



**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 utolsó módosításának dátuma: 2024. 11. 22.

Kivonat

Napjaink egyik legsúlyosabb környezeti problémája a levegőszennyezés, melyhez jelentősen hozzájárulnak a lakosság által fűtés céljából elégetett tüzelőanyagokból, illetve a tüzelőanyagokkal együtt illegálisan elégetett hulladékokból származó szennyezők is. A probléma kifejezetten aktuális, 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. 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 cito- és genotoxikus hatásait vizsgáltam humán tüdő sejtvonalon.

A sejtparaméterek vizsgálatát különböző fluoreszcens festékekkel és azok kombinációinak alkalmazásával valósítottam meg. Az élő és elpusztult sejtek arányát Hoechst 33342 és Propidium-jodid festékek segítségével határoztam meg, a reaktív oxigéngyökök (ROS) sejtekre kifejtett hatását pedig CellROX Green-nel elemeztem. A sejtek DNS károsodásának vizsgálatát pedig Comet teszttel végeztem.

A viabilitás vizsgálat eredményei alapján a hagyományos tüzelőanyagok égetéséből származó aeroszolok egy vizsgált koncentrációban sem, míg a PP már 25 mg/l, a PE, PET és PS minták 50 mg/l-es koncentrációban citotoxikus hatásúak az A549 sejtekre. Ezzel a genotoxicitás mértéke néhány kivétellel korrelációban van. Párhuzamos mérési eredmények tükrében az 50 mg/l koncentrációjú tölgy, feketeszén, barnaszén minták kis mértékben, továbbá a PS, PE, PET, PP mintákból származó aeroszolok fokozzák a sejtekben az oxidatív stresszt, ami hozzájárulhat a A549 tesztsejtekben tapasztalt genotoxicitáshoz.

Kulcsszavak: aeroszolok, hulladékégetés, citotoxicitás, genotoxicitás

Tartalomjegyzék

Kivonat.....	2
1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. A levegőszennyezés és a légköri aeroszolok	4
2.2. Háztartási hulladékégetés és következményei	5
2.2.1. A hulladékégetésre vonatkozó hazai jogszabály.....	6
2.3. Aeroszol részecskék egészségre gyakorolt hatásai	7
2.4. A flow citometria és fluoreszcens festékek.....	8
2.5. Vizsgálható sejtparaméterek és gyakran alkalmazott citotoxicitási tesztek.....	10
2.5.1. Flow citometriás festési módszerek	10
2.6. DNS károsodás (Comet teszt)	14
2.7. Az A549 sejtvonal, mint tesztsejtek.....	15
3. Célkitűzés.....	16
4. Anyag és módszer	17
4.1. Sejttenyésztés	17
4.2. Mintavétel és Mintaelőkészítés	18
4.3. Flow citometria	19
4.3.1. Hoechst 33342- propídium-jodid festés és kapuzási stratégia.....	20
4.3.2. Hoechst 33342- propídium-jodid és CellROX Green festés, kapuzás.....	22
4.4. Alkalikus Comet teszt	24
4.5. Statisztika	25
5. Eredmények és értékelésük	26
5.1. Ezüst nanorészecske, mint pozitív kontroll.....	26
5.2. Az egyes hagyományos tüzelőanyagok elégetéséből származó aeroszolok citotoxikus hatása a humán tüdősejtekre.	26

5.3. Műanyagokkal terhelt tüzelőanyagok elégetéséből származó aeroszolok hatása a humán tüdősejtekre.	28
5.4. A DNS károsodás mértékének kimutatása – Comet teszt.....	30
6. Összefoglalás.....	33
Irodalomjegyzék	34
A képek jegyzéke.....	38

1. Bevezetés

A környezetszennyezés mára óriási méreteket öltött a megnövekedett ipari tevékenység, a közlekedés, valamint a növekvő népesség, és annak fogyasztói szemlélettel járó környezethasználata 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 származó aeroszolok cito- és genotoxikus hatását, illetve ezek 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 [1,2]. Ezért fontos, hogy még átfogóbb képet kapjunk arról, hogy a szennyezők milyen potenciális cito- és genotoxikus változásokat eredményezhetnek a biológiai, szűkebb értelemben véve humán szervezetekben. Ezekről egyelőre globális és hazai szinten is kevés ismeretünk van, annak ellenére, hogy a háztartási szeméttégetés 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 kimutatására és számszerűsítésére számos, különböző elvek alapján működő teszt módszer áll a rendelkezésemre, melyekhez egyedi protokollok tartoznak. Több sejtparaméter párhuzamos vizsgálatát végeztem el annak érdekében, hogy részletes ismereteket kapjak a minták 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 aeroszolok tehát szuszpenzióban lévő szilárd vagy folyékony részecskék halmaza. A jelenlegi környezetkutatás központi témái közé tartozik az aeroszolok légkörre, éghajlatra és egészségre gyakorolt hatásainak vizsgálata.

Forrásuk lehet természetes eredetű, de emberi tevékenységhez köthető, úgynevezett antropogén származású aeroszolat is megkülönböztetünk. A részecskék méretüket tekintve a 100 nanométerestől a néhányszor tíz mikrométeres nagyságrendig terjedő tartományba esnek. Ezek a részecskék befolyásolják a Föld energiaegyensúlyát (összetételüktől függően elnyelik vagy visszaverik a hőt és a napfényt), 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 [3].

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 elősegítői lehetnek [4].

Az aeroszolat képződési mechanizmusuk alapján két osztályba lehet csoportosítani: megkülönböztetünk elsődleges aeroszolat, melyek közvetlenül a légkörbe bocsátódnak ki különböző forrásokból folyadék vagy szilárd halmazállapotban (ebbe a kategóriába tartoznak az égés során keletkező aeroszolok, részecskék is), a másodlagos részecskék pedig a légkörben keletkeznek gáz fázisú prekursorok magképződésével és kondenzációjával.

A légköri aeroszolok 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 azonban néhány esetben a $10\text{ }\mu\text{m}$ -ig (PM_{10}) terjedő részecskék is ebbe a kategóriába sorolandók.

2.2. Háztartási hulladékégetés és következményei

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, ugyanakkor ezt a problémát eredményezheti a szervezett hulladékgyűjtési rendszerek hiánya is. 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 tárgyak, kezelt fa elemek (OSB, bútorlapok) a tüzelőanyagköltségek csökkentése érdekében. A szilárd hulladék nyílt égetése során környezeti kockázatot jelentő szennyezőanyagok, például a PM_{10} mérettartományba eső aeroszolk, finom részecskék ($PM_{2,5}$) és korom részecskék kerülnek kibocsátásra. Mára azonban köztudottá vált, hogy különböző hulladékok nyílt égetése jelentős mennyiségű szerves toxikus vegyületet (policiklusos aromás szénhidrogéneket (PAH), dioxinokat, furánokat) termel [5].

A Kormányközi Éghajlat-változási Testület (IPCC) 2006-ban közzétett általános irányelvei alapján Wiedinmyer és mtsi (2014) megbecsülték a háztartásokban és a hulladéklerakókban elégetett hulladék mennyiségét. Számításaik szerint Magyarországon az éves szinten elégetett hulladék mennyisége az országban keletkező összes hulladék mintegy 2%-a, Romániában ez az érték eléri a 60%-ot. A hulladékégetés becsült hozzájárulása a környezeti PM_{10} -hez a fentebb bemutatott sorrendben 4%, illetve 35% [6]. Levegőkémikusok tanulmánya kimutatta, hogy a műanyag hulladék égetése tömegalapon akár 40-szer több PM_{10} -et és 800-szor több PAH-vegyületet bocsát ki, mint a száraz tűzifa égetése [7]. Azonban 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 [8].

Hoffer és mtsi (2024) a PET (polietilén-tereftalát) égetésből és a fatüzelésből származó kibocsátásnak a környezeti PM_{10} koncentrációjához való relatív hozzájárulását vizsgálták 2-BEVT (2-(benzoiloxi)-etil-vinil-tereftalát) és LGS (levoglukozán) nyomjelző anyagok segítségével [9]. Öt magyarországi mintavevő állomásról származó aeroszolminták alapján végeztek összehasonlító vizsgálatokat és megállapították, hogy az ország északkeleti régiójában (Miskolc és Putnok) a PET-égetés relatív hozzájárulása a környezeti PM_{10} koncentrációhoz lényegesen magasabb, mint az ország más részein. A tanulmányban szereplő települések közül a leginkább (Miskolc) és a legkevésbé

(Veszprém) érintett települések között közel 5-szörös eltérés is megfigyelhető volt. Veszprémben a minták túlnyomó többségében (80%), míg Budapesten a PM₁₀ minták mindössze 66%-ában volt számszerűsítve a 2-BEVT, ennek ellenére Budapesten a PET-égetés relatív aránya magasabb, mint Veszprémben. A tűzifa-fogyasztási statisztikák, a fatüzelés nyomjelzőjének (LGS) számszerűsített koncentrációja, valamint a légköri PM₁₀ mintákban talált PET és egyéb típusú hulladékok nyomjelzőinek tömegkoncentrációi alapján azt a komplex következtetést vonták le, hogy a fűtési szezonban a háztartásokban keletkező összes háztartási hulladék mintegy 10%-át a háztartásokban lévő kályhákban égették el. E helytelen gyakorlatból származó levegőszennyezés kockázatot jelent mind a lakosság, mind pedig más élőlények és az ökoszisztéma számára is.

Kováts és mtsai (2022) vizsgálatai bizonyították, hogy a hulladékégetésből származó polipropilén (PP), polisztirol (PS), poliuretán (PU), polietilén (PE) és polivinil-klorid (PVC) műanyag minták eltérő ökototoxicitást mutattak [1]. A fő szennyező anyagok tekintetében a mintákat „PAH-típusú” és „nehézfém-típusú” kategóriákra lehetett osztani. A legnagyobb ökototoxicitást 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 baktériumtörzseken genotoxikusnak minősültek. A genotoxicitás erős korrelációban van a kimutatott PAH-vegyületek kvalitatív és kvantitatív jellemzőivel.

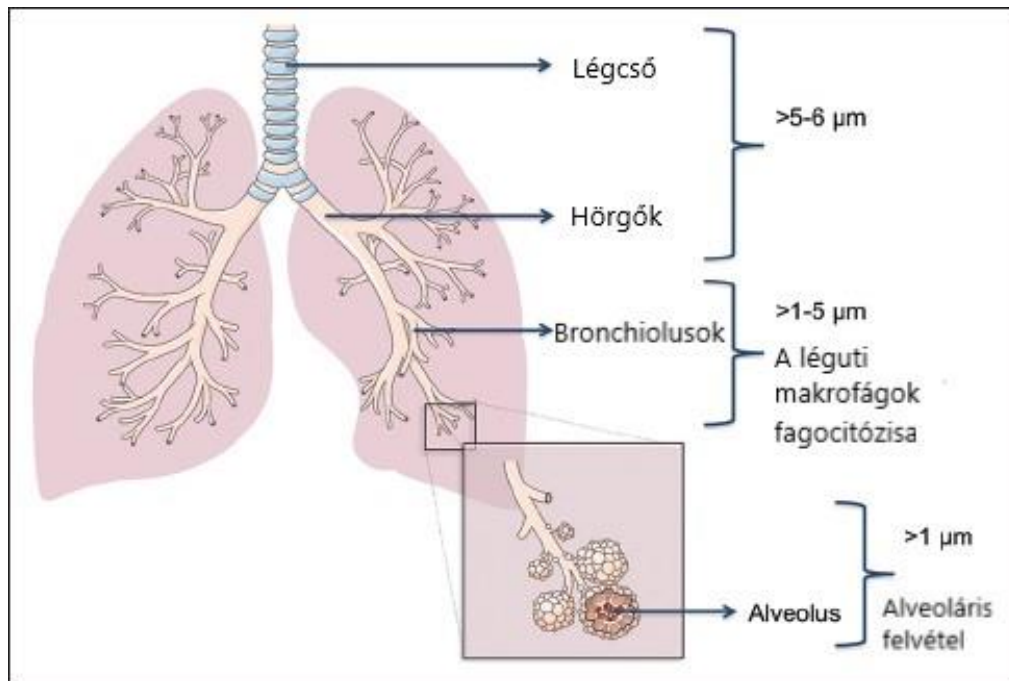
2.2.1. A hulladékégetésre vonatkozó hazai jogszabály

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.”*

2.3. Aeroszol részecskék egészségre gyakorolt hatásai

Az emberi szervezet alveoláris hámja a tüdőben rendkívül permeábilis. 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 működést, 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 $10\text{ }\mu\text{m}$ és a $2,5\text{ }\mu\text{m}$ alatti mérettartományokat, ugyanis előbbi a tüdő hörgőibe, utóbbi pedig a hörgőcskékbe és léghólyagocskákba is képes bejutni (1. ábra).



