

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Particulate matter (PM) influence on S-nitrosothiols stability as a potential health risk factor

mgr Anna Wądołek

Praca doktorska została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Stochel i dr Marii Oszajcy (promotor pomocniczy) oraz na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Ewy Kondurackiej.

Rozprawa doktorska powstała w trakcie realizacji Środowiskowych Studiów Doktoranckich w ramach Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16, "Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej" InterDokMed, realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

Od wielu lat rośnie zainteresowanie biologiczną rolą S-nitrozotioili z uwagi na ich udział w szlakach sygnalizacji tlenu azotu (NO). S-nitrozacja białek jest procesem odwracalnego przyłączania tlenu azotu do reszt tiolowych cysteiny, będącego ważnym mechanizmem regulacyjnym w sygnalizacji komórkowej. S-nitrozoglutation (GSNO) oraz S-nitroalbumina (HSA-NO) są istotnymi biologicznie S-nitrozotioilami odpowiadającymi m.in. za funkcję wazorelaksacyjną. Zachwianie biologicznej równowagi tlenu azotu, regulującego napięcie naczyń krwionośnych, a co za tym idzie ciśnienie tętnicze krwi oraz agregację płytek krwi i leukocytów, może być szczególnie niebezpieczne dla osób z chorobami układu krążenia. W układach biologicznych wyróżnia się dwa typy mechanizmów rozkładu S-nitrozotioili: enzymatyczny i nieenzymatyczny. Za rozkład nieenzymatyczny odpowiedzialne są między innymi jony metali przejściowych. W związku z tym, iż zaadsorbowane związki metali przejściowych wchodzi w skład pyłów zawieszonych PM_{2.5} i PM₁₀ (PM) postuluje się, że mogą one zaburzać ścieżki sygnalizacji tlenu azotu przebiegające z udziałem S-nitrozotioili. Cząsteczki pyłu zawieszonego w kontakcie z płynami fizjologicznymi oraz przedostając się do krwioobiegu mogą uwalniać rozpuszczalne w wodzie jony metali prowadząc do zaburzenia fizjologicznej równowagi S-nitrozotioili. Motywacją do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej były liczne doniesienia literaturowe wskazujące zanieczyszczenie powietrza jako ważny czynnik ryzyka chorób cywilizacyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem chorób układu krążenia i chorób autoimmunologicznych. Przedstawione w niniejszej pracy hipotezy i wyniki mają na celu poznanie molekularnego mechanizmu przyczyniającego się do rozwoju stanu chorobowego spowodowanego wpływem pyłu zawieszonego na szlaki sygnalizacyjne zależne od tlenu azotu. Za główny cel badań przyjęto stworzenie kompleksowego modelu, oceniającego wpływ pyłu zawieszonego na stabilność wybranych S-nitrozotioili. W badaniach skoncentrowano się na S-nitrozoglutationie oraz S-nitroalbuminie jako przedstawicielach nisko- i wysoko-cząsteczkowych S-nitrozotioili. W pracy porównano wpływ standardowego materiału zanieczyszczeń powietrza (SRM 1648a, NIST) oraz pyłu zawieszonego zebranego w Krakowie.

W celu poznania źródła i charakteru aktywności biologicznej cząstek stałych pyłu miejskiego, porównano wpływ zawiesiny PM z wpływem wodnych ekstraktów tych pyłów na efektywność uwalniania NO z S-nitrozoglutationu (GSNO). Przeprowadzone badania wykluczyły bezpośrednią rolę cząstek stałych w procesie rozkładu GSNO, wskazując że jedynie rozpuszczalna w wodzie frakcja jest czynnikiem uwalniającym NO. W związku z powyższym

