

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΤΣΟΧΑ Μ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ, ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΕΡΙΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΩΝ  
ΡΥΠΩΝ IN VITRO ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ  
ΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΡΥΠΩΝ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΕΡΙΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΩΝ ΡΥΠΩΝ  
IN VITRO ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ  
ΡΥΠΩΝ

ΤΣΟΧΑ Μ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ, ΧΗΜΙΚΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΑΡΗΓΙΑΝΝΗΣ ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ: Αναπληρωτής καθηγητής Περιβαλλοντικής  
Μηχανικής, Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής, ΑΠΘ

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-  
Τοξικολογίας, ΠΘ

ΔΡ.ΚΑΡΑΚΙΤΣΙΟΣ ΣΠΥΡΟΣ: Επικεφαλής βιολογικής μονάδας, Εργαστήριο  
Περιβαλλοντικής Μηχανικής, ΑΠΘ

## Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής, του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών μου «Τοξικολογία», του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Σαρηγιάννη Δημοσθένη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντας μου τη συγκεκριμένη εργασία και την καθοδήγηση του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον κ. Κουρέτα Δημήτριο για τις πολύτιμες γνώσεις που πρόσφερε κατά την διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Καρακίσιο Σπύρο για την χρήσιμες υποδείξεις κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Για την άριστη συνεργασία, την βοήθεια τους, αλλά και το ευχάριστο κλίμα που αναπτύχθηκε θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Κερμενίδου Μαριάνθη και τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Ζαρκάδα Ιωάννη και Τσαβέ Ολγα.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στους γονείς μου Τριανταφυλλιά και Μιχάλη και στον αδερφό μου Νίκο, για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη τους, όλα αυτά τα χρόνια.

## Περιεχόμενα

1. Θεωρητικό μέρος.....	8
1.1 Ατμοσφαιρικοί ρύποι.....	8
1.1.1 Πηγές.....	8
1.1.2 Ταξινόμηση αέριων ρύπων .....	9
1.2 Αιωρούμενα σωματίδια .....	10
1.2.1 Ταξινόμηση.....	10
1.2.2 Πηγές - Μηχανισμοί σχηματισμού .....	11
1.2.3 Χημική σύσταση .....	13
1.2.4 Επιπτώσεις στην υγεία .....	13
1.3 Ατμοσφαιρική ρύπανση και καρκινογένεση.....	15
1.3.1. Καρκινογόνες ουσίες του ατμοσφαιρικού αέρα.....	15
1.3.2. Τύποι χημικών καρκινογόνων .....	17
1.3.3. Στάδια χημικής καρκινογένεσης.....	17
1.3.4. Μηχανισμοί χημικής καρκινογένεσης.....	18
1.3.5. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης .....	20
1.4 Οξειδωτικό στρες και αιωρούμενα σωματίδια .....	21
1.4.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό stress .....	21
1.4.2 Συχνοί κυτταρικοί στόχοι των ΔΜΟ .....	22
1.4.3 Τρόποι επαγωγής του οξειδωτικού στρες από τα αιωρούμενα σωματίδια. ....	23
2. Πειραματικό μέρος .....	24
2.1 Δειγματοληψία αιωρούμενων σωματιδίων .....	24
2.1.1 Σημεία δειγματοληψίας .....	24
2.1.2 Περιγραφή δειγματολήπτη .....	25

2.1.3	Στάδια μεθόδου .....	26
2.1.4	Εκχύλιση φίλτρων .....	27
2.1.5	Ανάλυση μετάλλων με ED- XRF .....	27
2.2	Καλλιέργεια κυττάρων .....	29
2.2.1	Κυτταρική σειρά A549.....	29
2.2.2	Συνθήκες καλλιέργειας.....	29
2.2.3	Ανακαλλιέργεια κυττάρων .....	30
2.2.4	Κρυοσυντήρηση .....	31
2.2.5	Μέτρηση αριθμού ζωντανών κυττάρων .....	32
2.3	Μελέτη κυτταροτοξικότητας των αέριων σωματιδιακών ρύπων .....	32
2.3.1	Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας.....	32
2.3.2	Περιγραφή μεθόδου- Αρχή της βιοφωτάυγειας.....	33
2.3.3	Αντιδραστήρια-Στάδια μεθόδου .....	34
2.4	Διερεύνηση ενδεχόμενου αποπτωτικού μηχανισμού .....	35
2.4.1	Κασπάσες και απόπτωση.....	35
2.4.2	Προσδιορισμός των επιπέδων της πρωτεΐνης κασπάσης-3 .....	36
2.4.3	Αντιδραστήρια- στάδια μεθόδου .....	36
3.	Αποτελέσματα – συζήτηση.....	38
3.1	Αποτελέσματα μετρήσεων στα κύτταρα A549.....	38
3.1.1	Αποτελέσματα κυτταρικής επιβίωσης .....	38
3.1.2	Διερεύνηση αποπτωτικού μηχανισμού .....	41
3.1.3	Χημική σύσταση σωματιδίων .....	42
3.1.4	Σχολιασμός αποτελεσμάτων.....	45
3.1.5	Συμπεράσματα .....	47
4.	<i>Βιβλιογραφία</i> .....	48

## **Περίληψη**

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι ο προσδιορισμός της τοξικότητας των αιωρούμενων σωματιδίων μέσω της ικανότητάς των προσροφημένων στην επιφάνεια συστατικών τους να επάγουν το οξειδωτικό στρες. Τα δείγματα αιωρούμενων σωματιδίων που ελήφθησαν από την περιοχή της Θεσσαλονίκης δοκιμάστηκαν σε ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα (A549 κυτταρική σειρά). Η δειγματοληψία των αιωρούμενων σωματιδίων πραγματοποιήθηκε σε έναν σταθμό υποβάθρου και σε έναν κυκλοφοριακό σταθμό, στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλονίκης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των δειγμάτων ώστε να παραληφθούν οι υδατοδιαλυτές ενώσεις. Τα κύτταρα A549 εκτέθηκαν σε αντιπροσωπευτικά δείγματα σωματιδίων και υπολογίστηκε η τοξικότητα τους. Επιπρόσθετα, έγινε προσδιορισμός της δραστηριότητας της πρωτεΐνης κασπάσης-3, μελετήθηκε ο αποπτωτικός μηχανισμός και εντοπίστηκε το στάδιο της απόπτωσης στο οποίο βρισκόταν τα κύτταρα μετά την έκθεση τους στα σωματίδια. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε ότι τα προσροφημένα στην επιφάνεια των σωματιδίων μέταλλα, είναι μια από τους κύριες αιτίες επαγωγής οξειδωτικού στρες, καθώς δρουν ως καταλύτες στις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Επίσης τα από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φάνηκε ότι τα μικρότερα σε διάμετρο σωματίδια PM1 παρουσιάζουν μεγαλύτερη τοξικότητα σε σχέση με τα PM2.5 και PM10.

## ***Abstract***

Airborne particulate matter contains a large number of cytotoxic substances able to induce adverse health effects. In the present study, we have investigated the toxicity of PM through their ability to induce oxidative stress in A549 human lung epithelial cells. For this purpose, PM measurements were performed at two sampling sites. PM samples were agitated with deionized water, to extract the water-soluble compounds. For the evaluation of cytotoxicity, A549 cells were exposed to PM sample extracts. Moreover, the caspase-3 activity was determined in order to evaluate the apoptosis mechanism. Oxidative stress mediated by PM arise from different types of sources. These sources involve either direct generation of ROS from the surface of particles, or ROS formation from soluble compounds such as transition metals. Transition metals were found able to induce oxidative stress, because they act like catalysts in biochemical reactions. In addition, PM composition was found to be more important parameter than PM mass. The results of this study indicated that PM<sub>1</sub> are more likely to induce DNA damage than the PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> fraction.

## 1. Θεωρητικό μέρος

### 1.1 Ατμοσφαιρικοί ρύποι

Ως ατμοσφαιρικός ρύπος μπορεί να θεωρηθεί οποιαδήποτε ουσία, σε στερεή, υγρή ή αέρια μορφή η οποία άμεσα ή έμμεσα έχει αρνητική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.

#### 1.1.1 Πηγές

Η ατμοσφαιρική ρύπανση οφείλεται τόσο σε φυσικές πηγές (αποσύνθεση φυσικών προϊόντων, ηφαίστεια, πυρκαγιές, έκλυση αεροζόλ από τους ωκεανούς κ.α.) όσο και σε ανθρωπογενείς (βιομηχανικές διεργασίες, καύση στερεών ή υγρών καυσίμων για θέρμανση, μεταφορές κ.α.)(Ραφομανίκης Σ. and Καστρινάκης Ε., 2009). Οι κυριότεροι ατμοσφαιρικοί ρύποι που εκπέμπονται στο περιβάλλον , μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:

- αιωρούμενα σωματίδια,
- ενώσεις που περιέχουν θείο (SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, κ.α.)
- ενώσεις που περιέχουν άνθρακα, υδρογονάνθρακες ( CH<sub>4</sub>, VOCs, κ.α.)
- οξείδια του αζώτου και αμμωνία (N<sub>2</sub>O, NO<sub>x</sub>, NH<sub>3</sub>)
- μονοξείδιο του άνθρακα
- βαρέα μέταλλα (Pb, Cd, Hg)
- αλογονούχες ενώσεις (HF, HCL)

Μεγάλες ποσότητες οργανικών θειούχων ενώσεων, υδρόθειου και θειικών αλάτων προέρχονται από τους ωκεανούς ενώ το διοξείδιο του θείου οφείλεται κυρίως σε ανθρωπογενείς πηγές όπως οι καύσεις κάρβουνου, πετρελαίου και πυριτών.

Το μονοξείδιο του άνθρακα ως προϊόν της ατελούς καύσης του άνθρακα εκπέμπεται από αυτοκίνητα, εγκαταστάσεις παραγωγής ενέργειας και διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές, αλλά και από ηφαίστεια, δασικές πυρκαγιές και οξείδωση μεθανίου στην ατμόσφαιρα.

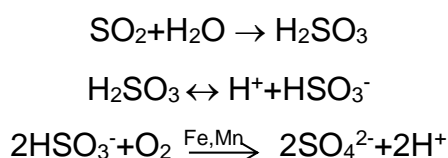
Τα διάφορα οξείδια του αζώτου είναι κυρίως προϊόντα καύσεων (πετρελαίου, φυσικού αερίου άνθρακα), καθώς κατά την καύση καίγεται μέρος του αζώτου της ατμόσφαιρας. Η αμμωνία ωστόσο προέρχεται κυρίως από βιολογικές δράσεις.



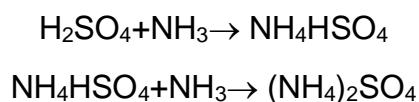
Το μεγαλύτερο ποσοστό των αέριων υδρογονανθράκων που εκπέμπεται είναι μεθάνιο και προέρχεται από την αναερόβια μικροβιακή αποικοδόμηση οργανικής ύλης ωστόσο το ποσοστό που οφείλεται σε ανθρωπογενείς δραστηριότητες είναι πολύ μικρό και προέρχεται από διαφυγές υγραερίων, καύση υγρών και στερεών καυσίμων, εξάτμιση βενζίνης και πετρελαιοειδών. Οι υδρογονάνθρακες απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα είτε απευθείας, είτε ως παραπροϊόντα μερικής καύσης άλλων υδρογονανθράκων, που είναι ιδιαίτερα δραστικές. Στις αστικές περιοχές, σημαντικότερη πηγή υδρογονανθράκων αποτελεί το αυτοκίνητο.

### 1.1.2 Ταξινόμηση αέριων ρύπων

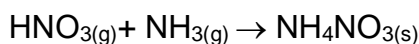
Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι μπορούν να ταξινομηθούν βάση του τρόπου εκπομπής τους σε πρωτογενείς, δηλαδή αυτούς που προέρχονται απευθείας από τις πηγές εκπομπής και δευτερογενείς, αυτούς που είναι αποτέλεσμα χημικού μετασχηματισμού των πρωτογενών ρύπων ή είναι προϊόντα διάφορων αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στην ατμόσφαιρα ( όζον, νιτρικό υπεροξυ-ακετύλιο, θειικό αμμώνιο, αλδεΐδες, SO<sub>3</sub> κ.α.). Η ομογενής οξειδωση του SO<sub>2</sub> και η ετερογενής οξειδωση του θειώδους οξέος, με τελικό προϊόν σταγονίδια H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> είναι τέτοιου είδους δευτερογενείς αντιδράσεις. Κατά την ετερογενή οξειδωση ως καταλύτες δρουν κατιόντα μετάλλων (Fe, Mn, Mg, V) που κατά κύριο λόγο υπάρχουν στην ατμόσφαιρα των αστικών περιοχών.



Τα σταγονίδια H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> στη συνέχεια διαλύονται στο νερό της βροχής (όξινη βροχή) ή αντιδρούν με την ατμοσφαιρική αμμωνία προς σχηματισμό θειικών αλάτων του αμμωνίου, τα οποία ανάλογα με τη σύσταση και την σχετική υγρασία που επικρατεί στην ατμόσφαιρα παραμένουν στην υγρή φάση είτε σχηματίζουν στερεά σωματίδια διαμέτρου μικρότερης του 1μm.



Το SO<sub>2</sub> προσροφάτε επίσης στην επιφάνεια αιωρούμενων σωματιδίων κοντά στις πηγές εκπομπής τους. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω το προσροφημένο SO<sub>2</sub> μετά από ετερογενή καταλυτική οξείδωση προς H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και αντίδραση με την αμμωνία, , σχηματίζει στερεά θειικά άλατα του αμμωνίου. Τα θειικά άλατα είτε ως σταγονίδια είτε ως στερεά σωματίδια είναι διαλυτά στο νερό της βροχής. Επίσης η οξείδωση του NO<sub>2</sub> προς HNO<sub>3</sub> που πραγματοποιείται στην ατμόσφαιρα είτε μέσω του ενδιάμεσου N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, είτε μέσω της αντίδρασης με τη ρίζα OH<sup>·</sup>, μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό δευτερογενών σωματιδίων NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, καθώς το σχηματιζόμενο HNO<sub>3</sub> αντιδρά με την αμμωνία της ατμόσφαιρας. Αν δεν υπάρχει αρκετή αμμωνία στην ατμόσφαιρα, το HNO<sub>3</sub> θα παραμείνει στην αέρια φάση.



Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι κατηγοριοποιούνται επίσης ανάλογα με τη μορφή τους σε αέριους (αέρια, ατμοί) και σωματιδιακούς.

## 1.2 Αιωρούμενα σωματίδια

Με τον όρο αιωρούμενα σωματίδια, ορίζουμε τα σωματίδια και σταγονίδια με διάμετρο από 0,001-2·10<sup>2</sup>μm που βρίσκονται σε διασπορά στην αέρια φάση, όπως η ιπτάμενη τέφρα, ο καπνός, η ομίχλη, κ.α. που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Συχνά χρησιμοποιείται και ο όρος *αερολύματα (aerosol)* (Φυτιάνος Κ. and Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ., 2009).

### 1.2.1 Ταξινόμηση

Τα σωματίδια ταξινομούνται ανάλογα με το μέγεθος τους σε (Meng et al., 2013, EPA, 2016) :

- Χονδρόκοκκα (coarse): Έχουν διάμετρο ( $d > 2,5\mu\text{m}$ ) και παράγονται συνήθως με μηχανικούς τρόπους.
- Λεπτόκοκκα (fine): Έχουν διάμετρο ( $d \leq 2,5\mu\text{m}$ ) και συνήθως παράγονται δευτερογενώς από αέριες ενώσεις.

- Υπέρλεπτα σωματίδια: είναι σωματίδια με διάμετρο ( $d \leq 0,1\mu\text{m}$ )

Οι σωματιδιακοί ρύποι ταξινομούνται επίσης και με βάση την τρόπο σχηματισμού τους σε:

- α) κόνεις (dusts): σωματίδια με μέγεθος από  $1\mu\text{m}$ - $200\mu\text{m}$  που σχηματίζονται ως αποτέλεσμα διάβρωσης ή κατακερματισμού στερεών υλικών
- β) καπνός (smoke): σωματίδια μικρότερα από  $10\mu\text{m}$  που σχηματίζονται κατά την ατελή καύση ουσιών που περιέχουν άνθρακα
- γ) ιπταμένη τέφρα (fly ash): λεπτόκοκκα σωματίδια τέφρας στερεών καυσίμων παρασυρόμενα από τα καυσαέρια
- δ) κάπνα (fume): λεπτότατα σωματίδια με μέγεθος από  $0,001\mu\text{m}$ - $1\mu\text{m}$  που σχηματίζονται δευτερογενώς στην ατμόσφαιρα από συμπύκνωση ουσιών (μαύρος άνθρακας, στερεά πετρελαίου) που βρέθηκαν λόγω ειδικών συνθηκών στην αέρια φάση.
- ε) αχλύς (mist): σταγονίδια αιωρούμενα στην ατμόσφαιρα που σχηματίζονται από μηχανικές δράσεις ή από συμπύκνωση αερίων.