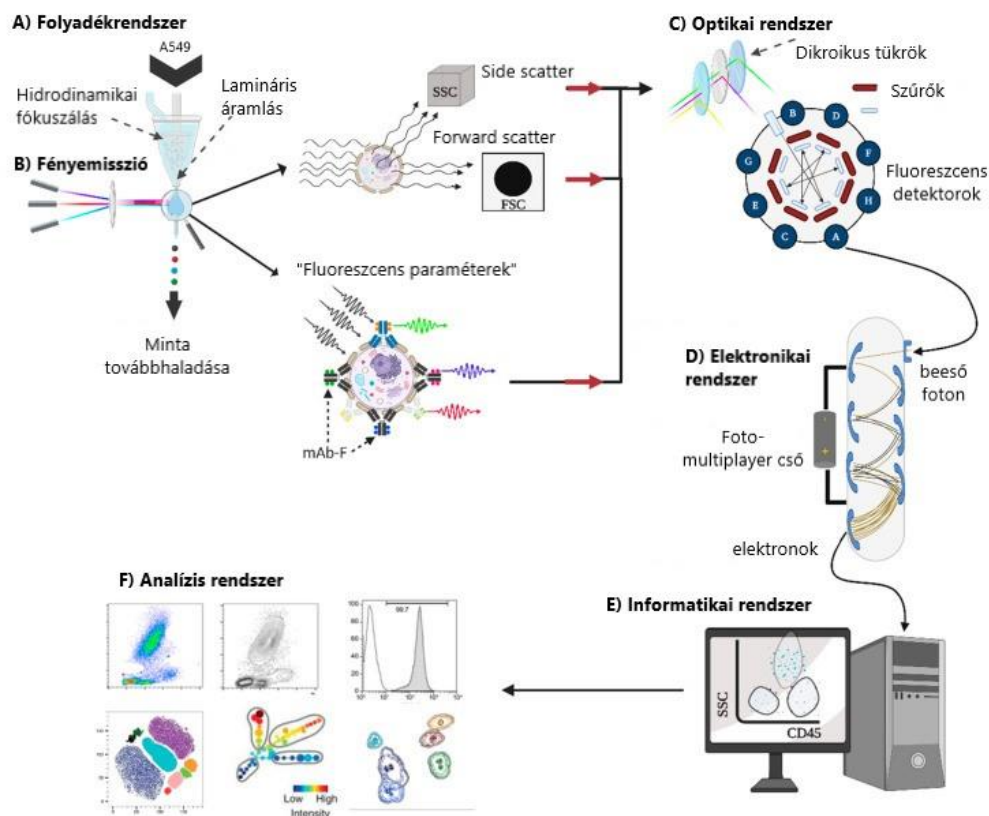
1. ábra: A tüdőbe kerülő mikro- és nanorészecskék méretfüggő lerakódását bemutató vázlatos ábra¹

Az aeroszol részecskék nagy része abszorbeálja a levegő nedvességtartalmát, így vízben oldható, mérgező anyagokat juttathatnak a tüdőbe. Ennek következtében a sejtek oxido-redukciós állapota megváltozhat, melynek eredményeként oxidatív stressz lép fel. [10,11]

2.4. 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 érzékelő 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 (2. ábra). Az általam használt Beckman Coulter Gallios típusú citométerben a gerjesztőlézerek térben elválasztott áramlási metszéspontokkal rendelkeznek. Az áramból származó fluorokróm-kibocsátás külön optikai szálakon keresztül jut el a detektorsorokhoz. Ez lehetővé teszi több különböző fluorokróm egyidejű kimutatását, vagyis a sejtek multiparaméteres elemzését.

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. A FCM automatizált módszer, óriási előnye, hogy akár több ezer 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 statisztikai megbízhatósága jelentősen nagyobb a fluoreszcens mikroszkóppal végzett technikákénál [12].



2. ábra: Az FCM készülék felépítésének és működésének vázlata [13]

A sejtanalitikai vizsgálatok számára kiváló lehetőségként szolgálnak az egyre nagyobb választékban rendelkezésre álló fluoreszcens festékek. Ezek lehetővé teszik különböző sejtparaméterek vizsgálatát és ezáltal speciális sejt-alcsoportok elkülönítését. A gerjesztő fény hatására fluoreszkálnak, illetve szelektíven kötődnek bizonyos sejtszervekhez, molekulákhoz. A fluoreszcencia intenzitása 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 kettő, három vagy akár 4 fluorofórral való jelölése esetén az egyes fluorofórok különböző színű (hullámhosszú) emissziói megfelelő detektor konfiguráció mellett elkülöníthetők. Egy minta jelöléséhez jellemzően olyan markereket kell alkalmazni, amelyek azonos hullámhosszon gerjeszthetők (ami a lézer hullámhossza), de a különböző detektorokhoz tartozó hullámhosszakon emittálnak.

A fluoreszcens festékekkel vizsgálható paraméterek közt szerepelnek egyebek mellett a sejtek viabilitása, az apoptózis, nekrozis és a mitokondriumok aktivitása.

2.5. Vizsgálható sejtparaméterek és gyakran alkalmazott citotoxicitási tesztek

Ebben az alfejezetben a fluoreszcens festékek működési elvét, biokémiai hátterét, valamint a laboratóriumi munkám során használt fluoreszcens festékkombinációkat és mutatom be. A munkám során olyan fluoreszcens festékekkel dolgoztam, melyekkel a sejtek viabilitása és a reaktív oxigéngyökök (ROS) esetleges sejtkárosító hatásai deríthetők fel, azonban számos más paraméter vizsgálatára fejlesztettek már ki fluoreszcens markereket, módszereket.

2.5.1. Flow citometriás festési módszerek

2.5.1.1 Festési eljárások elve, háttere

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

Specifikusság: A fluoreszcens festéknek szelektíven kell kötődnie a célmolekulához, anélkül, hogy más sejtkomponenseket megjelölne.

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

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

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

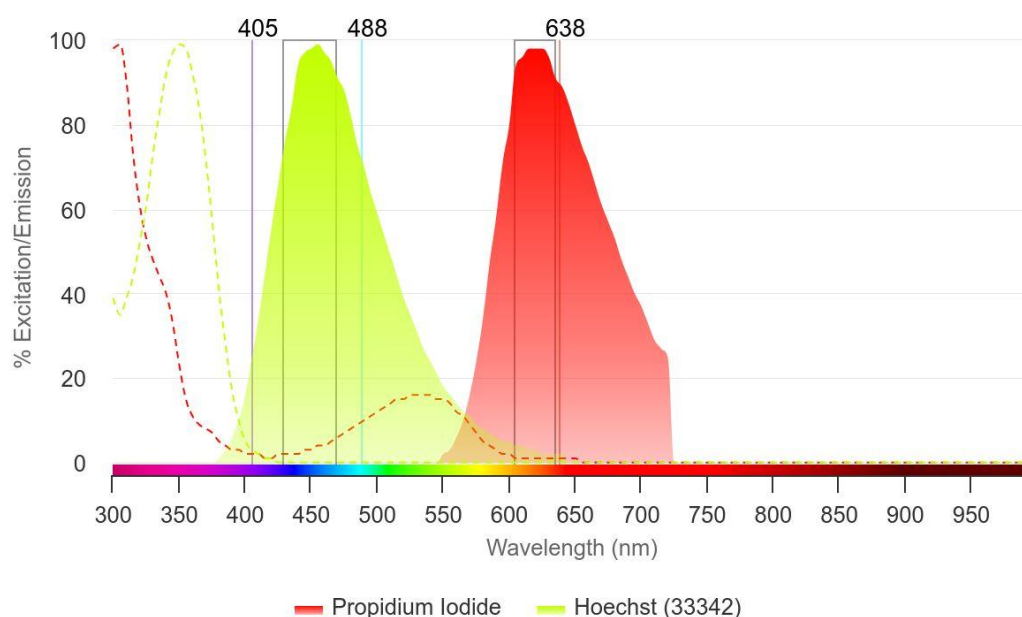
Célszerű a mikroszkóppal is kompatibilisnek lennie, vagyis olyan hullámhosszon fényt kibocsátania, amely könnyen detektálható és vizualizálható fluoreszcens mikroszkóppal.

Fontos, hogy a festék lehetővé tegye a kísérletekben a konzisztens eredmények elérését, az elvégzett mérések legyenek reprodukálhatóak.

2.5.1.2 A sejtek viabilitásának vizsgálata, Hoechst 33342-Propidium-jodid festékek kombinációja

A Hoechst 33342 [14] és propidium-jodid [15] (H-PI) fluoreszcens festékkombináció a sejtekben lévő DNS jelölésére és vizualizálására használható. A két festék együttes alkalmazása lehetővé teszi a sejtek életképességének és a sejthalálnak a felmérését, valamint különböző sejtfolymatok, például az apoptózis és a sejtciklus előrehaladásának tanulmányozását.

A biszbenzimid típusú membrán permeábilis Hoechst 33342 festék a kettős szálú DNS kis barázdáihoz kötődik, elsősorban UV fénnnyel, de kisebb mértékben a 405 nm-es lézerrel is gerjeszthető. Az emissziós maximuma 455 nm hullámhosszágon van, vagyis kék fluoreszcenciát bocsát ki. Az emissziós maximuma nem kötött állapotban 510-540-es értékekre tolódik el. A propidium-jodid egy membrán-impermeábilis nukleinsav-interkalátor. Ez egy vörös fluoreszcens festék, amely az elhalt vagy sérült sejtek sejtmagjában lévő DNS-hez kötődik, az ép sejtmembránnal rendelkező sejtekbe nem képes bejutni. [16]. A nukleinsavhoz kötött állapotban gerjesztési maximuma 535 nm-nél, emissziós maximuma pedig 617 nm-nél van (3. ábra).



3. ábra: Hoechst 33342 és PI festékek gerjesztési (szaggatott vonalak) és emissziós görbéi a hullámhossz függvényében. A csúcsokon lévő boxok az FL9 (H) és FL3 (PI)-csatornákat jelöli, melyeken az alkalmazott Beckman Coulter Gallios citométerrel detektálható a festékek emissziója.