do dalszych pomiarów stosowano roztwór wyekstrahowany ze składników stałych w czasie 24h, a wyniki dotyczące zmiennego wpływu czasu wytrąsania wykazały, że wydłużenie procedury, nie przyczynia się do wzrostu stężenia uwalnianego NO. Ponadto, w celu zidentyfikowania czynnika aktywnego powodującego rozkład S-nitrozotiole wykonano eksperymenty z udziałem chelatora jonów metali przejściowych, etylenodiaminotetraoctanem sodu (EDTA). EDTA zastosowany przed i po iniekcji GSNO do roztworu zawiesiny lub ekstraktu powodował brak lub natychmiastowe zatrzymanie jakiegokolwiek sygnału rejestrowanego przez czujnik NO. Wyniki te potwierdziły dominującą rolę jonów metali w rozkładzie GSNO. Na tej podstawie opracowano powtarzalną procedurę pomiarową do dalszych badań. Ilościową zależność pomiędzy stężeniem wodnych ekstraktów SRM 1648a a rozkładem S-nitrozotiole, określono z użyciem GSNO, HSA-NO i GSNO w środowisku osocza krwi. W badaniach w środowisku wodnym, zaobserwowano natychmiastowe uwalnianie NO, tożsamy z rozkładem S-nitrozotiole, a ilość uwolnionego NO rosła, wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów. Różnice między SRM 1648a i KR PM2.5 ujawniły większy potencjał krakowskiego pyłu miejskiego, a odczytane sygnały były około trzykrotnie wyższe, niż w przypadku materiału referencyjnego. Podobne zachowanie zaobserwowano w przypadku analizy rozkładu HSA-NO pod wpływem SRM 1648a. Porównanie ilości NO uwolnionego z S-nitrozotiole o małej i dużej masie cząsteczkowej wykazało, że w analogicznych warunkach pomiarowych, HSA-NO jest bardziej stabilne. Ograniczony dostęp do nitrozowanych reszt cysteiny oraz zdolność wiązania i transportowania jonów metali przez albuminę, odzwierciedlały jej potencjalną rolę ochronną. Inny charakter rozkładu wykazało GSNO w doświadczeniach przeprowadzonych w środowisku osocza krwi, pozyskanego od grupy pacjentów zmagających się z chorobami układu krążenia i zdrowej grupy kontrolnej. Analiza danych ilościowych NO uwolnionego z GSNO, przez tę samą ilość ekstraktu SRM 1648a, wykazała nieistotne różnice (1% vs 1,5-0,8% dla grupy pacjentów chorych względem zdrowych). Jednak podczas rejestrowania procesu uwalniania zaobserwowano dodatkowy parametr -opóźnienie czasowe- pomiędzy wstrzyknięciem GSNO a faktycznym wzrostem sygnału zarejestrowanego dla NO. Czas opóźnienia różnił się istotnie statystycznie dla badanego osocza pobranego od osób chorych względem osocza od zdrowych ochotników. Wyniki uzyskane w modelowym eksperymencie, z użyciem roztworu albuminy jako środowiska, przybliżyły wyjaśnienie tego zjawiska. Albumina surowicy ludzkiej posiadająca wolną grupę tiolową zlokalizowaną w Cys34, jest uważana za bardzo ważny rezerwuuar wolnych tioli w osoczu krwi. W związku z tym zweryfikowano wpływ ilości zredukowanej grupy tiolowej jako czynnika ochronnego. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały, że

całkowicie zablokowana HSA-NEM powoduje uwalnianie około dwukrotnie większej ilości NO, w porównaniu z albuminą o zwiększonej dostępności dla grup -SH (HSA-SH). Ponadto, pomimo stosowania stężenia białka odpowiadającego średniemu stężeniu w osoczu krwi, poziom rozkładu GSNO okazał się wyraźnie niższy niż w eksperymencie *in vitro*. Wpływają na to inne aktywne składniki krwi, takie jak: enzymy, jony metali czy naturalnie występujące reduktory, np. kwas askorbinowy. Stan utlenienia jonów metali wyekstrahowanych z miejskich cząstek stałych, może zmienić ich potencjał w kontekście rozkładu S-nitrozotiole, dlatego rozprawę uzupełniono o badania ekstraktów PM z dodatkiem związków o charakterze redukującym: glutationu (GSH) lub kwasu askorbinowego (AscA). Dodatek GSH do roztworu przyspieszył proces rozkładu GSNO zachodzącego w obecności ekstraktu SRM 1648a, w przeciwieństwie do efektu wywoływanego przez ekstrakt KR PM2.5. Suplementacja roztworu zawierającego ekstrakt z cząstek stałych kwasem askorbinowym spowodowała znaczny wzrost uwalnianego NO dla obu ekstraktów PM. Obserwowany efekt silnie zależał od stężenia reduktora, a ilość uwalnianego NO w obecności AscA była znacząco wyższa niż w przypadku dodania tej samej ilości GSH do ekstraktów. Oba reduktory wykazały aktywność w rozkładzie GSNO również w eksperymencie bez ekstraktów PM. Porównanie kinetyki procesu uwalniania NO wykazało, że bez obecności ekstraktów miejskich cząstek stałych, proces przebiega znacząco wolniej, wskazując na efekt wynikający z modyfikacji składników ekstraktu pyłu przez reduktor. W badaniach nad wpływem dodatku kwasu askorbinowego do ekstraktu SRM1648a w środowisku osocza krwi, porównano stabilność GSNO u pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego i grupą kontrolną. W obu grupach badanych, ilość uwolnionego NO była większa niż w grupie kontrolnej lub w badaniu bez zastosowania związku redukującego. Ponadto, dodanie AscA znacznie przyspieszyło proces rozkładu i skracало czas opóźnienia we wszystkich grupach, ponieważ początkowa szybkość uwalniania NO zwiększyła się, a czas potrzebny do uzyskania maksymalnego sygnału został skrócony. Zaobserwowane różnice i silnie podwyższone uwalnianie NO z GSNO w środowisku osocza od uczestników chorych w porównaniu z grupą kontrolną przypisano zmianom w jakości osocza, m.in. zmniejszonej ilości albuminy w osoczu. Zmniejszona zawartość oznaczonych dostępnych wolnych tioli, wykazała silną korelację z rozkładem GSNO, co zostało potwierdzone również w modelowym eksperymencie ze zmodyfikowaną albuminą jako środowisko badanej reakcji. Dostępność grupy -SH w albuminie okazała się istotnym czynnikiem w procesie uwalniania NO w obecności ekstraktu SRM1648a zarówno z, jak i bez dodatku AscA.

