

Nanomateriaalien syöpävaarallisuuden tunnistaminen

LOPPURAPORTTI TYÖSUOJELURAHASTON HANKKEESTA N:O 117369



Kirsi Siivola
Kukka Aimonen
Hanna Saarelainen
Gerard Vales
Katriina Huuromonen
Mira Hartikainen
Sauli Savukoski
Satu Suhonen
Julia Catalán
Henrik Wolff
Hannu Norppa

Nanomateriaalien syöpävaarallisuuden tunnistaminen

LOPPURAPORTTI TYÖSUOJELURAHASTON HANKKEESTA
N:O 117369

Kirsi Siivola, Kukka Aimonen, Hanna Saarelainen, Gerard Vales, Katriina Huuonen, Mira Hartikainen, Sauli Savukoski, Satu Suhonen, Julia Catalán, Henrik Wolff ja Hannu Norppa

Työterveyslaitos

Työturvallisuus

PL 40

00032 Työterveyslaitos

www.ttl.fi

Toimitus: Kirsi Siivola, Kukka Aimonen, Hanna Saarelainen, Hannu Norppa

Valokuvat: Mira Hartikainen, Kukka Aimonen, Hanna Saarelainen, Suomen Molekyyli lääketieteen
Instituutin (FIMM) Digitaalisen mikroskopian ja molekyylipatologian yksikkö

Piirroksat: Kukka Aimonen, Kirsi Siivola, Hanna Saarelainen

© 2021 Työterveyslaitos ja kirjoittajat

Hanke on toteutettu Työsuojelurahaston tuella (hanke n:o 117369).

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

ISBN 978-952-391-000-3 (nid)

ISBN 978-952-261-999-0 (PDF)

PunaMusta Oy, Tampere 2021.

Tiivistelmä

Nanomateriaalien käyttö on voimakkaasti lisääntymässä eri toimialoilla Suomessa. Nanomateriaaleja hyödyntävän työelämän tuottavuuden kannalta on ensiarvoisen tärkeää, että mahdollisista riskeistä on realistinen kuva, jotta ne voidaan minimoida. Syöpävaarallisuus on keskeisessä asemassa myös nanomateriaalien riskinarvioinnissa. Riskinarviointi vaikuttaa suoraan nanomateriaalien sääntelyyn, kuten työympäristön raja-arvojen asettamiseen sekä luokitteluun ja merkitsemiseen. Nanomateriaalien moninaisuus asettaa kuitenkin suuria haasteita toksikologiselle testaukselle ja riskinarvioinnille. Syöpävaarallisuuden arvioinnin kannalta on tärkeää ymmärtää, onko perimämyrkyllisyys primääristä vai onko se sekundäärinen, tulehdukseen liittyvä ilmiö. Primääriselle perimämyrkyllisyydelle ei voida asettaa kynnsannosta, mutta sekundäärisen vaikutuksen tapauksessa se on ehkä mahdollista. Tämä on keskeinen kysymys erityisesti heikkoliukoisten nanomateriaalien, kuten hiilinanoputkien syöpävaarallisuuden arvioinnissa.

Tässä hankkeessa selvitettiin DNA:n kaksoisjuostekatkosten roolia hiilinanoputkien perimämyrkyllisen vaikutuksen synnyssä ja tutkittiin DNA:n kaksoisjuostekatkokset tunnistavavan γ -H2AX-värjäyksen soveltuvuutta keuhkojen nanomateriaalialtistuksen aiheuttamien DNA:n kaksoisjuostekatkosten määrän ja sijainnin selvittämiseen. Menetelmä soveltui hyvin hiilinanoputkialtistuksen aiheuttaman genotoksisen vaikutuksen osoittamiseen aiemmin kerätyistä, parafiiniin säilötyistä hiiren keuhkokudosnäytteistä, ja DNA-vauriot voitiin paikantaa suhteessa nanomateriaalien sijaintiin ja histopatologisiin löydöksiin. Vaikka keuhkoputkia ympäröivän keuhkoepiteelikudoksen γ -H2AX-positiivisuuden havaittiin kohonneen useiden hiilinanoputkialtistusten seurauksena, erot olivat harvoin tilastollisesti merkitseviä. Keskittämällä analyysi nanomateriaaleja ympäröiviin solukasumiin perimämyrkyllinen vaikutus oli sen sijaan selvästi havaittavissa, ja tulokset korreloivat DNA-vaurioanalyysin ja tulehdustekijöiden mRNA-ekspression kanssa.

Sekundäärinen perimämyrkyllisyyden tunnistamiseksi soluviljelmissä sovellettiin sekä tulehdus- ja keuhkosolujen yhteisviljelyyn perustuvaa menetelmää, että kasvatusliuoksen siirtoa altistetuilta tulehdussoluilta keuhkosoluille. Näistä jälkimmäinen osoittautui toimivaksi menetelmäksi, jolla todennäköisesti voidaan tunnistaa sekundääristä perimämyrkyllisyyttä aiheuttavia nanomateriaaleja, mutta se ei ollut vielä tarpeeksi spesifinen korvaamaan eläinkokeita. Menetelmää voidaan kuitenkin hyödyntää testauksen kohdentamisessa nanomateriaaleihin, joilla on suurin todennäköisyys aiheuttaa sekundääristä perimämyrkyllisyyttä, ja spesifisyyttä mahdollisesti jatkokehittelyllä parantaa. Hanke tuotti uusia menetelmiä nanomateriaalien syöpävaarallisuuden arvioinnin tueksi, ja tulokset parantavat ymmärrystämme siitä, mitä keuhkoissa tapahtuu, kun hengitämme nanomateriaaleja ja kuinka perimämyrkyllinen vaikutus syntyy.

Abstract

Use of nanomaterials is increasing greatly within different fields of Finnish industry. It is essential for the productivity of the working life that there is a realistic picture of the potential risks in order to minimize them. Carcinogenicity plays a key role in the risk assessment of chemicals, including nanomaterials. Risk assessment has a direct impact on the regulation of nanomaterials, such as the setting of occupational exposure limit values and the classification and labeling of nanomaterials. However, the diversity of nanomaterials poses major challenges for toxicological testing and risk assessment. It is important for risk assessment to understand, whether genotoxicity is a primary or a secondary, inflammation-related phenomenon. No threshold dose can be set for primary genotoxicity, but in the case of a secondary effect it may be possible. This is a key question, especially in the assessing the carcinogenicity of poorly soluble nanomaterials, such as carbon nanotubes.

In this project, we investigated the role of DNA double-strand breaks in the genotoxicity of carbon nanotubes and the suitability of γ -H2AX staining for determining the quantity and location of DNA double-strand breaks caused by pulmonary nanomaterial exposure. The method was well suited for demonstrating the genotoxic effect of carbon nanotube exposure from previously collected paraffin-embedded mouse lung tissue samples, and DNA damage could be located relative to the location of nanomaterials and histopathological findings. Although the γ -H2AX level in the bronchial epithelial tissue was observed to be elevated after several carbon nanotube exposures, the differences were rarely statistically significant. On the other hand, by concentrating the analysis on the cell clusters surrounding the nanomaterials, the genotoxic effect was, instead, clearly detectable, and the results correlated with DNA damage analysis and mRNA expression of inflammatory cytokines.

For the identification of secondary genotoxicity in lung cell cultures, we experimented with both co-culture of inflammatory and lung cells and a method based on medium transfer from exposed inflammatory cells. The second proved to be a viable method likely to identify nanomaterials that have secondary genotoxic effects. However, the method is not specific enough to replace animal testing. Nonetheless, it can be used to target testing towards nanomaterials that are most likely to cause secondary genotoxicity and developed further to increase specificity. In this project, we developed new methods to support the carcinogenic risk assessment of nanomaterials, and the results improve our understanding of what happens in the lungs when we inhale nanomaterials and how the genotoxic effect arises.

Sisällys/Table of contents

Tiivistelmä.....	3
Abstract	4
Sisällys/Table of contents.....	5
1 Lähtökohta ja taustat.....	7
1.1 DNA:n kaksoisjuostekatkokset.....	7
1.2 Sekundäärisen genotoksisuuden tunnistaminen soluviljelmissä	10
2 Tavoitteet.....	14
2.1 DNA:n kaksijuosteisten katkosten tunnistaminen koe-eläinten keuhkoissa ...	14
2.2 Sekundäärisen genotoksisuuden tunnistaminen soluviljelmissä	14
3 Materiaalit ja menetelmät.....	15
3.1 DNA:n kaksijuosteisten katkosten tunnistaminen koe-eläinten keuhkoissa ...	15
3.1.1 Materiaalit	15
3.1.2 Gamma-H2AX-värjäys.....	19
3.1.3 Analyysi ja tilastollinen testaus.....	19
3.1.4 Aspiraatiokokeet hiirillä	21
3.1.5 Instillaatiokokeet hiirillä.....	22
3.1.6 Inhalaatiokokeet hiirillä.....	23
3.1.7 Kokeet geenimuunnelluilla rotilla.....	23
3.1.8 Pimeäkenttämikroskopia.....	25
3.2 Sekundäärisen genotoksisuuden tunnistaminen soluviljelmissä	26
3.2.1 Materiaalit	26
3.2.2 Materiaalien karakterisointi.....	27
3.2.3 Materiaalien dispersointi elatusliuoksiin.....	28
3.2.4 Soluviljely.....	28
3.2.5 Tulehdustekijöitä sisältävän kasvatusliuoksen tuottaminen makrofageja altistamalla ja mikrotumatesti keuhkosoluilla.....	29
3.2.6 Yhteisviljelmien muodostaminen.....	30

3.2.7	Keuhkosolu- ja yhteisviljelmien altistaminen ja mikrotumatesti.....	31
3.2.8	Tulehdustekijöiden määrittäminen kasvatusliuksesta.....	32
3.2.9	Tilastolliset analyysit	32
4	Tulokset.....	33
4.1	DNA:n kaksijuosteisten katkoksten tunnistaminen koe-eläinten keuhkoissa ...	33
4.1.1	Aspiraatiokokeet hiirillä	33
4.1.2	Instillaatiokokeet hiirillä.....	40
4.1.3	Inhalaatiokokeet hiirillä.....	44
4.1.4	Kokeet geenimuunnelluilla rotilla.....	45
4.2	Sekundäärisen genotoksisuuden tunnistaminen soluviljelmissä	50
4.2.1	Biologiset epäpuhtaudet.....	50
4.2.2	Kasvatusliukseen vapautuneet tulehdustekijät.....	50
4.2.3	Mikrotumatesti.....	52
5	Pohdinta ja johtopäätökset.....	57
5.1	Kaksoisjuostekatkokset keuhkokudoksessa	57
5.2	Sekundäärisen genotoksisuuden tunnistaminen soluviljelmissä	60
6	Tiedotus ja muu tiedon hyödyntäminen.....	64
7	Kiitokset.....	66
8	Lähteet.....	67
	Liite 1. Ruiskusuodatuksen soveltuvuus kuitumaisten nanomateriaalien poistamiseen kasvatusliuksesta.....	74

1 Lähtökohta ja taustat

Nanoteknologian kehitys on lisännyt maailmanlaajuisesti nanomateriaalien valmistusta, tutkimusta ja tuotekehittelyä. Myös Suomessa lukuisat yritykset hyödyntävät nanomateriaaleja. Nanomateriaaleille altistuvien työntekijöiden määrän odotetaan nousevan voimakkaasti lähitulevaisuudessa. Ammatillista altistumista nanopartikkelien tuotannon tai käytön yhteydessä tapahtuu erityisesti hengitysteitse (Guseva Canu ym. 2016, Jiménez ja van Tongeren 2017, Goede ym. 2018, Schulte ym. 2018).

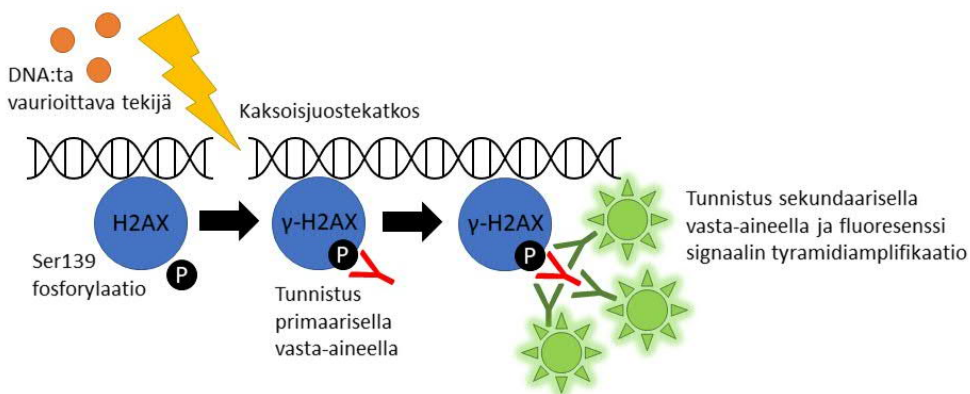
Tietämys nanomateriaalien haitoista on aktiivisen tutkimuksen ansiosta kohentunut, joskin suurin osa tiedosta koskee edelleenkin vain muutamaa nanohiukkastyyppeä, eikä toksisia vaikutusmekanismeja tunneta riittävästi (Alenius ym. 2014, Krug 2014, Savolainen 2016, He ym. 2017, Liu ja Tang 2020). Nanomateriaalien moninaisuus asettaa suuria haasteita toksikologiselle testaukselle ja riskinarvioinnille, ja vain pieni osa voidaan testata eläinkokeissa. Nanomateriaaleille soveltuvien, solupohjaisten testien kehittäminen on siksi avainasemassa. Heikkoliukoisten nanomateriaalien, kuten hiilinanoputkien, syöpävaarallisuuden kannalta keskeinen ilmiö on tulehdukseen mahdollisesti liittyvä sekundäärinen perimämyrkyllisyys. Tulehdussolujen ja keuhkosolujen yhteisviljelmien avulla sekundäärinen perimämyrkyllisyys on mahdollista erottaa primäärisestä perimämyrkyllisyydestä, mikä edesauttaa vaaranarviota ja vähentää eläinkokeiden tarvetta. Uusilla mikroskooppimenetelmillä nanomateriaalit ja niiden aiheuttamat DNA:n kaksoisjuostekatkokset voidaan paikantaa koe-eläinten kudoksissa ja valottaa näin nanomateriaalien perimämyrkyllisyyden mekanismeja hyödyntäen uudelleen aiemmissa eläinkokeissa kerättyjä keuhkokudosnäytteitä.

1.1 DNA:n kaksoisjuostekatkokset

Hankkeessa selvitettiin syöpävaarallisuuden arvioinnin kannalta tärkeää kysymystä, aiheuttavatko nanomateriaalit DNA:n kaksoisjuostekatkoksia. DNA:n kaksoisjuostekatko on vakava DNA-vaurio, joka voi syntyä ionisoivan säteilyn, perimämyrkyllisten kemikaalien, häiriintyneen solunjakautumisen tai oksidatiivisen stressin vaikutuksesta (Vamvakas ym. 2008). Useiden eri nanomateriaalien on todettu johtavan reaktiivisten happiradikaalien muodostumiseen ja aiheuttavan soluissa ja kudoksissa oksidatiivista stressiä ja DNA-vaurioita. Keuhkoaltistuksen hiilinanoputkille on havaittu aiheuttavan oksidatiivisen stressireaktion, joka on yhdistetty tulehdusta edistävien sytokiinien lisääntyneeseen tuotantoon, tulehdusreaktioon, fibroosiin ja karsinogeneesiin (Fukushima ym. 2018, Catalán ym. 2016, Manke ym. 2013).

Jotta geneettinen materiaali pysyisi eheänä, soluissa on lukuisia korjausmekanismeja, jotka havaitsevat kaksoisjuostekatkokset ja aloittavat niiden korjauksen välittömästi. Kaksoisjuostekatkoksen korjaus on kuitenkin monimutkaista, ja virheellinen korjaus voi johtaa geeni- ja kromosomimutaatioiden syntyyn. Mikäli korjaus ei onnistu, solussa aktivoituu ohjelmoitu solukuolema, apoptoosi. Soluihin kerääntyneet DNA-vauriot ja mutaatiot mm. DNA:n korjausta ohjaavissa geeneissä voivat kuitenkin auttaa soluja välttämään apoptoosin ja vähitellen muuttumaan syöpäsoluiksi.

H2AX on nukleosomien histonioktomeerin komponentti, joka fosforyloidaan, kun solun DNA-juosteeseen syntyy kaksoisjuostekatkos. H2AX:n fosforyloituminen johtaa muiden DNA:n korjausproteiinien kerääntymiseen katkospaikalle ja solusyklin hidastumiseen, mikä antaa lisäaikaa vaurioiden korjaamiseen. Fosforyloidun H2AX:n eli γ -H2AX:n on osoitettu myös itse osallistuvan kaksoisjuostekatkosten korjausprosessiin. Se on tarkka ja luotettava markkeri DNA:n kaksoisjuostekatkosten tunnistamisessa (Mah ym. 2010). Fosforyloidun H2AX:n tunnistavia vasta-aineita voidaan käyttää DNA:n kaksoisjuostekatkosten leimaamiseen soluissa ja kudoksenäytteissä (Kuva 1). Hankkeessa hyödynnettiin vasta-aineeseen liitettyä immunofluoresenssiväriä katkoskohtien havainnoinnissa ja analysoinnissa.



Kuva 1. DNA:n kaksoisjuostekatkoksen aiheuttaman H2AX-komponentin fosforyloidun γ -H2AX-muodon immunofluoresenssileimauksen periaate. Fosforyloitu H2AX tunnistetaan ensin primäärisellä vasta-aineella ja edelleen sekundaarisella vasta-aineella yhdistettynä fluoresenssignaalin tyramidiamplyfikaatioon.

Alun perin menetelmää käytettiin lähinnä säteilyn perimämyrkyllisten vaikutusten tutkimiseen, mutta viime vuosina kiinnostus γ -H2AX-värjäystä kohtaan on lisääntynyt myös nanomateriaalitutkimuksen parissa (Collins ym. 2017). Värjäysmenetelmää on käytetty useiden erilaisten nanomateriaalien aiheuttamien kaksoisjuostekatkosten tunnistamiseen soluviljelmistä (Pogribna ym. 2021). Myös hiilinanoputkien on osoitettu aiheuttavan kaksoisjuostekatkoksia soluviljelmissä ja vaikutuksen on arveltu liittyvän tutkittujen materiaalien fysikaalis-kemiallisiin ominaisuuksiin tai funktionalisointiin (Mrakovic ym. 2015, Fraser ym. 2020, van Berlo ym. 2012, Cveticanin ym. 2010).

Aiemmissa Työsuojelurahaston rahoittamissa hankkeissa (nro 112248, Norppa ym. 2017 ja nro 109137, Rydman ym. 2013) γ -H2AX-värjäystä käytettiin hiilinanoputkille altistettujen hiirten keuhkoista eristettyihin soluihin. Havaittu nousu kaksoisjuostekatkosten määrässä oli lupaava, mutta ei tilastollisesti merkitsevä. Käytetty lähestymistapa, jossa kudokset pilkotaan ja solut eristetään, toimii vain, kun altisteen vaikutus kohdistuu kaikkiin tutkitun näytteen soluihin. Keuhkojen altistuessa nanomateriaaleille tilanne on kuitenkin toinen, koska hiukkaset eivät jakaudu kudokseen tasaisesti. Keuhkokudosleikkeiden γ -H2AX-värjäys parantaa kaksoisjuostekatkosten havainnointia ja kvantifiointia, kun vaikutus on keskittynyt vain tietyille kudosalueille.

Värjäyksen on aiemmin osoitettu toimivan kemikaalialtistusten aiheuttamien kaksoisjuostekatkosten tunnistamisessa parafiiniin valetuissa histopatologisissa kudospäätteissä mm. ohutsuoletta ja maksasta (Plappert-Helbig ym. 2019). Värjäys toimii, vaikka kudospäätteiden keräämisestä olisi kulunut pidempikin aika. Hankkeen aikana γ -H2AX-värjäysmenetelmää kehitettiin Työterveyslaitoksen laboratoriolaitteistolle sopivaksi ja sitä optimoitiin siten, että suuren näytemäärän yhtäaikainen käsittely on mahdollista. Kaksoisjuostekatkosten tunnistuksen herkkyyden parantamiseksi menetelmään lisättiin fluoresenssisignaalia vahvistava tyramidiamplyfikaatio. Värjätyt kudospäätteet skannattiin digitaaliseen muotoon yhteistyössä Suomen Molekyylilääketieteen Instituutin (FIMM) Molekyylipatologian yksikön kanssa, ja skannaustiedostoja käytettiin näytteiden analysointiin tietokoneella. Hankkeen aikana myös määritettiin γ -H2AX-analyysin periaatteet ja etsittiin käyttötarkoitukseen sopiva analyysiohjelmisto.

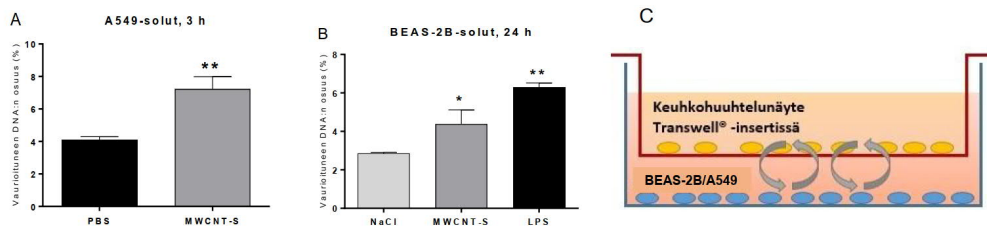
Hankkeen tavoitteena oli γ -H2AX-värjäyksen ja analyysimenetelmän optimoinnin lisäksi tutkia menetelmän soveltuvuutta keuhkojen nanomateriaalialtistuksen aiheuttamien DNA:n kaksoisjuostekatkosten määrän ja sijainnin määrittämiseen. Tutkimuksia, joissa menetelmää olisi käytetty nanomateriaalien perimämyrkyllisten vaikutusten tunnistamiseen parafiiniin valetuista kudospäätteistä on vain vähän. Metallisten nanopartikkelien kuten hopean, koboltin ja titaanidioksidin on havaittu lisäävän γ -H2AX-positiivisten solujen määrää altistettujen jyrksijöiden kudoksissa (Wiemann ym. 2017, Wan ym. 2017,

Relier ym. 2017). Lisäksi keuhkoaltistuksen nanokokoisille pii- ja hiilimustahiukkasille on osoitettu lisäävän γ -H2AX-positiivisuutta rotan keuhkokudoksessa (Rittinghausen ym. 2013). Gamma-H2AX-värjäyksen yhdistämistä muihin immunologiisiin värjäyksiin tutkitaan ja automatisoituja analyysimenetelmiä on kehitteillä (Nelson ym. 2017, Lengert ym. 2018, Stenvall ym. 2020).

Menetelmä parantaa nanomateriaalien syöpävaarallisuuden arviointia selvittämällä nanomateriaalien kykyä aiheuttaa syövän synnyn kannalta tärkeitä perimävaurioita keuhkoissa. Tuloksia voidaan hyödyntää tutkittujen hiilinanoputkimateriaalien riskin-arvioinnissa sekä arvioitaessa muiden samankaltaisten nanomateriaalien vaarallisuutta.

1.2 Sekundäärisen genotoksisuuden tunnistaminen soluviljelmissä

Hankkeessa kehitettiin soluviljelymenetelmiä, jotka jäljittelevät sekundäärisen perimämyrkyllisen (genotoksisen) vaikutuksen syntymistä keuhkoissa ja mahdollistavat sekundäärillä genotoksisella mekanismilla toimivien syöpävaarallisten nanomateriaalien nopean, luotettavan ja aikaisen tunnistamisen *in vitro*. Sekundääristä genotoksisuutta ei pystytä havaitsemaan vain yhtä solutyyppeä hyödyntävillä, perinteisillä soluviljelytekniikoilla, mutta tulehdus- ja epiteelisolujen yhteisviljelmillä ja tulehdus-soluilta siirretyillä kasvatusliuoksilla tällainen vaikutus on joissakin tapauksissa pystytty havaitsemaan (Evans ym. 2019, Ventura ym. 2020). Olemme myös aiemmin osoittaneet sekundäärisen genotoksisen vaikutuksen hiilinanoputkille ja lipopolysakkarideille (LPS) altistettujen hiirten keuhkohuuhtelunäytteille altistetuissa keuhkosoluviljelmissä (kuva 2, Norppa ym. 2017). LPS saa hiirillä aikaan voimakkaan keuhkotulehduksen, mutta ei ole primäärisesti genotoksinen BEAS-2B-keuhkoepiteelisoluilla (Aimonen ym. julkaisematon tulos). Paine laajemmin sovellettavien soluviljelypohjaisten menetelmien kehittämiseen on kasvamassa, koska eläinkokeet ovat työläitä ja kalliita, eikä markkinoille tulevia uusia nanomateriaaleja voida laajasti testata koe-eläimillä. Eläinkokeet eivät ole enää sallittuja kosmetiikassa käytettävien aineiden toksikologisessa testauksessa EU:ssa, ja on mahdollista, että samaa periaatetta aletaan jossain vaiheessa soveltaa myös muihin aineisiin.



Kuva 2. Hiilinanoputkille ja lipopolysakkarideille (LPS) altistettujen hiirten keuhkokuuhtelunäytteiden aiheuttama sekundäärinen (tulehdussolujen välittämä) perimämyrkyllisyys solulinjoilla (Norppa ym. 2017). Vaurioituneen DNA:n osuus (%; DNA:n yksijuosteiset katkokset, komeettamenetelmä) ihmisen (A) A549- ja (B) BEAS-2B-epiteelisoluissa lisääntyi yhteisviljelmissä pitkille, suorille hiilinanoputkille (MWCNT-S, Mitsui-7) altistetuilta hiiriltä kerättyjen keuhkokuuhtelunäytteen solujen kanssa. Keuhkokuuhtelunäytteet lisättiin Transwell®-insertin päälle, epiteelisolut kasvoivat viljelyastian pohjalla (C). DNA-vaurioiden taso BEAS-2B-soluissa kohosi myös, kun niitä viljeltiin yhdessä LPS-käsitellyiltä hiiriltä peräisin olevien keuhkokuuhtelunäytteen solujen kanssa (B). Kontrolliviljelmissä keuhkokuuhtelunäytteen solut olivat peräisin fosfaattipuskuriliuosta (PBS) tai fysiologista suolaliuosta (NaCl) saaneilta hiiriltä. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t -testi).

Hypoteesimme olivat seuraavat:

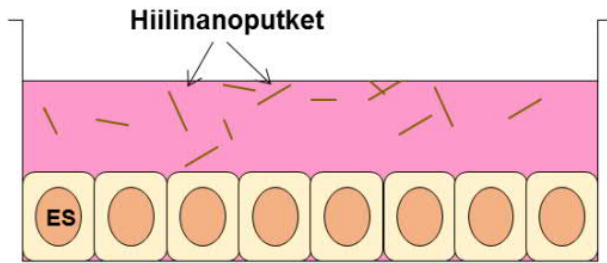
1. Syöpävaarallisilla, heikkoliukoisilla nanomateriaaleilla, kuten hiilinanoputkilla, on sekundäärinen genotoksinen vaikutusmekanismi, kun altistumien tapahtuu hengitysteitse.
2. Ihmisen solujen *in vitro* -malleilla, joka perustuu keuhkoepiteelisolujen yhteisviljelyyn tulehdussolujen kanssa (makrofaagit, monosyytit tai neutrofiilit) tai kasvatusliuoksen siirtoon tulehdussoluilta keuhkoepiteelisoluille, voidaan jäljitellä sekundäärisessä genotoksisuudessa keskeisiä solujen välisiä vuorovaikutuksia tai signaalintireittejä. Aiemmat tutkimustulokset samankaltaisilla menetelmillä (Evans ym. 2019, Ventura ym. 2020) viittaavat siihen, että tämä on mahdollista.
3. Yhteisviljelymenetelmällä havaittavat genotoksiset mekanismit ovat samankaltaisia kuin vastaavat mekanismit *in vivo*.
4. Kun yhteisviljelyä käytetään rinnan pelkkien epiteelisolujen viljelmien kanssa, menetelmää voidaan käyttää vaihtoehtona eläinkokeille nanomateriaalien syöpävaarallisuuden tunnistamisessa.

