

The role of neutrophils in particle-induced DNA damage in the lung

Citation for published version (APA):

Knaapen, A. M. (2002). The role of neutrophils in particle-induced DNA damage in the lung. Maastricht: Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2002

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 8

Summary and general discussion

Chronic exposure to particles such as particulate air pollution (particulate matter, PM) and crystalline silica (e.g. quartz) has been associated with increased lung cancer rates in both rats and humans [1-5]. Nevertheless, the mechanisms involved in carcinogenesis after particle exposure have only partly been elucidated. Carcinogenesis is a complicated multistep process and specifically in the initiation stage, genotoxic events are thought to play a crucial role. *In vitro* studies indicated that the genotoxic properties of particles may depend on characteristics such as size, shape, chemical composition, surface reactivity, crystallinity, hydrophobicity, and solubility [6]. In rats however, carcinogenicity after high dose exposures appears to be independent from any inherent genotoxic activity of the particles, and is considered to be mainly related to genotoxic processes and increased epithelial cell proliferation caused by (chronic) inflammation and inflammatory phagocyte-derived ROS [7-9]. These observations imply that studies aiming to investigate the mechanisms involved in particle-induced genotoxicity need an approach which allows to discriminate between primary (particle-induced) and secondary (inflammatory phagocyte-induced) genotoxic processes. Since the generation of ROS is thought to be a crucial event in both processes, the present thesis has aimed to investigate ROS-induced DNA damage in respiratory tract epithelial target cells after particle exposure. In the first part of the thesis (Chapters 2-4), we specifically focussed on mechanisms involved in primary genotoxicity, whereas in Chapters 5-7 secondary genotoxic processes are described. In these final chapters special emphasis was put on the role of neutrophils, since these cells are hypothesised to be potent mediators of secondary genotoxicity in particle-exposed rats [10]. Two different types of particles were used, particulate matter (PM) and quartz, which are both known to be associated with an array of pulmonary diseases in humans (Chapter 1.5), including an increased risk of lung cancer development.

Findings on primary genotoxicity

In the first part of this thesis (Chapters 2-4) possible mechanisms involved in ROS-mediated primary genotoxic effects of PM and quartz are discussed. Major focus was on the hydroxyl radical, since it is the most reactive ROS towards DNA [11]. In the past, numerous studies have provided indirect or circumstantial evidence that $\cdot\text{OH}$ could play a crucial role in both quartz- and PM-induced genotoxicity [12-18]. In this thesis electron spin resonance with a specific spin-trap (DMPO) was applied to directly demonstrate that both PM and DQ12-quartz are able to generate $\cdot\text{OH}$ in aqueous solutions. Importantly, $\cdot\text{OH}$ formation by both particles was facilitated by the addition of H_2O_2 , which points to an involvement of Fenton-like mechanisms, indicating a role of transition metals. Indeed, $\cdot\text{OH}$ formation by PM was inhibited by deferoxamine, suggesting an important role of iron [19]. On the other hand, the $\cdot\text{OH}$ -generating capacity of DQ12-quartz is likely to be explained by the action of reactive functionalities at the particle surface [20,21]. This was confirmed by experiments showing that ESR-detected $\cdot\text{OH}$ formation by DQ12 was reduced after treatment of the particle surface

with either aluminium lactate or PVNO [22,23]. Since $\cdot\text{OH}$ is strongly implicated in DNA damage, the $\cdot\text{OH}$ -generating properties of both PM and quartz provide a possible common mechanism involved in their primary genotoxic action. Analysis of DNA strand breakage and 8-OHdG induction (Figure 1) were used as (semi-)specific tools to detect $\cdot\text{OH}$ -mediated DNA damage [24,25]. Using naked DNA we demonstrated that the ability of PM to induce DNA strand breakage and 8-OHdG was indeed closely related to its $\cdot\text{OH}$ -generating properties (Chapters 2 & 3). Similar results were also found for quartz, although not presented in this thesis (unpublished data) [26].

	In vitro (Acellular)	In vitro (Cellular)	In vivo
Oxidant Measurement	$\cdot\text{OH}$ (Electron spin resonance)	$\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 (neutrophils)	Antioxidant capacity (TEAC, Rat BAL-fluid)
DNA damage			
8-OHdG	Dot-blot (Calf thymus DNA)	HPLC, Immunostaining (A549, RLE)	Immunostaining (Nasal epithelium)
Strand breaks	Plasmid Assay (Supercoiled plasmid DNA)	Comet (A549, RLE)	Comet (Rat epithelial lung cells)

Figure 1. Schematic overview of the various methods and models used in the present thesis to investigate the role of ROS in particle-induced DNA damage.

