the other types of particles in this investigation, it seems that the wood smoke particles generate a greater response in terms of FPG sites. The comparison with traffic-generated particles in this biological system is important, as we have shown that this type of DNA damage is a sensitive marker for systemic effects in humans when exposed to particles from traffic sources.

Conclusion

We conclude, that if wood smoke particles are deposited in and translocate from the lungs in the same manner as traffic-generated particles, then we would expect, according to our results, health effects at least to the same extent. This knowledge about the toxicological effects of wood smoke particles compared to traffic-generated particles is thus important, while there is a need to extrapolate epidemiological data as foundation for a possible regulation.

1 Indledning

1.1. Baggrund

I store dele af verden er afbrænding af biomasse en betydelig luftforureningskilde. I Danmark er brænderøg en væsentlig kilde til partikulær luftforurening, idet det seneste estimat finder at omkring 44 % af det samlede danske udslip af partikler stammer fra forbrænding af træ i private boliger (Illerup et al. 2004). Danmarks Miljøundersøgelser har tidligere målt partikel niveauet i et beboelsesområde med mange private brændeovne. Disse målinger viste at partikel niveauet var sammenlignelig med niveauet af partikler ved meget trafikerede veje i København (Glasius et al. 2004). I de fleste epidemiologiske studier har der været fokus på partikler fra trafikken og bidraget fra biomasse/brænderøg har oftest været minimalt. Der er derfor begrænset viden om helbredseffekterne kilderne imellem. På trods af denne begrænsede viden er der tilstrækkelig dokumentation for brænderøgs kræftfremkaldende og mutagene effekter i dyremodeller og på baggrund af dette konkluderede en arbejdsgruppe hos The International Agency for Research on Cancer (IARC) at indendørs udsættelse for biomasseafbrænding (især brænde) sandsynligvis er carcinogent for mennesker (Group 2A) (Straif et al. 2006).

1.2. Partikelegenskaber

Partikler inddeles i tre grupper efter deres størrelse i diameter: grove, fine og ultrafine. De grove har en størrelse på mellem 10 og 2,5 mikrometer (PM_{10}), de fine er under 2,5 mikrometer ($PM_{2,5}$) og de ultrafine er mindre end 0,1 mikrometer. De ultrafine partikler er fortrinsvis forbrændingspartikler fra trafik (i byområder) og afbrænding af træ i brændeovne (beboelsesområder med lav bebyggelse). De fine er lang-transporterede og kondenserede partikler, og de grove stammer primært fra bremse- og dækslid, vind ophvirvlet vej- og jordstøv og andre naturlige kilder. Partiklernes sammensætning er meget kompleks og afhænger af kilderne. Således er partikler genereret i trafik fra motorer og bremseslid ofte meget metalholdige, mens partikler i brænderøg har lavet metalindhold, men højt indhold af PAH (polyaromatiske kulbrinter). Således havde standard dieselpartikler (DEP; SRM2975) et indhold af PAH på 67 ng/mg mens brænderøg havde 9745 ng/mg PAH (Kobach et al. 2006). Ultrafine partikler fra dieseludstødning er mindre end tilsvarende brænderøgspartikler (fx 24 vs. 31 nm i gennemsnit) målt af Kobach et al. 2006. Både niveauet af PAH og antallet af ultrafine partikler som vi udsættes for menes at have stor betydning for de helbredsskadelige effekter. For de ultrafine partikler er dette på grund af høj alveolær deposition, mulighed for systemisk translokation, stor overflade og antal, som giver større mulighed for cellulær interaktion og virkning af adsorbere stoffer fra overfladen (Oberdörster et al. 2005).

1.3. Epidemiologisk viden om helbredseffekter af partikler

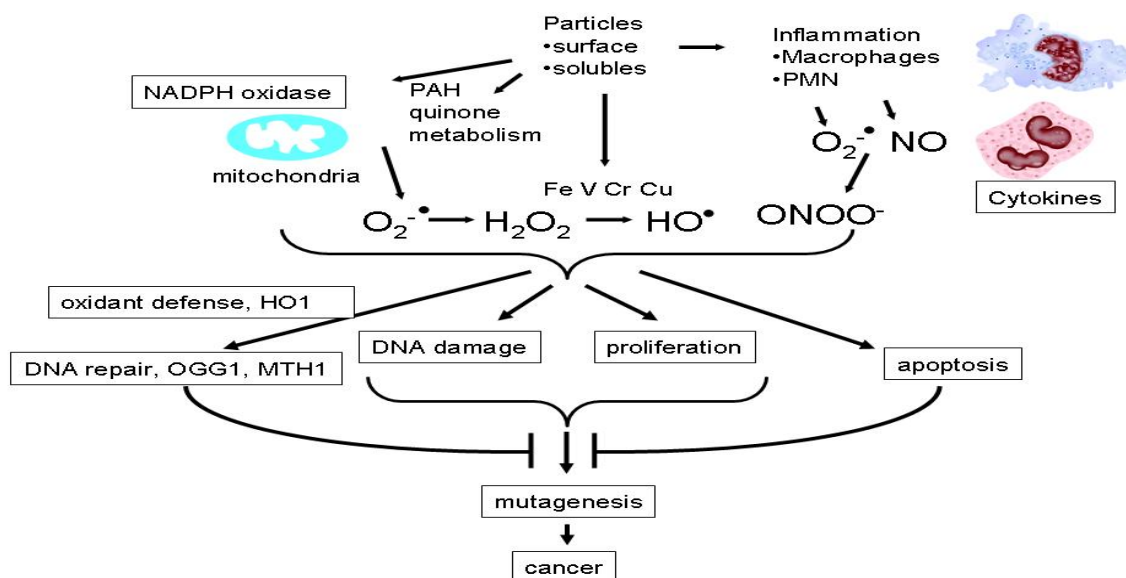
Kohortebaserede epidemiologiske studier har vist at partikulær luftforurening, oftest med fokus på trafikerede byområder, kan have alvorlige helbredseffekter især hvad angår øget forekomst af cancer og lunge- og hjertekarsygdomme (Dockery et al. 1993, Pope, III et al. 2002, Brunekreef et al. 2002). Med hensyn til helbredseffekterne af brændeovns-partikler har Boman et al. (2003) i en oversigtsartikel sammenholdt en række tidsserieundersøgelser baseret på områder hvor brændeovne mentes at være en væsentlig kilde til partikeludslip (Boman et al. 2003). De undersøgte helbredsudfald var dødelighed, skadestuebesøg og indlæggelser for astma og andre luftvejssymptomer. Dosis-responseestimer for brænderøgspartiklerne var for disse 9 studier mindst lige så høje som fra steder, hvor trafik, olieforbrænding og/eller industri er vigtigste partikelkilder.

På trods af svaghederne i en sådan sammenligning, syntes der at være belæg for at brændeovnspartikler kan være ligeså skadelige som andre partikeltyper. Samme konklusion har et review af risikoen ved brænderøg, der også inddrager skovbrande, indendørs brug af biomasse i 3. verdenslande og toksikologi (Naeher et al. 2007).

Et nyere tidsseriestudie fra USA med kildeallokering af $PM_{2,5}$ har dog ikke fundet sammenhæng mellem biomasse som kilde og skadelige helbredseffekter, men bidraget fra biomasse var beskedent og udgjorde ca. 3-11 % af den totale $PM_{2,5}$ masse (Hopke et al. 2005). Derimod har et helt nyt tidsseriestudie baseret på hospitalsindlæggelser blandt ældre og børn i forhold til kildeallokeret PM_{10} i København fundet robuste sammenhænge med bidrag fra biomasse (Andersen et al. 2007). I dette studie er der for en 1½-årsperiode benyttet kemisk og grundstofanalyse og en receptormodel, som er en kombination af kemisk massebalance og faktoranalyse, til at allokere PM_{10} målt dagligt på taget af H.C. Ørsted Institutet til 6 forskellige kilder: biomasse, sekundære, olie, jordskorpe, havsprøjt og køretøjer. Biomasse repræsenterede ca. 25 % af total PM_{10} og må formodes også at inkludere langtransporteret biomasserelaterede partikler. Til støtte for kildeallokeringen af biomasse var der en korrelation med CO niveauer ($r = 0,61$). Indlæggelser for hjerte- og luftvejssygdomme var signifikant associeret med biomasserelaterede partikel niveauer i dagene forud og dette var for luftvejssygdomme uafhængigt af total PM_{10} . Denne epidemiologiske undersøgelse støtter altså at der er betydelige helbredseffekter knyttet til partikulær luftforurening under danske forhold.

1.4. Toksikologisk viden om partikler

Partiklers vigtigste virkningsmekanismer i helbredssammenhæng menes at involvere inflammation og oxidativt stress med resulterende skade på biomolekyler og celler, som vist i figur 1 (Knaapen et al. 2004, Risom et al. 2005).



FIGUR 1: Mulige mekanismer for partikel-induceret DNA skade og udvikling af cancer. Partikler kan aktivere inflammatoriske celler til at danne reaktive oxygen forbindelser, der kan skade DNA. Partiklerne kan også direkte via overgangsmetaller eller genotoksiske stoffer på overfladen danne reaktive oxygen forbindelser i celler. Hvis disse partikel-inducerede DNA skader ikke bliver repareret af cellens egne forsvars- og reparationsystemer, kan det medføre akkumulering af mutationer og en risiko for udvikling af cancer.

Oksidativt stress opstår ved dannelse af reaktive oxygen forbindelser (ROS; engelsk: reactive oxygen species) direkte fra partikler på overfladen eller ved opløselige oksidanter eller sekundært ved at stimulere målceller eller inflammationsceller til ROS produktion. DNA er et af de vigtige malmolekyler for oksidativt stress og oxidativ DNA skade, især oxidation af guanin og DNA strengbrud (SB) menes at være vigtige for udvikling af cancer og måske også i udvikling af åreforkalkning. Oksideret guanin i DNA kan desuden være resultat af indbygning af oksideret dGTP. Der er meget aktive reparations-mekanismer for disse læsioner, eksempelvis reparerer enzymet OGG1 oksideret guanin i DNA. Der er efterhånden fundet stor evidens for sådanne effekter forårsaget af partikler fra forbrændingsprocesser i celle kultur forsøg og i forsøgsdyr eksponeret via luftveje eller oralt, herunder blandt andet opregulering af OGG1 og hæmoxygenase 1 (HO1) som begge er vigtige for forsvaret mod ROS (Risom et al. 2003, Dybdahl et al. 2004, Dybdahl et al. 2003, Müller et al. 2004, Danielsen et al. 2007). Hos mennesker er der helt konsistent fundet øget oxidation af guanin i DNA fra hvide blodlegemer i relation til udsættelse for partikulær luftforurening (Sørensen et al. 2003; 2005; Ovabge et al. 2005; Vinzents et al. 2005; Bräuner et al. 2007).

