

IN VITRO -SOLUMALLIT SISÄILMASTA KERÄTTYJEN HIUKKASTEN TERVEYSVAIKUTUSTEN TUTKIMUKSESSA

Maria-Elisa Nordberg¹, Tamara Gajšt¹, Martin Täubel², Pasi Jalava¹, Kaisa Jalkanen², Anne Hyvärinen² ja Kati Huttunen¹

¹ Itä-Suomen Yliopisto (University of Eastern Finland, UEF)

² Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL), Ympäristöterveysyksikkö

TIIVISTELMÄ

Ihmisen keuhkosolukkoa jäljittelevät solumallit ovat oleellisia sisäilmasta kerättyjen hiukkasnäytteiden terveysvaikutusten tutkimisessa. Tavoitteemme oli optimoida kaksi solumallia altistuskokeita varten ja testata itsevalmistettua keuhkosurfaktanttia hiukkasnäytteiden laimennosliuoksena. Kolmisolu- ja primäärisolumalli kasvatettiin soluviljelyinserteillä ilman ja nesteen rajapinnassa. Ne altistettiin kaupunkiasunnon sisäilmasta kerätyille hiukkasille, jotka suspensoitiin keuhkosurfaktanttiin. Altistuksen jälkeen tarkkailtiin solukkojen vasteita ja havaittiin molempien solumallien reagoivan sisäilman hiukkasiin. Altistusta pelkälle keuhkosurfaktantille solukot sietivät hyvin. Keuhkosurfaktantti soveltuu hiukkasten laimentamiseen altistuskokeissa, ja molemmat testatut solumallit ovat käyttökelpoisia sisäilman hiukkasten vaikutusten tutkimiseen.

JOHDANTO

Eläinkokeita on käytetty jo pitkään keuhkotoksisuuden tutkimuksessa, mutta jyrsijöiden hengitystiet poikkeavat ihmisen vastaavista rakenteellisesti ja toiminnallisesti /1/, minkä vuoksi eläinkokeiden tutkimustulokset eivät ole suoraan vertailukelpoisia ihmisissä havaittujen vaikutusten kanssa. Lisäksi, lainsäädännön ja eläinkokeisiin liittyvien eettisten ohjeistusten tiukentuessa, eläinkokeita on yhä enemmän alettu korvaamaan ihmisen soluja ja kudoksia hyödyntävillä *in vitro* -malleilla, jotka ovat edullisempi ja helpommin toteutettavissa oleva vaihtoehto eläinkokeille /1/.

Hengitysteiden epiteelikerros on ensimmäisenä kosketuksissa sisäänhengitettyjen hiukkasten kanssa, minkä vuoksi sitä pyritään jäljittelemään hengitysteiden kudosomeissa /1/. Inhalaatiotoksikologian tutkimuksissa yleisesti käytettyjä solulinjoja ovat karsinoomaperäiset eli sekundääriset keuhkorakkuloiden- ja keuhkoputkien epiteelisolut. Yksinkertaisimmissa solumalleissa yhtä tai useampaa sekundäärisolulinjaa kasvatetaan erilaisissa yhdistelmissä joko soluviljelynesteen alla tai ilman ja nesteen rajapinnassa. Sekundäärisoluviljelmien etu on siinä, että niitä voidaan viljellä suhteellisen pitkiä aikoja ja käyttää useissa erillisissä laboratorioskokeissa, mikä laskee myös koesarjojen kustannuksia merkittävästi. Ne ovat kuitenkin muuntuneet joissain määrin karsinoomaluonteensa takia ja näin ollen niiden vertailukelpoisuus terveeseen ihmisen keuhkosoluksoon ei ole suoraviivaista. Sekundäärisoluista kasvatetut mallit ovat myös hyvin yksinkertaisia verrattuna oikeaan keuhkokudokseen, joka koostuu useista eri solutyypeistä eri tehtävineen. Monimutkaisempien, useammasta solulinjasta koostuvien solumallien on ajateltu mahdollistavan solujen välisen viestinnän ja vuorovaikutuksen totuudenmukaisemman ja monipuolisemman tutkimisen /2, 3/. Yhteissoluviljelmiä onkin jo joitakin vuosia käytetty erilaisten hiukkasaltistusten tutkimisessa /4, 5/.