To extend our observations beyond naked DNA, PM and DQ12-quartz were also tested in pulmonary target cell lines. Therefore, alveolar epithelial cells from human (A549), or rat (RLE) origin were used, since these cells are considered to be a specific target for particle-induced hyperplasia and carcinogenicity [4,27,28]. We demonstrated that DQ12-quartz as well as PM cause primary DNA damage (8-OHdG and DNA strand breakage) in both RLE and A549 cells. In line with experiments on naked DNA, our data suggest that also target cellular DNA damage induced by PM or quartz could be at least partly attributed to the generation of $\cdot\text{OH}$. However, it is important to realise that PM and quartz are totally different types of particles and that dissimilar mechanisms may underlie $\cdot\text{OH}$ -mediated DNA damage in target cells. Whereas DQ12-quartz is a more or less homogeneous particulate compound, comprised of about 90% crystalline silica (the rest being amorphous silica), PM is chemically highly heterogeneous (Chapter 1.5). The most important difference however, is the fact that in contrast to DQ12, a large part of PM is soluble. Indeed, although the insoluble particle core of PM was suggested to contribute to cellular DNA damage (Chapter 4), we demonstrated that the $\cdot\text{OH}$ -generating capacity of PM and associated DNA damage was most likely due to factors present in the soluble fraction, probably iron (Chapters 3 & 4). Under normal conditions iron is carefully sequestered in a target cell. However, during iron exposure the cellular iron-binding capacity may be overwhelmed, which could facilitate Fenton-mediated $\cdot\text{OH}$ formation and thus the induction of DNA damage [29,30]. For quartz on the other hand, $\cdot\text{OH}$ generation and related cellular DNA damage is thought to be mainly associated with surface properties of the insoluble particles [6]. Due to its extremely high reactivity, $\cdot\text{OH}$ will only react with DNA when it is generated in direct proximity [31]. Considering a role of $\cdot\text{OH}$ generated at the quartz surface, this implicates that insoluble quartz particles should migrate

into the nucleus after uptake by target cells. Preliminary studies performed in our lab indicate that A549 as well as RLE cells are indeed able to ingest particles [32]. However, although quartz particles have been found in the nuclei of alveolar epithelial cells after prolonged exposure (26 Days) [33], we did not observe nuclear translocation after short-term incubations (2-4 h), as used in our *in vitro* studies (unpublished observations). Nevertheless, evaluation of nuclear particle migration and associated site-specific induction of $\cdot\text{OH}$ -mediated DNA damage remains a challenge for future research. In addition, to assess the role of particle uptake more generally, and to further elucidate (geno)toxicokinetics of insoluble particles in target cells, it would be helpful to evaluate DNA damage on a single cell level and to correlate individual cellular particle burdens with DNA damage.

Our acellular experiments indicated that the presence of H_2O_2 was more or less a prerequisite for PM and quartz to generate $\cdot\text{OH}$. In contrast, in A549 and RLE cells, $\cdot\text{OH}$ -mediated DNA damage by both particles was observed in the absence of extracellularly added H_2O_2 . However, observations on endogenous H_2O_2 production in alveolar type II cells [34], suggest that H_2O_2 might still be involved in particle-induced cellular DNA damage. This is further supported by studies showing the induction of H_2O_2 generation by rat type II cells upon exposure to quartz [35]. Moreover, others demonstrated that PM-induced DNA strand breakage in lung target cells could be inhibited by the addition of the H_2O_2 scavenger catalase [36]. In considering a role of H_2O_2 it should be noted that it is freely diffusible through the cell and is thought to induce DNA damage via intranuclear $\cdot\text{OH}$ formation upon reaction with DNA-bound transition metals [19,30]. As such, it could be hypothesised that particle-induced endogenous H_2O_2 generation provides a possible mechanism for $\cdot\text{OH}$ -mediated DNA damage in the absence of a direct interaction between particles and nuclear DNA. However, the significance of such a mechanism remains to be evaluated.

Findings on secondary genotoxicity

Phagocyte-derived ROS have been suggested to be responsible for the secondary genotoxic processes as observed in particle-exposed rats [7,37]. Among phagocytes, neutrophils have the largest capacity to generate ROS [38,39]. Moreover, rat BAL-derived neutrophils were shown to be more potent to induce mutations than alveolar macrophages [37]. Therefore, it is likely to suggest that the neutrophil represents the major effector cell in secondary genotoxicity of particles in the rat. However, the ability and mechanism of neutrophils to induce oxidative DNA damage specifically in pulmonary epithelial target cells for particle-induced carcinomas was not yet investigated. In Chapters 5 and 6 we demonstrated using a coincubation model that activated neutrophils caused the induction of 8-OHdG and strand breaks in DNA from rat lung type II epithelial cells (RLE) *in vitro*. Interestingly, the observations on 8-OHdG support *in vivo* studies on quartz-exposed rats, which already provided circumstantial evidence for neutrophil-induced 8-OHdG formation in the lung [17,18]. In addition, the data on DNA strand breakage are complementary to our own *in vivo* observations in the rat, where epithelial DNA strand breakage was associated with neutrophil presence and activity (Chapter 7).