De toksikologiske undersøgelser, i forsøgspersoner og dyremodeller, af brænderøgspartikler begrænser sig til af påvirkning af respiration, mikrovaskulær permeabilitet, trakealcelleskade, mulig øgning af tumorforekomst i lunger og påvirkning af det innate immunsystem med nedsat infektionsresistens (Zelikoff et al. 2002, Naeher et al. 2007). De fleste af studierne er gamle og inddrager ikke de nuværende hypoteser om effekt af partikler via inflammation og oxidativt stress (Knaapen et al. 2004). En enkelt undersøgelse, som var baseret på effekter i en cellekultur, fandt et øget niveau af DNA streng brud, lipid peroksidation og frigivelse af cytokiner (Leonard et al. 2000). En senere undersøgelse fra samme gruppe vises det at partikler opsamlet fra en kontrolleret skov/markbrand giver hydroxyl radikal produktion med hydrogen peroxid og at partiklerne inducerer ROS dannelse i en celle kultur (Leonard et al. 2007). Begge disse studier peger altså i retning af at biomasse forbrændingspartikler resulterer i effekter svarende til hvad vi kan se for trafikrelaterede partikler.

1.5. Partikel eksponering og biomarkører hos mennesker

Det er muligt at belyse partiklers effekter i form af oxidativt stress, DNA skade og inflammation ved brug af biomarkører hos mennesker. Vi har således tidligere vist sammenhæng mellem eksponering for partikler fra trafik og oksiderede guaniner i hvide blodlegemers DNA (Sørensen et al. 2003, Vinzents et al. 2005, Sørensen et al. 2005, Bräuner et al. 2007). I Sverige er der udført et eksponeringsforsøg for at belyse hvilke effekter inhalation af brænderøg giver raske forsøgspersoner, når man ser på en række forskellige biomarkører. 13 forsøgspersoner blev eksponeret i 4 timer, hvor brænderøg blev ledt ind i et til formålet bygget kammer. Scenariet blev gentaget uden brænderøg, og forsøgspersonerne var derved deres egen kontrol. Resultaterne fra dette forsøg viste at der var øgede niveauer af inflammations- og koagulationsmarkører i plasma og en tendens til øget lipid oxidation målt i urin efter eksponering med brænderøg (Barregard et al. 2006).

2 Formålet med denne undersøgelse

Brænderøgspartikler udgør et toksikologisk set jomfrueligt område og formålet med dette forsøg er at undersøge om velkarakteriserede brænderøgspartikler forårsager celle toksicitet og DNA skader i humane cellelinier. Hypotesen er at brænderøgspartiklers evne til at forårsage DNA skader og celle toksicitet kan sammenlignes med andre typer af partikler med mere velkendte effekter, deriblandt trafikgenerede partikler. Der er som anført stor viden om andre partiklers evne til at forårsage DNA skade i både dyr og mennesker, og viden om brænderøgspartikler kan således bidrage til grundlag for ekstrapolationer. Vi undersøger dosis-respons sammenhænge for følgende parametre: celle toksicitet, målt som LDH frigivelse, DNA skader målt som SB og FPG skader og niveauet af intracellulær ROS som et mål for oksidativt stress.

3 Analysemetoder

3.1. Partikelmateriale

Undersøgelsen er et samarbejde med Per Schwarze fra Statens Institut for Folkehelse, Oslo, hvor vi anvender deres velkarakteriserede partikler (brænderøgspartikler, to opsamlinger af partikler fra en motorvejstunnel i Oslo (Tunnel St+ og Tunnel St-) og standard diesel partikler (SRM2975) (Kocbach et al. 2006). Ydermere er der også opsamlede mineral partikler, som en formodet negativ kontrol. Brænderøgspartiklerne er opsamlet fra en almindelig norsk brændeovn placeret i et laboratorium. Brænderøgen blev kølet ned ved fortynding med ufiltreret luft og opsamlet på polycarbonat filtre med pore størrelse 0,8 µm og diameter 102 mm, ved hjælp af et luftflow gennem filteret på 13,3 l/min. Brænderøgspartiklerne blev kun opsamlet ved høj-temperatur forbrænding. Partikel niveauet i laboratoriet blev målt og beregnet til at udgøre mindre end 0,005%. Brænderøgspartiklerne blev skrabet af 25 filtre og samlet i en batch.

Tunnel St+ er partikler opsamlet i en motorvejstunnel i april 2004, hvor nordmændene stadig bruger pigdæk (engelsk: studded tires) på deres biler og Tunnel St- er partikler opsamlet i september 2004, hvor nordmændene ikke bruger pigdæk. Opsamlingen foregik 2 meter over vejniveau og 4 meter fra passerende trafik, på polycarbonat filtre med pore størrelse 0,8 µm og diameter 37 mm, ved hjælp af et luftflow på 6 l/min. Partiklerne blev opsamlet kontinuert over 2 uger, blev skrabet af filtrene og samlet i en batch.

Standard diesel partiklerne SRM2975 er købt kommercielt hos The National Institute of Standards and Technology i USA.

Yderligere detaljer omkring opsamlingerne er tidligere publiceret (Kocbach et al. 2006).

3.2. Karakterisering af opsamlede partikler

Partiklerne er velkarakteriserede (tabel 1) og disse data er tidligere publiceret (Kocbach et al. 2006). De semi-kvantitative mængder af carbon aggregater og mineral partikler og diameteren af primære partikler i carbon aggregaterne er analyseret med transmission elektron mikroskopi. Summen af 18 forskellige PAH er analyseret med GC-MS og indholdet af organisk carbon er bestemt med "thermal optical transmission", som tidligere rapporteret (Kocbach et al. 2006).

Tabel 1. Partikel karakterisering.

Sample	Mineral partikler	Carbon aggregater	Primær partikel diameter (nm)	PAH indhold (ng/mg)	Organisk carbon (%)
Tunnel St+	++	+	25	510	9,3
Tunnel St-	+	++	24	747	24,4
Brænderøgspartikler	-	+++	31	11797	35,4
SRM2975	-	+++	24	84	16,3
Mineral	+++	-	--	--	--

--Ikke analyseret.

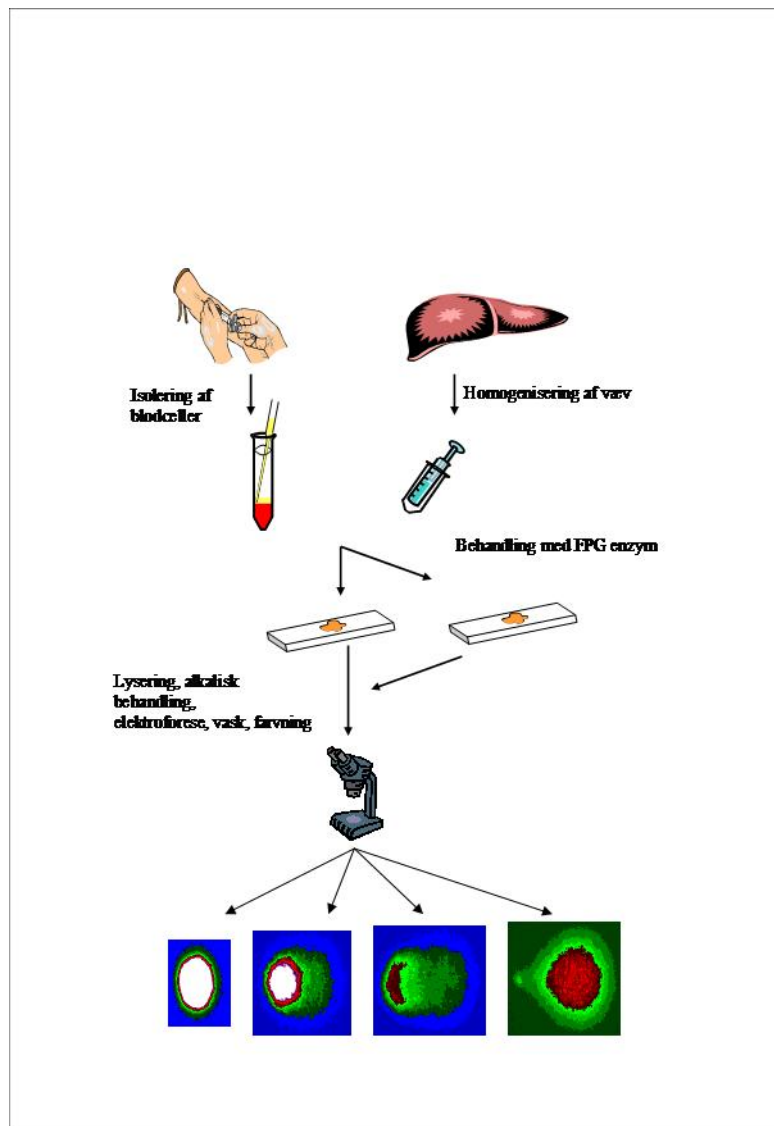
3.3. Cellekulturer

De to celletyper der bruges i studiet er henholdsvis den humane lungeepitel cellelinie (A549) og monocyt cellelinien THP-1. A549 cellelinien, der er adherende, blev isoleret i 1972 fra et lungecarcinom og repræsenterer som type II lungeepitel celler de vigtigste mål celler for partikulær luftforurening. THP-1 cellelinien er isoleret fra et 1-årigt barn med akut monocytisk leukæmi i 1980. Disse celler er i suspension og er i dette studie surrogat for humane lymfocytter og monocytter, som er de blodceller vi ser effekt på i studier med mennesker udsat for partikler. Begge celle typer findes hos American Type Culture Collection i USA). Vi har venligst fået A549 cellelinien fra det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø i København og THP-1 cellelinien fra Statens Institut for Folkehelse i Oslo. Følgende celle kultur medier anvendes; A549: F12 nutrient mixture (HAM) suppleret med 10% føtalt kalve serum, 1% L-glutamin og 1% penicillin-streptomycin; THP-1: RPMI 1640 medium suppleret med 10% føtalt kalve serum, 10 mM Hepes, 1 mM natriumpyruvat og 0,1% gentamicine.