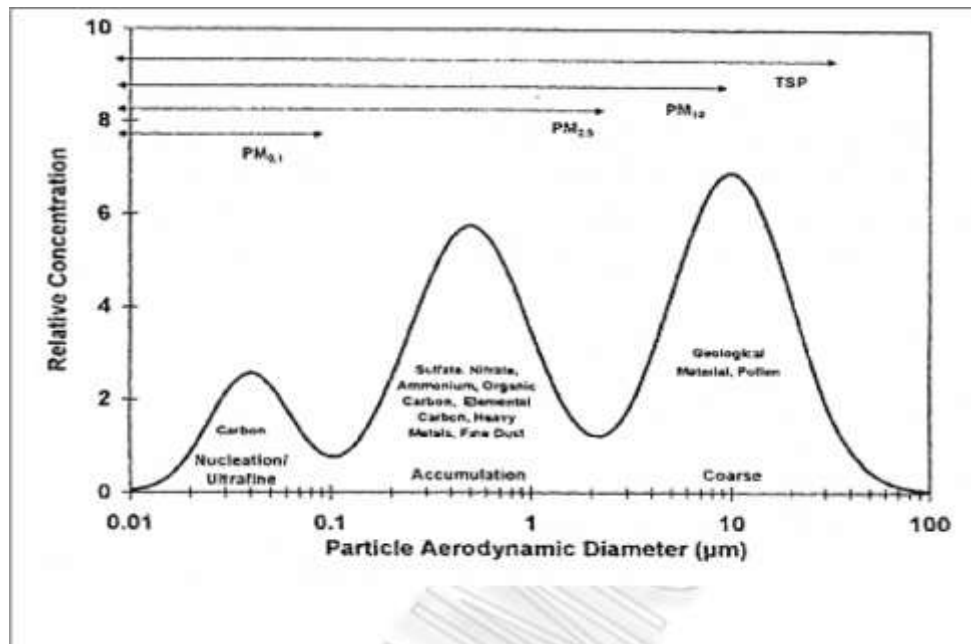
### 1.2.2 Πηγές - Μηχανισμοί σχηματισμού

Τα αιωρούμενα σωματίδια, προέρχονται από φυσικές και ανθρωπογενείς πηγές και είτε εκπέμπονται απευθείας από την πηγή (πρωτογενή) είτε δημιουργούνται στην ατμόσφαιρα από μετατροπή αερίων σε σωματίδια (δευτερογενή), (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Ατμοσφαιρικά σωματίδια μικρότερα από  $100\mu\text{m}$

	Πρωτογενή σωματίδια	Δευτερογενή σωματίδια
<b>Φυσικές Πηγές</b>	Σκόνη εδάφους	Θειικά από βιογενή αέρια
	Θαλάσσια σταγονίδια	Θειικά από ηφαιστειακό $\text{SO}_2$
	Ηφαιστειακές εκπομπές	Οργανικά από βιογενή VOC
	Πρωτογενή οργανικά αεροζόλ	Νιτρικά από $\text{NO}_x$
<b>Ανθρωπογενείς πηγές</b>	Βιομηχανικές εκπομπές (πλην αιθάλης)	Θειικά από $\text{SO}_2$
	Αιθάλη	Νιτρικά από $\text{NO}_x$
	Καύση βιομάζας	Οργανικά από ανθρωπογενή VOC

Οι κύριοι μηχανισμοί σχηματισμού δευτερογενών σωματιδίων στην ατμόσφαιρα είναι η πυρήνωση και η συμπύκνωση υπέρκορων ατμών. Τα σωματίδια αυτά (πυρήνες Aitken) που σχηματίζονται κατά αυτόν τον τρόπο έχουν αρχικά πολύ μικρό μέγεθος (0,005 $\mu\text{m}$  -0,1 $\mu\text{m}$ ) αλλά στη συνέχεια συσσωματώνονται προς μεγαλύτερα σωματίδια με διάμετρο 0,1  $\mu\text{m}$ -2,5  $\mu\text{m}$ . Οι πυρήνες Aitken σε αστικές περιοχές εμφανίζουν υψηλό αριθμό και οι πιθανές πηγές τους είναι καταιγίδες σκόνης, ηφαίστεια, πυρκαγιές δασών, εξατμίσεις αυτοκινήτων, φωτο-οξειδωτικές αντιδράσεις και βιομηχανικές εκπομπές. Ωστόσο τα σωματίδια με μέγεθος από 0,1 $\mu\text{m}$ -1 $\mu\text{m}$  σχηματίζονται κυρίως από συμπύκνωση ατμών, προϊόντα καύσης και από ατμοσφαιρική σκόνη και επίσης ευθύνονται για τον σχηματισμό ομίχλης. Πάνω από 1 $\mu\text{m}$  τα σωματίδια προέρχονται από συσσωμάτωση μικρότερων σωματιδίων, από προϊόντα καύσης, στάχτες, σκόνη και κονιορτοποιήσεις από οχήματα και πεζούς. Οι σταγόνες βροχής, οι νιφάδες χιονιού, η γύρη και τα έντομα ανήκουν σ' αυτήν την κατηγορία.(Φυτιάνος Κ. and Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ., 2009, Γαντεκάκης Ι., 1999). Στην εικόνα 1 φαίνεται μια αντιπροσωπευτική κατανομή των αιωρούμενων σωματιδίων κατά μάζα και κυριότερα συστατικά (Watson G. John et al., 1998).



Εικόνα 1: Κατανομή αιωρούμενων σωματιδίων κατά μάζα και κυριότερα συστατικά

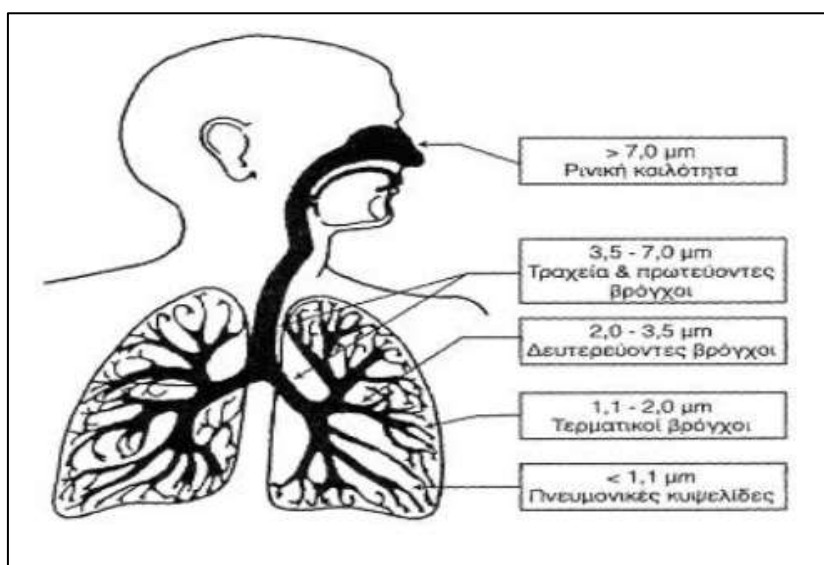
### 1.2.3 Χημική σύσταση

Γενικά τα αιωρούμενα σωματίδια αποτελούνται από μια ανόργανη φάση (στερεό ανόργανο υλικό, υδατοδιάλυτα ανόργανα άλατα, στοιχειακός άνθρακας κ.α.) και από μία οργανική φάση (οργανικός άνθρακας). Το ποσοστό ανόργανης και οργανικής φάσης εξαρτάται από την προέλευση των σωματιδίων, τις ατμοσφαιρικές συνθήκες και το μέγεθος τους. Στις ρυπασμένες αστικές περιοχές, το ποσοστό της ανθρακούχου φάσης στα μικρά σωματίδια φτάνει μέχρι και τα 40%, ενώ τα μεγάλα σωματίδια είναι κυρίως ανόργανα (πυριτικά άλατα, ενώσεις εδαφικής προέλευσης κ.α.). Τα θαλάσσια αεροζόλ είναι υδατικά διαλύματα NaCl και  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Φυτιάνος Κ. and Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ., 2009).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία οι περιοχές προέλευσης των σωματιδίων είναι η Ηλιούπολη μια περιοχή στα δυτικά της Θεσσαλονίκης (background site) και ένα κυκλοφοριακό σταθμό (traffic site), μπροστά από το Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Στη δυτική περιοχή τα αιωρούμενα σωματίδια προέρχονται κυρίως από καύση βιομάζας, ενώ στο κυκλοφοριακό σταθμό τα σωματίδια προέρχονται κυρίως από τη κυκλοφορία των οχημάτων.

### 1.2.4 Επιπτώσεις στην υγεία

Οι επιπτώσεις των αιωρούμενων σωματιδίων στην ανθρώπινη υγεία είναι σημαντικές και έχουν άμεση σχέση με το μέγεθος και τη χημική σύσταση των σωματιδίων. Η κύρια οδός εισόδου των αιωρούμενων σωματιδίων στον οργανισμό είναι η αναπνοή. Στο αναπνευστικό σύστημα έχουν την δυνατότητα να εισέλθουν τα σωματίδια με διάμετρο μικρότερη των 10 $\mu\text{m}$ , τα οποία αποτελούν το εσπνεύσιμο κλάσμα των σωματιδίων (PM10). Ανάλογα με το μέγεθος τους τα σωματίδια κατακρατούνται σε διαφορετικά σημεία του αναπνευστικού συστήματος με τελικό προορισμό τις πνευμονικές κυψελίδες (εικόνα 2). Θωρακικά σωματίδια ( $d \leq 7\mu\text{m}$ ) ονομάζονται αυτά που διαπερνούν το ανώτερο τμήμα της αναπνευστικής οδού (ρινοφαρυγγική κοιλότητα) και αναπνεύσιμα ( $d \leq 2,5\mu\text{m}$ ) καλούνται τα σωματίδια που έχουν την δυνατότητα να εισχωρήσουν βαθύτερα στους αεραγωγούς και τις κυψελίδες. Τα αναπνεύσιμα σωματίδια αποτελούν το πιο επικίνδυνο κλάσμα καθώς εισχωρούν στις κυψελίδες (Φυτιάνος Κ. and Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ., 2009).



Εικόνα 1: Κατανομή των αιωρούμενων σωματιδίων στο αναπνευστικό σύστημα ανάλογα με το μέγεθος τους.

Η τοξική δράση των σωματιδίων ασκείται με έναν ή περισσότερους από τους παρακάτω τρόπους (Wark Kenneth et al., 1998).

1. Το σωματίδιο μπορεί να είναι τοξικό εγγενώς λόγω των έμφυτων χημικών ή φυσικών χαρακτηριστικών του.
2. Το σωματίδιο μπορεί να παρεμβαίνει σε έναν ή περισσότερους μηχανισμούς που φυσιολογικά καθαρίζουν το αναπνευστικό σύστημα.
3. Το σωματίδιο μπορεί να δρα σαν μεταφορέας ενός απορροφημένου τοξικού συστατικού, στην περίπτωση των σταγονιδίων ή απορροφημένων τοξικών συστατικών στην περίπτωση των στερεών σωματιδίων.

Είναι πολύ δύσκολο να διατυπωθεί μια ακριβής σχέση ανάμεσα στην έκθεση ενός ανθρώπου σε σωματίδια σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και στις δυσμενείς επιπτώσεις που αυτά επιφέρουν. Πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο χρόνος έκθεσης καθώς επίσης έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις ότι η ταυτόχρονη έκθεση σε σωματίδια και άλλα είδη ρύπων, όπως  $SO_2$ , έχει ως αποτέλεσμα περισσότερες επιπτώσεις στην υγεία από την έκθεση σε κάθε ρύπο ξεχωριστά.

Σε μελέτες που έχουν γίνει σε πληθυσμούς που έχουν εκτεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σωματιδίων (Shaughnessy et al., 2015), οι άνθρωποι εμφάνιζαν συμπτώματα όπως ανωμαλία στην αναπνοή, επιδείνωση των είδη υπαρχόντων

αναπνευστικών και καρδιαγγειακών ασθενειών, μεταβολές στον αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού, καρκινογένεση, καταστροφή του πνευμονικού ιστού και πρόωρο θάνατο. Οι κατηγορίες του πληθυσμού που είναι πιο ευαίσθητες είναι οι ηλικιωμένοι, τα παιδιά, άνθρωποι που πάσχουν από άσθμα, γρίπη, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και καρδιαγγειακές παθήσεις. Κάποιοι από τους μηχανισμούς που οδηγούν στην εμφάνιση ασθενειών θα αναλυθούν παρακάτω, ωστόσο δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως όλοι οι μηχανισμοί.

### **1.3 Ατμοσφαιρική ρύπανση και καρκινογένεση**

#### **1.3.1. Καρκινογόνες ουσίες του ατμοσφαιρικού αέρα**

Υπάρχουν αδιαμφισβήτητες ενδείξεις , ότι ο ατμοσφαιρικός αέρας περιέχει εκατομμύρια γενετοξικές ενώσεις όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), είναι αποδεδειγμένα γενετοξικές και καρκινογόνες (Straif K., 2013). Επίσης αρκετοί άλλοι ρύποι όπως είναι το αρσενικό, το κάδμιο, το βενζόλιο, το ραδόνιο, ο αμίαντος και άλλα χημικά που χρησιμοποιούνται κυρίως στους επαγγελματικούς χώρους, έχουν χαρακτηριστεί ως καρκινογόνα (πίνακας 2). Ακόμη, η μεταλλαξιγόνος δράση των αερομεταφερόμενων σωματιδίων εκτιμάται ότι οφείλεται σε τουλάχιστον 500 ταυτοποιημένες ενώσεις, ενώ η ποικιλία του μεγέθους των σωματιδίων και οι διάφορες χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην ατμόσφαιρα συμβάλλουν τελικά στη πολύπλοκη φύση του γενετοξικού δυναμικού του αέρα (Claxton and Woodall Jr, 2007).

*Πίνακας 2: Agents Classified by the IARC Monographs (IARC).*

<b>Agent</b>	<b>Group</b>
<b>Bitumens, occupational exposure to straight-run bitumens and their emissions during road paving</b>	2B
<b>Benzo[a]pyrene</b>	1
<b>Benzene</b>	1
<b>Engine exhaust, diesel</b>	1
<b>Engine exhaust, gasoline</b>	2B
<b>Radon-222 and its decay products</b>	1

<b>Arsenic and inorganic arsenic compounds</b>	1
<b>Cadmium and cadmium compounds</b>	1
<b>Biomass fuel (primarily wood), indoor emissions from household combustion of</b>	2A
<b>Sulfur dioxide</b>	3
<b>Carbon black</b>	2B
<b>Tobacco smoking</b>	1
<b>Tobacco smoke, second-hand</b>	1
<b>Outdoor air pollution, particulate matter in</b>	1
<b>Carbon black</b>	2B
<b>Asbestos (all forms, including actinolite, amosite, anthophyllite, chrysotile, crocidolite, tremolite)</b>	1
<b>Formaldehyde</b>	1
<b>1,3-Butadiene</b>	1
<b>Nickel, metallic and alloys</b>	2B

\* Group 1, carcinogenic to humans; Group 2A, probably carcinogenic to humans; Group 2B, possibly carcinogenic to humans; Group 3, not classifiable as to its carcinogenicity to humans; Group 4, probably not carcinogenic to humans.

Σε μελέτες που έχουν γίνει ανά τον κόσμο σε μη καπνιστές, η μακροχρόνια έκθεση σε ατμοσφαιρικά λεπτά σωματίδια (PM<sub>2.5</sub>) έχει συσχετιστεί με θνησιμότητα λόγω καρκίνου του πνεύμονα και με τη συχνότητα εμφάνισης του (Beelen Rob et al., 2008, Raaschou-Nielsen et al., 2011, Turner et al., 2011). Η έκθεση σε λεπτά σωματίδια (PM<sub>2.5</sub>) έχει συμβάλει σε 3,2 εκατομμύρια πρόωρους θανάτους παγκοσμίως το 2010, οφειλόμενων σε μεγάλο βαθμό σε καρδιαγγειακές παθήσεις και 223,000 θανάτους λόγω καρκίνου του πνεύμονα. Πάνω από τους μισούς θανάτους από καρκίνο του πνεύμονα λόγω των PM<sub>2.5</sub>, είναι στην Κίνα και σε άλλες χώρες της ανατολικής Ασίας (Lim and Vos, 2012).