The data presented in Chapter 6 indicate that neutrophil-induced DNA strand break formation in neighbouring cells is likely to involve H_2O_2 , which is in line with earlier observations on non-pulmonary target cells [40,41]. Furthermore, by the identification of specific DNA base modifications, such as 8-OHdG (Chapter 5), and by the use of specific scavengers we and others demonstrated that a major part of DNA damage induced by neutrophils is mediated by the intracellular generation of $\cdot\text{OH}$, which parallels observations on primary DNA damage by quartz or PM (Chapter 2-4) [40,42,43]. Interestingly, data from Chapter 6 also suggest that a close contact between target cells and activated neutrophils is a

prerequisite for genotoxicity to occur, because H_2O_2 might otherwise be prematurely consumed by for instance myeloperoxidase. In Chapter 6 we also evaluated the association between nasal inflammation (neutrophil numbers in nasal lavage) and the induction of 8-OHdG in nasal epithelial cells from 80 children selected from a larger cohort sampled in Nordrhein-Westfalen (Germany). However, no clear relationship between the presence of neutrophils and epithelial DNA damage was observed (Chapter 6).

In Chapter 7 we demonstrated that intratracheal instillation of quartz causes acute DNA strand breakage in epithelial lung cells of the rat. Rather than evaluating whole lung homogenates, we isolated epithelial cells in order to study DNA damage in specific target cells for particle-induced pulmonary carcinogenesis. We found that DNA strand breakage was reduced by treatment of the quartz particle surface prior to instillation, indicating a crucial role of the reactive functionalities at the silica surface. Since simple coating procedures (aluminium lactate or PVNO) inhibited quartz-induced genotoxicity, these data further strengthen the body of evidence that the quartz hazard is a variable entity [44], and that quartz is not uniformly carcinogenic across industries where there is quartz exposure [5]. Most interestingly, the inhibition of DNA damage by surface treatment was paralleled by a reduction of inflammatory cell influx. Since neutrophils, and to a lesser extent macrophages, are potent generators of ROS, the data suggest the contribution of a neutrophil-mediated process of secondary DNA damage in the quartz-exposed rat. More specifically, although observed from single dose exposures to either native or surface-modified quartz, we demonstrated the existence of a sort of threshold for neutrophil-mediated DNA strand breaks in the rat lung, which corresponds to observations from others on 8-OHdG and HPRT-mutations [10,18,37].

Using *in vitro* incubations we demonstrated that quartz directly activates neutrophils to generate ROS (Chapter 7). However it needs to be emphasised that this process might not necessarily relate to ROS generation in the lung. For instance, reference non-toxic particles such as carbon black and titanium dioxide are often unable to elicit a direct oxidative burst in inflammatory cells *in vitro* [45,46], whereas instillation of these particles in the rat induces an inflammatory reaction and subsequent ROS-mediated mutagenesis [37,47]. This would suggest that phagocyte-mediated ROS release and related DNA damage in the lung after particle exposure is not only a matter of particle-phagocyte interactions, but is a consequence of a co-operative action of particles, inflammatory phagocytes, pulmonary epithelial target cells and cytokines. However, the presence of particles such as quartz and PM could still impact on the ultimate genotoxic effect of the inflammatory cell-generated ROS, since a combination of H_2O_2 and such particles was shown to result in the formation of the deleterious $^{\bullet}OH$ (Chapters 2-4).

Some perspectives on particle genotoxicity

The studies described in the first part of this thesis demonstrate that PM and DQ12-quartz are able to induce primary, inflammation-independent DNA damage in epithelial lung target cells *in vitro*. As such, these data indicate that PM as well as DQ12-quartz should be considered as genotoxic. It remains however to be established whether these mechanisms of primary genotoxicity contribute to genotoxic processes after *in vivo* exposure to quartz or PM. Furthermore, the composition of both types of particles may vary with their origin, and it should therefore be realised that their inherent capacity to induce DNA damage may vary depending on their ultimate chemical and physical characteristics. This also implies that one should be cautious in making generalisations about the mechanisms involved in the genotoxic action of PM or quartz.

