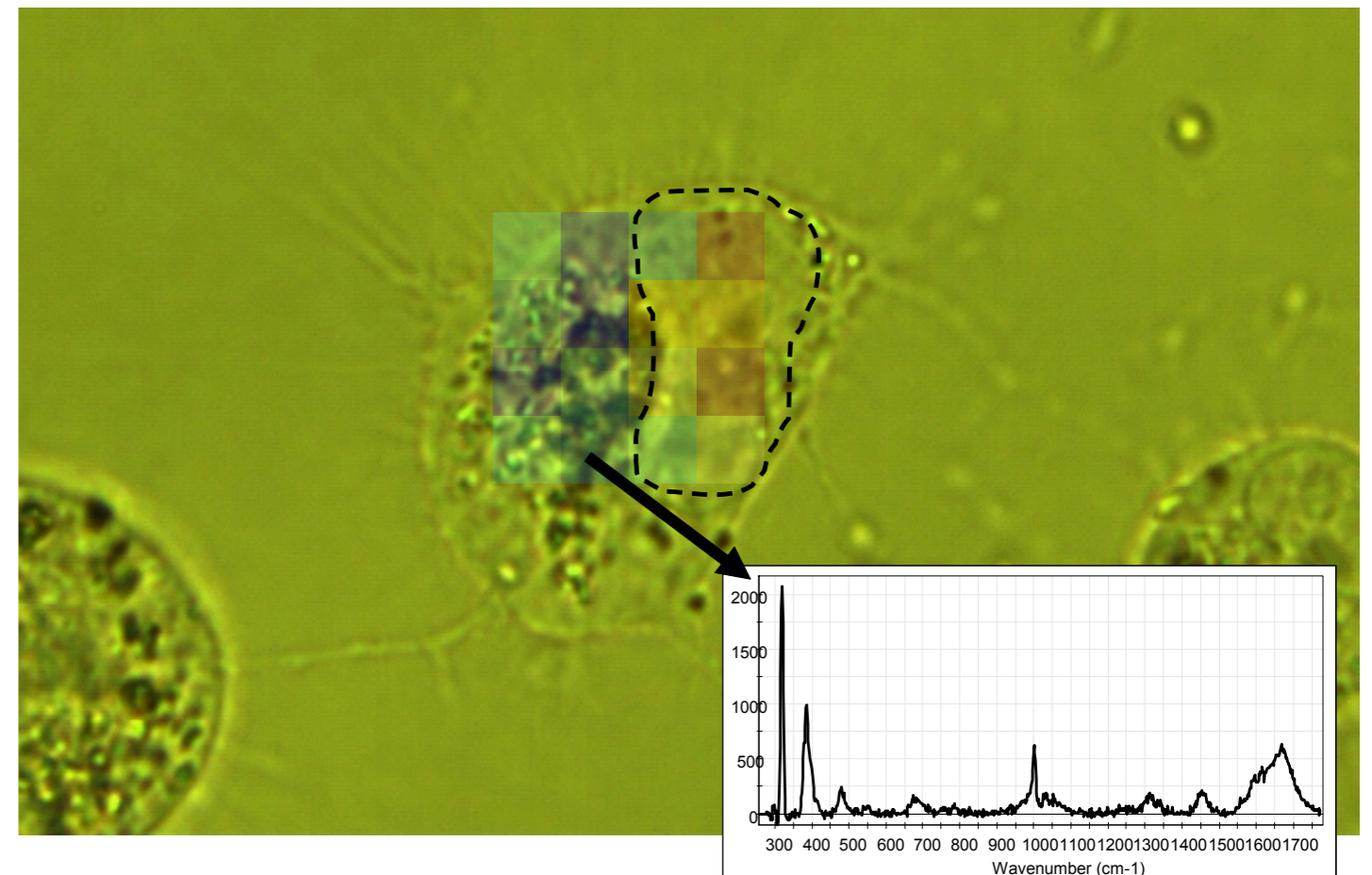


LINNEA AHLINDER OCH LARS ÖSTERLUND



FOI är en huvudsakligen uppdragsfinansierad myndighet under Försvarsdepartementet. Kärnverksamheten är forskning, metod- och teknikutveckling till nytta för försvar och säkerhet. Organisationen har cirka 1000 anställda varav ungefär 800 är forskare. Detta gör organisationen till Sveriges största forskningsinstitut. FOI ger kunderna tillgång till ledande expertis inom ett stort antal tillämpningsområden såsom säkerhetspolitiska studier och analyser inom försvar och säkerhet, bedömning av olika typer av hot, system för ledning och hantering av kriser, skydd mot och hantering av farliga ämnen, IT-säkerhet och nya sensorers möjligheter.

Linnea Ahlinder och Lars Österlund

# Hyperspektral analys av celler och vävnad exponerade för luftburna partiklar

Titel	Hyperspektral analys av celler och vävnad exponerade för luftburna partiklar
Title	Hyperspectral analysis of cells and tissue that are exposed to airborne particles
Rapportnr/Report no	FOI-R--2995--SE
Rapporttyp	Teknisk rapport
Report Type	Technical Report
Sidor/Pages	31 p
Månad/Month	Februari/February
Utgivningsår/Year	2011
ISSN	1650-1942
Kund/Customer	Försvarsdepartementet/Ministry of Defence
Projektnr/Project no	E900016
Godkänd av/Approved by	Anders Norqvist

**FOI, Totalförsvarets Forskningsinstitut**  
 Avdelningen för CBRN-skydd och säkerhet

**FOI, Swedish Defence Research Agency**  
 CBRN Defence and Security

901 82 Umeå

SE-901 82 Umeå

## Sammanfattning

Det finns en ökande kunskap om att exponering för luftburna partiklar kan vara ett hälso- och miljöproblem. Det finns därför behov att studera och kartlägga den typ av partikelexponering som försvaret måste hantera. Försvarets personal utsätts för partikelexponering i internationella uppdrag från industriella utsläpp, detonationsprodukter och förbränningsprodukter. Det pågår ett omfattande miljöarbete inom försvaret där man studerar livscykelaspekter på försvarsmateriel (energetiska material, isoleringsmateriel, saneringsmateriel etc.). Internationellt har även en ökad medvetenhet om miljö-, hälsoeffekter och dess koppling till direkta och indirekta kostnader börjat få genomslag. Mycket lite är dock känt om hälsoeffekter av små partiklar. Det är viktigt att belysa dessa aspekter, dels för att stödja riskanalyser kopplad till partikelexponering av försvarets personal eller konsekvenser av försvarets arbete, och dels för framtagande/upphandling av försvarsmateriel. En viktig del av detta arbete är att utveckla metoder för att kartlägga partikel-exponering. I detta projekt har en översyn gjorts av partikelexponering och dess hälsopåverkan. Ett urval av partiklar har lyfts fram. Dessa används i försvaret eller så bedöms det finns en ökad risk för exponering av dessa. Projektet har sammanfattat några viktiga tekniker för att karaktärisera nanopartiklar ( $< 0,1 \mu\text{m}$ ) och ultrafina partiklar ( $0,1-1 \mu\text{m}$ ), vilka anses vara mest toxiska. Hyperspektral dataanalys är en statistisk metod som har potential att kunna klassificera hälsoeffekter av små partiklar och bedöms kunna vara ett komplement till traditionella toxikologiska metoder. Studien visar att kombinationen av statistiska metoder och mikrospektroskopiska metoder utgör ett viktigt komplement till övriga metoder för att karaktärisera upptag och biologiska förändringar i celler och vävnad.

Nyckelord: Hyperspektral dataanalys, luftburna partiklar, nanopartiklar, partikelkaraktärisering, toxikologi

## Summary

There is a growing awareness that exposure to airborne particles may be a health and environmental problem. It is therefore necessary to study and identify the particle exposure that defence must handle. Defence personnel are exposed to particulate matter in international missions from industrial emissions, detonation products and combustion products. There is an ongoing work to study the life cycle aspects of defense materials (energetic materials, insulation materials, decontamination materials etc.). Internationally, the awareness of environmental and health effects, and its relation to direct and indirect costs, has increased. Little is known about the health effects of fine particles. It is important to highlight these aspects, partly to support risk assessments associated with particle exposure, or consequences of defense work, and partly for the production/procurement of defense materials. An important part of this work is to develop methods to survey particle exposure. This project is a review of particle exposure and its health effects. A selection of particles is emphasized. These are used in the defense or it is expected there is an increased risk of exposure of these. The project has summarized some important techniques for characterizing nanoparticles ( $<0.1 \mu\text{m}$ ) and ultrafine particles ( $0.1\text{-}1 \mu\text{m}$ ), which are considered most toxic. Hyperspectral data analysis are statistical methods that have the potential to classify health effects of fine particles and possibly to be a complement to traditional toxicological methods. The study shows that the combination of statistical methods and micro spectroscopic methods is an important complement to other methods to characterize the uptake and biological changes in cells and tissues.