Begge cellelinier inkuberes ved 37 °C i 5% CO₂.

3.4. DNA skader

Vi har anvendt enkeltcelle gelelektroforese (også populært kaldet comet metoden) til at måle mange forskellige uspecifikke skader i form af DNA SB. Andre oksidative og specifikke skader på DNA, deriblandt 8-oxodG skaden fremkommer, når reaktive iltforbindelser reagerer med guanin basen i DNA. Disse typer af skader kan måles som FPG skader ved inkubation med FPG enzymet fra *E. coli*. Dette enzym der skærer DNA ved oksiderede puriner og er optimeret og kalibreret ved hjælp af røntgenstråling i afdelingen (Møller et al. 2004). Metoden er skematiseret i figur 2.



FIGUR 2: Comet metoden: enkeltcelle suspensioner fås ved isolering af hvide blodceller eller cellekulturer, eller ved at mase væv gennem en si. Efter indstøbning i agarose, lyses cellerne og behandles derefter i en opløsning med høj saltkoncentration og detergent. Under elektroforesen vandrer DNA mod anoden, betinget af antallet af strengbrud. Efter farvning af DNAet kan skadesniveauet bedømmes i et fluorescensmikroskop, hvor runde celler (billedet længst til venstre) er uskadede og hvor de comet lignende celler (billedet længst til højre) er maksimalt skadede. Se tekst for flere detaljer. Figuren er modificeret fra (Møller 2005).

Til partikel eksponeringerne sås 10^5 celler ud i en 24 brøndsplade ($1.9 \text{ cm}^2/\text{brønd}$) og får lov til at sætte sig natten over. Cellerne eksponeres med 1 ml partikel opløsning fortyndet med celle kultur medie til de endelige koncentrationer; 0, 2.5, 25, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Efter 3 timers eksponering høstes cellerne med trypsin-EDTA og centrifugeres ved 3000 rpm i 6 minutter før de indstøbes i agarose på en tynd plastik plade. Cellekernerne lyses i mindst 1 time i en opløsning med høj saltkoncentration og detergent. Halvdelen af agarose gellerne enzymbehandles med FPG i 45 minutter i varmeskab ved 37°C . Herefter lægges de i en alkalisk buffer i 40 minutter hvorefter elektroforesen sættes i gang og varer 20 minutter. Under elektroforesen vandrer DNA mod anoden (pluspolen), hvilket er betinget af antallet af strengbrud.

Gellerne farves med et DNA bindende farvestof, og i et fluorescensmikroskop ligner vandringen kometer, hvor skadesniveauet kan angives ved hvor lang den lysende DNA hale er. Prøverne blev kodet før visuel scoring hvor SB og FPG skader blev bedømt ud fra 100 nuclei ved brug af et fem-

klasse scoringssystem (den arbitrære skala for niveauet af skader ligger imellem 0 og 400). Forsøgene blev udført på tre forskellige dage med en dobbeltbestemmelse (n = 6).

3.5. Celle toksicitet

Celle toksiciteten af partiklerne blev målt som lactate dehydrogenase (LDH) aktivitet i celle mediet efter 24 timers eksponering. En stigning i antallet af døde celler eller membranskadede celler øger LDH aktiviteten som blev målt med Cytotoxicity Detection Kit fra Roche Applied Science, Penzberg, Germany. I dette assay er brøndarealet 0.3 cm² (96 brøndsplader) og den anbefalede mængde partikel opløsning var 200 µl i hver brønd.

3.6. Statistisk analyse

In vitro analyseres med parametriske ANOVA med posthoc tests for gruppeforskelle, idet data i disse systemer som regel kan opnå normalfordeling efter transformation. Om nødvendigt anvendes Kruskal-Wallis som non-parametriske analyse. Alle variable er testet med 5% signifikans niveau. P-værdier refererer til post-hoc tests. Den statistiske analyse er udført i Statistica 5.5 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

4 Resultater og diskussion

Den lavest effektive dosis (Low effect level), hvor partiklerne giver statistisk signifikant forhøjede niveauer af DNA skade, celle toksicitet og dannelse af ROS er vist i nedenstående tabel 2 for A549 cellerne og tabel 3 for THP-1 cellerne.

Tabel 2: A549 celler; Laveste dosis (µg/ml) med signifikant forhøjet DNA skade, celle toksicitet og ROS produktion.

Sample	Streng brud ^a	FPG skader ^a	LDH ^{a, d}
Tunnel St+	100	25	25 (19 %)
Tunnel St-	25 ^b	2,5 ^b	200 (27 %)
Brænderøgspartikler	25	2,5 ^c	2,5 (6,8 %)
SRM2975	25	100	100 (17 %)
Mineral	25	2,5 ^b	IS

^a Hvis ikke andet anført giver alle doserne, over den i tabellen givne, signifikant forhøjede niveauer i forhold til kontrollen.

^b Kun signifikant ved denne ene dosis.

^c Skadesniveau kunne ikke måles ved dosis 200 µg/ml.

^d I parentes er LDH frigivelsen i % angivet.

Tabel 3: THP-1 celler; Laveste dosis (µg/ml) med signifikant forhøjet DNA skade, celle toksicitet og ROS produktion.

Sample	Streng brud ^a	FPG skader ^a	LDH ^{a, c}
Tunnel St+	25	100	100 (9,3 %)
Tunnel St-	25	IS	100 (7,8 %)
Brænderøgspartikler	25	25	IS
SRM2975	100	2,5 ^b	IS
Mineral	IS	25 ^b	IS

^a Hvis ikke andet anført giver alle doserne, over den i tabellen givne, signifikant forhøjede niveauer i forhold til kontrollen.

^b Ikke signifikant ved dosis 200 µg/ml.

^c I parentes er LDH frigivelsen i % angivet.

IS: Ingen signifikante effekter.

For A549 cellerne giver alle partikeltyperne et signifikant øget niveau af DNA SB ved 25 µg/ml ($p < 0,05$; alle ANOVA undtagen Tunnel St- med Kruskal-Wallis) undtagen for Tunnel St+ som først giver signifikant øget niveau af SB ved 100 µg/ml ($p < 0,05$; ANOVA). Efter eksponeringen finder vi også øgede niveauer af FPG skader for alle partiklerne ($p < 0,05$; alle ANOVA), dog kan det signifikante niveau ved 2,5 µg/ml for Tunnel St- og mineral partiklerne måske tilskrives tilfældigheder, da der ikke ses et dosis-respons forløb med signifikante skadesniveauer ved højere doser. For brænderøgspartiklerne ses allerede et signifikant niveau af FPG skader ved 2,5 µg/ml. Ved dosis 200 µg/ml for brænderøgspartiklerne er niveauet af DNA SB så højt, at comet metoden når et mætningspunkt, hvilket medfører at FPG skaden ikke kan måles korrekt.

For THP-1 cellerne finder vi et signifikant øget niveau af DNA SB ved 25 µg/ml for Tunnel St+, Tunnel St- og for brænderøgspartiklerne ($p < 0,05$; ANOVA). For dieselpartiklerne SRM2975 er SB signifikant øget ved 100 µg/ml ($p < 0,05$; ANOVA) og mineralpartiklerne giver ikke signifikant skade i form af SB. Niveauet af FPG skaderne er signifikant øget ved 2,5 µg/ml med SRM2975 og ved 25 µg/ml med både brænderøgspartikler og mineralpartikler ($p < 0,05$; ANOVA). For Tunnel St+ er der signifikante FPG skader ved 100 µg/ml ($p < 0,05$; ANOVA) og Tunnel St- giver ingen FPG skader.

Generelt udviser resultaterne for niveauet af SB et lineært dosis-respons forløb i begge cellelinier. For FPG skaderne ser det derimod anderledes ud, da dosis-respons forløbet flader ud ved en dosis på 25 eller 100 µg/ml. Dette gælder især tunnel og mineral partiklerne, mens brænderøgspartikler viser konsistent forhøjede skadeniveauer ved alle de højere koncentrationer. Affladning af DNA skader er næppe relateret til analysemetoden (comet), som kan mættes ved høje niveauer, men de er ikke nået her; men det er muligt, at de cellulære mekanismer, der fremkalder DNA skaderne er mætbare. Der er formentlig ikke tale om direkte oksidative virkning, da fx SRM2975 næsten ikke giver ROS dannelse i vandig opløsning.

Undersøgelser af oksiderede guaniner som FPG skader er sandsynligvis mere relevant for udviklingen af cancer end DNA SB. I den forbindelse har vi observeret at menneskers udsættelse for luftforurening medfører flere DNA skader i hvide blodlegemer (lymfocytter og monocytter), især målt som FPG skader mens SB har vist mindre respons (Sørensen et al. 2003, Vinzents et al. 2005). Det kan dog skyldes at SB repareres hurtigere end FPG skader og derfor kan være forsvundet, hvis eksponeringen er ophørt. Den dosis-afhængige stigning vi ser i FPG skadesniveauet bekræfter at brænderøgspartikler, her i celle kultur systemer, inducerer oxidativ skade på DNA ved lavere dosis end for partikler fra trafikken (Tunnel Tst+ og Tunnel Tst-) jfr. tabel 2 og 3. Diesel partiklerne SRM2975, der i THP-1 cellerne giver et signifikant øget niveau af

FPG skader ved 2,5 µg/ml ($p < 0,05$; ANOVA), er kun ved denne ene dosis mere potent end brænderøgspartiklerne.

