

mgr farm. Monika Jankowska-Kiełtyka

**Badania nad wpływem pyłowych zanieczyszczeń powietrza  
na progresję zaburzeń neurodegeneracyjnych  
o podłożu autoimmunologicznym: badania *in vitro* i *in vivo*  
w mysim modelu eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia  
mózgu i rdzenia (EAE)**

**Research on the influence of air pollution on the progression of  
neurodegenerative disorders with an autoimmune background: *in vitro* and  
*in vivo* studies in a mouse model of experimental autoimmune  
encephalomyelitis (EAE)**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii Mózgu  
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, Kraków

Promotor  
prof. dr hab. n. med. Irena Nalepa  
Promotor pomocniczy  
dr n. biol. Adam Roman

## **STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM**

Ekspozycja na zwiększone stężenie cząstek pyłu zawieszonego (*ang. particulate matter, PM*) w zanieczyszczonym powietrzu jest uważana za istotny czynnik ryzyka dla zdrowia człowieka. Zagadnienie to jest przedmiotem dużego zainteresowania środowiska naukowego i opinii publicznej z racji powszechnego przekonania o powiązaniu narażenia na PM z rozwojem choróbkojarzonych ze wzrostem uprzemysłowienia i rozwoju cywilizacyjnego. Coraz liczniejsze doniesienia literaturowe wskazują na potrzebę uzupełnienia luki w wiedzy na temat związku pomiędzy ekspozycją na PM a zapadalnością lub pogorszeniem przebiegu chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych, w tym stwardnienia rozsianego, w które obok licznych znanych czynników sprawczych autoimmunizacji, środowiskowe zanieczyszczenie powietrza może być także istotnie zaangażowane. Wśród potencjalnych mechanizmów leżących u podstaw szkodliwego wpływu cząstek PM w kontekście etiologii chorób neurodegeneracyjnych postulowane są te same mechanizmy, które uważane są za kluczowe także w procesie neurodegeneracji. Mieszanina cząstek zanieczyszczeń powietrza charakteryzuje się ogromną zmiennością i różnorodnością składu chemicznego i właściwości fizycznych oraz rodzajem możliwych wywoływanych efektów. Pomimo wieloaspektowego negatywnego wpływu tzw. smogu na organizm ludzki,

charakter i nasilenie wywoływanych skutków (zwłaszcza słabiej zbadanej długotrwałej ekspozycji) oraz rola wybranych składowych PM (zwłaszcza słabiej zbadanej komponenty nieorganicznej) to zagadnienia wciąż otwarte i wymagające wyjaśnienia. Niezadowalająca jakość powietrza i wciąż niewystarczająca wiedza na temat toksyczności PM, wymagają podejmowania działań zmierzających do ograniczenia emisji i prowadzenia intensywnych badań naukowych dotyczących poznania ich biologicznego oddziaływania, także w kontekście zaangażowania w procesy neurodegeneracyjne i autoimmunologiczne.

Celem pracy było określenie wpływu ekspozycji na pyłowe zanieczyszczenia powietrza na procesy zapalne i oksydacyjne w wybranych liniach komórkowych pochodzących z tkanek potencjalnie zaangażowanych w patomechanizmy stwardnienia rozsianego oraz wpływu na progresję zaburzeń neurodegeneracyjnych o podłożu autoimmunologicznym w mysim modelu eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE).

Zbadano wpływ PM *in vitro* na odpowiedź metaboliczną, procesy zapalne i oksydacyjne komórek pochodzenia makrofagalnego, neuronalnego i glejowego w oparciu o ocenę żywotności i śmiertelności komórek, aktywności metabolicznej i liczby komórek, ocenę syntezy wolnych rodników tlenowych i uwalniania tlenku azotu II (NO) oraz analizę zmian ekspresji genów wybranej linii komórkowej. Dalej, zbadano wpływ ekspozycji na cztery wybrane frakcje PM jako składowe materiału zanieczyszczeń powietrza, na wybrane parametry behawioru oraz odpowiedzi immunologicznej *ex vivo* i *in vivo* u zdrowych myszy. Ocenie podlegały takie parametry jak przyrost masy ciała, funkcje motoryczne, zachowania lękowe i parametry odpowiedzi zapalnej. Kolejno, dokonano implementacji mysiego modelu EAE wraz z charakterystyką kinetyki modelu o łagodnym przebiegu, tak by umożliwić zbadanie wpływu ekspozycji na pył zawieszony o obniżonej zawartości materii organicznej (LAp120) na behawioralne i biochemiczne parametry autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia u myszy. Określono wpływ na zapadalność i nasilenia objawów EAE, wybrane parametry układu odpornościowego i odpowiedzi prozapalnej, przyrost masy ciała oraz funkcje motoryczne.