Keywords: Hyperspectral data analysis, airborne particles, nanoparticles, particle characterisation, toxicology

# Innehåll

<b>1</b>	<b>Inledning .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Partikelkaraktärisering .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Vävnadspenetration och cellupptag .....</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>Toxicitetsstudier .....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>Relevanta partiklar för försvaret .....</b>	<b>20</b>
5.1	Aluminiumoxider.....	20
5.2	Ceriumoxid (Ceria).....	20
5.3	Järnoxider .....	20
5.4	Kol .....	21
5.5	Koppar.....	21
5.6	Polycykliska aromatiska kolväten (PAH) .....	21
5.7	Polymerer.....	22
5.8	Sillika.....	22
5.9	Silikater .....	22
5.10	Titanoxid.....	22
5.11	Wolfram.....	23
5.12	Zink .....	23
<b>6</b>	<b>Hyperspektral dataanalys .....</b>	<b>24</b>
<b>7</b>	<b>Slutsatser .....</b>	<b>28</b>
<b>8</b>	<b>Referenser .....</b>	<b>29</b>



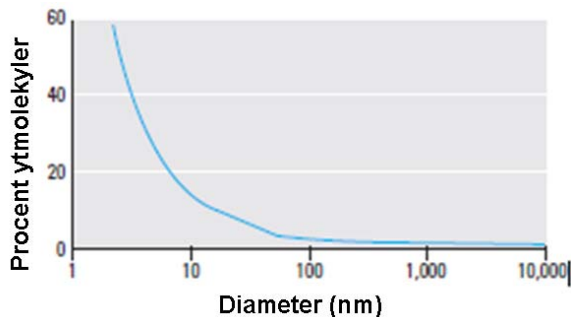
# 1 Inledning

Det finns en ökande kunskap om att exponering för luftburna partiklar kan vara ett hälso- och miljöproblem. Partiklar med varierande storlek släpps ut från både naturliga källor, t.ex. vid skogsbränder, kraftiga vindar eller vulkanutbrott, men också från allt fler antropogena källor, som t.ex. från industri, förbränningsprocesser, explosioner, fordon (emissioner och däckfriktion) etc.[1] Luftburna partiklar kan även innehålla patogener och/eller fungera som bärare av farliga ämnen. Det diskuteras i den vetenskapliga litteraturen att partiklar i kombination med annan typ av exponering kan resultera i synergetiska negativa effekter som är allvarligare än de individuella komponenterna. Partiklar med en mindre diameter än 100 nm benämns som nanopartiklar och de är förknippade med särskilda risker. Storlek ( $D_{90}$ ; diameter för 90 % av partiklarna) och partikelstorleksfördelning ( $PSF = D_{90}/D_{10}$ ) brukar ofta definieras olika inom olika tillämpningsområden. En användbar definition är följande[2]:

<b>Storlek (<math>D_{90}</math>)</b>	<b><math>PSF (D_{90}/D_{10})</math></b>
Nanopartiklar < 0,1 $\mu\text{m}$	Monodispersiv < 1,02 (idealt = 1,00)
Ultrafina partiklar 0,1 – 1 $\mu\text{m}$	Ultrasmal 1,02 – 1,05
Fina partiklar 1 – 10 $\mu\text{m}$	Smal 1,05 – 1,5
Medium 10 – 1,000 $\mu\text{m}$	Medium 1,5 – 4
Grova 1 – 10 mm	Bred 4 – 10
Mycket grova > 10 mm	Mycket bred > 10

Storleken gör att nanopartiklar kan få annorlunda optiska, magnetiska eller elektroniska egenskaper, och att de per viktenhet får en mycket stor yta. De viskösa krafterna är i samma storleksordning eller större än gravimetriska för små partiklar och gör att de kan vara luftburna lång tid och färdas lång väg från utsläppskällan beroende på transportmekanismer. Den stora ytan och de förändrade elektroniska egenskaperna kan göra partiklarna mer reaktiva och ger dem en förmåga att adsorbera fler molekyler per viktenhet än större partiklar (se figur 1).[3, 4] Storleken gör också att nanopartiklar har en annorlunda biokinetik än större partiklar. De kan tas upp av celler, transporteras till olika organ och kan, till skillnad från större partiklar, transporteras via nerver till centrala nervsystemet.[1] Nanopartiklar kan på så sätt ha andra egenskaper än samma ämne i större partikelstorlek och det är svårt att förutsäga deras toxicitet baserat enbart på deras bulkegenskaper. Specifika studier av nanopartiklar bör göras för att klarlägga spridning, toxicitet, bioackumulering och upptag.





**Figur 1.** Antal ytmolekyler, som funktion av partikelstorlek. Bild från Oberdörster et al. 2005.

Koncentrationen av nanopartiklar i omgivande luft är i regel låg, men där det frisätts nanopartiklar kan koncentrationen vara mångdubbel bakgrundsnivån och eftersom partikelstorleken är så liten motsvarar en låg koncentration ett stort antal partiklar.[1] Inom försvaret används material och metoder som kan ge ökad exponering för partiklar, t.ex. kan en ökad exponering för nanopartiklar fås från detonationsprodukter, rökgranater och ammunitionsrester (wolfram, koppar, zink, bly, krom, tenn, polymerer etc.), tillsatser i bränsle för förbättrad förbränning (aluminiumoxid, ceria etc.), saneringspulver (oxider av jordartsmetaller, titan, järn, etc.), industrikemikalier (kol, PAH, silika etc.), byggnads- och isoleringsmaterial (silikater) och förbränningsprodukter (kol, kisel, zink etc.).

Här ges en sammanfattning av kunskapsläget och de rådande forskningstrenderna kring riskerna med nanopartiklar och hur dessa risker kan utvärderas. Särskilt fokuserar denna studie på möjligheterna att använda hyperspektral dataanalys av Ramanspektroskopidata för att prediktera toxicitet hos luftburna partiklar och aerosoler, som är relevanta i försvarsrelaterade tillämpningar.

## 2 Partikelkaraktärisering

Vikten av att noggrant karaktärisera nanopartiklar i relevant media har pekats ut i flera rapporter.[1, 3, 4, 5, 6] Eftersom nanopartiklar har speciella egenskaper p.g.a. sin storlek innebär det att fler egenskaper än de traditionella, massbaserade, egenskaperna måste bestämmas.[5] Storlek, kemisk sammansättning och ytegenskaper är bland de viktigaste egenskaperna som bidrar till en partikels toxicitet och utöver toxicitet är det relevant att undersöka om partikeln kan bioackumuleras.[1, 3, 6, 7] Partiklar som riskerar att bioackumuleras är partiklar som är persistenta och fettlösliga. Därmed är löslighet, som också till stor del beror av storlek och ytegenskaper, en annan viktig egenskap att bestämma vid en riskutvärdering.[5]

Karaktäriseringen av nanopartiklar kan försvåras av flera faktorer. Ett av de största problemen är att det är svårt att detektera och koncentrationsbestämma nanopartiklar i matriser där nanopartiklarna utgör en mycket liten del av provet.[6] Dessutom saknas det certifierade referensmaterial och det finns endast ett fåtal standarder att använda för kalibrering.[3, 6] Standardmaterial kan endast fås från statliga institut som NIST och BCR. Vanliga referensmaterial för ultrafina och fina partiklar är NIST/BCR SRM latex (polystyren)  $> 0,2 \mu\text{m}$  och BCR CRM-kvarts  $> 1 \mu\text{m}$ . Motsvarande standarder för nanopartiklar har kort livslängd jämfört med andra standarder. Det är vanligt att de nanopartiklar som ska karaktäriseras är i form av kolloida lösningar, vilka inte är stabila, och därför krävs det metoder som påverkar provet minimalt. Av den anledningen är det vanligt att använda ljusspridningsmetoder för detektion.[6] Partiklar kan detekteras med en rad olika tekniker som alla har sina för- och nackdelar.[2] En del tekniker kan användas för flera olika provformer (aerosol, emulsion, pulver, torrt pulver i luft, sprej, suspension). Andra är begränsade till en viss form av provform (aerosol eller suspension). Det är önskvärt att mäta antalet partiklar till skillnad mot massa eller volym eller andra storheter som endast indirekt kopplar till det verkliga antalet partiklar. Dynamisk ljusspridning (DLS), laserdiffraktion (t.ex. statisk ljusspridning, SLS), elektro-akustisk, elektronmikroskopi (SEM eller TEM) och sedimenteringsmetoder är användbara för suspensioner, medan elektrisk mobilitet, laserdiffraktion, impaktering och time-of-flight är de tekniker som främst används för luftburna partiklar och aerosoler.[2] Kristallstruktur och morfologi kan bestämmas med transmissions-elektronmikroskopi (TEM, se nedan) och är ett viktigt komplement till medelvärdesbildande tekniker som inte tar hänsyn till partikelform. För pulver är röntgendiffraktion (XRD) en etablerad metod som både ger information om (medel-) partikelstorlek och kristallstruktur.[6] Elektrisk mobilitetsanalys där partiklar differentieras i ett elektriskt fält (differential mobilitetsanalys, DMA) är en av få tekniker att studera partikelstorleksfördelning under 10 nm i luft och är föreslagen att ingå som metod för att karaktärisera nanopartiklar i inhalationsstudier i en föreslagen ISO standard (ISO/EN 10808:2010).

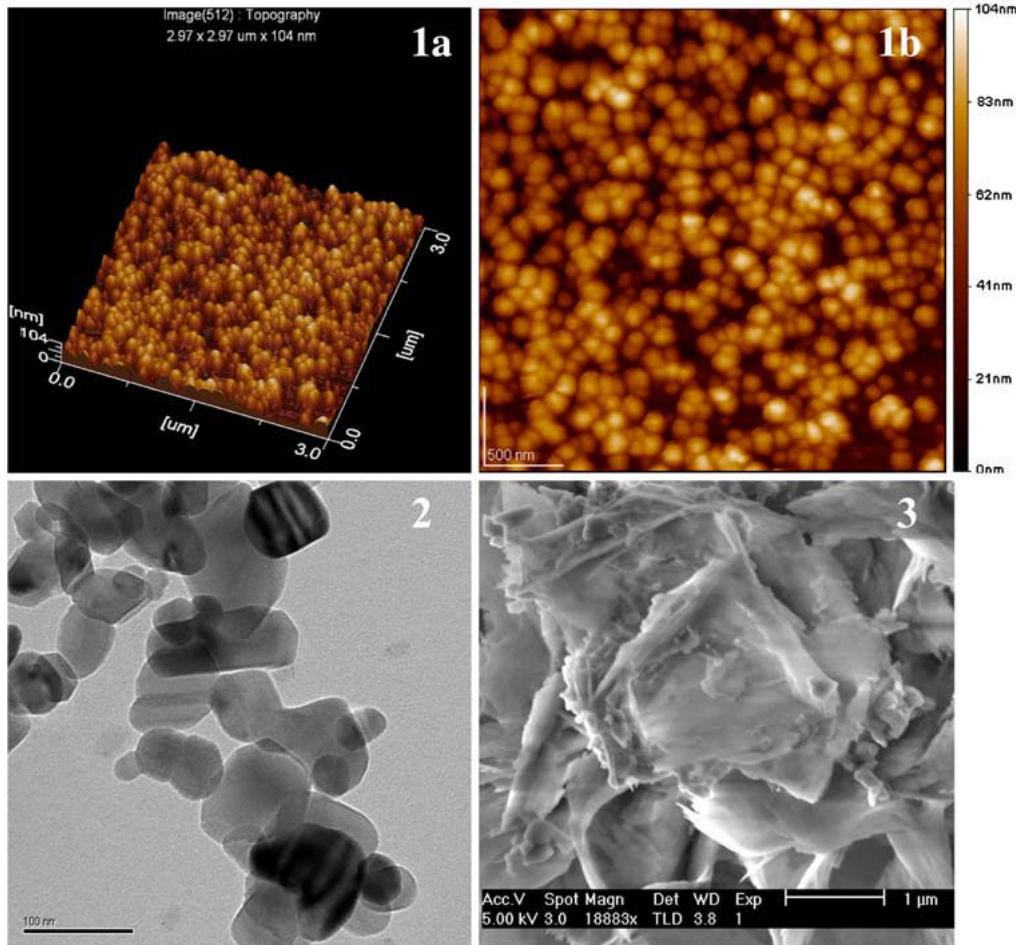
Partiklar med olika storlek och form kan ha olika löslighet och toxicitet och lösligheten kan påverkas avsevärt av adsorberade joner eller molekyler.[5] Lösligheten är något som också varierar med t.ex. pH och jonstyrka och därför varierar lösligheten in vivo och förändras troligen av de biokemiska reaktioner