2.5.1.6 Reaktív oxigéngyökök (ROS) és az oxidatív stressz sejtekre kifejtett hatása, vizsgálatuk CellROX Green fluoreszcens festékkel

A reaktív oxigéngyökök a 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 [25].

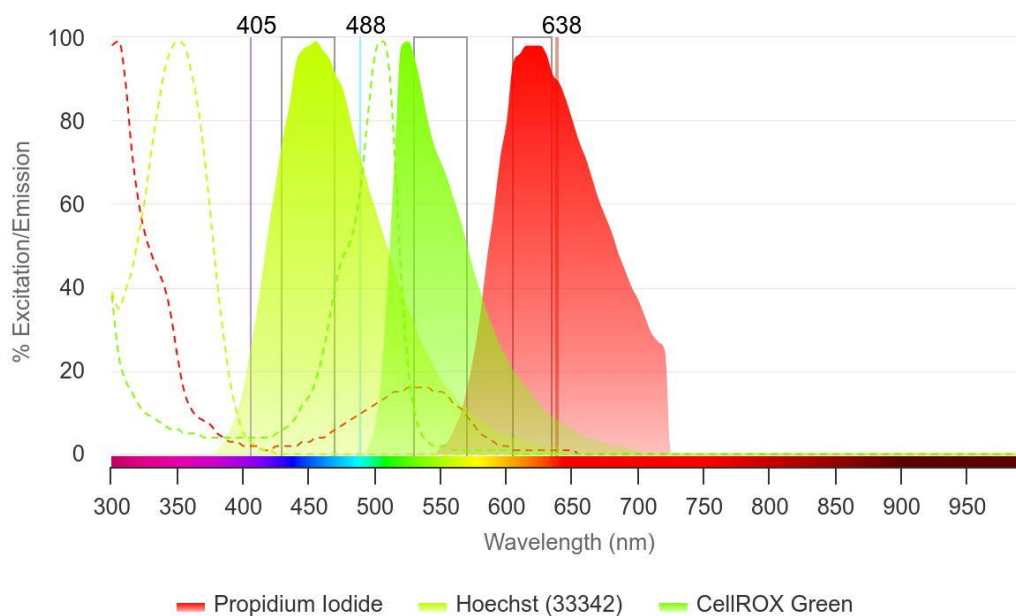
A metabolikus folyamatok eredményeként létrejövő reaktív oxigéngyökök egyes- és kettős DNS szál törések kialakulásához vezethetnek [26]. A DNS fragmentáció a replikációban jelentős hibát okoz. Az oxidáló szerek módosíthatják a bázisokat, amelyek helytelen párosodásával az eredeti bázisrend módosulása következik be.

A ROS vegyületek fehérjékben és lipidekben is a sejtek diszfunkciójához vagy sejthalálhoz vezető közvetlen károsodást okozhatnak [27]. A lipidperoxidáció és a sejthalál összefüggésbe hozható a sejtek fosfolipidjeire gyakorolt apoptózist indukáló hatásaival, a szfingomielináz aktiválásával és ceramid felszabadulással [28].

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.

A CellROX Green (CRG) lehetővé teszi a reaktív oxigénfajták (ROS) élő sejtekben való áramlási citometriás kimutatását, azonban a ROS-képződés, -felhalmozódás és -leépülés dinamikus életciklusáról – ami a makromolekulák oxidatív károsodásához, ennek következtében pedig sejthalálhoz vezet – az oxidatív stressz adatok félreértelmezése és a téves következtetések levonásának elkerülése érdekében többparaméteres módszerrel készíthetünk megfelelően értelmezhető profilt [29]. Mivel az oxidatív stressz a membránlipidek és fehérjék károsodásán keresztül sejthalált idézhet elő, a membránintegritás elemzése is kiemelkedően fontossá válik. Kísérleteim során a membránintegritás változásának nyomon követése céljából a minták által előidézett oxidatív stressz szintjét a Hoechst 33342-propidium-jodid kombinációval együttesen mértem. A CellROX Green sejt-permeábilis, azonban redukált állapotban nem fluoreszkál. Oxidációja után a fluorogén jel abszorpciós/emissziós maximuma

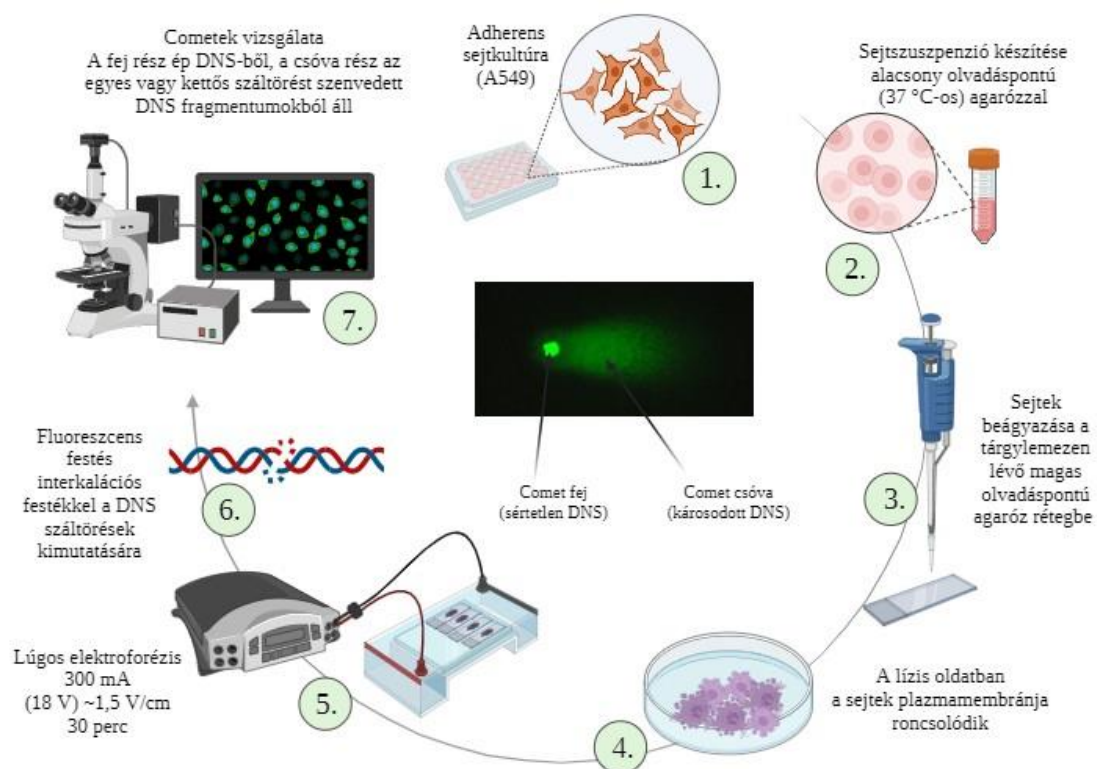
508/525 nm [30] (5. ábra). E reagens alkalmazása mellett negatív kontrollként antioxidáns hatású N-acetil-cisztein (NAC), pozitív kontrollként pedig a ROS-t indukáló terc-butil-hidroperoxid oldat (TBHP) használata javasolt.



4. ábra: Hoechst 33342, PI és CellROX Green festékek gerjesztési (szaggatott vonalak) és emissziós görbéi a hullámhossz függvényében. A csúcsokon lévő boxok az FL3, FL9 és az FL1-csatornákat jelöli, melyeken az alkalmazott citométer detektálja a festék emisszióját.

2.6. DNS károsodás (Comet teszt)

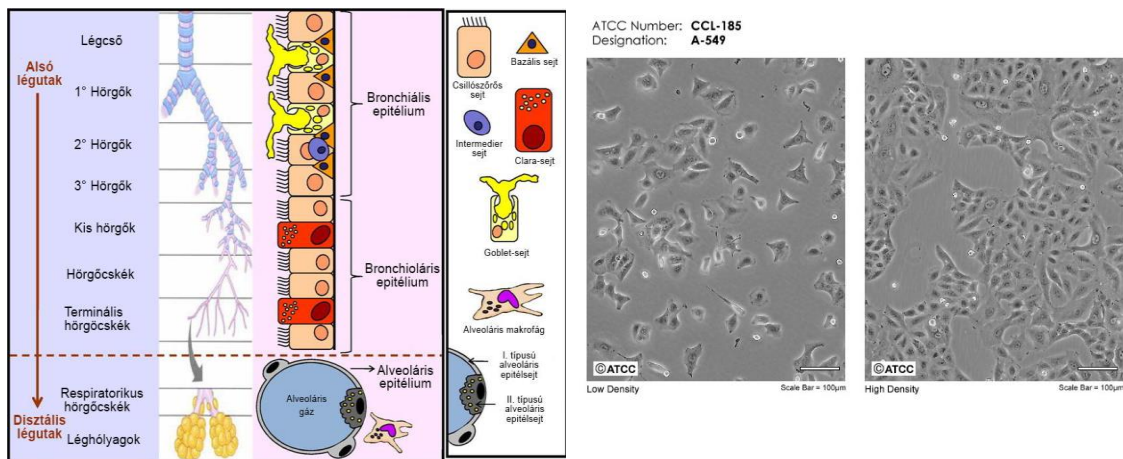
A Comet teszt egyedi sejtekben használható, a DNS egyes és kettős száltöréseinek és azok mértékének kimutatására. A Comet-teszt tehát a genotoxicitás értékelésére értékes módszer. A sejteket agaróz gélbe ágyazva mikroszkópos tárgylemezre helyezzük és nagy sókoncentráció mellett egy detergenssel lizáljuk, 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 futtatjuk. 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 reagenssel jelöljük, ami fluoreszcens mikroszkóp alkalmazásával válik megfigyelhetővé (6. ábra). 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 [31].



5. ábra: A Comet teszt sematikusan ábrája

2.7. Az A549 sejtvonaltól, mint testsejtektől

Mind alapkutatásokban, mind gyógyszerkutatásokban a tüdőszövet modellezésére leggyakrabban használt tüdőrák sejtvonaltól az FDA által tesztelt és jóváhagyott A549, mely aeroszol toxikológiai vizsgálatoknál is ideális. Ezt a sejtvonaltól először D. J. Giard és munkatársai tenyésztették ki egy 58 éves kaukázusi férfi tumorából származó tüdőrákszövetből 1972-ben [32]. Ez a sejtvonaltól hipotriploid adenocarcinoma alveoláris bazális epitelsejtekből áll (1. ábra) és a disztális légutakban helyezkedik el (7. ábra). Morfológiájukat tekintve az A549 sejtek laphám jellegűek (8. ábra). 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.



6. ábra: Az alsó légutak felépítése és sejtípusai³

7. ábra: Fáziskontraszt mikroszkópos felvételek A549 sejtekről eltérő konfluenciában. Méreetsávok: 100 µm⁴

3. Célkitűzés

A kutatást a Pannon Egyetem Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet, Levegőkémia Kutatócsoportjának egy korábbi kutatása, mégpedig a zárt terű hulladékégetésből származó aeroszolkarakterisztikájának megismerésére, illetve a környezeti PM₁₀ koncentrációhoz való hozzájárulásának számszerűsítésére tett 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.

