



Työterveyslaitos | Arbetshälsöinstitutet
Finnish Institute of Occupational Health

Nanohiukkasten perimämyrkyllisyyden perusta

LOPPURAPORTTI TYÖSUOJELURAHASTON HANKKEESTA N:O 112248

Hannu Norppa
Kirsi Siivola
Kukka Aimonen
Satu Suhonen
Saila Pesonen
Gerard Vales
Hanna Lindberg
Joonas Koivisto
Kai Savolainen
Julia Catalán





Työterveyslaitos | Arbetshälsoinstitutet
Finnish Institute of Occupational Health

Nanohiukkasten perimämyrkyllisyyden perusta

LOPPURAPORTTI TYÖSUOJELURAHASTON HANKKEESTA N:O 112248

Hannu Norppa, Kirsi Siivola, Kukka Aimonen, Satu Suhonen, Saira Pesonen,
Gerard Vales, Hanna Lindberg, Joonas Koivisto, Kai Savolainen, Julia Catalán

Työterveyslaitos

Helsinki



Työterveyslaitos

Työympäristö

PL 40

00251 Helsinki

www.ttl.fi

© 2017 Työterveyslaitos ja kirjoittajat

Julkaisu on toteutettu Työsuojelurahaston tuella.

Tämän teoksen osittainenkin kopiointi on tekijänoikeuslain (404/61, siihen myöhemmin tehtyine muutoksineen) mukaisesti kielletty ilman asianmukaista lupaa.

ISBN 978-952-261-744-6 (nid.)

ISBN 978-952-261-743-9 (PDF)

Juvenes Print, Tampere 2017

TIIVISTELMÄ

Hankeen tavoitteena oli selvittää (a) hiilinanoputkialtistumisesta aiheutuvan keuhkotulehduksen merkitystä perimämyrkyllisten (genotoksisten) vaikutusten synnyssä hiirten keuhkoissa, (b) hiilinanoputkialtistumisesta aktivoituvien tulehdussolujen tuottamien genotoksisten tekijöiden vaikutusta soluviljelmissä, (c) astman merkitystä tekijänä, joka voisi mahdollisesti lisätä alttiutta hiilinanoputkien genotoksisille vaikutuksille ja (d) hiukkaskoon, soluun kulkeutumisen ja solunsisäisen liukenemisen merkitystä osittain liukoisten metallioksidinanohiukkasten genotoksisuudessa.

Tutkimuksissa havaittiin, että 4 päivän inhalaatioaltistus syöpävaarallisiksi tunnetuille pitkille ja suorille hiilinanoputkille (MWCNT-S) johti hiirten keuhkoissa tulehduksen lisäksi genotoksiseen vaikutukseen keuhkosyövän kohdesoluissa (tyypin II alveolaariset solut). Sen sijaan lyhyiden ja taipuisien hiilinanoputkien (MWCNT-T) hengittäminen ei aiheuttanut genotoksista vaikutusta eikä tulehdusta keuhkoissa. Kummallakaan hiilinanoputkityypillä ei ollut systeemistä genotoksista vaikutusta luuytimessä tai verisoluisia. Tuloksemme osoittavat, että pitkien ja suorien hiilinanoputkien hengittäminen saa keuhkoissa aikaan genotoksisia vaikutuksia, joita ei nähdä lyhyillä ja taipuisilla hiilinanoputkilla. Genotoksisuus saattaa olla tärkeä osatekijä MWCNT-S:n syöpävaarallisuudessa.

Tulehduksen ja genotoksisuuden välistä yhteyttä tutkittiin myös muuntogeenisillä hiirilä, joilta puuttui *IL1R*-geeni (interleukiini 1:n reseptori). *IL-1R*:n katsotaan olevan keskeisessä roolissa tulehdusta ohjaavan inflammasomin aktivaatiossa. Jos inflammasomista riippuvainen tulehdus olisi tärkeää genotoksisten vaikutusten synnylle, hiilinanoputkialtistuksen tulisi aiheuttaa vähemmän DNA-vaurioita geenimuunneltujen kuin normaalien hiirien keuhkoissa. Inhalaatioaltistus MWCNT-S:lle aiheutti selvän paikallisen genotoksisen vaikutuksen hiirten keuhkoissa riippumatta *IL1R*-geenistä. Näinollen *IL1R* ei ole välttämätön MWCNT-S:n aiheuttaman genotoksisen vaikutuksen synnylle keuhkoissa. Systeemistä genotoksista vaikutusta ei nähty luuytimen, veren tai pernan soluissa.

Tulehdussolujen tuottamien genotoksisten tekijöiden roolia MWCNT-S:n aiheuttaman genotoksisen vaikutuksen synnyssä tutkittiin epiteelisolujen ja tulehdussolujen yhteisviljelmissä. Insertissä olevia ihmisen makrofaageja käsiteltiin MWCNT-S:llä, ja genotoksista vaikutusta tarkasteltiin insertin toisella puolella kasvatettavissa epiteelisoluissa. Lisäksi MWCNT-S:llä käsittelyiltä hiiriltä keuhkokuuhtelulla kerättyjä tulehdussoluja lisättiin inserttiin ja viljeltiin yhdessä insertin ulkopuolella kasvavien epiteelisolujen kanssa. MWCNT-S-käsiteltyjen hiirten keuhkokuuhtelunäytteen soluilla näytti olevan kyky tuottaa genotoksisia tekijöitä, sillä DNA-vauriot lisääntyivät epiteelisoluissa insertin toisella puolella.

Astmaiset hiiret eivät olleet terveitä eläimiä herkempiä MWCNT-S:n genotoksisille vaikutuksille. Itse asiassa hiilinanoputkikäsitteilyn genotoksinen vaikutus voitiin osoittaa vain ei-astmaisilla hiirillä. Astmaisilla hiirillä DNA-vaurioiden perustaso keuhkoissa oli selkeästi kohonnut MWCNT-S:stä riippumatta. Astmaisilla hiirillä DNA-vaurioiden määrä oli koholla myös veren valkosoluissa, mikä viittasi siihen, että astmaan liittyvä tulehdus tai oksidatiivinen stressi saivat aikaan yleisen genotoksisen vaikutuksen.

Osittain liukoisten sinkkioksidi- (ZnO) ja kuparioksidhiukkasten (CuO) genotoksisuutta ja kulkeutumista soluun tutkittiin ihmisen keuhkoepiteelisoluilla (BEAS-2B). Sekä nanokokoinen että (hiukkaskooltaan suurempi) hienojakoinen ZnO olivat solutoksia kapealla ja alhaisella annosalueella ja aiheuttivat kromosomimuutoksia (mikrotumia) 48 tunnin käsitelyssä. Kuitenkin vain nanokokoinen ZnO lisäsi DNA-vaurioita 3 ja 6 tunnin käsitelyllä. Tulokset selittyvät luultavasti sillä, että ZnO nanohiukkaset liukenevat solun sisällä hyvin nopeasti – niitä ei näkynyt lainkaan hyperspektraalimikroskoopissa tunnin kuluttua käsitelystä. Hienojakoisilla ZnO-hiukkasilla liukeneminen kestää hieman kauemmin.

Nanokokoiset CuO-hiukkaset olivat solutoksisempia ja aiheuttivat DNA-vaurioita selvästi alhaisemmilla annoksilla ihmisen keuhkoepiteelisoluissa kuin mikrokokoiset CuO-hiukkaset. CuO-nanohiukkaset aiheuttivat soluissa myös mikrotumia ja hidastivat solusykliä. CuO näytti liukenevan epiteelisoluissa hitaammin kuin ZnO. Hyperspektraalimikroskooppianalyysin perusteella CuO-nanohiukkasia oli soluissa paljon enemmän kuin mikrohiukkasia. Epiteelisolut näyttivät siis ottavan tehokkaammin sisään nano- kuin mikrohiukkasia. Luultavasti Cu^{+2} -ionien solunsisäinen pitoisuus kohoaa nopeammin korkeammalle nanohiukkasten kuin mikrohiukkasten kohdalla, mikä selittää nanokoisen CuO:n suuremman solu- ja genotoksisuuden. Hiukkaskoolta voidaan olettaa olevan vaikutusta myös ihmisen hengitysteitse tapahtuvassa altistumisessa CuO-hiukkasille niin, että pienemmät hiukkaset ovat toksisempia.

ABSTRACT

The project aimed at clarifying (a) the role of carbon nanotube –induced pulmonary inflammation in the formation of genotoxic effects in mouse lungs, (b) the *in vitro* effect of genotoxic factors produced by activated inflammatory cells after treatment with carbon nanotubes (CNTs), (c) the significance of asthma as a factor that could increase susceptibility to the genotoxic effects of CNTs and (d) the impact of particle size, cellular uptake and intracellular dissolution in determining the genotoxicity of partly soluble metal oxide nanoparticles.

In murine lungs, a 4-day inhalation exposure to carcinogenic and inflammogenic long and straight multi-walled carbon nanotubes (MWCNT-S) was observed to lead to a genotoxic effects in the target cells of lung carcinogenesis (type II alveolar cells). However, inhalation of long and tangled multi-walled carbon nanotubes (MWCNT-T) did not produce genotoxic effects or inflammation in the lungs. Neither of the CNT types had a systemic genotoxic influence in the bone marrow or blood cells. Our results show that the inhalation of MWCNT-S produces local genotoxic effects which are not seen with MWCNT-T. Genotoxicity may be an important factor in the known carcinogenicity of MWCNT-S.

The association of inflammation and genotoxicity was also studied with genetically engineered mice that were deficient of the *IL1R* (interleukin 1 receptor) gene. IL-1R is considered to play a crucial role in the activation of the inflammasome which controls inflammation. If inflammasome-dependent inflammation is important in the formation of genotoxic effects, exposure to CNTs should induce less DNA damage in the lungs of the knock-out than normal mice. Inhalation exposure to MWCNT-S caused a clear local genotoxic effects in murine lungs irrespective of the *IL1R* gene. Thus, *IL1R* is not necessary for the genotoxic effects induced by MWCNT-S in the lungs. No genotoxic effects were seen in cells of the bone marrow, blood or spleen.

The role of genotoxic factors produced by inflammatory cells in response to MWCNT-S was studied in co-cultures of epithelial cells and inflammatory cells. Macrophages in cell culture inserts were treated with MWCNT-S, and genotoxic effects were examined on human bronchial epithelial BEAS-2B cells grown on the other side of the insert. In other experiments, inflammation was induced in mice by a treatment with MWCNT-S, and inflammatory cells collected by bronchoalveolar lavage were added to the insert and cultured together with epithelial cells grown outside the insert.

Asthmatic mice were not more sensitive than healthy mice to the genotoxicity of MWCNT-S. In fact, the genotoxic effect of MWCNT-S was obvious only in non-asthmatic mice. In the asthmatic mice, the baseline level of DNA damage in the lungs was elevated irrespective of MWCNT-S. Asthma was also associated with an increase in DNA damage

in blood leukocytes, suggesting a general genotoxic effect of the lung inflammation or oxidative stress present in asthma.

The genotoxicity and cellular uptake of partly soluble zinc oxide (ZnO) and copper oxide (CuO) nanoparticles was studied in BEAS-2B cells. Both nanosized and fine ZnO were cytotoxic within a narrow and low dose area and induced micronuclei in a 48-h treatment. Nevertheless, only nanosized ZnO increased the level of DNA damage after 3-h and 6-h treatment. These results are possibly explained by the fact that ZnO nanoparticles were dissolved inside the cell very quickly – hyperspectral microscopy showed no presence of particles in the cells an hour after the treatment. The dissolution of fine ZnO particles probably takes a bit longer, so that their genotoxic effects could only be seen in the longer treatment applied in the micronucleus assay.

CuO nanoparticles were more cytotoxic and induced DNA damage in BEAS-2B cells at clearly lower doses than microsized CuO particles. Nanosized CuO also induced micronuclei and a delay in cell cycle of BEAS-2B cells. CuO seemed to be dissolved in epithelial cells slower than ZnO. Based on hyperspectral microscopy, the cells contained much more nanosized than microsized particles and therefore appeared to more efficiently take up nanosized than microsized particles. Thus it can be assumed that the intracellular concentration of Cu^{+2} ions will be higher in the case of nanosized than microsized CuO particles, which probably explains the higher cytotoxicity and genotoxicity of nanosized CuO. Particle size can be expected to play a role also in human inhalation exposure to CuO, so that smaller particles have higher toxic effects than larger particles.



SISÄLLYS

1	LÄHTÖKOHTA JA TAUSTAT	9
1.1	Pitkät ja suorat hiilinanoputket - uusi asbesti?	10
1.2	Hiilinanoputkien genotoksisuus ja tulehdus - klastogeeniset tekijät.....	12
1.3	Osittain liukoiset metalliset nanohiukkaset - Troijan hevonen?.....	13
2	TAVOITTEET, TULOKSIEN HYÖTY JA SOVELLETTAVUUS	14
3	TEHTÄVÄT JA MENETELMÄT	15
3.1	Tutkitut nanomateriaalit.....	15
3.2	Hiilinanoputket: genotoksiset vaikutukset ja tulehdus hiirillä.....	15
3.2.1	Hiilinanoputkien genotoksisuus hiirillä.....	16
3.2.2	Pitkien, suorien hiilinanoputkien genotoksisuus <i>IL1R</i> -poistogeenisillä hiirillä.....	17
3.3	Tulehdussolujen tuottamien genotoksisten tekijöiden merkitys.....	18
3.3.1	In vitro.....	18
3.3.2	Ex vivo.....	20
3.4	Astma hiilinanoputkien genotoksisuuden alttiustekijänä.....	23
3.5	Osittain liukoisen metallioksidin genotoksisuuden perusta	24
3.5.1	ZnO.....	24
3.5.2	CuO.....	25
4	TULOKSET	26
4.1	Hiilinanoputket: genotoksiset vaikutukset ja tulehdus hiirillä.....	26
4.1.1	Hiilinanoputkien genotoksisuus hiirillä.....	26
4.1.2	Pitkien, suorien hiilinanoputkien genotoksisuus <i>IL1R</i> -poistogeenisillä hiirillä.....	29
4.2	Tulehdussolujen tuottamien genotoksisten tekijöiden merkitys.....	31
4.2.1	In vitro.....	31
4.2.2	Ex vivo.....	32
4.3	Astma hiilinanoputkien genotoksisuuden alttiustekijänä.....	36
4.4	Osittain liukoisen metallioksidin genotoksisuuden perusta	39



4.4.1	ZnO.....	39
4.4.2	CuO.....	41
5	POHDINTA ja johtopäätökset.....	44
5.1	Hiilinanoputket: genotoksiset vaikutukset ja tulehdus hiirillä.....	44
5.2	Tulehdussolujen tuottamien genotoksisten tekijöiden merkitys.....	45
5.3	Astma hiilinanoputkien genotoksisuuden alttiustekijänä.....	46
5.4	Osittain liukoisien metallioksidihukkasten genotoksisuuden perusta.....	47
6	TIEDOTUS JA MUU TIEDON HYÖDYNTÄMINEN.....	49
7	LÄHTEET	51

1 LÄHTÖKOHTA JA TAUSTAT

Nanomateriaalien valmistus, tutkimus ja tuotekehittäminen ovat voimakkaasti lisääntymässä maailmanlaajuisesti. Nanotechnology Consumer Products Inventory (CPI) on listannut yli 1800 kuluttajatuotetta, joissa ilmeisesti käytetään nanomateriaaleja (Vance ym. 2015). Suomessakin yli 200 yrityksen on arvioitu hyödyntävän nanoteknologiaa. Nanomateriaalien suosion syynä ovat niiden usein poikkeukselliset ominaisuudet verrattuna kemiallisesti samanlaisiin, tavanomaisiin materiaaleihin. Euroopan komission (2011) määritelmän mukaan nanomateriaalilla tarkoitetaan materiaalia, jonka sisältämistä hiukkasista vähintään 50 % lukumääräperusteisen kokojakauman mukaisesti on kooltaan 1–100 nm tai jonka ulkomiotoista yksi tai useampi on 1–100 nm. Nanohiukkaset ovat siis virusten kokoluokkaa ja huomattavasti pienempiä kuin elimistön solut.

Synteettisille nanomateriaaleille altistuvien työntekijöiden määrän arvioidaan nousevan lähitulevaisuudessa miljooniin ja altistuvien kuluttajien satoihin miljooniin. Uusia synteettisiä nanomateriaaleja tulee markkinoille kiihtyvällä tahdilla. Tämä ominaisuus asettaa suuria haasteita nanomateriaalien toksikologiselle testaukselle ja riskinarvioinnille. Viime vuosina tietämys nanomateriaalien mahdollisista haitoista on aktiivisen tutkimuksen ansiosta kohentunut, joskin suuri osa tiedosta koskee edelleenkin vain muutamaa nanohiukkastyyppeä, eikä toksisia vaikutusmekanismeja tunneta riittävästi (Savolainen ym. 2013; Alenius ym. 2014; Krug 2014; Savolainen 2016). Osalla nanomateriaaleista on havaittu olevan osin uudenlaisia toksisia ominaisuuksia (Huang ym. 2009; Savolainen ja Vainio 2011; Sargent ym. 2009, 2012; Rydman ym. 2013; Alenius ym. 2014). Näiden ominaisuuksien merkityksen ymmärtäminen on keskeinen kysymys nanomateriaalien riskinarvioinnissa.

Nanohiukkaset voivat päästä elimistöön keuhkojen, ruoansulatuskanavan, nenän hajuepiteelin ja mahdollisesti ihon kautta. Ammatillista altistumista nanopartikkelien tuotannon tai käytön yhteydessä tapahtuu erityisesti hengitysteitse (Savolainen ym. 2010; Koivisto ym. 2012; Guseva Canu ym. 2016). Keuhkoja suojaavilla syöjäsoluilla (makrofaageilla) näyttää olevan rajallinen kyky seuloa hengityksen mukana tulevia nanohiukkasia, jotka voivat näin kulkeutua varsinaiseen keuhkokudokseen (Geiser ym. 2008). Kudoksissa nanohiukkaset pääsevät solujen sisään eri tavoin kuin suuremmat hiukkaset tai saavat aikaan tulehduksen ja voivat näin aiheuttaa vaurioita.

Hiilinanoputket ja metallioksidit ovat tärkeimpiä nanomateriaaleja ja niiden tuotanto ja teknologinen käyttö kasvavat erittäin nopeasti. Viimeaikaiset tutkimukset ovat antaneet viitteitä siitä, että erityisesti pitkät ja suorat hiilinanoputket sekä eräät osittain liukoiset metallinanopartikkelit ovat perimämyrkyllisiä (genotoksisia).



Tämän tutkimusprojektin tarkoituksena oli selvittää hiilinanoputkien ja osittain liukoisten metallioksidinanohiukkasten genotoksisten vaikutusten perustaa ja luoda näin paremmat edellytykset nanomateriaalien turvallisuuden, varsinkin syöpävaarallisuuden arvioinnille.

1.1 Pitkät ja suorat hiilinanoputket - uusi asbesti?

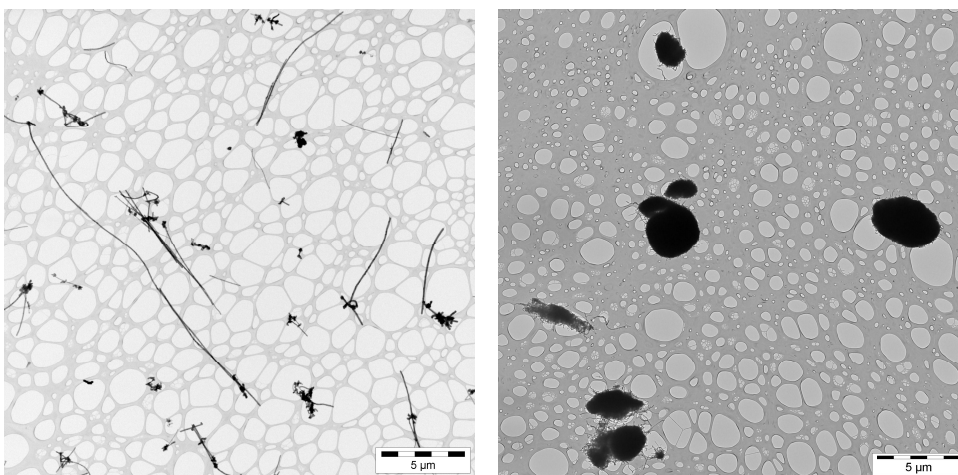
Hiilinanoputket muodostuvat kiteisen hiilen putkimaisista verkoista (Rao ja Govindaraj 2005). Putkien halkaisija on pienimmillään vain <1-3 nanometriä ja pituus vaihtelee sadoista nanometreistä kymmeniin, jopa satoihin mikrometreihin. Yksiseinäiset hiilinanoputket koostuvat yksittäisistä putkimaisista hiiliverkoista, kun taas moniseinäisissä hiilinanoputkissa on useita sisäkkäisiä hiiliputkiverkostoja. Hiilinanoputket ovat kevyitä, kestävät erittäin hyvin kemiallista käsittelyä ja korkeita lämpötiloja ja omaavat puolijohteen ja metallin ominaisuuksia (Smart ym. 2006; Sun ym. 2002; Ju-Nam ja Lead 2008). Hiilinanoputkien maailmanlaajuinen tuotanto on lisääntynyt muutaman vuoden aikana monituhattaisesta, joten niille altistumisen todennäköisyys on samalla nopeasti kasvanut. Hiilinanoputkien teolliset käyttömahdollisuudet ovat suuret, ja yhä useammat suomalaiset yritykset hyödyntävät tuotteittensa valmistamisessa hiilinanoputkia. Hiilinanoputkia käytetään muun muassa komposiittimateriaaleissa (mm. urheiluvälineet), elektronisissa laitteissa, polttokennoissa, kemiallisina sensoreina ja lääketieteessä (Poole ja Owens 2003; Gomez-Gualdrón ym. 2011; Zhao ja Liu 2012).

Viime aikoina huolta on aiheuttanut erityisesti se, että hiilinanoputket ja muut nanokuidut saattavat koe-olosuhteissa aiheuttaa asbestisairauksien kaltaisia, vakavia tautitiloja, kuten keuhkojen soluvälitilan sidekudoskasvua (vrt. asbestoosi), keuhkosyöpää ja keuhkopussin tai vatsakalvon pahanlaatuista mesotelioomaa (Poland ym. 2008; Shvedova ym. 2008; Takagi ym. 2008, 2012; Sakamoto ym. 2009; Park ym. 2011; Zhao ja Liu 2012).

Asbestista saadun tiedon perusteella oletetaan yleisesti, että pitkillä ja ohuilla kuiduilla, kun ne ovat elimistössä pysyviä, voi olla samanlaisia haittavaikutuksia kuin asbestilla. Haitallisten hiilinanoputkien kohdalla näyttää kuitenkin siltä, että on puhuttava pitkistä ja ”paksuista” kuiduista (Rydman ym. 2013). Mikä on ohutta mikroskaalassa, onkin paksua nanomaailmassa. Muutaman nanometrin vahvuiset, ohuimmat hiilinanoputket ovat yleensä varsin joustavia, ja voivat muodostaa sykeröitä (**Kuva 1**). Paksuimpien moniseinäisten hiilinanoputkien läpimitta voi olla yli 50 nanometriä, ja tällaiset kuidut ovat usein suoria ja neulamaisia muistuttaen asbestikuituja.