Sekundäärisolumalleihin liittyviin haasteisiin on pyritty löytämään ratkaisua tuomalla markkinoille ihmisen nenästä, keuhkoputkista ja alveoleista eristetyistä primäärisoluista kasvatettavia keuhkokudosmalleja, jotka jäljittelevät oikeaa keuhkokudosta useine eri solutyypeineen. Primäärisolujen jakautuminen on kuitenkin rajoittunutta verrattuna sekundäärisoluihin; yleensä niitä voidaan käyttää vain yhteen laboratorionkokeeseen. Primäärisolut ovat myös kalliita ja työlämpiä kasvattaa, joten kokonaisten edustavien koeasetelmien toteuttaminen on haasteellisempää kuin sekundäärisoluilla. Toistaiseksi primäärisolujen saatavuus on rajoitettua varsinkin niissä tapauksissa, joissa solujen luovuttajien täytyy täyttää tutkimusasetelman kannalta olennaiset kriteerit.

Ihmisen hengitysteiden ja keuhkojen epiteelisolujen pintaa peittää suojaava lima- eli surfaktanttikerros. Surfaktanttia tuottavat siihen erikoistuneet epiteelisolut (pikarisolut) ja tiehyet. Ilmatie- ja keuhkosurfaktantti suojaa ihmisen soluja ja kudoksia vierailta aineilta ja taudinaiheuttajilta, kuten sieniltä, bakteereilta ja viruksilta. Käytämme itsevalmistettua keuhkosurfaktanttia altistuskokeissa jäljitelläksemme mahdollisimman totuudenmukaisesti oikeaa ihmisen hengitystiealtistusta. Tässä työssä käytetty keuhkosurfaktantti koostuu mm. vedestä, fosfolipideistä, rasvahapoista, steroleista, proteiineista ja antioksidanteista, joita on havaittu olevan ihmisperäisessä keuhkosurfaktantissa /6, 7/.

Tavoitteenamme oli optimoida ihmisen keuhkoepiteelisolukkoa jäljittelevä kolmen sekundäärisolulinjan solumalli ja monimutkaisempi primäärisolumalli altistuskokeita varten ja testata itsevalmistetun keuhkosurfaktantin toimivuutta hiukkasnäytteiden laimennosliuoksena.

MENETELMÄT

Hiukkasnäytteiden keräys ja näytteiden valmistus altistuskokeisiin

Sisäilmahiukkasnäytteet kerättiin kosteusvaurioitumattomasta kaupunkiasunnosta NIOSH BC251 -bioaerosolisyklonikeräimellä (National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH, Morgantown, WV, USA). Altistuksissa käytettiin keräimen ensimmäisen vaiheen näytettä ($\geq 2,1 \mu\text{m}$ hiukkaset). Näytettä kerättiin seitsemän päivän ajan 12 tunnin jaksoissa, jolloin kokonaiskeräysaika oli 84 tuntia. Pumppausnopeus oli näytteenkeräyksessä 10 l/min. Näytekeräyksen jälkeen näytteet pakastettiin $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Hiukkasnäytteet suspensoitiin soluviiljelynesteeseen sekoittaen voimakkaasti ja sonikoiden 15 minuutin ajan, minkä jälkeen hiukkasnäytteet laimennettiin neljään eri pitoisuuteen (1:4, 1:8, 1:16, 1:32) itsevalmistettuun keuhkosurfaktanttiin (8 mg/ml dipalmitoyylifosfatidyylikoliini, 1 mg/ml fosfatidyyliglyseroli, 0,2 mg/ml fosfatidyylietanoliini, 75 $\mu\text{g/ml}$ palmitiinihappo, 75 $\mu\text{g/ml}$ glyseryyli tripalmitaatti, 0,2 mg/ml kolesteroli, 0,5 mg/ml albumiini, 50 $\mu\text{g/ml}$ glutationi, 50 $\mu\text{g/ml}$ askorbiinihappo, 25 $\mu\text{g/ml}$ virtsahappo, 1 $\mu\text{g/ml}$ α -tokoferoli, HBSS). Keuhkosurfaktantti valmistettiin soveltaen aiempia tieteellisten julkaisuiden ohjeita /8, 9, 10/.

