

Słowa kluczowe: WWA, TNF- α , komórki płuc

Anna CZARNY*, Ewa ZACZYŃSKA*, Anna JANICKA**,
Włodzimierz SZCZEPANIAK**, Wojciech WALKOWIAK***

WPLYW WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH NA PRODUKCJĘ TNF- α PRZEZ LUDZKIE KOMÓRKI PŁUC, *in vitro*

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne są odpowiedzialne za ostre i przewlekłe reakcje alergiczne dróg oddechowych. Komórki nabłonkowe układu oddechowego odpowiadają na zanieczyszczenia powietrza produkcją cytokin zaangażowanych w reakcje zapalne płuc. Czynniki nekrozy guza (TNFs), cytokiny plejotropowe, odgrywają kluczową rolę w systemie obronnym gospodarza jak również w procesach immunopatologicznych. Nasze badania dotyczyły określenia ilości i składu WWA w gazach emitowanych w czasie pracy silnika samochodowego, określenia cytotoksyczności *in vitro* na standardowych liniach komórkowych: ludzkiej A549 oraz mysiej L929. Zawartość WWA w spalinach emitowanych przez silnik na biegu jałowym wynosiła 0,12912 [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$], a w spalinach silnika obciążonego 0,10680 [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]. Roztwory ekstraktów WWA (50%) nie były toksyczne dla komórek. Mieszaniny WWA indukowały produkcję przez ludzkie komórki płuc A549 niewielkich ale znamienne wyższych ilości TNF- α w porównaniu do komórek nie traktowanych WWA. Komórki traktowane ekstraktem WWA uzyskanym z gazów emitowanych przez silnik obciążony, produkowały większe ilości TNF- α , mimo mniejszej zawartości WWA w tych gazach. Badania nasze mogą przyczynić się do konstrukcji nowych typów silników, opracowania lepszych paliw oraz do wprowadzenia nowej, bardziej skutecznej terapii wielu schorzeń układu oddechowego.

1. WSTĘP

Mieszkańcy dużych aglomeracji miejskich są narażeni na działanie zanieczyszczeń powietrza i związane z tym ryzyko wielu chorób. Pojazdy samochodowe emitują zanieczyszczenia zawierające cząsteczki stałe (PM) oraz niebezpieczne wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), występujące zarówno w postaci zaadsorbowanej na cząstkach pyłu jak i w formie gazowej. WWA stanowią liczną grupę związków zawierających od dwóch do kilku, a nawet kilkunastu pierścieni aromatycznych w cząsteczce. Wdychane do płuc spaliny wywołują reakcje immunologiczne prowadząc do wielu schorzeń zarówno układu oddechowego, jaki i krążenia.

* Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, PAN, Wrocław

** Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wrocławska, Wrocław

*** Zakład Pojazdów Samochodowych i Silników Spalinowych, Politechnika Wrocławska, Wrocław, czarny@iitd.pan.wroc.pl

Wiadomo, że substancje znajdujące się w spalinach stymulują produkcję licznych mediatorów reakcji immunologicznej, związanych z ostrymi lub przewlekłymi chorobami alergicznymi dróg oddechowych. Komórki nabłonkowe dróg oddechowych są pierwszą linią obrony przed działaniem substancji chemicznych oraz drobnoustrojów znajdujących się w powietrzu [1,15]. Zanieczyszczenia powietrza, między innymi WWA stymulują komórki do produkcji mediatorów reakcji immunologicznej wśród nich cytokin [5,14]. Białka te odpowiadają za regulację szeregu procesów i funkcji całą serią cytotoksycznych reakcji, takich jak produkcja czynników związanych z procesem zapalnym [2,3]. Czynniki nekrozy guza (tumor necrosis factor- α , TNF- α) jest plejotropową cytokiną odgrywającą ważną rolę w zjawiskach patologicznych oraz obronnych organizmu.

Czynnik ten stymuluje komórki nabłonkowe do wydzielania innych cytokin, pobudzających napływ i aktywację komórek zapalnych [4]. Podwyższony poziom TNF- α ma znaczenie w zabezpieczeniu organizmu przed drobnoustrojami i ograniczeniu infekcji. W silnych reakcjach zapalnych ten mediator wywołuje gorączkę, szok toksyczny i odgrywa krytyczną rolę w niszczeniu tkanek gospodarza [15].