Studies described in the second part show that neutrophils induce oxidative DNA damage (8-OHdG, strand breakage) in alveolar epithelial cells *in vitro*. Moreover, the data support our own *in vivo* observations in rats exposed to quartz (Chapter 7), where it seems that at least a part of the DNA damage as observed in isolated epithelial cells can be attributed to a secondary genotoxic effect of neutrophils. In general, these data contribute to the consensus on a crucial role of inflammatory phagocytes in particle-induced genotoxicity in the rat [9]. Considering DNA damage (8-OHdG, strand breakage) as a premutagenic event, our *in vitro* and *in vivo* observations are also complementary to studies which suggest that particle-mediated mutagenicity (HPRT, p53) in the rat lung is driven by neutrophil-derived ROS [18,37].

In this thesis the role of oxidants in particle-induced DNA damage was investigated using an approach which included a whole array of tests ranging from *in vitro* acellular incubations to *in vivo* studies in rats and humans (Figure 1). This allowed us to separately investigate mechanisms involved in either primary or secondary particle-induced DNA damage. The acellular assays as described in the first part represent valuable tools for an efficient and fast screening of the ROS-generating capacity and associated ability of particles to induce damage in naked DNA. However, it should be kept in mind that the effects as seen in these assays, where DNA is in direct contact with high particle concentrations, are unlikely to occur in cellular DNA. As such, for purposes of mechanistical research, acellular assays are only useful to supplement findings on particle-induced genotoxicity in cellular assays. Cellular genotoxicity studies, attempting to contribute to the elucidation of mechanisms involved in particle-induced carcinogenicity should ideally be performed by using target cells relevant for neoplastic outcomes [9]. Also *in vivo* studies should focus on specific target cells instead of evaluating DNA damage in whole lung homogenates or inflammatory cells obtained by BAL. We showed that isolation of epithelial cells, as described in Chapter 7 provides an opportunity to tackle particle-induced *in vivo* genotoxicity in a 'multiple-marker' approach, since the contribution of various factors, including inflammatory cell influx, antioxidant status and cytotoxicity can be evaluated within a single animal. Moreover, when applied in studies evaluating DNA damage at different time points and multiple doses, in combination with a DNA repair assessment, this model could be of great value to provide more insight in kinetics and persistence of particle-induced DNA damage in the rat.

Although data from Chapter 7, together with the *in vitro* observations from Chapters 5 & 6, suggest the involvement of neutrophils in quartz-induced DNA damage in the rat lung, recent studies indicate that also other processes should be considered [18,48]. An alternative process would be a primary *in vivo* genotoxic effect of quartz, as already indicated by our *in vitro* studies (Chapter 4). However, it must be realised that the rat is not completely valid to investigate *in vivo* primary DNA damage, since particle exposure will always be accompanied by a certain level of neutrophil influx. As a consequence, the rat model as applied in Chapter 7 can only be used to indirectly assess the contribution of primary genotoxicity, for instance by comparing epithelial DNA damage induced by primary genotoxic particles with effects of non-genotoxic particles (e.g. TiO₂) or compounds (e.g. endotoxins), administered at doses eliciting an equal neutrophil influx. However, the best and most direct method to evaluate *in vivo* primary genotoxicity in the rat would be to inhibit the influx of neutrophils after particle exposure, what could be achieved by depletion of the rat lung from alveolar macrophages [49].

Implications for risk assessment

The major question that remains to be answered, is whether the mechanisms of particle-induced DNA damage as discussed in this thesis are relevant to humans. Considering primary genotoxicity of particles, it can be assumed that humans are at a certain risk at any exposure.

In other words, for non-inflammatory doses the exposure-response relationship for primary genotoxicity is expected to be more or less linear. Secondary genotoxicity on the other hand, will only occur at particle doses that elicit a significant inflammatory cell influx with associated ROS generation, at levels that overwhelm the pulmonary antioxidant- and DNA repair capacity. As such, a dose-response relationship for particle-related secondary genotoxicity will have a threshold, as illustrated in Chapter 7. However, this concept of secondary genotoxicity is based on rat studies using particles mostly at overload doses. Since genotoxicity and carcinogenicity observed in this model are obviously high dose effects, the extrapolation to humans, generally exposed to much lower particle concentrations and having a less extensive inflammatory response, is a major subject for ongoing debate [9].