Kolmisolumalli

Ihmisen keuhkoepiteeli- (A549), makrofagi- (THP-1) ja endoteelisoluja (EA.hy926) ylläpidettiin ilmankosteudeltaan optimaalisessa soluviiljelyinkubaattorissa $+37 \text{ }^\circ\text{C}$ lämpötilassa ja 5 % hiilidioksidipitoisuudessa. Solut jaettiin 2-3 kertaa viikossa toimittajan ohjeiden mukaisesti.

EA.hy926-solut viljeltiin läpinäkyvien ThinCert™-soluviljelyinserttien (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Itävalta) basaalipuolelle ~6 000 solua/cm², minkä jälkeen niiden annettiin kiinnittyä kaksi tuntia. Insertit käännettiin oikein päin soluviljelynestettä (DMEM, 10% FBS, 1% Pen-Strep, 1% L-Glut) sisältävän 24-kuoppalevyn kuoppiin ja A549-solut viljeltiin inserttien apikaalipuolelle ~12 000 solua/cm². Kolmen vuorokauden kuluttua soluviljelyneeste vaihdettiin tuoreeseen insertin molemmin puolin. ja seuraavana päivänä inserttien apikaalipuolelle lisättiin erillisessä viljelmässä PMA:lla käsiteltyjä, erilaistettuja THP-1-soluja ~24 000 solua/cm². Näiden solujen annettiin kiinnittyä neljä tuntia ja solukot siirrettiin ilman ja nesteen rajapintaan poistamalla viljelyneeste insertin apikaalipuolelta. Valmiita solukkoja inkuboitin vielä yön yli ennen altistamista hiukkasnäytteille.

Primäärisolumalli

Keuhkokudossolukko kasvatettiin ihmisen keuhkoputken epiteelityvisoluista (human bronchial epithelial cell, NHBE, Lonza[®], Walkersville, MD, USA). Soluja kasvatettiin valmistajan ohjeiden mukaan ensin soluviljelypulloissa, ja solumäärän lisääntyneitä solut siirrettiin kasvamaan läpinäkyviin ThinCert™-soluviljelyinsertteihin (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Itävalta) ilman ja nesteen rajapinnassa. Keuhkokudoksen kasvua ja erilaistumista seurattiin valomikroskoopilla ja resistanssimittauksin. Keuhkokudossolukot altistettiin 22:n viljelypäivän jälkeen.

Altistukset

Altistukset tehtiin samalla tavalla molemmille solumalleille. Altistuspäivänä mitattiin molempien solukoiden resistanssi (transepithelial/transendothelial electrical resistance, TEER) käyttäen EndOhm-kammiota ja EVOM2™ -resistanssimittaria (World Precision Instruments, WPI, Sarasota, FL, USA). Solukot altistettiin kaupunkiasunnosta kerätyille sisäilmahiukkasille neljällä laimennossuhteella (1:4, 1:8, 1:16, 1:32) ilman ja nesteen rajapinnassa 24 tunnin ajan.

