



**Pannon Egyetem
Intézményi Tudományos Diákköri
Konferencia
2023**



**Zárt terű hulladékégetésből származó füstgázok és aeroszolok
toxicitásának vizsgálata**

Készítette: Varga Flóra Judit

Témavezető: Dr. Kakasi Balázs

Mérnöki Kar, MTA-PE Levegőkémia Kutatócsoport, Bio-nanotechnológiai
és Műszaki Kémiai Kutatóintézet

A pályamunka lezárásának dátuma: 2023. 04. 18.

Tartalomjegyzék

Kivonat.....	1
1. Bevezetés.....	2
2. Irodalmi áttekintés.....	3
2.1. A levegőszennyezés és a légköri aeroszolok	3
2.2. A háztartási hulladék illegális elégetésének ökotoxikus hatásai.....	4
2.3. Háztartási hulladékégetésre vonatkozó jogszabályok.....	4
2.4. Aeroszol részecskék egészségre gyakorolt hatásai	5
2.5. Az A549 sejtvonala, mint tesztsejtek.....	6
2.6. A Flow citometria és fluoreszcens festékek.....	8
2.7. Vizsgálható sejtparaméterek és a leggyakrabban alkalmazott citotoxicitási tesztek	10
2.7.1. Flow citometriás festési módszerek	10
2.7.2. ELISA alapú tesztek	12
2.7.3. DNS károsodás (Comet teszt).....	14
3. Célkitűzés.....	15
4. Anyag és módszer	16
4.1. Sejttenyésztés	16
4.2. Mintavétel és Mintaelőkészítés	16
4.3. Flow citometria	18
4.4. Hoechst 33342- propidium-jodid festés – kapuzási stratégia	18
4.5. Statisztika	21
5. Eredmények és értékelésük	22
5.1. Ezüst nanorészecske, mint pozitív kontroll.....	22
5.2. Az egyes hagyományos tüzelőanyagok elégetéséből származó aeroszolok hatása a humán tüdősejtekre.	22

5.3. Az egyes hagyományos tüzelőanyagok és azok műanyagokkal való együttes elégetéséből származó aeroszolok hatása a humán tüdősejtekre.	25
6. Összefoglalás.....	28
Irodalomjegyzék	29
A képek jegyzéke és linkek:	32

Kivonat

Napjaink egyik legsúlyosabb környezeti problémája a levegőszennyezés. Az Európai Unióban szigorú szabályozások vonatkoznak az iparból, a mezőgazdaságból, a különböző erőművekből és a közlekedésből származó káros anyagok levegőbe való kibocsátására, a levegőszennyezéshez azonban jelentősen hozzájárulnak a lakosság által fűtés céljából elégetett tüzelőanyagokból, illetve a tüzelőanyagokkal együtt illegálisan elégetett hulladékból származó szennyezők is. Kifejezetten aktuális a probléma, hiszen a növekvő energiaárak miatt, illetve gondatlanságból adódóan a lakosság egy része hulladékok elégetéséhez folyamodik, ami miatt a toxikus, mutagén és karcinogén anyagok, mint pl. nehézfémek, dioxinok, PAH-ok és PAH-származékok légköri koncentrációja jelentősen megnőhet (Hoffer et al., 2020). A rossz levegőminőség humán egészségügyi hatásának ismeretéhez vizsgálni kell a fentebb említett szennyezők karakterisztikus biológiai hatásait.

Munkám során kontrollált körülmények között egyénileg és együttesen elégetett hagyományos szilárd tüzelőanyag- és hulladékmintákból származó füstgázok egyes frakcióinak lehetséges toxikus hatásait vizsgáltam humán tüdő sejtvonalon.

Céлом megállapítani az egyes füstgáz frakciók cito- és genotoxikus hatásait különböző sejtparaméterek vizsgálatával. A választott sejtparaméterek vizsgálatát flow citometriával, Comet teszttel, illetve különböző ELISA tesztekkel végzem.

Az elvégzett mérések alapján egyelőre az akác és az összes műanyag, azaz PE, PP és PET égéséből eredő 50 mg/l koncentrációjú, aeroszolatot tartalmazó minták mutattak szignifikáns toxicitást a negatív kontrollokhoz képest, tehát citotoxikus hatással voltak a humán A549 sejtekre.

A közeljövőben megvalósításra kerül a még meg nem mért és a megismétlendő minták Flow Citometriás vizsgálata, valamint a fentebb említett tesztek elvégzése.

Kulcsszavak: aeroszol, hulladékégetés, citotoxicitás

1. Bevezetés

A környezetszennyezés mára óriási méreteket öltött a megnövekedett ipari tevékenység, a közlekedés, valamint a növekvő népesség, és annak fogyasztói szemléletéből adódó környezethasználat eredményeképpen. Az ipar, a mezőgazdaság és a lakosság által termelt szennyezők elkerülhetetlenül károsítják a talajt, a természetes és mesterséges vizeket, a levegőt és az élőlényeket egyaránt, azaz a Föld minden szféráját érintik a káros hatások.

Jelen dolgozat a háztartási hulladékok elégetéséből adódó citotoxicitás mértékét hivatott részletesebben taglalni. Az elégetett anyagok szennyező komponensei egészségkárosítóak az élőlényekre nézve. A Pannon Egyetem kutatói korábbi tanulmányukban igazolták a különböző, ellenőrzött körülmények között elégetett műanyag hulladékok ökotoxikológiai hatását (Kováts et al., 2022). Ezért fontos, hogy még átfogóbb képet kapjunk arról, hogy a szennyezők milyen változásokat eredményezhetnek a biológiai szervezetekben, illetve több és egzaktabb információnk legyen az égés során keletkezett vegyületek citotoxikusságáról. Ezekről egyelőre globális és hazai szinten is kevés ismeretünk van, annak ellenére, hogy a háztartási szemétegetés eredményezte levegőszennyezés igen súlyos probléma.

A citotoxicitás vizsgálatok az életképes vagy nem életképes sejtekhez kapcsolódó sejt- vagy anyagcsere-változásokat mutatják ki. A genotoxicitás, a DNS károsító hatás eredményeként fellépő genetikai anyag károsodását jelenti. Ezek vizsgálatára számos, különböző elvek alapján működő tesztrendszer állnak a rendelkezésünkre, melyekhez javaslatok, illetve protokollok tartoznak. Célszerű több sejtparaméter párhuzamos vizsgálatát végezni, hogy részletes ismereteket kapjunk a minta károsító tulajdonságáról.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A levegőszennyezés és a légköri aeroszolok

A Föld légköre a gázfázisú komponensek mellett szilárd és folyékony halmazállapotú részecskéket is tartalmaz. A légköri aeroszol a gáznemű közegben diszpergált szilárd vagy folyadék részecskék együttes rendszere. A jelenlegi környezetkutatás központi témái közé tartozik az aeroszolok légkörre, éghajlatra és egészségre gyakorolt hatása.

A részecskék méretüket tekintve a nanométerestől a néhányszor tíz mikrométeres nagyságrendig terjedő tartományba esnek. Ezek a részecskék befolyásolják a Föld energiaegyensúlyát, a hidrológiai körforgást, az atmoszférikus keringést, valamint az üvegházhatású gázok légköri koncentrációját. Továbbá betegségeket okozhatnak és fokozhatnak. Az elsődleges paraméterek, amelyek meghatározzák az aeroszolok környezeti és egészségügyi hatásait, a koncentrációjuk, a méretük, szerkezetük és kémiai összetételük (Pöschl, 2005).

A levegőben szálló részecskék meghatározóak a biológiai organizmusok, szaporítóanyagok és kórokozók (pollen, baktériumok, vírusok) terjedésében, amelyek légúti, szív- és érrendszeri, fertőző és allergiás betegségek kiváltói vagy fokozói lehetnek (Bernstein et al., 2004).

Az aeroszolatok képződési mechanizmusuk alapján két osztályba lehet csoportosítani: megkülönböztetünk elsődleges aeroszolatokat, melyek közvetlenül a légkörbe bocsátódnak ki különböző forrásokból folyadék vagy szilárd halmazállapotban, a másodlagos részecskék pedig a légkörben keletkeznek gáz fázisú prekursorok magképződésével és kondenzációjával.

A légköri aeroszol részecskék koncentrációja, összetétele és méreteloszlása időben és térben erősen változó. A „részecskék finom frakciója” kifejezés azokra a részecskékre korlátozódik, melyeknek aerodinamikai átmérőjük $1\text{ }\mu\text{m}$ (PM_{10}) vagy $2,5\text{ }\mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$). A légszennyezés-szabályozás szerint néhány esetben azonban a $10\text{ }\mu\text{m}$ -ig (PM_{10}) terjedő részecskék is ebbe a kategóriába sorolandók.

2.2. A háztartási hulladék illegális elégetésének ökotoxikus hatásai

A légszennyezés jelentős forrásává vált a háztartásokban történő hulladékégetés mind a fejlődő, mind a fejlett országokban. A szemétegetés motivációja a hulladékkezelésre, valamint az energiafelhasználásra vonatkozó költségek elkerülése lehet. A szilárd hulladékok elégetésének gyakorlata Európában többnyire tiltott, mégis vannak bizonyítékok arra, hogy a háztartásokban gyakran égetik el az olyan háztartási hulladékokat, mint például műanyag, kezelt fa (OSB, bútorlapok) a tüzelőanyagköltségek csökkentése érdekében. De nemcsak Európában, hanem világméretben is problémát ölt a műanyag égetése, ami tovább eszkalálódhat, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy a műanyagtermelés várhatóan 2050-ig növekedni fog (Geyer et al., 2017).

