



Työterveyslaitos

Hiilinanoputkien aiheuttamien terveysvaikutusten karakterisointi systemi- toksikologian avulla

Tietoa työstä

Jukka Sund
Jaana Palomäki
Marit Ilves
Elina Rydman
Terhi Savinko
Joonas Koivisto
Minnamari Vippola

Dario Greco
Henrik Wolff
Lea Pylkkänen
Kai Savolainen
Anne Puustinen
Harri Alenius



Työterveyslaitos

Hiilinanoputkien aiheuttamien terveysvaikutusten karakterisointi systeemitoksikologian avulla

LOPPURAPORTTI TYÖSUOJELURAHASTON HANKKEESTA NRO 110168

Jukka Sund, Jaana Palomäki, Marit Ilves, Elina Rydman, Terhi Savinko,
Joonas Koivisto, Minnamari Vippola, Dario Greco, Henrik Wolff, Lea
Pylkkänen, Kai Savolainen, Anne Puustinen, Harri Alenius

Työterveyslaitos

Helsinki 2013

Työterveyslaitos

Systeemitoksikologian tiimi

Topeliuksenkatu 41 a A

00250 Helsinki

www.ttl.fi

Toimitus: Jukka Sund, Anne Puustinen, Harri Alenius

Kansi: Mainostoimisto Albert Hall Finland Oy Ltd

© 2013 Työterveyslaitos ja kirjoittajat

Julkaisu on toteutettu Työterveyslaitoksen tuella

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

ISBN 978-952-261-290-8 (nid.)

ISBN 978-952-261-291-5 (PDF)

Juvenes Print, Tampere 2013

TIIVISTELMÄ

Nanomateriaalien pienen koon aikaansaamat uudet ominaisuudet ovat johtaneet nanomateriaaliteollisuuden räjähdysmäisen kasvun. Nanoteknologiaan liittyvän tutkimuksen määrä on viime vuosina kasvanut lähes eksponentiaalisesti, mutta turvallisuustutkimuksen osuus on ollut vähäistä. Hiilinanoputket ovat monikäyttöisiä teollisia nanomateriaaleja, jotka soveltuvat lukuisiin teollisuusaloihin. Hiilinanoputkien asbestin kaltainen muoto on kuitenkin nostanut esiin kysymyksiä niiden turvallisuudesta: muutamissa tutkimuksissa hiilinanoputket ovatkin osoittautuneet vaarallisiksi ja ne ovat aiheuttaneet altistuskokeissa muun muassa syöpää hiirille.

Työsuojelurahaston rahoittamassa projektissa olemme tutkineet hiilinanoputkien muodon osuutta terveysvaikutuksiin. Vertailimme pitkien ja jäykkien moniseinäisten hiilinanoputkien, pitkien ja lankakerämäisten moniseinäisten hiilinanoputkien sekä krokidoliittiasbestin vaikutuksia ihmisen primäärimakrofaagien erittämien proteiinien määrään ja laatuun. Lisäksi analysoimme yllä mainittujen hiilinanoputkien aikaansaamia tulehdusreaktioita hiirten keuhkoissa.

Jäykät hiilinanoputket aiheuttivat samankaltaisten proteiinien erityksen ihmisen primäärimakrofaageista kuin asbesti. Lankakerämäisten hiilinanoputkien sekretomimuutokset olivat vähäisempiä. Monet erittyneistä proteiineista liittyivät tulehdusreaktioihin, muuttamat viittasivat myös makrofaageissa käynnistyneeseen pyroptosiin. Yhden proteiinin, Syklofiliini A:n, on aikaisemmin osoitettu ilmentyvän astmassa. Tämän proteiinin erityys lisääntyi ainoastaan jäykille hiilinanoputkille altistamisen jälkeen. Hiirikokeissa havaittiin, että jäykät hiilinanoputket aiheuttivat astmankaltaisen tulehdustilan hiirten keuhkoissa. Astmareaktiot olivat luonnollisen immunitietin solujen välittämiä, normaalissa astmassa välittäjinä toimivat Th2-tyyppin solut. Lankakerämäiset hiilinanoputket eivät aiheuttaneet astmareaktioita hiirissä. Asbestin tiedetään aiheuttavan asbestoosia, mesoteliomaa ja keuhkosyöpää, mutta näissä lyhyen aikavälin altistumiskokeissa ei löytynyt mitään tunnettuja syöpää ennustavia signaalintireittejä, vain allergiseen tulehdukseen liittyviä tekijöitä tuli esiin.

Tutkimustemme perusteella jäykät hiilinanoputket aiheuttavat tulehdusreaktioita soluviljelmässä ja hiirten keuhkoissa. On mahdollista, että pitkät ja jäykät hiilinanoputket aiheuttavat ongelmia myös ihmisille. Työpaikoilla, joissa käsitellään pitkiä ja jäykkiä hiilinanoputkia, täytyy huolehtia riittävästä suojautumisesta ja altistuminen on minimoitava. Pitkät ja jäykät hiilinanoputket vaikuttavat ongelmallisilta, mutta pitkät ja lankakerämäiset hiilinanoputket eivät saaneet aikaan vastaavia reaktioita kokeissamme. Arvioitaessa hiilinanoputkien ja muiden teollisten nanomateriaalien turvallisuutta, on pidettävä mielessä nanomateriaalien monimuotoisuus – yleistämistä tulee välttää. Teollisten nanomateriaalien turvallisuutta pitää arvioida materiaali kerrallaan.

ABSTRACT

The new, interesting properties provided by the small size of engineered nanomaterials (ENMs) have caused a rapid growth in nanomaterial industry. At the same time, the number of publications in the field of nanotechnology is rising almost exponentially. Lagging behind are the safety studies of ENMs. Carbon nanotubes (CNTs) are one of the most versatile ENMs; they are already used widely in many fields of industry. Recently, some concerns of the safety of CNTs have arisen because of their asbestos-like properties and because of some forms of CNTs were found to cause cancer in mice.

In this project supported by Finnish Work Environment Fund, we have investigated the safety of carbon nanotubes, particularly the influence of CNT morphology on toxicity. The effects of long tangled CNTs (tangled CNTs), long rigid CNTs (rigid CNTs) and crocidolite asbestos on protein secretion from human primary macrophages were compared. In addition, we studied the inflammation responses in mice lung after exposure to tangled CNTs and rigid CNTs.

Rigid CNTs and asbestos caused similar type changes to secreted proteins from human primary macrophages. Exposure to tangled CNTs induced less protein secretion. Many secreted proteins were involved in inflammation and some in pyroptosis. One protein, which had increased secretion only after exposure to rigid CNTs, called Cyclophilin A, has been linked to asthma formation in mice lung. Interestingly, the asthma-like condition could be detected also in our *In vivo* experiments after exposure to rigid CNTs. Surprisingly, the asthma reactions were induced by cells of innate immunity. Normally asthma is Th2-cell mediated. Tangled CNTs were not causing asthma symptoms in mice. Asbestos exposure is associated with a risk for mesothelioma, asbestosis and lung cancer, but no pathways linked to these diseases came up in the performed short-term exposure studies.

Our studies suggest that rigid carbon nanotubes induced inflammatory reactions in human primary macrophages and in mice. Results indicate that long and rigid CNTs might cause problems in workplaces, therefore adequate protection and exposure prevention should be a priority. Even though long and rigid CNTs appear to be hazardous, long and tangled CNTs failed to produce harmful effects in our models. Therefore, when evaluating the safety of carbon nanotubes and engineered nanomaterials in general, it must be taken into an account that ENMs are highly heterogeneous and the safety must be analyzed individually – generalization should be avoided.

SISÄLTÖ

1	LÄHTÖKOHTA JA TAUSTAT	3
1.1	Teolliset nanomateriaalit ja niiden käyttökohteet	3
1.2	Teollisten nanomateriaalien terveysvaikutukset	3
1.3	Aikaisemmat tutkimukset	4
2	TAVOITTEET	5
3	MENETELMÄT JA TOTEUTUS	6
3.1	Valitut nanomateriaalit ja niiden ominaisuudet	6
3.2	Solukokeet	6
3.2.1	Solujen kasvatus	6
3.2.2	<i>In vitro</i> -kokeet	7
3.2.3	Solukuolleisuus	7
3.3	Kaksisuuntaisen differentiaaligelelektroforeesin (2D-DIGE) periaate	7
3.4	Makrofaageista eritettyjen proteiinien analysointi	8
3.5	Proteiinien tunnistaminen	9
3.6	Hiirikokeet	9
3.6.1	Hiiret	9
3.6.2	Inhalaatioaltistukset	9
3.6.3	Näytteiden kerääminen	10
3.6.4	RNA:n eristys keuhkokudoksesta	10
3.6.5	Komplementaarisen DNA:n (cDNA) synteesi	10
3.6.6	Polymeraasiketjureaktio (PCR)	10
3.6.7	ELISA	10
3.7	Tilastolliset analyysit	11
3.8	DNA-mikrosiruanalyysi	11
4	TULOKSET	12
4.1	Solukuolleisuus oli vähäistä kuuden tunnin altistuksissa	12

4.2	Jäykät kuidut aiheuttavat kasvaneen proteiinierityksen ihmisen primäärimakrofaageissa.....	12
4.3	2D-DIGE analyysillä saatiin selville proteiinitäplät, joiden ilmentyminen oli muuttunut tilastollisesti merkittävästi.....	13
4.4	Asbestin ja jäykkien hiilinanoputkien aiheuttamat muutokset proteiinien erityksessä muistuttavat toisiaan.....	16
4.5	Eri altisteilla vähän yhteisiä eritettyjä proteiineja	17
4.6	Altistus jäykällä hiilinanoputkilla aiheuttaa voimakkaan tulehdussolujen kerääntymisen hiirten keuhkoihin.....	19
4.7	Hankitun immunitietin vaste kasvaa hiirten keuhkoissa jäykällä hiilinanoputkilla tehdyn altistuksen jälkeen.....	20
4.8	Th2-tyyppin kemokiinien määrä kasvaa jäykällä hiilinanoputkilla altistettujen hiirten keuhkoissa	20
4.9	Jäykät hiilinanoputket aiheuttavat keuhkojen hyperreaktivateetin	21
4.10	IL-4 tuotanto jäykällä hiilinanoputkilla altistetuissa hiirissä on riippuvainen syöttösoluista.....	22
4.11	Geenien ilmentyminen muuttuu jäykällä hiilinanoputkilla altistettujen hiirten keuhkoissa	23
4.12	Astmaan ja keuhkotulehdukseen liittyvät vasteet jäykille hiilinanoputkille altistettujen hiirten keuhkoissa havaittiin myös DNA-mikrosirutekniikalla	24
5	POHDINTA.....	26
5.1	Jäykät hiilinanoputket ja asbesti aiheuttavat samankaltaisia vaikutuksia ihmisen primäärimakrofaagien proteiinieritykselle.....	26
5.2	Jäykät hiilinanoputket aiheuttavat astman kaltaisen reaktion hiirten keuhkoissa	29
6	YHTEENVETO	32
7	LÄHTEET	34

1 LÄHTÖKOHTA JA TAUSTAT

1.1 Teolliset nanomateriaalit ja niiden käyttökohteet

Teollisiksi nanomateriaaleiksi (TNM) määritellään ihmisen tarkoituksellisesti tuottamat hiukkaset, joiden yksi ulottuvuus on alle 100 nm. Pieni koko tuo materiaaleista esiin uusia ominaisuuksia, joita nanoteknologia pyrkii hyödyntämään. Nanoteknologia onkin yksi 2000-luvun alun suurimmista kasvualoista, vuoteen 2015 mennessä nanoteknologian lopputuotteiden markkina-arvoksi on arvioitu 1000 miljardia dollaria (Roco 2011). Määrällisesti eniten tuotetaan metallioksiedeja, varsinkin titaanidioksidia, jonka maailmanlaajuisen tuotannon on arvioitu olevan vuonna 2015 jopa 260 000 tonnia (Robichaud ym. 2009). Hiilinanoputkia on yksiseinäisiä (swCNT), jotka muodostuvat yhdestä hiiliatomikerroksesta ja moniseinäisiä (mwCNT), joissa on useita sisäkkäisiä yksiseinäisiä hiilinanoputkia. Hiilinanoputkien ominaisuuksiin kuuluu että ne ovat pitkiä, usein mikrometrejä, ja halkaisijaltaan ohuita – alle 100 nm (Donaldson ym. 2006). Nämä ominaisuudet antavat hiilinanoputkille hyvän sähkönjohtokyvyn ja mekaanisen kestävyuden (Sinha ym. 2006, Sun ym. 2002). Teollisia nanomateriaaleja käytetään yleisesti pinnoitteissa, elektroniikassa, kosmetiikassa ja lääketieteen sovelluksissa (Alexiou ym. 2006, Avouris ym. 2007, Lee ym. 2008, Salata 2004).

1.2 Teollisten nanomateriaalien terveysvaikutukset

Teollisiin nanomateriaaleihin liittyvä tutkimus on kasvanut räjähdysmäisesti viime vuosina, mutta nanomateriaalien terveystutkimuksen osuus kaikista alaan liittyvistä selvityksistä on pieni. Terveystutkimuksia tarvitaan nanoteollisuuden työntekijöiden sekä nanotuotteiden loppukäyttäjien turvallisuuden varmistamiseksi. Hyvänä esimerkkinä turvallisuustutkimuksen ja nanotuotteiden sääntelyn hitaudesta on, että Euroopan Unioni onnistui määrittämään nanomateriaali-termin vasta vuonna 2011 (2011/696/EU), vaikka nanomateriaalin määritelmä on keskeinen osa nanokokoisten hiukkasten sääntelyä ja nanoteknologiaa on käytetty kulutustuotteissa jo vuosia.

Pieni koko tuo mukanaan monien etujen lisäksi myös haittoja. Hengitysteiden kautta tapahtuvassa altistumisessa pienet hiukkaset pääsevät syvemmälle keuhkoihin kuin suuremmat (Oberdörster ym. 2005). Nanokokoisen titaanidioksidin on todettu aiheuttavan enemmän tulehdusta hiiren keuhkoissa kuin saman yhdisteen suuremmat hiukkaset (Sager ym. 2008). Myös hiilinanoputkien on pelätty aiheuttavan ongelmia elimistössä niiden kuitumaisuudesta johtuen. Asbestin kaltaiset pitkät ja biohajoamattomat nanokuidut saattavat olla vaarallisia päästessään keuhkoihin. Hiirikokeissa eräiden hiilinanoputkien onkin

raportoitu aiheuttavan tulehdusta, fibroosia ja mesoteliomaa keuhkoissa (Poland ym. 2008, Ryman-Rasmussen ym. 2009, Takagi ym. 2008).

1.3 Aikaisemmat tutkimukset

Aikaisemmissa tutkimuksissamme olemme selvittäneet erilaisten nanokokoisten titaanidioksidien terveysvaikutuksia hiirissä (Rossi ym. 2010a, Rossi ym. 2010b) ja useiden eri teollisten nanomateriaalien haitallisuutta ja kykyä aktivoida immuunivastetta hiiren anti-geeniä esittelevissä soluissa (Palomäki ym. 2010). Lisäksi tutkimme erilaisten teollisten nanomateriaalien proteiinikorona eli tarttumista proteiineihin ja arvioimme tarttumisen terveysvaikutuksia (Sund ym. 2011).