A Levegőkémia Kutatócsoport munkájába bekapcsolódva célom vizsgálni a zárt térben elégetett hagyományos szilárd tüzelőanyagok (akác, csertölg, lignit, német brikett, cseh barnaszén, lengyel feketeszen), és ezekhez adagolt, háztartásokban előforduló műanyag hulladékok (PP, PE, PET, PS, PU) füstgázainak és aeroszolfrakcióinak cito- és genotoxicitását. A különböző hulladéktípusok egyedileg, illetve együttes elégetéséből származó részecskeminták biológiai hatását is vizsgálom, valamint célom az adott hulladéktípusra jellemző sejtleletani 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 [33]. Életben maradásuk érdekében az A549 sejteket 10% magzati szarvasmarhasérummal (FBS) módosított Dulbecco's MEM (DMEM) tápközegeben 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 (még nem teljes) a konfluenciájuk, akkor át kell helyezni a sejteket (legalábbis egy kisebb populációt) új flaskába, annak érdekében, hogy az osztódásukhoz a tér biztosítva legyen (25 cm² felületű flaskákkal dolgoztam, a későbbiekben részletezett eljárás során alkalmazott anyagi mennyiségek e flaskaméretre vonatkoznak). 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 flaskából aspirációs vákuumszívó rendszerrel (VACUSIP) eltávolítottam a (korábbi mycoplasma fertőzések elkerülése végett 10x hígításban egy széles spektrumú aminoglikozid antibiotikumot, Gentamicin szulfátot és 100x hígításban Penicillin-Sztreptomycin antibiotikumokat is tartalmazó) tápfolyadékot, majd háromszor átmostam 1-2 ml PBS-el. A mosás után 0,5 ml Tripszin-EDTA oldatot adtam a tenyésztő flaskába, annak érdekében, hogy a letapadt sejtek is kinyerhetők legyenek, majd ezután lezártam azt, és inkubátorba helyeztem, melyben 37 °C és 5% CO₂ tartalom van. 2 perc letelte után a flaskát vortexszel rázattam, majd miután mikroszkóppal való ellenőrzést követően meggyőződtem arról, hogy a sejtek ténylegesen leváltak, 1 ml teljes DMEM oltatot pipettáztam bele. Miután megfelelően leváltak a sejtek a flaska faláról, a sejtuszupenziót eppendorf csövekbe pipettáztam át, majd lecentrifugáltam a szuszpenziót 200G

sebességgel. Ezt követően a sejtekről lepipettáztam a felülúszó folyadékot és 1ml DMEM-t juttattam a csövekbe. A vortex-szel reszuszpendált sejtekből végeztem a sejtszámlálást, valamint a toxicitási teszteket.

4.2. Mintavétel és Mintaelőkészítés

A kutatócsoport illetékes tagjai a Servant S114 típusú, 5 kW fűtőteljesítményű öntöttvas kályhába helyezett egységnyi mennyiségű szilárd tüzelőanyag- és hulladéktípusokat kontrollált körülmények között elégették úgy, hogy az egyes minták égetése között a kályhát 10 percig 700 °C fölé melegítették a keresztszennyeződések elkerülése érdekében. A kémény egy mintavevőpontjából a keletkezett gázokat és PM₁₀ mérettartományba eső aeroszol részecskéket három, 1-1 dl desztillált vizet tartalmazó gázmosón vezették át. Ezeket a frakciókat elegyítették. A vízben elnyelődött frakció összetevőit 0,4 µm-es szűrőn szűrték. A minta összes szénttartalmát (TC = Total Carbon) meghatározták (1. táblázat), melynek ismeretében kiszámoltam az expozíciókhoz elkészítendő minták pontos koncentrációját a $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ keverési egyenlettel. A mintákat antibiotikum mentes tápközeggel keverve 5, 25 és 50 mg teljes szántartalom/l koncentrációra állítottam be.

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

A minta neve	TC (mg/l) szűrt	TC (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 feketeszen	112,8	124,5
Putnoki barnaszén	57,1	63,2
Bútorlap mix	50,33	56,3
PP (polipropilén) mix	154,6	203,3
PE (polietilén) mix	115,9	132,5
PET (polietilén-tereftalát) mix	170,1	208,8

PS (polisztirol) mix	220,4	276,3
PU (poliuretán) mix	93,6	90,3

A mérések során a 24 well-es plate-ben lévő lyukakba azonos mennyiségű, 40.000-100.000 közötti sejtet juttattam 1-1 ml DMEM-be wellenként. A sejteket az aeroszolokat és a füstgázfrakciót tartalmazó, 5 mg/l, 25 mg/l és 50 mg/l-es oldatokkal 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 sejtszuspenziót tartalmazó csövekbe. A mintákat 300G fordulatszámon 10 percig centrifugáltam, 1 ml PBS-el mostam, majd ugyanilyen paraméterekkel megismételtem a centrifugálást, végül reszuspendáltam a sejteket 500 µl PBS-ben. Az 1 ml mintákhoz 2 µl (1 µg/ml) Hoechst 33342 és 2,5 µl, 1.5 mM-os PI fluoreszcens festéket adtam, másik esetben ugyanezeket a festékeket a 2 µl, 2,5 mM-os, DMSO oldattal stabilizált CellROX Green festékkel való festés és a sejtszuspenzió 30 percig 37 °C-on 95 % CO₂ tartalom mellett való inkubálása után adtam. A harmadik módszer estében pedig 5 µl JC-1-et adtam 0,5 ml sejtszuspenzióhoz. A megfestett sejteket (további) 10 percig 37 °C-os termosztátban inkubáltam, végül flow citométerrel mértem.

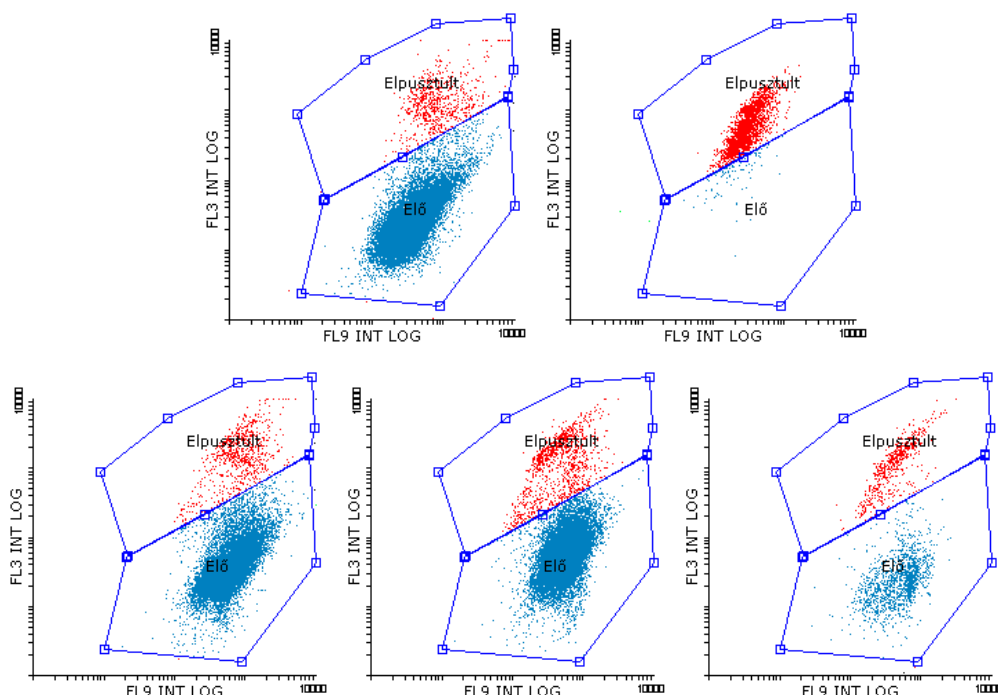
4.3. Flow citometria

Munkám során a fluoreszcens festékekkel festett minták vizsgálatát egy Beckman Coulter Gallios típusú flow citométerrel végeztem. A készülékben egy 405 nm-es, egy 488 nm-es és egy 633 nm-es gerjesztőlézer van. Amikor egy lézersor megvilágít egy sejtet, a sejtben lévő fluoreszcens molekulákat gerjeszti. A különböző fluorokrómok emissziójának észlelésére különböző detektorok alkalmazhatók, ezzel lehetővé válik a multiparaméteres elemzés. A fluorokrómok által kibocsátott fluoreszcencia detektálására az általam használt készülékben 10 detektor szolgál. Az FL9 – FL10 detektorok az ibolyaszín gerjesztő lézerhez, az FL6 – FL8 detektorok a vöröshöz, az FL1 – FL5 detektorok pedig a kék gerjesztő lézerekhez tartoznak külön optikai utakhoz tartozva. 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 3-5 percig vagy 20000 detektált esemény eléréséig tartott. A citométerhez tartozó Gallios 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.

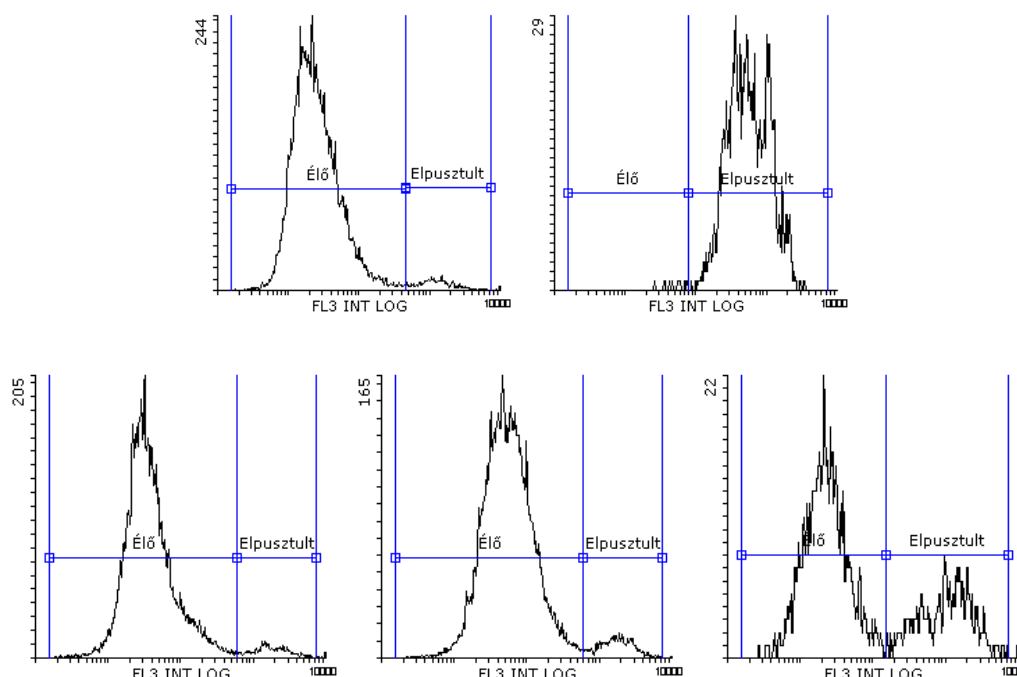
4.3.1. Hoechst 33342- propídium-jodid festés és kapuzási stratégia

A viabilitás vizsgálatot először a sejtmembrán áteresztő és a DNS AT-gazdag régióihoz kötődő Hoechst 33342, valamint 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 elpusztult sejtek populációi (9. ábra). Az eredményeket az élő és elhalt sejtek százalékos arányával jellemeztem.



9. ábra: Példa egy (rendre) negatív kontroll (DMEM), egy pozitív kontroll (0,5 mM Ag nanorészcseke) és az 5 mg/l-es, 25 mg/l-es és az 50 mg/l-es koncentrációjú PE mintával kezelt sejtek populációinak kapuzására FL3log/FL9log pontdiagramokon.