Zaobserwowano, że zarówno ekspozycja na NIST1648a, jak i LAp120 negatywnie wpływa na parametry żywotności i aktywności metabolicznej komórek linii makrofagalnej i neuronalnej oraz hodowli pierwotnych mieszanych gleju czyli mikrogleju, astrocytów i oligodendrocytów, ze względu na zwiększone wytwarzanie ROS. Ten negatywny wpływ PM jest zależny od stężenia oraz czasu ekspozycji. Ponadto, LAp120 wywiera przeważanie silniejszy efekt niż NIST1648a w tych samych stężeniach i punktach czasowych, co może być

związane z wyższą zawartością metali oraz interakcjami między niektórymi organicznymi składnikami i metalami, a przez to silniejszą zdolnością do indukcji wolnych rodników i stresu oksydacyjnego. NIST1648a powoduje znacznie silniejszą, niż ekspozycja na LAp120, aktywację genów związanych z programową śmiercią komórkową i w odróżnieniu do LAp120, stymuluje aktywność prozapalną.

Narażenie zdrowych zwierząt na każdy z badanych materiałów PM powoduje zmniejszenie przyrostu masy ciała, nasilenie aktywności lokomotorycznej i zachowań lękowych, zaburzenie chodu oraz zmiany immunologiczne w OUN i obwodowo, jednak nasilenie tych zmian i zaangażowane mechanizmy wydają się być zróżnicowane. Podobnie, ekspozycja zdrowych zwierząt na każdą z badanych składowych PM powoduje widoczne zmiany w profilu wydzielanych mediatorów ścieżki zapalnej. Dodatkowo, zaobserwowane zmiany po ekspozycji na SiO<sub>2</sub>, NIST1648a i LAp120 w postaci aktywacji mikrogleju i zmienionej ekspresji enzymów szlaków metabolizmu argininy świadczą o dysregulacji układu cytokin i o pojawiającej się tendencji prozapalnej. Nieoczekiwanie, ekspozycja na SiO<sub>2</sub> - materiał uważany za mało reaktywny chemicznie - wywiera bardzo wyraźny negatywny wpływ na badane parametry biochemiczne i behawioralne.

Ponadto w pracy wykazano, że ekspozycja na LAp120 nie wpływa na zapadalność oraz nasilenie objawów modelu EAE, na parametry statusu oksydoredukcyjnego oraz na funkcjonowanie układu odpornościowego. Ekspozycja na LAp120 wydaje się stymulować nieswoiste procesy zapalne i niespecyficzne reakcje immunologiczne, co przejawia się jako nasilenie owrzodzenia w miejscu podania adiuwantu w celu wywołania EAE. Ekspozycja na LAp120 u chorych myszy nie wywołuje wyraźnych różnic w zakresie regulacji stanu zapalnego.

Podsumowując, pomimo wyraźnego negatywnego oddziaływania PM, zwłaszcza frakcji nieorganicznej, na odpowiedź metaboliczną, procesy zapalne i oksydacyjne komórek wywodzących się z tkanek potencjalnie zaangażowanych w patomechanizmy stwardnienia rozsianego, to jednak ekspozycja na ten materiał zanieczyszczeń powietrza o obniżonej zawartości składników organicznych, nie wpływa na zapadalność oraz nasilenie objawów w modelu tego schorzenia u myszy, czyli EAE. W kwestii kilku wybranych parametrów zachowań lokomotorycznych, ekspozycja na frakcję nieorganiczną wydaje się wykazywać tendencję do łagodzenia negatywnych skutków modelu. U zdrowych myszy, niektóre skutki ekspozycji na składowe PM są wyraźniej zaznaczone po krótszym okresie inhalacji, ulegając obniżeniu lub zanikowi wraz z czasem, co sugeruje występowanie mechanizmów adaptacji. Biologiczne oddziaływanie PM, który stanowi złożoną mieszaninę wielu składników, różni

się od efektów ekspozycji na poszczególne frakcje wdychane oddzielnie ze względu na możliwe interakcje synergistyczne i antagonistyczne. Efekt PM nie jest prostą sumą efektów wywieranych przez ekspozycję na jego składowe. Stymulujące lub supresyjne oddziaływanie PM może nasilać niespecyficzne reakcje immunologiczne w ramach zaburzonej immunoregulacji organizmu.