Ο καρκίνος του πνεύμονα πιθανώς προέρχεται από την μακροχρόνια έκθεση στην ατμοσφαιρική ρύπανση, ο κίνδυνος ωστόσο εμφάνισης της νόσου είναι μικρότερος σε σχέση με τον κίνδυνο που προκύπτει από το κάπνισμα (Higgins, 1976, Pershagen, 1990).



### 1.3.2. Τύποι χημικών καρκινογόνων

Τα χημικά καρκινογόνα ταξινομούνται σε δύο κύριες ομάδες: τα γενετοξικά καρκινογόνα και τα μη γενετοξικά ή επιγενετικά καρκινογόνα. Γενετοξικά καρκινογόνα είναι αυτά που δρουν σε κύτταρα στόχους διαφόρων ιστών για το σχηματισμό συμπλόκων με το DNA, προκαλώντας έτσι γενετικές βλάβες. Συνήθως πρόκειται για οργανικές ουσίες συνθετικές ή φυσικές. Τα καρκινογόνα αυτά που αντιδρούν με το DNA περιέχουν ηλεκτρονιόφιλα μόρια ή μπορούν να μετατραπούν σε ηλεκτρονιόφιλα ενεργά μόρια από τον ξενιστή. Η χημική αλλοίωση του DNA είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ των πυρηνόφιλων κέντρων του DNA και των ηλεκτρονιόφιλων μορφών των καρκινογόνων. Τα πυρηνόφιλα κέντρα του DNA είναι τα άτομα οξυγόνου και αζώτου των νουκλεοτιδίων καθώς επίσης και τα άτομα οξυγόνου των φωσφορικών του σκελετού του DNA.

Επιγενετικά καρκινογόνα είναι αυτά που στερούνται της μοριακής δομής που απαιτείται για το σχηματισμό ηλεκτρονιόφιλων μορίων και επομένως δεν αντιδρούν με το DNA. Ασκούν τη δράση τους είτε έμμεσα, οδηγώντας σε νεοπλασματικό μετασχηματισμό των κυττάρων, είτε ευνοώντας την ανάπτυξη όγκων από κρυπτογενετικά μετασχηματισμένα κύτταρα. Συνήθως, πρόκειται για συνθετικά εντομοκτόνα, προσθετικές ουσίες των τροφών και φάρμακα. Για να προκαλέσουν καρκίνο απαιτείται μακροχρόνια έκθεση και υψηλές συγκεντρώσεις της χημικής ουσίας (Μπόνιος Μ. et al., 2007).

### 1.3.3. Στάδια χημικής καρκινογένεσης

Η διαδικασία της ογκογένεσης μπορεί να χωριστεί σε δύο κύρια στάδια. Πρώτα έχουμε το στάδιο της ενάρξεως (initiation) της καρκινογένεσης. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από το μετασχηματισμό ενός φυσιολογικού κυττάρου σε ένα νεοπλασματικό κύτταρο μέσα από μια σειρά γενετικών βλαβών. Οι γενετικές αυτές βλάβες περιλαμβάνουν μια σειρά αλλοιώσεων του DNA οι οποίες συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του αναδιπλασιασμού του και είναι μη αναγνωρίσιμες από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA, έχουν δηλαδή τον χαρακτήρα μεταλλάξεων. Περιλαμβάνουν συνήθως μεταθέσεις, απώλειες και αντικαταστάσεις σε κάποια

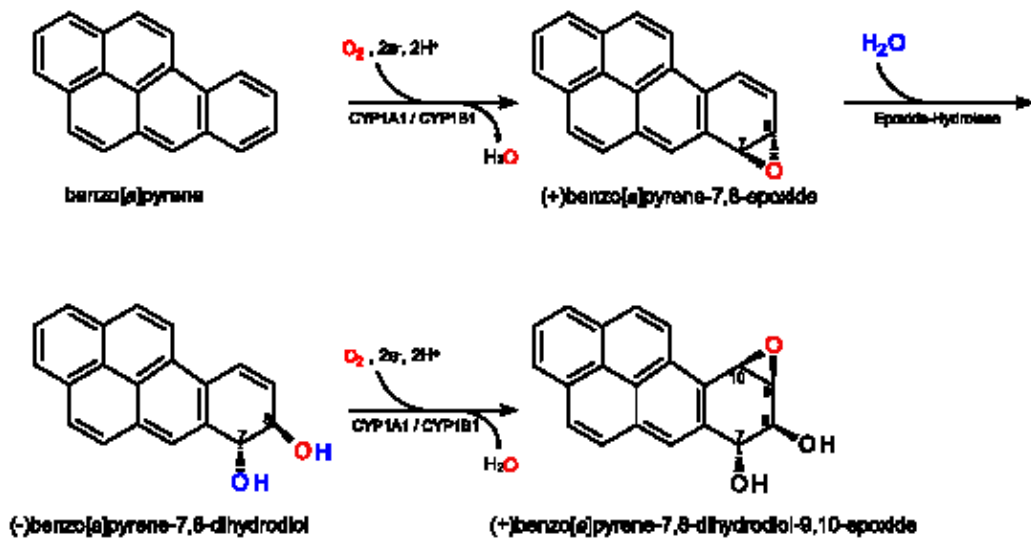
νουκλεοτίδια του DNA ή μπορεί να έχουν τη μορφή ευρύτερων ανακατατάξεων ολόκληρων τμημάτων του μορίου του DNA.

Αποτέλεσμα των μεταλλάξεων αυτών είναι η δημιουργία μετασχηματισμένων κυττάρων που μέσω ενεργοποίησης ογκογονιδίων, απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων και πολλαπλών αντιγραφών οδηγούν στο σχηματισμό νεοπλασματικών κυττάρων. Κατά το δεύτερο στάδιο της ογκογένεσης το οποίο ονομάζεται και στάδιο προαγωγής (promotion) της καρκινογένεσης, έχουμε κινητοποίηση των διαδικασιών πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων και μείωση της απόπτωσης τους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κλώνων νεοπλασματικών κυττάρων που οδηγούν τελικά στο σχηματισμό όγκων (Μπόνιος Μ. et al., 2007).

#### **1.3.4. Μηχανισμοί χημικής καρκινογένεσης**

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω είναι γνωστή η σύνδεση των ηλεκτρονιόφιλων μορφών των χημικών ουσιών μέσω ομοιοπολικών δεσμών με το DNA του κυττάρου. Ωστόσο, από τα γνωστά χημικά καρκινογόνα λίγα ανήκουν στην κατηγορία αυτών που αντιδρούν άμεσα με το DNA, δηλαδή στην κατηγορία των «άμεσων καρκινογόνων». Στη μεγαλύτερη πλειοψηφία τους τα χημικά καρκινογόνα δεν αντιδρούν άμεσα με τα συστατικά του κυττάρου αλλά απαιτείται η ενζυματική μετατροπή τους σε μια μορφή χημικά ικανή να αντιδράσει με το DNA του κυττάρου.

Ο οξειδωτικός μεταβολισμός ενός καρκινογόνου και η μετατροπή του σε ενεργό μορφή περιγράφηκαν πρώτα από τον J.A.Miller και τους συνεργάτες του, (Miller and Miller, 1981), ενώ το 1960 που ανακαλύφθηκε το κυτόχρωμα p450 φάνηκε ότι οι μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος p450 σχετιζόταν με το μεταβολισμό των χημικών καρκινογόνων (εικόνα 2). Σήμερα είναι γνωστά 57 γονίδια που κωδικοποιούν τα CYPs (Cytochrome-p450-dependent monooxygenases) ένζυμα (Guengerich and Shimada, 1991).



Εικόνα 2: Μεταβολισμός του βενζο[α]πυρενίου από το κυτόχρωμα P450 1A1.

Μετά το μεταβολισμό (όπου αυτός είναι αναγκαίος) ενός καρκινογόνου και τη μετατροπή του σε μια μορφή χημικά ικανή να αντιδράσει με το DNA δημιουργείται ένα σύμπλοκο DNA-καρκινογόνου, ικανό να προκαλέσει ποικίλες γονιδιωματικές αλλαγές. Ογκογονίδια “κλειδιά” και ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι συχνοί στόχοι γενετικών αλλοιώσεων και ειδικότερα μεταλλάξεων που ωθούν τα κύτταρα στο να ξεφύγουν από τον έλεγχο της ανάπτυξης και να διαφοροποιηθούν υιοθετώντας χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων, διαταράσσοντας έτσι κεντρικά μονοπάτια και δίκτυα σηματοδότησης (Hanahan and Weinberg, 2011, Hammerman PS et al., 2012).

Στον καρκίνο του πνεύμονα καθώς και σε πολλούς άλλους καρκίνους μια πολύ συχνή και ανιχνεύσιμη μετάλλαξη είναι στο TP53 γονίδιο. Το πνευμονικό καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων (SQCC) άλλος ένας κοινός τύπος πνευμονικού καρκίνου, προκαλώντας 400,000 θανάτους ετησίως, παγκόσμια. Σχεδόν όλοι οι SQCC καρκίνοι εμφανίζουν σωματική μετάλλαξη του TP53 γονιδίου. Επίσης χαρακτηρίζονται από συχνές μεταλλάξεις των ακόλουθων μονοπατιών CDKN2A/RB1, NFE2L2/KEAP1/CUL3, PI3K/AKT και SOX2/TP63/NOTCH1 γεγονός που αποδεικνύει συνήθως δυσλειτουργίες στον κυτταρικό κύκλο, απόκριση στο οξειδωτικό στρες, σήματα απόπτωσης των κυττάρων ή και κυτταρική διαφοροποίηση των πλακωδών κυττάρων. Σε έναν άλλο τύπο καρκίνου, το πνευμονικό αδενοκαρκίνωμα οι δυο πιο κοινές μεταλλάξεις είναι στα EGFR και KRAS, οι οποίες σπανίζουν στον SQCC ενώ αντίθετα αλλοιώσεις στην FGFR οικογένεια κινασών είναι κοινές και στους δύο τύπους (Hammerman PS et al., 2012). Πολλά από τα παραπάνω χαρακτηριστικά χρησιμοποιούνται σαν βιοδείκτες σε διάφορες κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες και

στη χημειοπροφύλαξη. Επίσης λόγω της δυσκολίας να διερευνηθεί ο ακριβής μηχανισμός δημιουργίας του καρκίνου, τα δεδομένα από την μέτρηση των βιοδεικτών αποτελούν μια εξαιρετική λύση ώστε να εκτιμηθεί η σχέση της έκθεσης σε ατμοσφαιρική ρύπανση με το ενδεχόμενο ανάπτυξης καρκίνου.

Εκτός όμως από τα γενοτοξικά καρκινογόνα που άμεσα ή έμμεσα (μετά από μεταβολισμό τους σε ενεργείς μορφές) αντιδρούν με το DNA, υπάρχουν και μη γενοτοξικοί - επιγενετικοί μηχανισμοί καρκινογένεσης. Οι επιγενετικές αλλοιώσεις είναι μια πολύ σημαντική κατηγορία μοριακών αλλοιώσεων καθώς συμβάλουν εξίσου σημαντικά στην δημιουργία και εξέλιξη της νόσου (Jones and Baylin, 2002)

Στην περίπτωση των μη γενοτοξικών καρκινογόνων, ο τρόπος δράσης τους είναι αρκετά πολύπλοκος και πολλές φορές αμφιλεγόμενος. Περιλαμβάνει τη διαμόρφωση των ενζύμων του μεταβολισμού, την ενεργοποίηση του οξειδωτικού stress, τη μεταβολή των ενδοκυτταρικών επικοινωνιών, την καταστολή των μηχανισμών της απόπτωσης και την ενεργοποίηση της αναπαραγωγής αυξητικών παραγόντων μέσω κυτταροτοξικών επιδράσεων. Είναι αξιοσημείωτο ότι πολλά μη γενοτοξικά καρκινογόνα συχνά επηρεάζουν πολλές από τις παραπάνω οδούς δράσης.

### **1.3.5. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης**

Ο ανθρώπινος οργανισμός πραγματοποιεί μια προσπάθεια επιδιόρθωσης της χημικής αλλοίωσης του DNA από ειδικούς ενζυματικούς μηχανισμούς του κυττάρου, με στόχο τον επανασχηματισμό της φυσιολογικής αλυσίδας του DNA. Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA αποτελούν ένα από τα σπουδαιότερα φαινόμενα που σχετίζονται με την καρκινογένεση, αφού έχει επανειλημμένα παρατηρηθεί ότι η απουσία ή η μειωμένη δραστηριότητά τους οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία στις καρκινογόνες επιδράσεις (Friedberg, 2001). Οι περισσότεροι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA φαίνεται ότι δρουν με απομάκρυνση της λαθεμένης βάσης και αντικατάστασης της από τη σωστή (excision repair) (Yu et al., 1999). Σε περίπτωση μη έγκαιρης επέμβασης των επιδιορθωτικών μηχανισμών και αφαίρεσης της βλάβης από το DNA, ο αναδιπλασιασμός του τελευταίου μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες DNA, πράγμα που σημαίνει νέες γενετικές πληροφορίες για το κύτταρο και ενδεχόμενη εξέλιξη σε νεοπλασματική κατάσταση.

## 1.4 Οξειδωτικό στρες και αιωρούμενα σωματίδια

### 1.4.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

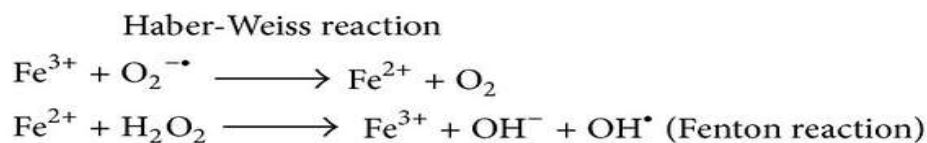
Ελεύθερη ρίζα είναι ένα μόριο ή άτομο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα (Jenkins, 1988). Το άτομο του υδρογόνου αποτελεί την πιο απλή ελεύθερη ρίζα με ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Λόγω της αστάθειας στη δομή τους οι ελεύθερες ρίζες αποσπούν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια προκειμένου να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στοιβάδα και να υιοθετήσουν έτσι μια πιο σταθερή δομή. Το γεγονός αυτό τις καθιστά πολύ δραστικά μόρια, που αντιδρούν είτε μεταξύ τους, είτε με άλλα μόρια, οξειδώνοντας τα. Αντίθετα αντιοξειδωτικό μπορεί να θεωρηθεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα, είναι ικανό να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος. Οξειδωτικό stress, λοιπόν είναι μία διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων υπέρ των πρώτων.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια ετερογενής ομάδα μορίων, στην οποία συγκαταλέγονται και οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ) ή (ROS), οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Οι ΔΜΟ περιλαμβάνουν την πολύ δραστική ρίζα υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ), την ρίζα σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), την ρίζα αλκοξειδίου ( $\text{RO}\cdot$ ), η ρίζα υπεροξειδίου ( $\text{ROO}\cdot$ ), τις μη ρίζες, υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), όζον ( $\text{O}_3$ ) κ.α. Επίσης εκτός από τις δραστικές μορφές οξυγόνου, υπάρχουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (ΔΜΑ) ή (RNS) και θείου (ΔΜΘ) ή (RSS).

Η προέλευση των ελεύθερων ριζών μπορεί να είναι είτε ενδοκυτταρική, όπως για παράδειγμα οι ρίζες που δημιουργούνται κατά τον φυσιολογικό μεταβολισμό του κυττάρου, είτε εξωκυτταρική, σαν συνέπεια για παράδειγμα της έκθεσης σε υπεριώδη ή ιοντική ακτινοβολία, στον καπνό του τσιγάρου, στις εκπομπές αέριων ρύπων από τα αυτοκίνητα και γενικότερα εξαιτίας της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, της διατροφής, ορισμένων ξеноβιοτικών ουσιών κ.α. Τα μιτοχόνδρια είναι κύρια ενδογενής πηγή ROS, καθώς δημιουργούνται κατά την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Πιο συγκεκριμένα, τα κύρια σημεία παράγωγής της ρίζας  $\text{O}_2^{\cdot-}$  και  $\text{H}_2\text{O}_2$  στην αναπνευστική αλυσίδα εντοπίζονται στα σύμπλοκα I και III, ενώ και πολλά άλλα μιτοχονδριακά

ένζυμα εμπλέκονται στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Vibha Rani and Yadav, 2015, Chance et al., 1979).

Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο  $O_2^{\cdot-}$  και του  $H_2O_2$  δημιουργείται στη συνέχεια η πολύ δραστική ρίζα  $\cdot OH$ .



#### 1.4.2 Συχνοί κυτταρικοί στόχοι των ΔΜΟ

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, λόγω του μονήρους ηλεκτρονίου στη στοιβάδα σθένους οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές και προσβάλλουν διάφορα βιομόρια, μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Συχνοί κυτταρικοί στόχοι προσβολής των δραστικών μορφών οξυγόνου είναι το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες, ωστόσο η σειρά προτίμησης τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η θέση παραγωγής των ΔΜΟ, η σχετική ευκολία οξειδωσης του εκάστοτε βιομορίου καθώς και τα διαθέσιμα ιόντα μετάλλων που υπάρχουν.

Είναι γνωστό σήμερα ότι οι ρίζες  $\cdot OH$  φαίνεται να αποτελούν την κύρια πηγή για βλάβες στο DNA. Η οξειδωτική τροποποίηση του DNA μπορεί να προκαλέσει διάφορες συνέπειες όπως σχάση των αλυσίδων (single or double strand breaks), ανταλλαγή αδερφών χρωματίδων (sister chromatid exchange), διασυνδέσεις του τύπου DNA-DNA, DNA-πρωτεΐνες και τροποποιήσεις των βάσεων του DNA. Παρόλο που και οι τέσσερις βάσεις του DNA είναι δυνατόν να τροποποιηθούν οξειδωτικά, οι πυριμιδίνες κυτοσίνη και ειδικά η θυμίνη είναι εξαιρετικά ευαίσθητες σε τέτοιου είδους τροποποιήσεις. Ορισμένες φορές οι τροποποιημένες βάσεις απομακρύνονται έπειτα από την δράση επιδιορθωτικών μηχανισμών και στο σημείο εκείνο σχηματίζονται απουρινικές ή απυρημιδινικές θέσεις (AP sites).

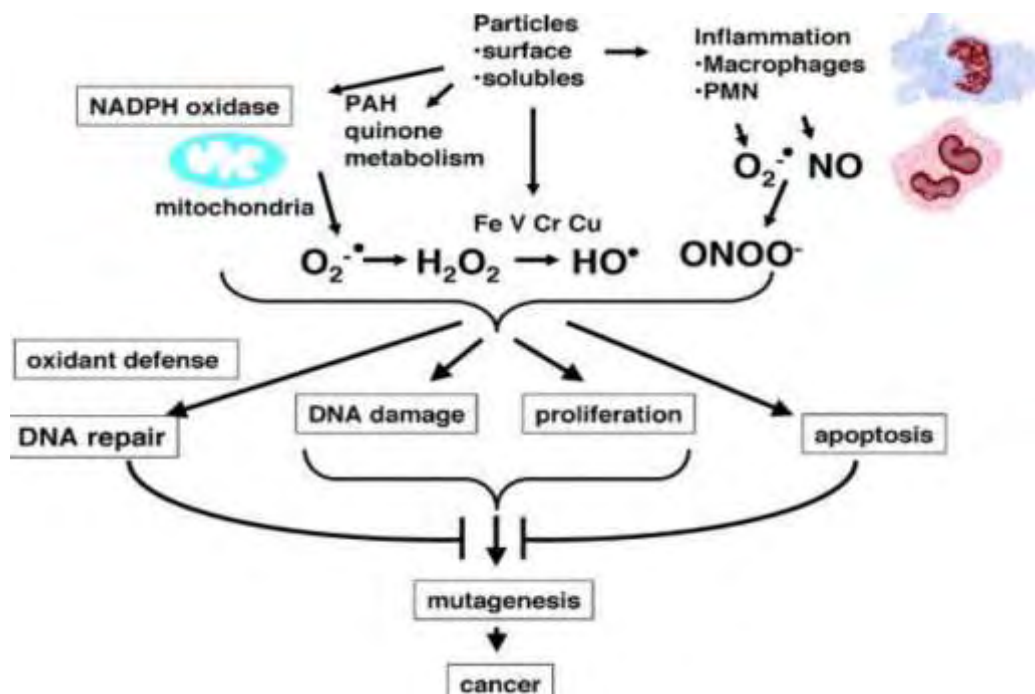
Στην περίπτωση των σχάσεων, σε διάφορα σημεία της φωσφοδιεστερικής αλυσίδας του DNA δημιουργούνται μη τυπικά 3' και 5' άκρα, τα οποία δεν αναγνωρίζονται ως υποστρώματα από τις DNA πολυμεράσες. Ενώ οι σχάσεις στη μια αλυσίδα μπορούν να επιδιορθωθούν εύκολα, οι διπλές σχάσεις προκαλούν σοβαρά προβλήματα στο κύτταρο.

Οι διασυνδέσεις DNA-πρωτεϊνών, δημιουργούν προβλήματα στο ξεδίπλωμα της χρωματίνης, την επιδιόρθωση του DNA και τις διαδικασίες σύνθεσης νέου DNA ή RNA (Γαλάρης, 2001).

### 1.4.3 Τρόποι επαγωγής του οξειδωτικού στρες από τα αιωρούμενα σωματίδια

Το οξειδωτικό stress που επάγεται από τα PM προκύπτει από διάφορες πηγές ( εικόνα 4), που περιλαμβάνουν:

1. άμεση δημιουργία των ΔΜΟ από την επιφάνεια των σωματιδίων
2. δημιουργία ΔΜΟ, λόγω των διαλυτών ουσιών, όπως είναι τα μεταβατικά μέταλλα ή οργανικών μορίων
3. τροποποιημένη λειτουργία των μιτοχονδρίων ή της NADPH-οξειδάσης
4. ενεργοποίηση των φλεγμονοδών κυττάρων, ικανών για την δημιουργία ΔΜΟ και ΔΜΑ



Εικόνα 3:Πιθανοί μηχανισμοί επαγωγής του οξειδωτικού stress από τα αιωρούμενα σωματίδια και ο ρόλος τους στην καρκινογένεση.

Στην πρώτη περίπτωση, η άμεση δημιουργία ΔΜΟ από την επιφάνεια των σωματιδίων οφείλεται στην παρουσία οξειδωτικών ουσιών και ελευθέρων ριζών που είναι προσροφημένες στην επιφάνεια. Παρόλο που ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εξηγήσει την καταστροφή του DNA σε μη κυτταρικό περιβάλλον σε κυτταρικό περιβάλλον για να ισχύει κάτι τέτοιο θα πρέπει είτε τα σωματίδια να είναι ικανά να διασχίσουν την κυτταρική μεμβράνη και να φτάσουν στον πυρήνα είτε οι εξωκυτταρικές ΔΜΟ μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων ριζών να προσεγγίσουν τελικά τον πυρήνα.

Προσροφημένα στην επιφάνεια των σωματιδίων μπορεί να είναι και μεταβατικά μέταλλα (σίδηρος, χαλκός, χρώμιο, βανάδιο), τα οποία έχουν την ικανότητα να επάγουν το οξειδωτικό στρες μέσω των αντιδράσεων Fenton (Han et al., 2001, Ghio et al., 2000), αλλά και ως καταλύτες στις αντιδράσεις Harber-Weiss, οι οποίες περιεγράφηκαν παραπάνω. Τα μεταβατικά μέταλλα είτε διαλύονται στην υγρή φάση των πνευμόνων, είτε παραμένουν και δρουν πάνω στην επιφάνεια των σωματιδίων, καθώς έχει βρεθεί ότι σε σωματίδια που προέρχονται από καύση πετρελαίου (DEP), ειδικές λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια, έχουν την ικανότητα δημιουργίας συμπλόκων με τον σίδηρο, συγκρατώντας τον με τον τρόπο αυτό στην επιφάνεια.

Επίσης τα μη υδατοδιαλυτά, οργανικά μόρια π.χ. PAHs που συναντώνται στην επιφάνεια των σωματιδίων και μπορούν να παραληφθούν με εκχύλιση σε οργανικό διαλύτη, επάγουν εξίσου το οξειδωτικό στρες, όπως φαίνεται και από διάφορες μελέτες που έχουν γίνει.

## **2. Πειραματικό μέρος**

### **2.1 Δειγματοληψία αιωρούμενων σωματιδίων**

#### **2.1.1 Σημεία δειγματοληψίας**

Η δειγματοληψία των αιωρούμενων σωματιδίων πραγματοποιήθηκε σε δύο σημεία της ευρύτερης περιοχής του Νομού Θεσσαλονίκης. Το πρώτο σημείο είναι ο σταθμός αστικού υποβάθρου που βρίσκεται στο μπαλκόνι οικίας στην Ηλιούπολη (40° 40' N, 22° 55' E), στη δυτική Θεσσαλονίκη. Το δεύτερο σημείο της δειγματοληψίας (40° 37'



N, 22° 57' Δ) αντιστοιχεί στο μπαλκόνι του δεύτερου ορόφου του κτιρίου Δ της Πολυτεχνικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ύψος ~6 m). Οι σταθμοί αστικού υποβάθρου και κίνησης απέχουν από τη θάλασσα περίπου 4,1 km και 1 km, αντίστοιχα, ενώ η μεταξύ τους απόσταση υπολογίζεται περίπου ίση με 5,6 km. Ο πρώτος σταθμός (σταθμός υποβάθρου) αντιστοιχεί σε μια πυκνοκατοικημένη περιοχή της δυτικής Θεσσαλονίκης, μακριά από κεντρικό δρόμο. Αντίθετα ο δεύτερος σταθμός (κυκλοφοριακός σταθμός ή σταθμός κίνησης) βρίσκεται πάνω σε κεντρική αρτηρία της Θεσσαλονίκης, την οδό Εγνατία, μία οδό με μεγάλη κυκλοφορία καθ' όλη την διάρκεια της ημέρας.

Η δειγματοληψία και των PM10 και των PM2.5 πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα πρότυπα EN 12341:1998 («Ποιότητα του αέρα-προσδιορισμός του κλάσματος PM10 αιωρούμενων σωματιδίων- Μέθοδος αναφοράς και διαδικασία ελέγχου στο πεδίο για την απόδειξη της ισοδυναμίας αναφοράς των μεθόδων μέτρησης») και EN 14907:2005 («Πρότυπη σταθμική μέθοδος για τον προσδιορισμό του κλάσματος μάζας των PM2.5 των αιωρούμενων σωματιδίων»), αντίστοιχα. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για την δειγματοληψία του κλάσματος PM1.

### 2.1.2 Περιγραφή δειγματολήπτη

Για τις δειγματοληψίες των PM χρησιμοποιήθηκαν δειγματολήπτες μικρού όγκου αέρα (Low Volume Systems , LVS) (Εικόνα 1) τα οποία πληρούν τις προϋποθέσεις του προτύπου EN 14907:2005. Η μέθοδος περιλαμβάνει έναν εισαγωγέα συλλογής PM (TCR- Tecora) συνδεδεμένο απευθείας με ένα υπόστρωμα φίλτρου και μια συσκευή ρυθμιζόμενης ροής (Εικόνα 1), ενώ ακολουθεί σταθμικός προσδιορισμός των PM που συλλέγονται στο φίλτρο. Η κεφαλή είναι κατασκευασμένη από ανοξείδωτο ατσάλι.

Η ταχύτητα του αέρα που εισέρχεται από το κενό που υπάρχει μεταξύ του κυλινδρικού σώματος της κεφαλής και του καλύμματος που υπάρχει πάνω από αυτό είναι  $2,3 \text{ m}^3 / \text{h}$ . Το κάλυμμα προστατεύει από την εισαγωγή των ατμοσφαιρικών κατακριμνήσεων, καθώς και από άλλες πηγές επιμόλυνσης. Ο εξωτερικός αέρας διέρχεται από την είσοδο (κεφαλή) του δειγματολήπτη, η οποία είναι εκλεκτική για το εκάστοτε κλάσμα PM, έχοντας γνωστή και σταθερή ταχύτητα ροής και οδηγείται στον υποδοχέα του φίλτρου.

Ο δειγματολήπτης διαθέτει σύστημα καταγραφής του χρόνου δειγματοληψίας, της ατμοσφαιρικής πίεσης, της θερμοκρασίας περιβάλλοντος, καθώς και της μείωσης της πίεσης. Επιπλέον, το σύστημα δειγματοληψίας προστατεύεται από τα καιρικά φαινόμενα με αδιάβροχα καλύμματα.



Εικόνα 4: Δειγματολήπτης LVS (TCR-Tecora) με κεφαλή υποδοχής για φίλτρο

Τα φίλτρα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (polytetrafluoroethylene, PTFE) που χρησιμοποιήθηκαν έχουν διαχωριστική ικανότητα 99.99% και διαθέτουν προστατευτικό δακτύλιο (Pall Corporation).

### 2.1.3 Στάδια μεθόδου

Πριν την τοποθέτηση των φίλτρων στους δειγματολήπτες, τα φίλτρα PTFE τοποθετήθηκαν στον αφυγραντήρα για 24h και ακολούθησε η ζύγισή τους σε αναλυτικό ζυγό 3 φορές. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον δειγματολήπτη.

Το κλάσμα PM συλλέγεται στο δειγματολήπτη για χρονική περίοδο, 24h. Μετά την πάροδο των 24h τα φίλτρα απομακρύνονται τους από τους δειγματολήπτες, τοποθετούνται σε πλαστικά τρυβλία Petri και παραμένουν σε υάλινο αφυγραντήρα έως την ζύγιση. Η ζύγιση γίνεται σε αναλυτικό ζυγό 1 φορά (1<sup>η</sup> μέτρηση) και μετά από 48h ζυγίζονται άλλες δύο φορές (2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> μέτρηση). Το βάρος του αφόρτιστου φίλτρου καθώς και του επιφορτισμένου υπολογίστηκε από το μέσο όρο των τριών μετρήσεων. Η θερμοκρασία στο χώρο αποθήκευσης θα πρέπει να είναι  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Η μάζα των PM υπολογίστηκε από τη διαφορά των μετρήσεων του επιφορτισμένου από τα αφόρτιστο φίλτρο.

Τα τριβλία που θα χρησιμοποιηθούν για μελλοντική χρήση, μετά τις τρεις ζυγίσεις, καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύονται στην κατάψυξη στους  $-25^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.1.4 Εκχύλιση φίλτρων**

Το  $\frac{1}{4}$  του φίλτρου χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση. Τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια και προστίθεται 5 ml απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε συσκευή υπερήχων όπου και παρέμειναν για 40 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση.

Ακολούθως τα δείγματα, παρέμειναν στο εργαστήριο έως ότου αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο για μελλοντική χρήση.

#### **2.1.5 Ανάλυση μετάλλων με ED- XRF**

Η χρήση της μεθόδου XRF επιλέχθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μετάλλων και των στοιχείων στα δείγματα. Το  $\frac{1}{4}$  του φίλτρου χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση με ED-XRF. Πρόκειται για μια σχετικά γρήγορη τεχνική μη καταστρεπτική και δεν απαιτεί κατεργασία του δείγματος. Επιπλέον μπορεί να παρέχει πληροφορίες για πολλά στοιχεία ταυτόχρονα.

Οι μετρήσεις με την μέθοδο της φθορισμετρίας των ακτίνων X πραγματοποιήθηκαν με το φασματόμετρο Epsilon 5 της εταιρίας PANalytical (εικόνα 6). Το φασματόμετρο αποτελείται από μία λυχνία ακτίνων X με άνοδο Gd (μέγιστη ισχύς 600W, 100kV μέγιστη τάση λειτουργίας, 6mA ρεύμα λυχνίας), έναν ανιχνευτή στερεάς κατάστασης με κρύσταλλο Ge (ενεργή επιφάνεια  $30\text{ mm}^2$ ) με διακριτική ικανότητα 140eV στα 5.897keV και παράθυρο Be πάχους 8μm. Το φασματόμετρο προσφέρει επιλογή από εννέα (9) δευτερογενείς στόχους που προσφέρουν είτε μονοχρωματική ή πολωμένη διεγείρουσα δέσμη ακτίνων X, ενώ οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν είτε στο κενό είτε σε ατμόσφαιρα ηλίου.



