



Työterveyslaitos

# **Yhteisaltistus fullereenille ja orgaanisille teollisuus- kemikaaleille**

**Olli Laine  
Maili Lehto  
Esa Vanhala  
Jarkko Tornaesus  
Harri Alenius  
Topi Karilainen**

**Tomasz Róg  
Oana Cramariuc  
Ilpo Vattulainen  
Helena Taberman  
Janne Jänis**



**Työterveyslaitos**

# Yhteisaltistus fullereenille ja orgaanisille teollisuuskemikaaleille

LOPPURAPORTTI TYÖSUOJELURAHASTON HANKKEESTA 110358

Olli Laine,<sup>1</sup> Maili Lehto,<sup>1</sup> Esa Vanhala,<sup>1</sup> Jarkko Tornaesus,<sup>1</sup> Harri Alenius<sup>1</sup>

Topi Karilainen,<sup>2</sup> Tomasz Róg,<sup>2</sup> Oana Cramariuc,<sup>2</sup> Ilpo Vattulainen<sup>2</sup>

Helena Taberman,<sup>3</sup> Janne Jänis<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Työterveyslaitos

<sup>2</sup>Tampereen teknillinen yliopisto

<sup>3</sup>Itä-Suomen yliopisto

Helsinki 2014

Työterveyslaitos

Systeemitoksikologia

Topeliuksenkatu 41 a A

00250 Helsinki

[www.ttl.fi](http://www.ttl.fi)

Toimitus: Olli Laine

Kansi: Mainostoimisto Albert Hall Finland Oy Ltd

© 2014 Työterveyslaitos ja kirjoittajat

Julkaisu on toteutettu Työsuojelurahaston tuella.

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

ISBN 978-952-261-443-8 (nid.)

ISBN 978-952-261-444-5 (PDF)

Juvenes Print, Tampere 2014

## TIIVISTELMÄ

Toksisuustestit soluilla ja atomistiset molekyyliidynamiikkasimulaatiot osoittavat, että työpaikalla tapahtuva yhteisaltistus  $C_{60}$ -fullereenille voi voimistaa orgaanisten teollisuuskemikaalien aiheuttamia terveysvaikutuksia. Tutkitut kemikaalit olivat asetofenoni, bentsaldehydi, bentsyylialkoholi, *m*-kresoli ja tolueneeni, joita voidaan käyttää fullereenin kanssa reagentteina ja liuottimina teollisuusprosesseissa. Yhteisaltistus voi olla mahdollista, kun työpaikan ilmaan pääsee fullereenipölyä ja höyrystynyttä orgaanista kemikaalia tai aerosolisoi- tunutta fullereeniliuosta. Suodattamattomat ja suodatetut  $C_{60}$ :n ja orgaanisten kemikaalien seokset edustivat tutkimuksessa erilaisia yhteisaltistusskenaarioita solukokeissa, joissa tutkitaan akuuttia solutoksisuutta ja immunotoksisuutta. Toksisuus testattiin  $C_{60}$ :lle ja orgaanisille kemikaaleilla yhdessä ja erikseen käyttäen THP-1 –soluista johdettuja makrofageja. Tilastollisesti merkittäviä yhteisvaikutuksia nähtiin suodattamattomalla bentsaldehydin ja  $C_{60}$ :n seoksella, joka oli solutoksisempaa kuin pelkkä bentsaldehydi sekä suodatetulla *m*-kresolin ja  $C_{60}$ :n seoksella, joka oli hieman vähemmän solutoksista kuin pelkkä *m*-kresoli. Kemikaalien hydrofobisuus korreloi yhteisvaikutusten kanssa, kun tarkasteltiin tulehdus- markkereiden IL-1 $\beta$  ja TNF- $\alpha$  erittymistä. Atomistiset molekyyliidynamiikkasimulaatiot osoittivat, että  $C_{60}$  aggregoitui yhdessä kaikkien kemikaalien kanssa vesipitoisessa ympä- ristössä. Stabiilien aggregaattien ydin oli pääasiassa fullereenia ja niiden pinta oli peittynyt orgaanisilla molekyyyleillä. Käytännössä kaikki  $C_{60}$ -molekyylit aggregoituvat yhteen, mutta osa orgaanisista molekyyleistä jäi vesifaasiin.

## ABSTRACT

*In vitro* toxicological studies together with atomistic molecular dynamics simulations show that occupational co-exposure with C<sub>60</sub> fullerene may strengthen the health effects of organic industrial chemicals. The chemicals studied were acetophenone, benzaldehyde, benzyl alcohol, *m*-cresol, and toluene which can be used with fullerene as reagents or solvents in industrial processes. Potential co-exposure scenarios include a fullerene dust and organic chemical vapor, or a fullerene solution aerosolized in workplace air. Unfiltered and filtered mixtures of C<sub>60</sub> and organic chemicals represented different co-exposure scenarios in *in vitro* studies where acute cytotoxicity and immunotoxicity of C<sub>60</sub> and organic chemicals were tested together and alone by using human THP-1-derived macrophages. Statistically significant co-effects were observed for an unfiltered mixture of benzaldehyde and C<sub>60</sub> that was more cytotoxic than benzaldehyde alone, and for a filtered mixture of *m*-cresol and C<sub>60</sub> that was slightly less cytotoxic than *m*-cresol. Hydrophobicity of chemicals correlated with co-effects when secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was considered. Complementary atomistic molecular dynamics simulations revealed that C<sub>60</sub> co-aggregated with all chemicals in aqueous environment. Stable aggregates had a fullerene-rich core and a chemical-rich surface layer, and while essentially all C<sub>60</sub> molecules aggregated together, a portion of organic molecules remained in water.

# SISÄLTÖ

1	JOHDANTO.....	5
1.1	Taustaa .....	5
1.2	Tavoite.....	6
1.3	Tutkimusasetelma.....	6
2	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	7
2.1	Kemikaalit.....	7
2.2	Fullereenisuspensioiden valmistus.....	7
2.3	Fullereenin ja fullereenisuspensioiden karakterisointi.....	7
2.4	Soluviljely.....	7
2.5	Elektronimikroskopia .....	8
2.6	Toksisuusmääritykset .....	8
2.7	Molekyylimallitus.....	8
2.8	Tilastolliset analyysit.....	8
3	TULOKSET.....	9
3.1	Fullereenin ja fullereenisuspensioiden karakterisointi.....	9
3.2	Fullereenin imeytyminen soluihin .....	10
3.3	Fullereenisuspensioiden akuutti solutoksisuus .....	11
3.4	Fullereenisuspensioiden immunotoksisuus.....	12
3.5	Atomistiset MD-simulaatiot .....	13
3.6	Toksikologisten ja teoreettisten tulosten vertailu .....	15
4	TULOSTEN TARKASTELU.....	18
5	JOHTOPÄÄTÖKSET .....	20
6	KII T OKSET.....	21
	LÄHTEET.....	22

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Taustaa

Fullereenit ovat hiilinanomateriaaleihin kuuluvia hiilen allotrooppeja, joiden olemassaolo todistettiin vuonna 1985.<sup>1</sup> Ne ovat olleet voimakkaan tutkimuksen alaisena löytämisestään lähtien ja joitain fullereenipohjaisia materiaaleja hyödynnetään jo kaupallisissa sovellutuksissa.<sup>2</sup> Nykyisiä sovellusaloja ovat mm. kosmetiikka,<sup>3</sup> elektroniikka<sup>4,5</sup> ja nanolääketiede,<sup>6,7</sup> joissa hyödynnetään fullereenien erityisiä ominaisuuksia kuten korkeaa elektroniaffiniteettia, sähkönjohtavuutta, antioksidanttisuutta ja kykyä sitoa reaktiivisia vapaita radikaaleja.