som partiklarna kan trigga igång.[5] En karaktärisering försvåras därför av att det kan vara problematiskt att bereda suspensioner som ger en tillförlitlig bild av hur partiklarna uppträder i den miljö där de ska studeras.[3] Problemet finns också inom ekotoxikologin, där det idag saknas kunskap kring hur nanomaterial bör blandas med sediment/jord för olika ekotoxikologiska försök.[3] En bestämning av lösligheten försvåras också av att nanopartiklar lätt bildar aggregat eller agglomerat<sup>1</sup>, vilket påverkar partikelstorlek och ytegenskaper så att både löslighet och andra egenskaper som hör ihop med toxicitet kan förändras.[3] Det är därför viktigt att bestämma storleken hos och lösligheten för både primärpartiklarna och de partikelaggregat och partikelagglomerat, i relevant media, som partiklarna uppträder i.

Vanliga metoder för storleksbestämning i lösning är ljusspridningsmetoder, där elektromagnetisk strålning, t.ex. laser, röntgenstrålning eller neutroner, används för karaktärisering.[6] Med dynamisk ljusspridning (DLS) mäts variationer i det spridda ljus som beror av partikelns diffusion. Det är en enkel och snabb metod, som är mycket användbar så länge systemet inte består av många olika komponenter, då tolkningen blir för komplicerad. Statisk ljusspridning (SLS) kan användas tillsammans med DLS för att ge information om partikelns form. SLS är en metod där det utnyttjas att partiklar ger olika interferensmönster beroende på storlek. Ytterligare en ljusspridningsmetod är nefelometri, det där mäts hur monokromatiskt ljus förändras när det sprids från provet. Det finns ett samband mellan ljusets intensitet och partikelns storlek, men sambandet är inte trivialt och metoden passar bara för karaktärisering av väldefinierade partiklar i ett visst storleksintervall.[6]

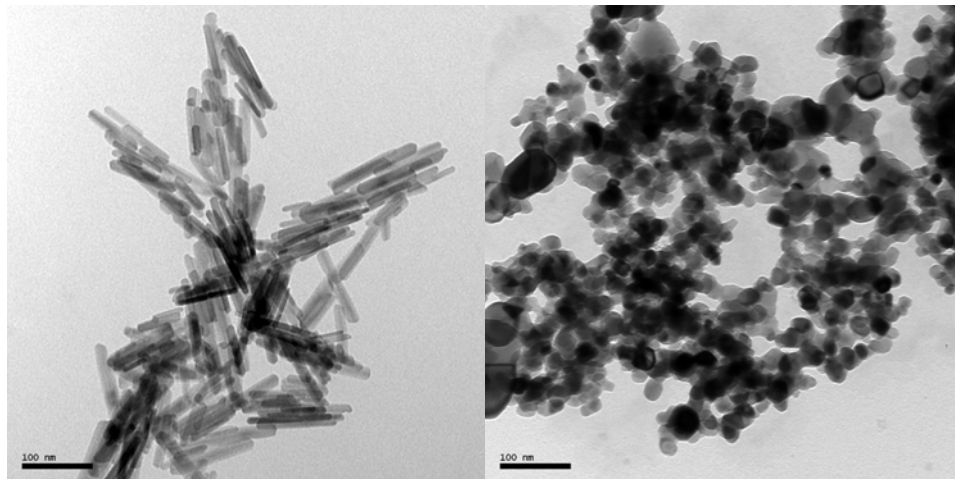
---

<sup>1</sup> Aggregat är definierat som hårda agglomerat och är således en undergrupp av den mer generella benämningen agglomerat.



**Figur 2.** ZnO-nanopartiklar (50-70 nm) dispergerade i destillerat vatten, torkade på silika och avbildade med AFM (1a och 1b), TEM (2) och SEM (3) under standardförhållanden. Bild från Hassellöv et al. 2009.

Förutom ljusspridningsmetoder har spektroskopi (fluorescens, UV-Vis), elektronmikroskopi och atomkraftsmikroskopi (AFM) använts för storleksbestämning (se exempel i figur 2).[6] Fluorescens kan också användas för att undersöka partikeldistribution eftersom det är en metod som även ger spatial information om den kopplas med optisk mikroskopi, och speciellt konfokal optisk mikroskopi.[6] Metoden kräver dock att partikeln antingen är naturligt fluorescerande eller är inmärkt med en fluorofor. I syftet att undersöka partikeldistribution är isotopmärkning, kärnspinsresonans (MRI) och mikro-Ramanspektroskopi eller Ramanavbildning (*eng.* imaging), intressanta metoder. De förra är experimentellt resurskrävande och begränsade till vissa ämnen, speciellt para-magnetiska för MRI. Raman imaging har utvecklats mycket de senaste åren och ger både spatial och kemisk information, samtidigt som den är inmärkningsfri.[8]



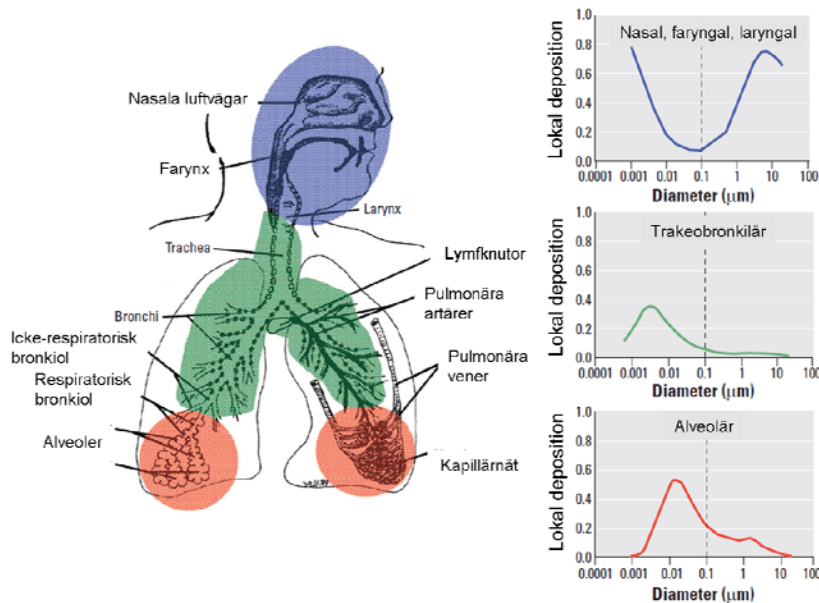
**Figur 3.** TEM-bilder av FeO(OH)-nanopartiklar (vänster) och TiO<sub>2</sub>-nanopartiklar (höger)

Elektronmikroskopi, såsom svepelektronmikroskopi (SEM) och transmissions-elektronmikroskopi (TEM, se figur 3), är metoder där enstaka partiklar från provet studeras genom att det mäts hur elektroner interagerar med partiklarnas yta. I SEM mäts de elektroner som emitteras från ytan, medan man med TEM lyser igenom provet och de elektroner som inte absorberas detekteras med en detektor, t.ex. en CCD-kamera. Elektronmikroskopi ger detaljerad information om den lokala strukturen och morfologin som är svåra att studera med andra metoder och det är också bra metoder för avbildning av partiklar, men för att få information om hela provet behövs många mätningar och därför finns ett stort behov av automatiserade instrument.[6] Andra nackdelar med elektromikroskopi är att det är metoder som kräver en komplicerad provuppställning och provupparbetning. För både SEM och TEM krävs vakuum, vilket kan påverka partiklarna. [6] Även infärgning kan vara aktuellt. [6] Med atomkraftsmikroskopi (AFM) används en tunn spets som får röra sig över ytan och repulsiva och attraherande krafter mellan spetsen och provytan mäts med hjälp av laser. Till skillnad från TEM och SEM behöver provet inte vara torrt. [6] Ytterligare en fördel är att det är en enklare provuppställning, där vakuum inte alltid behövs.[6]

Partiklarnas yta bestäms vanligen med BET-metoden (Brunauer, Emmett, Teller-metoden), i vilken provet torkas och sedan mäts adsorptionen av N<sub>2</sub>-gas på partiklarnas yta, varvid den s.k. specifika ytan erhålls.[6] Detta är en standardiserad metod för bestämning av partikelyta. Ytans laddning är svår att mäta direkt, men en uppskattning av den kan fås från den s.k. zeta-potentialen, som kan beräknas med elektrofores där mobiliteten i ett pålagt elektriskt fält mäts.[6]

### 3 Vävnadspenetration och cellupptag

När partiklar andas in deponeras de, beroende på storlek, i olika delar av andningsorganen. En signifikant mängd nanopartiklar kan, till skillnad från större partiklar, deponeras i andningsorganens alla delar (figur 4).[1]



