

Nano-partiklars effekter på humana lungceller – utveckling av ett integrerat system med partikelgenerering och celler.

Slutrapport 2007-12-21

Bakgrund

Under det senaste decenniet har många studier visat på hälsoeffekter vid exponering för luftburna partiklar vid halter normalt förekommande i städer. Hälsoeffekterna är både påtagliga på kort sikt, exempelvis i form av ökad användning av läkemedel för astmatiker och ökat antal sjukhusinläggningar på grund av lungsjukdom under dagar med förhöjda partikelhalter, men visar sig också på längre sikt i form av ökad dödlighet i cancer samt hjärt- och kärlsjukdomar. De största partikelkällorna i Sverige är trafik och småskalig vedeldning. Under senare år har pannor för förbränning av ved och pellets utvecklats som ger betydligt lägre utsläpp av partiklar och flyktiga luftföroreningar. Vi har dock i en nyligen utförd studie visat att partiklar från förbränning av pellets skadar arvsmassan i odlade lungceller lika mycket som partiklar insamlade vid förbränning av ved i en gammal icke miljögodkänd panna (1). I en annan studie visade vi att partiklar från tunnelbanan (vilka har ett högt järninnehåll) var betydligt mer skadliga för odlade lungceller än partiklar från Hornsgatan (2). För att ytterligare kunna utveckla pannor och bränslen krävs mer kunskap om vilka partiklar som är farligast för hälsan då partiklar uppvisar stora skillnader i toxicitet och DNA-skador.

Under de senare åren har de allra minsta partiklarna, så kallade ”ultrafina” partiklar eller ”nanopartiklar” satts i allt mer fokus eftersom man misstänker att de är extra farliga för människors hälsa. För att undersöka dessa partiklar utan att behöva exponera djur eller människor krävs nya typer av testsystem. Den vanligast förekommande metodiken för att undersöka hur celler påverkas av partiklar är genom att;

- 1) samla in partiklar på filter
- 2) extrahera partiklarna med något lösningsmedel
- 3) blanda partiklarna med cellmedium
- 4) utsätta odlade lungceller för medium-partikelblandningen.

Det finns dock en uppenbar risk för att de ultrafina partiklarna dels inte kan extraheras effektivt från filtret och dels kan förändras exempelvis med avseende på storlek innan cellerna exponeras. Ett annat problem är risken att man lösgör filtermaterial vid extraktion av partiklarna. För att på ett bättre sätt studera partiklars effekter på lungceller krävs att partiklar genereras och direkt leds till cellerna utan att blandas med cellmedium.

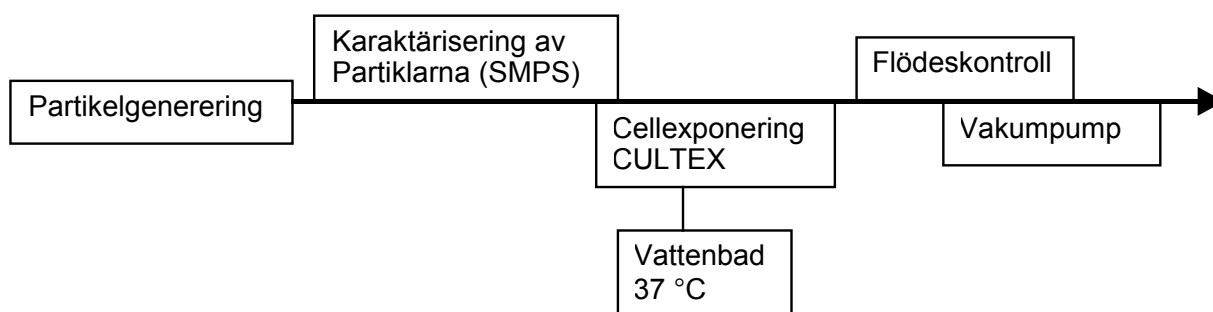
Metodik

Vi utvecklar och testar ett system där nanopartiklar genereras varefter celler direkt exponeras för dessa. Nanopartiklar genereras genom två olika metoder:

- i) Kommersiellt tillgängligt där nanopulver av metalloxider görs luftburna med hjälp av en rotationsborstegenerator (RBG).
- ii) Metaller förångas i en ugn kopplad till CULTEX-systemet.

