



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i IMMiT

Milena Chraniuk

„Markery toksyczności w liniach komórkowych
ludzkiego układu oddechowego w warunkach oddziaływania
lotnych związków organicznych”

Praca doktorska napisana pod kierunkiem
prof. dr hab. Lidii Wolskiej

Gdańsk 2020

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Markery toksyczności w liniach komórkowych ludzkiego układu oddechowego w warunkach oddziaływania lotnych związków organicznych”

Streszczenie:

Współczesny człowiek ekspozycjonowany jest na lotne związki organiczne (LZO) każdego dnia w wielu miejscach takich jak mieszkania, biura, galerie handlowe, szkoły. Zmienność składu oraz stężeń LZO w powietrzu wewnątrz sprawia, że oszacowanie narażenia człowieka poprzez układ oddechowy na związki toksyczne jest już dużym wyzwaniem. Jeszcze większym wyzwaniem jest określenie zależności dawka-odpowiedź i szacowanie ryzyka zdrowotnego. Regulacje prawne kładą coraz mocniejszy nacisk na rozwój metod badawczych z zastosowaniem modeli *in vitro*. W przypadku LZO największe znaczenie w badaniach laboratoryjnych mają komórkowe modele układu oddechowego.

Celem pracy było określenie przydatności markerów do oceny toksycznego oddziaływania lotnych związków organicznych na model *in vitro* układu oddechowego.

Realizację celu rozpoczęto od wytypowania LZO należących do różnych klas najczęściej występujących w powietrzu wewnątrz. Przeprowadzono także weryfikację właściwości fizykochemicznych wybranych związków po czym dokonano wstępnego wyboru LZO należących do węglowodorów alifatycznych, węglowodorów aromatycznych, aldehydów, estrów oraz terpenów. Wśród badanych LZO znalazły się związki, na które nigdy wcześniej nie ekspozycjonowano inhalacyjnych modeli *in vitro*. Następnie określono stężenia LZO umożliwiające wykonanie krzywych dawka – odpowiedź przy czym dla części związków wybrano stężenia dotychczas nieuwzględniane w pracach eksperymentalnych. Przygotowano także listę biomarkerów z uwzględnieniem markerów cytotoksyczności (aktywność mitochondriów, aktywność dehydrogenazy mleczanowej LDH) oraz markerów dodatkowych (zdolność do sekrecji interleukiny IL-8, białko całkowite, białko HSP70, glutation utleniony i zredukowany, substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym TBARS, aktywność mitochondriów oraz utlenianie lipidów w testach przeżyciowych). Część z wybranych biomarkerów nigdy wcześniej nie służyła do oceny toksyczności LZO w modelu układu oddechowego.

Prace badawcze realizowano z wykorzystaniem powszechnie stosowanej linii komórkowej pneumocytów A549 (o charakterze nowotworowym) oraz nowej linii CI- huAEC (linia komórek pierwotnych, pneumocyty zdrowe). Dla obu modeli wykonano badania inhalacyjne *in vitro* w układzie Air – Liquid Interface P.R.I.T®. Ekspozycje na LZO prowadzono przez 1h przy stałym przepływie gazów nad powierzchnią komórek i w stałych warunkach temperaturowych.

Dane zebrane podczas prac eksperymentalnych umożliwiły wyznaczenie niepełnych krzywych dawka-odpowiedź dla aktywności mitochondriów oraz aktywności LDH. Jednocześnie dla większości badanych LZO wyznaczono parametry IC (ang. Inhibitory Concentration) lub EC (ang. Effective Concentration), które wykorzystano także do porównania z modelami *in vivo*. Rezultaty pomiarów stężeń wydzielonego IL-8 charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem. Dla tego biomarkera wyodrębniono jednak grupę związków powodującą brak różnic istotnych statystycznie między stężeniami IL-8 wydzielanymi po ekspozycji na rosnące stężenia LZO. W przypadku białka HSP70 oraz białka całkowitego nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie między próbkami zebranymi po ekspozycjach na rosnące stężenia LZO. Wstępne eksperymenty z glutationem wykazały obecność procesów utleniania związku już na etapie przygotowania wzorca. Próbkę badaną na obecność substancji TBARS zawierały jedynie ich nieznaczne stężenia. Prace z testami przeżyciowymi umożliwiły zebranie szerokiej dokumentacji fotograficznej (zdjęcia komórek wykonane podczas obserwacji mikroskopowej w świetle UV), którą poddano analizie komputerowej. Prace na dwóch modelach komórkowych wykazały obecność różnych reakcji na zbliżone stężenia

poszczególnych LZO. Porównanie rezultatów uzyskanych w testach *in vitro* z wynikami badań *in vivo* wskazało na istnienie wysokiej korelacji między efektami toksycznymi obserwowanymi dla modeli.