**Figur 4.** Predikterad deposition av partiklar efter inandning. Beräkningarna är baserade på data från International Commission on Radiological Protection. Bild från Oberdörster et al. (2005)

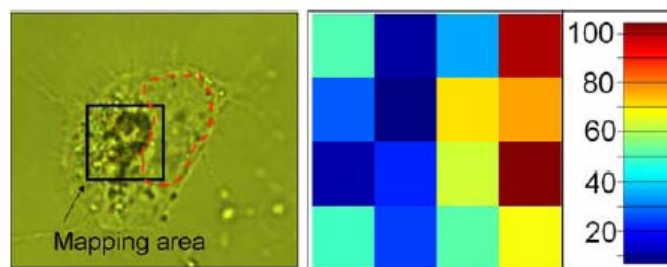
Kroppen har många mekanismer för att göra sig av med partiklar i luftvägarna. Upplösning av partiklar eller upplösning genom proteinbindning hör till de s.k. kemiska clearance-processerna, som syftar till att få partiklarna att t.ex. absorberas eller diffundera till blodcirkulationen eller det lymfatiska systemet för att oskadliggöras. Utöver kemiska clearance-processer finns det ett antal metoder för translokation av partiklar, där det vanligaste för fasta partiklar är att de omsluts av makrofager genom fagocytos.[1] Det har visat sig att fagocytos med makrofager fungerar olika effektivt för partiklar av olika storlek. I en studie där råttor exponerades för nanopartiklar visades att 80 % av de större partiklarna hade tagits upp av makrofager efter 24 h, medan 80 % av nanopartiklarna var kvar i lungorna.[1] Istället för att oskadliggöras av makrofager kan partiklarna växelverka med epitelceller eller translokera till det intrastatiska utrymmet, varifrån de kan tas upp i blodcirkulationen. Från blodcirkulationen kan partiklarna nå organ som lever, mjälte, benmärg, hjärta och njurar och det finns också en risk att partiklarna ackumuleras systemiskt.[1, 9] I en studie där järnoxidnanopartiklar undersöktes i råttor visades det att halveringstiden i blodet var så lång som 22,8 dagar.[9] Ytterligare en clearance-väg för nanopartiklar är neuronalt upptag via luktnerver, genom vilka nanopartiklarna kan transporteras till det centrala nervsystemet, CNS. Denna väg tros vara unik för nanopartiklar.[1]

Flera faktorer påverkar en nanopartikelns biokinetik. Yta och storlek är särskilt viktiga för att förutsäga partikelns öde i kroppen. Att belägga nanopartiklar med funktionella grupper kan dramatiskt påverka partikelns upptag, clearance och toxikologi, bl.a. för att partiklar med positivt laddad yta kan ge toxiska effekter genom att fästa till cellmembran.[4, 7, 10] Ytfunctionalisering av partiklar är ett framväxande område inom läkemedelsforskning och syftar bl.a. till att styra distribution av läkemedel till önskat organ i kroppen, och till att styra utsöndring av aktiv substans, samtidigt som läkemedelsbärarna, d.v.s. nanopartiklarna, inte ska påverka kroppen negativt.

Vävnadspenetrationsstudier och studier av cellupptag behövs för både ekotoxikologiska och humantoxikologiska frågeställningar.[3] Inom humantoxikologi är sådana studier viktiga för att öka förståelsen av hur nanopartiklar distribueras, metaboliseras och elimineras. Inom ekotoxikologi är det av stor vikt att kunna mäta partiklar i biologiska prover, särskilt för att utvärdera partiklars persistens och huruvida de bioackumuleras. [3] Bioackumulering kan mätas genom att upptaget över tid studeras i små organismer eller i organ i större organismer. För nanomaterial kan sådana mätningar bli besvärliga eftersom det kan vara svårt att detektera små mängder nanopartiklar.[3]

Radioaktivitetsmätningar (genom isotop-inmärkning) och fluorescensmätningar är bland de mest använda metoderna för att mäta partikeldistribution. Metoderna kräver dock att partiklarna som ska studeras är radioaktiva eller fluorescerande, vilket kan bli komplicerat eftersom det kan vara svårt och kostsamt att märka in partiklar med fluorofer och eftersom det är möjligt att de inmärkta partiklarna har annorlunda egenskaper än de partiklar som ska studeras. Andra möjliga analysmetoder är röntgenfluorecensspektroskopi (XRF), atomabsorptionsspektroskopi (AAS) och Ramanspektroskopi.[8]

Ramanspektroskopi är en metod som ger möjlighet att analysera partiklar i celler och vävnader. Ramanspektroskopi är normalt inte lika känslig som många andra metoder som fluorescens och isotop-inmärkning och det kan vara svårt att särskilja specifika kemiska komponenter i signalen pga. bakgrunds-spridning och fluorescens. Ramanmetoder har dock utvecklats under det senaste decenniet vilket har förnyat intresset för Ramanspektroskopi i medicinska och biologiska tillämpningar. Ramanspektroskopi har flera fördelar framför XRF och AAS. XRF har nackdelen att cellerna skadas i analysen och AAS ger en mycket låg spatial upplösning.[8] Med Ramanspektroskopi kan t.ex. vävnader och celler, eller delar av celler, analyseras utan att provet skadas och utan att inmärkning krävs.[8] Metoden kan användas både för att undersöka distributionen av partiklar och för att få information om andra komponenter i biologiska prover, t.ex. proteiner och lipider. Om ett konfokalt instrument används kan provet mätas i både två- och tre dimensioner, s.k. Ramanmappning eller Ramanavbildning(se figur 5). Ramanspektroskopi har tidigare använts för att lokalisera organiska föreningar i celler [11], analysera distributionen av metall-karbonylkomplex i celler [8], analysera fettrika vävnader[12], identifiera olika kemiska komponenter i celler [13], identifiera olika cellulära komponenter i bakterier [13] och för att undersöka bröstcanceravvävnad.[13] Utveckling går mot in vivo-metoder där man kopplar in laserljus och filter direkt i önskade organ/vävnad genom fiberoptik.[14, 15, 16]



**Figur 5.** Ramanmappning av human lungepitelcell (A549). Vänster: optisk mikroskopibild. Cellkärna markerad med röd streckad linje. Höger: motsvarande intensitetskarta, som visar relativ intensitet för RNA/DNA-topp vid  $782\text{ cm}^{-1}$ .

I tidigare nanotoxikologiska studier från FOI har distributionen av partiklar i lungvävnader undersökts i mikroskop och det har också gjorts en studie där partikeldistributionen i humana lungepitelceller (A549) har studerats med hjälp av mikro-Ramanspektroskopi och elektronmikroskopi (TEM).[17] Det är möjligt att också använda mikro-Ramanspektroskopi för att undersöka lungvävnader och med denna metod eventuellt påvisa partiklar som ej är synliga i mikroskop. Förutom lungvävnader finns det fler biologiska prover, t.ex. lymfknutor från råttor, som isoleras i en pågående studie, som skulle kunna undersökas med mikro-Ramanspektroskopi.

Något som kan försvåra en analys med Ramanspektroskopi är att Ramanspridningen ofta är låg och det därför kan krävas relativt långa mättider.[8] Det har i en tidigare studie av vävnader gjort att endast makroskopiska detaljer kunde mätas.[18] I en in vitro-studie användes ytförstärkt Ramanspektroskopi för att förstärka signalen.[11] Ytförstärkning kräver dock ytterligare tillförsel av partiklar och kan modifiera det biologiska svaret. I en studie av vävnad har man använt koherent anti-Stokes Ramanspektroskopi (CARS), där två lasrar används för att ge en signal som förstärks av resonans.[12] Med denna metod kan specificiteten öka men det krävs väsentliga framsteg och innovationer för att mäta i det s.k. fingeravtrycksområdet (som ger mest kemisk information) i biologiska prover med denna teknik. Mättiden kan också minskas genom att använda en känslig detektor, såsom EM-CCD, som kan detektera enstaka fotoner.[13] Denna utveckling har visat sig vara mycket användbar i fotokänsliga och biologiska prover.

En annan nackdel med Ramanspektroskopi är att bakgrunden kan bli komplicerad p.g.a. fluorescens, som kan ge en signal som är många gånger större än Ramansignalen. I en in vitro-studie har principalkomponentanalys (se Hyper-spektral dataanalys) använts för att separera Ramansignalen från bakgrunden.[19] Principalkomponentanalys har också använts för klassificering i en ex vivo-undersökning av cancervävnad. I denna undersökning användes spektralt skift-Ramanspektroskopi (SSRS) för att subtrahera fluorescens.[20]



Djupprofilerande metoder som konfokal optisk mikroskopi (ofta kopplat med fluoroforfunktionalisering) och Ramanavbildning är användbara för att studera upptagsprocesser i vävnad, inklusive hudmodeller. Med nära-infraröda (NIR) fluoroforer kan distribution i 3D erhållas på millimeterskala. Raman imaging kan ge motsvarande information i 100  $\mu\text{m}$  skala och är dessutom inmärkningsfri. Dessa metoder är intressanta för att studera upptag och distribution av både partiklar och kemikalier. Kinetisk information kan ge kunskap om dos-respons och hjälpa till för att ta fram riktlinjer för gränsvärden.