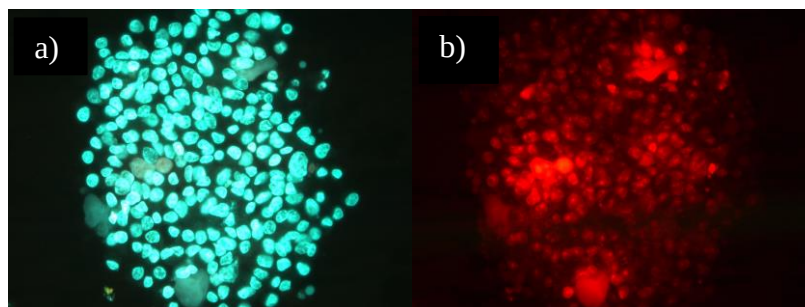
Használható továbbá egy másik kiértékelési módszer, amelyben a sejtpopuláció detektor által érzékelt eseményeit hisztogramon ábrázoljuk (10. ábra).



10. ábra: A festett élő és elhalt sejtek populációinak FL3 fluoreszcencia intenzitásának ábrázolása egydimenziós hisztogramon. Rendre: negatív kontroll (DMEM), pozitív kontroll (0,5 mM Ag nanorészecske), az 5 mg/l, a 25 mg/l és az 50 mg/l koncentrációjú, PE-vel terhelt tüzelőanyag égéséből származó füstgázfrakcióval kezelt minta

Ekkor a jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitásának függvényében ábrázolt eseményszám 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.

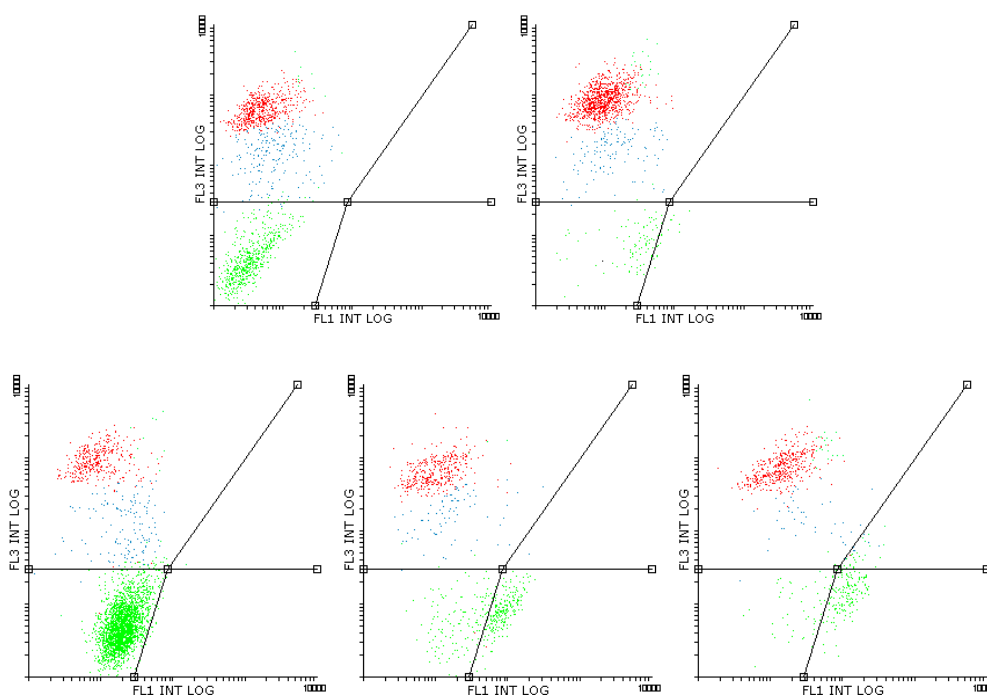
A mintákat fluoreszcens mikroszkóppal is vizsgáltam. A kék és a vörös fluoreszcencia gerjesztésére és kimutatására alkalmas szűrőkockákat alkalmazva detektáltam a sejteket.

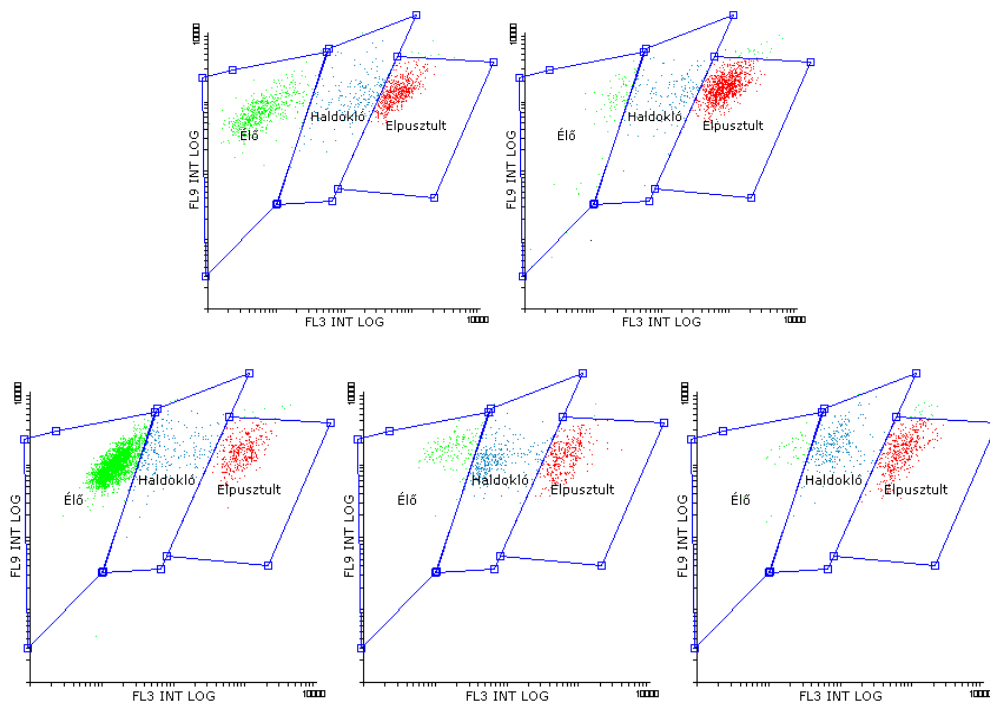


11. ábra: Hoechst33342-vel (a) és Propidium-jodiddal (b) festett A549 sejtek
(azonos sejtpopuláció látható a képeken)

4.3.2. Hoechst 33342- propídium-jodid és CellROX Green festés, kapuzás

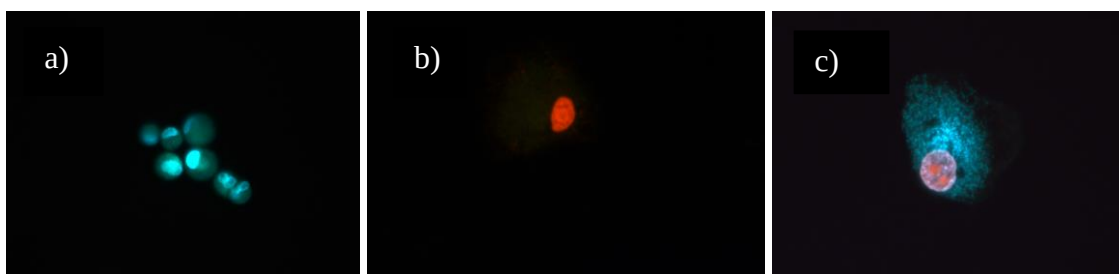
A fentebb bemutatott két reagens-kombinációt a CellROX Green (CRG) jelöléssel egészítettem ki annak érdekében, hogy az apoptotikus sejthalál folyamatában meghatározó szerepet játszó reaktív oxigén specieszek képződési mechanizmusáról és mennyiségéről is átfogó képet kapjak. A H-PI együttese az FL9–FL3-csatorna jeleiből vizualizálható, a CRG pedig az FL1-csatornán mutat megnövekedett fluoreszcenciát. A sejtpopulációk kapuzását FL1/FL3, valamint FL3/FL9 pontdiagramok alapján végeztem. Előbbi kiértékelése során (12. ábra felső blokk) megadtam az élő sejtek és az emelkedett fluoreszcenciát mutató jelek arányát, utóbbin (12. ábra alsó blokk) pedig egymástól megkülönböztetve rögzítettem az élő, a haldokló (moribund), valamint az elpusztult sejtek populációját.





12. ábra: A PE-vel terhelt tüzelőanyag égéséből származó füstgázfrakcióval kezelt sejtek populációi az FL1log/FL3log (fent) és az FL3log/FL9log (lent) detektor jelei alapján Rendre: negatív kontroll (DMEM), pozitív kontroll (0,5 mM Ag nanorészecske), az 5 mg/l, a 25 mg/l és az 50 mg/l koncentrációjú, PE-vel terhelt tüzelőanyag égéséből származó füstgázfrakcióval kezelt minta

A Hoechst 33342 – Propidium-jodid – CellROX Green festékkombinációval jelölt sejteket is vizsgáltam fluoreszcens mikroszkóppal, a készült felvételeket az alábbi ábrán tüntettem fel (13. ábra).



13. ábra: Hoechst33342-vel (a) Propidium-jodiddal (b) és CellROX Green-nel (c) együttesen festett A549 sejtek különböző szűrőkockák alkalmazása mellett megfigyelve.

4.4. Alkalikus Comet teszt

A dezoxiribonukleinsav károsodásának mérésére használatos az egysejtes gélelektroforézis. A sejtek agaróz gélbe ágyazását követően magas só és detergens koncentráció mellett azok citoplazmájának lúgos közegben való emésztése valósul meg. Az emésztés után visszamaradó sejtmag DNS tartalmának kettős hélix szerkezete alkalikus közegben felbomlik, így lehetővé válik az egyszeres száltörések, sőt a magas pH-n egyszeres száltöréssé alakuló lúglabilis sérülések kimutatása, analizálása is.

A 0,5 ml PBS-ben szuszpendált sejtek mennyiségét Bürker-kamra segítségével számszerűsítettem. Ennek alapján egy detergenssel zsírtalanított, majd 1%-os NMPA (normál olvadáspontú) agarózzal előrétegezett mikroszkóp tárgylemezre felvittem a sejtsuszpenziót úgy, hogy a sejtsuszpenzió 100 µl-éből és az 1%-os LMPA (alacsony olvadáspontú agaróz) 65 µl-éből álló elegyből 75 µl-t juttattam a már lemezen lévő agaróz gélbe. Végül pedig 1%-os NMPA oldatból fedőréteget képeztem a beágyazott sejtekre. A tárgylemezeket ezt követően a 2,5 M NaCl-t, 100 mM tetranátrium-EDTA-t, 10 mM Tris bázist, N-lauril-szarkozint (1 tömeg/térf.) tartalmazó, 10 térfogatszázalék dimetil-szulfoxiddal (DMSO) kiegészített 10-es pH-jú hideg lízis oldatba helyeztem minimálisan 1 órától akár több napig terjedő intervallumig (A protokollok szerint körülbelül egy hétig nem befolyásoló tényező a kísérlet ezen pontján az alkalmazott időintervallum). A lízis oldatból kivett lemezeket ezt követően mostam a 0,3 M NaOH-ból, 10 mM tetranátrium-EDTA-ból, és 2 térfogatszázalék DMSO-ból álló, 13,1-es pH-jú oldattal, majd ugyanilyen oldattal feltöltött elektroforézis kádba helyeztem a lemezeket. 30 perc várakozási idő eltelte után állandó áramerősség ((300 mA, ~1,5 V/cm) mellett 30 percig futtattam. A lemezeket desztillált vízzel háromszor 5-5 percig mostam, majd etanollal fixáltam. A megfuttatott és fixált sejteket 50 µl 1x VistaGreen fluoreszcens festékkel kezeltem, végül 25 perc sötét helyen való száradást követően fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam, fényképeket készítettem (20. ábra), majd a cometeket TriTek CometScore ver. 2.0.0.38 programmal elemeztem és az 50 mg/l koncentrációjú mintákból készült párhuzamosokat összevontan értékeltem (pool testing).