Erityisesti pitkät ja suorat moniseinäiset hiilinanoputket voivat - asbestin tavoin - aiheuttaa syöpää, keuhkofibroosia ja asbestoosin kaltaisia tulehdusreaktioita (Poland ym. 2008; Shvedova ym. 2008; Takagi ym. 2008, 2012; Sakamoto ym. 2009). Näitä vaikutuksia on kuvattu sekä hiirellä että rotalla. Pitkät (>10 µm), monikerroksiset nanoputket aiheuttivat

tulehdusta ja granuloomia (kiinteitä makrofaagikertymiä) hiirten vatsaontelon mesoteliissä, kun taas lyhyemmällä (<5 µm) putkilla ei ollut samanlaista vaikutusta (Poland ym. 2008). Vatsaontelon tai kivespussin altistaminen hiilinanoputkille tuotti hiirille ja rotille pahanlaatuisia mesoteliomia enemmän kuin krokidoliitti-asbesti (Takagi ym. 2008; Sakamoto ym. 2009; Nagai ym. 2011; Rittinghausen ym. 2014). Mesoteliomaa syntyi jo varsin alhaisilla hiilinanoputkiannoksilla (Takagi ym. 2012). Kansainvälinen syöväntutkimusjärjestö (IARC, International Agency for Research on Cancer) on luokitellut yhden pitkän ja suoran hiilinanoputkityypin (MWCNT-7, **Kuva 1**) ihmiselle mahdollisesti syöpävaaralliseksi (Grosse ym. 2014). MWCNT-7:n on osoitettu aiheuttavan myös keuhkosyöpää 2 vuoden inhalaatioaltistuksessa rotilla (Kasai ym. 2016) ja toimivan tuumoripromootorina hiiren keuhkosyöpämallissa (Sargent ym. 2014). Toinen, samankaltainen MWCNT-tyyppi lisäsi transtrakeaalisen intrapulmonaarisen aerosolinä annosteltuna keuhkosyöpää ja mesoteliomaa rotilla (Suzui ym. 2016).



Kuva 1. Altistuskammiosta kerättyjä ilmanäytteitä transmissioelektronimikroskooppissa kokeesta, jossa hiiriä altistettiin inhalaatiolla moniseinäisille hiilinanoputkille. Vasemmalla olevat, syöpävaaralliseksi osoitetut MWCNT-7-hiilinanoputket ovat jäykkiä ja suorita (tässä raportissa MWCNT-S), kun taas oikealla olevat, taipuisat hiilinanoputket ovat muodostuneet sykeröistä. (Kuvat: Esa Vanhala).

Hiilinanoputkien havaittiin myös aiheuttavan genotoksisia muutoksia hiiren ja rotan keuhkosoluissa (Muller ym. 2008a,b; Shvedova ym. 2008) ja soluviljelmillä tehdyissä tutkimuksissa (Kisin ym. 2007; Li ym. 2007a,b; Zhu ym. 2007; Lindberg ym. 2009, 2013; Catalán ym. 2012). Aiemmassa TSR-hankeessamme MWCNT-7 oli genotoksinen sekä ihmisen viljellyissä epiteelisoluissa että hiiren keuhkoissa (Rydman ym. 2013).

1.2 Hiilianoputkien genotoksisuus ja tulehdus - klastogeeniset tekijät

Edellisessä TSR:n rahoittamassa hankkeessamme (Rydman ym. 2013) havaitsimme, että pitkät, suorat hiilianoputket tuottavat DNA-vaurioita sekä soluviljelmässä että hengitysteitse altistettujen hiirten keuhkosoluissa. Genotoksinen vaikutus oli erityisen selvä hiirillä. Samalla keuhkoissa nähtiin voimakas tulehdus. Vaikka yleisesti otaksutaan, että nanohiukkasten genotoksisuus koe-eläimillä on sekundäärinen seuraus tulehdusprosessista, siihen liittyvästä oksidatiivisesta stressistä ja hapen reaktiivisten välituotteiden syntymisestä (Donaldson ym. 2010; Borm ym. 2011), asia on tällä hetkellä varsin epäselvä. Hiilianoputkien ja muiden nanohiukkasten riskinarvioinnin kannalta on keskeistä ymmärtää, syntykö genotoksinen vaikutus tulehduksen tai oksidatiivisen stressin seurauksena vai onko se tulehduksesta riippumaton ilmiö (Greim ja Norppa 2010). Edellisessä tapauksessa perimämyrkyllisellä vaikutuksella on kynnysarvo, jälkimmäisessä todennäköisesti ei. Aiemman tutkimuksemme lisäksi on muutamia muitakin esimerkkejä siitä, että nanohiukkasaltistus saa aikaan sekä tulehduksen että genotoksinen vaikutuksen (Driscoll ym. 1997; Trouiller ym. 2009; Bourdon ym. 2012). Toisaalta genotoksinen vaikutus on kuvattu myös ilman tulehdusta ja tulehdus ilman genotoksista vaikutusta (Lindberg ym. 2012; Saber ym. 2012). Kaiken kaikkiaan koe-eläintutkimuksia, joissa olisi samanaikaisesti tarkasteltu sekä tulehdusta että genotoksista vaikutusta, on vain muutama. Koska hiilianoputket ovat genotoksisia myös soluviljelmässä (esim. Lindberg ym. 2009, 2013, Rydman ym. 2013), joissa useimmat tulehduksen osatekijöistä eivät ole läsnä, on ilmeistä, että tulehdus yksin ei ole ratkaiseva tekijä. Viimeaikaiset tuloksemme viittaavat siihen, että hiilianoputket vaikuttavat viljeltyjen solujen mitokondrioihin ja saavat aikaan uudenlaisen radikaalin muodostumiseen (Nymark ym. 2014, 2015).

Erittäin mielenkiintoinen kysymys tässä yhteydessä ovat ns. klastogeeniset tekijät - solujen erittämät aineet, jotka pilkkovat kromosomeja ja ovat siis genotoksisia (Lindholm ym. 2010). Klastogeenisiä tekijöitä on löydetty mm. ionisoivalle säteilylle altistuneilta ja eräitä kroonisia tulehdussairauksia (nivelreuma, punahukka, systeeminen skleroosi) sairastavilta (Emerit 2007). Klastogeenisen tekijän ilmaantuminen näyttää liittyvän oksidatiiviseen stressiin ja erityisesti superoksidin muodostumiseen. Klastogeeninen tekijä lisää uuden superoksidin tuotantoa monosyyteissä ja neutrofiileissä, minkä arvellaan johtavan itseään ylläpitävään genotoksiseen prosessiin. Monosyytit ja neutrofiilit ovat valkosoluja, joilla on keskeinen rooli myös tulehduksessa.

Klastogeenisen tekijän kemiallista luonnetta ei tunneta, mutta se on yhdistetty solun kalvorakenteiden rasvojen härskiintymisessä syntyviin arakidonihapon aineenvaihduntatuotteisiin, nukeliinihappojen eräisiin epätavallisiin rakenneosiin sekä sytokiineihin kuten tuumorinekroosifaktori alfa (Emerit 2007; Lindholm ym. 2010), joka on tärkeä välttämättömyys

tulehduksessa. Klastogeenisen tekijän kemiallinen tunnistaminen ei kuitenkaan ole tarpeen, sillä sen läsnäolo esim. keuhkokuuhtelunäytteessä voidaan osoittaa toiminnallisesti genotoksisuustestillä. Tähän mennessä tätä ilmeistä mahdollisuutta ei ole kuitenkaan tutkittu nanomateriaalien yhteydessä. Tässä projektissa selvitimme asiaa.

1.3 Osittain liukoiset metalliset nanohiukkaset - Troijan hevonen?

Nanotoksikologian avainkysymyksiä on, edistääkö pieni hiukkaskoko nanopartikkeleiden kulkeutumista soluihin ja leviämistä elimistöön ja johtaako tämä, nanopartikkeleiden muiden poikkeuksellisten ominaisuuksien ohella, lisääntyneisiin haittavaikutuksiin (Oberdörster 2008; Norppa ja Greim 2009; Greim ja Norppa 2010; Cho ym. 2011). Osittain liukoiset, myrkylliset metallinano hiukkaset näyttävät muodostavan tässä yhteydessä erityisen ongelmallisen aineryhmän.

Cho ym. (2011) ovat esittäneet, että nanokokaisen sinkkioksidin (ZnO) rotilla aiheuttama vakava keuhkovaurio johtuu siitä, että ZnO-hiukkaset menevät fagosytoosiin (solusyönnin) avulla tehokkaasti sisälle soluihin, joissa ne nopeasti liukenevat. Liukenemista edistää suuresti se, että soluorganellisissa (fagosomi, myöhemmin lysosomi), johon "syöty" hiukkanen joutuu, on happamat olosuhteet. Hiukkasmuotoisella sinkillä on selvempi toksinen vaikutus kuin liukoisella sinkillä. Ilmiö on nimetty Troijan hevosen mukaan. ZnO- ja kuparinano hiukkasten tulehdusvaikutus rotan keuhkoissa on voimakkaampi ja piirteiltään erilainen kuin liukoisen sinkin ja kuparin vaikutus (Cho ym. 2010).

Koska nanohiukkaset liukenevat suurempia partikkeleja nopeammin, on odotettavissa, että nanokokoinen ZnO tai kuparioksidi (CuO) on haitallisempaa kuin esim. hienojakoinen ZnO tai CuO. Tämä on osoitettu kuparioksidin (CuO) nanohiukkasilla, jotka aiheuttivat soluviljelmissä monta kertaa enemmän DNA-vaurioita kuin karkeammat hiukkaset (Karls-son ym. 2009; Semisch ym. 2014).

Myös ZnO-nanohiukkaset ovat selvästi genotoksisia (Dufour ym. 2006). Aiemmissä solutesteissämme nanokokoinen ZnO aiheutti DNA-vaurioita ja mikrotumia jo hyvin alhaisilla annoksilla; mikrotumia syntyi sekä kromosomien katkeamisen että solun jakautumisen häiriöiden seurauksena (Siivola ym. 2017; Lindberg ym. 2017). Koska Troijan hevonen - ilmiö saattaa olla tärkeässä asemassa metallihiukkasiin liittyvän syövän kehittymisessä, on selvitettävä, selittääkö se myös ZnO:n ja muiden osittain liukoisten nanometallien genotoksisuuden. Tätä kysymystä tutkittiin tässä hankkeessa mm. hyödyntäen hyperspektraalista mikroskooppia nanohiukkasten paikantamisessa soluissa. Hyperspektraalimikroskoopin avulla eri nanomateriaalit voidaan tunnistaa kudoksista tai soluista ilman kemiallisia tai radioaktiivisia leimoja pimeäkenttäteknikan ja materiaaleille tyypillisen spektrin ja avulla.

2 TAVOITTEET, TULOKSIEN HYÖTY JA SOVELLETTAVUUS

Hankkeen tarkoituksena oli tutkia, miten haitallisiksi epäillyt nanohiukkaset saavat aikaan genotoksisia vaikutuksia.

Projektin tavoitteina oli selvittää:

a) hiilinanoputkialtistumisesta aiheutuvan keuhkotulehduksen merkitystä genotoksisten vaikutusten synnyssä hiirten keuhkoissa. Normaaleja ja geneettisesti manipuloituja hiiriä hyödyntävän tutkimuksen odotettiin tuottavan uutta tietoa genotoksisen vaurion ja tulehduksen välisestä suhteesta.

b) hiilinanoputkialtistumisesta aktivoituvien tulehdussolujen tuottamien genotoksisten tekijöiden vaikutusta soluviljelmissä. Epiteelisolujen ja tulehdussolujen yhteisviljelmiä hyödyntävällä tutkimuksella pyrittiin selvittämään makrofaagien ja keuhkokuuhtelunäytteen solujen kykyä välittää hiilinanoputkikäsittelyn vaikutusta.

c) astman merkitystä tekijänä, joka voisi mahdollisesti lisätä alttiutta hiilinanoputkien genotoksille vaikutuksille. Hiiren astmamallia käytettiin hyväksi tutkittaessa, ovatko astmaattiset yksilöt tavallista herkempiä hiilinanoputkille.

d) miten osittain liukoisten metallioksidinanohiukkasten koko, kulkeutuminen soluun ja liukeneminen solussa vaikuttavat niiden genotoksisuuteen. Soluviljelmissä tutkittiin mm. hyperspektraalimikroskopiolla, kuinka nanokokoiset ja mikrokokoiset tai hienojakoiset sinkkioksidi- ja kuparioksidinanohiukkaset kulkeutuvat soluun ja liukenevat happamissa soluorganelleissa ja miten tämä heijastuu niiden genotoksiseen vaikutukseen (Troijan hevonen -ilmiö).

Hankkeessa hyödynnettiin osin (kohdat a ja c) Suomen Akatemian rahoittaman projektin "Hiilinanomateriaalien aiheuttamat tulehdusreaktiot" (päättö 139115) eläinaltistuksia. Näin vähensimme tarvittavien koe-eläinten määrää ja jaoimme kustannukset. Akatemian hanke keskittyi immunotoksikologiaan, kun nyt raportoitavan hankkeen aiheena olivat genotoksikologiset vaikutukset.

Hankkeessa oli alun perin tarkoitus myös selvittää, pystyvätkö nanohiukkaset aiheuttamaan sellaisia genotoksisia muutoksia, joita nykyiset testit eivät paljasta. Koska projektin rahoitus toteutui vain osittain, tämä osa jätettiin hankkeesta kuitenkin pois.

Syntynyttä tietoa voidaan käyttää suoraan nanohiukkasten vaaran- ja riskinarvioinnissa.

3 TEHTÄVÄT JA MENETELMÄT

3.1 Tutkitut nanomateriaalit

- **Moniseinäiset hiilinanoputket:** kaksi mitoiltaan erilaista materiaalia:

- a) *MWCNT-S*, pitkät, suorat ja paksut (MWCNT-XNRI-7, Mitsui & Co, Ltd, Tokyo, Japani). Kuidut keskimäärin 60–74 nm x 4 µm, ks. **Kuva 1**. IARC:n ihmiselle mahdollisesti syöpävaaralliseksi luokiteleva nanomateriaali (Grosse ym 2014).
- b) *MWCNT-T*, lyhyet, taipuisat ja ohuet (Cheap Tubes, Inc., Brattleboro, VT, USA). Kuidut keskimäärin 15–21 nm x 0,4 µm.

Käytetyt hiilinanoputket on karakterisoitu yksityiskohtaisesti aiemmin mm. pyyhkäisy- ja transmissioelektronimikroskopiolla ja energiadisersiivisellä röntgenspektrometrialla (ks. Catalán ym. 2016). Kumpaakin materiaalia tutkittiin myös aiemmassa TSR-hankkeessamme (Rydman ym 2013).

- **Kupari (II) oksidi:** kaksi kooltaan erilaista, päällystämätöntä materiaalia (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Saksa):

- a) *Nanokokoinen CuO* (544868; primääripartikkelin läpimitta < 50 nm).
- b) *Mikrokokoinen CuO* (208841; primääripartikkelin läpimitta < 10 µm).

Käytetyt kuparioksidihiuksat on karakterisoitu yksityiskohtaisesti aiemmin (Semisch ym. 2014).

- **Sinkkioksiidi:** kaksi kooltaan erilaista, päällystämätöntä sinkkiittimateriaalia (Umicore Zinc Chemicals, Angleur, Belgia):

- a) *Nanokokoinen ZnO* (ZANO®; primääripartikkelien läpimitta 30–35 nm).
- b) *Hienojakoinen ZnO* (Pharma B; primääripartikkelien läpimitta 150–300 nm).

Käytetyt sinkkioksidihiuksat on karakterisoitu mm. pyyhkäisy- ja transmissioelektronimikroskopiolla, energiadisersiivisellä röntgenspektrometrialla ja röntgendiffraktiometrialla (Roszak ym. 2016).

3.2 Hiilinanoputket: genotoksiset vaikutukset ja tulehdus hiirillä

Aiemmassa hankkeessamme havaitsimme, että faryngalisella aspiraatiolla annosteltu MWCNT-S tuottaa hiirille keuhkotulehduksen ja DNA-vaurioita keuhkosoluissa (Rydman ym. 2013). Sen sijaan MWCNT-T ei aiheutti vain lievän tulehduksen eikä DNA-vaurioita. Myös inhalaatioaltistuksessa MWCNT-S sai aikaan selkeän tulehduksen ja DNA-vaurioita

keuhkoissa. Tässä hankkeessa selvitimme MWCNT-T:n genotoksisuutta inhalaatioaltistuksessa. Lisäksi tutkimme tarkemmin MWCNT-S-inhalaation genotoksisuutta ja mahdollista yhteyttä tulehduksen ja genotoksisuuden välillä.

3.2.1 Hiilinanoputkien genotoksisuus hiirillä

Edellisessä TSR-hankeessamme (Rydman ym. 2013) faryngaalisella aspiraatiolla annostellut pitkät ja suorat MWCNT-S-hiilinanoputket saivat aikaan annosvasteisen lisäyksen DNA-vaurioiden määrässä keuhkosoluissa. Paikallisesta genotoksisesta vaikutuksesta oli osoituksena myös se, että havaitsimme inhalaatioaltistuksen MWCNT-S:lle aiheuttavan DNA-vaurioita hiirten keuhkoissa ja keuhkohuuhtelunäytteen (BAL, brochoalveolar lavage) soluissa jo suhteellisen alhaisella altistustasolla ($8,2 \pm 1,7 \text{ mg/m}^3$; 4 pv, 4 h/pv). Tämän paikallisen genotoksisen vaikutuksen lisäksi MWCNT-S:llä ei ollut kuitenkaan systeemistä genotoksista vaikutusta, sillä DNA:n kaksijuosteisia katkoksia ilmentävien γ -H2AX-positiivisten valkosolujen osuus ei ollut lisääntynyt veressä, eikä luuytimessä havaittu nousua mikrotumia sisältävien punasolujen määrässä.

Nyt raportoitavassa hankkeessa selvitimme, kohdistuuko MWCNT-S:n genotoksinen vaikutus keuhkosyövän todennäköisiin kohdesoluihin hiirellä, tyypin II alveolaariin (ATII) soluihin ja Clara-soluihin käyttäen kehittämäämme mikrotumamenetelmää näille solutypeille (Lindberg ym. 2010).

Naaraspuoliset C57BL/6-hiiret (Scanbur AB, Sollentuna, Ruotsi) pidettiin neljän ryhmässä ruostumattomasta teräksestä valmistetuissa häkeissä, joiden pohjalla oli puulastuja, ja ne saivat vapaasti rehua (1314 FORTI; Altromin Spezialfutter GmbH & Co, Saksa) sekä vettä. Eläintilojen valo-pimeä-sykli oli 12 tuntia, lämpötila 20–21 °C ja suhteellinen kosteus 40–45 %. Hankkeen eläinkokeet tehtiin määräysten mukaisesti (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, Strasbourg, 18.3.1986, otettu käyttöön Suomessa 31.5.1990) ja niillä oli Etelä-Suomen aluehallintoviraston hankelupalautakunnan myöntämä lupa.

Hiiret altistettiin (6-8 hiirtä/ryhmä) MWCNT-S:lle inhalaatiolla neljänä päivänä viikossa (4 h/päivä). Kuitumateriaali saatettiin aerosolimuotoon leijupetigeneraattorilla, joka tuotti tasalaatuista hiilinanoputkiaerosolia altistuskammion ilmaan, josta mitattiin jatkuvasti hiilinanoputkien massapitoisuutta (punnituskapselille kerätty näyte), lukumäärää kondensatiohiukkaskaskurilla (CPC; Condensation Particle Counter) ja kokojakaumaa liikkuvuusko-
koluokittelijalla (SMPS, Scanning Mobility Particle Sizer) ja sähköisellä alipaineimpaktorilla (ELPI, Electrical Low Pressure Impactor). Keskimääräinen MWCNT-S-pitoisuus altistuskammiossa oli $10,8 \pm 2,8 \text{ mg/m}^3$. Verinäytteet kerättiin 48 h ja keuhkosolunäytteet 72 h altistuksen päättymisen jälkeen. ATII-solut sekä Clara-solut eristettiin aiemman mukaisesti

(Lindberg ym 2010). Punasoluista sekä ATII- ja Clara-soluista suoritettiin mikrotuma-analyysit. Menetelmät on kuvattu tarkemmin julkaisussamme (Catalán ym. 2016).

Tutkimuksissa selvitettiin lisäksi taipuisien hiilinanoputkien (MWCNT-T) genotoksisia vaikutuksia naaraspuolisilla C57BL/6-hiirillä.

Hiiret altistettiin (6-8 hiirtä/ryhmä) MWCNT-T:lle inhalaatiolla neljän tunnin ajan tai neljänä päivänä viikossa (4 h/päivä). Altistus tapahtui samalla tavalla kuin edellä on kuvattu. Keskimääräinen MWCNT-T-pitoisuus altistuskammiossa oli 17,54 mg/m³. Menetelmät on kuvattu yksityiskohtaisesti julkaisussamme (Catalán ym. 2016). Vuorokausi viimeisen altistuksen jälkeen hiiristä kerättiin BAL-, keuhkosolu-, luuydin-, verinäytteet. BAL-soluista ja keuhkosoluista tutkittiin DNA-vauriot (genotoksinen vaikutus kohdekudoksessa) komeettamenetelmällä käyttäen tietokoneavusteista fluoresenssimikroskooppista menetelmää (Falck ym. 2009; Lindberg ym. 2009, 2012). Luuydinäytteistä ja viljellyistä pernan lymfosyyteistä tutkittiin mikrotumat, kuten edellä on mainittu. MWCNT-T:llä saatuja tuloksia verrattiin MWCNT-S:llä saatuihin tuloksiin.

Hiirikokeista saadut immunotoksikologiset tulokset, jotka eivät olleet osa nyt raportoitavaa hanketta, on osin julkaistu koskien tulehdussolujen jakaumaa BAL-näytteessä, tulehdusreaktion välittäjäaineita BAL-näytteen supernatantissa ja tulehdusreaktion osallistuvien geenien ilmentymistä (RNA-tasolla) keuhkokudoksessa (Rydman ym. 2014).

3.2.2 Pitkien, suorien hiilinanoputkien genotoksisuus *IL1R*-poistogeenisillä hiirillä

Tulehduksen osatekijöiden roolia genotoksinen vaikutuksen synnyssä tutkittiin tarkemmin käyttämällä geneettisesti manipuloituja *IL1R*^{-/-}-hiiriä, joilta puuttui interleukiini 1:n (IL-1) tyypin I reseptori (kanta B6.129S7-Il1r1^{tm1Imx}/J, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) (ks. Rydman ym. 2015). IL-1R:n katsotaan olevan keskeisessä roolissa tulehdusta ohjaavan inflammasomin aktivaatiossa. Hiilinanoputkien aiheuttaman tulehduksen odotetaan siksi olevan tavallista lievempi *IL1R*-poistogeenisillä hiirillä (ks. Rydman ym. 2015). Jos inflammasomista riippuvainen tulehdus on tärkeää genotoksisten vaikutusten synnylle, hiilinanoputkialtistuksen tulisi aiheuttaa vähemmän DNA-vaurioita geenimuunneltujen kuin normaalien hiirien keuhkoissa.

Tutkimus tehtiin inhalaatioaltistuksella (4 h ja 4 päivää, 4 h/päivä) samalla tavoin kuin taipuisille hiilinanoputkille tehdyssä altistuskokeessa (ks. 3.2.1) mutta alhaisemmalla pitoisuudella (7,71 mg/m³). Altistussysteemi on kuvattu aiemmassa julkaisussa (Rydman ym. 2014). Poistogeenisten hiirten vertailuryhmänä toimivat normaalit C57BL/6-hiiret (*IL1R*^{-/-}-hiirten peruskanta). Solunäytteet kerättiin 24 h altistuksen päättymisen jälkeen. BAL-soluista ja keuhkosoluista tutkittiin paikalliset DNA-vauriot komeettatekniikalla käyttämällä samoja menetelmiä kuin aiemminkin (ks. Catalán ym. 2016). Luuytimen polykromaattisista punasoluista selvitettiin mikrotumallisten solujen osuus ja veren valkosoluista DNA:n

kaksijuosteiset katkokset (γ -H2AX-menetelmä; Westbrook ym. 2009). Lisäksi pernasoluja (lymfosyyttejä) viljeltiin ja niistä analysoitiin mikrotumien esiintyminen sytokineesiblokkitekniikalla (Record ym. 1995; Leopardi ym. 2010). Lisääntyminen luuydin- ja pernasolujen mikrotumien ja veren valkosolujen γ -H2AX-fokusten määrässä hengitysteitse tapahtuneen altistuksen jälkeen kuvastaa systeemistä genotoksista vaikutusta.