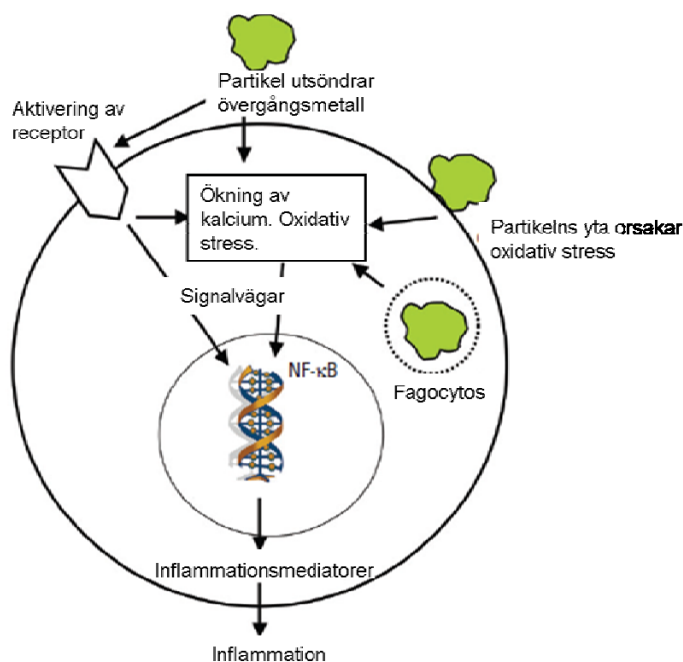
## 4 Toxicitetsstudier

Både in vivo- och in vitro-studier behövs för att utreda partiklars humantoxikologiska och ekotoxikologiska effekter. Hittills har nanopartiklar förknippats med negativa respiratoriska och kardiovaskulära effekter [1], adsorption av proteiner [21], oxidativ stress/skada [21], inflammation[1], fibros [4] och cancer [3]. Studier visar att partiklarna kan ta sig igenom cellmembran och translokera till olika organ.[1]

Nanopartiklar kan adsorbera protein, varav en del är protein som ingår i cellens försvar och som används för igenkänning av främmande material.[1] Även andra protein kan adsorberas och riskerna med detta behöver utredas. [3] Proteiner kan binda på olika sätt, antingen i sin nativa eller denaturerade form, till partiklarna och det är troligt att nanopartiklar kan bidra till att protein bildar kluster, att biologiska reaktioner störs och att proteiner veckas felaktigt.[22] Nanopartiklar kan på så sätt ha en koppling till amyloida sjukdomar.[22] En farhåga är också att nanopartiklar kan ackumuleras i organismer och att de kan adsorbera skadliga föroreningar, så att miljöstörande ämnen på så sätt koncentreras i organismer.[23]

En del av partiklarnas toxicitet är storleksberoende. Asbest är en partikel som har visat sig ge allvarliga lungskador eftersom de är för stora för att transporteras bort av makrofager.[3] Asbestfibrerna bryts inte ned, utan stannar i lungan, där de kan orsaka inflammation och ge fibros.[3] Efter långtidsexponering kan asbest orsaka cancer.[3]

Oxidativ stress har pekats ut som en av de viktigaste faktorerna för att beskriva partiklars toxicitet och som ett bra mått för att kunna jämföra toxiciteten hos många olika nanopartiklar.[24] Det finns ett direkt samband mellan partiklarnas yta och deras förmåga att bilda reaktiva syreföreningar (ROS), eftersom det på ytorna finns reaktiva grupper som kan producera superoxidradikaler.[4, 21] Produktionen av ROS beror inte bara på storleken och ytan, utan också på den kemiska kompositionen och hur partikeln interagerar med cellen.[21] Figur 6 ger exempel på olika vägar som partiklar kan ta för att orsaka oxidativ stress.



**Figur 6.** Hypotetiska cellulära interaktioner med nanopartiklar. Inflammation och oxidativ stress kan medieras genom ett antal vägar: a) partikelns yta orsakar oxidativ stress som resulterar i ökat intracellulärt kalcium och genaktivering. b) metalljoner, som utsöndrats från nanopartiklarna, orsakar oxidativ stress, ökat intracellulärt kalcium och genaktivering. c) membranbundna receptorer aktiveras av metalljoner som utsöndrats från nanopartiklar, vilket ger genaktivering. d) intracellulära nanopartiklar orsakar oxidativ stress. Bild från Oberdörster et al. 2005.

Celler kan neutralisera ROS med hjälp av antioxidanter som t.ex. glutation, men när produktionen av ROS är naturligt hög kan det bli en obalans, oxidativ stress, där glutation förbrukas samtidigt som mängden oxiderat glutation ackumuleras. En oxidativ stress skulle kunna förvärra tillståndet hos individer med sjukdomar i respirationssystemet, t.ex. astma eller kronisk obstruktiv lungsjukdom (KOL).[1] Det finns en hierarkisk modell för att beskriva oxidativ stress. Enligt denna modell producerar cellen antioxidativa enzym (fas II-responsen) vid ett första steg av oxidativ stress. Om detta inte är tillräckligt för att neutralisera ROS leder den oxidativa stressen till en pro-inflammatorisk respons, som medieras av cytokiner och kemokiner. Det sista steget är programmerad celledöd, som medieras av pro-apoptotiska faktorer, som utsöndras ur mitokondrier.

Det finns screeningmetoder för alla nivåer av oxidativ stress och för att mäta produktion av ROS. Nanopartiklars förmåga att bilda ROS har tidigare mätts indirekt genom att syrekonsumtionen har uppmätts och jämförts mot furfurylalkohol (FFA), som neutraliserar ROS [24]. ROS-produktion i celler kan studeras genom att glutation färgas in med färgade eller fluorescerande föreningar.[10, 24] Uttrycket av fas II-enzym, som t.ex. HO-1, kan mätas med immunoblotting-tekniker och enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) kan användas för att mäta mängden proinflammatoriska cytokiner som IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF och TNF- $\alpha$  eller kemokiner som IL-8.[24] I en stu-

die har även uttrycket av GM-CSF mRNA studerats med hjälp av kvantitativ Realtids-PCR.[21]

Det finns även en rad metoder för att studera cytotoxicitet. I sin enklaste form kan det göras genom en visuell undersökning med mikroskop eller elektronmikroskop för att se cellulära förändringar, men vanligast är att man använder kolorimetriska metoder för att undersöka om det finns membranskador, mitokondrieskador eller för att undersöka metabolisk aktivitet eller aktivitet hos enzym.[24] Vanligen går metoderna ut på att ett ämne med en viss färg eller fluorescens tillsätts och denna tas bara upp av celler med skadat cellmembran, alternativt tas det upp av alla celler, men blir färgad eller fluorescerande först sedan det omvandlats av enzymer eller i metabola reaktioner i friska celler. Eftersom nanopartiklar skulle kunna adsorbera infärgningar eller vara redoxaktiva kan de störa analysen, så det är ofta lämpligt att använda flera olika analysmetoder.[10] Ramanspektroskopi i kombination med en multivariat dataanalys har lyfts fram som en möjlig metod för att analysera nanopartiklar som är svåra att analysera med befintliga kolorimetriska metoder.[25]

Det finns också analysmetoder för att undersöka genotoxicitet. En sådan metod är flödescytometri, där laser används för att skilja ut celler med olika storlek och optisk densitet. Med DNA-infärgning kan flödescytometri användas för att skilja ut celler som genomgått apoptos.[10] Kometsvanstest (Comet assay) är också användbart för att undersöka DNA-skada. I kometsvanstest används gelelektrofores, där intakt DNA vandrar till överdelen av gelen medan skadat DNA bildar en "svans".[10]

Av etiska och ekonomiska skäl är in vitro-studier att föredra framför in vivo-försök, särskilt för screening. Det är också lämpligt att använda in vitro-studier för att öka förståelsen för effekter i intressanta organ eller organeller som identifierats efter in vivo-försök.[10] Det finns idag många publikationer kring in vitro-studier av upptag och toxicitet i olika cellinjer, men då både koncentrationer, exponeringstid och dos är faktorer som varierar stort, och olika grupper har använt olika cellinjer och odlingsförhållanden, är studierna svåra att jämföra med varandra.[10] Det finns ett stort behov av validerade in vitro-metoder och det är viktigt att använda relevanta doser.[3, 10] Det är även viktigt att partikelexponeringen sker på ett reproducerbart sätt med validerade tekniker (ISO/FDIS 10808:2010).

## 5 Relevanta partiklar för försvaret

### 5.1 Aluminiumoxider

Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) är föreslaget som tillsats i bränsle för att förbättra förbränningssegenskaper.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  förekommer även i skyddsmaterial, elektrisk komponenter och filtersystem. Aluminiumoxid har visats påverka tillväxten hos ett antal växter.[3] Det finns dock en osäkerhet kring om effekterna kommer från aluminiumoxidpartiklarna eller från fria aluminiumjoner.[3] Lösligheten för metalljoner är pH beroende och miljöbetingelser bör betraktas i toxikologiska studier där aluminium/aluminiumoxid förekommer. Aluminiumoxid har också testats i ett mindre antal in vitro-studier som visar att de är något cytotoxiska och genotoxiska.[26]

### 5.2 Ceriumoxid (Ceria)

Ceria eller ceriumdioxid ( $\text{CeO}_2$ ) är föreslaget som tillsats i bränsle för att förbättra förbränningssegenskaper. Bussar använder det idag som tillsats (t.ex. i Stockholm). Ceria förekommer i oxidationskatalysatorer. Ceriumoxid har antibakteriell effekt.[3, 27] och i en studie där toxiciteten hos ceriananopartiklar utvärderades hos modellorganismen *Daphna magna* fann man att ceria ger en akut toxisk effekt.[28] I in vivo- och in vitro-försök har ceria dock ökat viabiliteten hos neuronala celler, gliaceller, celler från ryggmärg samt uppvisat antiinflammatoriska egenskaper i mus.[27] Detta anses bero på redox-kemin kring  $\text{Ce}^{4+}$  och  $\text{Ce}^{3+}$ , som har en känd syrelagringsförmåga, vilket skulle kunna förklara en minskning av ROS i celler.[27]

### 5.3 Järnoxider

Järnoxid finns i flera former, såsom hematit ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), götit ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ) och maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Järnoxidpartiklar har utvärderats i flera olika cellinjer har visats vara något cytotoxiska.[10, 29] Det gäller framförallt vid högre doser ( $> 100 \mu\text{g/ml}$ ).[10] Magnetit har studerats in vivo, bl.a. i en studie där magnetit-nanopartiklar administrerades intratrakealt i råttor. Studien visade att magnetitnanopartiklar kan orsaka kronisk lunginflammation.[30] Det är också känt att järnoxidnanopartiklar kan störa blodkoagulationen.[9]

Järnoxidnanopartiklars toxicitet tycks påverkas av omgivningen, vilket har påvisats i en studie där det visats att samtidig exponering för kimrök (carbon black) och  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  framkallar oxidativ stress i humana lungepitelceller. Detta kan förklaras av att kolnanopartiklarna kan reducera  $\text{Fe}^{3+}$  i cellerna och att det kan leda till oxidativ skada.[31]

## 5.4 Kol

Kolnanopartiklar kan finnas i flera olika former. Inom försvaret används stora mängder aktivt kol i filter och skyddskläder. De har en heterogen partikelstorleksfördelning varav en del är av nanostorlek. Vanligast är att det tillverkas kolnanopartiklar i form av fulleren, såsom kol 60-nanopartiklar, kolnanorör (med ett skikt, s.k. SWNT – singel-wall nanotube, eller flera skikt, s.k. MWNT – multi-wall nanotube), [10] eller den nyupptäckta formen grafen.