Käytimme hankkeessa sekä kasvatusliuoksen siirtoa altistetuilta tulehdussoluilta keuhkoepiteelisoluille että keuhkoepiteelisolujen yhteisviljelyä tulehdussolujen (makrofaagit) kanssa. Molempien lähestymistapojen on aiemmin raportoitu havaitsevan

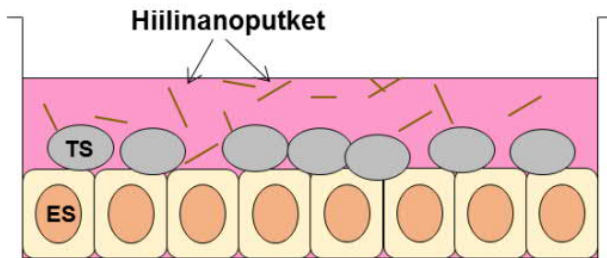
dekstraanipinnoitettujen magnetiittinanopartikkeleiden (dSPION) aiheuttaman sekundaarisen genotoksisen vaikutuksen soluviljelmillä (Evans ym. 2019). Ensimmäisessä menetelmässä vain makrofagit (dTHP-1) altistettiin testimateriaaleille, ja tulehdustekijöitä sisältävä kasvatusliuos (conditioned medium, CM) siirrettiin keuhkosoluille (16HBE). Primaarisen genotoksisen vaikutuksen poissulkemiseksi makrofageilta kerätty CM-kasvatusliuos puhdistettiin testimateriaaleista suodattamalla ennen sen siirtoa keuhkosoluille.

Jotta testimenetelmämme kattaisivat myös solujen välisen kontaktin ja happiradikaalien kautta välittyvän sekundaarisen vaikutuksen, käytimme vertailukohtana perinteisten epiteelisoluviljelmien lisäksi kuvassa 3 esitettyä mallia, jossa epiteelisoluja viljeltiin tulehdussolujen kanssa ilman inserttiä. Yhteisviljelmässä testimateriaali on kontaktissa sekä tulehdus- että epiteelisolujen kanssa ja voi näin ollen aiheuttaa myös primäärisiä genotoksisia vaikutuksia. Primäärinen ja sekundaarinen (tulehdusvälitteinen) genotoksisuus voidaan erottaa toisistaan vertailemalla yhteisviljelmän testituloksia epiteelisoluultistuksen tuloksiin. Mikäli tulos on yhteisviljelmillä positiivinen ja epiteeliviljelmillä negatiivinen tai heikommin positiivinen, vaikutus on kokonaan tai osittain sekundaarinen, ja tulehduksella on rooli perimämyrkyllisen vaikutuksen synnyssä. Mikäli tulos on positiivinen sekä epiteelisoluilla että yhteisviljelmillä, kyseessä on primäärinen perimämyrkyllisyys. Jos tulos on positiivinen epiteelisoluviljelmillä mutta negatiivinen tai heikommin positiivinen yhteisviljelmissä, tulehdussoluilla on suojaava vaikutus. Perimämyrkyllisyyden mittarina on *in vitro*-mikrotumatesti (OECD 2016), jonka katsotaan erityisesti soveltuvan tähän tarkoitukseen, koska menetelmässä tarkastellaan peruuttamattomia kromosomivaurioita (Alenius ym. 2014).

Sekundaarisen perimämyrkyllisyyden mekanismit eivät todennäköisesti rajoitu makrofagien vapauttamien happiradikaalien aiheuttamiin vaurioihin. Proinflammatoriset sytokiinit kuten TNF α tai IL-1 β voivat aiheuttaa typpioksidisyntaasin aktivoitumisen ja tätä kautta johtaa typpioksidin muodostumiseen epiteelisoluissa (Green ym. 1994). Reitillä saattaa olla merkitystä nanomateriaalien toksikologiassa, sillä sekundaarista perimämyrkyllisyyttä aiheuttavan dSPION-nanopartikkelin on aiemmin havaittu kohottavan makrofagien erittämiä sytokiinipitoisuuksia (Evans ym. 2019). Näin ollen myös tässä hankkeessa seurattiin TNF α :n ja IL-1 β :n erittymistä soluviljelyliuoksiin.



Epiteelisolujen (ES) viljelmä



Yhteisviljelmä: tulehdussolut (TS) ja epiteelisolut (ES) yhdessä

Kuva 3. Perimämyrkyllisyyden testaamisen periaate käytettäessä epiteelisolujen ja tulehdussolujen yhteisviljelmiä.

2 Tavoitteet

Hankkeen tavoitteena oli parantaa nanomateriaalien syöpävaarallisuuden arviointia (1) selvittämällä syövän synnyn kannalta tärkeiden DNA:n kaksijuosteisten katkosten muodostumista erilaisille hiilinanoputkille altistettujen hiirten ja rottien keuhkoissa ja (2) kehittämällä soluviljelmillä ilman eläinkokeita toteutettava testimenetelmä sekundäärin (tulehdusperäisen) genotoksisuuden tunnistamiseksi.

2.1 DNA:n kaksijuosteisten katkosten tunnistaminen koe-eläinten keuhkoissa

Hankkeessa tavoitteena oli selvittää syövän synnyn kannalta tärkeiden DNA:n kaksijuosteisten katkosten muodostumista erilaisille hiilinanoputkille altistettujen hiirten keuhkoissa ja rotilla tehtävissä hiilinanoputkien syöpätutkimuksissa. DNA:n kaksoisjuosteisten katkoksia voidaan olettaa muodostuvan nanomateriaalien aiheuttaman oksidatiivisen stressin seurauksena. Käyttämässämme menetelmässä DNA-vauriot voidaan osoittaa histopatologisista keuhkovalmisteista, jolloin samalla nähdään, mihin keuhkokudoksen osaan tai solutyypin DNA-vaurioita kohdistuu ja onko vaikutus yhteydessä kudoksessa olevaan nanomateriaaliin ja kudokseen tulleisiin tulehdus-soluihin. Koska tarkoitus oli käyttää aiemmista kokeista kerättyjä keuhkovalmisteita ja uusia valmisteita Ranskassa joka tapauksessa tehtävistä karsinogeenisuuskokeista, uusia eläinkokeita ei tarvittu. Tutkimuksen odotettiin antavan uutta tietoa nanomateriaali-altistumiseen liittyvän perimämyrkyllisen vaikutuksen syntymisestä ja kohdentumisesta hengitysteitse tapahtuvassa altistumisessa.

2.2 Sekundäärin genotoksisuuden tunnistaminen soluviljelmässä

Hankkeessa kehitettiin tulehdussolujen ja epiteelisolujen yhteisviljelyyn perustuvaa, uutta perimämyrkyllisyyden testimenetelmää, jonka odotettiin pystyvän tunnistamaan primäärisesti perimämyrkyllisten nanomateriaalien lisäksi myös sekundäärisesti perimämyrkylliset materiaalit, mikä ei ole mahdollista perinteisillä soluviljelymenetelmillä. Sekundäärinen perimämyrkyllisyys liittyy tulehdukseen ja sen osoittamiseen on aiemmin tarvittu koe-eläimiä. Tarkoituksena ei ollut mallintaa tarkkaan tapahtumia ihmisen keuhkoissa vaan kehittää käytännöllinen menetelmä, jolla sekundäärisellä genotoksisella mekanismilla toimivat syöpävaaralliset aineet voitaisiin tunnistaa ilman eläinkokeita. Lähestymistapa on siis samankaltainen kuin laajassa käytössä olevissa perinteisissä *in vitro* –genotoksisuustesteissä, joita käytetään primäärin genotoksisen potentiaalin kartoittamiseen lyhytaikaisissa altistuksissa.

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 DNA:n kaksijuosteisten katkosten tunnistaminen koe-eläinten keuhkoissa

3.1.1 Materiaalit

DNA:n kaksoisjuostekatkosten tutkimuksessa hyödynnettiin pääosin aiempien koe-eläinlaitosten yhteydessä hiiristä kerättyjä histopatologisia keuhkokudosnäytteitä. Osa altistuksista oli suoritettu Työterveyslaitoksella Suomessa ja osa Tanskan työterveyslaitoksella (National Research Centre for the Working Environment, NRCWE). Pääosa hankkeessa hyödynnetyistä eläinkoenäytteistä oli kerätty osana EU-rahoitteista NANoREG-projektia (EU:n 7. puiteohjelma, hankenro 310584). Näytteitä oli myös aiemmista Työsuojelurahaston rahoittamista hankkeista (hankenumerot 109137 ja 112248). Hankkeessa tutkittujen, hiilinanoputkimateriaaleille altistettujen hiirten keuhkokudosnäytteiden alkuperä on esitetty taulukossa 1, josta ilmenee myös kunkin materiaalin karakterisaatiotietojen lähde.

Työterveyslaitoksella tehdyissä altistuksissa käytettiin aspiraatiomenetelmää, jossa nesteeseen laimennettu nanomateriaali viedään pipetin avulla nukutetun koe-eläimen keuhkoputken suulle. Tanskan NRCWE:n tekemissä kokeissa käytettiin intratrakeaalista instillaatiota, jossa nanomateriaalilaimennos annostellaan kapean putken avulla keuhkoputken kautta keuhkoihin. Sekä aspiraation että instillaation on osoitettu olevan kustannustehokkaita ja luotettavia menetelmiä, joilla haluttu altistusannos saadaan kokonaisuudessaan keuhkoihin. Molemmat ovat yleisesti käytettyjä altistusmenetelmiä nanomateriaalien koe-eläintutkimuksissa (Lai ja Warheit 2014).

Lisäksi aineistoon sisällytettiin vertailun vuoksi inhalaatioaltistuksella tehtyjä eläin-koesarjoja. Inhalaatioaltistus vastaa todennäköisintä työperäisen altistumisen skenaarioria, jossa herkästi pölyviä kuivia nanohiukkasia leijailee työpaikan hengitysilmassa. Inhalaatioaltistus vaatii kuitenkin erikoisvalmisteiset koe-eläintilat ja laitteistot sekä erityisammattitaitoa, ja se on siksi hyvin kallista. Jotta yksinkertaisempien altistusmenetelmien tuloksia voidaan luotettavasti käyttää työperäisen hengitystiealtistumisen riskinarviointiin, on tärkeää vertailla eri altistustapoja. Inhalaationäytesarja sisälsi samoilla hiilinanoputkimateriaaleilla rinnakkain tehtyjä aspiraatio- ja inhalaatioaltistuksia. Aiemmissä tutkimuksissa on osoitettu, että nämä altistusmenetelmät johtavat samankaltaiseen vasteeseen keuhkoissa, mutta erojakin löytyy (Kinaret ym. 2017).

Taulukko 1. Hankkeessa tutkittujen hiilinanoputkimateriaalien ja karakterisaatiotietojen lähde sekä keuhkokudosnäytteiden alkuperä.

Koodi	Alkuperä	Karakterisaatio	Käytetty altistustapa	Hiirikokeiden alkuperä
NRCWE-006 ¹	NRCWE ³	Jensen 2013	Inhalaatio /Aspiraatio	Catalán ym. 2016 (TSR), NANoREG ⁵
NRCWE-007 ²	NRCWE ³	Jensen 2013	Inhalaatio /Aspiraatio	Catalán ym. 2016 (TSR)
NM-402	JRC ⁴	Rasmussen ym. 2014	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NM-403	JRC ⁴	Rasmussen ym. 2014	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-040	NRCWE ³	Jackson ym. 2015	Intratrakeaalinen	Poulsen ym. 2016, 2017 (NANoREG)
NRCWE-041	NRCWE ³	Jackson ym. 2015	Intratrakeaalinen	Poulsen ym. 2016, 2017 (NANoREG)
NRCWE-043	NRCWE ³	Jackson ym. 2015	Intratrakeaalinen	Poulsen ym. 2016, 2017 (NANoREG)
NRCWE-046	NRCWE ³	Jackson ym. 2015	Intratrakeaalinen	Poulsen ym. 2016, 2017 (NANoREG)
NRCWE-061	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-062	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-063	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-064	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NM-411	JRC ⁴	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-051	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-052	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-053	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-054	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-055	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-056	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
NRCWE-057	NRCWE ³	NANoREG ⁵	Intratrakeaalinen	NANoREG ⁵
Krokidoliitti	Leibniz IUF ⁶	Poulsen ym. 2017	Intratrakeaalinen	Poulsen ym. 2016, 2017 (NANoREG)

¹Mitsui-7; ²Cheaptubes; ³National Research Centre for the Working Environment, Tanska; ⁴European Commission Joint Research Center, Ispra, Italia;

⁵NRCWE:n julkaisemattomat tulokset EU FP7 NANoREG-hankkeesta; ⁶Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung

Gamma-H2AX-värjäyksiin käytettyjen keuhkokudosnäytteiden lisäksi hiiristä kerättiin näytteitä tulehdusindikaattoreiden, DNA:n yksijuosteisten katkoksten ja mahdollisten systeemisten vaikutusten määrittämiseksi. Nyt raportoitavaa hanketta varten koottiin yhteen saatavilla olevat analyysitulokset, joista osa on julkistettu aiemmin osana NANoREG-hanketta tai tieteellisinä artikkeleina. Saatavilla ollut aineisto on listattu taulukossa 2.

Taulukko 2. Gamma-H2AX-värjättyihin näytesarjoihin liittyvät taustatiedot, joita hyödynnettiin hankkeen tilastollisissa analyyseissä.

Näytesarja	Tutkimusmenetelmä	Liittyvä julkaisu
Aspiraatiot hiirillä	DNA-vauriot ^{a,b}	NANoREG Tulosraportti D4.16, Norppa ym. 2016
	Neutrofilia ^a ja eosinofilia ^a	NANoREG Tulosraportti D4.16, Norppa ym. 2016 Tutkimusartikkeli, Ilves ym. 2018
	Sytokiinien lähetti-RNA ^b	NANoREG Tulosraportti D4.16, Norppa ym. 2016 Tutkimusartikkeli, Ilves ym. 2018
Instillaatiot hiirillä	DNA-vauriot ^{a,b}	NANoREG Tulosraportti D4.13 Tutkimusartikkeli, Poulsen ym. 2016
	Neutrofilia ^b	NANoREG Tulosraportti D4.13 Tutkimusartikkeli, Poulsen ym. 2016
Inhalaatiot hiirillä	DNA-vauriot ^{a,b}	TSR-loppuraportti, Rydman ym. 2013 Tutkimusartikkeli, Catalán ym. 2016
	γ -H2AX ^b	TSR-loppuraportti, Rydman ym. 2013 Tutkimusartikkeli, Catalán ym. 2016
	Neutrofilia ^a ja eosinofilia ^a	TSR-loppuraportti, Rydman ym. 2013 Tutkimusartikkeli, Kinaret ym. 2017
	Sytokiinien lähetti-RNA ^b	TSR-loppuraportti, Rydman ym. 2013 Tutkimusartikkeli, Kinaret ym. 2017

^a Määritetty keuhkokuuhtelunäytteestä, ^b Määritetty keuhkokudoksesta

Tutkimuksissa käytetyt nanomateriaalit on karakterisoitu tarkkaan, ja keskeiset materiaaliominaisuudet on esitetty taulukossa 3. Hankkeessa tutkittiin tiettyjen fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien yhteyttä näytteissä havaittuun γ -H2AX-positiivisuuteen. Jotta tutkimuksissa saataisiin kattava kuva hiilinanoputkimateriaalien kyvystä aiheuttaa DNA:n kaksoisjuostekatkoksia, näytesarjaan sisällytettiin fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan erilaisia materiaaleja. Materiaalien joukossa oli 13 moniseinäistä hiilinanoputkimateriaalia (multi-walled carbon nanotube, MWCNT) ja 8 yksiseinäistä hiilinanoputkimateriaalia (single-walled carbon nanotube, SWCNT). Osa materiaaleista oli funktionalisoitu hydroksylaatiolla (OH), karboksylaatiolla (COOH) tai aminoinnilla (NH₂). Kuidut erosivat toisistaan myös paksuudeltaan, pituudeltaan ja pinta-alaltaan.

Taulukko 3. Tutkittujen hiilinanoputkien keskeiset materiaaliominaisuudet.

Materiaali	Kuitutyyppi	Funktionalisointi	Paksuus (nm)	Pituus (µm)	BET pinta-ala (m ² /g) ¹
NM-402	MWCNT	Perusmuotoinen	11	1.4 ± 0.19	226
NM-403	MWCNT	Perusmuotoinen	10-15	0.1-1	135
NRCWE-006	MWCNT	Perusmuotoinen	74 ± 28	5.7 ± 3.7	22
NRCWE-007	MWCNT	Perusmuotoinen	17 ± 7	0.5 ± 0.3	75
NRCWE-040	MWCNT	Perusmuotoinen	8-15	10-50	150
NRCWE-041	MWCNT	Hydroksyloitu (OH)	8-15	10-50	152
NRCWE-043	MWCNT	Perusmuotoinen	50-80	10-20	82
NRCWE-046	MWCNT	Perusmuotoinen	13-18	1-12	223
NRCWE-061	MWCNT	Aminoitu (NH ₂)	8-15	> 50	170.4
NRCWE-062	MWCNT	Perusmuotoinen	< 8	10-30	443.2
NRCWE-063	MWCNT	Hydroksyloitu (OH)	< 8	10-30	426.4
NRCWE-064	MWCNT	Karboksyloitu (COOH)	< 8	10-30	445.2
NM-411	SWCNT	Perusmuotoinen	2	1	861
NRCWE-051	SWCNT	Perusmuotoinen	1-2	5-30	442.6
NRCWE-052	SWCNT	Perusmuotoinen	1-2	5-30	405.7
NRCWE-053	SWCNT	Hydroksyloitu (OH)	1-2	5-30	367.8
NRCWE-054	SWCNT	Hydroksyloitu (COOH)	1-2	5-30	370.8
NRCWE-055	SWCNT	Perusmuotoinen	1-2	1-3	453.1
NRCWE-056	SWCNT	Hydroksyloitu (OH)	1-2	1-3	356.7
NRCWE-057	SWCNT	Karboksyloitu (COOH)	1-2	1-3	281.6
Krokidoliitti	Asbesti		180	4.6	8.3

¹ Pinta-ala määritetty Brunauer-Emmett-Teller-menetelmällä (BET)

Aiemmista projekteista peräisin olevien näytteiden lisäksi hankkeen aikana kerättiin myös uutta näyteaineistoa yhteistyössä Ranskan työterveyslaitoksen (Institut national de recherche et de sécurité, INRS) kanssa. INRS suoritti aspiraatioaltistuksia geenimuunnelluilla rotilla kahdella hiilinanoputkimateriaalilla (Mitsui-7 eli NRCWE-006 ja NM-403) ja toimitti 8 kuukautta altistuksen jälkeen kerätyt keuhkoleikkeet Työterveyslaitokselle histopatologista arviointia ja γ -H2AX-analyysejä varten yhteistyösopimuksen mukaisesti.

3.1.2 Gamma-H2AX-värjäys

Hankkeen alussa suoritettujen optimointien jälkeen samaa värjäysmenetelmää käytettiin kaikkien analysoitujen, hiiristä ja rotista kerättyjen kudoksenäytteiden värjäykseen.

Parafiiniin valetut keuhkokudosleikkeet leikattiin mikroskooppilaseille 3,5 μm paksuisiksi leikkeiksi mikrotomilla. Leikkeistä poistettiin parafiini ksyleenissä ja ne rehydroitiin etanolisarjassa. Näytteitä keitettiin puskuriliuoksessa (pH 9.0) 20 minuutin ajan antigenien paljastamiseksi, minkä jälkeen ne jäähdytettiin huoneenlämpöön steriilissä vedessä.

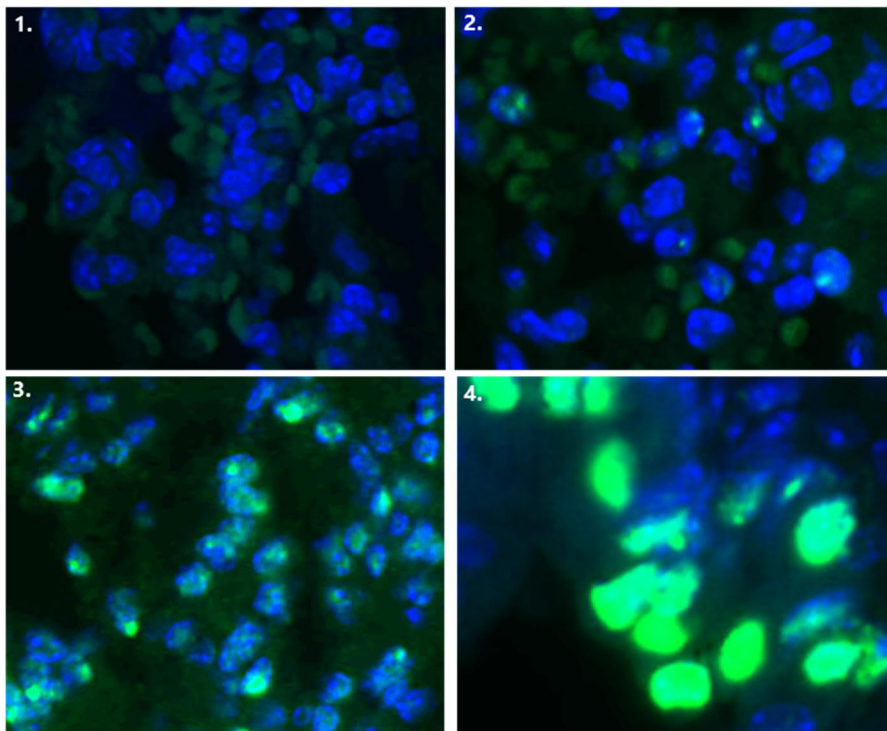
Näytteiden γ -H2AX-värjäykseen käytettiin ohjelmoitavaa Autostainer-laitteistoa (Labvision Autostainer 360, Thermo Scientific), joka mahdollisti värjäyksen automatisoinnin ja siten suuremman näytemäärän yhtäaikaista käsittelyä. Ensimmäisten inkubaatiovaiheiden aikana fosforyloituun H2AX-komponenttiin sidottiin primäärivasta-aine (Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb, Bionordika), joka tunnistettiin edelleen sekundaarisella vasta-aineella (Goat anti-rabbit IgG, ThermoFisher Scientific). Kaksoisjuostekatkosten leimaukseen vihreällä fluoresenssivärillä ja analysoitavan signaalin vahvistukseen käytettiin tyramidiampifikaatiota (Alexa Fluor™ 488 Tyramide SuperBoost™ Kit, ThermoFisher Scientific) noudattaen valmistajan ohjeita. Kudoksenäytteet värjättiin lisäksi solujen tumien DNA-molekyyleihin sitoutuvalla sinisellä DAPI-värillä näytteiden peittauksen yhteydessä (Vectashield hardset with 4',6-diamidino-2-phenylindole, Vectorlabs). Värjättyjä näytteitä säilytettiin jääkaapissa valolta suojattuna. Tietokoneanalyysia varten värjättyt näytelasit skannattiin digitaaliseen muotoon Helsingin Yliopistolla, FIMM:n Digitaalisen mikroskopian ja molekyylipatologian yksikössä.

3.1.3 Analyysi ja tilastollinen testaus

Näytteet analysoitiin CaseViewer-ohjelmalla (3DHISTECH Ltd.) käyttäen Marker Counter -moduulia. CaseViewer-ohjelmalla on mahdollista tarkastella näytettä eri suurennoksilla ja ohjelma mahdollistaa kunkin fluoresenssikanavan säädön ja tarkastelun erikseen. Ohjelman Marker Counter -moduulin avulla solut voidaan luokitella valittuihin katego-

rioihin. Vaikka värjäytystä kudosleikkeistä voidaan laskea yksittäisten solujen positiivisten signaalien määrä, se ei välttämättä suoraan kerro katkoskohtien tarkkaa lukumäärää. Kun katkoskohtien määrä kasvaa suureksi, yksittäisten positiivisten signaalien havainnointi ei ole enää mahdollista (Rothkamm ym. 2013). Kun vaurioiden määrä ylittää solun korjauskapasiteetin, γ -H2AX-positiivisuus erottuu koko tumän kattavana pan-nukleaarisena värinä, ja solu on menossa apoptoosiin (Moeglin ym. 2019). Analysoitavat solut luokiteltiin neljään kategoriaan (kuva 4) seuraavia periaatteita noudattaen:

1. Negatiiviset solut: Tuma erottuu DAPI-värjäytyneenä, kauttaaltaan sinisenä.
2. Heikosti positiiviset solut: Tuman alueella erottuu ≤ 3 vihreätä γ -H2AX-positiivista kohtaa
3. Positiiviset solut: Tuman alueella erottuu >3 vihreätä γ -H2AX-positiivista kohtaa
4. Apoptoottiset solut: Tuma on värjäytynyt kauttaaltaan γ -H2AX-positiiviseksi



Kuva 4. Gamma-H2AX-analyysiin käytetyt solukategoriat: 1. Negatiiviset solut, 2. Heikosti positiiviset solut, 3. Positiiviset solut ja 4. Apoptoottiset solut. Tumat erottuvat sinisinä (DAPI-värjäys) ja γ -H2AX on leimattu vihreällä (Alexa Fluor™ 488).

Tulosten tilastolliseen testaukseen käytettiin GraphPad Prism 8 -ohjelmaa (versio 8.4.3, San Diego, CA, USA). Altistettujen eläinten γ -H2AX-positiivisten solujen määrää verrattiin kontrolliryhmään yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA, Dunnetin parivertailu). Kun altistuksessa oli käytetty useampia annoksia samasta hiilinanoputkimateriaalista, altistusannoksen vaikutusta γ -H2AX-positiivisten solujen määrään testattiin lineaarisella regressioanalyysillä. Niissä näytesarjoissa, joissa kaikki näytteet oli kerätty samoista hiiryksilöistä, γ -H2AX-tulosten ja kerätyn taustadatan välisiä riippuvuuksia tutkittiin Pearsonin korrelaatiotestillä. Instillaationäytesarjassa käytettyjen hiilinanoputkien erilaisien materiaaliominaisuuksien yhteyttä γ -H2AX-positiivisten solujen määrään tutkittiin kategoristen muuttujien osalta 1-suuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) ja jatkuvien muuttujien osalta lineaarisella regressioanalyysillä. Tulosten katsottiin olevan tilastollisesti merkitseviä, kun $p < 0,05$.

3.1.4 Aspiraatiokokeet hiirillä

Kehitetyn γ -H2AX-värjäys ja -analyysimenetelmän validointiin käytettiin näytesarjaa, jossa C57BL/6-kannan hiiriä altistettiin kerta-aspiraatiolla kolmelle annokselle (200, 800 ja 1600 $\mu\text{g/ml}$) Mitsui-7-hiilinanoputkimateriaalia (NRCWE-006), jonka Kansainvälinen syövätutkimuslaitos (IARC) on todennut ihmiselle mahdollisesti syöpää aiheuttavaksi (ryhmä 2B). Eläinkoe tehtiin vuosina 2013–2014 osana NANoREG-projektia Työterveyslaitoksen koe-eläintiloissa Etelä-Suomen aluehallintoviraston eläinkoelautakunnan myöntämän eläinkoeluvan mukaisesti noudattaen voimassa olevaa eläinkoelainsäädäntöä. Näytteenkeräykset olivat 24 tuntia ja 28 vuorokautta altistuksen jälkeen. Kontrolliryhmät oli altistettu fosfaattipuskurilla, johon oli lisätty 10 % seerumia. Samaa puskuriliuosta käytettiin myös hiilinanoputkilaimennoksiin. Jokaisesta altistusryhmästä värjättiin neljän hiiren kudosnäyte.