Kokeissa käytettiin negatiivista ja positiivista kontrolliryhmää sekä koodattuja valmisteita. Positiivisena kontrollikäsittelynä oli WC-Co (1 mg/hiiri, faryngaalisella aspiraatiolla) sekä syklofosfamidi (1 mg/kg, intraperitoneaalisesti).

3.3 Tulehdussolujen tuottamien genotoksisten tekijöiden merkitys

Tällä tutkimuksella pyrittiin saamaan tietoa aktivoituneiden tulehdussolujen (neutrofiilit, makrofaagit, monosyytit ja eosinofiilit) tuottamien klastogeenisten tekijöiden merkityksestä hiilinanoputkien genotoksisuudessa. Tätä varten pystytettiin yhteisviljelymenetelmä, jossa ihmisen epiteelisoluja viljeltiin membraani-inserttiin sijoitettujen, hiilinanoputkille *in vitro* tai *ex vivo* altistettujen tulehdussolujen kanssa. Epiteelisoluista tutkittiin DNA-vaurioiden esiintyminen komeettamenetelmällä. Tutkimuksessa käytettiin negatiivista ja positiivista kontrollia sekä koodattuja valmisteita.

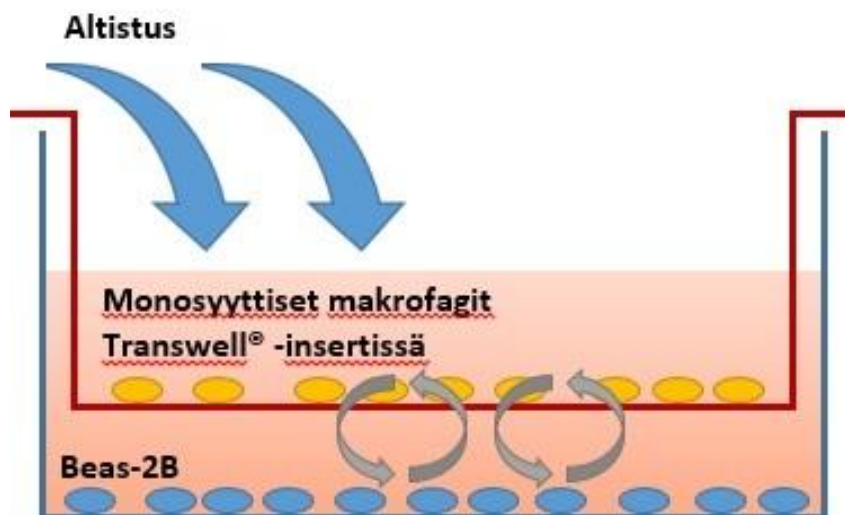
3.3.1 *In vitro*

Ensimmäisissä kokeissa insertissä olevia ihmisen monosyyteistä erikoistettuja makrofaageja käsiteltiin hiilinanoputkilla, ja DNA-vauriot tutkittiin ihmisen BEAS-2B-epiteelisoluista. Sopivien koeolosuhteiden löytämiseksi testattiin erilaisia vaihtoehtoja monosyyttien eristämiseksi ja erilaistamiseksi sekä makrofaagien ja epiteelisolujen yhteisviljelyn toteuttamiseksi.

Monosyytit eristettiin veren puna- Valkosolukerroksesta (Punaisen Ristin veripalvelu, Helsinki) Ficoll-gradienttisentrifugaation avulla ja pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuksella (PBS, Phosphate Buffered Saline, Lonza-BioWhittaker) kolme kertaa. Monosyyttien annettiin tarttua kasvatusmaljan pohjaan (45 min, +37 °C, 5 % CO₂) RPMI 1640 -kasvatusliuoksessa (Roswell Park Memorial Institute; Invitrogen; sisälsi lisäksi 2 mM L-glutamiinia ja 1 % penisilliini-streptomysiinihuosta). Ylimääräiset solut pestiin pois viljelymaljalta PBS:llä, ja maljalle tarttuneiden monosyyttien viljelyä jatkettiin SFMM-kasvatusliuoksessa (Serum-Free Macrophage Medium, Invitrogen), johon oli lisätty erilaistumista stimuloivaa ihmisen GM-CSF-kasvutekijää (10 ng/ml; Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Immunotools) ja 1 % penisilliini-streptomysiinihuosta. Makrofaagien kasvatusliuos vaihdettiin kahden päivän välein.

BEAS-2B-soluja viljeltiin aluksi BEGM-kasvatusliuoksessa (Bronchial Epithelial Growth Medium, Clonetics) viljelykaapissa (+37 °C, 5 % CO₂). Ennen varsinaisten altistuskokeiden aloittamista selvitettiin, mikä kasvatusliuos ja ajoitus soveltuisivat parhaiten makrofaagien ja keuhkoepiteelisolujen yhteisviljelyyn. Lukuisten kokeilujen jälkeen päädyttiin 48 tunnin viljelyyn SFMM-kasvatusliuoksessa. Kunkin testimateriaalin solutoksisuus testattiin sekä makrofaagien että BEAS-2B-solujen viljelmissä, ja yhteisviljelykokeissa käytetyt annokset valittiin näiden tutkimusten tulosten ja aiempiin julkaisuihin perusteella.

Ennen altistusta solut siirrostettiin yhteisviljelmiin 12-kuoppalevyille. BEAS-2B-soluja viljeltiin kuopan pohjalla ja erilaistettuja makrofaageja, joihin altistus kohdistettiin, Corning Transwell®-insertissä (reikäkoko 0.4 µm; Corning) (**Kuva 2**).



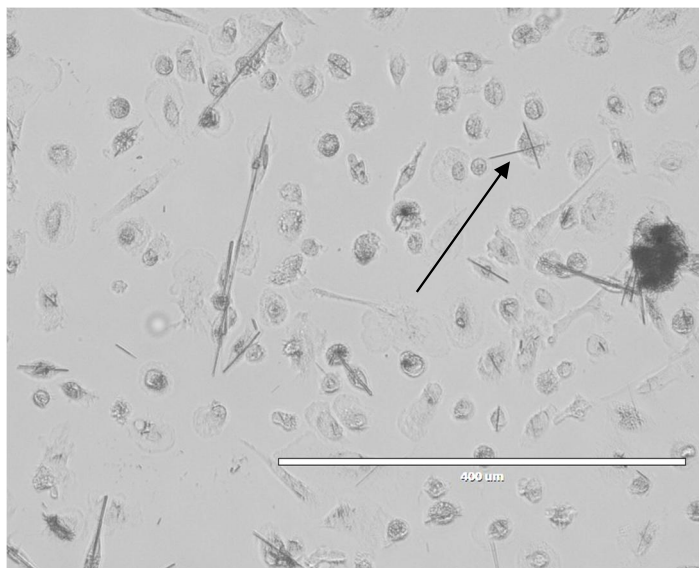
Kuva 2. Monosyyttisten makrofaagien ja BEAS-2B-keuhkoepiteelisolujen yhteisviljelyn periaate. Solutyypit erotettiin toisistaan Transwell®-membraani-insertillä, joka esti hiilinanoputkien kulkeutumisen mutta mahdollisti klastogeenisen tekijän siirtymisen epiteelisolujen puolelle.

Hiilinanoputkien lisäksi tutkittiin vertailumateriaaleina krysotiili-asbestikuituja, joiden on havaittu aiheuttavan DNA-vaurioita BEAS-2B soluissa vastaavissa yhteisviljelykokeissa (Kienast ym. 2000), sekä tsymosaania (sienten pinnan rakenneproteiini), jonka on raportoitu aktivoivan makrofaageja ja aiheuttavan happiradikaalien muodostusta yhteisviljelmissä (Guichard ym. 2010). Koska klastogeenisen tekijän erittymisen ja sen epiteelisoluihin kohdistuvan vaikutuksen aikataulu ei ollut selvillä koeolosuhteissamme, tutkimme useita eri aikapisteitä.

Mahdollisen klastogeenisen tekijän vaikutusta selvitettiin aiempia julkaisuja mukaillen altistamalla insertissä olevat makrofaagit krysotiili-asbestille (**Kuva 3**) tai makrofaageja

aktivoivalle tsy-mosaanille niin, että yhtä makrofaagia kohden viljelmään lisättiin yksi tsy-mosaani-partikkeli. Altistusta jatkettiin makrofaagien ja epiteelisolujen yhteisviljelmissä 3 ja 24 tunnin ajan, minkä jälkeen BEAS-2B-solut kerättiin komeetta-analyyysiä varten.

Hiilinanoputkien vaikutusta BEAS-2B-soluihin testattiin sekä suorassa altistuksessa että yhteisviljelmässä. Hiilinanoputket punnittiin steriiliin lasiputkeen ja dispersoitettiin makrofaagien viljelyliuokseen, johon oli lisätty 0,6 mg/ml albumiinia (BSA; Bovine Serum Albumin). Suspension laadun parantamiseksi käytettiin ultraäänikäsittelyä (37 kHz, 20 min, +37 °C; ElmaSonic S15H, Tovatech LLC).



Kuva 3. Asbestille altistettuja ihmisen makrofaageja faasikontrastimikroskoopissa. Kuvakentässä näkyy useita asbestikuituja (esim. nuolen kohdalla). Makrofaagit pyrkivät tuhoamaan kuituja solusyönnillä. Mittajana 400 μm (kuva: Saira Pesonen).

3.3.2 Ex vivo

Tutkimuksia jatkettiin *ex vivo* -kokeilla, joissa keuhkoepiteelisoluja viljeltiin hiilinanoputkille altistettujen hiirten BAL-solujen kanssa. Keuhkokuuhtelunäyte sisältää tyypillisesti useita eri puolustusoluja - pääosin makrofaageja, mutta myös neutrofiilejä, eosinofiilejä ja lymfosyyttejä. Eri solutyypit toimivat monimutkaisessa yhteistyössä poistaakseen ja tuhotakseen vierasaineita ja patogeenejä keuhkoissa ja niiden keskinäiset suhteet vaihtelevat altisteesta ja altistuksen voimakkuudesta riippuen.

Tutkimuksissa käytettyjen hiilinanoputkien (MWCNT-S) on aiemmin todettu aiheuttavan sekä genotoksisia että immunotoksisia vaikutuksia altistettujen hiirten keuhkoissa: tulehdussolujen määrän lisääntymistä ja DNA-vaurioita keuhkosoluissa (Rydman ym. 2013, 2014). *Ex vivo* -yhteisviljelykokeiden avulla pyrittiin selvittämään, aiheutuuko havaittu genotoksinen vaikutus tulehdussolujen erittämistä klastogeenisistä tekijöistä.

Ex vivo -kokeissa epiteelisoluna käytettiin bronkiaalisten BEAS-2B-epiteelisolujen lisäksi alveolaarista A549-epiteelisolulinjaa. A549 on keuhkocyöpäsoluminja, jota käytetään BEAS-2B-solujen ohella yleisesti hengitystiealtistuksia simuloivissa tutkimuksissa.

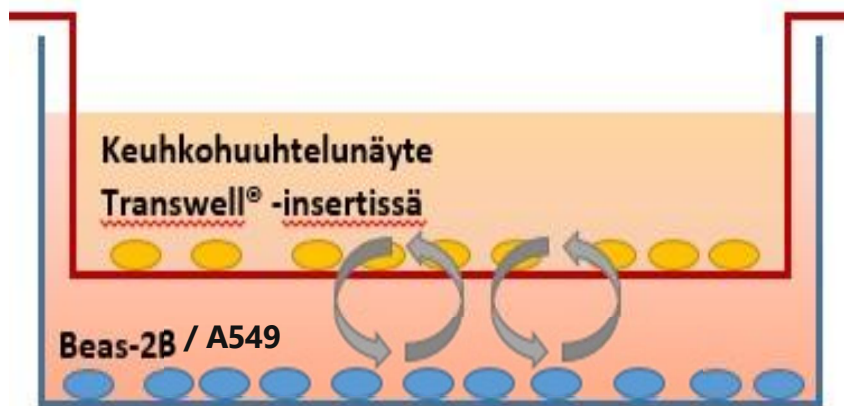
Ex vivo yhteisviljelykoetta varten 10 hiirtä (C57Bl/6 ♀, ikä 7-8 viikkoa, paino n. 20 g) altistettiin pitkille, suorille hiilinanoputkille hengitysteitse aspiraatio-menetelmällä, jossa nesteeseen dispersoitu testimateriaali pipetoitiin nukutetun koe-eläimen henkitorven suulle, josta se sisäänhengityksen mukana kulkeutui keuhkoihin. Aspiraatioaltistus toistettiin kolmena peräkkäisenä päivänä annoksella 10 µg/hiiri. Hiilinanoputket annettiin dispersiona (200 µg/ml; 50 µl/hiiri/aspiraatio) PBS:ssä, johon oli lisätty 0,6 mg/ml BSA:ta (Sigma-Aldrich). Dispersio valmistettiin ultraäänikäsittelyllä (20 min, +37 °C, ElmaSonic S15H, Tovatech LLC). Verrokkiryhmälle (10 hiirtä) aspiraatioaltistus suoritettiin kolmena peräkkäisenä päivänä pelkällä PBS-liuoksella, joka sisälsi 0,6 mg/ml BSA:ta. Eläinkokeet tehtiin Etelä-Suomen aluehallintoviraston (ESAVI) hankelupalautakunnan (ELLA) luvalla.

24 tuntia viimeisen aspiraation jälkeen hiiret lopetettiin ja niistä kerättiin näytteet sekä *ex vivo* -yhteisviljelykokeeseen että suoraa komeetta-analyysiä varten. Yhteisviljelykokeeseen käytetyt tulehdussolut kerättiin huuhtelemalla hiirten keuhkot kahdesti soluviljelyliuoksella (RPMI 1640, Invitrogen; 800 µl/huuhtelu). Tämän jälkeen keuhkot huuhdeltiin vielä neljä kertaa suolaliuoksella (800 µl/huuhtelu, 0,9 % NaCl, Baxter), jotta talteen saatiin tulehdussoluja myös komeetta-analyysiä varten. Hiirten oikea keuhko kerättiin niin ikään komeetta-analyysiä varten. BAL-solut sekä oikeasta keuhkosta eristetyt keuhkosolut prosessoitiin komeetta-menetelmällä heti näytteenkeräyksen jälkeen.

Ex vivo -menetelmää testattiin BEAS-2B- ja A549-solulinjoilla (American Type Culture Collection, LGC Promochem AB), joita viljeltiin 12-kuoppalevyillä soluviljelykaapissa (37 °C, 5 % CO₂). BEAS-2B-soluja kasvatettiin LHC-9-kasvatusliuoksessa ja A549-soluja RPMI 1640-kasvatusliuoksessa (Invitrogen; lisäksi 1 % penisilliini-streptomysiiniä, 1 % L-glutamiinia ja 10 % fetaalivasikan seerumia). Yhteisviljelykokeessa hiirten BAL-näyte lisättiin sellaisenaan viljeltyjen keuhkosolujen kanssa samaan viljelymaljaan siten, että solut oli erotettu toisistaan Transwell®-membraani-insertillä (**Kuva 4**). BEAS-2B- ja A549-solut kerättiin komeetta-analyysiä varten kolmen ja 24 tunnin yhteisviljelyn jälkeen.

Koska aiemmassa tutkimuksessa pienhiukkasille altistettujen rottien keuhkohuuhtelusolujen havaittiin aiheuttavan genotoksisia muutoksia epiteelisoluissa, kun niitä on lisätty yhteisviljelmään suhteessa 50:1 (Driscoll ym. 1997), kokeet toistettiin vielä tällä solutyypin

suhteella. Erityisesti neutrofiilien osuuden keuhkohuuhtelunäytteen tulehdussoluista on todettu olevan yhteydessä havaittuun genotoksisuuteen. Neutrofiilejä kerääntyy keuhkoihin tulehdusreaktion akuutissa vaiheessa makrofagien erittämien sytokiinien ja kemokiinien kutsumana. Neutrofiilit pyrkivät tuhoamaan vierasaineita mm. sulkemalla ne solusyönnin jälkeen happiradikaaleja ja entsyymejä sisältävään fagosomiin. Neutrofiilien on arveltu olevan tärkeä linkki tulehdusreaktion ja genotoksisuuden välillä (Knaapen ym. 2006).



Kuva 4. Keuhkohuuhtelunäytteen ja viljeltyjen keuhkosolujen (BEAS-2B tai A549) yhteisviljelyn periaate. Solutyypit erotettiin toisistaan Transwell®-membraani-insertillä. Insertin tarkoituksena oli estää suora kontakti eri solutyypien välillä ja ehkäistä keuhkohuuhtelunäytteeseen mahdollisesti jääneiden hiilinanoputkien suora kontakti viljeltyjen kohdesolujen kanssa. Insertti kuitenkin mahdollisti tulehdussolujen erittämän klastogeenisen tekijän siirtymisen vapaasti soluviljelynestessä.

Tässä kokeessa positiivisena vertailuaineena käytettiin lipopolysakkaridia (LPS, Sigma-Aldrich), gram-negatiivisten bakteerien ulkokalvon proteiinia, jonka tiedetään aiheuttavan voimakkaan tulehdusreaktion keuhkoissa (Duan ym. 2012).

20 C57Bl/6 hiirtä (♀, ikä 7-8 viikkoa, paino n. 20 g) käsiteltiin MWCNT-S:llä hengitysteitse kerta-aspiraatiolla (10 µg/hiiri/aspiraatio), 20 hiirtä LPS-liuoksella (200 µg/hiiri/aspiraatio) ja 20 hiirtä fysiologisella suolaliuoksella (0,9 % NaCl, Baxter). 18 tuntia aspiraation jälkeen hiiret lopetettiin ja niistä kerättiin keuhkohuuhtelunäytteet yhteisviljelyä varten (5 x 800 µl PBS). Kuudesta LPS-altistetusta ja kuudesta NaCl-altistetusta hiirestä kerättiin myös oikea keuhko *in vivo* -komeetta-analyysiä varten. Keuhkohuuhtelunäytteistä tehtiin solupreparaatit mikroskooppilaseille tulehdussolujen lukumäärän määrittystä varten.

BAL-näytteistä tehdyt solupreparaatit värjättiin May-Grünwald-Giemsä-värijäyksellä solutyypien erottamiseksi ja niistä laskettiin tulehdussolujen (makrofaagit, neutrofiilit,

eosinofiilit ja lymfosyytit) määrät mikroskoopilla. Kustakin preparaattista laskettiin vähintään 3 näkökenttää ja 100 solua.

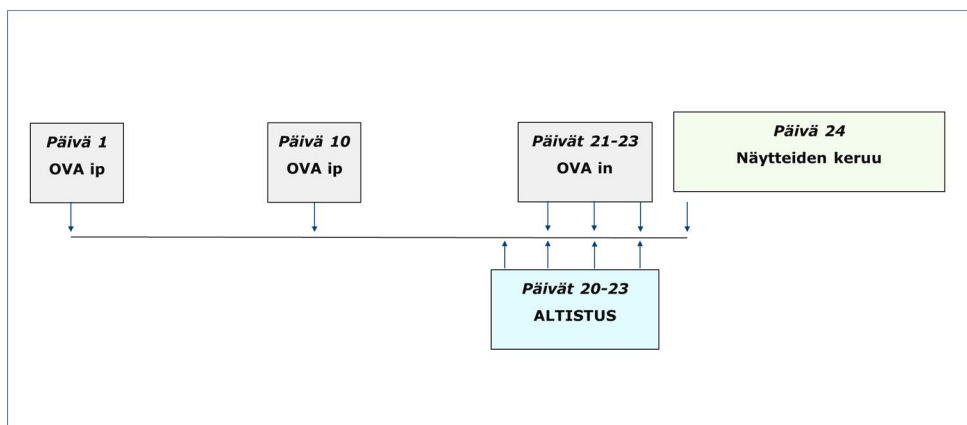
BEAS-2B-soluja viljeltiin LHC-9 -soluviljelyneusteessä ja A549-soluja RPMI 1640 -soluviljelyneusteessä (lisänä 1 % penisilliini-streptomysiiniliuosta, 1 % L-glutamiinia ja 10 % FBS:ää). BEAS-2B- ja A549 -solut siirrostettiin näytteenkeräyspäivän aamuna solutiheyteen 50 000 solua/kuoppa, ja solujen annettiin kiinnittyä viljelykuopan pohjalle ennen yhteisviljelyn aloittamista. Yhteisviljelykoetta varten kunkin altistusryhmän BAL-näytteet yhdistettiin ja niiden solumäärä säädettiin siten, että yhtä viljeltyä keuhkosolua kohden inserttiin lisättiin 50 keuhkohuuhtelulla kerättyä tulehdussolua (2 500 000 solua / insertti).

LPS-stimulaatio toimi toivotulla tavalla, ja talteen kerätty solumäärä riitti kolmeen rinnakkaiseen BEAS-2B-yhteisviljelykuoppaan ja kolmeen rinnakkaiseen A549-kuoppaan. Hiilinanoputkilla ja suolaliuoksella käsiteltyjen hiirten BAL-näytteissä tulehdussoluja oli vähemmän ja kummassakin tapauksessa soluja riitti vain yhteen BEAS-2B yhteisviljelykuoppaan ja yhteen A549-kuoppaan. BAL-näytteen solut lisättiin Transwell®-insertteihin, ja yhteisviljelyä jatkettiin soluviljelykaapissa 24 tuntia. Tämän jälkeen BEAS-2B ja A549 -solut kerättiin viljelymaljoilta ja preparoitin komeettamenetelmää varten.

3.4 Astma hiilinanoputkien genotoksisuuden alttiustekijänä

Tässä tutkimuksessa käytimme BALB/c-hiirten astmamallia selvittääksemme, ovatko astmaattiset hiiret tavallista herkempiä hiilinanoputkille. Astmaattisilla hiirillä on keuhkotulehdus, joka saattaa tehdä hiiristä tavallista alttiimpia myös hiilinanoputkien genotoksisille vaikutuksille. Hiirille aiheutettiin astma aiemmin kuvatulla menetelmällä (Rossi ym. 2010). Eläimet altistettiin pitkille, suorille hiilinanoputkille inhalaatiolla (6,25 mg/m³) 4 tunnin ja 4 päivän (4 h/päivä) ajan (ks. **Kuva 5**). Vertailuryhmänä toimivat terveet hiiret. Positiivisena kontrollina käytettiin mitomysiini C:tä (2 mg/kg intraperitoneaalisesti; näyte 24 h myöhemmin). Analyysit tehtiin koodattuilta valmisteilta.

Keuhkosolujen ja BAL-näytteen solujen yksijuosteiset DNA-katkokset tutkittiin komeettamenetelmällä. Positiivisena kontrollina oli WC-Co (faryngalisella aspiraatiolla, 1 mg/hiiri). Lisäksi veren valkosoluista määritettiin DNA:n kaksijuosteisia katkoksia sisältävien, γ -H2AX-positiivisten solujen määrä 2000 solussa per hiiri. Mikrotumallisten solujen esiintymistiheys analysoitiin luuytimen polykromaattisista punasoluista (2000 solua/hiiri) ja pernan viljellyistä lymfosyyteistä (2000 kaksitumaista solua/hiiri).



Kuva 5. Astmamalli ja koejärjestely. OVA ip – ovalbumiini plus alumiinisuolo-adjuvaanti fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS) intraperitoneaalisesti. OVA in – ovalbumiini PBS:ssä intranasalisesti. Terve verrokkiryhmä sai ovalbumiinin sijasta PBS:ää.

