

9 Listopada 2021

Warszawa, Poland

## Abstrakt (w języku polskim)

Wiodącym kierunkiem opisanych tu badań była próba określenia skutków zdrowotnych ekspozycji na różne składniki submikronowych cząstek aerozolu organicznego (OA) o znaczeniu atmosferycznym przy użyciu dwóch linii komórkowych pochodzących z ludzkich płuc. Unoszące się w powietrzu drobne cząstki stałe o średnicach aerodynamicznych  $< 2,5 \mu\text{m}$  (tzw. *frakcja respirabilna PM<sub>2.5</sub>*) są główną przyczyną pogorszenia jakości powietrza, zmian klimatycznych, a nade wszystko – wykazują niekorzystne skutki zdrowotne podczas wdychania. Ekspozycja na cząstki PM<sub>2.5</sub> wywołuje liczne patologie układu oddechowego, w tym: astmę, alergie, przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP), zapalenie oskrzeli, rozedmę płuc, zmniejszoną czynność płuc i liczne przypadki raka płuc. Badania opisane w niniejszej pracy mają na celu próbę rozszyfrowanie zmian zachodzących w ludzkich komórkach płuc na poziomie molekularnym, biochemicznym i/lub genowym, które to zmiany zostały wywołane ekspozycją na respirabilny pył aerozolowy OA. Pył ów pochodził z czterech istotnych źródeł: (i) procesy utleniania nienasyconych węglowodorów monoterpenuwch w reakcjach ozonu z  $\alpha$ -pinenem ( **$\alpha$ -pinenowe SOA**), (ii) procesy chemicznego starzenia aerozolu izoprenowego wzbogaconego we polarną frakcję organosiarczanową, w tym siarczan 2-metylotetrolu (2-MTS) (**poddane starzeniu izoprenowe SOA**), (iii) utlenianie węglowodorów aromatycznych w powietrzu zanieczyszczonym tlenkami azotu (**atmosferyczny mononitrofenolowy aerosol**) oraz (iv) procesy spalania biomasy (BBA) (**aerosol spalania biomasy**).

W celu określenia skutków ostrej ekspozycji na kluczowe składniki pyłów z wyżej wymienionych źródeł do badań *in vitro* wybrałam dwa modele komórkowe: BEAS-2B (tj. unieśmiertelnione ludzkie komórki nabłonka oskrzeli) i A549 (tj. komórki ludzkiego gruczołakoraka). W pierwszych dwóch projektach opisanych w niniejszej rozprawie, cząstki  $\alpha$ -pinenowe SOA oraz aerozolu izoprenowego zostały wytwarzane w laboratorium w przepływowym reaktorze utleniającym (OFR) z użyciem chemii rodników hydroksylowych ( $\bullet\text{OH}$ ). W przypadku aerozolu izoprenowego proces jego starzenia chemicznego prowadziłam w układzie heterogenicznym, co odzwierciedla procesy starzenia atmosferycznego w czasie od 0 do 22 dni. Tak wytworzony aerosol poddałam analizom chemicznym z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczym tandemowym spektrometrem mas wyposażonym w źródło elektrosprej (LC/ESI-HR-MS/MS). Analizy te były ukierunkowane na oznaczenie głównych składników chemicznych wytworzonego aerozolu, w tym: kwasów karboksylowych, nadtlenczków oraz związków wielofunkcyjnych. W celu porównawczym przeprowadziłam analizy składu chemicznego rzeczywistego aerozolu frakcji PM<sub>2.5</sub> oraz aerozolu wytworzonego w komorach aerozolowych Amerykańskiej Agencji Środowiska (US EPA) w procesach fotoutleniania monocyklicznych węglowodorów aromatycznych. Wyniki tych ostatnich analiz opisałam w trzecim rozdziale niniejszej pracy.

Wytworzone laboratoryjnie mieszaniny aerozolowe, zawierające zarówno znane markery, jak również nowe składniki, wprowadzałam do hodowli komórkowych płuc celem

oceny ich działania cytotoksycznego na owe komórki ze szczególnym uwzględnieniem procesów proliferacji. Wyznaczona eksperymentalnie żywotność komórkowa (zależna od czasu i/lub stężenia badanego składnika SOA) posłużyła mi do określenia stężenia hamującego  $IC_{50}$  tego składnika lub ich mieszanin. Ponadto zastosowałam testy funkcjonalne z sondami fluorescencyjnymi do detekcji tworzących się komórkowych (ROS) i mitochondrialnych (mtROS) reaktywnych form tlenu po ekspozycji; testy te wykorzystywały odpowiednio cytometrię przepływową oraz mikroskopię konfokalną. Zmiany żywotności komórkowej analizowałam z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej i testów barwnych dla żywych i/lub martwych komórek, podczas gdy procesy apoptozy komórkowej – w teście aneksyny V/jodku propidyny przy użyciu cytometrii przepływowej. Wykorzystałam ilościową reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) do oceny zmian genowych, które były wynikiem ekspozycji aerozolu na badane komórki, indukowanych przez modulację stresu oksydacyjnego i ekspresję genów zapalnych.