Tämä, Työsuojelurahaston rahoittama projekti pohjautuu Palomäen ym. (2011) tutkimukseen, jossa selvitettiin useiden erilaisten moniseinäisten hiilinanoputkien vaikutuksia ihmisen primäärimakrofaageissa. Tutkimuksessa havaittiin, että tietyn tyyppiset hiilinanoputket aktivoivat NLPR3-inflammasomikompleksin ihmismakrofaageissa ja saivat aikaan voimakkaan tulehdusreaktion. Näiden tulosten pohjalta halusimme selvittää moniseinäisten hiilinanoputkien terveysvaikutuksia proteomiikkaa hyödyntämällä solu- sekä hiirimalleja.

2 TAVOITTEET

Projektin tarkoituksena oli selvittää moniseinäisten hiilinanoputkien terveysvaikutuksia *in-vitro* sekä *in-vivo* -malleissa hyödyntämällä proteomiikan menetelmiä. Positiivisena kontrollina käytetään krokidoliittiasbestia. Yksityiskohtaiset osatavoitteet ovat:

- I. Tutkia erityyppisten hiilinanoputkien aiheuttamia muutoksia ihmisen primäärimakrofaagien erittämässä proteiineissa, sekretomissa.
- II. Analysoida hiilinanoputkien aiheuttamia keuhkotulehdusvasteita normaaleissa ja poistogeenisissä hiirissä proteomiikan ja DNA-mikrosirutekniikan avulla.

3 MENETELMÄT JA TOTEUTUS

3.1 Valitut nanomateriaalit ja niiden ominaisuudet

Testattaviksi materiaaleiksi valittiin nanokokoiset jäykät ja pitkät moniseinäiset hiilinanoputket (rigid mWCNT), lankakerämäiset ja pitkät moniseinäiset hiilinanoputket (tangled mWCNT) ja krokidoliittiasbesti. Jäykkien (rigid) mWCNT -kuitujen keskipituus oli 13 µm, halkaisija yli 50 nm ja alkuainepitoisuus yli 99 % hiiltä. Lankakerämäisten (tangled) mWCNT -kuitujen vastaavat mitat olivat 10-50 µm, 8-15 nm ja yli 99 % hiiltä, lisäksi katalyyttijäämiä alle 0,5 % (kuparia, rautaa ja nikkeliä). Asbestikuidut taas olivat keskipituudeltaan 4,6 µm, halkaisijaltaan 180 nm. Asbestikuitujen alkuainepitoisuuksia ei ollut saatavilla. Kuvat materiaaleista löytyvät Palomäki ym. julkaisusta (2011) ja materiaalien karakterisointi elektronimikroskopiolla (pyyhkäisy- ja läpäisyelektronimikroskopia, TEM), energiadiispersiivisellä spektroskopiolla (EDS, energy dispersion spectroscopy), röntgendiffraktiolla ja Brunauer-Emmet-Teller-menetelmällä (BET) on kuvattu Vippola ym. 2009.

Materiaalidispersiot valmistettiin punnitsemalla materiaalit lasiputkiin ja tekemällä niistä 1000 µg/ml laimennos PBS-liuokseen (fosfaattipuskuroitu suolaliuos, pH 7.4), jossa 2 % lämpö-inaktivoitua seerumia (fetal bovine serum, FBS). Tämän jälkeen liuosta ultraäänikäsiteltiin (sonikoitiin) 20 minuuttia +30 °C:ssa. Tämän jälkeen dispersio laimennettiin edelleen 100 µg/ml:ksi makrofaagien elatusliuokseen ja sonikoitiin uudestaan 20 minuuttia +30 °C:ssa.

3.2 Solukokeet

3.2.1 Solujen kasvatusta

Kokeissa käytettiin ihmisveren monosyyteistä erilaistettuja makrofaageja (Veripalvelu, Suomen Punainen Risti).

Makrofaagit erilaistettiin veren perifeerisistä monosyyteistä, jotka oli eristetty punavalkosolukerroksesta (Buffy coat) Ficoll gradientti-sentrifugaation avulla. Monosyytit pestiin kolmesti PBS:llä (pH 7.4), jonka jälkeen niiden annettiin tarttua 6-kuoppalevyille 50 minuuttia +37 °C:ssa ja 5 % CO₂:ssa RPMI 1640 (Invitrogen), 2 mM L-glutamiini, 1 % PEST elatusliuoksessa. Tämän jälkeen solut pestiin kolme kertaa PBS:llä. Solut erilaistettiin ja kasvatettiin 1 ml:ssä Serum-Free Macrophage Medium -elatusliuosta (Invitrogen), johon oli lisätty kasvutekijä (10 ng / ml GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Immunotools) ja 1 % PEST. Makrofaagi-elatusliuos vaihdettiin kahden päivän välein ja solut altistettiin nanomateriaaleilla tai asbestikuiduilla seitsemän päivää eristyksen jälkeen.

3.2.2 *In vitro* -kokeet

Makrofaageja altistettiin kuusi tai kahdeksantoista tuntia +37 °C, 5 % CO₂:ssa 100 µg/ml nanomateriaalidispersiolla (kts 3.1). Kaksi tuntia altistuksen käynnistymisestä, solut pestiin kolmesti lämpimällä PBS:llä ja elatusliuos vaihdettiin RPMI 1640 -liuokseen proteomiikka-analyysyä häiritsevän albumiinin poistamiseksi. Altistuksen päätteeksi elatusliuos kerättiin talteen ja mahdolliset hajonneet solut poistettiin sentrifugoimalla 750 g, 5 min +4 °C, jonka jälkeen elatusliuos pakastettiin -70 °C.

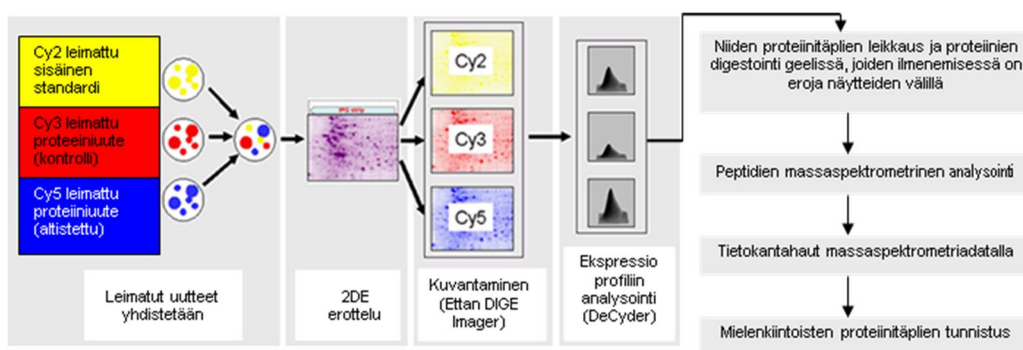
Pilottikokeissa soluja altistettiin myös bakteerin soluseinäarakenteella, LPS:llä (bakteerinen lipopolysakkaridi, Escherichia Coli O111:B4, Sigma Aldrich) 100 ng / ml pitoisuudella.

3.2.3 Solukuolleisuus

Solukuolleisuus mitattiin elatusliuoksen laktaattidehydrogenaasientsyymipitoisuuden (LDH) avulla kaupallisella kitillä (Cytotoxicity detection kitPLUS [LDH], Roche), valmistajan ohjeiden mukaan.

3.3 Kaksisuuntaisen differentiaaligeelielektroforeesin (2D-DIGE) periaate

Kaksisuuntaisessa geelielektroforeesissa proteiinit erotellaan ensin toisistaan proteiinien isoelektrisen pisteen (pI) (isoelektroninen fokusointi) ja sen jälkeen molekyylipainon mukaan geelielektroforeesilla (SDS-PAGE). Näin proteiinitäplät saadaan levitettyä isommalle pinta-alalle. Geelipohjaisten proteomiikkamenetelmien suurin ongelma on tarpeeksi hyvän toistettavuuden aikaansaaminen. Eri aikoina suoritettujen isoelektristen fokusointien ja geelielektroforeesien välillä voi olla suuriakin eroja proteiinispottien koossa ja ajautumisessa, vaikka näyte olisi sama. Tutkimuksessa käytettiin differentiaali-geelielektroforeesi (DIGE) -tekniikkaa, jolla toistettavuuseroja voidaan merkittävästi vähentää (Ünlü ym. 1997).



Kuva 1. 2D-DIGE:n ja proteiinien tunnistusten periaatteet

Yksi proteiininäyte leimataan fluoresoivalla Cy5-leimalla (esim. kontrolli) ja toinen Cy3-leimalla (esim. nanomateriaalilla altistettu näyte). Cy2-leimalla leimataan niin kutsuttu sisäinen standardi, joka sisältää yhtä paljon kaikkia kokeessa mukana olevia näytteitä (Kuva 1). Tämän jälkeen leimatut proteiiniuutteet sekoitettiin keskenään ja niissä olevat proteiinit erotellaan 2D-geelelektroforeesilla. Geelit kuvannetaan kolmella eri aallonpituusalueella fluoresenssidetektorilla (Ettan Dige Imager, GE Healthcare), jolloin yhdestä geelistä saadaan kolme eri proteomia (Kuva 1). Koska näytteitä tarvitaan vähintään kolme/ryhmä biologisten erojen toteamiseksi tilastollisesti, joudutaan ajamaan useampi geeli. Teknisen variaation korjaamiseksi kaikilla ajetuilla geeleillä käytetään samaa Cy2-leimattua sisäistä standardia, jota hyödynnetään vertaillessa proteiinien ilmentymistä ja intensiteettiä eri ryhmien välillä.

3.4 Makrofaageista eritetyjen proteiinien analysointi

Eritetyt proteiinit konsentroidiin (Amicon Ultra-15-centrifugal filter, Millipore) ja proteiiniliuos puhdistettiin isoelektristä fokuointia häiritsevistä aineista kuten suoloista (Ettan™ 2D clean-up kit). 50µg asbestilla, lankakerämäisellä mwCNT:llä tai jäykällä mwCNT:llä altistettujen tai altistamattomien solujen erittämiä proteiineja leimattiin 200 pmol:lla Cy5- tai Cy3-leimalla 30 minuuttia pimeässä jäällä. Sisäinen standardi tehtiin yhdistämällä yhtä suuri määrä materiaaleilla altistettujen sekä altistamattomien solujen erittämiä proteiineja, jotka leimattiin Cy2 värillä. Isoelektrinen proteiinien fokuointi tehtiin 18 cm IPG-liuskoilla (Immobiline Drystip 13 cm 3-10 nl, GE Healthcare) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Isoelektrinen fokuointi suoritettiin Ettan™ IPGphor II -laitteella (ohjelma: 150 V 3 tuntia, 300 V 3 tuntia, 300-1000 V gradientti 6 tuntia, 1000-8000 V gradientti 1 tunti, 8000 V 2 tuntia). Fokusoinnin jälkeen liuskoilla olevat proteiinit pelkistettiin ensin 15 minuuttia 65 mM ditioneittoli-tasapainotuspuskurissa ja sitten alkyloitiin 15 minuuttia 53 mM iodoasetamidi-tasapainotuspuskurissa. Tämän jälkeen proteiinit eroteltiin koon perusteella SDS-PAGE:lla (12,5 % geeli) DALT six -laitteistolla (GE Healthcare) 15 mA/geeli 5 tuntia.

Geelit kuvannettiin (Ettan DIGE Imager, GE Healthcare) ja proteiinitäplien ilmentyminen analysoitiin DeCyder 7.0 -ohjelmalla (GE Healthcare). Kiinnostavien proteiinitäplien määrittelyä varten valittiin 1,5-kertainen ekspressiomuutos verrattuna kontrolliin ja Student t-testiarvo <0.05. Mielenkiintoiset proteiinitäplät leikattiin geelistä hopeaväryksen jälkeen ja tunnistettiin kuten kohdassa 3.5. Tarkemmat tilastolliset analyysit tehtiin DeCyder Extended Data Analysis -ohjelmalla (GE Healthcare) ja VENN-diagrammit internet-pohjaisella ohjelmalla (<http://simbioinf.com/mcbc/applications/genevenn/genevenn.htm>).

Pilottikokeissa eritettyjen proteiinien analysointiin käytettiin SDS-PAGE:a, jossa proteiini-näytteitä kuumennettiin +94 °C:ssa pelkistävässä puskurissa (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 5

% β -merkaptetoetanolii, 2 % bromofenolin sininen, 2 % SDS, 25 % glyseroli). Tämän jälkeä proteiinit eroteltiin koon perusteella SDS-PAGE:ssa ja värjäettiin hopeanitraatilla.

3.5 Proteiinien tunnistaminen

Hopeavärjätyt proteiinipisteet leikattiin geelistä, geelissä olevat proteiinit pilkottiin trypsiinillä ja muodostuneet peptidit analysoitiin kuten Korolainen ym. (2006) kuvaa. Peptidiuutteet kuivattiin vakuumisentrifuugissa ja analysoitiin LC-ESI-QTOF-massaspektrometrillä (QTOF Global, Waters). Käänteisfaasierottelu tehtiin 75 μm \times 15 cm NanoEase Atlantis[®] dC18 -kolonnilla (Waters) 250 nl/min virtausnopeudella. Peptidit eluoiitiin kolonnista 60 minuutissa lineaarisella 0-60 % liuos B (0.1 % muurahaishappo 95 %:ssa asetonitrilissä) -gradientilla. Aloituluoksena käytettiin 0,1 % muurahaishappoa 5 %:ssa asetonitrilissä. Proteiinitunnistukset LC-MS/MS aineistosta tehtiin Mascot-tietokantahaun avulla (Matrix Science).

3.6 Hiirikokeet

3.6.1 Hiiret

7-8 viikon ikäiset C57Bl/6 ja BALB/c hiiret hankittiin Scanburista ja syöttösolupöistogeneisetpuutteellisehiiret Jackson Lab:sta. Hiiret olivat karanteenissa viikon ajan saapumisen jälkeen. Niitä pidettiin neljän ryhmässä rautahäkeissä ja niitä ruokittiin Altromin No. 1314 FORTI -ruoalla ja hana vedellä. Huoneen kosteus pidettiin 40-45 %:ssa, lämpötila 20-21 °C:ssa, lisäksi pidettiin yllä 12-tunnin valo-pimeäsykliä.

Kokeet tehtiin noudattaen eurooppalaisia eettisiä koe-eläin säännöksiä (European Convention for Experimental and Other Scientific Purposes, Strasbourg 18. maaliskuuta 1986). Kokeet on myös hyväksytty Etelä-Suomen aluehallintoviraston eläinkoelautakunnassa (ESAVI-2010-05040/Ym-23).

3.6.2 Inhalaatioaltistukset

Kuitumateriaaleista tehtiin altistuksia varten aerosolia leijupetigeneraattorilla (TSI FBAG 3400A), jonka tuottaman hiilinanoputkiaerosolin pitoisuutta voitiin säätää. Generaattori tuotti aerosolia altistuskammioon, jossa hiiret sijaitsivat. Altistuskammion ilmasta mitattiin jatkuvasti hiilinanoputkien massapitoisuutta (punnituskapselille kerätty näyte), lukumäärää (CPC-laite) ja kokojakaumaa (SMPS- ja ELPI-laitteistot). Kammioista otettiin myös suodatinnäytteitä elektronimikroskooppista tarkastelua varten.