3.5 Osittain liukoisen metallioksidin genotoksisuuden perusta

Tutkimuksessa selvitettiin, kuinka metallioksidin koko, kulkeutuminen soluun ja liukeneminen solun sisällä vaikuttaa sen genotoksisuuteen. Kokeet tehtiin ihmisen BEAS-2B-keuhkoepiteelisolujen viljelmissä, ja malliaineina olivat osittain liukoiset ja tunnetusti genotoksiset sinkkioksidi- ja kuparioksidihiuksat (Dufour ym. 2006; Lindberg ym. 2017). Ajatuksena oli, että jos ZnO:n ja CuO:n solunsisäinen liukeneminen on keskeistä genotoksisten vaikutusten syntymisessä, nanohiukkasten tulisi olla genotoksisempia kuin suuremmat hiukkaset ja niiden vaikutuksen tulisi syntyä aiemmin kuin isommilla hiukkasilla.

3.5.1 ZnO

Nanokokaisen ja hienojakoisen ZnO:n solutoksisuus BEAS-2B-soluille selvitettiin 3 ja 24 tunnin (DNA-vauriotutkimuksia varten) ja 48 tunnin (mikrotumatestiä varten) altistuksessa. Elävien solujen määrä käsitellyissä viljelmissä ilmaistiin prosentteina kontrolliviljelmien solumäärästä. Kuolleiden solujen tunnistamiseen käytettiin trypan-sinistä (valokenttämikroskoopi) tai propidiumjodidia (fluoresenssimikroskoopi).

Sinkkioksidin genotoksisuutta koskevat tulokset on julkaistu (Roszak ym. 2016), ja käytetyt menetelmät on kuvattu yksityiskohtaisesti kyseisessä artikkelissa. DNA-vaurion (komeettamenetelmä) syntymisen voimakkuutta verrattiin 3 ja 24 tunnin käsittelyillä. ZnO-hiukkasten kykyä aiheuttaa mikrotumia tutkittiin sytokineesi-blokkimenetelmällä 48 tunnin altistuksessa (sytokalasiini B lisättiin 6 tunnin käsittelyn jälkeen). Kokeissa käytettiin rinnakkaisia

viljelmiä, negatiivista ja positiivista kontrollia sekä koodattuja valmisteita. Tutkimus tehtiin yhteistyössä Työlääkätieteen Nofer-Instituutin (Łódź, Puola) kanssa.

Hiukkasten kohtaloa soluissa selvitettiin hyperspektraalimikroskopiolla (CytoViva, Inc, Auburn, AL, USA). Kyseessä on pimeäkenttämikroskooppi, johon liitetyllä laitteistolla pystytään tunnistamaan pienet hiukkaset soluissa niistä siroavan näkyvän valon spektrin (lähellä infrapunaista aallonpituusaluetta) avulla. Liuenneita hiukkasia ei luonnollisesti nähdä mikroskoopissa.

Tutkittavista hiukkasista ja käsittelemättömistä soluista tehtiin ensin erilliset spektrikirjastot. Soluvalmisteet tehtiin sytosentrifuugilla. Analyysissä otettiin 100-kertaisella objektiivilla pimeäkenttäkuvia soluista, ja kuvat prosessoitiin kuten aiemmin on kerrottu (Ilves ym. 2014). Käsitteilyistä soluista saatuja spektrejä verrattiin hiukkasspektrikirjastoon, kun pelkistä soluista saadut spektrit oli ensin suodatettu pois. BEAS-2B-soluja altistettiin ZnO-partikkeleille 1, 3, 6, 24 ja 48 h.

3.5.2 CuO

CuO-hiukkaset dispersoitiin BEGM-kasvatusliuokseen (Lonza), jossa oli 0,06 % naudan seerumin albumiinia. Dispersiot käsiteltiin ultraäänellä allasonikaattorissa 35 °C:ssa 20 min ajan ja laimennettiin käsittelypitoisuuksiin. Ennen käyttöä dispersiot sonikoitiin vielä 20 min ajan. Aluksi selvitettiin CuO-hiukkasten solutoksisuus BEAS-2B-solujen viljelmissä 3, 6, 24 ja 48 tunnin käsittelyn jälkeen laskemalla elävien solujen lukumäärä hemosytometrissä faasikontrastilla (kuolleet solut tunnistettiin trypan-sinisellä) ja vertaamalla tulosta negatiivisista kontrolliviljelmistä (käsitelty soluviljelymediumilla ja albumiinilla) saatuun solumäärään. Nanokokoinen CuO oli solutoksisempaa kuin mikrokokoinen CuO. Tulosten perusteella annosalueeksi genotoksisuustutkimuksiin valittiin 2-40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (7,6-152 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nanokokoiselle CuO:lle ja 5-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (19-380 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hienojakoiselle CuO:lle.

DNA-vaurion (komeetta-menetelmä) syntymistä tutkittiin 3 ja 24 tunnin käsittelyillä. Hiukkasten kykyä aiheuttaa mikrotumia selvitettiin sytokineesi-blokkimenetelmällä 48 tunnin käsittelyn jälkeen. Kokeissa käytettiin rinnakkaisia viljelmiä, negatiivista ja positiivista kontrollia (20 mM H₂O₂ komeattestissä ja mitomysiini C mikrotumatestissä) sekä koodattuja valmisteita.

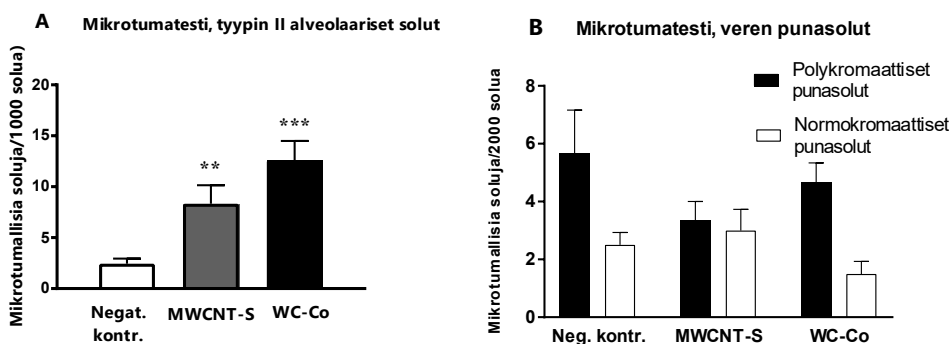
CuO-hiukkasten kohtaloa soluissa selvitettiin hyperspektraalimikroskopiolla, kuten yllä ZnO:n yhteydessä on kuvattu. BEAS-2B-soluja altistettiin CuO-partikkeleille (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 3 tunnin ajan. Altistuksen jälkeen viljelmiä inkuboitiin 50 %:ssa fetaaliseerumissa RPMI 1640-mediumissa, jotta solujen pintaan kiinnittyneet hiukkaset saataisiin irti. Partikkelien peittävä alue ja solussa olevien partikkelien lukumäärä analysoitiin hyperspektraalimikroskopiolla 15 solusta kutakin rinnakkaista viljelmää kohti (30 solua/käsittely).

4 TULOKSET

4.1 Hiilianoputket: genotoksiset vaikutukset ja tulehdus hiirillä

4.1.1 Hiilianoputkien genotoksisuus hiirillä

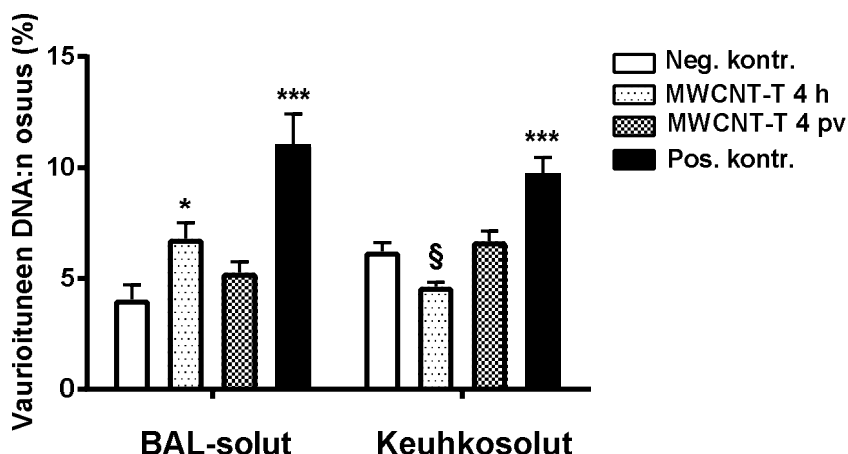
MWCNT-S. Tutkimme, onko MWCNT-S:llä genotoksista vaikutusta hiirten keuhkosyövän kehittymisen kannalta tärkeissä keuhkosoluissa – ATII-soluissa ja Clara-soluissa. Hiirten inhalaatioaltistus MWCNT-S:lle ($10,8 \pm 2,8$ mg/m³; 4 pv, 4 h/pv) aiheutti selkeän, tilastollisesti merkitsevän lisääntymisen mikrotumia sisältävien ATII-solujen määrässä (**Kuva 6A**). Clara-soluja ei saatu kerättyä riittävästi, jotta otos olisi ollut edustava ja tästä syystä näitä tuloksia ei esitetä tässä raportissa. Positiivinen kontrollikäsittely (WC-Co) lisäsi niin ikään mikrotumallisten tyyppin II alveolaaristen solujen esiintymistä. MWCNT-S:n inhalaatio ei johtanut mikrotumallisten polykromaattisten punasolujen lisääntymiseen verinäytteissä (**Kuva 6B**).



Kuva 6. Pitkillä, suorilla hiilianoputkilla (MWCNT-S) oli paikallinen genotoksinen vaikutus C57Bl/6-hiirten keuhkoissa 72 tuntia 4 päivän (4 h/pv) inhalaatioaltistuksen ($10,8 \pm 2,8$ mg/m³) jälkeen. **(A)** MWCNT-S aiheutti selkeän (** $p < 0,01$) lisääntymisen negatiivisen kontrolliryhmän (Neg. kontr.) tulokseen verrattuna mikrotumia sisältävien tyyppin II alveolaaristen solujen esiintymisessä. Faryngalisella aspiraatiolla annosteltu volframikarbidin ja koboltin seos (WC-Co; 1 mg/hiiri; näyte 48 h myöhemmin) toimi positiivisella kontrollikäsittelyinä aiheuttaen voimakkaan lisäyksen (***) mikrotumia sisältävien tyyppin II alveolaaristen solujen esiintymisessä. **(B)** MWCNT-S-altistus ei kuitenkaan vaikuttanut mikrotumien esiintymiseen nuorissa (polykromaattisissa) tai kypsissä (normokromaattisissa) punasoluissa 48 tuntia altistuksen päättymisen jälkeen kerättyssä häntäverinäytteessä. Myöskään WC-Co:lla ei ollut vaikutusta veren mikrotumallisten punasolujen määrään. Pylväät kuvastavat keskiarvoja (+ keskiarvon keskiarvo; 6 eläintä/ryhmä). Tilastanalyysit perustuvat yksisuuntaiseen varianssianalyysiin ja *a posteriori* Bonferroni-testiin. Tulokset on julkaistu (Catalán ym. 2016).

Tulokset siis vahvistavat aiempia löydöksiämme, joiden mukaan hengitysteitse saadun MWCNT-S:n genotoksinen vaikutus on paikallinen (Rydman ym. 2013). Sama koskee myös faryngaalisella aspiraatiolla annosteltua WC-Co:ta. Kummankin käsittelyn vaikutus on selkeästi havaittavissa ATII-soluissa, jotka ovat keuhkosyövän kohdesoluja. Genotoksinen vaikutus saattaa siksi olla tärkeä osatekijä MWCNT-S:n tunnetussa syöpävaarallisuudessa. MWCNT-S:llä ja WC-CO:lla ei näytä kuitenkaan olevan systeemistä genotoksista vaikutusta.

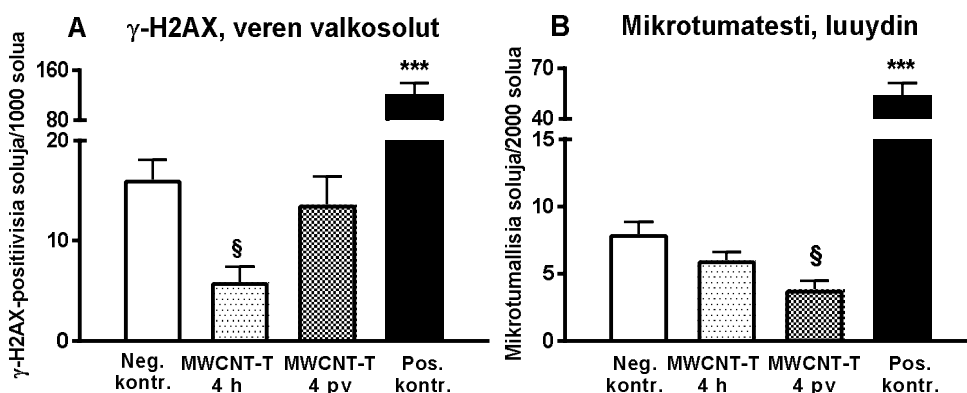
MWCT-T. Neljän tunnin MWCNT-T-inhalaatioissa (17,54 mg/m³; näytteet kerättiin 24 h myöhemmin) DNA-vaurioiden määrä oli kohonnut hiirten BAL-soluissa kontrolliryhmään verrattuna. Keuhkosoluissa DNA-vaurioiden taso oli sen sijaan laskenut 4 tunnin MWCNT-T-altistuksessa. (Kuva 7). Neljän päivän MWCNT-T-altistus ei vaikuttanut DNA-vaurioiden esiintymiseen kummassakaan solutyypissä. Positiivinen kontrollikäsitteily (WC-Co ja mitomysiini C) aiheutti selkeän nousun DNA-vaurioiden määrässä sekä BAL- että keuhkosoluissa.



Kuva 7. Taipuisilla hiilinanoputkilla (MWCNT-T) oli paikallinen genotoksinen vaikutus komeettatestissä C57Bl/6-hiirillä 24 tuntia 4 tunnin inhalaatioaltistuksen (17,54 mg/m³) jälkeen, kun tarkasteltiin vaurioituneen DNA:n osuutta (%; keskiarvo + keskiarvon keskivirhe; 8 eläintä/ryhmä) keuhkokuuhtelunäytteen (BAL, bronchoalveolar lavage) soluissa (* $p < 0,05$). 4 päivän (4 h/ pv) altistuksessa DNA-vauriot eivät lisääntyneet BAL-soluissa tai keuhkosoluissa. Keuhkosoluissa DNA-vaurioiden taso oli tilastollisesti merkittävästi (§ $p < 0,05$) laskenut 4 tunnin MWCNT-T-altistuksen jälkeen. Positiivinen kontrollinkäsittely (Pos. kontr.) volframikarbidin ja kobolttin seoksella (1 mg/ hiiri, aspiraatiolla) ja mitomysiini C:llä (2 mg/kg, intraperitoneaalisesti; näyte 24 h myöhemmin) aiheutti selkeän lisääntymisen (***) DNA-vaurioiden tasossa negatiivisen kontrolliryhmän (Neg. kontr.) tulokseen verrattuna. Tilastoanalyysit perustuvat hierarkiseen varianssianalyysiin ja *a posteriori* Bonferroni-testiin. Tulokset on julkaistu 4 päivän altistuksen osalta (Catalán ym. 2016).

MWCNT-T-inhalaatiolla oli näinollen paikallista genotoksista vaikutusta vain altistusjakson alussa keuhkojen puolustuslinjan soluissa, jotka keräävät suuren osan hiukkasmateriaalista. Neljän päivän MWCNT-T-altistuksessa BAL-solujen DNA-vaurioiden taso oli itse asiassa alhaisempi kuin kontrolliryhmässä. Varsinaisessa keuhkokudoksessa DNA-vaurioiden lisääntymistä ei nähty.

Hiirten inhalaatioaltistus MWCNT-T:lle ei lisännyt γ -H2AX-positiivisten veren valkosolujen eikä mikrotumia sisältävien luuytimen polykromaattisten punasolujen esiintymistiheyttä (**Kuva 8**). Itse asiassa poikkeavien solujen määrä MWCNT-T-käsittelyssä oli merkitsevästi laskenut verrattuna kontrolliryhmään neljän tunnin (DNA:n kaksijuosteiset katkokset) tai neljän päivän (mikrotumat) MWCNT-T-altistuksen jälkeen. Positiivinen kontrollikäsittely aiheutti hyvin selvän lisäyksen sekä DNA:n kaksijuosteisia katkoksia että mikrotumia sisältävien solujen esiintymisessä.

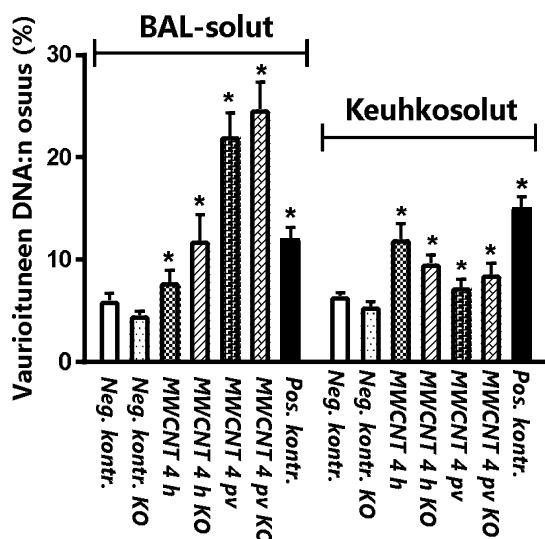


Kuva 8. Taipuisilla hiilinanoputkilla (MWCNT-T) ei ollut systeemistä genotoksista vaikutusta C57Bl/6-hiirillä 24 tuntia 4 tunnin tai 4 päivän (4 h/pv) inhalaatioaltistuksen (17,54 mg/m³) jälkeen, kun tarkasteltiin **(A)** DNA:n kaksijuosteisia katkoksia sisältävien (γ -H2AX-positiivisten) veren valkosolujen ja **(B)** luuytimen mikrotumallisten polykromaattisten punasolujen esiintymistiheyttä. Sen sijaan MWCNT-T aiheutti tilastollisesti merkitsevän (§ $p < 0,05$) vähenemisen kontrolliryhmään verrattuna γ -H2AX-positiivisten solujen määrässä 4 tunnin altistuksessa ja mikrotumallisten solujen määrässä 4 päivän altistuksessa. Positiivinen kontrollikäsittely (Pos. kontr.) voframikarbidiin ja kobolttin seoksella (1 mg/hiiri, aspiraatiolla) ja mitomyysiini C:llä (2 mg/kg intraperitoneaalisesti; näyte 24 h myöhemmin) aiheutti voimakkaan, tilastollisesti merkitsevän lisääntymisen (***) sekä γ -H2AX-positiivisten että mikrotumallisten solujen esiintymisessä negatiivisen kontrolliryhmän (Neg. kontr.) tulokseen verrattuna. Pylväät kuvastavat keskiarvoja (+ keskiarvon keskivirhe; 8 eläintä/ryhmä).. Tilastoanalyysit perustuvat 1-suuntaiseen varianssianalyysiin ja *a posteriori* Bonferroni-testiin. Tulokset on julkaistu 4 päivän altistuksen osalta (Catalán ym. 2016).

MWCNT-T:llä ei siis ollut systeemistä genotoksista vaikutusta. Päinvastoin – inhalaatio- altistus MWCNT-T:lle näytti osin vähentävän veren valkosoluissa ja luuytimessä havait- tavien genotoksisten muutosten perustasoa.

4.1.2 Pitkien, suorien hiilinanoputkien genotoksisuus *IL1R*-poistogeenisillä hiirillä

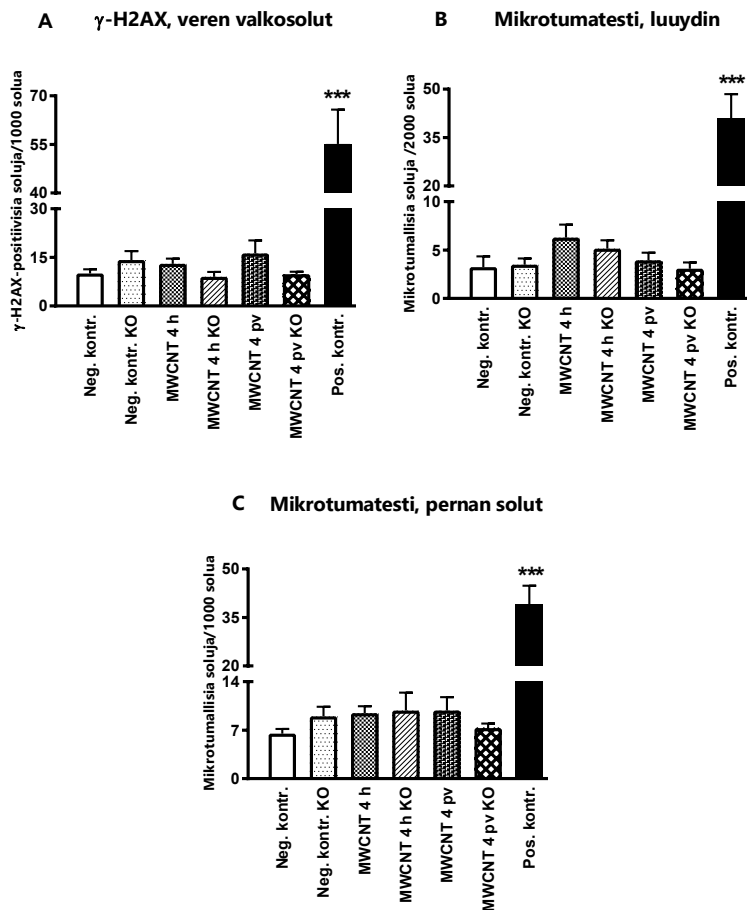
MWCNT-S-inhalaatio (7,71 mg/m³; 4 h tai 4 pv, 4 h/pv) aiheutti DNA-vaurioita komeetta- testissä sekä normaaleilla että *IL1R*-poistogeenisillä C57Bl/6-hiirillä 24 tuntia 4 tunnin tai 4 päivän (4 h/pv) inhalaatioaltistuksen jälkeen sekä BAL-soluissa että keuhkosoluissa. *IL1R*- geenin puuttumisella ei ollut vaikutusta (Kuva 9). Myös positiivinen kontrollikäsitteily WC- Co:lla ja syklofosamidilla normaaleilla hiirillä nosti DNA-vaurioiden tasoa.



Kuva 9. Pitkät, suorat hiilinanoputket (MWCNT-S) olivat genotoksisia komeettatestissä sekä normaaleilla että *IL1R*-poistogeenisillä (KO, knock-out) C57Bl/6-hiirillä 24 tuntia 4 tunnin tai 4 päivän (4 h/pv) inhalaatioaltistuksen (7,71 mg/m³; 4 h tai 4 pv, 4 h/pv) jälkeen, kun tarkasteltiin vaurioituneen DNA:n osuutta (%; keskiarvo + keskiarvon keskivirhe; 8 eläintä/ryhmä) keuhko- huuhtelunäytteen (BAL, bronchoalveolar lavage) soluissa ja keuhkosoluissa. *IL1R*-geenin puut- tumisella ei ollut vaikutusta. Positiivinen kontrollikäsitteily (Pos. kontr.; normaalit hiiret) volframi- karbidin ja koboltin seoksella (1 mg/hiiri, aspiraatiolla) ja syklofosamidilla (1 mg/kg, intraperito- neaalisesti) nosti DNA-vaurioiden tasoa. * Tilastollisesti merkitsevä ero ($p < 0,05$) samaa genotyyp- piä edustavaan normaalien (Neg. kontr) tai KO-hiirten (Neg. kontr KO) negatiiviseen kont- rolliryhmään verrattuna (2-suuntainen varianssianalyysi ja *a posteriori* Bonferroni-testi).