W pierwszej części niniejszej pracy określiłam ilościowo reakcję na wzrastające stężenia trzech znanych składników  $\alpha$ -pinenowego SOA, tzn. kwasu pinowego, pinonowego i 3-metylo-1,2,3-butanotrikarboksylowego oraz pełnej mieszaniny  $\alpha$ -pinenowego SOA w liniach komórkowych A549 i BEAS-2B. W trakcie badań oznaczałam zmiany w proliferacji komórkowej, żywotność komórek oraz stres oksydacyjny. Procesy ozonolizy  $\alpha$ -pinenu ( $C_{10}H_{16}$ ) – obficie emitowanego lotnego związku organicznego klasy monoterpenu przez roślinność lądową, ma znaczący udział w budżecie SOA na poziomie globalnym; jednak co ciekawe, jego wpływ na patofizjologię płuc pozostawał ciągle niepewny. Badania składu chemicznego  $\alpha$ -pinenowego SOA udowodniły ~57 % udział w jego masie kwasu pinowego, pinonowego i 3-metylo-1,2,3-butanotrikarboksylowego oraz znaczący wkład wielofunkcyjnych wodoronadtlenków. Postawiłam hipotezę, że te ostatnie są główną przyczyną obserwowanych zmian toksykologicznych badanego aerozolu.

Druga część niniejszej pracy dotyczy badań toksyczności inhalacyjnej związanej z cząsteczkami aerozolu pochodzenia izoprenowego. Izopren ( $C_5H_8$ ) to najobficiej (po metanie) emitowany do atmosfery węglowodór przez ekosystemy roślinne. Po przedostaniu się do dolnych warstw atmosfery izopren ulega reakcjom z rodnikami hydroksylowymi  $\bullet OH$ . W warunkach niskiego stężenia  $NO_x$  ( $NO_x = NO + NO_2$ ) reakcja ta prowadzi do tworzenia bardzo reaktywnych produktów pośrednich w fazie gazowej, w tym epoksydioli (IEPOX). Te ostatnie reagują dalej, co dostarcza szerokiej gamy produktów o malejących prężnościach par, takich jak organiczne siarczany (organosiarczany, OS), w tym najbardziej rozpowszechniony w atmosferze siarczan 2-metylotetrolu (2-MTS). 2-MTS może ulegać dalszym przemianom chemicznym, co prowadzi do powstania fotochemicznie starzejących się cząstek o znacznie bardziej złożonym składzie chemicznym. W badaniach opisanych w tej części pracy pokazałam, że chemiczne starzenie cząstek aerozolu izoprenowego nasila stres oksydacyjny oraz indukuje procesy zapalne w liniach komórkach BEAS-2B.

Trzeci zrealizowany projekt badawczy dotyczył oznaczania profilu toksykologicznego mono-nitrofenoli. Związki te stanowią powszechne i niebezpieczne zanieczyszczenia środowiska, w formie – pyłów respirabilnych w atmosferze, pozostałości rolniczych w glebie, wód atmosferycznych i lądowych, produktów niekontrolowanych pożarów i odpadów przemysłowych. We współpracy z Amerykańską Agencją Środowiska pokazałam, że jednym z ważnych źródeł mono-nitrofenoli w atmosferze są produkty utleniania węglowodorów aromatycznych, które to produkty wchodziły w skład cząstek aerozolu. W pierwszej fazie badań



zweryfikowałam hipotezę negatywnego oddziaływania mono-nitrofenoli na powierzchnię błony komórkowej płuc. Wykorzystałam tu zarówno sztuczną dwuwarstwową błonę lipidów eukariotycznych (otrzymaną w laboratorium), jak również żywe komórki pochodzące obu linii komórkowych. W drugiej fazie przedstawiłam porównawcze badania toksykologiczne 2-nitrofenolu (2NP), 3-nitrofenolu (3NP), 4-nitrofenolu (4NP) oraz ich równomolowej mieszaniny przy użyciu testów ROS, mtROS, żywotności komórek i śmierci komórkowej.

W ostatniej części pracy przeprowadziłam szczegółową analizę toksykologiczną czterech ważnych składników procesów spalania biomasy (BBA) z użyciem linii komórkowych A549 i BEAS-2B. Spalanie biomasy jest głównym źródłem zanieczyszczenia powietrza, szczególnie na obszarach miejskich, podmiejskich i wiejskich. Postawiłam hipotezę, że długotrwałe wdychanie tak zanieczyszczonego powietrza może indukować zwiększoną zachorowalność i śmiertelność. Cztery badane składniki BBA obejmowały: lewoglukozan (LG), kwas 3-nitrosalicylowy (NS), 4-nitrokatechol (4NC) i 4-nitrogwajakol (4NG). Komórki z obu linii poddałam ekspozycji na te składniki i analizowałam je pod kątem zachodzących zmian ogólnych ROS i mtROS przy różnych stężeniach i czasach ekspozycji. Pozwoliło to mi przewidzieć zachodzące zmiany w szlakach biochemicznych. Ta seria prac zakończyła się propozycją opracowania mechanizmów śmierci komórkowej po ekspozycji.

Zrozumienie składu chemicznego aerozolu pochodzącego z czterech rozpatrywanych źródeł dostarczyła mi możliwości wykonania porównawczego profilu toksykologicznego jego głównych składników na ludzkie komórki płuc. Zebrane dane pozwoliły określić źródło(a) pyłów z największymi negatywnymi skutkami po inhalacji, dzięki wyznaczonym wartościom toksykologicznym, w tym – IC<sub>50</sub>. Dodatkowo, opisane badania pozwoliły mi szeroko nakreślić zmiany patofizjologiczne w płucach na poziomie molekularnym i komórkowym po ekspozycji na składniki pyłów, które różniły się istotnie w zależności pochodzenia, składu chemicznego i parametrów ekspozycji (czas, stężenia próbki). Przeprowadzone badania pokazują pilną potrzebę opracowania przepisów i strategii kontroli w celu złagodzenia skutków emisji pyłów, szczególnie tych pochodzących ze spalania biomasy, ze względu na ich potwierdzoną toksyczność inhalacyjną już krótkim czasie ekspozycji.

*Janina*  
9/11/2021