Another point of discussion could be the specific role of the neutrophil. Although shown beyond doubt *in vitro*, the genotoxic effect of neutrophils on respiratory tract epithelial cells *in vivo* is only indirectly demonstrated, and largely based on observations in particle-exposed rats. Since the nasal lavage fluid from healthy persons mainly contains neutrophils (~80% of total cells), this led us to suggest that the nose would be an appropriate 'model' to evaluate neutrophil-induced DNA damage in the human respiratory tract. However, to our own surprise we could not find a clear relation between neutrophil numbers present in nasal lavage and 8-OHdG formation in nasal epithelial cells (Chapter 6). Although one could think of various explanations for this discrepancy, the data indicate that only the presence of neutrophils is not necessarily linked to epithelial DNA damage. Therefore, models are needed that allow to study the causal relationship between neutrophils and pulmonary genotoxicity *in vivo*, and to assess the importance of other possible contributing factors, such as the presence of alveolar macrophages, particles, cytokines or growth factors.

Secondary to a discussion on the causal relationship between neutrophils and pulmonary genotoxicity in general, it should be realised that, in contrast to the rat, the inflammatory response in humans chronically exposed to crystalline silica is mainly characterised by an influx of macrophages and lymphocytes, whereas only minimal increases in neutrophils are seen [5]. Together with the fact that we could not find a relation between neutrophils and nasal epithelial DNA damage, these observations raise the question whether neutrophils play a significant role in secondary genotoxicity of chronically particle-exposed humans at all. On the other hand, recent data on humans acutely exposed to PM suggest that neutrophils might play a role in the more acute phase of particle exposure [50]. In conclusion, together with these observations on humans, the data presented in this thesis demonstrate that the relation between particles, neutrophils and respiratory tract genotoxicity is a complicated one, and that a definite mechanism of secondary genotoxic processes during particle exposure still remains to be determined. Therefore, the studies as described in Chapters 5-7 should be considered as a starting point to further elucidate the significance and role of neutrophils in particle-induced genotoxicity *in vivo*.

In the present thesis mechanisms involved in the induction of primary and secondary particle-induced DNA damage were evaluated. However, it should be emphasised that this approach does not provide any insight into more downstream processes of carcinogenesis associated with chronic particle exposure. Especially for purposes of risk assessment, it must be realised that genotoxicity only relates to DNA reactivity, which means that it is essentially not the same as carcinogenicity. Therefore, whereas the data presented in this thesis indicate that particles (PM, quartz) as well as inflammatory phagocytes (neutrophils) induce ROS-mediated DNA damage in target cells relevant for tumourigenic outcomes, the implication of these processes for particle-related lung carcinogenesis requires much further study.

Samenvatting

Chronische inademing van deeltjes zoals fijn stof (Engels: particulate air pollution, ofwel particulate matter, PM) en kristallijn silica (kwarts) kan longkanker veroorzaken in zowel ratten als mensen. Echter, de mechanismen die een rol spelen in de vorming van een longtumor na blootstelling aan stofdeeltjes zijn nog niet opgehelderd. In het algemeen geldt dat genotoxische gebeurtenissen een belangrijke rol spelen in carcinogenese. Door *in vitro* studies is aangetoond dat de genotoxische eigenschappen van deeltjes worden bepaald door diverse kenmerken zoals grootte, vorm, chemische samenstelling, kristalliniteit, oplosbaarheid, en reactiviteit van het deeltjesoppervlak. *In vivo* studies hebben echter laten zien dat tumorvorming in de rattelong niet zozeer afhankelijk is van de intrinsieke genotoxische activiteit van de deeltjes, maar meer een gevolg is van (chronische) inflammatoire processen. Dit betekent dat men ter bestudering van het mechanisme van deeltjes-genotoxiciteit een onderscheid dient te maken tussen primaire (door deeltjes veroorzaakte) en secundaire (door inflammatie veroorzaakte) genotoxische effecten. In beide processen speelt de productie van reactieve zuurstof species (RZS) een belangrijke rol. De doelstelling van dit proefschrift was om DNA schade te bestuderen in long epitheel cellen na blootstelling aan deeltjes. De nadruk lag hierbij vooral op de rol van RZS. In het eerste deel van het proefschrift (hoofdstukken 2-4) zijn mechanismen van primaire genotoxiciteit beschreven, terwijl in de hoofdstukken 5-7 speciale aandacht is gegeven aan secundaire genotoxische processen. Daarin ligt de nadruk op de specifieke rol van neutrofielen, omdat deze cellen mogelijk een belangrijke functie vervullen in secundaire genotoxiciteit in de rat. De studies zijn uitgevoerd met zowel PM als kwarts (DQ12). Van beide stoffen is bekend dat ze een verscheidenheid aan respiratoire aandoeningen kunnen veroorzaken, waaronder longkanker.