## **STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (SUMMARY)**

Exposure to increased concentrations of particulate matter (PM) in polluted air is considered to be a significant risk factor for human health. This issue is of great interest to the scientific community and public opinion due to the common belief that exposure to PM is related to the development of diseases associated with the increase in industrialization and the development of civilization. More and more literature reports indicate the need to fill the gap in knowledge about the relationship between exposure to PM and the incidence or worsening of autoimmune and neurodegenerative diseases, including multiple sclerosis, in which, in addition to numerous known causative factors of autoimmunity, environmental air pollution may also be significantly involved. Among the potential mechanisms underlying the harmful effect of PM particles in the context of the etiology of neurodegenerative diseases, the same mechanisms are postulated, which are also considered crucial in the process of neurodegeneration. The mixture of air pollutant particles is characterized by great variability and diversity in chemical composition and physical properties, and the type of possible induced effects. Despite the multifaceted negative impact of the so-called smog on the human body, the nature and severity of the effects (especially less studied long-term exposure) and the role of selected components of PM (especially less studied inorganic components) are still open issues that require clarification. Unsatisfactory air quality and still insufficient knowledge about the toxicity of PM require taking actions to reduce emissions and conducting intensive scientific research to understand their biological impact, also in the context of involvement in neurodegenerative and autoimmune processes.

The aim of the study was to determine the effect of exposure to particulate air pollution on inflammatory and oxidative processes in selected cell lines derived from tissues potentially involved in the pathomechanisms of multiple sclerosis and the impact on the progression of autoimmune neurodegenerative disorders in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

The influence of PM in vitro on the metabolic response, inflammatory and oxidative processes of macrophagal, neuronal and glial cells were examined based on the assessment of cell viability and mortality, metabolic activity and number of cells, assessment of the production of reactive oxygen species and the release of nitric oxide II (NO) and the analysis of changes in gene expression of the selected cell line. Further, the effects of exposure to four selected PM fractions as components of air pollutant material on selected behavioral parameters and the ex vivo and in vivo immune response in healthy mice were investigated. Parameters such as weight gain, motor function, anxiety behavior and parameters of the inflammatory response were assessed. Subsequently, the mouse EAE model was implemented along with the kinetics characterization of the mild-course model to allow the study of the effect of exposure to particulate matter with reduced organic matter (LAp120) on the behavioral and biochemical parameters of autoimmune encephalomyelitis in mice. The influence on the incidence and severity of EAE symptoms, selected parameters of the immune system and pro-inflammatory response, on weight gain and motor functions was determined.

It was observed that both NIST1648a and LAp120 exposure negatively affect the parameters of the viability and metabolic activity of macrophagal, neuronal and glial cells due to increased ROS production. This negative effect of PM depends on the concentration and the exposure time. Moreover, LAp120 has a predominantly stronger effect than NIST1648a at the same concentrations and time points which may be related to the higher metal content and interactions between some organic components and metals and thus a stronger ability to induce free radicals synthesis and oxidative stress. NIST1648a causes much stronger activation of genes associated with programmed cell death than LAp120 and, unlike LAp120, it stimulates pro-inflammatory activity. Exposure of healthy animals to each of the tested materials of PM causes a reduction in body weight gain, an increase in locomotor activity and anxiety behavior, a disturbance of gait and immunological changes in the CNS and peripherally, however, the intensity of these changes and the mechanisms involved seem to be varied. Similarly, exposure of healthy animals to each of the tested components of PM causes visible changes in the profile of secreted mediators of the inflammatory pathway.

Additionally, the observed changes after exposure to SiO<sub>2</sub>, NIST1648a and LAp120 in the form of microglia activation and altered expression of arginine metabolism enzymes indicate a dysregulation of the cytokine system and an emerging pro-inflammatory tendency. Surprisingly, exposure to SiO<sub>2</sub> - a material considered to be chemically inert - has a very clear negative impact on the biochemical and behavioral tested parameters. Moreover, the study

showed that exposure to LAP120 did not affect the incidence and severity of symptoms of the EAE model, the parameters of the redox status and the functioning of the immune system.

To sum up, despite the clear negative impact of PM, especially the inorganic fraction, on the metabolic response, inflammatory and oxidative processes of cells originating from tissues potentially involved in the pathomechanisms of multiple sclerosis, exposure to this material of air pollutants with a reduced content of organic components does not affect the incidence and the severity of symptoms in a mouse model of the disease, that is EAE. In terms of a few selected parameters of locomotor behavior, exposure to the inorganic fraction seems to have a tendency to mitigate the negative effects of the model. In healthy mice, some of the effects of exposure to the PM components are more pronounced after a shorter inhalation period, decreasing or disappearing over time, suggesting the presence of adaptation mechanisms. The biological effect of PM, which is a complex mixture of many components, differs from the effects of exposure to individual fractions inhaled separately due to possible synergistic and antagonistic interactions. The PM effect is not the simple sum of the effects of exposure to its components. The stimulating or suppressive effect of PM may exacerbate non-specific immune responses as part of impaired immunoregulation of the organism.