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 következő képlettel számoltam:

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

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. A programmal futtatott eredményeket szövegesen közlöm az Eredmények és értékelésük című fejezetben.

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

ahol: 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

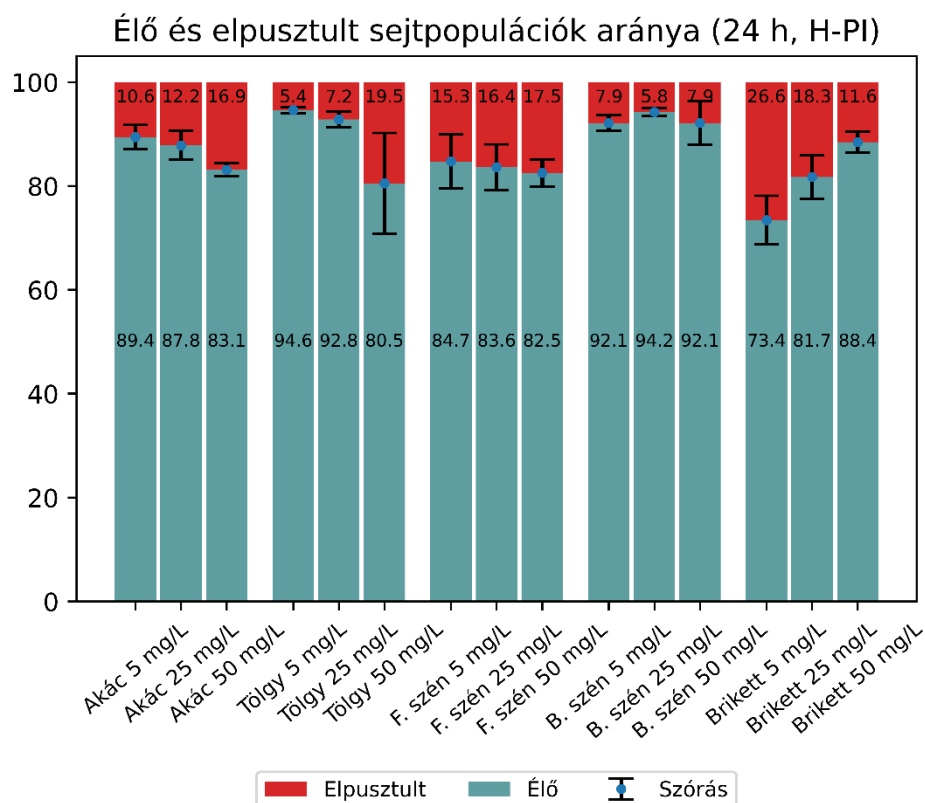
5.1. Ezüst nanorészecske, mint pozitív kontroll

Az ezüst nanorészecske (AgNP) toxikus hatással van az általam vizsgált A549-es sejtekre, ezért a H-PI festésnél 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 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 (9-10. ábra).

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

A flow citométeres viabilitás (H-PI) vizsgálatok során 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 oszlopdiagrammon (16. ábra) fogaltam össze.

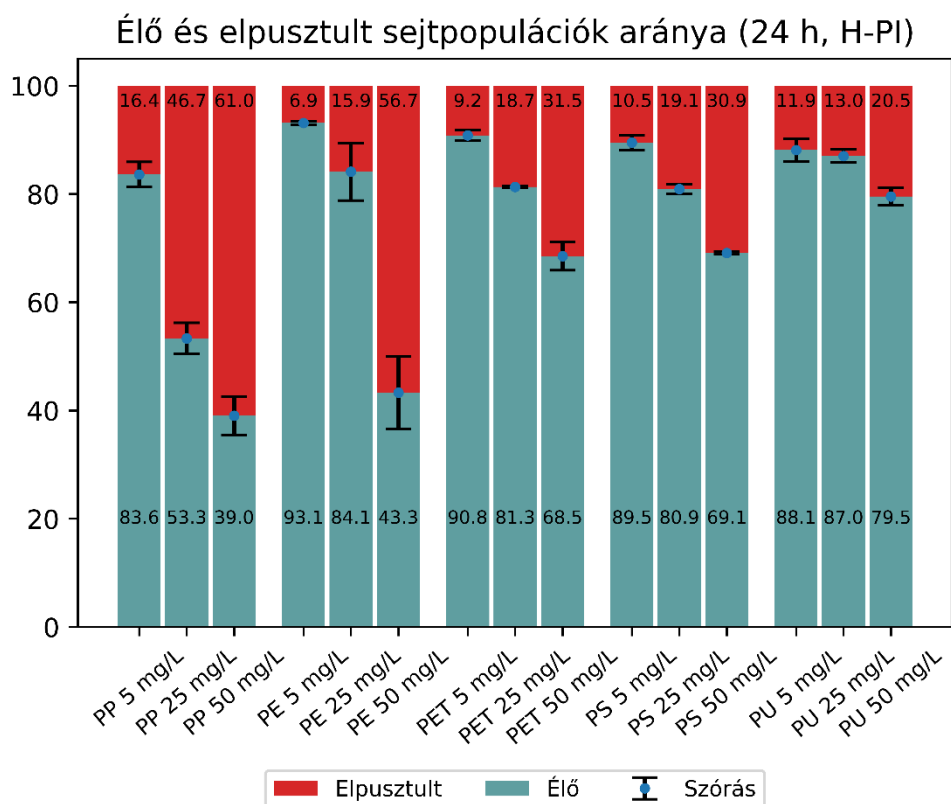


16. ábra: Élő és elhalt sejtpopulációk aránya a sejtek hagyományos tüzelőanyagok füstgázfrakcióival történő 24 órás expozíciója után.

Először a hagyományos tüzelőanyagok égéséből származó aeroszolok 24 órás expozícióinak potenciális toxikus hatásait (16. ábra) elemzem. Előzetes elvárásaink szerint a legtöményebb mintának kellene a legtöbb elhalt sejtet eredményeznie, ez a német brikett és a barna szén kivételével igazolódott. Az akác, a tölgy és a lengyel feketeszen 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 cseh barnaszén mintának a különböző koncentrációi sem egymáshoz, sem a negatív kontrollhoz képest nem mutattak szignifikáns különbséget a sejtek életképességének csökkentésében.

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. A tápanyaghatás nevű jelenség miatt - miszerint minél nagyobb az alkalmazott koncentráció, annál több tápanyagot kapnak a sejtek - valószínűsíthető, hogy a fordított tendencia a mérés megismétlését követően is fennáll majd.

5.3. Műanyagokkal terhelt tüzelőanyagok elégetéséből származó aeroszolok hatása a humán tüdősejtekre.

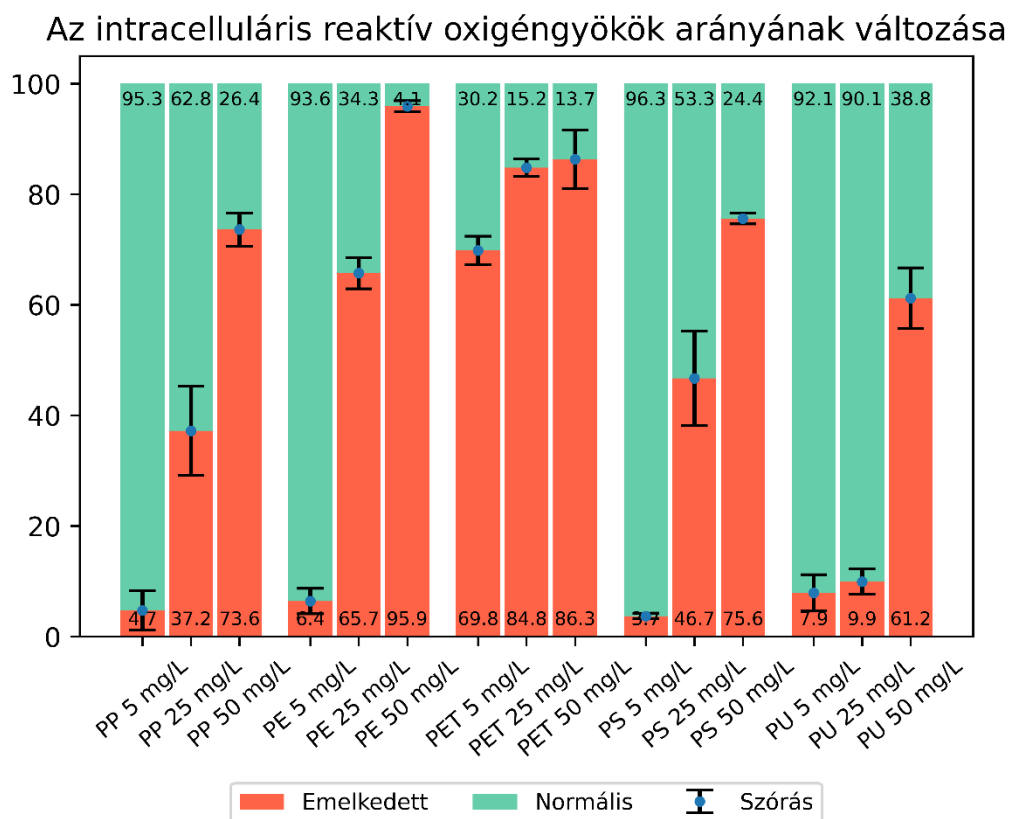


17. ábra: Élő és elhalt sejtpopulációk aránya a sejtek műanyagokkal terhelt hagyományos tüzelőanyagok égéséből származó füstgázfrakcióival történő 24 órás expozícióját követően.

A fa -, illetve szénmintákhoz viszonyítva szembetűnő a különbség, miszerint a műanyagok égéséből származó aeroszolatot tartalmazó minták (17. ábra) a humán tüdősejtekre nézve toxikusabbak. A jellemző tendencia ez esetben is megfigyelhető, vagyis a töményebb minta nagyobb arányú sejtpusztulást okoz. Az EN ISO 10993-5, 8.5 szakasza [34] alapján *"A sejtek életképességének több mint 30%-kal való csökkentése citotoxikus hatásnak számít."* Ennek értelmében citotoxikusnak mondható a PP 25 mg/L, továbbá a PP, PE, PET és PS 50 mg/L koncentrációban. Kiugróan toxikusnak mondható a PP és PS minta, előbbi már 25 mg/l koncentrációban is nagy arányú sejtpusztulást eredményez. A PU minta viszont 50 mg/L-es koncentrációban sem eredményez 30%, vagy annál nagyobb sejtpusztulást, azonban emelkedett az elhalt sejtek aránya.