Med hensyn til celle toksiciteten syntes der først og fremmest at være stor forskel på cellelinierne. I THP-1 cellerne er kun Tunnel St+ og Tunnel St- moderat toksiske ved 100 µg/ml ($p < 0,05$; Kruskall-Wallis og ANOVA) med maksimal toksicitet ved 200 µg/ml på henholdsvis 14,6 og 9,9 % LDH frigivelse.

For A549 cellerne er brænderøgspartiklerne allerede signifikant toksiske ved 2,5 µg/ml ($p < 0,05$; ANOVA) og den maksimale LDH frigivelse er på 20,4 % ved 100 µg/ml. Tunnel St+, SRM2975 og Tunnel St- giver statistisk signifikant LDH frigivelse ved doser på henholdsvis 25 ($p < 0,05$; ANOVA), 100 ($p < 0,05$; Kruskall-Wallis) og 200 µg/ml ($p < 0,05$; Kruskall-Wallis). De maksimale LDH frigivelser for Tunnel St+ og Tunnel St- er på 27,7 og 27,2 % ved 200 µg/ml, og for SRM2975 på 17,1 % ved 100 µg/ml.

5 Konklusion

Vi viser i dette forsøg at brænderøgspartikler giver DNA skader både i form af SB og FPG skader i dyrkede menneskeceller, som svarer til lungeceller, der er mest udsat for partikler, og til hvide blodlegemer, der er et mål for effekter af partikler i blodcirkulationen. Forsøget viser at brænderøgspartikler giver et betydeligt respons i form af FPG skader ved lavere doser end for partikler fra trafikken. Sammenligningen med de trafikgenererede partikler i dette biologiske system er vigtig, da vi har vist at denne type DNA skader er følsomme mål for systemiske effekter af partikler fra trafikilder hos mennesker. Disse systemiske effekter med tegn på oksidativt stress må formodes også at være relevante for hjertekarsygdom. Dvs. at hvis brænderøgspartikler deponeres i og optages fra lungerne på samme måde som trafikgenererede partikler, kan vi ud fra vores resultater forvente mindst samme helbredseffekter. Denne viden om brænderøgspartiklers toksiske virkninger i forhold til trafikgenererede partikler er således vigtig som grundlag for regulering, da der er behov for at ekstrapolere epidemiologiske data i den retning.

6 Referencer

Andersen ZJ, Wahlin P, Raaschou-Nielsen O, Scheike T, Loft S. Ambient particle source apportionment and daily hospital admissions among children and elderly in Copenhagen. *J.Expo.Sci.EnvIRON.Epidemiol.* 2007; In press. doi: 10.1038/sj.jes.7500546

Barregard L, Sällsten G, Gustafson P, Andersson L, Johansson L, Basu S, Stigendal L. Experimental exposure to wood-smoke particles in healthy humans: effects on markers of inflammation, coagulation, and lipid peroxidation. *Inhal.Toxicol.* 2006; 18:845-853.

Boman BC, Forsberg AB, Järholm BG. Adverse health effects from ambient air pollution in relation to residential wood combustion in modern society. *Scand.J.Work Environ.Health* 2003; 29:251-260.

Bräuner EV, Forchhammer L, Møller P, Simonsen J, Glasius M, Wåhlin P, Raaschou-Nielsen O, Loft S. Exposure to ultrafine particles from ambient air and oxidative stress-induced DNA damage. *Environ.Health Perspect.* 2007; 115:1177-1182.

Brunekreef B and Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet* 2002; 360:1233-1242.

Danielsen PH, Risom L, Wallin H, Autrup H, Vogel U, Loft S, Møller P. DNA damage in rats after a single oral exposure to diesel exhaust particles. *Mutat.Res.* 2007; In press. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.06.011

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; 329:1753-1759.

Dybdahl M, Risom L, Bornholdt J, Autrup H, Loft S, Wallin H. Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo. *Mutat.Res.* 2004; 562:119-131.

Dybdahl M, Risom L, Møller P, Autrup H, Wallin H, Vogel U, Bornholdt J, Daneshvar B, Dragsted LO, Weimann A, Poulsen HE, Loft S. DNA adduct formation and oxidative stress in colon and liver of Big Blue rats after dietary exposure to diesel particles. *Carcinogenesis* 2003; 24:1759-1766.

Glasius M, Mønster J, Bossi R, Berkowicz R, Ketzel M, Schleicher O, Vinkelsøe J, Wåhlin P, Palmgren F. Emission of particles and polycyclic aromatic hydrocarbons from residential wood combustion. 2004.

Hopke PK, Ito K, Mar T, Christensen WF, Eatough DJ, Henry RC, Kim E, Laden F, Lall R, Larson TV, Liu H, Neas L, Pinto J, Stölzel M, Suh H, Paatero P, Thurston GD. PM source apportionment and health effects: 1. Intercomparison of source apportionment results. *J.Expo.Anal.EnvIRON.Epidemiol.* 2005; 16: 275-286

Illerup JB and Nielsen M. Improved PM emissions inventory for residential wood combustion. 2004; *EUR 21302*:142-149.

Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int.J.Cancer* 2004; 109:799-809.

Kocbach A, Li Y, Yttri KE, Cassee FR, Schwarze PE, Namork E. Physicochemical characterisation of combustion particles from vehicle exhaust and residential wood smoke. Part Fibre.Toxicol. 2006; 3:1

Leonard SS, Castranova V, Chen BT, Schwegler-Berry D, Hoover M, Piacitelli C, Gaughan DM. Particle size-dependent radical generation from wildland fire smoke. *Toxicology* 2007; 236:103-113.

Leonard SS, Wang S, Shi X, Jordan BS, Castranova V, Dubick MA. Wood smoke particles generate free radicals and cause lipid peroxidation, DNA damage, NFkappaB activation and TNF-alpha release in macrophages. *Toxicology* 2000; 150:147-157.

Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.* 2005; 96 Suppl 1:1-42.

Møller P, Friis G, Christensen PH, Risom L, Plesner G, Kjærsgaard J, Vinzents P, Loft S, Jensen A, Tved M. Intra-laboratory comet assay sample scoring exercise for determination of formamidopyrimidine DNA glycosylase sites in human mononuclear blood cell DNA. *Free Radic.Res.* 2004; 38:1207-1214.

Müller AK, Farombi EO, Møller P, Autrup HN, Vogel U, Wallin H, Dragsted LO, Loft S, Binderup ML. DNA damage in lung after oral exposure to diesel exhaust particles in Big Blue rats. *Mutat.Res.* 2004; 550:123-132.

Naeher LP, Brauer M, Lipsett M, Zelikoff JT, Simpson CD, Koenig JQ, Smith KR. Woodsmoke health effects: a review. *Inhal.Toxicol.* 2007; 19:67-106.

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ.Health Perspect.* 2005; 113:823-839.

Pope CA, III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002; 287:1132-1141.

Risom L, Dybdahl M, Bornholdt J, Vogel U, Wallin H, Møller P, Loft S. Oxidative DNA damage and defence gene expression in the mouse lung after short-term exposure to diesel exhaust particles by inhalation. *Carcinogenesis* 2003; 24:1847-1852.

Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat.Res.* 2005; 592:119-137.

Sørensen M, Autrup H, Hertel O, Wallin H, Knudsen LE, Loft S. Personal exposure to PM2.5 and biomarkers of DNA damage. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2003; 12:191-196.

Sørensen M, Schins RP, Hertel O, Loft S. Transition metals in personal samples of PM2.5 and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2005; 14:1340-1343.

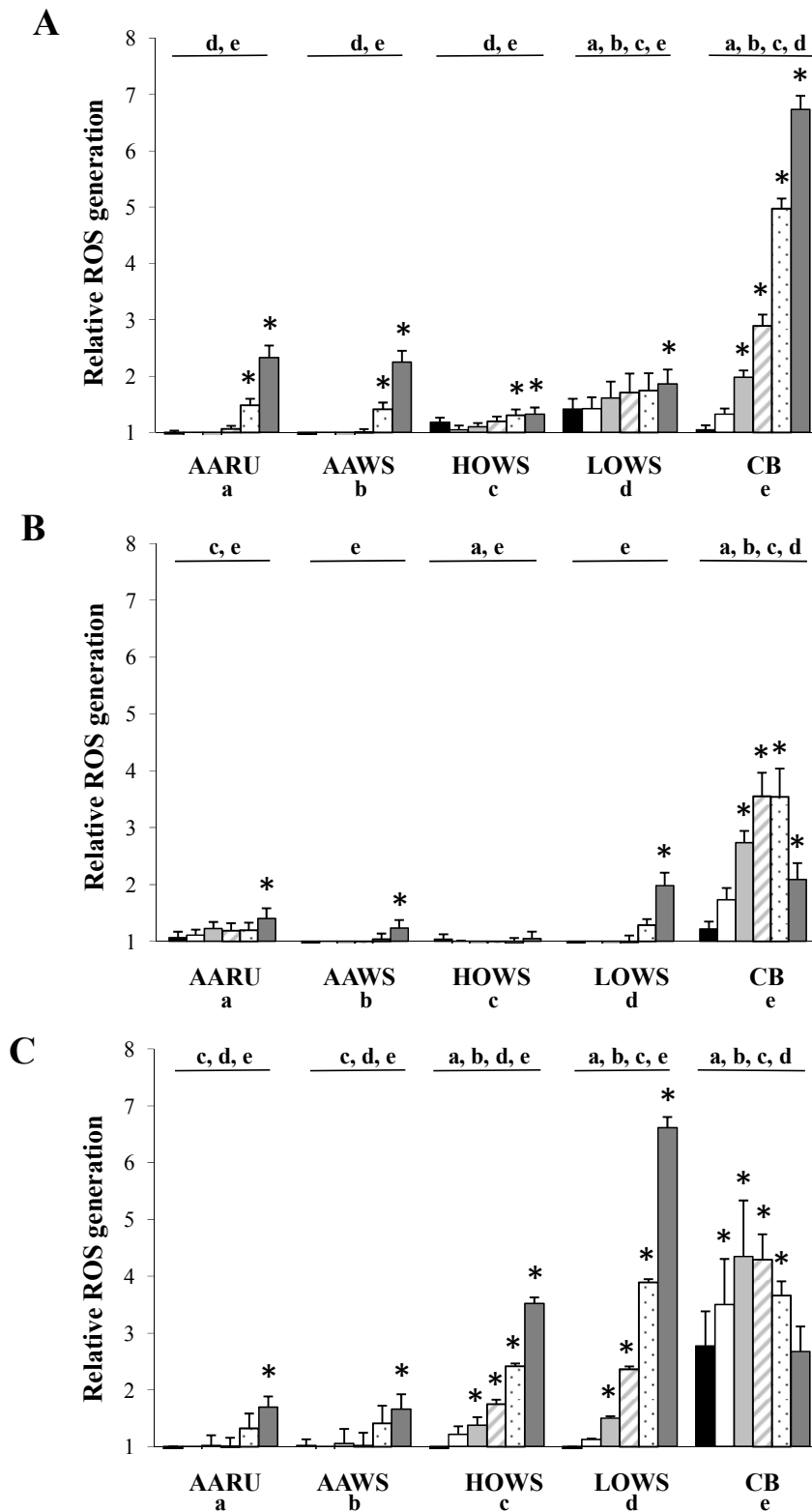
Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El GF, Cogliano V. Carcinogenicity of household solid fuel combustion and of high-temperature frying. *Lancet Oncol.* 2006; 7:977-978.