*Εικόνα 6 : φασματόμετρο XRF (Epsilon 5, PANanalytical)*

Η ποσοτική ανάλυση των αιωρούμενων σωματιδίων με την τεχνική της φθορισμετρίας των ακτίνων Χ (XRF) παρουσιάζει εν γένει αναλυτικές δυσκολίες κυρίως λόγω των σχετικά μικρών στοιχειακών συγκεντρώσεων των αιωρούμενων σωματιδίων (της τάξης των μερικών δεκάδων  $\text{ng}/\text{cm}^2$ ). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η επιλογή του τύπου του φίλτρου που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα καθώς το πάχος του αλλά και η σύστασή του πρέπει να επιλέγονται με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιείται το υπόβαθρο, ενώ θα πρέπει να πληροί τις προϋποθέσεις για σωστή προσαρμογή στο δειγματολήπτη και να είναι συμβατή η αντίσταση του στην πίεση του αέρα που εισέρχεται στον δειγματολήπτη.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα φίλτρα με βάση το Teflon (PTFE) είναι γενικά αποδεκτά ως βέλτιστη επιλογή για την ανάλυση των αιωρούμενων σωματιδίων με την μέθοδο XRF. Τα φίλτρα από Teflon περιέχουν ελάχιστα ιχνοστοιχεία ώστε να μην «επιμολύνουν» τις μετρήσεις ενώ ταυτόχρονα το ιδιαίτερο μικρό πάχος τους μειώνει σημαντικά το υπόβαθρο λόγω σκέδασης βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο τα ελάχιστα ανιχνεύσιμα όρια της τεχνικής XRF.

Ο χρόνος μέτρησης για κάθε δείγμα ήταν 2 ώρες και για την ανάλυση των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πακέτο λογισμικού. Τα όρια ανίχνευσης της κυμαίνονταν από 1 μέχρι  $70 \text{ ng}/\text{cm}^2$  για τα παρακάτω στοιχεία Na, Mg, Al, Si, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, και Pb.

## 2.2 Καλλιέργεια κυττάρων

### 2.2.1 Κυτταρική σειρά A549

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της τοξικότητας των δειγμάτων ήταν η κυτταρική σειρά A549 (A549 cell line, ECACC). Η κυτταρική σειρά A549 είναι μια καρκινική σειρά που αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος πνεύμονα. Αναπτύχθηκε το 1972 από τους Giard et al. (Giard et al., 1973), μέσω της αφαίρεσης και στη συνέχεια καλλιέργειας, καρκινικού πνευμονικού ιστού, από έναν 58χρονο άντρα καυκάσιας φυλής.

Σε φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα αυτά είναι πλακώδη και είναι υπεύθυνα για τη διάχυση ουσιών όπως είναι το νερό και διάφοροι ηλεκτρολύτες, στις πνευμονικές κυψελίδες. Σε καλλιέργεια *in vitro* τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μονοστοιβάδα και είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας.

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι η ικανότητα τους να συνθέτουν λεκιθίνη. Επίσης περιέχουν υψηλά επίπεδα ακόρεστων λιπαρών οξέων τα οποία είναι σημαντικά για τη διατήρηση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης στα κύτταρα.

Χρησιμοποιούνται ευρέως *in vitro* ως μοντέλο επιθηλιακών πνευμονικών κυττάρων τύπου II, σε πειράματα μεταβολισμού φαρμάκων, προσδιορισμού τοξικότητας και ως ξενιστές. Η επιλογή τους στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε λόγω του υψηλού δυναμικού πολλαπλασιασμού τους και της καταλληλότητας τους ως μοντέλο για την αξιολόγηση δειγμάτων αιωρούμενων σωματιδίων.

### 2.2.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Το αρχικό κρυοφαλίδιο των A549 κυττάρων θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο 37°C για 1 λεπτό και πριν λιώσει εντελώς ο πάγος τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε falcon και έγινε προσθήκη 7ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1200rpm ανά λεπτό στους 18°C για 5 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση σε 2ml θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά σε 75cm<sup>2</sup> φλάσκα, με 16 ml θρεπτικό μέσο. Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το F-12 Ham ( Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma Aldrich), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυικό βόειο ορό (FBS, Sigma

Aldrich) 1% L- γλουταμίνη (L-gutamine solution 200Mm, Sigma Aldrich) και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Penicillin-Streptomycin solution, Sigma Aldrich). Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε με διήθηση σε φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45μm πριν εισαχθεί στα κύτταρα. MrFrosty).Θα πρέπει να αναφερθεί ότι όλη η διαδικασία απομόνωσης και καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε υπο αυστηρά στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow) ώστε να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις των κυττάρων.

Η επώαση έγινε σε ειδικό κλίβανο με θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα που περιείχε 5% CO<sub>2</sub> και τα κύτταρα ελέγχθηκαν μετά από 24 ώρες, για τυχόν επιμολύνσεις.

### **2.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων**

Ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε όταν στην κεκλιμένη επιφάνεια της φλάσκας είχε σχηματιστεί ταπήτιο από κύτταρα σε ποσοστό 70%-80%, το οποίο παρατηρήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο.

Στάδια αννακαλλιέργειας:

- 1) αφαίρεση θρεπτικού μέσου
- 2) πλύση της μονοστοιβάδας κυττάρων με ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) με pH 7.4.
- 3) προσθήκη 2 ml θρυψίνης (Trypsin-EDTA solution, Sigma Aldrich) και παραμονή στον κλίβανο επώασης για 3 λεπτά ώστε να γίνει αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας
- 4) παρατήρηση της φλάσκας σε οπτικό μικροσκόπιο ώστε να διαπιστωθεί η αποκόλληση
- 5) προσθήκη 7 ml θρεπτικού μέσου για απενεργοποίηση της θρυψίνης
- 6) συλλογή σε falcon και αναδιανομή του εναιωρήματος κυττάρων σε καινούριες φλάσκες σε αναλογία 1:3.

Για την A549 κυτταρική σειρά, ο απαιτούμενος χρόνος έως την επόμενη ανακαλλιέργεια κάθε φλάσκας ήταν 48 – 72 ώρες.

#### 2.2.4 Κρυοσυντήρηση

Η κρυοσυντήρηση των κυττάρων έγινε με σκοπό την αποθήκευση τους για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ως κρυοσυντηρητική ουσία χρησιμοποιήθηκε το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο. Το DMSO έχει την ιδιότητα να αποτρέπει την κρυστάλλωση στο εσωτερικό του κυττάρου λόγω της απότομης μείωσης της θερμοκρασίας, διατηρώντας έτσι τα κύτταρα ζωντανά. Ωστόσο είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου. Για το λόγο αυτό απαιτείται η άμεση μεταφορά των κυττάρων σε πάγο μόλις γίνει η προσθήκη του DMSO.

Στάδια κρυοσυντήρησης:

- 1) δημιουργία εναιωρήματος κυττάρων, ακολουθώντας τα ίδια βήματα με την ανακαλλιέργεια
- 2) μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου
- 3) τοποθέτηση εναιωρήματος σε falcon και φυγοκέντρηση στα 1200rpm/λεπτό για 5 λεπτά
- 4) αφαίρεση υπερκείμενου , επαναδιάλυση σε θρεπτικό μέσο με 6% DMSO και προσθήκη 1 ml σε κρυοφιαλίδια τοποθετημένα μέσα σε πάγο.
- 5) μεταφορά των κρυοφιαλιδίων σε ειδικό σκεύος (Mr. Frosty), που είναι πληρωμένο με ισοπροπανόλη και τοποθέτηση στους 80°C για 24 ώρες
- 6) μεταφορά κρυοφιαλιδίων στο υγρό άζωτο σε ειδικές θήκες

Η τοποθέτηση στο σκεύος Mr. Frosty επιτρέπει την σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας, με ρυθμό 1°C/min ώστε να εξασφαλιστεί η ζωτικότητα των κυττάρων.

## 2.2.5 Μέτρηση αριθμού ζωντανών κυττάρων

Προκειμένου να υπολογιστεί ο αριθμός των ζώντων κυττάρων καθώς και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων, λαμβάνονται από εναιώρημα καλλιέργειας 10 μl κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό και αναμιγνύονται με χρήση μικροπιπέττας με 10 μl trypanblue. Το trypanblue (μπλε του τρυπανίου) είναι μια χημική ένωση η οποία έχει την ικανότητα να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη μόνο των νεκρών κυττάρων (όχι των βιώσιμων) με αποτέλεσμα να χρωματίζονται μπλε. Στη συνέχεια λαμβάνονται 10 μl από το μίγμα εναιωρήματος – trypanblue και τοποθετούνται με την βοήθεια μικρού ρύγχους κάτω από καλυπτρίδα σε πλάκα αιματοκυτταρομέτρου (NeubauerImprovedMarienfeld, Germany). Το δείγμα απλώνεται κάτω από την καλυπτρίδα εξαιτίας του τριχοειδούς φαινομένου και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων με την χρήση οπτικού μικροσκοπίου σε μεγένθυση 10x. Μετά από την μέτρηση όλων των βιώσιμων κυττάρων στα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα της πλάκας Neubauer κάθε ένα από τα οποία περιλαμβάνει δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα, υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός στο εναιώρημα με βάση το τύπο:  $(N/4) \times 2 \times 10^4 \times V$  όπου N ο αριθμός των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα της πλάκας Neubauer δια 4 για να βρεθεί ο μέσος όρος των τετραγώνων, επί 2 λόγω της αραιώσης που πραγματοποιείται με το trypanblue και V ο όγκος του συνολικού αρχικού εναιωρήματος σε ml.

## 2.3 Μελέτη κυτταροτοξικότητας των αέριων σωματιδιακών ρύπων

### 2.3.1 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας

Ο έλεγχος της κυτταρικής βιωσιμότητας έγινε χρησιμοποιώντας το kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay της Promega. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι μία ομογενής μέθοδος που προσδιορίζει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων μέσω της ποσοτικοποίησης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που υπάρχει σε κάθε κύτταρο. Η παρουσία του ATP σηματοδοτεί την ύπαρξη μεταβολικά ενεργών κυττάρων και χρησιμοποιείται ως δείκτης βιωσιμότητας. Το ποσοστό του ATP είναι ευθέως ανάλογο με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που υπάρχουν σε μια καλλιέργεια.



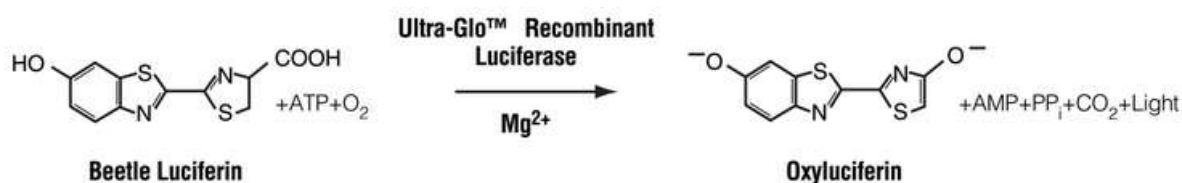
Η μέθοδος είναι σχεδιασμένη για ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών δειγμάτων και καθίσταται έτσι ιδανική για αυτοματοποιημένη υψηλής απόδοσης διαλογή ( High-throughput screening, HTS), μελέτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μελέτες κυτταροτοξικότητας.

### 2.3.2 Περιγραφή μεθόδου- Αρχή της βιοφωτάυγειας

Βιοφωταύγεια ή *βιοφωτισμός* (bioluminescence) χαρακτηρίζεται η δημιουργία φωτός σε διάφορα μήκη κύματος που εκπέμπεται από διάφορους ζώντες οργανισμούς. Το φαινόμενο της βιοφωταύγειας παρουσιάζεται σε πολλές βιο-ομάδες πολύ διαφορετικές μεταξύ τους όπως τα βακτήρια, οι μύκητες, οι πυγολαμπίδες (και άλλα κολεόπτερα) καθώς και σε διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς. Η αιτία της φωτοβολίας αυτής των ζωντανών οργανισμών είναι η οξείδωση της πρωτεΐνης λουσιφερίνης. Αυτή η βιοχημική αντίδραση απαιτεί τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση.

#### Λουσιφερίνη/Λουσιφεράση (ένζυμο πυγολαμπίδων) + ATP = Φως

Πιο αναλυτικά, πρόκειται για μια οξείδωση της λουσιφερίνης,



Ακολουθώντας λοιπόν, την αρχή της βιοφωτάυγειας, το ATP ποσοτικοποιήθηκε μετρώντας την ένταση του φωτός που παράγεται λόγω της αντίδρασης του με το ένζυμο λουσιφεράση. Η μέτρηση έγινε σε φωτόμετρο (λουμινόμετρο).

Το κιτ CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay της Promega, χρησιμοποιεί το θερμοσταθερό ένζυμο λουσιφεράση, που προέρχεται από γονίδιο της πυγόλαμπιδας, *Photuris pennsylvanica* (LucPpe2). Το ένζυμο αυτό είναι πιο σταθερό *in vitro* και λιγότερο ευαίσθητο σε χημική καταπόνηση (pH, αππορρυπαντικά κ.α.).

Παράλληλα γίνεται αναστολή όλων των ενδογενών ενζύμων που απελευθερώνονται κατά

την διάρκεια της λύσης των κυττάρων όπως είναι οι ΑΤΡάσες. Οι απελευθέρωση ΑΤΡασών θα είχε άμεση επιρροή στην ακριβή μέτρηση των επιπέδων του ΑΤΡ.

### 2.3.3 Αντιδραστήρια-Στάδια μεθόδου

Για την συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- CellTiter-glo υπόστρωμα (λιοφυλιωμένο ένζυμο λουσιφεράση/υπόστρωμα λουσιφερίνη)
- CellTiter-glo ρυθμιστικό διάλυμα
- 96-θεσεων «πιάτο» με μη διάφανο πάτο
- Δείγματα αιωρούμενων σωματιδίων
- Λουμινόμετρο

Το ρυθμιστικό διάλυμα και το υπόστρωμα διατηρήθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

Έγινε τήξη του ρυθμιστικού διαλύματος και αποθήκευση του σε θερμοκρασία δωματίου για 48ώρες πριν τη χρήση. Το υπόστρωμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου ξεπαγώσει πλήρως.

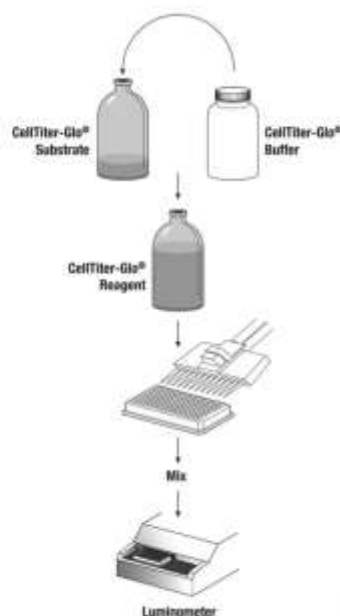
Στη συνέχεια 10ml από το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφέρθηκαν στο μπουκάλι που περιείχε το υπόστρωμα ώστε να γίνει η ανασύσταση του ενζύμου. Το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά έως ότου δημιουργηθεί ομογενές διάλυμα.

Στο πιάτο των 96- θέσεων, μετά από μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο τοποθετήθηκαν 5000 κύτταρα/θέση που αντιστοιχούν σε 100μl κυτταρικού εναιωρήματος/θέση. Το πιάτο τοποθετήθηκε στον κλίβανο επώασης για 2 μέρες. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν τα δείγματα των σωματιδίων, τα οποία είχαν αραιωθεί με θρεπτικό υλικό σε διάφορες συγκεντρώσεις. Για κάθε δείγμα έγιναν 3 επαναλήψεις. Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε  $\text{H}_2\text{O}_2$  και σαν αρνητικός μάρτυρας, θρεπτικό μέσο (μη εκτεθειμένα κύτταρα). Η ποσότητα των δειγμάτων και του θετικού και αρνητικού σήματος που προστέθηκε σε κάθε θέση ήταν 100μl. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 3 ώρες και για 24 ώρες.

Πριν την προσθήκη του αντιδραστήριου υποστρώματος/ρυθμιστικού διαλύματος, τα εκτεθειμένα κύτταρα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

Ακολούθως, προστέθηκαν 100μl του αντιδραστηρίου και το πιάτο αναδεύτηκε για 2 λεπτά σε ειδικό αναδευτήρα, ώστε να πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων. Μετά την ανάδευση, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά ώστε να σταθεροποιηθεί το σήμα του φωτός.