MWCNT-S-inhalaatiolla ei nähty systeemistä genotoksista vaikutusta γ -H2AX-analysissä veren valkosoluissa tai mikrotumatestissä luuytimessä ja paman soluissa normaaleilla tai

IL1R-poistogeenisillä hiirillä 24 tuntia 4 tunnin tai 4 päivän (4 h/pv) inhalaatioaltistuksen ($7,71 \text{ mg/m}^3$; 4 h tai 4 pv, 4 h/pv) jälkeen (**Kuva 10**).



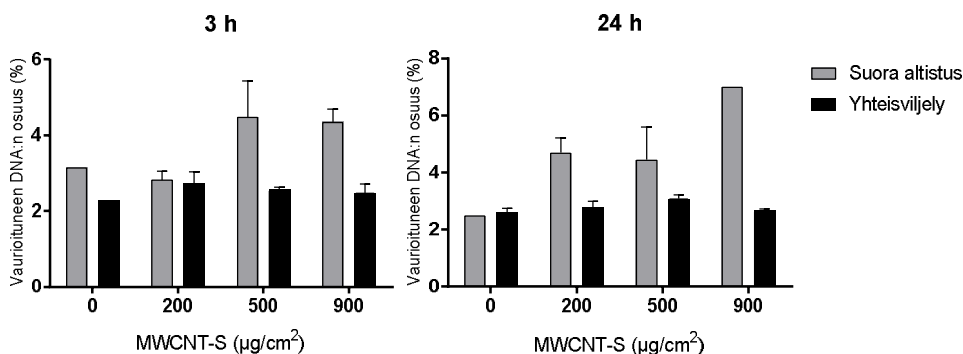
Kuva 10. Pitkillä, suorilla hiilianoputkilla (MWCNT-S) ei ollut systeemistä genotoksisista vaikutusta normaaleilla tai *IL1R*-poistogeenisillä (KO, knock-out) C57Bl/6-hiirillä 24 tuntia 4 tunnin tai 4 päivän (4 h/pv) inhalaatioaltistuksen ($7,71 \text{ mg/m}^3$; 4 h tai 4 pv, 4 h/pv) jälkeen, kun tarkasteltiin **(A)** DNA:n kaksijuosteisia katkoksia sisältävien (γ -H2AX-positiivisten) veren valkosolujen, **(B)** luuytimen mikrotumallisten polykromaattisten punasolujen ja **(C)** pernan mikrotumallisten kaksitumaisten lymfosyyttien esiintymistiheyttä. *IL1R*-geenin puuttumisella ei ollut vaikutusta. Positiivinen kontrollikäsittely (Pos. kontr.; normaalit hiiret) volframikarbidin ja koboltin seoksella (1 mg/hiiri, aspiraatiolla) ja syklofosamidilla (1 mg/kg, intraperitoneaalisesti; näyte 24 h myöhemmin) lisäsi γ -H2AX-positiivisten ja mikrotumallisten solujen esiintymistä (***) $p < 0,001$, 2-suuntainen varianssianalyysi ja *a posteriori* Bonferroni-testi) verrattuna normaalien hiirten kontrolliryhmään (Neg. kontr.). Pylväät kuvastavat keskiarvoja (+ keskiarvon keski- virhe). Neg. kontr KO, KO-hiirten negatiivinen kontrolliryhmä.

Tulokset osoittavat jälleen kerran, että MWCNT-S-inhalaatiolla on paikallinen genotoksinen vaikutus hiirten BAL-soluissa ja keuhkoissa mutta ei systeemistä genotoksista vaikutusta. Koska DNA-vaurioiden taso on samanlainen sekä L-1R-poistogeenisillä että normaaleilla hiirillä, *IL1R*-geeni ei ole tarpeen MWCNT-S:n aiheuttaman paikallisen genotoksinen vaikutuksen synnylle.

4.2 Tulehdussolujen tuottamien genotoksisten tekijöiden merkitys

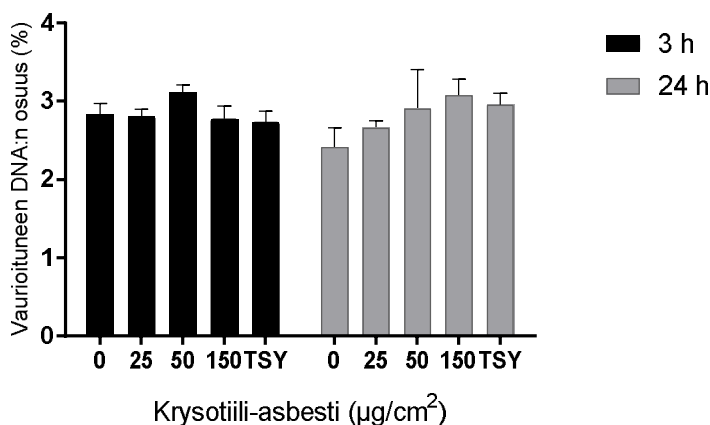
4.2.1 In vitro

Makrofageiksi erilaistettujen monosyyttien ja BEAS-2B-keuhkoepiteelisolujen yhteisviljelykokeissa ei lukuisista yrityksistä huolimatta saatu viitteitä siitä, että hiilinanoputkille altistetut makrofagit erittäisivät soluviljelyliuokseen sellaista klastogeenistä tekijää, jonka genotoksinen vaikutus BEAS-2B-soluihin olisi havaittavissa komeettamenetelmällä (**Kuva 11**). Sen sijaan BEAS-2B-solujen suora altistus hiilinanoputkille aiheutti DNA-vaurioita kummallakin käsittelyajalla.



Kuva 11. Pitkien, suorien hiilinanoputkien (MWCNT-S) vaikutus vaurioituneen DNA:n osuuteen (%; komeettamenetelmä) ihmisen makrofaagien kanssa yhteisviljelyssä BEAS-2B-soluissa. Yhteisviljelmissä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää vaikutusta, mutta BEAS-2B-solujen suora altistus lisäsi DNA-vaurioita sekä 3 että 24 tunnin käsittelyssä. Pylväät kuvastavat keskiarvoja (+ keskiarvon keskivirhe)

Insertissä viljeltyjen makrofagien altistaminen krysotiili-asbestille ei myöskään lisännyt vaurioituneen DNA:n osuutta yhteisviljelyssä BEAS-2B-soluissa 3 tai 24 tuntia altistuksen aloittamisesta. Makrofaagien altistaminen makrofaageja aktivoivalle tsyмосaanille ei sekään lisännyt DNA-vaurioita BEAS-2B-soluissa (**Kuva 12**).



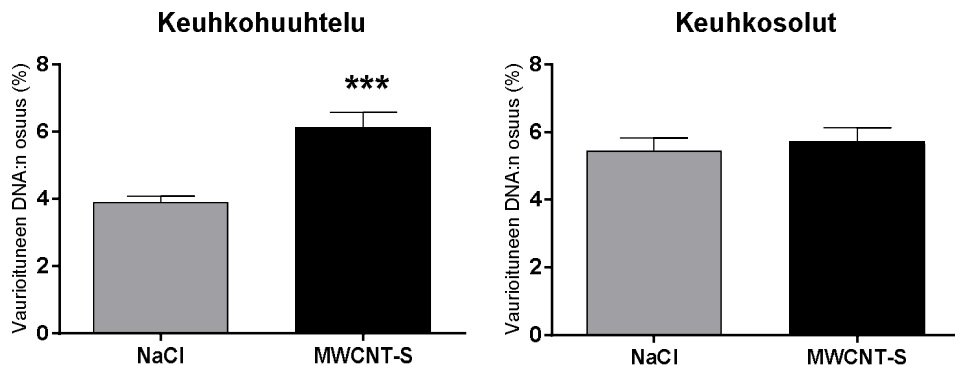
Kuva 12. Krysotiili-asbestilla ja tsyмосааnilla (TSY) ei ollut vaikutusta vaurioituneen DNA:n osuuteen (%; komeettamenetelmä) makrofaagien kanssa yhteisviljelyssä BEAS-2B-soluissa. Pylväät kuvastavat keskiarvoja (+ keskiarvon keskivirhe)

Makrofaagien altistus yhteisviljelymallissa ei siis saanut aikaan genotoksista vaikutusta insertin toisella puolella kasvaneissa epiteelisoluissa millään käytetyistä käsittelyistä. Epiteelisolujen suora käsittely MWCNT-S:llä sen sijaan lisäsi DNA-vaurioita.

4.2.2 Ex vivo

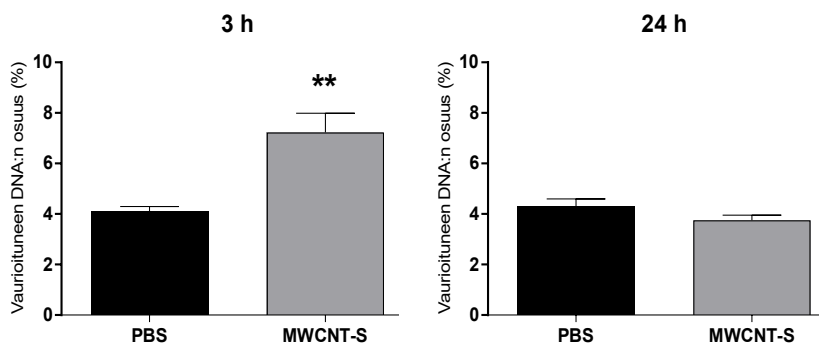
Hiiren BAL-soluista ja keuhkosta eristetyistä soluista suoritetussa komeetta-analysissä havaittiin, että altistus pitkille, suorille hiilinanoputkille aiheutti DNA-vaurioita BAL-soluissa, mutta ei keuhkosoluissa (**Kuva 13**). Aiemmissa kokeissamme hiilinanoputkille aspiraatiolla altistetut hiirillä nähtiin merkitsevä nousu DNA-vaurioissa myös keuhkosoluissa, mutta vaikutus oli silloinkin lievempi kuin BAL-soluissa (Rydman ym. 2013), jotka altistuivat huomattavasti suuremmille hiilinanoputkiannoksille kuin keuhkokudos.

Pitkille, suorille hiilinanoputkille altistettujen hiirten BAL-solujen kanssa *ex vivo* yhteisviljelyssä alveolaarisissa A549-soluissa DNA-vauriot lisääntyivät tilastollisesti merkitsevästi 3 tunnin yhteisviljelyn jälkeen, mutta ei 24 tunnin yhteisviljelyn jälkeen (**Kuva 14**). Näyttää siis siltä, että BAL-näytteen solut eivät enää tuottaneet riittävästi genotoksista tekijää 24 tunnin viljelyn jälkeen.



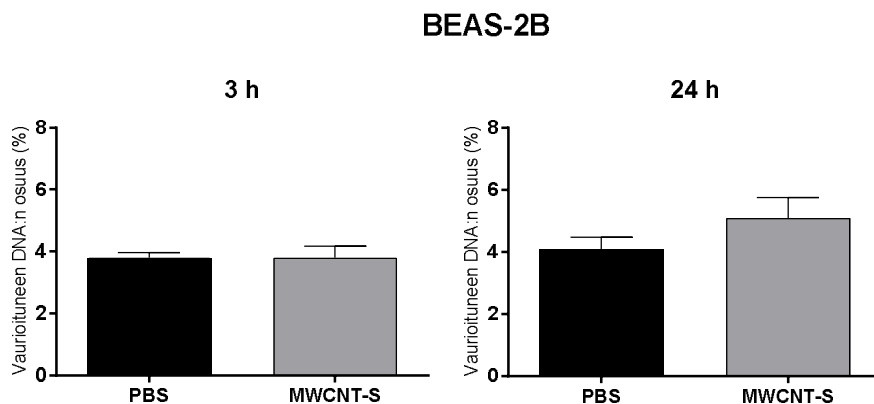
Kuva 13. DNA-vaurioiden osuus (%; komeettamenetelmä) pitkällä, suorilla hiilinanoputkilla (MWCNT-S) käsitellyjen hiirten keuhkokuuhtelunäytteen soluissa ja keuhkosoluissa. DNA-vauriot lisääntyivät altistettujen hiirten keuhkokuuhtelunäytteen soluissa mutta eivät keuhkosoluissa verrattuna suolaliuokselle (0,9 % NaCl) altistettuihin hiiriin. Pylväät kuvastavat keskiarvoja (+ keskiarvon keskivirhe). *** $p < 0,001$ (t -testi; NaCl-ryhmään verrattuna).

A549



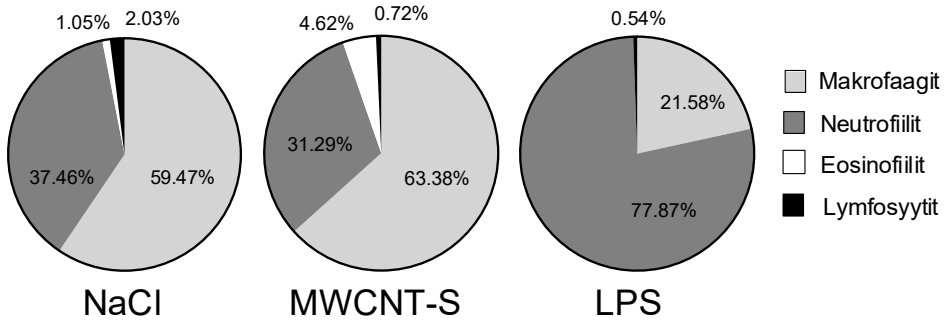
Kuva 14. Sekundäärinen (tulehdussolujen välittämä) perimämyrkyllinen vaikutus. Vasemmalta: vaurioituneen DNA:n osuus (%; komeettamenetelmä) ihmisen A549-epiteelisoluissa 3 ja 24 tunnin yhteisviljelmässä pitkille, suorille hiilinanoputkille (MWCNT-S) altistetuilta hiiriltä kerättyjen keuhkokuuhtelunäytteen solujen (Transwell® -membraani-insertissä) kanssa. DNA-vauriot lisääntyivät tilastollisesti merkitsevästi 3 tunnin yhteisviljelyn jälkeen, mutta vaikutusta ei havaittu 24 tunnin yhteisviljelyssä. Pylväät kuvastavat keskiarvoja (+ keskiarvon keskivirhe). ** $p < 0,01$ (t -testi; PBS-ryhmään verrattuna). PBS – keuhkokuuhtelunäyte fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella käsitellyiltä hiiriltä (kontrolliryhmä).

Bronkiaaliset BEAS-2B-solut näyttivät reagoivat klastogeeniseen tekijään hitaammin kuin alveolaariset A549-solut. Yhteisviljelyssä BEAS-2B-soluissa hiilinanoputkialtistettujen hiirten BAL-solut lisäsivät hieman vaurioituneen DNA:n osuutta verrattuna suolaliuosaltistukseen 24 tunnin yhteisviljelyn jälkeen, mutta ero suolaliuoksella käsiteltyjen eläinten keuhkokuuhutelnäytteen vaikutukseen ei ollut tilastollisesti merkitsevää (**Kuva 15**). On mahdollista, että solut olivat ehtineet korjata DNA-vauriot tai sitten vaurioista kärsineet solut kuolivat 24 tunnin viljelyn aikana.



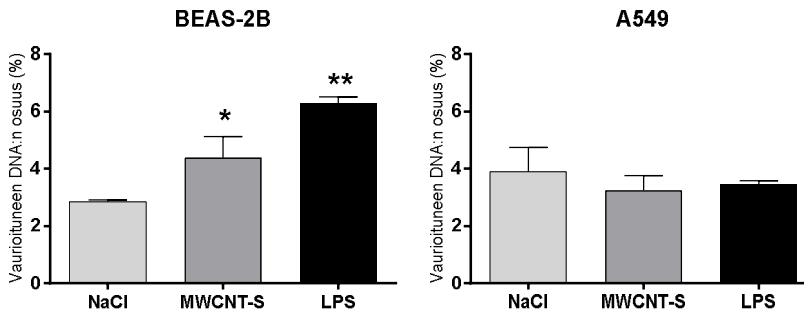
Kuva 15. Vaurioituneen DNA:n osuus (%; komeettamenetelmä) BEAS-2B-soluissa, joita viljeltiin 3 tai 24 tuntia pitkille, suorille hiilinanoputkille (MWCNT-S) altistettujen hiiren keuhkokuuhutelnäytteen solujen (Transwell® -membraani-insertissä) kanssa. 24 tunnin näytteessä DNA-vaurioiden taso BEAS-2B-soluissa oli hieman korkeampi yhteisviljelyssä hiilinanoputkille altistettujen hiirten keuhkokuuhutelnäytteen solujen kanssa kuin fosfaattipuskuroidulle suolaliuokselle (PBS) altistettujen hiirten keuhkokuuhutelnäytteen kanssa – ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää. Pylväät kuvastavat keskiarvoja (+ keskiarvon keskivirhe).

Seuraavassa koesarjassa tulehdussolujen määrää *ex vivo* -kokeessa kasvatettiin niin, että BAL-solujen ja epiteelisolujen suhde oli 50:1, kuten oli tehty aiemmassa yhteisviljelytutkimuksessa, jossa oli käytetty rotan BAL-soluja (Driscoll ym. 1997) Tunnettu keuhkotulehduksen aiheuttaja LPS lisäsi selvästi tulehdussolujen kokonaismäärää BAL-näytteessä n. 2,5-kertaiseksi suolaliuokselle altistettuun ryhmään verrattuna. Tulehdussolujen kokonaismäärä ei ollut noussut MWCNT-S-ryhmässä. LPS-altistetuilla hiirillä neutrofiilien osuus oli selvästi kasvanut verrattuna hiilinanoputkille ja suolaliuokselle altistettuihin hiiriin (**Kuva 16**). Sen sijaan eosinofiilisiä tulehdussoluja ei havaittu LPS-altistuksen jälkeen lainkaan.



Kuva 16. Erityyppisten tulehdussolujen keskimääräiset osuudet keuhkokuuhtelunäytteessä pitkille, suorille hiilinanoputkille (MWCNT-S), lipopolysakkaridille (LPS) ja fysiologiselle suolaliuokselle (NaCl) altistetuilla hiirillä. LPS-altistus lisäsi huomattavasti neutrofiilien osuutta.

Yhteisviljelykokeessa MWCNT-S:lle altistettujen hiirten BAL-solujen havaittiin lisäävän DNA-vaurioiden määrää (suolaliuosryhmään verrattuna) insertin toisella puolella viljelyssä BEAS-2B-soluissa. DNA-vaurioiden taso BEAS-2B-soluissa oli kohonnut vielä selvemmin yhteisviljelmissä LPS:lla käsiteltyjen hiirten BAL-solujen kanssa. Sen sijaan A549-soluissa DNA-vaurioiden määrä ei lisääntynyt 24 tunnin yhteisviljelyssä kummallakaan käsitelyllä (**Kuva 17**).



Kuva 17. DNA-vaurioiden osuus (%; komeettamenetelmä) BEAS-2B- ja A549-soluissa 24 tunnin yhteisviljelyssä keuhkokuuhtelunäytteen solujen (Transwell®-membraani-insertissä) kanssa, jotka oli kerätty pitkillä, suorilla hiilinanoputkilla (MWCNT-S), lipopolysakkaridilla (LPS) tai fysiologisella suolaliuoksella (NaCl; kontrolli) käsitellyiltä hiiriltä. DNA-vauriot lisääntyivät BEAS-2B-soluissa yhteisviljelmissä MWCNT- ja LPS-altistuksesta peräisin olevien keuhkokuuhtelunäytteen solujen kanssa. A549-soluissa ei havaittu vaikutusta. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (t -testi, NaCl-ryhmään verrattuna).

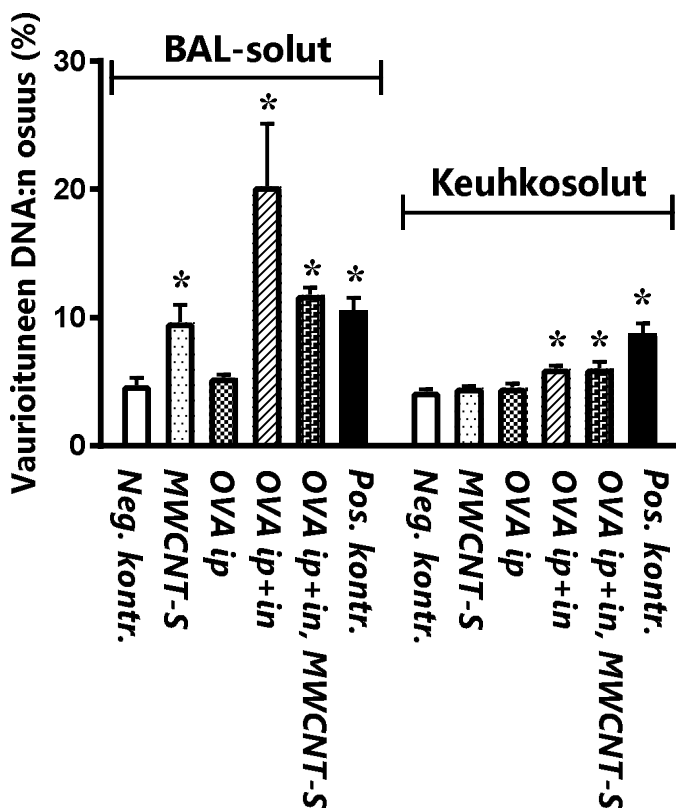
Tuloksemme osoittavat, että hiirten aspiraatiokäsittely MWCNT-S:llä ja LPS:lla saa aikaan genotoksisen tekijän syntyminen keuhkokuuhtelunäytteen soluissa.

4.3 Astma hiilinanoputkien genotoksisuuden alttiustekijänä

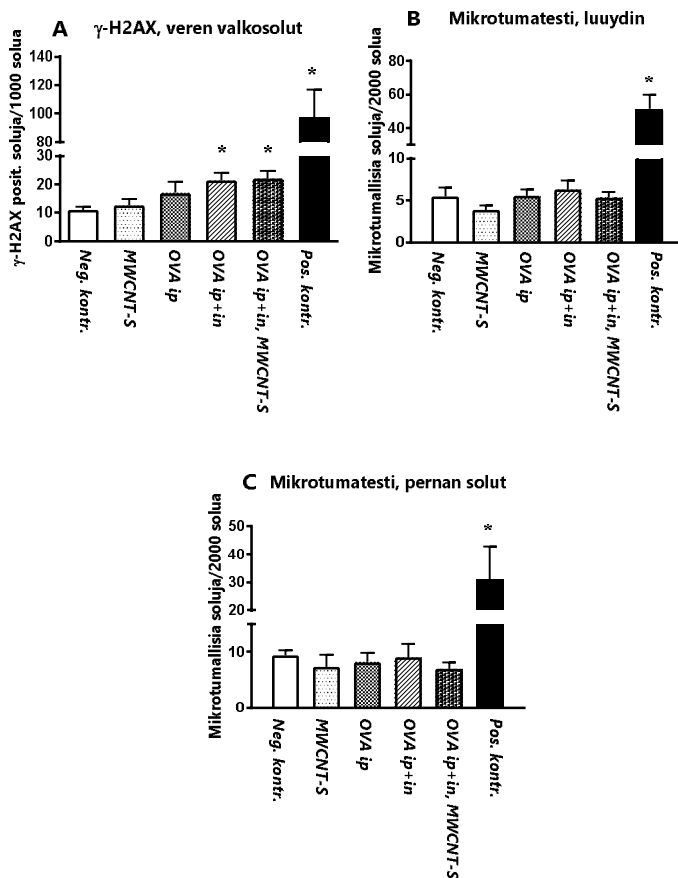
Altistus MWCNT-S:lle aiheutti tilastollisesti merkitsevän lisäyksen DNA-vaurioiden määrässä (komeettatesti) BAL-soluissa mutta ei keuhkosoluissa (**Kuva 18**). Astmaattisilla hiirillä DNA-vaurioiden perustaso oli noussut sekä BAL-näytteen että keuhkon soluissa, mutta hiilinanoputkialtistus ei tästä enää lisännyt DNA-vaurioiden määrää. Positiivinen kontrollikäsittely WC-Co:lla ja syklofosfamidilla (terveet hiiret) aiheutti DNA-vaurioita kummassakin solutyypissä.