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. Számításaimat a hagyományos tüzelőanyagok égetése során keletkezett aeroszolok, a műanyaggal terhelt tüzelőanyagokból származó aeroszolok (PP, PE, PET, PS, PU) és a kezeletlen A549 sejtek életképességét jelző mutatóik összehasonlításával végeztem. A szignifikanciák meghatározására minden esetben az adott méréshez és adott expozíciós időhöz tartozó negatív kontrollok élő sejtjeinek arányát hasonlítottam az 50 mg/l koncentrációjú frakciókkal kezelt sejtpopulációk élő sejtjeinek arányához. A legfőbb következtetés pedig az, hogy a hagyományos tüzelőanyagok égéséből származó aeroszolok a vizsgált koncentrációkban nem, míg a műanyagok égéséből létrejött aeroszolok a legtöményebb alkalmazott koncentrációban a PU kivételével toxikusak a sejtekre nézve.

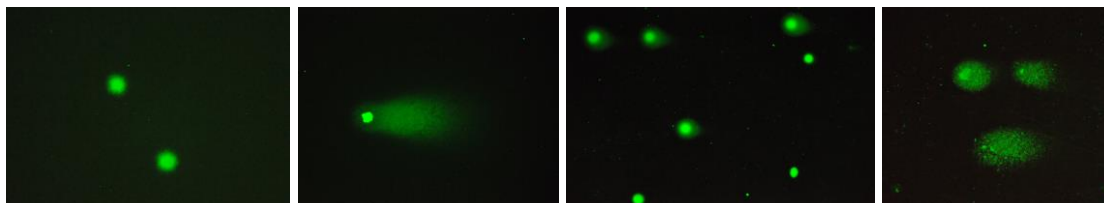
A H-PI-CRG mérés értékelése során az FL1log/FL3log detektorok jelei alapján az alacsony (12. ábra, felső sor, bal alsó régió) és emelkedett (12. ábra, felső sor, jobb alsó régió) FL1-FL3 fluoreszcencia intenzitású eseményszámok egymáshoz viszonyított arányát adtam meg (19. ábra). Azt mutattam ki, hogy a minták dózisfüggő mértékben indukálták a reaktív oxigéngyököket. Tehát a koncentrációk növekedésével nagyobb mértékű a ROS-ok által előidézett oxidatív stressz, ezáltal a CellROX Green marker a sejten belül több gyökhöz tud kapcsolódni, ami a sejten belül nagyobb zöld jelintenzitást generál. Danielsen és mtsi (2011) kimutatták, hogy a környezeti levegő és a füst részecskék szervesanyag-tartalma meghatározó hatással a DNS-károsodás indukciójában a humán A549 és a THP-1 sejtvonalakban. Kutatásukban az oxi-PAH és kinon vegyületek jelentősen hozzájárultak az oxidatív stressz hatásához; azt a glutation csökkenéseként értékelték a THP-1 makrofág sejtekben [35]. A megnövekedett oxidatív stressz szintjét a DNS károsodás értékeléséről szóló fejezetben (5.4.) fogom korreláltatni a minták genetikai állományra kifejtett toxikus hatásainak mértékével.



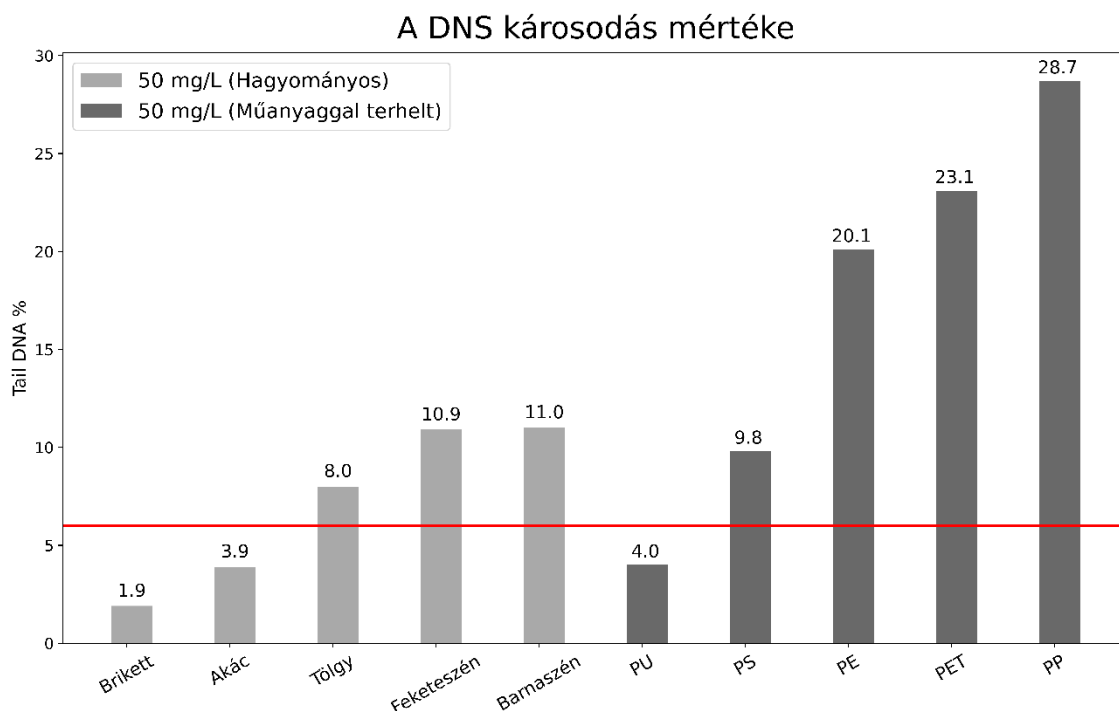
19. ábra: A H-PI-CRG festés során tapasztalt fluoreszcencia változások az alkalmazott műanyag égetéséből származó aeroszol mintakonzentrációk függvényében

5.4. A DNS károsodás mértékének kimutatása – Comet teszt

A következőkben a DNS károsodás feltárására vonatkozó kísérleti eredményeket mutatom be (20. és 21. ábra).



20. ábra: Fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgált minták
rendre: negatív kontroll, pozitív kontroll, feketeszen 50 mg/L, PET 50 mg/L



21. ábra: A DNS károsodás mértékének számszerűsítése

Az eredmények alapján a műanyaggal terhelt aeroszol minták genotoxikus hatása jelentősebb a hagyományos tüzelőanyagok elégetéséből származó aeroszolonakénál. Irodalmi említések szerint egy minta pozitívnak tekinthető, amennyiben a párhuzamosok csóva DNS% mediánjának átlaga 5-10% tartományba esik. A JaCVAM VMT és az OECD 489-es irányelvek által meghatározott adatelfogadhatósági kritériumok alapján negatívnak tekintettem azt a mintát, amelynek a csóva DNS % értéke a 6%-ot nem haladja meg [36]. Három párhuzamos mérés összevont (lsd. 4.4. fejezet) eredményei tükrében az 50 mg/l koncentrációjú tölgy, feketeszén, barnaszén minták kis mértékben, továbbá a PS, PE, PET, PP minták fokozottan okoztak genetikai károsodást a humán A549 tesztsejtekben, míg a brikett, akác, és poliuretánnal terhelt tüzelőanyagokból származó aeroszolonak nem mutattak károsító hatást a sejtek genetikai állományára nézve.

A genotoxicitás eredmények néhány kivétellel korrelációban vannak a citotoxicitás vizsgálatban kapott eredményekkel. Mindkét vizsgálati módszerben egyértelműen a legtoxikusabbnak a polipropilén aeroszolonak tartalmazó füstgázfrakció bizonyult. Jelentős károsító hatású továbbá a PE és PET aeroszolonak tartalmazó minta is, mind a sejtek életképességére, mind genetikai állományukra nézve.

A H-PI-CRG kombináció alkalmazásával az FL1-FL3 detektorok jelei alapján a fluoreszcencia intenzitások dózisfüggő emelkedését állapítottam meg, ami a ROS-ok által

indikált oxidatív stressz szintjének növekedését, ezáltal a DNS károsodást foglalja magában. Ezt az általam elvégzett Comet teszt eredményei is igazolják. A PP, PE, PET és PS minták a leginkább genotoxikusak, és ezekben a mintákban legnagyobb az FL1-FL3 fluoreszcencia intenzitás növekedése. A PU kisebb mértékben okoz oxidatív stresszt, így a DNS károsító hatása is kisebb.

Az általam vizsgált minták eredményeit összevetve Kovács et al hasonló mintákon, más tesztekkel mért eredményeivel (a genotox SOS Chromotesttel, a *Vibrio fischeri* baktériumtözsön és a *Daphnia magna* vizibolhán vizsgált ökotox tesztekkel), analógiát figyeltem meg [1]. A Chromotest számszerűsítésére szolgáló SOSIF értékek kiugróan magasak voltak a PS, PP, valamint a PU minták esetében is. Utóbbi a Comet tesztben nem mutatott szignifikáns genotoxikus hatást. Másik különbség, hogy a PE SOSIF értéke nem érte el a pozitívnak tekinthető 1,5 feletti határértéket, azonban a csóva DNS %-a kiugróan magas volt.

A Chromotest egy baktérium alapú teszt. Az ezzel kapott eredmények jó indikátorai lehetnek annak, hogy egy mintának lehet genotoxikus hatása, de nem minden esetben extrapolálható a baktériummal mért eredmény egy magasabb rendű szervezettel kapott eredményhez. Metabolikus aktivitás imitálására alkalmazható az S9 májenzim frakció, amit patkánymájból vonnak ki. Az S9 frakció olyan enzimek keverékét tartalmazza, mint a citokróm P450-ek, flavintartalmú monooxigenázok és más, a gyógyszer-metabolizmusban részt vevő enzimek. Ezt a keveréket gyakran használják in vitro genotoxicitási vizsgálatokban, hogy szimulálják a genotoxikussághoz biotranszformációt igénylő vegyi anyagok metabolikus aktiválódását [37].

A műanyaggal terhelt tüzelőanyagok égetése során PAH-vegyületek (néhányat kiemelve: naftalin, 2-metil-naftalin, fluorén, fenantrén, antracén, benzantracén, pirén) szabadulnak fel, melyek szignifikáns hozzájárulást mutattak a genotoxicitáshoz. Emellett a mintákban jelenlévő fém- és nehézfém (Cr, Cd, Mo, Ni, Sb, Zn) részecskék koncentrációja is összefüggésben van a káros hatással. A mintákban jelenlévő PAH és nehézfém koncentráció, valamint a SOSIF értékek között jelentős korrelációt figyeltek meg, mely vonatkoztatható a Comet tesztben megfigyelt hatásokra is.

6. Összefoglalás

Munkám során hagyományos szilárd tüzelőanyagok és háztartási hulladékok egyéni és együttes elégetéséből keletkező aeroszolok potenciális toxicitását vizsgáltam meg. Ehhez Hoechst 33342 - propídiium-jodid fluoreszcens festékkombinációval kivitelezett viabilitás vizsgálatot, a reaktív oxigénvegyületek a sejtek életképességét befolyásoló szerepének tanulmányozására pedig Hoechst – Propidium-jodid – CellROX Green markerekkel történő fluoreszcens festést végeztem. A genetikai károsodás mértékét Comet teszttel számszerűsítettem.

A vizsgált minták között akác, tölgy, német brikett, cseh barnaszén, lengyel feketeszen, illetve fához adagolt PE, PP, PET PS és PU szerepeltek. Az elvégzett mérések alapján a PU kivételével az összes műanyag, azaz PE, PP, PET és PS égéséből eredő 50 mg/l koncentrációjú, valamint a PP 25 mg/L koncentrációjú mintái mutattak szignifikáns toxicitást a negatív kontrollokhoz képest, tehát az EN ISO 10993-5, 8.5 szabvány tekintetében citotoxikus hatással voltak a humán A549 sejtekre, vagyis az elpusztult sejtek aránya meghaladta a 30%-ot. A H-PI-CRG fluoreszcens festés alapján a minták dóziszfüggő mértékben indukálták a reaktív oxigéngyököket. Tehát a koncentrációk növekedésével a CellROX Green marker több RO gyökhöz konjugálódik, ennek következtében az oxidatív stressz mértékét jelző zöld fluoreszcencia intenzitása megnőtt.

A genotoxicitás (Comet teszt) eredmények néhány kivétellel korrelációban vannak a citotoxicitás vizsgálatban kapott eredményekkel. Három párhuzamos mérés eredményei tükrében az 50 mg/l koncentrációjú tölgy, feketeszen, barnaszén minták kis mértékben, továbbá a PS, PE, PET, PP mintákból származó aeroszolok fokozzák a sejtekben az oxidatív stresszt, ami hozzájárulhat a A549 tesztsejtekben tapasztalt genotoxicitáshoz. A brikett, az akác, és a poliuretánnal terhelt tüzelőanyagokból származó aeroszolok viszont nem mutattak károsító hatást a sejtek genetikai állományában. Ezen információk összefüggésbe hozhatók a ROS-ok oxidatív stresszt, ezáltal a genetikai állomány károsodását okozó tulajdonságaival.

Habár az emberek egyre inkább felismerik a háztartási hulladékok elégetésének mind a környezetre, mind az egészségre kifejtett káros hatásait, az eredményeim tükrében is fontos tudatosítani a lakosság körében, hogy e tevékenység számos egészségügyi veszélyt és kockázatot rejt magában.

Irodalomjegyzék

- [1] N. Kováts, K. Hubai, T.A. Sainnokhoi, B. Eck-Varanka, A. Hoffer, Á. Tóth, B. Kakasi, G. Teke, Ecotoxic emissions generated by illegal burning of household waste, *Chemosphere* 298 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134263>.
- [2] A. Hoffer, B. Jancsek-Turóczi, Á. Tóth, G. Kiss, A. Naghiu, E. Andrea Levei, L. Marmureanu, A. MacHon, A. Gelencsér, Emission factors for PM10 and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from illegal burning of different types of municipal waste in households, *Atmos Chem Phys* 20 (2020) 16135–16144. <https://doi.org/10.5194/acp-20-16135-2020>.
- [3] U. Pöschl, Atmospheric aerosols: Composition, transformation, climate and health effects, *Angewandte Chemie - International Edition* 44 (2005) 7520–7540. <https://doi.org/10.1002/anie.200501122>.
- [4] J.A. Bernstein, N. Alexis, C. Barnes, I.L. Bernstein, J.A. Bernstein, A. Nel, D. Peden, D. Diaz-Sanchez, S.M. Tarlo, P.B. Williams, Health effects of air pollution, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114 (2004) 1116–1123. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.08.030>.
- [5] P.M. Lemieux, C.C. Lutes, D.A. Santoianni, Emissions of organic air toxics from open burning: a comprehensive review, *Prog Energy Combust Sci* 30 (2004) 1–32. <https://doi.org/10.1016/J.PECS.2003.08.001>.
- [6] C. Wiedinmyer, R.J. Yokelson, B.K. Gullett, Global emissions of trace gases, particulate matter, and hazardous air pollutants from open burning of domestic waste, *Environ Sci Technol* 48 (2014) 9523–9530. <https://doi.org/10.1021/es502250z>.
- [7] S.D. Bernal, H.M. Shapiro, L.B. Chen, Monitoring the effect of anti-cancer drugs on L1210 cells by a mitochondrial probe, rhodamine-123, *Int J Cancer* 30 (1982) 219–224. <https://doi.org/10.1002/IJC.2910300215>.
- [8] R. Geyer, J.R. Jambeck, K.L. Law, Production, use, and fate of all plastics ever made, 2017. <http://advances.sciencemag.org/>.

- [9] A. Hoffer, A. Meiramova, Á. Tóth, B. Jancsek-Turóczi, G. Kiss, Á. Rostási, E.A. Levei, L. Marmureanu, A. Machon, A. Gelencsér, Assessment of the contribution of residential waste burning to ambient PM10 concentrations in Hungary and Romania, *Atmos Chem Phys* 24 (2024) 1659–1671. <https://doi.org/10.5194/acp-24-1659-2024>.
- [10] E. Fröhlich, S. Salar-Behzadi, Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: Role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in Silico Studies, *Int J Mol Sci* 15 (2014) 4795–4822. <https://doi.org/10.3390/ijms15034795>.
- [11] Z. Ren-Jian, H. Kin-Fai, S. Zhen-Xing, The Role of Aerosol in Climate Change, the Environment, and Human Health, *Atmospheric and Oceanic Science Letters* 5 (2012) 156–161. <https://doi.org/10.1080/16742834.2012.11446983>.
- [12] M. Rieseberg, C. Kasper, K.F. Reardon, T. Scheper, Flow cytometry in biotechnology, *Appl Microbiol Biotechnol* 56 (2001) 350–360. <https://doi.org/10.1007/s002530100673>.
- [13] J. Flores-Gonzalez, J.C. Cancino-Díaz, L. Chavez-Galan, Flow Cytometry: From Experimental Design to Its Application in the Diagnosis and Monitoring of Respiratory Diseases, *Int J Mol Sci* 21 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.3390/IJMS21228830>.
- [14] Hoechst 33342-Biotium 40047 (2019.)
- [15] Propidium Iodide Nucleic Acid Stain, Molecular Probes (2006.)
- [16] A. Pollack, G. Ciancio, Chapter 3 Cell Cycle Phase-Specific Analysis of Cell Viability Using Hoechst 33342 and Propidium Iodide after Ethanol Preservation, *Methods Cell Biol* 33 (1990) 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60508-7](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60508-7).
- [17] L.C. Crowley, B.J. Marfell, A.P. Scott, N.J. Waterhouse, Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry, *Cold Spring Harb Protoc* 2016 (2016) 953–957. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>.
- [18] P.X. Petit, H. Lecoœur, E. Zorn, C. Dauguet, B. Mignotte, M.L. Gougeon, Alterations in mitochondrial structure and function are early events of

- dexamethasone-induced thymocyte apoptosis., *Journal of Cell Biology* 130 (1995) 157–167. <https://doi.org/10.1083/JCB.130.1.157>.
- [19] A. Cossarizza, C. Franceschi, D. Monti, S. Salvioli, E. Bellesia, R. Rivabene, L. Biondo, G. Rainaldi, A. Tinari, W. Malorni, Protective Effect of N-Acetylcysteine in Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis in U937 Cells: The Role of Mitochondria, *Exp Cell Res* 220 (1995) 232–240. <https://doi.org/10.1006/EXCR.1995.1311>.
- [20] L.C. Liu, Z.S. Wu, J.L. Chen, Z.F. Wu, H.C. Lai, Y.H. Huang, Mitochondrial Dysfunction Involved in the Cytotoxicity of Tramadol in Human Endometrial Carcinoma Cells, *Int J Mol Sci* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms24010099>.
- [21] F. Sivandzade, A. Bhalerao, L. Cucullo, Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe, (2019). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3128>.
- [22] A. Perelman, C. Wachtel, M. Cohen, S. Haupt, H. Shapiro, A. Tzur, JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry, *Cell Death Dis* 3 (2012). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.171>.
- [23] G. Chen, Y. Yang, C. Xu, S. Gao, A Flow Cytometry-based Assay for Measuring Mitochondrial Membrane Potential in Cardiac Myocytes After Hypoxia/Reoxygenation, *J. Vis. Exp* (2018) 57725. <https://doi.org/10.3791/57725>.
- [24] B. Xiao, X. Deng, W. Zhou, E.K. Tan, Flow cytometry-based assessment of mitophagy using mitotracker, *Front Cell Neurosci* 10 (2016). <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00076>.
- [25] P.D. Ray, B.W. Huang, Y. Tsuji, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cell Signal* 24 (2012) 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.
- [26] R.J. Aitken, K.T. Jones, S.A. Robertson, Reactive oxygen species and sperm function-in sickness and in health, *J Androl* 33 (2012) 1096–1106. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535>.
- [27] E.R. Stadtman, R.L. Levine, Protein Oxidation, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899: 191-208., 2006. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>.

- [28] G.O. Fruehwirth, A. Hermetter, A. Hermetter, P.J. Quinn, X. Wang, Mediation of Apoptosis by Oxidized Phospholipids, 2008.
- [29] V. Fallico, M. Rea, C. Stanton, N. Iles, J. McKinney, Next-generation multiparameter flow cytometry assay improves the assessment of oxidative stress in probiotics, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103501>.
- [30] T. Fisher Scientific, CellROX® Green and CellROX® Orange Flow Cytometry Assay Kits *formulated for flow cytometry* *for oxidative stress detection*, n.d. www.lifetechnologies.com/flowcytometry.
- [31] D.W. Fairbairn, P.L. Olive, K.L. O'Neill, The comet assay: a comprehensive review, ELSEVIER, 1995.
- [32] D.J. Giard, S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Doslik, W.P. Parks, In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors, 1973. <http://jnci.oxfordjournals.org/>.
- [33] Z.J. Lu, Y.Q. Ren, G.P. Wang, Q. Song, M. Li, S.S. Jiang, T. Ning, Y.S. Guan, J.L. Yang, F. Luo, Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549, J Exp Clin Cancer Res 28 (2009). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-16>.
- [34] ISO 10993-5:2009 (en), Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, (n.d.). <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en> (accessed March 19, 2024).
- [35] P.H. Danielsen, P. Møller, K.A. Jensen, A.K. Sharma, H. Wallin, R. Bossi, H. Autrup, L. Mølhave, J.L. Ravanat, J.J. Briedé, T.M. De Kok, S. Loft, Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines, Chem Res Toxicol 24 (2011) 168–184. <https://doi.org/10.1021/tx100407m>.
- [36] J.P. McNamee, P. V. Bellier, Use of a standardized JaCVAM in vivo rat comet assay protocol to assess the genotoxicity of three coded test compounds; ampicillin trihydrate, 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride, and N-nitrosodimethylamine, Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 786–788 (2015) 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.02.005>.

- [37] C. Jagger, M. Tate, P.A. Cahill, C. Hughes, A.W. Knight, N. Billinton, R.M. Walmsley, Assessment of the genotoxicity of S9-generated metabolites using the GreenScreen HC GADD45a–GFP assay, *Mutagenesis* 24 (2009) 35–50.
<https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEN050>.

A képek jegyzéke

-
- [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.)
A Comet teszt sematikus ábráját (6. ábra) a BioRENDER tudományos kép- és illusztrációkészítő programmal szerkesztettem.

Köszönetnyilvánítás

Hálával és köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Dr. Kakasi Baláznak*, aki lelkesedéssel és rendkívül segítőkészen támogatott a munkám során.

Szeretném külön kifejezni köszönetemet a *Levegőkémia Kutatócsoport* munkatársainak, *Dr. Gelencsér Andrásnak*, *Dr. Jancsek-Turóczy Beatrixnek*, *Dr. Hoffer Andrásnak* és *Dr. Tóth Ádámnak*, hogy rendelkezésemre bocsátották a hulladékégetésből származó aeroszol mintákat.

Köszönet illeti a *Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet munkatársait*, akik szakmai tanácsokkal, kedves hozzáállásukkal és jó hangulatú beszélgetésekkel járultak hozzá a TDK munkám elkészüléséhez.