Menetelmän optimointivaiheessa oli havaittu, että hiirten keuhkokudosleikkeissä γ -H2AX-positiivisuutta havaittiin runsaammin keuhkoputkien epiteelissä ja materiaaliaggregaattien ympärille kerääntyneissä soluissa. Siksi jokaisesta keuhkokudosnäytteestä valittiin satunnaisesti kahdeksan 200 μm x 200 μm kokoista annotaatiota, siten, että kukin annotaatio sisälsi keuhkoputken epiteelikerrosta ja sen viereistä kudosta. Kunkin annotaation kaikki tumat luokiteltiin yllä mainittuihin neljään kategoriaan, ja jokaisesta näytteestä analysoitiin vähintään 1200 solua. Analyysi toistettiin myös siten, että annotaatiot sijoitettiin nanomateriaalin ympärille kertyneiden solukasautumien alueelle. Myöhemmin Mitsui-7-näytesarjan kudosleikkeitä käytettiin jokaisessa värjäyssarjassa positiivisina kontrollinäytteinä, joiden avulla varmistettiin γ -H2AX-värjäyksen onnistuminen.

Alkuperäisissä hiirikokeissa tulehdusreaktiota tutkittiin määrittämällä tulehdussolujen osuudet keuhkohuuhtelunäytteestä ja mittaamalla eri sytokiinien tuotannon aktivoitumista lähetti-RNA-pitoisuuksien avulla keuhkokudosnäytteistä. Paikallisia genotoksisia vaikutuksia tutkittiin DNA:n yksijuostekatkoksia mittaavalla komeettamenetelmällä keuhkohuuhtelunäytteen ja keuhkokudoksen soluista ja systeemistä genotoksisuutta mikrotumamenetelmällä luuytimen soluista. Mitsui-7-näytesarjassa tulehdusindikaattoreiden ja genotoksisuuden analysointiin käytetyt näytteet oli kerätty samoista hiiryksilöistä, joiden keuhkokudosnäytteistä tehtiin γ -H2AX-määritys.

3.1.5 Instillaatiokokeet hiirillä

Suurin hankkeessa käytetty näytesarja koostui Tanskan työterveyslaitoksen keräämästä aineistosta, jossa materiaaliominaisuuksiltaan erilaisista hiilinanoputkista oli tuotettu karboksyloituja (-COOH), hydroksyloituja (-OH) ja aminoituja (-NH₂) muotoja. Alkuperäiset eläinkokeet oli suoritettu NANoREG-projektin yhteydessä vuosina 2012–2015 Tanskan viranomaisten myöntämän eläinkoeluvan mukaisesti noudattaen EU:n eläinkoelainsäädäntöä. Tutkimuksissa C57Bl/6J-kannan hiirille annosteltiin hiilinanoputkilaimennosta (54 μg /hiiri) intratrakeaalilla instillaatiolla kerran, ja näytteet kerättiin 28 vuorokautta altistuksen jälkeen. Näytesarjassa verrokkimateriaalina oli krokidoliittiasbesti (kerta-annos 18 μg /hiiri), joka on syöpävaarallinen, kooltaan hiilinanoputkia suurempi kuitu. Negatiivinen kontrolliryhmä sai steriiliä vettä, johon oli lisätty 2 % hiiren seerumia. Samaa vesiliuosta käytettiin myös materiaalilaimennoksiin.

NRCWE toimitti pyydetyt parafiiniin valetut kudoksenäytteet Työterveyslaitokselle γ -H2AX-värjäystä varten. Kaikkia alkuperäisen suunnitelman mukaisia materiaaleja ei pystytty sisällyttämään analyysiin puutteellisen näytemäärän vuoksi. Gamma-H2AX-värjäys ja -analyysi suoritettiin niille altistussarjoille, joista oli mahdollista värjätä kolmen altistetun hiiren keuhkokudosnäyte per ryhmä. Lisäksi jokaisesta altistusryhmästä värjättiin yhden negatiivisen kontrollihiiren näyte.

Koska kaikissa näytteissä ei ollut havaittavissa materiaalin ympärille kertyneitä solukasautumia, jokaisesta keuhkokudosnäytteestä valittiin satunnaisesti kahdeksan 200 μm x 200 μm kokoista näytealuetta, siten, että kukin sisälsi keuhkoputken epiteeliä ja sen viereistä kudosta. Kunkin näytealueen kaikki tumat luokiteltiin yllä listattuihin neljään kategoriaan, ja jokaisesta näytteestä analysoitiin vähintään 1200 solua.

NRCWE auttoi myös koostamaan tilastollisiin testeihin käytetyn taustadatan. Hiiristä oli määritetty DNA:n yksijuostekatkokset komeettamenetelmällä sekä keuhkohuuhtelunäytteen että keuhkokudoksen soluista ja tulehdusreaktion indikaattorina toimiva neutrofiilien määrä keuhkohuuhtelunäytteessä. Instillaationäytesarjassa tulehdusindi-

kaattoreista ja DNA:n yksijuostekatkoksista kerätyt tulokset olivat peräisin samoista altistusryhmistä, mutta eivät samoista hiiriyksilöistä kuin γ -H2AX-värjäykseen käytetyt keuhkokudosnäytteet.

3.1.6 Inhalaatiokokeet hiirillä

Osana hanketta haluttiin myös vertailla erilaisten keuhkoaltistustapojen mahdollista vaikutusta DNA:n kaksoisjuostekatkosten esiintymiseen keuhkokudoksessa. Työterveyslaitoksella oli tehty aiemmassa Työsuojelurahaston rahoittamassa hankkeessa (nro 109137; Rydman ym. 2013) inhalaatioaltistuksia rinnakkain aspiraatioaltistusten kanssa. Altistukset tehtiin Työterveyslaitoksen koe-eläintiloissa Etelä-Suomen aluehallintoviraston eläinlääkärin myöntämän eläinlääkärin mukaisesti noudattaen voimassa olevaa eläinlääkärin säädäntöä. C57Bl/6-kannan hiiriä altistettiin kerta-aspiraatiolla annokselle 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ja inhalaatiomenetelmällä 4 x 4 tuntia pitoisuudelle $8.2 \pm 1.7 \text{ mg}/\text{m}^3$ Mitsui-7-hiilinanoputkia tai 4 x 4 tuntia pitoisuudelle $10.8 \pm 2.8 \text{ mg}/\text{m}^3$ Cheaptubes-hiilinanoputkia.

Aiemmissä kokeissa oli todettu, että tulehdusreaktion laatu ja voimakkuus riippuivat altistustavasta. Mitsui-7-hiilinanoputket aiheuttivat huomattavasti vakavamman tulehduksen inhalaatioaltistuksella kuin aspiraatiomenetelmällä annettuina. Aiempien tulosten perusteella arvioitiin, että eri altistustavat voisivat aiheuttaa myös eritasoisen γ -H2AX-vasteen tai että γ -H2AX-positiivisuuden sijainti keuhkokudoksessa olisi erilainen.

Myös inhalaatioaltistuksen jälkeen γ -H2AX-positiivisuutta havaittiin runsaammin keuhkoputkien epiteelissä. Mitsui-7-näytteissä havaittiin keuhkokudoksessa materiaaliagregaatteja, joiden ympärillä oli γ -H2AX-positiivisia soluja. Cheptubes-näytteissä ei havaittu yhtä selkeitä materiaaliagregaatteja. Analysoitavat kudosalueet valittiin epiteelialueelta samoin periaattein kuin instillaatiosarjassa. Jokaisesta keuhkokudosnäytteestä valittiin satunnaisesti kahdeksan 200 μm x 200 μm kokoista näytealuetta siten, että kukin sisälsi keuhkoputken epiteeliä ja sen viereistä kudosta. Kunkin näytealueen kaikki tumat luokiteltiin yllä listattuihin neljään kategoriaan, ja jokaisesta näytteestä analysoitiin vähintään 1200 solua.

3.1.7 Kokeet geenimuunnelluilla rotilla

Osana hanketta toteutettiin yhteistyössä Ranskan työterveyslaitoksen (INRS) kanssa tutkimus geenimuunneltuja rottia hyödyntäen. Tutkimuksessa käytetyiltä rotilla oli inaktivoitu toinen kopio syöpäkasvainten syntyä säätelevästä p53-tuumorisuppressorigeenistä, jonka mutaatioiden on osoitettu olevan tärkeässä roolissa myös monissa

ihmisen syöpäsairauksissa. Geenin inaktivoinnin on osoitettu johtavan nopeutuneeseen tuumorigeneesiin, ja koe-eläimille alkaa tyypillisesti kehittyä spontaaneja kasvaimia jo 4 kuukauden iästä alkaen (van Boxtel ym. 2011).

OECD:n ohjeistuksen mukaan (Test No. 451: Carcinogenicity Studies) kemikaalien syöpävaarallisuuden osoittamiseen vaaditaan 18–24 kuukautta kestävä altistustutkimus. Pitkäkestoiset eläinkokeet ovat kalliita ja vaativat paljon työaikaa myös tutkijoilta. Tämän vuoksi kaikkia markkinoille tulevia nanomateriaaleja ei pystytä testaamaan kattavasti vaan päätelmiä syöpävaarallisuudesta tehdään lyhytkestoisten eläinkokeiden ja solukokeiden perusteella. Yksinkertaistetut ja lyhytkestoiset kokeet eivät välttämättä paljasta työperäisen toistuvan ja pitkäkestoisen altistuksen aiheuttamia terveyshaittoja. INRS:n suorittamien kokeiden tavoitteena oli kehittää nopeutettu eläinmalli nanomateriaalien karsinogeenisyyden osoittamiseksi.

Eläinkokeet p53^{+/-}-geenimuunnelluilla ja villityyppisillä Sprague Dawley-kannan rotilla suoritettiin Ranskan työterveyslaitoksen toimesta Ranskan viranomaisten myöntämän eläinkoeluvan mukaisesti noudattaen EU:n eläinkoelainsäädäntöä. Eläimet altistettiin 12 viikon ikäisinä intratrakeaalaisella instillaatiolla, jossa nukutetuille eläimille annosteltiin 250 µl hiiliinanoputkilaimennosta (1 mg/ml) kerran viikossa neljän viikon ajan. Ensimmäiset näytteet kerättiin osalta eläimistä 3 päivää viimeisen altistuksen jälkeen, mutta suurin osa näytteenkeräyksistä suoritettiin 8 kuukautta viimeisen altistuksen jälkeen. Keuhkokudosnäytteet fiksoitiin formaliinilla ja säilöttiin etanoliin ennen valamista parafiiniblokkeihin. Histopatologinen analyysi suoritettiin kaikille näytteille ja γ-H2AX-värjäykseen valittiin kolme kudosnäytettä jokaisesta altistusryhmästä.

Analyysi suoritettiin 8 kuukautta altistuksen jälkeen kerätyistä näytteistä. Johtuen rotan keuhkoista kerättyjen kudoksetleikkeiden korkeasta γ-H2AX-taustapositiivisuudesta analyysimenetelmää muokattiin verrattuna hiirinäytteissä sovellettuihin periaatteisiin. Jokaisesta altistusryhmästä valittiin, yhteistyössä näytteitä analysoineen patologin kanssa, 3 kudosnäytettä, joissa oli mahdollisimman paljon patologisia muutoksia. Näistä keuhkoleikkeistä kartoitettiin karsinogeneesin kannalta kiinnostavia muutoksia kuten granuloomia ja metaplasiaa, ja γ-H2AX-analyysi keskitettiin näiden muutosten alueelle. Kustakin leikkeestä analysoitiin yhteensä kahdeksan 200 µm x 200 µm kokoista näytealuetta, josta kaikki tumat luokiteltiin samoin periaattein kuin hiirinäytteissä. Jokaisesta näytteestä analysoitiin vähintään 1200 solua. Valikoitujen näytealueiden tuloksia vertailtiin kontrolliryhmän kudoksetleikkeistä satunnaisesti valittujen näytealueiden tuloksiin.

Koska altistuskokeet viivästyivät, INRS ei ehtinyt toimittaa hankkeen aikataulun puitteissa tuloksia muiden samoista altistuksista kerättyjen näytteiden osalta. Kun analyysit valmis-

tuvat, niille tehdään samantyyppinen tilastollinen analyysi kuin hankkeen hiirinäytteille, ja tulokset julkaistaan myöhemmin tieteellisenä artikkelina.

3.1.8 Pimeäkenttämikroskopia

Hyperspektraalimikroskooppilla voidaan tunnistaa nanomateriaaleja solu- ja kudoksenäytteistä niiden elektromagneettisen spektrin perusteella, mutta laitteisto mahdollistaa näytteiden tarkastelun myös valon sirontaan perustuvalla pimeäkenttäteknikalla (Fakhrullin ym. 2021). Saatavilla olevista hiilinanoputkimateriaaleista valmistettiin mikroskooppilasit hyperspektraalimikroskooppia (CytoViva, Inc., USA) varten ja niitä tarkasteltiin γ -H2AX-värjättyjen keuhkokudosleikkeiden rinnalla. Tarkastelussa todettiin, että tutkitut hiilinanoputket oli mahdollista havaita keuhkoleikkeistä pelkkää pimeäkenttäteknikkaa käyttäen ja pimeäkenttä- ja fluoresenssikuvia yhdistävällä DMF-tekniikalla (dual mode fluorescence) samaan kuvaan voitiin yhdistää myös fluoresoivalla vasta-aineella leimattujen γ -H2AX-kohtien vihreä signaali. Valikoituja alueita tarkasteltiin DMF-tekniikalla, jotta voitiin varmistua hiilinanoputkien sijainnista kudoksenäytteissä ja selvittää materiaalin sijainnin yhteyttä havaittuun γ -H2AX-positiivisuuteen.

3.2 Sekundäärisen genotoksisuuden tunnistaminen soluviljelmissä

3.2.1 Materiaalit

Hiilinanoputket, jotka aiheuttavat inhalaatiolla DNA-vaurioita hiirten keuhkoissa:

- Mitsui-7 (NRCWE-006, Hagoda Chemical Industry) on syöpävaarallinen (IARC 2017), pitkä (<10 µm), suora moniseinäinen hiilinanoputki, joka aiheuttaa DNA-vaurioita hiiren keuhkoissa (Catalán ym. 2016, Norppa ym. 2017)
- NM-400 (JRC Repository for Representative Test Materials, Rasmussen ym. 2014; Nanocyl MWCNT) on Mitsuita lyhyempi (<1 µm) ja taipuisa moniseinäinen hiilinanoputki, joka aiheuttaa DNA-vaurioita hiiren keuhkoissa (Catalán ym. julkaisematon tulos, EU FP7 MARINA-hanke)

Hiilinanoputki, joka muistuttaa Mitsui-7-hiilinanoputkea:

- NM-401 (JRC Repository for Representative Test Materials, Rasmussen ym. 2014) on pitkä (<5 µm), suora moniseinäinen hiilinanoputki, joka on aiheuttanut soluviljelmissä samanlaisia vaikutuksia kuin Mitsui-7, mm. uudentyyppisen radikaalin muodostumisen (IARC 2017)

Hiilinanoputki, joka ei aiheuta inhalaatiolla DNA-vaurioita hiiren keuhkoissa (Catalán ym. 2016, Norppa ym. 2017):

- Cheaptubes-hiilinanoputki (NRCWE-007, Cheap Tubes Inc.) on lyhyt (0.5 µm) ja taipuisa moniseinäinen hiilinanoputki

Syöpävaarallinen kuitumateriaali:

- Krokidoliittiasbesti (Pneumoconiosis Research Unit, Johannesburg) on syöpävaarallinen, kooltaan nanokuituja suurempi kuituinen vertailumateriaali

Positiivinen kontrollikemikaali, joka on primäärisesti perimämyrkyllinen:

- Mitomysiini C (MMC) aiheuttaa DNA:han ristsidoksia ja on siksi tehokas mikrotumien aiheuttaja. MMC oli mukana positiivisena kontrollina kaikissa testisarjoissa.

Positiivinen kontrolliaine, joka saa aikaan tulehdusreaktion:

- Lipopolysakkaridi (LPS). Aiemmassa tutkimuksessamme LPS ei ollut primäärisesti genotoksinen *in vitro* (Aimonen ym. julkaisematon tulos), mutta LPS-käsiteltyjen hiirten keuhkohuuhtelunäytteen solut aiheuttivat sekundäärisen genotoksisen vaikutuksen insertin toisella puolella kasvaneissa epiteelisoluissa (Norppa et al. 2017).

Positiivinen kontrollinanopartikkeli, jolla on raportoitu olevan sekundaarisia perimämyrkyllisiä vaikutuksia tässä tutkimuksessa käytetyillä solulinjoilla (Evans ym. 2019):

- Dekstraanipinnoitettu 8 nm magnetiittinanopartikkeli DexoMAG®40 (dSPION, Liquids Rersearch Ltd)

3.2.2 Materiaalien karakterisointi

Mitsui-7- ja Cheaptubes-hiilinanoputkien karakterisointi on kuvattu yksityiskohtaisesti aiemmissa julkaisuissa (Jensen 2013, Rydman ym. 2013, Catalán ym. 2016). Mitsui-7 hiilinanoputket on karakterisoitu myös RPMI1640-kasvatusliuoksessa käyttäen samaa dispersiomenetelmää, jota sovellettiin tässä hankkeessa (Ventura ym. 2020). NM-400- ja NM-401-hiilinanoputket on lisäksi karakterisoitu perusteellisesti JRC:n toimesta (Rasmussen ym. 2014), mukaan lukien materiaalien dispersiot DMEM-kasvatusliuoksessa. Poimintoja aiemmin julkaistuista tai valmistajan ilmoittamista tiedoista on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Sekundaarisen genotoksisuuden tutkimuksessa käytettyjen testimateriaalien ominaisuudet. Tiedot on koottu NANOGENOTOX- ja TSR-hankkeiden loppuraporteista sekä JRC:n raportista (Jensen 2013, Rydman ym. 2013, Rasmussen ym. 2014).

Materiaali	Mitsui NRCWE-006	Cheaptubes NRCWE-007	NM-400	NM-401	Krokidoliitti-asbesti
Valmistaja	Hagoda Chemical Industry	Cheap Tubes Inc.	ei saatavilla	ei saatavilla	Pneumoconiosis Research Unit
Halkaisija	74 nm ^a	17 nm ^a	14 nm ^a	64 nm ^a	180 nm ^b
Pituus	<10 µm ^a	0.5 µm ^a	<1 µm ^a	<5 µm ^a	4.6 µm ^b
SSA ^c	22 m ² /g	75 m ² /g	254 m ² /g	18 m ² /g	ei saatavilla
Puhtaus (wt%) ^d	82 %	94 %	84 %	82 %	ei saatavilla

^a Transmissioelektronimikroskopia (TEM), ^b Valmistajan antama tieto, ^c Spesifinen pinta-ala, määritetty käyttäen Brunauer-Emmett-Teller-menetelmää (BET), ^d Termogravimetrinen analyysi (TGA)

Hiilinanoputkien mahdollisia biologisia kontaminaatioita kartoitettiin ennen ensimmäisiä soluviljelykokeita ja viimeisten kokeiden jälkeen ISO 29701:2010 standardin mukaisesti Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit ja Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit -endotoksiinikittejä käyttäen. Testi mittaa materiaalinäytteen lipopolysakkariidipitoisuutta, joka kertoo bakteerikontaminaatiosta. Paitsi elävät bakteerit, myös lipopolysakkariidi itsessään voi aiheuttaa tulehdusreaktioita nisäkkäissä ja nisäkäspärisissä viljellyissä soluissa ja siksi testattavien materiaalien puhtaus on tärkeää tutkimus-

tulosten luotettavuuden varmistamiseksi. Testi suoritettiin valmistajan ohjeen mukaan käyttäen 100 µg/ml dispersiota kustakin hiilinanoputkimateriaalista. Ennen testausta materiaalidispersioita lämmitettiin (+75 °C, 15 min) endotoksiinien vapauttamiseksi. DSPION-nanopartikkelit toimitettiin 0,2 µm filterillä steriilisuodatettuna.

3.2.3 Materiaalien dispersointi elatusliuoksiin

Dispersiot valmistettiin juuri ennen altistusta NANOGENOTOX-hankkeessa kehitetyn standardoidun protokollan mukaisesti. Steriloituihin lasisiin tuikepulloihin (20 ml Scint-Burk glass pp-lock+Alu-foil, Wheaton Industries Inc.) punnitut nanomateriaalit esikasteltiin 30 µl etanolilla ja dispersoitiin 0,05 % naudan seerumin albumiinia (BSA, Sigma-Aldrich) sisältävään veteen sonikoimalla 16 min jäävesihauteessa (400 W, 10 % amplitudi; Branson Sonifier S-450D, Branson Ultrasonics Corp., USA). DSPION-nanopartikkelit toimitettiin valmiiksi veteen dispersoituna.

Tulehdustekijöitä sisältävän kasvatusliuoksen ja sitä vastaavan keuhkosolujen mikro-tumatestin osalta Mitsui-7- ja NM-401-dispersiot sonikoitiin kahteen kertaan, mutta toisen sonikoinnin ei pimeäkenttämikroskoopilla tarkasteltuna havaittu muuttavan dispersion laatua.

3.2.4 Soluviljely

Ihmisen THP-1-monosyyttisolut ja 16HBE14o⁻-keuhkoepiteelisolut hankittiin eurooppalaisesta autentikoitujen solulinjojen kokoelmasta (ECACC, Public Health England, UK). Molempia solulinjoja ja niiden yhteisviljelmiä kasvatettiin hiilidioksidi-inkubaattorissa +37 °C, 5 % CO₂.

THP-1-soluja viljeltiin RPMI1640-kasvatusliuoksessa (RPMI, Roswell Park Memorial Institute), johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia (FBS), 1 % L-glutamiinia ja 1 % penisilliini-streptomysiiniliuosta (myöhemmin suplementoitu RPMI). Solujen kasvutiheys pidettiin välillä 200 000–1 000 000 solua millilitrassa lisäämällä kasvatusliuosta tarpeen mukaan.

THP-1-solujen erilaistamisessa makrofageiksi (dTHP-1) noudatettiin Swansean yliopistolta saatua ohjetta. Makrofagien tuottamia tulehdustekijöitä sisältävän kasvatusliuoksen (conditioned medium, myöhemmin CM) valmistusta varten 5 miljoonaa THP-1 solua erilaistettiin pinnoittamattomissa T-25-viljelypulloissa lisäämällä kasvatusliuokseen 20 nM forboli-12-myristaatti-13-asetaattia (PMA). Yhteisviljelmien muodostamista varten siirrostettiin 8 miljoonaa THP-1 solua pinnoittamattomaan T-75-viljelypulloon ja erilaistettiin 50 nM PMA:lla. Kiinnittymättömät solut sekä PMA poistettiin 24 tunnin

kuluttua, viljelmät pestiin Dulbecon fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (DPBS) ja makrofagien viljelyä jatkettiin vielä 24 tuntia supplementoidussa RPMI1640-kasvatusliuoksessa.

16HBE14o⁻-keuhkoepiteelisoluja viljeltiin DMEM/MEM-kasvatusliuoksessa (Dulbecco's Modified Eagle Medium tai Minimal Essential Medium), johon lisättiin 10 % FBS, 1 % L-glutamiinia ja 1 % penisilliini-streptomysiiniliuosta (myöhemmin supplementoitu DMEM/MEM). Kasvatusliuos vaihdettiin uuteen 2–3 päivän välein ja solut siirrostettiin, kun ne peittivät 80–90 % pinnoitetun T75-viljelypullon pinta-alasta.

3.2.5 Tulehdustekijöitä sisältävän kasvatusliuoksen tuottaminen makrofageja altistamalla ja mikrotumatesti keuhkosoluilla

Hiilinanoputkien ja krokidoliittiasbestin sekundääristä genotoksisuutta tutkittiin ensin kasvatusliuoksen siirtoon perustuvalla menetelmällä, jossa makrofagit altistettiin testimateriaaleille ja tulehdustekijöitä sisältävä kasvatusliuos (CM) siirrettiin keuhkosoluviljelmille. CM-kasvatusliuoksen kykyä aiheuttaa mikrotumia keuhkosoluilla verrattiin perinteiseen mikrotumatestiin.

Testimateriaalit laimennettiin sarjassa 2, 10, 20, 50 sekä 100 µg/ml (0,8, 4, 8, 20, 40 µg/cm²) pitoisuuksiin supplementoituihin RPMI1640- ja MEM-kasvatusliuoksiin. Erilaistettua dTHP-1-makrofagiviljelmät altistettiin kullekin pitoisuudelle kahtena rinnakkaisena 26 tunnin ajan. Altistuksen jälkeen kasvatusliuokset kerättiin ja sentrifugoitiin (440 g, 6 min). Primäärisen genotoksisuuden poissulkemiseksi jäljelle jääneet kuidut poistettiin steriilisuodattamalla supernatantti PES-ruiskusuodattimilla (0,2 µm huokoskoko). Sekundäärisen genotoksisuuden positiivisena kontrollina käytettyä dSPION-nanopartikkeliä ei voitu partikkelin pienen koon vuoksi suodattaa, joten dSPION-altistuksessa tuotettu CM-kasvatusliuos sisälsi nanohiukkasia. Kuitumaisten hiilinanoputkien osalta suodatusmenetelmän todettiin dynaamisen valonsironnan (DLS) mittausten perusteella ja pimeäkenttämikroskoopilla tarkastellen poistavan nanomateriaalin riittävän tarkasti (Liite 1). Negatiiviset kontrolliviljelmät käsiteltiin supplementoidulla RPMI1640-kasvatusliuoksella, joka kerättiin ja käsiteltiin kuten testimateriaaleja sisältäneet kasvatusliuokset. Puhdistetuista kasvatusliuoksista pakastettiin (-80°C) näytteet tulehdustekijöiden määrittämistä varten. Mitsui-7-, Cheaptubes- ja dSPION-altistuksissa tuotetut CM-kasvatusliuokset siirrettiin keuhkosoluviljelmille saman päivän aikana. NM-400- ja NM-401-hiilinanoputkien sekä asbestin osalta puhdistettu CM-kasvatusliuos pakastettiin (-80°C) 5 vuorokauden ajaksi ennen keuhkosolualtistusta.

Ennen altistusta 16HBE14o⁻-solut siirrostettiin pinnoitettuihin T25-soluviljelypulloihin (1 miljoona solua/pullo) ja annettiin kiinnittyä 22 tuntia. 16HBE14o⁻-keuhkoepiteelisoluja altistettiin CM-kasvatusliuoksille tai testimateriaaleille (perinteinen mikrotumatesti kaksi rinnakkaisviljelmää) 22 tunnin ajan. Positiivisena kontrollina käytettiin mitomysiini C:tä (MMC, 0,01 µg/ml, Sigma-Aldrich). Altistuksen jälkeen 16HBE14o⁻-solut pestiin kolmesti DPBS:lla. Jotta mikrotumat voitiin analysoida aktiivisesti jakautuvista soluista, viljelmiin lisättiin sytokineesin estäjää (3 µg/ml sytokalasiini B) tuoreessa supplementoidussa MEM-kasvatusliuoksessa ja inkuboitiin edelleen 22 tuntia. Solut kerättiin kuten perinteisessä mikrotumatestissä (Rydman ym. 2013). Muutoksena aiemmin kuvattuun soluja käsiteltiin trypsiinillä 10 minuuttia.