MWCNT-S:llä ei ollut systeemistä genotoksista vaikutusta veren valkosoluissa (γ -H2AX-menetelmä), luuytimen polykromaattisissa punasoluissa (mikrotuma-analyysi) tai *ex vivo* viljellyissä pernan lymfosyyteissä (mikrotuma-analyysi) terveillä tai astmaisilla hiirillä (**Kuva 19**). Verrattuina terveisiin hiiriin astmaisilla hiirillä oli kuitenkin merkitsevästi korkeampi γ -H2AX-positiivisten valkosolujen esiintymistiheys veressä, mikä osoitti, että astmamallilla saatiin aikaan systeeminen lisäys DNA:n kaksijuosteisissa katkoksissa. Positiivinen kontrolli (WC-Co ja syklofosfamidi terveillä hiirillä) aiheutti voimakkaan genotoksisen vaikutuksen veren valkosoluissa, luuytimen polykromaattisissa punasoluissa ja pernan lymfosyyteissä.

Tulokset osoittavat, että MWCNT-S aiheuttaa DNA-vaurioita BAL-soluissa 4 päivän (4 h/pv) inhalaatioaltistuksessa hieman aiempia kokeita alhaisemmalle annostasolle (6,25 mg/m³). Astmaisilla hiirillä MWCNT-S:n genotoksista vaikutusta ei nähdä, vaan DNA-vaurioiden taso on koholla kaikissa astmaryhmissä sekä BAL- että keuhkosoluissa. Astmaisilla hiirillä DNA-vaurioiden perustaso on kohonnut myös veren valkosoluissa, eli astmamalli näyttää johtavan systeemisen genotoksiseen vaikutukseen.



Kuva 18. Pitkät, suorat hiilinanoputket (MWCNT-S) aiheuttivat paikallisen genotoksisen vaikutuksen terveiden C57Bl/6-hiirten keuhkohuuhtelunäytteen (BAL, bronchoalveolar lavage) soluis- sa mutta eivät keuhkosoluissa 24 tuntia 4 päivän (4 h/pv; päivinä 20., 22., 22. ja 23., ks. **Kuva 5**) inhalaatioaltistuksen (6,25 mg/m³) jälkeen, kun tarkasteltiin vaurioituneen DNA:n osuutta (%; keskiarvo + keskiarvon keskivirhe; komeettatesti). DNA-vaurioiden määrä oli lisääntynyt asmaattisilla hiirillä (OVA ip+in ja OVA ip+in, MWCNT-S) kummassakin solutyypissä MWCNT-S-käsittelystä riippumatta. Positiivinen kontrollikäsittely (Pos. kontr., terveet hiiret) volframikarbidin ja koboltin seoksella (1 mg/hiiri, aspiraatiolla) ja syklofosamidilla (1 mg/kg, intraperitoneaalisesti; näyte 24 h myöhemmin) lisäsi DNA-vaurioita sekä keuhkohuuhtelunäytteen että keuhkon soluissa. OVA ip - ovalbumiini ja adjuvantti intraperitoneaalisesti 1. ja 10. päivänä; OVA ip+in - ovalbumiini ja adjuvantti intraperitoneaalisesti 1. ja 10. päivänä sekä intranasaalisesti 21., 22. ja 23. päivä. * tilastollisesti merkitsevä ero ($p < 0,05$) negatiivisen kontrolliryhmän (Neg. kontr.) tulokseen verrattuna (2-suuntainen varianssianalyysi ja *a posteriori* -testi).

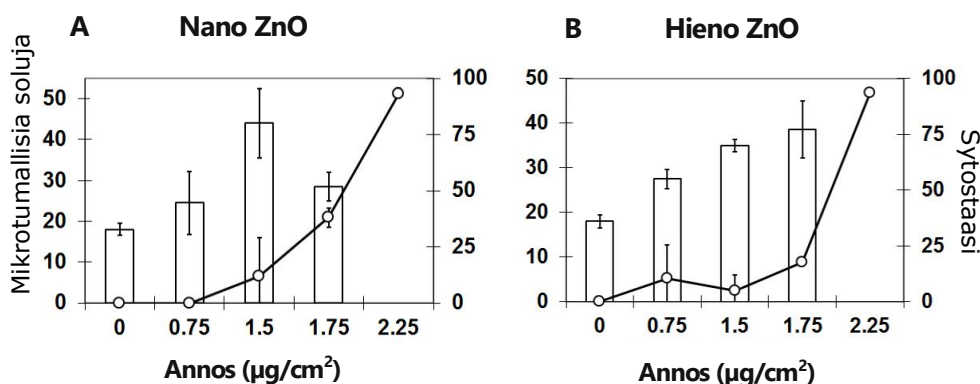


Kuva 19. Pitkillä, suorilla hiilianoputkilla (MWCNT-S) ei ollut systeemistä genotoksista vaikutusta terveillä tai astmaattisilla C57Bl/6-hiirillä 24 tuntia 4 päivän (4 h/pv; päivinä 20., 22., 22. ja 23., ks. **Kuva 5**) inhalaatioaltistuksen (6,25 mg/m³) jälkeen, kun tarkasteltiin **(A)** DNA:n kaksijuosteisia katkoksia sisältävien (γ -H2AX-positivisten) veren valkosolujen, **(B)** luuytimen mikrotumallisten polykromaattisten punasolujen ja **(C)** pernan mikrotumallisten kaksitumaisten lymfositien esiintymistiheyttä. *ex vivo*. Systeeminen genotoksinen vaikutus liittyi kuitenkin astmamalliin, sillä kaksijuosteisten DNA-katkosten määrän oli lisääntynyt astmaisilla hiirillä (OVA ip+in ja OVA ip+in, MWCNT-S) MWCNT-S-käsittelystä riippumatta. Positiivinen kontrollikäsittely (Pos. kontr., terveet hiiret) volframikarbidiin ja kobolttin seoksella (1 mg/hiiri, aspiraatiolla) ja syklofosfamidilla (1 mg/kg, intraperitoneaalisesti; näyte 24 h myöhemmin) lisäsi γ -H2AX-positiivisten ja mikrotumallisten solujen esiintymistä. Pylväät kuvastavat keskiarvoja (+ keskiarvon keskivirhe). OVA ip b - ovalbumiini ja adjuvantti intraperitoneaalisesti 1. ja 10. päivänä; OVA ip+in – ovalbumiini ja adjuvantti intraperitoneaalisesti 1. ja 10. päivänä sekä intranasaalisesti 21., 22. ja 23. päivä. * $p < 0,05$, verrattuna terveiden hiirten negatiiviseen kontrolliryhmään (Neg. kontr.) verrattuna (2-suuntainen varianssianalyysi ja *a posteriori* -testi).

4.4 Osittain liukoisen metallioksidin genotoksisuuden perusta

4.4.1 ZnO

Sekä nanokokoinen että hienojakoinen ZnO aiheuttivat mikrotumia BEAS-2B-soluissa 48 tunnin altistuksessa (**Kuva 20**). Vaikutus nähtiin kapealla annosalueella, jolla kumpikin ZnO-hiukkastyppi alkoi olla sytostaattinen eli hidasti solujen kasvua.



Kuva 20. Sekä **(A)** nanokokoinen ZnO (Nano ZnO) että **(B)** hienojakoinen ZnO (Hieno ZnO) lisäsivät mikrotumallisten solujen lukumäärää (per 1000 2-tumaista solua; pylväät) ja olivat sytostaattisia (käyrät) BEAS-2B-soluissa 48 tunnin altistuksessa. Tulokset on esitetty keskiarvoina (\pm keskiarvon keskivirhe). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; verrattuna kontrolliin. Tulokset on julkaistu (Roszak ym. 2016).

Nanokokoinen ZnO aiheutti DNA-vaurioiden annosvasteisen lisääntymisen BEAS-2B-soluissa kolmen ja kuuden tunnin käsittelyllä (**Kuva 21**). Samalla annostasolla hienojakoinen ZnO ei lisännyt DNA-vaurioita. Kumpikin ZnO-hiukkastyppi oli varsin solutoksinen, ja nanokokoinen ZnO:n genotoksinen vaikutus nähtiin kapealla, osin solutoksisella annosalueella.

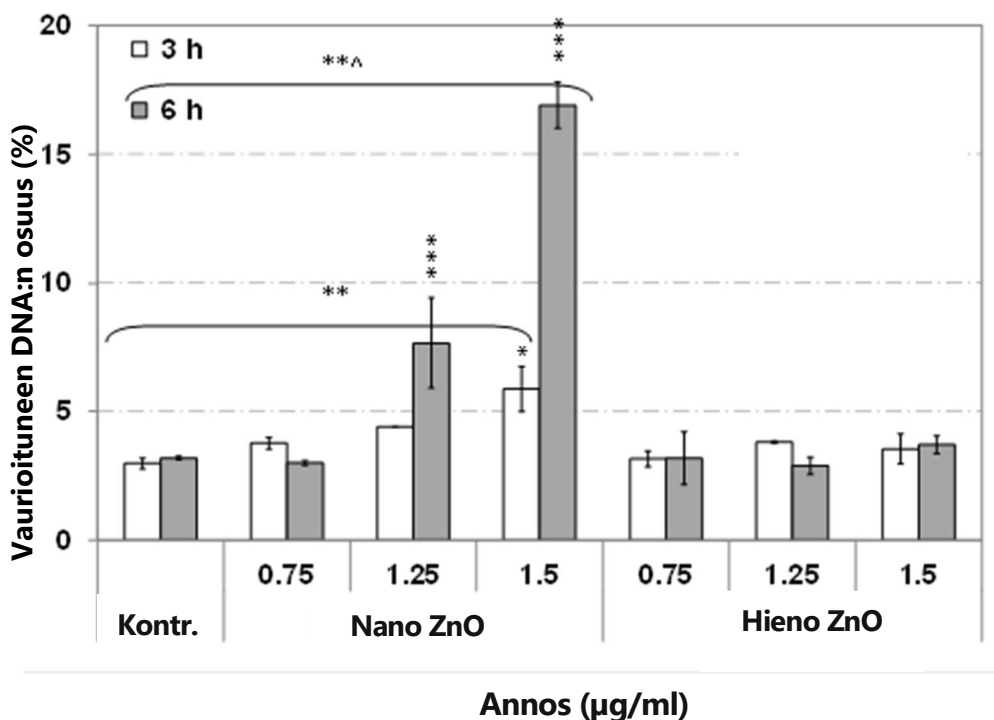
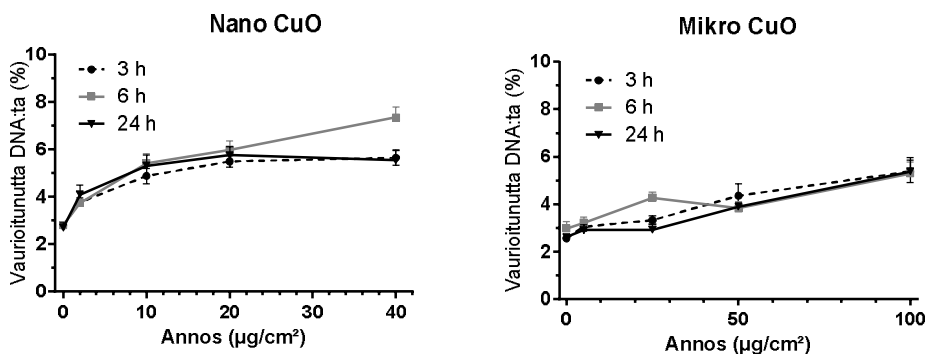


Fig 21. Nanokokoinen ZnO (Nano ZnO; 30-35 nm) aiheutti annosvasteisen nousun DNA-vaurioiden tasossa (komeettamenetelmä) BEAS-2B-soluissa 3 ja 6 tunnin altistuksessa. Hiemojakooinen ZnO ei lisännyt DNA-vaurioita (Hiemo ZnO; 150-300 nm). Tulokset on esitetty keskiarvoina (\pm keskiarvon keskivirhe). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; verrattuna kontrolliryhmään (Kontr.; yksisuuntainen varianssianalyysi ja Tukeyn *a posteriori* -testi) tai lineaariselle regressiolle (kaaret). Tulokset on julkaistu (Roszak ym. 2016).

Hyperspektraalimikroskoopissa BEAS-2B-solujen sisällä ei nähty nanokokoisia ZnO-hiukkasia, vaikka lyhyin tarkastelu-aika oli vain tunti. Näytti siis siltä, että ZnO-nanohiukkaset liukenevat nopeasti solun sisällä. Zn^{2+} -ionipitoisuuden äkillinen nousu solussa luultavasti selittää ZnO:n voimakkaan solutoksisuuden alhaisilla annoksilla.

4.4.2 CuO

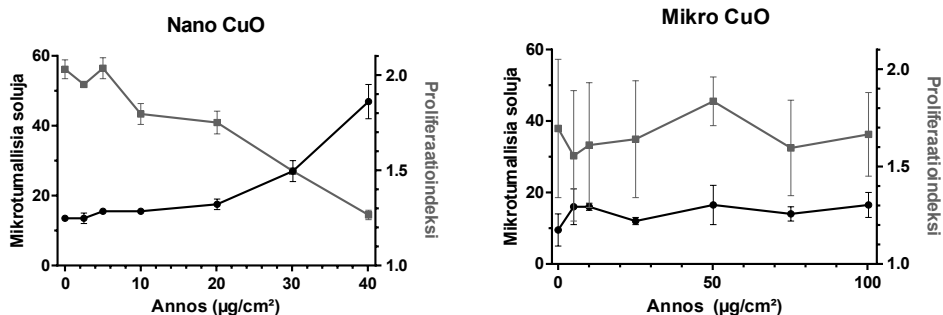
Sekä nanokokoinen että mikrokokoinen CuO aiheuttivat DNA-vaurioiden annoksesta riippuvaisen lisääntymisen BEAS-2B-soluissa kaikilla käsittelyajoilla (3, 6 ja 24 h) (**Kuva 22**). Nanokokoisen CuO:n vaikutus ilmeni kuitenkin selvästi alhaisemmillä annoksilla kuin mikrokokoisen CuO:n.



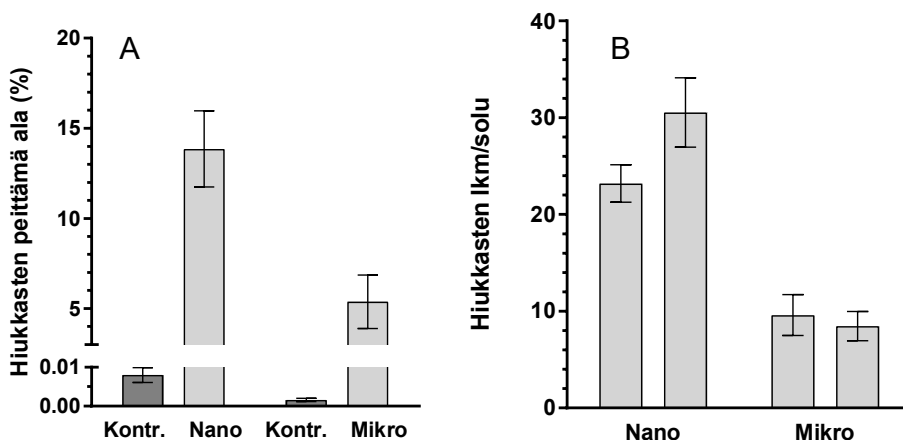
Kuva 22. DNA-vaurioiden osuus (%) BEAS-2B-soluissa 3, 6 ja 24 tunnin altistuksessa nanokokoisille (<50 nm) ja mikrokokoisille (<10 μm) CuO-hiukkasille. Tulokset on esitetty keskiarvoina (\pm keskiarvon keskivirhe). Nanokokoinen CuO aiheutti DNA-vaurioita selvästi alhaisemmillä annoksilla kuin mikrokokoinen CuO.

CuO-nanohiukkaset lisäsivät selkeästi mikrotumallisten solujen määrää korkeimmilla annoksilla, jotka myös hidastivat solusykliä, mikä ilmeni proliferaatioindeksin alenemisenä CuO-annoksen noustessa (**Kuva 23**). Mikrokokoinen CuO ei aiheuttanut mikrotumia tutkitulla annosalueella eikä myöskään vaikuttanut proliferaatioindeksiin.

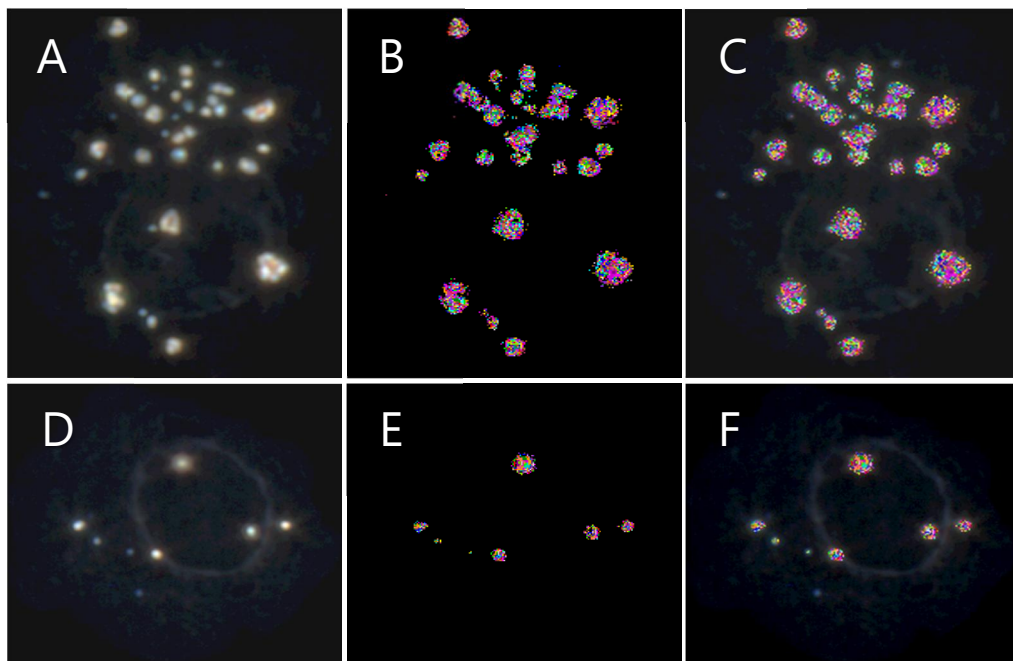
BEAS-2B solut ottivat sisään kummankin kokoisia hiukkasia (annoksella 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), joskin soluissa oli enemmän hiukkasia nanopartikkelialtistuksessa kuin mikropartikkeli-altistuksessa mitattuna partikkelien lukumäärällä ja osuutena mikroskooppilasilla olevan (litteän) solun pinta-alasta (**Kuva 24**). Mikroskoopissa solun sisällä näkyvät mikrokokoiset CuO:n partikkelit olivat samaa kokoluokkaa kuin soluissa olevat nanokokoiset CuO:n agglomeraatit (**Kuva 25**).



Kuva 23. Mikrotumallisten BEAS-2B-solujen esiintyminen (lkm/1000 2-tumaista solua; musta kuvaaja) ja proliferaatioindeksi (harmaa kuvaaja) 48 tunnin altistuksessa (vasemmalla) nanokokoisille (primääripartikkelien koko <50 nm) ja (oikealla) mikrokokoisille (<10 μm) CuO-hiukkasille. Tulokset on esitetty keskiarvoina (\pm keskiarvon keskivirhe). Nanokokoisella CuO:lla oli annosvasteinen vaikutus mikrotumia sisältävien solujen lisääntymiseen (genotoksinen vaikutus) ja proliferaatioindeksin alenemiseen (sytostaattinen vaikutus). Mikrokokoinen CuO ei aiheuttanut mikrotumia eikä ollut ollut sytostaattinen testin olosuhteissa.



Kuva 24. Hiukkasten määrä (keskiarvo \pm keskiarvon keskivirhe) BEAS-2B-soluissa hyperspektraalimikroskooppitulosten perusteella 3 tunnin altistuksessa nanokokoisille (Nano; <50 nm) ja mikrokokoisille (Mikro; <10 μm) CuO-hiukkasilla (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). **(A)** Hiukkasten peittävä solualan osuus (%). **(B)** Hiukkasten lukumäärä solua kohti. Mikrokokoisiin CuO-hiukkasiin verrattuna nanokokoiset CuO-hiukkaset peittivät selvästi suuremman alan soluissa ja niiden lukumäärä oli suurempi. Kuvasta **A** ilmenee, että soluissa, joita ei käsitelty CuO:lla (Kontr.), järjestelmän virheellisesti tunnistamien "hiukkasten" peittävä ala oli hyvin alhainen.



Kuva 25. Hyperspektraalimikroskooppikuvia BEAS-2B-soluista, joita on käsitelty **(A-C)** nanokokoisella (<50 nm) CuO:lla tai **(D-F)** mikrokokoisella CuO:lla. Kummallekin CuO-hiukkastyypille ja käsittelemättömille soluviljelmille luotiin erikseen oma spektrikirjasto liki-infrapunasille aallonpituuksille. Kun pelkistä soluista saadut spektrit "suodatettiin" pois käsiteltyjen solujen spektreistä, saatiin kullekin hiukkastyypille ominaiset spektrit. Vasemmalla on siroavan valon hyperspektraaliskannauksen tulos nanokokoisella **(A)** ja mikrokokoisella **(D)** CuO:lla käsitellystä solusta. Keskimmäisissä kuvissa **(B ja E)** laitteisto on tunnistanut hiukkaspektrien kanssa yhtenevät spektrit ja merkinnyt ne solun kuvaan väreillä (näkyvät mustavalkokuvassa terävinä pisteinä). Oikealla hyperspektraalikuva ja hiukkaspektrien tunnistuskuva nanokokoisella **(C)** ja mikrokokoisella **(F)** CuO:lla käsitellystä solusta on yhdistetty. Vaikka viljelmään lisätty annos on sama (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), nanokokoisella CuO:lla käsitellyssä solussa on silmin nähdenkin enemmän hiukkasia kuin mikrokokoisella CuO:lla käsitellyssä solussa.

5 POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

5.1 Hiilinanoputket: genotoksiset vaikutukset ja tulehdus hiirillä

Tutkimuksissa havaittiin, että 4 päivän inhalaatioaltistus syöpävaaralliseksi tunnetuille pitkille ja suorille MWCNT-S-hiilinanoputkille johti genotoksiseen vaikutukseen keuhkosyövän kohdesoluissa (tyypin II alveolaariset solut, ATII). Samoilla hiirillä havaittiin myös selkeä keuhkotulehdus (ks. Catalán ym. 2016). Myös aiemmassa hankkeessa osoitettiin, että MWCNT-S:n inhalaatio ja faryngaalinen aspiraatio aiheuttavat voimakkaan keuhkotulehduksen ja DNA-vaurioita hiiren keuhkosoluissa (sekapopulaatio) (Rydman ym. 2013, 2014, 2015; Rydman 2016). Samanlaisia tuloksia ovat raportoineet Kato ym. (2013). Nanopartikkeli-inhalaation aiheuttamaa mikrotumien lisääntymistä ATII-soluissa ei ole kuitenkaan aiemmin kuvattu, joskin ohuiden ja lyhyiden moniseinäisten hiilinanoputkien on havaittu aiheuttavan mikrotumia rottien ATII-soluissa intratrakeaalisen annostuksen jälkeen (Muller ym. 2008a).