A szilárd hulladék nyílt égetése során környezeti kockázatot jelentő szennyezőanyagok, például finom részecskék (PM_{2,5}) és korom részecskék kerülnek kibocsátásra. Mára azonban köztudottá vált, hogy különböző hulladékok nyílt égetése jelentős mennyiségű szerves toxikus vegyületet termel (Lemieux et al., 2004).

Kováts és mtsai (2022) vizsgálatai bizonyították, hogy a polipropilén (PP), polisztirol (PS), poliuretán (PU), polietilén (PE) és polivinil-klorid (PVC) műanyag minták eltérő ökotoxicitást mutattak. A fő szennyező anyagok tekintetében a mintákat „PAH-típusú” és „nehézfém-típusú” kategóriákra lehetett osztani. A legnagyobb ökotoxicitást PU és PS minták mutatták, ugyanis a PP vel egyetemben magas PAH-tartalommal rendelkeztek. Ugyanakkor e minták esetében a fitotoxicitási vizsgálat nem adott pozitív eredményt. A PU, PVC, PS és PP égetéséből származó vegyületek genotoxikusnak minősültek. A genotoxicitás erős korrelációban van a kimutatott PAH-vegyületekkel (Kováts et al., 2022).

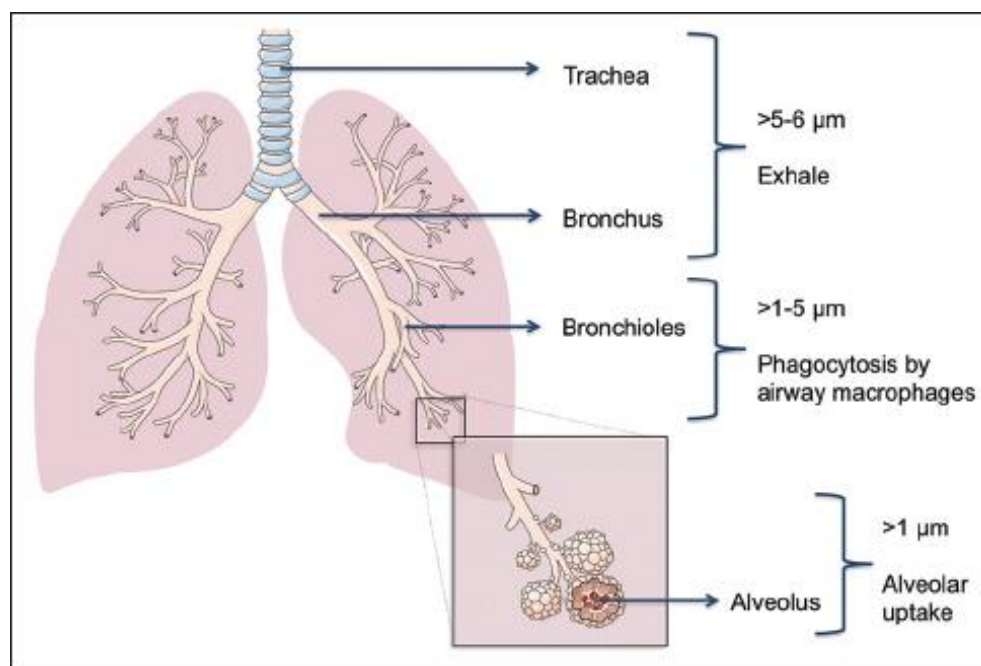
2.3. Háztartási hulladékégetésre vonatkozó jogszabályok

A Magyarországon jelenleg érvényben lévő, háztartási hulladékok égetésére vonatkozó jogszabályt a 306/2010. (XII. 23.), a levegő védelméről szóló Korm. rendelet 27. §-a tartalmazza. *„(1) E § rendelkezéseitől jogszabály eltérően rendelkezhet. (2) Hulladék nyílt téri, vagy a hulladékok égetésének feltételeit rögzítő jogszabályban foglaltaknak nem megfelelő berendezésben történő égetése, a háztartásban keletkező papírhulladék és veszélyesnek nem minősülő, kezeletlen fahulladék háztartási berendezésben történő égetése kivételével tilos. Nyílt téri hulladékégetésnek minősül, ha a hulladék az elemi kár kivételével bármilyen okból kigyullad.”*

2.4. Aeroszol részecskék egészségre gyakorolt hatásai

Az emberi szervezet rendkívül áteresztő hámja a tüdő alveoláris hámja. A káros hatás kockázata függ a részecskék anyagi minőségétől, méretétől, a tüdőben való tartózkodási idejétől. Toxikológiai vizsgálatokhoz sejtes vizsgálatok is alkalmazhatók. Fontos azonban tudni, hogy a sejtes vizsgálatok eredményei nem reprezentálják a teljes szervi működéseket, illetve az esetleges diszfunkciókat. Az állatmodellek sem tudják utánozni a humán expozíciót, azonban az ezekből származó adatokat és az azonosított sejtmechanizmusokból származó adatokat kombinálva megjósolhatók a belélegzett részecskék szisztémás hatásai.

Az aeroszolok egészségre gyakorolt káros hatásainak tanulmányozásakor fontos kiemelni a 10 μm és a 2,5 μm alatti mérettartományokat, ugyanis előbbi a tüdő hörgőibe, utóbbi pedig a hörgőcskékbe és léghólyagocskákba is képes bejutni (1. ábra).

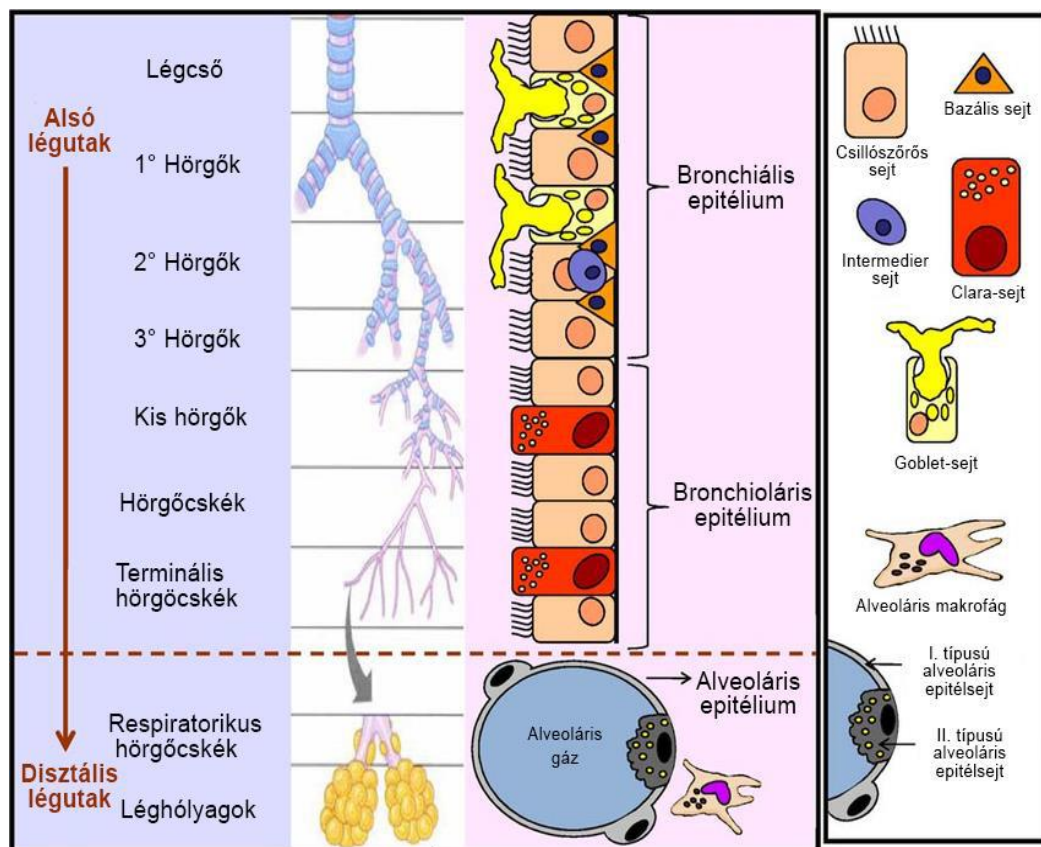


1. ábra: A tüdőbe kerülő mikro-/nanorészecskék méretfüggő lerakódását bemutató vázlatos ábra¹

Az aeroszol részecskék nagy része abszorbeálja a levegő nedvességtartalmát, így vízben oldható, mérgező anyagokat juttathat a tüdőbe, melyek a sejtek oxido-redukációs állapotának megváltozásának eredményeként fellépő oxidatív stresszt okoznak. (Fröhlich & Salar-Behzadi, 2014; Ren-Jian et al., 2012)