Analyysit ja mikroskopia

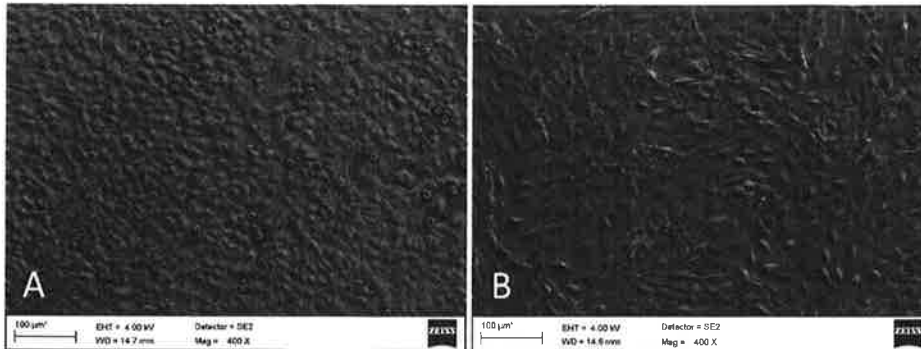
Altistusten jälkeen mitattiin solukoiden resistanssi uudelleen, minkä jälkeen solukoiden päältä kerättiin huuhteluneste proteiinianalyysijä varten ja inserttien alapuolelta soluviljelyneeste sytokiininanalyysijä varten. Proteiinianalyysit tehtiin käyttäen Bradford-reagenssia (Sigma Aldrich, Darmstadt, Saksa) ja IL-8-sytokiininanalyysit tehtiin kaupallisesti saatavalla Human CXCL8/IL-8 DuoSet ELISA -kitillä (Bio-Tech, Abingdon, Yhdistynyt kuningaskunta).

Solukot fiksattiin ja kuvannettiin valomikroskoopilla (light microscopy, LM) ja pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (scanning electron microscopy, SEM) SIB Labsissa (Itä-Suomen Yliopisto, Kuopio, Suomi). Valomikroskopiakuvaukset tehtiin Zeiss Axio Imager M2 -mikroskoopilla ja SEM-kuvaukset Zeiss Sigma HD/VP -mikroskoopilla.

TULOKSET

Mikroskopia

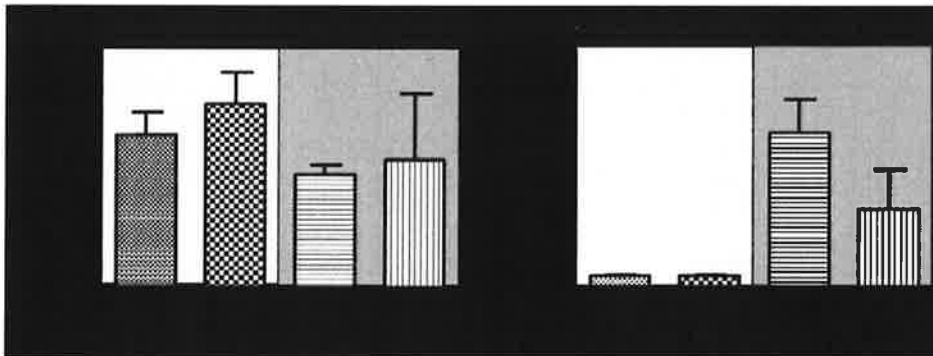
Primäärisolumallissa solujen nähtiin erilaistuneen keuhkokudoksen kaltaiseksi solukoksi soluviljelyinsertin pinnalle. Kolmisolumallissa solut kasvoivat yhtenäisenä kerroksena insertin molemmin puolin (kuva 1).



Kuva 1. Pyyhkäiselektronimikrooppikuvat A) A549- ja THP-1-soluista soluviljelyinserttien apikaalipuolella ja B) EA.hy926-soluista soluviljelyinserttien basaalipuolella kolmisolumallissa.