Το πιάτο μεταφέρθηκε στο λουμινόμετρο και έγινε μέτρηση της έντασης του φωτός. Παρακάτω περιγράφεται σχηματικά η διαδικασία (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Διαγραμματική απεικόνιση του τεστ βιωσιμότητας

## 2.4 Διερεύνηση ενδεχόμενου αποπτωτικού μηχανισμού

### 2.4.1 Κασπάσες και απόπτωση

Κύριο συστατικό του αποπτωτικού μηχανισμού στα θηλαστικά είναι η οικογένεια πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε μία αλυσιδωτή αντίδραση που πυροδοτείται από προαποπτωτικά σήματα και οδηγεί στην κατάτμηση του DNA και στη διάλυση του κυττάρου. Οι κασπάσες είναι από τις πιο ειδικές πρωτεάσες και απαραίτητη προϋπόθεση για να κάνουν επαρκή κατάλυση είναι

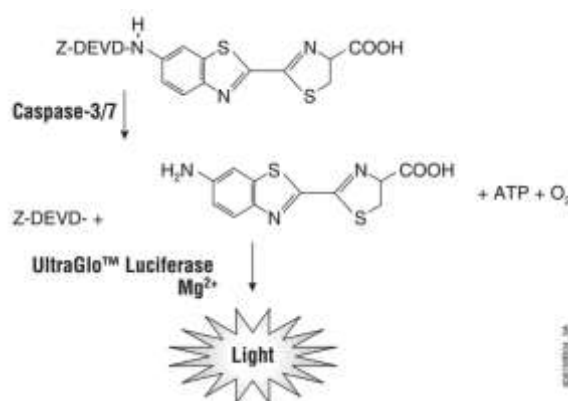
η αναγνώριση τεσσάρων τουλάχιστον αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της εκάστοτε περιοχής διάσπασης. Η τετραπεπτιδική χωροδιάταξη η οποία αναγνωρίζεται είναι διαφορετική για τους διάφορους τύπους κασπάσων.

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να εντοπιστεί η παρουσία της ενεργής κασπάσης-3, η οποία σηματοδοτεί την ύπαρξη διαδικασιών απόπτωσης στο κύτταρο.

### 2.4.2 Προσδιορισμός των επιπέδων της πρωτεΐνης κασπάσης-3

Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε το kit Caspase-Glo® 3/7 Assay της Promega. Η συγκεκριμένη μέθοδος προσδιορισμού είναι μια ομογενής φωτομετρική μέθοδος που μετρά τη δραστικότητα της πρωτεΐνης κασπάσης-3.

Η συγκεκριμένη μέθοδος παρέχει ένα φωτογονικό υπόστρωμα της πρωτεΐνης κασπάσης-3 το οποίο περιέχει μία τετραπεπτιδική αλληλουχία την DEVD. Η αλληλουχία αναγνωρίζεται από την κασπάση-3 και αποκόπτεται. Εκτός από το υπόστρωμα, το αντιδραστήριο είναι κατάλληλο και για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της κασπάσης, της λουσιφεράσης και την λύση των κυττάρων. Η παραγωγή φωτός είναι ανάλογη της ποσοστού δραστικότητας της κασπάσης-3 που υπάρχει στο δείγμα. Η παρακάτω αντίδραση περιγράφει αναλυτικά τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα.



### 2.4.3 Αντιδραστήρια- στάδια μεθόδου

Για την συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- CellTiter-glo υπόστρωμα

- CellTiter-glo ρυθμιστικό διάλυμα
- 96-θέσεων «πιάτο» με μη διάφανο πιάτο
- Δείγματα αιωρούμενων σωματιδίων
- Λουμινόμετρο

Το ρυθμιστικό διάλυμα και το υπόστρωμα διατηρήθηκαν στους -20°C, προστατευμένα από το φώς.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι παρόμοια με το τεστ βιωσιμότητας:

Έγινε τήξη του ρυθμιστικού διαλύματος και αποθήκευση του σε θερμοκρασία δωματίου για 48ώρες πριν τη χρήση. Το υπόστρωμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου ξεπαγώσει πλήρως.

Στη συνέχεια 2,5ml από το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφέρθηκαν στο μπουκάλι που περιείχε το υπόστρωμα ώστε να γίνει η ανασύσταση του ενζύμου. Το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά έως ότου δημιουργηθεί ομογενές διάλυμα.

Στο πιάτο των 96- θέσεων , μετά από μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο τοποθετήθηκαν 5000 κύτταρα/θέση που αντιστοιχούν σε 100μl κυτταρικού εναιωρήματος/θέση. Το πιάτο τοποθετήθηκε στον κλίβανο επώασης για 2 μέρες. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν τα δείγματα των σωματιδίων, τα οποία είχαν αραιωθεί με θρεπτικό υλικό σε διάφορες συγκεντρώσεις. Για κάθε δείγμα έγιναν 3 επαναλήψεις. Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και σαν αρνητικός μάρτυρας, θρεπτικό μέσο (μη εκτεθειμένα κύτταρα). Η ποσότητα των δειγμάτων και του θετικού και αρνητικού σήματος που προστέθηκε σε κάθε θέση ήταν 100μl. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 3 ώρες και για 24 ώρες.

Πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου υποστρώματος/ρυθμιστικού διαλύματος, τα εκτεθειμένα κύτταρα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ακολούθως, προστέθηκαν 100μl του αντιδραστηρίου και το πιάτο αναδεύτηκε για 2 λεπτά σε ειδικό αναδευτήρα, ώστε να πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων. Μετά την ανάδευση, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά ώστε να σταθεροποιηθεί το σήμα του φωτός.

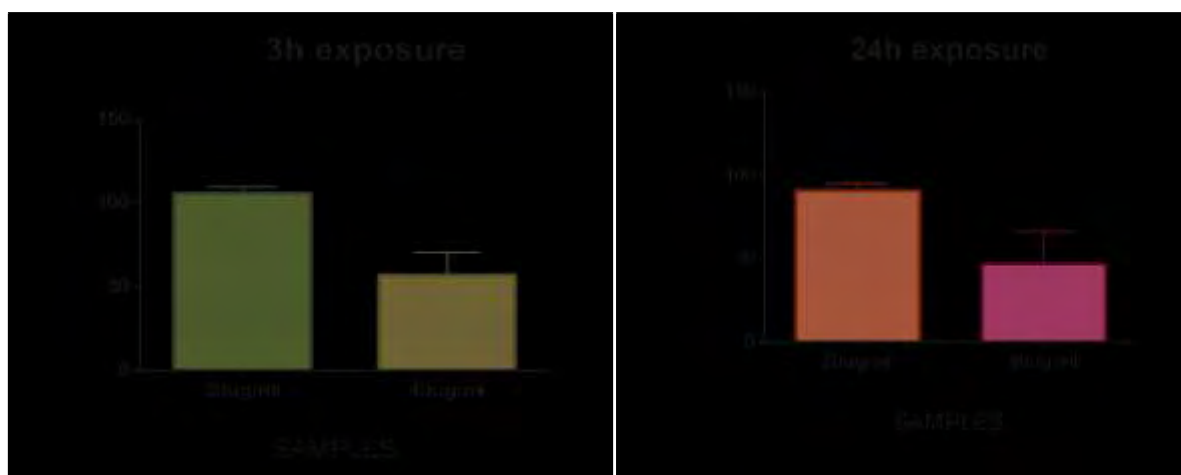
Το πιάτο μεταφέρθηκε στο λουμινόμετρο και έγινε μέτρηση της έντασης του φωτός.

### 3. Αποτελέσματα – συζήτηση

#### 3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων στα κύτταρα A549

##### 3.1.1 Αποτελέσματα κυτταρικής επιβίωσης

Για τον έλεγχο της βιωσιμότητας εξετάστηκαν συνολικά 18 δείγματα αιωρούμενων σωματιδίων κλασμάτων PM1, PM2,5 και PM10. Τα δείγματα προερχόταν από την χειμερινή και την θερινή περίοδο και από τους δύο σταθμούς, το σταθμό υποβάθρου, ο οποίος βρίσκεται στη δυτική Θεσσαλονίκη και τον κυκλοφοριακό σταθμό, ο οποίος ήταν εγκατεστημένος στο ΑΠΘ. Αρχικά τα δείγματα αραιώθηκαν σε συγκεντρώσεις 20μg/ml και 40μg/ml ώστε να βρεθεί η συγκέντρωση κατά την οποία εμφανίζεται τοξικότητα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μετά από 3 και από 24 ώρες έκθεσης και τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα. Η κυτταροτοξικότητα, εκφράζεται σε εκατοστιαία μεταβολή σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (100 %). Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPadPrizm 6 και έγινε one-way ANOVA ανάλυση.

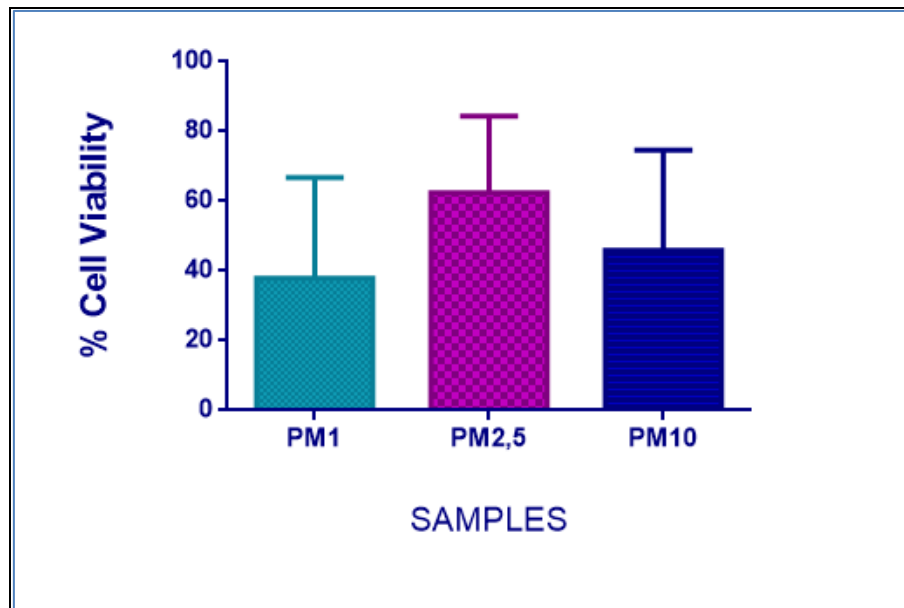


Εικόνα 8: 3ωρη και 24ωρη έκθεση σε συγκέντρωση σωματιδίων 20μg/ml και 40μg/ml, μέση τιμή ± τυπική απόκλιση

Είναι φανερό, ότι στη συγκέντρωση των 20μg/ml η τοξικότητα είναι πολύ μικρή σε σχέση με αυτήν των 40 μg/ml ( $p < 0.05$ ). Παρατηρήθηκε επίσης ότι δεν υπάρχει κάποια

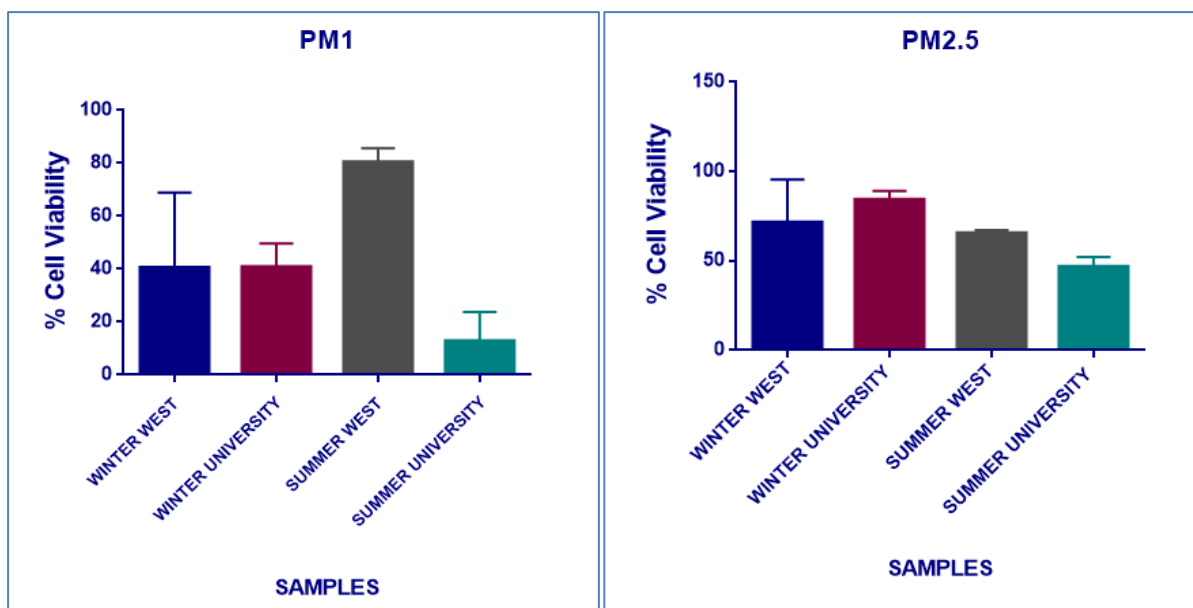
σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 και στις 24 ώρες έκθεσης. Αυτό πιθανόν φανερώνει ότι τα συστατικά των σωματιδίων ξεκινούν από πολύ νωρίς να αλληλοεπιδρούν με τα κύτταρα.

Παρακάτω παρουσιάζεται η συσχέτιση των διάφορων κλασμάτων αιωρούμενων σωματιδίων με την κυτταρική βιωσιμότητα στις 24 ώρες έκθεσης.



Εικόνα 9: Συσχέτιση κυτταροτοξικότητας με το μέγεθος των σωματιδίων, μέση τιμή±τυπική απόκλιση

Τα μικρότερα σε διάμετρο σωματίδια PM1 εμφανίζουν μεγαλύτερη τοξική δράση σε σχέση με τα PM2,5 και PM10 ( $p < 0.05$ ). Στα διαγράμματα που ακολουθούν γίνεται μια σύγκριση των δύο σταθμών υποβάθρου και κέντρου, αλλά και της χειμερινής και θερινής περιόδου. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

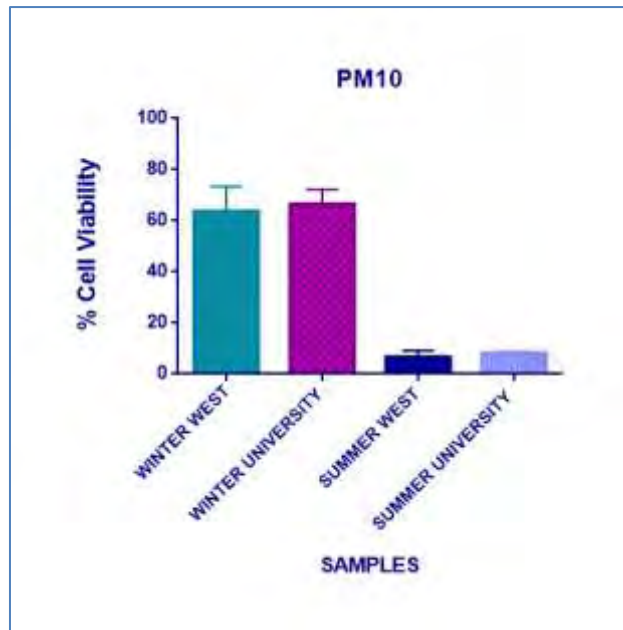


Εικόνα 10: Σχέση τοξικότητας – πηγής προέλευσης, για την χειμερινή και θερινή περίοδο των κλασμάτων PM1, PM2,5 μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Συγκέντρωση σωματιδίων 40μg/ml.

Στο κλάσμα των PM1, είναι εμφανές ότι στο σταθμό υποβάθρου (west) κατά την χειμερινή περίοδο η τοξικότητα ήταν σχεδόν διπλάσια σε σχέση με την θερινή περίοδο. Στον κυκλοφοριακό σταθμό (university) η εικόνα αλλάζει, καθώς μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα παρατηρείται κατά την θερινή περίοδο. Πιθανόν η αύξηση αυτή να οφείλεται στην αυξημένη κυκλοφορία των αυτοκινήτων. Κατά την χειμερινή ωστόσο περίοδο, δεν παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη διαφορά ανάμεσα στους δύο σταθμούς. Στο κλάσμα των PM 2,5 σωματιδίων οι τιμές δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές κατά την χειμερινή και θερινή περίοδο στον σταθμό υποβάθρου. Αντίθετα στον κυκλοφοριακό σταθμό παρατηρείται μεγαλύτερη κυτταρική επιβίωση κατά την χειμερινή περίοδο.