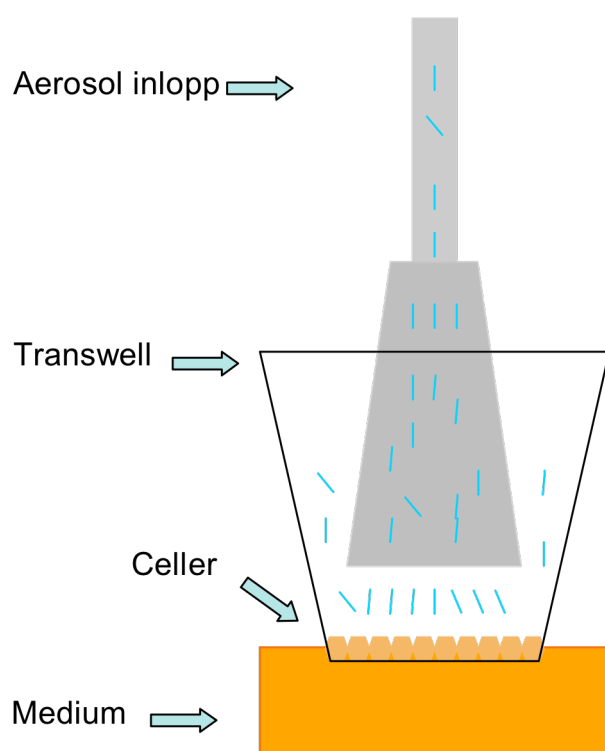
Partiklarna leds först till en SMPS (Scanning Mobility Particle Sizer) för karaktärisering och sedan till ett så kallat CULTEX-system (Vitrocell, <http://www.vitrocell.com>) som nyligen utvecklats för att möjliggöra exponering för

exempelvis gaser och partiklar (3). En schematisk beskrivning av experimentuppställningen visas i figur 1.



Figur 1. Schematisk beskrivning av experimentuppställningen

CULTEX-systemets princip är att lungceller odlas på ett membran ("transwells") som innebär att cellerna får näring från ett cellmedium under membranet, medan det ovan cellerna enbart finns en exponeringsaerosol (en blandning av luft och partiklar) (se figur 2). Hela systemet värms med ett vattenbad (37°C). Genom detta system



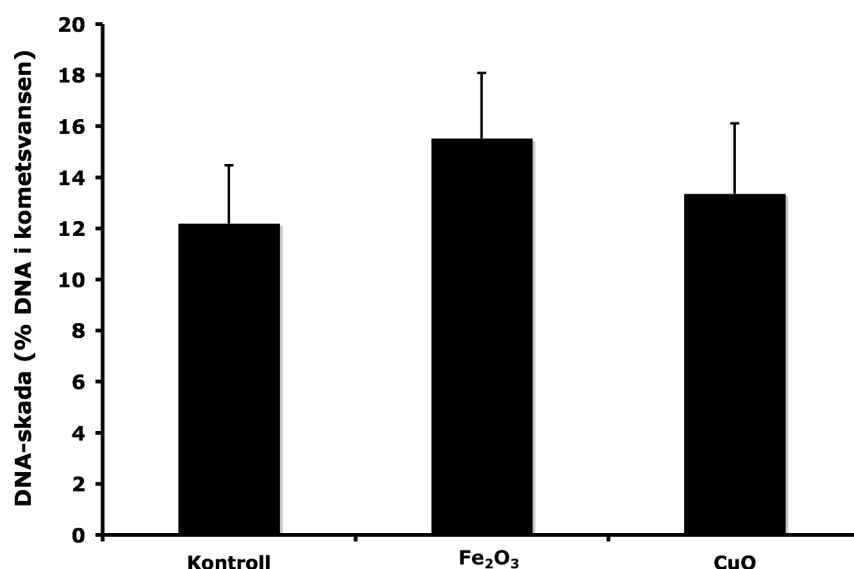
Figur 2. Schematisk beskrivning av principen för cellexponering med hjälp av CULTEX-systemet. Celler odlas på en membran ("transwell") med cellmedium under membranet och med ett flöde av luft/partiklar ovanifrån, vilket hindrar partiklarna från att interagera med cellmediet.

exponeras cellerna i gränsen mellan luft och vätska för direktgenererade partiklar. Jämfört med den traditionella metodiken för att studera partiklars effekter på lungceller är detta system betydligt mer likt en verklig exponeringssituation.