Kemokiini IL-8 -pitoisuus soluviljelyneesteessä ja solukkojen tiiveys

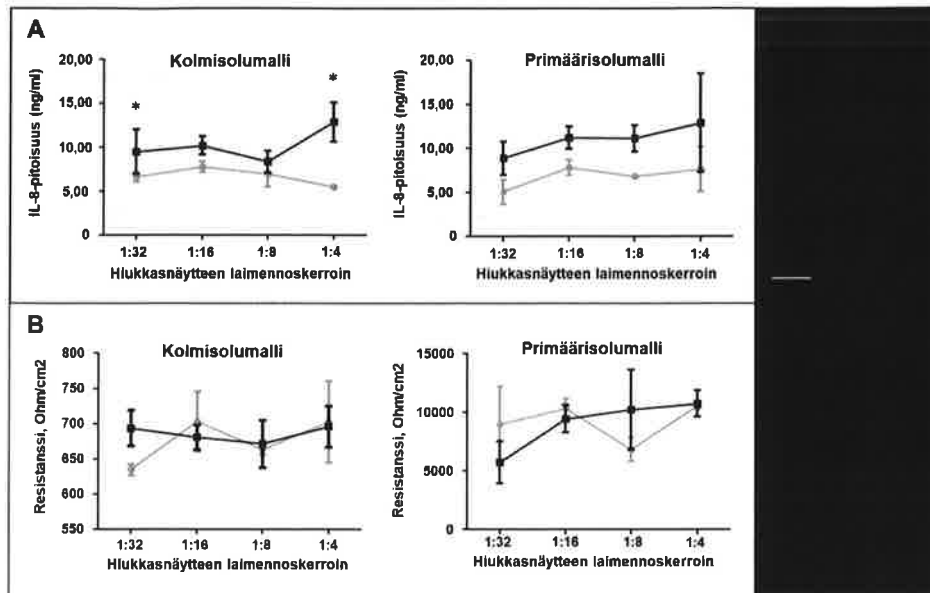
Keuhkosurfaktantille altistettujen solujen tuottama IL-8-pitoisuus ja solukon resistanssi eivät eronneet tilastollisesti merkittävästi (Mann Whitney t-testi, $p < 0,05$) pelkälle soluviljelyneesteelle altistetuista soluista kummallakaan solumallilla (kuva 2). Primäärisolumallissa solukon resistanssi oli selvästi kolmisolumallia suurempi (kuva 2).



Kuva 2. A) IL-8-pitoisuus ja B) solupeitteen resistanssi soluviljelyneesteelle ja keuhkosurfaktantille altistetussa kolmisolu- ja primäärisolumallissa.

Hiukkasnäytteelle altistetussa kolmisolumallissa IL-8-pitoisuus oli hieman suurempi kontrolliin verrattuna (kuva 3). Ero oli tilastollisesti merkittävä kahdella hiukkasnäytteen laimennoksella (1:32 ja 1:4) (kaksisuuntainen ANOVA, $p < 0,05$) (kuva 3A).

Hiukkasnäytteille altistettujen primäärisolujen IL-8 tuotanto vaikutti myös käynnistyvän altistuksen seurauksena, joskaan IL-8 pitoisuudessa ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa kontrollinäytteisiin verratessa (kuva 3A). Solukon resistanssimittauksissa ei havaittu merkittävää eroa näytteiden ja kontrollien välillä kummankaan solumallin kohdalla (kaksisuuntainen ANOVA, $p < 0,05$) (kuva 3B).



Kuva 3. Kolmi- ja primäärisolumallin A) IL-8-pitoisuus ja B) solukon resistanssi 24 tunnin hiukkasaltistuksen jälkeen. Hiukkasnäyte ja vastaava kontrollinäyte on laimennettu 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32 keuhkosurfaktanttiin.

Solukkojen huuhtelunesteen proteiininmittauksen herkkyuden todettiin olevan riittämätön erottelemaan eri altisteiden vaikutuksia molemmissa solumalleissa.

JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksessa havaittiin, että keuhkosurfaktantti soveltui hyvin hiukkasten laimennosliuokseksi eikä se ollut haitallista altistetuille soluille. Keuhkosurfaktantin koostumus ja vaikutukset soluihin voivat kuitenkin vaihdella eri valmistuserien välillä riippuen sekoituksen onnistumisesta, minkä vuoksi kukin erä on hyvä testata soluilla ennen varsinaisten altistuskokeiden aloittamista. Molemmissa solumalleissa solujen kasvatus soluviljelyinserteillä ilman ja nesteen rajapinnassa onnistui hyvin, ja kolmisolumallissa mikroskoopilla voitiin todeta solujen jakautuneen tasaisesti kasvatusalustana toimivan soluviljelyinsertin molemmille puolille. Lievästi kohonneen IL-8 -pitoisuuden perusteella hiukkasaltistus aktivoi altistettuja soluja, mutta mittaustulosten vaihtelun vuoksi ero kontrollinäytteisiin verrattuna oli tilastollisesti merkittävä vain muutamalla annoksella. Solukkojen resistanssissa ei havaittu kummankaan solumallin kohdalla merkittävää eroa altistettujen ja kontrollinäytteiden välillä, mikä viittaa siihen, ettei altistus ollut soluille akuutisti toksinen. Primäärisolumalli oli selvästi kolmisolumallia tiiviimpi, joten resistanssimittaukset soveltuvat paremmin primäärisoluista erilaistetun solukon eheyden arviointiin.

KIITOKSET

Kiitämme Suomen Akatemiaa hankkeen rahoittamisesta (rahoitusnumero 296724 ja 296587).

LÄHDELUETTELO

1. Huttunen, K. ja Korkalainen, M. (2017) Microbial Secondary Metabolites and Knowledge on Inhalation Effects. Exposure to Microbiological Agents in Indoor and Occupational Environments, 2017, s. 215-216.
2. Klein, S.G. ym. (2011) Potential of Coculture In Vitro Models to Study Inflammatory and Sensitizing Effects of Particles on the Lung. Toxicology In Vitro 25 (2011), s. 1516-1534.
3. Müller, L. ym. (2009) Oxidative Stress and Inflammation Response After Nanoparticle Exposure: Differences Between Human Lung Cell Monocultures and an Advanced Three-Dimensional Model of the Human Epithelial Airways. Journal of the Royal Society Interface.
4. Alfaro-Moreno, E. ym. (2008) Co-Cultures of Multiple Cell Types Mimic Pulmonary Cell Communication in Response to Urban PM₁₀. European Respiratory Journal 2008; 32, s. 1184-1194.
5. Klein, S.G. ym. (2013) An Improved 3D Tetraculture System Mimicking the Cellular Organization at the Alveolar Barrier to Study the Potential Toxic Effects of Particles on the Lung. Particle and Fibre Toxicology, 2013, 10:31.
6. Kumar, A. ym. (2017) A Biocompatible Synthetic Lung Fluid Based on Human Respiratory Tract Lining Fluid Composition. Pharmaceutical Research, 2017; 34(12), s. 2454-2465.
7. Bicer, E.M. (2015) Compositional Characterization of Human Respiratory Tract Lining Fluids for the Design of Disease Specific Simulants. King's College London, 2015.
8. Slade, R. ym. (1993) Comparison of Antioxidant Substances in Bronchoalveolar Lavage Cells and Fluid From Humans, Guinea Pigs, and Rats. Experimental Lung Research. Vol. 19.
9. Rauprich, P. ym. (2000) Influence of Modified Natural or Synthetic Surfactant Preparations on Growth of Bacteria Causing Infections in the Neonatal Period. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Sept. 2000, s. 817-822.
10. Sun, G. ym. (2001) Oxidative Interactions of Synthetic Lung Epithelial Lining Fluid with Metal-Containing Particulate Matter. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 281: L807-L815.