Fullereenipohjaisille materiaaleille odotetaan laaja-alaista käyttöä lähitulevaisuutta, jonka vuoksi tarvitaan nopeasti tietoa näiden uusien materiaalien turvallisuudesta työntekijöille, ympäristölle ja kuluttajille. Aikaisempien solu- ja eläinkokeiden perusteella puhtaan modifioimattoman fullereenin ei ole havaittu aiheuttavan mitään vakavia haittavaikutuksia.<sup>8-11</sup> Vakavimpien havaittujen vaikutusten syyksi on paljastunut myöhemmin jäämät tetrahydrofuraania (THF), jota on käytetty stabiilien fullereenisuspensioiden valmistuksessa toksikologisia kokeita varten.<sup>12-15</sup>

Useiden esimerkkien perusteella näyttää nykyään, että fullereenin mahdolliset haittavaikutukset johtuvat sen vuorovaikutuksista muiden yhdisteiden kanssa, jotka voivat olla joko luonnossa esiintyviä tai synteettisesti valmistettuja. Fullereeni muodostaa esim. useiden erilaisten yhdisteiden kanssa itsestäänjärjestyviä supramolekyylisiä komplekseja. Yhteisvaikutukset voivat johtaa mm. muutoksiin yhdisteiden kulkeutumisessa, biosaatavuudessa, imeytymisessä, kertymisessä ja toksisuudessa.

Esimerkki fullereenin ja luonnonaineen yhteisvaikutuksesta on C<sub>70</sub>-fullereenin ja gallushapon seos, joka aiheutti solukokeessa solukuoleman jo 15 minuutissa.<sup>16</sup> Ekotoksikologiassa on useita esimerkkejä yhteisvaikutuksista, joista eräässä vesikirpuilla ja levillä tehdyssä tutkimuksessa fenantreeni oli myrkyllisempää C<sub>60</sub>-fullereenin kanssa kuin ilman sitä, mutta pentakloorifenoli oli vähemmän myrkyllistä leville ja enemmän myrkyllistä vesikirpuille C<sub>60</sub>:n kanssa.<sup>17</sup> Samassa tutkimuksessa kaikkien ympäristömyrkyjen biosaatavuus laski C<sub>60</sub>:n kanssa. Tutkimus 17a-etinyyliestradiolilla ja seeprakaloilla osoitti, että vuorovaikutus C<sub>60</sub>:n kanssa vähensi myös 17a-etinyyliestradiolin biosaatavuutta.<sup>18,19</sup>

Lisäksi atrasiini ja polysykliset aromaattiset hiilivedyt (PAH) absorboituvat C<sub>60</sub>:een vesiympäristössä,<sup>20,21</sup> C<sub>60</sub> lisää trikloorietyleenin imeytymistä maaperästä kasveihin<sup>22</sup> ja C<sub>60</sub> edistää polyklooratun bifenyylin (PCB) ja fenantreenin kulkeutumista hiekkaisen maaperän läpi.<sup>23</sup> Seeprakalan maksasoluilla tehdyssä tutkimuksessa C<sub>60</sub> lisäsi arseenin imeytymistä soluihin ja samalla vähensi arseenin aiheuttamia soluvaurioita.<sup>24</sup> Toisaalta kemikaalit voivat vaikuttaa myös C<sub>60</sub>:n käyttäytymiseen, mikä havaittiin C<sub>60</sub>:lla ja teollisuusliuottimilla tehdyssä

tutkimuksessa, jossa C<sub>60</sub> läpäisi ihon paremmin kloroformin kuin toluenin tai sykloheksaanin kanssa.<sup>25</sup>

## 1.2 Tavoite

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää voiko hengitysteitse tapahtuva yhteisaltistus C<sub>60</sub>-fullereenille ja orgaanisille teollisuuskemikaaleille aiheuttaa vaaran työntekijöiden terveydelle.

## 1.3 Tutkimusasetelma

Tutkimukseen valittiin viisi fullereenin kanssa mahdollisesti reagenssina ja liuottimena käytettävää teollisuuskemikaalia, jotka olivat asetofenoni, bentsaldehydi, bentsyylialkoholi, *m*-kresoli ja tolueni. Niiden ja C<sub>60</sub>:n akuutti solutoksisuus ja immunotoksisuus testattiin yhdessä ja erikseen ihmisen THP-1 –soluista johdetuilla makrofageilla, jotka ovat tärkeitä ihmisen immuunipuolustuksen soluja ja laajasti käytettyjä malleja nanotoksikologiassa.<sup>26-28</sup>

Akuutti solutoksisuus määritettiin mittaamalla laktaattidehydrogenaasientsyymin (LDH) vapautumista altistetuista soluista ja immunotoksisuus testattiin vastaavasti mittaamalla tulehdusmarkkerimolekyylien IL-1 $\beta$  ja TNF- $\alpha$  erittymistä. Solut altistettiin suodattamattomille ja suodatetuille C<sub>60</sub>:n ja orgaanisten kemikaalien seoksille, joista ensimmäiset edustavat yhteisaltistumista fullereenipölylle ja kemikaalihöyrylle ja jälkimmäiset altistusta aerosolisoituneelle fullereeniliuokselle.

C<sub>60</sub>:n ja orgaanisten kemikaalien käyttäytymistä vesipitoisessa ympäristössä tutkittiin teoreettisesti molekyylimallituksen avulla, jossa käytettiin simulaatioita atomistisella molekyyliidynamiikalla (MD). Lisäksi määritettiin kokeellisesti C<sub>60</sub>:n puhtaus sekä C<sub>60</sub>:n pitoisuus, C<sub>60</sub>-aggregaattien kokojakauma ja sähköinen varaus C<sub>60</sub>:n ja orgaanisten kemikaalien seoksessa sekä tutkittiin C<sub>60</sub>:n kulkeutumista C<sub>60</sub>:lla altistettujen solujen sisälle.



## 2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 2.1 Kemikaalit

Työssä käytetyn sublimoimalla puhdistetun C<sub>60</sub>-fullereenin (99.95 %) valmistaja oli Materials Technologies Research ja orgaanisten kemikaalien asetofenonin, bentsaldehydin, bentsyylialkoholin, *m*-kresolin ja toluenin (≥ 99 %) valmistaja oli Sigma-Aldrich.

### 2.2 Fullereenisuspensioiden valmistus

Suspensioliuos (cRPMI) valmistettiin RPMI 1640 –soluviljelymediasta, johon oli lisätty GlutaMAX 1:tä, HEPES-puskuria, β-merkaptotetanolia, penisilliiniä ja streptomysiiniä. Fullereenin 1 mg/ml kantasuspensio valmistettiin dispersoimalla fullereeni cRPMI-liuokseen, joka sisälsi 2 % naudan seerumin albumiinia (BSA).

Suspensiot ravisteltiin yön yli kemikaalien kanssa ja ilman niitä ennen altistusta soluille. Esikokeiden perusteella solukokeissa käytetyksi fullereenikonsentraatioksi valittiin 200 µg/ml, asetofenonin, bentsaldehydin, bentsyylialkoholin ja toluenin konsentraatioksi 10 mM ja *m*-kresolin konsentraatioksi 5 mM. Osa suspensioista suodatettiin 0.45 µm suodatimen läpi ennen altistusta soluille.

### 2.3 Fullereenin ja fullereenisuspensioiden karakterisointi

Fullereenimateriaalin puhtaus varmistettiin analysoimalla se erittäin korkean erotuskyvyn Bruker Apex-Qe –massaspektrometrilaitteistolla. Fullereenipitoisuus suodatetussa suspensiossa määritettiin Micromass Quattro II –massaspektrometrilaitteistolla, joka oli liitetty HP 1100 –nestekromatografiin.

Suspensioissa muodostuneiden fullereeniaggregaattien kokojakauma ja sähköisestä pinta-varauksesta kertova ζ-potentiaali määritettiin suodatetuissa suspensioissa Zetasizer Nano ZS –laitteistolla.

### 2.4 Soluviljely

Ihmisen monosyyttisen leukemiasolulinjan THP-1 toimittaja oli American Type Culture Collection. Solulinja ylläpidettiin cRPMI-mediassa, johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia (FBS). THP-1 –solut erilaistettiin makrofagityypiksi soluiksi, jotka pestiin puskuriliuoksella ennen altistusta fullereenisuspensioille.