3.6.3 Näytteiden kerääminen

Hiiret lopetettiin isofluraani-yliannostuksella 24 tuntia viimeisen altistuksen jälkeen. Osassa kokeista hiiriltä mitattiin keuhpletysmografian avulla keuhkoreaktiviteetti metakoliinia hengittämällä, ennen lopetuksia, 24 tuntia viimeisen altistuksen jälkeen (Hamelmann ym. 1997). Keuhkot huuhdeltiin PBS:llä (800 µl, 10 s) keuhkoputkesta, minkä jälkeen keuhkohuuhtelu (BAL)-näyte siirrettiin näytelasille solusentrifuugin avulla. Näytelasilla solut värjättiin May Grünwald-Giemsa (MGG)-värillä ja laskettiin valomikroskoopilla. BAL supernatantti säilytettiin -70 °C:ssa sytokiinianalyysejä varten. Hiirten vasen keuhkolohko poistettiin, jäädytettiin ja säilöttiin -70 °C RNA eristyksiä varten. Loput keuhkoista fiksattiin formaliinilla, valettiin parafiiniin, leikattiin ja siirrettiin näytelasille, missä ne HE (hematoksyliini-eosiini), PAS (periodic acid-Schiff) tai HERO (Herovici's) -värjättiin.

3.6.4 RNA:n eristys keuhkokudoksesta

Keuhkonäytteet homogenisoitiin FastPrep FP120 (BIO 101, Thermo Savant), laitteella ja RNA eristettiin FastRNA Pro Green -kitillä (Qbiogene, MP Biomedicals). RNA:n määrä ja laatu mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä (ND-1000). Eristetty RNA liuotettiin nukleasivapaaseen veteen (DEPC) ja säilytettiin -70 °C:ssa.

3.6.5 Komplementaarisen DNA:n (cDNA) synteesi

cDNA syntesoiitiin 1 µg RNA:ta 25 µl:n reaktiossa MultiScribe Reverse Transcriptase (The High-Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems) -kitin avulla, käyttämällä hyväksi sattumanvaraisia alukkeita. Synteesi tehtiin 2720 Thermal Cycler -laitteella, (25 °C / 10 min; 37 °C / 120 min).

3.6.6 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

PCR alukkeet ja koettimet ostettiin Applied Biosystemsiltä. Reaaliaikainen PCR tehtiin 96-kuoppaisella optisella reaktiolevyllä käyttäen Relative Quantification 7500 Fast System (7500 Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems) -laitetta. Monistukset tehtiin 11 µl:n tilavuudessa. Reaktiossa oli mukana 20 ng cDNA:ta, TaqMan universal PCR master mixiä ja alukkeita (Applied Biosystems). Endogeenistä 18s RNA:ta käytettiin normalisointieeninä.

3.6.7 ELISA

Hiiri ELISA:t tehtiin valmistajan ohjeiden mukaan (eBioscience) ja määritettiin Multiskan MS -laitteella (Labsystems).

3.7 Tilastolliset analyysit

Tulokset analysoitiin GraphPad Prism 5 ohjelmalla (GraphPad Software Inc.), käyttäen ei-parittaista t-testiä tai Mann-Whitney U-testiä vertailtaessa ryhmien välisiä eroja. P-arvoa <0.05 pidettiin tilastollisesti merkittävänä.

3.8 DNA-mikrosiruanalyysi

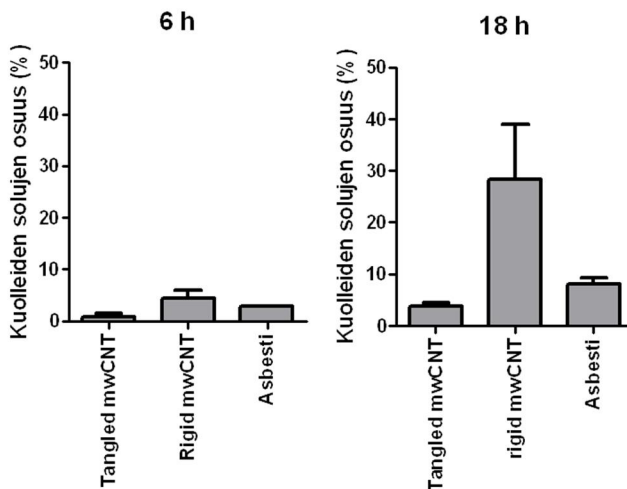
DNA-mikrosiruanalyysissä käytettiin hiirten keuhkokudoksesta eristettyä lähetti-RNA:ta. Lähetti RNA:n analysoitiin SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray -kitin (Agilent) avulla valmistajan ohjeiden mukaan.

DNA-mikrosiruanalyysistä saatu raakadata (GPR-muodossa) tuotiin R-ohjelmaan (v. 2.15) (R Core Team 2012) ja analysoitiin BioConductorin (Gentleman ym. 2004) limmapaketilla (Smyth 2005). Raakadatan laatu tarkistettiin ja mediaani raaka-intensiteetit muunnettiin \log_2 :ksi ja normalisoitiin quantile-menetelmällä. Samoja geenejä tunnistavien koettimien normalisoiduista arvoista laskettiin keskiarvot, jolloin muodostui lopullinen ilmentymismatriksi. Ilmentymismuutokset laskettiin sovittamalla arvot lineaariseen malliin ja laskemalla niistä moderoitu t-testi. Geenejä, joiden Benjamini ja Hochberg p-arvo oli < 0.01 ja \log_2 ilmentymismuutos $> |0.58|$, pidettiin tilastollisesti merkittävänä.

4 TULOKSET

4.1 Solukuolleisuus oli vähäistä kuuden tunnin altistuksissa

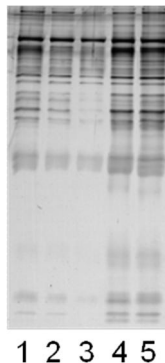
Solukuolleisuutta tutkittiin LDH-menetelmällä (Kuva 2), jotta saatiin selville, mikä altistus-pitoisuus olisi käyttökelpoisen solujen aktiivista erityistä tutkiviin proteomiikkakokeisiin. 18 tunnin kokeessa pitkät ja jäykät hiilinanoputket sekä asbesti aiheuttivat suuren solukuolleisuuden. Jäykkien hiilinanoputkien aiheuttama kuolleisuus oli suurin, jopa 30 % soluista oli kuollut. Asbestilla kuolleiden solujen osuus oli noin kymmenen prosenttia ja lankakerämäisellä mwCNT:llä alle viisi. Kuuden tunnin altistuksen jälkeen solukuolleisuudet olivat selvästi alhaisemmat kaikilla materiaaleilla verrattuna 18 tunnin altistukseen. Jäykkien mwCNT altistus aiheutti alle viiden prosentin solukuolleisuuden ja asbestilla sekä lankakerämäisellä mwCNT:llä altistettut solut eivät kärsineet solukuolemasta lainkaan.



Kuva 2. Testimateriaalien aiheuttama solukuolleisuus. Ihmisen primäärimakrofaagit altistettu lankakerämäisellä (tangled) mwCNT:llä, jäykällä (rigid) mwCNT:llä tai asbestilla 100 µg/ml.

4.2 Jäykät kuidut aiheuttavat kasvaneen proteiinierityksen ihmisen primäärimakrofaageissa

Solutoksisuuskokeen jälkeen tutkittiin eri altisteiden aikaansaamaa proteiinierytystä kuuden tunnin altistuksella (Kuva 3). Altistamattomat (1) sekä LPS (2) ja lankakerämäinen mwCNT (3) altistetut makrofaagit erittävät lähes yhtä paljon proteiineja elatusliuokseen. Sen sijaan jäykkä mwCNT (4) ja asbesti (5), jotka ovat rakenteeltaan jäykkiä kuituja, aiheuttivat kasvaneen proteiinierytksen. Kaiken kaikkiaan näyttää siltä, että kaikkien altisteiden aiheuttama erittyneiden proteiinien ilmentymisprofiili on samankaltainen. Asbesti ja jäykkä mwCNT altistetut makrofaagit erittivät lisäksi muutamia proteiini-kaistaleita, joita ei ollut havaittavissa altistamattomalla eikä LPS ja tangled mwCNT altistetuilla soluilla.



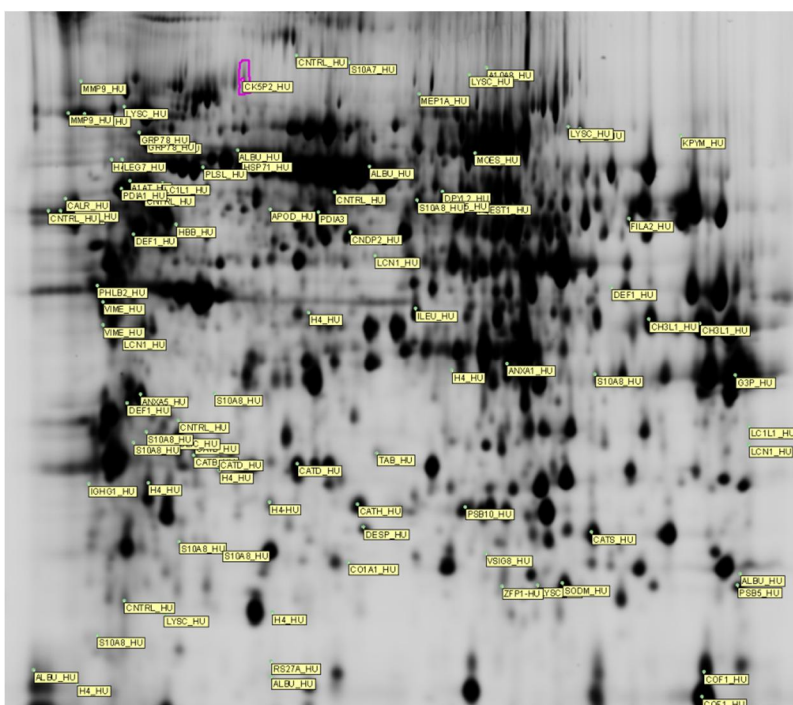
Kuva 3. Eritettyjen proteiinien ilmentymisprofiili kuuden tunnin altistuksessa. Hopeavärjätty SDS-PAGE geeli ihmisen primäärimakrofaageista erittyneistä proteiineista. Kontrolli (1) sekä LPS (2), lankakerämäinen mwCNT (3), jäykkä mwCNT (4) ja asbesti altistettu (5).

4.3 2D-DIGE analyysillä saatiin selville proteiinitäplät, joiden ilmentyminen oli muuttunut tilastollisesti merkittävästi

Ihmisen primäärimakrofaageja altistettiin kuuden tunnin ajan 100 µg/ml lankakerämaisillä hiilinanoputkilla, jäykillä hiilinanoputkilla tai asbestilla, erittyneet proteiinit kerättiin talteen ja analysoitiin 2D-DIGE-menetelmällä. Negatiivisena kontrollina käytettiin altistamattomien solujen erittämiä proteiineja. Tuloksia verrattiin kolmella tavalla: lankakerämäinen mwCNT verrattuna kontrolliin, jäykkä mwCNT verrattuna kontrolliin ja asbesti verrattuna kontrolliin. Yhteensä 2D-DIGE-analyysillä saatiin eroteltua yli 2500 proteiinitäplää.

Taulukossa 1 on kuvattu tunnistetut proteiinit. Mascot-pisteet kuvaavat proteiinitunnistuksen luotettavuutta, t-testi on proteiinitäplän ekspressioseron tilastollinen todennäköisyys, p-arvo. Ilmentymismuutos tarkoittaa proteiinin erittymisen pitoisuutta verrattuna altistamattomaan kontrolliin. Proteiinin lyhenne on yleinen kirjallisuudessa ja tietopankeissa

käytössä oleva lyhenne. Kontrolli verrattuna lankakerämäinen mwCNT analyysistä saatiin haarukoitua 34 proteiinitäplää, joiden erittyminen oli tilastollisesti merkittävästi kasvanut tai vähentynyt. Näistä saatiin tunnistettua massaspektrometrian ja tietokantahakujen avulla 22 (Taulukko 1C). Kolmentoista erittyminen oli noussut verrattuna kontrolliin ja yhdeksän oli alentunut. Jäykällä hiilinanoputkilla altistettujen solujen erittämistä proteiineista 106 erosi kontrollin sekretomista. Näistä 74 saatiin tunnistettua, joista 34:n erittyminen oli lissäntynyt ja 41:n pienentynyt kontrolliin verrattuna (Taulukko 1A). Asbestin ja kontrollin vertailussa erottui 88 proteiinitäplää. Näistä 40 saatiin tunnistettua, 20:n ollessa yliekspressoituneita ja 20:n ollessa aliekspressoituneita verrattuna kontrolliin (Taulukko 1B).



Kuva 4. 2D-DIGE kuva ihmisen primäärimakrofaagista eritetyistä proteiineista. Makrofaagit altistettiin lankakerämäisellä mwCNT:illä, jäykällä mwCNT:illä tai asbestilla. Negatiivisena kontrollina toimivat altistamattomat makrofaagit. Yksi täplä vastaa yhtä proteiinia. Kuvaan on merkitty LC-MS/MS-tekniikan avulla tunnistettuja proteiineja, joiden erittyminen on muuttunut tilastollisesti merkittävästi altistuksen jälkeen.



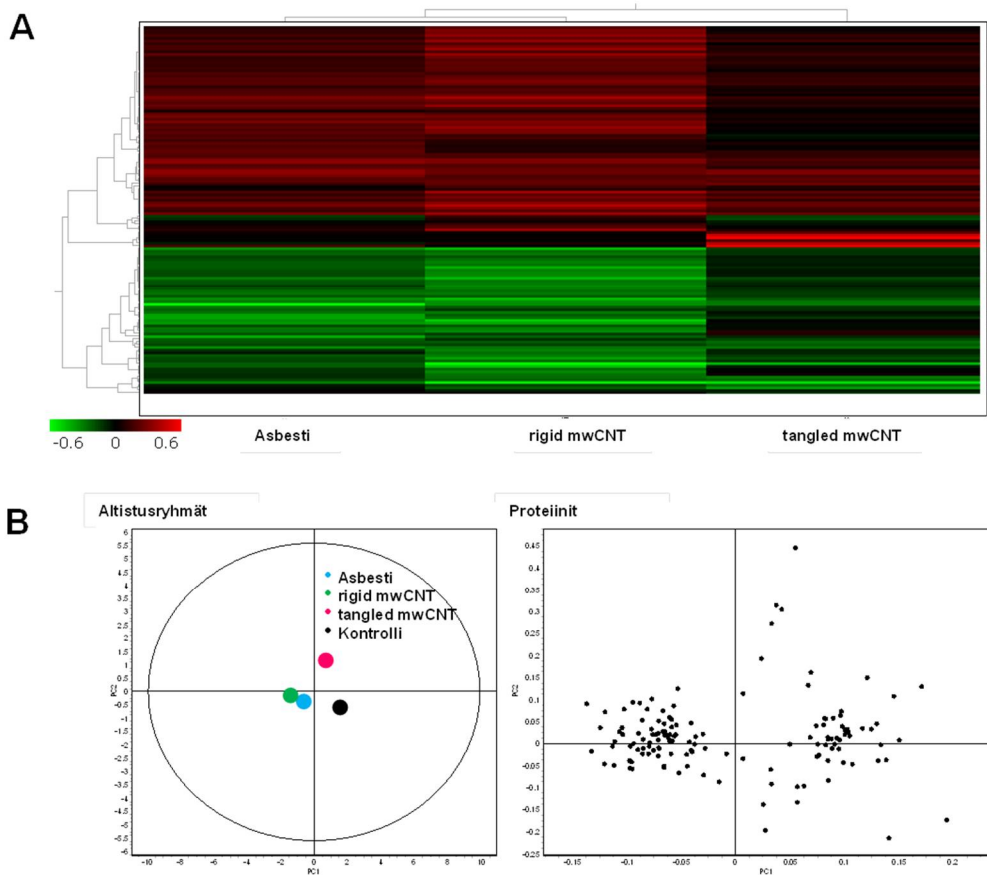
Taulukko 1. Tunnistetut proteiinit.