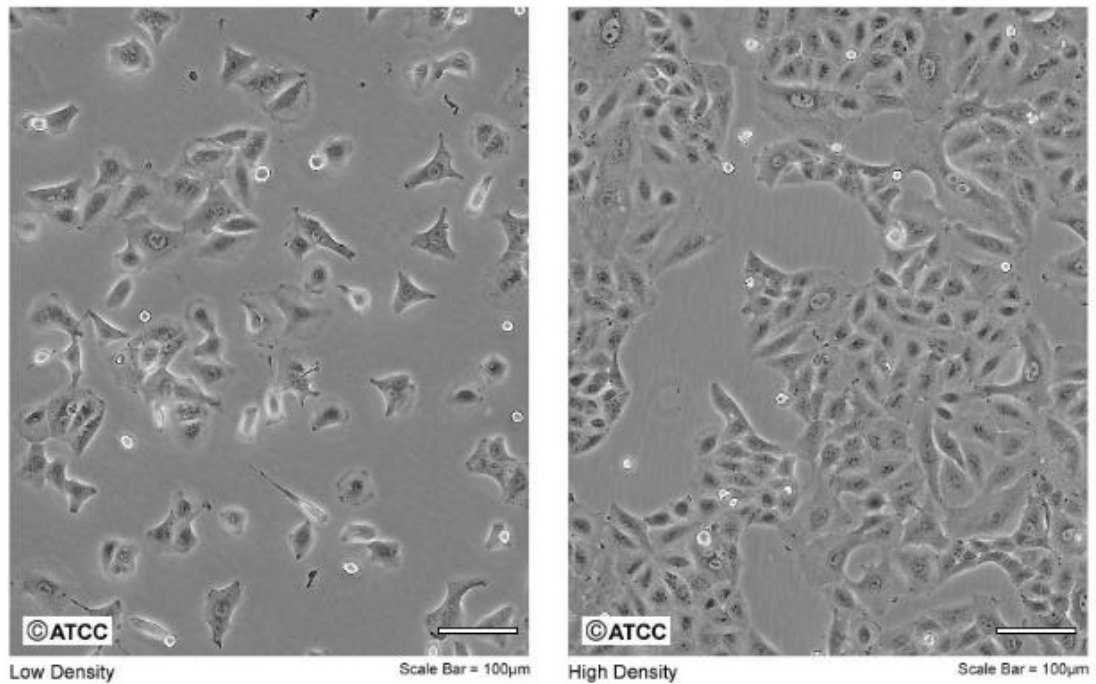
2.5. Az A549 sejtvonal, mint tesztsejtek

Mind alapkutatásokban, mind gyógyszerkutatásokban a tüdőszövet modellezésére leggyakrabban használt tüdőrák sejtvonala az FDA által tesztelt és jóváhagyott A549, mely aeroszol toxikológiai vizsgálatoknál is ideális. Ezt a sejtvonalat először D. J. Giard és munkatársai fejlesztették ki egy 58 éves kaukázusi férfi tumorából származó tüdőrákszövet eltávolításával és tenyésztésével 1972-ben (Giard et al., 1973). Ez a sejtvonala hipotriploid adenocarcinoma alveoláris bazális epitelsejtekből áll (1. ábra) és a disztális légutakban helyezkedik el (2. ábra). Morfológiájukat tekintve az A549 sejtek laphám jellegűek. Funkciójukat illetően felelősek a víz és az elektrolitok diffúziójáért az alveolusokban, képesek lecitint szintetizálni és nagy arányban tartalmaznak zsírsavakat, amik a membrán foszfolipidek fenntartásáért felelősek².



2. ábra: Az alsó légutak felépítése és sejtípusai³

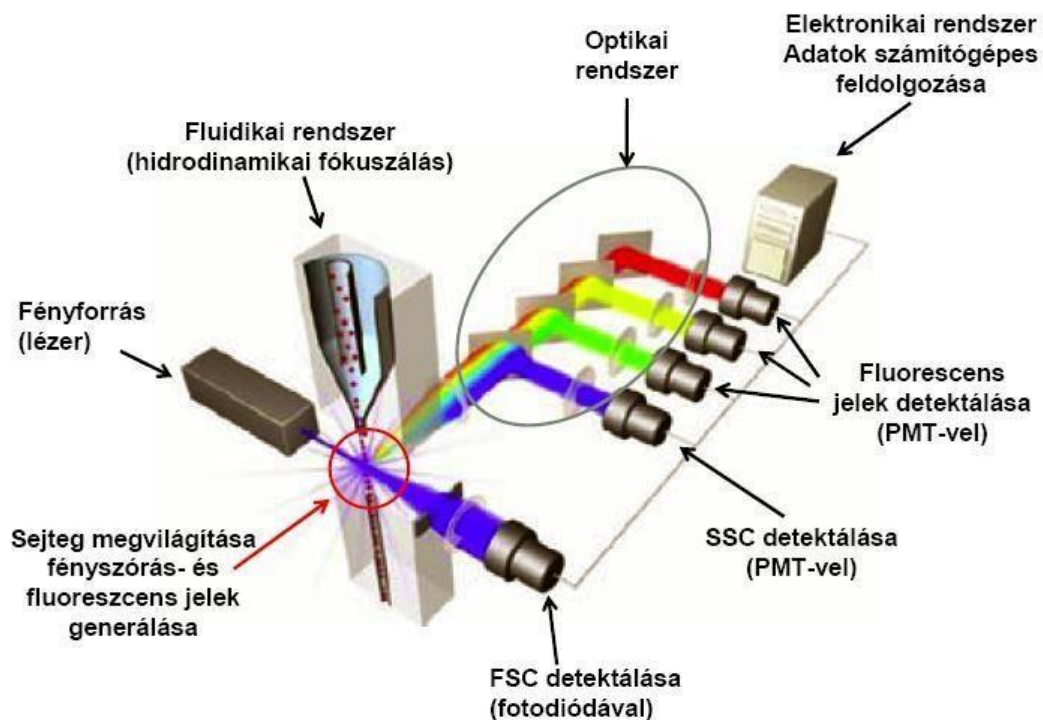
ATCC Number: **CCL-185**
Designation: **A-549**



3. ábra: Fáziskontrasztos mikroszkópos felvételek hagyományos 2D tenyészfűlkában
növesztett A549 sejtekről. A képek alacsony (balra) és magas (jobbra) konfluenciában
lévő sejteket mutatnak. Méreűsávok: 100 µm⁴

2.6. A Flow citometria és fluoreszcens festékek

A Flow (áramlási) citometria (FCM) egy olyan technológia, amely lehetővé teszi a sejtek és más mikroszkopikus részecskék számolását és egyenkénti vizsgálatát, ugyanis a sejtek tulajdonságai alapján különböző sejtpopulációk különíthetők el. Áramlási citometriás vizsgálatokat fejlesztettek ki a celluláris jellemzők, például a méret, a membránpotenciál, az intracelluláris pH, valamint a sejtkomponensek, például a DNS, különböző fehérjék, a felszíni receptorok és a kalcium szintjének meghatározására. A folyadékáramba szuszpendált sejtek egy elektronikus észlelő rendszeren, az úgynevezett áramlási cellán haladnak át a hidrodinamikai fókuszálás elve szerint. A cellán keresztülhaladó sejtet monokromatikus fény világítja meg, az emittált fényt pedig a készülék egy optikai rendszer segítségével, fotoelektron-sokszorozókkal detektálja (4. ábra). A detektorok megkülönböztetik a sejtekről előre irányuló fényszórás (FSC, Forward Scatter), a 90°-ban oldalra szórt (SSC, Side Scatter), illetve a különböző hullámhossz tartományba eső fény intenzitását. A mért paraméterek tehát a fluoreszcens- és fényszórás. Az FCM automatizált módszer, óriási előnye, hogy több tízezer sejtet képes detektálni másodpercenként, egy mérés pedig néhány percig tart, így hatalmas adathalmaz áll a mérés után a felhasználó rendelkezésére. E műszerrel végzett sejtanalitikai vizsgálatok megbízhatósága jelentősen nagyobb a fluoreszcens mikroszkóppal végzett technikákénál (Rieseberg et al., 2001).



4. ábra: Az FCM készülék felépítésének vázlata⁵

A sejtanalitikai vizsgálatok számára kiváló lehetőségként szolgálnak az egyre nagyobb választékban rendelkezésre álló fluoreszcens festékek. Ezek speciális sejtcsoportok elkülönítését, vagyis különböző sejtparaméterek vizsgálatát teszik lehetővé, a gerjesztő fény hatására fluoreszkálnak, illetve szelektíven kötődnek bizonyos sejtszervekhez, molekulákhoz. A fluoreszcens paraméter értéke arányos a jelölt molekula sejtben lévő mennyiségével.

Amellett, hogy számos sejt típuson alkalmazhatók, a rendkívül nagy változatosságuknak köszönhetően egy időben egyszerre több sejtparaméter vizsgálható velük. A sejt kettős, három vagy akár 4 fluorofórral való jelölése esetén az egyes fluorofórok különböző színű (hullámhosszú) emissziói különíthetők el. Egy minta jelöléséhez jellemzően olyan fluorofórokat kell alkalmazni, amelyek azonos hullámhosszon gerjeszthetők (ami a lézer hullámhossza), de különböző hullámhosszon emittálnak. A fluoreszcens festékekkel vizsgálható paraméterek közt szerepelnek egyebek mellett a sejtek viabilitása, az apoptózis, nekrozis és a mitokondrium aktivitása.

2.7. Vizsgálható sejtparaméterek és a leggyakrabban alkalmazott citotoxicitási tesztek

2.7.1. Flow citometriás festési módszerek

2.7.1.1 Festési eljárások elve, háttere

A fluoreszcens festési technika segítségével sejtekben vagy szövetekben lévő specifikus molekulákat fluoreszcens festékekkel jelöljük, lehetővé téve azok mikroszkópos megjelenítését és tanulmányozását. A következő alapelvek biztosítják, hogy a fluoreszcens festés megbízható és hatékony módszer legyen a sejteken belüli struktúrák, molekulák láthatóvá tételére:

Specifikusság: A fluoreszcens festékek szelektíven kell kötődnie a célmolekulához, anélkül, hogy más sejtkomponenseket jelölne.

Érzékenység: A fluoreszcens festékek a háttér fluoreszcenciától jól megkülönböztethető, határozott jelet kell produkálnia, amely könnyen kimutatható.

Fotostabilitás: Elvárás a festékekkel szemben, hogy ellenálló legyen, azaz a fény hatására ne veszítse el a fluoreszcens jelét legalább addig, amíg a mérés megvalósul.