## 2.5 Elektronimikroskopia

Fullereenihiukkausten kulkeutumista solujen sisälle tutkittiin kuvaamalla fullereenisuspensioille altistettuja soluja JEM-1220 –läpäisyelektronimikroskoopilla (TEM).

## 2.6 Toksisuusmääritykset

Altistuksen jälkeen solut sentrifugoitiin ja toksisuusmääritykset tehtiin supernatanteista. Akuutti solutoksisuus määritettiin mittaamalla vapautuneen LDH-entsyymin määrä, jota verrattiin positiivisen kontrollin antamaan LDH-määrään. Immunotoksisuutta kuvaavien tulehdusmarkkerimolekyylien IL-1 $\beta$  ja TNF- $\alpha$  pitoisuus mitattiin Bio-Plex 200 –laitteistolla.

## 2.7 Molekyylimallitus

Atomistiset MD-simulaatiot tehtiin GROMACS-ohjelmistolla.<sup>29,30</sup> Simulaatiot kestoltaan 100 ns tehtiin yhdeksälle eri systeemille, joissa kaikissa oli 100 C<sub>60</sub>-molekyyliä ja n. 85 000 vesimolekyyliä kuvitteellisessa laatikossa, jonka särmä oli 14 nm. Seitsemässä systeemissä oli lisäksi 500 orgaanisen kemikaalin molekyyliä ja kolmessa systeemissä natriumkloridia fysiologissa konsentraatiossa 120 mM.

## 2.8 Tilastolliset analyysit

Tulokset ilmoitetaan geometrisena keskiarvona ja niiden standardipoikkeamana. Tulosten laskemiseen käytettiin GraphPad Prism 5 –ohjelmistoa. Tilastolliset erot orgaanisten kemikaalien toksisuudessa fullereenin kanssa ja ilman sitä määritettiin Student's t –testillä ja Mann-Whitney U –testillä. Toksikologisten tulosten ja molekyylimallitustulosten vertailussa käytettiin lineaarista regressiota ja Pearsonin korrelaatiota. Kun ero ryhmien välillä oli  $P < 0.05$ , pidettiin sitä tilastollisesti merkitseväenä.

## 3 TULOKSET

### 3.1 Fullereenin ja fullereenisuspensioiden karakterisointi

Massaspektrometrinen analyysi varmisti tutkimamme C<sub>60</sub>-fullereenimateriaalin puhtauden, sillä analyysissä ei näkynyt mitään yleisiä C<sub>60</sub>:n epäpuhtauksia kuten hapettunutta C<sub>60</sub>-fullereenia, C<sub>70</sub>-fullereenia tai muita suurimolekyylisiä fullereeneja. C<sub>60</sub>-pitoisuus suodatetussa fullereenisuspensiossa ilman orgaanisia kemikaaleja määritettiin viidestä rinnakkaisesta näytteestä ja se oli  $5.6 \pm 1.1$  ng/ml, mikä on vain 0.028 ‰ C<sub>60</sub>-konsentraatiosta suodatamattomassa suspensiossa.

C<sub>60</sub>-aggregaattien intensiteetillä painotettu keskimääräinen halkaisija ja sähköisestä pinta-varauksesta kertova ζ-potentiaali suodatetussa fullereenisuspensiossa määritettiin kolmesta rinnakkaisesta näytteestä ja tulokset määrittelyistä on esitetty taulukossa 1. Määrittelyt tehtiin suodatetuista suspensioista, koska kiinteät hiukkaset suodatamattomissa näytteissä häiritsevät määrittelyä.

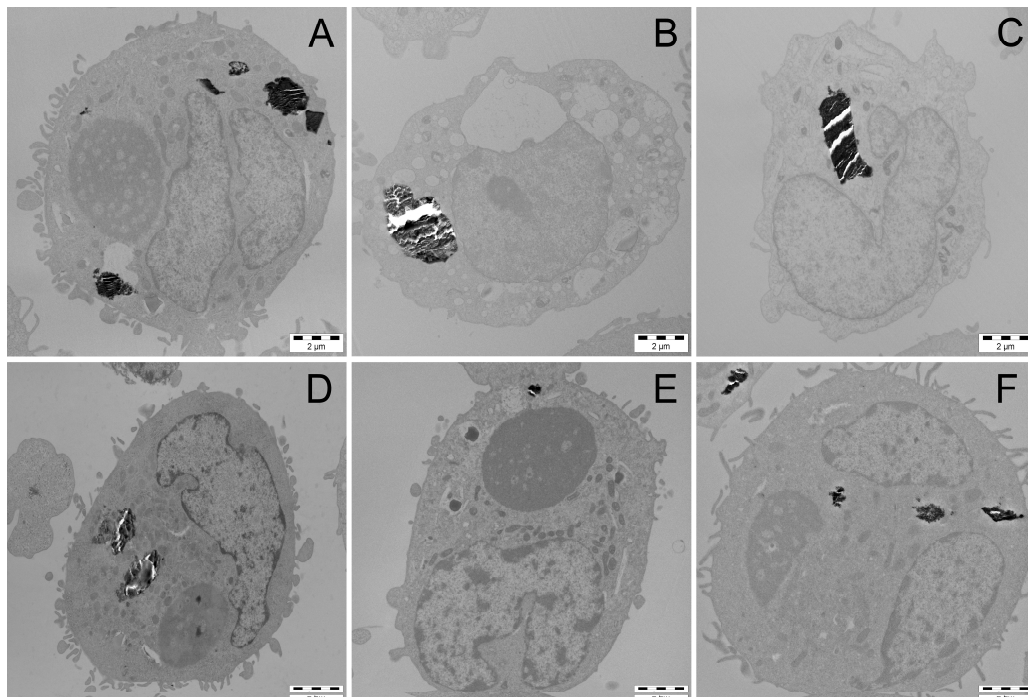
Aggregaattien keskimääräiset halkaisijat puhtaan fullereenin ja fullereenin ja kemikaalien suspensioissa eivät eronneet merkittävästi toisistaan, sillä aggregaattien koot olivat kaikissa näytteissä noin 200 nm. Puhtaan fullereenin muodostamien aggregaattien ζ-potentiaali oli hieman positiivisempi kuin fullereenin ja kemikaalien muodostamien aggregaattien.

*Taulukko 1. C<sub>60</sub>-aggregaattien intensiteetillä painotetut keskimääräiset halkaisijat ja ζ-potentiaalit suodatetuissa suspensioissa.*

Suspensio	Halkaisija (nm)	ζ-potentiaali (mV)
C <sub>60</sub>	201 ± 13	-8.9 ± 0.3
C <sub>60</sub> + asetofenoni	227 ± 15	-11.6 ± 0.9
C <sub>60</sub> + bentsaldehydi	213 ± 2	-13.1 ± 0.9
C <sub>60</sub> + bentsyylialkoholi	224 ± 14	-12.6 ± 1.4
C <sub>60</sub> + <i>m</i> -kresoli	196 ± 23	-12.0 ± 1.0
C <sub>60</sub> + tolueeni	209 ± 5	-12.5 ± 1.2

## 3.2 Fullereenin imeytyminen soluihin

TEM-kuvat fullereenisuspensioilla altistetuista soluista todistivat, että  $C_{60}$  imeytyy solujen sisälle. Kuva 1 esittää puhtaan fullereenin ja fullereenin ja kemikaalien suspensioille altistettuja soluja. TEM-kuvien perusteella  $C_{60}$ -aggregaattien koko kasvaa niiden kerääntyessä solujen sisälle, jolloin niiden halkaisija voi olla jopa 4  $\mu\text{m}$ .



Kuva 1. TEM-kuvat ihmisen THP-1 –soluista johdetuista makrofageista, jotka on altistettu puhtaan  $C_{60}$ :n (A) sekä  $C_{60}$ :n ja asetofenonin (B), bentsaldehydin (C), bentsyylialkoholin (D), *m*-kresolin (E) ja tolueenin (F) suodatetuille suspensioille. Mustat kertymät solujen sisällä ovat  $C_{60}$ -aggregaatteja.