Vinzents PS, Møller P, Sørensen M, Knudsen LE, Hertel O, Jensen FP, Schibye B, Loft S. Personal exposure to ultrafine particles and oxidative DNA damage. *Environ.Health Perspect.* 2005; 113:1485-1490.

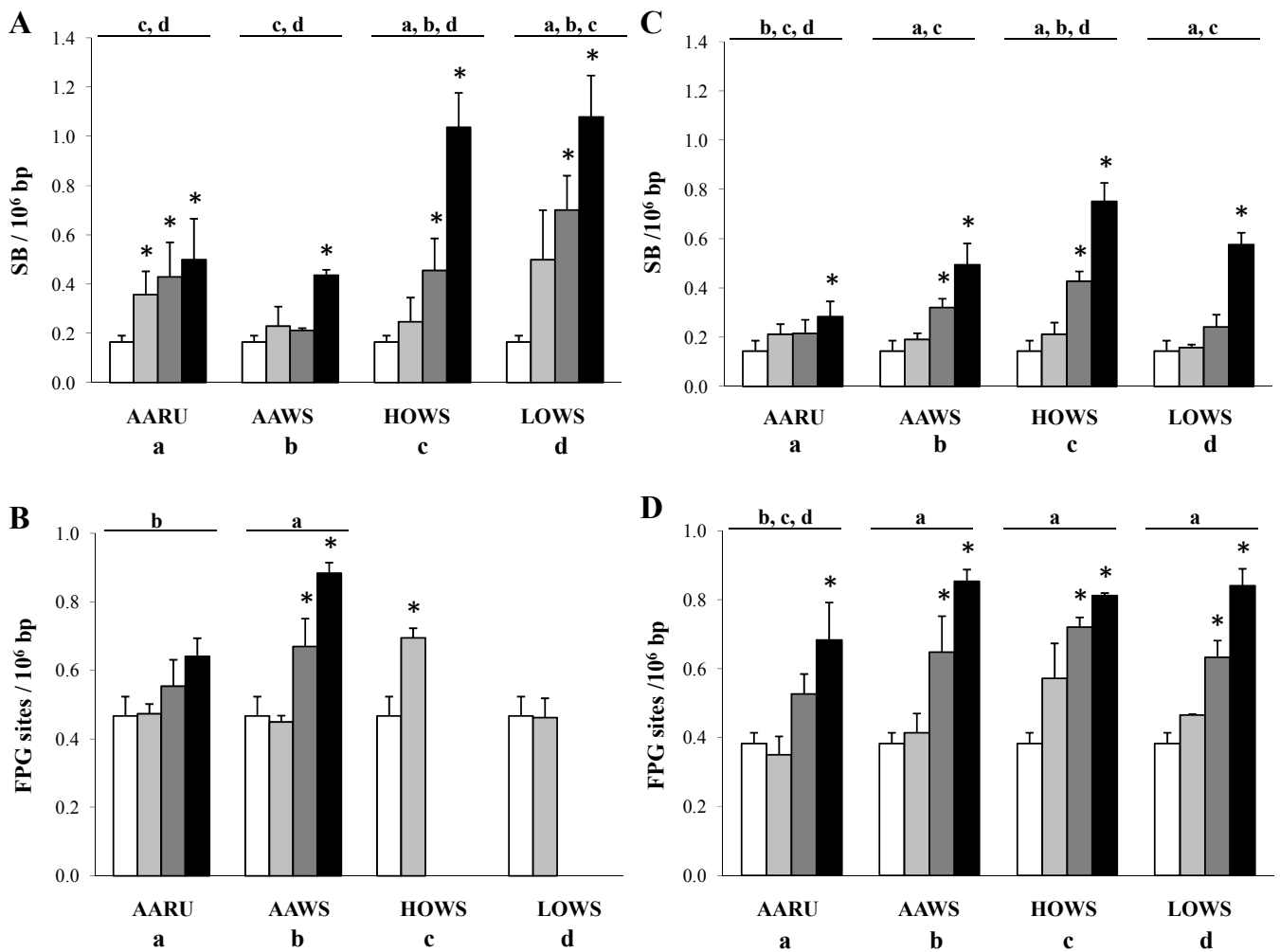
Zelikoff JT, Chen LC, Cohen MD, Schlesinger RB. The toxicology of inhaled woodsmoke. *J.Toxicol.Environ.Health B Crit Rev.* 2002; 5:269-282.

Bilag 2

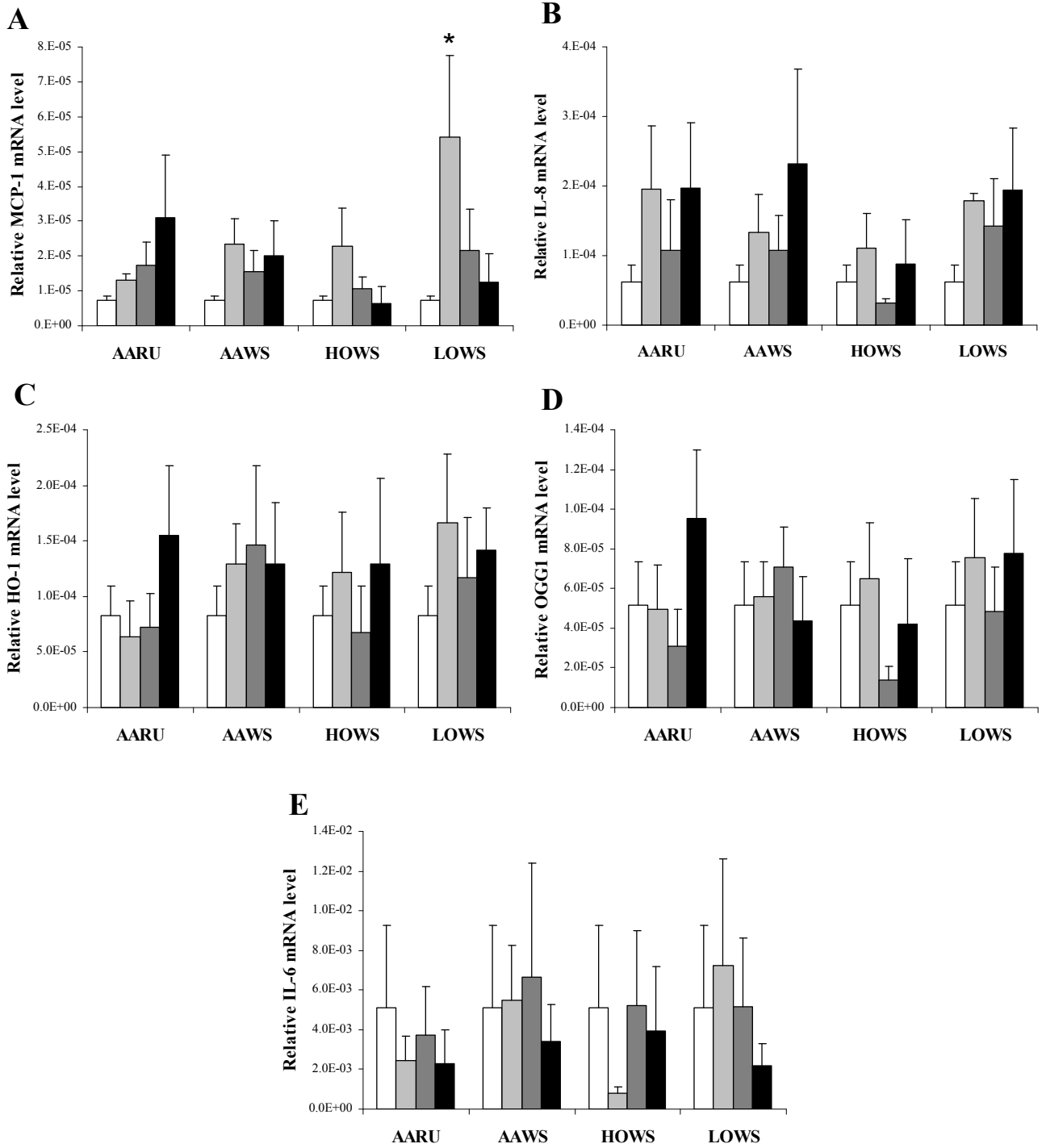
Figurer til kapitel 3 - *in vitro* forsøg