Näytepreparaatit valmistettiin ja värjättiin akridiinioranssilla sekä 4',6-diamidino-2-fenyyli-indolilla (DAPI; 1 µg/ml) kuten olemme aiemmin kuvanneet (Rydman ym. 2013). Näytteet koodattiin ja analysoitiin fluoresenssimikroskoopilla (AXIO Imager.Z1, Zeiss, Saksa) FITC/TRITC-kaksoissuodattimella. Mikrotumien esiintymistiheys laskettiin analysoimalla 1200 kaksitumaista solua viljelmää kohden (2400 jokaista annosta kohden). Materiaalien sytotoksisuutta (sytostaasi) arviottiin laskemalla 600 solulta viljelmää kohden solujen jakautumista kuvaava proliferaatioindeksi (CBPI, cytokinesis-blocked proliferation index, OECD 2016) kaavalla:

$CBPI = (\text{yksitumaisten määrä} + 2 \times \text{kaksitumaisten määrä} + 3 \times \text{monitumaisten määrä}) / \text{laskettujen solujen lukumäärä}$,

josta saadaan:

$\text{Sytostaasi \%} = 100 - 100[(CBPI_{\text{altistettu}} - 1) / (CBPI_{\text{kontrolli}} - 1)]$

3.2.6 Yhteisviljelmien muodostaminen

Yhteisviljelmien muodostamista varten keuhkoepiteelisolut siirrostettiin pinnoitetuille 6-kuoppalevyille (2 miljoonaa solua/kuoppa). Supplementoitu MEM-kasvatusliuos vaihdettiin kolmantena päivänä ja yhteisviljelmä muodostettiin kuudentena päivänä. Erilaistuneet makrofagit pestiin kolmesti DPBS:lla ja irrotettiin akkutaasiliuoksella (Gibco Stempro Accutase) 10 minuuttia ja sentrifugoitiin 100 g, 5 min. Keuhkosolukerroksen päälle 6-kuoppalevyille siirrostettiin 100 000 makrofagia/ml/kuoppa. Makrofagien annettiin kiinnittyä 90 min, jonka jälkeen kuoppiin lisättiin 2 ml supplementoitua RPMI1640-kasvatusliuosta. Yhteisviljelmän annettiin stabiloitua 24 tuntia ennen altistusta.

3.2.7 Keuhkosolu- ja yhteisviljelmien altistaminen ja mikrotumatesti

Toisena sekundäärisen genotoksisuuden tunnistamisen mahdollistavana menetelmänä sovelsimme mikrotumatestiä makrofagien ja keuhkoepiteelisolujen yhteisviljelmään. Yhteisviljelmät ja vastaavalla tavalla perustetut keuhkosoluviljelmät (ilman makrofageja, perinteinen mikrotumatesti) altistettiin 24 tunnin ajan rinnakkain samoille 6.25, 12.5, 25, 50 ja 100 µg/ml (1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25 µg/cm²) testimateriaalidispersioille supplementoidussa RPMI1640-kasvatusliuoksessa. Altistukset toteutettiin kahtena rinnakkaisena viljelmänä. Negatiivisena kontrollina käytettiin suplementoitua RPMI-kasvatusliuosta ja positiivisena kontrollina MMC:tä (0,01 µg/ml). Altistuksen jälkeen yhteisviljelmistä kerättiin kasvatusliuosnäyte tulehdustekijöiden määrittämistä varten (säilytys -80°C). Solut pestiin kolme kertaa DPBS:lla, minkä jälkeen viljelmiin lisättiin sytokalasiini B (3 µg/ml) supplementoidussa RPMI1640-kasvatusliuoksessa 44 tunnin ajaksi. Yhteisviljelmät pestiin kolme kertaa DPBS:lla, solut irroitettiin (0.25 % Trypsin-EDTA, 10 min), konsentroitiin sentrifugoimalla (210 g, 5 min), siirrettiin jäähauteeseen kylmässä supplementoidussa RPMI1640-kasvatusliuoksessa ja sytosentrifugoitiin (Cytospin 4, Thermo Fisher Scientific, USA) näytelaseille (600 rpm, 5 min). Solut fiksoitiin 3 % paraformaldehydillä (Sigma-Aldrich; 15 min, PBS:ssa), permeabilisoitiin 0,2 % triton-X100:lla (25 min, PBS:ssa) ja vasta-aineen epäspesifinen kiinnittyminen estettiin esikäsittelemällä solut 10 % BSA:lla (30 min, PBS:ssa). Näytelasit pestiin em. käsittelyjen välissä 3 kertaa ja BSA-käsittelyn jälkeen kerran jääkylmällä PBS:lla.

Keuhkoepiteelisolujen ja makrofagien erottamiseen käytettiin epiteelisoluille tyypillisen E-kadheriinin ja makrofageilla ekspressoituvan CD14-pintamarkkerin (LPS-reseptori) immunofluoresenssivärjäystä (Anti-human CD324-FITC-vasta-aine 20 µg/ml ja Anti-human CD14-PE/Dazzle 594 1 µg/ml, BioLegend). Vasta-aineet laimennettiin PBS:een, johon oli lisätty 1 % BSA ja värjäys suoritettiin peitinlasien alla yön yli +4°C lämpötilassa. Tämän jälkeen näytelasit pestiin PBS:ssa (5 min) ja värjättiin DAPI:lla (0,5 µg/ml, 5 min). Näytteet säilytettiin pimeässä +4°C:ssa ja analysoitiin 2 viikon kuluessa. Vertailusarjan näytteet (perinteinen keuhkosolujen mikrotumatesti) värjättiin akridiinioranssilla ja DAPI:lla kuten aiemmin. Ennen analyysiä näytelasit koodattiin. Näytteet analysoitiin AXIO Imager.Z1 -fluoresenssimikroskooppilla (Zeiss, Saksa), joka oli varustettu DAPI/FITC/TexasRed-kolmoissuodattimella (ChromaTechnology Corp., USA). NM-400 ja NM-401-sarjojen näytelasit skannattiin opetuskäyttöä varten digitaaliseen muotoon (Pannoramic 250 Flash III, 3DHISTECH Ltd., Unkari; DAPI-, FITC- ja TexasRed-suodattimet; 200-kertainen suurennos) ja mikrotuma-analyysin suoritettiin hyödyntämällä CaseViewer –ohjelmaa (versio 2.4, 3DHISTEC Ltd.), jossa mikrotumat voitiin annotoida myöhempää tarkastelua varten. Näiden näytteiden osalta lopullisen analyysin suoritti tutkijoiden välisten tulosten vertailun jälkeen eri tutkija. Sytostaasi määritettiin laskemalla CBPI-

indeksi 200 keuhkoepiteelisolusta ja mikrotumafrekvenssi analysoimalla 1000 kaksitumaista keuhkoepiteelisolua näytelasia kohden.

3.2.8 Tulehdustekijöiden määrittäminen kasvatusliuoksesta

Tulehdustekijät IL-1 β ja TNF- α määritettiin altistettujen makrofagien ja yhteisviljelmien kasvatusliuoksista virtausytometrillä (CytoFLEX S, Beckman Coulter, USA) Human Enhanced Sensitivity Cytometric Bead Array Flex Set -kittejä (BD Biosciences, #561521, #561516 ja #561509) käyttäen valmistajan ohjeen mukaan. Menetelmässä eri sytokiinit määritetään samasta näytteestä erotellen ne kutakin sytokiinia pyydystäviin helmiin konjugoitujen fluorokromien (APC ja APC-Cy7) määrän perusteella. Sytokiinimolekyylejä tunnistaneet vasta-aineet kvantifioidaan sekundäärisellä PE-fluorokromiin konjugoidulla vasta-aineella fluoresenssin keskiarvoa käyttäen. Vasta-ainekäsittelyt suoritettiin suodatinkuoppalevyllä ja konsentraatiot määritettiin interpoloimalla standardikäyrältä GraphPad Prism 9 -ohjelmistoa (versio 9.1.1, GraphPad Software, USA) käyttäen.

3.2.9 Tilastolliset analyysit

Tilastoanalyysit suoritettiin GraphPad Prism 9 -ohjelmistolla (versio 9.1.1, GraphPad Software, USA). Tulehdustekijöiden pitoisuuksien muutokset analysoitiin kaksisuuntaisella ANOVA:lla ja Dunnettin post hoc -testillä. Mikrotumien määrää altistetuissa viljelmissä verrattiin negatiiviseen kontrolliin kaksisuuntaisella Fisherin testillä ja annosvasteet määritettiin lineaarisella regressiolla. Sytostaasin muutokset analysoitiin yksisuuntaisella ANOVA:lla ja Dunnettin testillä. Tulosten katsottiin olevan tilastollisesti merkitseviä, kun $p < 0,05$.

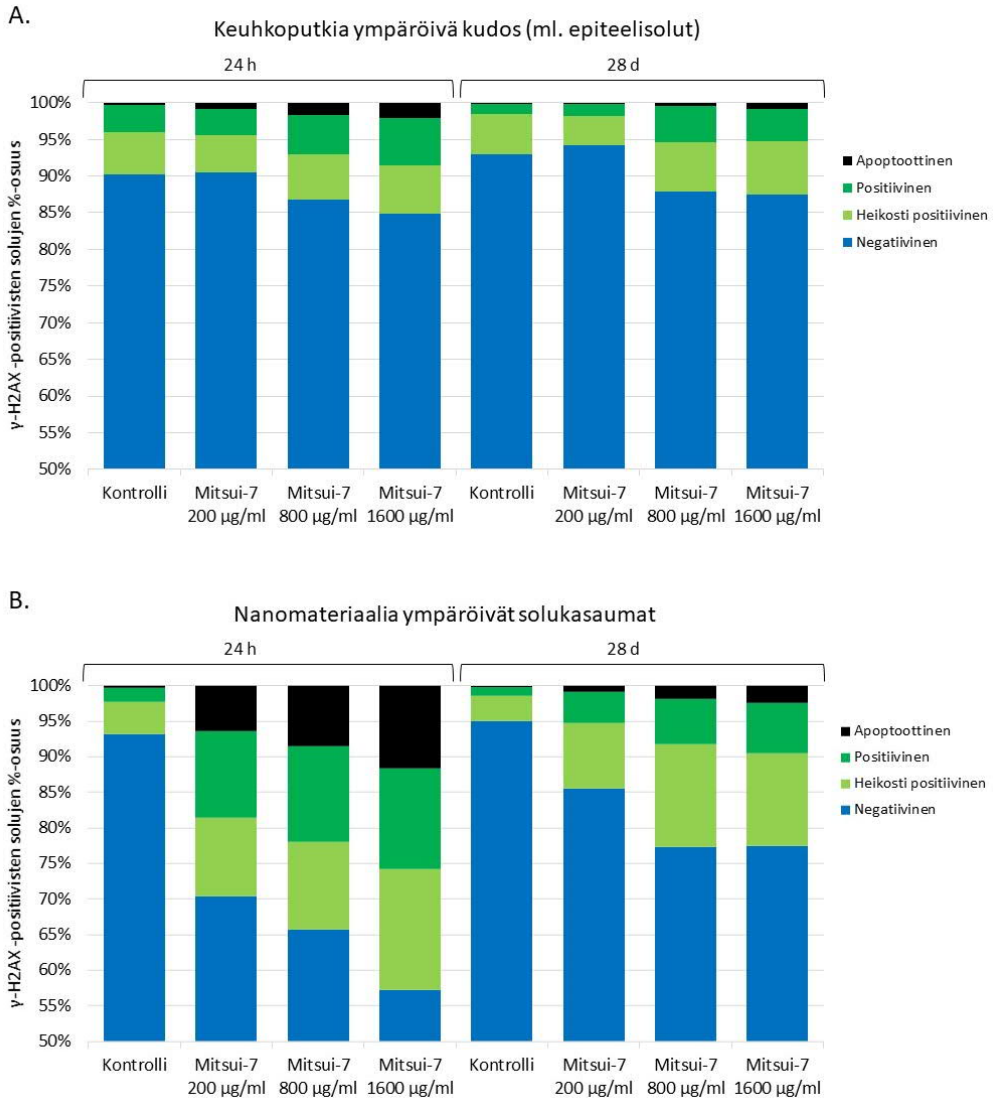
4 Tulokset

4.1 DNA:n kaksijuosteisten katkosten tunnistaminen koe-eläinten keuhkoissa

Kaksoisjuostekatkosten tunnistamiseen käytetyn γ -H2AX-värijäysmenetelmän optimointi onnistui ja värijäystä käytettiin hankkeessa sekä hiiristä että rotista kerättyjen keuhkokudosnäytteiden tutkimiseen. Seuraavissa kappaleissa on kuvattu tarkemmin kunkin näytesarjan tulokset.

4.1.1 Aspiraatiokokeet hiirillä

Menetelmän optimointiin ja validointiin käytettyjen, Mitsui-7-altistetuista hiiristä kerättyjen keuhkokudosnäytteiden γ -H2AX-värijäys paljasti, että positiivisia soluja oli runsaasti keuhkoputkien epiteelissä ja Mitsui-7-materiaalia ympäröivissä soluaggregaateissa. Muualla keuhkokudoksessa γ -H2AX-positiivisia soluja oli vain vähän. Kontrolliryhmien näytteissä γ -H2AX-positiivisia soluja havaittiin harvoin. Näytesarjan γ -H2AX-analyysin tulokset on esitetty kuvassa 5. Analysoitaessa keuhkoputken epiteelisoluja ja epiteelin viereisiä kudosalueita positiivisten solujen määrän havaittiin kohonneen erityisesti kahden korkeimman altistusannoksen seurauksena molemmissa tutkituissa aikapisteissä. Myös apoptoottisten solujen osuus oli kohonnut. Gamma-H2AX-analyysi toistettiin keskittyen kudoksenäytteissä havaittuihin solukasaumiin. Näillä alueilla γ -H2AX-positiivisia soluja oli huomattavasti enemmän erityisesti 24 tunnin aikapisteessä. Myös apoptoottisten solujen osuus oli korkea. Sekä keuhkoputkia ympäröivässä kudoksessa että materiaalia ympäröivissä solukasaumissa γ -H2AX-positiivisuus oli vähäisempää 28 päivän seurantajakson jälkeen.



Kuva 5. Gamma-H2AX-positiivisten solujen osuus kontrolliryhmän ja Mitsui-7-altistettujen C57BL/6-hiirten keuhkokudoksessa A) keuhkoputkien epiteelisolualueilla ja B) nanomateriaalia ympäröivissä granolomatoottisissa solukasaumissa. Negatiivisten, heikosti positiivisten, positiivisten ja apoptoottisten solujen prosenttiosuudet analysoiduilla alueilla 24 tuntia ja 28 päivää kerta-aspiraation jälkeen annoksilla 200, 800 ja 1600 µg/ml.

Apoptoottiset solut päätettiin rajata tilastollisen tarkastelun ulkopuolelle, koska niissä on käynnistynyt ohjelmoitu solukuolema, jonka seurauksena DNA pilkkoutuu. Tilastollinen testaus suoritettiin käyttäen γ -H2AX-positiivisia kohtia sisältäneiden solujen (positiiviset ja heikosti positiiviset solut) osuutta kaikista analysoiduista soluista. Keuhkoputkia ympäröivän kudoksen γ -H2AX-positiivisuus ei ollut tilastollisesti merkitsevästi lisääntynyt verrattaessa altistettuja ryhmiä kontrollieläimiin, mutta tuloksissa todettiin merkitsevä annosvaste 28 päivää altistuksen jälkeen (lineaarinen regressio, $p=0,0444$, $R^2=0,26$). Nanomateriaalia ympäröivissä solukasautumissa havaittu lisääntynyt γ -H2AX-positiivisuus oli tilastollisesti merkitsevää kaikkien altistusannosten osalta 24 tunnin aikapisteessä kontrolliryhmään verrattuna (1-suuntainen ANOVA, Dunnettin parivertailu, $p<0,005$), ja lisäksi havaittiin merkitsevä annosvaste (lineaarinen regressio, $p=0,0012$, $R^2=0,54$). Solukasautumien γ -H2AX-positiivisuus oli edelleen tilastollisesti merkitsevää 28 päivän seurantajakson jälkeen kahden korkeimman annoksen (800 ja 1600 $\mu\text{g/ml}$) osalta (1-suuntainen ANOVA, Dunnettin parivertailu, $p<0,05$), ja edelleen havaittiin myös merkitsevä annosvaste (lineaarinen regressio, $p=0,0149$, $R^2=0,35$).

Saatuja γ -H2AX-tuloksia verrattiin muihin samoista hiiristä kerättyihin analyysituloksiin, jotka on koostettu taulukkoon 5. Tulokset on aiemmin raportoitu NANoREG-projektin yhteydessä (Norppa ym. 2016), ja osa niistä on julkaistu osana tieteellistä artikkelia (Ilves et al. 2018). Mitsui-7-ryhmän hiirillä havaittiin komeetta-analysissä tilastollisesti merkitsevää lisääntymistä DNA-vaurioiden (1-juosteiset katkokset) tasossa keuhkokudoksen soluissa molemmissa tutkituissa aikapisteissä ja keuhkohuuhtelunäytteen soluissa 28 päivää altistuksen jälkeen. Neutrofiilien ja eosinofiilien määrä oli kohonnut keuhkohuuhtelunäytteissä 24 tuntia altistuksen jälkeen, ja useiden tulehdukseen liittyvien sytokiinien lähetti-RNA:n pitoisuus oli kohonnut keuhkokudoksessa molemmissa tutkituissa aikapisteissä. Näiden tulosten osalta suoritettiin Pearsonin korrelaatiotesti, jonka tulokset on esitetty taulukoissa 6 ja 7.

Taulukko 5. Mitsui-7-hiilinanoputkimateriaalin aiheuttamat perimämyrkylliset ja tulehdukselliset vaikutukset (keskiarvo ja keskihajonta) altistetuissa hiirissä 24 tuntia ja 28 vuorokautta altistuksen jälkeen (kerta-aspiraatio annoksilla 200, 800 ja 1600 µg/ml). DNA-vauriot analysoitiin komeettamenetelmällä (DNA:n %-osuus komeetan hännässä), neutrofilia ja eosinofilia määritettiin solulaskennalla mikroskooppilaseilta (solumäärä/3 näkökenttää) ja IL-1β, TNF-α, IL-6 ja IL-13 sytokiinien lähettiRNA-pitoisuudet määritettiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella polymeerasiketjureaktiolla (RT-qPCR).

	DNA-vauriot ^a	DNA-vauriot ^b	Neutrofilia ^a	Eosinofilia ^a	IL-1β ^b	TNF-α ^b	IL-6 ^b	IL-13 ^b
24 h								
Kontrolli	5,11 (1,06)	8,88 (0,42)	7,58 (3,58)	0,00 (0,00)	96423,91 (41682,26)	6544,01 (3744,86)	1346,18 (328,16)	53,83 (19,14)
200 µg/ml	6,37 (0,66)	9,47 (0,44)	4,84 (1,30)	2,25 (0,43)	118485,86 (24896,51)	10327,30 (1101,90)	25878,96 (10683,71)	3912,49 (1234,79)
800 µg/ml	5,85 (0,96)	9,54 (0,87)	7,17 (2,69)	1,25 (1,50)	254197,88 (73451,72)	17139,85 (2925,07)	43147,98 (13861,06)	1213,23 (915,11)
1600 µg/ml	5,30 (1,14)	10,79 (0,97)						
28 d								
Kontrolli	5,35 (0,84)	11,05 (0,80)	0,08 (0,14)	0,08 (0,14)	103751,77 (29631,57)	4417,24 (2897,45)	36,54 (31,97)	3254,57 (5637,08)
200 µg/ml	7,74 (1,10)	9,27 (1,11)	0,08 (0,14)	0,17 (0,17)	108216,74 (34951,16)	6417,79 (4506,37)	339,86 (216,00)	344,05 (584,37)
800 µg/ml	6,83 (1,91)	8,91 (0,70)	0,42 (0,36)	0,08 (0,14)	108102,79 (31632,67)	21966,93 (8483,70)	890,33 (352,85)	6228,33 (5924,97)
1600 µg/ml	6,35 (1,25)	11,40 (2,25)						

^aAnalyyysi tehty keuhkokuuhuteluäytteestä, ^bAnalyyysi tehty keuhkokudosnäytteestä

Taulukko 6. Mitsui-7-sarjan Pearsonin korrelaatiotestin tulos (r) ja tilastollinen merkitsevyys (p) 24 tuntia aspiraatioaltistuksen jälkeen kerätystä keuhkokuuhdelu- ja keuhkokudosnäytteistä määritettyjen DNA-vaurioita ja tulehdusta mittaavien analyysien osalta.

24 h	DNA-vauriot ^a	DNA-vauriot ^b	Neutrofilia ^a	Eosinofilia ^a	IL-1 β ^b	TNF- α ^b	IL-6 ^b	IL-13 ^b
γ -H2AX ^{1,b}	-0,083 p=0,380	0,262 p=0,163	0,112 p=0,364	0,293 p=0,177	0,489 p=0,053	0,327 p=0,150	0,456 p=0,068	0,084 p=0,398
γ -H2AX ^{2,b}	0,228 p=0,198	0,622 p=0,005	-0,282 p=0,187	0,425 p=0,084	0,672 p=0,008	0,615 p=0,017	0,752 p=0,002	0,498 p=0,050
DNA-vauriot ^a		0,137 p=0,307	-0,748 p=0,003	0,067 p=0,418	0,261 p=0,206	0,303 p=0,169	0,292 p=0,178	0,392 p=0,104
DNA-vauriot ^b			-0,097 p=0,382	-0,114 p=0,362	0,106 p=0,371	0,337 p=0,142	0,190 p=0,277	0,217 p=0,249
Neutrofilia ^a				-0,120 p=0,355	-0,094 p=0,386	-0,164 p=0,305	-0,194 p=0,272	-0,337 p=0,142
Eosinofilia ^b					-0,001 p=0,498	0,328 p=0,149	0,464 p=0,064	0,827 p<0,001
IL-1 β ^b						0,671 p=0,008	0,795 p=0,001	-0,101 p=0,378
TNF- α ^b							0,789 p=0,001	0,124 p=0,350
IL-6 ^b								0,313 p=0,161

¹ γ -H2AX-analyysi epiteelikudoksessa, ² γ -H2AX-analyysi solukasautumissa, ^aAnalyysi tehty keuhkokuuhdelunäytteestä, ^bAnalyysi tehty keuhkokudosnäytteestä

Taulukko 7. Mitsui-7-sarjan Pearsonin korrelaatiotestin tulos (r) ja tilastollinen merkitsevyys (p) 28 vuorokautta aspiraatioalvistuksen jälkeen kerätystä keuhkokuuhutelu- ja keuhkokudosnäytteistä määritettyjen DNA-vaurioita ja tulehdusta mittaavien analyysien osalta.

28 d	DNA-vauriot ^a	DNA-vauriot ^b	Neutrofilia ^a	Eosinofilia ^a	IL-1 β ^b	TNF- α ^b	IL-13 ^b	TGF- β ^b
γ -H2AX ^{1,b}	-0,416 <i>p</i> =0,054	0,221 <i>p</i> =0,205	0,323 <i>p</i> =0,153	-0,053 <i>p</i> =0,436	0,175 <i>p</i> =0,293	0,620 <i>p</i> =0,016	0,347 <i>p</i> =0,135	0,420 <i>p</i> =0,099
γ -H2AX ^{2,b}	-0,028 <i>p</i> =0,460	0,069 <i>p</i> =0,400	0,297 <i>p</i> =0,174	-0,107 <i>p</i> =0,371	-0,178 <i>p</i> =0,290	0,624 <i>p</i> =0,015	0,828 <i>p</i> <0,001	0,350 <i>p</i> =0,146
DNA-vauriot ^a		-0,301 <i>p</i> =0,129	0,079 <i>p</i> =0,404	-0,154 <i>p</i> =0,316	-0,192 <i>p</i> =0,275	0,143 <i>p</i> =0,329	0,248 <i>p</i> =0,219	-0,288 <i>p</i> =0,195
DNA-vauriot ^b			-0,656 <i>p</i> =0,010	-0,110 <i>p</i> =0,367	-0,034 <i>p</i> =0,459	-0,165 <i>p</i> =0,304	-0,386 <i>p</i> =0,108	-0,112 <i>p</i> =0,371
Neutrofilia ^a				0,140 <i>p</i> =0,332	0,085 <i>p</i> =0,397	0,200 <i>p</i> =0,267	0,096 <i>p</i> =0,384	0,540 <i>p</i> =0,043
Eosinofilia ^b					0,308 <i>p</i> =0,165	-0,233 <i>p</i> =0,234	-0,232 <i>p</i> =0,234	0,143 <i>p</i> =0,337
IL-1 β ^b						0,220 <i>p</i> =0,246	-0,271 <i>p</i> =0,197	-0,365 <i>p</i> =0,135
TNF- α ^b							0,715 <i>p</i> =0,004	-0,053 <i>p</i> =0,438
IL-13 ^b								0,008 <i>p</i> =0,491

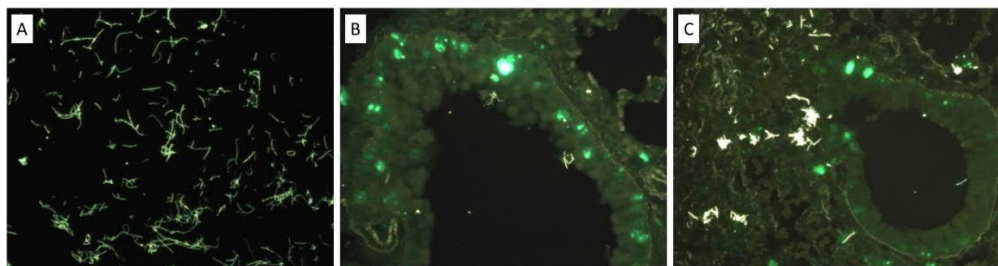
¹ γ -H2AX-analyysi epiteelikudoksessa, ² γ -H2AX-analyysi solukasautumissa, ^aAnalyysi tehty keuhkokuuhutelnäytteestä, ^bAnalyysi tehty keuhkokudosnäytteestä

Korrelaatiotestin perusteella 24 tuntia aspiraatioaltistuksen jälkeen kerätyissä näytteissä materiaaliaggregaatteja ympäröivissä solukasautumissa havaittu annosvasteinen γ -H2AX-positiivisuus oli yhteydessä keuhkokudoksen solujen DNA:n yksijuostekatkoksiin ja tulehdusta edistävien sytokiinien (IL-1 β , TNF- α , IL-6 ja IL-13) mRNA-tuotannon aktivoitumiseen. Keuhkohuuhtelunäytteen DNA-vaurioiden määrä oli käänteisessä yhteydessä huuhtelunäytteen neutrofiliaan, ja huuhtelunäytteen eosinofilia korreloi vahvasti keuhkokudoksen IL-13 sytokiinin mRNA-tuotannon kanssa. Lisäksi eri sytokiinien mRNA-tasojen välillä oli vahvaa korrelaatiota.

Myös 28 vuorokautta altistuksen jälkeen γ -H2AX-positiivisuuden havaittiin korreloivan tulehdusta edistävien sytokiinien mRNA-tuotannon kanssa. Gamma-H2AX positiivisuus keuhkoputkien epiteelisoluissa korreloi TNF- α -sytokiinin kanssa ja solukasautumissa TNF- α - ja IL-13-sytokiinien kanssa. Keuhkohuuhtelunäytteiden neutrofilia oli yhteydessä TGF- β -sytokiinin mRNA:n määrään keuhkokudoksenäytteissä. TNF- α - ja IL-13-sytokiinien välillä havaittiin vahva korrelaatio.

Molempien tutkittujen aikapisteiden osalta nähtiin negatiivinen korrelaatio keuhkohuuhtelunäytteen neutrofiilimäärän ja DNA-vaurioiden välillä, 24 tuntia altistuksen jälkeen keuhkohuuhtelunäytteen solujen ja 28 vuorokautta altistuksen jälkeen keuhkokudoksen solujen osalta.