W celu zidentyfikowania jonów metali obecnych w ekstraktach cząstek zawieszonych odpowiedzialnych za rozkład S-nitrozotiole wykonano analizę ICP-OES. Biorąc pod uwagę

uzyskane wyniki porównano oddzielny i łączny wpływ jonów Cu^{2+} oraz Fe^{3+} w obecności reduktorów ? na rozkład GSNO i potwierdzono wysoką aktywność jonów miedzi w tym procesie. Pomimo wykluczenia udziału jonów żelaza w rozkładzie GSNO, ich obecność wykazała wpływ na pomiar mierzonego stężenia tlenu azotu w układzie poprzez tworzenie nitrozylowych kompleksów żelaza. Efekt ten był obserwowany szczególnie podczas działania mieszaniny jonów Cu^{2+} z Fe^{3+} , co skutkowało zależnym od $[\text{Fe}^{3+}]$ spadkiem mierzonego stężenia tlenu azotu. Do zidentyfikowania pozostałych składników miejskich cząstek stałych odpowiedzialnych za rozkład S-nitrozotiole, zbadano rozkład GSNO pod wpływem Hg^{2+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} i Ag^+ . Analiza otrzymanych wyników wykazała, że ich udział w procesie uwalniania NO przez składniki ekstraktów PM jest znikomy, a aktywność cząstek stałych, może zostać przypisana w głównej mierze obecności jonów miedzi. Analogiczny wniosek został wysunięty w badaniach oceniających poziom rozkładu S-nitrozoalbuminy przez wodny roztwór jonów metali o składzie imitującym ekstrakt SRM 1648a (MIM). Porównywalne wyniki uzyskane dla ekstraktu SRM 1648a oraz roztworów MIM dodatkowo wykluczyły, w sposób pośredni, udział cząstek stałych w procesie uwalniania NO. Udział miedzi w porównaniu z innymi jonami metali był wyraźnie zauważalny w doświadczeniach porównujących potencjał rozkładu MIM i MIM pozbawionego Cu^{2+} (MIM-Cu). Mimo, że eliminacja jonów miedzi z mieszaniny zmniejszyła ilość uwalnianego NO, nadal pozostała wyższa niż tło. Ten dodatkowy wkład innych jonów metali zaobserwowano w badaniu oceniającym wpływ Zn^{2+} , Sb^{3+} , Ag^+ , Hg^{2+} oraz Cd^{2+} , użytych w stężeniach odzwierciedlających ich ilość w ekstrakcie SRM 1648a. Na podstawie uzyskanych wyników z S-nitrozoalbuminą stwierdzono, że jony Fe^{3+} obecne w miejskich PM nie wykazują wobec niej aktywności prowadzącej do rozkładu, ale nadal mogą wpływać na bilans NO w układach biologicznych, poprzez tworzenie kompleksów z tlenkiem azotu. Również redukcja Fe^{3+} do Fe^{2+} reduktorami AscA lub GSH nie wykazała wpływu na zwiększenie ilości uwalnianego NO. Eksperymenty z selektywnymi chelatorami jonów Cu^+ , Cu^{2+} lub innych metali przejściowych na uwalnianie NO przez wodne roztwory SRM 1648a, mieszanin modelowych MIM lub bezpośrednio przez Cu^{2+} , pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu rozkładu, opierającego się na potencjalnej redukcji jonów miedzi Cu^{2+} z udziałem białka. Zaobserwowano również, że dodatek reduktora (AscA) do roztworu miedzi, powoduje zależny od stężenia wzrost szybkości początkowej i stężenia NO uwalnianego z HSA-NO.

Analiza procesu trans-nitrozacji albuminy, poddanej 24-godzinnej dializie z zawiesiną SRM 1648a, wskazała na wywoływanie trwałych zmian w dostępności wolnego tiolu przy Cys34 w HSA. Konsekwencją tego była zmniejszona wydajność reakcji przyłączenia NO do albuminy.

Badania przedstawione w rozprawie wykazały, że nieorganiczne składniki pyłu zawieszonego PM2.5 i PM10 (PM) powodują modyfikację białek (albuminy, owalbuminy), zmieniając ich właściwości i funkcje i mogą się przyczyniać do patofizjologii układu krwionośnego i immunologicznego.