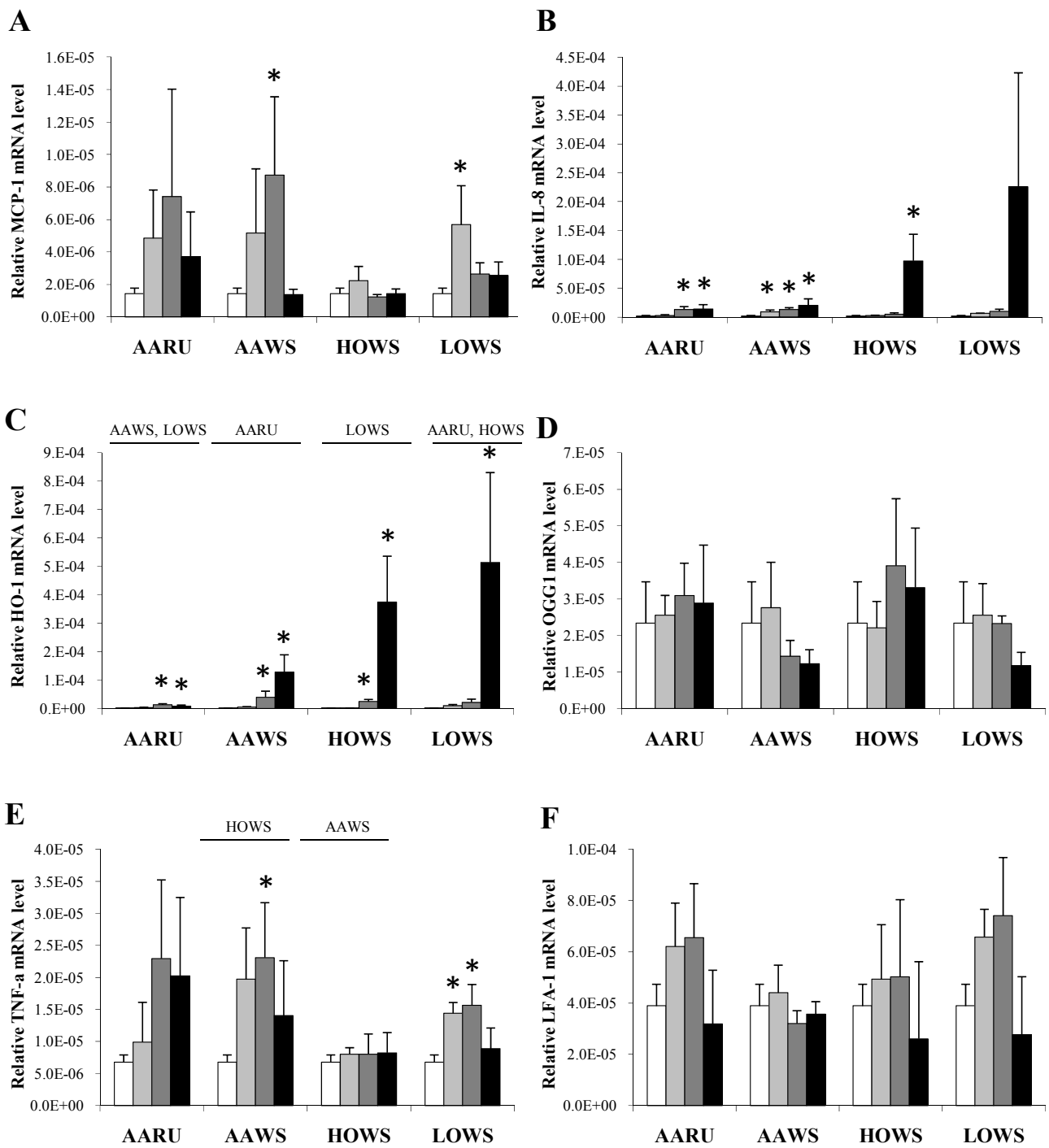
The relative ROS generation in acellular condition (A) in THP-1 cell cultures (B) and in A549 cell cultures (C) exposed 3 h to PM. The data are normalised to 1. Each bar represents the mean \pm SE ($n = 3$) of cultures exposed to 1.56 (black), 3.13 (white), 6.25 (light grey), 12.5 (hatched), 25 (dotted) and 50 (dark grey) $\mu\text{g/ml}$ of PM. The letters above each type of PM indicate statistically significant differences ($p < 0.05$, nested ANOVA) between that and other PM preparations. * Statistically significant compared to control ($p < 0.05$; post-hoc LSD test).



SB (A) and FPG sites (B) in A549 cell cultures and SB (C) and FPG sites (D) in THP-1 cell cultures exposed for 3 h to PM. Each bar represents the mean \pm SE ($n = 6$) of cultures exposed to 0 (light grey), 2.5 (white), 25 (dark grey) and 100 (black) $\mu\text{g/ml}$ of PM. The letters above each type of PM indicate statistically significant differences ($p < 0.05$, nested ANOVA) between that and other PM preparations. * Statistically significant compared to control ($p < 0.05$; post-hoc LSD test).



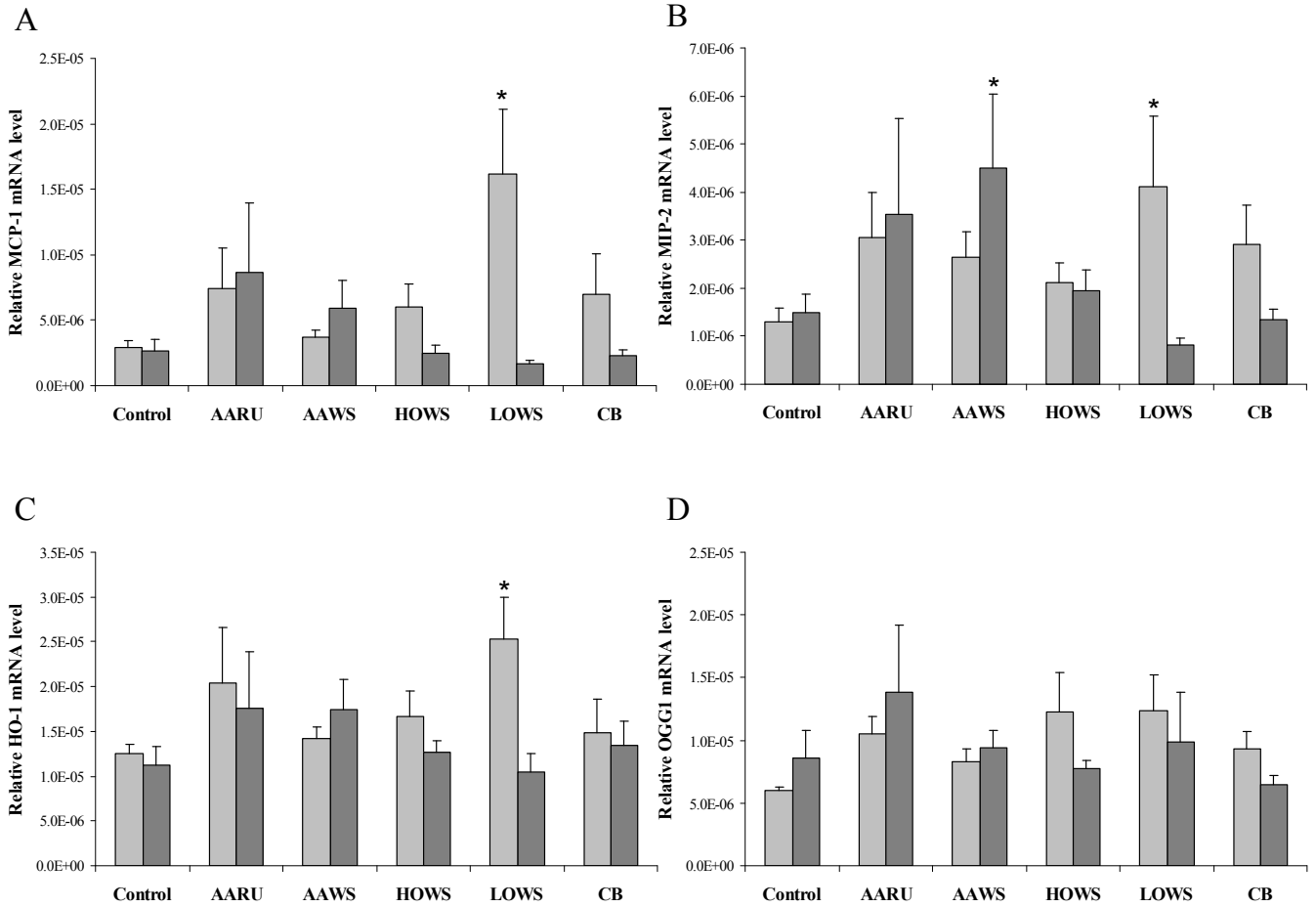
Gene expression in A549 cells after 3 h of exposure to 0 (light grey), 2.5 (white), 25 (dark grey) and 100 (black) µg/ml PM. * Statistically significant compared to control ($p < 0.05$; post-hoc LSD test).