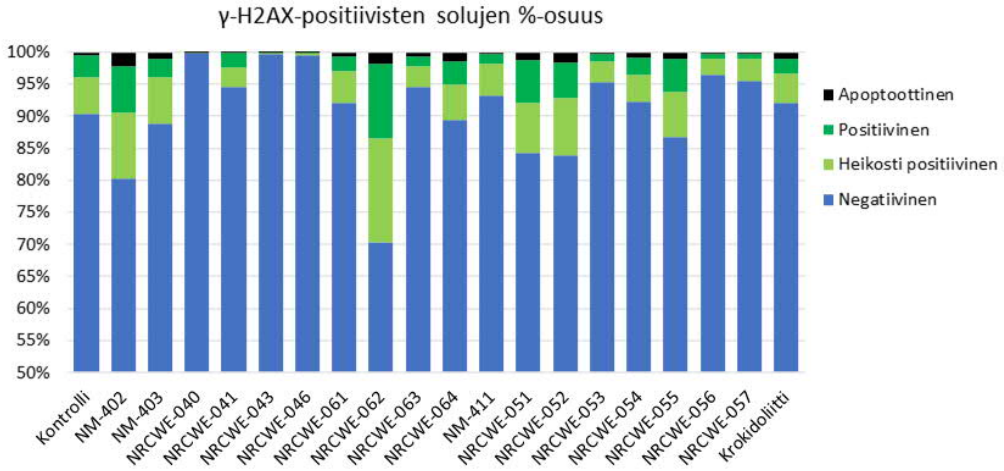
Pimeäkenttä- ja fluoresenssikuvia yhdistävällä DMF-tekniikalla (dual mode fluorescence) varustetulla pimeäkenttämikroskoopilla suoritetun tarkastelun perusteella Mitsui-7-hiilinanoputkia oli hiirten keuhkoputkien epiteelissä 24 tuntia aspiraatioaltistuksen jälkeen ja suuria määriä materiaalia näkyi kudoksessa edelleen 28 päivää myöhemmin (Kuva 6). Materiaali oli osin suorassa kontaktissa γ -H2AX-positiivisten solujen kanssa, mutta γ -H2AX-positiivisuutta havaittiin myös soluissa, joiden välittömässä läheisyydessä ei näkynyt hiilinanoputkia.



Kuva 6. Pimeäkenttä- ja fluoresenssikuvia yhdistävällä DMF-tekniikalla (dual mode fluorescence) varustetulla pimeäkenttämikroskoopilla kuvattua Mitsui-7 hiilinanoputkimateriaalia A) dispersiona sekä B) keuhkoputken epiteelissä 24 tuntia ja C) 28 päivää aspiraatioaltistuksen jälkeen. Gamma-H2AX-värjätyt solut näkyvät kudokseteissä vihreästi fluoresoivina ja hiilinanoputket erottuvat valkoisina (400-kertainen suurennos).

4.1.2 Instillaatiokokeet hiirillä

Tanskan työterveyslaitoksen (NRCWE) intratrakealisista instillaatioaltistuksista keräämien keuhkokudosnäytteiden γ -H2AX-analyysin tulokset on esitetty kuvassa 7. Gamma-H2AX-positiivisuutta havaittiin keuhkoputkien epiteelisoluissa ja materiaaliaggregaattien ympärillä. Kontrolliryhmien näytteissä γ -H2AX-positiivisuutta oli vain vähän. Keuhkoputkien epiteelistä analysoitu γ -H2AX-positiivisuus vaihteli huomattavasti eri hiilinanoputkimateriaalien välillä, ja osassa näytteistä havaittiin kontrolliryhmää matalampi γ -H2AX-taso. Korkein DNA:n kaksoisjuostekatkosten taso havaittiin NM-402, NRCWE-62, NRCWE-51, NRCWE-52 ja NRCWE-55 hiilinanoputkialtistusten jälkeen. Näistä materiaaleista kaksi ensiksi mainittua on moniseinäisiä ja muut kolme yksiseinäisiä hiilinanoputkia, mutta ne ovat kaikki muokkaamattomia ja melko ohuita kuituja.



Kuva 7. Negatiivisten, heikosti positiivisten, positiivisten ja apoptoottisten solujen prosenttiosuudet analysoiduilla keuhkokudosalueilla 28 päivää intratrakeaalisen instillaatioaltistuksen jälkeen.

Tilastollinen testaus suoritettiin käyttäen γ-H2AX-positiivisia kohtia sisältävien solujen (positiiviset ja heikosti positiiviset solut) osuutta kaikista analysoiduista soluista. Tilastollisesti merkitsevä γ-H2AX-positiivisuus verrattuna kontrolliryhmään havaittiin vain kahden hiilinanoputkimateriaalin osalta. DNA:n kaksoisjuostekatkokosten määrä oli suoritettujen analyysien perusteella kohonnut hiirten keuhkoputkien epiteelissä ja sitä ympäröivässä kudoksessa 28 vuorokautta altistuksen jälkeen moniseinäisillä NM-402- ja NRCWE-062-hiilinanoputkilla ($p < 0,01$ ja $p < 0,001$; 1-suuntainen ANOVA, Dunnettin parivertailu; Taulukko 8).

Instillaationäytesarja sisälsi materiaaliominaisuuksiltaan erilaisia hiilinanoputkia, ja tärkeimpien ominaisuuksien, kuten funktionalisoinnin, kuidun paksuuden ja pituuden sekä BET-pinta-alan yhteyttä γ-H2AX-positiivisuuteen tutkittiin tilastollisella testauksella (Taulukko 9). Kategoristen ominaisuuksien osalta käytettiin 1-suuntaista varianssianalyysia (ANOVA) ja jatkuvien muuttujien osalta lineaarista regressioanalyysia.

Tutkituista materiaaliominaisuuksista kuidun pituus oli 1-suuntaisen varianssianalyysin perusteella yhteydessä γ-H2AX-analyysin tuloksiin ($p = 0,008$). Tulosten tarkempi analyysi Dunnettin parivertailulla osoitti, että mikään pituuden perusteella luokitelluista ryhmistä ei kuitenkaan eronnut tilastollisesti merkitsevästi kontrolliryhmästä. Muut tutkitut materiaaliominaisuudet eivät olleet tilastollisesti merkitsevästi yhteydessä γ-H2AX-analyysin tuloksiin. Kuidun BET-pinta-alan ja γ-H2AX-positiivisuuden regressioanalyysin

tulokset antoivat aihetta tulosten tarkempaan tarkasteluun. Kun regressioanalyysi tehtiin vain moniseinäisten hiilinanoputkien (MWCNT) osalta, havaittiin BET-pinta-alan ja γ -H2AX-positiivisuuden välillä tilastollisesti merkitsevä yhteys ($p=0,0229$, $R^2=0,1122$).

Taulukko 8. Instillaationäytesarjaan liittyvät analyysitulokset: keskiarvo (keskihajonta), n=analysoitujen näytteiden lukumäärä. Altistusryhmistä on analysoitu γ -H2AX-positiivisten solujen osuus keuhkokudoksessa, DNA-vaurioiden määrä (hajonneen DNA:n %-osuus) keuhkokuuhtelunäytteen ja keuhkokudoksen soluissa ja neutrofiilien lukumäärä keuhkokuuhtelunäytteessä. Eri hiilinanoputki-materiaalien vasteita verrattiin kontrolliryhmään 1-suuntaisella varianssianalyysillä ja Dunnettin parivertailulla (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Materiaali	Gamma-H2AX ^b	DNA-vauriot ^a	Dna-vauriot ^b	Neutrofilia ^a
Kontrolli	7,59 (5,63) n=16	3,68 (2,13) n=34	5,15 (2,85) n=33	549 (741) n=36
NM-402	17,97 (5,23) n=3 **	3,06 (0,47) n=7	7,41 (5,33) n=7	16102 (8265) n=6 **
NM-403	9,89 (2,36) n=3	2,75 (0,36) n=6	2,77 (0,70) n=6	22948 (25850) n=7 ***
NRCWE-040	0,09 (0,08) n=3	4,33 (1,20) n=7	4,20 (1,20) n=7	3040 (1923) n=7
NRCWE-041	5,56 (4,76) n=3	3,81 (0,57) n=7	6,51 (2,26) n=7	4928 (2777) n=7
NRCWE-043	0,27 (0,10) n=3	3,67 (1,76) n=7	5,56 (1,60) n=7	2113 (2105) n=7
NRCWE-046	0,49 (0,69) n=3	3,41 (0,43) n=7	3,90 (1,46) n=7	6150 (4809) n=7
NRCWE-061	7,18 (4,09) n=3	2,41 (0,49) n=7	2,97 (0,55) n=7	38182 (17575) n=7 ***
NRCWE-062	27,69 (4,18) n=3 ***	4,66 (0,71) n=7	3,40 (0,91) n=7	6050 (5534) n=7
NRCWE-063	4,76 (1,46) n=3	7,64 (0,47) n=7 ***	4,91 (1,64) n=7	2546 (2389) n=7
NRCWE-064	8,98 (4,36) n=3	6,91 (1,01) n=7 ***	4,97 (1,08) n=7	1726 (1143) n=7
NM-411	6,62 (0,51) n=3	2,73 (0,56) n=7	6,82 (6,87) n=5	7372 (5775) n=7
NRCWE-051	14,23 (5,21) n=3	4,33 (0,94) n=7	8,58 (4,17) n=5	31098 (22256) n=7 ***
NRCWE-052	14,32 (2,74) n=3	3,26 (0,78) n=7	9,25 (7,90) n=6 *	6490 (4530) n=7
NRCWE-053	4,42 (2,35) n=3	2,99 (0,60) n=7	7,93 (2,96) n=7	1899 (1275) n=7
NRCWE-054	6,61 (1,25) n=3	3,83 (1,15) n=7	10,18 (4,43) n=6 **	13432 (11450) n=7 *
NRCWE-055	12,25 (1,62) n=3	3,07 (0,59) n=7	2,47 (0,70) n=7	8829 (6583) n=7
NRCWE-056	3,42 (0,62) n=3	3,49 (0,62) n=7	2,91 (1,00) n=7	10348 (8568) n=7
NRCWE-057	4,09 (0,82) n=3	2,77 (0,65) n=7	2,84 (0,68) n=7	1728 (1810) n=7
Krokidoliitti	7,51 (2,59) n=3	5,19 (0,69) n=7	4,47 (0,72) n=7	6831 (8826) n=6

^aAnalyyysi tehty keuhkokuuhtelunäytteestä, ^bAnalyyysi tehty keuhkokudosnäytteestä

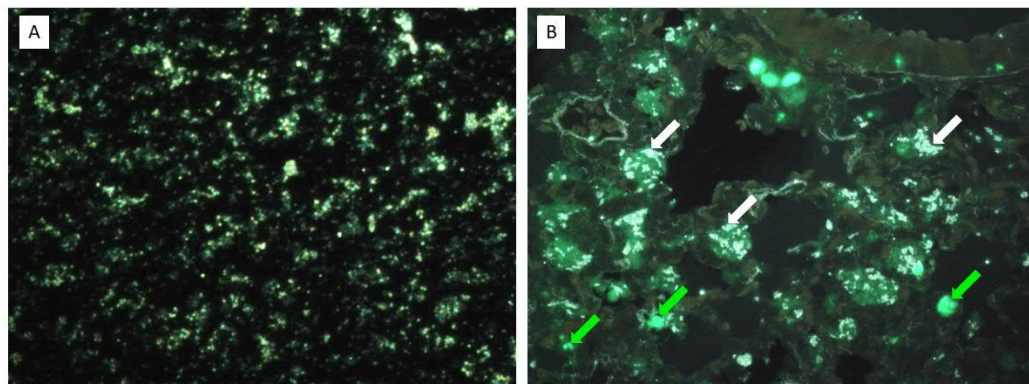
Taulukko 9. Materiaaliominaisuuksien yhteys havaittuun γ -H2AX-positiivisuuteen 1-suuntaisessa varianssianalyysissä (kuitutyyppi, funktionalisointi, kuidun paksuus ja pituus) tai lineaarisessa regressioanalyysissä (BET-pinta-ala).

Materiaaliominaisuus	Luokittelu tai vaihteluväli	Todennäköisyys (p) ja määrittelykerroin (R^2)
Kuitutyyppi	MWCNT, SWCNT	$p=0,9437$, $R^2=0,002$
Funktionalisointi	Perusmuotoinen, hydroksyloitu (OH), karboksyloitu (COOH), aminomuoto (NH ₂)	$p=0,1316$, $R^2=0,102$
Kuidun paksuus	<8 nm, 8–25 nm, >30 nm	$p=0,0904$, $R^2=0,093$
Kuidun pituus	1–12 μ m, 5–30 μ m, 10–50 μ m	$p=0,008$, $R^2=0,163$
BET-pinta-ala	Vaihteluväli 8,3–861 m ² /g	$p=0,0748$, $R^2=0,046$

Tanskan työterveyslaitoksen (NRCWE) hiilinanoputkialtistusten yhteydessä oli tutkittu myös perimämyrkyllisyyttä DNA:n yksijuostekatkoksia mittaavalla komeettamenetelmällä keuhkohuuhtelunäytteen ja keuhkokudosnäytteen soluista ja tulehdusvastetta määrittämällä keuhkohuuhtelunäytteen neutrofiilien määrä, mutta näytteet näihin analyyseihin oli kerätty eri hiiryksilöistä kuin γ -H2AX-analyyysiin käytetyt histopatologiset keuhkokudosnäytteet. Tässä näytesarjassa ei siksi ollut mahdollista suorittaa korrelaatio-analyyysiä γ -H2AX-tulosten ja muun taustadatan välillä. Kunkin hiilinanoputkimateriaalin aiheuttamaa vastetta verrattiin kontrolliryhmään 1-suuntaisella varianssianalyyysillä ja Dunnettin parivertailulla (Taulukko 8).

Vain harva tutkituista materiaaleista aiheutti DNA-vaurioita keuhkohuuhtelunäytteen soluissa tai keuhkokudoksessa. Moniseinäiset hiilinanoputkimateriaalit NRCWE-063 ja NRCWE-064 aiheuttivat DNA:n yksijuostekatkosten määrän nousun keuhkohuuhtelunäytteen soluissa ja yksiseinäiset hiilinanoputkimateriaalit NRCWE-052 ja NRCWE-054 keuhkokudoksessa. Neutrofiilien määrä oli tilastollisesti merkitsevästi koholla useassa altistusryhmässä, mikä osoittaa kyseisten hiilinanoputkimateriaalien aiheuttaman tulehdusreaktion jatkuvan keuhkoissa jopa 28 vuorokautta kerta-altistuksen jälkeen. DNA:n yksijuostekatkoksilla ja neutrofilialla ei ollut välitöntä yhteyttä γ -H2AX-positiivisuuteen.

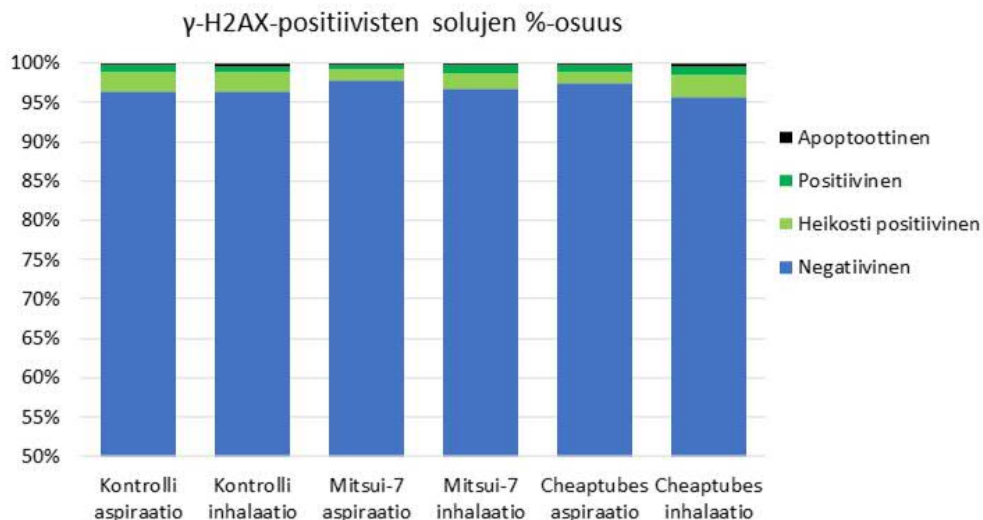
Pimeäkenttämikroskoopin DMF-tekniikalla suoritettu tarkastelu paljasti, että kaikkia tutkittuja hiilinanoputkimateriaaleja oli runsaasti keuhkokudoksessa ja solujen sisällä 28 päivää altistuksen jälkeen. Keuhkoputkia ympäröivässä kudoksessa γ -H2AX-positiivisuus ei ollut rajoittunut vain niihin soluihin, jotka olivat ottaneet nanomateriaalia sisäänsä tai soluihin, jotka olivat suorassa kontaktissa nanomateriaalin kanssa (Kuva 8). Verrokkialtisteena käytettyjä krokidoliittiasbestikuituja näkyi suuresta kuitukoosta johtuen keuhkoleikkeissä vain hyvin vähän, eikä materiaalin sijaintia suhteessa γ -H2AX-positiivisuuteen pystytty siksi tutkimaan.



Kuva 8. Pimeäkenttämikroskoopin DMF-tekniikalla kuvattua moniseinäistä NM-402-hiilinanoputkimateriaalia A) dispersiona ja B) keuhkokudoksessa 28 päivää instillaatioaltistuksen jälkeen. Gamma-H2AX-positiiviset tumat erottuvat keuhkokudoksessa vihreästi fluoresoivina (vihreät nuolet), ja nanomateriaali vaaleina rykelminä (valkoiset nuolet) (400-kertainen suurennos).

4.1.3 Inhalaatiokokeet hiirillä

Mitsui-7- ja Cheaptubes-materiaaleilla suoritetuista altistuksista kerätyn näytesarjan γ -H2AX-analyysin tulokset on esitetty kuvassa 9. Analyysissä vertailtiin annoksella 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tehtyjen kerta-aspiraatioiden aiheuttamaa γ -H2AX-positiivisuutta kontrolliryhmään ja samoilla materiaaleilla suoritettuihin inhalaatioaltistuksiin. Mitsui-7-inhalaatiossa eläimiä altistettiin 4 x 4 tuntia pitoisuudelle $8.2 \pm 1.7 \text{ mg}/\text{m}^3$ ja Cheaptubes-inhalaatiossa 4 x 4 tuntia pitoisuudelle $10.8 \pm 2.8 \text{ mg}/\text{m}^3$. Koska selviä materiaaliagregaatteja oli havaittavissa vain Mitsui-7-hiilinanoputkille altistetuissa hiirissä, analyysi suoritettiin epiteelikudosalueilta. Analysoiduilla alueilla oli vain vähän γ -H2AX-positiivisuutta, eikä ryhmien välillä havaittu juurikaan eroja.



Kuva 9. Gamma-H2AX-positiivisten solujen osuus hiirten keuhkokudoksessa 24 tuntia Mitsui-7- ja Cheaptubes-hiilinanoputkimateriaaleilla suoritettujen altistusten jälkeen. Negatiivisten, heikosti positiivisten, positiivisten ja apoptoottisten solujen prosentiosuudet analysoiduilla alueilla. Aspiraatioaltistus suoritettu kerta-annoksella 200 $\mu\text{g}/\text{aspiraatio}$. NRCWE-006-inhalaatiossa eläimiä altistettiin 4 x 4 tuntia annokselle $8.2 \pm 1.7 \text{ mg}/\text{m}^3$ ja NRCWE-007-inhalaatiossa 4 x 4 tuntia annokselle $10.8 \pm 2.8 \text{ mg}/\text{m}^3$.

Tilastollinen testaus suoritettiin käyttäen γ -H2AX-positiivisiä kohtia sisältäneiden solujen (positiiviset ja heikosti positiiviset solut) osuutta kaikista analysoiduista soluista (1-suuntainen ANOVA). Ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja. Gamma-H2AX-positiivisten solujen osuus analysoiduissa näytteissä oli kauttaaltaan matala eikä siksi mahdollistanut altistusmenetelmien tarkempaa vertailua.

4.1.4 Kokeet geenimuunnelluilla rotilla

Hankkeessa käytetyn γ -H2AX-värjäysmenetelmän todettiin soveltuvan myös rottien keuhkokudoksen värjäykseen. Kuitenkin sekä geenimuunneltujen p53^{+/-}-rottien että villityyppisten verrokkien näytteissä havaittiin runsasta γ -H2AX-positiivisuutta koko keuhkokudoksen alueella ja erityisesti keuhkoputkien epiteelissä. Tämä laaja positiivisuus ei vaikuttanut olevan yhteydessä eläinten altistukseen, eikä sen havaittu vähentyneen seurantajakson aikana. Positiivisten solujen korkeasta taustatasosta johtuen γ -H2AX-analysia ei voitu suorittaa noudattaen samoja periaatteita kuin hiirinäytteiden osalta.

Työterveyslaitoksen patologi analysoi H&E-värjättyt keuhkokudosleikkeet ja havaitsi huomattavia eroja kahden tutkitun hiilinanoputkimateriaalin aiheuttamassa reaktiossa 8 kuukautta viimeisen altistuksen jälkeen. Vastoin ennako-odotuksia, syöpäkasvaimia ei löytynyt koe-eläinten keuhkoista lainkaan. Geenimuunneltujen p53^{+/-}-rottien ja villityyppisten verrokkien välillä ei havaittu juurikaan eroja. Mitsui-7-altistus aiheutti keuhkokudokseen granuloomia, joihin liittyi kollageenin muodostusta ja fibroosia. Suurin osa Mitsui-7-hiilinanoputkista vaikutti olevan granuloomien eristämää ja hiilinanoputkimateriaalia oli runsaasti solujen sisällä. Keuhkokudoksessa ei havaittu laajempaa tulehdusaktiivisuutta. NM-403-altistus aiheutti kroonista tulehdusta, makrofagiaktivaatiota ja metaplasiaa. NM-403-hiilinanoputkia havaittiin sekä solujen sisällä että vapaana keuhkokudoksessa. Alustavien arvioiden mukaan metaplastiset alueet olivat p53^{+/-}-rotilla laajempia kuin villityyppisillä eläimillä, mutta havainto pitää vielä varmistaa tarkemmilla analyyseillä.

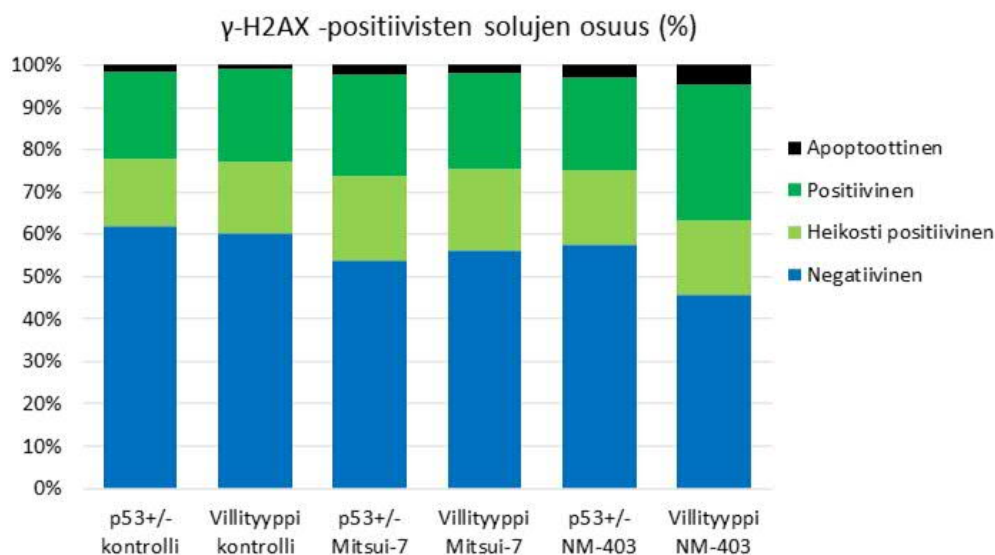
Histologisten tulosten perusteella γ -H2AX-analyysi suoritettiin Mitsui-7-altistettujen rottien osalta granulooma-alueilta ja NM-403-altistettujen rottien osalta metaplastisilta keuhkokudosalueilta. Analyysien tulokset on esitetty kuvassa 10. DNA:n kaksoisjuostekatkosten määrä oli hieman korkeampi hiilinanoputkille altistetuissa rotissa verrattuna negatiiviseen kontrolliryhmään. Eniten γ -H2AX-positiivisuutta havaittiin NM-403-altistetuilla villityyppisillä rotilla. Myös apoptoottisten solujen määrä oli hieman kohonnut metaplastisessa keuhkokudoksessa NM-403 altistuksen seurauksena.

Tilastollinen testaus suoritettiin käyttäen γ -H2AX-positiivisia kohtia sisältäneiden solujen (positiiviset ja heikosti positiiviset solut) osuutta kaikista analysoiduista soluista. Havaituista eroista vain villityyppisten rottien NM-403-altistuksen aiheuttama γ -H2AX-positiivisuus oli tilastollisesti merkitsevästi kohonnut verrattuna villityyppisiin verrokkieläimiin (1-suuntainen ANOVA, Dunnettin parivertailu, $p < 0,05$). Verrokkieläinten korkea γ -H2AX-positiivisuuden taustataso vaikeutti tilastollisesti merkitsevien tulosten saamista.

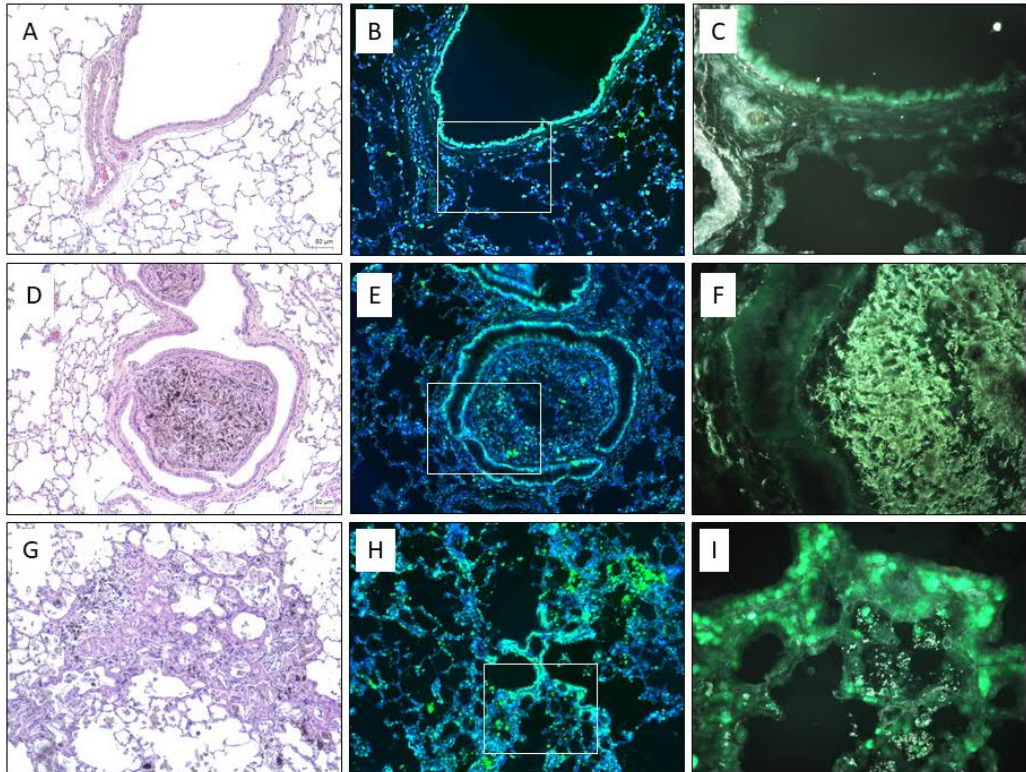
DNA:n kaksoisjuostekatkoksia sisältävien solujen tyyppin tunnistamiseksi suoritettiin kvalitatiivista vertailua tarkastelemalla rinnakkain H&E- (hematoksyliini ja eosini) ja γ -H2AX-värjättyjä kudosleikkeitä. Kuvissa 11 ja 12 on esitetty esimerkkejä H&E- ja γ -H2AX-värjättyjen leikkeiden vertailusta ja DMF-tekniikkaa hyödyntäviä pimeäkenttä-mikroskooppikuvia tutkimuksessa käytettyjen hiilinanoputki-materiaalien sijainnista suhteessa γ -H2AX-positiivisiin soluihin.