Kol 60-nanopartiklar har undersökts i ett antal olika in vitro-studier, med blandat resultat. Olika cellinjer har gett olika svar.[10] Ytegenskaperna tycks vara viktiga, då hydroxylerade partiklar är mindre cytotoxiska än ursprungliga partiklar, vilket tros bero på att de ursprungliga partiklarna har en större förmåga att trigga igång ROS.[11] I en studie med öringabborre visades att kol 60-nanopartiklar gav en signifikant ökning av fettoxidering i fiskarnas hjärnor.[3] I samma studie noterades att partiklarna eventuellt påverkat mikroorganismerna i vattnet eftersom vattnet klarnade under experimentet.[3]

SWNT anses vara den mest toxiska av fullerenerna. De har testats i ett flertal cellinjer.[10] Höga doser framkallar ROS, lipidperoxidering, oxidativ stress, mitokondrieskador och ändrad cellmorfologi.[10] Liksom för kol 60-nanopartiklar är de icke-funktionaliserade partiklarna mer toxiska än partiklar som är täckta med någon funktionell grupp.[10] Det finns flera teorier för att förklara toxiciteten hos SWNT. En är att det är det järn, som krävs vid syntesen, som är toxiskt, vilket tydligt påvisar hur viktigt det är med partikelkaraktärisering och renhetsbestämning.[10]

Studier av MWNT pekar på liknande resultat som SWNT. För att syntetisera MWNT krävs dock inget järn, så den cytotoxiska effekten måste förklaras av nanopartiklarna i sig själva.[10] En teori är att de verkar genom att fästa till cellmembranet. MWNT har på grund av sin storlek liknats vid de silikamineraler, som är beståndsdelar i asbest, vilket är en partikel som kan fastna i lungorna och orsaka skador.[1, 10]

## 5.5 Koppar

Koppar förekommer i energetiska material och i olika IR-system i försvaret. Kopparnanopartiklar påverkar tillväxten av växter såsom mungbönor och vete.[3] Koppar har även studerats i in vivo-försök. I en studie med möss visades att kopparnanopartiklar var betydligt mer toxiska än större kopparpartiklar.[32] Nanopartiklarna gav skador i njurar, lever och mjälte.[32] Det rapporteras också att kopparnanopartiklar är neurotoxiska.[33]

## 5.6 Polycykliska aromatiska kolväten (PAH)

PAH är ett samlingsnamn för flera olika organiska föreningar, som lätt bildas vid förbränning av organiskt material och som finns i stadsmiljöer. PAH-blandningar har studerats in vivo och anses öka risken för cancer.[34, 35]

## 5.7 Polymerer

En ökad användning av plaster i t.ex. energetiska material (minor, granater etc.) är intressant ur återvinningsaspekt, men måste nog undersökas ur ett eko- och humantoxikologiskt perspektiv. Icke-nedbrytbara polymera material är ett växande miljöproblem som visat sig negativt påverka havsbiotoper i form av utsvaltning och minskad fertilitet. Vetenskapliga rapporter visar på upptag, translokation och bioackumulation i olika kroppsorgan av små plastpartiklar i djurmodeller. Det finns farhågor att energetiska processer kan producera små partiklar med ökad biotillgänglighet.

## 5.8 Sillika

Silika finns i kristallin och amorf form, där den kristallina formen är förknippad med silikos (lungskador besläktade med de skador som kan fås av asbest) och cancer.[27] Kristallin silika har studerats in vivo och in vitro och har visats ge oxidativ stress och en proinflammatorisk respons.[36] Även den amorfa formen, som i mikrostorlek anses vara biologiskt inert, förknippas i nanostorlek med oxidativ stress och inflammation.[37] Det finns en mängd funktionaliserade silikapartiklar, framför allt amorf silika som har modifierats på olika sätt. Många av dessa är icke-toxiska.[27]

## 5.9 Silikater

Asbest förekommer i byggnader, fordon, fartyg, helikoptrar. Försvarsmateriel köps även idag in som innehåller asbest som isoleringsmaterial. Asbest är samlingsnamn på olika kristalliserade silikatfibrer. Asbest är hälsovådligt. Fibrerna tränger in i andningsorganen och orsakar asbestos och kan ge upphov till cancer. Asbestfibrer är av en sådan storlek att de fagocyteras av makrofagerna i lungorna, men bryts ej ner. De inducerar inflammatoriska reaktioner som frisätter cytokiner och tillväxtfaktorer och vävnadstillväxt.

## 5.10 Titanoxid

Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) finns i flera former, där anatas är den form som har visats vara mest toxisk in vitro.[27] Titandioxid anses dock vara mindre toxisk än t.ex. aluminiumoxid, järnoxid, silika och kolnanopartiklar och endast vid höga doser ( $> 100 \mu\text{g/ml}$ ) har andra former än anatas visats vara cytotoxiskt och framkallat ROS.[27] I studier med just titandioxid har dock de ökade riskerna med partiklar i nanostorlek påvisats.  $\text{TiO}_2$  har studerats i råttor och det visades i denna studie att  $\text{TiO}_2$ -nanopartiklar ger en större inflammatorisk respons än ekvivalent massdos av större  $\text{TiO}_2$ -partiklar.[38] Titandioxid har studerats i en mängd cellinjer samt i flera inhalationsstudier med råttor och mus [27] och har även testats i bakterier.  $\text{TiO}_2$  har en generell antibakteriell effekt.[3]

## 5.11 Wolfram

Det finns ett fåtal studier där wolframnanopartiklar har undersökts in vitro. I doser lägre än 250 µg/ml har de inte visats ha någon cytotoxisk effekt.[39]

## 5.12 Zink

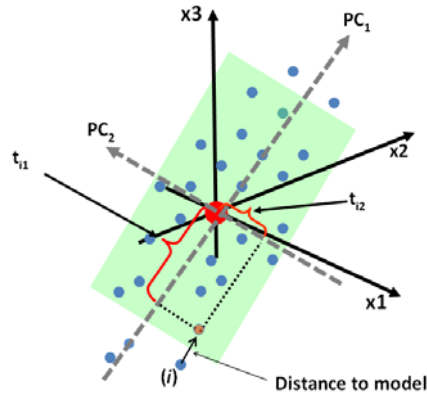
Zink förekommer i energetiska material som rökgranater. Det är en vanlig förekommande som förbränningsprodukt av biomassa. Toxiciteten hos zinknanopartiklar har inte studerats systematiskt ännu, men det finns en mängd toxicitetsstudier där zinkoxidens toxicitet har utretts. Zinkoxider har visats vara cytotoxiska i flera cellinjer, men liksom för aluminiumoxid diskuteras det huruvida en toxisk effekt kommer från nanopartiklarna eller från lösta joner.[40] Den gängse förklaringsmodellen är dock att toxiciteten härrör från lösta metalljoner.



## 6 Hyperspektral dataanalys

Det är svårt att få en överblick över stora dataset, särskilt om datasetet innehåller många variabler. Spektrala data är exempel på data som kan innehålla hundratals eller tusentals variabler (beroende på spektral upplösning) och där en analys kompliceras ytterligare av att varje spektrum består av toppar med breddning och där topparna eventuellt överlappar. Datapunkterna är således inte oberoende, utan kan vara helt eller delvis kolinjära, vilket gör att korrelationen mellan variablerna inte kan utredas med t.ex. vanlig linjärregression.[41] Spektra kan också innehålla brus och variabler/datapunkter med betydelslös information. Vid en multivariat dataanalys görs en samtidig analys av alla variabler och det är då möjligt att hitta trender och grupperingar bland observationerna/mätningarna samt att identifiera viktiga variabler (spektrala områden) och se korrelationsmönster.[41] Det finns många multivariata metoder som kan tillämpas för att få överblick över stora dataset och som kan användas för klassificering och prediktion. Ett exempel på data som kräver en multivariat dataanalys är s.k. hyperspektrala bilder. Hyperspektrala bilder är bilder där varje bildpunkt innehåller information från många våglängdsband. Bilderna används inom t.ex. fjärranalys och för kvalitetskontroll inom livsmedelsindustrin och de kan exempelvis samlas in med nära infraröd-spektroskopi [42] eller Raman-spektroskopi.[44] Hyperspektrala bilder innehåller både information om hela provet och detaljerad information om mindre delar (bildpunkter), vilket är en stor fördel om provet är komplext och inhomogent. Därför kan en hyperspektral dataanalys vara intressant i syfte att studera celler och vävnad exponerade för partiklar.

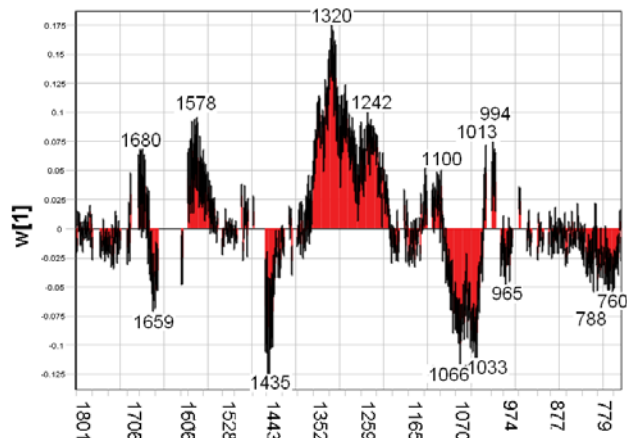
En vanlig multivariat projektionsmetod är principalkomponentanalys, PCA, där datas dimensioner minskas genom att data projiceras på principalkomponenter, variabler som sammanfattar den viktigaste spridningen i data. Genom att plotta mätningarna/observationerna i principalkomponenterna kan en bra överblick fås över data och det är möjligt att se trender och grupperingar. En sådan analys har tidigare gjorts av Ramanspektroskopidata för att analysera kolnanorörinducerad cytotoxicitet.[25] Med PCA kunde spektrala områden, som förändrats efter exponering för kolnanorör, identifieras. I PCA styrs dock inte urvalet av principalkomponenter och det är därför inte säkert att den korrelation som ska studeras kan ses, då det kan finnas andra spektrala skillnader som är större och som därför fångas upp av principalkomponenterna.