### 3.3 Fullereenisuspensioiden akuutti solutoksisuus

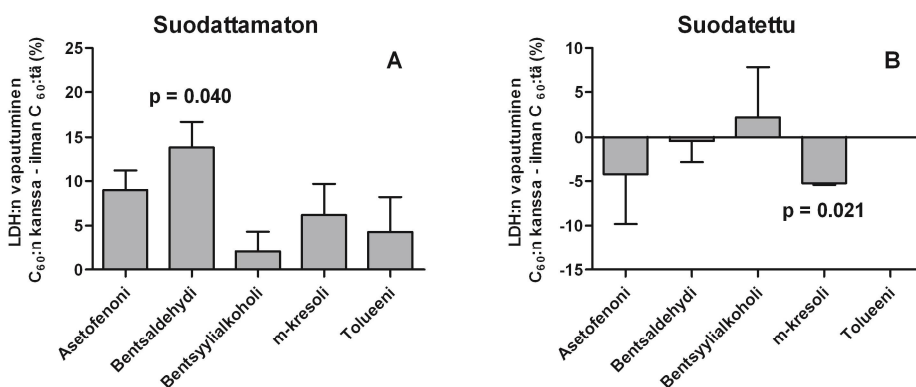
Esikokeet puhtaalla C<sub>60</sub>-fullereenilla ja orgaanisilla kemikaaleilla osoittivat, että kaikki testatut kemikaalit ovat akuutisti paljon solutoksisempia kuin C<sub>60</sub>, minkä vuoksi keskityimme tutkimaan C<sub>60</sub>:n vaikutusta kemikaalien toksisuuteen. Esikokeiden perusteella valitsimme konsentraatiot orgaanisille kemikaaleille kaikissa toksisuuskokeissa, jotka aiheuttivat 30-50 % nousun LDH-pitoisuudessa positiiviseen kontrolliin verrattuna lukuun ottamatta toluenia. Sen sijaan valittu C<sub>60</sub>-pitoisuus aiheutti 1-2 % nousun LDH-pitoisuudessa kontrolliin verrattuna.

Puhtaan toluenin vapauttama suhteellinen LDH-määrä oli vähemmän kuin 1 %, mikä saattoi johtua toluenin haihtumisesta näytteenkäsittelyn ja altistuksen aikana. Tolueneeni on testatuista kemikaaleista haihtuvin korkeimman höyrynpaineensa vuoksi ja sen pitoisuutta ei voitu nostaa kokeissa sen huonon vesiliukoisuuden vuoksi. Tutkittujen orgaanisten kemikaalien fysikaalisia ominaisuuksia on esitetty taulukossa 2.

*Taulukko 2. Orgaanisten yhdisteiden dielektrisyysvakiot, vesiliukoisuudet ja höyrynpaineet.*

Orgaaninen yhdiste	Dielektrisyysvakio <sup>31</sup>	Vesiliukoisuus <sup>32,33</sup> (g/l)	Höyrynpaine <sup>34</sup> (Pa)
Asetofenoni	17.44	5.5 <sup>25 °C</sup>	100 <sup>36 °C</sup>
Bentsaldehydi	17.85	3.0 <sup>20 °C</sup>	100 <sup>19 °C</sup>
Bentsyylialkoholi	11.92	35.0 <sup>20 °C</sup>	10 <sup>28 °C</sup>
<i>m</i> -Kresoli	12.44	23.5 <sup>20 °C</sup>	1 <sup>21 °C</sup>
Tolueneeni	2.379	0.519 <sup>25 °C</sup>	10 000 <sup>45 °C</sup>

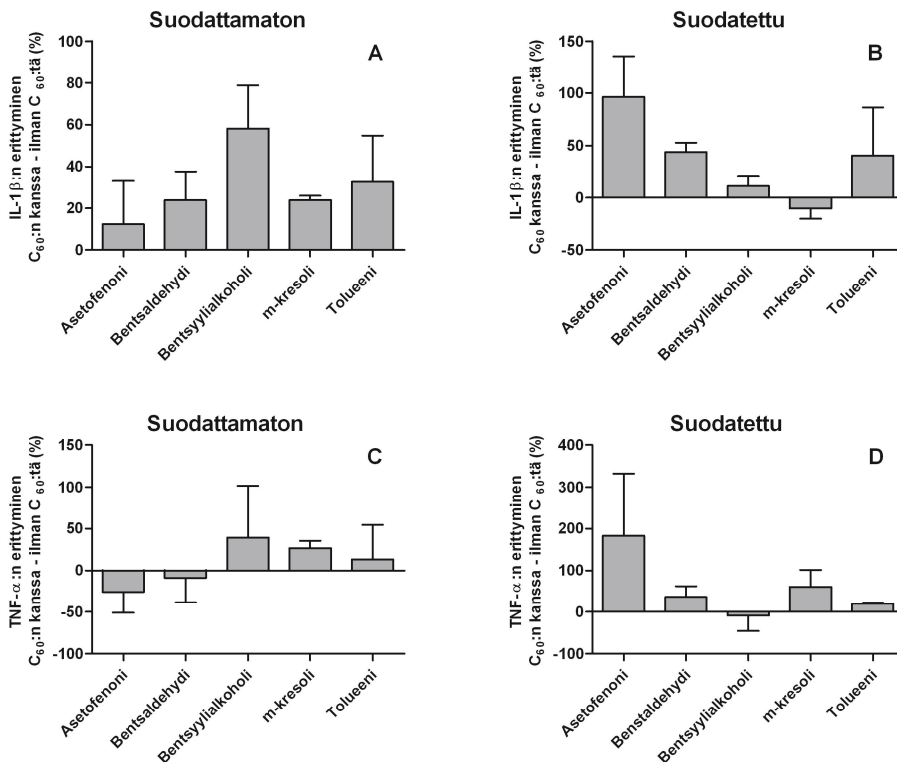
Kuva 2 esittää kuinka C<sub>60</sub> vaikuttaa orgaanisten kemikaalien akuuttiin solutoksisuuteen. C<sub>60</sub> lisäsi hieman kaikkien kemikaalien solutoksisuutta suodattamattomissa suspensioissa, mutta yhteisvaikutus oli tilastollisesti merkittävä ainoastaan bentsaldehydin kanssa. Bentsaldehydin solutoksisuus nousi 14 %, mikä on reilusti enemmän kuin puhtaan C<sub>60</sub>:n solutoksisuus. Positiivinen yhteisvaikutus bentsaldehydin solutoksisuudessa hävisi kokonaan suodatetussa suspensiossa. Tilastollisesti merkittävä negatiivinen yhteisvaikutus suuruudeltaan vain 5 % havaittiin *m*-kresolin suodatetussa suspensiossa, mikä tarkoitti, että C<sub>60</sub> vähensi *m*-kresolin solutoksisuutta.



Kuva 2. Erot orgaanisten kemikaalien solutoksisuudessa C<sub>60</sub>:n kanssa ja ilman sitä mitattuna LDH:n määrällä verrattuna positiiviseen kontrolliin. C<sub>60</sub> sekoitettiin yön yli orgaanisten kemikaalien kanssa ja ilman niitä cRPMI-mediassa, joka sisälsi 2 % BSA:ta, ennen 24 h altistusta soluille. Kolme suodattamatonta (A) ja kaksi suodatettua (B) näytettä tutkittiin.

### 3.4 Fullereenisuspensioiden immunotoksisuus

C<sub>60</sub> ei aiheuttanut tilastollisesti merkittäviä yhteisvaikutuksia orgaanisten kemikaalien immunotoksisuudessa. Yhteisvaikutukset IL-1 $\beta$ :n ja TNF- $\alpha$ :n erittymisessä on esitetty kuvassa 3. Korkeimmat havaitut positiiviset yhteisvaikutukset näkyivät samoilla kemikaaleilla molemmilla tulehdusmarkkereilla. Korkein C<sub>60</sub>:n aiheuttama nousu IL-1 $\beta$ :n ja TNF- $\alpha$ :n erittymisessä havaittiin suodattamattomilla suspensioilla bentsyylialkoholin kanssa. Suuri positiivinen yhteisvaikutus bentsyylialkoholin kanssa hävisi suodatetuissa suspensioissa. Korkein positiivinen yhteisvaikutus suodatetuissa suspensioissa näkyi asetofenonin kanssa.