Na podstawie danych prezentowanych w niniejszej pracy za biomarkery o kluczowym znaczeniu dla poznawania mechanizmów działania toksycznego LZO uznano:

- ✓ aktywność mitochondriów,
- ✓ uszkodzenia błony komórkowej,
- ✓ interleukinę ósmą.

Przeprowadzenie dalszych badań pozwoli również zweryfikować przydatność HSP70, białka całkowitego (jako odrębnego markera lub w połączeniu z innym parametrem), drugorzędowych produktów utleniania lipidów oraz glutationu. Aktywność mitochondriów i utlenianie lipidów badane z udziałem mikroskopu UV mogą być traktowane jako markery o dużym potencjale. Żadna z dotychczas opublikowanych prac badawczych nie podejmowała tematyki oceny przydatności biomarkerów stosowanych do określania toksyczności LZO w modelach *in vitro*.

Słowa kluczowe: lotne związki organiczne LZO, model komórkowy układu oddechowego, ekspozycje inhalacyjne *in vitro*, linia A549, linia CI-huAEC, system Air-Liquid Interface, toksyczność LZO

Title of doctoral dissertation:

"Toxicity markers in human respiratory cell lines under the influence of volatile organic compounds"

Abstract:

Modern man is exposed to volatile organic compounds (VOC) every day in places such as apartments, offices, shopping malls and schools. The variability of VOC composition and concentrations in indoor air means that estimating human exposure to toxic compounds through the respiratory system is a big challenge. Determining the dose-response relationship and estimating health risk is an even greater challenge. Legal regulations put more and more emphasis on the development of research methods employing *in vitro* models. In case of VOC, respiratory cell models are of the greatest importance in laboratory research.

The aim of the study was to determine the utility of markers for assessing the toxic effects of VOC on the respiratory tract *in vitro* model.

Firstly, VOCs were selected from various classes of compounds most often found in indoor air. Verification of the physicochemical properties of selected compounds was also carried out, followed by the initial selection of VOCs from groups of aliphatic hydrocarbons, aromatic hydrocarbons, aldehydes, esters and terpenes. The VOCs included compounds that have never been exposed to inhalation *in vitro* models before. Then VOC concentrations suitable for construction of dose - response curves were determined, including concentrations not yet considered in experimental literature. A list of biomarkers was also prepared, taking into account cytotoxicity markers (mitochondrial activity, lactate dehydrogenase activity) and additional markers (interleukin IL-8 secretion ability, total protein, HSP70 protein, oxidized and reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substances TBARS, mitochondrial activity and lipid oxidation in living cells). Some of the selected biomarkers have never been used to assess VOC toxicity in a respiratory cell model before.

The research was carried out using the commonly used A549 pneumocyte cell line (cancerous) and the new CI-huAEC line (primary cell line, healthy pneumocytes). *In vitro* inhalation studies were performed for both models in the Air - Liquid Interface P.R.I.T® system. VOC exposure was carried out for 1h with constant gas flow above the cell surface and at constant temperature conditions.

Data collected during experimental work enabled the determination of incomplete dose-response curves for mitochondrial activity and LDH activity. Inhibitory Concentration (IC) or

Effective Concentration (EC) parameters were determined for most VOCs and were also used for comparison with *in vivo* models. The measured concentrations of secreted IL-8 exhibited large variation.

For this biomarker, however, a group of compounds was identified that caused no statistically significant differences between the levels of IL-8 secreted by cells after exposure to increasing VOC concentrations. For HSP70 and total protein, no statistically significant differences were observed between samples collected after exposures to increasing VOC concentrations. Preliminary experiments with glutathione showed the compound oxidation processes already at the standard preparation stage. Samples tested for TBARS contained insignificant concentrations thereof. Conduction of viability tests enabled the collection of extensive photographic documentation (pictures of cells taken during microscopic observation in UV light), which was subjected to computer analysis. Work on two cell models led to observation of varying responses of cells to similar concentrations of particular VOCs. Comparison of the results obtained in the *in vitro* tests with the results of the *in vivo* tests indicated occurrence of a high correlation between the toxic effects observed for the models.

Based on the data presented in this work, it was concluded that the biomarkers of key importance for understanding the mechanisms of VOC toxicity are:

- ✓ mitochondrial activity,
- ✓ cell membrane damage,
- ✓ IL-8 secretion.

Further research is expected to verify the usefulness of HSP70, total protein (as a separate marker or in combination with another parameter), lipid oxidation secondary products and glutathione. Mitochondrial activity and lipid oxidation assessed using a UV microscope can be regarded as markers of high potential. None of the research published to date has addressed the topic of assessing the biomarkers suitability for determining VOCs toxicity in *in vitro* models.

Keywords: volatile organic compounds (VOC), respiratory cell model, *in vitro* inhalation exposures, A549 line, CI-huAEC line, Air-Liquid Interface system (ALI), VOC toxicity