W naszych wcześniejszych badaniach *in vitro*, wykazaliśmy, że miejskie zanieczyszczenia indukowały w ludzkich komórkach płuc syntezę interferonu (IFN- γ) oraz tlenków azotu, niektórych mediatorów związanych z reakcją zapalną [5]. Obecne badania koncentrowały się na określeniu *in vitro*, poziomu TNF- α produkowanego przez ludzkie komórki płuc linii A549 traktowane nietoksycznym stężeniem oczyszczonych i scharakteryzowanych pod względem chemicznym WWA ekstrahowanych ze spalin samochodowych.

2. MATERIAŁY I METODY

Pobór próbek spalin. Do badań wykorzystano silnik doświadczalny VW 1,9. Silnik pracował w dwóch charakterystycznych stanach: bez obciążenia (na biegu jałowym) oraz z obciążeniem 30Nm. Zestaw do poboru prób gazów spalinowych składał się z sorbentu (rurki z węglem aktywnym typu SKC-lot 120) oraz filtra z włókna szklanego (Staplex TF AGF 810). Pobór odbywał się dwustopniowo.

Ekstrakcja WWA. Ekstrakcja WWA zaadsorbowanych na węglu aktywnym odbywała się za pomocą chlorku metylenu w łaźni ultradźwiękowej. W celu oczyszczenia ekstraktu z substancji przeszkadzających zastosowano metodę SPE – technikę ekstrakcji do fazy stałej (Solid Phase Extraction).

Skład WWA. Analizę chromatograficzną prowadzono na chromatografie gazowej Hewlett-Packard 5890, z detektorem płomieniowo jonizacyjnym, umożliwiającym ilościowe i jakościowe oznaczanie zaadsorbowanych WWA. Stężenia poszczególnych WWA w próbkach określano na podstawie

krzywej standardowej poszczególnych związków, ustalonej w tych samych warunkach.

Oznaczenie cytotoksyczności WWA. W doświadczeniach użyto ludzkiej linii komórek nabłonkopodobnych płuc A549 ATCC CCL 185 oraz mysiej fibroblastycznej L929CCL1 [8]. Cytotoksyczność badanych materiałów określano na płytkach plastikowych 96 dołkowych, metodą **MTT**.

Oznaczenie aktywności TNF- α . Poziom TNF- α w nadsączach znad komórek traktowanych WWA wg procedury załączonej do komercyjnego testu firmy PharMingen (USA).

Analiza statystyczna. Wyniki analizowano przy użyciu testu t-studenta, wartości $p < 0,05$ przyjęto jako statystycznie istotne.

3. WYNIKI

Analiza WWA. Stężenie WWA w gazach spalinowych emitowanych przez silnik na biegu jałowym (silnik nieobciążony) było wyższe i wynosiło $0,12912 \text{ } [\mu\text{g}/\text{dm}^3]$. W próbkach tych wykryto: fluoranten (54%) fenantren (28%), fluoren (9%) acenaftylen (5%) i acenaften (4%). Gdy silnik pracował z zadaniem obciążeniem (30Nm) ilość WWA wynosiła $0,10680 \text{ } [\mu\text{g}/\text{dm}^3]$ i stwierdzono obecność fenantrenu (51%) acenaftenu (30%), fluorenu (9%) oraz acenaftyleny i fluorantenu (po 5%).

Cytotoksyczność roztworów WWA. Mieszanina WWA otrzymana ze spalin emitowanych przez silnik bez obciążenia nie była toksyczna dla komórek. Natomiast WWA znajdujące się w gazach powstających w trakcie pracy silnika obciążonego były w niewielkim stopniu toksyczne zarówno dla ludzkich komórek płuc linii A549 jak i mysich komórek fibroblastycznych, linii L929.