Koska geenimuunneltujen p53^{+/-}-rottien altistukset ja näytteenkeräys viivästyivät suunnitellusta, värjäys- tai analyysimenetelmää ei ehditty hankkeen puitteissa optimoimaan rotan keuhkokudoksenäytteille paremmin sopivaksi. On mahdollista, että

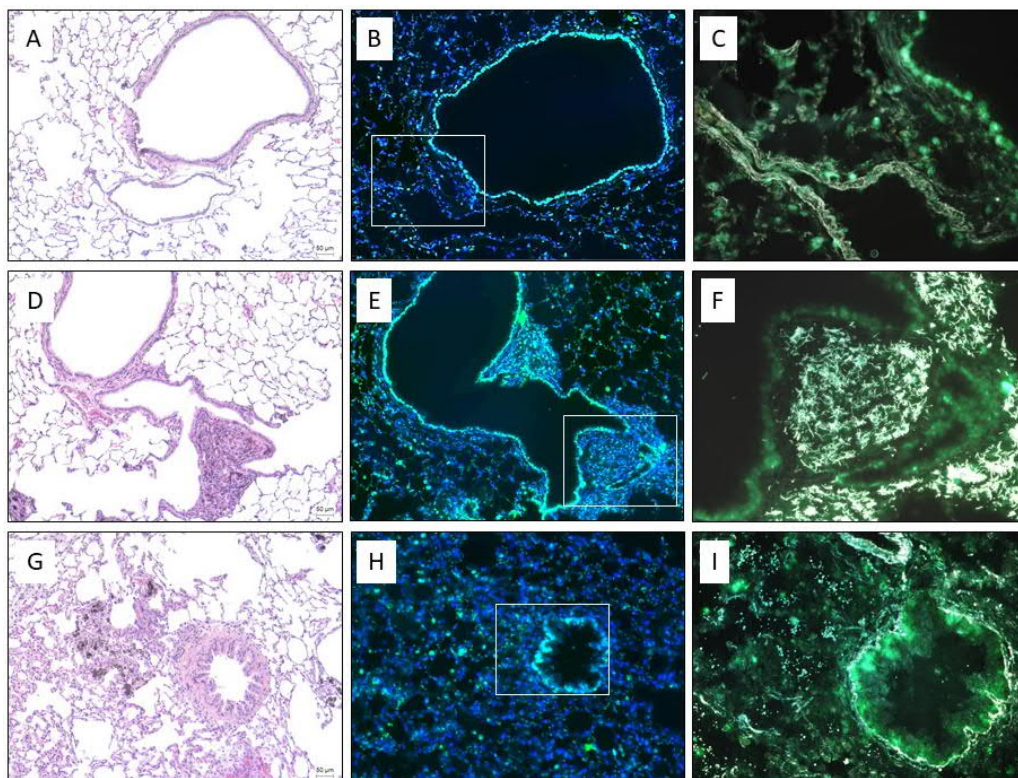
vasta-ainepitoisuutta muuttamalla tai tyramidiamplyfikaatiosta luopumalla γ -H2AX-signaalin taustatasoa saataisiin alemmaksi, mikä voisi parantaa mahdollisten erojen havaitsemista verrokkien ja altistettujen koe-eläinten välillä. INRS:n tutkimusryhmän tulehdus- ja perimämyrkyllisyysmarkkerien analyysit ovat yhä kesken, eikä lopullisia tilastollisia analyysejä pystytä vielä tekemään.



Kuva 10. Gamma-H2AX-positiivisten solujen osuus p53^{+/-}-rottien ja villityyppisten verrokkien keuhkokudoksessa 8 kuukautta altistuksen jälkeen. Negatiivisten, heikosti positiivisten, positiivisten ja apoptoottisten solujen prosenttiosuudet analysoiduilla alueilla. Solut analysoitiin granulooma-alueilta (Mitsui-7) tai metaplastisilta keuhkokudoksesta (NM-403).



Kuva 11. Geenimuunneltujen p53^{+/-}-rottien keuhkokudosnäytteiden vertailu eri värjäys- ja mikroskopiotekniikoilla: A) Normaali keuhkokudos 8 kuukautta kontrollialtistuksen jälkeen, H&E-värjäys; B) Kontrollialtistus, γ -H2AX-värjäys; C) Kontrollialtistus, pimeäkenttämikroskopia yhdistettynä fluoresenssimikroskopiaan; D) Granulooma 8 kuukautta Mitsui-7-altistuksen jälkeen, H&E-värjäys; E) Mitsui-7 -altistus, γ -H2AX-värjäys; F) Mitsui-7-altistus, pimeäkenttämikroskopia; G) Metaplastinen keuhkokudos 8 kuukautta NM-403-altistuksen jälkeen, H&E-värjäys; H) NM-403 -altistus, γ -H2AX-värjäys; I) NM-403-altistus, pimeäkenttämikroskopia.



Kuva 12. Villityyppisten verrokkirottien keuhkokudosnäytteiden vertailu eri värjäys- ja mikroskopiatekniikoilla: A) Normaali keuhkokudos 8 kuukautta kontrollialtistuksen jälkeen, H&E-värjäys; B) Kontrollialtistus, γ -H2AX-värjäys; C) Kontrollialtistus, pimeäkenttämikroskopia yhdistettynä fluoresenssimikroskopiaan; D) Granulooma 8 kuukautta Mitsui-7-altistuksen jälkeen, H&E-värjäys; E) Mitsui-7 -altistus, γ -H2AX-värjäys; F) Mitsui-7-altistus, pimeäkenttämikroskopia; G) Metaplastinen keuhkokudos 8 kuukautta NM-403-altistuksen jälkeen, H&E-värjäys; H) NM-403 -altistus, γ -H2AX-värjäys; I) NM-403-altistus, pimeäkenttämikroskopia.

4.2 Sekundäärisen genotoksisuuden tunnistaminen soluviljelmissä

Sekundääristä eli tulehdustekijöihin liittyvää genotoksisuutta testattiin kahdella erilaisella menetelmällä, joissa molemmissa makrofagit toimivat tulehdustekijöiden pääasiallisena tuottajana. Ensimmäisessä menetelmässä vain makrofagit (THP-1-solut) altistettiin testimateriaaleille, ja tulehdustekijöitä sisältävä suodatettu kasvatusliuos (conditioned medium, CM) siirrettiin keuhkosoluille (16HBE). Toisessa menetelmässä makrofagien ja keuhkosolujen yhteisviljelmää altistettiin testimateriaaleille.

4.2.1 Biologiset epäpuhtaudet

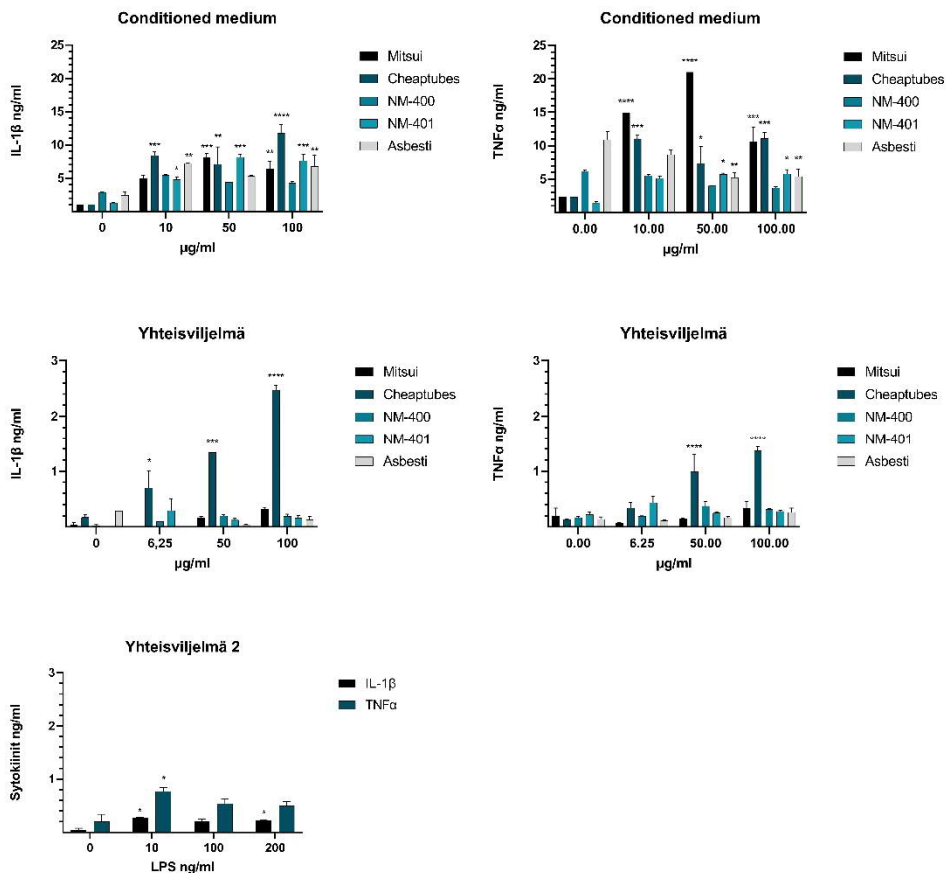
Endotoksiinitestien perusteella hiilinanoputkissa ei havaittu biologisia kontaminaatioita. Tutkituista materiaaleista mitatut endotoksiinipitoisuudet olivat alle 0,5 EU/ml, joka on Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston (US Food and Drug Administration, FDA) asettama raja-arvo inhalaatioon käytettäville nesteille. Tätä pitoisuutta pienempien endotoksiinimäärien ei oleteta aiheuttavan tulehdusvastetta myöskään soluviljelmissä.

4.2.2 Kasvatusliukseen vapautuneet tulehdustekijät

Sytokiinien IL-1 β - ja TNF α -konsentraatiot mitattiin sekä CM-kasvatusliuoksista että makrofagien ja keuhkosolujen yhteisviljelmien kasvatusliuoksista (Kuva 13). Yleisesti CM-kasvatusliuoksissa mitattiin huomattavasti suurempia sytokiinipitoisuuksia kuin yhteisviljelmistä. CM-kasvatusliuoksessa negatiivisten kontrollien IL-1 β - ja TNF α -pitoisuudet olivat keskimäärin 14.2- ja 30.2-kertaiset yhteisviljelmien negatiivisiin kontroleihin verrattuna.

Cheaptubes-hiilinanoputket aiheuttivat selkeimmän nousun IL-1 β -konsentraatioissa sekä CM- että yhteisviljelmissä. Yhteisviljelmissä tilastollisesti merkitsevää IL-1 β -lisääntymistä aiheutti lisäksi vain kemiallisena positiivisena kontrollina käytetty LPS. CM-viljelmissä sen sijaan tilastollisesti merkitsevä IL-1 β :n nousu nähtiin kaikilla muilla materiaaleilla paitsi NM-400-hiilinanoputkilla.

TNF α :n osalta suurimmat lisäykset havaittiin CM-kasvatusliuoksessa Mitsui-hiilinanoputkilla ja yhteisviljelmässä Cheaptubes-hiilinanoputkilla. Yhteisviljelmissä myös LPS aiheutti TNF α :n selkeän lisääntymisen, mutta muilla testimateriaaleilla tilastollisesti merkitseviä vaikutuksia ei esiintynyt. CM-viljelmissä tilastollisesti merkitsevää nousua TNF α -tasossa havaittiin kaikilla muilla testimateriaaleilla paitsi NM-400-hiilinanoputkilla ja krokidoliittiasbestilla, joiden osalta negatiivinen kontrolli oli selvästi muita korkeammalla tasolla.

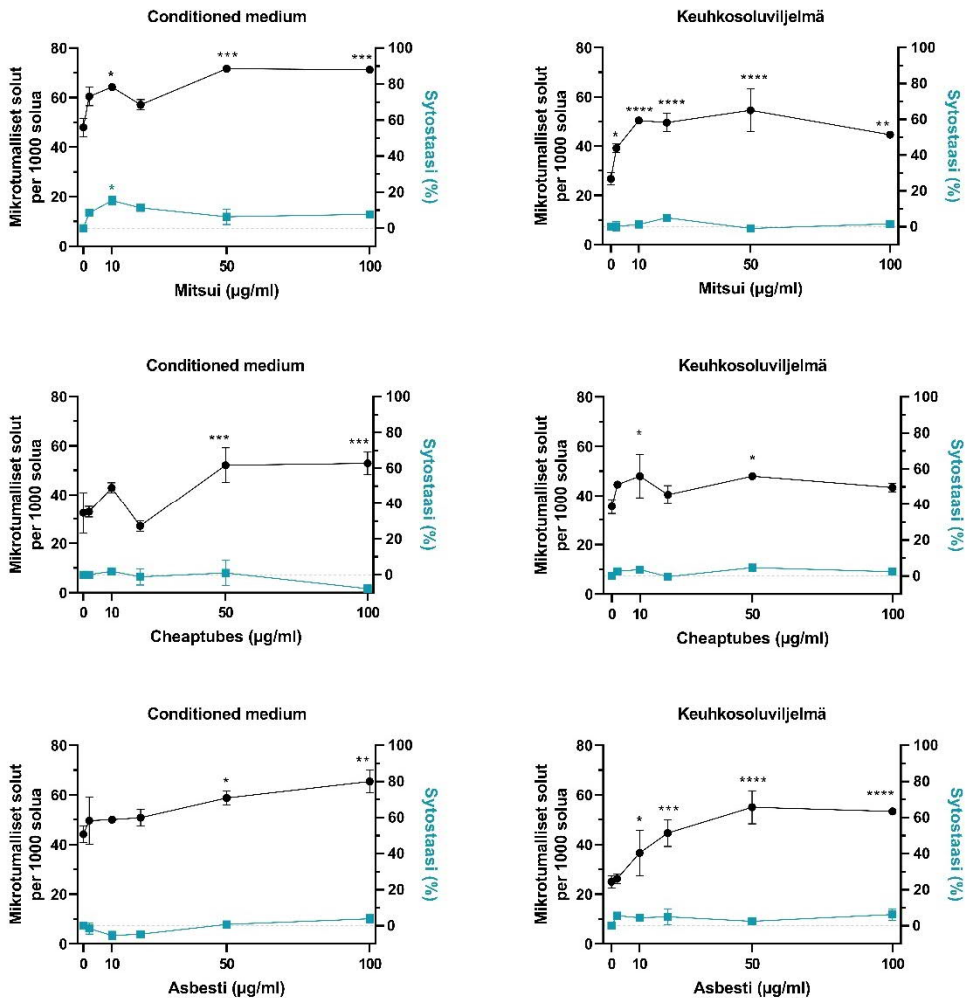


Kuva 13. Sytokiinien IL-1β- ja TNFα-konsentraatiot CM-kasvatusliuoksissa (THP-1-solujen 26 tunnin altistuksen jälkeen) sekä makrofagien ja keuhkosolujen yhteisviljelmiä kasvatusliuoksissa hiilinanoputki- (Mitsui, Cheaptubes, NM-400, NM-401), kromidoliittiasbesti- sekä lipopolysakkaridi- (LPS) käsittelyn (24 tuntia) jälkeen. Tilastollisesti merkitsevää sytokiini-konsentraation nousua havaittiin tähdillä merkityissä viljelmissä (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, 2-suuntainen ANOVA).

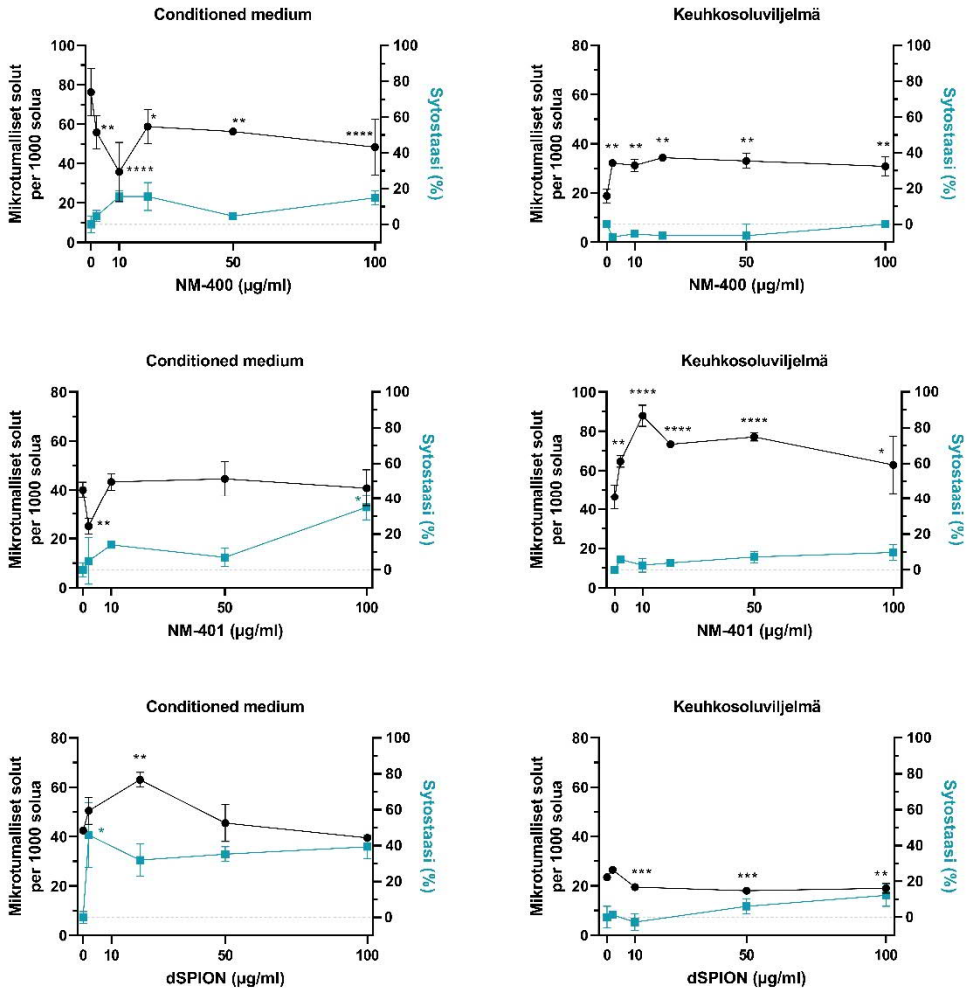
4.2.3 Mikrotumatesti

Mitsui- ja Cheaptubes-hiilinanoputket ja krokidoliittiasbesti aiheuttivat mikrotumatason nousua sekä CM-altistuksessa että perinteisessä mikrotumatestissä (kuva 14). Mitsui-hiilinanoputkien ja asbestin osalta vaikutus oli lievempi CM-viljelmissä. Mitsui tuotti CM-viljelmässä suurimmillaan 1.5-kertaisen vaikutuksen negatiiviseen kontrolliin verrattuna, kun taas perinteisessä mikrotumatestissä (keuhkosoluviljelelmä) suurin vaikutus oli 2.0-kertainen. Krokidoliittiasbestilla suurin vaikutus oli CM-viljelmillä 1.5-kertainen ja perinteisessä mikrotumatestissä 2.2-kertainen. Cheaptubes-hiilinanoputket aiheuttivat CM-viljelmissä 1.6-kertaisen vaikutuksen ja perinteisessä testissä 1.4-kertaisen vaikutuksen. NM-400- ja NM-401-hiilinanoputket sen sijaan aiheuttivat mikrotumia vain perinteisessä mikrotumatestissä, mutta CM-altistuksessa mikrotumien määrä laski osin perustason (negatiivinen kontrolli) alapuolelle (kuva 15). NM-400-hiilinanoputkilla tehdyssä kokeessa mikrotumien perustaso oli kuitenkin muita kokeita korkeampi, joten tulosta ei voi tältä osin pitää erityisen merkittävänä. Positiivisena partikkelikontrollina käytetyt dSPION-nanopartikkelit aiheuttivat mikrotumia vain CM-altistuksessa, mutta eivät perinteisessä mikrotumatestissä. Mitsui- ja Cheaptubes-hiilinanoputket sekä asbesti aiheuttivat annosvasteen CM-altistuksessa ($p=0,08$, $p=0,013$ ja $p=0,002$, lineaarinen regressioanalyysi). Perinteisessä mikrotumatestissä vain asbesti sai aikaan annosvasteen ($p=0,004$).

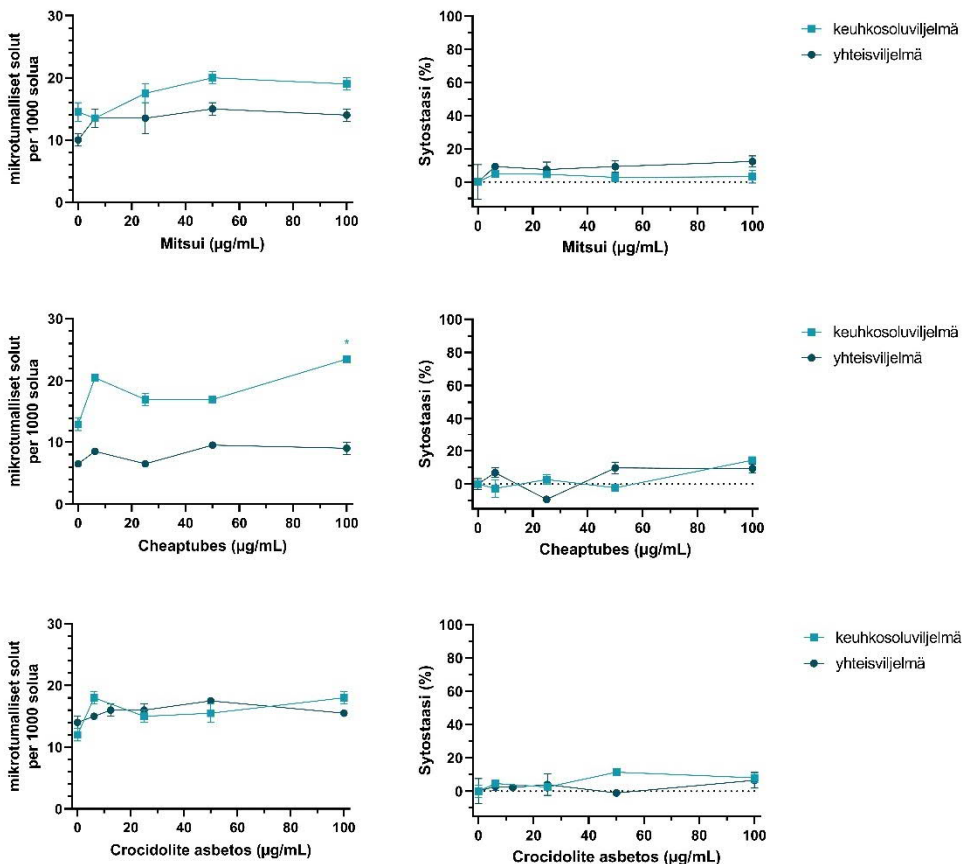
Mikään testimateriaaleista ei aiheuttanut mikrotumia yhteisviljelmissä (kuvat 16 ja 17). Toisaalta vastaavalla viljelyaikataululla toteutetussa perinteisessä mikrotumatestissä havaittiin CM-sarjasta poiketen tilastollisesti merkitsevää mikrotumatason nousua vain yksittäisillä annoksilla (Cheaptubes ja NM-400, 100 µg/ml). Yhteisviljelmissä ei myöskään havaittu annosvastetta millään altistuksella, mutta Mitsui- ja Cheaptubes-hiilinanoputket sekä LPS aiheuttivat annosvasteen keuhkosoluviljelmissä ($p=0,02$, $p=0,03$ ja $p=0,02$).



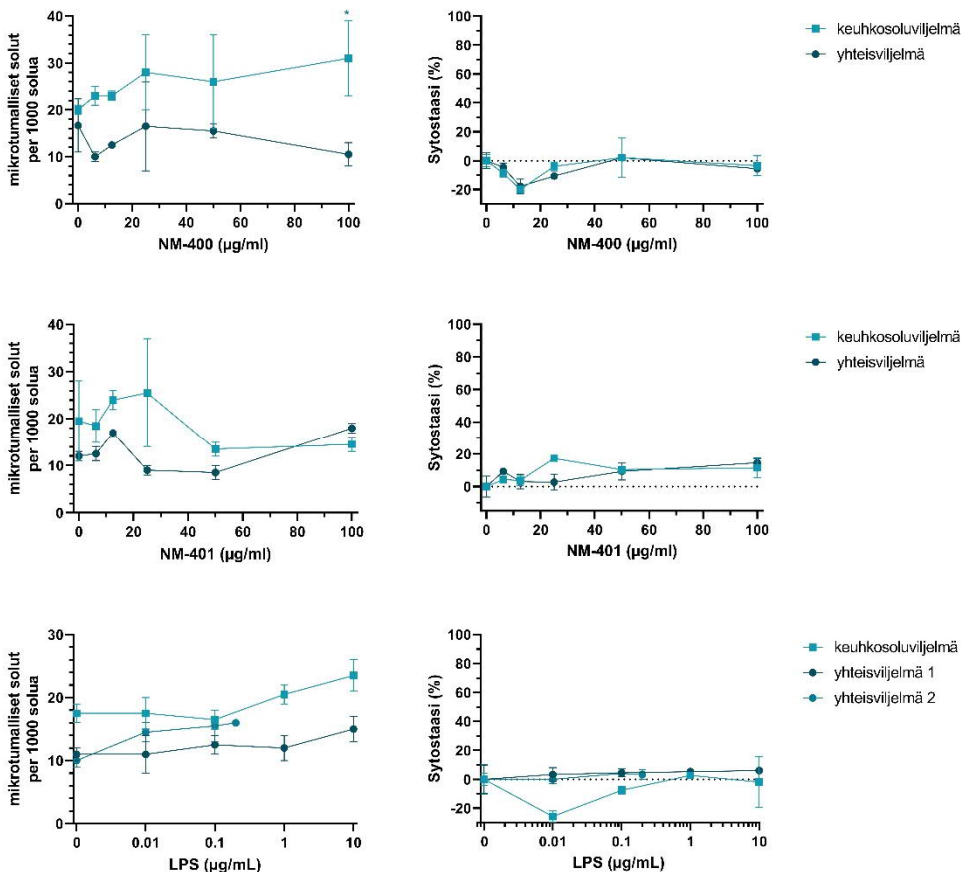
Kuva 14. Mikrotumallisten solujen lukumäärä ja sytostaasi suoraan Mitsui- ja Cheaptubes-hiilinanoputkille sekä kromidoliittiasbestille altistetuissa keuhkosoluviljelmissä (oikealla) sekä altistetuilta makrofageilta kerätyllä tulehdustekijöitä sisältävällä elatusliuoksella (Conditioned medium) altistetuissa keuhkosoluviljelmissä (vasemmalla). Viljelmiä altistettiin 22 tuntia. Kaikki materiaalit aiheuttivat tilastollisesti merkitsevää mikrotumatason nousua sekä keuhkosoluilla että CM-altistuksessa (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, kaksisuuntainen Fisherin testi).



Kuva 15. Mikrotumallisten solujen lukumäärä ja sytostaasi suoraan NM-400- ja NM-401-hiilinanoputkille sekä dekstraanilla päällystetyille superparamagneettisille rautaoksidinanopartikkeleille (dSPION) altistetuissa keuhkosoluviljelmissä (oikealla) sekä altistetuilta makrofageilta kerätyllä tulehdustekijöitä sisältävällä elatusliuoksella (Conditioned medium) altistetuissa keuhkosoluviljelmissä (vasemmalla). Viljelmiä altistettiin 22 tuntia. NM-400- ja NM-401-hiilinanoputket aiheuttivat tilastollisesti merkitsevää mikrotumatason nousua keuhkosoluviljelmissä ja toisaalta laskua CM-viljelmissä, kun taas dSPION-nanopartikkelit aiheuttivat mikrotumatason nousua CM-viljelmissä, mutta laskua keuhkosoluviljelmissä (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, kaksisuuntainen Fisherin testi).