A					B				
Mascot pisteet	T-testi	Eksp. muutos	Prot. lyhenne	Proteiinin nimi	Mascot pisteet	T-testi	Eksp. muutos	Prot. lyhenne	Proteiinin nimi
132,50	0,012	3,04	HSPB1	Heat shock protein beta-1	58	0,0055	2,18	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
157	0,046	2,61	CATS	Cathepsin S	220,27	0,046	2,17	CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1
58	0,013	2,54	CATD	Cathepsin D	798	0,019	2,11	ALBU	Serum albumin
146,49	0,0027	2,4	S10A7	Protein S100-A7	58	0,01	1,93	CATD	Cathepsin D
85	0,031	2,35	MYP2	Myelin P2 protein	678,90	0,047	1,93	CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1
267	0,023	2,35	CYTB	Cystatin-B	220,66	0,01	1,89	ANXA2	Annexin A2
160,41	0,0023	2,33	ANXA1	Annexin A1	81	0,0081	1,87	CATD	Cathepsin D
137	0,0037	2,3	LCN1	Lipocalin 1	73	0,034	1,86	LCN1	Lipocalin-1
504,00	0,014	2,23	EFHD2	EF-hand domain-containing protein D2	68	0,044	1,85	PRDX1	Peroxiredoxin-1
113	0,017	2,21	FKBP1A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	63	0,0058	1,77	CATH	Pro-cathepsin H
137,34	0,012	2,18	LCN1	Lipocalin 1	157	0,032	1,76	CATS	Cathepsin S
63	0,011	2,17	CATH	Pro-cathepsin H	121	0,041	1,65	TAGL2	Transgelin-2
43	0,025	2,06	PLSL	Plastin-2	60	0,037	1,61	CK5P2	CK5 regulatory subunit-associated protein 2
133,83	0,02	2,03	H4	Histone H4	32	0,0076	1,61	CATD	Cathepsin D
650	0,0045	2,01	COF1	Cofilin-1	482	0,046	1,61	ALBU	Serum albumin
39	0,02	1,97	CATB	Cathepsin B	56	0,033	1,6	CATB	Cathepsin B
433	0,013	1,96	FABP5	Fatty acid-binding protein 5 epidermal	129	0,036	1,58	LCN1	Lipocalin-1
164	0,023	1,95	CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	585	0,049	1,57	GP3	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase
58	0,038	1,93	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	389,16	0,026	1,55	TBA1B	Tubulin alpha-1B chain
365	0,024	1,92	ANXA1	Annexin A1	39	0,02	1,54	CATB	Cathepsin B
45	0,043	1,88	EFT1A1	Elongation factor 1-alpha 1	337	0,033	-1,51	ALBU	Serum albumin
81	0,0057	1,8	CATD	Cathepsin D	1229	0,014	-1,53	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
66	0,016	1,75	THIO	Thioredoxin	364	0,014	-1,55	CALR	Calreticulin
436	0,012	1,72	MOES	Moesin	61	0,00034	-1,63	1433G	14-3-3 protein gamma
500	0,017	1,7	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	180	0,0047	-1,63	CALR	Calreticulin
309,20	0,017	1,69	H4	Histone H4	123	0,044	-1,63	HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
72	0,018	1,66	PSB10	Proteasome subunit beta type-10	136	0,0073	-1,64	PDI1A	Protein disulfide-isomerase
228,02	0,045	1,62	EFHD2	EF-hand domain-containing protein D2	652	0,026	-1,67	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
56	0,026	1,6	LEG1	Galectin-1	39	0,017	-1,67	CATS	Cathepsin S
151,74	0,02	1,57	H4	Histone H4	103	0,045	-1,73	DEF1	Neutrophil defensin 1
151,35	0,029	1,56	CATD	Cathepsin D	150	0,0061	-1,78	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
84	0,036	1,56	COF1	Cofilin-1	57	0,025	-1,84	A2MG	Alpha-2-macroglobulin
93	0,046	1,54	COTL1	Coactosin-like protein	54	0,0039	-1,85	CALR	Calreticulin
56	0,016	1,53	CATB	Cathepsin B	79	0,0084	-1,88	ALBU	Serum albumin
272,58	0,047	-1,59	H4	Histone H4	120	0,026	-1,9	A2MG	Alpha-2-macroglobulin
524	0,025	-1,60	PDI1A	Protein disulfide-isomerase A3	576,82	0,017	-2,24	TRFL	Lactotransferin
61	0,00034	-1,63	1433G	14-3-3 protein gamma	40	0,029	-2,28	AIAT	Alpha-1-antitrypsin
65	0,00074	-1,69	LCN1	Lipocalin-1	60	0,022	-2,33	DPYL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2
652	0,031	-1,71	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	998	0,038	-2,74	ALBU	Serum albumin
150	0,025	-1,73	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	70	0,041	-2,8	CNTRL	Centriolin
58	0,035	-1,75	VIME	Vimentin					
180	0,0057	-1,78	CALR	Calreticulin					
178	0,045	-1,79	ANXA5	Annexin A5					
1229	0,009	-1,80	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	252	0,03	3,25	2AAA	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform
46	0,039	-1,80	MMP9	Matrix metalloproteinase-9	61	0,01	3,19	S10A8	Protein S100-A8
355,0222	0,041	-1,81	IL1RA	Interleukin 1 receptor antagonist protein	220,27	0,046	2,17	CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1
188	0,016	-1,84	VIME	Vimentin	68	0,025	2,04	LCN1	Lipocalin-1
58	0,041	-1,88	EST1	Liver carboxylesterase 1	58	0,0055	1,96	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
136	0,006	-1,92	PDI1A	Protein disulfide-isomerase	436	0,0045	1,84	MOES	Moesin
54	0,0028	-1,92	CALR	Calreticulin	63	0,036	1,84	CATH	Pro-cathepsin H
364	0,0015	-1,93	CALR	Calreticulin	172	0,044	1,66	ILEU	Leukocyte elastase inhibitor
504	0,00048	-1,94	CALR	Calreticulin	39	0,0095	1,64	CATB	Cathepsin B
425	0,02	-1,98	DPYL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	187	0,046	1,62	CO1A1	Collagen alpha-1(I) chain
363,6795	0,0006	-1,99	COF2	Cofilin 2	365	0,015	1,61	ANXA1	Annexin A1
109,99	0,022	-1,99	S10A8	Protein S100-A8	30	0,017	1,57	CNDP2	Cytosolic non-specific dipeptidase
171,74	0,0042	-2,00	PTG3	Pentraxin-related protein	29	0,03	1,53	MEP1A	Mephrin A subunit alpha
1016	0,045	-2,01	CH3L1	Chitinase-3-like protein 1	39	0,035	-1,52	CATS	Cathepsin S
104	0,0084	-2,04	PERM	Myeloperoxidase	61	0,00034	-1,63	1433G	14-3-3 protein gamma
909	0,0061	-2,06	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	337	0,025	-1,66	ALBU	Serum albumin
498	0,049	-2,08	MMP9	Matrix metalloproteinase-9	67	0,019	-1,77	ACTB	Actin cytoplasmic 1
108	0,0026	-2,18	SODM	Superoxide dismutase [Mn] mitochondrial	65	0,01	-1,82	LCN1	Lipocalin-1
120	0,0059	-2,23	A2MG	Alpha-2-macroglobulin	188	0,04	-1,86	VIME	Vimentin
35	0,0075	-2,26	PHLB2	Pleckstrin homology-like domain family B member 2	175	0,026	-2,22	LCN1	Lipocalin-1
40	0,046	-2,39	AIAT	Alpha-1-antitrypsin	137	0,025	-2,45	LC1L1	Putative lipocalin 1-like protein 1
198	0,035	-2,41	MMP9	Matrix metalloproteinase-9	70	0,035	-2,64	H4	Histone H4
1074	0,02	-2,64	CH3L1	Chitinase-3-like protein 1					
57	0,0015	-2,67	A2MG	Alpha-2-macroglobulin					
60	0,035	-2,71	DPYL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2					
70	0,041	-2,80	CNTRL	Centriolin OS					
82(184)	0,041	-2,92	SPB3	Serpin B3					
872,4592	0,017	-3,43	PSA7	Proteasome subunit alpha type 7					
143,18	0,0064	-3,75	LCN1	Lipocalin 1					
713,8779	0,0082	-5,76	SLPI	Antileukoproteinasase					

4.4 Asbestin ja jäykkien hiilinanoputkien aiheuttamat muutokset proteiinien erityksessä muistuttavat toisiaan

Eri altisteiden aiheuttamia muutoksia makrofaagien sekretomiin tutkittiin hierarkkisella ryhmittelyllä ja pääkomponenttianalyysillä, jotta saatiin yleiskuva proteiinien ilmentymisprofiilista. Kuvassa 5A näkyy, että asbesti ja jäykkä mWCNT aiheuttivat samankaltaiset muutokset eritettyissä proteiineissa, kun proteiinien ilmentymistasot on normalisoitu kontrolliin. Kirkkaammat värit mWCNT paneelissa verrattuna asbestiin viittaavat siihen, että hiilinanoputket saivat aikaan suuremmat muutokset proteiinien eritystasoissa. Lankakerämäisten hiilinanoputkien aiheuttama altistusvaste eroaa asbestin ja jäykkien mWCNT:n reaktioista. Lankakerämäisillä hiilinanoputkilla esiintyy myös muutama täysin niille spesifinen proteiinierityksen muutos.

Pääkomponenttianalyysi ilmaisee hierarkkisen ryhmittelyn tulokset diagrammin muodossa. Pääkomponenttianalyysissä ryhmiä ei ole normalisoitu kontrolliin. Altistusryhmätestissä asbesti ja jäykkä mWCNT sijoittuivat lähemmäksi yhteen neljännekseen, kun taas kontrolli ja lankakerämäinen mWCNT olivat omissa neljänneksissään kaukana jäykistä kuiduista. Proteiini-analyysissä voidaan havaita yksi tiukasti ryhmittynyt kasautuma, joka koostuu asbestiin ja jäykkään mWCNT:hen kytköksissä olevista proteiineista. Toinen, löyhempi proteiini-ryhmittymä, koostuen kontrolliin ja lankakerämäisiin hiilinanoputkiin liittyvistä proteiineista on y-akselin toisella puolella.



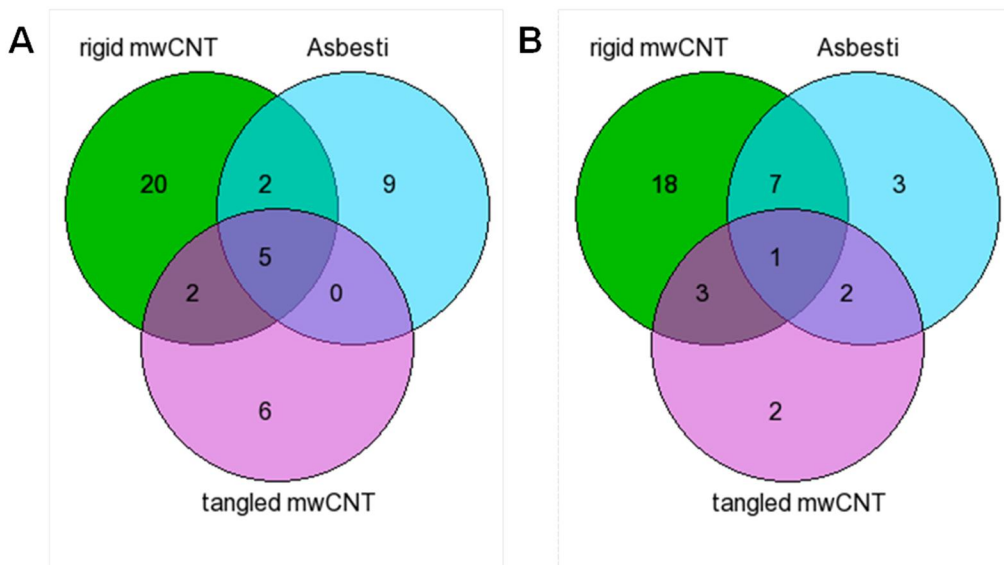
Kuva 5. Hierarkkinen ryhmittely ja pääkomponenttialyysi tunnistetuista proteiineista. (A) Proteiinien ilmentyminen normalisoituna kontrolliin. Proteiinit, joiden erittyminen on lisääntynytä väritetty punaisella, vihreällä proteiinit joiden erittyminen on vähentynyt. (B) Pääkomponenttialyysi altistusryhmistä ja tunnistetuista proteiineista. Analyysit tehtiin DeCyder-ohjelman EDA-moduulilla. Lankakerämäinen (tangled) mWCNT, jäykkä (rigid) mWCNT.

4.5 Eri altisteilla vähän yhteisiä eritettyjä proteiineja

VENN-diagrammin avulla tutkittiin, saivatko eri altisteet aikaan samojen proteiinien erityksen makrofaageista. Kuvassa 6A on esitetty yhteiset ja altisteelle spesifiset eritetyt proteiinit, joiden määrä oli kasvanut verrattuna altistamattomien makrofaagien erittämiin proteiineihin. Jäykällä hiilinanoputkilla oli 20 niille ominaista eritettyä proteiinia. Asbestilla lukema on 9, kun taas lankakerämäiset hiilinanoputket aiheuttivat kuuden spesifisen proteiinin erityksen makrofaageista. Asbestilla ja jäykällä mWCNT:llä oli yhteisiä proteiineja kaksi (Katepsiini D ja Katepsiini S), kuten myös lankakerämäisellä ja jäykällä mWCNT:llä

(Anneksiini A1 ja Moesiini). Kaikille altistelle yhteisiä eritettyjä proteiineja oli viisi: Lipokaliini 1, Katepsiini H, Katepsiini B, Kloridin intrasellulaarinen kanavaproteiini 1 ja Pyruvaatti kinaasin isosyymit M1/M2.