**Figur 7.** Principalkomponentanalys. Dimensionerna har minskats från tre till två genom att två principalkomponenter har beräknats (PC1 och PC2). PC1 beskriver den största spridningen i data och PC2 är ortogonal. PC1 och PC2 spänner upp ett projektiionsplan.

Partiell minstakvadratregression (PLS) är en projektiionsmetod som liknar PCA, men där urvalet av principalkomponenter styrs så att de beskriver de största skillnaderna mellan olika responsvariabler. Diskriminant PLS (PLS-DA) är ett specialfall av PLS, där responsvariablerna består av information om gruppstillhörighet. I en PLS-DA modell väljs således principalkomponenterna ut för att beskriva den största skillnaden mellan olika grupper. Båda metoderna har tidigare tillämpats på Ramanspektroskopiskt data. PLS har använts för att lokalisera E-vitamin i biologiska prover.[43] PLS-DA har använts i ett examensarbete, där en analys gjordes av spektrala skillnader mellan nanopartikel-exponerade celler och kontrollceller (se figur 8).[44]

Exempel på andra multivariata metoder som har tillämpats på spektroskopidata och som skulle kunna användas för analys och klassificering av hyperspektrala bilder är artificiella neurala nätverk, vertexkomponentanalys (VCA) och hierarkisk klusteranalys (HCA). Artificiella neurala nätverk har använts för att klassificera celler i olika cellcykelfaser [45] och HCA har använts för att urskilja olika organeller i celler [46]. VCA är en metod som har konstruerats för att urskilja komponenter (referenssubstanser) i hyperspektrala bilder där det på förhand är okänt vilka och hur många referenssubstanser som finns. Metoden har framgångsrikt använts för att urskilja vener, gallgångar, röda blodkroppar och cellkärnor i Ramanbilder från levervävnad.[47]



**Figur 8.** Viktplot från PLS-DA. Viktplotten visar viktiga spektrala områden hos celler exponerade för järnhydroxidnanopartiklar (positiva värden) och kontrollceller (negativa värden).

Dessa studier visar på möjligheterna att med hjälp av spektroskopiska metoder samla in både information från partiklar i cellen, men också samla in detaljerad information om innehållet av proteiner, lipider, DNA, RNA och kolhydrater i partikelexponerade celler, och använda data för klassificering. Detta kräver dock data av tillräckligt hög kvalitet för att en sådan analys ska kunna göras. En del metoder, t.ex. PLS, kräver också att spektra kan kopplas till responsvariabler, t.ex. toxikologiskt data och partikelkaraktäristik.

I det examensarbete som tidigare har gjorts inom hyperspektral dataanalys av lungceller exponerade för nanopartiklar identifierades några problem som försvårade analysen och pekar på framtida utvecklingsmöjligheter för Ramanavbildning av celler och vävnad.[44]

1) Man såg att signalstyrkan varierade mellan olika mättdagar, vilket ansågs bero på att lasern fluktuerar något. Detta problem löstes genom att alla spektra vektornormaliserades. En sådan normalisering leder dock till att skillnader i signalstyrka som kommer från intressanta koncentrationsskillnader mellan olika delar av cellen jämnas ut samt att mätningar som är delvis tagna utanför cellen eller utanför cellen är svårare att identifiera. Möjligheterna att på något annat sätt normalisera spektra eller komma förbi problemet med fluktuerande laserstyrka bör utredas. En del av problemet kan troligen elimineras om försöken görs randomiserat.

2) Cellerna påverkades av den långa mättiden och av uppvärmningen. I arbetet var mättiden 72 minuter (3\*90 s i varje mätpunkt) med  $\lambda=514$  nm, 12,5 mW. Vid längre mättider visade cellerna tydliga tecken på skada, genom att de släppte från substratet och fick membranskador. Det är önskvärt att mättiderna kan kortas. Det skulle i sådant fall medge att fler bildpunkter kan samlas in, t.ex. så att mätningar kan samlas in i tre dimensioner istället för i ett fixt plan. Det bör undersökas hur cellerna påverkas av att mätas fler gånger, men med kortare mättider, och om det på något sätt går att kyla provet under mätningen. Problemet skulle också kunna lösas genom att en mer känslig detektor används.

3) Spektra får en komplicerad bakgrund p.g.a. fluorescens. I den studie som gjorts kunde bakgrunden korrigeras i efterhand, men det är troligt att komponenter i vävnader och somliga partiklar kan bidra till betydligt större fluorescens än vad som observerats i examensarbetet. Metoder för fluorescensreduktion bör utredas och kan eventuellt lösas med kortare mättider och lägre laser-effekt, vilka kräver känslig fotondetektion, t.ex. EM-CCD teknologi.

4) Signal/brusförhållandet var lågt och brusfiltrering var inte möjlig eftersom den spektrala upplösningen var så låg att topparnas amplitud minskades med den bruselimineringssalgoritmen som testades. Den spektrala upplösningen kan ökas genom att använda ett annat gitter, men det leder till långa mättider. Bättre signal/brusförhållande kan fås om fler mätningar görs i varje punkt, men det krävs i sådant fall att mättiden minskas för att cellerna inte ska ta skada. Detta bör optimeras. Återigen skulle den spektrala kvalitén kunna ökas genom att en känsligare detektor kan användas. Då kan både spektral upplösning ökas och/eller signal/brusförhållandet förbättras.

5) En spektral skillnad kunde påvisas, särskilt i cytoplasma, men det gick inte att utesluta att den spektrala skillnaden är ett resultat av att partiklarna adsorberar protein. Vad adsorption av protein har för konsekvenser i ett toxikologiskt perspektiv är inte helt utrett och det saknas referensdata för att beskriva detta. Relevanta variabler till vilka man kan koppla de hyperspektrala bilderna, bör identifieras.

Sammanfattningsvis finns det en stor potential i att använda multivariata metoder för att analysera komplicerade och stora dataset, som t.ex. spektroskopidata. Med hyperspektral dataanalys kan spektrala områden, som förändrats efter partikelexponering, identifieras och den kunskapen kan eventuellt användas för prediktion och klassificering. På så sätt finns en möjlighet att metoden skulle kunna användas som ett screeningverktyg för att utvärdera risker med nanomaterial. Kunskapen om hur celler påverkas spektralt av nanopartiklar skulle även kunna ge intressant information om de mekanismer som ligger bakom toxiciteten, särskilt om toxikologisk data och information om partikelkaraktäristik, kopplas ihop med spektralt data i multivariata modeller. I den här rapporten har framför allt möjligheterna att samla in data med Ramanspektroskopi diskuterats, men även data från andra analysmetoder, t.ex. fluorescens eller nära-infraröd spektroskopi, skulle kunna analyseras multivariat för att ge information om celler och vävnader. Multivariata tekniker är också applicerbara för helt andra analysmetoder och med andra frågeställningar. Till exempel skulle det kunna vara användbart att göra en multivariat dataanalys för att analysera partiklar i andra matriser än just celler och vävnader, t.ex. textilier, och man kan också analysera andra ämnen än nanopartiklar, t.ex. läkemedel.

## 7 Slutsatser

Exponering för små partiklar är ett växande problem. Partiklar med varierande storlek släpps ut från både naturliga källor, t.ex. vid skogsbränder eller vulkanutbrott, men också från allt fler antropogena källor, som t.ex. från industri och förbränningsprocesser, och framför allt från fordon och däckfriktion. Partiklar med en mindre diameter än 100 nm benämns som nanopartiklar och de mellan 100-1000 nm kallas ultrafina partiklar. Dessa partiklar är förknippade med särskilda risker vilket bl.a. beror på deras förmåga att tas upp i människa och penetrera vävnad, samt lång uppehållstid i luft och löslighet i suspensioner. De mekanismer som ligger bakom deras toxicitet är dock inte utrett idag.

Inom försvaret används nanopartiklar som tillsats i t.ex. drivmedel, energetiska material, saneringsmedel och i filter och skyddskläder. Nanopartiklar kan genereras vid explosioner och impaktering (wolfram, zink, koppar, plaster, etc.) och förekommer i luftburna utsläpp (rökgaser, avgaser från fordon, industrier, etc.). Nanopartiklar föreslås även användas i detektionsinstrument, skyddskläder och som bärare av läkemedel. Det finns även farhågor att nanopartiklar kan användas som bärare av toxiska ämnen i antagonistiska syften. Sammantaget ger det en behovsbild att systematiskt sammanställa vetenskaplig data och föreslå metoder för att klassificera och identifiera potentiella risker associerade med olika typer av nanopartiklar.

Karaktärisering och klassificering av toxiska egenskaper hos små ( $< 1 \mu\text{m}$ ) partiklar kräver avancerad teknologi. Det är ofta nödvändigt att använda statistiska modeller för att gruppera och klassificera stora datamängder där man inte har a priori kunskap om orsak-verkansamband. Kombinationen av hyperspektral dataanalys och laserbaserad detektion av partiklar är en lovande teknologi för att klassificera både partikeldistribution i celler och vävnad och för att studera partikelinducerade cellulära och biokemiska föreändringar. Konfokala optiska detektionstekniker som bygger på fluorescens och vibrationsspektroskopi är intressanta, speciellt Raman imaging öppnar upp möjligheten för djupprofilerande (3D) avbildning av celler och vävnader exponerade för partiklar. Raman imaging är en inmärkningsfri metod som dessutom kan användas för att göra 3D analys av kemikalier och partiklar i textilier och bör därför kunna tillämpas i penetrationsstudier för personligt skydd.