Primaire genotoxiciteit

In het eerste deel van het proefschrift (hoofdstukken 2-4) worden mogelijke mechanismen van primaire genotoxiciteit van kwarts en PM beschreven. De nadruk in deze studies lag voornamelijk op de functie van het hydroxyl radicaal ($\cdot\text{OH}$), omdat dit het meest reactieve zuurstof species is. Daarnaast hebben in het verleden reeds verschillende studies indirect bewijs geleverd voor een mogelijke rol van $\cdot\text{OH}$ in de genotoxische effecten van PM en kwarts. Om te onderzoeken of PM en kwarts inderdaad $\cdot\text{OH}$ kunnen produceren is in de hoofdstukken 2-4 gebruik gemaakt van elektron spin resonantie (ESR). Hieruit bleek dat de vorming van $\cdot\text{OH}$ door beide stofdeeltjes in grote mate werd versterkt na toevoeging van waterstofperoxide (H_2O_2). Dit duidt op een mogelijke rol van Fenton reacties, hetgeen impliceert dat transitie metalen betrokken zijn. De vorming van $\cdot\text{OH}$ door PM kon worden geblokkeerd door de toevoeging van deferoxamine. Dit suggereert dat ijzer een belangrijke rol speelt (hoofdstukken 2 en 3). Voor kwarts geldt dat de productie van $\cdot\text{OH}$ voor een groot deel verklaard kan worden door de reactiviteit van het deeltjes-oppervlak. Dit werd inderdaad bevestigd door (niet in dit proefschrift beschreven) experimenten waarin $\cdot\text{OH}$ productie door DQ12-kwarts kon worden gereduceerd na behandeling van het deeltjes-oppervlak met aluminium lactaat of polyvinylpyridine-N-oxide (PVNO).

De gezamenlijke eigenschap van PM en kwarts om $\cdot\text{OH}$ te kunnen produceren duidt mogelijk op een overeenkomstig mechanisme dat betrokken is bij de primaire genotoxiciteit van beide deeltjes, zeker gezien de reactiviteit van het OH-radicaal. Detectie van DNA strengbreuken en 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) werden gebruikt als (semi-) specifieke methoden om DNA schade door $\cdot\text{OH}$ nader te bestuderen. In de hoofdstukken 2 en 3 werd aangetoond dat PM zowel DNA strengbreuken als 8-OHdG kan induceren in naakt DNA (plasmid-assay, dot-blot analyse). Dit effect bleek duidelijk te zijn gerelateerd aan de

mogelijkheid van PM om $\cdot\text{OH}$ te produceren. Vergelijkbare experimenten toonden aan dat dit tevens het geval was voor kwarts.

Ook in cellulaire systemen is de primaire genotoxiciteit van PM en kwarts bestudeerd. Hiervoor is gebruik gemaakt van alveolaire epitheel cellen van zowel rat (RLE) als humane (A549) oorsprong. Alveolaire epitheel cellen worden gezien als een specifiek doelwit voor tumor vorming na langdurige blootstelling aan deeltjes. Zowel kwarts als PM veroorzaakten primaire DNA schade (8-OHdG en DNA strengbreuken) in beide cellijnen. Net als in kaal DNA bleek dat ook in de epitheel cellen een groot deel van de DNA schade, veroorzaakt door beide deeltjes, kon worden toegeschreven aan de vorming van $\cdot\text{OH}$. De ESR experimenten toonden aan dat de aanwezigheid van H_2O_2 een belangrijke factor is voor PM en kwarts om $\cdot\text{OH}$ te kunnen genereren. In hoeverre waterstofperoxide, mogelijk endogeen geproduceerd, een belangrijke rol speelt in de vorming van $\cdot\text{OH}$ in de epitheel cellen zal nog verder moeten worden uitgezocht.