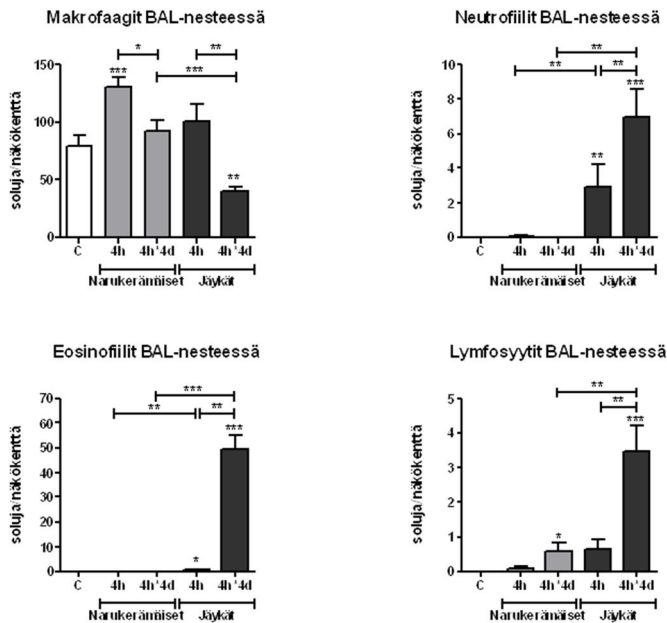
6B-kuvassa VENN-diagrammi kuvaa proteiineja, joiden erityis on vähentynyt altistuksen jälkeen suhteessa altistamattomiin soluihin. Jäykällä mwCNT:llä altistetut solut erittivät 18 erilaista proteiinia, joita ei erity muilla materiaaleilla altistetuista soluista. Asbestialtistetuilla soluilla näitä proteiineja oli kolme ja lankakerämäisillä hiilinanoputkilla kaksi. Yhteisiä proteiineja, joiden erityis makrofaageista oli vähentynyt altistuksen jälkeen, oli jäykällä mwCNT:llä ja asbestilla seitsemän (Alfa-1-antitrypsiini, Alfa-2-makroglobuliini, Kalretikuliini, Sentioliini, Dihydropyrimidinaasiin liittyvä proteiini 2, 78 kDa glukoosi-säätelyproteiini ja Disulfidi-isomeraasi proteiini), jäykällä ja lankakerämäisellä mwCNT:llä kolme (Histoni H4, Lipokaliini-1 ja Vimentiini). Vastaavasti lankakerämäisellä mwCNT:llä ja asbestilla oli kaksi samaa proteiinia - Albumiini ja Katepsiini S. Vain yhden proteiinin erittyminen oli vähentynyt kaikilla altisteilla (14-3-3 proteiini gamma).



Kuva 6. VENN-diagrammi tunnistetuista proteiineista. GeneVenn-ohjelmalla tehty vertailu proteiineista, jotka ovat yhteisiä eri tunnistuslistoille. Proteiinit, joiden eristys on lisääntynyt (A) tai vähentynyt (B) verrattuna kontrolliin. Lankakerämäinen (tangled) mwCNT, jäykkä (rigid) mwCNT.

4.6 Altistus jäykällä hiilinanoputkilla aiheuttaa voimakkaan tulehdussolujen kerääntymisen hiirten keuhkoihin

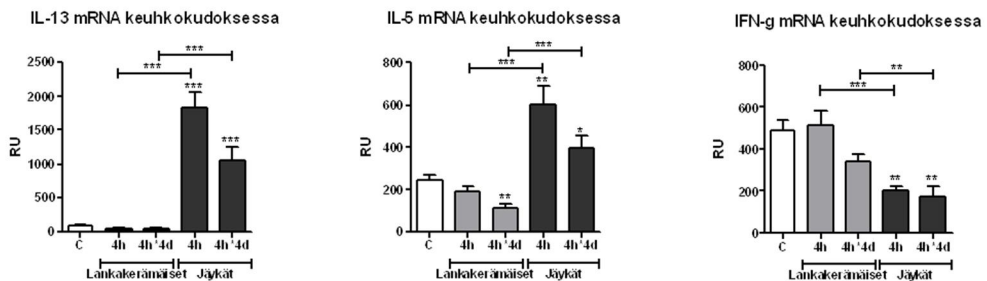
Hiilinanoputkialtistettujen hiirten keuhkoista laskettiin tulehdussolut, jotta voitiin päätellä aiheuttavatko materiaalit tulehdusta (Kuva 7). Ainoastaan lyhyt altistus lankakerämaisillä hiilinanoputkilla sai aikaan makrofaagisolujen määrän kasvun. Pitkässä altistuksessa jäykällä hiilinanoputkilla makrofaagien määrä hiirten keuhkoissa laski verrattuna altistamattomiin hiiriin. Neutrofiilien määrä hiirten keuhkohuuhtelunesteessä nousi vain jäykällä hiilinanoputkilla, pitkässä altistuksessa neutrofiilien määrä oli suurempi kuin kerta-altistuksessa. Myös eosinofiilien määrä kasvoi voimakkaasti keuhkohuuhteessa pitkässä altistuksessa jäykällä hiilinanoputkilla, lankakerämaisillä hiilinanoputket eivät saaneet aikaan neutrofiilien, eikä eosinofiilien määrän kasvua. Lisäksi jäykät hiilinanoputket aiheuttivat lymfosyyttien kerääntymisen hiirten keuhkoihin, kun hiiriä altistettiin neljänä peräkkäisenä päivänä. Lankakerämaisillä hiilinanoputket saivat aikaan selkeästi pienemmän lymfosyyttien kertymisen.



Kuva 7. Hiilinanoputkilla altistettujen hiirten keuhkohuuhteen solumäärät. BL57/6-hiiriä altistettiin joko 4 tuntia tai 4 tuntia neljänä peräkkäisenä päivänä. Solut laskettiin keuhkohuuhteesta valomikroskoopilla. C = PBS altistettu kontrolli *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

4.7 Hankitun immuniteetin vaste kasvaa hiirten keuhkoissa jäykillä hiilinanoputkilla tehdyn altistuksen jälkeen

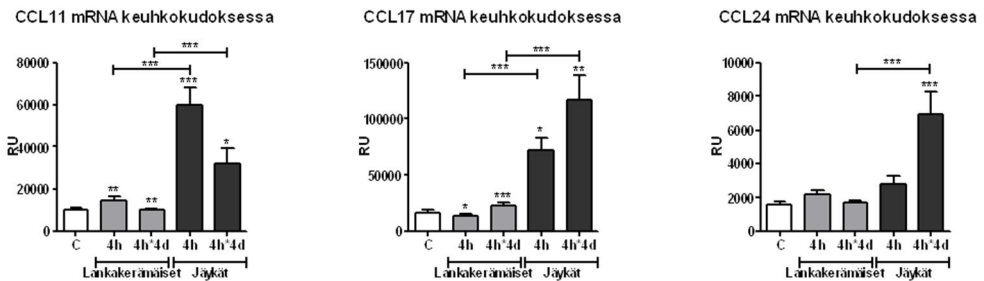
Klassisten Th1 ja Th2 -sytokiinien määrä tutkittiin hiirten keuhkokudoksessa, jotta saataisiin selville, aiheuttavatko materiaalit hiirissä synnynnäisen vai hankitun immuniteetin aktivoitumisen (Kuva 8). Allergiaan liittyvän Interleukiini-13:n (IL-13) määrä kasvoi keuhkokudoksessa heti kerta-altistuksen jälkeen jäykillä hiilinanoputkilla, minkä jälkeen sen määrä lähes puoliintui neljän päivän altistuksessa. Lankakerämäiset hiilinanoputket eivät aiheuttaneet IL-13 mRNA tuotantoa hiirten keuhkoissa. Samantyyppinen vaikutus havaittiin myös toisella allergisen reaktion merkkimolekyylin, IL-5:n mittauksessa, missä altistus jäykillä hiilinanoputkilla aiheutti IL-5 tuotannon heti neljän tunnin altistuksen jälkeen. Tämän jälkeen IL-5:n määrä laski. Lankakerämäiset hiilinanoputket aiheuttivat jopa IL-5 tuotannon vähenemisen verrattuna altistamattomiin hiiriin. Interferoni-gamman (IFN- γ), joka muuntaa tulehdusvasteita Th1-tyyppisiksi, tuotanto väheni lähetti-RNA-tasolla hiirten keuhkokudoksessa jäykillä hiilinanoputkilla tehdyn altistuksen jälkeen, niin kerta-altistuksessa kuin peräkkäisinä päivinä tehdyn altistuksen jälkeen. Lankakerämäiset hiilinanoputket eivät aiheuttaneet hiirten keuhkoissa IFN- γ :n tuotannon merkittävää laskua.



Kuva 8. Sytokiinien määrä hiirten keuhkoissa hiilinanoputkialtistuksen jälkeen. BL57/6-hiiriä altistettiin joko 4 tuntia tai 4 tuntia neljänä peräkkäisenä päivänä. Sytokiini-tasot keuhkokudoksessa mitattiin lähetti-RNA:n määrästä. C = PBS altistettu kontrolli *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

4.8 Th2-tyypin kemokiinien määrä kasvaa jäykillä hiilinanoputkilla altistettujen hiirten keuhkoissa

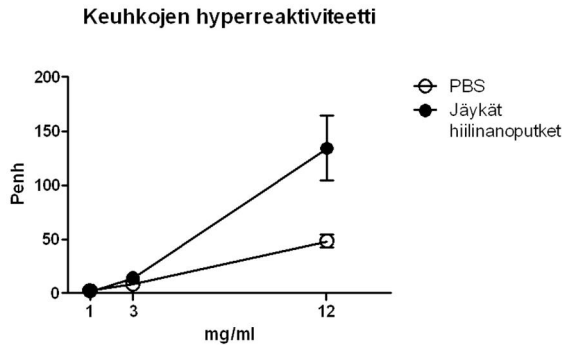
Koska allergisiin, Th2-tyypin, reaktioihin liittyvät sytokiinit olivat koholla hiilinanoputkialtistuksen jälkeen, halusimme tutkia myös allergiseen vasteeseen liittyvien kemokiinien määrää keuhkokudoksessa (Kuva 9). Eosinofiilien houkuttelemiseen liittyvän CCL11:n (C-C motiivi kemokiini 11) määrä oli voimakkaasti koholla kerta-altistetuilla hiirillä, jotka olivat hengittäneet jäykkiä hiilinanoputkia. Peräkkäisten altistusten jälkeen CCL11:n määrä puoliintui niin kuin IL-13 määrä. Lankakerämäiset hiilinanoputket aiheuttivat vain hieman CCL11 määrän kasvua. Säätely-T-solujen ja dendriittisten solujen houkuttelemiseen liittyvän kemokiinin, CCL17:n määrä oli erittäin selkeästi koholla jäykille hiilinanoputkille altistettujen hiirten keuhkokudoksessa. Tämän kemokiinin määrä oli voimakkaammin koholla peräkkäisten altistusten kuin kerta-altistuksen jälkeen. Lankakerämäiset hiilinanoputket aiheuttivat pienen nousun CCL17 määrässä, mutta verrattuna jäykkien hiilinanoputkien aiheuttamaan reaktioon, nousu oli minimaalista. CCL24:n, joka houkuttelee eosinofiilejä sekä basofiilejä, ilmentyminen keuhkoissa erosi muista kemokiineista, siten että sen määrä kasvoi vasta perättäisten jäykillä hiilinanoputkilla tehtyjen altistusten jälkeen. Lankakerämäiset hiilinanoputket eivät saaneet keuhkoissa aikaan kasvanutta CCL24-tuotantoa.



Kuva 9. Kemokiinien määrä hiirten keuhkoissa hiilinanoputkialtistuksen jälkeen. BL57/6-hiiriä altistettiin joko 4 tuntia tai 4 tuntia neljänä peräkkäisenä päivänä. Kemokiini-tasot keuhkokudoksessa mitattiin lähetti-RNA:n määrästä. C = PBS altistettu kontrolli *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

4.9 Jäykät hiilinanoputket aiheuttavat keuhkojen hyperreaktivityetin

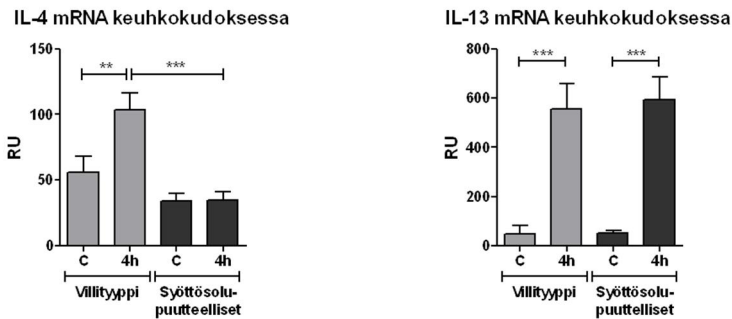
Tutkiaksemme tarkemmin jäykkien hiilinanoputkien hiirille aiheuttamia astmankaltaista vaikutuksia, mittasimme hiirten keuhkojen hyperreaktivityetin 24 tuntia hiilinanoputkialtistuksen jälkeen (Kuva 10). Keuhkojen hyperreaktivityetti olikin jäykillä hiilinanoputkilla altistetuilla hiirillä selkeästi korkeampi verrattuna PBS-altistettuihin kontrollihiiriin.



Kuva 10. Jäykällä hiilinanoputkilla altistettujen hiirten keuhkoreaktiiviteetti. BALB/c-hiirten keuhkojen hyperreaktiteetti kasvavaan metakoliinipitoisuuteen mitattiin keuhopletysmografialla.

4.10 IL-4 tuotanto jäykällä hiilinanoputkilla altistetuissa hiirissä on riippuvainen syöttösoluista

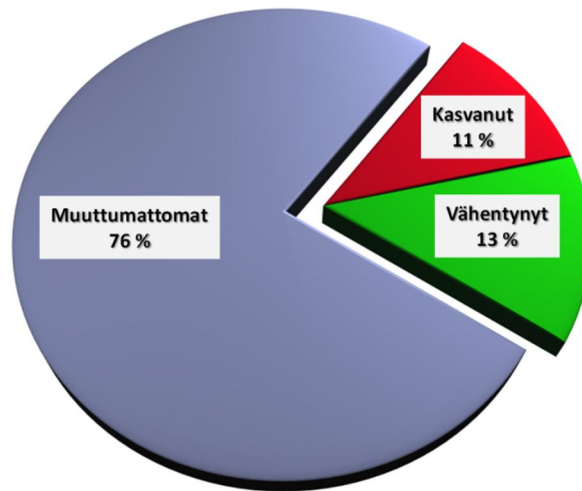
Syöttösolupistogeenisen hiirikannan avulla tutkittiin, erittävätkö syöttösolut astmavaasteelle tärkeitä sytokiineja, IL-4:ää ja IL-13:a, hiilinanoputkialtistuksen jälkeen. Kuva 11 osoittaa, että IL-4 tuotanto oli syöttösoluriippuvaista, koska sen tuotanto syöttösoluputeellisten hiirten keuhkoissa on vähäisempää kuin villityypin hiirillä. IL-13 taas ei ole riippuvainen syöttösoluista, koska sen tuotanto ei vähentynyt syöttösoluputeellisten hiirten keuhkoissa.