Kuva 3. Suhteelliset erot orgaanisten kemikaalien immunotoksisuudessa C<sub>60</sub>:n kanssa ja ilman sitä määritettynä erittyneiden tulehdusmarkerimolekyylien IL-1β (a, b) ja TNF-α (C, D) pitoisuudella. C<sub>60</sub> sekoitettiin yön yli orgaanisten kemikaalien kanssa ja ilman niitä cRPMI-mediassa, joka sisälsi 2 % BSA:ta, ennen 24 h altistusta soluille. Kaksi suodattamatonta (A, C) ja kaksi suodatettua (B, D) näytettä tutkittiin.

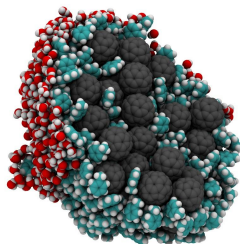
### 3.5 Atomistiset MD-simulaatiot

Simulaatiot osoittivat, että fullereenin ja orgaanisten kemikaalien molekyylit aggregoituvat nopeasti vesifaasissa. Simulaatioiden lopussa kaikki fullereenit olivat aggregoituneet yhteen molekyylikompleksiin, joka sisälsi vaihtelevan määrän orgaanisia kemikaaleja yhdisteistä riippuen. Tolueneenin tapauksessa 98 mooli-% molekyyleistä oli osa kompleksia, mutta hydrofiilisten kemikaalien tapauksessa jopa 25 mooli-% molekyyleistä pysyi vesifaasissa (taulukko 3). Natrium- ja kloridi-ionit pysyivät vesifaasissa eivätkä vaikuttaneet C<sub>60</sub>:n ja orgaanisten kemikaalien aggregoitumiseen.

Taulukko 3. Orgaanisten molekyylien jakautuminen  $C_{60}$ :n ja orgaanisten kemikaalien simuloituissa seoksissa.

Simuloitu seos	Liutotin	Orgaaniset molekyyliet liuottimessa (%)	Orgaaniset molekyyliet kompleksin pinnalla (%)	Orgaaniset molekyyliet kompleksin sisällä (%)
$C_{60}$ + asetofenoni	Vesi	2.4	38.4	59.2
$C_{60}$ + bentsaldehydi	Vesi	4.8	39.9	55.3
$C_{60}$ + bentsyylialkoholi	Vesi	24.6	46.2	29.2
$C_{60}$ + bentsyylialkoholi	Suolaliuos	22.4	51.4	26.2
$C_{60}$ + <i>m</i> -kresoli	Vesi	14.4	50.6	35.0
$C_{60}$ + tolueeni	Vesi	3.0	41.4	55.6
$C_{60}$ + tolueeni	Suolaliuos	2.6	42.4	55.0

Esimerkki  $C_{60}$ :n ja orgaanisen kemikaalin kompleksista on kuvassa 4, joka esittää  $C_{60}$ :n ja tolueenin muodostaman aggregaatin läpileikkausta. Esimerkin mukaisesti kompleksien sisäosa sisältää suurimmaksi osaksi  $C_{60}$ -molekyylejä ja kompleksien pintaa peittävät pääasiassa orgaaniset molekyyliet. Bentsyylialkoholia ja *m*-kresolia sisältävissä systeemeissä on lisäksi yksittäisiä vesimolekyylejä kompleksien pinnalla.

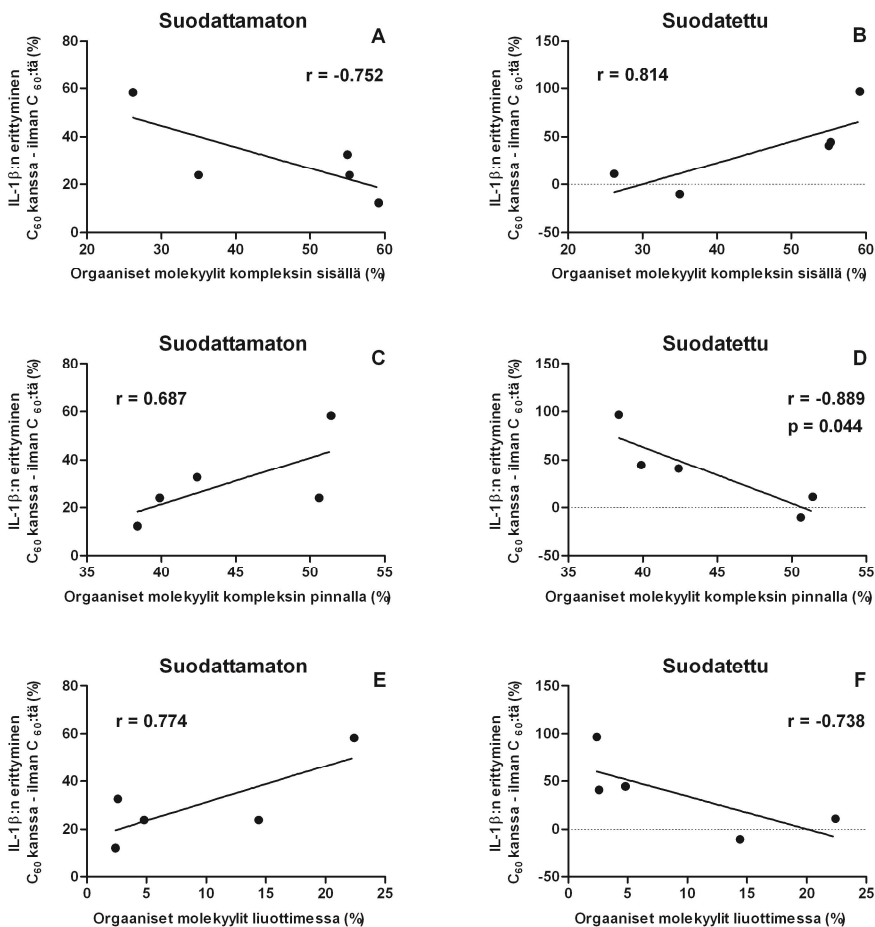


Kuva 4. Läpileikkaus  $C_{60}$ :n ja tolueenin kompleksista vedessä, joka koostuu fullereeni- (harmaa), tolueeni- (sinivihreä/valkoinen/punainen) ja vesimolekyyleistä (punainen/valkoinen).