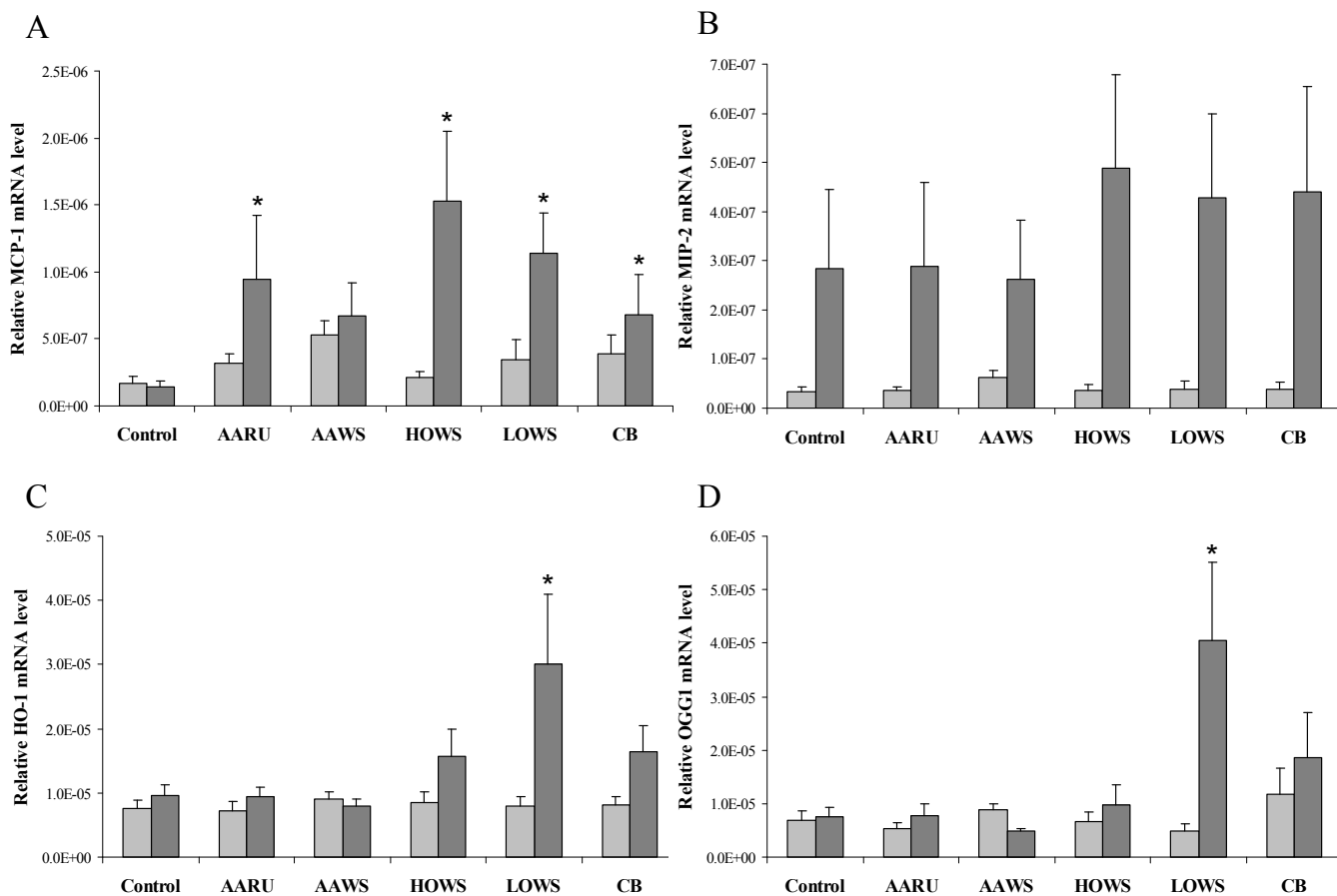
Gene expression in THP-1 cells after 3 h of exposure to 0 (light grey), 2.5 (white), 25 (dark grey) and 100 (black) $\mu\text{g/ml}$ of PM. * Statistically significant compared to control ($p < 0.05$; post-hoc LSD test).

Bilag 3

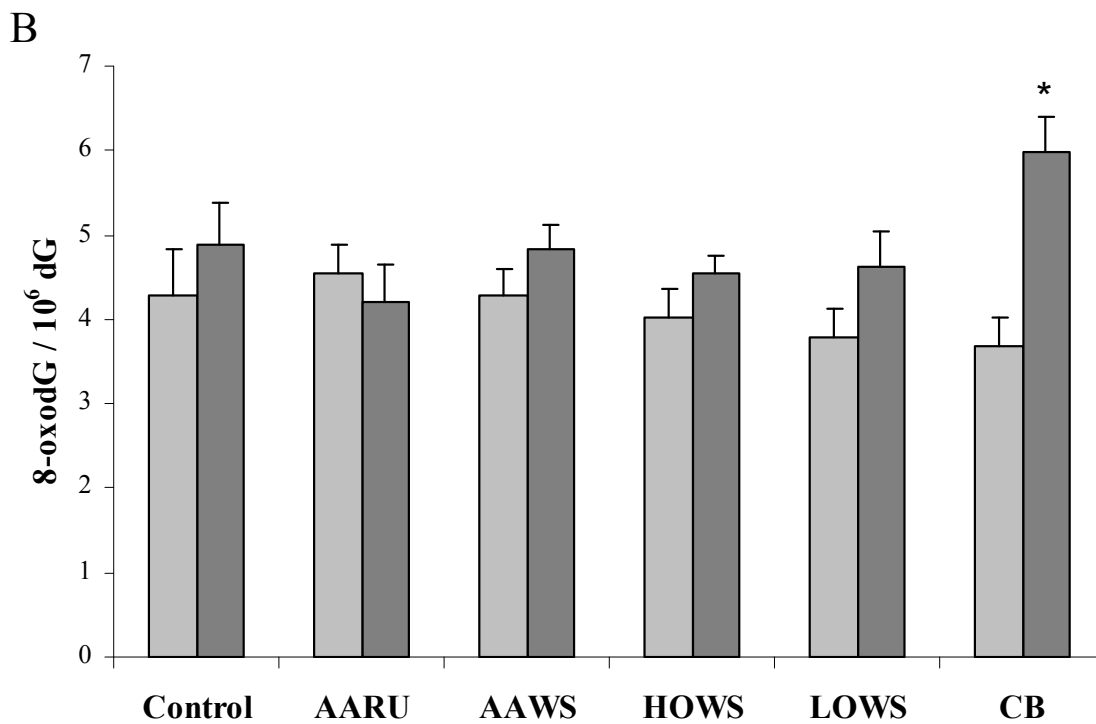
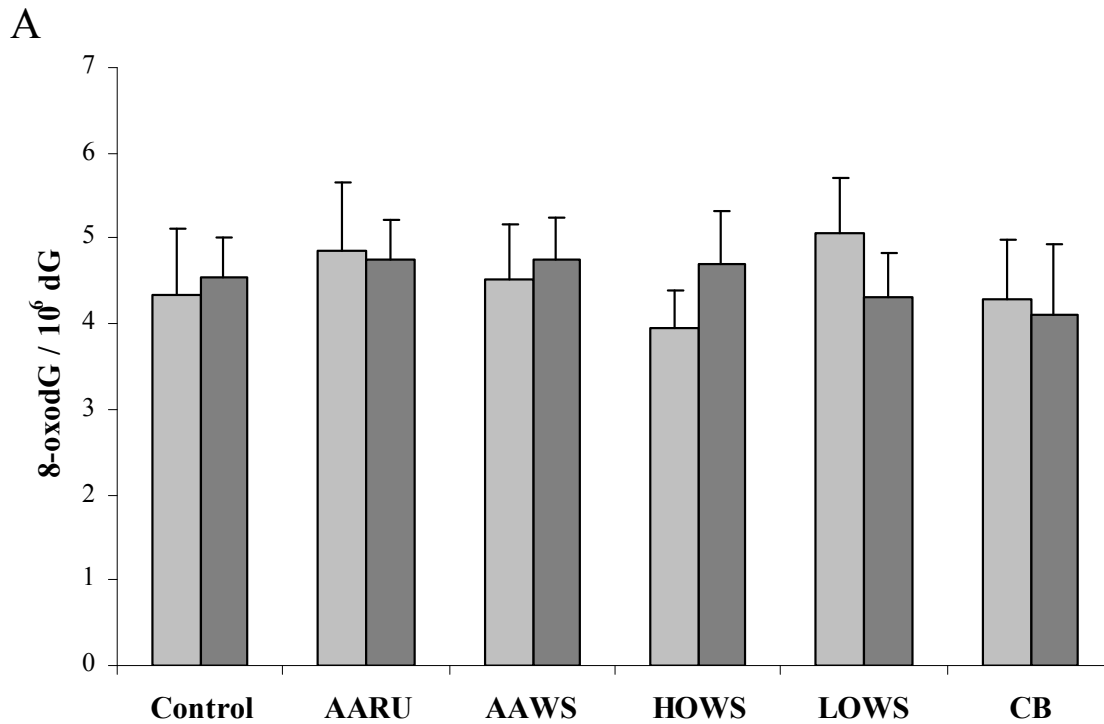
Figurer til kapitel 6 - *in vivo* resultater