Nyt raportoitavassa hankkeessa lyhyiden, taipuisien ja ohuiden MWCNT-T-hiilinanoputkien hengittäminen ei aiheuttanut genotoksista vaikutusta keuhkoissa. Tulos on yhteneväinen aiemmassa hankkeessa MWCNT-T:n faryngaalisella aspiraatiolla saamamme negatiivisen tuloksen kanssa (Rydman ym. 2013). MWCNT-T-inhalaatio ei myöskään saanut aikaan keuhkotulehdusta (Rydman ym. 2014). MWCNT-T:n genotoksisuudesta koe-eläimillä ei ole muita tutkimuksia. Samankaltaisten, ohuehkojen tai lyhyiden MWCNT-materiaalien genotoksisuudesta *in vivo* on saatu sekä positiivisia että negatiivisia tuloksia (Muller ym. 2008a; Kim ym. 2012, 2014; Cao ym. 2014; Poulsen ym. 2015).

Kummallakaan tutkimallamme hiilinanoputkityypillä ei ollut systeemistä genotoksista vaikutusta luuytimessä tai verisoluissa. Tuloksia on tarkasteltu laajemmin julkaisussamme (Catalán ym. 2016).

Tulehduksen ja genotoksisuuden välistä yhteyttä tutkittiin myös poistogeenisillä hiirillä, joilta puuttui *IL1R*-geeni (interleukiini 1:n reseptori). *IL-1R*:n katsotaan olevan keskeisessä roolissa tulehduksen ohjaavan inflammasomin aktivaatiossa. Jos inflammasomista riippuvainen tulehdus olisi tärkeää genotoksisten vaikutusten synnylle, hiilinanoputkialtistuksen tulisi tuottaa vähemmän DNA-vaurioita geenimuunneltujen kuin normaalihiirien keuhkoissa. Inhalaatioaltistus MWCNT-S:lle aiheutti selvän paikallisen genotoksisen vaikutuksen hiirten keuhkoissa riippumatta *IL1R*-geenistä. Näinollen *IL1R* ei ole välttämätön MWCNT-S:n aiheuttaman genotoksisen vaikutuksen synnylle keuhkoissa. Aiemmassa tutkimuksessa MWCNT-S:n faryngaalinen aspiraation aiheuttama neutrofilia ja neutrofiilejä kutsuvien kemokiinien mRNA-tasot olivat alentuneet *IL1R*^{-/-}-hiirillä, mutta keuhkotulehduksen *IL1R*-geenin puuttuminen ei poistanut (Rydman ym. 2015).

Tuloksemme osoittavat, että MWCNT-S-inhalaation aikaansaamaan akuuttiin keuhkotulehdukseen liittyy paikallinen genotoksinen vaikutus, joka ei riipu *IL1R*-geenistä ja jota ei nähdä taipuisilla hiilinanoputkilla. Genotoksisuus saattaa olla tärkeä osatekijä MWCNT-S:n syöpävaarallisuudessa. MWCNT-S:ää ohuempien hiilinanoputkien syöpävaikutus on epäselvempi: intraperitonealisella injeksiolla tehdyissä tutkimuksissa eri materiaaleilla on saatu vaihtelevia tuloksia (Muller ym. 2009; Nagai ym. 2011; Rittinghausen ym. 2014).

5.2 Tulehdussolujen tuottamien genotoksisten tekijöiden merkitys

Ex vivo -kokeittemme tulokset osoittivat, että hiirten aspiraatiokäsittely MWCNT-S-hiilinanoputkilla johti genotoksisen tekijän syntymiseen BAL-näytteen soluissa. Membraaniinsertin sisälle sijoitetut, MWCNT-S:llä käsitellyiltä hiiriltä kerätyt BAL-solut saivat aikaan DNA-vaurioiden lisääntymisen insertin toisella puolella viljellyissä epiteelisoluissa. Alveolaarisissa A549-soluissa lisääntyminen tapahtui 3 tunnin (mutta ei 24 tunnin) yhteisviljelyn jälkeen ja bronkiaalisissa BEAS-2B-soluissa 24 tunnin (mutta ei 3 tunnin) yhteisviljelyn seurauksena. On epäselvää, mistä solulinjojen välinen aikatauluero johtui. BEAS-2B-soluilla genotoksinen vaikutus oli selvempi, kun tulehdussolujen ja epiteelisolujen lukumäärän suhdetta kasvatettiin (50:1) kuin jos BAL-näyte lisättiin yhteisviljelmiin sellaisenaan. DNA-vaurioiden taso oli noussut myös BAL-näytteen soluissa.

LPS on tehokas tulehduksen aiheuttaja ja sai tässäkin kokeessa aikaan faryngalisella aspiraatiolla annosteltuna voimakkaan neutrofiilisen tulehdusreaktion hiirten keuhkoissa. BAL-solut LPS:lla käsitellyiltä hiiriltä aiheuttivat yhteisviljellyissä BEAS-2B-soluissa selkeän nousun DNA-vaurion tasossa ja näyttivät näin ollen tuottavan genotoksista tekijää yhteisviljelmissä.

Tulokset sopivat aiempaan käsitykseen, jonka mukaan klastogeenisen tekijä liittyy tulehdusreaktioon. Tutkimuksestamme ei ilmene, mitkä tulehdusolut tuottavat genotoksista tekijää. Neutrofiilejä oli tässä sarjassa saman verran suolaliuoksella ja MWCNT-S:llä käsitellyissä ryhmissä, joten neutrofiilien määrä sinänsä ei selitä tuloksia, ellei avainasemassa ole käsiteltyjen aktivoimien tulehdussolujen määrä.

Keuhkohuuhtelulla hiireltä talteen saatava tulehdussolujen kokonaismäärä oli alhainen, eikä mahdollistanut useiden rinnakkaisviljelmien tai aikapisteiden käyttöä samassa kokeessa, lukuun ottamatta LPS-käsittelyä. Saatuja tuloksia on siksi pidettävä alustavina. Rotilta keuhkohuuhtelulla saataisiin kerättyä suurempi määrä tulehdussoluja kuin hiiriltä, mikä mahdollistaisi laajemmat yhteisviljelykokeet.

Ihmisen monosyyteistä erikoistetuilla makrofaageilla tehdyissä yhteisviljelykokeissa ei havaittu genotoksisia vaikutuksia insertin toisella puolella kasvaneissa BEAS-2B-soluissa

makrofaagien altistuksessa MWCNT-S:lle, asbestille tai tsyмосaanille. Makrofaagien kasvatusolosuhteet Transwell®-insertissä eivät ehkä suosineet riittävästi makrofaagien aktiivisuutta. Tulevaisuudessa aktivaatio-olosuhteiden optimointiin tulisi kiinnittää erityistä huomiota. Koska sekundäärinen genotoksinen vaikutus voi välittyä myös reaktiivisten happiradikaalien välityksellä, muunkinlaiset koe-järjestelyt tulevat kyseeseen.

5.3 Astma hiilinanoputkien genotoksisuuden alttiustekijänä

Aiemmat tutkimukset TTL:ssa ovat osoittaneet, että MWCNT-S aiheuttaa BALB/c-hiirillä keuhkotulehdusta, johon ei kuitenkaan liity (toisin kuin tulehduskerkillä C57Bl/6-hiirillä) eosinofiilien (mm. astmaan liittyvä tulehdussolutyyppi) kulkeutumista keuhkoihin. Kun BALB/c-hiiriä altistettiin MWCNT-S:lle inhalaatiolla, DNA-vaurion määrä BAL-näytteissä oli kohonnut (kontrolliin verrattuna), mutta (toisin kuin C57Bl/6-hiirillä) altistus ei lisännyt DNA-vaurioita keuhkosoluissa. Keuhkohuuhtelunäytteessä suuri osa soluista on makrofaageja, jotka suojaavat keuhkoja keräämällä vieraita hiukkasia. Kokeessamme makrofaagit joutuivat siis suoraan alttiiksi isojen hiilinanoputkiannosten kanssa, mikä selittää genotoksisen vaikutuksen. Negatiivinen tulos keuhkosoluissa saattaa kuvastaa sitä, että hiilinanoputkien tulehdusvaikutus BALB/c-kannalla ei ollut riittävä tuottamaan DNA-vaurioita keuhkoissa.

Mallissamme astma saatiin aikaan toistuvalla ovalbumiini-käsittelyllä, joka sellaisenaan aiheutti DNA-vaurioita sekä BAL- että keuhkosoluissa. Tämä löydös selittyy astmaan liittyvän keuhkotulehduksen sekundäärisellä vaikutuksella. MWCNT-S:lle altistuneilla astmaattisilla hiirillä DNA-vaurioiden määrä oli korkeampi kuin terveillä kontrollihiirillä, mutta ei poikennut astmaattisten hiirten tasosta. Johtopäätöksenä on siis, että sekä MWCNT-S:n hengittäminen että astma aiheuttavat DNA-vaurioita BALB/c-hiirten BAL-soluissa, mutta astma ei lisää hiilinanoputkien vaikutusta. BALB/c-hiirten keuhkosoluissa hiilinanoputkille altistuminen ei vaikuttanut DNA-vaurioiden määrään, mutta astmaisilla hiirillä DNA-vauriotaso keuhkoissa oli kohonnut hiilinanoputkialtistumisesta riippumatta. Tulokset osoittavat myös, että eosinofiilia keuhkoissa ei ole tarpeen DNA-vaurion muodostumiselle BAL-soluissa. MWCNT-S:lla ei ollut systeemistä genotoksista vaikutusta. Astmaattisilla hiirillä havaittiin kuitenkin enemmän DNA:n kaksijuosteisia katkoksia veren valkosolujen tumissa kuin terveillä hiirillä.

Astmaiset hiiret eivät siis olleet terveitä eläimiä herkempiä MWCNT-S:n genotoksisille vaikutuksille. Hiilinanoputkikäsittelyn genotoksinen vaikutus voitiin osoittaa vain ei-astmaisilla hiirillä. Astmaisilla hiirillä DNA-vaurioiden perustaso keuhkoissa oli selkeästi kohonnut MWCNT-S:stä riippumatta. DNA-vaurioiden määrä oli astmaisilla hiirillä koholla myös veren valkosoluissa, mikä viittasi siihen, että astmaan liittyvä tulehdus tai oksidatiivinen stressi johtavat yleiseen (systemiseen) genotoksiseseen vaikutukseen.

DNA-vaurioiden lisääntyminen keuhkoissa on aiemmin kuvattu kahdessa astmahiiromalissa: pölypunkilla aiheutetussa astmassa (Chan ym. 2016) sekä muuntogeenisillä hiirillä, joilla astma liittyi IL-13-sytokiiniin (interleukiini 13) ylituotantoon (Chapman ym. 2014). Jälkimmäisessä tutkimuksessa nähtiin myös systeeminen genotoksinen vaikutus.

5.4 Osittain liukoisen metallioksidihiukkasten genotoksisuuden perusta

Hankkeessa BEAS-2B-soluilla saadut tulokset ZnO:n ja CuO:n nanokoisilla ja suuremmilla hiukkasilla vahvistavat ennakkokäsitystä hiukkaskoon merkityksestä osittain liukoisten metallioksidien genotoksisuudessa. ZnO ja CuO olivat kumpikin genotoksisia, mutta ZnO näytti liukenevan solun sisällä selvästi nopeammin kuin CuO.

Nanokokoinen ja hienojakoinen ZnO olivat solutoksisia BEAS-2B-soluille samalla, hyvin kapealla annosalueella (1,5–3,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Nanokokoinen ZnO (1,25–1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) lisäsi DNA-vaurioita 3 ja 6 tunnin käsittelyn jälkeen, kun hienojakoinen ZnO ei vaurioittanut DNA:ta. Sekä nanokokoinen että hienojakoinen ZnO aiheuttivat kuitenkin mikrotumia kutakuinkin samoilla, liki solutoksisilla annoksilla (1,25–1,75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 48 tunnin käsittelyssä. ZnO-nanohiukkasten liukeneminen solun sisällä näytti tapahtuvan varsin nopeasti, sillä hyperspektraalimikroskooppianalyysissä solun sisällä ei nähty partikkeleita yhden tunnin kuluttua käsittelystä. ZnO-nanohiukkasia ei näkynyt BEAS-2B-solujen sisällä tunnin käsittelyn jälkeen aiemmassakaan tutkimuksessa (Gilbert ym. 2012).

Tulokset kuvastanevat nanokokoinen ZnO:n parempaa kulkeutumista soluun tai nopeampaa liukenemistä solun sisällä käsittelyn alussa, mikä johtaa genotoksisen vaikutukseen (DNA-vauriot). Myöhemmässä vaiheessa erot tasaantuvat, ja sekä nanokokoinen että hienojakoinen ZnO ovat genotoksisia (mikrotumatesti). Koska ZnO on genotoksinen hyvin kapealla, liki sytotoksisella annosalueella, pienet erot esim. ZnO-partikkelien dispersiossa saattavat vaikuttaa paljonkin genotoksisuustestin lopputulokseen ja tulosten toistettavuuteen, mikä voi selittää ristiriitaiset tulokset ZnO:n genotoksisuudesta tieteellisessä kirjallisuudessa (ks. Roszak ym. 2016).

Vaikuttaa siltä, että ZnO:n genotoksisuus liittyy sen solutoksisuuteen, niin että genotoksisista vaikutusta ei välttämättä ole odotettavissa ilman solutoksisuutta. Tämä seikka vaatii lisätutkimuksia, mutta jos se on totta, ZnO:n genotoksiset vaikutukset työntekijöillä voitaisiin ehkä välttää pitämällä altistumistasot riittävän alhaisina. On silti pidettävä mielessä että olosuhteissa, jossa ZnO-altistuminen johtaa paikalliseen solutoksisen vaikutukseen, genotoksinen vaikutus on mahdollinen. Ammatillisessa ZnO-altistumisessa kuvattu metallikuume (Fine ym. 1997; Plum ym. 2010) saattaa edustaa tällaista tilannetta. Toisaalta yksikin soluun päässyt ZnO-hiukkanen saattaa olla solutasolla toksinen ja genotoksinen, mikä monimutkaistaa turvallisten annosten arviointia. Nanokokoinen ZnO:n

on osoitettu olevan genotoksinen hiirillä keuhkoputkeen ja vatsaonteloon annosteltuna sekä suun kautta annettuna (Jacobsen ym. 2015; Ghosh ym. 2016; Pati ym. 2016).

Nanokokoiset CuO-hiukkaset olivat solutoksisempia ja aiheuttivat DNA-vaurioita BEAS-2B-soluissa selvästi alhaisemmillä annoksilla (10-40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) kuin mikrokokoiset CuO-hiukkaset (50-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Toisin kuin mikrokokoiset hiukkaset CuO-nanohiukkaset lisäsivät myös mikrotumia (30-40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ja hidastivat solusykliä. Koska nanohiukkasten agglomeraatteja oli soluissa hyperspektraalianalyysin perusteella paljon enemmän kuin mikrohiukkasia, BEAS-2B-solut näyttivät ottavan tehokkaammin sisään nano- kuin mikrohiukkasia. Näin ollen Cu^{+2} -ionien solunsisäisen pitoisuus luultavasti kohoaa korkeammaksi nanohiukkasten kuin mikrohiukkasten kohdalla, mikä selittänee nanokokoisen CuO:n korkeamman solu- ja genotoksisuuden. Suuremman pinta-alansa vuoksi nanohiukkasten odotetaan liukenevan solun sisällä mikrohiukkasia nopeammin. Samoilla CuO-hiukkasilla aiemmin tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että vain nanokokoinen CuO aiheutti DNA-vaurioita HeLa S3 -syöpäsoluissa ja liukeni keinotekoisessa lysosomineesteessä huomattavasti paremmin kuin mikrokokoinen CuO (Semisch ym. 2014).

CuO ei ole yhtä solutoksinen kuin ZnO ja sen genotoksinenkin vaikutus vaatii suurempia annoksia. Toisaalta CuO:n genotoksisuus on nähtävissä selvästi laajemmalla annosalueella ja on siksi helpommin osoitettavissa kuin ZnO:n genotoksisuus. Tämä selittää osaltaan myös sen, että hiukkaskoon vaikutus on selkeämpi CuO:lla kuin ZnO:lla – muita tärkeitä tekijöitä ovat selvästi suurempi hiukkaskokoero nanokokoisen ja mikrokokoisen CuO:n kuin nanokokoisen ja hienojakoisen ZnO:n välillä ja CuO:n ZnO:a hitaampi solunsisäinen liukeneminen.

Hiukkaskoolla voidaan olettaa olevan vaikutusta myös ihmisen hengitysteitse tapahtuvassa altistumisessa CuO:lle niin, että nanohiukkaset ovat solu- ja genotoksisempia kuin mikrokokoiset hiukkaset. Intraperitoneaalisenä injektiona annetun nanokokoisen CuO:n on havaittu olevan genotoksista hiirillä ja rotilla (Song ym. 2012; Privalova ym. 2014).

Kumppaakaan tutkituista metallioksidoista ei ole luokiteltu syöpävaaralliseksi, vaikka sekä ZnO:n että CuO:n genotoksisuudesta on näyttöä niin soluviljelmistä kuin eläinkokeistakin. Lisäksi kumpikin yhdiste näyttää olevan genotoksisempi nanomuotoisena kuin suuremmassa hiukkaskoossa. Erityisesti ZnO:n genotoksinen vaikutus tuntuu liittyvän solutoksisuuteen, mutta turvallisten annosten arviointia hankaloittaa se, että yksikin pienhiukkasten solun sisällä voi olla genotoksinen.

6 TIEDOTUS JA MUU TIEDON HYÖDYNTÄMINEN

Tämän raportin lisäksi hankkeen tulokset julkaistaan kansainvälisessä ja kotimaisessa tieteellisessä kirjallisuudessa. Tutkimustuloksia on tähän mennessä julkaistu kahdessa tieteellisessä artikkelissa:

- Catalán J, Siivola KM, Nymark P, Lindberg H, Suhonen S, Järventaus H, Koivisto AJ, Moreno C, Vanhala E, Wolff H, Kling KI, Jensen KA, Savolainen K, Norppa H (2016) In vitro and in vivo genotoxic effects of straight versus tangled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* 10:794–806.
- Roszak J, Catalán J, Järventaus H, Lindberg HK, Suhonen S, Vippola M, Stępnik M, Norppa H (2016) Effect of particle size and dispersion status on cytotoxicity and genotoxicity of zinc oxide in human bronchial epithelial cells. *Mutat Res* 805:7–18.

Tuloksia tuodaan esiin myös kansainvälisissä ja kotimaisissa, nanomateriaalien turvallisuutta käsittelevissä konferensseissa, symposiumeissa, työpajoissa, komiteoissa ja työryhmissä sekä Euroopan Unionin Nanosafety Clusterissa. Toistaiseksi hanketta ja sen tuloksia on esitetty seuraavasti (esittäjä/esityksen tekijä alleviivattu):

Esitelmät

- Norppa H, Siivola KM, Vales G, Aimonen KJ, Lindberg HK, Falck GC-M, Catalán J, Savolainen KM. Genotoxicity of nanomaterials: challenges and nanospecificity. SENN2015 International Congress on Safety of Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies, Helsinki, 12.–15.4.2015, Programme and Abstracts, 21. (Keynote-esitelmä)
- Norppa H, Siivola KM, Vales G, Lindberg HK, Falck GC, Vanhala E, Catalán J, Savolainen KM. Genotoxicity of metal nanoparticles: nanospecific effects? ICOH2015, 31st International Congress on Occupational Health, Seoul, Etelä-Korea, 31.5.–5.6.2015, Abstracts, SS-0103. (Kutsuesitelmä, jonka esitti sairastapauksen vuoksi H. Wolff)
- Norppa H. Genotoxicity of nanomaterials. RADM Margaret Kitt (MPH, MD, Deputy Director for Program, NIOSH, Morgantown, WV, USA), vierailu Työterveyslaitoksessa, Helsinki, 26.2.2016.
- Norppa H (2016) Genotoksikologia ja nanoturvallisuus. Työterveyslaitos, Työympäristösalkkupäivä, Helsinki, 16.6.2016.
- Norppa H, Siivola K, Vales G, Lindberg H, Falck G, Vanhala E, Savolainen K, Catalán J. Nanospecific genotoxic effects of metal nanoparticles. European Environmental Mutagenesis & Genomics Society 45th Annual Meeting, Kööpenhamina, Tanska, 14.–18.8.2016, Abstracts, 32.



Posterit

- Catalán J, Järventaus H, Suhonen S, Siivola K, Moreno C, Rossi E, Koivisto J, Vanhala E, Wolff H, Alenius H, Savolainen K, Norppa H. Genotoxicity of long, tangled carbon nanotubes in mice. 52nd Annual Meeting of Society of Toxicology, San Antonio, Texas, USA, 10.–14.3. 2013. Abstract PS453. Toxicologist (Suppl to Toxicol Sci) 132 (1) (2013) 97.
- Siivola KM, Lindberg HK, Suhonen S, Norppa H. Genotoxicity of copper oxide nanoparticles in bronchial epithelial cells in vitro – effect of particle size and bovine serum albumin. nanoTOX2014, 7. International Nanotoxicology Congress, Antalya, Turkki, 23.–26.4.2014 Program & Abstracts, P096, 93-94
- Catalán J, Järventaus H, Suhonen S, Koivisto J, Moreno C, Rydman E, Alenius H, Savolainen K, Norppa H. Genotoxicity of long, needle-like carbon nanotubes in healthy and asthmatic mice. nanoTOX2014, 7. International Nanotoxicology Congress, Antalya, Turkki, 23.–26.4. 2014, Program & Abstracts, P228, 163–164.
- Pesonen S, Matikainen S, Norppa H, Catalán J. An in vitro coculture method for detection of secondary genotoxic effects in bronchial epithelial cells by carbon nanotube exposed macrophages. 43rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), Genome Integrity: from Mechanisms to Applied and Regulatory Research, Lancaster, UK, 6.–10.7.2014, Poster 096, Abstracts, 132. Mutagenesis 29:530..
- Siivola K, Lindberg H, Suhonen S, Norppa H. Genotoxicity and cellular uptake of copper oxide nanoparticles in bronchial epithelial cells in vitro – effect of particle size. SENN2015 International Congress on Safety of Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies, Helsinki, 12.–15.4.2015, Programme and Abstracts, Poster 74, 77.
- Norppa H, Siivola KM, Vales G, Lindberg HK, Falck GCM, Suhonen S, Vanhala E, Catalán J. Genotoxicity of metal nanoparticles – possible nanospecific effects. nanoTOX 2016 - 8th International Nanotoxicology Congress, 1.–4.6.2016, Boston, MA, USA, Abstracts, 213.

Tutkimustuloksia on lisäksi tarkoitus hyödyntää tekeillä olevassa erikoistyössä ja suunnitellussa väitöskirjassa.

7 LÄHTEET

Alenius H, Catalán J, Lindberg H, Norppa H, Palomäki J, Savolainen K (2014) Nanomaterials and human health. Kirjassa: Vogel U, Savolainen K, Wu Q, van Tongeren M, Brouwer D, Berges M (toim.) Handbook of Nanosafety – Measurement, Exposure and Toxicology. Academic Press, Waltham, USA, 59–133.

Borm PJ, Tran L, Donaldson K (2011) The carcinogenic action of crystalline silica: a review of the evidence supporting secondary inflammation-driven genotoxicity as a principal mechanism. *Crit Rev Toxicol* 41:756–770.

Bourdon JA, Saber AT, Halappanavar S, Jackson PA, Wu D, Hougaard KS, Jacobsen NR, Williams A, Vogel U, Wallin H, Yauk CL (2012) Carbon black nanoparticle intratracheal installation results in large and sustained changes in the expression of miR-135b in mouse lung. *Environ Mol Mutagen* 53:462–468.