Kuva 16. Mikrotumallisten keuhkosolujen lukumäärä (vasemmalla) ja sytostaasi (oikealla) Mitsui- ja Cheaptubes-hiilinanoputkille sekä krokidoliittiasbestille 24 tunnin ajan altistetuissa keuhkosoluviljelmissä sekä keuhko- ja tulehdussolujen yhteisviljelmissä. Yhteisviljelmien solutyypit erotettiin analyysissa E-kadheriinin ja CD14:n (LPS-reseptori) immunofluoresenssivärjäyksen avulla. Tilastollisesti merkitsevä ero mikrotumallisten solujen määrässä altistetun ja kontrolliviljelmän välillä havaittiin vain Cheaptubes-hiilinanoputkilla keuhkosoluviljelmässä (* $p=0,018$, kaksisuuntainen Fisherin testi). Materiaalit eivät näillä pitoisuuksilla aiheuttaneet tilastollisesti merkitsevää solukuolemaa tai solujakautumisen hidastumista (yksisuuntainen ANOVA).



Kuva 17. Mikrotumallisten keuhkosolujen lukumäärä (vasemmalla) ja sytostaasi (oikealla) NM-400- ja NM-401-hiilinanoputkille sekä lipopolysakkarideille (LPS) 24 tunnin ajan altistetuissa keuhkosoluviljelmissä sekä keuhko- ja tulehdussolujen yhteisviljelmissä. Yhteisviljelmien solutyypit erotettiin analyysissä immunofluoresenssivärjäyksen avulla. Tilastollisesti merkitsevä ero mikrotumallisten solujen määrässä altistetun ja kontrolliviljelmän välillä havaittiin vain NM-400-hiilinanoputkilla (* $p=0,035$, kaksisuuntainen Fisherin testi). Materiaalit eivät näillä pitoisuuksilla aiheuttaneet tilastollisesti merkitsevää solukuolemaa tai solujakautumisen hidastumista (yksisuuntainen ANOVA).

5 Pohdinta ja johtopäätökset

Syöpävaarallisuus on keskeisessä asemassa kemikaalien, mukaan lukien nanomateriaalien, riskinarvioinnissa. Riskinarviointi vaikuttaa suoraan nanomateriaalien sääntelyyn, kuten työympäristön raja-arvojen asettamiseen sekä luokitteluun ja merkitsemiseen. Nämä seikat ovat keskeisiä työsuojelussa ja työterveyden edistämisessä. Erityisesti heikkoliukoisten nanomateriaalien riskinarvioinnin kannalta on tärkeää ymmärtää, onko perimämyrkyllisyys primääristä vai onko se sekundäärinen, tulehdukseen liittyvä ilmiö, sillä primääriselle perimämyrkyllisyydelle ei voida asettaa kynnysannosta, mutta sekundäärisen vaikutuksen tapauksessa se on ehkä mahdollista. Hankkeessa selvitettiin DNA:n kaksoisjuostekatkosten roolia hiilinanoputkien perimämyrkyllisen vaikutuksen synnyssä ja kehitettiin menetelmiä DNA:n kaksoisjuostekatkosten analyysiin keuhkokudosleikkeissä sekä sekundäärinen, tulehduksesta johtuvan perimämyrkyllisen vaikutuksen tunnistamiseen keuhkosoluviljelmissä. Kehittämiämme menetelmiä voidaan hyödyntää nanomateriaalien syöpävaarallisuuden arvioinnissa.

5.1 Kaksoisjuostekatkokset keuhkokudoksessa

Tulostemme perusteella on selvää, että DNA:n kaksoisjuostekatkokset tunnistavaa γ -H2AX-värjäystä on mahdollista hyödyntää aiemmin kerättyjen, parafiiniin säilöttyjen histopatologisten kudoksetäytteiden tutkimukseen. Menetelmä soveltui hyvin hiilinanoputkialtistuksen aiheuttaman genotoksisen vaikutuksen osoittamiseen hiiren keuhkonäytteistä. Lisäksi hyödynsimme γ -H2AX-värjäysmenetelmää geenimuunneltujen ja villityyppisten rottien kudoksetäytteiden analysointiin. Värjäys antaa uutta tietoa DNA:n kaksoisjuostekatkosten määrästä ja samalla nähdään, mihin keuhkokudoksen osaan tai solutyyppeihin DNA-vaurioita on syntynyt ja onko vaikutus yhteydessä kudoksessa olevaan nanomateriaaliin ja kudokseen kertyneisiin tulehdussoluihin. Tällaisen lähestymistavan voidaan olettaa tarkentavan ja parantavan nanomateriaalien syöpävaarallisuuden arviointia.

Ammatillista altistumista nanomateriaaleille tapahtuu hengitysteitse erityisesti jauhemaisten nanopartikkelien tuotannon tai käytön yhteydessä (Kuijpers ym. 2017). Myös hiilinanoputkimateriaalien tuotantoon ja käyttöön on osoitettu liittyvän hengitystiealtistumisen riski (Hedmer ym. 2013). Yksi tutkimistamme hiilinanoputkimateriaaleista (Mitsui-7 eli NRCWE-006) on luokiteltu ihmiselle mahdollisesti syöpää aiheuttavaksi (IARC, ryhmä 2B) ja IARC on suosittanut muidenkin moniseinäisten hiilinanoputkimateriaalien syöpävaarallisuuden uudelleen arvioimista (IARC 2019). Hankkeessa käytetyt vasta-aineet mahdollistavat DNA:n kaksoisjuostekatkosten

analysoinnin jyrksijöiltä, mutta vasta-aineita vaihtamalla samaa värjäystä on mahdollista hyödyntää myös ihmisenäytteiden analysointiin työperäisen altistumisen jälkeen. Myös arkistoituja ihmisen kudostenäytteitä voidaan tutkia selvittäessä DNA:n kaksijuosteisten katkoksten merkitystä syövässä ja muissa sairauksissa.

Vaikka γ -H2AX-positiivisuuden havaittiin kohonneen useiden hiilinanoputkialtistusten seurauksena, erot olivat harvoin tilastollisesti merkitseviä. Analyysimenetelmää olisi mahdollista parantaa, mikäli γ -H2AX-signaalin intensiteetti pystyttäisiin määrittämään solujen luokittelun ohessa. Intensiteetin mittaaminen voisi paljastaa suurempia eroja eri altistusryhmien välillä erityisesti silloin, kun positiivisissa soluissa on selvästi yli 3 kaksijuosteisten katkoksohjausta. Analyysia olisi myös mahdollista automatisoida tekoälypohjaisten kuva-analyysiohjelmistojen avulla, jolloin siihen voitaisiin sisällyttää suurempia keuhkokudosalueita ja analysoitavien solujen määrää voitaisiin helposti kasvattaa.

H2AX:n fosforylaatio tapahtuu minuuteissa kaksijuosteisten katkoksen synnyttyä, ja γ -H2AX-positiivisuus alkaa hävitä noin tunnin kuluttua vauriosta DNA:n korjausprosessin edetessä (Kinner ym. 2008). Säteilyaltistetuilla hiirillä γ -H2AX-signaalin on osoitettu häviävän keuhkokudoksesta noin vuorokauden kuluessa altistuksesta (Rübe ym. 2008). Tästä huolimatta havaitsimme, että γ -H2AX-positiivisten solujen määrä oli koholla vielä 28 päivää altistuksen jälkeen kerätyissä hiirten keuhkokudostenäytteissä ja 8 kuukautta altistuksen jälkeen kerätyissä rotan keuhkokudostenäytteissä. Nämä havainnot kertovat altistuksen aiheuttamasta jatkuvasta, kroonistuneesta DNA:ta vaurioittavasta vaikutuksesta. Tutkittujen hiilinanoputkimateriaalien havaittiin pysyvän keuhkokudoksessa seuranta-ajan ajan ja erityisesti materiaalin ympärille kertyneissä solukasautumissa hiilinanoputkia todettiin olevan myös solujen sisällä. Materiaalin ympärille kertyneet solut ovat pääasiassa makrofageja, jotka pyrkivät poistamaan haitalliset hiukkaset solu-syönnillä. On mahdollista, että soluagregaatissa γ -H2AX-värjäyksellä havaitut DNA:n kaksijuosteisten katkokset aiheutuvat osin nanomateriaalin suorasta vaikutuksesta solujen perimäaineeseen. Solukasautumissa havaittiin myös paljon apoptoottisia soluja, mikä kertoo altistuksen aiheuttaman kuormituksen ylittäneen solujen korjauskapasiteetin.

Eryisesti keuhkoputkien epiteelissä ja sitä ympäröivässä kudoksessa γ -H2AX-positiivisia soluja oli runsaasti ilman, että niillä olisi havaittu välitöntä kontaktia hiilinanoputkimateriaaliin. Heikkoliukoisten nanomateriaalien, kuten hiilinanoputkien, syöpävaarallisuuden kannalta keskeinen ilmiö on tulehdukseen mahdollisesti liittyvä sekundäärinen perimämyrkyllisyys. Joissakin tutkimuksissa on dokumentoitu H2AX:n fosforyloitumista vaurioituneiden solujen viereisissä soluissa (ns. bystander-vaikutus). Signaalin solujen välillä ajatellaan välittyvän tulehduksesta edistävien sytokiinien välityksellä tai se saattaa johtua reaktiivisista happiradikaaleista (Mah ym. 2010). Hankkeessa havaittiin, että

tutkituissa Mitsui-7-hiilinanoputkilla altistetuissa hiirissä, γ -H2AX-tulokset korreloivat DNA-vaurioanalyysin ja tulehdustekijöiden mRNA-ekspression kanssa.

Nanomateriaalien luokittelu materiaaliaiominaisuuksien perusteella helpottaisi niiden vaaranarviota. Toistaiseksi nanomateriaaleille ei ole pystytty määrittelemään yksiselitteisiä luokitteluperiaatteita. Tutkimuksessa saatiin viitteitä siitä, että materiaaliominaisuudet vaikuttavat hiilinanoputkien perimämyrkyllisyyteen. Materiaaliominaisuuksiltaan erilaiset hiilinanoputket aiheuttivat eri tasoisen γ -H2AX-vasteen. Kuidun pituuden uskotaan olevan yksi tärkeimmistä materiaalien haitallisiin vaikutuksiin liittyvistä ominaisuuksista (Poulsen ym. 2016, Catalán ym. 2016, Nielsen ym. 2021) ja viitteitä tästä saatiin myös raportoitavan hankkeen γ -H2AX-analyyseissä. Funktionalisoinnin ja γ -H2AX-positiivisuuden välillä ei havaittu yhteyttä, mutta eniten γ -H2AX-positiivisuutta aiheuttaneet materiaalit olivat perusmuotoisia. Aiempien tutkimusten perusteella erityisesti karboksyloinnin on ehdotettu vähentävän hiilinanoputkien aiheuttamia tulehdusvaikutuksia hengitystiealtistuksessa (Poulsen ym. 2016).

Moniseinäisten hiilinanoputkien osalta kuitujen BET-pinta-ala oli yhteydessä lisääntyneeseen γ -H2AX-positiivisuuteen. BET-pinta-alan on aiemmin raportoitu olevan yhteydessä erityisesti moniseinäisten hiilinanoputkien aiheuttamaan neutrofiiliseen tulehdusreaktioon (Poulsen ym. 2016), mutta samassa tutkimuksessa todettiin suuremman BET-pinta-alan suojaavan DNA:n yksijuostekatkoksilta. Moniseinäisten hiilinanoputkien BET-pinta-alan yhteys keuhkokudoksen kaksoisjuostekatkoksiin on mielenkiintoinen löydös, joka antaa aihetta jatkotutkimuksiin.

Ranskan työterveyslaitoksen (INRS:n) suorittamissa altistuksissa paljastui, että testatut kaksi hiilinanoputkimateriaalia aiheuttivat keuhkokudoksessa hyvin erilaisen reaktion 8 kuukautta intratrakeaalisen instillaation jälkeen. Mitsui-7-hiilinanoputkia saaneilla rotilla oli keuhkoissa granuloomia, fibroosia ja kollageeninmuodostusta, mutta ei laajaa tulehdusta, ja suurin osa kuiduista oli granuloomissa (usein solujen sisällä). NM-403-hiilinanoputkille altistettujen eläinten keuhkoissa nähtiin kroonista tulehdusta, makrofagiaktivaatiota ja metaplasiaa, ja kuituja oli sekä solujen sisällä että vapaana keuhkokudoksessa. Havaittu ero selittynee materiaalien erilaisilla ominaisuuksilla: Mitsui-7-kuidut ovat jäykempiä, paksumpia ja pidempiä kuin NM-403-kuidut. Kokeissa ei havaittu syöpäkasvaimia, joten tuloksista ei voida suoraan ennustaa kumpi reaktio on lopulta haitallisempi karsinogeneesin kannalta. Koska INRS:n samoista eläimistä kerättyjen tulehdus- ja perimämyrkyllisyysnäytteiden analyysit ovat vielä kesken, lopullisia johtopäätöksiä havaittujen tulehdusreaktioiden ja kohonneen γ -H2AX-positiivisuuden mahdollisesta yhteydestä systeemisiin genotoksiin vaikutuksiin ei voida vielä tehdä. Voidaan kuitenkin todeta, että p53^{+/-}-rottamalli ei toiminut odotetusti

nanomateriaalien keuhkoaltistukseen liittyvän karsinogeneesin nopeutetussa ennustamisessa. Altistukset antoivat kuitenkin uutta tietoa tutkittujen hiilinanoputki-materiaalien aiheuttamista hyvin erilaisista kroonisista vasteista keuhkokudoksessa.

Koska γ -H2AX-värjäykseen käytettävät vasta-aineet ovat kalliita ja hankkeessa käytetty analyysimenetelmä on vielä aikaa vievä, menetelmän käyttö kannattaa keskittää sellaisten nanomateriaalien tutkimiseen, joiden perimämyrkyllisyydestä on saatu viitteitä aiemmissa tutkimuksissa. Jos eläinkokeen kudospäätteissä havaitaan DNA-vaurioita tai altisteen epäillään aiheuttavan systeemistä perimämyrkyllisyyttä, γ -H2AX-menetelmä voi antaa tärkeää tietoa vaikutusten sijainnista kudoksessa. Menetelmän käyttö ei rajoitu vain keuhkokudokseen vaan pienin muutoksin sitä voidaan hyödyntää kaikkien tyypillisimpien kohdekudosten värjäykseen.

Tutkimus antaa tärkeää uutta tietoa nanomateriaalialtistumiseen liittyvän perimämyrkyllisen vaikutuksen kohdentumisesta hengitysteitse tapahtuvassa altistumisessa. Kaksoisjuostekatkoksia havaittiin etenkin keuhkoputkien epiteelisoluissa ja keuhkokudokseen kertyneiden nanomateriaaliallargaattien ympärillä, eli havaittu perimämyrkyllinen vaikutus liittyi nanomateriaalien ja tulehdussolujen läheiseen läsnäoloon. Kaiken kaikkiaan hankkeen tulokset vahvistavat käsitystä siitä, että tulehdusreaktio on keskeisessä roolissa hiilinanoputkien hengitystiealtistuksen aiheuttamien haitallisten terveysvaikutusten ja perimämyrkyllisyyden synnissä.

5.2 Sekundäärinen genotoksisuuden tunnistaminen soluviljelmissä

Menetelmällä, jossa keuhkoepiteelisoluja käsiteltiin testimateriaaleilla altistettujen makrofagien kasvatusliuoksella (CM), havaittiin sekä tulehdustekijöiden (IL-1 β ja TNF α) lisääntymistä että mikrotumatason nousua. Kaikki testatut kuitumateriaalit aiheuttivat mikrotumia 16HBE-epiteelisoluissa ilman CM-kasvatusliuosta eli olivat primäärisesti genotoksisia, toisin kuin sekundäärinen genotoksisuuden positiivisena partikkeli-kontrollina käytetyt dSPION-nanopartikkelit, jotka lisäsivät mikrotumien määrää odotetusti vain CM:n läsnäollessa. Kuitumateriaaleista Mitsui-7, Cheaptubes ja asbesti osoittautuivat CM-mallissa myös sekundäärisesti genotoksiksiksi. Erityisesti Mitsui-7- ja Cheaptubes-hiilinanoputkien osalta tulokset näyttivät korreloivan kohonneiden tulehdustekijöiden pitoisuuksien kanssa. Asbestin ja NM-400-hiilinanoputkien osalta tulos jäi epäselväksi kontrolliviljelmän kohonneen TNF α -tason vuoksi. NM-400:lla ja NM-401:lla ei näissä kokeissa ollut sekundäärisiä genotoksisia vaikutuksia, vaikka NM-401:n osalta tulehdustekijöiden tasossa nähtiin nousua. Tulokset eivät korreloi eläinkokeiden (Catalán ym. 2016) tulosten kanssa, sillä Cheaptubes-hiilinanoputket, joilla ei eläinkokeiden perusteella odotettu olevan genotoksista vaikutusta, aiheuttivat mikrotumia CM:sta

riippumatta. Cheaptubes-hiilinanoputkia vastaavat lyhyet ja taipuisat NM-403-hiilinanoputket eivät myöskään Mitsui-7 tavoin aiheuttaneet tulehdusta hiirten pleuraontelossa (Wils ym. 2021).

CM-kasvatusliuoksen steriilisuodatus ei sovellu nanopartikkeleiden poistamiseen kasvatusliuoksesta sellaisten materiaalien osalta, joiden kaikki mitat ovat nanoskaalalla. Menetelmää voidaan kuitenkin hyödyntää myös pienikokoisille, pyöreille nanohiukkasille poistamalla testimateriaali ultrasentrifuugin avulla. Tämän projektin puitteissa ultrasentrifugointi ei kuitenkaan sopivan laitteen puuttuessa ollut mahdollista. Kuitumaisille hiilinanoputkille suodatusmenetelmän todettiin kuitenkin pimeäkenttämikroskoopilla tarkastellen olevan riittävä.

Cheaptubes- ja Mitsui-7-hiilinanoputket aiheuttivat jonkin verran DNA-vaurioita aiemmissa tutkimuksissamme toisella keuhkoputken epiteelisolulinjalla (BEAS-2B), mutta kummassakin tapauksessa DNA-vauriot oli todennäköisesti vielä mahdollista korjata, sillä genotoksista vaikutusta ei havaittu pysyviä kromosomivaurioita ilmentävässä mikro-tumatestissä (Catalán ym. 2016). Mitsui-7:llä altistettujen hiirten keuhkohuuhtelunäytteet aiheuttivat DNA-vaurioita BEAS-2B-soluilla (Norppa ym. 2017), mikä viittasi sekundäärisen genotoksiseen mekanismiin, sillä keuhkohuuhtelunäytteet lisättiin BEAS-2B-viljelmiin inserteissä, jotka läpäisevät huonosti Mitsui-7:n tyyppisiä kuitumateriaaleja.

Tässä hankkeessa päädyttiin käyttämään BEAS-2B-solujen sijaan alkuperältään vastaavaa 16HBEo⁻-solulinjaa, jonka viljelyolosuhteet olivat yhteisviljelmää ajatellen helpommin sovitettavissa yhteen dTHP-1-makrofagien kanssa. Näiden solulinjojen yhdistelmää oli myös aiemmassa julkaisussa käytetty onnistuneesti osoittamaan dSPION-nanopartikkeleiden aiheuttama sekundäärinen genotoksisuus sekä kasvatusliuosta siirtäen että yhteisviljelyssä (Evans ym. 2019). Tässä hankkeessa testasimme yhteisviljelmämenetelmää jo aiemmin eläinkokeissa tutkituilla kontrollimateriaaleilla, jotta saisimme tietää, kuinka hyvin menetelmä kuvastaa eläinkokeissa saatuja tuloksia.

Yhteisviljelmissä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää genotoksisuutta. CM-sarjassa sekundäärinen genotoksisuuden partikkelikontrollina käytettyjä dSPION-nanopartikkeleita ei tosin voitu tutkia yhteisviljelmissä nanomateriaalin tuottajan toimitusvaikeuksien vuoksi. Toisena sekundäärinen genotoksisuuden positiivisena kontrollina käytetty LPS oli yhteisviljelmissä negatiivinen. Aiemmassa TSR-hankkeessamme havaitsimme, että insertissä olleet keuhkohuuhtelunäytteen solut LPS:llä käsitellyiltä hiiriltä lisäsivät selvästi DNA-vaurioiden määrää insertin ulkopuolella kasvaneissa BEAS-2B-soluissa (Norppa ym. 2017), mutta näissä kokeissa keuhkohuuhtelunäytteen soluja (joista 78% oli neutrofiileja) oli 50 kertaa enemmän kuin BEAS-2B soluja. Lisäksi on

otettava huomioon, että korjattavissa olevia DNA-vaurioita mittaava komeettamenetelmä on mikrotumatestiä herkempi.

Myös yhteisviljelmien verrokkina suoritettu perinteinen mikrotumatesti antoi CM-sarjan verrokkiviljelmistä poiketen pääosin negatiivisia tuloksia. Tilastollisesti merkitsevä primäärinen genotoksinen vaikutus nähtiin vain Cheaptubes-hiilinanoputkilla. Verrokkiviljelmät pelkillä keuhkoepiteelisoluilla viljeltiin samoin kuin yhteisviljelmää varten viljellyt keuhkosolut, mikä selittää eron perinteisen mikrotumatestin tuloksissa CM- ja yhteisviljelysarjojen välillä. Mikrotumatestille on olennaista, että solut jakautuvat aktiivisesti ja kasvavat yhtenä kerroksena. Tilastollisesti merkitsevää primääristä genotoksisuutta ei havaittu yhteisviljelmäsarjassa todennäköisesti siksi, että menetelmässä epiteelisoluviljelmissä käytetty solumäärä oli liian suuri, jolloin solut kasvoivat päällekkäin eivätkä altistuneet tasaisesti ja toisaalta solukohtainen annos jäi huomattavasti pienemmäksi kuin CM-sarjassa. Toisaalta myös tulehdustekijöiden pitoisuudet yhteisviljelmien kasvatusliuoksissa jäivät Cheaptubes-altistusta lukuun ottamatta kontrolliviljelmien tasolle ja myös kontrolliviljelmissä tulehdustekijöiden pitoisuudet olivat CM-sarjaan verrattuna huomattavasti matalammat. Analyysilaseilla näkyvien dTHP-1-solujen määrä oli hyvin toimivasta värjäyksestä huolimatta matala. Tämä voisi viitata siihen, että käyttämässämme menetelmässä, joka perustui pääosin aiemmin kuvattuun protokollaan (Evans ym. 2019), viljelyolosuhteet eivät olleet dTHP-1-soluille optimaaliset ja solutyypin yhteisviljely olisi vaatinut lisää kehittäelytyötä.

Mitsui-7-hiilinanoputkien primääristä ja sekundääristä genotoksisuutta on aiemmin testattu soluviljelmillä vaihtelevin tuloksin. Edellisessä TSR-hankeessamme (Catalán ym. 2016) Mitsui-7 tuotti DNA-vaurioita mutta ei mikrotumia perinteisissä testeissä BEAS-2B-soluilla. Katon ym. (2013) mukaan Mitsui-7 aiheutti mikrotumia ihmisen A549-keuhkosoluissa ja sisarkromatidivaihdoksia kiinanhamsterin CHO-soluissa primäärisellä mekanismilla. Venturan ym. (2020) tutkimuksessa mikrotumien havaittiin lisääntyneen A549-soluissa vain yhteisviljelmissä THP-1-makrofagien kanssa mutta ei tavallisissa viljelmissä. Kummassakaan viljelmätyypissä ei kuitenkaan nähty selkeää lisääntymistä DNA-vaurioissa, mutta perinteisen viljelmän A549-soluissa oli runsaasti nukleoplasmisia siltoja, joiden yhteydessä havaittiin hiilinanoputkia. Hiilinanoputkilla vaihteleviin tuloksiin voivat vaikuttaa monet seikat, mm. solulinjojen väliset erot ja materiaalin biologinen kontaminaatio. Tässä hankkeessa kuitumateriaalien mahdolliset kontaminaatiot selvitettiin endotoksiinitestillä sekä ennen kokeiden aloittamista että uudelleen hankkeen lopussa – kontaminaatiot eivät siis tässä tapauksessa selitä Cheaptubes-hiilinanoputkien muita materiaaleja korkeampaa tulehdusvastetta yhteisviljelmissä tai eläinkokeiden kanssa ristiriitaisia tuloksia.

Mikrotumien perustason vaihtelu oli 16HBE⁻-soluilla suurta. Perustasoissa oli merkittäviä eroja sekä koesarjojen että viljely- ja analyysimenetelmien välillä. Yhteisviljelmän ja sen yhteydessä tehdyn perinteisen mikrotumatestin osalta ero voi ainakin osittain selittyä erilaisella keräys- ja värjäysmenetelmällä, jolloin osa mikrotumista jää yhteisviljelmissä ehkä huomaamatta. CM-viljelmien osalta THP-soluilta kerätty media näyttää jo itsessään hieman nostavan mikrotumien perustasoja. Ero perinteisen mikrotumatestin perustasossa CM- ja yhteisviljelmäsarjojen välillä selittyy pääosin erilaisilla viljelyolosuhteilla.

Vaikka altistettujen makrofagien kasvatusliuoksen siirtoon perustuva CM-menetelmä pystyy joissakin tapauksissa, kuten dSPION-nanopartikkeleiden kohdalla, tunnistamaan sekundäärisen genotoksisuuden soluviljelmissä, sillä ei kuitenkaan tässä vaiheessa voida erottaa toisistaan haitallisia ja vähemmän haitatallisia kuitumateriaaleja eläinkokeita vastaavalla tavalla. CM-menetelmää voidaan kuitenkin käyttää sekundäärisesti genotoksisten materiaalien alustavaan tunnistamiseen, ja myös yhteisviljelymenetelmästä saattaa olla jatkossa mahdollista kehittää toimiva testi vastaavaan tarkoitukseen viljelyolosuhteita optimoimalla. Myös menetelmän spesifisyyttä on ehkä mahdollista jatkokehittelyllä parantaa mm. optimoimalla menetelmä toiselle keuhkosolulinjalle.

6 Tiedotus ja muu tiedon hyödyntäminen

Tämän raportin lisäksi hankkeen tulokset julkaistaan kansainvälisessä ja kotimaisessa tieteellisessä kirjallisuudessa. Hankkeen pohjalta on valmistumassa myös pro gradu - tutkielma (Hanna Saarelainen, Itä-Suomen yliopisto). Tuloksia tuodaan esiin myös kansainvälisissä ja kotimaisissa, nanomateriaalien turvallisuutta käsittelevissä konferensseissa, symposiumeissa, työpajoissa, komiteoissa ja työryhmissä. Toistaiseksi hanketta ja sen tuloksia on esitetty seuraavasti (esittäjä/esityksen tekijä alleviivattu):

Aimonen K, Huumonen K, Savukoski S, Lindberg H, Schoonenberg A, Välimäki K, Libertini S, Wolff H, Catalán J, Norppa H. *In situ* detection of DNA double strand breaks by immunofluorescent γ -H2AX staining in mice exposed to multiwalled carbon nanotubes. The 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019), Toxicology – Science Providing Solutions, Kansainvälinen konferenssi 8-11.9.2019, Helsinki, Abstraktit: *Toxicol Lett* 314, Supplement 1, P01-005, S122.

Norppa H. Nanohiukkasten toksikologia. Nanoturvallisuusseminaari 12.9.2019, Tieteiden talo, Helsinki. Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriö ja Työterveyslaitos.

Siivola K. Kohti turvallista nanoteknologian tulevaisuutta -webinaari 16.9.2020. Johdatus nanotoksikologiaan. Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriö ja Työterveyslaitos.

Aimonen K, Suhonen S, Siivola K, Vales G, Norppa H, Catalán J. *In vitro* approaches for the genotoxicity testing of nanomaterials. NanoScience Days 2020, Jyväskylän yliopiston järjestämä kansainvälinen verkkokonferenssi 6-7.10.2020.

Aimonen K, Savukoski S, Huumonen K, Schoonenberg A, Välimäki K, Libertini S, Vogel U, Wolff H, Catalán J, Norppa H. Carbon nanotube -induced genotoxicity in mice: Detection of DNA double strand breaks in histopathological lung specimens. NanoSafe 2020, kansainvälinen verkkokonferenssi 16.-17.10.2020.