Kuva 11. Sytokiinitasojen vertailu villityypin ja syöttösoluputeellisten hiirien keuhkoissa. Jäykällä hiilinanoputkilla altistettujen BL57/6-hiirten keuhkokudoksesta mitattiin lähettirna:n määrät. Altistuksen pituus oli 4 tuntia. C = PBS altistettu kontrolli * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

4.11 Geenien ilmentyminen muuttuu jäykällä hiilinanoputkilla altistettujen hiirten keuhkoissa

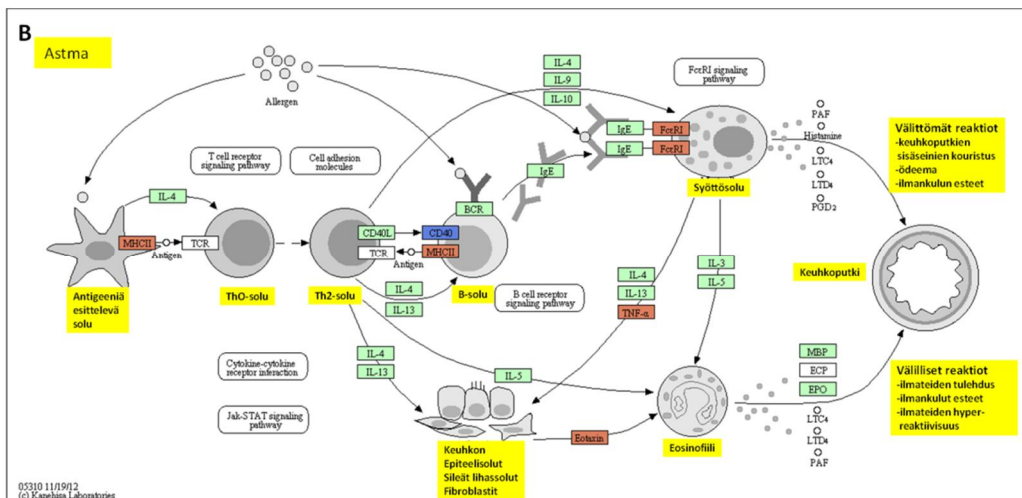
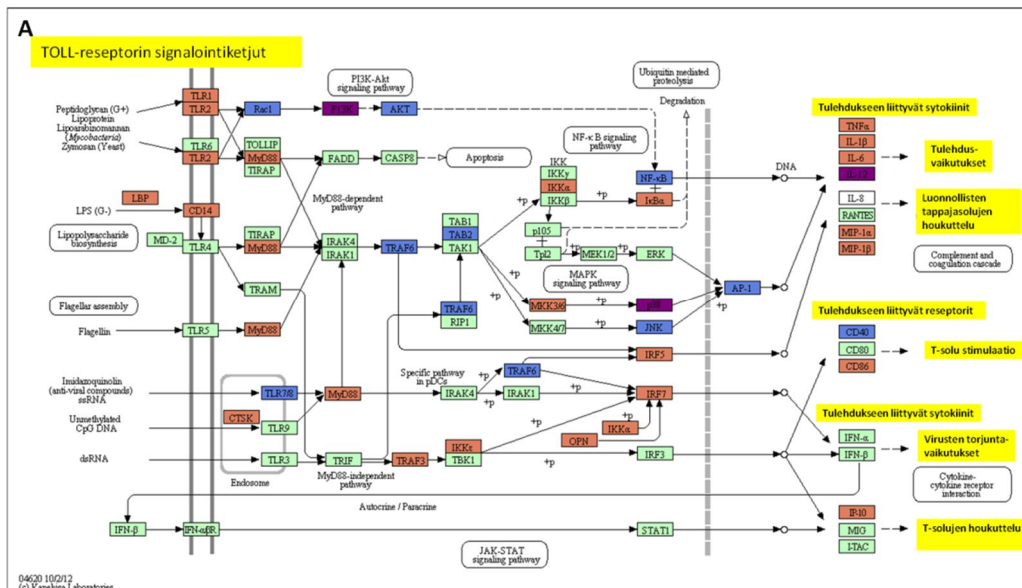
DNA-mikrosiruanalyysissä hiirten keuhkokudoksesta analysoitiin lähes 40 000 geenin ilmentymistä rigid mWCNT altistuksen jälkeen ja verrattiin PBS-altistettuihin kontrollihiiriin (Kuva 12). 76 % hiirten keuhkojen geeneistä pysyi ilmentymiseltään muuttumattomana, kun hiiriä altistettiin jäykällä hiilinanoputkilla. 11 %:lla geeneistä ilmentyminen kasvoi ja 13 %:lla ilmentyminen väheni.



Kuva 12. Geenien ilmentyminen hiirten keuhkoissa jäykän mWCNT altistuksen jälkeen. Geenien ilmentyminen on mitattu hiirten keuhkokudoksesta eristetyistä lähetti-RNA:sta. Jäykällä mWCNT altistettujen hiirten keuhkojen geenien ilmentymistä verrattiin PBS-altistettujen hiirten keuhkojen geenien ilmentymiseen. Sininen lohko kuvaa geenejä, joiden ilmentyminen pysynyt samana verrattuna altistamattomiin hiiriin, punainen lohko kuvaa geenejä, joiden ilmentyminen on kasvanut ja vihreä lohko geenejä, joiden ilmentyminen on vähentynyt. Geenejä, joiden Benjamini ja Hochberg p -arvo oli < 0.01 ja \log_2 ilmentymismuutos $> |0.58|$, pidettiin tilastollisesti merkittävinä.

4.12 Astmaan ja keuhkotulehdukseen liittyvät vasteet jäykille hiilinanoputkille altistettujen hiirten keuhkoissa havaittiin myös DNA-mikrosirutekniikalla

DNA-mikrosirutekniikan avulla yritettiin selvittää laajemmalla tasolla jäykkien hiilinanoputkien vaikutuksia hiirten keuhkokudoksessa (Kuva 13 A ja B). 13 A -kuvassa esitetään TOLL-reseptorin signaaliketjuja ja ketjuissa tunnistettuja geenejä. TOLL:in kaltainen reseptori 1 (TLR1) ja TLR2:n sekä CD14:n (Monosyytin differentaatio antigeeni CD14) ilmentyminen kasvoi jäykille hiilinanoputkille altistettujen hiirten keuhkoissa. Lisäksi useille TOLL-signaaliketjuille tärkeän geenin, MyD88:n (Myeloidi differentaation pimmäärivaste proteiini) ilmentyminen kasvoi. Signaalireittien aktivoitumisen tuloksena tulehdukseen liittyvien sytokiinien, TNF- α :n (tumour necrosis factor alpha), IL-1 β :n ja IL-6:n, määrä keuhkoissa kasvoi. Lisäksi kasvoi T-solu stimulaatiossa tärkeän CD86-reseptorin (T-lymfosyytin aktivaatioantigeeni CD86) määrä, kuten myös luonnollisten tappajasolujen houkuttelemiseen tarvittavien kemokiinien CCL3:n (kuvassa MIP-1 α) ja CCL4:n (kuvassa MIP-1 β) sekä t-solujen houkuttelemiseen tarvittavan CXCL10:n (C-X-C motiivi kemokiini 10, kuvassa IP-10) määrä. Kuvassa 13 B esitetään astmaan liittyviä signalointiketjuja. Geenitasolla, jäykillä hiilinanoputkilla altistettujen hiirten keuhkoissa havaittiin astmaan liittyvän MHCII-reseptorin (MHC luokan II trans-aktivaattori) määrän kasvu, lisäksi kasvoivat aiemmin mainittu, astmaattisen reaktion syntyyn tarvittava, TNF- α sekä Eotaxin (CCL11) ja Fc ϵ RI (Korkean affiniteetin immunoglobuliini-reseptori subunit alfa). MHCII liittyy antigeeniä esittelevän solun ja Th0-solun välisiin vuorovaikutuksiin, jossa Th0-solusta tulee Th2-tyypin solu. Lisäksi MHCII toimii Th2-solujen ja B-solujen välisessä kommunikoinnissa. Fc ϵ RI on syöttösolun pinnalla oleva reseptori, joka aktivoi syöttösolun IgE:n (Immunoglobuliini E) kohdatessaan. TNF- α on syöttösolun erittämä proteiini, joka aktivoi keuhkoissa epiteelisoluja, sileitä lihassoluja ja fibroblasteja. Nämä solut taas erittävät Eotaxin-proteiinia, joka aktivoi eosinofiilejä.



Kuva 13. DNA-mikrosirutekniikan avulla tehty analyysi (A) TOLL-reseptorin signalointiin liittyvistä, (B) Astmaan liittyvistä reiteistä. Jäykällä hiilinanoputkilla altistettujen BALB/c-hiirten keuhkokuoduksesta tehtiin kattava lähetti-RNA analyysi DNA-mikrosirutekniikan avulla. Punaiset laatikot kuvaavat geenejä, joiden ilmentyminen on kasvanut ja siniset geenejä, joiden ilmentyminen on vähentynyt. Vihreät laatikot ovat vain ihmisessä esiintyviä geenejä.

5 POHDINTA

Teollisten nanomateriaalien tarjoamat uudet mahdollisuudet lukuisiin elämää helpottaviin sovelluksiin ovat saaneet aikaan nanoteollisuuden voimakkaan kasvun. Samalla myös teollisten nanomateriaalien parissa työskentelevien ihmisten määrä on karttunut nopeasti. Tämä tarkoittaa sitä, että työpaikka-altistumisten mahdollisuus kasvaa. Onkin tärkeää yrittää selvittää mahdollisimman nopeasti teollisten nanomateriaalien terveysvaikutukset ja turvallisuusnäkökohdat, jotta työpaikoille saadaan tietoa suojautumisesta ja lainsäätäjille avaimet turvallisen työympäristön luomiseen.

Tässä, Työsuojelurahaston rahoittamassa projektissa olemme selvittäneet hiilinanoputkien terveysvaikutuksia solu- ja hiirimalleissa. Keuhkojen kautta tapahtuvassa altistumisessa tärkeässä roolissa ovat keuhkoissa partioivat syöjäsolut eli makrofaagit. Tästä syystä käytimme solukokeissamme ihmisen primäärimakrofaageja. Makrofaagien erittämien proteiinien kartoittaminen mahdollistaa nanomateriaalien aiheuttaman keuhkotulehduksen alkuvaiheiden selvityksen. Hiirimalleissa pystyimme tutkimaan keuhkotulehdusta suuremmissa mittakaavassa, poistogeenisten hiirten avulla saimme myös alustavaa tietoa teollisten nanomateriaalien aiheuttamien vaikutusten mekanismeista.

5.1 Jäykät hiilinanoputket ja asbesti aiheuttavat samankaltaisia vaikutuksia ihmisen primäärimakrofaagien proteiinieritykselle

Palomäki ym. (2011) osoittivat että jäykät hiilinanoputket pääsevät ihmisen primäärimakrofaagien sisään ja aktivoivat NLRP3-inflammasomikompleksin. Tutkiaksemme hiilinanoputkien aiheuttamia vaikutuksia laajemmin, käytimme 2-D DIGE -menetelmää saadaksemme kokonaiskuvan makrofaageista erittyvistä proteiineista hiilinanoputkialtistuksen jälkeen.

Alustavien kokeiden perusteella päädyimme käyttämään kuuden tunnin altistusta, jossa materiaalien aiheuttama solutoksisuus oli vähäistä (Kuva 2). Alustavissa kokeissa selvisi myös, että altistus jäykillä hiilinanoputkilla ja asbestilla aiheuttivat kasvaneen proteiinierityksen makrofaageissa verrattuna altistamattomiin soluihin, mistä voitiin päätellä solujen aktivoituneen (Kuva 3). 2D-DIGE-analyysillä saatiin kattava kuva makrofaagisolujen erittämistä proteiineista altistuksen jälkeen (Kuva 4). Altistus jäykillä hiilinanoputkilla saa aikaan voimakkaimman reaktion makrofaageissa; voitiin tunnistaa 74 proteiinia, joiden eritystaso oli tilastollisesti merkittävästi muuttunut verrattuna altistamattomien makrofaagien erittämiin proteiineihin. Asbestialtistus aiheuttaa myös monien proteiinien erityksen kasvun tai alentumisen. Massaspektrometrian ja tietokantahakujen perusteella tunnistet-

tiin 40 proteiinia. Pienimmän muutoksen solujen eritykseen aiheuttavat lankakerämäiset hiilinanoputket, 13:ta proteiinin sekreetio on tilastollisesti merkittävästi lisääntynyt ja yhdeksän vähentynyt verrattuna altistamattomiin soluihin (Taulukko 1).

Hierarkkinen ryhmittely ja pääkomponenttianalyysi osoittavat, että krokidoliittiasbesti ja jäykät hiilinanoputket aiheuttavat samankaltaisen reaktion makrofaageissa (Kuva 5). Lisäksi VENN-analyysissä asbestille ja hiilinanoputkille löytyy seitsemän yhteistä proteiinia, joiden erityks on kasvanutta ja kahdeksan yhteistä proteiinia, joiden erityks on vähentynyttä (Kuva 6). Tulokset ovat linjassa Palomäen ym. (2011) tutkimuksen kanssa, jossa molemmat - asbesti ja jäykät hiilinanoputket - saivat aikaan NLRP3-inflammasomin aktivoitumisen. Lankakerämäiset hiilinanoputket eivät aktivoineet NLRP3-kompleksia eivätkä siten aiheuttaneet tulehdusreaktion käynnistymistä. Samankaltaisten vaikutusten yksi syy voi olla asbestin ja jäykkien hiilinanoputkien samankaltainen kuitumainen muoto, joka voi saada aikaan lysosomien hajoamisen materiaalien endosytoosin jälkeen (Hornung ym. 2008, Palomäki ym. 2011) ja siten aiheuttaa voimakkaan tulehdusreaktion sekä samankaltaisen profiilin soluista aktiivisesti eritetyille proteiineille. Lankakerämäisten hiilinanoputkien erittämien proteiinien profiili muistuttaa jopa enemmän altistamattomien solujen erityksprofiilia, kuin asbestin ja jäykkien hiilinanoputkien (Kuva 5B proteiinianalyysi).

Jäykällä hiilinanoputkilla altistetut makrofaagit erittävät muun muassa Tioredoksiinia (THIO), Galektiini-1:tä (LEG1) ja Anneksiini A1:tä (ANXA1) enemmän kuin altistamattomat makrofaagit. Lisäksi Peptidylprolyl cis-trans isomeraasi A:n (PPIA) erityks on merkittävästi kasvanut vain jäykällä hiilinanoputkilla altistetuilla makrofaageilla. Lankakerämäisillä hiilinanoputkilla altistetut makrofaagit erittävät kasvaneesti Seriiini/threoniini-proteiini fosfataasi 2A 65 kDa regulatorinen subunit A α -isoformia (2AAA), jota muilla altisteilla ei eritetä. Kaikilla altisteilla altistetut solut erittävät kasvaneesti Katepsiini H:tä (CATH), Katepsiini B:tä (CATB), Kloridin intrasellulaarista kanavaproteiini 1:tä (CLIC1) sekä Lipokaliini 1:tä (LCN1) ja Pyruvaattikinaasi isozyymi M1/M2:tä (KPYM). Matriksi metalloproteiinaasi 9:n (MMP9) erityks oli vähentynyt tilastollisesti merkittävästi jäykällä hiilinanoputkilla altistetuilla soluilla. Kaikilla altisteilla voitiin havaita 14-3-3 proteiini gamman (1433G) erityksen väheneminen (Taulukko 1).