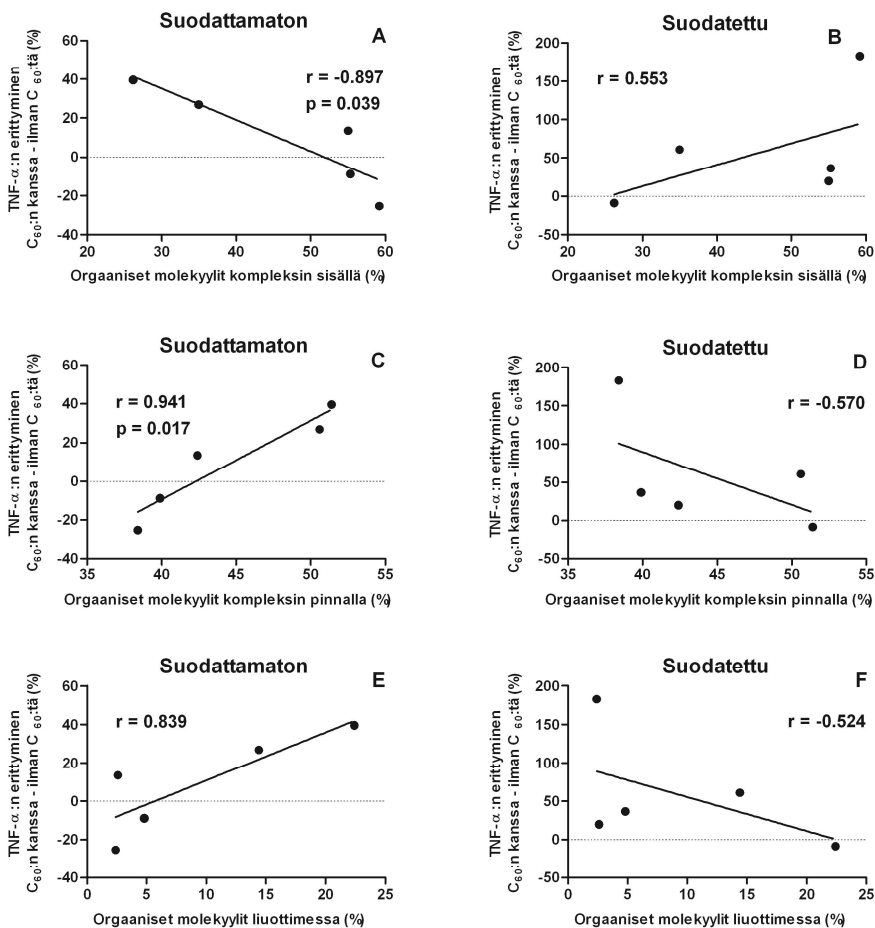


### 3.6 Toksikologisten ja teoreettisten tulosten vertailu

Tuloksia toksikologisista tutkimuksista ja atomistisista MD-simulaatioista vertailtiin niiden välisten korrelaatioiden selvittämiseksi. Kuvassa 5 vertaillaan IL-1 $\beta$ :n erittymistä ja orgaanisten kemikaalien jakautumista simuloidussa seoksessa ja kuvassa 6 vastaava vertailu tehdään TNF- $\alpha$ :n kanssa.



Kuva 5. Korrelaatiot  $C_{60}$ :n aiheuttamien muutosten tulehdusmarkkeri IL-1 $\beta$ :n erittymisessä ja orgaanisten kemikaalien jakautumisen simuloiduissa seoksissa välillä. Korrelaatiot määritettiin suodattamattomille (A, C, E) ja suodatetuille (B, D, F) näytteille, joissa tarkasteltiin orgaanisten molekyylien jakautumista kompleksien sisälle (A, B), kompleksien pinnalle (C, D) ja liuottimeen (E, F).



Kuva 6. Korrelaatiot  $C_{60}$ :n aiheuttamien muutosten tulehdusmarkkeri TNF- $\alpha$ :n erittymisessä ja orgaanisten kemikaalien jakautumisen simuloituissa seoksissa välillä. Korrelaatiot määritettiin suodattamattomille (A, C, E) ja suodatetuille (B, D, F) näytteille, joissa tarkasteltiin orgaanisten molekyylien jakautumista kompleksien sisälle (A, B), kompleksien pinnalle (C, D) ja liuottimeen (E, F).

Fullereenin aiheuttamilla muutoksilla IL-1 $\beta$ :n erittymisessä oli tilastollisesti merkittävä negatiivinen korrelaatio kompleksin pinnalla olevan kemikaalin osuuden kanssa, kun tutkittiin suodatettuja suspensioita. Suurin nousu IL-1 $\beta$ :n erittymisessä havaittiin asetofenonin kanssa, jolloin orgaanisten kemikaalin osuus kompleksin pinnalla oli pienin. Toisaalta IL-1 $\beta$ :n erityys pysyi lähes muuttumattomana bentsyylialkoholin ja *m*-kresolin kanssa, jolloin orgaanisen kemikaalin osuus kompleksin pinnalla oli suurin.

Muut korrelaatiot IL-1 $\beta$ :n kanssa eivät olleet tilastollisesti merkittäviä, mutta muutama trendejä IL-1 $\beta$ :n erittymisessä ja orgaanisten kemikaalien jakautumisessa oli havaittavissa: IL-1 $\beta$ :n erittyminen muuttui orgaanisten kemikaalien jakautumisen funktiona päinvastaiseen suuntaan suodattamattomilla ja suodatetuilla näytteillä. Orgaanisten kemikaalien määrä kompleksien pinnalla ja liuotuksessa vaikuttaa IL-1 $\beta$ :n erittymiseen päinvastoin kuin orgaaniset kemikaalit kompleksin sisällä.

Fullereenin aiheuttamilla muutoksilla TNF- $\alpha$ :n erittymisessä oli tilastollisesti merkittävä korrelaatio kompleksin sisällä ja pinnalla olevien kemikaalien osuuden kanssa, kun tutkittiin suodattamattomia suspensioita. Suurin nousu TNF- $\alpha$ :n erittymisessä havaittiin bentsyylialkoholin kanssa, jolloin orgaanisten kemikaalien osuus kompleksin pinnalla oli pienin. Samassa tilanteessa suurin lasku TNF- $\alpha$ :n erittymisessä havaittiin asetofenonin kanssa, jolloin orgaanisten kemikaalien osuus kompleksin sisällä oli suurin.

Tarkasteltaessa orgaanisten molekyylien määrää kompleksin pinnalla suurin nousu TNF- $\alpha$ :n erittymisessä havaittiin bentsyylialkoholin ja *m*-kresolin kanssa, jotka olivat runsaimpia kemikaaleja kompleksin pinnalla. Sen sijaan asetofenonia oli vähiten kompleksin pinnalla ja sen kanssa TNF- $\alpha$ :n erittyminen pienentyi eniten. TNF- $\alpha$ :n erittyminen muuttui samalla tavalla IL-1 $\beta$ :n erityksen kanssa orgaanisten kemikaalien jakautumisen suhteen, mutta korrelaativakiot olivat pienempiä TNF- $\alpha$ :n kuin IL-1 $\beta$ :n kanssa.

## 4 TULOSTEN TARKASTELU

Atomististen MD-simulaatioiden tulokset sopivat hyvin yhteen aikaisempien teoreettisten ja kokeellisten tutkimusten kanssa, joissa on havaittu erittäin hydrofobisen  $C_{60}$ :n ja  $C_{70}$ :n aggregoituvan helposti vedessä ja myös aggregoituvan yhdessä orgaanisten molekyylien kanssa.<sup>16,35-39</sup> Fullereeniaggregaatit veteen tehdyissä fullereenisuspensioissa, jotka on tehty liuotinta vaihtamalla, voivat sisältää liuotinjäämiä, vaikka liuottimet on poistettu suspensiosta haihuttamalla.<sup>36,37,40</sup> Tämän ja aikaisempien tutkimusten perusteella  $C_{60}$ -fullereeni aggregoituu hyvin todennäköisesti kehossa heti altistuksen jälkeen, kun se pääsee kosketuksiin fysiologisten nesteiden kanssa.

Orgaanisten molekyylien jakaantuminen simuloituissa komplekseissa voidaan selittää pääasiassa kemikaalien vesiliukoisuuden perusteella. Vesiliukoisin kemikaali oli bentsyylialkoholi, joka oli myös runsain yhdiste liuottimessa ja vähiten runsas yhdiste kompleksin sisällä. Samalla tavalla toiseksi vesiliukoisin yhdiste *m*-kresoli oli toiseksi runsain yhdiste liuottimessa ja toiseksi vähiten runsas yhdiste kompleksin sisällä. Sen sijaan vähiten vesiliukoisin yhdiste tolueni ei ollut runsain yhdiste kompleksin sisällä, joka olikin asetofenoni. Orgaanisten yhdisteiden poolisuus, joka määritellään dielektrisyysvakion avulla, ei korreloinut molekyylien jakautumisen kanssa, koska eniten ja vähiten pooliset yhdisteet käyttäytyivät simulaatioissa samalla tavalla.