Utveckling och utvärdering av CULTEX-systemet

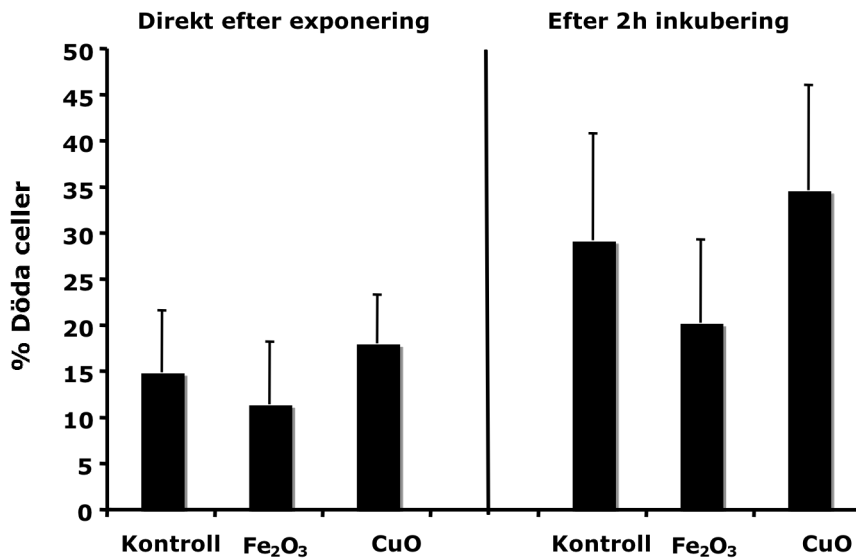
CULTEX-systemet är en ny metodik uppsatt på Institutionen för Biovetenskaper och Näringslära på Karolinska Institutet med hjälp av ett anslag från Ångpanneföreningen. Systemet är i funktion och optimeras fn för nano-partiklar.

1. Vid cellexponering av kommersiellt tillgängligt nanopulver av järnoxid eller kopparoxid, som gjorts luftburna med hjälp av en rotationsborstegenerator (RBG), inducerades inte signifikant mer DNA-skador av partiklar än av luft, mätt med metoden ”Comet assay” (se figur 3). Vidare inducerades inte heller celldöd i en högre utsträckning efter exponering varken av järnoxid eller kopparoxid jämfört med kontroller, mätt med infärgning av trypanblått (se figur 4).



Figur 3. DNA-skada i odlade lungceller mätt med metoden ”Comet assay”. Cellerne har exponerats för luft (kontroll), Fe₂O₃ (järnoxid) och CuO (kopparoxid) i ett CULTEX-system.

De odlade lungcellerna dog i större utsträckning i CULTEX-systemet jämfört med celler odlade i ett konventionellt cellskåp. För att åtgärda detta problem har gassammansättningen i kontrollen optimerats. Vidare har buffertkapaciteten i cellmediet optimerats. Avsaknaden av signifikant ökning av DNA-skador efter exponering av metalloxyder tros bero på en låg nivå av partikeldeponering på cellerna



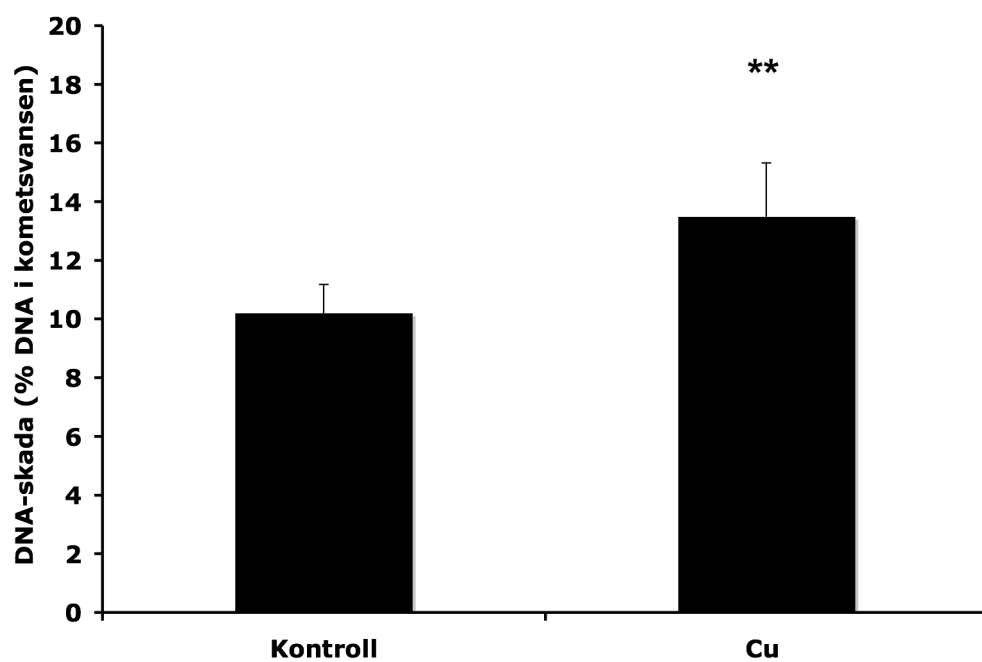
Figur 4. Celldöd i odlade lungceller mätt med infärgning med trypanblått. Cellerna har exponerats för luft (kontroll), Fe₂O₃ (järnoxid) och CuO (kopparoxid) i ett CULTEX-system. Cellerna har analyserats direkt efter samt två timmar efter exponering.