Στο κλάσμα των PM10, όπως φαίνεται παρακάτω, υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ της θερινής και της χειμερινής περιόδου.

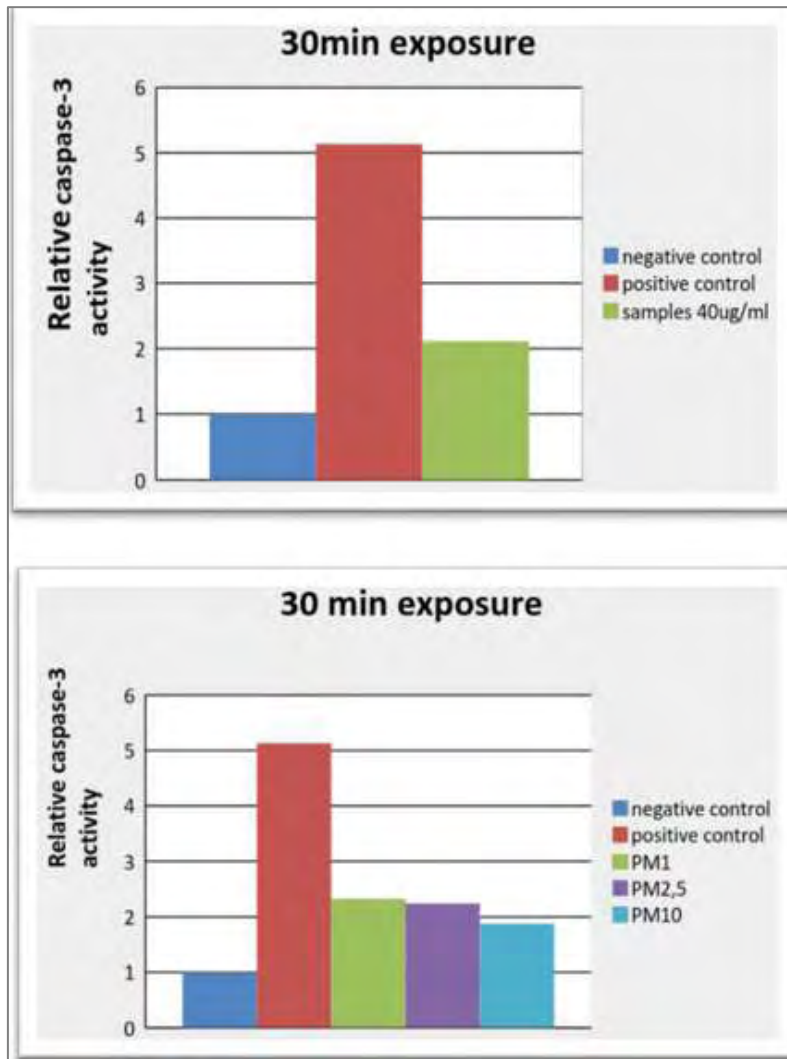




Εικόνα 11: Σχέση τοξικότητας – πηγής προέλευσης, για την χειμερινή και θερινή περίοδο των κλασμάτων PM10, μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Συγκέντρωση σωματιδίων 40μg/ml.

### 3.1.2 Διερεύνηση αποπτωτικού μηχανισμού

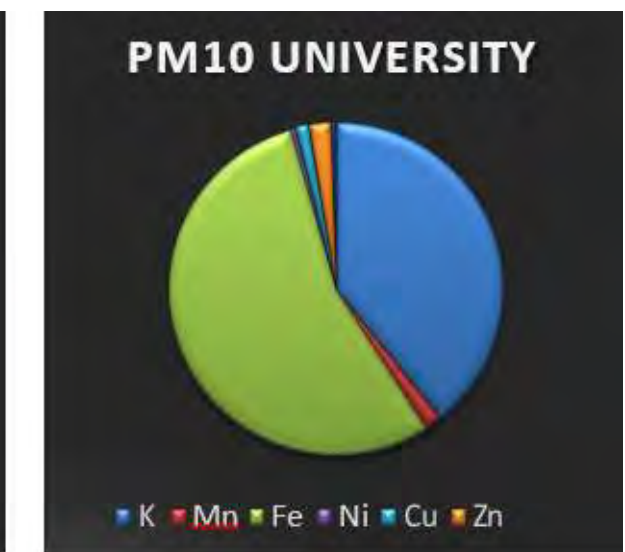
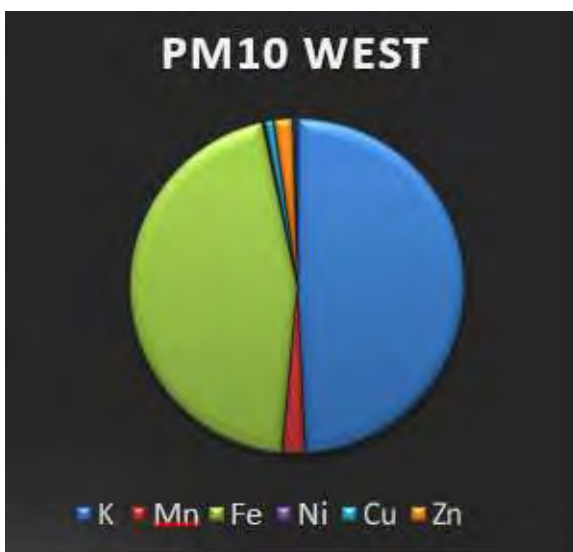
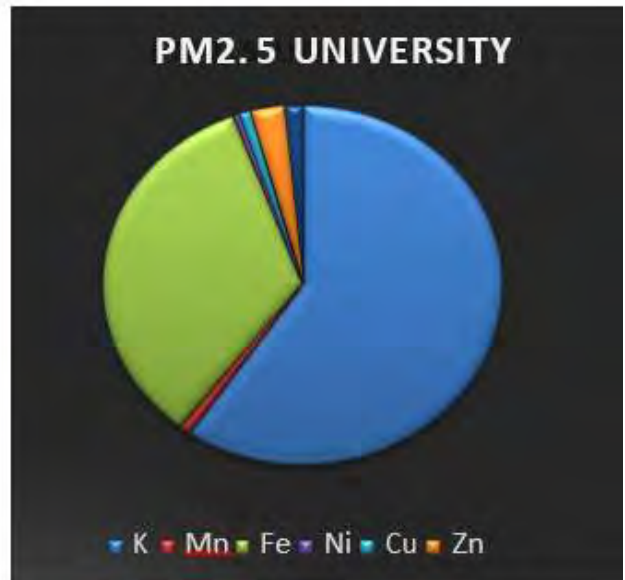
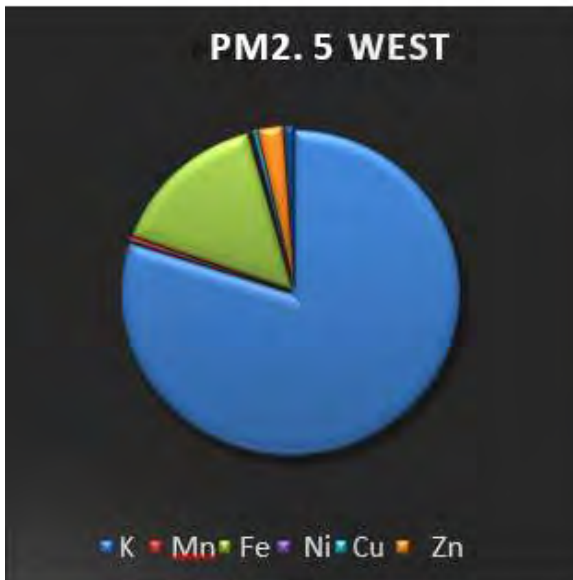
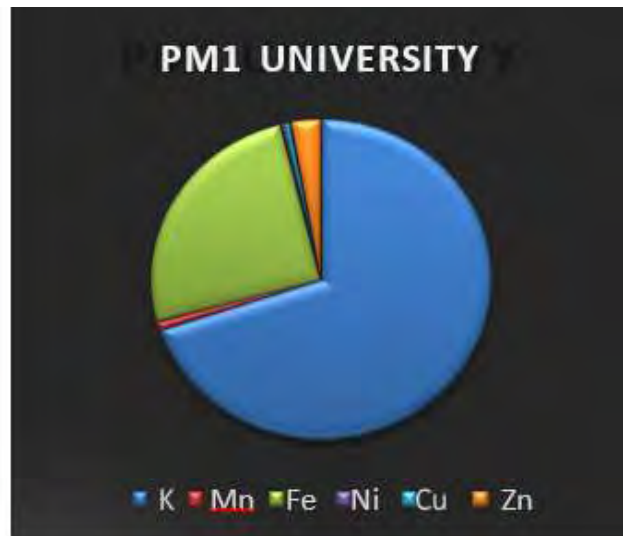
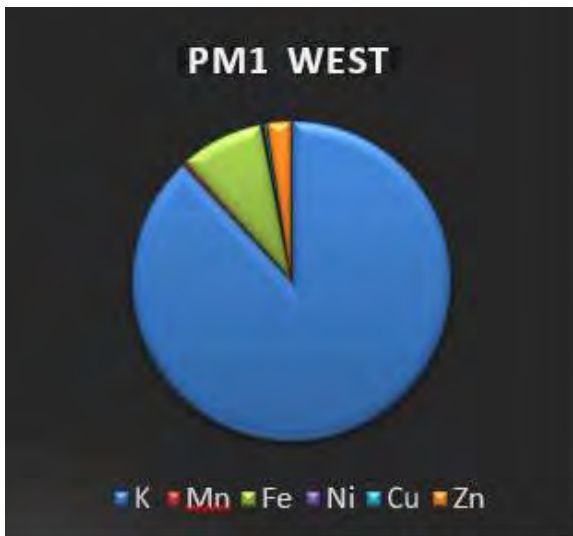
Στα δείγματα των 40μg/ml έγινε στη συνέχεια το τεστ της πρωτεΐνης κασπάσης-3, με πρώτη μέτρηση στα 30 λεπτά και δεύτερη στις 3 ώρες έκθεσης. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με το τεστ βιωσιμότητας και δείχνουν ότι τα δείγματα εμφανίζουν τοξικότητα. Δεν υπάρχει ωστόσο κάποια διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στα 30 λεπτά και στις 3 ώρες, γεγονός που δείχνει ξανά ότι η ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού είναι άμεση. Και στα τρία κλάσματα των σωματιδίων παρατηρείται ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Στα PM1 η σχετική δραστικότητα της πρωτεΐνης φαίνεται να είναι μεγαλύτερη από τα σωματίδια PM2,5 και PM10. Ως **relative caspase-3 activity = 1**, θεωρούνται οι μετρήσεις του αρνητικού μάρτυρα (κύτταρα που δεν εκτέθηκαν σε τοξικό παράγοντα). Παρακάτω παρατίθενται οι μετρήσεις των 30 λεπτών. Η στατιστική ανάλυση έγινε με one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).



Εικόνα 12: Σχετική δραστηριότητα κασπάσης-3 σε σχέση με το σύνολο των σωματιδίων και των τριών κλασμάτων ξεχωριστά, σε συγκέντρωση 40μg/ml.

### 3.1.3 Χημική σύσταση σωματιδίων

Στα παρακάτω διαγράμματα πίτας, παριστάνεται η κατανομή μετάλλων και καλίου των τριών κλασμάτων και από τους δύο σταθμούς μέτρησης. Τα μέταλλα και το κάλιο αποτελούν ένα μικρό ποσοστό της συνολικής μάζας των σωματιδίων, ωστόσο αναπαρίστανται μεμονωμένα, για διευκόλυνση της ανάγνωσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .



Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι τιμές διάφορων στοιχείων, όπως προέκυψαν από την ED-XRF ανάλυση. Εκφράζονται σε  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

SAMPLES	PM fraction	PM conc ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	$\mu\text{g}/\text{m}^3$						
			K	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Pb
SAMPLE WINTER/WEST	1	70,3	1,0418	0,0068	0,1247	0,0023	0,0026	0,0332	0,0072
SAMPLE WINTER/WEST	1	38,3	0,8232	0,0016	0,05	0,0016	0,0047	0,0233	0,0035
SAMPLE WINTER/WEST	2,5	59,5	1,1298	0,0092	0,2121	0,0012	0,0055	0,0366	0,0139
SAMPLE WINTER/WEST	2,5	49,2	0,8814	0,0047	0,1713	0,0022	0,0091	0,0381	0,0078
SAMPLE WINTER/WEST	2,5	61,1	1,1497	0,0016	0,1264	0,0013	0,0042	0,022	0,0252
SAMPLE WINTER/WEST	10	62,7	0,9831	0,0428	0,6972	0,0041	0,0138	0,0352	0,0096
SAMPLE WINTER/UNIVERSITY	1	21,3	0,3086	0,0033	0,0786	0,0008	0,002	0,0084	0,0033
SAMPLE WINTER/UNIVERSITY	2,5	39,4	0,4364	0,0063	0,1383	0,004	0,0046	0,0163	0,0092
SAMPLE WINTER/UNIVERSITY	10	44,1	0,2685	0,0188	0,6441	0,0022	0,0182	0,0166	0,0065
SAMPLE WINTER/UNIVERSITY	10	54	0,5759	0,0261	1,0266	0,0169	0,0236	0,0365	0,0136
SAMPLE WINTER/UNIVERSITY	10	115,1	1,1031	0,0465	1,0205	0,0073	0,0163	0,0606	0,0096
SAMPLE SUMMER/UNIVERSITY	1	16,9	0,1804	0,0004	0,0606	0,001	0,0018	0,0098	0,0037
SAMPLE SUMMER/UNIVERSITY	1	21,5	0,292	0,0063	0,144	0,0023	0,0025	0,0143	0,0072
AMPLE SUMMER/UNIVERSITY	2,5	24,2	0,1957	0,0037	0,2215	0,0014	0,0053	0,0127	0,0066
SAMPLE SUMMER/UNIVERSITY	10	23,1	0,3321	0,0083	0,491	0,0046	0,0106	0,0106	0,0029
SAMPLE SUMMER/WEST	10	23,5	0,2086	0,0128	0,3949	0,0025	0,0062	0,0083	0,0023

Πίνακας 3: Πίνακας περιεκτικότητας μετάλλων και άλλων στοιχείων, από ανάλυση ED-XRF

Τα δείγματα του κεντρικού σταθμού όπως φαίνεται και από τον πίνακα έχουν πιο υψηλό ποσοστό σιδήρου, χαλκού, ψευδαργύρου, νικελίου σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα του σταθμού υποβάθρου. Τα μέταλλα αυτά προέρχονται κατά κύριο λόγο από τις εξατμίσεις των αυτοκινήτων, δικαιολογώντας έτσι το υψηλό ποσοστό τους στα δείγματα του κεντρικού σταθμού. Ένα ακόμη αξιοσημείωτο γεγονός, είναι τα υψηλότερα ποσοστά καλίου, στα δείγματα του σταθμού υποβάθρου κατά τους χειμερινούς μήνες. Το κάλιο αποτελεί δείκτη της καύσης βιομάζας, η οποία κατά τους χειμερινούς μήνες είναι αυξημένη.

### 3.1.4 Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Όπως ήταν αναμενόμενο τα δείγματα, εμφάνισαν τοξικότητα και παρατηρήθηκε μία δόσο-εξαρτώμενη σχέση στις δοκιμές των 20 και 40  $\mu\text{g/ml}$ . Η εξάρτηση αυτή επιβεβαιώθηκε και με δοκιμές σε συγκέντρωση 60 $\mu\text{g/ml}$ , όπου η κυτταρική επιβίωση μειώθηκε αναλογικά. Όταν η συγκέντρωση παρέμεινε σταθερή στα 40 $\mu\text{g/ml}$ , παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στις τιμές της κυτταρικής επιβίωσης για το κάθε κλάσμα σωματιδίων. Η διαφοροποίηση αυτή ήταν αναμενόμενη.

Μια πολύ σημαντική παράμετρος είναι η ενεργός επιφάνεια των σωματιδίων, ειδικότερα στα μικρότερα σε μέγεθος σωματίδια. Σε πολλές μελέτες αναφέρεται (Duffin et al., 2002, Hefland et al., 2001) πως η ενεργός επιφάνεια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις βιολογικές επιπτώσεις των σωματιδίων. Για όμοιες μάζες σωματιδίων, στα διαφορά κλάσματα αντιστοιχεί διαφορετικός αριθμός σωματιδίων. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν όμοιες μάζες σωματιδίων και αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα PM1 σωματίδια περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό σωματιδίων και μεγαλύτερη συνολική ενεργό επιφάνεια, σε σχέση με τα PM2,5 και PM10, για την δεδομένη μάζα. Έτσι, αποδείχθηκαν πιο τοξικά.