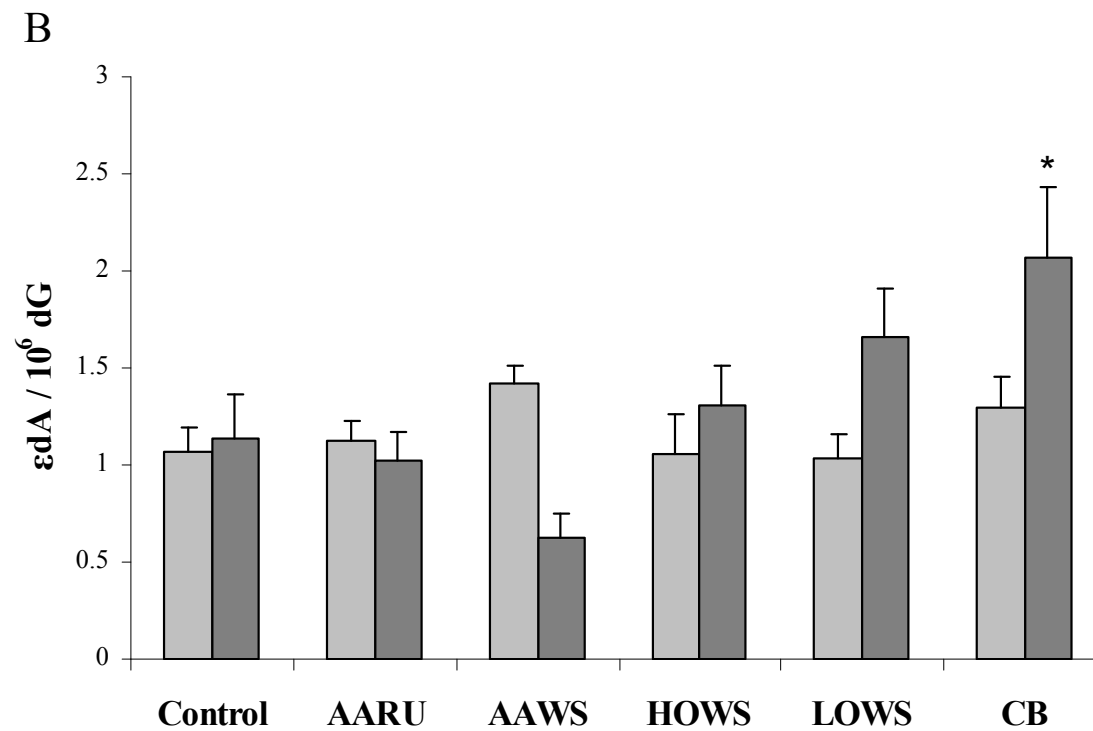
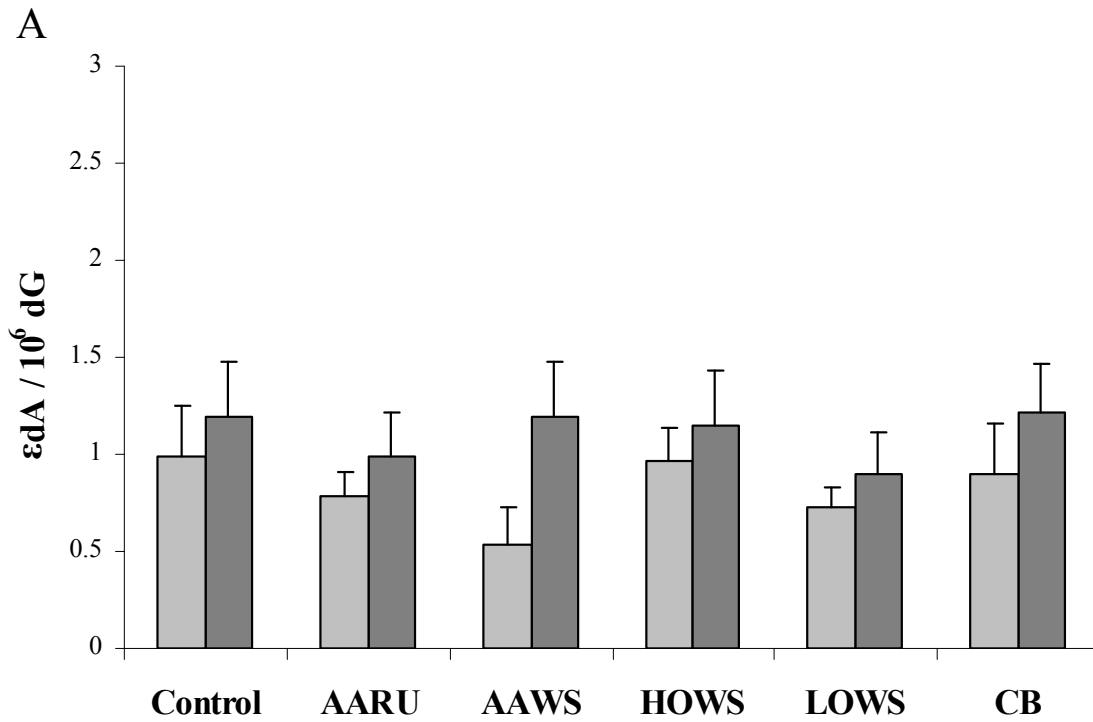
Relative mRNA expression, in lung tissue after intratracheal instillation (light grey) and intragastric administration (dark grey) quantified by real-time RT-PCR. Bars and whiskers denote the mean \pm SEM in groups of rats exposed to 0 (control) and 0.64 mg/kg bodyweight of AARU (ambient air particulate from a rural area), AAWS (ambient air particulate from a wood stove rich area), HOWS (particles from a wood stove with normal O₂ supply), LOWS (particles from a wood stove with low O₂ supply) or CB. * P < 0.05 as compared with control.



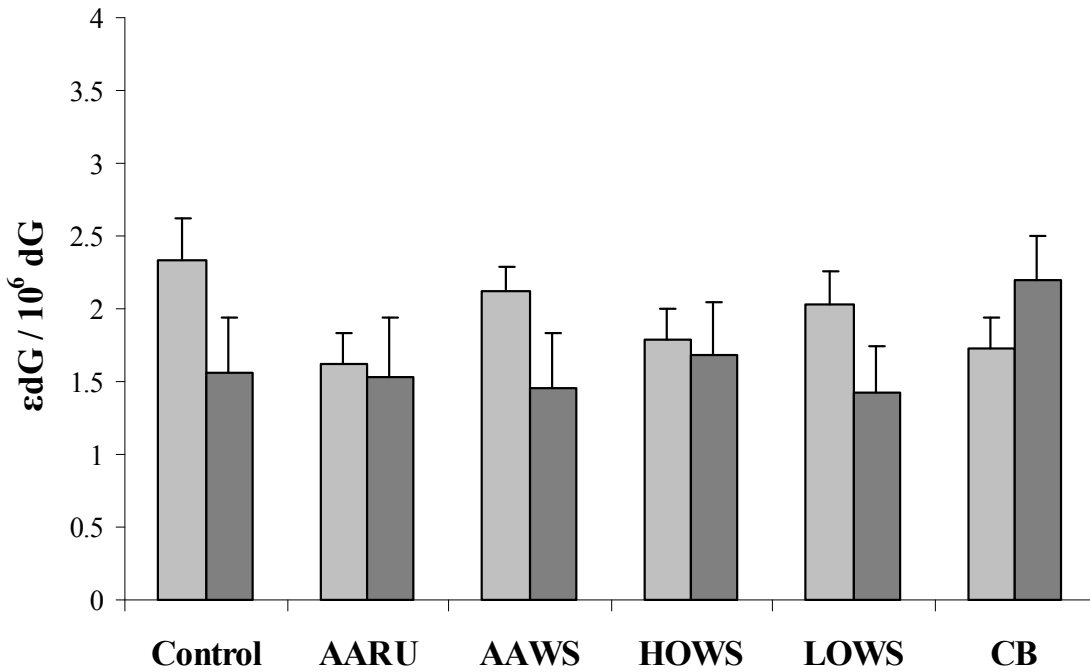
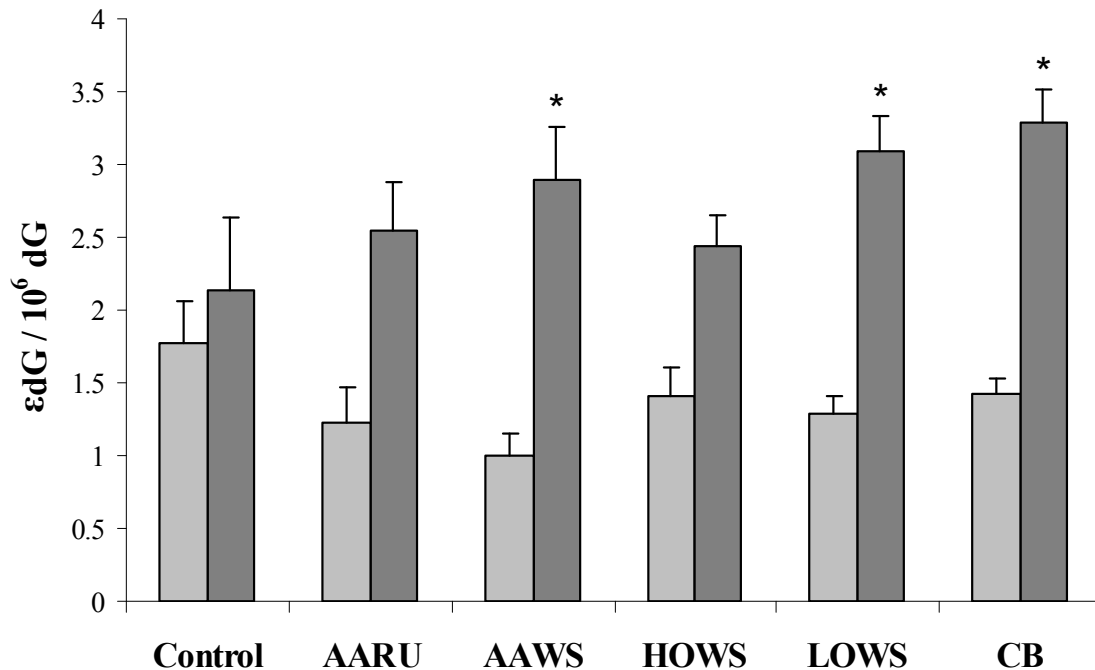
Relative mRNA expression, in liver tissue after intratracheal instillation (light grey) and intragastric administration (dark grey) quantified by real-time RT-PCR. Bars and whiskers denote the mean \pm SEM in groups of rats exposed to 0 (control) and 0.64 mg/kg bodyweight of AARU (ambient air particulate from a rural area), AAWS (ambient air particulate from a wood stove rich area), HOWS (particles from a wood stove with normal O₂ supply), LOWS (particles from a wood stove with low O₂ supply) or CB. * P < 0.05 as compared with control.



Oxidized DNA expressed as 8-oxodG in lung (A) and liver (B) after intratracheal instillation (light grey) and intra-gastric administration (dark grey). Bars and whiskers denote the mean \pm SEM in groups of rats exposed to 0 (control) and 0.64 mg/kg bodyweight of AARU (ambient air particulate from a rural area), AAWS (ambient air particulate from a wood stove rich area), HOWS (particles from a wood stove with normal O₂ supply), LOWS (particles from a wood stove with low O₂ supply) or CB. * P < 0.05 as compared with control.



The etheno-adduct, ϵ dA in lung (A) and liver (B) after intratracheal instillation (light grey) and intra-gastric administration (dark grey). Bars and whiskers denote the mean \pm SEM in groups of rats exposed to 0 (control) and 0.64 mg/kg bodyweight of AARU (ambient air particulate from a rural area), AAWS (ambient air particulate from a wood stove rich area), HOWS (particles from a wood stove with normal O₂ supply), LOWS (particles from a wood stove with low O₂ supply) or CB. * P < 0.05 as compared with control.

A**B**

The etheno-adduct, ϵ dG in lung (A) and liver (B) after intratracheal instillation (light grey) and intragastric administration (dark grey). Bars and whiskers denote the mean \pm SEM in groups of rats exposed to 0 (control) and 0.64 mg/kg bodyweight of AARU (ambient air particulate from a rural area), AAWS (ambient air particulate from a wood stove rich area), HOWS (particles from a wood stove with normal O₂ supply), LOWS (particles from a wood stove with low O₂ supply) or CB. * P < 0.05 as compared with control.