vid exponeringen. För att partiklarna ska ha möjlighet att deponera på cellerna istället för att flöda förbi används nu ett pulserande (jmf med andning) partikelflöde vilket har visats ge en högre partikeldeponering analyserat med transmissionselektronmikroskop (TEM).

2. Koppar (i form av en kopparaerosol genererad i ugnen kopplad till CULTEX-systemet) orsakar mer DNA-skador än kontrollen (en blandning av kvävgas, syre och koldioxid) vid användning av pulserande flöde (se figur 5).

Framtida applikationer

Genom detta system kommer nanopartiklar att kunna testas avseende deras giftighet (toxicitet). Exempelvis kan frågor angående hur toxiciteten påverkas av den kemiska sammansättningen hos partiklarna utredas. Vidare är det möjligt att välja ut olika storleksfraktioner för att testa om/hur toxiciteten beror på storleken på partiklarna. Med hjälp av sådana resultat finns större möjligheter för industrin att tillverka bättre pannor, partikelfilter etcetera. Med hjälp av detta system kan djurförsök undvikas.



Figur 5. DNA-skada i odlade lungceller mätt med metoden ”Comet assay”. Cellerna har exponerats för en kopparaerosol respektive en gasblandning (kontroll), i ett CULTEX-system. **, signifikant med ett p-värde <0.01.

Referenser

1. Hanna L. Karlsson, Lennart Nilsson och Lennart Möller. Subway particles are more genotoxic than street particles and induce oxidative stress in cultured human lung cells. *Chem Res Toxicol*. 2005 Jan;18(1):19-23.
2. Hanna L. Karlsson, Anders G. Ljungman, John Lindbom och Lennart Möller. Comparison of genotoxic and inflammatory effects of particles generated by wood combustion, a road simulator and collected from street and subway. *Toxicol Lett*. 2006 Sep 10;165(3):203-11.
3. Knebel JW, Ritter D, Aufderheide M. Exposure of human lung cells to native diesel motor exhaust - development of an optimized in vitro test strategy. *Toxicol In Vitro*. 2002 Apr;16(2):185-92.

Dr-avhandling där Ångpanneföreningen finns med i "acknowledgements"

"Particularly harmful particles? - A study of airborne particles with a focus on genotoxicity and oxidative stress" av Hanna Karlsson (handledare Prof L Möller) Institutionen för biovetenskaper och näringslära, Karolinska Institutet, 2006.

<http://diss.kib.ki.se/2006/91-7140-972-6/>

Vetenskapliga artiklar där Ångpanneföreningen har varit medfinansiärer och finns med i "acknowledgements"

Hanna L. Karlsson, Åsa Holgersson and Lennart Möller (2007). Mechanisms related to the genotoxicity of particles in the subway and from other sources. Chem Res Toxicol, In Press.

Hanna L. Karlsson, Pontus Cronholm, Johanna Gustafsson and Lennart Möller (2007). Copper oxide nanoparticles are highly toxic in vitro – a comparison between different nanoparticles. Submitted

Johanna Gustafsson, Hanna L. Karlsson, Pontus Cronholm and Lennart Möller (2007). The importance of particle size on the toxicity of nano and micrometer sized metal oxide particles. Final manuscript, submission in January 2008.

L. Möller (Prof), H. Karlsson (Dr) C. Johansson (Doktorand) och P. Cronholm (Doktorand)

**Karolinska Institutet, Inst för Biovetenskaper, Novum, SE 141 57
Huddinge, Stockholm
lennart.moller@ki.se
08-608 91 89, 08-608 33 26**