A fluoreszcens festék legyen kompatibilis a jelölt molekulával, azaz nem zavarhatja annak biológiai funkcióját, és nem okozhat sejthalált.

A mikroszkóppal is kompatibilisnek kell lennie, vagyis olyan hullámhosszon kell fényt kibocsátania a festékeknek, amely könnyen detektálható és vizualizálható fluoreszcens mikroszkóppal.

Fontos, hogy a festék lehetővé tegye a kísérletekben a konzisztens eredmények elérését, a festékekkel végzett mérések legyenek reprodukálhatóak.

2.7.1.2 A Hoechst-PI festékek kombinációja

A Hoechst és propidium-jodid fluoreszcens festékkombináció a sejtekben lévő DNS festésére és vizualizálására használható. A két festék együttes alkalmazása lehetővé teszi sejtek életképességének és a sejthalálnak a felmérését, valamint különböző sejtfolymatok, például az apoptózis és a sejtciklus előrehaladásának tanulmányozását.

A membrán permeábilis Hoechst festékek a kettős szálú DNS kis barázdáihoz kötődnek, és UV fénnel történő gerjesztéskor kék fluoreszcenciát bocsátanak ki. A membrán impermeábilis propidium-jodid viszont egy vörös fluoreszcens interkalációs

festék, amely az elhalt vagy sérült sejtek sejtmagjában lévő DNS-hez kötődik, az ép sejtmembránnal rendelkező sejtekbe nem képes bejutni. (Pollack & Ciancio, 1990).

2.7.1.3 AnnexinV-PI festékkombináció

E két festéket egymás mellett az apoptotikus sejthalál különböző stádiumainak kimutatására és megkülönböztetésére szokás használni. Az Annexin V egy kalciumkötő fehérje, mely a foszfatidil-szerinhez kötődik (PS). A PS egy olyan foszfolipid, ami az apoptózis korai szakaszában a plazmamebrán belső lapjáról a külsőre transzlokálódik. Az Annexin V a nekrotikus sejteket is megfestheti; mivel ezeknek a sejteknek a membránja megrepedt, lehetővé teszi a festék számára a teljes plazmamembránhoz való hozzáférést. Egy Annexin V /PI vizsgálatban a sejteket zöld fluoreszcens festékkel jelölik és a PI-t annak érdekében adják a mintához, hogy a nekrotikus vagy késői apoptotikus sejteket vörös fluoreszcenciával jelöljék (Crowley et al., 2016).

2.7.1.4 Mitotracker Deep Red (MTR) és a Mitotracker Green (MTG)

A Mitotracker festékek szelektíven felhalmozódnak a mitokondriumokban, az eukarióta sejtek energiatermeléséért felelős organelleumaiban, ezért azok működésének vizsgálatára jól felhasználhatóak élő sejtekben. A gyakran alkalmazott MTR és MTG relatív fluoreszcenciájának megfigyelésével megadható a mitokondriális membránpotenciál, valamint a sejt általános mitokondriális egészsége. Nyomon követhetők a mitokondriumok mikrotubulusokkal és aktin filamentumokkal történő mozgása, valamint tanulmányozható a valós idejű vizualizálással azok dinamikája (Xiao et al., 2016).

A Mitotracker Green festék a mitokondriális membránpotenciáltól függetlenül a mitokondriumokat zöld színre festi, ezért alkalmazzák előszeretettel a teljes mitokondriális tömeg jelölésére (Xiao et al., 2016). Ezzel szemben a Mitotracker Deep red a membránpotenciáltól függvényében kötődik az aktív mitokondriumokhoz és azokat távoli vörös fluoreszcens fénnel jelzi (Xiao et al., 2016).

2.7.1.5 Jelölés a JC1 festékkel

A mitokondriális membránpotenciál vizsgálatára alkalmas a lipofil kationos festék, a JC1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolil-karbocianin-jodid). A magas membránpotenciálú, vagyis aktív mitokondriumokban a vegyület J-aggregátumokban felhalmozódik, míg az inaktív mitokondriumokban a JC-1 molekulák monomer

állapotban maradnak. Előbbi esetben a festékmolekulák vörös fluoreszcenciát mutatnak ki, utóbbi esetben pedig zöldet. A két fluoreszcencia aránya jól reprezentálja a mitokondriumok aktivitását (Perelman et al., 2012).

2.7.2. ELISA alapú tesztek

2.7.2.1 A sejtek viabilitásának vizsgálata

E vizsgálati típus alatt egy sejtenyészetben lévő elhalt sejtek arányának megállapítását értjük. Az elhalt sejteket jelölhetjük tripánkékekkel, ugyanis az élő sejtben ez az azoszínész nem tud behatolni az ép membránon keresztül a sejtbe, szemben a sérült membránnal rendelkező sejtek esetében, melyeket kékre fest. Laboratóriumi munkám során ezt a festéket rutinszerűen alkalmaztam manuális sejtszámlálásra, melynek célja az volt, hogy néhány mikroliter sejtszuszpenzió felhasználásával a teljes mennyiség sejtszámára következtessék. Segédeszközként Bürker-kamrát alkalmaztam.

A sejtek jelölésére az egyik széles körben alkalmazott DNS festék a sejtmembrán-permeábilis Hoechst (*Hoechst 33342-Biotium 40047*, PSF006, 2019.) festékcsalád. Ezek a biszbenzimid típusú vegyületek UV-fénnyel gerjesztődnek. Az emissziós maximumuk 455 nm hullámhosszúságon van, amely nem kötött állapotban 510-540-es értékekre tolódik el. A festés nagyon stabil és az élő sejtekre több napig vagy hosszabb ideig nem toxikus.

Egy sejtpopulációban lévő elhalt sejtek szelektív festésére használható a propidium-jodid (*Propidium Iodide Nucleic Acid Stain*, Molecular Probes, MP 01304, 2006), mely egy membrán-impermeábilis nukleinsav-interkalátor. A festék csak akkor képes bejutni a sejtekbe, ha azok sejtmembránja sérült. A nukleinsavhoz kötött állapotban gerjesztési maximuma 535 nm-nél, emissziós maximuma pedig 617 nm-nél van.

2.7.2.2 A sejtmembrán integritás vizsgálata (LDH teszt)

Az apoptoikus sejthalál mértékének számszerűsítése a plazmamembrán integritásának elvesztését meghatározó vizsgálatokkal történhet. A membránintegritás elvesztésének egyik vizsgálati módszere a laktát-dehidrogenáz (LDH) nevű citoszolikus enzim sejtenyésztési közegbe való felszabadulásának mérése. Az extracelluláris LDH a közegben számszerűsíthető egy kapcsolt enzimátikus reakcióval, melyben az LDH katalizálja a laktát átalakulását piruváttá $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ -ra történő redukciója révén. A dehidrogenáz enzimek egyik osztályát a diaforáz enzimek alkotják, melynek egyik

specifikus tagja a NADH-diaforáz, ami a redukció során felszabadult NADH-t használja fel. A NADH diaforáz általi oxidációja egy tetrazoliumsó redukciójához vezet, amely egy vörös formazán termékké alakul. Ez a vegyület spektrofotometriásan 490 nm-en mérhető. A formazán képződési szintje egyenesen arányos a tenyésztőközegbe felszabaduló LDH mennyiségével. Ezen adatok ismeretében kvantitatívan megadható a citotoxicitás mértéke (Lobner, 2000).

2.7.2.3 A sejtek metabolikus aktivitásának vizsgálata (XTT teszt)

Az XTT tesztel a sejtek proliferációját, vagyis szaporodását és életképességét a vizsgált mintával való kezelést követően kolorimetrikusan határozzák meg. Az XTT, vagy más redoxi-diének értékes eszközként szolgálnak az életképes sejtek mennyiségi értékelésére, mert a festékeket csak az anyagcserében aktív sejtek redukálják.

Az XTT reagens érzékeny a sejtek redoxpotenciáljára. Az aktívan lélegző sejtek a vízben oldódó XTT vegyületet az aktív mitokondriumokban lévő dehidrogenáz aktivitás által narancssárga színű formazán termékké alakítják.

2.7.2.4 Reaktív oxigéngyökök (ROS) és az oxidatív stressz sejtekre kifejtett hatása

A reaktív oxigéngyökök mitokondriális oxidatív anyagcsere, valamint a sejtek xenobiotikumokra, citokinekre és bakteriális támadásra adott válaszreakciói során keletkeznek. Az oxidatív stressz ROS-ok vagy oxidánsok feleslegéből eredő egyensúlytalanságra utal, amely meghaladja a sejt hatékony antioxidáns válaszreakcióra való képességét. Az oxidatív stressz makromolekuláris károsodást eredményez, valamint szerepet játszik különböző betegségek, mint például az ateroszklerózis, cukorbetegség, rák, neurondegeneráció vagy épp a korai öregedés kialakulásában (Ray et al., 2012).

A metabolikus folyamatok eredményeként létrejövő reaktív oxigéngyökök egyes- és kettős DNS száltörések kialakulásához vezethetnek, (Aitken et al., 2012). A DNS fragmentáció a replikációban jelentős hibát okoz. Az oxidáló szerek módosíthatják a bázisokat, amelyek helytelen párosodásával az eredeti bázissorend módosulása következik be.

A ROS vegyületek fehérjékben és lipidekben is a sejtek diszfunkciójához vagy sejthalálhoz vezető közvetlen károsodást okozhatnak (Stadtman & Levine, n.d.). A lipidperoxidáció és a sejthalál összefüggésbe hozható a sejtek foszfolipidjeire gyakorolt apoptózist indukáló hatásaival, a szfingomielináz aktiválásával és ceramid felszabadulással (Fruhworth et al., 2008).