## 8 Referenser

- [1] Oberdörster, G; Oberdörster, E; Oberdörster, J. 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives* 113, pp.823-839.
- [2] H. G. Merkus, *Particle Size Measurements, Particle Technology Series, Vol 17*, Springer, 2009
- [3] *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. 2004. The Royal Society & The Royal Academy of Engineering*
- [4] Nel, A; Xia, T; Mädler, L; Li, N. 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* 311, pp.622-627.
- [5] Borm, P; Klaessig, F.C; Landry, T.D; Moudgil, B, Pauluhn, J; Thomas, K; Trottier, R; Wood, S. 2005. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part V: Role of Dissolution in Biological Fate and Effects of Nanoscale Particles. *Toxicological Sciences* 90, pp.23-32.
- [6] Hassellöv, M; Readman, J.W; Ranville, J.F; Tiede, K. 2008. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* 17, pp.344-361.
- [7] Wiesner, M.R; Lowry, G.V; Alvarez, P; Dionysiou, D; Biswas, P. 2006. Assessing the Risks of Manufactured Nanomaterials. *Environmental Science & Technology* 15, pp.4336-4345.
- [8] Meister, K; Niesel, J; Schatzschneider, U; Metzler-Nolte, N; Schmidt, D.A; Havanith, M. 2010. Label-free Imaging of Metal-Carbonyl Complexes in Live Cells by Raman Microspectroscopy. *Angewandte Chemie* 49, pp.3310-3312.
- [9] Zhu, M-T; Feng, W-Y; Wang, Y; Wang, B; Wang, M; Ouyang, H; Zhao, Y-L; Chai, Z-F. 2008. Particokinetics and Extrapulmonary Translocation of Intratracheally Instilled Ferric Oxide Nanoparticles in Rats and the Potential Health Risk Assessment. *Toxicological Sciences* 107, pp.342-351.
- [10] Lewinski, N; Colvin, V; Drezek, R. 2008. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* 4, pp.26-49.
- [11] Eliasson, C; Lorén, A; Engelbrektsson, J; Josefson, M; Abrahamsson, J; Abrahamsson, K. 2005. Surface-enhanced Raman scattering imaging of single living lymphocytes with multivariate evaluation. *Spectrochimica acta part A* 61, pp.755-760.
- [12] Evans, C.L; Potma, E.O; Puoris'haag, M; Côté, D; Lin, C.P; Xie, S. 2005. Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *PNAS* 46, pp.16807-16812.

- [13] Confocal Raman: Imaging in Life Science – Living Cells, Bacteria & Tissues. 2009. WITec application note.
- [14] D. B. Chithrani, C. W. Chan, C. W. *Nano Lett.* 2007, 7, 1542; S.
- [15] Keren et al *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105, 5844
- [16] C. Krafft et al, *Spectrosc. Eur.* 2010, 22, 14
- [17] Andersson, P.O; Lejon, C; Ekstrand-Hammarström, B; Akfur, C; Ahlinder, L; Bucht, A; Österlund, L. 2010. Polymorph and size dependent uptake and toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in living lung epithelial cells. Submitted to Small.
- [18] Krafft, C; Codrich, D; Pelizzo, G; Sego, V. 2007. Raman and FTIR imaging of lung tissue: Methodology for control samples. *Vibrational Spectroscopy* 46, pp.141-149.
- [19] Eliasson, C; Lorén, A; Murty, K.V.G.K; Josefson, M; Käll, M; Abrahamsson, J; Abrahamsson, K. 2001. Multivariate evaluation of doxorubicin surface-enhanced Raman spectra. *Spectrochimica Acta part A* 57, pp.1907-1915.
- [20] Margee, N.D; Villaumie, J.S; Marple, E.T; Ennis, M; Elborn, J.S; McGarvey, J.J. 2009. Ex Vivo Diagnosis of Lung Cancer Using a Raman Miniprobe. *The Journal of Physical Chemistry B* 113, pp.8137-8141.
- [21] Hussain, S; Boland, S; Baeza-Squiban, A; Hamel, R; Thomassen, L.C.J; Martens, J.A; Billon-Galland, M.A; Felury-Feith, J; Moisan, F; Pairon, J.C; Marano, F. 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology* 260, pp.142-149.
- [22] Linse, S; Cabaleiro-Lago, C; Xue, W.F; Lynch, I; Lindman, S; Thulin, E; Radford, S.E. 2007. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *PNAS* 104, pp.8691-8696.
- [23] Petersen, E.J; Huang, Q; Weber Jr, W.J. 2008. Ecological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Lumbricus variegatus*. *Environmental Health Perspectives* 116, pp.496-500.
- [24] Xia, L; Kovochich, M; Brant, J; Hotze, M; Sempf, J; Oberley, T; Sioutas, C; Yeh, J.I; Wiesner, M.R; Nel, A.E. 2006. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles to Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. *Nano Letters* 8, pp.1794-1807.
- [25] Knief, P; Clarke, C; Herzog, E; Davoren, M; Lyng, F.M; Meade, A.D; Byrne, H.J. 2009. Raman spectroscopy – a potential platform for the rapid measurement of carbon nanotube-induced cytotoxicity. *Analyst* 134, pp.1182-1191.

- [26] Di Virgilio, A.L; Reigosa, M, Arnal, P.M; Fernández Lorenzo de Mele, M. 2010. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of Hazardous Materials* 177, pp.711-718.
- [27] Suh, W.H; Suslick, K.S; Stucky, G.D; Suh, Y-H. 2009. Nanotechnology, nanotoxicology and neuroscience. *Progress in Neurobiology* 87, pp.133-170.
- [28] García, A; Espinosa, R; Delgado, L; Casals, E; González, E, Puentes, V; Barata, C; Font, X; Sánchez, A. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. 2010. *Desalination*. In press.
- [29] Karlsson, H.L; Gustafsson, J; Cronholm, P; Möller, L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles – A comparison between nano- and microscale. *Toxicology letters* 188, pp.112-118.
- [30] Park, E-J; Kim, H; Kim, Y; Yi, J; Coi, K; Park, K. 2010. Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice. *Toxicology* 275, pp.65-71.
- [31] Guo, B; Zebda, R; Drake, S.J; Sayes, C.M. 2009. Synergistic effect of co-exposure to carbon black and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on oxidative stress in cultured lung epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology* 6:4.
- [32] Chen, Z; Meng, H; Xing, G; Chen, C; Zhao, Y; Jia, G; Wang, T; Yuan, H; Ye, C; Zhao, F; Chai, Z; Zhu, C; Fang, X; Ma, B; Wan, L. 2005. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters* 163, pp.109-120.
- [33] Wang, J; Rahman, M.F; Duhart, H.M; Newport, G.D; Patterson, T.A; Murdock, R.C; Hussain, S.M; Schlager, J.J; Ali, S.F. 2009. Expression changes of dopaminergic system-related genes in PC12 cells induced by manganese, silver or copper nanoparticles. *NeuroToxicology* 30, pp.926-933.
- [34] Dasenbrock, C; Peters, L; Creutzenberg, O; Heninrich, U. 1996. The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. *Toxicology Letters* 88, pp.15-21.
- [35] Boström, C-E; Gerde, P; Hanberg, A; Jernström, B; Johansson, C; Kyrklund, T; Rannug, A; Törnqvist, M, Victorin, K; Westerholm, R. 2002. Cancer Risk Assessment, Indicators, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air. *Environmental Health Perspectives* 100, pp.451-488.
- [36] Park, E-J; Park, K. 2009. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology Letters* 184, pp.18-25,



- [37] Brunner, T.J; Wick, P; Manser, P; Spohn, P; Grass, R.N; Limbach, L.K; Bruinink, A; Stark, W.J. 2006. In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. *Environmental Science & Technology* 40, pp.4374-4381.
- [38] Jiang, W; Kim, B,Y.S; Rutka, J.T; Chan, W.C.W. 2008. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature nanotechnology* 3, pp.145-150.
- [39] Hussain, S.M; Hess, K.L; Gearhart, J.M; Geiss, K.T; Schlager, J.J. 2005. In Vitro Toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro* 19, pp.975-983.
- [40] Song, W; Xhang, J; Guo, J; Zhang, J; Ding, F; Li, L; Sun, Z. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicology Letters* 199, pp.389-397.
- [41] Eriksson, L; Johansson, E; Kettaneh-Wold, N; Trygg, J; Wikström, C, Wold, S. 2006. Multi- and Megavariate Data Analysis Part 1: Basic Principles and Applications. Umetrics Academy.
- [42] Burger, J.E. (2006) *Hyperspectral NIR analysis: data exploration, correction and regression*. Diss. Sveriges lantbruksuniversitet. Umeå.
- [43] Beattie, J.R; Maguire, C; Gilchrist, S; Barrett, L.J; Cross, C.E; Possmeyer, F; Ennis, M; Elborn, J.S; Curry, W.J; McGarvey, J.J; Schock, B.C. 2007. The use of Raman microscopy to determine and localize vitamin E in biological samples. *The FASEB Journal* 21, pp.766-776.
- [44] Ahlinder, L. 2010. Raman mapping and hyperspectral data analysis: a study of in vitro cellular response to TiO<sub>2</sub> and goethite nanoparticles. Examensarbete, FOI, Umeå universitet. 2010.
- [45] Boydstone-White, S; Romeo, M; Chernenko, T; Regina, A; Miljkovic, M; Diem, M. 2006. Cell-cycle-dependent variations in FTIR microspectra of single proliferating HeLa cells: Principal component and artificial neural network analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, pp.908-914.
- [46] Matthäus, C; Chernenko, T; Newmark, J.A; Warner, C.M; Diem, M. 2007. Label-Free Detection of Mitochondrial Distribution in Cells by Nonresonant Raman Microspectroscopy. *Biophysical Journal* 93, pp.668-673.
- [47] Krafft, C; Diderhoshan, M.A; Recknagel, P; Miljkovic, M; Bauer, M; Popp, J. 2010. Crisp and soft multivariate methods visualize individual cell nuclei in Raman images of liver tissue sections. *Vibrational Spectroscopy*. Article in press.