Cao Y, Jacobsen NR, Danielsen PH, Lenz AG, Stoeger T, Loft S, Wallin H, Roursgaard M, Mikkelsen L, Møller P (2014) Vascular effects of multiwalled carbon nanotubes in dyslipidemic ApoE^{-/-} mice and cultured endothelial cells. *Toxicol Sci* 138:104–116.

Catalán J, Järventaus H, Vippola M, Savolainen K, Norppa H (2012) Induction of chromosomal aberrations by carbon nanotubes and titanium dioxide nanoparticles in human lymphocytes in vitro. *Nanotoxicology* 6:825–836.

Catalán J, Siivola KM, Nymark P, Lindberg H, Suhonen S, Järventaus H, Koivisto AJ, Moreno C, Vanhala E, Wolff H, Kling KI, Jensen KA, Savolainen K, Norppa H (2016) In vitro and in vivo genotoxic effects of straight versus tangled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* 10:794–806.

Catalán J, Rydman E, Aimonen K, Hannukainen K-S, Suhonen S, Vanhala E, Moreno C, Meyer V, da Silva Perez D, Sneek A, Forsström U, Højgaard C, Willemoes M, Winther JR, Vogel U, Wolff H, Alenius H, Savolainen KM, Norppa H (2017) Genotoxic and inflammatory effects of nano-fibrillated cellulose in murine lungs. *Mutagenesis* 32:23–32.

Chan TK, Loh XY, Peh HY, Tan WN, Tan WS, Li N, Tay JJ, Wong WS, Engelward BP (2016) House dust mite-induced asthma causes oxidative damage and DNA double-strand breaks in the lungs. *J Allergy Clin Immunol* 138:84–96.

Chapman AM, Malkin DJ, Camacho J, Schiestl RH (2014) IL-13 overexpression in mouse lungs triggers systemic genotoxicity in peripheral blood. *Mutat Res* 769:100–107.

Cho WS, Duffin R, Poland CA, Howie SE, Macnee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K (2010) Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung; important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect* 118:1699–1706.

Cho WS, Duffin R, Howie SE, Scotton CJ, Wallace WA, Macnee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K. (2011) Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. *Part Fibre Toxicol* 8:27.

Donaldson K, Poland CA, Schins RP (2010) Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology* 4:414–420.

Driscoll KE, Deyo LC, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Bertram TA (1997) Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis* 18:423–430.

Duan Y, Learoyd J, Meliton A, Leff A, Zhu X (2012) Inhibition of Pyk2 blocks lung inflammation and injury in a mouse model of acute lung injury. *Respiratory Research* 13:4.

Dufour EK, Kumaravel T, Nohynek GJ, Kirkland D, Toutain H (2006) Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 607:215–224.

Emerit I (2007) Clastogenic factors as potential biomarkers of increased superoxide production. *Biomarker Insights* 2:429–438.

Euroopan Komissio (2011) Komission suositus, annettu 18 päivänä lokakuuta 2011, nanomateriaalin määritelmästä (2011/696/EU). Euroopan unionin virallinen lehti L275, 38–40.

Falck GC-M, Lindberg HK, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalán J, Savolainen K, Norppa H (2009) Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. *Hum Exp Toxicol* 28:339–352.

Fine JM, Gordon T, Chen LC, Kinney P, Falcone G, Beckett WS (1997) Metal fume fever: characterization of clinical and plasma IL-6 responses in controlled human exposures to zinc oxide fume at and below the threshold limit value. *J. Occup Environ Med* 39:722–726.

Geiser M, Casaulta M, Kupferschmid B, Schulz H, Semmler-Behnke M, Kreyling W (2008) The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38:371–376.

Ghosh M, Sinha S, Jothiramajayam M, Jana A, Nag A, Mukherjee A (2016) Cyto-genotoxicity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticle in human lymphocyte cells in vitro and Swiss albino male mice in vivo. *Food Chem Toxicol* 97:286–296.

Gilbert B, Fakra SC, Xia T, Pokhrel S, Mädler L, Nel AE (2012) The fate of ZnO nanoparticles administered to human bronchial epithelial cells. *ACS Nano* 6:4921–4930.

Gomez-Gualdrón DA, Burgos JC, Yu J, Balbuena PB (2011) Carbon nanotubes engineering bio-medical applications. *Prog Mol Biol Transl Sci* 104:175–245.

Greim H, Norppa H (2010) Genotoxicity testing of nanomaterials - Conclusions. *Nanotoxicology* 4:421–424.

Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K, on behalf of the International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group (2014). Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol* 15:1427–1428.

Guichard Y, Gaté L, Darne C, Bottin MC, Langlais C, Micillino JC, Goutet M, Julien S, Stéphane B. (2010) In vitro study of mutagenesis induced by crocidolite-exposed alveolar macrophages NR8383 in cocultured big blue rat2 embryonic fibroblasts. *J Toxicol* 2010: 323828.

Guseva Canu I, Bateson TF, Bouvard V, Debia M, Dion C, Savolainen K, Yu JJ (2016) Human exposure to carbon-based fibrous nanomaterials: A review. *Int J Hyg Environ Health* 219:166–175.

Huang S, Chueh PJ, Lin YW, Shih TS, Chuang SM (2009) Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 241:182–194.

Ilves M, Palomäki J, Vippola M, Lehto M, Savolainen K, Savinko, T, Alenius H (2014) Topically applied ZnO nanoparticles suppress allergen induced skin inflammation but induce vigorous IgE production in the atopic dermatitis mouse model. *Part Fibre Toxicol*. 11:38.

Jacobsen NR, Stoeger T, van den Brule S, Saber AT, Beyerle A, Vietti G, Mortensen A, Szarek J, Budtz HC, Keramanizadeh A, Banerjee A, Ercal N, Vogel U, Wallin H, Møller P (2015) Acute and subacute pulmonary toxicity and mortality in mice after intratracheal instillation of ZnO nanoparticles in three laboratories. *Food Chem Toxicol* 85:84–95.

Ju-Nam Y, Lead JR (2008) Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ* 400:396–414.

Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L (2009) Size-dependent toxicity of metal oxide particles — A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett* 188:112–118.

Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S (2016) Lung carcinogenicity of inhaled multiwalled carbon nanotube in rats. *Part Fibre Toxicol* 13:53.

Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K (2013) Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology* 7:452–461.

Kienast K, Kaes C, Drumm K, Buhl R, Micke P, Oesch F, Hengstler J (2000) Asbestos-exposed blood monocytes – deoxyribonucleic acid strand lesions in co-cultured bronchial epithelial cells. *Scand J Work Environ Health* 26:71–77.

Kim JS, Sung JH, Song KS, Lee JH, Kim SM, Lee GH, Ahn KH, Lee JS, Shin JH, Park JD, Yu IJ (2012) Persistent DNA damage measured by comet assay of Sprague Dawley rat lung cells after five days of inhalation exposure and 1 month post-exposure to dispersed multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs) generated by new MWCNT aerosol generation system. *Toxicol Sci* 128:439–448.

Kim JS, Sung JH, Choi BG, Ryu HY, Song KS, Shin JH, Lee JS, Hwang JH, Lee JH, Lee GH, Jeon K, Ahn KH, Yu IJ (2014) In vivo genotoxicity evaluation of lung cells from Fischer 344 rats following 28 days of inhalation exposure to MWCNTs, plus 28 days and 90 days post-exposure. *Inhal Toxicol* 26:222–234.

Kisin ER, Murray AR, Keane M J, Shi XC, Schwegler-Berry D, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Wallace WE, Kagan VE, Shvedova AA (2007) Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J Toxicol Environ Health A* 70:2071–2079.

Knaapen A, Gungör N, Schins R, Borm P, Van Schooten F (2006) Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis* 21:225–236.

Koivisto AJ, Aromaa M, Mäkelä JM, Pasanen P, Hussein T, Hämeri K (2012) Concept to estimate regional inhalation dose of industrially synthesized nanoparticles. *ACS Nano* 6:1195–1203.

Krug HF (2014) Nanosafety research—are we on the right track? *Angew Chem Int Ed* 53:12304–12319.

Leopardi P, Cordelli E, Villani P, Cremona TP, Conti L, DeLuca G, Crebelli R (2010) Assessment of in vivo genotoxicity of the rodent carcinogen furan: evaluation of DNA damage and induction of micronuclei in mouse splenocytes. *Mutagenesis* 25:57–62.

Li JG, Li WX, Xu JY, Cai XQ, Liu RL, Li YJ, Zhao QF, Li QN (2007a) Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. *Environ Toxicol* 22:415–421.

Li Z, Hulderman T, Salmen R, Chapman R, Leonard SS, Young SH, Shvedova A, Luster MI, Simeonova PP (2007b) Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ Health Perspect* 115:377–382.

Lindberg HK, Falck GC-M, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalán J, Savolainen K, Norppa H (2009) Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicol Lett* 186:166–173.

Lindberg HK, Falck GC-M, Catalán J, Järventaus H, Santonen T, Norppa H (2010) Micronucleus assay for mouse alveolar type II and Clara cells. *Environ Molec Mutag* 51:164–172.

Lindberg HK, Korpi A, Santonen T, Säkkinen K, Järvelä M, Tornaeus J, Ahonen N, Järventaus H, Pasanen A-L, Rosenberg C, Norppa H (2011) Micronuclei, hemoglobin adducts and respiratory tract irritation in mice after inhalation of toluene diisocyanate (TDI) and 4-4'-methylenediphenyl diisocyanate (MDI). *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutag* 723:1–10.

Lindberg HK, Falck GC-M, Catalán J, Koivisto AJ, Suhonen S, Järventaus H, Rossi E, Nykäsenoja H, Peltonen Y, Alenius H, Savolainen KM, Norppa H (2012) Genotoxicity of inhaled nanosized TiO₂ in mice. *Mutat Res* 745:58–64.

Lindberg H, Falck GC-M, Singh R, Järventaus H, Suhonen S, Vanhala E, Catalán J, Vippola M, Farnier PB, Savolainen KM, Norppa H (2013) Genotoxicity of single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human epithelial and mesothelial cells in vitro. *Toxicology* 313:24–37.

Lindberg HK, Siivola KM, Falck GC-M, Suhonen S, Järventaus H, Vippola M, Vanhala E, Catalán J, Savolainen KM, Norppa H (2017) Genotoxicity of zinc oxide nanoparticles in human bronchial epithelial cells and mesothelial cells in vitro. *Käsikirjoitus valmisteilla*.

Lindholm C, Acheva A, Salomaa S (2010) Clastogenic plasma factors: a short overview. *Radiat Environ Biophys* 49:133–138.

Muller J, Decordier I, Hoet P, Lombaert N, Thomassen L, Huaux F, Lison D, Kirsch-Volders M (2008a) Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* 29:427–433.

Muller J, Huaux F, Fonseca A, Nagy JB, Moreau N, Delos M, Raymundo-Piñero E, Béguin F, Kirsch-Volders M, Fenoglio I, Fubini B, Lison D (2008b) Structural Defects Play a Major Role in the Acute Lung Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes: Toxicological Aspects. *Chem Res Toxicol* 21:1698-1705.

Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, Misawa N, Yamashita Y, Akatsuka S, Ishihara T, Yamashita K, Yoshikawa Y, Yasui H, Jiang L, Ohara H, Takahashi T, Ichihara G, Kostarelos K, Miyata Y, Shinohara H, Toyokuni S (2011) Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:E1330–8.

Norppa H, Greim H (2009) Conclusions and outlook. *Toxicol Lett* 186:174–175.

Nymark P, Jensen KA, Suhonen S, Kembouche Y, Vippola M, Kleinjans J, Catalán J, Norppa H, van Delft J, Briedé JJ (2014) Free radical scavenging and formation by multi-walled carbon nanotubes in cell free conditions and in human bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 11:4.

Nymark P, Wijshoff P, Cavill R, van Herwijnen M, Coonen MLJ, Claessen S, Catalán J, Norppa H, Kleinjans J, Briedé JJ (2015) Extensive temporal transcriptome and microRNA analyses identify

molecular mechanisms underlying mitochondrial dysfunction induced by multi-walled carbon nanotubes in human lung cells. *Nanotoxicology* 9:624–635.

Oberdörster G (2008) Nanoparticles and the brain: cause for concern? *J Nanosci Nanotechnol* 8:1–11.

Park EJ, Roh J, Kim SN, Kang MS, Han YA, Kim Y, Hong JT, Choi K (2011) A single intratracheal instillation of single-walled carbon nanotubes induced early lung fibrosis and subchronic tissue damage in mice. *Arch Toxicol* 85:1121–1131.

Pati R, Das I, Mehta RK, Sahu R, Sonawane A (2016) Zinc-oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects by inducing oxidative stress responses in macrophages and adult mice. *Toxicol Sci* 150:454–472.

Plum LM, Rink L, Haase H (2010) The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health* 7:1342–1365.

Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WAH, Seaton A, Stone V, Brown S, MacNee W, Donaldson K (2008) Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol* 3:423–428.

Poole CP Jr, Owens FJ (2003) *Introduction to nanotechnology*. Wiley, New York, s 114–132.

Poulsen SS, Saber AT, Williams A, Andersen O, Købler C, Atluri R, Pozzebon ME, Mucelli SP, Simion M, Rickerby D, Mortensen A, Jackson P, Kyjovska ZO, Mølhav K, Jacobsen NR, Jensen KA, Yauk CL, Wallin H, Halappanavar S, Vogel U (2015) MWCNTs of different physicochemical properties cause similar inflammatory responses, but differences in transcriptional and histological markers of fibrosis in mouse lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 284:16–32.

Privalova LI, Katsnelson BA, Loginova NV, Gurvich VB, Shur VY, Valamina IE, Makeyev OH, Sutunkova MP, Minigalieva IA, Kireyeva EP, Rusakov VO, Tyurnina AE, Kozin RV, Meshtcheryakova EY, Korotkov AV, Shuman EA, Zvereva AE, Kostykova SV (2014) Subchronic toxicity of copper oxide nanoparticles and its attenuation with the help of a combination of bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 12379-12406.

Rao CNR, Govindaraj A (2005) *Nanotubes and nanowires*, RSC Publishing, Cambridge, s 1.

Record IR, Jannes M, Dreosti IE, King RA (1995) Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. *Food Chem Toxicol* 33:919–922.

Rittinghausen S, Hackbarth A, Creutzenberg O, Ernst H, Heinrich U, Leonhardt A, Schaudien D (2014) The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats. *Part Fibre Toxicol* 11:59.

Rossi EM, Pylkkänen L, Koivisto AJ, Nykäsenoja H, Wolff H, Savolainen K, Alenius H (2010) Inhalation exposure to nanosized and fine TiO₂ particles inhibits features of allergic asthma in a murine model. *Part Fibre Toxicol* 7:35.

Roszak J, Catalán J, Järventaus H, Lindberg HK, Suhonen S, Vippola M, Stępnik M, Norppa H (2016) Effect of particle size and dispersion status on cytotoxicity and genotoxicity of zinc oxide in human bronchial epithelial cells. *Mutat Res* 805:7–18.

Rydman E (2016) Inflammatory effects of nanosized titanium dioxide and carbon nanotube pulmonary exposure. Academic dissertation, University of Helsinki and Finnish Institute of Occupational Health. Helsinki. *Dissertationes Scholae Doctoralis Ad Sanitatem Investigandam Universitatis Helsinkiensis*. 100 s. + 4 liitettä.

Rydman E, Catalán J, Nymark P, Palomäki J, Norppa H, Alenius H, Koivisto J, Wolff H, Hämeri K, Pylkkänen L, Järventaus J, Suhonen S, Siivola S, Tuomi T, Järvelä M, Vanhala E, Rantala J, Vippola M, Savolainen K (2013) Evaluation of the Health Effects of Carbon Nanotubes. Final Report on Project No. 109137 of the Finnish Work Environment Fund. Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki. 55 s.

Rydman E, Ilves M, Koivisto A, Kinaret P, Fortino V, Savinko T, Lehto M, Pulkkinen V, Vippola M, Hämeri K, Matikainen S, Wolff H, Savolainen K, Greco D, Alenius H (2014) Inhalation of rod-like carbon nanotubes causes unconventional allergic airway inflammation. *Part Fibre Toxicol* 11: 48.

Rydman EM, Ilves M, Vanhala E, Vippola M, Lehto M, Kinaret PAS, Pylkkänen L, Happonen M, Hirvonen M-R, Greco D, Savolainen K, Wolff H, Alenius H (2015) A single aspiration of rod-like carbon nanotubes induces asbestos-like pulmonary inflammation mediated in part by the IL-1 receptor. *Toxicol Sci* 147:140–155.

Saber AT, Jensen KA, Jacobsen NR, Birkedal R, Mikkelsen L, Møller P, Loft S, Wallin H, Vogel H (2012) Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers. *Nanotoxicology* 6:453–471.

Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N, Ogata A (2009) Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci* 34:65–76.

Sargent LM, Shvedova AA, Hubbs AF, Salisbury JL, Benkovic SA, Kashon ML, Lowry DT, Murray AR, Kisin ER, Friend S, McKinstry KT, Battelli L, Reynolds SH (2009) Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. *Environ Mol Mutagen*. 50:708–717.

Sargent LM, Hubbs AF, Young SH, Kashon ML, Dinu CZ, Salisbury JL, Benkovic SA, Lowry DT, Murray AR, Kisin ER, Siegrist KJ, Battelli L, Mastovich J, Sturgeon JL, Bunker KL, Shvedova AA,



Reynolds SH (2012) Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat Res* 745:28–37.

Sargent LM, Porter DW, Staska LM, Hubbs AF, Lowry DT, Battelli L, Siegrist KJ, Kashon ML, Mercer RR, Bauer AK, Chen BT, Salisbury JL, Frazer D, McKinney W, Andrew M, Tsuruoka S, Endo M, Fluharty KL, Castranova V, Reynolds SH (2014) Promotion of lung adenocarcinoma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol* 11:3.

Savolainen K (2016) Nanotekniikan lupaukset. *Työterveyslaitos*. 215 s.

Savolainen K, Pyökkänen L, Norppa H, Falck G, Lindberg H, Tuomi T, Vippola M, Alenius H, Hämeri K, Koivisto J, Brouwer J, Mark D, Bard D, Berges M, Jankowska E, Posniak M, Farmer P, Singh R, Krombach F, Bihari P, Kasper G, Seipenbusch M (2010) Nanotechnologies, engineered nanomaterials and occupational health. *Safety Science* 48:957–963.

Savolainen K, Backman U, Brouwer D, Fadeel B, Fernandes T, Kuhlbusch T, Landsiedel R, Lynch I, Pyökkänen L together with the members of the NanoSafety Cluster who have contributed to the document and listed in an alphabetical order: Ahluwalia A, Ahtiainen J, Aitken R, Alenius H, Asbach C, Athersuch T, Bergamaschi E, Berges M, Bessems J, Bleeker E, Bloch D, Boland S, Boraschi D, Bos P, Bouillard J, Bouwmeester H, Byrne H J, Buttino I, Caillard B, Carlander D, Calzolari L, Cassee F, Cattaneo S, Costa AL, Crossley A, Dahmann D, Dawson K, Dekkers S, Dondero F, Falk A, Gehr P, González Fernández Á, Groenewold M, Gutleb A, Haase A, Handy R, Hassellöv M, Hazebrouck B, Hristozov D, Hund-Rinke K, Ilves M, Jensen KA, Johnson A, Jovasevic-Stojanovic M, Juntunen E, Kendall K, Koivisto J, Koppen G, Korenstein R, Krombach F, Kühnel D, Larese FF, Lofts S, Loureiro S, Maimon O, Marcomini A, Marvin HJP, Migliore L, Nelissen I, Njuguna J, Norppa H, Oomen A, Pakarinen K, Palmqvist A, Papadopoulos M, Park M, Peijnenburg W, Peters R, Pietroiusti A, Pozzi Mucelli S, Pronk A, Rebe SR, Riediker M, Rietveld A, Sachse S, Salvi O, Sánchez-Jiménez A, Santamaria J, Schlich K, Scott-Fordsmand J, Sips A, Sirviö S, Stamm H, Steinfeldt M, Stockmann-Juvala H, Svendsen C, Tielemans E, Tran L, Valsami-Jones E, Van de Meent D, van Gestel K, Vandebriel R, Vanhala E, Vázquez-Campos S, Vippola M, Vogel U, von der Kammer F, Wick P, Winther-Nielsen M, Özgüz V (2013) Nanosafety in Europe 2015-2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations. *Finnish Institute of Occupational Health*. 212 s.

Savolainen K, Vainio H (2011) Synteettisten nanohiukkasten ja nanoteknologian riskit. *Duodecim* 127:1097–1104.

Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, Johnson VJ, Gorelik O, Arepalli S, Hubbs AF, Mercer RR, Keohavong P, Sussman N, Jin J, Yin J, Stone S, Chen BT, Deye G, Maynard A, Castranova V, Baron PA, Kagan VE (2008) Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295:L552–L565.

Semisch A, Ohle J, Witt B, Hartwig A (2014) Cytotoxicity and genotoxicity of nano- and micro-particulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Part Fibre Toxicol* 11:10.

Siivola K (2017) Genotoxicity of zinc oxide nanoparticles in bronchial epithelial cells in vitro. Pro Gradu Thesis, University of Helsinki. 76 s.

Smart SK, Cassady AI, Lu GQ, Martin DJ. (2006) The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* 44:1034–1047.

Song M-F, Li YS, Kasai H, Kawai K (2012) Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *J Clin Biochem Nutr* 50:211–216.

Sun YP, Fu K, Lin Y, Huang W (2002) Functionalized carbon nanotubes: properties and applications. *Acc Chem Res* 35:1096–1104.

Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, Tsuda H (2016) Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci* 107:924–935.

Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J (2008) Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci* 33:105–116.

Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J (2012) Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci* 103:1001–1004.

Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH (2009) Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 69:8784–8789.

Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Jr, Rejesk, D, Hull MS (2015) Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 6:1769–1780.

Westbrook AM, Wei B, Braun J, Schiestl RH (2009) Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. *Cancer Res* 69:4827–4834.

Zhao X, Liu R (2012) Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environ Int* 40:244–255.

Zhu L, Chang DW, Dai L, Hong Y (2007) DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. *Nano Lett* 7:3592–3597.

Työsuojelurahaston rahoittamassa hankkeessa selvitettiin nanomateriaalien perimämyrkyllisyyteen (genotoksisuuteen) vaikuttavia tekijöitä mm. hyödyntämällä muuntogeenisiä hiiriä ja hyperspektraalimikroskooppia. Tarkastelun kohteina olivat moniseinäiset hiilinanoputket sekä sinkkioksidi- ja kuparioksidihiuksaset.

Tutkimuksessa saatiin uutta tietoa hiilinanoputkien syöpävaarallisuuden mahdollisista syistä. Pitkät ja suorat hiilinanoputket aiheuttavat hengitetyinä hiiren keuhkoissa kromosomimuutoksia syöpävaikutuksen kohdesoluissa. Taipuisat hiilinanoputket eivät ole genotoksisia. Genotoksisuudella on yhteys keuhkotulehdukseen – tulehdussolujen erittämät genotoksiset tekijät näyttävät olevan tärkeitä. Astmaisilla hiirillä pitkien ja suorien hiilinanoputkien genotoksisuutta ei nähdä, sillä astma kohottaa DNA-vaurioiden perustasoa keuhko- ja verisoluisissa.

Hiukkaskoko vaikuttaa sinkki- ja kuparioksidihiuksasten kulkeutumiseen soluihin ja liukenemiseen solun sisällä. Hiukkaset ovat genotoksisempia nanomuodossa kuin suuremmassa koossa.



Työsuojelurahasto
Arbetskyddsfonden
The Finnish Work Environment Fund

Työterveyslaitos
Arbetshälsainstitutet
Finnish Institute of Occupational Health

PL 40, 00251 Helsinki

www.ttl.fi

ISBN 978-952-261-744-6 (nid.)

ISBN 978-952-261-743-9 (PDF)