A reaktív oxigéngyökök nagy mértékben származnak sérült mitokondriumokból, ezért fontos a mitokondriális membránpotenciál változásának ismerete, melyet többek között Mitotracker Deep Red és JC-1 fluoreszcens festési eljárásokkal követhetünk nyomon.

2.7.3. DNS károsodás (Comet teszt)

A Comet teszt eukarióta sejtekben használható, a DNS egyes és kettős száltöréseinek vizsgálatára. Annak ellenére, hogy a toxikológiai vizsgálatokat sejteken végezzük, a Comet-teszt a genotoxicitás értékelésére értékes módszer. A sejteket agaróz gélbe ágyazva mikroszkópos tárgylemezre helyezik és nagy sókoncentráció mellett egy detergenssel lizálják, ennek következtében roncsolódik a sejtek plazmamembránja, a DNS széttekeredik, és csak a nukleotid váz marad vissza. Az így előkészített mintát magas pH-n, azaz lúgos közegben gélelektroforézissel futtatják. Az elektromos térben a fragmentált, töltéssel rendelkező DNS darabok a megfelelő elektród irányába elmozdulva csóvát húznak, melyek üstökösökre emlékeztető alakot eredményeznek (comet = üstökös). Az így kezelt minták DNS tartalmát fluoreszcens festékekkel jelölik, ami fluoreszcens mikroszkóp alkalmazásával válik megfigyelhetővé. Minél sérültebbek, azaz minél kisebbek a DNS fragmentumok, annál nagyobb utat tesznek meg az elektród irányába adott idő alatt. Ezért a csóva kiterjedéséből arányosan megadható a DNS száltörések mennyisége. A Comet teszt rendkívül érzékeny, ugyanakkor gyorsan és az eukarióta sejtek széles spektrumán alkalmazható a DNS károsodás mérésére (Fairbairn et al., 1995).

3. Célkitűzés

A kutatást az MTA-PE kutatócsoport egy korábbi kutatása, mégpedig a zárt terű hulladékégetésből származó aeroszolok karakterisztikájának megismerésére való törekvés indikálta. Rendkívül fontos, hogy a nagy diverzitású szennyezőforrás típusokat humánegészségügyi szempontból is jellemezzük *in vitro* sejtbiológiai módszerekkel. A kutatási eredmények a társadalom számára hasznosak, informatív és ezáltal prevencióra készítő jellegűek lehetnek.

Zárt terű, hagyományos kályhában elégetett tüzelőanyagok és hulladékok toxicitásáról jelenleg kevés szakirodalom áll a rendelkezésünkre, a téma mind hazai, mind nemzetközi szinten alulkutatott, ezért ez a kutatás hiánypótló jelentőségű.

Az MTA-PE Levegőkémia kutatócsoport munkájába bekapcsolódva célom vizsgálni a zárt térben elégetett hagyományos szilárd tüzelőanyagok (akác, csertölg, lignit, német brikett, cseh barnaszén, lengyel feketeszen, bútortlap), és ezekhez adagolt, háztartásokban előforduló műanyag hulladékok (PP, PE, PET) füstgázainak és aeroszol frakcióinak cito- és genotoxicitását. A különböző hulladéktípusok egyedileg, illetve együttes elégetéséből származó részecskeminták biológiai hatását is vizsgáljuk, valamint célunk az adott hulladéktípusra jellemző sejteleltani elváltozások megismerése és tipizálása *in vitro* módszerekkel humán tüdő sejtvonalakon.

4. Anyag és módszer

4.1. Sejttenyésztés

A különböző hulladéktípusok égéséből származó vegyületek okozta sejtélettani elváltozásokat humán tüdő sejtvonalon in vitro módszerekkel vizsgáljuk, mert a szennyezés káros hatásai elsődlegesen közvetlenül a tüdőt érintik. A humán tüdőrákszövetből származó A549 sejtek in vitro tenyésztéskor monoréteget alkotva könnyen növekednek és a tenyésztőflaska felületéhez tapadnak. A sejtek megduplázódási ideje általában 22 óra, bár néha elérheti a 40 órát is. Életben maradásuk érdekében az A594 sejteket 10% magzati szarvasmarhasérummal (FBS) módosított Dulbecco's MEM (DMEM) tápközegben tenyésztik.

Az általam használt sejt kultúra a letapadó (adherens) sejt kultúrák közé tartozik, vagyis az A549 sejtek a tenyésztés során a tenyésztőedényhez rögzülnek. Ha ott felszaporodtak, megfelelő (de még nem teljes) a konfluenciájuk, akkor át kell oltanunk a sejteket új edénybe, annak érdekében, hogy az osztódásuk biztosítva legyen. Ezt a folyamatot passzálásnak nevezzük. Munkám során a passzálásokat a fertőzések elkerülése végett UV lámpával sterilizált lamináris fülkében, steril oldatokkal, eszközökkel végeztem. A használandó oldatokat a művelet előtt 10 perccel 37 °C-os vízfürdőbe helyeztem, ugyanis a sejtek érzékenyek lehetnek a hidegsokra.

A passzálás folyamata a következő: a letapadt sejtek felszedése úgy történt, hogy a tenyésztő edényről leöntöttem a tápfolyadékot, majd háromszor átmostam 1-2 ml PBS-el. A mosás után 0,5 ml Tripszin-EDTA oldatot adtam a tenyésztő edénybe, ezután lezártam azt és a termosztát szekrénybe helyeztem 37°C 5% CO₂. 2 perc letelte után az edényt vortexszel rázattam, majd 1ml teljes DMEM oltatot adtam hozzá. Miután megfelelően leváltak a sejtek a flaska faláról, a sejtszuspenziót eppendorf csövekbe pipettáztam át, majd lecentrifugáltam a szuszpenziót 2000 rpm sebességgel. Ezt követően a sejtekről lepipettáztam a folyadékot és 1ml DMEM-t juttattam a csövekbe. A vortexszel reszuszendált sejtekből végeztem a sejtszámlálást és a további munkákat.

4.2. Mintavétel és Mintaelőkészítés

A kutatócsoport illetékes tagjai az öntöttvas kályhába helyezett szilárd tüzelőanyag- és hulladéktípusokat kontrollált körülmények között elégették, majd a kémény egy mintavevőpontjából a keletkezett gázokat és aeroszol részecskéket három, 1-1 dl vizet

tartalmazó gázmosón vezették át. Ezeket a frakciókat elegyítették. A vízben elnyelődött frakció összetevőit 0,4 µm-es szűrőn szűrték, majd meghatározták a minta összes szerves széntartalmát (TOC = Total Organic Carbon). A kapott eredmények mg/l-es koncentrációval adhatók meg (1. táblázat). Ezekből az adatokból számoltam az expozíciókhoz elkészítendő minták pontos koncentrációját a $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ keverési egyenlettel.

1. táblázat: A kontrollált körülmények között elégetett hagyományos szilárd tüzelőanyagok és műanyag hulladékok szűrt és nem szűrt füstgázfrakcióinak teljes szerves széntartalma (TOC)

A minta neve	TOC (mg/l) szűrt	TOC (mg/l) nem szűrt
Akác mix	293,3	330,4
Csertölgy mix	126,0	160,7
Lignit mix	37,2	39,7
Német brikett mix	341,5	357,5
Cseh barnaszén	101,1	111,1
Lengyel feketeszén	112,8	124,5
Putnoki barnaszén	57,1	63,2
Bútorlap mix	50,33	56,3
PP mix	154,6	203,3
PE mix	115,9	132,5
PET mix	170,1	208,8

A mérések során a 24 well-es plate-ben lévő lyukakba 40.000-100.000 sejtet juttattam 1-1 ml DMEM-be wellenként. A sejteket a füstgázfrakciót tartalmazó, 5 mg/l, 25 mg/l és 50 mg/l-es oldatokkal 4-, valamint 24 órás expozíciónak tettem ki.

Az expozíciós idő lejártá után az egyes well-ekből a felül úszó sejteket eppendorf csövekbe juttattam, a letapadt sejteket pedig 2 percig tartó 100 µl tripszin-EDTA oldattal való inkubálást követően szuszpendáltam. Ezután 400 µl DMEM tápoldatot pipettáztam a well-ekbe. A sejteket felszedtem, az egész 500 µl elegyet átpipettáztam a már meglévő 1 ml sejtsuszpenzót tartalmazó csövekbe. A mintákat 300G fordulatszámon 10 percig centrifugáltam, 1 ml PBS-el mostam, majd ugyanilyen paraméterekkel megismételtam a centrifugálást, végül reszuszpéndáltam a sejteket 500 µl PBS-ben. A mintákhoz 2 µl

Hoechst és 2,5 µl PI fluoreszcens festéket adtam. A megfestett sejteket 10 percig 37 °C-os termosztátban inkubáltam, végül Flow Citométerrel mértem.

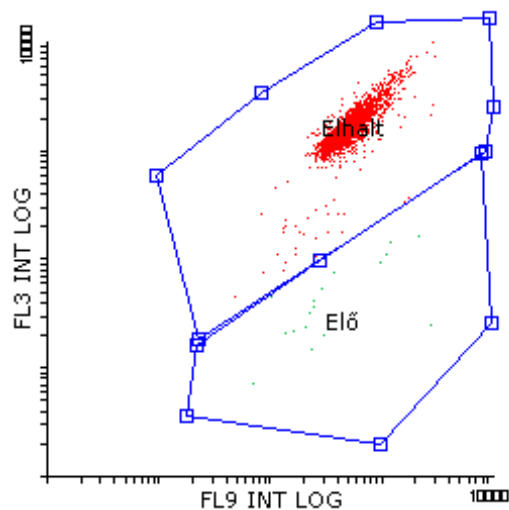
4.3. Flow citometria

Munkám során a fluoreszcens festékekkel festett minták vizsgálatát egy Beckman Coulter Gallios típusú flow citométerrel végeztem. A készülékben egy 405 nm-es, 488 nm-es és egy 633 nm-es gerjesztőlézer van. A fluoreszcens festékek által emittált jeleket azokkal a detektorokkal rögzítettem, melyek megfelelnek az adott festék emissziós spektrumának.