Het is belangrijk om te realiseren dat PM en kwarts twee totaal verschillende soorten stofdeeltjes zijn. Dit impliceert dat er verschillende mechanismen ten grondslag kunnen liggen aan de vorming van $\cdot\text{OH}$ en de hieraan gerelateerde inductie van DNA schade. DQ12-kwarts is grotendeels homogeen en bestaat voor ongeveer 90% uit kristallijn silica (de rest is amorf silica). PM daarentegen, heeft een zeer complexe en heterogene samenstelling. Het belangrijkste verschil is echter dat, in tegenstelling tot kwarts, een groot deel van PM oplosbaar is. In hoofdstuk 3 is aangetoond dat de onoplosbare deeltjes-fractie van PM mogelijk een bijdrage levert aan de cellulaire genotoxiciteit. Echter, de eigenschap van PM om $\cdot\text{OH}$ te produceren en DNA te beschadigen bleek toch grotendeels de verantwoordelijkheid van water-oplosbare componenten. De belangrijkste factor hierin is waarschijnlijk ijzer (hoofdstukken 2 en 3). Voor kwarts is reeds aangetoond dat $\cdot\text{OH}$ productie voornamelijk kan worden toegeschreven aan de reactiviteit van het oppervlak van de onoplosbare deeltjes. Vanwege de extreem hoge reactiviteit van het OH-radicaal zal het alleen met DNA kunnen reageren indien het ook in de directe omgeving hiervan is geproduceerd. Het is echter onwaarschijnlijk dat de waargenomen DNA schade een gevolg is van de productie van $\cdot\text{OH}$ direct aan het kwarts-oppervlak, zeker gezien het feit dat in de celkern geen kwartsdeeltjes konden worden gedetecteerd (niet gepubliceerde observaties).

Concluderend, de studies gepresenteerd in het eerste deel van dit proefschrift tonen aan dat PM en kwarts DNA schade kunnen veroorzaken in long epitheel cellen. Hierin blijkt een belangrijke rol te zijn weggelegd voor het hydroxyl radicaal. Het blijft echter onduidelijk of deze mechanismen van primaire *in vitro* genotoxiciteit ook *in vivo* een rol spelen. Verder moet men zich realiseren dat in werkelijkheid de samenstelling van zowel PM als kwarts variabel is. Dit impliceert dat de capaciteit van beide deeltjes om DNA schade te veroorzaken wordt bepaald door hun uiteindelijke fysieke en chemische eigenschappen. Dit houdt tevens in dat men voorzichtig moet zijn met het generaliseren van de mechanismen die mogelijk leiden tot een genotoxisch effect van PM en kwarts.

Secundaire genotoxiciteit

Op dit moment wordt gedacht dat de productie van RZS door fagocyten een belangrijke rol speelt in de secundaire genotoxische effecten van stofdeeltjes. In de rattelung wordt de inflammatoire response na blootstelling aan deeltjes gekenmerkt door een sterke toename van het aantal neutrofielen. Van alle fagocyten hebben de neutrofielen de grootste capaciteit om RZS te produceren. Dit suggereert dat in de rat de neutrofiel mogelijk een cruciale rol speelt in de genotoxische effecten van deeltjes. In de hoofdstukken 5 en 6 is aangetoond dat geactiveerde neutrofielen inderdaad 8-OHdG en DNA strengbreuken kunnen veroorzaken in RLE cellen. Hierbij is gebruik gemaakt van een *in vitro* co-incubatie model waarin RLE cellen worden blootgesteld aan neutrofielen. De data gepresenteerd in hoofdstuk 6 geven

verder aan dat de productie van H_2O_2 door neutrofielen een belangrijke rol speelt in de vorming van DNA strengbreuken. Ook is aangetoond dat een direct contact tussen de neutrofiel en de target cel een voorwaarde is voor de inductie van DNA schade. Het feit dat 8-OHdG wordt gevormd in de RLE cellen geeft aan dat een deel van de DNA schade veroorzaakt door neutrofielen kan worden verklaard door de intracellulaire productie van $\cdot OH$ (hoofdstuk 5). Hoofdstuk 6 beschrijft tevens een *in vivo* studie waarin de relatie tussen inflammatie en DNA schade in de humane neus werd onderzocht. In een groep van 80 kinderen werd bepaald in hoeverre het aantal neutrofielen in een neuslavage was gerelateerd aan DNA schade in epitheelcellen, verkregen door middel van een neusbrush. Met deze studie hoopten we de vraag te beantwoorden of neutrofielen ook genetische schade kunnen veroorzaken in de luchtwegen van de mens. Echter, er kon geen duidelijke correlatie worden waargenomen tussen de aanwezigheid van neutrofielen en de mate van DNA schade (8-OHdG) in nasale epitheel cellen.

In Hoofdstuk 7 is een *in vivo* studie gepresenteerd waarin wordt aangetoond dat intratracheale instillatie van DQ12-kwarts gepaard gaat met de inductie van DNA strengbreuken in het long epitheel van de rat. In deze studie werden long epitheel cellen geïsoleerd, om zodoende DNA schade te kunnen bestuderen in cellen die een specifiek doelwit zijn voor carcinogeniteit veroorzaakt door stofdeeltjes. De mate van DNA schade (strengbreuken) kon worden gereduceerd wanneer de kwartsdeeltjes vooraf waren behandeld met de oppervlakte modifierende stoffen aluminium lactaat of PVNO. Deze experimenten tonen niet alleen aan dat kwarts *in vivo* DNA schade kan veroorzaken, maar leveren tevens een bewijs dat in dit proces een belangrijke rol is weggelegd voor de reactiviteit van het kwartsdeeltjes-oppervlak. Een andere belangrijke bevinding was dat de reductie van DNA schade door oppervlakte coating gepaard ging met een verminderde influx van inflammatoire fagocyten, en dan vooral neutrofielen.