Mielenkiintoisimmat proteiinit joiden erityks makrofaageista lisääntyy altistuksen jälkeen, liittyvät tulehdusvasteeseen (THIO, ANXA1, LEG1 ja PPIA) sekä apoptoosiin (CATH, CATB ja ANXA1). THIO on antioksidanttinen entsyymi, jonka muodostuminen lisääntyy solun sisällä happirasituksessa. THIO:n on myös osoitettu erittyvän aktivoituneista makrofaageista, havaittu houkuttelevan tulehdussoluja tulehduspaikalle ja siten vahvistavan tulehdusreaktiota (Bertini ym. 1999). ANXA1 on myös antioksidanttinen entsyymi ja sen on havaittu toimivan lisäksi solusyömisessä. Aktivoituneissa makrofaageissa ANXA1 fosforyloituu ja siirtyy solukalvolle, jossa siitä poistetaan n-teminaalinen osa. Tämän jälkeen se

eritetään ulos (d'Aquisto ym. 2008, Vong ym. 2007). Solun ulkopuolella ANXA1 vähentää synnynnäisen immunitetin vasteita ja tehostaa hankittua immunitettia, muun muassa aktivoiden monia signaalinvälitysreittejä T-soluissa. (d'Aquisto ym. 2008). Lisäksi ANXA1:n on havaittu vapautuvan apoptoottisista soluista (Pupjalis ym. 2011). Galektiinit ovat β -galaktosidaaseihin sitoutuvia molekyylejä (Dhirapong ym. 2009). LEG1 toimii solun ulkopuolella kaksoisroolissa: jos tulehdusta ei ole, se houkuttelee tulehdussoluja ja kun akuutti tulehdus on päällä, LEG1 heikentää tulehdusvasteita (Auvynet ym. 2013). Se pystyy lisäksi käynnistämään neutrofiileissa solukuoleman, mikä osaltaan voimistaa tulehdusreaktioita, T-soluille LEG1 ei sitä vastoin aiheuta solukuolemaa (Stowell ym. 2008). LEG1:n on myös osoitettu muuntavan T-soluja Th2-suuntaan, jolloin T-soluista tulee IL-10:tä tuottavia säätely-T-soluja, jotka toimivat tulehdusvasteiden säätelijöinä (Ceden-Laurent ym. 2012). Yksi mielenkiintoisimmista makrofaageista erittyvistä proteiineista on PPIA, toiselta nimeltään Syklofilin A. Solun sisällä PPIA toimii proteiinien laskostumisessa. Sen on näytetty erittyvän ulos makrofaageista LPS-altistuksen jälkeen (Henderson ja Henderson 2008). PPIA:n on osoitettu aiheuttavan hiirille astmavälitteistä keuhkotulehdusta ja leukosyyttien, kuten monosyyttien, eosinofiilien, neutrofiilien ja T-solujen, liikkumista tulehduskudokseen (Gwinn ym. 2006), lisäksi PPIA:n ilmentyminen on koholla pienisoluisessa keuhkosyövässä ja sen myös edistää syöpäsolujen kasvua (Yang ym. 2007). PPIA erittyi kokeissamme ulos pelkästään jäykillä hiilinanoputkilla altistetuista makrofaageista, minkä vuoksi se voisi olla mahdollinen biomarkkeri jäykille hiilinanoputkille altistumiselle. Tätä täytyy kuitenkin tutkia vielä tarkemmin.

Katepsiinien erittyminen ulos solusta on usein merkki ohjelmoidusta solukuolemasta, joka voi johtua lysosomien kalvorakenteen hajoamisesta (Hornung ym. 2008). Palomäki ym. (2011) on osoittanut että jäykät hiilinanoputket aiheuttavat Katepsiini B:n erittyvän ulos makrofaageista. Tässä projektissa huomasimme lisäksi Katepsiini H:n erityksen, mikä todennäköisesti myös johtuu samasta solunsisäisestä lysosomivauriosta. Pyroptoosi on solujen ohjelmoitua kuolemaa tulehduksen aikana Kaspasi-1 välitteisesti (Galluzzi ym. 2012). Erona apoptoosiin on että solut paisuvat nekroosin tapaan ja erittävät ympäristöönsä huomattavasti enemmän proteiineja, kuin apoptoosissa, jossa solu kutistuu ja solun osat pakataan kalvorakenteiden sisään (Bergsbagen ym. 2009). Pyroptoosia on ehdotettu yhdeksi makrofaagien keinoista bakteeri-infektioiden torjumiseksi, se voimistaa paikallista tulehdusta ja houkuttelee paikalle lisää tulehdussoluja (Bortoluci ja Medzhitov 2010, Bergsbagen ym. 2009). Tämä voisi olla yksi makrofaagien keino yrittää torjua jäykkiä hiilinanoputkia ja osasy siihen, että ne aiheuttavat kudoksissa voimakkaan tulehdusreaktion.

5.2 Jäykät hiilinanoputket aiheuttavat astman kaltaisen reaktion hiirten keuhkoissa

Solukokeiden avulla voidaan tehokkaasti tutkia teollisten nanomateriaalien vaarallisuutta ja pohtia vaikutuksia ympäröivissä soluissa. Jotta saataisiin vihjeitä, mitä nanomateriaalit voisivat saada aikaan päästessään ihmisen elimistöön, täytyy käyttää eläinmalleja. Samoja nanomateriaaleja, joita käytettiin makrofaagikokeissa, tutkittiin myös hiirimalleissa käyttäen keuhkoaltistusta mallina työympäristössä mahdollisesti tapahtuvaan altistumiseen. Näin voidaan laajentaa tutkimusta soluista kudoksiin ja mahdollisesti löytää yhteys kudoksissa tapahtuvien vaikutusten ja soluista erittyvien proteiinien välille.

Jäykät hiilinanoputket aiheuttavat neutrofiilien ja lymfosyyttien määrän kasvun keuhkohuuhteessa. Lankakerämäiset hiilinanoputket eivät saaneet aikaan merkittäviä tulehdusolujen määrien kasvua (Kuva 7). Neljänä peräkkäisenä päivänä tehdyn altistuksen jälkeen merkittävää oli eosinofiilien erittäin suuri määrä keuhkohuuhteessa. Eosinofiilien kertyminen keuhkoihin on yksi astman kliinisistä oireista. Eosinofiilit lisäksi erittävät lukuisia sytokiineja sekä muita molekyyliä, jotka aiheuttavat muun muassa keuhkojen hyperaktiiviteettia, liman muodostumista, jatkuvaa tulehdusta sekä leukosyyttien kerääntymistä keuhkoihin (Pearlman 1999). Astmareaktiot saadaan hiirillä aikaan herkistämällä ensin hiiret allergisiksi tietyille molekyylille ja tämän jälkeen altistamalla hiiret keuhkojen kautta allergeenille. Jäykät hiilinanoputket näyttävät saavan allergisen reaktion aikaan hiirten keuhkoissa ilman herkistystä.

Koska keuhkohuuhteen solujakauma viittasi hankitun immunitettiin aktivoitumiseen jäykällä hiilinanoputkilla tehdyn altistuksen jälkeen, selvitettiin Th1 ja Th2 -tyypin sytokiinien määrät keuhkokudoksessa. Sytokiinit ovat pieniä molekyyliä, joita solut erittävät tietynlaisen aktivaation jälkeen (Dinarello 2000). Koska hiirten keuhkohuuhteen eosinofiilimäärät olivat korkeita, kiinnitettiin erityisesti huomiota sytokiineihin, jotka muuntavat Th0-tyypin (naiivit T-solut) soluja Th2-tyypin (tyypin 2 auttaja T-solut) soluiksi sekä houkuttelevat ja aktivoivat eosinofiileja. Tällaisia ovat IL-13 ja IL-5, jotka houkuttelevat eosinofiileja ja parantavat niiden elinkykyä, samalla vahvistaen allergisen Th2-tyypin vasteita ja heikentäen Th1-tyypin reaktioita (Akdis ym. 2011). IL-5 ja IL-13 määrät kasvoivatkin jäykille hiilinanoputkille altistettujen hiirten keuhkokudoksessa heti kerta-annoksen jälkeen. Neljänä peräkkäisenä päivänä tehtyjen altistusten jälkeen määrät laskivat hieman (Kuva 8). Yhdistettynä keuhkohuuhteen solujakaumaan (Kuva 7), vaikuttaa siltä että Th2 solut (tyypin 2 auttaja T-solut) siirtyvät nopeasti keuhkokudokseen altistuksen jälkeen ja houkuttelevat paikalle eosinofiileja sekä neutrofiileja ja lymfosyyttejä, joiden siirtyminen keuhkoihin kestää muutaman päivän. Lankakerämäiset hiilinanoputket eivät saa aikaan Th2-tyypin sytokiinien määrän kasvua keuhkokudoksessa. Th1-tyypin sytokiinin, IFN- γ :n, määrä sen sijaan lisääntyy keuhkokudoksessa lankakerämäisillä hii-

linanoputkilla tehdyn altistuksen jälkeen (Kuva 8). IFN- γ muuntaa Th0-soluja Th1-tyyppiseksi, auttaa hävittämään solunsisäisiä viruksia ja bakteereita, sekä aiheuttaa apoptoosia kudoksissa (Akdis ym. 2001). Jäykällä hiilinanoputkilla altistettujen hiirten keuhkokudoksessa IFN- γ :n määrä laski verrattuna PBS-altistettuihin verrokkihiiriin (Kuva 8).

Kemokiinit ovat sytokiinien kaltaisia pieniä molekyyliä, jotka toimivat kemiallisina houkuttelumolekyyleinä. Kemokiineja on sekä homeostaasia ylläpitäviä, joita eritetään jatkuvasti, että sellaisia joita eritetään vain stimulaation jälkeen. Tulehdukseen liittyviä kemokiineja eritetään vain tiettyjen solujen aktivoituttua. Eri tulehdussolut reagoivat vain tiettyihin kemokiineihin, joten eritetyistä kemokiineista voidaan päätellä mitä tulehdussoluja tulehduspaikalla on (Zlotnik ym. 2006). Th2-tyypin kemokiinien määrä oli koholla jäykällä hiilinanoputkilla altistettujen hiirten keuhkoissa (Kuva 9). Eosinofiileja sekä Th2-tyypin soluja houkuttelevan CCL11 määrä oli voimakkaasti koholla jo kerta-altistuksen jälkeen. Dendriittisiä soluja ja säätely-T-soluja houkuttelevan CCL17 sekä basofiileja houkuttelevan CCL24 määrät kasvoivat voimakkaammin peräkkäisinä päivinä tehdyn altistuksen jälkeen. Lankakerämäiset hiilinanoputket eivät saaneet aikaan merkittävää Th2-tyypin kemokiinien määrän kasvua hiirten keuhkokudoksessa.

Tulehdussolujakauma, sytokiinit ja kemokiinit kaikki antavat viitteitä astman kaltaisesta tilasta hiirten keuhkoissa, kun niitä on altistettu jäykällä hiilinanoputkilla. Lisäksi myös keuhkojen reagointi hengitettyä metakoliinia kohtaan kasvoi (Kuva 10). Keuhkojen hyperreaktiiviteetti on yksi astman keskeisimpiä kliinisiä oireita, joka voidaan mitata myös hiirilä (Hamelmann ym. 1997). Koska jäykät hiilinanoputket aiheuttavat selvästi hiirille astmaattisia oireita, haluttiin selvittää mitkä solut ovat keskeisiä näissä reaktioissa. IL-4 ja IL-13 ovat tärkeimpiä Th2-tyypin sytokiineja. Ne aktivoivat B-solut erittämään IgE:tä, saavat aikaan fibroblastien jakaantumista ja kollageenin muodostumista. Lisäksi IL-4 saa aikaan Th0-solujen muuntumisen Th2-soluiksi ja myös estää T-solujen apoptoosia, (Martinez ym. 2009). IL-4 ja IL-13 erittyvät muun muassa aktivoituneista syöttösoluista ja T-soluista (Akdis ym. 2011). Syöttösoluputteellisia hiiriä käyttämällä voitiin haarukoida mitkä solut ovat mukana Th2 tyypin sytokiinien erityksessä jäykille hiilinanoputkille altistettujen hiirten keuhkoissa. Kuva 11 osoittaa että IL-4 erityks tapahtuu syöttösolujen kautta, IL-13 erityks taas ei ole riippuvaista syöttösoluista.

DNA-mikrosiruanalyysillä saatiin kokonaiskuva hiirten keuhkoissa aktivoituvista geeneistä jäykille hiilinanoputkille altistumisen jälkeen. Voitiin havaita, että ilmentyminen kasvoi 11 %:lla keuhkojen geeneistä ja 13 %:lla geeneistä ilmentyminen väheni hiilinanoputkialtistuksen jälkeen (Kuva 12). Lisäksi astmaan liittyvät signaaliketjut aktivoituivat, lisäksi tulehdukseen kytkeytyvien TOLL-reseptorien aktivaatioreittien geenien ilmentyminen kasvoi (Kuva 13). DNA-mikrosiruanalyysi osoittaa, että jäykät hiilinanoputket saavat aikaan monitahoisen tulehdusreaktion hiirten keuhkoissa.

Analyysissä ei tullut esiin syöpään yhdistettyjä signalointireittejä, vaikka tutkimuksessa käytetyn jäykän mwCNT:n on osoitettu aiheuttavan mesoteliomaa ja keuhkosyöpää koe-eläimissä ((Poland ym. 2008, Ryman-Rasmussen ym. 2009, Takagi ym. 2008). Näiden sairauksien kehittyminen vie aikaa, joten altistustutkimuksemme saattoi olla liian lyhytkestoinen, jotta olisimme tulehdus- ja astmavasteen lisäksi saanneet syövän kehittymiseen viittaavia tuloksia.

6 YHTEENVETO

Jo solukokeet osoittavat, että jäykät hiilinanoputket aiheuttavat enemmän aktivaatioita makrofaageille kuin lankakerämäiset hiilinanoputket. Lisäksi jäykkien hiilinanoputkien vaikutukset ovat samankaltaisia asbestin kanssa - jopa vakavampia. Tähän syynä voi olla samankaltainen muoto, joka vaikeuttaa materiaalien poistoa keuhkoista, sekä hajoamattomuus (Osmond-Mcleod ym. 2011). Jäykillä nanoputkilla altistetut makrofaagit erittävät lukuisia proteiineja, jotka toimivat tulehdusreaktioissa ja aktivoivat tulehdussoluja Th2-suuntaan. Syklofiilin A erittyy pelkästään jäykillä hiilinanoputkilla altistetuista makrofaageista, ja voisi olla linkki makrofaagien ja keuhkoissa hiirten keuhkoissa muodostuvan voimakkaan tulehduksen välillä.

Hiirikokeissa havaitaan jäykkien hiilinanoputkien aiheuttama astman kaltainen tulehdustila keuhkoissa. Th2-tyypin solujen, sytokiinien ja kemokiinien määrä keuhkoissa kasvaa, lisäksi keuhkoissa on hyperreaktivateettiä, joka on yksi astman aiheuttamista tiloista. Jäykät hiilinanoputket saavat aikaan Th2-tyyppisen vasteen mutta Th2-sytokiinien ilmaantuminen keuhkoihin on niin nopeaa, etteivät ne voi olla peräisin Th2-tyypin soluista, vaan luonnollisen immunitietin soluista, mitä ei ole ennen havaittu. Astmareaktiot voidaan havaita myös DNA-mikrosiruanalyysin avulla. Lankakerämäiset hiilinanoputket eivät aiheuta tämän kaltaisia vasteita. Syöttösolut vaikuttavat olevan vastuussa IL-4:n erittämisestä, mutta IL-13 tuottajasoluja ei voida yksilöidä.

Pitkät ja jäykät hiilinanoputket voivat mahdollisesti aiheuttaa myös työpaikoilla tapahtuvissa altistumisissa ongelmia. Työpaikoilla, joissa käsitellään pitkiä ja jäykkiä kuitumaisia nanomateriaaleja, on tiedostettava mahdolliset riskit. Altistumismahdollisuudet on syytä minimoida käyttämällä vetokaappeja ja suljettuja prosesseja mikäli vain mahdollista. Lisäksi on huolehdittava henkilökohtaisesta suojautumisesta ja käytettävä riittävän tehokkaita hengityssuojaimia.