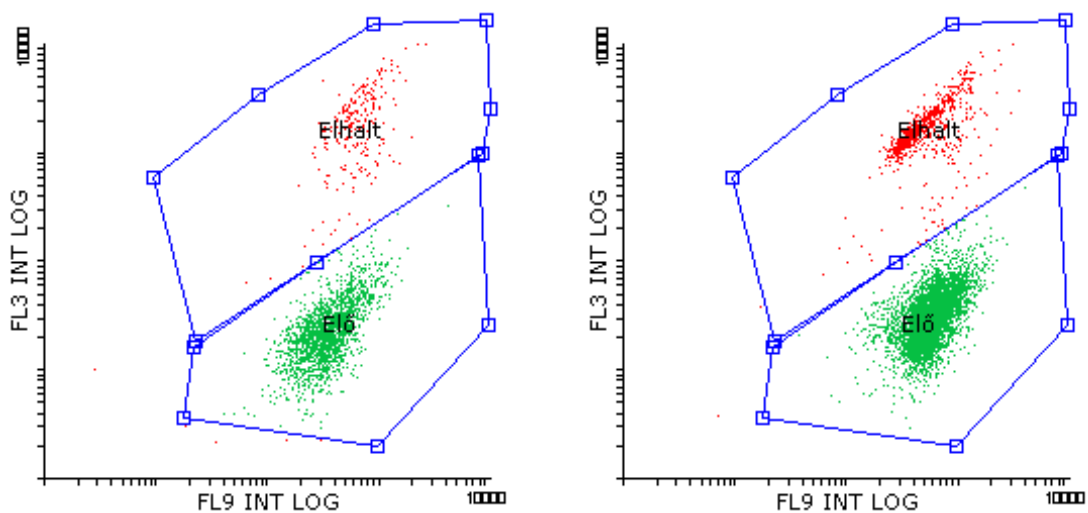
Miután meggyőződtem róla, hogy a citométer hordozófolyadék tankja megfelelően fel van töltve, illetve miután megtörtént a detektorok kalibráló gyöngyökkel való bekalibrálása, megkezdtem a minták mérését. A mintákról való adatgyűjtés 3 percig vagy 20000 detektált esemény eléréséig tartott. A citométerhez tartozó szoftver segítségével rögzítettem az adatokat, melyeket LMD (List Mode File) fájlként ment el a szoftver. Ezeket a fájlokat a Flowing Software 2.5.1-es verziójú programmal értékeltem ki.

4.4. Hoechst 33342- propídium-jodid festés – kapuzási stratégia

A viabilitás vizsgálatot először a sejtmembrán áteresztő, valamint a DNS AT-gazdag régióhoz kötődő Hoechst 33342 és a sejtpopulációban lévő elhalt sejtek szelektív festésére használható propídium-jodid festékkombinációval végeztem. A Hoechst-tel jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitását az FL9 log (kék) detektor, míg a propídium-jodiddal jelöltek fluoreszcencia intenzitását az FL3 log (vörös/narancs) detektor érzékeli. A két detektor jelét egy pontdiagramon ábrázolva megkaphatók az élő és elhalt sejtek populációi (5-7. ábra). Az eredményeket az élő és elhalt sejtek százalékos arányával jellemeztem.



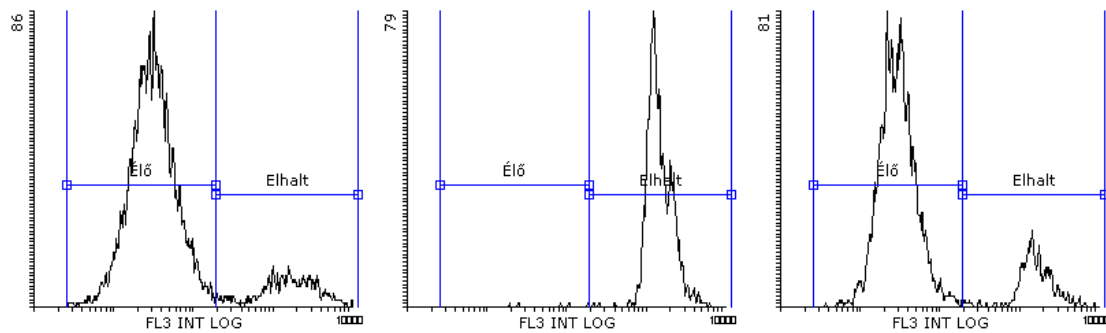
5. ábra: Példa egy pozitív kontroll populációinak kapuzására (tölgy minta)



6. ábra (balra): Példa egy negatív kontroll populációinak kapuzására
(sejtek DMEM-ben)

7. ábra (jobbra): Példa a sejtpopulációk egy 50 mg/l koncentrációjú mintával való 24
órás expozícióját követő kapuzására (tölgy minta)

Használható továbbá egy másik kiértékelési módszer, amelyben a sejtpopuláció,
detektor által érzékelt eseményeit hisztogramon ábrázoljuk (8. ábra).



8. ábra: A festett élő és elhalt sejtek populációinak FL3 fluoreszcencia intenzitásának ábrázolása egydimenziós hisztogramon. Rendre: negatív kontroll, pozitív kontroll és az 50 mg/l koncentrációjú, tölgy égéséből származó füstgázfrakcióval kezelt minta

Ekkor a jelölt sejtek fluoreszcenciájának függvényében ábrázolt eseményszáma ad képet az élő és elhalt sejtek mennyiségi változásáról. A populációk esetenként szépen elkülönülnek, de néha a hisztogramon nagyobb mértékben átfednek az egyes populációk jelei, mint a pontdiagramokon, ezért célszerűen a pontdiagramokból (FL3 – FL9) származó értékekkel végeztem a kiértékelést és a számolást.

4.5. Statisztika

A különbözőség vizsgálatára kétmintás t-próbát végeztem, mely azt mutatja meg, hogy két, egymástól független mintában egy-egy valószínűségi változó átlagai egymástól szignifikánsan különböznek-e. A számoláshoz a következő képletet alkalmaztam:

$$t \text{ próba} = \frac{(m_1 - m_2)}{\sqrt{\frac{(s_1)^2}{n_1} + \frac{(s_2)^2}{n_2}}}$$

ahol: m az egyik valószínűségi változó átlaga a mintában; s a valószínűségi változó szórása; n pedig a minta elemszáma.

A statisztikai szignifikancia annak a mértéke, hogy az eredmények a véletlennek mekkora valószínűségű következményei. Az előre megállapított valószínűségi szint, azaz a szignifikanciaszint a Fischer-féle definíció szerint 5% vagy $p < 0,05$, azt mutatja, hogy a kapott eredmény ennél a szintnél kisebb valószínűséggel tudható be pusztán a véletlennek. Az eredményt az adott szinten szignifikánsnak tekintik, vagyis a nullhipotézis elvetésre kerül. A szint mértéke azt mutatja meg tehát, hogy az eredmény legfeljebb akkora valószínűséggel lehet a véletlen műve.

A próba alkalmazhatóságának feltétele az, hogy a szórások egyezzenek, ezt külön statisztikai próba, az F próba segítségével kell ellenőrizni és amennyiben szükséges, akkor egy, a szórások egyezését nem igénylő Welch-próbát kell végrehajtani. A számolást Python programnyelv segítségével végeztem oly módon, hogy figyelembe vettem a szórások közti különbséget a próbák szabadságfokai alapján.

$$\text{Welch} - \text{féle } t \text{ próba} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)}{\frac{n_1}{n_1+1}} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)}{\frac{n_2}{n_2+1}}} - 2$$

ahol ugyancsak: m az egyik valószínűségi változó átlaga a mintában; s a valószínűségi változó szórása; n pedig a minta elemszáma.

Nullhipotézisem az volt, hogy a két vizsgált változó, azaz a negatív kontroll élő sejtpopulációjának átlaga és a mintával kezelt sejtpopuláció élő sejtjeinek átlaga statisztikai szempontból megegyezik.