Aggregaattien koot olivat samaa luokkaa kuin aggregaattien koot aikaisemmissa tutkimuksissa, joissa  $C_{60}$  oli dispersoitu liuokseen, joka sisälsi naudan sikion seerumia (FBS).<sup>41,42</sup>  $C_{60}$ :n ja orgaanisten kemikaalien aggregaattien  $\zeta$ -potentiaalit olivat myös saman suuruisia kuin FBS:ään dispesoidulla  $C_{60}$ :lla.<sup>42</sup> Orgaanisten kemikaalien vesiliukoisuudet ja dielektrisyysvakiot eivät korreloineet  $C_{60}$ -aggregaattien keskimääräisten halkaisijoiden ja  $\zeta$ -potentiaalien kanssa, koska ne olivat lähes samoja eri kemikaalien kanssa. Tämä havainto voidaan selittää proteiinikoronalla, joka muodostuu hyvin todennäköisesti  $C_{60}$ -aggregaattien pinnalle BSA:ta sisältävässä liuoksessa.<sup>42,43</sup>

Solukokeissa emme nähneet yhtä suuria  $C_{60}$ :n ja kemikaalien yhteisvaikutuksia toksisuuteen kuin aikaisemmissa ekotoksikologisissa tutkimuksissa.<sup>17</sup> Yhdessä aikaisemmassa tutkimuksessa fenantreeni oli 10 kertaa toksisempi vesikirpuille  $C_{60}$ :n kanssa kuin ilman sitä ja pentakloorifenolin toksisuus leville väheni puoleen  $C_{60}$ :n kanssa. Yksi selitys eroihin yhteisvaikutusten suuruudessa saattaa olla erot  $C_{60}$ :n ja kemikaalien vuorovaikutusajoissa ennen altistuksia, sillä meidän kokeissamme ne olivat huomattavasti lyhyemmät kuin aikaisemmissa töissä. Levillä ja vesikirpuilla tehdyssä tutkimuksessa  $C_{60}$ :a sekoitettiin ensin yksinään vedessä kaksi kuukautta ja sen jälkeen orgaanisten kemikaalien kanssa viisi päivää. Toisessa seeprakaloilla tehdyssä tutkimuksessa  $C_{60}$ :a sekoitettiin ensin yksinään vedessä viisi kuukautta ja sen jälkeen 17 $\alpha$ -etinyylestradiolin kanssa jopa 28 päivää.<sup>19</sup>

C<sub>60</sub>:n pitkät sekoitusajat vedessä simuloivat hyvin tilanteita, joissa C<sub>60</sub>-fullereenia joutuu ympäristöön. C<sub>60</sub>:n ja kemikaalien pitkät sekoitusajat yhdessä edistävät myös orgaanisten molekyylien sitoutumista fullereenihiukkasiin ja niiden aggregoitumista yhdessä. Halusimme pitää C<sub>60</sub>:n ja kemikaalien sekoitusajan mahdollisimman lyhyenä omassa tutkimussessamme, koska se simuloi parhaiten tilannetta kehossa mahdollisen työpaikka-altistuksen jälkeen. Samasta syystä tutkimme myös suodattamattomia C<sub>60</sub>-suspensioita, koska ne simuloivat tilannetta, jossa fullereenipölyä joutuu hengityselimiin.

Lievien positiivisten yhteisvaikutusten häviäminen akuutissa solutoksisuudessa C<sub>60</sub>-suspensioiden suodatuksen jälkeen voidaan selittää orgaanisten molekyylien sitoutumisella fullereenikomplekseihin, jotka poistettiin suodattamalla. Paras esimerkki on bentsaldehydi, joka on toiseksi hydrofobisin tutkituista yhdisteistä ja toiseksi runsain yhdiste simuloitun kompleksin sisällä. C<sub>60</sub> saattaa toimia orgaanisten molekyylien kuljettajana solujen sisällä kuten uusissa fullereenipohjaisissa lääkkeenkuljetussysteemeissä,<sup>44</sup> mikä voi selittää havaitun solutoksisuuden nousun.

Tarkasteltaessa yhteisvaikutuksia immunotoksisuuteen muuttuvat tulokset täysin. Korkein havaittu positiivinen yhteisvaikutus suodattamattomien suspensioiden immunotoksisuudessa havaittiin bentsyylialkoholin kanssa ja vastaavasti korkein havaittu positiivinen yhteisvaikutus suodatettujen suspensioiden immunotoksisuudessa nähtiin asetofenonin kanssa. On mahdollista, että suuret suspensioitumattomat C<sub>60</sub>-hiukkaset yhdessä vesiliukoisten kemikaalien kanssa aiheuttavat suurimmat havaitut suodattamattomien suspensioiden yhteisvaikutukset immunotoksisuudessa.

C<sub>60</sub>:n tulehdusmarkkerien erittymisessä aiheuttamien muutosten ja orgaanisten molekyylien jakaantumisen simuloituissa seoksissa korrelaatioanalyysi osoitti, että orgaanisten molekyylien määrät kompleksien pinnalla ja liuotimessa vaikuttivat samalla tavalla yhteisvaikutuksiin. Syynä on todennäköisesti se, että hyvin vesiliukoiset kemikaalit ovat runsaita myös kompleksien pinnalla. Kompleksin pinta on dynaaminen ympäristö, jossa molekyylit vaihtavat nopeasti paikkaa liuotimessa olevien molekyylien kanssa.

## 5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksemme mukaan altistuminen orgaanisille teollisuuskemikaaleille yhdessä C<sub>60</sub>-fullereenin kanssa voi vahvistaa kemikaalien aiheuttamia terveysvaikutuksia. Havaitsemamme yhteisvaikutukset olivat pieniä luultavasti johtuen kemikaalien ja C<sub>60</sub>:n lyhyestä vuorovaikutusajasta ennen altistuskokeita. Atomistiset simulaatiot tukivat lisäksi kokeellisia tuloksia. Niiden mukaan orgaaniset molekyylit aggregoituvat helposti yhdessä C<sub>60</sub>-molekyylin kanssa vesipitoisessa ympäristössä ja C<sub>60</sub>-kompleksit sisältävät enemmän hydrofobisia kun hydrofiilisiä orgaanisia molekyyleja. Orgaanisten molekyylin ja C<sub>60</sub>-molekyylin aggregoituminen yhdessä voi selittää hydrofobisten molekyylin kasvaneen solutoksisuuden suodattamattomissa suspensioissa, mutta ei hydrofiilisten molekyylin lisääntynyttä immunotoksisuutta suodattamattomissa suspensioissa. Tulosten perusteella erilaiset yhteisaltistumisskenaariot on otettava huomioon nanomateriaaleja käsittelevillä työpaikoilla ja mahdollisesti huolehdittava työntekijöiden suojaamisesta yksittäisten kemikaalien ja materiaalien lisäksi myös yhteisaltistukselta.

## 6 KIITOKSET

Tutkimustyön rahoitukseen ovat osallistuneet Työsuojelurahasto (projekti 110358), Suomalainen Tiedeakatemia (Väisälän rahasto), Suomen Akatemia ja Euroopan Tutkimusneuvosto (Advanced Grant CROWDED-PRO-LIPIDS). Kiitämme CSC–Tieteen Tietotekniikan Keskusta (Espoo) laskentaresursseista.