Concluderend geven de studies in het tweede deel van dit proefschrift aan dat neutrofielen DNA schade kunnen veroorzaken in long epitheel cellen *in vitro*. Ook de *in vivo* studie van hoofdstuk 7 toont aan dat in de rat tenminste een deel van de DNA schade na blootstelling aan kwarts kan worden toegeschreven aan neutrofielen. De data bevestigen tevens de heersende opvatting met betrekking tot de cruciale rol van inflammatoire fagocyten in de (secundaire) genotoxische effecten van deeltjes in de rat. Indien DNA schade kan worden beschouwd als een pre-mutagene gebeurtenis, dan zijn de beschreven data tevens complementair met eerdere *in vivo* studies waarin werd aangetoond dat neutrofielen betrokken zijn bij mutagene effecten van kwarts in de rat (HPRT, p53). In hoeverre neutrofielen betrokken zijn bij genotoxische processen in de humane luchtwegen blijft echter onduidelijk.

Deeltjes-genotoxiciteit in perspectief

In dit proefschrift is een hele serie van verschillende experimenten gebruikt om de genotoxiciteit van deeltjes nader te bestuderen. De gebruikte methoden varieerden van acellulaire *in vitro* incubaties tot *in vivo* studies met ratten en mensen. Hierdoor was het mogelijk om primaire en secundaire genotoxiciteit van stofdeeltjes separaat te onderzoeken. De acellulaire chemische methoden beschreven in de hoofdstukken 2-4 kunnen worden beschouwd als een waardevol hulpmiddel om op een snelle en efficiënte manier deeltjes-genotoxiciteit te screenen. Echter, men moet zich realiseren dat zulke methoden, waar kaal DNA in direct contact wordt gebracht met relatief grote hoeveelheden stof, ver af staan van de werkelijkheid. Daarom kunnen deze experimenten alleen worden beschouwd als een aanvulling op cellulaire testmethoden. Genotoxiciteits-studies met als doel om het carcinogene risico van stofdeeltjes te bestuderen, moeten idealiter worden uitgevoerd met cellen die een relevant doelwit zijn voor de uiteindelijke ontwikkeling van een tumor. Dit geldt zowel voor *in vivo* als *in vitro* studies. De methode zoals beschreven in hoofdstuk 7 scheidt de

mogelijkheid om genotoxiciteit van stofdeeltjes te analyseren op een multifunctionele manier, omdat de bijdrage van diverse factoren, zoals inflammatie, toxiciteit en antioxidant capaciteit kan worden geanalyseerd binnen een enkel dier. Echter, zulke rat modellen zijn niet geschikt om de mechanismen van primaire en secundaire genotoxiciteit separaat te onderzoeken. In de rat gaat blootstelling aan deeltjes namelijk altijd gepaard met een bepaalde mate van inflammatie. Om beide processen individueel te kunnen onderzoeken, moeten meer verfijnde *in vivo* modellen worden ontwikkeld. Ook de specifieke rol van de neutrofiel verdient extra aandacht. De genotoxische activiteit van neutrofielen mag dan wel onomstotelijk zijn aangetoond in *in vitro* studies, de rol van de neutrofiel in genotoxiciteit *in vivo* is vooralsnog voornamelijk gebaseerd op associatieve waarnemingen in de aan stofdeeltjes blootgestelde rat. Daarnaast rest de vraag of de beschreven mechanismen van primaire en (door neutrofielen veroorzaakte) secundaire DNA schade van relevantie zijn voor de mens.

Tot slot: dit proefschrift beschrijft een aantal processen die mogelijk betrokken zijn bij primaire, dan wel secundaire DNA schade veroorzaakt door stofdeeltjes. Vooral met het oog op risicobeoordeling moet worden benadrukt dat genotoxiciteit alleen verwijst naar DNA reactiviteit. Ook al hebben onze studies aangetoond dat deeltjes (PM, kwarts), alsook neutrofielen, DNA schade kunnen veroorzaken in cellen die relevant zijn voor carcinogenese, de implicatie hiervan voor de uiteindelijke ontwikkeling van longtumoren zal nog verder moeten worden onderzocht.