5. Eredmények és értékelésük

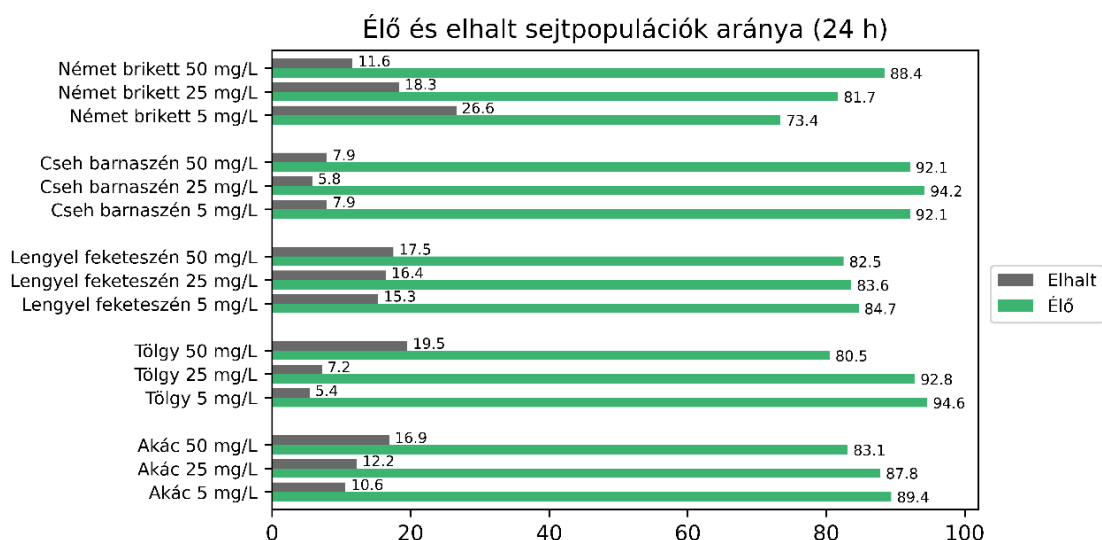
5.1. Ezüst nanorészecske, mint pozitív kontroll

Az ezüst nanorészecske (AgNP) toxikus hatással van az általam vizsgált A549-es sejtekre, ezért a pozitív kontrollt az AgNP oldattal kívántam előállítani. Ennek bizonyítására 0,01mM, 0,1 mM és 1 mM-os hígítások mellett kezeltem a sejteket, e minták mellé természetesen negatív és pozitív kontrollt is készítettem. Utóbbit a sejtek 30%-os H₂O₂ oldattal való kezelésével végeztem. Vizsgálatom tárgya az volt, hogy milyen koncentrációjú oldattal szükséges a 4 és 24 órás expozíciót megvalósítani, annak érdekében, hogy az egész sejtpopuláció elpusztuljon.

Az ezüst nanorészecske koncentrációjának növelésével az elhalt sejtek aránya növekvő tendenciát mutatott az expozíciókat követően. A 0,1 mM és 1 mM koncentrációjú oldatok esetében az elhalt sejtek aránya nagyobb volt, mint 96 %, de nem volt közöttük szignifikáns eltérés, ezért A további mérések során a pozitív kontrollt úgy állítottam elő, hogy a sejteket 500 nM koncentrációjú AgNP oldattal kezeltem (6. ábra).

5.2. Az egyes hagyományos tüzelőanyagok elégetéséből származó aeroszolok hatása a humán tüdősejtekre.

A Flow citométeres viabilitás vizsgálatokat úgy végeztem, hogy a hígított oldatokkal 3-3 párhuzamos mérést hajtottam végre. A kapott eredményekből az élő és elhalt sejtek százalékos arányát átlagoltam, valamint meghatároztam a három mérés szórását is. Eredményeimet táblázatban (2. és 3. táblázat) és oszlopdiagrammok (9. és 10. ábra) segítségével foglaltam össze.



5. ábra: Élő és elhalt sejtpopulációk aránya a sejtek hagyományos tüzelőanyagok füstgázfrakcióival történő 24 órás expozícióját követően.

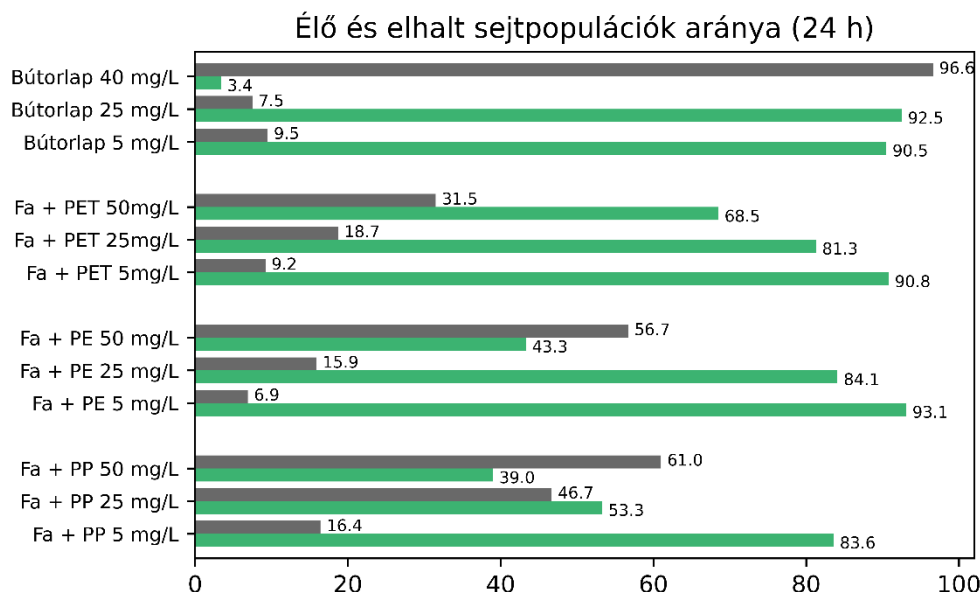
Az oszlopdiagramokkal csak a 24 órás expozíciók eredményeit adtam meg. Először a hagyományos tüzelőanyagok égéséből származó aeroszolok potenciális toxikus hatásait elemzem. Előzetes elvárásaink szerint a legtöményebb mintának kellene a legtöbb elhalt sejtet eredményeznie, ez a német brikett kivételével minden esetben igazolódott. Az akác, a tölgy és a lengyel faszén mintái jól reprezentálják azt a fordított arányosságot, ami a minta töménysége és az élő sejtek aránya között van, azaz minél töményebb mintával végezzük az expozíciót, annál inkább csökken az élő sejtek száma.

A német brikett minták esetében azt tapasztaltam, hogy a 24 órás expozíció után az élő-elhalt arány nem a várt tendenciát mutatja, hanem azt, hogy a füstgázfrakció koncentrációjának növekedésével az elhalt sejtek aránya csökken. Ezért e minta mérését célszerű lesz megismételni. Ennek ellenére előfordulhat az is, hogy a mérést megismételve is ezt az eredményt és tendenciát kapjuk, ugyanis létezik egy tápanyaghatás nevű jelenség, miszerint minél nagyobb az alkalmazott koncentráció, annál több tápanyagot kapnak a sejtek. Ez tehát eredményezhet fordított eredményt.

2. táblázat: Az élő és elhalt sejtek aránya és szórása 3-3 párhuzamos mérés kiértékeléséből. A sejteket hagyományos tüzelőanyagok égéséből származó aeroszollokkal való expozíciónak tettük ki.

	4 órás expozíció			24 órás expozíció		
	Élő átlag (%)	Elhalt átlag (%)	Szórás	Élő átlag (%)	Elhalt átlag (%)	Szórás
Akác 5 mg/L	78,4	21,6	2,6	89,4	10,6	2,3
Akác 25 mg/L	81,8	18,2	3,0	87,8	12,2	2,8
Akác 50 mg/L	69,5	30,5	7,5	83,1	16,9	1,3
Tölgy 5 mg/L	86,8	13,2	3,9	94,6	5,4	0,6
Tölgy 25 mg/L	87,7	12,3	6,6	92,8	7,2	1,5
Tölgy 50 mg/L	79,4	20,6	10,2	80,5	19,5	9,7
Lengyel faszén 5 mg/L	89,3	10,7	2,7	84,7	15,3	5,2
Lengyel faszén 25 mg/L	87,1	12,9	1,2	83,6	16,4	4,4
Lengyel faszén 50 mg/L	94,1	5,9	0,4	82,5	17,5	2,6
Cseh barnaszén 5 mg/L	92,7	7,3	0,7	92,1	7,9	1,5
Cseh barnaszén 25 mg/L	90,3	9,7	1,6	94,2	5,8	0,8
Cseh barnaszén 50 mg/L	92,9	7,1	1,5	92,1	7,9	4,2
Német brikett 5 mg/L	84,0	16,0	6,1	73,4	26,6	4,7
Német brikett 25 mg/L	94,6	5,4	1,1	81,7	18,3	4,2
Német brikett 50 mg/L	89,0	11,0	2,6	88,4	11,6	2,0

5.3. Az egyes hagyományos tüzelőanyagok és azok műanyagokkal való együttes elégetéséből származó aeroszolok hatása a humán tüdősejtekre.



6. ábra: Élő és elhalt sejtpopulációk aránya a sejtek hagyományos tüzelőanyagok és műanyagok együttes égéséből származó füstgázfrakcióival történő 24 órás expozícióját követően.

A fa -, illetve szénmintákhoz viszonyítva szembetűnő a különbség, miszerint a műanyagok égéséből származó aeroszolatot tartalmazó minták a humán tüdősejtekre nézve toxikusabbak. A jellemző tendencia ez esetben is megfigyelhető, hogy a töményebb minta nagyobb arányú sejtpusztulást okoz. Fontos kiemelni a 40 mg/l koncentrációjú, bútorlap égéséből származó aeroszolatot tartalmazó oldat kiugróan sok elhalt sejtet eredményező mintáját. Mivel a minta teljes szerves széntartalma (TOC) alacsony volt (~50mg/l), ezért csökkenteni kellett a koncentrációt annak érdekében, hogy a sejtek számára megfelelő mennyiségű tápközeg is legyen a vizsgálandó oldat mellett. Így lett 40 mg/l, viszont így is csak nagyjából 1:5 arányban volt a tápközeg a sejtek számára. Könnyen lehet, hogy a mortalitást a tápközeg hiánya okozta, ezért ez a mérés nem reprezentálja hitelesen a minta toxikusságát.

3. táblázat: Az élő és elhalt sejtek aránya és szórása 3-3 párhuzamos mérés kiértékeléséből. A sejteket hagyományos tüzelőanyagok és hulladékok égéséből származó aeroszolokkal való expozíciónak tettük ki.