Poziom TNF- α . Okazało się, że ludzkie komórki płuc linii A549 inkubowane przez 24 godziny z $10 \mu\text{l}$ roztworów mieszaniny WWA produkowały większe ilości tej cytokiny w porównaniu do komórek nie traktowanych WWA. Poziom TNF- α wytwarzanego przez komórki poddane działaniu przez 24 godziny, nietoksycznego stężenia WWA pochodzących z gazów silnika nieobciążonego jak i obciążonego był niski, jednak znacząco wyższy w porównaniu do kontroli $6,1 \text{ pg/ml}$ (i odpowiednio $8,3 \text{ pg/ml}$ $p > 0,0003$, $17,4 \text{ pg/ml}$ $p > 0,0009$). Synteza TNF- α w komórkach inkubowanych z mieszaniną WWA emitowanych przez silnik obciążony, była wyższa niż w komórkach traktowanych próbkami WWA z gazów z silnika nieobciążonego, różnica ta była znamienna statystycznie, $p > 0,0018$. Być może większa zawartość fenantrenu i acenaftenu w próbkach WWA emitowanych przez silnik obciążony wpływała na zwiększoną produkcję TNF. Po 48 godzinach inkubacji komórek A549 z mieszaniną WWA synteza TNF- α była prawie o połowę niższa we wszystkich badanych próbkach w porównaniu do produkcji tej cytokiny po 24 godzinach, ale nadal utrzymywała się różnica w poziomie tej cytokiny między komórkami

traktowanymi badanymi próbkami. Komórki hodowane w obecności roztworu WWA emitowanych przez silnik nieobciążony produkowały podobne ilości TNF jak komórki kontrolne (3,7 pg/ml). W nadsączach znad komórek inkubowanych z mieszaniną WWA z silnika obciążonego był wyższy poziom TNF- α (7,9pg/ml) niż w kontroli. Różnica ta była istotna statystycznie $p > 0,001$.

4. DYSKUSJA

Z danych epidemiologicznych wynika, że ekspozycja na zanieczyszczenia powietrza jest przyczyną wielu schorzeń, jak nowotwory płuc, astma, oraz choroby układu krążenia [3,7,8,9,10]. Jednak wpływ tych zanieczyszczeń na układ immunologiczny jest słabiej poznany, tym bardziej, że narażenie na działanie zanieczyszczeń powietrza rzadko ogranicza się tylko do konkretnych substancji czy nawet do pojedynczych grup związków. Nie zawsze wiadomo, które substancje mają immunogenne działanie. Odpowiedni poziom cytokin, mediatorów reakcji obronnej organizmu ma wpływ na stan zdrowia. Jedną z ważnych cytokin jest TNF- α , odgrywający kluczową rolę w reakcjach zapalnych, które jak się wydaje pełnią ważne funkcje w utrzymaniu homeostazy. Płuca są ekspozowane na wpływ zanieczyszczeń powietrza a makrofagi alweolarne i komórki nabłonkowe stanowią pierwszą linię obrony układu oddechowego przed szkodliwymi substancjami. TNF stymuluje te komórki do wydzielania cytokin zaangażowanych w proces napływania, aktywacji komórek zapalnych i nasilenia reakcji na szkodliwe substancje [11]. W naszych badaniach *in vitro* hodowla komórek nabłonkowych płuc była traktowana mieszaniną kilku wyekstrahowanych i oczyszczonych WWA. Mimo, że ilość WWA w próbkach gazów emitowanych przez silnik na biegu jałowym była większa, mieszanina ta okazała się mniej toksyczna dla komórek zarówno A540 jak i L929. Synteza TNF- α w komórkach A549 stymulowanych mieszaniną z silnika nie obciążonego, o większej zawartości WWA, była znacząco niższa w porównaniu do komórek traktowanych ekstraktem WWA uzyskanych z silnika obciążonego. Ponieważ skład WWA był różny, można podejrzewać, że znacznie większa zawartość fenantrenu w spalinach silnika obciążonego, wpływała na indukcję TNF- α w komórkach A549. Obok fenantrenu także stężenie acenaftenu w tych próbkach było większe, co również mogło mieć znaczenie w stymulacji komórek do produkcji tej cytokiny. Wyniki niektórych autorów wskazują, że spaliny samochodowe hamowały syntezę mediatorów immunologicznych, związanych z obroną przeciwbakteryjną [12]. W naszych badaniach wykazaliśmy, że zanieczyszczenia powietrza umożliwiały wpływały na zwiększenie adhezji bakterii do komórek płuc [13]. Inni autorzy wykazali, że zanieczyszczenia powietrza indukowały syntezę cytokin związanych z reakcjami alergicznymi [14]. Wyjaśnienie roli i mechanizmów działania WWA w stymulacji reakcji komórek może przyczynić się do opracowania skutecznej terapii

schorzeń układu oddechowego i krążenia, opracowania innych mniej szkodliwych rodzajów paliw, a także do konstrukcji nowych typów silników samochodowych.

Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, grant nr N 40405832/1669

LITERATURA

- [1] Auger F., Gendron M.C., Chamot C., Marano F., Dazy A.C. 2006. Responses of well-differentiated nasal epithelial cells exposed to particles: role of the epithelium in airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 215: 285-94.
- [2] Clapp R.W., Jacobs M.M., Loechler EL. 2008. Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007. *Rev Environ Health.*, 23:1-37.
- [3] Cohen A.J., Pope, C.A. 1995. Lung cancer and air pollution. *Environ. Health Perspect.*, 103 Suppl. 8.: 219-224.
- [4] Curfs D..M. J., Knaapen A. M, Pachen D. M. F. A., Gijbels M..J. J., Lutgens E., Smook M. L. F., Kockx M. M., Daemen M.J. A. P., Schooten F. J. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce an inflammatory atherosclerotic plaque phenotype irrespective of their DNA binding properties. *FASEB.*, 19: 1290-2.
- [5] Czarny A., Zaczyńska E., Kołwzan B., Pawelczyk A. 2003. Production of cytokines and nitrate oxide by lung cells treated with air contamination. W: *Chemicals in Sustainable Agriculture. Chemistry for Agriculture*, pod red. Górecki H, Dobrzański Z., Czech-Pol Trade, Prague, Brussels, Stockholm., 4: 503-510.
- [6] Czarny A., Zaczyńska E., Kołwzan B. 2002. Association of slime *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to lung cells with urban air contamination. W: *Chemical products in agriculture and environment chemistry for agriculture*. Ed. Górecki H., Dobrzanski Z.; Prague Brussels, Stockholm.,3: 423-428.
- [7] Imrich A., Ning Y.Y., Koziel H., Coull B., Kobzik L. 1999. Lipopolysaccharide priming amplifies lung macrophage tumor necrosis factor production in response to air particles. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 159: 117-124.
- [8] Lieber M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., Todaro, G. 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer.*, 17: 62-70.
- [9] Salvi, S., Blomberg A., Rudell B, Kelly F., Sandstrom T., Holgate S. T., Frew A. 1999. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 159: 702-709.
- [10] Sanchez, D., Penichet M., Garcia M., Wang M., Saxon A. 1999. Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104: 1183-1188.
- [11] Schober W., Lubitz S., Belloni B., Gebauer G., Lintelmann J., Matuschek G., Weichenmeier I., Eberlein-König B., Buters J., Behrendt H. 2007. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enhance allergic inflammation by acting on human basophils. *Inhal. Toxic.*, 19::151-156.
- [12] Segala, C., Fauroux, B., Just J., Grimfeld, A., Neukirch F. 1998. Short-term effect of winter air pollution on respiratory health of asthmatic children in Paris. *Eur. Respir. J.*, 11: 677-685.
- [13] Yin X.J., Dong C.C., Ma J.Y., Roberts J.R., Antonini J.M., Ma J.K. 2007. Suppression of phagocytic and bactericidal functions of rat alveolar macrophages by the organic component of diesel exhaust particles. *J Toxicol Environ Health A.*, 70: 820-8.

INFLUENCE OF POLYAROMATIC HYDROCARBONS (PAHS) ON TNF- A PRODUCTION
BY HUMAN LUNG CELLS *IN VITRO*

The PAHs are known to modulate the production of cytokines associated with acute and chronic respiratory symptoms and allergic respiratory disease. The epithelial cells constitute the primary targets of inhaled lung toxicants and are therefore particularly important in the induction of cytokines and inflammatory responses in the lung. Tumor necrosis factors (TNFs) are pleiotropic cytokines that play important roles in host defense or immunopathological processes. In this study we determined of PAHs concentration in diesel exhaust and investigated *in vitro* the toxic effect of purified PAHs solution on human lung cells A549 and mouse fibroblast cells L929. The PAHs concentration in exhaust from idle engine was 0,12912 [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$], load engine 0,10680 [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]. Solutions of PAHs (50%) were not toxic for human and mouse cells. The PAHs induced, low levels of TNF- α in human lung cells A549, but statistically higher than in control. The TNF- α production was higher when cells were treated with load engine PAHs.