Catalán J, Siivola KM, Aimonen K, Vales G, Saarelainen H, Suhonen S, Hartikainen M, Norppa H. Genotoxicity of nanomaterials. 56th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2021), Kansainvälinen virtuaalinen konferenssi 27.9.-1.10.2021, Abstraktit: CEC05-01, *Toxicol Lett* 350S, S8-S9.

Kehittämiämme menetelmiä tullaan soveltamaan tai tuloksia hyödyntämään mm. seuraavissa hankkeissa:

EU H2020 SAbYNA kehittää yksinkertaisia, tehokkaita lähestymistapoja, joiden avulla teollisuus voi suunnitella lähtökohtaisesti turvallisempia (safe by design) nanomateriaaleja tai niitä hyödyntäviä tuotteita. Tuloksia hyödynnetään arvioitaessa

soluviljelyyn perustuvien menetelmien sopivuutta riskinarviointiin ja turvallisempien nanomateriaalien suunnitteluun.

EU H2020 NanoInformaTIX (Development and Implementation of a Sustainable Modelling Platform for NanoInformatics), jossa kehittämäämme soluviljelyyn perustuvaa menetelmää käytetään erilaisten hiilipohjaisten nanomateriaalien primäärisen ja sekundäärisen perimämyrkyllisyyden perusteellisempaan kartoittamiseen.

SAF€RA-TSR GrapHazard (Energiantuotannossa ja -varastoinnissa käytettävien grafeeni-peräisten nanomateriaalien vaaranarvio, hankenumero 200338), jossa kehittämäämme soluviljelyyn perustuvaa menetelmää käytetään grafeenipohjaisten materiaalien primäärisen ja sekundäärisen perimämyrkyllisyyden kartoittamiseen.

EU H2020 PlasticHeal (Innovative tools to study the impact and mode of action of micro and nanoplastics on human health: towards a knowledge base for risk assessment), jossa γ -H2AX-värjäystä hyödynnetään keuhkojen kautta tapahtuvan mikro- ja nanomuovi-altistuksen aiheuttaman perimämyrkyllisyyden selvittämisessä.

7 Kiitokset

Haluamme kiittää yhteistyökumppaneitamme Tanskan ja Ranskan työterveyslaitoksia (NRCWE ja INRS) keuhkokudosnäytteistä ja mahdollisuudesta hyödyntää analyyseissämme heidän vielä julkaisemattomia tutkimustuloksiaan. Multipat Oy valmisti osan histologisista keuhkokudosnäytteistä. Värjätyt kudosleikkeet ja joitakin soluviljelmänäytteitä skannattiin digitaaliseen muotoon yhteistyössä Suomen Molekyylilääketieteen Instituutin (FIMM, HiLIFE, Helsingin Yliopisto) Digitaalisen mikroskopian ja molekyylipatologian yksikön kanssa. Kiitämme Stephen Evansia ja Swansea yliopistoa THP-1-solujen käsittelyyn ja yhteisviljelmiin liittyvistä työhjeistä. Lisäksi haluamme kiittää Annabrita Schoonenbergia ja Silvana Libertiniä neuvoista γ -H2AX-värjäysmenetelmän kehitysvaiheessa sekä Suvi Ahtiaista neuvoista tilastoanalyysien suunnittelussa.

8 Lähteet

- Alenius H, Catalán J, Lindberg H, Norppa H, Palomäki J, Savolainen K (2014). Nanomaterials and human health. Kirjassa: Vogel U, Savolainen K, Wu Q, van Tongeren M, Brouwer D, Berges M (toim.) *Handbook of Nanosafety - Measurement, Exposure and Toxicology*. Academic Press, Waltham, USA, 59-133.
- Catalán J, Siivola KM, Nymark P, Lindberg H, Suhonen S, Järventaus H, Koivisto AJ, Moreno C, Vanhala E, Wolff H, Kling KI, Jensen KA, Savolainen KM, Norppa H (2016). *In vitro* and *in vivo* genotoxic effects of straight versus tangled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* 10:794-806. doi: 10.3109/17435390.2015.1132345.
- Cveticanin J, Joksic G, Leskovac A, Petrovic S, Sobot AV, Neskovic O (2010). Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology* 21(1):015102. doi: 10.1088/0957-4484/21/1/015102.
- Evans SJ, Cliff MJD, Singh N, Wills JW, Hondow N, Wilkinson TS, Burgum MJ, Brown AP, Jenkins GJ, Doak SH (2019). *In vitro* detection of *in vitro* secondary mechanisms of genotoxicity induced by engineered nanomaterials. *Part Fibre Toxicol* 13;16(1):8. doi: 10.1186/s12989-019-0291-7.
- Lai DY, Warheit DB (2014). Nanotoxicology: The Case for *in vivo* Studies. Kirjassa: Fadeel F (toim.). *Handbook of Safety Assessment of Nanomaterials: From Toxicological Testing to Personalized Medicine*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA. 562 s. ISBN: 9789814463379.
- Fakhrullin R, Nigamatzyanova L, Fakhrullina G (2021). Dark-field/hyperspectral microscopy for detecting nanoscale particles in environmental nanotoxicology research. *Sci Total Environ* 772:145478. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145478.
- Fraser K, Kodali V, Yanamala N, Birch ME, Cena L, Casuccio G, Bunker K, Lersch TL, Evans DE, Stefaniak A, Hammer MA, Kashon ML, Boots T, Eye T, Hubczak J, Friend SA, Dahm M, Schubauer-Berigan MK, Siegrist K, Lowry D, Bauer AK, Sargent LM, Erdely A (2020). Physicochemical characterization and genotoxicity of the broad class of carbon nanotubes and nanofibers used or produced in U.S. facilities. *Part Fibre Toxicol* 17(1):62. doi: 10.1186/s12989-020-00392-w.
- Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto M (2018). Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. *J Occup Health* 60(1):10-30. doi: 10.1539/joh.17-0102-RA.

- Goede H, Christopher-de Vries Y, Kuijpers E, Fransman W (2018). A review of workplace risk management measures for nanomaterials to mitigate inhalation and dermal exposure. *Ann Work Expo Health* 62:907-922. doi: 10.1093/annweh/wxy032.
- Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, Seguin MC, Klotz FW, Slayter M, Nelson BJ, Nancy CA (1994). Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett* 43:87-94. doi: 10.1016/0165-2478(94)00158-8.
- Guseva Canu I, Bateson TF, Bouvard V, Debia M, Dion C, Savolainen K, Yu JJ (2016). Human exposure to carbon-based fibrous nanomaterials: A review. *Int J Hyg Environ Health* 219:166-175. doi: 10.1016/j.ijheh.2015.12.005.
- He X, Fu P, Aker WG, Hwang HM (2017). Toxicity of engineered nanomaterials mediated by nano-bio-eco interactions. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 36:21-42. doi: 10.1080/10590501.2017.1418793.
- Hedmer M, Kåredal M, Gustavsson P, Rissler J (2013). The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals: 148. Carbon nanotubes. *Arbete och Hälsa* nr 2013;47(5). ISBN: 978-91-85971-46-6.
https://gupea.ub.gu.se/bitstream/2077/34980/1/gupea_2077_34980_1.pdf
- Ilves M, Vilske S, Aimonen K, Lindberg HK, Pesonen S, Wedin I, Nuopponen N, Vanhala E, Højgaard C, Winther JR, Willemoës M, Vogel U, Wolff H, Norppa H, Savolainen K, Alenius H (2018). Nanofibrillated cellulose causes acute pulmonary inflammation that subsides within a month. *Nanotoxicology* 12(7):729-746. doi: 10.1080/17435390.2018.1472312.
- IARC (2017). Some nanomaterials and fibres. IARC Working Group. Lyon; 30 Sep–7 Oct 2014. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 111. 316 s.
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol111/mono111.pdf>
- IARC (2019). Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for the IARC Monographs during 2020–2024. *IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans*. https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/10/IARCMonographs-AGReport-Priorities_2020-2024.pdf
- Jackson P, Kling K, Jensen KA, Clausen PA, Madsen AM, Wallin H, Vogel U (2015). Characterization of genotoxic response to 15 multiwalled carbon nanotubes with variable physicochemical properties including surface functionalizations in the FE1-Muta (TM) mouse lung epithelial cell line. *Environ Mol Mutagen* 56(2):183-203. doi: 10.1002/em.21922.

- Jensen KA (2013). Deliverable 4.1: Summary report on primary physicochemical properties of manufactured nanomaterials used in NANOGENOTOX. *NANOGENOTOX Final Report 2013*.
https://www.anses.fr/en/system/files/nanogenotox_deliverable.1.pdf
- Jiménez AS, van Tongeren M (2017). Assessment of human exposure to ENMs. *Adv Exp Med Biol* 947:27-40. doi: 10.1007/978-3-319-47754-1_2.
- Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, et al., Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K (2013). Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both *in vitro* and *in vivo* assay systems. *Nanotoxicology* 7:452–61. doi: 10.3109/17435390.2012.674571.
- Kinaret P, Ilves M, Fortino V, Rydman E, Karisola P, Lähde A, Koivisto J, Jokiniemi J, Wolff H, Savolainen K, Greco D, Alenius H (2017). Inhalation and Oropharyngeal Aspiration Exposure to Rod-Like Carbon Nanotubes Induce Similar Airway Inflammation and Biological Responses in Mouse Lungs. *ACS Nano* 11(1):291-303. doi: 10.1021/acsnano.6b05652.
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36(17):5678-94. doi: 10.1093/nar/gkn550.
- Koivisto AJ, Aromaa M, Mäkelä JM, Pasanen P, Hussein T, Hämeri K (2012). Concept to estimate regional inhalation dose of industrially synthesized nanoparticles. *ACS Nano* 6:1195-1203. doi: 10.1021/nn203857p.
- Krug HF (2014). Nanosafety research—are we on the right track? *Angew Chem Int Ed* 53:12304–12319. doi: 10.1002/anie.201403367.
- Kuijpers E, Bekker C, Brouwer D, le Feber M, Fransman W (2017). Understanding workers' exposure: Systematic review and data-analysis of emission potential for NOAA. *J Occup Environ Hyg* 14(5):349-359. doi: 10.1080/15459624.2016.1252843.
- Lengert N, Mirsch J, Weimer RN, Schumann E, Haub P, Drossel B, Löbrich M (2018). AutoFoci, an automated high-throughput foci detection approach for analyzing low-dose DNA double-strand break repair. *Sci Rep* 8(1):17282. doi: 10.1038/s41598-018-35660-5.
- Liu N, Tang M (2020). Toxic effects and involved molecular pathways of nanoparticles on cells and subcellular organelles. *J Appl Toxicol* 40:16-36. doi: 10.1002/jat.3817.

- Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC (2010). gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24(4):679-86. doi: 10.1038/leu.2010.6.
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int* 2013:942916. doi: 10.1155/2013/942916.
- Moeglin E, Desplancq D, Conic S, Oulad-Abdelghani M, Stoessel A, Chipier M, Vigneron M, Didier P, Laszlo Tora 15 16 17 18, Etienne Weiss (2019). Uniform Widespread Nuclear Phosphorylation of Histone H2AX Is an Indicator of Lethal DNA Replication Stress. *Cancers (Basel)* 11(3):355. doi: 10.3390/cancers11030355.
- Mrakovcic M, Meindl C, Leitinger G, Roblegg E, Fröhlich E (2015). Carboxylated short single-walled carbon nanotubes but not plain and multi-walled short carbon nanotubes show *in vitro* genotoxicity. *Toxicol Sci* 144(1):114-27. doi: 10.1093/toxsci/kfu260.
- Nelson BC, Wright CW, Ibuki Y, Moreno-Villanueva M, Karlsson HL, Hendriks G, Sims CM, Singh N, Doak SH (2017). Emerging metrology for high-throughput nanomaterial genotoxicology. *Mutagenesis* 32(1):215-232. doi: 10.1093/mutage/gew037.
- Nielsen H, Bram Knudsen K, Carriere Mayne-L'Hermite, Bobyk L, Allard S, Miserque F, Pibaleau B, Pinault M, Wallin H, Vogel U (2021). Safe-by-design strategies for lowering the genotoxicity and pulmonary inflammation of multiwalled carbon nanotubes: Reduction of length and the introduction of COOH groups. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 87. doi: 10.1016/j.etap.2021.103702.
- Norppa H, Aimonen K, Lindberg H, Vilske S, Ilves M, Pesonen S, Wolff H, Savukoski S, Wedin I, Nuopponen M, Alenius H (2016). Deliverable D 4.16: Immunotoxic and genotoxic effects after short-term inhalation of fibrous nanomaterials. *NANoREG Final Report*. https://www.rivm.nl/sites/default/files/2019-01/NANoREG_D4_16_DR_Immunotoxic_and_genotoxic_effects_after_short_term_inhalation_of_fibrous_nanomaterials.pdf
- Norppa H, Siivola K, Aimonen K, Suhonen S, Pesonen S, Vales G, Lindberg H, Koivisto J, Savolainen K, Catalán J (2017). Nanohiukkasten perimämyrkyllisyyden perusta. Loppu-raportti Työsuojelurahaston hankkeesta N:o 112248. Työterveyslaitos, Helsinki. Juvenes Print, Tampere (2017). 59 s.
- OECD (2016). Test No. 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris, 29 s. doi: 10.1787/9789264264861-en.

- Plappert-Helbig U, Libertini S, Frieauff W, Theil D, Martus HJ (2019). Gamma-H2AX immunofluorescence for the detection of tissue-specific genotoxicity *in vivo*. *Environ Mol Mutagen* 60(1):4-16. doi: 10.1002/em.22238.
- Pogribna M, Hammons G (2021). Epigenetic Effects of Nanomaterials and Nanoparticles. *J Nanobiotechnology* 19(1):2. doi: 10.1186/s12951-020-00740-0.
- Poulsen SS, Jackson P, Kling K, Knudsen KB, Skaug V, Kyjovska ZO, Thomsen BL, Clausen PA, Atluri R, Berthing T, Bengtson S, Wolff H, Jensen KA, Wallin H, Vogel U (2016). Multi-walled carbon nanotube physicochemical properties predict pulmonary inflammation and genotoxicity. *Nanotoxicology* 10(9): 1263–1275. doi: 10.1080/17435390.2016.1202351.
- Poulsen SS, Knudsen KB, Jackson P, Weydahl IEK, Saber AT, Wallin H, Vogel U (2017). Multi-walled carbon nanotube-physicochemical properties predict the systemic acute phase response following pulmonary exposure in mice. *PLoS One* 12(4):e0174167. doi: 10.1371/journal.pone.0174167.
- Rasmussen K, Mast J, De Temmerman P, Verleysen E, Waegeneers N, Van Steen F, Pizzolon J, De Temmerman L, Van Doren E, Jensen K, Birkedal R, Clausen P, Kembouche Y, Thieriet N, Spalla O, Giuot C, Rousset D, Witschger O, Bau S, Bianchi B, Shivachev B, Dimowa L, Nikolova R, Nihtianova D, Tarassov M, Petrov O, Bakardjieva S, Motzkus C, Labarraque G, Oster C, Cotogno G, Gaillard C (2014). Multi-walled Carbon Nanotubes, NM-400, NM-401, NM-402, NM-403: Characterisation and Physico-Chemical Properties. EUR 26796. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union. JRC91205.
- Relier C, Dubreuil M, Garcia OL, Cordelli E, Mejia J, Eleuteri P, Robidel F, Loret T, Pacchierotti F, Lucas S, Lacroix G, Trouiller B (2017). Study of TiO₂ P25 Nanoparticles Genotoxicity on Lung, Blood, and Liver Cells in Lung Overload and Non-Overload Conditions After Repeated Respiratory Exposure in Rats. *Toxicol Sci* 156(2):527-537. doi: 10.1093/toxsci/kfx006.
- Rittinghausen S, Bellmann B, Creutzenberg O, Ernst H, Kolling A, Mangelsdorf I, Kellner R, Beneke S, Ziemann C (2013). Evaluation of immunohistochemical markers to detect the genotoxic mode of action of fine and ultrafine dusts in rat lungs. *Toxicology* 303:177-86. doi: 10.1016/j.tox.2012.11.007.
- Rothkamm K, Barnard S, Ainsbury EA, Al-Hafidh J, Barquinero JF, Lindholm C, Moquet J, Perälä M, Roch-Lefèvre S, Scherthan H, Thierens H, Vral A, Vandersickel V (2013). Manual versus automated γ -H2AX foci analysis across five European laboratories:

can this assay be used for rapid biodosimetry in a large scale radiation accident?
Mutat Res 756(1-2):170-3. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.04.012.

Rübe CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rübe C (2008). DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* 14(20):6546-55. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5147.

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

Savolainen K (2016). Nanotekniikan lupaukset. Työterveyslaitos, Helsinki, 215 s.

Schulte P, Leso V, Niang M, Iavicoli I (2018). Biological monitoring of workers exposed to engineered nanomaterials. *Toxicol Lett* 298:112-124. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.06.003.

Siivola KM, Suhonen S, Hartikainen M, Catalán J, Norppa H (2020). Genotoxicity and cellular uptake of nanosized and fine copper oxide particles in human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 856-857:503217. doi: 10.1016/j.mrgentox.2020.503217.

Stenvall A, Larsson E, Holmqvist B, Strand SE, Jönsson BA (2020). Quantitative γ -H2AX immunofluorescence method for DNA double-strand break analysis in testis and liver after intravenous administration of $^{111}\text{InCl}_3$. *EJNMMI Res* 10(1):22. doi: 10.1186/s13550-020-0604-8.

Vamvakas S, Vock EH, Lutz WK (1997). On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol* 27(2):155-74. doi: 10.3109/10408449709021617.

van Berlo D, Clift MJD, Albrecht C, Schins RPF (2012). Carbon nanotubes: an insight into the mechanisms of their potential genotoxicity. *Swiss Med Wkly* 142:w13698. doi: 10.4414/smw.2012.13698.

van Boxtel R, Kuiper RV, Toonen PW, van Heesch S, Hermsen R, de Bruin A, Cuppen E (2011). Homozygous and heterozygous p53 knockout rats develop metastasizing sarcomas with high frequency. *Am J Pathol* 179(4):1616-22. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.036.

- Ventura C, Pereira JFS, Matos P, Marques B, Jordan P, Sousa-Uva A, João Silva M (2020). Cytotoxicity and genotoxicity of MWCNT-7 and crocidolite: assessment in alveolar epithelial cells versus their coculture with monocyte-derived macrophages. *Nanotoxicology* 14(4):479-503. doi: 10.1080/17435390.2019.1695975.
- Wan R, Mo Y, Zhang Z, Jiang M, Tang S, Zhang Q (2017). Cobalt nanoparticles induce lung injury, DNA damage and mutations in mice. *Part Fibre Toxicol* 14(1):38. doi: 10.1186/s12989-017-0219-z.
- Wiemann M, Vennemann A, Blaske F, Sperling M, Karst U (2017). Silver Nanoparticles in the Lung: Toxic Effects and Focal Accumulation of Silver in Remote Organs. *Nanomaterials (Basel)* 7(12):441. doi: 10.3390/nano7120441.
- Wils RS, Jacobsen NR, Vogel U, Roursgaard M, Møller P (2021). Inflammatory Response, Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage in Mice After Intrapleural Exposure to Carbon Nanotubes. *Tox Sci* 183(1):184–194. doi: 10.1093/toxsci/kfab070.

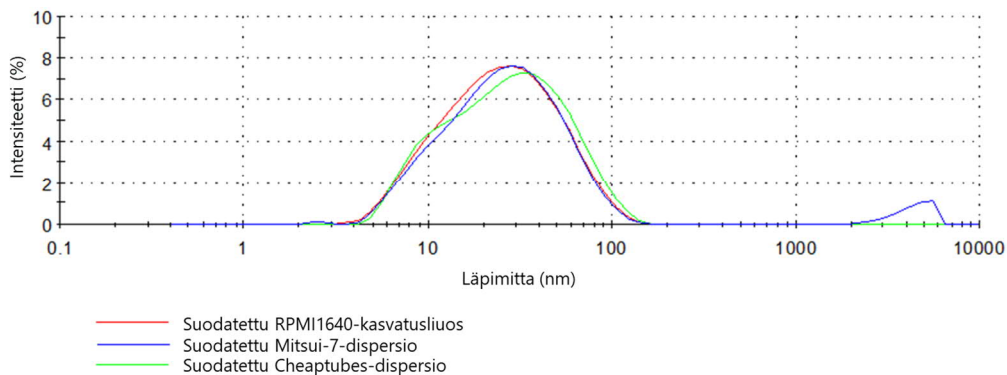
Liite 1. Ruiskusuodatuksen soveltuvuus kuitumaisten nanomateriaalien poistamiseen kasvatusliuoksesta

Testasimme ruiskusuodatuksen soveltuvuutta nanokuitujen poistamiseen kasvatusliuoksesta käyttäen mallimateriaaleina Mitsui-7- ja Cheaptubes-hiilinanoputkia, joiden materiaaliominaisuuksien katsottiin edustavan hankkeessa tutkittujen hiilinanoputkimateriaalien ääripäitä. Vaikka hiilinanoputkien halkaisija on alle 0.2 μm (käytetyn PET-suodattimen huokoskoko), pääosan materiaalista oletetaan jäävän suodattimeen joko pituuden ja jäykkyyden tai toisiinsa kietoutumisen vuoksi.

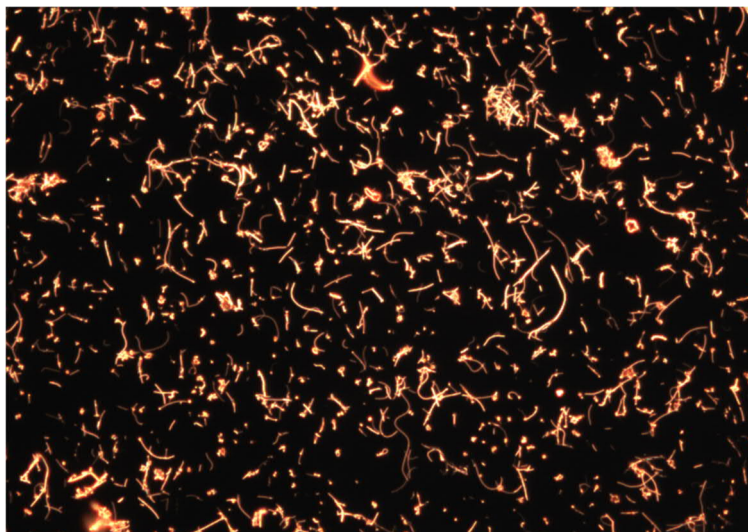
Nanomateriaalit dispersoitiin kuten kappaleessa 3.2.3 on kuvattu ja laimennettiin korkeimpaan genotoksisuustestissä käytettyyn pitoisuuteen (100 $\mu\text{g/ml}$) supplementoidulla RPMI1640-kasvatusliuoksella. Laimennettuja dispersioita sekä kontrollina käytettyä supplementoitua RPMI1640-kasvatusliuosta inkuboitiin 26 tunnin ajan soluviljelykaapissa (10 ml, T-25 soluviljelypulloissa; 37 °C) vaakatasossa, mikä vastaa kokeessa käytettävää altistusta. Kasvatusliuokset sentrifugoitiin (440 g, 6 min), supernatantti steriilisuodattettiin PES-ruiskusuodattimilla (huokoskoko 0.2 μm) ja niiden hiukkaskokojakauma määritettiin dynaamisella valonsironnalla (DLS). Mittaus suoritettiin välittömästi suodatuksen jälkeen Zetasizer Nano ZS -laitteistolla (Malvern, Saksa) kertakäyttöisessä polystyreenikyvetissä (Sarstedt) 37 °C:n lämpötilassa, kuten olemme aiemmin kuvanneet (Siivola ym. 2020). Analyysiohjelmistona käytettiin Zetasizer Software -versiota 6.20. Kasvatusliuokselle käytettiin veden taitekerrointa (RI) 1,33 sekä viskositeettia 0,6864. Hiilinanoputkille asetettiin RI 2,5 ja absorptiokerroin 0,99. Tulokset on perustuvat 7 perättäisen mittauksen keskiarvoon. Kasvatusliuoksista otettiin lisäksi 10 μl näytteet pimeäkenttämikroskooppitarkastelua (Olympus Corporation, Japani) varten. Näytteitä tarkasteltiin 100-1000-kertaisilla suurennoksilla.

Pitkien ja jäykkien Mitsui 7 -hiilinanoputkien osalta DLS:llä havaittiin pieni määrä materiaalia, jonka keskimääräinen läpimitta on noin 4–6 μm (kuva L1), joten on mahdollista, että pieni osuus jäykistä hiilinanoputkista läpäisee filtterin fysikaaliskemiallisten ominaisuuksiensa ansiosta. DLS-mittausten tuloksia tarkastellessa on huomattava, että analyysitekniikka olettaa materiaalin pyöreäksi partikkeliksi, joten kuitujen osalta laitteen antama partikkelikoko ei vastaa materiaalin todellisia mittasuhteita. Mikroskooppitarkastelussa ei kuitenkaan löytynyt kuitumateriaalia, joten on todennäköistä, että suodatuksen läpäisseen materiaalin osuus oli niin pieni, ettei sillä ollut genotoksisuustestien tulosten kannalta merkitystä. Lyhyiden ja taipuisien Cheaptubes-hiilinanoputkien osalta kasvatusliuoksessa ei havaittu kummallakaan menetelmällä kontrolliliuoksesta poikkeavaa materiaalia. Koska hiilinanoputket voidaan

suhteellisen helposti havaita pimeäkenttämikroskoopilla (kuva L2), voimme olettaa, että suodatusmenetelmä poistaa kuidut kasvatusliuksesta riittävän tarkasti.



Kuva L1. Ruiskusuodatettujen kasvatusliuosten intensiteettiperusteinen partikkelikokojakauma (nm) dynaamisella valonsironnalla (DLS) mitattuna. Kuvaajat perustuvat 7 mittauksen keskiarvoon. Molemissa hiilinanoputkidispersioissa havaittiin suodatuksen jälkeen pääasiassa samankokoisia partikkeleita kuin pelkässä supplementoidussa RPMI1640-kasvatusliuksessa (punainen kuvaaja). Mitsui-7-dispersiossa (sininen kuvaaja) havaittiin lisäksi pieni määrä suurempia partikkeleita.



Kuva L2. Suodattamaton mitsui-7-dispersio pimeäkenttämikroskoopilla kuvattuna (400-kertainen suurennos).

Nanomateriaalien moninaisuus asettaa suuria haasteita toksikologiselle testaukselle ja riskinarvioinnille. Syöpävaarallisuuden arvioinnin kannalta on tärkeää ymmärtää, onko perimämyrkyllisyys primääristä vai onko se sekundaarinen, tulehdukseen liittyvä ilmiö, sillä primääriselle perimämyrkyllisyydelle ei voida asettaa kynnsannosta, mutta sekundaarisen vaikutuksen tapauksessa se on ehkä mahdollista. Tämä on keskeinen kysymys erityisesti heikkoliukoisten nanomateriaalien, kuten hiilinanoputkien syöpävaarallisuuden arvioinnissa. Tässä hankkeessa selvitettiin DNA:n kaksoisjuostekatkosten roolia hiilinanoputkien perimämyrkyllisen vaikutuksen synnyssä ja tutkittiin DNA:n kaksoisjuostekatkokset tunnistavavan γ -H2AX-värjäyksen soveltuvuutta keuhkojen nanomateriaalialtistuksen aiheuttamien DNA:n kaksoisjuostekatkosten määrän ja sijainnin selvittämiseen. Sekundaarisen perimämyrkyllisyyden tunnistamiseksi soluviljelmissä sovellettiin sekä kasvatusliuoksen siirtoa altistetuilta tulehdussoluilta keuhkosoluille, että tulehdus- ja keuhkosolujen yhteisviljelyyn perustuvaa menetelmää.



Työsuojelurahasto
Arbetskyddsfonden
The Finnish Work Environment Fund

Työterveyslaitos
Arbetshälsoinstitutet
Finnish Institute of Occupational Health

PL 40, 00032 Työterveyslaitos

www.ttl.fi

ISBN 978-952-391-000-3 (nid.)
ISBN 978-952-261-999-0 (PDF)