	4 órás expozíció			24 órás expozíció		
	Élő átlag (%)	Elhalt átlag (%)	Szórás	Élő átlag (%)	Elhalt átlag (%)	Szórás
Fa + PP 5 mg/L	81,9	18,1	0,2	83,6	16,4	2,3
Fa + PP 25 mg/L	49,3	50,7	0,8	53,3	46,7	2,9
Fa + PP 50 mg/L	44,0	56,0	9,3	39,0	61,0	3,6
Fa + PE 5 mg/L	89,5	10,5	1,5	93,1	6,9	0,3
Fa + PE 25 mg/L	77,0	23,0	2,2	84,1	15,9	5,3
Fa + PE 50 mg/L	83,5	16,5	1,6	43,3	56,7	6,7
Fa-PET 5mg/L	80,5	19,5	2,8	90,8	9,2	1,0
Fa-PET 25mg/L	88,4	11,6	1,3	81,3	18,7	0,2
Fa-PET 50mg/L	67,9	32,1	9,5	68,5	31,5	2,6
Bútorlap 5 mg/L	92,0	8,0	2,2	90,5	9,5	1,3
Bútorlap 25 mg/L	93,4	6,6	0,2	92,5	7,5	1,5
Bútorlap 40 mg/L	66,8	33,2	2,5	3,4	96,6	0,3

Annak eldöntésére, hogy a negatív kontroll és a kezelt sejtpopuláció élő-elhalt arányában van-e szisztematikus eltérés, illetve, hogy a minta toxikus-e a vizsgált sejtekre, szignifikancia vizsgálatot végeztem. Szignifikanciaszintként a leggyakrabban alkalmazott $p < 0,05$ értéket használtam. Ez azt jelenti, hogy két minta esetében a szignifikanciaszintnél nagyobb valószínűséggel előforduló különbség már nem a véletlen műve. A vizsgálat eredményeit a 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat: A negatív kontroll és a kezelt sejtek közti eltérés mértéke ($p < 0,05$)

	Szignifikáns különbség a negatív kontrollhoz képest	
	4h expozíció	24 h expozíció
	50 mg/l	50 mg/l
Lengyel faszén	nincs	nincs
Német brikett	nincs	nincs
Cseh barnaszén	nincs	nincs
Tölgy	nincs	nincs
Akác	van	van
Bútorlap	van	van
Fa + PP	van	van
Fa + PE	van	van
Fa + PET	van	van

A szignifikanciák meghatározására minden esetben az adott méréshez és adott expozíciós időhöz tartozó negatív kontrollok élő sejtjeinek arányát hasonlítottam az 50 mg/l koncentrációjú tüzelőanyagfrakciókkal kezelt sejtpopulációk élő sejtjeinek arányához. A 4. táblázat alapján látható, hogy mind a 4, mind a 24 órás expozíció esetében a szignifikanciák konzekvensen alakulnak. A legfőbb következtetés pedig az, hogy az akác és a műanyagok égéséből származó aeroszolk toxikusak a sejtekre nézve. Azonban fontos megjegyezni, hogy az akác mintának nagyon magas a TOC tartalma, és kissé kilóg a hagyományos tüzelőanyagok sorából. Ezért egy ismételt mintavételre és mérésre fog sor kerülni, hogy teljes mértékben bizonyos legyen, hogy nem a mintavételnél történt valami gond.

6. Összefoglalás

Munkám során hagyományos szilárd tüzelőanyagok és háztartási hulladékok egyéni és együttes elégetéséből keletkező aeroszolok potenciális toxicitását vizsgáltam meg, melyhez eddig Hoechst 33342 és propídium-jodid fluoreszcens festékkombinációval történő viabilitás vizsgálatot végeztem el.

A vizsgált minták között akác, tölgy, német brikett, cseh barnaszén, lengyel feketeszen, bútorlap, illetve fához adagolt PE, PP és PET szerepeltek. Komplex következtetés egyetlen típusú viabilitás vizsgálatból nem vonható le, azonban jó és átfogó képet tud adni a potenciális toxicitásról. Az elvégzett mérések alapján egyelőre az akác és az összes műanyag, azaz PE, PP és PET égéséből eredő 50 mg/l koncentrációjú, aeroszolat tartalmazó minták mutattak szignifikáns toxicitást a negatív kontrollokhoz képest, tehát citotoxikus hatással voltak a humán A549 sejtekre.

A közeljövőben megvalósításra kerül a még el nem végzett putnoki barnaszén és a lignit mintáinak Flow Citometriás vizsgálata, továbbá a DNS károsodás kimutatására szolgáló Comet teszttel, mitokondriális aktivitás teszttel (FCM), illetve egy-egy ELISA teszttel kívánjuk folytatni a háztartási hulladékégetésből keletkező füstgázok és aeroszolok potenciális toxikus jellemzését.

Legfőbb motivációnk az aeroszolok toxikus karakterisztikájának megismerése és jellemzése. Humánegészségügyi szempontból elengedhetetlen az információszerzés, ugyanis jelenleg nagyon csekély mennyiségű információ áll a rendelkezésünkre a zárt terű hulladékégetésből származó aeroszolok toxicitását illetően. Ez a téma nemcsak Magyarországon, hanem nemzetközileg is alulkutatott, ezért munkánk hiánypótló jelentőséggel bír.

Irodalomjegyzék

- Aitken, R. J., Jones, K. T., & Robertson, S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function-in sickness and in health. In *Journal of Andrology* (Vol. 33, Issue 6, pp. 1096–1106). <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535>
- Bernstein, J. A., Alexis, N., Barnes, C., Bernstein, I. L., Bernstein, J. A., Nel, A., Peden, D., Diaz-Sanchez, D., Tarlo, S. M., & Williams, P. B. (2004). Health effects of air pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(5), 1116–1123. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.08.030>
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), 953–957. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O’neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. In *Mutation Research* (Vol. 339).
- Fröhlich, E., & Salar-Behzadi, S. (2014). Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: Role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in Silico Studies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15, Issue 3, pp. 4795–4822). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms15034795>
- Fruhworth, G. O., Hermetter, A., Hermetter, A., Quinn, P. J., & Wang, X. (2008). *Mediation of Apoptosis by Oxidized Phospholipids*.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). *Production, use, and fate of all plastics ever made*. <http://advances.sciencemag.org/>
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Doslik, H., & Parks, W. P. (1973). *In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors*. <http://jnci.oxfordjournals.org/>
- Hoechst 33342-Biotium 40047. (n.d.).
- Hoffer, A., Jancsek-Turóczi, B., Tóth, Á., Kiss, G., Naghiu, A., Andrea Levei, E., Marmureanu, L., MacHon, A., & Gelencsér, A. (2020). Emission factors for PM10 and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from illegal burning of different types of

- municipal waste in households. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 20(24), 16135–16144. <https://doi.org/10.5194/acp-20-16135-2020>
- Kováts, N., Hubai, K., Sainnokhoi, T. A., Eck-Varanka, B., Hoffer, A., Tóth, Á., Kakasi, B., & Teke, G. (2022). Ecotoxic emissions generated by illegal burning of household waste. *Chemosphere*, 298. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134263>
- Lemieux, P. M., Lutes, C. C., & Santoianni, D. A. (2004). Emissions of organic air toxics from open burning: a comprehensive review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 30(1), 1–32. <https://doi.org/10.1016/J.PECS.2003.08.001>
- Lobner, D. (2000). Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*, 96(2), 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(99\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(99)00193-4)
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., & Tzur, A. (2012). JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death and Disease*, 3(11). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.171>
- Pollack, A., & Ciancio, G. (1990). Chapter 3 Cell Cycle Phase-Specific Analysis of Cell Viability Using Hoechst 33342 and Propidium Iodide after Ethanol Preservation. *Methods in Cell Biology*, 33(C), 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60508-7](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60508-7)
- Pöschl, U. (2005). Atmospheric aerosols: Composition, transformation, climate and health effects. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 44, Issue 46, pp. 7520–7540). <https://doi.org/10.1002/anie.200501122>
- Propidium Iodide Nucleic Acid Stain*. (2006).
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. In *Cellular Signalling* (Vol. 24, Issue 5, pp. 981–990). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Ren-Jian, Z., Kin-Fai, H., & Zhen-Xing, S. (2012). The Role of Aerosol in Climate Change, the Environment, and Human Health. *Atmospheric and Oceanic Science Letters*, 5(2), 156–161. <https://doi.org/10.1080/16742834.2012.11446983>

- Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K. F., & Scheper, T. (2001). Flow cytometry in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3–4), 350–360. <https://doi.org/10.1007/s002530100673>
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine (London, England : 2005)*, 77(7), C98–C101. <https://doi.org/10.12968/HMED.2016.77.7.C98>
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (n.d.). *Protein Oxidation*.
- Xiao, B., Deng, X., Zhou, W., & Tan, E. K. (2016). Flow cytometry-based assessment of mitophagy using mitotracker. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 10, Issue MAR2016). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00076>

A képek jegyzéke és linkek:

-
- [1] Suer H, Bayram H. Liposomes as potential nanocarriers for theranostic applications in chronic inflammatory lung diseases. Biomed Biotechnol Res J 2017;1:1-8
- [2] <https://www.synthego.com/a549-cells> (2023. 03. 08.)
- [3] <https://dea.lib.unideb.hu/server/api/core/bitstreams/6c0bd4f7-8423-496e-bd90-f2d7d646503d/content> (2023. 03. 08.)
- [4] <https://www.atcc.org/products/ccl-185> (2023. 03. 18.)
- [5] <http://www.biofizika.aok.pte.hu/data/2019/0516/564/A%CC%81ralmla%CC%81si%20citometria%20handout.pdf> (2023. 03. 08.)