Ωστόσο δεν θα μπορούσαμε να πούμε με σιγουριά, πως αρκεί μία μόνο παράμετρος για να εξηγηθούν η διαφορές στην κυτταροτοξικότητα του κάθε κλάσματος. Η εξήγηση απορρέει από έναν συνδυασμό φυσικοχημικών παραμέτρων, που περιλαμβάνουν εκτός από το μέγεθος, την χημική σύσταση και την μάζα των σωματιδίων.

Παρατηρώντας τον παρακάτω πίνακα, προκύπτει ότι τα PM2.5 και PM10 του κυκλοφοριακού σταθμού (university), έχουν μεγαλύτερα ποσοστά σε μεταβατικά μέταλλα (Fe, Cu, Zn, Mn) σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Καθώς ο σταθμός μέτρησης βρίσκεται κοντά σε δρόμο με μεγάλη κυκλοφορία αυτοκινήτων, τα μέταλλα αυτά πιθανόν προέρχονται από τις εξατμίσεις οχημάτων αλλά και από άλλες πηγές όπως, η σκόνη δρόμου και τα προϊόντα φθοράς των ελαστικών και των φρένων (Thorpe and Harrison, 2008, Rehbein et al., 2012, Manoli et al., 2002).

Τα μικρότερα σε μέγεθος σωματίδια και ειδικότερα τα PM1 σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Rastogi et al., 2012), προέρχονται κατά κύριο λόγο από πηγές καύσης όπως είναι πρωτογενείς εκπομπές οχημάτων, παρουσιάζοντας έτσι μεγαλύτερο ποσοστό σε οργανική μάζα σε αντίθεση με τα PM2.5 και PM10 (McWhinney et al., 2012). Στον σταθμό υποβάθρου, αντίθετα η κύρια πηγή καύσης είναι η καύση βιομάζας. Ένα άλλο

χαρακτηριστικό των δειγμάτων του σταθμού υποβάθρου που επιβεβαιώνει αυτήν την πηγή προέλευση τους, είναι η υψηλή περιεκτικότητά τους σε κάλιο (K) και λεβογλουκοζάνη, που θεωρούνται δείκτες της καύσης βιομάζας (Sarigiannis et al., 2015, Argyropoulos et al., 2016).

Στην παρούσα μελέτη τα PM1 σωματίδια παρουσιάζουν μεγαλύτερη μείωση στην κυτταρική επιβίωση, ενώ αμέσως μετά ακολουθούν τα PM10 και όχι τα PM2.5 όπως πιθανόν να αναμενόταν, λόγω του μικρότερης διαμέτρου τους. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε μία μελέτη στην πόλη του Τορόντο, όπου εξετάστηκαν δείγματα από κεντρικό κυκλοφοριακό σταθμό (Akhtar et al., 2014). Στη μελέτη αυτή τα χοντρά σωματίδια (coarse) εμφάνισαν την μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα, συγκρινόμενα με τα λεπτά (fine) και υπέρλεπτα (ultrafine), στην ίδια συγκέντρωση. Το γεγονός αποδόθηκε κυρίως στην υψηλότερη περιεκτικότητα των χοντρών σωματιδίων σε μέταλλα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης, εκτός από τον προσδιορισμό της τοξικότητας, ήταν και η διερεύνηση του αν ο κυτταρικός θάνατος, επέρχεται μέσω διαδικασιών απόπτωσης και συγκεκριμένα μέσω ενεργοποίησης της οικογένειας των κασπασών. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-3/7 θεωρείται γενικά πρώιμο γεγονός κατά την έναρξη της σηματοδότησης του αποπτωτικού μηχανισμού, ωστόσο μας οδηγεί σε σαφή αποτελέσματα για την ύπαρξη ενός τέτοιου μηχανισμού.

Από τις μετρήσεις στα A549 κύτταρα είναι εμφανές ότι οι προσροφημένες στην επιφάνεια των σωματιδίων χημικές ουσίες είναι ικανές να οδηγήσουν το κύτταρο στον κύκλο της απόπτωσης και παρατηρήθηκε ότι το φαινόμενο δεν είναι χρόνο-εξαρτώμενο, στο χρονικό εύρος που δοκιμάστηκε, αλλά αντίθετα είναι εξαρτώμενο του μεγέθους των σωματιδίων. Όπως και στη δοκιμή βιωσιμότητας, τα PM1 σωματίδια, ενεργοποιούν σε μεγαλύτερο βαθμό την κασπάση-3/7.

Η δημιουργία των ΔΜΟ είναι μια σημαντική αιτία που το κύτταρο, μέσω πολύπλοκων μονοπατιών, οδηγείται τελικά στην ενεργοποίηση των κασπασών (Ciracu and Aw, 2010). Η δημιουργία των ΔΜΟ και η επαγωγή του οξειδωτικού στρες λόγω των μετάλλων, όπως περιεγράφηκε αναλυτικά στο θεωρητικό μέρος, μας επιβεβαιώνει πως η ύπαρξη αποπτωτικού μηχανισμού είναι κάτι αναμενόμενο για τα δείγματα που εξετάστηκαν.

Αξίζει να αναφερθεί ότι στο εργαστήριο μας πραγματοποιήθηκε και μια μελέτη του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των δειγμάτων αυτών με τη μέθοδο της διθειοτριόλης (DTT). Στα αποτελέσματα, φάνηκε ότι τα δείγματα με το μεγαλύτερο οξειδοαναγωγικό

δυναμικό ήταν τα PM1 και αυτό εξηγείται λόγω της περιεκτικότητας τους σε μέταλλα και της μεγάλης ενεργού επιφάνειας τους. Ωστόσο σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η περιεκτικότητα τους σε πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες. Οι PAHs δεν διαθέτουν λειτουργικές ομάδες ικανές να ανάγουν το οξυγόνο και να δημιουργήσουν ελεύθερες ρίζες. Μετά όμως από μετατροπή που οφείλεται ή σε αντιδράσεις καύσης ή σε διάφορες αντιδράσεις στην ατμόσφαιρα είτε σε βιοχημικές αντιδράσεις *in vivo*, αποκτούν οξειδοαναγωγικά ενεργές ομάδες (Ntziachristos et al., 2007). Ένα παράδειγμα είναι η μετατροπή των PAHs σε κινόνες (benzo[a]pyren-quinone) (Sun et al., 1984).

### 3.1.5 Συμπεράσματα

Στην συγκεκριμένη *in vitro* μελέτη διερευνήθηκαν οι βιολογικές επιπτώσεις των τριών κλασμάτων σωματιδίων σε καρκινικά πνευμονικά κύτταρα A549. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν πως όλα τα κλάσματα σωματιδίων είναι ικανά να προκαλέσουν κυτταροτοξικά φαινόμενα καθώς επίσης και να ενεργοποιήσουν τον αποπτωτικό μηχανισμό, με το κλάσμα των PM1 να εμφανίζεται ως το πιο επικίνδυνο για την υγεία. Έγινε ακόμη φανερό, πως η περιεκτικότητα των σωματιδίων σε μέταλλα συσχετίζεται άμεσα με τις τοξικές τους επιδράσεις στα κύτταρα. Παρόλα αυτά, για να εξηγηθεί με σαφήνεια η τοξικότητα των PM θα πρέπει να γίνει συνδυασμός όλων των φυσικοχημικών παραμέτρων συμπεριλαμβανομένης της σύστασης, του μεγέθους, της μάζας και της πηγής προέλευσης. Ακόμη η ποσότητα των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, καθώς μετά από την βιομετατροπή σε κατάλληλα μόρια είναι ικανά να επάγουν το οξειδωτικό στρες.



#### 4. Βιβλιογραφία

- AKHTAR, U. S., RASTOGI, N., MCWHINNEY, R. D., URCH, B., CHOW, C.-W., EVANS, G. J. & SCOTT, J. A. 2014. The combined effects of physicochemical properties of size-fractionated ambient particulate matter on in vitro toxicity in human A549 lung epithelial cells. *Toxicology Reports*, 1, 145-156.
- ARGYROPOULOS, G., BESIS, A., VOUTSA, D., SAMARA, C., SOWLAT, M. H., HASHEMINASSAB, S. & SIOUTAS, C. 2016. Source apportionment of the redox activity of urban quasi-ultrafine particles (PM<sub>0.49</sub>) in Thessaloniki following the increased biomass burning due to the economic crisis in Greece. *Science of The Total Environment*, 568, 124-136.
- BEELEN ROB, HOEK GERARD, VAN DEN BRANDT PIET A., GOLDBOHM R ALEXANDRA, FISCHER PAUL, SCHOUTEN LEO J., ARMSTRONG BEN & BERT, B. 2008. Long-Term Exposure to Traffic-Related Air Pollution and Lung Cancer Risk. *Epidemiology*, 19, 702-710.
- CHANCE, B., SIES, H. & BOVERIS, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59, 527-605.
- CIRCU, M. L. & AW, T. Y. 2010. REACTIVE OXYGEN SPECIES, CELLULAR REDOX SYSTEMS AND APOPTOSIS. *Free radical biology & medicine*, 48, 749-762.
- CLAXTON, L. D. & WOODALL JR, G. M. 2007. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 636, 36-94.
- DUFFIN, R., TRAN, C. L., CLOUTER, A., BROWN, D. M., MACNEE, W., STONE, V. & DONALDSON, K. 2002. The Importance of Surface Area and Specific Reactivity in the Acute Pulmonary Inflammatory Response to Particles. *Annals of Occupational Hygiene*, 46, 242-245.
- EPA. 2016. *Particulate Matter (PM) Basics* [Online]. Available: <https://www.epa.gov/pm-pollution/particulate-matter-pm-basics#PM> [Accessed].
- FRIEDBERG, E. C. 2001. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*, 1, 22-33.
- GHIO, A. J., RICHARDS, J. H., CARTER, J. D. & MADDEN, M. C. 2000. Accumulation of iron in the rat lung after tracheal instillation of diesel particles. *Toxicol Pathol*, 28, 619-27.
- GIARD, D. J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., ARNSTEIN, P., KERSEY, J. H., DOSIK, H. & PARKS, W. P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51, 1417-23.
- GUENGERICH, F. P. & SHIMADA, T. 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology*, 4, 391-407.
- HAMMERMAN PS, HAYES DN, MD, W. & 2012. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489, 519-525.
- HAN, J.-Y., TAKESHITA, K. & UTSUMI, H. 2001. Noninvasive detection of hydroxyl radical generation in lung by diesel exhaust particles. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 516-525.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, ROBERT A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 646-674.
- HEFLAND, R. B., SCHWARZEL, P. E., JOHANSEN, B. V., MYRAN, T., UTHUS, N. & REFSNES, M. 2001. Silica-induced cytokine release from A549 cells:



- importance of surface area versus size. *Human & Experimental Toxicology*, 20, 46-55.
- HIGGINS, I. T. 1976. Epidemiological evidence on the carcinogenic risk of air pollution. *IARC Sci Publ*, 41-52.
- IARC Agents Classified by the IARC Monographs. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.
- JENKINS, R. R. 1988. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*, 5, 156-70.
- JONES, P. A. & BAYLIN, S. B. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3, 415-28.
- LIM, S. S. & VOS, T. 2012. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990&#x2013;2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380, 2224-2260.
- MANOLI, E., VOUTSA, D. & SAMARA, C. 2002. Chemical characterization and source identification/apportionment of fine and coarse air particles in Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment*, 36, 949-961.
- MCWHINNEY, R. D., RASTOGI, N., URCH, B., SILVERMAN, F., BROOK, J. R., EVANS, G. J. & ABBATT, J. P. D. 2012. Characterization of the University of Toronto Concentrated Aerosol Particle Exposure Facility (CAPEF)—Effects on Fine and Ultrafine Nonrefractory Aerosol Composition. *Aerosol Science and Technology*, 46, 697-707.
- MENG, X., MA, Y., CHEN, R., ZHOU, Z., CHEN, B. & KAN, H. 2013. Size-fractionated particle number concentrations and daily mortality in a Chinese city. *Environ Health Perspect*, 121, 1174-8.
- MILLER, E. C. & MILLER, J. A. 1981. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer*, 47, 1055-64.
- NTZIACHRISTOS, L., FROINES, J. R., CHO, A. K. & SIOUTAS, C. 2007. Relationship between redox activity and chemical speciation of size-fractionated particulate matter. *Particle and Fibre Toxicology*, 4, 5-5.
- PERSHAGEN, G. 1990. Air pollution and cancer. *IARC Sci Publ*, 240-51.
- RAASCHOU-NIELSEN, O., ANDERSEN, Z. J., HVIDBERG, M., JENSEN, S. S., KETZEL, M., SØRENSEN, M., HANSEN, J., LOFT, S., OVERVAD, K. & TJØNNELAND, A. 2011. Air pollution from traffic and cancer incidence: a Danish cohort study. *Environmental Health*, 10, 1-11.
- RASTOGI, N., MCWHINNEY, R. D., AKHTAR, U. S., URCH, B., FILA, M., ABBATT, J. P. D., SCOTT, J. A., SILVERMAN, F. S., BROOK, J. R. & EVANS, G. J. 2012. Physical Characterization of the University of Toronto Coarse, Fine, and Ultrafine High-Volume Particle Concentrator Systems. *Aerosol Science and Technology*, 46, 1015-1024.
- REHBEIN, P. J. G., JEONG, C.-H., MCGUIRE, M. L. & EVANS, G. J. 2012. Strategies to Enhance the Interpretation of Single-Particle Ambient Aerosol Data. *Aerosol Science and Technology*, 46, 584-595.
- SARIGIANNIS, D. A., KARAKITSIOS, S. P., ZIKOPOULOS, D., NIKOLAKI, S. & KERMENIDOU, M. 2015. Lung cancer risk from PAHs emitted from biomass combustion. *Environmental Research*, 137, 147-156.
- SHAUGHNESSY, W. J., VENIGALLA, M. M. & TRUMP, D. 2015. Health effects of ambient levels of respirable particulate matter (PM) on healthy, young-adult population. *Atmospheric Environment*, 123, Part A, 102-111.

- STRAIF K., C. A., SAMET J. 2013. Air pollution and cancer *IARC Scientific Publications*, 161.
- SUN, J. D., WOLFF, R. K., KANAPILLY, G. M. & MCCLELLAN, R. O. 1984. Lung retention and metabolic fate of inhaled benzo(a)pyrene associated with diesel exhaust particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 73, 48-59.
- THORPE, A. & HARRISON, R. M. 2008. Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic: A review. *Science of The Total Environment*, 400, 270-282.
- TURNER, M. C., KREWSKI, D., POPE, C. A., CHEN, Y., GAPSTUR, S. M. & THUN, M. J. 2011. Long-term Ambient Fine Particulate Matter Air Pollution and Lung Cancer in a Large Cohort of Never-Smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184, 1374-1381.
- VIBHA RANI & YADAV, U. C. S. 2015. *Free Radicals in Human Health and Disease*, Springer India.
- WARK KENNETH, WARNER F. CECIL & DAVIS, W. T. 1998. *Air Pollution: it's origin and control*.
- WATSON G. JOHN, CHOW JUDITH, MOONSMULLER HANS, GREEN MARK, FRANK NEIL & MARC, P. 1998. *Guidance for using continuous monitors in PM25 monitoring networks*.
- YU, Z., CHEN, J., FORD, B. N., BRACKLEY, M. E. & GLICKMAN, B. W. 1999. Human DNA repair systems: an overview. *Environ Mol Mutagen*, 33, 3-20.
- ΓΑΛΑΡΗΣ, Δ. 2001. *Ελεύθερες ρίζες: χημεία-βιοχημεία*, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ,  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
- ΓΑΝΤΕΚΑΚΗΣ Ι. 1999. *Ατμοσφαιρική Ρύπανση*
- ΜΠΟΝΙΟΣ Μ., ΡΕΠΑΣΟΣ Ε., ΠΟΥΛΟΥ Μ., ΜΕΛΕΞΟΠΟΥΛΟΥ Χ. & Μ., Π. 2007. *Χημική Καρκινογένεση Κλινική Παθολογία*.
- ΡΑΨΟΜΑΝΙΚΗΣ Σ. & ΚΑΣΤΡΙΝΑΚΗΣ Ε. 2009. *Βασικές αρχές αντιρρυπαντικής τεχνολογίας ατμοσφαιρικών ρυπών*.
- ΦΥΤΙΑΝΟΣ Κ. & ΣΑΜΑΡΑ-ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ Κ. 2009. *Χημεία Περιβάλλοντος*.