On muistettava, että vaikka tässä projektissa tutkittu hiilinanoputki vaikuttaa todella ongelmalliselta, kyse on yksittäisestä, tietyn muotoisesta hiilinanoputkesta. Näiden tulosten perusteella ei voida yleistää, että kaikki hiilinanoputket ovat vaarallisia ja aiheuttavat samanlaisia ongelmia keuhkoissa kuin asbesti. Esimerkiksi toinen tutkimuksissamme käytetty, lankakerämäinen hiilinanoputki, joka on jo yleisessä käytössä nanoteollisuudessa, ei aiheuttanut keuhkotulehdusta hiirissä. Hiilinanoputket ja teolliset nanomateriaalit yleensä ovat monimuotoinen ryhmä yhdisteitä, joiden terveysvaikutukset täytyy määrittää materiaali kerrallaan, tekemättä yleistyksiä.

Tämän projektin perusteella voidaan todeta, että proteomiikkaa voidaan tehokkaasti hyödyntää teollisten nanomateriaalien turvallisuustutkimuksessa, varsinkin solukokeissa:

eritetyistä proteiineista moni voi olla osallisena hiirten keuhkoissa havaittavaan astman kaltaisen tulehduksen syntyyn. Tulevissa projekteissa tulemme keskittymään hiirten keuhkokuuhteen proteomiin, tässä projektissa tehdyt hiirityöt toimivat niille lähtökohtana. Lisäksi pyrimme varmistamaan DNA-mikrosiruanalyysin geenitason tulokset myös proteiinitasolla. Esimerkiksi PPIA proteiini on niiden 20 proteiinin joukossa, jotka ovat yhteisiä sekä sekretomi- että DNA-mikrosirulöydöksille. Tulevaisuudessa proteiinityöt tehdään laitokselle hankitulla uudella massaspektrometrialaitteistolla, joka mahdollistaa moninkertaisen proteiinin määrän tunnistamisen näytteistä verrattuna tässä työssä käytettyyn DIGE-pohjaiseen proteomiikka-analyysiin.

7 LÄHTEET

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_032.pdf

Akdis, M., S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares, C. Rhyner, N. Ouaked, A. Schaffartzik, W. Van De Veen, S. Zeller, M. Zimmermann, ja C.A. Akdis. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J.Allergy Clin.Immunol.* 127:701-21.e1-70.

Alexiou, C., R. Jurgons, C. Seliger, ja H. Iro. 2006. Medical applications of magnetic nanoparticles. *J.Nanosci Nanotechnol.* 6:2762-2768.

Auvynet, C., S. Moreno, E. Melchy, I. Coronado-Martinez, J.L. Montiel, I. Aguilar-Delfin, ja Y. Rosenstein. 2013. Galectin-1 promotes human neutrophil migration. *Glycobiology.* 23:32-42.

Avouris, P., Z. Chen, ja V. Perebeinos. 2007. Carbon-based electronics. *Nat.Nanotechnol.* 2:605-615.

Bergsbaken, T., S.L. Fink, ja B.T. Cookson. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat.Rev.Microbiol.* 7:99-109.

Bertini, R., O.M. Howard, H.F. Dong, J.J. Oppenheim, C. Bizzarri, R. Sergi, G. Caselli, S. Pagliei, B. Romines, J.A. Wilshire, M. Mengozzi, H. Nakamura, J. Yodoi, K. Pekkari, R. Gurunath, A. Holmgren, L.A. Herzenberg, L.A. Herzenberg, ja P. Ghezzi. 1999. Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. *J.Exp.Med.* 189:1783-1789.

Bortoluci, K., ja R. Medzhitov. 2010. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 67:1643-1651.

Cedeno-Laurent, F., M. Opperman, S.R. Barthel, V.K. Kuchroo, ja C.J. Dimitroff. 2012. Galectin-1 Triggers an Immunoregulatory Signature in Th Cells Functionally Defined by IL-10 Expression. *The Journal of Immunology.* 188:3127-3137.

D'Acquisto, F., M. Perretti, ja R.J. Flower. 2008. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br.J.Pharmacol.* 155:152-169.

Dhirapong, A., A. Lleo, P. Leung, M.E. Gershwin, ja F. Liu. 2009. The immunological potential of galectin-1 and -3. *Autoimmunity Reviews.* 8:360-363.

Dinarello, C.A. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 118:503-508.

Donaldson, K., R. Aitken, L. Tran, V. Stone, R. Duffin, G. Forrest, ja A. Alexander. July 2006. Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. *Toxicological Sciences*. 92:5-22.

Ernst, S., C. Lange, A. Wilbers, V. Goebeler, V. Gerke, ja U. Rescher. 2004. An Annexin 1 N-Terminal Peptide Activates Leukocytes by Triggering Different Members of the Formyl Peptide Receptor Family. *The Journal of Immunology*. 172:7669-7676.

Galluzzi, L., I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, ja G. Kroemer. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19: 107-120.

Gentleman, R.C., V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y. Yang, ja J. Zhang. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5:R80.

Gibbons, M.A., A.C. MacKinnon, P. Ramachandran, K. Dhaliwal, R. Duffin, A.T. Phythian-Adams, N. van Rooijen, C. Haslett, S.E. Howie, A.J. Simpson, N. Hirani, J. Gauldie, J.P. Iredale, T. Sethi, ja S.J. Forbes. 2011. Ly6Chi Monocytes Direct Alternatively Activated Profibrotic Macrophage Regulation of Lung Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 184:569-581.

Gwinn, W.M., J.M. Damsker, R. Falahati, I. Okwumabua, A. Kelly-Welch, A.D. Keegan, C. Vanpouille, J.J. Lee, L.A. Dent, D. Leitenberg, M.I. Bukrinsky, ja S.L. Constant. 2006. Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention. *J.Immunol.* 177:4870-4879.

Hamelmann, E., J. Schwarze, K. Takeda, A. Oshiba, G.L. Larsen, C.G. Irvin, ja E.W. Gelfand. 1997. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 156:766-775.

Harris, J.G., R.J. Flower, ja M. Perretti. 1995. Alteration of neutrophil trafficking by a lipocortin 1 N-terminus peptide. *Eur.J.Pharmacol.* 279:149-157.

Helming, L., ja S. Gordon. 2007. Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules. *Eur.J.Immunol.* 37:33-42.

- Henderson, B., ja S. Henderson. 2009. Unfolding the relationship between secreted molecular chaperones and macrophage activation states. *Cell Stress Chaperones*. 14:329-341.
- Hernandez, J.D., J.T. Nguyen, J. He, W. Wang, B. Ardman, J.M. Green, M. Fukuda, ja L.G. Baum. 2006. Galectin-1 Binds Different CD43 Glycoforms to Cluster CD43 and Regulate T Cell Death. *The Journal of Immunology*. 177:5328-5336.
- Hornung, V., F. Bauernfeind, A. Halle, E.O. Samstad, H. Kono, K.L. Rock, K.A. Fitzgerald, ja E. Latz. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat.Immunol.* 9:847-856.
- Korolainen, M.A., G. Goldsteins, T.A. Nyman, I. Alafuzoff, J. Koistinaho, ja T. Pirttilä. 2006. Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neurobiol.Aging*. 27:42-53.
- Lee, Y.J., D.S. Ruby, D.W. Peters, B.B. McKenzie, ja J.W. Hsu. 2008. ZnO nanostructures as efficient antireflection layers in solar cells. *Nano Lett.* 8:1501-1505.
- Liew, F.Y., N.I. Pitman, ja I.B. McInnes. 2010. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat.Rev.Immunol.* 10:103-110.
- Martinez, F.O., L. Helming, ja S. Gordon. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu.Rev.Immunol.* 27:451-483.
- Miao, E.A., I.A. Leaf, P.M. Treuting, D.P. Mao, M. Dors, A. Sarkar, S.E. Warren, M.D. Wewers, ja A. Aderem. 2010. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat.Immunol.* 11:1136-1142.
- Oberdorster, G., E. Oberdorster, ja J. Oberdorster. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ.Health Perspect.* 113:823-839.
- Osmond-McLeod, M.J., C.A. Poland, F. Murphy, L. Waddington, H. Morris, S.C. Hawkins, S. Clark, R. Aitken, M.J. McCall, ja K. Donaldson. 2011. Durability and inflammogenic impact of carbon nanotubes compared with asbestos fibres. *Part Fibre Toxicol.* 8:15-8977-8-15.
- Palomaki, J., E. Valimaki, J. Sund, M. Vippola, P.A. Clausen, K.A. Jensen, K. Savolainen, S. Matikainen, ja H. Alenius. 2011. Long, Needle-like Carbon Nanotubes and Asbestos Activate the NLRP3 Inflammasome through a Similar Mechanism. *ACS Nano*.
- Palomaki, J., P. Karisola, L. Pylkkanen, K. Savolainen, ja H. Alenius. 2010. Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology*. 267:125-131.

- Pearlman, D.S. 1999. Pathophysiology of the inflammatory response. *J.Allergy Clin.Immunol.* 104:s132-s137.
- Perretti, M. 1997. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte– endothelium interaction. *Trends Pharmacol.Sci.* 18:418-425.
- Poland, C.A., R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W.A. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. Macnee, ja K. Donaldson. 2008. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat.Nanotechnol.* 3:423-428.
- Pupjalis, D., J. Goetsch, D.J. Kottas, V. Gerke, ja U. Rescher. 2011. Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling. *EMBO Molecular Medicine.* 3:102-114.
- R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rabinovich, Ariel, Hershkoviz, Hirabayashi, Kasai, ja Lider. 1999. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology.* 97:100-106.
- Robichaud, C.O., A.E. Uyar, M.R. Darby, L.G. Zucker, ja M.R. Wiesner. 2009. Estimates of Upper Bounds and Trends in Nano-TiO₂ Production As a Basis for Exposure Assessment. *Environ.Sci.Technol.* 43:4227-4233.
- Roco, M. 2011. The Long View of Nanotechnology Development: The National Nanotechnology Initiative at 10 Years. In Springer Netherlands. 1-28.
- Rossi, E.M., L. Pylkkänen, A.J. Koivisto, M. Vippola, K.A. Jensen, M. Miettinen, K. Sirola, H. Nykäsenoja, P. Karisola, T. Stjernvall, E. Vanhala, M. Kiilunen, P. Pasanen, M. Mäkinen, K. Hämeri, J. Joutsensaari, T. Tuomi, J. Jokiniemi, H. Wolff, K. Savolainen, S. Matikainen, ja H. Alenius. 2010a. Airway Exposure to Silica-Coated TiO₂ Nanoparticles Induces Pulmonary Neutrophilia in Mice. *Toxicological Sciences.* 113:422-433.
- Rossi, E.M., L. Pylkkanen, A.J. Koivisto, H. Nykasenoja, H. Wolff, K. Savolainen, ja H. Alenius. 2010b. Inhalation exposure to nanosized and fine TiO₂ particles inhibits features of allergic asthma in a murine model. *Part Fibre Toxicol.* 7:35-8977-7-35.
- Ryman-Rasmussen, J., M.F. Cesta, A.R. Brody, J. Shipley-Phillips, J.I. Everitt, E.W. Tewksbury, O.R. Moss, B.A. Wong, D.E. Dodd, M.E. Andersen, ja J.C. Bonner. 2009. Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nat Nano.* 4:747-751.

- Sager, T.M., C. Kommineni, ja V. Castranova. 2008. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol.* 5:17-8977-5-17.
- Salata, O.V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology.* 2:3.
- Sinha, N., J. Ma, ja J.T. Yeow. 2006. Carbon nanotube-based sensors. *J.Nanosci Nanotechnol.* 6:573-590.
- Smyth, GK (2005). Limma: linear models for microarray data. In: 'Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor'. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber, Springer, New York, 397-420.
- Stowell, S.R., Y. Qian, S. Karmakar, N.S. Koyama, M. Dias-Baruffi, H. Leffler, R.P. McEver, ja R.D. Cummings. 2008. Differential Roles of Galectin-1 and Galectin-3 in Regulating Leukocyte Viability and Cytokine Secretion. *The Journal of Immunology.* 180:3091-3102.
- Sun, G., J. Kürti, M. Kertesz, ja R.H. Baughman. 2002; 2002. Dimensional Changes as a Function of Charge Injection in Single-Walled Carbon Nanotubes. *J.Am.Chem.Soc.* 124:15076-15080.
- Sund, J., H. Alenius, M. Vippola, K. Savolainen, ja A. Puustinen. 2011. Proteomic characterization of engineered nanomaterial-protein interactions in relation to surface reactivity. *ACS Nano.* 5:4300-4309.
- Takagi, A., A. Hirose, T. Nishimura, N. Fukumori, A. Ogata, N. Ohashi, S. Kitajima, ja J. Kanno. 2008. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J.Toxicol.Sci.* 33:105-116.
- Unlu, M., M.E. Morgan, ja J.S. Minden. 1997. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* 18:2071-2077.
- Vippola, M., G.C.M. Falck, H.K. Lindberg, S. Suhonen, E. Vanhala, H. Norppa, K. Savolainen, A. Tossavainen, and T. Tuomi. 2009. Preparation of nanoparticle dispersions for in-vitro toxicity testing. *Human and Experimental Toxicology.* 28:377-385.
- Vong, L., F. D'Acquisto, M. Pederzoli-Ribeil, L. Lavagno, R.J. Flower, V. Witko-Sarsat, ja M. Perretti. 2007. Annexin 1 cleavage in activated neutrophils: a pivotal role for proteinase 3. *J.Biol.Chem.* 282:29998-30004.
- Yang, H., J. Chen, J. Yang, S. Qiao, S. Zhao, ja L. Yu. 2007. Cyclophilin A is upregulated in small cell lung cancer and activates ERK1/2 signal. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 361:763-767.

Yurchenko, V., S. Constant, E. Eisenmesser, ja M. Bukrinsky. 2010. Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin.Exp.Immunol.* 160:305-317.

Zlotnik, A., O. Yoshie, ja H. Nomiya. 2006. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 7:243.

Hiilinanoputket ovat yksi monipuolisimmista ja käytetyimmistä teollisista nanomateriaaleista. Hiilinanoputkien asbestinkaltainen muoto on kuitenkin herättänyt kysymyksiä niiden käytön turvallisuudesta.

Tässä Työsuojelurahaston rahoittamassa projektissa tutkittiin proteomiikan menetelmien avulla kahden erimuotoisen, moniseinäisen hiilinanoputken sekä asbestin vaikutuksia ihmisen makrofaagisolujen proteiinien erityykseen eli sekreto-miin. Lisäksi on verrattu samojen hiilinanoputkien aikaansaa-mia reaktioita hiirten keuhkoissa.

Tulokset antavat uutta tietoa hiilinanoputkien turvallisuudesta. Projektin avulla selvitettiin, aiheuttaako jokin makrofaagi-en erittämistä proteiineista hiirissä havaitut vaikutukset. Tutkimus herättää myös kysymyksen siitä, että voiko astmaan viittaava varhainen altistumisvaste ja tulehdus ennustaa syö-vän syntyä. Tulosten perusteella voidaan arvioida, millaiset hiilinanoputket vaativat suojautumista työpaikoilla ja miten voidaan vaikuttaa hiilinanoputkien kanssa työskentelevien asenteisiin.

TYÖTERVEYSLAITOS

Työterveyslaitos, Systeemitoksikologian tiimi
Topeliuksenkatu 41 a A, 00250 Helsinki

www.ttl.fi

ISBN 978-952-261-290-8
ISBN 978-952-261-291-5

(nid.)
(PDF)



Työterveyslaitos



Työsuojelurahasto
Arbeterskyddsfonden
The Finnish Work Environment Fund