## LÄHTEET

1. H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature* 1985, 318, 162.
2. *Production and Applications of Carbon Nanotubes, Carbon Nanofibers, Fullerenes, Graphene and Nanodiamonds: A Global Technology Survey and Market Analysis*, ET-113, Innovative Research and Products, Stamford, CT, USA 2011.
3. M. Lens, *Recent Pat. Biotechnol.* 2011, 5, 67.
4. B. C. Thompson, J. M. J. Fréchet, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 58.
5. D. M. Guldi, B. M. Illescas, C. M. Atienza, M. Wielopolski, N. Martín, *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38, 1587.
6. P. Chawla, V. Chawla, R. Maheshwari, S. A. Saraf, S. K. Saraf, *Mini Rev. Med. Chem.* 2010, 10, 662.
7. P. Anilkumar, F. Lu, L. Cao, P. G. Luo, J. H. Liu, S. Sahu, K. N. Tackett, Y. Wang, Y. P. Sun, *Curr. Med. Chem.* 2011, 18, 2045.
8. H. J. Johnston, G. R. Hutchison, F. M. Christensen, K. Aschberger, V. Stone, *Toxicol. Sci.* 2010, 114, 162.
9. K. Aschberger, H. J. Johnston, V. Stone, R. J. Aitken, C. L. Tran, S. M. Hankin, S. A. Peters, F. M. Christensen, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2010, 58, 455.
10. T. M. Scown, R. van Aerle, C. R. Tyler, *Crit. Rev. Toxicol.* 2010, 40, 653.
11. T. B. Henry, E. J. Petersen, R. N. Compton, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011, 22, 533.
12. E. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.* 2004, 112, 1058.
13. C. M. Sayes, A. M. Gobin, K. D. Ausman, J. Mendez, J. L. West, V. L. Colvin, *Bio-materials* 2005, 26, 7587.
14. P. Spohn, C. Hirsch, F. Hasler, A. Bruinink, H. F. Krug, P. Wick, *Environ. Pollut.* 2009, 157, 1134.
15. X. R. Xia, N. A. Monteiro-Riviere, J. E. Riviere, *Toxicol. Lett.* 2010, 16, 128.
16. E. Salonen, S. Lin, M. L. Reid, M. Allegood, X. Wang, A. M. Rao, I. Vattulainen, P. C. Ke, *Small* 2008, 4, 1986.
17. A. Baun, S. N. Sørensen, R. F. Rasmussen, N. B. Hartmann, C. B. Koch, *Aquat. Toxicol.* 2008, 86, 379.



18. J.-W. Park, T. B. Henry, F.-M. Menn, R. N. Compton, G. Sayler, *Chemosphere* 2010, *81*, 1227.
19. J.-W. Park, T. B. Henry, S. Ard, F. M. Menn, R. N. Compton, G. S. Sayler, *Nanotoxicology* 2011, *5*, 406.
20. X. Hu, J. Liu, P. Mayer, G. Jiang, *Environ. Toxicol. Chem.* 2008, *27*, 1868.
21. K. Gai, B. Shi, X. Yan, D. Wang, *Environ. Sci. Technol.* 2011, *45*, 5959.
22. X. Ma, C. Wang, *Environ. Eng. Sci.* 2010, *27*, 989.
23. L. Zhang, L. Wang, P. Zhang, A. T. Kan, W. Chen, M. B. Tomson, *Environ. Sci. Technol.* 2011, *45*, 1341.
24. C. L. Azevedo Costa, I. S. Chaves, J. Ventura-Lima, J. L. Ribas Ferreira, L. Ferraz, L. Machado de Carvalho, J. M. Monserrat, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2012, *155*, 206.
25. X. R. Xia, N. A. Monteiro-Riviere, J. E. Riviere, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010, *242*, 29.
26. S. Lanone, F. Rogerieux, J. Geys, A. Dupont, E. Maillot-Marechal, J. Boczkowski, G. Lacroix, P. Hoet, *Part. Fibre Toxicol.* 2009, *6*, 14.
27. O. Lunov, T. Syrovets, C. Loos, J. Beil, M. Delacher, K. Tron, G. U. Nienhaus, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester, T. Simmet, *ACS Nano* 2011, *5*, 1657.
28. H. Haniu, N. Saito, Y. Matsuda, Y. A. Kim, K. C. Park, T. Tsukahara, Y. Usui, K. Aoki, M. Shimizu, N. Ogihara, K. Hara, S. Takanashi, M. Okamoto, N. Ishigaki, K. Nakamura, H. Kato, *Int. J. Nanomedicine* 2011, *6*, 3487.
29. B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.* 2008, *4*, 435.
30. D. Lingwood, B. Binnington, T. Róg, I. Vattulainen, W. Chai, T. Feizi, M. Grzybek, Ü. Coskun, C. Lingwood, K. Simons, *Nature Chem. Biol.* 2011, *7*, 260.
31. D. R. Lide, in *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition (Internet Version 2009)*, (Ed: D. R. Lide), CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA 2009, pp. 6–169.
32. D. R. Lide, in *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition (Internet Version 2009)*, (Ed: D. R. Lide), CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA 2009, pp. 8–115.
33. K. Verschueren, *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 4th Edition*, Vol. 1, John Wiley & Sons, 2001, pp. 314–594.

34. D. R. Lide, in *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition (Internet Version 2009)*, (Ed: D. R. Lide), CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA 2009, pp. 6–83.
35. D. Heymann, *Lunar Planet. Sci.* 1996, 27, 543.
36. S. Deguchi, R.G. Alargova, K. Tsujii, *Langmuir* 2001, 17, 6013.
37. J. A. Brant, J. Labille, J.-Y. Bottero, M. R. Wiesner, *Langmuir* 2006, 22, 3878.
38. R. G. Alargova, S. Deguchi, K. Tsujii, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 10460.
39. N. Y. Borovkov, S. V. Blokhina, A. M. Kutepov, N. S. Lebedeva, N. A. Pavlycheva, *Thermochim. Acta* 2005, 430, 167.
40. B. Todorovic-Markovic, S. Jovanovic, V. Jokanovic, Z. Nedic, M. Dramicanin, Z. Markovic, *Appl. Surf. Sci.* 2008, 255, 3283.
41. H. Kato, N. Shinohara, A. Nakamura, M. Horie, K. Fujita, K. Takahashi, H. Iwahashi, S. Endoh, S. Kinugasa, *Mol. Biosyst.* 2010, 6, 1238.
42. M. Horie, K. Nishio, H. Kato, N. Shinohara, A. Nakamura, K. Fujita, S. Kinugasa, S. Endoh, K. Yamamoto, O. Yamamoto, E. Niki, Y. Yoshida, H. Iwahashi, *J. Biochem.* 2010, 148, 289.
43. C. Ge, J. Du, L. Zhao, L. Wang, Y. Liu, D. Li, Y. Yang, R. Zhou, Y. Zhao, Z. Chai, C. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011, 108, 16968.
44. A. Montellano, T. Da Ros, A. Bianco, M. Prato, *Nanoscale* 2011, 3, 4035.

Fullereenit kuuluvat teollisiin hiilinanomateriaaleihin, joilla on useita erilaisia sovelluksia materiaalin ainutlaatuisista ominaisuuksista johtuen. Aikaisempien tutkimusten perusteella fullereenit ovat melko vaarattomia, mutta niillä saattaa olla terveydelle haitallisia yhteisvaikutuksia joidenkin kemikaalien kanssa. Tämän vuoksi tässä Työsuojelurahaston rahoittamassa hankkeessa tutkittiin fullereenin ja viiden orgaanisen teollisuuskemikaalin yhteisvaikutuksia.

Yhteisaltistuksen haitallisuutta testattiin solukokeilla, joissa tutkittiin fullereenin ja kemikaalien yhdessä ja erikseen aiheuttamaa solumyrkyllisyyttä ja tulehdusreaktioita. Lisäksi fullereenin ja kemikaalien käyttäytymistä yhdessä arvioitiin molekyyylimallituksen avulla, minkä jälkeen solukokeiden ja mallituksen antamia tuloksia verrattiin keskenään.

Tulosten perusteella työpaikalla tapahtuva yhteisaltistus fullereenille voi voimistaa orgaanisten teollisuuskemikaalien aiheuttamia haittavaikutuksia. Tässä hankkeessa havaitut yhteisvaikutukset olivat vähäisiä, mutta erilaiset altistuslähteet kannattaa huomioida suojattaessa työntekijöitä nanomateriaalialtistukselta.

## TYÖTERVEYSLAITOS

Työterveyslaitos, Systemitoksikologia  
Topeliuksenkatu 41 a A, 00250 Helsinki

[www.ttl.fi](http://www.ttl.fi)

ISBN 978-952-261-443-8 (nid.)  
ISBN 978-952-261-444-5 (pdf)



Työsuojelurahasto  
Arbetsarskyddsfonden  
The Finnish Work Environment Fund



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO



ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO