



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Instytut Biologii

Adrianna Dąbrowska-Hulka

**Rola mitochondrialnego kanału BK_{Ca}
w fizjologii i uszkodzeniach komórek nabłonka
oddechowego wywołanych przez pyły miejskie**

The role of the mitochondrial BK_{Ca} channel in the physiology
and damage of the respiratory epithelial cells induced
by urban particulate matter

Rozprawa doktorska
Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Piotr Bednarczyk
Katedra Fizyki i Biofizyki, Instytut Biologii, SGGW

Promotor pomocniczy:
Dr Agnieszka Łukasiak
Katedra Fizyki i Biofizyki, Instytut Biologii, SGGW

Warszawa, 2026

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 12/6/2026

Czytelny podpis promotora 

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 12.06.2026

Czytelny podpis autora rozprawy Adrianna Dąbrowska - Hulko

Badania niniejszej rozprawy doktorskiej powstały dzięki finansowemu wsparciu
Narodowego Centrum Nauki w Krakowie
w ramach projektu OPUS 18 nr 2019/35/B/NZ1/02546



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Składam serdeczne podziękowania:

Panu Promotorowi dr hab. Piotrowi Bednarczykowi, Prof. SGGW za możliwość pracy w ciekawym projekcie, przekazaną wiedzę, pomoc w przygotowaniu rozprawy doktorskiej i życzliwość.

Pani Promotor pomocniczej dr Agnieszce Łukasiak za cenne wskazówki, wsparcie w trakcie prowadzenia badań będących przedmiotem rozprawy i miłą atmosferę współpracy.

Pani dr Joannie Bujak za interesujące dyskusje, wsparcie merytoryczne i mentalne.

Panu dr Bartoszowi Osuchowi za współpracę w trakcie niektórych doświadczeń i wspólnie spędzony czas.

Panu dr Mirosławowi Zajęcowi za cenne wskazówki i miłą atmosferę współpracy.

Pani dr Kamili Maliszewskiej-Olejniczak za wsparcie merytoryczne i udostępnienie linii komórkowej niezbędnej do przeprowadzenia niektórych doświadczeń.

Panu mgr Jakubowi Hoserowi za ciekawą współpracę i wspólne dbanie o pomieszczenia laboratoryjne.

Pani mgr Karolinie Pytlak za cenne wsparcie w trakcie stażu naukowego.

Wszystkim Pracownikom, Doktorantom, Studentom Katedry Fizyki i Biofizyki za stworzenie miłej atmosfery współpracy.

Szczególne podziękowania składam:

*Moim Rodzicom, Dziadkom i całej mojej rodzinie za to, że zawsze mogę liczyć na ich
wsparcie.*

Mojemu Mężowi za wszystko.

Spis treści

Streszczenie w języku polskim	13
Streszczenie w języku angielskim	15
Indeks skrótów	17
1. Wstęp	21
1.1 Czynniki uszkadzające komórki	21
1.2 Pyły miejskie	25
1.2.1 Źródła pyłów miejskich	26
1.2.2 Rodzaje pyłów miejskich	26
1.2.3 Skład pyłów miejskich	28
1.2.4 Wpływ pyłów miejskich na układ oddechowy człowieka	30
1.2.5 Uszkodzenia komórek przez pyły miejskie	35
1.3 Tkanka nabłonkowa	36
1.3.1 Budowa nabłonka oddechowego	36
1.3.2 Funkcje nabłonka oddechowego	37
1.4 Mitochondria	38
1.4.1 Budowa i funkcje mitochondriów	38
1.4.2 Uszkodzenia mitochondriów przez pyły miejskie	44
1.5 Kanały jonowe	46
1.5.1 Kanał potasowy typu BK _{Ca}	47
1.5.2 Aktywatory i inhibitory kanału typu BK _{Ca}	51
1.6 Cytoprotekcja	52
1.6.1 Związki pochodzenia naturalnego o działaniu cytoprotekcyjnym	53
1.6.2 Udział mitochondrialnych kanałów potasowych w cytoprotekcji	59
2. Cel pracy	61
3. Materiały i metody	63
3.1 Substancje wykorzystywane w przeprowadzonych badaniach	63
3.2 Modele linii komórkowych	66
3.2.1 Linia komórkowa HBE WT	66
3.2.2 Linia komórkowa HBE ΔαBK	67
3.2.3 Hodowla komórkowa	68
3.3 Analiza aktywności kanału mitoBK_{Ca} w mitochondriach linii komórek HBE WT	68
3.3.1 Przygotowanie mitochondriów i mitoplastów do pomiarów elektrofizjologicznych	68
3.3.2 Eksperymenty patch-clamp	69
3.4 Ocena zmian szybkości oddychania komórkowego	71
3.4.1 Ocena zużycia tlenu w modelu całych komórek	71
3.4.2 Kontrola oddechowa	72
3.4.3 Ocena zużycia tlenu w komórkach uprzepuszczalnych	73
3.4.4 Analiza aktywności IV kompleksu łańcucha oddechowego	73
3.5 Pomiar różnicy potencjałów wewnętrznej błony mitochondrialnej	74
3.5.1 Pomiar różnicy wewnętrznej błony mitochondrialnej za pomocą Oksygrafu	74
3.5.2 Pomiar różnicy potencjałów w wewnętrznej błonie mitochondrialnej za pomocą sondy JC-1	75
3.6 Ocena cytotoxyczności	76
3.6.1 Barwienie błękitem trypanu	76
3.6.2 Test apoptoza-nekroza	76
3.6.3 Pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej	77
3.7 Pomiary reaktywnych form tlenu	77

3.7.1	Pomiar poziomu reaktywnych form tlenu na poziomie komórkowym.....	77
3.7.2	Pomiar poziomu reaktywnych form tlenu na poziomie mitochondrialnym	77
3.8	Pomiar liczby mitochondriów.....	78
3.9	Pomiary oporu przeznabłonkowego TEER	78
3.10	Analiza poziomu białek - Western blot	79
3.11	Analiza statystyczna	80
4.	Wyniki	81
4.1	Analiza aktywności kanału BK _{Ca} w mitochondriach linii komórek HBE WT	81
4.2	Ocena oddychania komórkowego w komórkach HBE WT	85
4.3	Fluorescencyjny pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej	87
4.4	Zmiany szybkości oddychania w obecności PM – kontrola oddechowa	90
4.5	Ocena syntezy reaktywnych form tlenu po ekspozycji na pyły miejskie.....	93
4.5.1	Pomiary całkowitego poziomu reaktywnych form tlenu	93
4.5.2	Mitochondrialny poziom reaktywnych form tlenu	95
4.6	Ocena przeznabłonkowego oporu elektrycznego	97
4.7	Pomiar patch-clamp w linii komórek HBE ΔαBK	100
4.8	Ocena szybkości zużycia tlenu w komórkach HBE ΔαBK	102
4.9	Całkowity poziom reaktywnych form tlenu w komórkach HBE ΔαBK	104
4.10	Poziom mitochondrialnych reaktywnych form tlenu w komórkach HBE ΔαBK	107
4.11	Przeżywalność komórek	108
4.11.1	Przeżywalność mierzona za pomocą testu apoptoza-nekroza	108
4.11.2	Przeżywalność mierzona za pomocą pomiaru wycieku LDH.....	109
4.11.3	Przeżywalność mierzona za pomocą barwienia Trypan Blue.....	111
4.12	Pomiar TEER w komórkach HBE WT i HBE ΔαBK.....	112
4.13	Kontrola oddechowa - komórki HBE ΔαBK	113
4.14	Określenie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej z wykorzystaniem JC-1	114
4.15	Aktywność kompleksu IV łańcucha oddechowego	115
4.16	Ocena liczby mitochondriów	118
4.17	Analiza poziomu białek kompleksów łańcucha oddechowego.....	119
5.	Dyskusja	124
6.	Wnioski.....	132
7.	Spis publikacji naukowych i wskaźniki naukometryczne	135
7.1	Publikacje naukowe	135
7.2	Konferencje, kursy, szkolenia.....	135
7.2.1.	Konferencje:.....	135
7.2.2.	Kursy i szkolenia:.....	136
7.2.3	Seminaria.....	136
7.2.4.	Wskaźniki naukometryczne	137
8.	Bibliografia	139

Streszczenie w języku polskim

Ekspozycja na pyły miejskie (PM) może prowadzić do szeregu negatywnych konsekwencji zdrowotnych, takich jak kaszel, trudności w oddychaniu, zaostrzenie astmy czy uszkodzenie nabłonka układu oddechowego. Ostatnie dane wskazują, że mitochondria są miejscem akumulacji PM. Wcześniej wykazano, że mitochondria pełnią rolę w apoptotycznej transdukcji sygnału, co stało się punktem wyjścia do badania strategii cytoprotekcyjnych.

Mitochondria to organelle komórkowe pełniące szereg ważnych funkcji, takich jak synteza ATP, regulacja procesów śmierci komórkowej, produkcja reaktywnych form tlenu oraz udział w regulacji stężenia jonów wapnia w komórce. Dodatkowo, w wewnętrznej błonie mitochondrialnej znajdują się selektywne kanały jonowe, w tym mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie aktywowany wapniem (kanał mitoBK_{Ca}). Zaobserwowano, że aktywacja tego kanału prowadzi do odpowiedzi cytoprotekcyjnych, co udokumentowano m.in. w kardiomiocytach i neuronach. I tutaj, pojawia się pytanie, czy aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych ma znaczenie w cytoprotekcji komórek nabłonka oddechowego, szczególnie w przypadku uszkodzeń wywołanych przez pyły miejskie.

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej koncentrowały się na analizach elektrofizjologicznych, biochemicznych oraz biofizycznych, które dotyczyły charakterystyki kanału mitoBK_{Ca} oraz efektów fizjologicznych wywołanych przez jego aktywatory i inhibitory. Wykorzystano także techniki eksperymentalne do określenia mechanizmów uszkodzenia komórek przez pyły miejskie. Celem pracy było określenie roli mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w fizjologii komórek nabłonka oddechowego oraz analiza jego roli w uszkodzeniach komórek tych wywołanych przez PM. Hipotezy pracy zakładały, że mitochondrialny kanał BK_{Ca} pełni istotną rolę w fizjologii komórek nabłonka oddechowego, a jego aktywacja inicjuje procesy ochronne w efekcie uszkodzeń wywołanych przez pyły miejskie.

Pierwsza część pracy zawiera serię doświadczeń przeprowadzonych z użyciem techniki patch-clamp. Wykazano aktywację kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE WT po podaniu kwercetyny oraz jego hamowanie po zastosowaniu syntetycznego inhibitora – Penitremu A. Analog kwercetyny – izoramnetyna – nie zmienił aktywności kanału. Kolejne eksperymenty wykazały wzrost zużycia tlenu przez komórki HBE WT po podaniu kwercetyny oraz syntetycznego aktywatora kanału BK_{Ca} – NS11021. Wykazano, że ten wzrost jest związany z aktywacją kanału mitoBK_{Ca}, a penitrem A odwracał ten efekt. Mechanizm tego zjawiska tłumaczy się zwiększonym napływem potasu do macierzy mitochondrialnej, co prowadzi do częściowego rozproszenia potencjału mitochondrialnego i zwiększonej aktywności łańcucha transportu elektronów. Potwierdzono ten mechanizm, mierząc potencjał mitochondrialny przy

użyciu sondy fluorescencyjnej rodaminy 123. Okazało się, że kwercetyna zmniejszała potencjał błony mitochondrialnej w sposób zależny od stężenia.

Dalsze badania oddychania komórkowego wykazały, że pyły miejskie poważnie upośledzają funkcjonowanie mitochondriów w komórkach układu oddechowego. W badaniach biochemicznych stwierdzono również wzrost poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach HBE WT po ekspozycji na PM. Ten efekt był częściowo odwrócony w obecności kwercetyny, lecz nie izoramnetyny. Ponadto, pomiar przeznabłonkowego oporu elektrycznego (TEER), który określa zdolność komórek nabłonka do tworzenia szczelnej monowarstwy, wskazuje na jego uszkodzenia po ekspozycji na PM. Ten efekt był odwracany przy użyciu aktywatora kanału BK_{Ca} – kwercetyny i hamowany w obecności penitremu A.

W kolejnej części rozprawy przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem nowej wygenerowanej linii komórkowej (HBE $\Delta\alpha BK$) z delecją kanału potasowego o dużym przewodnictwie aktywowanego wapniem. Potwierdzono brak obecności kanału w błonie plazmatycznej oraz wewnętrznej błonie mitochondrialnej za pomocą techniki patch-clamp. Badania szybkości zużycia tlenu w komórkach HBE $\Delta\alpha BK$ wykazały brak wpływu kwercetyny. Przeprowadzono także analizy, które wykazały niższy poziom przeżywalności dla komórek z delecją kanału. Z pomiarów TEER wynikało również, że komórki z delecją miały obniżoną zdolność do tworzenia szczelnej monowarstwy. Kontrola oddechowa wykazała, że komórki tej linii charakteryzowały się upośledzoną funkcją mitochondriów w porównaniu do komórek HBE WT, co może wynikać z obniżonej aktywności kompleksu IV łańcucha oddechowego w komórkach HBE $\Delta\alpha BK$.

Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, że mitochondrialny kanał BK_{Ca} pełni istotną funkcję w fizjologii komórek nabłonka oddechowego oraz jego aktywacja odgrywa ważną rolę w ochronie tych komórek przed uszkodzeniami wywołanymi przez pyły miejskie.

Streszczenie w języku angielskim

Exposure to particulate matter (PM) can lead to various negative health consequences, including coughing, difficulty breathing, asthma exacerbations, and damage to respiratory epithelial cells. Recent data indicate that mitochondria are the site of PM accumulation. It has previously been demonstrated that mitochondria play a crucial role in apoptotic signal transduction, making them a valuable starting point for investigating cytoprotective strategies.

Mitochondria are cellular organelles that perform several crucial functions, including ATP synthesis, regulation of cell death processes, production of reactive oxygen species, and control of calcium ion concentrations within the cell. Additionally, selective ion channels are present in the inner mitochondrial membrane, including the mitochondrial large-conductance calcium-activated potassium channel (mitoBK_{Ca}). Activation of this channel has been shown to lead to cytoprotective responses, as documented in cardiomyocytes and neurons. And here, the question arises whether activation of mitochondrial potassium channels is important for the cytoprotection of respiratory epithelial cells, especially in the case of damage induced by particulate matter.

The research conducted as part of the doctoral thesis focused on electrophysiological, biochemical, and biophysical analyses related to the characterization of the mitoBK_{Ca} channel and the physiological effects of its activators and inhibitors. Experimental techniques were also employed to determine the mechanisms of cell damage caused by urban dust. The thesis aimed to determine the role of the mitochondrial BK_{Ca} channel in the physiology of respiratory epithelial cells and to analyze its role in the damage caused by PM. The hypothesis assumed that the mitochondrial BK_{Ca} channel plays a crucial role in the physiology of respiratory epithelial cells, and its activation triggers protective processes in response to damage caused by particulate matter.

The first part of the thesis includes a series of experiments using the patch-clamp technique. Activation of the mitoBK_{Ca} channel was demonstrated in HBE WT cells after the administration of quercetin and its inhibition by the synthetic inhibitor Penitrem A. The quercetin analogue – isorhamnetin – did not change channel activity. Further experiments showed increased oxygen consumption in HBE WT cells after quercetin administration and synthetic BK_{Ca} channel activator NS11021. This increase was linked to mitoBK_{Ca} channel activation, and Penitrem A reversed this effect. The mechanism behind this phenomenon is explained by an increased influx of potassium into the mitochondrial matrix, resulting in partial dissipation of the mitochondrial membrane potential and enhanced electron transport chain activity. This mechanism was confirmed by measuring mitochondrial potential using the

fluorescent probe rhodamine 123. It was found that quercetin reduced the mitochondrial membrane potential in a concentration-dependent manner.

Further studies of cellular respiration revealed that particulate matter severely impairs mitochondrial function in respiratory cells. Biochemical studies also showed increased reactive oxygen species levels in HBE WT cells after exposure to PM. This effect was partially reversed in the presence of quercetin, but not isorhamnetin. Additionally, measurement of the transepithelial electrical resistance (TEER), which determines the ability of epithelial cells to form a tight monolayer, indicated damage to the cells after exposure to PM. This effect was reversed by the BK_{Ca} channel activator quercetin and inhibited in the presence of Penitrem A.

In the next part of the thesis, experiments were carried out using a new generated cell line (HBE $\Delta\alpha$ BK) with deletion of the large-conductance calcium-activated potassium channel. The absence of the channel in the plasma membrane and inner mitochondrial membrane was confirmed using the patch-clamp technique. Oxygen consumption studies in HBE $\Delta\alpha$ BK cells showed no effect of quercetin. Cell survival analyses also demonstrated a lower survival rate in the channel-deleted line. TEER measurements also indicated that cells with the deletion had reduced ability to form a tight monolayer. Respiratory control revealed that cells from this line exhibited impaired mitochondrial function compared to HBE WT cells, which may be attributed to a decreased activity of complex IV in the electron transport chain of HBE $\Delta\alpha$ BK cells.

The obtained results indicate that the mitochondrial BK_{Ca} channel plays a crucial role in the physiology of respiratory epithelial cells, and its activation is important in protecting these cells from damage caused by particulate matter.

Indeks skrótów

AA	antymycyna A (<i>ang. antimycin A</i>)
ADP	adenozyno-5'-difosforan (<i>ang. adenosine-5'-diphosphate</i>)
AP-1	aktywator białkowy 1 (<i>ang. activator protein 1</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (<i>ang. adenosine-5'-triphosphate</i>)
ASIC1a	kanał jonowy wrażliwy na kwas 1a (<i>ang. acid-sensing ion channel 1a</i>)
BK _{Ca}	kanał potasowy regulowany jonami wapnia o dużym przewodnictwie (<i>ang. large conductance calcium -regulated K⁺ channel</i>)
BSA	surowicza albumina bydlęca (<i>ang. bovine serum albumin</i>)
CGS7184	1-[[[(4-chlorofenylo)amino]okso]-2-hydroksy-6-trifluorometylo-1H-indolo-3-karboksylan etylu (<i>ang. ethyl 1-[[[(4-chlorophenyl)amino]oxo]-2-hydroxy-6-trifluoromethyl-1H-indole-3-carboxylate</i>)
COFI	badanie kohortowe dotyczące włóknienia płuc (<i>ang. cohorte fibrose</i>)
COX	cyklooksygenaza (<i>ang. cyclooxygenase</i>)
CRP	białko C-reaktywne (<i>ang. C-reactive protein</i>)
DMEM	płyn hodowlany Dulbecco's Modified Eagle's (<i>ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (<i>ang. deoxyribonucleic acid</i>)
EC	węgiel pierwiastkowy (<i>ang. elemental carbon</i>)
EGTA	kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'-tetraoctowy (<i>ang. ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>)
ESCAPE	europejskie badanie kohortowe dotyczące skutków zanieczyszczenia powietrza (<i>ang. european study of cohorts for air pollution effects</i>)
ETC	łańcuch transportu elektronów (<i>ang. electron transport chain</i>)
EPA	Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (<i>ang. US Environmental Protection Agency</i>)
FBS	płodowa surowica bydlęca (<i>ang. fetal bovine serum</i>)
FeNO	frakcja wydychanego tlenu azotu (<i>ang. fraction of exhaled nitric oxide</i>)
FEV1	wymuszona objętość wydechowa pierwszosekundowa (<i>ang. forced expiratory volume in 1 second</i>)
FVC	pojemność życiowa płuc (<i>ang. forced vital capacity</i>)
FCCP	p-trifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu (<i>ang. carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>)
IPF	samoistne włóknienie płuc (<i>ang. idiopathic pulmonary fibrosis</i>).
HBE	ludzkie komórki nabłonka oskrzelowego (<i>ang. human bronchial epithelial cells</i>)

HEPES	kwask 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy (<i>ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid</i>)
HIF-1 α	czynnik indukowany hipoksją 1 alfa (<i>ang. hypoxia-inducible factor 1α</i>)
IbTx	iberiotoksyna (<i>ang. iberiotoxin</i>)
IK _{Ca}	kanal potasowy o pośredniej przewodności aktywowany przez wapń (<i>ang. intermediate-conductance calcium-activated potassium channel</i>)
IMAC	wewnętrzny mitochondrialny kanal anionowy (<i>ang. inner mitochondrial anion channel</i>)
JC1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylo-benzimidazolylokarbokyanina jodkowa, fluorescencyjna sonda potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\psi_m$) (<i>ang. 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, a fluorescent probe used to assess mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)</i>)
KCNMA1	gen kodujący podjednostkę α kanału BK _{Ca} (<i>ang. gene encoding the α subunit of the BK_{Ca} channel</i>)
KCNMB1	gen kodujący podjednostkę $\beta 1$ kanału BK _{Ca} (<i>ang. gene encoding the $\beta 1$ subunit of the BK_{Ca} channel</i>)
KHE	wymiennik potas/proton (<i>ang. K⁺/H⁺ exchanger</i>)
LPS	lipopolisacharyd (<i>ang. lipopolysaccharide</i>)
MAPK	kinaza białkowa aktywowana mitogenem (<i>ang. mitogen-activated protein kinase</i>)
MCU	mitochondrialny uniporter wapniowy (<i>ang. mitochondrial calcium uniporter</i>)
mitoBK _{Ca}	mitochondrialny kanal potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia (<i>ang. mitochondrial large conductance calcium -regulated K⁺ channel</i>)
mitoK	mitochondrialny kanal potasowy (<i>ang. mitochondrial K⁺ channel</i>)
mitoK _{ATP}	mitochondrialny kanal potasowy regulowany przez ATP (<i>ang. ATP-regulated mitochondrial potassium channel</i>)
MnSOD	mitochondrialna manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (<i>ang. mitochondria-located manganese superoxide dismutase</i>)
mPTP	mitochondrialny por przejściowy przepuszczalności (<i>ang. mitochondrial permeability transition pore</i>)
mtDNA	mitochondrialn kwas deoksyrybonukleinowy (<i>ang. mitochondrial deoxyribonucleic acid</i>)
NADH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (<i>ang. nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NMDAR	receptor N-metylo-D-asparaginianowy (<i>ang. N-methyl-D-aspartate receptor</i>)

NF-kB	czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów B (<i>ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B Cells</i>)
NOS	syntaza tlenku azotu (<i>ang. nitric oxide synthase</i>)
NP _o	prawdopodobieństwo otwarcia N kanałów (<i>ang. N channels open probability</i>)
NRF2	jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (<i>ang. nuclear transcription factor erythroid-derived type 2</i>)
NS11021	N'-[3,5-bis (trifluorometylo) fenylo]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-ilo) fenylo]-tiomocznik (<i>ang. N'-[3,5-Bis (trifluoromethyl) phenyl]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-yl) phenyl] -thiourea</i>)
NS1619	1,3-dihydro-1-[2-hydroksy-5-(trifluorometylo)fenylo]-5(trifluorometylo) -2H-benzimidazol-2-on (<i>ang. 1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5- (trifluoromethyl) phenyl] -5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-one</i>)
OC	węgiel organiczny (<i>ang. organic carbon</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PAH	wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (<i>ang. poly-aromatic hydrocarbons</i>)
Pax	paksylina (<i>ang. paxilline</i>)
PBS	sól fizjologiczna w buforze fosforanowym (<i>ang. phosphate-buffered saline</i>)
PM	pyły miejskie (<i>ang. particulate matter</i>)
PM ₁₀	gruboziarniste cząstki stałe o średnicy aerodynamicznej $\leq 10 \mu\text{m}$
PM _{2,5}	drobne cząstki stałe o średnicy aerodynamicznej $\leq 2,5 \mu\text{m}$
PM _{0,1}	ultradrobne cząstki o średnicy $\leq 0,1 \mu\text{m}$
POChP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
RCK1	domena wiążąca wapń 1, domena regulatorowa przewodnictwa potasu 1 (<i>ang. regulator of conductance of K⁺</i>)
RCK2	domena wiążąca wapń 2, domena regulatorowa przewodnictwa potasu 2 (<i>ang. regulator of conductance of K⁺</i>)
RFT	reaktywne formy tlenu (<i>ang. reactive oxygen species</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (<i>ang. ribonucleic acid</i>)
ROFA	popioły lotne z oleju (<i>ang. residual oil fly ash</i>)
ROX	zużycie tlenu resztkowego (<i>ang. residual oxygen consumption</i>)
RyR	receptor rianodynowy (<i>ang. ryanodine receptors</i>)
SDS	dodecylosiarczan sodu (<i>ang. sodium dodecyl sulfate</i>)
Slo1	podjednostka α kanału potasowego BK _{Ca} kodowana przez gen KCNMA1 (<i>ang. alpha gene – homolog KCNMA1</i>)
SALIA	badanie wpływu zanieczyszczenia powietrza na funkcjonowanie płuc, stany zapalne i starzenie się (<i>ang. study on the influence of air pollution on lung function, inflammation and ageing</i>)

SAPALDIA	badanie dotyczące zanieczyszczenia powietrza i chorób płuc (ang. <i>study on air pollution and lung disease in adults</i>)
SK _{Ca}	kanał potasowy o małej przewodności aktywowany przez wapń (ang. <i>small-conductance calcium-activated potassium channel</i>)
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa (ang. <i>superoxide dismutase</i>)
SOD2	dysmutaza ponadtlenkowa 2 (ang. <i>superoxide dismutase 2</i>)
STS	staurosporyna (ang. <i>staurosporine</i>)
TASK-3	kanał potasowy wrażliwy na kwas, pokrewny TWIK, typ 3 (ang. <i>TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel</i>)
TBST	sól fizjologiczna buforowana TRIS z Tween 20 - monolaurynian polioksyetyleno (20) sorbitanu (ang. <i>tris-buffered saline with Tween 20 - polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate</i>)
TC	węgiel całkowity (ang. <i>total carbon</i>)
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>transforming growth factor beta</i>)
TEER	przeznabłonkowy opór elektryczny (ang. <i>transepithelial electrical resistance</i>).
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (ang. <i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>)
TIM	translokaza błony wewnętrznej (ang. <i>translocase of the inner membrane</i>)
TJs	połączenia ścisłe (ang. <i>tight junctions</i>)
TMPD	N,N,N',N'-tetrametyloparafenylo-diamina dichlorowodorek (ang. <i>tetramethylphenylenediamine</i>)
TOM	translokaza błony zewnętrznej (ang. <i>translocatase of the outer membrane</i>)
UV	promieniowanie ultrafioletowe (ang. <i>ultraviolet</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
WWA	wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
VDAC	kanał anionowy zależny od napięcia (ang. <i>voltage - dependent anion channel</i>)
VEDEC	izoforma kanału potasowego BK _{Ca} z C-końcowym regionem zawierającym sekwencję aminokwasów VEDEC
VEGF	naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

1. Wstęp

1.1 Czynniki uszkodzające komórki

Uszkodzenia komórek są pierwszym etapem prowadzącym do dezintegracji tkanek czy organów wewnętrznych. Wiele czynników środowiskowych może się przyczyniać do uszkodzeń na poziomie komórkowym. Czynniki te indukują głównie procesy biologiczne takie jak:

- obniżenie poziomu ATP,
- uszkodzenia błon komórkowych,
- zaburzenia przebiegu szlaków biochemicznych,
- uszkodzenia DNA.

Komórki posiadają wyspecjalizowane mechanizmy ochrony przed czynnikami uszkodzającymi. W przypadku niektórych, a także mniej nasilonych uszkodzeń, komórki ulegają adaptacji. Takie mało nasilone uszkodzenia mogą zostać odwrócone przez komórkowe mechanizmy naprawcze i komórka może powrócić do prawidłowego stanu fizjologicznego. Zjawisko adaptacji na czynniki uszkodzające może nie tylko być neutralne z punktu widzenia fizjologii komórki, ale również może przynieść pozytywne skutki, jak zwiększona wydajność lub produktywność. W przypadku większych uszkodzeń może nastąpić wzmożone zaburzenie funkcjonowania komórek i ich degeneracja. Z kolei bardziej znaczące uszkodzenia komórek mogą nawet prowadzić do śmierci komórkowej (Miller i Zachary 2017).

Jednym z najczęściej uszkodzających komórki czynników jest niedotlenienie, które może być spowodowane zbyt niskim stężeniem tlenu we krwi w wyniku niewydolności serca lub układu oddechowego, spadku perfuzji naczyniowej (ischemia) lub zmniejszonego transportu O₂ przez erytrocyty. Niedotlenienie komórki może również powstać na skutek hamowania aktywności enzymów oddechowych komórki, na przykład poprzez związki toksyczne (Miller i Zachary 2017; Wheaton i Chandel 2011). Niedotlenienie i niedokrwienie mogą uszkadzać m.in. komórki siatkówki. Następuje wtedy indukowanie ekspresji czynnika indukowanego niedotlenieniem HIF-1 α (*ang. hypoxia-inducible factor*), który aktywuje ekspresję genów, takich jak czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF, *ang. vascular endothelial growth factor*) i syntazy tlenu azotu (NOS, *ang. nitric oxide synthase*). Zwiększona produkcja VEGF powoduje zaburzenie bariery krew-siatkówka, co prowadzi do obrzęku siatkówki. Z kolei, zwiększona ekspresja NOS powoduje wzrost produkcji tlenu azotu, który jest być toksyczny dla komórek i może prowadzić do ich śmierci (Kaur et al. 2008).

Komórki mogą również być uszkodzane poprzez narażenie na czynniki infekcyjne. Należą do nich cząsteczki białek - priony, wirusy, mikroorganizmy takie jak bakterie czy grzyby, a także pasożyty. Wirusy mogą wykorzystywać aparat syntezy DNA komórki gospodarza w produkcji własnych produktów ekspresji genów. Wiele szczepów bakterii wykazuje zdolność do produkcji toksyn, które uszkodzają komórki. Podobnie pasożyty mogą wydzielać produkty metabolizmu, które niekorzystnie działają na funkcjonowanie komórek gospodarza. Uszkodzenia komórek są zaostrzane w przypadku wielu infekcji zakaźnych przez immunologiczne reakcje zapalne skierowane przeciwko drobnoustrojowi (Miller i Zachary 2017). Przykładem są infekcje prionowe, które mogą uszkadzać komórki ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Rozprzestrzenianie się i replikacja prionów w obrębie OUN prowadzi do neurotoksyczności mikroglejowej, stresu oksydacyjnego i aktywacji układu dopełniacza (Unterberger et al. 2005).

Czynniki fizyczne również mogą uszkadzać komórki. Należą do nich urazy mechaniczne, ekstremalne temperatury, zarówno niskie, jak i wysokie, promieniowanie i impulsy elektryczne. Uszkodzenie na drodze czynników fizycznych może uszkodzić komórki bezpośrednio, na przykład poprzez miażdżenie i rozrywanie, a także pośrednio poprzez zaburzenie dopływu krwi do tych komórek i tkanek, a więc powodując niedotlenienie. Ciepło o niskiej intensywności może uszkadzać naczynia krwionośne, wpływać na reakcje biochemiczne w komórce za pośrednictwem enzymów, na których aktywność ma wpływ temperatura. Ekstremalnie wysokie temperatury mogą powodować denaturację białek, w tym tych enzymatycznych. Niskie temperatury skutkują zwężeniem naczyń krwionośnych, ograniczając dopływ krwi do komórek i tkanek. Skrajnie niskie temperatury skutkują tworzeniem kryształków lodu w cytozolu, co może prowadzić do permabilizacji błon biologicznych. Promieniowanie jonizujące oddziałuje na atomy lub cząsteczki, które następnie powodują bezpośrednie uszkodzenie błony komórkowej lub organelli lub produkcję wolnych rodników. Wolne rodniki mogą być również generowane przez promieniowanie ultrafioletowe (UV) i mogą uszkadzać struktury i cząsteczki w komórce, na przykład błony biologiczne i cząsteczki DNA (Miller i Zachary 2017). Rodzaje czynników powodujących uszkodzenia komórek podsumowano w Tabeli 1.

Tabela 1. Podział czynników uszkodzających komórki oraz ich opis.

Podział czynników uszkodzających	Czynnik uszkodzający komórki	Opis
Czynniki fizyczne	Urazy mechaniczne	Bezpośrednie uszkodzenia tkanki na skutek urazów (np. cięcia, uderzenia, rozdarcia).
	Temperatura	Ekstremalne temperatury mogą uszkodzać komórki. Zbyt niska temperatura (np. odmrożenia) prowadzi do powstawania kryształów lodu wewnątrz komórek, a wysoka temperatura (np. oparzenia) denaturuje białka i powoduje śmierć komórek.
	Promieniowanie	Promieniowanie jonizujące (np. rentgenowskie, gamma) powoduje uszkodzenie DNA i innych makrocząsteczek komórki, co prowadzi do mutacji lub śmierci komórki.
	Ciśnienie	Nagłe zmiany ciśnienia (np. uraz ciśnieniowy podczas nurkowania) mogą prowadzić do pęknięcia błon komórkowych.
Czynniki biologiczne	Mikroorganizmy	Wirusy, bakterie, grzyby i pasożyty mogą bezpośrednio niszczyć komórki poprzez infekcję, produkcję toksyn lub wprowadzanie zmian w metabolizmie komórek.
	Reakcje immunologiczne	Nadmierna reakcja układu immunologicznego może prowadzić do autoagresji, gdzie komórki układu odpornościowego niszczą własne zdrowe komórki (np. w chorobach autoimmunologicznych).
Czynniki genetyczne	Mutacje genetyczne	Błędy powstające podczas naprawy w DNA mogą prowadzić do nieprawidłowego funkcjonowania

		białek, co wpływa na pracę komórki i prowadzi do jej dysfunkcji lub śmierci.
	Choroby dziedziczne	Niektóre wrodzone zaburzenia metaboliczne (np. mukowiscydoza, anemia sierpowata) prowadzą do nieprawidłowego funkcjonowania komórek i tkanek.
Niedobory substancji odżywczych	Niedobory witamin i składników mineralnych	Brak odpowiednich składników odżywczych (np. witamin, minerałów, białek) może prowadzić do zaburzeń w metabolizmie komórek i ich funkcjonowaniu.
	Niedotlenienie (hipoksja)	Niedobór tlenu w komórkach (spowodowany np. niewydolnością oddechową, niedokrwieniem) prowadzi do zmniejszenia produkcji ATP, co skutkuje uszkodzeniem komórek.
Czynniki oksydacyjne	Stres oksydacyjny	Wolne rodniki (reaktywne formy tlenu i azotu) mogą uszkadzać lipidy, białka i DNA w komórkach, prowadząc do ich dysfunkcji i śmierci. Stres oksydacyjny jest często związany z chorobami takimi jak miażdżyca, cukrzyca czy choroby neurodegeneracyjne.
Czynniki metaboliczne	Zaburzenia metaboliczne	Niekontrolowane zmiany w metabolizmie (np. w cukrzycy, otyłości) mogą prowadzić do odkładania się toksycznych produktów metabolizmu w komórkach, co prowadzi do ich uszkodzenia.
Zaburzenia homeostazy wewnątrzkomórkowej	Nadmierna kumulacja jonów wapnia	Nagłe wzrosty poziomu wapnia w komórkach mogą aktywować enzymy proteolityczne, fosfolipazy i inne, co prowadzi do degradacji białek, lipidów i kwasów nukleinowych.

	Zaburzenia równowagi wodno-elektrolitowej	Niedobór wody lub elektrolitów, jak również ich nadmiar, może prowadzić do pęcznienia komórek, zaburzeń w funkcjonowaniu pomp jonowych i ostatecznie ich śmierci.
Czynniki chemiczne	Toksyny	Substancje chemiczne takie jak metale ciężkie (ołów, rtęć), pestycydy czy środki przemysłowe mogą zakłócać funkcje enzymatyczne i uszkadzać struktury komórkowe.
	Leki	Niektóre leki w nadmiarze lub o nieodpowiednim działaniu mogą prowadzić do toksyczności i uszkodzenia komórek, zwłaszcza wątroby i nerek.
	Zanieczyszczenia powietrza – w tym pyły miejskie (PM, ang. particulate matter)	Tlenki azotu, tlenki siarki czy cząstki stałe mogą uszkadzać komórki dróg oddechowych i płuc. Ekspozycja na pyły miejskie przyczynia do wzrostu syntezy reaktywnych form tlenu, wzrostu poziomu stanu zapalnego i spadku przeżywalności komórek.

1.2 Pyły miejskie

Zanieczyszczenie powietrza to proces, który polega na emisji do atmosfery substancji, które mogą oddziaływać na środowisko, a także na zdrowie organizmów w nim żyjących (Kinney 2008). Do najczęstszych składników zanieczyszczeń powietrza należą: tlenek węgla (CO), pyły miejskie (PM), ołów (Pb), ozon (O₃) oraz dwutlenek siarki (SO₂), dwutlenek azotu (NO₂), czy azotan amonu (NH₄NO₃) (Kuźma et al. 2020; Schraufnagel et al. 2019), a także zanieczyszczenia organiczne takie jak pozostałości popiołów lotnych z oleju (ROFA, *ang. residual oil fly ash*) i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (PAH, *ang. poly-aromatic hydrocarbons*) (Harrison i Yin 2000). Zanieczyszczenia powietrza mogą pochodzić ze źródeł pierwotnych, takich jak emisje w wyniku działań przemysłowych, czy też transportu. Zanieczyszczenia pochodzą również ze źródeł wtórnych, takich jak reakcje chemiczne zachodzące z innymi zanieczyszczeniami (Schraufnagel et al. 2019).

Pyły miejskie są częścią zanieczyszczeń powietrza, które stanowią niejednorodną mieszaninę cząsteczek stałych i ciekłych zawieszonych w powietrzu. Pochodzą one ze źródeł pierwotnych (Schraufnagel et al. 2019; Manisalidis et al. 2020). Wielkość i skład chemiczny PM nie jest stała – różni się w zależności od miejsca, pory roku oraz warunków atmosferycznych (World Health Organization 2013).

1.2.1 Źródła pyłów miejskich

Źródłem pyłów miejskich w powietrzu może być bezpośrednia emisja do atmosfery lub reakcje chemiczne z udziałem związków chemicznych w stanie gazowym takich jak dwutlenek siarki, tlenki azotu, amoniak i lotne związki organiczne. Gazy te mogą być uwalniane zarówno ze źródeł antropogenicznych, jak i naturalnych (Atkinson et al. 2010), jednak dominujące są źródła antropogeniczne (K.-H. Kim et al. 2015). Źródła antropogeniczne pyłów miejskich obejmują spalanie paliw stałych (węgiel, lignit, olej ciężki i biomasa), erozję nawierzchni spowodowaną ruchem drogowym oraz ścieranie okładzin hamulców i opon, a także mogą pochodzić z działalności przemysłowej i rolniczej (Srimuruganandam i Shiva Nagendra 2012). Z kolei PM pochodzące ze źródeł naturalnych powstają w wyniku wybuchów wulkanów, burz piaskowych, pożarów lasów. PM mogą również stanowić fragmenty roślin, takie jak pyłki i wykazywać działanie alergizujące (Misra et al. 2001).

1.2.2 Rodzaje pyłów miejskich

Podział PM jest zazwyczaj dokonany według średnicy cząsteczek. Dzięki temu można określić zarówno sposób ich dystrybucji w atmosferze, a także w układzie oddechowym oraz w innych układach i narządach organizmu człowieka (Esworthy 2014). Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (US Environmental Protection Agency — EPA) proponuje podział PM w dwóch kategoriach wielkości na podstawie ich przewidywanej zdolności penetracji do płuc jako:

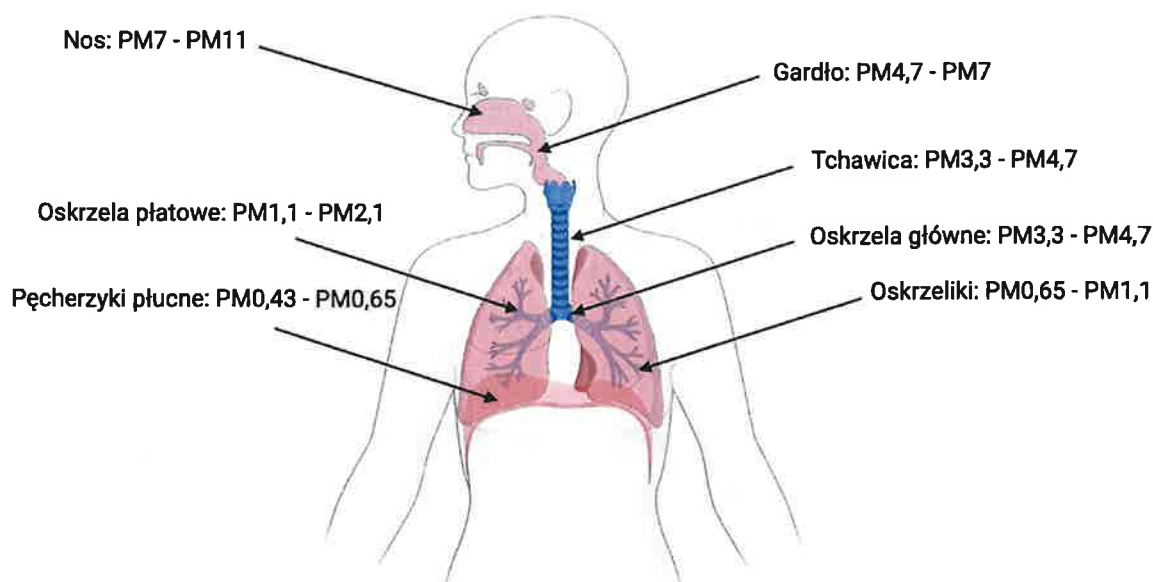
- gruboziarniste cząstki stałe (PM₁₀) o średnicy aerodynamicznej $\leq 10 \mu\text{m}$,
- drobne cząstki stałe (PM_{2,5}) o średnicy aerodynamicznej $\leq 2,5 \mu\text{m}$ (Esworthy 2014).

Pyły miejskie drobne o średnicy równej lub mniejszej niż $0,1 \mu\text{m}$ są klasyfikowane jako cząstki ultradrobne (PM_{0,1}) (Hasheminassab et al. 2013). Należą do nich również najmniejsze cząsteczki PM o wielkości mierzonej w nanometrach (Flood-Garibay et al. 2023).

Największe cząsteczki pyłów miejskich są wytwarzane mechanicznie przez rozbijanie większych frakcji stałych. Cząsteczki PM₁₀ to głównie materiał pochodzący ze skorupy ziemskiej, pył drogowy i przemysłowy, powstają również w wyniku działalności rolniczej i górniczej. PM₁₀ mogą również pochodzić ze źródeł naturalnych i stanowić fragmenty roślin i owadów, zarodniki pleśni i pyłki. Z kolei cząsteczki pyłów miejskim PM_{2,5} i mniejsze, powstają jako efekt reakcji chemicznych cząsteczek w stanie gazowym, w wyniku których powstają cząsteczki w stanie stałym. Mniejsze cząsteczki PM zawierają również aerozole i pary związków organicznych (Organization 2021).

Warto zwrócić uwagę, że cząsteczki pyłów miejskich drobnych i ultradrobnych ze względu na swój niewielki rozmiar, mają możliwość pozostawania w atmosferze przez długi czas – od kilku tygodni do nawet miesięcy, a także mogą być transportowane na odległość setek lub tysięcy kilometrów (Johansson et al. 2007) dlatego stanowią szczególne zagrożenie dla środowiska naturalnego i zdrowia oraz życia człowieka i innych organizmów.

Podczas oddychania przez nos, rzęski i śluz działają jak bardzo skuteczny filtr dla większości cząstek zanieczyszczeń powietrza przekraczających średnicę 10 μm . Ponieważ frakcja PM₁₀ osiada szybko, ma tendencję do gromadzenia się w tchawicy (górnej części gardła) lub w oskrzelach (Atkinson et al. 2010), co może powodować reakcję obronną organizmu w celu pozbycia się tych cząsteczek – kichanie, kaszel (Cadelis et al. 2014). Cząsteczki PM₁₀ mogą przenikać do dalszych części układu oddechowego, a najmniejsze z nich trafiają nawet do pęcherzyków płucnych. PM mogą lokalizować się głęboko w płucach ze względu na wysoką przenikalność pęcherzyków (Löndahl et al. 2006). Cząsteczki o wielkości od około 5 do 10 μm mogą lokalizować się w drzewie tchawiczo-oskrzelowym. Z kolei PM o wielkości od 1 do 5 μm osadzają się w oskrzelikach i pęcherzykach płucnych (Löndahl et al. 2006). Możliwość penetracji cząsteczek PM w układzie oddechowym w zależności od ich wielkości podsumowano na Rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat akumulacji cząstek pyłów miejskich w obrębie układu oddechowego w zależności od średnicy. Liczby podane na rysunku podane są w mikrometrach. Na przykład PM7-PM11 oznacza wielkość pyłów miejskich o średnicy cząstek od 7 do 11 μm . Rysunek przygotowano w programie *BioRender.com* na podstawie (Izzotti et al. 2022; Löndahl et al. 2006).

Najmniejsze cząsteczki pyłów miejskich - pył drobny i ultradrobny o wielkości mniejszej lub równej 1 μm , mogą przedostawać się do krwiobiegu i transportowane są również do innych tkanek (Valavanidis et al. 2008), co stanowi kolejny czynnik zagrożenia dla zdrowia i życia człowieka (Traboulsi et al. 2017). Pył ultradrobny o najmniejszej średnicy (nanocząsteczki) może przekraczać nawet barierę krew-mózg i akumulować się w tkance nerwowej (Flood-Garibay et al. 2023). Udowodniono również obecność licznych agregatów nanocząstek PM w łożysku, a otrzymane wyniki mogą wskazywać również na możliwość do penetracji tych cząstek również do płodu (N. M. Liu et al. 2021).

1.2.3 Skład pyłów miejskich

W skład pyłów miejskich wchodzi takie związki chemiczne jak azotany, siarczany, jony amonowe, jony nieorganiczne, związki organiczne (np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne), jak również węgiel pierwiastkowy i organiczne związki oraz metale (np. żelazo, miedź, nikiel, kadm, mangan, cynk i wanad) (World Health Organization 2013). Pyły miejskie mogą zawierać również jony nieorganiczne (np. siarczany, azotany, amon, sól, potas, wapń, magnez i chlorki) (Cheung et al. 2011; K.-H. Kim et al. 2015). W skład PM mogą wchodzić też

związki biologiczne, między innymi pochodzenia mikrobiologicznego (np. endotoksyna, fragmenty komórek), które mogą mieć działanie alergizujące (World Health Organization 2013).

Węgiel i związki organiczne stanowią 70-80% całkowitej masy PM_{2,5}. Glin, krzem, siarka, potas, wapń i żelazo stanowią 40-50% masy PM₁₀. Z kolei, aniony azotanowe, siarczanowe i amonowe stanowią około 10-20% masy PM_{2,5} i PM₁₀ (Manisalidis et al. 2020). Warto jednak zwrócić uwagę, że skład pyłów miejskich może znacznie się różnić w zależności od regionu geograficznego, warunków atmosferycznych i pory roku.

W 10-letnim badaniu składników pyłów miejskich w Dżakarcie, wykazano, że siarka i węgiel miały najwyższe stężenia w PM_{2,5}, podczas gdy PM_{2,5-10} były zdominowane przez elementy skorupy ziemskiej (Al, Si, Ca, Ti i Fe). W Bogor i Tangerang, PM_{2,5} zawierały wysokie stężenia ołowiu ze względu na produkcję prętów ołowianych i recykling baterii (Santoso et al. 2020). Z kolei, w Surabaji na Jawie (Indonezja) składniki skorupy ziemskiej, zwłaszcza krzemionka z erupcji wulkanicznych, były obecne w wysokich stężeniach w PM. Ponadto poziomy ołowiu w PM_{2,5} i PM_{2,5-10} w Surabai były znacznie wyższe w porównaniu z innymi miastami we wschodniej Jawie (Santoso et al. 2019). To wskazuje na znaczne różnice w składach PM w zależności od regionu geograficznego i jego specyficznych uwarunkowań. Różnice w stężeniu i w składzie PM_{2,5} w trzech miastach w Polsce w zależności od pory roku podano w Tabeli 2.

Tabela 2. Stężenia cząstek PM_{2,5} oraz ich komponentów (µg/m³) w różnych porach roku w Katowicach, Gdańsku i Diabłej Górze w Polsce. Węgiel pierwiastkowy (EC, ang. elemental carbon) to cząstki pierwotne, które są emitowane bezpośrednio do atmosfery. Powstają w wyniku niepełnego spalania paliw kopalnych oraz biomasy. Węgiel organiczny (OC, ang. organic carbon) to cząstki pierwotna lub wtórna, która jest emitowana bezpośrednio lub powstająca w atmosferze w wyniku utleniania gazów pochodzenia antropogenicznego i biogenicznego. Stężenia węgla (OC i EC) mierzone termicznie (analyzer Behrcarbon) można porównać z tymi mierzonymi wyłącznie metodą termooptyczną jako węgiel całkowity (TC, ang. total carbon), (TC=OC+EC). Na podstawie (Rogula-Kozłowska et al. 2014).

Miasto	Pora roku	PM _{2,5}	EC	OC	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	Cl ⁻	NH ₄ ⁺	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	As, Ni, Cd, Pb, Ti, Al, Fe
Katowice	Wiosna	33,02	9,83	4,03	2,81	2,44	1,23	2,82	2,78	0,21	0,68	0,13	0,33
	Lato	17,29	3,37	2,81	4,41	0,74	0,79	0,72	0,48	0,12	0,24	0,09	0,36
	Jesień	38,26	2,49	3,33	4,21	2,46	1,54	1,96	0,44	0,29	0,30	0,06	0,44
	Zima	82,97	20,38	12,29	6,89	4,74	3,32	4,22	1,06	0,33	0,21	0,08	0,76
Gdańsk	Wiosna	21,05	2,6	0,21	1,38	2,10	0,56	1,13	1,21	0,09	0,20	0,06	0,38
	Lato	13,09	0,87	1,31	2,01	0,51	0,21	0,44	0,48	0,04	0,20	0,04	0,30
	Jesień	18,29	1,74	2,18	1,87	1,89	0,47	0,83	1,78	0,14	0,21	0,06	0,16
	Zima	42,75	6,1	6,68	4,30	5,64	1,22	3,18	0,85	0,34	0,14	0,09	0,20
Diabla Góra	Wiosna	15,02	2,07	0,57	1,53	1,88	0,14	1,13	1,55	0,12	0,17	0,05	0,11
	Lato	8,74	0,44	0,95	2,12	0,30	0,19	0,36	0,75	0,06	0,17	0,04	0,16
	Jesień	11,24	0,93	1,39	2,01	1,46	0,20	0,67	1,05	0,10	0,13	0,04	0,10
	Zima	25,93	5,19	3,63	4,85	4,77	0,22	2,31	1,81	0,19	0,10	0,03	0,08

1.2.4 Wpływ pyłów miejskich na układ oddechowy człowieka

Zanieczyszczenia powietrza, w tym również PM mogą wywierać szereg negatywnych efektów na zdrowie ludzi i innych organizmów. W 2013 roku oszacowano, że na świecie

rocznie umiera ponad dwa miliony osób w wyniku bezpośredniego wpływu zanieczyszczenia powietrza, które wywołuje uszkodzenia układu oddechowego, w tym płuc (A. S. V. Shah et al. 2013). Zdecydowana większość spośród opisanych zgonów spowodowana jest narażeniem na pyły miejskie (Chuang et al. 2011; A. S. V. Shah et al. 2013). Warto zwrócić uwagę, że w 2016 roku liczba szacowanych przypadków śmiertelnych w związku z narażeniem na zanieczyszczenia powietrza wzrosła do 3 milionów rocznie (WHO 2016), a 2017 szacowano już nawet 5 milionów rocznie zgonów powodowanych przez narażenie na zanieczyszczenia powietrza (Global Burden of Diseases 2017) (Evangelopoulos et al. 2020; Kuźma et al. 2020).

Ekspozycja na cząstki PM stanowi wyższe zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi niż takie składniki zanieczyszczeń atmosferycznych jak ozon przygruntowy, czy też tlenek węgla (K.-H. Kim et al. 2015). Warto zwrócić uwagę, że szacowane jest, że wzrost stężenia PM_{2,5} w atmosferze skutkuje wzrostem śmiertelności o 0,7% (J I Levy et al. 2000; Jonathan I. Levy i Hanna 2011).

Ekspozycja układu oddechowego na PM może powodować takie objawy jak kaszel czy trudności z oddychaniem oraz wywołuje zaostrzenie astmy czy podrażnienie dróg oddechowych. Osoby narażone na PM_{2,5} mogą odczuwać również bóle w klatce piersiowej (Guaita et al. 2011; K.-H. Kim et al. 2015). Ekspozycja na pyły miejskie powoduje nie tylko uszkodzenia układu oddechowego, ale w sposób bezpośredni przyczynia się również do rozwoju miażdżycy, chorób sercowo-naczyniowych, nieregularnego rytmu serca, a nawet zwiększa ryzyko zawału mięśnia sercowego (Atkinson et al. 2010; Cadelis et al. 2014; Correia et al. 2013; Fang et al. 2013; Meister et al. 2012). Wykazano również, że narażenie na pył zawieszony zwiększa lepkość osocza, powoduje dysfunkcję śródbłonna i wyzwała reakcje fazy ostrej. Te zmiany prowadzą do zaburzeń autonomicznej kontroli rytmu serca (Pratiwi et al. 2023).

Zaobserwowano również, że narażenie na oddychanie powietrzem z wysokimi stężeniami PM jest czynnikiem ryzyka pogorszenia zdolności kognitywnych, w szczególności u osób starszych. W badaniu przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych z udziałem osób w wieku podeszłym, zaobserwowano, że osoby zamieszkujące tereny o wyższych wartościach stężeń PM_{2,5} miały 1,5 razy wyższy współczynnik popełnianych błędów w testach pamięciowych i orientacji przestrzennej (Ailshire et al. 2017) w porównaniu do osób starszych, które zamieszkiwały obszary z niższymi stężeniami PM_{2,5}. Podobne obserwacje odnotowano u kobiet w wieku podeszłym. Przy wyższym narażeniu na PM_{2,5} doświadczały one spadku ogólnych funkcji poznawczych w wyższym stopniu niż osoby starsze, które w niższym stopniu

były narażone na ekspozycję na PM_{2,5}. Autorzy tych badań postulują, że wzrost stężenia PM o 10 µg/m³ w przypadku długotrwałej ekspozycji może przyczyniać się do spadku funkcji kognitywnych wraz z wiekiem średnio 2 lata szybciej niż na terenach z niższym zanieczyszczeniem (Schikowski i Altuğ 2020). Zmiany w zakresie funkcji poznawczych spowodowane ekspozycją na pyły miejskie, które mogłyby świadczyć o procesach neurodegeneracyjnych, nie są obserwowane tylko u osób w wieku podeszłym. Badania mózgu przeprowadzone pośmiertnie wykazały wczesne objawy neurodegeneracji u młodych osób mieszkających miastach o wysokim stopniu zanieczyszczenia powietrza (Calderón-Garcidueñas et al. 2008). Co więcej, badania epidemiologiczne prowadzone w Stanach Zjednoczonych wykazały silną korelację między cukrzycą u dorosłych pacjentów a zanieczyszczeniem powietrza cząsteczkami stałymi. Korelacja ta jest również widoczna po uwzględnieniu innych czynników ryzyka, takich jak otyłość i pochodzenie etniczne (Pearson et al. 2010). Osobami, które w największym stopniu są narażone na negatywne skutki zdrowotne w wyniku ekspozycji na PM to osoby starsze, dzieci, a także pacjenci z chorobami serca i płuc (Guaita et al. 2011; K.-H. Kim et al. 2015).

Takie składniki PM_{2,5} jak mangan, miedź, żelazo, cynk i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą zwiększać produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach i tym samym prowadzić do uszkodzeń na drodze stresu oksydacyjnego. Uszkodzeniom tym mogą podlegać również cząsteczki DNA, co prowadzi do karcynogenezy, mutogenezy i innych trwałych uszkodzeń (Wei i Tang 2018).

Narażenie na zanieczyszczenie powietrza, w szczególności PM, wiąże się ze znacznym pogorszeniem jakości funkcjonowania płuc u osób dorosłych. W badaniach, w których poszukiwano powiązania zanieczyszczenia powietrza i chorób płuc u osób dorosłych (SAPALDIA, *ang. study on air pollution and lung disease in adults*) przebadano 9651 osób w wieku od 18 do 60 lat. Wykazano, że narażenie na PM wiązało się ze spadkiem pojemności życiowej płuc (FVC, *ang. forced vital capacity*) o 3,4% i wymuszonej objętości wydechowej pierwszosekundowej (FEV₁, *ang. Forced Expiratory Volume in 1 Second*) o 1,6% (B. W. Martin et al. 1997). Inne badania dotyczące wpływu zanieczyszczenia powietrza na funkcję płuc, stan zapalny i starzenie się (SALIA, *ang. study on the influence of air pollution on lung function, inflammation and ageing*) wykazały, że wzrost stężenia PM₁₀ o 10 µg/m³ doprowadza do spadku FVC i FEV₁ odpowiednio o 4,7% i 3,4% (Dalecká et al. 2021; Kyung i Jeong 2020). Pod wpływem ekspozycji na PM w komórkach płuc i innych tkankach układu oddechowego dochodzi do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu, co z kolei przyczynia się do stresu

wewnątrzkomórkowego. Stres wewnątrzkomórkowy i wynikający z niego wzrost odpowiedzi immunologicznej wywołują dysfunkcję układu oddechowego. Co ważne, zwiększony stres oksydacyjny i stan zapalny mogą negatywnie wpływać na szczelność bariery nabłonkowej (Maher et al. 2020; Calderón-Garcidueñas et al. 2019; Kelly i Fussell 2015; L. G. Costa et al. 2017; Rao et al. 2018).

PM_{2,5} może wywierać negatywny wpływ na równowagę w komórkowych poziomach jonów wapnia w komórkach układu oddechowego, co wpływa na wiele szlaków przekazywania sygnałów. Podwyższone poziomy Ca^{2+} występujące w efekcie ekspozycji na PM_{2,5} prowadzą do aktywacji szlaków sygnałowych prowadzących do aktywacji odpowiedzi immunologicznej. Wzrost poziomu jonów wapnia stanowią kolejny mechanizm, na drodze którego prowadzą do wzrostu poziomu RFT po ekspozycji na PM, a także zwiększonego poziomu apoptozy i nekrozy komórek (Wei i Tang 2018).

Ekspozycja na PM_{2,5} zwiększa poziom stanu zapalnego w komórkach układu oddechowego nie tylko na drodze zwiększenia produkcji reaktywnych form tlenu. Pyły miejskie mogą powodować również nadekspresję genów odpowiedzialnych z syntezę cytokin prozapalnych. Badania wykazały, że narażenie na PM_{2,5} powoduje zwiększenie liczby limfocytów T, neutrofilii, mastocytów, eozynofili i mastocytów w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym (Wei i Tang 2018). Stres oksydacyjny i stymulacja cytokinami prozapalnymi aktywują ścieżki przekazywania sygnału, co prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak NF- κ B (*ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i AP-1 (*ang. activator protein 1*). AP-1 to dimer białkowy, który odgrywa rolę w aktywacji ekspresji genów odpornościowych i zapalnych w chorobach wywołanych stresem oksydacyjnym (Leikauf et al. 2020). Z kolei aktywacja NF- κ B prowadzi do reakcji cytotoksycznych na drodze apoptozy (T. Li et al. 2018).

Mimo, że ekspozycja na pyły miejskie prowadzi do reakcji śmierci komórkowej na drodze nekrozy, a także do uwalniania większej ilości cytokin prozapalnych, co stymuluje aktywność komórek układu immunologicznego, narażenie na PM może jednocześnie skutkować osłabieniem funkcjonowania komórek układu odpornościowego. Zebrano również unoszące się w powietrzu cząsteczki pobrane z sześciu miast europejskich. Makrofagi szczurów poddali działaniu tych cząstek przez 24 godziny i stwierdzili znaczne zmniejszenie żywotności makrofagów pęcherzykowych przy narażeniu na PM_{0,2-2,5} w zakresie od 300 pg/ml do 150 g/ml (K.-H. Kim et al. 2015; Wei i Tang 2018).

Z kolei, ekspozycja na dym w doświadczeniach prowadzonych *ex vivo* zmniejsza fagocytozę i zwiększa produkcję cytokin IL-6 i IL-8 w ludzkich makrofagach. PM prowadzi również do uwalniania mediatorów molekularnych kinazy białkowej B, kinazę białkową aktywowaną mitogenem (MAPK, *ang. mitogen-activated protein kinase*), które powodują przewlekły stan zapalny w komórkach, tkankach i układzie oddechowym. Zmienia się również odpowiedź komórek T, indukując limfocyty Th-2 i nadmierną produkcję IL-4 i IL-13, co może prowadzić do rozwoju lub zaostrzenia astmy (T. Li et al. 2018).

Ekspozycja na pyły miejskie może nieść szczególne ryzyko u osób chorujących na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP). U tych pacjentów narażenie na PM wiązało się ze zwiększonym wskaźnikiem hospitalizacji i śmiertelności. Metaanaliza przeprowadzona w 2020 roku wykazała, że wzrost stężenia PM₁₀ o 10 µg/m³ zwiększył wskaźnik hospitalizacji pacjentów z POChP o 2,7%. Podobnie stwierdzono, że wzrost stężenia PM₁₀ o 10 µg/m³ zwiększył wskaźnik śmiertelności z powodu POChP o 1,1% (Kyung i Jeong 2020).

Wysokie stężenie pyłów miejskich w atmosferze jest również niebezpieczne z punktu widzenia osób z objawami chorób atopowych. Narażenie na PM wiąże się również z uczuleniem alergicznym i zaostrzeniem astmy. Pacjenci z astmą narażeni na PM mają zwiększoną nadreaktywność dróg oddechowych i zwiększoną frakcję wydychanego tlenu azotu (FeNO, *ang. fraction of exhaled nitric oxide*), co prowadzi do zmniejszenia objętości płuc i pojemności dyfuzyjnej płuc. Narażenie na PM_{2,5}, które prowadzi do stężenia tych cząsteczek w osoczu wynoszącego 10 µg/m³, zwiększa częstość wizyt w placówkach ochrony zdrowia. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że próby zmniejszenia ekspozycji na PM zapobiegają oraz wspomagają leczenie POChP i astmy (Kyung i Jeong 2020).

Wysoka ekspozycja na pyły miejskie może również stanowić czynnik pogarszający przebieg samoistnego włóknienia płuc (IPF, *ang. idiopathic pulmonary fibrosis*). Narażenie na PM_{2,5} w stężeniu 8 µg/m³ zwiększało ryzyko śmiertelności (Goobie et al. 2022). Badanie Cohorte Fibrose (COFI) we Francji wykazało, że wzrost stężenia PM_{2,5} i PM₁₀ o 10 µg/m³ zwiększył śmiertelność z powodu IPF odpowiednio o 7,93 i 2,01 razy. Wyniki te wskazują, że narażenie na wyższe poziomy PM znacznie zaburza funkcjonowanie płuc, co prowadzi do wzrostu śmiertelności i ostrego zaostrzenia IPF (Kyung i Jeong 2020). Pogorszenie stanu osób chorujących na samoistne włóknienie płuc w efekcie ekspozycji na PM może zachodzić ze względu na stres oksydacyjny zapalenie mięszu z udziałem TGF-β (*ang. transforming growth factor beta*) (N. Singh i Singh 2021).

Zarówno u dzieci, jak i dorosłych, narażonych na PM, częstość występowania i śmiertelność z powodu zapalenia płuc wzrasta. Metaanaliza wykazała, że dodatkowy wzrost stężenia PM₁₀ i PM_{2,5} o 10 µg/m³ zwiększa częstość występowania zapalenia płuc u dzieci odpowiednio o 1,5% i 1,8% (Kyung i Jeong 2020).

Narażenie na PM₁₀ i PM_{2,5} jest również czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworów płuc. Europejskie badanie kohortowe dotyczące skutków zanieczyszczenia powietrza (ESCAPE, ang. european study of cohorts for air pollution effects) wykazało, że każdy wzrost poziomów PM₁₀ i PM_{2,5} o 10 µg/m³ i 5 µg/m³ zwiększał ryzyko raka płuc odpowiednio 1,22-krotnie i 1,18-krotnie (Lipfert 2017). Metaanaliza przeprowadzona w Korei wykazała, że wzrost stężenia PM_{2,5} o 10 µg/m³ doprowadził do 1,09-krotnego wzrostu ryzyka raka płuc. Z kolei związek między poziomami PM₁₀ a zdarzeniami raka płuc był słabszy w porównaniu do poziomów PM_{2,5} (Kyung i Jeong 2020).

1.2.5 Uszkodzenia komórek przez pyły miejskie

Pyły miejskie głównie wywołują uszkodzenia na poziomie komórkowym. Ważnym mechanizmem, na zasadzie którego PM zaburzają homeostazę komórek jest stres oksydacyjny spowodowany poprzez generowanie RFT. Pyły miejskie są też odpowiedzialne za inicjowanie szlaków prowadzących do uszkodzeń na drodze stanu zapalnego, ponieważ zwiększają syntezę mediatorów prozapalnych (cytokiny i chemokiny), ale również powodują stymulację receptorów kapsaicyny. PM mogą również działać jako czynnik uszkadzający DNA, co może prowadzić do mutagenyzy (Valavanidis et al. 2008; Nel et al. 2006).

PM_{2,5} oraz pyły ultradrobne wykazują silne działanie prooksydacyjne. Wykazano, że składnikami PM, które w szczególnym stopniu odpowiedzialne są za ten efekt są związki węgla, takich jak chinony i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (N. Li et al. 2003). Działanie prooksydacyjne chinonów wynika z tworzenia RFT poprzez reakcje redoks przy udziale jonów metali i NADPH. Ze względu na wysoką nadprodukcję reaktywnych form tlenu w wyniku ekspozycji na chinony, są to cząsteczki, które mogą prowadzić do karcynogenezy (Hirakawa et al. 2002; Qiu i Cadenas 1997).

Z kolei komórkowy mechanizm działania wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych (WWA) zawartych w pyłach miejskich przebiega w kilku mechanizmach (Valavanidis et al. 2008). Pierwszy z nich obejmuje generowanie epoksydów diolowych katalizowanych przez cytochrom P450. Prowadzi to do tworzenia adduktu DNA, co przyczynia się do karcynogenezy (Denissenko et al. 1996, 53; Ohnishi i Kawanishi 2002). Kolejny

mechanizm WWA uszkodzający komórki to działanie prooksydacyjne na drodze tworzenia kationów rodnikowych katalizowane przez peroksydazy cytochromu P450. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne przyczyniają się również do syntezy chinonów przez dehydrogenazy dihydrodiolowe, przyczyniające się do karcynogenezy indukowanej WWA (Cavalieri i Rogan 1995; Flowers et al. 1996).

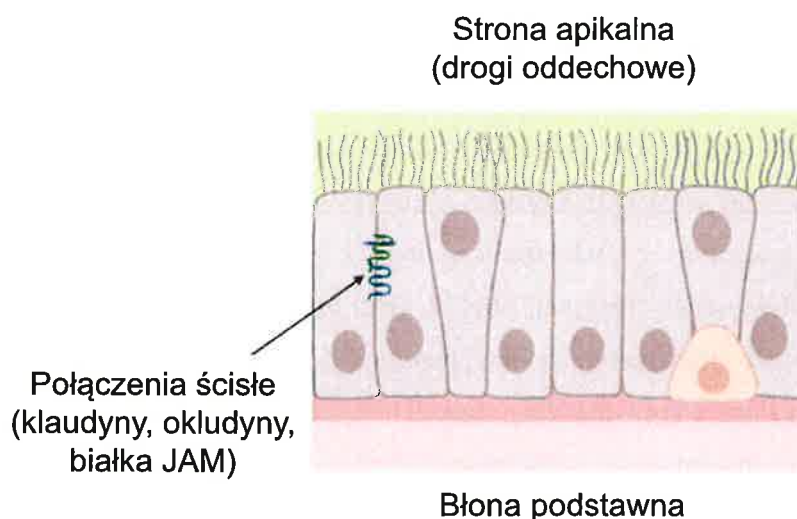
Kolejnymi składnikami PM, które powodują uszkodzenia na poziomie komórkowym są metale, takie jak Fe, Ni, V, Co, Cu i Cr (Valavanidis et al. 2008). Przyczyniają się one do wzrostu syntezy RFT, a następnie do stresu oksydacyjnego w komórkach nabłonka dróg oddechowych (Schaumann et al. 2004; Knaapen et al. 2002; Ghio et al. 1999), co może być przyczyną uszkodzenia DNA na tle oksydacyjnym (Kasprzak 2002).

1.3 Tkanka nabłonkowa

Nabłonek jest kluczowym elementem tworzącym strukturę organizmu. Tkanka nabłonkowa formuje barierę ochronną i umożliwia zachodzenie podstawowych procesów fizjologicznych. Nabłonek wyściela organy i jamy ciała, gdzie służy jako dynamiczne środowisko do wymiany substancji chemicznych między środowiskiem zewnętrznym i wewnętrznym organizmu (Knight i Holgate 2003).

1.3.1 Budowa nabłonka oddechowego

W układzie oddechowym występują cztery główne warstwy histologiczne: błona śluzowa dróg oddechowych, która obejmuje nabłonek i podtrzymującą ją blaszkę właściwą, błonę podśluzową, warstwę chrzęstną i/lub mięśniową oraz przydanki. Nabłonek oddechowy to rzęskowy nabłonek kolumnowy pseudowarstwowy, wyściełający większość dróg oddechowych. Nabłonek oddechowy nie występuje jedynie w krtani ani gardle. Klasyfikowany jest jako pseudowarstwowy, chociaż jest pojedynczą warstwą komórek wzdłuż błony podstawnej. Jednak układ jąder komórkowych nie znajduje się w tej samej płaszczyźnie, co w obrazie histologicznym jest charakterystyczne dla nabłoneków wielowarstwowych. (Kia'i i Bajaj 2024). Komórkowy model struktury nabłonka oddechowego jest przedstawiony na Rysunku 2.



Rysunek 2. Komórkowy model struktury nabłonka oddechowego. Komórki nabłonka oddechowego tworzą monowarstwę ściśle połączonych komórek ułożonych na błonie podstawnej. Połączenia powstają na podstawie ścisłych połączeń (TJ, *ang. tight junction*) składających się z kładyny, okładyny i białka JAM.

Powierzchnie światła jamy nosowej, tchawicy, oskrzeli i oskrzelików wyścielone są rzęskowym nabłonkiem kolumnowym pseudostratyfikowanym i zawierają komórki kubkowe, których rolą jest wydzielanie śluzu. Śluz stanowi pierwszą linię obrony przed wnikającymi patogenami środowiskowymi. Rzęski przesuwają cząstki związane ze śluzem w górę i na zewnątrz w celu wydalenia ich z organizmu (Rokicki et al. 2016).

Obszar wymiany gazowej płuc składa się z milionów pęcherzyków płucnych, które są wyścielone cienkim nabłonkiem płaskim, który umożliwia łatwą dyfuzję tlenu i dwutlenku węgla. Kolejnym typem komórek tworzących pęcherzyki płucne są sześciennne komórki pneumocyty typu II. Są one odpowiedzialne za produkcję surfaktantu, który składa się głównie z dipalmitoilofosfatydylocholiny. Pełni on kluczową rolę w obniżaniu napięcia powierzchniowego wody, dzięki czemu umożliwia skuteczną wymianę gazową (Rokicki et al. 2016).

1.3.2 Funkcje nabłonka oddechowego

Nabłonek oddechowy dzięki zdolności do tworzenia szczelnych połączeń międzykomórkowych działa jako bariera przeciwko patogenom i zanieczyszczeniom, wydzielając śluz i ułatwiając oczyszczanie śluzowo-rzęskowe. Umożliwia również skuteczną wymianę gazową w płucach, co jest kluczowe dla oddychania komórkowego i utrzymania

poziomu tlenu w organizmie. Ponadto nabłonek oddechowy przyczynia się do regulacji mechanizmów immunologicznych i poziomu stanu zapalnego, wykrywając i reagując na atakujące patogeny, jednocześnie minimalizując uszkodzenia tkanek. Odgrywa również rolę sensoryczną w wykrywaniu zapachów i substancji drażniących, wyzwalając reakcje odruchowe, takie jak kaszel lub kichanie. Elementy te są również bardzo ważne w procesach zapobiegania infekcjom i uszkodzeniom innych tkanek organizmu poprzez проникnięcie potencjalnie szkodliwych substancji obcych. Jego funkcje w ochronie barierowej, wymianie gazowej, nadzorze immunologicznym i percepcji sensorycznej podkreślają jego znaczenie w ochronie organizmu i optymalizacji funkcji oddechowych. (Rackley i Stripp 2012).

Komórki znajdujące się w nabłonku oddechowym mają również możliwość regeneracji po uszkodzeniu wywołanym przez wdychane cząstki stałe. Komórki podstawne, przytwierdzone do błony podstawnej przez hemidesmosomy, mogą różnicować się w inne typy komórek znajdujące się w nabłonku. Reagują one na uszkodzenia i działają w obronie antyoksydacyjnej nabłonka dróg oddechowych i transepitelialnym ruchu wody (Kia'i i Bajaj 2024). Zrozumienie roli, które pełni nabłonek dróg oddechowych jest kluczowe dla opracowania strategii skutecznego zapobiegania i leczenia chorób układu oddechowego, szczególnie tych wywołanych przez pyły miejskie.

1.4 Mitochondria

1.4.1 Budowa i funkcje mitochondriów

Mitochondria to organelle wewnątrzkomórkowe stanowiące nawet 20% lub więcej całkowitej objętości komórki (W. Martin i Mentel 2010). Mitochondria pełnią szereg kluczowych funkcji z punktu widzenia fizjologii komórki. Najważniejszą rolą mitochondriów jest synteza ATP poprzez fosforylację oksydacyjną. Regulują komórkowy poziom jonów wapnia, apoptozę, produkcję reaktywnych form tlenu (RFT), a także mają swój udział w szlakach przekazywania sygnałów w komórkach (Simcox i Reeve 2016).

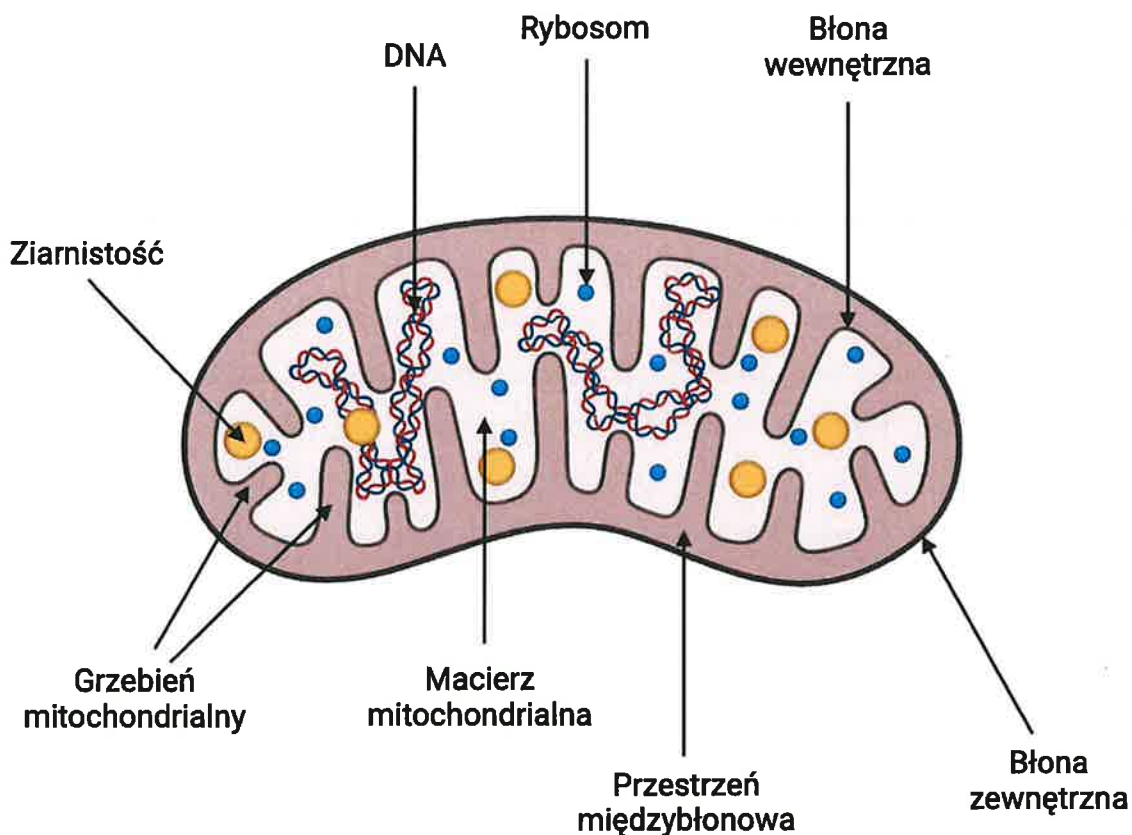
Prawdopodobnie, mitochondria pierwotnie powstały w wyniku endosymbiozy z przodka alfa eubakterii, który został wchłonięty przez komórkę gospodarza (Simcox i Reeve 2016). Miało to miejsce najprawdopodobniej w okolicach 1,5 miliarda lat temu (Gray 1992).

Kształt mitochondriów może ulegać dynamicznym zmianom. Organelle te są zazwyczaj owalne, ale mogą też być bardziej rozszerzone i siateczkowate, a także przypominać struktury w kształcie pręcików (Simcox i Reeve 2016). Mitochondria są otoczone dwiema błonami biologicznymi (Rysunek 2). Zewnętrzna błona oddziela cytozol od przestrzeni

międzybłonowej, a jej skład jest podobny do błony komórkowej. Zewnętrzna błona mitochondrialna umożliwia transport małych cząsteczek (rozpuszczalnych w lipidach) do przestrzeni międzybłonowej na drodze dyfuzji. Z kolei transport małych białek (<5 kDa) i białek hydrofilowych zachodzi przez poryny, kanał anionowy zależny od napięcia (VDAC, *ang. voltage-dependent anion channel*). Wewnętrzna błona mitochondrialna oddziela przestrzeń międzybłonową od macierzy mitochondrialnej. Jest selektywna dla jonów wapnia czy potasu oraz protonów. Jej skład znacznie różni się od składu mitochondrialnej błony zewnętrznej, ponieważ błona wewnętrzna zawiera większe ilości kardiolipiny oraz białek niż błona zewnętrzna. Białka w błonie wewnętrznej pełnią szereg ważnych funkcji z punktu widzenia fizjologii tych organelli, między innymi uczestniczą w ścieżkach przekazywania sygnałów czy prowadzenia fosforylacji oksydacyjnej (Simcox i Reeve 2016).

Unikalną cechą mitochondriów jest to, że podobnie jak jądro komórkowe zawierają informację genetyczną. Posiadają własny genom, który koduje 13 białek łańcucha oddechowego. Jednak, większość genów kodujących białka mitochondrialne znajduje się w genomie jądrowym. Zatem, białka te muszą być importowane do mitochondriów. Warto zwrócić uwagę, że aby większe cząsteczki białka mogły trafić do mitochondriów, wymagają określonych sekwencji kierujących. Dostęp do przestrzeni międzybłonowej oraz macierzy mitochondrialnej organelli jest regulowany głównie przez dwa białka transportowe, translokaza błony zewnętrznej (TOM, *ang. translocator of the outer membrane*) i translokaza błony wewnętrznej (TIM, *ang. translocator of the inner membrane*) (Simcox i Reeve 2016).

W strukturze macierzy mitochondrialnej widoczne są wewnętrzne fałdy błony biologicznej, zwane grzebieniami mitochondrialnymi, które zwiększają powierzchnię procesu fosforylacji oksydacyjnej i utrzymanie gradientu protonów (Simcox i Reeve 2016). Dawniej uważano, że to wgłębienie wewnętrznej błony mitochondrialnej powoduje powstawanie grzebieni mitochondrialnych. Jednak analiza wykonana za pomocą mikroskopii elektronowej wykazała, że ten model jest niedokładny, ponieważ grzebień tak naprawdę powstają z odrębnej błony połączonej z przestrzenią międzybłonową za pomocą połączeń tubularnych (Frey i Mannella 2000). Strukturę mitochondriów podsumowano na Rysunku 3.



Rysunek 3. Schematyczna budowa mitochondriów. Na rysunku zaznaczono błonę zewnętrzną i wewnętrzną, przestrzeń międzybłonową, grzebienie mitochondrialne, macierz mitochondrialną, ziarnistości, rybosomy oraz mitochondrialne DNA. Opracowanie własne. Rysunek wykonano w programie *BioRender.com*.

Liczba mitochondriów znajdująca się w danej komórce może wskazywać jak wysokie jest jej zapotrzebowanie na energię. Komórki należące do tkanek wymagających większej ilości energii, na przykład komórki mięśni szkieletowych, kardiomiocyty i neurony mają większą liczbę mitochondriów niż komórki np. skóry (Simcox i Reeve 2016).

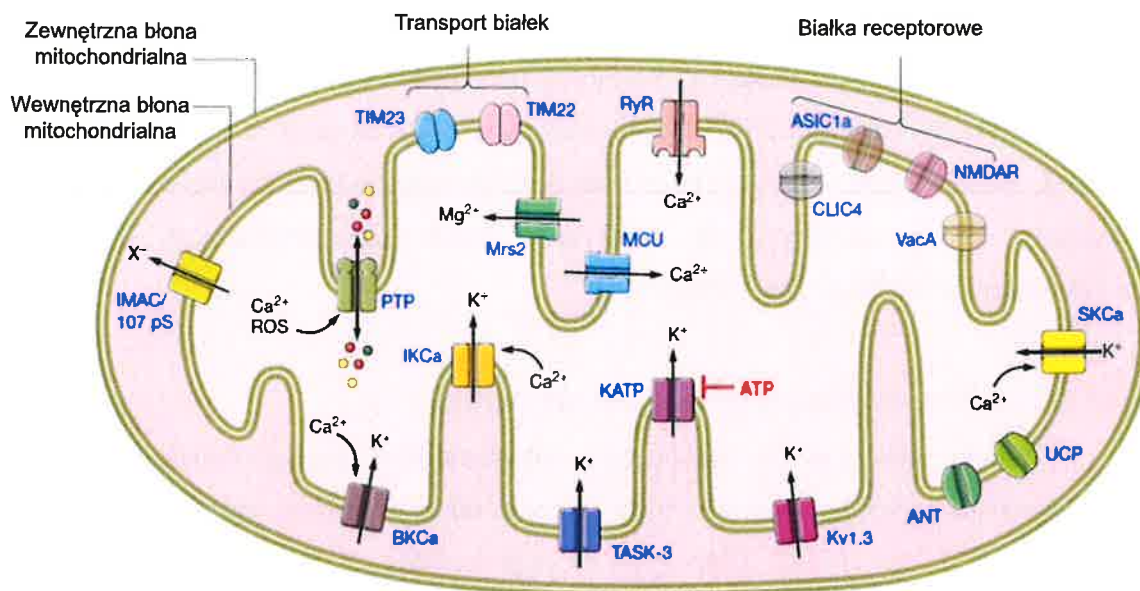
Produkcja energii w mitochondriach polega na syntetyzowaniu cząsteczek ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej, która jest sposobem tlenowego metabolizmu glukozy. Fosforylacja oksydacyjna jest znacznie bardziej wydajna niż fosforylacja substratowa w beztlenowym metabolizmie glukozy podczas glikolizy. Synteza ATP w mitochondriach zachodzi poprzez transport elektronów pomiędzy łańcuchem kompleksów białek zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Ten łańcuch kompleksów białkowych nazywany jest łańcuchem transportu elektronów (ETC, *ang. electron transport chain*) (Simcox i Reeve 2016) i zawiera:

- kompleks I - oksydoreduktaza NADH (NADH, *ang. nicotinamide adenine dinucleotide*) katalizuje utlenianie NADH, pochodzącego z cyklu kwasu cytrynowego, który jest donorem dwóch elektronów, które przechodzą do mononukleotydu flawinowego. Następnie zachodzi redukcja ubichinonu do ubichinolu. To ten transfer elektronów jest sprzężony z przemieszczeniem się czterech protonów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną (Simcox i Reeve 2016). Kompleks I jest największy pod kątem masy molekularnej (980 kDa) i u ssaków składa się z 46 podjednostek, z których 7 jest kodowana przez geny znajdujące się w genomie mitochondrialnym (Koopman et al. 2010; Lenaz et al. 2006),
- kompleks II, czyli oksydoreduktaza bursztynianu/ubichinonu, odpowiada za utlenianie bursztynianu do fumaranu w cyklu Krebsa. Elektrony, które powstały w tej reakcji redoks są przekazywane do łańcucha transportu elektronów poprzez redukcję ubichinonu. Transport elektronów nie jest w tym przypadku związany z transportem protonów. Kompleks II jest najmniejszym kompleksem łańcucha ETC, który składa się z czterech podjednostek. Genu kodujące białka kompleksu II znajdują się w genomie jądrowym (Cecchini 2003; Yankovskaya et al. 2003; Horsefield et al. 2004),
- kompleks III, oksydoreduktaza koenzym Q - cytochrom c to enzym, który katalizuje utlenienie ubichinolu. Jednocześnie następuje redukcja dwóch cząsteczek cytochromu c. Kompleks III jest złożony z dwóch kompleksów, z których każdy zawiera po 11 podjednostek, w tym jedna jest produktem genu kodowanego przez genom mitochondrialny, a także trzy cytochromy – cytochrom c1 i dwa cytochromy b (Iwata et al. 1998),
- kompleks IV - oksydaza cytochromu c katalizuje redukcję tlenu. Podczas gdy elektrony przemieszczają się na tlen cząsteczkowy, łącznie osiem protonów jest przemieszczanych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, generując gradient protonów, który zostanie później wykorzystywany przez końcowy kompleks fosforylacji oksydacyjnej w celu wytworzenia cząsteczki ATP (Tsukihara et al. 1996). Kompleks IV jest zbudowany z 13 podjednostek, z których trzy są kodowane przez genom mitochondrialny (COXI, II, III) (Tsukihara et al. 1996),
- syntaza ATP, enzym ten syntetyzuje cząsteczki ATP z adenozynodifosforanu (ADP) i fosforanu nieorganicznego dzięki energii zgromadzonej w gradiencie elektrochemicznym. Syntaza ATP to duży kompleks, który składa się z 16 podjednostek

(Rubinstein et al. 2003), zawiera dwie podjednostki kodowane przez genom mitochondrialny (Ferguson 2000; Yoshida et al. 2001).

Oprócz udziału w syntezie ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej, mitochondria pełnią szereg innych ważnych funkcji w procesach fizjologicznych zachodzących w komórce. Jednym z tych procesów jest śmierć komórkowa na drodze apoptozy. W przebiegu tego rodzaju śmierci komórkowej zachodzi kurczenie się komórek, powstają pęcherzyki błonowe, dochodzi również do fragmentacji jądra komórkowego, a także kondensacji chromatyny jądrowej. Po tych zmianach morfologicznych komórka ulega dalszej fragmentacji, a następnie jest degradowana przez makrofagi. W komórkach ssaków występują dwie główne ścieżki apoptozy, ścieżka wewnętrzna i ścieżka zewnętrzna. Mitochondria odgrywają kluczową rolę w obydwu ścieżkach. Wewnętrzna ścieżka jest kontrolowana przez produkty genów z rodziny Bcl-2, które kierują szlakami przekazywania sygnałów, w efekcie których następuje uwalnianie proapoptotycznych białek z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (Pradelli et al. 2010; Simcox i Reeve 2016). Druga ścieżka – zewnętrzna, polega na aktywacji kaspazy-8, utworzeniu kompleksu sygnalizacyjnego, który inicjuje kaskadę szlaku sygnałowego. W efekcie prowadzi to do zwiększenia przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej i uwolnienia cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej, co jest sygnałem do dalszych reakcji prowadzących do śmierci na drodze apoptozy (Simcox i Reeve 2016).

Mitochondria mają swój udział również w śmierci komórkowej na drodze nekrozy. Śmierć nekrotyczna komórek charakteryzuje się zwiększaniem ich objętości, wyczerpaniem dostępnej puli ATP i przerwaniem ciągłości błon biologicznych. Nekroza może wystąpić między innymi w odpowiedzi na uszkodzenie na drodze ischemii. Powoduje to spadek pH w odpowiedzi na warunki beztlenowe i znaczne zmniejszenie ilości ATP, co powoduje wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia. Te zmiany w poziomach wapnia mogą następnie wywołać otwarcie mPTP (mPTP, *ang. mitochondrial permeability transition pore*), co z kolei znacznie zmienia przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej i skutkuje spadkiem potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, zakłóca fosforylację oksydacyjną i powoduje pęcznienie macierzy, a tym samym zaburzenie struktury grzebienia mitochondrialnego. Prowadzi to do pęknięcia zewnętrznej błony mitochondrialnej i aktywacji szeregu enzymów hydrolitycznych. W efekcie tych zmian zachodzi śmierć komórkowa na drodze nekrozy (Orrenius et al. 2015; Morciano et al. 2015).



Rysunek 4. Na rysunku zaznaczono białka błonowe odpowiedzialne za transport białek do mitochondriów, takie jak TIM23 (ang. *translocase of the inner membrane 23*) oraz TIM22 (ang. *translocase of the inner membrane 22*), białka ASIC1a (ang. *acid-sensing ion channel 1a*) i receptor N-metylo-D-asparaginianowy (NMDAR, ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*), a także białka IMAC (ang. *inner mitochondrial anion channel*), BK_{Ca} (ang. *large-conductance calcium-activated potassium channel*), IK_{Ca} (ang. *intermediate-conductance calcium-activated potassium channel*), TASK-3 (ang. *TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 3*), K_{ATP} (ang. *ATP-sensitive potassium channel*), Kv1.3 (ang. *voltage-gated potassium channel subunit Kv1.3*), SK_{Ca} (ang. *small-conductance calcium-activated potassium channel*), RyR (ang. *ryanodine receptor*), MCU (ang. *mitochondrial calcium uniporter*), Mrs2 (ang. *mitochondrial RNA splicing 2 protein*) oraz PTP (ang. *permeability transition pore*) umożliwiające przepływ jonów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Dodatkowo zaznaczono główne czynniki aktywujące (Ca²⁺, ROS - czarne strzałki) lub hamujące (ATP - czerwone linie) aktywność kanałów. Na podstawie (Szabo i Zoratti 2014).

Kolejną ważną funkcją, którą mitochondria pełnią w komórce jest buforowanie i utrzymywaniu homeostazy jonów wapnia. Jony wapnia są wtórnymi przekąźnikami w wielu szlakach sygnałowych i mają wpływ uwalnianie neuroprzekąźników i regulują ekspresję genów. Przekazywanie sygnałów z udziałem jonów wapnia jest też ważne w procesach śmierci komórkowej na drodze apoptozy i nekrozy (Simcox i Reeve 2016; Clapham 2007). Mitochondria mają zdolność do akumulowania wapnia dzięki obecności uniportera (MCU) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, co pozwala na transport jonów wapnia do macierzy mitochondrialnej zgodnie z gradientem potencjału elektrochemicznego. Z kolei transport wapnia przez zewnętrzną błonę mitochondrialną odbywa się poprzez VDAC (Gincel et al. 2001; Keinan et al. 2013; Weisthal et al. 2014). Mitochondria produkują reaktywne formy tlenu na drodze fosforylacji oksydacyjnej. Ma to miejsce głównie poprzez aktywność kompleksów I

i III łańcucha oddechowego. Kompleksy te wytwarzają nadadtlenek (O_2^-), który może być następnie przekształcony w inne cząsteczki wolnych rodników, w tym nadadtlenek wodoru i nadtlenoazotyn, poprzez reakcje z dysmutazą nadadtlenkową 2 (SOD2, ang. superoxide dismutase 2) lub NO (Murphy 2009). Z kolei, reaktywne formy tlenu mogą uszkadzać organelle komórek, ale są również ważnymi elementami licznych szlaków przekazywania sygnałów, na przykład tych prowadzących do biosyntezy białek odpowiedzialnych za reakcje antyoksydacyjne (St-Pierre et al. 2006).

1.4.2 Uszkodzenia mitochondriów przez pyły miejskie

Ostatnio wykazano, że uszkodzenia mitochondriów mogą prowadzić do zaburzeń funkcjonowania całych komórek głównie z uwagi na udział w procesie starzenia się komórek prowadzącego do ich śmierci. Ekspozycja na pyły miejskie może uszkadzać mitochondria głównie na drodze stresu oksydacyjnego. Uszkodzenia wiążą się również z zaburzoną integralnością błony (Guo et al. 2017), zmianami w transporcie protonów (X. Li et al. 2016), upośledzeniami metabolizmu (R. Gao et al. 2017) zaburzeniami autofagii (Zhen et al. 2019). Składnikami PM, które są opisywane jako przyczyny tych zaburzeń funkcjonowania mitochondriów są azotany, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i węgiel. Ze względu na to, że te składniki generują uszkodzenia mitochondriów na drodze stresu oksydacyjnego, mogą się też przyczyniać do wzrostu poziomu stanu zapalnego w obrębie tkanki (Van Den Heuvel et al. 2016).

Reaktywne formy tlenu powstające w odpowiedzi na zaburzenia funkcjonowania mitochondriów pod wpływem ekspozycji na PM prowadzą do szeregu negatywnych efektów z punktu widzenia fizjologii tych organelli. Pierwszym z nich są uszkodzenia mitochondrialnego DNA (mtDNA). W przypadku nadprodukcji RFT, dysmutaza nadadtlenkowa nie katalizuje neutralizacji wszystkich reaktywnych form tlenu i w efekcie pozostałe wolne rodniki uszkadzają nici DNA (Breton et al. 2019; X. Gao et al. 2017; Grevendonk et al. 2016). Co ważne, mtDNA jest o wiele bardziej narażone na uszkodzenia ze strony reaktywnych form tlenu, ponieważ w przeciwieństwie do DNA jądrowego nie jest chronione otoczką jądrową (Chew et al. 2020).

Kolejnym elementem mitochondriów, który jest szczególnie narażony na uszkodzenia w wyniku ekspozycji na PM są białka mitochondrialne. RFT powstałe w odpowiedzi na PM mogą utleniać również białka. Proces ten prowadzi do deformacji strukturalnej białka, dezintegracji kompleksów, degradacji ich cząsteczek. Może to również skutkować utratą

możliwości do pełnienia fizjologicznych funkcji białek (Berlett i Stadtman 1997; Chondrogianni et al. 2014; Hensley i Floyd 2002; Chew et al. 2020; Lodovici i Bigagli 2011).

W efekcie narażenia na działanie pyłów miejskich uszkodzeniu mogą ulegać również lipidy tworzące błony biologiczne, również te wchodzące w skład zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej. Peroksydacja lipidów powoduje zmianę ich struktury. To z kolei ma negatywny wpływ na strukturę podwójnej błony mitochondrialnej i może prowadzić do dezintegracji kompleksów błonowych. Naruszona integralność strukturalna błon biologicznych w mitochondriach prowadzi do uwolnienia RFT i czynników proapoptotycznych do cytoplazmy. Rozpoczyna to kaskadę sygnałową szlaków stresu komórkowego. (Chew et al. 2020; Keller et al. 1998; Zhen et al. 2019). Uszkodzeniom może też ulegać struktura grzebieni mitochondrialnych, w szczególności przy narażeniu na pyły ultradrobne (N. Li et al. 2003).

Uszkodzenie mitochondriów pod wpływem ekspozycji na PM wywołuje aktywację mechanizmów ochronnych w komórkach, na przykład szlaku odpowiedzi antyoksydacyjnej (Kanninen et al. 2015; Vomund et al. 2017). Warto zwrócić uwagę, że ekspozycja komórek na antyoksydanty lub aktywacja sygnalizacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego pochodzenia erytroidalnego typu 2 (NRF2, *ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) przed podaniem PM wywołuje efekt ochronny przed uszkodzeniami komórek i ich komponentów, w tym mitochondriów (Pardo et al. 2019; Soberanes et al. 2019; Zhong et al. 2017). Może to stanowić ważny element w poszukiwaniu strategii ochronnych skierowanych do osób narażonych na wysoką ekspozycję na zanieczyszczenia powietrza, w tym pyły miejskie, ale wymaga dalszych badań.

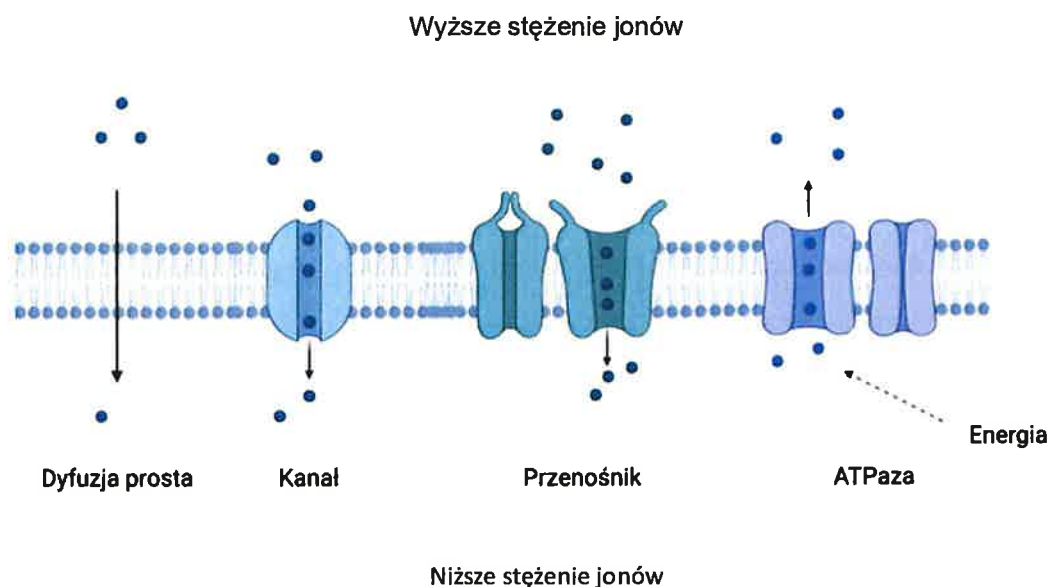
Mitochondria komórek tworzących tkanki układu oddechowego są bezpośrednio narażone na uszkodzenia wywołane przez pyły miejskie. Negatywny efekt na funkcjonowanie mitochondriów komórek dróg oddechowych pod wpływem ekspozycji na PM potwierdzono w doświadczeniach *in vivo* z udziałem gryzoni. Eksperymenty z udziałem szczurów narażonych na PM_{2,5} wykazały, że uszkodzenie płuc pod wpływem ekspozycji na PM jest silnie związane z nieprawidłowościami w obrębie struktury i funkcji mitochondriów. Zaburzenia te obejmowały wzrost objętości mitochondriów, zaburzenia struktury grzebienia mitochondrialnego, mniejszą aktywność mitochondrialnej manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD, *ang. mitochondria-located manganese superoxide dismutase*), zakłócenie dynamiki fuzji i peroksydacją lipidów w mitochondriach (R. Li et al. 2015). Wykazano również, że ekspozycja na PM_{2,5} skutkowałą zapadnięciem się pęcherzyków płucnych czy zapaleniem płuc. Zauważono również uszkodzenia oksydacyjne w obrębie

komórek i mitochondriów w płucach charakteryzujących się zwiększoną peroksydacją lipidów oraz zmniejszonym stosunkiem glutationu do disiarczku glutationu (Riva et al. 2011).

1.5 Kanały jonowe

Białka kanałowe (kanały jonowe) to przez błonowe struktury w błonach biologicznych, które umożliwiają określonym jonom, głównie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} lub Cl^- szybką dyfuzję zgodną z gradientami elektrochemicznymi. Wydajność transportu jonów przez kanały jonowe jest stosunkowo wysoka. Kanały jonowe mają przewagę nad nośnikami, ponieważ przez jeden otwarty kanał może przejść do miliona jonów na sekundę. Szybkość ta jest około 1000 razy większa niż transport prowadzony przez jakiekolwiek znane białko nośnikowe. Transport jonów przez kanały odbywa się wyłącznie z gradientem stężeń, tzn. biorą one udział w transporcie pasywnym, zgodnym z gradientem (Rysunek 5, Tabela 3).

Z kolei, transport aktywny to mechanizm przemieszczania cząsteczek wbrew gradientowi stężeń, wymagający udziału wyspecjalizowanych białek błonowych oraz dostarczenia energii. Proces ten występuje w dwóch podstawowych formach: pierwotnej oraz wtórnej. Pierwotny transport aktywny wykorzystuje energię pochodzącą bezpośrednio z hydrolizy ATP, czy na przykład absorpcji światła, co umożliwia zmianę konformacji białek przenośnikowych i przemieszczanie jonów przez błonę biologiczną. Klasycznym przykładem jest pompa sodowo-potasowa (Na^+ , K^+ -ATPaza), która w sposób skoordynowany transportuje trzy jony sodu na zewnątrz błony i umożliwia przemieszczenie dwóch jonów potasu do jej wnętrza. Mechanizm ten odpowiada za utrzymanie gradientów elektrochemicznych niezbędnych do przewodnictwa nerwowego, transportu wtórnego i zachowania potencjału spoczynkowego błony. Sprzężenie transportu jonów z hydrolizą ATP jest ścisłe, a w warunkach odwróconego gradientu stężeń ten sam system może działać w kierunku syntezy ATP, co podkreśla jego znaczenie w homeostazie energetycznej komórki (Kłyszajko-Stefanowicz 2015). Podsumowanie rodzajów transportu przez błony biologiczne zostało przedstawione na Rysunku 5. Transport przez kanały jonowe porównano z innymi nośnikami w Tabeli 3. Zdolność do kontrolowania przepływów jonów przez te kanały jest niezbędna dla wielu funkcji komórkowych, takich jak odbierania, przewodzenia i przesyłania sygnałów między komórkami (Alberts et al. 2002). Ostatnio odkryto znaczącą rolę kanałów jonowych w cytoprotekcji (Sun i Feng 2013; Maliszewska-Olejniczak et al. 2025; Sato et al. 2005).



Rysunek 5. Sposoby transportu jonów przez błony biologiczne. Zaznaczono dyfuzję prostą, transport przez kanał, przenośnik/transporter oraz transport aktywny. Dla przenośnika i niebieskie kulki oznaczają jony. Rysunek wykonano w programie *Biorender.com*.

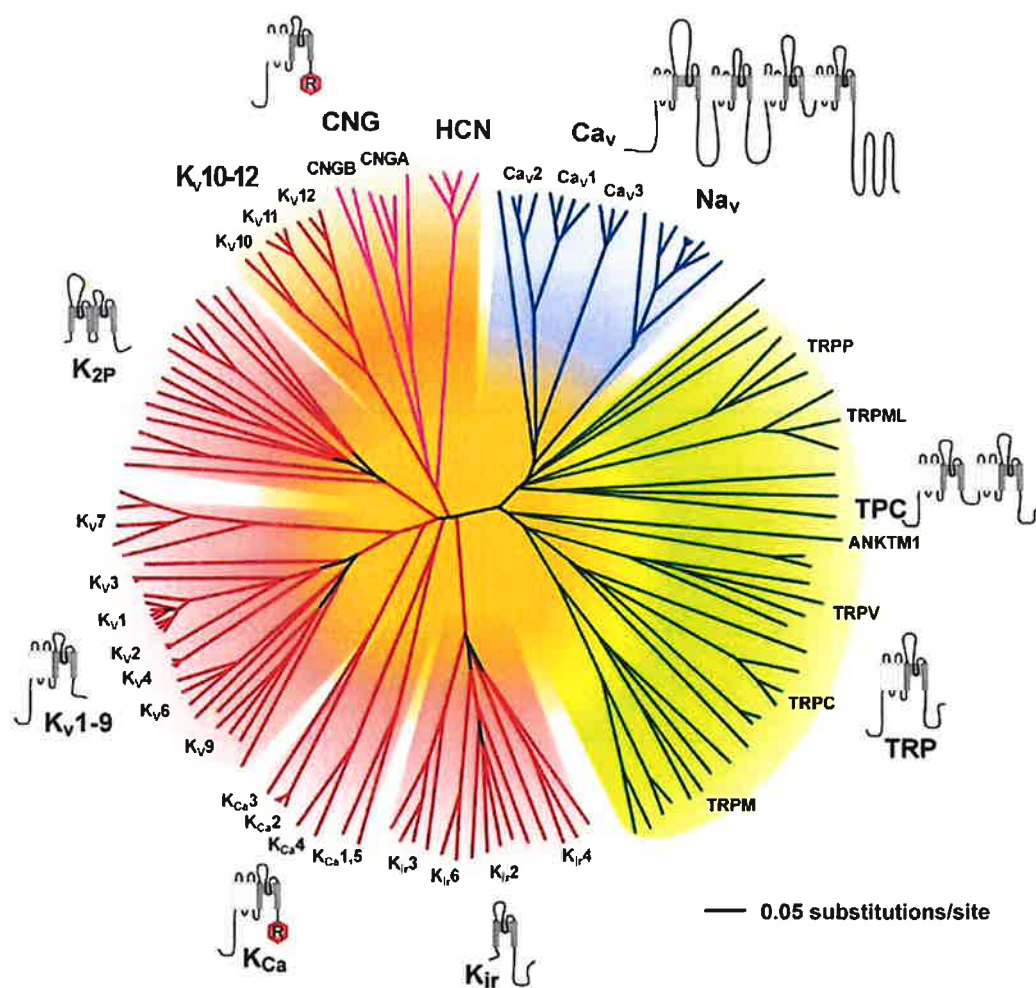
Tabela. 3 Porównanie transportu jonów przez kanały jonowe, przenośniki/transportery i pompy.

Rodzaj transportu	Bierny		Aktywny
Rodzaj	Kanał jonowy	Nośnik	Pompa
Selektywność	10-20x	Pośrednia	Bardzo wysoka
Szybkość (jony/s)	10^6	<1000	100
Transport w kontekście gradientu	Zgodnie	Zgodnie/wbrew	Wbrew
Wymóg dostarczenia energii	Nie	Nie	Tak
Jony/zmiana konformacji	Wiele	Ok. 1	1-kilka

1.5.1 Kanał potasowy typu BK_{Ca}

W komórkach nabłonkowych oprócz transportu przez błony biologiczne jony są również transportowane przez warstwy komórek. Te procesy fizjologiczne są częściowo realizowane przez białka super rodziny kanałów jonowych bramkowanych napięciem. Ta super

rodzina kanałów jest jedną z największych grup białek przekazywania sygnału, zajmując trzecie miejsce po receptorach sprzężonych z białkiem G i kinazach białkowych (Yu i Catterall 2004). Każdy kanał tej rodziny zawiera podobną strukturę poru, zwykle kowalencyjnie przyłączoną do domen regulacyjnych, które regulowane są przez zmiany napięcia błony, czy wewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe. W tej super rodzinie białek kanałowych opisano: kanały sodowe (Na_v), wapniowe (Ca_v) i potasowe (K_v) bramkowane napięciem; kanały potasowe aktywowane wapniem (K_{Ca}); kanały jonowe modulowane cyklicznymi nukleotydami; kanały receptora przejściowego potencjału (TRP); kanały potasowe prostownicze (K_{ir}); i kanały potasowe dwuporowe ($\text{K}_{2\text{P}}$) (Yu i Catterall 2004). Na rysunku 6 przedstawiono schemat zależności sekwencji aminokwasów w obszarach porów rodziny kanałów jonowych.



Rysunek 6. Drzewo filogenetyczne rodziny kanałów jonowych. Na podstawie („Ion channel families | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY”, b.d.).

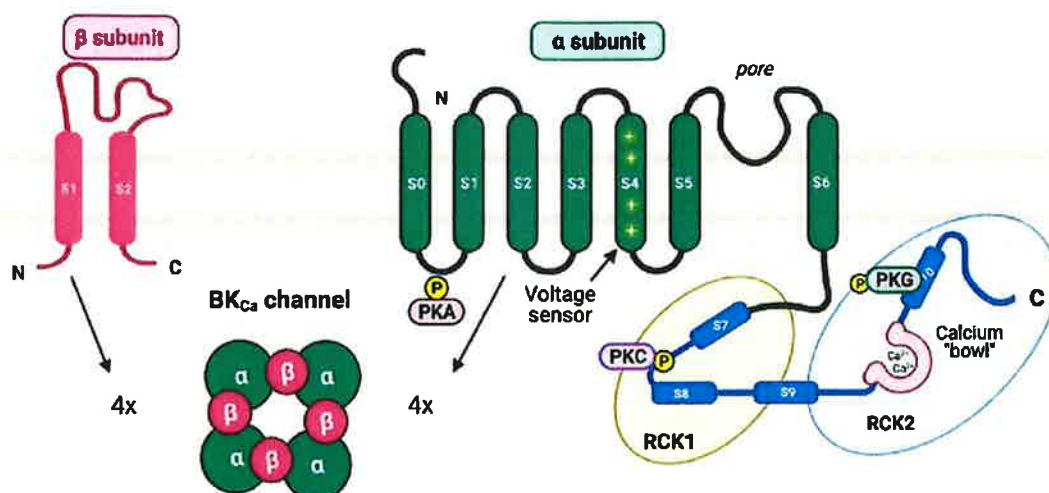
Kanały potasowe są największą rodziną spośród tych występujących w błonach biologicznych organizmów żywych. Kanały te obecne są zarówno w pobudliwych i niepobudliwych komórkach. Wśród kanałów potasowych wyróżnić można kanały potasowe aktywowane przez jony Ca^{2+} (kanały K_{Ca}) (Faber i Sah 2003; K. R. Shah et al. 2021).

Rodzinę kanałów K_{Ca} można podzielić na trzy główne podrodziny na podstawie ich przewodnictwa. Pierwszą podrodziną są kanały SK (niskie przewodnictwo - 4–14 pS). Obejmuje ona trzy izoformy kanałów potasowych: $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$ (SK1), $\text{K}_{\text{Ca}2.2}$ (SK2) i $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ (SK3). Kolejną podrodzinę stanowią kanały o średnich wartościach przewodnictwa - IK (przewodnictwo - 32–39 pS). $\text{K}_{\text{Ca}2.x}$ i $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ są regulowane wyłącznie przez zmiany stężenia Ca^{2+} . Trzecią podrodzinę stanowią kanały BK_{Ca} lub inaczej $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$, Slo1 (duże przewodnictwo - 200–300 pS). Kanały te są aktywowane przez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} i potencjał błonowy, jednak są mniej wrażliwe na zmiany stężenia wapnia niż dwie pozostałe podrodziny kanałów K_{Ca} (K. R. Shah et al. 2021; Ishii et al. 1997; Cox 2011). Rodziny kanałów jonowych podsumowano na Rysunku 6.

Kanały K_{Ca} pełnią szereg ważnych funkcji z punktu widzenia funkcjonowania komórki. Należą do nich:

- regulacja stężenia wewnątrzkomórkowego jonów Ca^{2+} ,
- regulacja potencjału błonowego,
- utrzymanie homeostazy poziomu jonów K^{+} ,
- regulacja objętości komórek,
- rola w uwalnianiu neuroprzekaźników (K. R. Shah et al. 2021).

Kanały potasowe o dużym przewodnictwie (BK_{Ca}) są aktywowane przez wapń oraz regulowane zmianami polaryzacji błony biologicznej (głównie przy depolaryzacji błony). Zależność tych kanałów od wapnia zmienia się w zależności od potencjału błony – stała dysocjacji (K_d) wapnia mieści się w zakresie mikromolarnym przy potencjałach spoczynkowych błony (~ -60 mV), i w zakresie nanomolarnym przy depolaryzacji (+20 do +40 mV). W skrajnych sytuacjach, kanały te mogą się otwierać przy niskim poziomie wapnia i odpowiednich wysokich wartościach potencjału (Faber i Sah 2003). Strukturę kanału BK_{Ca} zaprezentowano na Rysunku 7. Dodatkowo zaznaczono podjednostki regulatorowe typu β .



Rysunek 7. Struktura kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego wapniem (kanał BK_{Ca}). Kanał BK_{Ca} to kompleks złożony z tetrameru, który tworzą cztery podjednostki α tworzące por i cztery podjednostki β regulujące. Podjednostka α obejmuje domeny transbłonowe (S0-S6) na końcu N i domeny wewnątrzkomórkowe (S7-S10) na końcu C. Por powstaje między S5 i S6, a segment S4 stanowi sensor napięcia. Miejsce fosforylacji dla kinazy PKA (ang. *protein kinase A*) znajduje się w domenach transbłonowych, z kolei miejsca dla PKC (ang. *protein kinase C*) i PKG (ang. *protein kinase G*) znajdują się w domenach wewnątrzkomórkowych. Segmenty S7-S10 są powiązane z regulacyjną domeną przewodnictwa potasu (RCK1 i RCK2). Opis i rysunek przygotowany na podstawie (Al-Karagholi 2023).

Geny *KCNMA1* oraz *KCNMB1-4* są odpowiedzialne za kodowanie podjednostek α oraz $\beta 1$ - $\beta 4$ kanału BK_{Ca} (Sakai et al. 2011). Alternatywne składanie genu kodującego podjednostkę α prowadzi do powstania różnych izoform tego kanału potasowego. Na przykład, w komórkach glejaka mózgu odkryto wariant kanału mitoBK_{Ca} nazywanego STREX, który reaguje na bodźce mechaniczne (Walewska et al. 2018). Z kolei w mitochondriach pochodzących z komórek serca zidentyfikowano izoformę kanału BK_{Ca}-VEDEC, która wyróżnia się unikalną sekwencją 50 aminokwasów. Kluczowe znaczenie ma tutaj sekwencja VEDEC na C-końcu podjednostki α , która kieruje kanał BK_{Ca} do wewnętrznej błony mitochondrialnej (Harpreet Singh et al. 2013).

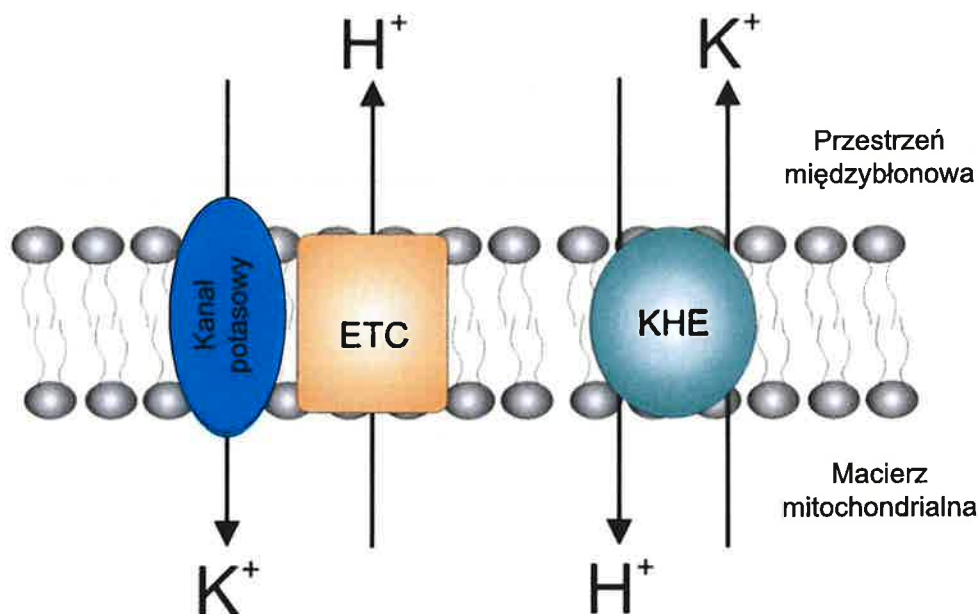
Wykazano, że aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych (mitoK) powoduje zmiany w objętości macierzy mitochondrialnej i oddychaniu komórkowym. Może też zmieniać wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej (Checchetto et al. 2016). Odkryto, że wszystkie te właściwości są istotne w regulacji syntezy mitochondrialnych reaktywnych form tlenu (mitoRFT). Dlatego, uważa się, że zmiany aktywności kanałów potasowych, obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej są zaangażowane w regulację poziomu wolnych rodników (Akopova et al. 2020). Zmiany zachodzące w komórce w efekcie transportu potasu do macierzy mitochondrialnej podsumowano na Rysunku 8.



Rysunek 8. Skutki transportu jonów potasu do macierzy mitochondrialnej.

1.5.2 Aktywatory i inhibitory kanału typu BK_{Ca}

Farmakologia rodziny kanałów BK_{Ca} jest całkiem dobrze poznana. Kanały te mogą być regulowane nie tylko poprzez czynniki endogenne, jak jony wapnia, czy napięcie, ale również przez związki dostarczane do komórek z zewnątrz. Obecnie trwają poszukiwania nowych selektywnych aktywatorów, które zwiększają napływ potasu do macierzy mitochondrialnej, co może prowadzić do cytoprotekcji. Aktywatory kanałów BK_{Ca} obejmują substancje syntetyczne, takie jak NS1619 (1,3-Dihydro-1[2-hydroksy-5-(trifluorometylo)fenylo]-5-(trifluorometylo)-2H-benzimidazol-2-on) i NS11021 (N'-[3,5-Bis (trifluorometylo) fenylo]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-ilo) fenylo]-tiomocznik) (Testai et al. 2013; Hannigan et al. 2016; Leanza et al. 2019; Kampa et al. 2021), CGS7184 (1 - [[(4-chlorofenylo) amino] okso]-2-hydroksy-6-trifluorometylo-1H-indolo-3-karboksylan etylu) (Augustynek et al. 2018), oraz substancje pochodzenia naturalnego, takie jak np. naringenina. Ponadto, do znanych inhibitorów kanałów BK_{Ca}, które hamują aktywność kanałów typu BK, należą paksylina, penitrem A, czy też iberiotoksyna pochodzenia naturalnego (IbTx, *ang. iberiotoxin*) (Testai et al. 2013; Hannigan et al. 2016; Leanza et al. 2019; Kampa et al. 2021). Schemat skutków transportu jonów potasu i protonów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną podsumowano na Rysunku 9.



Rysunek 9. Uproszczony schemat transportu jonów potasu i protonów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Na rysunku zaznaczono kanał potasowy, ETC - łańcuch transportu elektronów oraz KHE – wymiennik proton/potas (*ang. K^+/H^+ exchanger*).

1.6 Cytoprotekcja

Cytoprotekcja to proces, w którym substancje chemiczne zapewniają ochronę przed szkodliwymi czynnikami uszkadzającymi komórki (Diwanay et al. 2004). Substancje cytoprotekcyjne mogą działać między innymi na zasadzie ochrony przed uszkodzeniami wywoływanymi przez np. reaktywnych form tlenu. Jest to możliwe na zasadzie dwóch mechanizmów (Dinkova-Kostova i Talalay 2008). Pierwszy to bezpośrednie działanie antyoksydacyjne – reakcje redoks z udziałem antyoksydantu i RFT, które prowadzą do powstania nieszkodliwych dla komórek związków. Drugi mechanizm polega na aktywacji przez związek o działaniu cytoprotekcyjnym szlaków przekazywania sygnałów w komórce, które prowadzą do aktywacji komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych (Mehta et al. 2018; Dinkova-Kostova i Talalay 2008).

Ważnym rodzajem cytoprotekcji jest chemoprotekcja. Termin ten odnosi się do cytoprotekcji przeciw środkom chemioterapeutycznym. Terapie przeciwnowotworowe powodują ostrą i przewlekłą toksyczność. Obejmuje ona nie tylko komórki nowotworowe, ale również komórki prawidłowe (Diwanay et al. 2004). Cytotoksyczność chemioterapeutyków wobec zdrowych komórek należy modulować, aby poprawić skuteczność leczenia. Istnieją

związki, które mogą działać chemoprotekcyjnie dzięki modulowaniu odpowiedzi tkankowych lub zakłócaniu mechanizmów toksyczności. Zastosowanie takich środków może zmniejszyć skutki uboczne związaną z leczeniem przeciwnowotworowym, a także może umożliwić intensyfikację leczenia w przypadku choroby wysokiego ryzyka (Diwanay et al. 2004).

1.6.1 Związki pochodzenia naturalnego o działaniu cytoprotekcyjnym

Związki pochodzenia naturalnego mogą wykazywać działanie cytoprotekcyjne. Jedną z grup tych związków są karotenoidy, czyli barwniki roślinne o kolorach żółtym, pomarańczowym i czerwonym (Khoo et al. 2011). Karotenoidy naturalnie występują w niektórych roślinach, algach, grzybach oraz bakteriach, w których zachodzi proces ich syntezy (Alscher i Hess 2017). Wykazują one działanie cytoprotekcyjne poprzez np. wychwytywanie wolnych rodników czy wygaszanie tlenu singletowego. Mogą również absorbować promieniowanie UV, które wykazuje działanie cytotoksyczne (Stahl i Sies 2012; Balić i Mokos 2019; Dąbrowska 2020).

Do karotenoidów należą dwie grupy związków – karoteny i ksantofile. Karoteny to niepolarne węglowodory, do których należą α - i β -karoten i likopen. Z kolei cząsteczki ksantofili mają polarny obszar złożony z grupy hydroksylowej lub ketonowej. Do tej grupy związków należą na przykład astaksantyna, zeaksantyna, luteina i β -kryptoksantyna (Alscher i Hess 2017; Chinembiri et al. 2014). α - i β -karoten i β -kryptoksantyna pełnią w organizmie człowieka funkcję prowitaminy A (Eroglu et al. 2012).

Karotenoidy wykazują działanie antyoksydacyjne (Milani et al. 2017; Fernández-García 2014). Zdolność do wygaszania tlenu singletowego przez karotenoidy rośnie wraz ze wzrostem liczby sprzężonych wiązań podwójnych w cząsteczkach tych związków (Milani et al. 2017). Wysokie stężenia karotenoidów mogą jednak wykazywać również efekt prooksydacyjny (Eichler et al. 2002). Karotenoidy mogą mieć wpływ na komórkowe szlaki przekazywania sygnału, dzięki czemu regulują odpowiedź stresową oraz poziom stanu zapalnego powstającego w odpowiedzi na czynniki stresowe, na przykład promieniowanie UV (Wertz et al. 2005, 2004; Dąbrowska 2020).

Jednym z karotenoidów działającym silnie cytoprotekcyjnie jest na przykład likopen. Wykazuje on działanie antyoksydacyjne na drodze wygaszania tlenu singletowego (Di Mascio et al. 1989), a także chroni mitochondrialne DNA przed uszkodzeniami (Rizwan et al. 2011).

Likopen może również chronić przed uszkodzeniami macierzy zewnątrzkomórkowej (Rizwan et al. 2011).

Kolejną grupą związków o działaniu cytoprotekcyjnym są betalainy, do których należą czerwone barwniki - betacyjaniny (Hadipour et al. 2020; Dąbrowska 2020). Aktywność antyoksydacyjna soku z buraka, który jest głównym źródłem betacyjanin, jest wyższa niż soku z pomidora, marchewki, pomarańczy, ananasa (Ryan i Prescott 2010). Fermentowany i świeży sok z buraka wykazuje też działanie antymutagenne (Klewicka 2010). Betacyjaniny zmniejszają poziom stanu zapalnego wywołanego przez uwalnianie wolnych rodników z neutrofili - reaktywnych form tlenu i HClO (Allegra et al. 2005). Związki te oddziałują z czynnikiem transkrypcyjnym Nrf2, dzięki czemu regulacją ekspresji genów. Dzięki temu pod wpływem betacyjanin wzrasta poziom ekspresji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za reakcje antyoksydacyjne, co jest efektem cytoprotekcyjnym (Krajka-Kuźniak et al. 2013).

1.6.1.1 Polifenole

Ważną i liczną grupą związków o działaniu cytoprotekcyjnym są polifenole (Adhami et al. 2008; Nichols i Katiyar 2010). Związki te działają antyoksydacyjne, przeciwzapalne oraz immunomodulująco (Perron i Brumaghim 2009; Dąbrowska 2020). Polifenole znajdują się głównie w produktach spożywczych, takich jak warzywa, owoce, czekolada, kawa, herbata i wino czerwone. Do polifenoli należą kilka grup związków chemicznych:

- kwasy fenolowe,
- flawonoidy,
- katechiny,
- stylbeny,
- proantocyjanidyny,
- ellagitaniny,
- antocyjany (Perron i Brumaghim 2009).

Polifenole wykazują działanie cytoprotekcyjne, między innymi dzięki silnym właściwościom antyoksydacyjnym (Perron i Brumaghim 2009). W strukturze polifenoli obecne są grupy fenolowe, dzięki którym te związki mogą oddziaływać z reaktywnymi formami tlenu i reaktywnymi formami azotu (RNS, *ang. reactive nitrogen species*) (Manach et al. 2004).

Działanie antyoksydacyjne polifenoli jest możliwe nie tylko bezpośrednio z wolnymi rodnikami. Polifenole mogą również chelatować jony metali ciężkich, które mogą generować

w komórkach powstawanie reaktywnych form tlenu bądź azotu. Na przykład polifenole obecne w herbacie mogą chelatować jony miedzi (Yokozawa et al. 1997).

Związki polifenolowe wykazują nie tylko cytoprotekcyjne właściwości, ale również mogą działać przeciwnowotworowo dzięki prooksydacyjnemu i cytotoksycznemu działaniu w kierunku komórek nowotworowych. Polifenole mogą przyczyniać się do powstawania RFT w komórkach, w których zaszła transformacja nowotworowa. W efekcie tego zachodzi aktywacja szlaków przekazywania sygnału EGFR/MAPK (*ang. epidermal growth factor receptor/mitogen activated protein kinase*) oraz PI3K/Akt (*ang. phosphatidylinositide 3kinases/protein kinase B*). Prowadzi to do indukcji apoptozy, zahamowania cyklu komórkowego lub spowolnienia proliferacji komórek nowotworowych (Avtanski i Poretsky 2018; Balasubramanian et al. 2002). Polifenole w komórkach nowotworowych mogą również wpływać na aktywację szlaków przekazywania sygnału, które prowadzą do wytworzenia czynników przeciwzapalnych (T. Singh i Katiyar 2013).

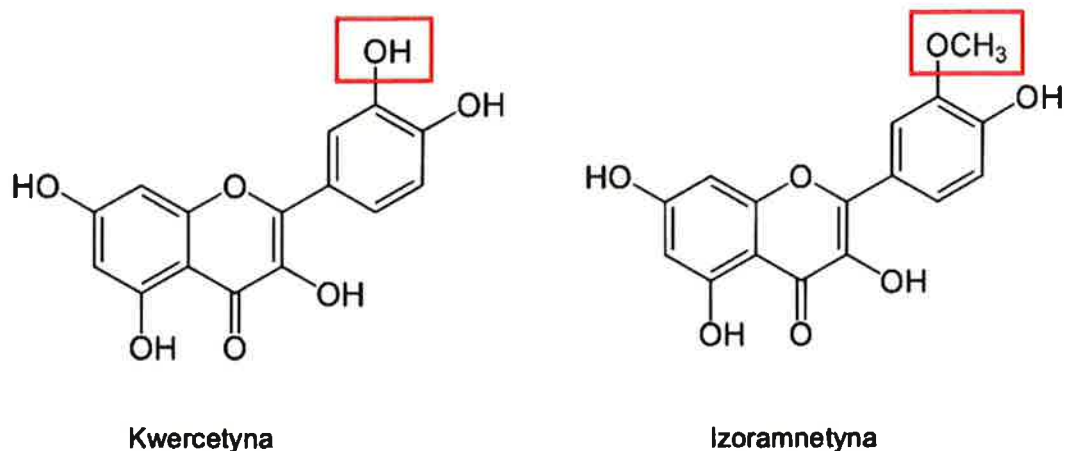
Przeciwnowotworowe właściwości polifenoli potwierdzono zarówno w doświadczeniach *in vitro* jak i *in vivo*. Polifenole pochodzące z herbaty indukują apoptozę komórek nowotworowych skóry. Związki te powodują również wzrost ekspresji genów supresorowych w komórkach (Halder et al. 2008). Na przykład, u myszy z nowotworem skóry wywołanym promieniowaniem UVB, które otrzymywały polifenole wyizolowane z winogron, obserwowano spadek proliferacji komórek nowotworowych i to prowadziło do niższego rozrostu guza (Mittal et al. 2003).

Polifenole mogą wywoływać zarówno antyoksydacyjne, jak i prooksydacyjne efekty. To, jakie działanie będzie dominujące, ściśle zależy od zastosowanego stężenia związku polifenolowego. W niższych dawkach niższych stężeniach związki te zazwyczaj wykazują działanie antyoksydacyjne i cytoprotekcyjne. Z kolei ten sam związek w wyższym stężeniu może wywołać efekt prooksydacyjny i cytotoksyczny (H.-S. Kim et al. 2014; Dąbrowska 2020).

1.6.1.2 Kwercetyna

Jednym z ciekawszych związków jest kwercetyna, polifenol należący do flawonoidów, do klasy flawonoli, który również wykazuje działanie cytoprotekcyjne, między innymi dzięki antyoksydacyjnemu i przeciwzapalnemu właściwościom. To związek chemiczny o kolorze żółtym, który jest słabo rozpuszczalny w gorącej wodzie, dobrze rozpuszczalny w alkoholu

i lipidach oraz nierozpuszczalny w zimnej wodzie (Anand David et al. 2016). Wzór strukturalny kwercetyny zaprezentowano na Rysunku 10.



Rysunek 10. Wzór strukturalny kwercetyny i izoramnetyny. Na podstawie (C. Liu et al. 2023).

Kwercetyna nie jest syntetyzowana w organizmie człowieka (Lakhanpal 2007), może zostać dostarczona wraz z żywnością, znajduje się w ponad 20 roślinach (Anand David et al. 2016). Źródła kwercetyny i ich występowania geograficzne podsumowano w Tabeli 4.

Tabela 4. Rośliny będące źródłem kwercetyny i ich występowanie geograficzne. Na podstawie (Anand David et al. 2016).

Nazwa rośliny	Rodzina	Występowanie geograficzne
Morwa biała (<i>Morus alba</i>)	<i>Moraceae</i>	Chiny
Herbata chińska (<i>Camellia sinensis</i>)	<i>Theaceae</i>	Azja Południowo-Wschodnia
Czosnek dęty (<i>Allium fistulosum</i>)	<i>Amaryllidaceae</i>	Chiny
<i>Calamus scipionum</i>	<i>Calamoideae</i>	Brunei, Sumatra
Moringa olejodajna (<i>Moringa oleifera</i>)	<i>Moringa</i>	Obszary tropikalne, subtropikalne
Wąkrotka azjatycka (<i>Centella asiatica</i>)	<i>Apiaceae</i>	Indie

Dziurawiec cuchnący (<i>Hypericum hircinum</i>)	<i>Clusiaceae</i>	Europa
Dziurawiec zwyczajny (<i>Hypericum perforatum</i>)	<i>Hypericaceae</i>	Europa
Seler zwyczajny (<i>Apium graveolens</i>)	<i>Apiaceae</i>	Europa, Afryka Północna, Syberia i Kaukaz Europa, Afryka Północna, Syberia i Kaukaz
Brokuł (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)	<i>Brassicaceae</i>	Europa i Azja
Jarmuż (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabellica</i>)	<i>Brassicaceae</i>	Europa
Kolendra siewna (<i>Coriandrum sativum</i>)	<i>Apiaceae</i>	Południowa Europa, północna Afryka do południowo-zachodniej Azji
Salata siewna (<i>Lactuca sativa</i>)	<i>Asteraceae</i>	Morze Śródziemne, Syberia
Cebula czerwona (<i>Allium cepa</i>)	<i>Liliaceae</i>	Europa
Rukiew wodna (<i>Nasturtium officinale</i>)	<i>Brassicaceae</i>	Większość świata
Szparag lekarski (<i>Asparagus officinalis</i>)	<i>Asparagaceae</i>	Egipt, Unia Europejska, Chiny, Meksyk
kapar ciernisty (<i>Capparis spinosa</i>)	<i>Capparaceae</i>	Europa
Śliwa domowa (<i>Prunus domestica</i>)	<i>Rosaceae</i>	Europa, Chiny, Stany Zjednoczone
Jabłoń domowa (<i>Malus domestica</i>)	<i>Rosaceae</i>	Ameryka Północna, Europa
Wiśnia ptasia (<i>Prunus avium</i>)	<i>Rosaceae</i>	
Pomidor zwyczajny (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Solanaceae</i>	Ameryka Łacińska, Europa
Żurawina błotna (<i>Vaccinium oxycoccos</i>)	<i>Ericaceae</i>	Europa, Anatolia, Maghreb i Azja Zachodnia

Antyoksydacyjne właściwości kwercetyny są szczególnie istotne, ponieważ działa ona jako jeden z najsilniejszych wymiataczy reaktywnych form tlenu wśród flawonoidów (Pocernich et al. 2011) oraz zmniejsza uszkodzenia komórkowe spowodowane przez reaktywne formy tlenu (Jagtap et al. 2009). Z drugiej strony, udowodniono, zmniejszenie uszkodzeń komórek przez RFT w limfocytach i neuronach w obecności kwercetyny wraz z witaminą C

(Lakhanpal 2007). Kwercetyna może też regulować ekspresję genów kodujących enzymy odpowiedzialne za reakcje detoksykacji. Dzięki temu kwercetyna zapobiega uszkodzeniom mięśnia sercowego wywołanym przez lipopolisacharyd (LPS, *ang. lipopolysaccharide*), ponieważ pod jej wpływem następuje zwiększanie poziomów dysmutazy ponadtlenkowej SOD (*ang. superoxide dismutase*) i katalazy oraz zmniejszanie poziomów dialdehydu malonowego (H. Liu et al. 2014).

Kolejnym elementem ochronnych właściwości kwercetyny jest regulowanie procesu zapalnego. Kwercetyna hamuje enzymy odpowiedzialne za reakcje zwiększające poziom stanu zapalnego - cyklooksygenazę (COX, *ang. cyclooxygenase*) i lipooksygenazę. Dzięki temu w efekcie działania kwercetyny następuje spadek poziomów mediatorów stanu zapalnego, takich jak prostaglandyny i leukotrieny (Xiao et al. 2011; Warren et al. 2009). Co więcej, kwercetyna wpływa na zmniejszenie poziomów mediatorów stanu zapalnego, takich jak syntaza NO, enzym COX-2 i poziomu białka C-reaktywnego (CRP, *ang. C-reactive protein*) w linii komórkowej ludzkich hepatocytów (García-Mediavilla et al. 2007). Modulowanie poziomu stanu zapalnego przez kwercetynę zostało również potwierdzone przez doświadczenia prowadzone *in vivo*. Szczurom podawano kwercetynę w dawce równoważnej 80 mg/kg. Wykazano, że kwercetyna hamowała ostry oraz przewlekły stan zapalny (Nouri et al. 2019). Podobnie, aktywność przeciwzapalną kwercetyny potwierdzono w przypadku zapalenia stawów indukowanego adiuwantem (Guardia et al. 2001; Mamani-Matsuda et al. 2006).

Co więcej, w badaniach wykazano, że kwercetyna posiada właściwości przeciwnadciśnieniowe, rozszerzające naczynia krwionośne, przeciwotyłociowe, a także wpływa na spadek poziomu cholesterolu całkowitego we krwi i wykazuje działanie przeciwmiażdżycowe (Salvamani et al. 2014; Sultana i Anwar 2008). Wykazano również przeciwnowotworowe, przeciwwrzodowe, antyalergiczne i przeciwwirusowe, immunomodulacyjne i przeciwcukrzycowe działanie kwercetyny (Lakhanpal 2007). Kwercetyna może przynieść również korzyści we wsparciu terapii dny moczanowej, ponieważ może zapobiegać akumulacji kwasu moczowego dzięki hamowaniu aktywności oksydazy ksantynowej (Ahmad et al. 2008).

Co ciekawe, kwercetyna może również chronić przed środowiskowymi czynnikami uszkadzającymi komórki na drodze stresu oksydacyjnego. Efekt ten udowodniono w uszkodzeniu spowodowanym przez dym tytoniowy. Narażenie na dym tytoniowy jest elementem powodującym powstawanie wolnych rodników, które, mogą uszkadzać błony erytrocytów. Wykazano, że kwercetyna i jej metabolity mogą chronić erytrocyty przed

uszkodzeniami błony komórkowej, które są spowodowane przez wolne rodniki powstające w efekcie palenia wyrobów tytoniowych (Begum i Terao 2002).

Kwercetyna posiada, nie tylko cytoprotekcyjne właściwości, ale również może działać cytotoksycznie wobec komórek nowotworowych. Kwercetyna może indukować apoptozę komórek nowotworowych, zmniejszając dzięki temu wzrost guzów nowotworowych w mózgu, wątrobie, jelicie grubym oraz innych narządach i tkankach. Kwercetyna działa również hamująco na rozprzestrzenianie się komórek złośliwych i tworzenie przerzutów (Akan i Garip 2013; Vásquez-Garzón et al. 2009). Działanie przeciwnowotworowe kwercetyny zauważono również w badaniach z udziałem pacjentów chorujących na rodzinną polipowatość gruczolakowatą (FAP, ang. *familial adenomatous polyposis*). Pacjentom z FAP podawano kurkuminę 480 mg i kwercetynę 20 mg doustnie 3 razy dziennie przez 6 miesięcy. Okazało się, że taka interwencja skutkowała zmniejszeniem liczby i wielkości gruczolaków jelita krętego i odbytnicy. Warto zaznaczyć, że ta interwencja u pacjentów nieniosła znaczących skutków ubocznych (Cruz-Correa et al. 2006).

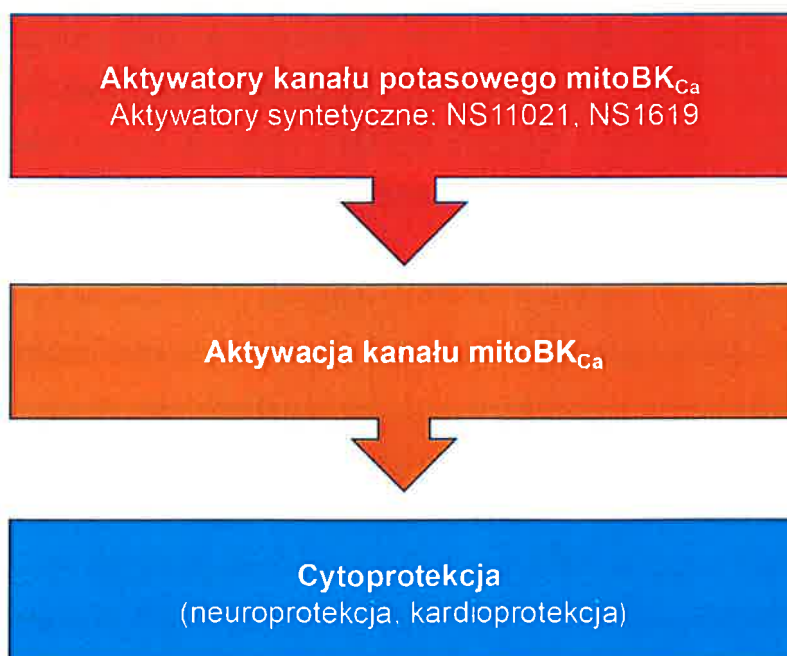
Okazuje się, że kwercetyna wspomaga również leczenie infekcji bakteryjnych i wirusowych. Wykazuje właściwości przeciwbakteryjne przeciwko patogennym szczepom bakterii obecnym w układzie pokarmowym, oddechowym, moczowym oraz na skórze. Jej właściwości przeciwwzakaźne i hamujące replikację mogą się przyczyniać do właściwości przeciwwirusowych (Johari et al. 2012; Cushnie i Lamb 2005; Ramos et al. 2006; Anand David et al. 2016).

Innym ciekawym związkiem o zbliżonej strukturze jest izoramnetyna (Rysunek 10). Jest ona kluczowym składnikiem aktywnym występującym w owocach rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) oraz liściach miłorzębu dwuklapowego (*Ginkgo biloba* L.) (Gong et al. 2020). Badania wykazały, że izoramnetyna posiada właściwości ochronne dla układu sercowo-naczyniowego i nerwowego, a także działa antynowotworowo, przeciwzapalnie, przeciwutleniająco (Lei et al. 2024). Mechanizmy działania izoramnetyny obejmują regulację szlaków sygnałowych takich jak PI3K/AKT/PKB, NF- κ B, MAPK oraz wpływ na ekspresję odpowiednich cytokin i kinaz. Zatem, wykorzystanie izoramnetyny stanowi obiecujący kierunek w rozwoju farmakologii. Niemniej jednak, dokładne działanie izoramnetyny jest jeszcze niewystarczająco poznane i wymaga dalszych badań naukowych (Gong et al. 2020).

1.6.2 Udział mitochondrialnych kanałów potasowych w cytoprotekcji

Udowodniono, że mitochondrialne kanały potasowe biorą udział w cytoprotekcji (O'Rourke et al. 2005). Na przykład, zaobserwowano, że aktywacja kanału mitoK_{ATP} jest

powiązana z mechanizmem ochrony przed uszkodzeniem niedokrwinnym. Aktywacja tego kanału potasowego skutkuje w tym przypadku ochroną komórek przed apoptozą i aktywacją PTP (Akao et al. 2001; Hausenloy et al. 2004; Juhaszova et al. 2004). Wykazano również, że kanał mitoBK_{Ca} pełni rolę w cytoprotekcji. Opisano, że aktywatory kanału mitoK_{Ca} zapewniają ochronę przed uszkodzeniem wywołanym niedokrwieniem i reperfuzją analogicznie jak ma to miejsce w przypadku aktywacji mitoK_{ATP} (Matsushita et al. 2003), ale poprzez odrębną ścieżkę. Ponieważ kanał mitoBK_{Ca} może być aktywowany przy wysokim stężeniu jonów wapnia Ca²⁺ w mitochondriach, może przeciwdziałać dalszej akumulacji jonów Ca²⁺. Aktywacja mitoBK_{Ca} może także regulować objętość mitochondriów oraz wpływać na zwiększenie wydajności fosforylacji oksydacyjnej (O'Rourke et al. 2005). Cytoprotekcyjny efekt aktywacji mitochondrialnego kanału potasowego mitoBK_{Ca} został wcześniej opisany w modelu kardiomiocytów (Borchert et al. 2013) oraz neuronów (Mattson i Liu 2003), co zostało podsumowane na Rysunku 11.



Rysunek 11. Schemat udział kanału mitoBK_{Ca} w kardioprotekcji i neuroprotekcji. Na podstawie (Borchert et al. 2013; Mattson i Liu 2003).

2. Cel pracy

Nabłonek dróg oddechowych jest głównym miejscem akumulacji cząstek stałych, takich jak pyły miejskie (PM). W odpowiedzi na stres, komórki mogą uruchamiać mechanizmy ochronne. Badania ostatnich lat wykazały, że aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych (mitoK) uruchamia procesy fizjologiczne komórki zarówno związane z przeżyciem, jak i śmiercią. Opublikowane badania wykazują, że cytoprotekcja komórek powiązana jest z aktywacją kanałów mitoK zarówno przez substancje pochodzenia naturalnego, jak i syntetyczne. Dokładny mechanizm udziału kanałów potasowych wewnętrznej błony mitochondrialnej w cytoprotekcji, nie jest nadal dokładnie poznany. Pomimo intensywnie trwających badań wciąż nie opisano roli mitochondrialnych kanałów potasowych w nabłonku tkanek układu oddechowego bezpośrednio poddawanych wpływowi czynników uszkadzających, takich jak pyły miejskie. W związku z powyższym badania w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu:

- określenie udziału mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego przez wapń (kanał mitoBK_{Ca}) w fizjologii komórek nabłonka oddechowego, oraz
- analiza roli aktywacji mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w uszkodzeniach komórek nabłonka oddechowego wywołanych przez pyły miejskie.

Hipotezami pracy doktorskiej są:

- Mitochondrialny kanał BK_{Ca} pełni ważną rolę w fizjologii komórek nabłonka oddechowego.
- Aktywacja mitochondrialnego kanału BK_{Ca} jest istotnym elementem ochrony w uszkodzeniach komórek nabłonka oddechowego wywołanych przez pyły miejskie.

Realizując szczegółowe cele badań skupiono się na:

1. Charakterystyce farmakologicznej kanału mitoBK_{Ca} obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego za pomocą techniki patch-clamp – poszukiwania specyficznych modulatorów kanału.
2. Ocenie zmian oddychania komórkowego w obecności aktywatorów i inhibitorów kanału mitoBK_{Ca} przy wykorzystaniu systemu Oxygraph-2K.
3. Określeniu kontroli oddechowej w komórkach inkubowanych z pyłami miejskimi oraz kwercetyną.

4. Określenie różnicy potencjałów wewnętrznej błony mitochondrialnej metodą fluorometryczną za pomocą O2k-FluoRespirometer lub sondy fluorescencyjnej JC- 1.
5. Analizie poziomu reaktywnych form tlenu zarówno na poziomie komórkowym jak i mitochondrialnym.
6. Poszukiwaniu właściwości cytoprotekcyjnych kwercetyny i izoramnetyny w uszkodzeniach komórek nabłonka oddechowego wywołanego przez pyły miejskie korzystając z barwienia błękitem trypanu, testu apoptoza-nekroza oraz pomiaru aktywności dehydrogenazy mleczanowej.
7. Określeniu przeżywalności komórek w obecności PM i modulatorów kanału mitoBK_{Ca}.
8. Ocenie integralności bariery warstwy komórek nabłonka na podstawie oceny pomiaru oporu przeznabłonkowego (TEER).
9. Ocenie oddychania komórkowego dla obu modeli komórkowych.
10. Określeniu potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz aktywności IV kompleksu łańcucha oddechowego.
11. Analizie liczby mitochondriów i poziomu białek kompleksów łańcucha oddechowego.

Do realizacji szczegółowych celów badawczych wykorzystane zostały modele komórek linii komórek HBE WT i nowo wygenerowanej linii HBE $\Delta\alpha\text{BK}$.

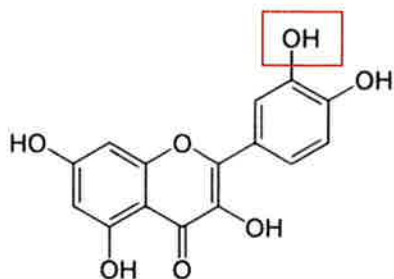
3. Materiały i metody

3.1 Substancje wykorzystywane w przeprowadzonych badaniach

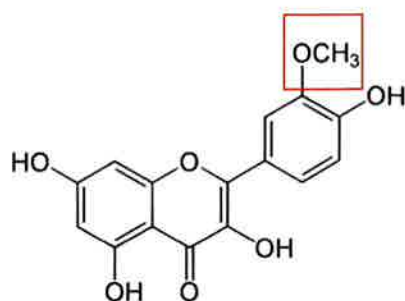
W trakcie realizacji zadań badawczych wykorzystane zostały substancje wymienione poniżej:

- Pożywka Minimal Essential Medium Eagle (MEM; Sigma),
- Surowica bydlęca płodowa 10% (FBS; Fetal Bovine Serum, Gibco),
- 100 IU/ml penicylina (Gibco),
- 100 mg/ml streptomycyna (Gibco),
- Trypsyna (Sigma Aldrich, USA),
- PBS (Lonza),
- Dioctan 2',7'-dichlorofluorescyny 25 μ M (H2DCFDA; Invitrogen),
- MitoSOX Red (Molecular Probes),
- Pyły miejskie 50 μ g/ml PM₁₀ (NIST, USA),
- NS11021 1, 3, 10 μ M (Sigma Aldrich, USA),
- Penitrem A 300 nM (Sigma Aldrich, USA),
- Kwercetyna 1, 3, 10 μ M (Sigma Aldrich, USA),
- Izoramnetyna 1, 3, 10 μ M (Sigma Aldrich, USA),
- Oligomycyna 4 μ g/ml (Sigma Aldrich, USA),
- Cyjanek karbonylowego-p-trifluorometoksyfenylohydrazonu - FCCP 0,5 μ M (Sigma Aldrich, USA),
- Rotenon 2,5 μ M (Sigma Aldrich, USA),
- Antymycyna A 0,5 μ M (Sigma Aldrich, USA),
- Digitonina 10 μ g/ml (Sigma Aldrich, USA),
- Rotenon 2,5 μ M (Sigma Aldrich, USA),
- Trypan Blue (Gibco),
- do wykonania pomiarów oddychania komórkowego wykorzystano roztwór MiR05 zawierający EGTA 0,5 mM, MgCl₂ 3 mM, kwas laktobionowy 60 mM, tauryna 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, D-sacharoza 110 mM, BSA, wolne od kwasów tłuszczowych 1g/L, pH = 7,1.

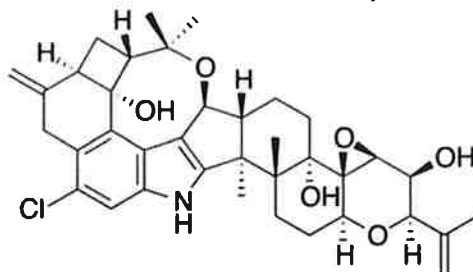
Struktury chemiczne modulatorów kanału BK_{Ca} wykorzystanych w doświadczeniach: aktywatora – kwercetyny, inhibitora – penitremu A pokazano na Rysunku 12. Wskazano również strukturę analogu kwercetyny – izoramnetyny.



Kwercetyna – aktywator kanału mitoBK_{Ca}



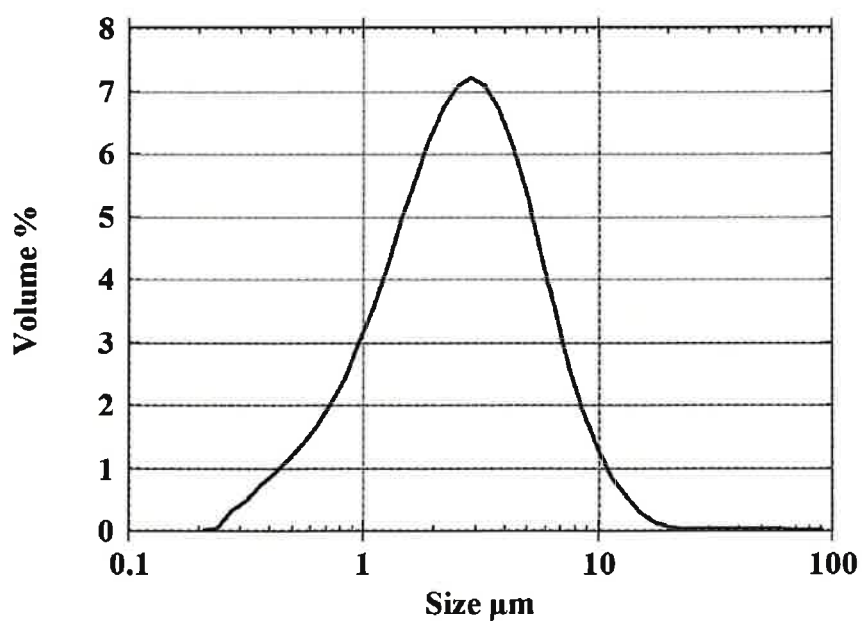
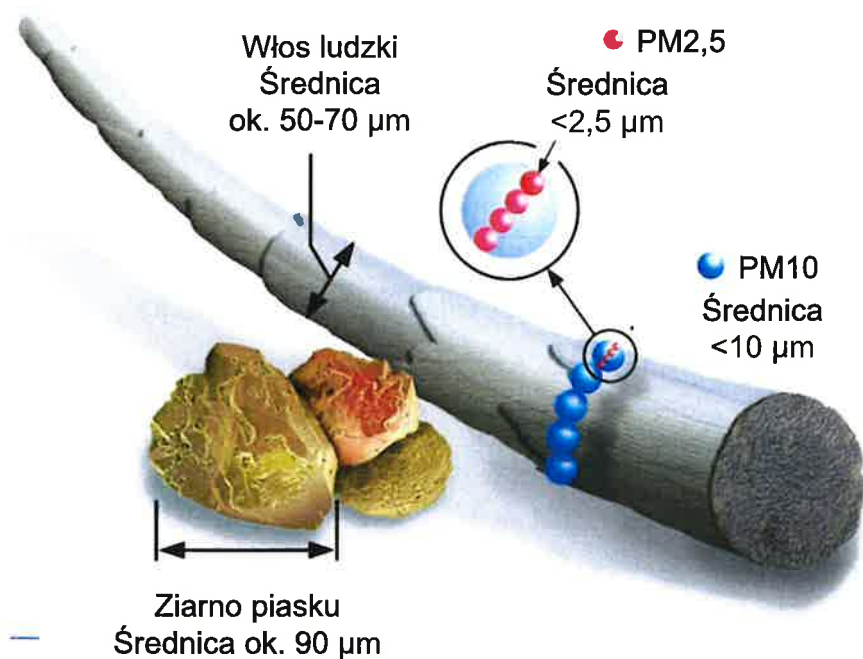
Izoramnetyna – analog kwercetyny



Penitrem A – inhibitor kanału BK_{Ca}

Rysunek 12. Struktury chemiczne kwercetyny, izoramnetyny oraz penitremu A. Czerwoną ramką oznaczono grupę funkcyjną różniącą kwercetynę (grupa hydroksylowa) oraz izoramnetynę (grupa alkoksylowa).

Pyły miejskie PM < 4 µm SRM-2786 zostały pozyskane z Krajowego Instytutu Standardów i Technologii w USA (NIST, Nation Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). W pracy wykorzystano PM zgodnie ze standardem NIST, aby zapewnić powtarzalność eksperymentów biofizycznych i biochemicznych. Skład próbek PM był w każdym doświadczeniu taki sam. PM zostały uzyskane z atmosferycznego materiału cząsteczkowego w 2005 roku z systemu filtracji powietrza w dużym centrum wystawienniczym w Pradze, Czechy. Jak deklaruje producent, próbka PM nie ma na celu reprezentowania konkretnego obszaru, z którego została pobrana, a powinna odzwierciedlać skład pyłu zawieszonego obecnego w środowisku miejskim. Średnice pyłów miejskich zostały porównane na Rysunku 27. Dodatkowo w panelu poniżej przedstawiono rozkład średnic PM w próbce (Schantz et al. 2016).

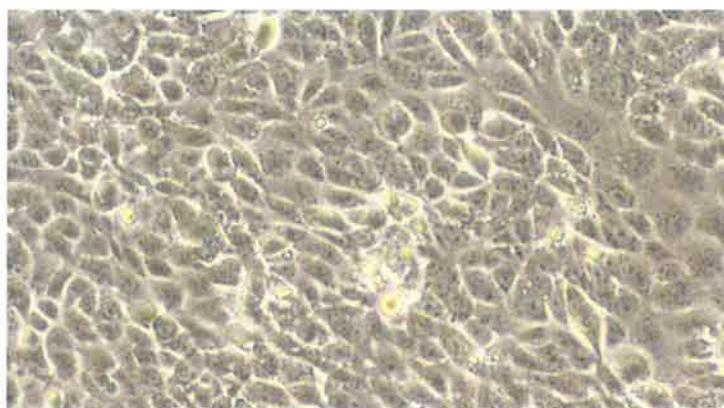


Rysunek 27. Porównanie średnicy pyłów miejskich PM2,5 i PM10 do średnic włosa ludzkiego i ziarnka piasku – panel na górze. Na podstawie (Guaita et al. 2011). W panelu poniżej przedstawiono średni rozkład średnic pyłów miejskich w próbkach wykorzystywanych w badaniach (z certyfikatu NIST).

3.2 Modele linii komórkowych

3.2.1 Linia komórkowa HBE WT

Modelem komórkowym wykorzystywanym w badaniach była linia komórek nabłonka dróg oddechowych. Wykorzystano linię ludzkich komórek nabłonka oskrzeli (16HBE14o-SCC150, Merck). 16HBE14o- to linia komórkowa pochodząca od rocznego pacjenta płci męskiej z płuc i serca. Linia ta została unieśmiertelniona plazmidem SV40 z wadliwym miejscem startu replikacji (pSVori-). Komórki tej linii zachowują charakterystyczne cechy prawidłowych, zróżnicowanych komórek nabłonka oskrzeli: morfologię, ekspresję cytokeratyny, zdolność do tworzenia ścisłych połączeń i kierunkowy transport jonów. Są one szeroko wykorzystywane jako model *in vitro* w badaniach dotyczących transportu leków w układzie oddechowym (Forbes et al. 2003), właściwości i szczelności bariery tworzonej przez komórki nabłonka dróg oddechowych (Wan et al. 2000). W dalszej części oznaczyłam tą linię skrótem HBE WT. Morfologię komórek HBE WT przedstawiono na zdjęciu mikroskopowym (Rysunek 13). W tej linii komórkowej opisano obecność białek kanałowych typu BK_{Ca} zarówno w błonie plazmatycznej jak i w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Sek et al. 2021).

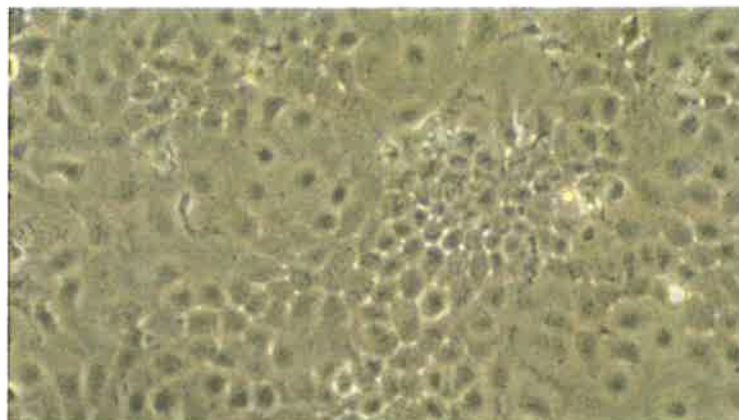


50 μm

Rysunek 13. Zdjęcie mikroskopowe przedstawiające morfologię komórek HBE WT. Zdjęcia wykonano kamerą DLTX1080PCMO SHDU2SD (DELTA optical) umieszczoną w odwróconym mikroskopie optycznym (Olympus) pod powiększeniem 20x.

3.2.2 Linia komórkowa HBE $\Delta\alpha$ BK

Nowa wygenerowana linia komórkowa HBE $\Delta\alpha$ BK (klon HBE WT) została wyprowadzona we współpracy dwóch laboratoriów (Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN i Katedry Fizyki i Biofizyki, Instytutu Biologii SGGW) (Maliszewska-Olejniczak et al. 2024) przy wykorzystaniu precyzyjnego systemu CRISPR/Cas9 umożliwiającego edycję genomów zgodnie z protokołem Nature Protocol (Ran et al. 2013). Narzędzie CRISPR/Cas9 zostało oparte na mechanizmie odpornościowym obecnym u bakterii i archeonów (Makarova, Wolf, et al. 2011), w którym nukleaza Cas9 odpowiedzialna jest za cięcie obcego DNA, co chroni komórki przed bakteriofagami (Makarova, Wolf, et al. 2011; Makarova, Haft, et al. 2011). Edycja genomu, która jest wynikiem wykorzystania systemu CRISPR/Cas9 przebiega w kilku etapach. Na początku docelowe miejsce cięcia w sekwencji DNA jest rozpoznawane przez nukleazę Cas9. Następuje połączenie tej sekwencji z RNA kierującym (g-RNA, ang. guided-RNA). RNA kierujące łączy się z odcinkiem o długości 30 nukleotydów. W ten sposób powstaje kompleks, w którym zachodzi przecięcie nici komplementarnej oraz niekomplementarnej do sekwencji RNA kierującego. Powstanie takiego dwuniciowego pęknięcia umożliwia zarówno wprowadzenie delecji w badanym genie, a także wprowadzenie nowego genu w żądane miejsce w genomie (Ran et al. 2013). W przypadku linii HBE $\Delta\alpha$ BK została wprowadzona delecja w podjednostce α kanału jonowego BK_{Ca} przy użyciu g-RNA zaprojektowanego i opublikowanego jak w (Kulawiak et al. 2023) oraz białka Cas9. Transfekcja komórek HBE WT była prowadzona za pomocą plazmidu FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega). Morfologię komórek HBE $\Delta\alpha$ BK przedstawiono na zdjęciu mikroskopowym poniżej (Rysunek 14).



50 μm

Rysunek 14. Zdjęcie mikroskopowe przedstawiające morfologię komórek HBE $\Delta\alpha\text{BK}$. Zdjęcia wykonano kamerą DLTX1080PCMO SHDU2SD (DELTA optical) umieszczoną w odwróconym mikroskopie optycznym (Olympus) pod powiększeniem 20x.

3.2.3 Hodowla komórkowa

Komórki HBE WT i HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ hodowano w pożywce Minimal Essential Medium Eagle (MEM). Pożywka była wzbogacana o 10% płodową surowicę bydlęcą (FBS) i antybiotykami (100 IU/ml penicyliny, 100 mg/ml streptomycyny). Komórki hodowano w inkubatorze komórkowym w 37°C w wilgotnej atmosferze z 5% CO_2 . Komórki przesiewano na wczesnych pasażach w przybliżeniu dwa razy w tygodniu po osiągnięciu około 90% konfluencji. Do określenia liczby komórek wykorzystano licznik komórek TC20 (BioRad).

3.3 Analiza aktywności kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w mitochondriach linii komórek HBE WT

3.3.1 Przygotowanie mitochondriów i mitoplastów do pomiarów elektrofizjologicznych

Mitochondria i mitoplasty do pomiarów elektrofizjologicznych z wykorzystaniem metody patch-clamp przygotowano zgodnie z wcześniej opisaną procedurą (Bednarczyk, Koziel, et al. 2013; Bednarczyk, Wieckowski, et al. 2013; Dabrowska et al. 2023; Maliszewska-Olejniczak et al. 2024). W skrócie, komórki po osiągnięciu 90% konfluencji, zawieszono w PBS i odwirowano przy 400×g przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu usuwano supernatant, a osad zawieszono w 2 ml roztworu preparatywnego z EGTA (P/E) (250

mM sacharoza, EGTA - kwas 2-[2-(2-{2-[bis(karboksymetylo)amino]etoksy}etoksy)etylo-(karboksymetylo)amino]octowy, pH 7,2). Następnie komórki homogenizowano (homogenizator szkło-szkło nr 19, Kontes Glass) i wirowano przy 9200×g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Osad ponownie zawieszono w roztworze P/E i wirowano przez 10 minut przy 750×g w celu oddzielenia frakcji mitochondriów. Supernatant zawierający mitochondria wirowano przez 10 minut przy 9200×g. Ostatecznie osad z wyizolowanymi mitochondriami zawieszono w roztworze izotonicznym (150 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,2). Powyższe kroki procedury były wykonane w temperaturze 4°C.

W celu przygotowania mitoplastów wyizolowane mitochondria komórek inkubowano przez około 1 min w roztworze hipotonicznym (5 mM HEPES, 100 μM CaCl₂, pH 7,2). Następnie dodawano hipertoniczny roztwór (750 mM KCl, 30 mM HEPES i 100 μM CaCl₂, pH 7,2) w celu przywrócenia izotoniczności buforu. Mitoplasty, to mitochondria pozbawione zewnętrznej błony z rozfałdowaną błoną wewnętrzną, zwykle są otrzymywane na drodze osmozy. W ten sposób wewnętrzna błona mitochondrialna tworzy sferę zamykającą macierz mitochondrialną we wnętrzu.

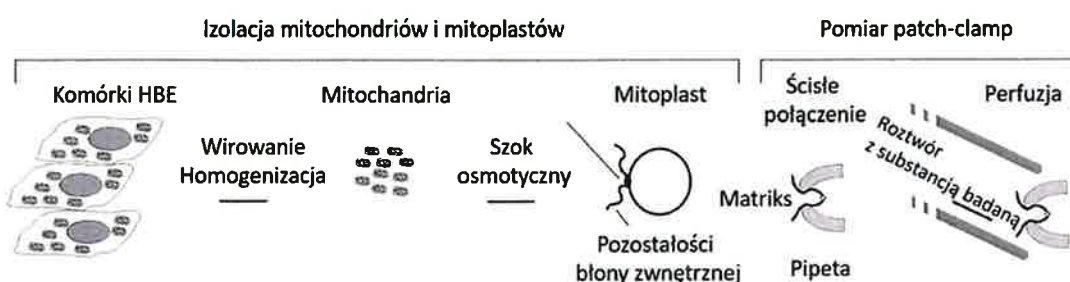
3.3.2 Eksperymenty patch-clamp

Metoda patch-clamp to technika z zakresu elektrofizjologii, która umożliwia badanie aktywności kanałów jonowych w błonach biologicznych. Technika ta ma zastosowanie zarówno dla badań na całych komórkach, jak również na fragmentach błony komórkowej czy wewnętrznej błony mitochondrialnej. Technika patch-clamp umożliwia badania przepływu jonów przez pojedynczy kanał jonowy. Przepływ może być badany z obydwu stron – na zewnątrz cytoplazmy lub macierzy mitochondrialnej, a także od wewnętrznej strony cytoplazmy czy też wewnątrz macierzy mitochondriów. Do każdego doświadczenia patch-clamp przygotowywano świeże mitoplasty, czyli mitochondria pozbawione zewnętrznej błony mitochondrialnej. Eksperymenty patch-clamp przeprowadzono przy użyciu pipety szklanej bez filamentu wypełnionej roztworem izotonicznym (150 mM KCl, 10 mM HEPES i 100 μM CaCl₂ przy pH 7,2), którą wykorzystywano do zasysania pojedynczego mitoplastu. Zdjęcie zawierające pipetę oraz wykorzystywany system perfuzji przedstawiono na Rysunku 15.



Rysunek 15. Pipeta pomiarowa (po prawej) oraz system perfuzji (po lewej cztery szklane kapilary) wykorzystywany w doświadczeniach patch-clamp.

Za pomocą techniki patch-clamp przeprowadzono badania w celu określenia zmian prawdopodobieństwa otwarcia kanałów kanału mitoBK_{Ca} w obecności następujących związków: kwercetyna, penitrem A, izoramnetyna. Badane substancje przygotowano w roztworze izotonicznym i wprowadzano do pomiaru za pomocą systemu perfuzyjnego. Przebiegi prądowo-czasowe eksperymentów rejestrowano w trybie jednokanałowym za pomocą programu Clampex. Sygnał był wzmacniany przez Axopatch 200B oraz konwertowany przez Digidata 1440A (próbkowanie 100 kHz, filtrowanie 1 kHz). Do wyznaczenia przewodnictwa badanego kanału wykorzystano zależność prądowo-napięciową. Substancje regulujące aktywność kanału mitoBK_{Ca} podawano jako rozcieńczenia w roztworze izotonicznym z wykorzystaniem systemu perfuzyjnego. Bieżącą aktywność pojedynczego kanału nagrywano, a następnie porównywano z aktywnością kontrolną kanału. Analizowano prawdopodobieństwo otwarcia kanału (NPo) za pomocą jednokanałowego trybu wyszukiwania z wykorzystaniem oprogramowania Clampfit 10.7 (Axon Instruments, Molecular Device). Schematyczny przebieg eksperymentu patch-clamp zobrazowano na schemacie (Rysunek 16).

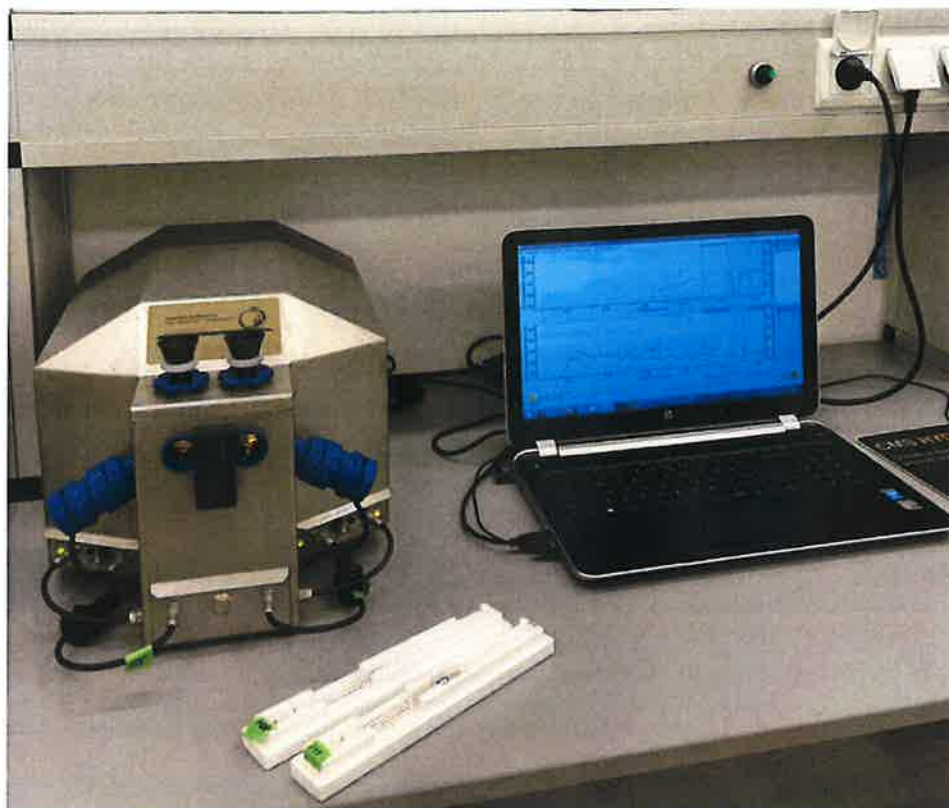


Rysunek 16. Schemat przebiegu doświadczeń patch-clamp. Pierwszy etap obejmuje izolację mitochondriów oraz przygotowanie mitoplastów z wykorzystaniem szoku osmotycznego. W części elektrofizjologicznej można wyróżnić: zasysanie mitoplastu do pipety pomiarowej oraz podawanie modulatorów (aktywatorów oraz inhibitorów kanałów jonowych) z wykorzystaniem systemu perfuzyjnego.

3.4 Ocena zmian szybkości oddychania komórkowego

3.4.1 Ocena zużycia tlenu w modelu całych komórek

Analizę zmian szybkości oddychania w całych komórkach wykonano przy wykorzystaniu systemu Oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Austria) według metody opisanej w (Hall i Moghimi 2019). Zestaw eksperymentalny pokazano na Rysunku 17. W skrócie, komórki HBE WT oraz HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ zbierano, odwirowano i ponownie zawieszono w pożywce MEM. 1×10^6 komórek/ cm^3 dodawano do komór pomiarowych (2 ml). Szybkość oddychania była mierzona jako pochodna zmian stężenia tlenu (nmol/ml) w czasie i wyrażona jako ubytek tlenu w $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{ml})$. Kwercetyna (1, 3 lub $10 \mu\text{M}$), izoramnetyna (1, 3 lub $10 \mu\text{M}$), penitrem A (300 nM) były dodawane do komór po stabilizacji szybkości oddychania. Maksymalną aktywność białek łańcucha transportu elektronów (ETC, *ang. electron transport chain*) zmierzono po podaniu cyjanku karbonylowego-p-trifluorometoksyfenylohydrazonu (FCCP; $1 \mu\text{M}$).



Rysunek 17. Na rysunku przedstawiono system Oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Austria) wykorzystywany w badaniach oceny zmian szybkości oddychania komórkowego.

3.4.2 Kontrola oddechowa

Metoda oceny zużycia tlenu przy użyciu systemu Oxygraph-2K została wykorzystana do przeprowadzenia kontroli oddechowej. W tym celu, komórkom HBE WT oraz HBE $\Delta\alpha$ BK po osiągnięciu 80% konfluencji zmieniano pożywkę 24 godziny przed pomiarem, lub poddawano preinkubacji z badanymi substancjami: 50 μ g PM, 1 μ M lub 3 μ M kwercetyną. W dzień pomiaru komórki zebrano, odwirowano i ponownie zawieszono w pożywce MEM - komórki HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK w ilości 1×10^6 komórek/ cm^3 , a następnie dodano do komór pomiarowych.

Wyciek niefosforylujący określono w obecności inhibitora syntazy ATP, oligomycyny (4 μ g/ml). Maksymalną aktywność łańcucha transportu elektronów zmierzono podając 1 μ M cyjanku karbonylowego-p-trifluorometoksyfenylohydrazonu (FCCP; 1 μ M). Na zakończenie pomiaru, zużycie tlenu określono w obecności rotenonu (2,5 μ M) i antymycyny A (0,5 μ M).

3.4.3 Ocena zużycia tlenu w komórkach uprzepuszczalnych

Ocena zużycia tlenu w komórkach uprzepuszczalnych (permeabilizowanych) została wykonana analogicznie do oceny szybkości oddychania w komórkach nieuprzepuszczalnych. Po usunięciu trypsyny i odwirowaniu komórek, osad z komórkami został zawieszony w buforze do pomiaru aktywności mitochondriów MiR05 (0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 60 mM kwas laktobionowy, 20 mM tauryna, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM D-sacharoza, 1g/l BSA). 1×10^6 komórek/ml dodawano do komór pomiarowych. Przed podaniem związków, których badano wpływ na szybkość oddychania, do komór dodano digitoninę (10 µg/ml), której optymalne stężenie określono na podstawie wcześniejszych doświadczeń z miareczkowaniem tej substancji. Digitonina wykazuje duże powinowactwo do cholesterolu, który występuje w dużej ilości w błonie komórkowej. Prowadzi to do solubilizacji, uprzepuszczalnienia błony plazmatycznej i pozwala na swobodne wnikanie substancji, w tym substratów łańcucha oddechowego – bursztynianu. Błony mitochondriów, w szczególności błona wewnętrzna, są ubogie w cholesterol i digitonina nie narusza ich integralności. Dlatego, w takich warunkach możliwe jest dokładna analiza aktywności mitochondriów.

3.4.4 Analiza aktywności IV kompleksu łańcucha oddechowego

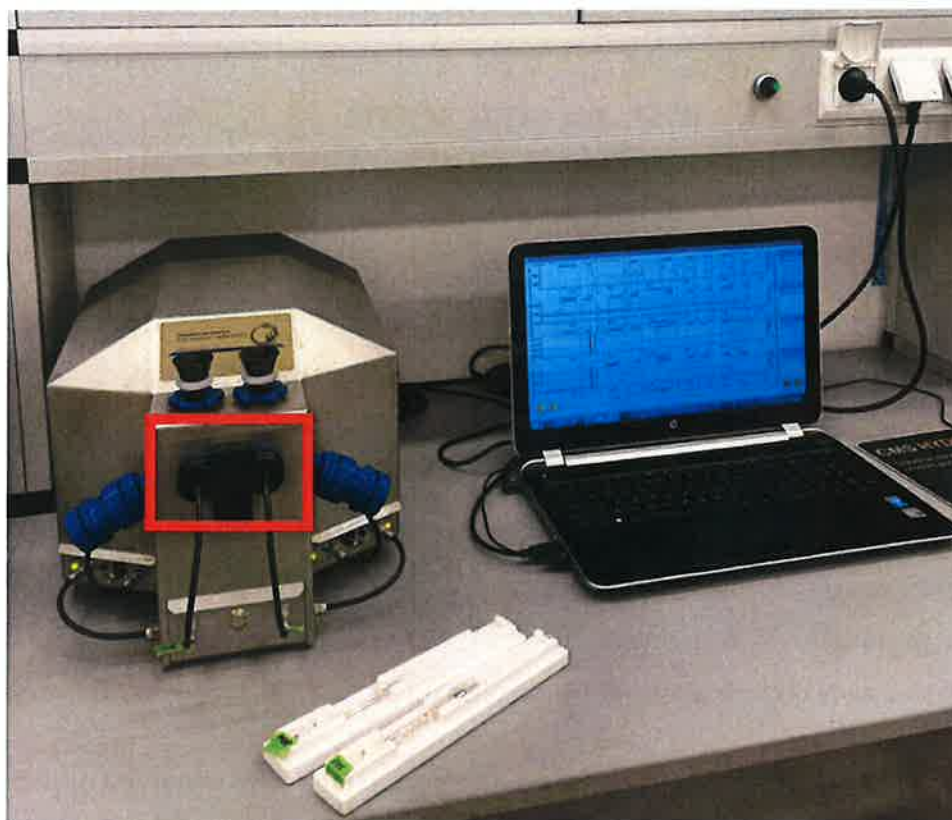
Pomiary aktywności IV kompleksu łańcucha oddechowego przeprowadzono przy użyciu systemu Oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Austria). Komórki do pomiarów przygotowano, jak opisano w podrozdziale 3.4.1. Dodatkowo, do komory dodawano 2 mM askorbinian z 0,5 µM TMPD (N,N,N',N'-Tetrametyloparafenylo-diamina dichlorowodorek), czego celem było dostarczenie elektronów bezpośrednio do kompleksu IV. W wyniku reakcji autooksydacji askorbinianu powstałe zużycie tlenu zależy jedynie od stężenia tlenu w komorze. Blokując kompleks IV za pomocą 50 mM azydku sodu, można oddzielić autooksydację i oddychanie wynikające z aktywności kompleksu IV.

W celu oszacowania oddychania tlenowego, które realizowane jest w tym układzie przez kompleks IV łańcucha oddechowego, wybrano trzy interwały pomiarowe po podaniu TMPD wraz z askorbinianem oraz kolejne trzy interwały pomiarowe po podaniu azydku sodu. Stosunek szybkości zużycia tlenu do stężenia tlenu w przypadku trzech pierwszych pomiarów interwałów świadczy o wydajności kompleksu IV łańcucha oddechowego, a kolejnych trzech o poziomie autooksydacji askorbinianu.

3.5 Pomiar różnicy potencjałów wewnętrznej błony mitochondrialnej

3.5.1 Pomiar różnicy wewnętrznej błony mitochondrialnej za pomocą Oksygrafu

Różnicę potencjałów wewnętrznej błony mitochondrialnej zbadano metodą fluorometryczną za pomocą O2k-FluoRespirometer (Oroboros Instruments, Austria) przy użyciu fluoroforu – Rodaminy 123 ($1,3 \mu\text{M}$). Rodamina 123 jest związkiem, który akumuluje się w mitochondriach o wysokiej różnicy potencjałów. Duże stężenie tego barwnika powoduje wygaszenie fluorescencji cząsteczek fluorochromu. Spadek fluorescencji odpowiada zatem wysokiej aktywności mitochondriów i znacznej różnicy potencjału. Układ eksperymentalny pokazano na Rysunku 18. Do system Oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Austria) zastosowano dodatkowe sondy mierzące zmiany fluorescencji.



Rysunek 18. System O2k-FluoRespirometer (Oroboros Instruments, Austria) stanowi system Oxygraph-2K (Oroboros Instruments, Austria) wraz z dedykowanymi sondami zaznaczonymi w czerwonej ramce.

Komórki HBE WT i HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ zebrano, odwirowano i zawieszono w roztworze (1×10^6 komórek/ cm^3), MiR05 (0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl_2 , 60 mM kwas laktobionowy, 20 mM

tauryna, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM D-sacharoza, 1g/l BSA). Kolejno, do komór pomiarowych dodano Rodaminę 123 w stężeniu 1,3 μM . Następnie podano digitoninę (10 $\mu\text{g/ml}$) w celu permeabilizacji błony komórkowej oraz rotenon (0,5 μM) w celu zablokowania kompleksu I w mitochondriach. Jako substrat II kompleksu łańcucha oddechowego dodano bursztynian (2mM). Po podaniu ADP (2,5 mM) zablokowano syntazę ATP za pomocą oligomycyny (4 mg/ml). Następnie dodano kwercetynę (1, 3, 10 lub 30 μM), i w kolejnym doświadczeniu izoramnetynę (1, 3, 10 lub 30 μM) w celu zbadania wpływu tych substancji na potencjał błony mitochondrialnej. Na zakończenie eksperymentu do komór pomiarowych dodano FCCP (1 μM) w celu maksymalnego rozprężenia mitochondriów.

3.5.2 Pomiar różnicy potencjałów w wewnętrznej błonie mitochondrialnej za pomocą sondy JC-1

Pomiar różnicy potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej był wykonany za pomocą sondy fluorescencyjnej JC-1 (Thermofisher, Mitochondrial Membrane Potential Probe). Sonda JC-1 jest barwnikiem kationowym, który lokalizuje się w mitochondriach o wysokim potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej. Negatywnym po stronie macierzy mitochondrialnej. Przy niskich stężeniach (zwykle, z powodu niskiego potencjału błony mitochondrialnej) JC-1 jest głównie monomerem, który emituje fluorescencję 530±15 nm (kolor zielony). Przy wysokich stężeniach (z powodu wysokiego potencjału błony mitochondrialnej) barwnik agreguje, co powoduje przesunięcie w widmie jego fluorescencji i skutkuje emisją światła o długości 590±17 nm (kolor czerwony).

Komórki HBE WT i HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ po osiągnięciu 90% konfluencji odrywano z wykorzystaniem trypsyny i ponownie zawieszono w pożywce hodowlanej MEM w stężeniu 300 000 komórek/ml. Zawiesinę komórek umieszczono w dołkach przezroczystych płytek 96 dołkowych w ilości 30 000 komórek/dołek. Komórki hodowano przez 48 godzin w inkubatorze w warunkach, jak opisano w podrozdziale 3.2.3 Hodowla komórkowa. Po tym czasie pożywkę usunięto, komórki przemyto PBS i inkubowano przez 30 minut z barwnikiem fluorescencyjnym JC-1 w celu pomiaru potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Po inkubacji komórki przemywano PBS i dodawano do dołków PBS wraz z zadanymi stężeniami NS11021, penitrem A, FCCP, oligomycyny, rotenonu i antymycyny A. Komórki inkubowano przez 30 minut, a następnie mierzono fluorescencję za pomocą Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific) przy długościach fal 538 i 590 nm i wzbudzeniu 485 nm.

3.6 Ocena cytotoksyczności

3.6.1 Barwienie błękitem trypanu

Cytotoksyczność pyłów miejskich badano za pomocą barwienia błękitem trypanu (Trypan Blue). Komórki HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK inkubowane były z PM przez 24h. Komórki były inkubowane z kwercetyną, izoramnetyną i penitremem A w różnych stężeniach przez 24h. Po inkubacji, komórki były oderwane za pomocą trypsyny, a następnie zawieszone w pożywce i inkubowane z barwnikiem Trypan Blue w stosunku 1:1 przez 3 minuty.

3.6.2 Test apoptoza-nekroza

Test apoptozy i nekrozy wykonano za pomocą RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega). Protokół doświadczeń przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta. W skrócie, komórki wysiano w 50 μ l pożywki na białych 96-dołkowych płytkach w ilości 30 000 komórek na dołek. Przygotowano zestaw dołków kontrolnych bez komórek, który stanowiła jedynie pożywka w celu określenia luminescencji tła i fluorescencji tła. Odpowiednie rozcieńczenie wanikozydu A przygotowano w pożywce w 4-krotności pożądanego stężenia końcowego. Przygotowano również dołki kontrolni negatywnej bez podawania badanych związków. Jako kontrolę pozytywną wykorzystałam staurosporynę (STS), która pełni rolę induktora apoptozy zależnej od kaspaz. Jest to naturalny antybiotyk, który został wyizolowany z bakterii *Streptomyces staurosporeus*. Mechanizm działania staurosporyny opiera się na jej zdolności do hamowania kinaz białkowych. Dzieje się to poprzez blokadę miejsca wiązania ATP, co uniemożliwia kinazom białkowym prawidłowe funkcjonowanie. Inhibicja jest kluczowa dla aktywacji procesów apoptotycznych w komórkach, dlatego STS można wykorzystać jako pozytywną kontrolę w prowadzonym doświadczeniu.

Komórki w pozostałych dołkach inkubowano z zadanymi stężeniami pyłów miejskich, kwercetyny, izoramnetyny oraz penitremu A. Do odpowiednich dołków w 96-dołkowej płytce testowej dodano kwercetynę, aby końcowe stężenie wynosiło: 1, 3, 10 lub 30 μ M, oraz analogicznie izoramnetynę: 1, 3, 10 lub 30 μ M. Następnie do każdej studzienki dodano 100 μ l 2x stężonego odczynnika do wykrywania apoptozy i nekrozy RealTime-Glo™ Annexin V w medium hodowlanym. Komórki inkubowano na zakrytej 96-studzienkowej płytce w temperaturze 37°C, 5% CO₂ w inkubatorze do hodowli komórkowych. Luminescencja i fluorescencja została zmierzona przy wzbudzeniu 475nm i emisji 500–550 nm. Pomiar był prowadzony po 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 i 24 godzinach.

3.6.3 Pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej

Pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) wykorzystywany jest do oceny poziomu śmierci komórkowej i ich lizy. Im wyższe uwalnianie LDH z komórek do medium hodowlanego, tym wyższy stopień ich uszkodzenia. Aktywność LDH mierzono za pomocą zestawu komercyjnego do pomiaru LDH (nr katalogowy 11644793001; Roche Diagnostics Mannheim, Niemcy) według zaleceń producenta. W skrócie, komórki wysiewano na 96-dołkowe płytki w medium hodowlanym. Komórki hodowane z 2% Triton-X-100 w pożywce wykorzystane zostały jako kontrola maksymalnego wycieku LDH. Natomiast, komórki hodowane w dwukrotnie niższej gęstości bez 2% Triton-X-100 były traktowane jako kontrola minimalnego wycieku LDH. Po 24-godzinnej inkubacji, eluat (100 μ l) zbierano znad komórek i przeniesiono na inną 96-dołkową płytkę. Absorbancja była mierzona przy długości fali 490 nm. Wykorzystano czytnik Multiskan Sky High.

3.7 Pomiary reaktywnych form tlenu

3.7.1 Pomiar poziomu reaktywnych form tlenu na poziomie komórkowym

W celu pomiaru zmian w syntezie reaktywnych form tlenu, komórki hodowano na płytce 96-dołkowej w liczbie 50 000 komórek na dołek. Do pomiaru użyto sondy fluorescencyjnej dwuocjanu 2',7'-dichlorofluoresceiny (H2DCFDA) w stężeniu 25 μ M. Sonda ta w postaci octanu nie fluoryzuje, natomiast po wnikięciu do komórki grupy octanowe ulegają odcięciu za pomocą esteraz, co powoduje fluorescencję w zależności od stanu redox komórki. Komórki HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK były inkubowane z 25 μ M H2DCFDA w PBS przez 30 min. Po inkubacji dodano 50 μ g/ml PM<4,0 μ m oraz zadane stężenia NS11021, penitremu A, kwercetyny i izoramnetyny. Komórki inkubowano przez 3 godziny i mierzono fluorescencję przy użyciu Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific) przy długościach fali wzbudzenia/emisji: 485/538 nm.

3.7.2 Pomiar poziomu reaktywnych form tlenu na poziomie mitochondrialnym

W celu pomiaru zmian w syntezie RFT pochodzenia mitochondrialnego, komórki przygotowano na płytce 96-dołkowej - 50 000 komórek na dołek. Do pomiaru wykorzystano sondę fluorescencyjną MitoSOX Red (Invitrogen). MitoSOX Red to barwnik fluorescencyjny, który wykrywa nadadtlenek (O_2^-). Barwnik specyficznie lokalizuje się w mitochondriach

w żywych komórkach. Utlenianie odczynnika MitoSOX przez mitochondrialny ponadtlenek powoduje powstanie czerwonej fluorescencji. Następnie komórki HBE były inkubowane z 25 μ M MitoSOX Red w PBS prze 30 min. Po inkubacji dodano 50 μ g/ml PM<4,0 μ m oraz różne stężenia NS11021 (1, 3 lub 10 μ M), kwercetyny (1, 3 lub 10 μ M), izoramnetyny (1, 3 lub 10 μ M), penitrem A (300 nM). Komórki inkubowano godzinę i mierzono fluorescencję przy użyciu Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific) przy długościach fali wzbudzenia/emisji: 485/590 nm.

3.8 Pomiar ilości mitochondriów

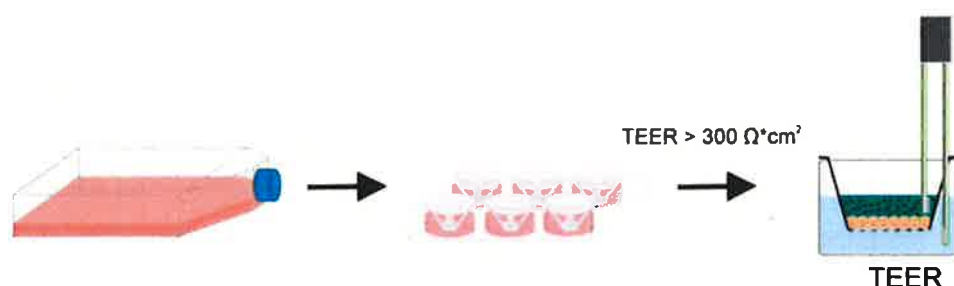
Analizę ilości mitochondriów przeprowadzono z wykorzystaniem BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Niemcy). Komórki wysiano na przezroczystą płytkę 96-dółkową przy różnych stężeniach komórek - 10 000, 25 000, 50 000 i 100 000 na dółek. Po 24 godzinach komórki traktowano 100 nM BioTracker488 w medium hodowlanym przez 30 minut. Mierzono fluorescencję przy użyciu Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific) przy użyciu następujących ustawień Ex/Em: BioTracker (475 nm/514 nm).

Dodatkowo oprócz pomiarów fluorescencyjnych wykonano obrazowanie żywych komórek przeprowadzone z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego przy użyciu następujących ustawień Ex/Em 475 nm/514 nm. Pasek na skali jest równy 50 μ m.

3.9 Pomiary oporu przeznabłonkowego TEER

Integralność bariery warstwy komórek nabłonka została przeprowadzona na podstawie oceny pomiaru oporu przeznabłonkowego (TEER, *ang. trans epithelial electrical resistance*). W skrócie, komórki wysiewano na inserty komórkowe (Corning Costar Snapwell, 0,45 μ m, pole powierzchni 1,12 cm²). Kolejno, komórki hodowano na granicy faz ciecz-ciecz (LLI), a następnie na granicy faz powietrze-ciecz (ALI) w celu polaryzacji komórek. Przed każdym eksperymentem pożywkę do hodowli komórek zastąpiono sterylnym roztworem Ringera zarówno po wierzchołkowej (0,5 ml) i podstawno-bocznej (3,5 ml) stronie monowarstwy komórek, a następnie inkubowano przez 1 h w temperaturze 37 °C i 5% CO₂. W kolejnym kroku zmierzono opór TEER za pomocą urządzenia EVOM2 z elektrodami typu chopstick (WPI) STX-2. Schemat układu doświadczalnego przedstawiono na Rysunku 19. Aby uzyskać ostateczny opór monowarstwy komórek, od każdego odczytu TEER odjęto rezystancję wkładki (Snapwell). Komórki, które nie osiągnęły wartości TEER przekraczającej co najmniej 300

$\Omega \cdot \text{cm}^2$, nie były brane pod uwagę w dalszych eksperymentach. Kolejnym krokiem było podanie na monowarstwy komórek kwercetyny, penitrememu A wraz z kwercetyną, izoramnetyny, penitrememu A wraz z izoramnetyną, NS11021, penitrememu A wraz z NS11021 1 godzinę przed właściwym pomiarem. Następnie dodano pyły miejskie do części apikalnej monowarstwy (w końcowym stężeniu $50 \mu\text{g}/\text{ml}$) i wykonano pomiar TEER ($T = 0$). Następnie mierzono przeznabłonkowy opór monowarstw po 30, 60, 90 i 180 minutach od czasu podania pyłów miejskich.



Rysunek 19. Schemat pomiaru integralności warstwy komórek nabłonka komórek HBE WT i HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ w oparciu o pomiar oporu przeznabłonkowego. PM dodano od strony apikalnej monowarstwy komórkowej.

3.10 Analiza poziomu białek- Western blot

W celu przygotowania preparatów białkowych, komórki HBE WT i HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ hodowano do pełnej konfluencji w butelkach 75 cm^2 . Następnie, komórki zbierano z wykorzystaniem trypsyny i poddano lizie zimnym buforem RIPA w szklanym homogenizatorze (Wheaton Tight, USA). Próbkę odwirowano, supernatanty przenoszono do nowych probówek. Do oznaczenia stężenia białka zastosowano metodę Bradford. Jako marker masy cząsteczkowej białka zastosowano PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA). Białka rozdzielono w 10% żelu SDS PAGE i przeniesiono na membrany PVDF (Bio-Rad, USA). Błony inkubowano z barwnikiem GelCode Blue Safe Protein Stain (Thermo Fisher Scientific, USA) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie membrany odbarwiono buforem zawierającym 10% kwas octowy i 50% etanol. Błony blokowano 10% mlekiem w buforze PBST (50 mM PBS, 0,2% Tween-20, $\text{pH} = 8,4$) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Przeciwciała pierwszorzędowe przygotowano z 5% mleka w buforze TBST. Zastosowano następujące przeciwciała pierwotne: mysie

monoklonalne OXPHOS (45-8099, ThermoFisher). To zestaw przeciwciał monoklonalnych, który jest wykorzystywany w badaniach biochemicznych do analizy szlaków oddychania komórkowego, a dokładniej, do identyfikacji i badania kompleksów białkowych wchodzących w skład łańcucha oddechowego: CI-NDFB8 - NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial - białko kodowane przez gen *NDFB8* tworzące kompleks I łańcucha oddechowego, CII-SDHB - Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial - białko kodowane przez gen *SDHB* tworzące kompleks II łańcucha oddechowego, CIII-UQCRC2 - Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial - białko kodowane przez gen *UQCRC2* tworzące kompleks III łańcucha oddechowego, CIV-MTCO1 - Cytochrome c oxidase subunit 1 - białko kodowane przez gen *ATP5A* tworzące kompleks IV łańcucha oddechowego, CV-ATP5A - ATP synthase lipid-binding protein – białko kodowane przez gen *ATP5A* tworzące kompleks V łańcucha oddechowego. Przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z peroksydazą chrzanową przygotowano z 5% mleka w buforze PBS. Prążki białkowe wizualizowano przy użyciu odczynnika ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham, RPN 2236).

3.11 Analiza statystyczna

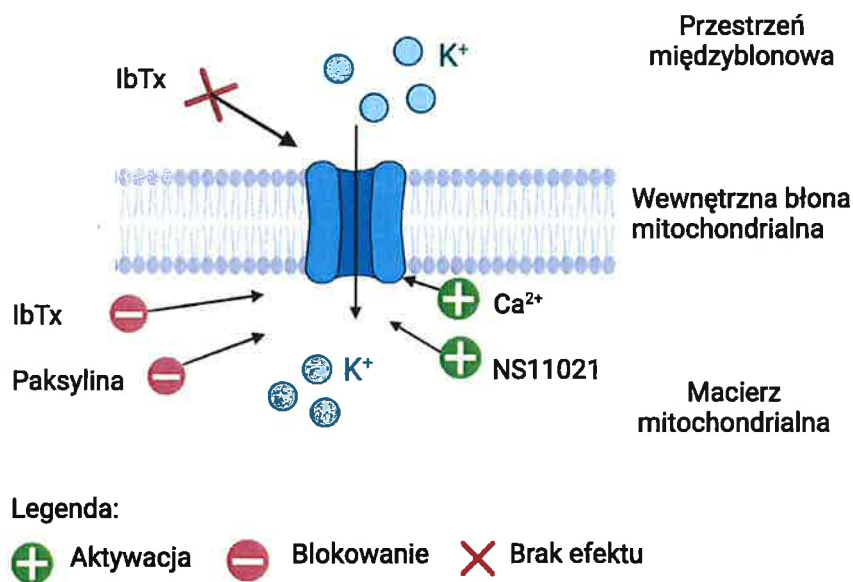
W niniejszej pracy analizowane dane przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD, *ang. standard deviation*). Większość eksperymentów wykonywano w trzech lub więcej niezależnych powtórzeniach. Analizę statystyczną prowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA dla grup o różnej wariancji. Wyniki analizowane były w programie GraphPad Prism 4 przy poziomach istotności statystycznej 0,05 (*), 0,01 (**), 0,001 (***).

Do przygotowania rycin, grafik i figur wykorzystywano również program graficzny CorelDRAW 12, Biorender oraz PowerPoint.

4. Wyniki

4.1 Analiza aktywności kanału BK_{Ca} w mitochondriach linii komórek HBE WT

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej opisano kanały potasowe (O'Rourke et al. 2005). W poprzednich badaniach (Sek et al. 2021) zidentyfikowano dwie populacje mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego przez jony Ca²⁺ (kanał mitoBK_{Ca}) w ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli (HBE WT). Właściwości biofizyczne i farmakologiczne kanałów zostały scharakteryzowane z wykorzystaniem techniki patch-clamp. Zaobserwowano aktywność obu kanałów o średniej przewodności bliskiej 285 pS w symetrycznym roztworze 150/150 mM KCl. Prawdopodobieństwo otwarć kanałów zwiększało się po zastosowaniu syntetycznego aktywatora kanałów potasowych - NS11021 w zakresie stężeń mikromolowych. Dodatkowo, aktywność kanału była całkowicie blokowana przez 1 μM paksylinę i 300 nM iberiotoksynę (IbTx) podawaną od strony cytoplazmatycznej. Paksylina i iberiotoksyna są selektywnymi inhibitorami kanałów typu BK_{Ca}. Z uwagi, że paksylina jest związkiem niskocząsteczkowym, może przechodzić przez błony komórkowe, natomiast iberiotoksyna ma utrudnioną migrację z uwagi na jej bardzo dużą masę cząsteczkową (Sek et al. 2021). Na Rysunku 20 poniżej przedstawiono podsumowanie efektów inhibitorów i aktywatorów kanału BK_{Ca}.



Rysunek 20. Podsumowanie właściwości farmakologicznych mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego wapniem (kanał mitoBK_{Ca}) obecnego w ludzkich komórkach epitelium oskrzeli (HBE WT). Na rysunku zaznaczono regulację kanału mitoBK_{Ca} przez iberiotosynę

(IbTx), paksylinę, NS11021 i jony wapnia (Ca^{2+}). „+” w zielonym kółku oznacza aktywację kanału, „-” w czerwonym kółku oznacza blokowanie aktywności kanału, a czerwony „x” oznacza brak efektu. Rysunek wykonano w programie *BioRender.com*.

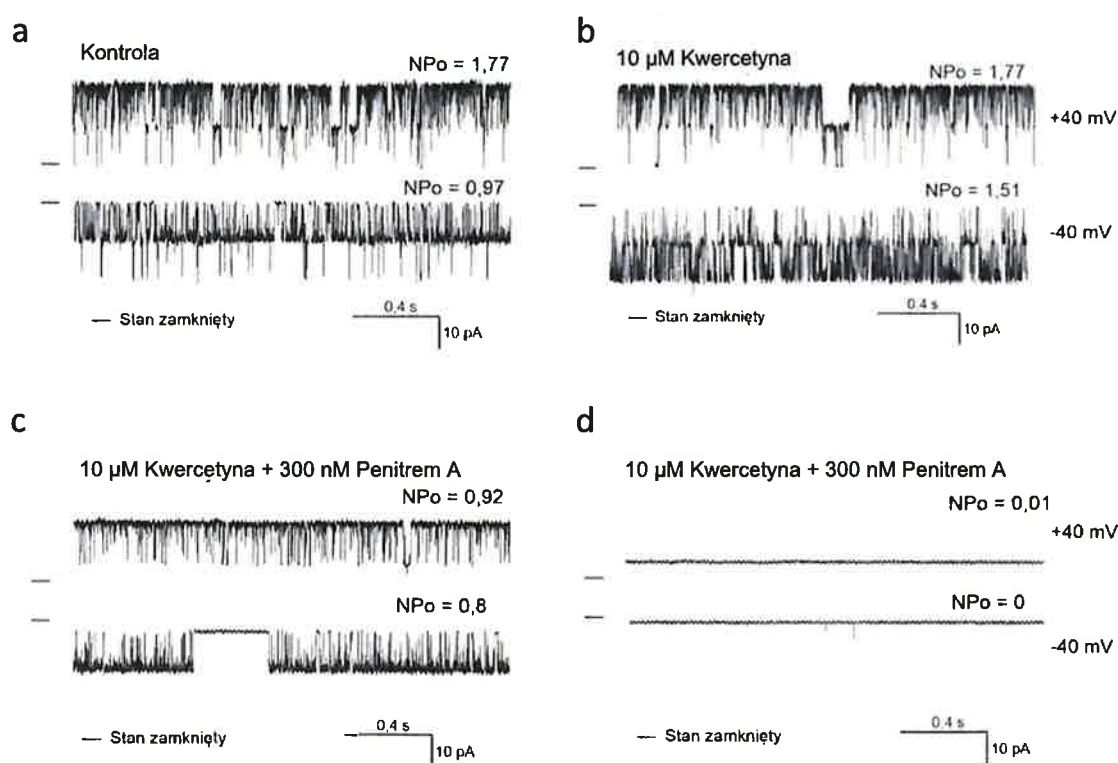
Większość mitochondrialnych modulatorów kanałów potasowych wykazuje szerokie spektrum skutków ubocznych. Należą do nich właściwości rozprzęgające, hamowanie łańcucha oddechowego i wpływ na komórkową homeostazę wapnia. Na przykład, wykazano, że NS11021 zmienia komórkową homeostazę wapnia, a zatem działanie tego związku może być związane ze zwiększonym poziomem wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , co prowadzi do modulacji funkcji mitochondriów (Kun et al. 2009). Dodatkowo, wykazano, że paksylina może hamować ATPazy zależne od wapnia (Bilmen et al. 2002), a w mikrosomach mózgowych szczurów paksylina hamuje uwalnianie wapnia zależne od 1,4,5-trifosforanu (InsP_3) (Longland et al. 2000). Dlatego, wciąż trwają prace nad poszukiwaniami związków z jak najmniejszym spektrum działań niepożądanych. Racjonalne zastosowanie inhibitorów lub aktywatorów kanałów ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia komórkowych konsekwencji hamowania lub aktywacji kanałów mitochondrialnych.

Wykazano również, że można zastosować związki pochodzenia naturalnego jako aktywatory kanału BK_{Ca} . Na przykład po zahamowaniu kanałów $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ przez paksylinę, kwercetyna aktywuje kanały w komórkach śródbłonka. Wskazuje to na konkurencję wiązania paksyliny i kwercetyny w regulacji kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$. Wskazano również, że analog kwercetyny – izoramnetyna nie ma wpływu na aktywność kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, a po jej zastosowaniu paksylina całkowicie hamuje ten kanał. Dodatkowo wykorzystano badania modelowania molekularnego. Wyniki dokowania kwercetyny i paksyliny do kanału BK_{Ca} sugerują, że paksylina nie może wiązać się z kanałem BK_{Ca} po aktywacji kanału kwercetyną. Zatem, wydaje się, że prawdopodobnym mechanizmem tego zjawiska jest tworzenie się zawady przestrzennej przez kwercetynę (Kampa et al. 2022).

Interesujące wyniki z wykorzystaniem kwercetyny jako aktywatora kanału BK_{Ca} w komórkach linii śródbłonka skłoniły mnie do sprawdzenia tego efektu również w ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli (HBE WT). Jednak z uwagi na konkurencję wiązania z kanałem kwercetyny oraz paksyliny, poszukiwano innego niskocząsteczkowego inhibitora. Ze względu na wysoką masę cząsteczkową iberiotoksyny, zdecydowano się wykorzystać syntetyczny inhibitor kanału BK_{Ca} – penitrem A (Asano et al. 2012).

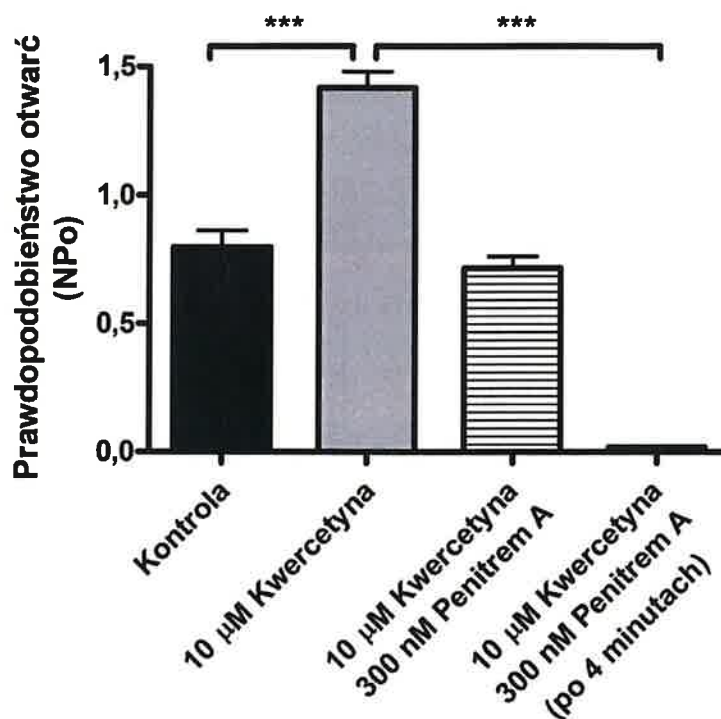
W celu identyfikacji i zbadania wpływu kwercetyny, pochodnej kwercetyny - izoramnetyny i penitremu A na aktywność kanału potasowego BK_{Ca} wykorzystano technikę

patch-clamp. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe jest badanie właściwości biofizycznych oraz farmakologicznych badanych kanałów jonowych na poziomie pojedynczych białek. Serię eksperymentów patch-clamp przeprowadzono z wykorzystaniem mitoplastów wyizolowanych z komórek HBE WT. Szczegółowy opis techniki znajduje się w podrozdziale 3.3. Wpływ kwercetyny mierzono przy stężeniu $10\ \mu\text{M}$. To stężenie zostało wybrane na podstawie poprzednich badań, w których udowodniono, że aktywacja kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ przez kwercetynę w stężeniu $10\ \mu\text{M}$ jest mierzona również po odpłukaniu (Kampa et al. 2021). Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w obecności $100\ \mu\text{M}\ \text{CaCl}_2$. Wynik przedstawione zostały jako reprezentatywne fragmenty nagrań uzyskanych podczas pomiarów patch-clamp (Rysunek 21). W celu potwierdzenia, że badany był kanał $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, do układu pomiarowego dodany został inhibitor tego kanału - $300\ \text{nM}$ penitrem A. Tuż po podaniu penitremu A, aktywność kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ zmniejszyła się o 50%, a kanał pozostawał w stanie całkowicie zamkniętym 4 minutach po dodaniu penitremu A (Rysunek 21d).



Rysunek 21. Ocena aktywności kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w komórkach HBE WT pod wpływem kwercetyny i penitremu A przy napięciach $+40\ \text{mV}$ oraz $-40\ \text{mV}$ w symetrycznym roztworze $150/150\ \text{mM}\ \text{KCl}$. (a) Przykładowe rejestracje zmian przepływającego prądu jonowego dla kontrolnej aktywności kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, (b) po podaniu $10\ \mu\text{M}$ kwercetyny oraz (c) w obecności $10\ \mu\text{M}$ kwercetyny i $300\ \text{nM}$ penitremu A. (d) Całkowity efekt blokowania kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ obserwowano po 4 minutach od chwili podania penitremu A. Na rysunku zaznaczono przez NPo - prawdopodobieństwo otwarć N kanałów jonowych obecnych w pipiecie podczas pomiarów. W tym przypadku $N = 2$. Powtórzenia, $n = 3$.

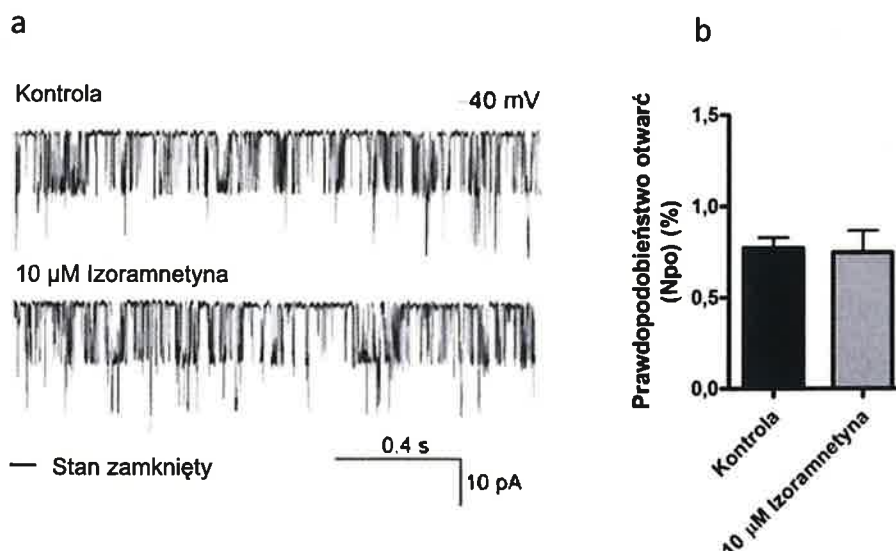
Wykazano, że prawdopodobieństwo otwarcia (NPo) kanału mitoBK_{Ca} przy napięciu -40 mV wzrosło z poziomu 0,97 do 1,51 po dodaniu 10 μ M kwercetyny, a po podaniu 300 nM penitremu A obserwowano całkowite zamknięcie kanału po 4 min. – NPo spadło do zera (Rysunek 22). Przy napięciu +40 mV, efektu aktywacji kanału przez kwercetynę nie obserwowano z uwagi na wysokie prawdopodobieństwo otwarcia. Z uwagi na ujemny potencjał elektryczny wnętrza mitochondriów, kluczowy jest wynik otrzymany przy napięciu -40 mV.



Rysunek 22. Analiza prawdopodobieństw otwarć kanałów mitoBK_{Ca} pod wpływem 10 μ M kwercetyny przy napięciu -40 mV w symetrycznym roztworze 150/150 mM KCl (średnia $\pm$ SD, n = 3). Istotność statystyczną określono na poziomie $p < 0,001$ (***) wykorzystując analizę jednoczynnikowej wariancji ANOVA. Przez NPo zaznaczono prawdopodobieństwo otwarć N kanałów jonowych obecnych w pipiecie podczas pomiarów. W tym przypadku N = 2. Powtórzenia, n = 3.

W badaniach wpływu zmian aktywności białek kanałowych na procesy fizjologiczne komórki ważne jest potwierdzenie wpływu modulatorów, dlatego jako kontrolę do powyższego eksperymentu zastosowano analog kwercetyny - izoramnetynę. Porównanie struktury chemicznej kwercetyny i izoramnetyny znajduje się na Rysunku 12. Kolejne doświadczenia patch-clamp z wykorzystaniem izoramnetyny przeprowadzono w tych samych warunkach. W trakcie badań wykazano, że obecność 10 μ M izoramnetyny nie zmieniała aktywności kanału mitoBK_{Ca}. Reprezentatywne fragmenty nagrań oraz analizę prawdopodobieństw otwarcia

kanałów przedstawiono na Rysunku 23a i 23b odpowiednio. W przypadku pomiarów dla kwercetyny i izoramnetyny wykonano analizę prawdopodobieństw otwarć dla dwóch kanałów ($N = 2$).



Rysunek 23. Ocena aktywności kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE WT pod wpływem izoramnetyny przy napięciu -40 mV w symetrycznym roztworze 150/150 mM KCl. (a) Przykładowe rejestracje zmian przepływającego prądu jonowego dla kontrolnej aktywności kanału mitoBK_{Ca} oraz po podaniu 10 μM izoramnetyny. (b) Analiza prawdopodobieństw otwarć kanałów mitoBK_{Ca} pod wpływem 10 μM izoramnetyny przy napięciu -40 mV w symetrycznym roztworze 150/150 mM KCl (średnia ± SD, $n = 3$). Istotność statystyczną określono jako nieistotny statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA. Przez NPo zaznaczono prawdopodobieństwo otwarć N kanałów jonowych obecnych w pipiecie podczas pomiarów. W tym przypadku $N = 2$.

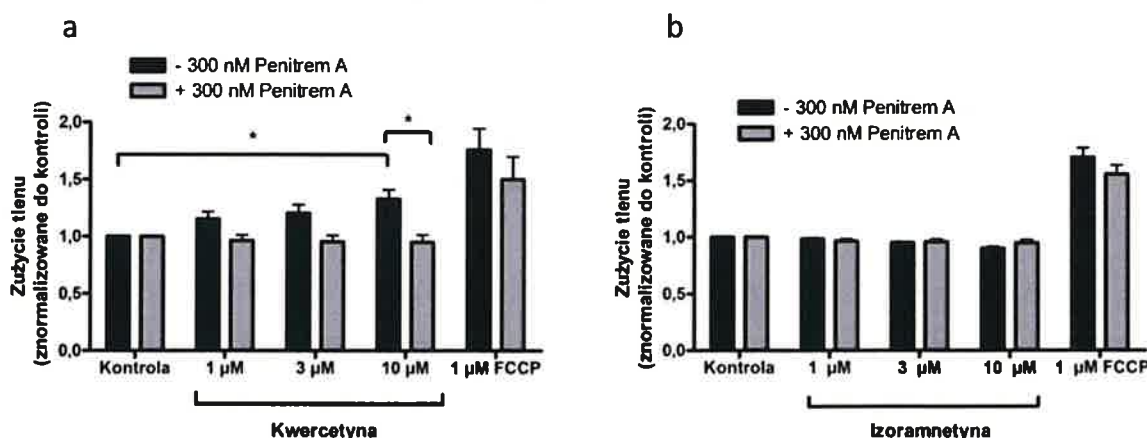
Otrzymane dane jednoznacznie wskazują, że kwercetyna jest aktywatorem kanału mitoBK_{Ca}, izoramnetyna nie zmienia aktywności a penitrem A jest blokerem kanału obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ludzkich komórek nabłonka oskrzeli (HBE WT). W przypadku komórek HBE WT, nie został zaobserwowany efekt konkurencji wiązania z białkiem kanału kwercetyny oraz penitremu A.

4.2 Ocena oddychania komórkowego w komórkach HBE WT

Z uwagi na ujemny potencjał po stronie macierzy mitochondrialnej napływ potasu przez kanały jest ułatwiony. Dlatego, uważa się, że aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych wpływa na aktywność łańcucha transportu elektronów wywołaną depolaryzacją wewnętrznej błony mitochondrialnej po napływie potasu. Ze względu na zaobserwowaną

zdolność kwercetyny do aktywacji kanału mitoBK_{Ca} przy napięciach ujemnych zbadano jej wpływ na szybkość oddychania komórkowego. W celu określenia szybkości oddychania komórek, zastosowano metodę opisaną w podrozdziale 3.4.1, która umożliwia pomiary zużycia tlenu w czasie rzeczywistym. Pomiary przeprowadzono na całych komórkach HBE WT. Dzięki wykorzystaniu aktywatora kanału – kwercetyny oraz syntetycznego inhibitora penitremu A można było określić wpływ regulacji transportu potasu przez kanał mitoBK_{Ca} na zmiany szybkości oddychania komórek.

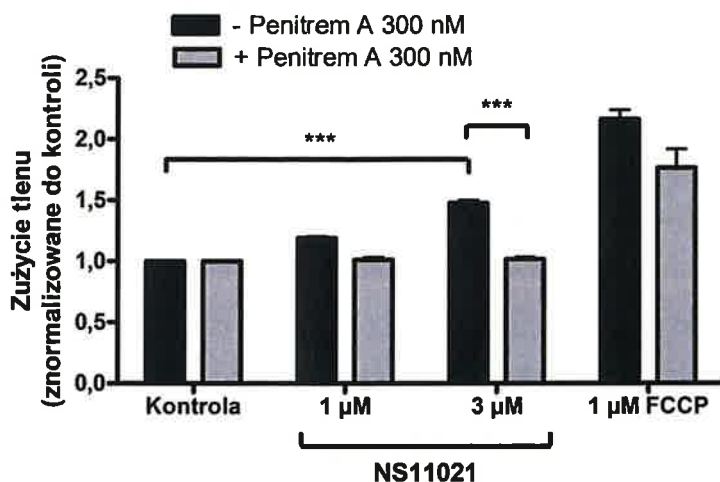
Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że 1, 3 i 10 μM kwercetyna zwiększała szybkość oddychania komórek HBE WT w sposób zależny od stężenia. Zaobserwowano wzrost szybkości oddychania o 15,2% dla stężenia 1 μM i o 32,8% dla 10 μM kwercetyny, co pokazano na Rysunku 24a. Takiego efektu tego nie obserwowano po podaniu izoramnetyny (1, 3, 10, μM) (Rysunek 24b), a podanie 300 nM penitremu A przed aplikacją kwercetyny odwraca efekt kwercetyny, co sugeruje, że zwiększenie szybkości oddychania komórek HBE WT przez kwercetynę jest związane z aktywacją kanału mitoBK_{Ca}. Całkowite rozprężnięcie łańcucha transportu elektronów indukowano poprzez zastosowanie FCCP w stężeniu 1 μM .



Rysunek 24. Ocena wpływu kwercetyny, izoramnetyny oraz penitremu A na szybkość zużycia tlenu przez komórki HBE WT. Słupki przedstawiają wpływ (a) kwercetyny w stężeniach 1, 3, 10 μM oraz (b) izoramnetyny (1, 3, 10 μM) na szybkość zużycia tlenu przez komórki HBE WT. Wpływ badanych związków – kwercetyny oraz izoramnetyny (czarne słupki) porównano z szybkością zużycia tlenu zmierzoną w obecności 300 nM penitremu A (szare słupki) odpowiednio na (a) i (b). Pełne rozprężnięcie łańcucha transportu elektronów uzyskiwano przez dodatek 1 μM FCCP. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,05$ (*) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

Podobny efekt, jak w przypadku kwercetyny uzyskano po użyciu klasycznego, ale syntetycznego aktywatora – NS11021. Komórki HBE WT po podaniu tego związku wykazały

wzrost szybkości zużycia tlenu zależny od stężenia, który również został zahamowany przez penitrem A (Rys 25). Aby uzyskać maksymalne rozprężenie łańcucha oddechowego, co przekłada się na maksymalny wzrost szybkości oddychania, podawano FCCP w stężeniu 1 μ M. Maksymalne oddychanie było wyższe w przypadku komórek traktowanych kwercetyną bez inhibitora kanału BK_{Ca}, co również potwierdza udział kanału potasowego w regulacji zmian szybkości oddychania.



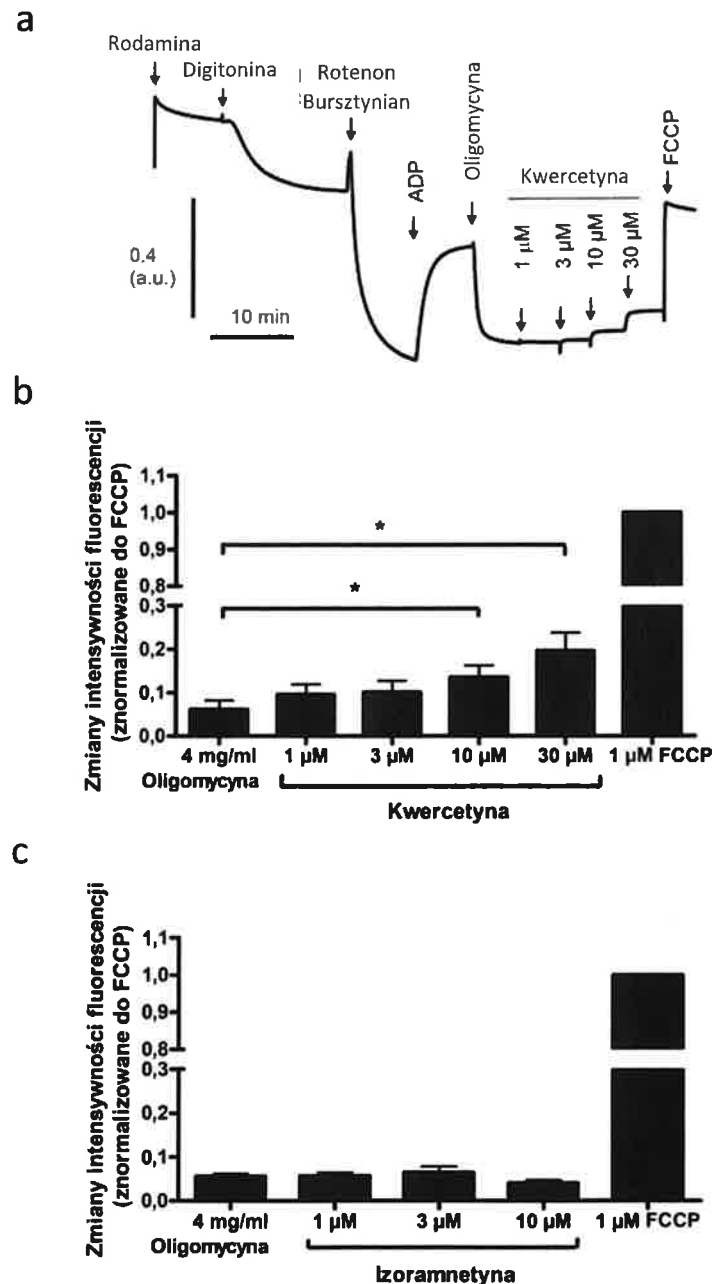
Rysunek 25. Analiza wpływu NS11021 na szybkość zużycia tlenu w komórkach HBE WT. Słupki przedstawiają wpływ 1 i 3 μ M NS11021 na szybkość zużycia tlenu przez komórki HBE WT. Efekt syntetycznego aktywatora NS11021 (czarne słupki) porównano z szybkością zużycia tlenu zmierzoną w obecności 300 nM penitremu A (szare słupki). Pełne rozprężenie łańcucha transportu elektronowego wywołano przez dodanie 1 μ M FCCP. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, n = 3. Istotność statystyczną określono przy p < 0,001 (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

NS11021, klasyczny aktywator kanału mitoBK_{Ca}, wykorzystano do potwierdzenia wpływu aktywacji tego kanału na szybkość oddychania. Ze względu na to, że NS11021 wywołuje szereg skutków ubocznych, o których wspomniano wcześniej tego aktywatora nie stosowano w innych doświadczeniach.

4.3 Fluorescencyjny pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej

Poprzednie badania wykazały, że aktywatory mitochondrialnych kanałów potasowych prowadzą do depolaryzacji wewnętrznej błony mitochondrialnej poprzez zwiększony napływ K⁺ do macierzy mitochondrialnej (Testai et al. 2013; Körper et al. 2003). Dlatego zaplanowano kolejny etap badań, w którym badano wpływ kwercetyny i izoramnetyny na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej. Analizy dokonano przy użyciu barwnika fluorescencyjnego - rodaminy 123. Do komór pomiarowych (Oxygraph-2k Oroboros

z fluorescencyjną przystawką) dodawano związki w następującej kolejności: 1,3 μM rodaminy, która jest znaną sondą fluorescencyjną wykorzystywaną do określenia potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, 10 μM digitoniny, która powoduje uprzepuszczalnienie błony komórkowej, dzięki czemu sonda może dostać się do wnętrza komórki, a to umożliwia pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Następnie dodawano 0,5 μM rotenonu, który stanowi inhibitor kompleksu I łańcucha oddechowego, dzięki czemu transport elektronów w łańcuchu oddechowym zachodził z wyłączeniem kompleksu I, kolejno podano 2 mM bursztynian, który stanowi substrat kompleksu II łańcucha oddechowego. Po tym dodano 2,5 μM ADP jako substrat syntezy ATP, a następnie 4 $\mu\text{g/ml}$ oligomycyny, która hamuje aktywność syntazy ATP. Następnie podano badane związki – kwercetynę oraz izoramnetynę (1, 3, 10, 30 μM), a na zakończenie doświadczenia, rozpręgacz - 1 μM FCCP. Przykładowy wynik zmian potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej przedstawiono na Rysunku 26a. Na Rysunku 26b, przedstawiono analizę danych z powtórzeń doświadczeń, ale tylko od chwili podania oligomycyny. Tutaj można zauważyć, że kwercetyna w stężeniach 1, 3, 10, 30 μM powoduje depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej w sposób zależny od stężenia. Najbardziej widoczny efekt zaobserwowano przy najwyższym stężeniu. Obserwowany spadek potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej był o 19,6% niższy w obecności 30 μM kwercetyny. Na Rysunku 26c z kolei widzimy, że izoramnetyna nie miała wpływu na zmiany potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. W obu przypadkach dane zostały znormalizowane do poziomu potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej po podaniu 1 μM FCCP.

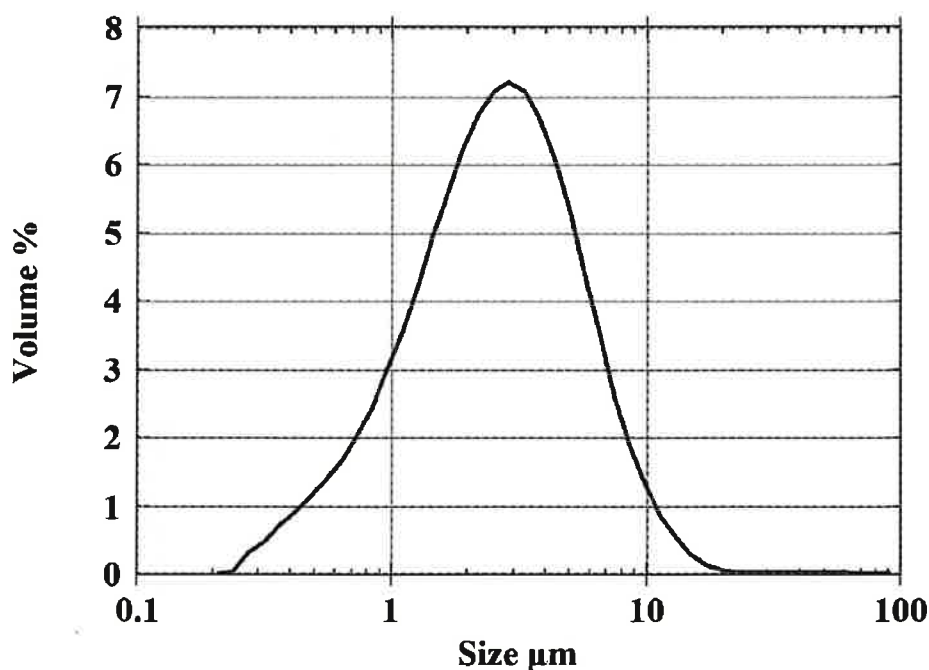


Rysunek 26. Analiza potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej z wykorzystaniem rodamin 123 w komórkach HBE WT. (a) Przykładowy zapis zmian intensywności fluorescencji po zastosowaniu 1,3 μM rodamin, 10 μM digitoniny, 0,5 μM rotenonu, 2 mM bursztynianu, 2,5 μM ADP, 4 μg/ml oligomycyny, kwercetyny (1, 3, 10, 30 μM), i na koniec 1 μM FCCP. Analiza zmiany potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej pod wpływem kwercetyny w różnych stężeniach (1, 3, 10, 30 μM) (b) i izoramnetyny (1, 3, 10 μM) (c). Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD, n = 3. Istotność statystyczną określono na poziomie $p < 0,05$ (*) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

Ten etap doświadczeń był ważny z uwagi na określenie roli aktywacji i blokowania kanału mitoBK_{Ca} w regulacji oddychania komórkowego badanego modelu nabłonka.

4.4 Zmiany szybkości oddychania w obecności PM – kontrola oddechowa

Jednym z celów pracy jest określenie udziału aktywacji kanału mitoBK_{Ca} w ochronie komórek nabłonka przed uszkodzeniami wywoływanymi przez pyły miejskie. Do realizacji doświadczeń wybrano pyły miejskie o średnicy około 4 μM . Taki rozmiar PM dociera w rejon nabłonka oskrzeli układu oddechowego człowieka. Rozkład średnic pyłów miejskich zawartych w próbce przedstawiono na Rysunku 27. Szczegółowe informacje dotyczące wykorzystywanych pyłów miejskich przedstawiono w podrozdziale 3.1.

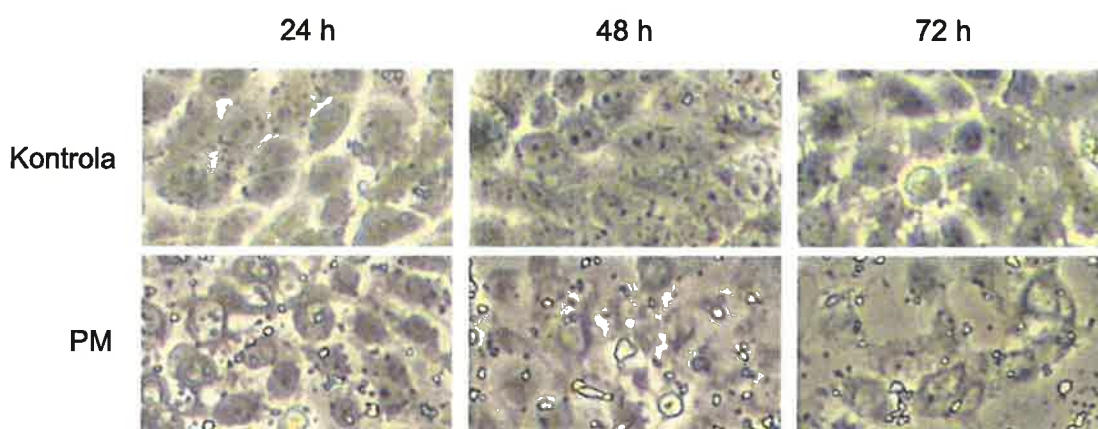


Rysunek 27. Rozkład wielkości pyłów miejskich w próbkach wykorzystywanych w badaniach. Wykres został pobrany z karty charakterystyki produktu SRM-2786 (pyły miejskie PM < 4 μm SRM-2786 z Krajowego Instytutu Standardów i Technologii w USA. Z uwagi na oczekiwaną powtarzalność wykonywanych doświadczeń wykorzystywano tylko ten produkt.

Określenie dawki stężenia pyłów miejskich używanych w eksperymentach zostało ustalone na etapie wstępnych wyników przedstawionych w propozycji projektu w ramach konkursu OPUS18. Szacowano wówczas, że stężenie 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ powoduje uszkodzenia komórek

nabłonka (HBE WT) w zakresie 50-70% w porównaniu do kontroli z staurosporyną (maksymalnego uszkodzenia) oraz kontroli, w której nie podano pyłów miejskich.

Jako dodatkowy element obserwacji morfologii komórek nabłonka w obecności PM wykonane zostały doświadczenia opisane poniżej. W obserwacjach mikroskopowych zauważono, że inkubacja komórek z 50 $\mu\text{g}/\text{m}$ PM znacznie zaburza normalną morfologię oraz strukturę monowarstwy komórek HBE WT (Rysunek 28). Do dalszych doświadczeń wybrano inkubację 24-godzinną, ponieważ w jej wyniku widać już zmiany morfologiczne, z kolei po 48 i 72 godzinach w obserwacjach mikroskopowych widać wiele martwych komórek, co mogłoby utrudniać przeprowadzenie doświadczeń.



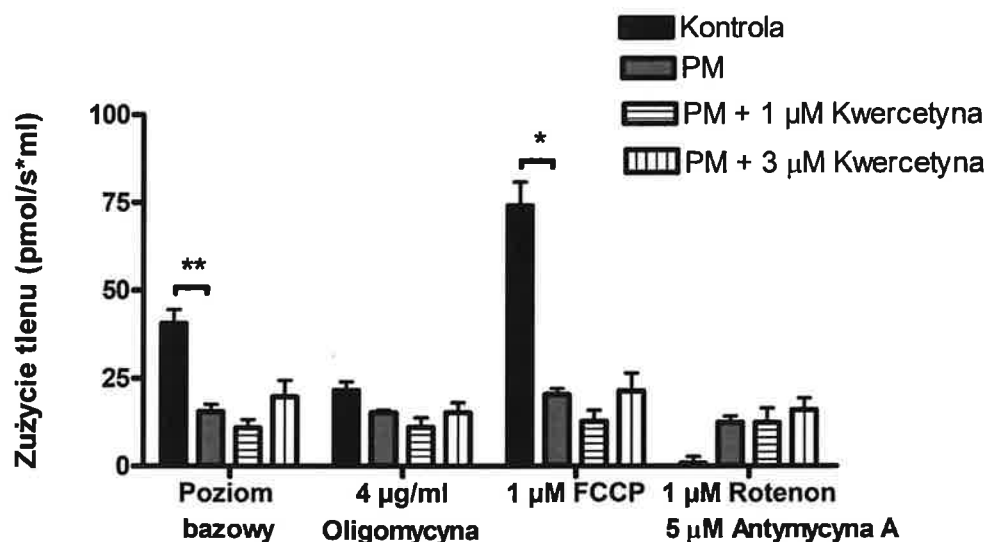
Rysunek 28. Zdjęcia mikroskopowe komórek HBE WT po inkubacji z pyłami miejskimi (50 $\mu\text{g}/\text{m}$ PM) po czasie 24, 48, 72 godzin. Zdjęcia wykonano kamerą DLTX1080PCMOSH DU2SD (DELTA optical) umieszczoną w odwróconym mikroskopie optycznym (Olympus) pod powiększeniem 20x.

Poprzednio wykazano, że aktywacja kanału mitoBK_{Ca} przez kwercetynę przyspiesza oddychanie komórkowe oraz obniża potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej komórek HBE WT. Postanowiono więc sprawdzić, czy przez aktywację kanału mitoBK_{Ca} będzie możliwe odwrócenie dysfunkcji mitochondriów wywołanych przez pyły miejskie.

W tym etapie badań zaplanowano pomiary zmian szybkości oddychania w obecności pyłów miejskich. Badań tych nie można przeprowadzić podając PM bezpośrednio do komór pomiarowych Oksygrafu ze względu na zanieczyszczanie elektrody pomiarowej przez te cząstki, co uniemożliwia prowadzenie pomiaru. Dlatego PM podawałam w hodowli komórkowej w formie preinkubacji z pożywką, żeby uniknąć uszkodzenia urządzenia pomiarowego i zaburzeń przebiegu doświadczeń. Komórki były inkubowane 24 h z 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PM w pożywce przed pomiarem. W celu analizy właściwości ochronnych kwercetyny na funkcje mitochondriów sprawdzono również wpływ inkubacji 24-godzinnej z 50 $\mu\text{g}/\text{m}$ PM oraz

1 i 3 μM kwercetyny na kontrolę oddechową komórek HBE WT. Komórki nie inkubowane z PM (kontrola), 24 godziny przed pomiarem miały zmienioną pożywkę.

Kontrola oddechowa została oceniona za pomocą systemu Oxygraph-2K. W tym pomiarze wykorzystano inhibitor ATPazy, oligomycynę (4 $\mu\text{g/ml}$), rozpręgacz FCCP w stężeniu 1 μM , a resztkowe zużycie tlenu mierzono wykorzystując inhibitory kompleksów łańcucha oddechowego: 2,5 μM rotenon–inhibitor kompleksu I oraz 0,5 μM antymycynę A, która jest inhibitorem kompleksu III łańcucha oddechowego. Rysunek 29 przedstawia zmiany w oddychaniu komórek HBE WT, które jest znacznie niższe (o około 62%) w komórkach poddanych inkubacji z 50 $\mu\text{g/ml}$ PM przez 24 godziny. Poziom oddychania komórkowego po podaniu rozpręgacza FCCP, również uległ zmniejszeniu (o 61%) po ekspozycji na pyły miejskie. Może to sugerować, że funkcje mitochondriów są upośledzone po ekspozycji na PM. W tym przypadku jednoczesna ekspozycja na PM i kwercetynę (1, 3 μM) nie przywróciła prawidłowej funkcji mitochondriów. W pomiarach nie udało się otrzymać danych w obecności 10 μM kwercetyny, ponieważ nie uzyskano stabilizacji szybkości zużycia tlenu.



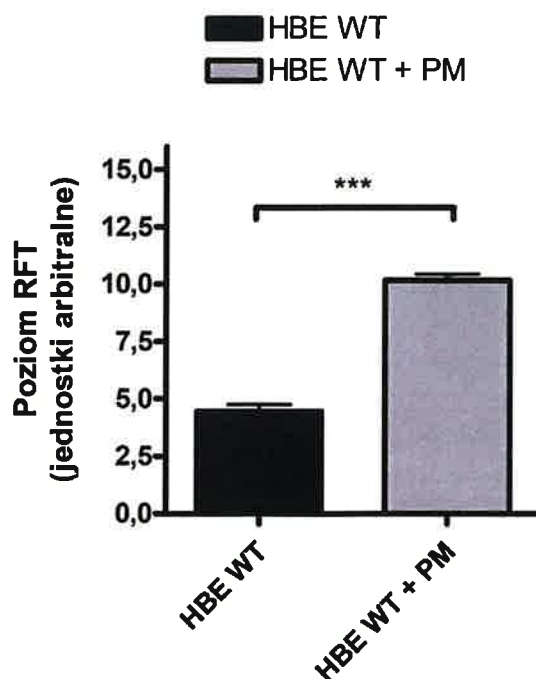
Rysunek 29. Wpływ 24-godzinnej ekspozycji komórek HBE WT na pyły miejskie, kwercetynę i izoramnetynę na funkcję mitochondriów w komórkach HBE. Komórkom HBE podawano 4 $\mu\text{g/ml}$ oligomycyny, 1 μM FCCP i 1 μM rotenon z 5 μM antymycynę A w celu pomiaru dysfunkcji mitochondriów w komórkach kontrolnych (czarne słupki). Komórki inkubowano przez 24 godziny z 50 $\mu\text{g/ml}$ PM (szare słupki), komórki inkubowano przez 24 godziny z 50 $\mu\text{g/ml}$ PM i 1 μM kwercetyny (linie poziome), komórki inkubowano 24 godziny z 50 $\mu\text{g/ml}$ PM i 3 μM kwercetyny (linie pionowe). Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.5 Ocena syntezy reaktywnych form tlenu po ekspozycji na pyły miejskie

4.5.1 Pomiary całkowitego poziomu reaktywnych form tlenu

Reaktywne formy tlenu uczestniczą w procesach komórkowych i wpływają na szlaki przekazywania sygnału w komórce. Regulują funkcje metaboliczne komórek, a także wpływają na proces śmierci komórkowej oraz migrację komórek. Wykazano również związek regulacji poziomu RFT przez aktywację mitochondrialnych kanałów potasowych (Gómez Del Val et al. 2024).

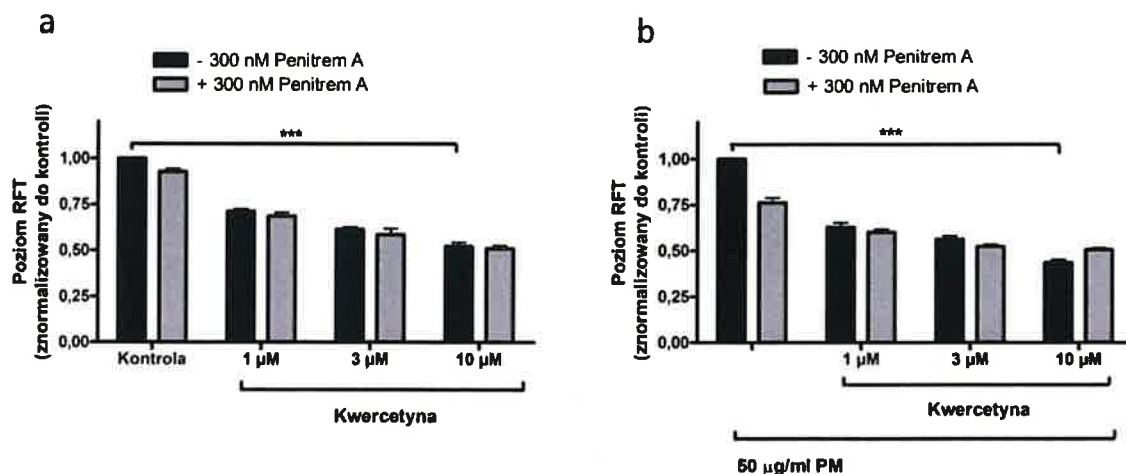
Zmiany w aktywności mitochondriów prowadzą do zmian w poziomie reaktywnych form tlenu. Ze względu na to, że zaobserwowano udział pyłów miejskich w uszkodzeniach funkcji komórkowych, postanowiono również zbadać ich efekt na poziom reaktywnych form tlenu w komórkach. Ekspozycja komórek HBE WT na PM spowodowała istotny wzrost poziomu reaktywnych form tlenu w porównaniu z grupą kontrolną – komórkami HBE WT nieinkubowanymi z PM. Podstawowy poziom RFT w niepoddanych działaniu PM komórkach HBE WT wynosił około 4 jednostki arbitralne, natomiast po ekspozycji na PM wzrósł do około 10 jednostek arbitralnych. Różnica ta była istotna statystycznie ($***p < 0,001$), co wskazuje, że PM silnie indukuje stres oksydacyjny w ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli (Rysunek 30).



Rysunek 30. Wpływ 50 µg/ml PM na poziom całkowity RFT w komórkach HBE WT. Czarny słupek przedstawia kontrolny poziom RFT. Szary słupek przedstawia dane po zastosowaniu 50 µg/ml PM.

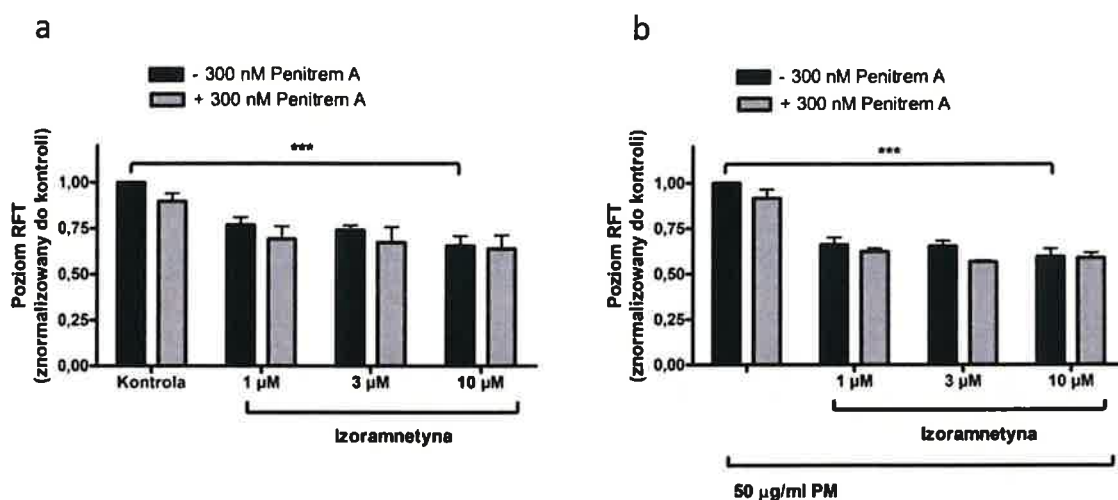
Dane zostały znormalizowane do wartości kontrolnych i wyrażane jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

Kolejno, właściwości przeciwutleniające kwercetyny oraz ochronne właściwości tego związku związane z aktywacją kanału BK_{Ca} i izoramnetyny, a także prooksydacyjny efekt PM określono metodą barwienia fluorescencyjnego za pomocą sondy H2DCFDA. Postawione zostało pytanie czy poziom reaktywnych form tlenu może być regulowany w wyniku aktywacji kanału mito BK_{Ca} ? W tym eksperymencie określono wpływ ekspozycji 50 $\mu\text{g/ml}$ PM na poziomy RFT w komórkach HBE WT. Kwercetyna (1, 3, 10, 30 μM) (Rysunek 31a) wykazały działanie przeciwutleniające w komórkach HBE. Największą aktywność antyoksydacyjną w przeprowadzonym eksperymencie miała kwercetyna w stężeniu 10 μM , która obniżała poziom RFT o 52%. Działanie antyoksydacyjne w komórkach traktowanych PM zaobserwowano zarówno dla kwercetyny, jak i izoramnetyny. Działanie przeciwutleniające kwercetyny jest najbardziej widoczne przy stężeniu 10 μM , gdyż poziom RFT jest niższy o 44% w porównaniu do poziomu w komórkach traktowanych PM. Co ciekawe, penitrem A 300 nM nie odwrócił działania kwercetyny w stężeniach 1 i 3 μM , co mogłoby prowadzić do wniosku, że właściwości przeciwutleniające kwercetyny na komórki HBE nie są powiązane z otwarciem kanału mito BK_{Ca} . Jedynie w przypadku obecności 10 μM kwercetyny i penitremu A obserwowano udział aktywacji tego kanału w regulacji poziomu RFT (Rysunek 31b).



Rysunek 31. Wpływ kwercetyny na syntezę reaktywnych form tlenu w komórkach HBE WT. Czarne słupki przedstawiają wpływ kwercetyny (1, 3, 10 μM) na wewnątrzkomórkowy poziom RFT. Wpływ 50 $\mu\text{g/ml}$ PM na poziom całkowity RFT wraz z kwercetyną (1, 3, 10 μM) (b). Szare słupki przedstawiają dane w obecności 300 nM penitremu A. Dane zostały znormalizowane do wartości kontrolnych i wyrażane jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

W kolejnych pomiarach poziomu reaktywnych form tlenu na poziomie komórkowych określono wpływ ekspozycji 50 $\mu\text{g/ml}$ PM wraz z izoramnetyną (1, 3, 10, 30 μM) (Rysunek 32). Okazało się, że również analog kwercetyny – izoramnetyna wykazuje działanie przeciwutleniające w komórkach HBE. Wynik wskazujący, że penitrem A 300 nM nie odwrócił działania kwercetyny, koresponduje z obserwacją, że izoramnetyna (która nie aktywowała kanału mitoBK_{Ca} w doświadczeniach patch-clamp) może również zmniejszać stres oksydacyjny w komórkach HBE, zarówno kontrolnych, jak i tych inkubowanych z 50 $\mu\text{g/ml}$ PM. Jednak w tym przypadku nie można stwierdzić udziału aktywacji kanału w regulacji poziomu reaktywnych form tlenu.



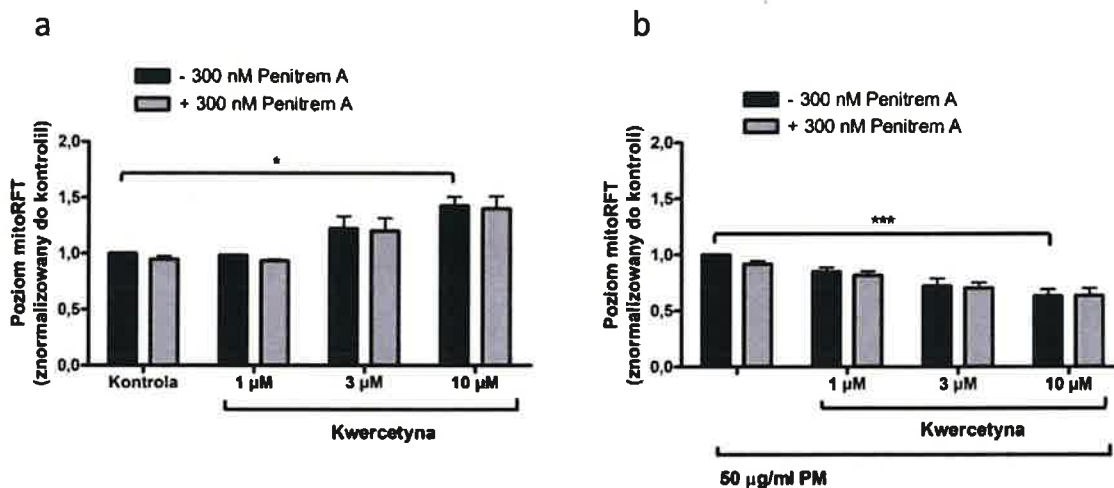
Rysunek 32. Ocena wpływu izoramnetyny na syntezę reaktywnych form tlenu w komórkach HBE WT. Czarne słupki przedstawiają wpływ izoramnetyny (1, 3, 10 μM) (a) na wewnątrzkomórkowy poziom RFT. Wpływ 50 $\mu\text{g/ml}$ PM na poziom całkowity RFT wraz z izoramnetyny (1, 3, 10 μM) (b). Szare słupki przedstawiają dane po zastosowaniu 300 nM penitremu A. Dane zostały znormalizowane do wartości kontrolnych i wyrażane jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.5.2 Mitochondrialny poziom reaktywnych form tlenu

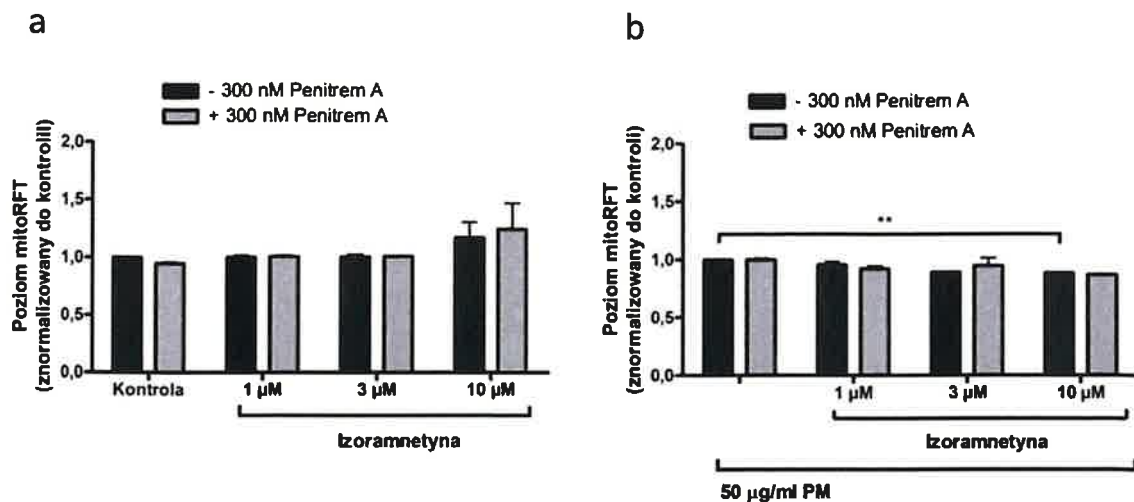
Znaczna część reaktywnych form tlenu powstaje w mitochondriach komórek w wyniku „wycieku” elektronów z łańcucha oddechowego. Te „wyciekające” elektrony, głównie z kompleksu I i III łańcucha oddechowego mogą redukować tlen cząsteczkowy niecałkowicie, tworząc anionorodnik nadadtlenkowy ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

Ze względu na aktywację kanału mitoBK_{Ca} w mitochondriach oraz działanie antyoksydacyjne kwercetyny i izoramnetyny podjęto próbę określenia poziomu mitochondrialnych RFT za pomocą barwienia fluorescencyjnego z użyciem sondy MitoSOX.

Zmiany fluorescencji tej sondy związane są z RFT pochodzenia mitochondrialnego (mitoRFT). Syntezę mitoRFT mierzono w kontrolnych komórkach HBE WT, jak i komórkach HBE WT po ekspozycji na 50 $\mu\text{g/ml}$ PM. Jak przedstawiono na Rysunku 33, kwercetyna (1, 3, 10, 30 μM) nie wykazała działania przeciwutleniającego na poziom mitoRFT w komórkach HBE, podobnie jak izoramnetyna (1, 3, 10, 30 μM) (Rysunek 33). Kwercetyna i izoramnetyna wykazały właściwości antyoksydacyjne w mitochondriach komórek HBE w przypadku uszkodzeń oksydacyjnych wywołanych PM w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Właściwości przeciwutleniające kwercetyny były silniejsze niż izoramnetyny – w przypadku 10 μM kwercetyny nastąpił spadek syntezy RFT o 35%, a w przypadku 10 μM izoramnetyny o 12%. Podobnie jak w przypadku wyników na poziomie komórkowym, penitrem A 300 nM nie odwracał działania kwercetyny.



Rysunek 33. Ocena wpływu kwercetyny na syntezę reaktywnych form tlenu na poziomie mitochondriów w komórkach HBE WT. Czarne słupki przedstawiają wpływ kwercetyny (1, 3, 10 μM) na poziom mitoRFT. Wpływ 50 $\mu\text{g/ml}$ PM na poziom mitoRFT wraz z kwercetyną (1, 3, 10 μM) (b). Szare słupki przedstawiają dane po zastosowaniu 300 nM penitremu A. Dane zostały znormalizowane do wartości kontrolnych i wyrażane jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.



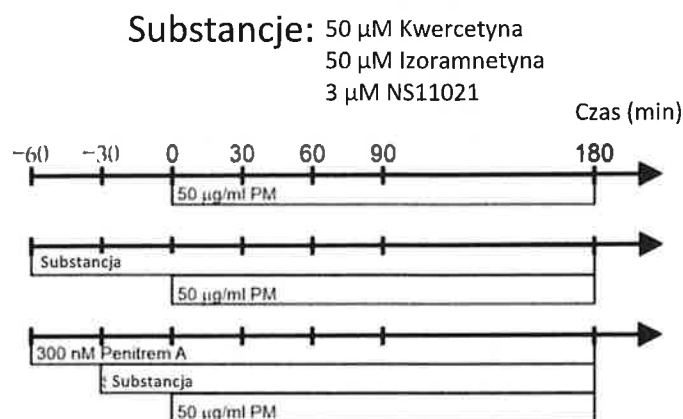
Rysunek 34. Wpływ izoramnetyny na syntezę reaktywnych form tlenu na poziomie mitochondriów komórek HBE WT. Czarne słupki przedstawiają wpływ izoramnetyny (1, 3, 10 μM) (a) na poziom mitoRFT. Wpływ 50 $\mu\text{g/ml}$ PM na poziom mitochondrialnych RFT wraz z izoramnetyny (1, 3, 10 μM) (b). Szare słupki przedstawiają dane po zastosowaniu 300 nM penitremu A. Dane zostały znormalizowane do wartości kontrolnych i wyrażane jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.6 Ocena przeznabłonkowego oporu elektrycznego

Obserwowane zmiany na poziomie funkcjonowania komórki przy aktywacji/hamowaniu kanału mitoBK_{Ca}, w tym dotyczących poziomu reaktywnych form tlenu, dysfunkcji mitochondriów, skłania do poszukiwań roli kanału również na poziomie funkcjonowania tkanki. Jak wspomniano w podrozdziale 1.3.2 kluczową funkcją tkanki nabłonkowej jest jej możliwość do tworzenia szczelnej bariery. Pomiar tej własności jest możliwy dzięki analizie poziomów przeznabłonkowego oporu elektrycznego (TEER), który prowadzony jest zazwyczaj w warunkach *in vitro*. TEER służy również jako wskaźnik ogólnej kondycji bariery nabłonkowej.

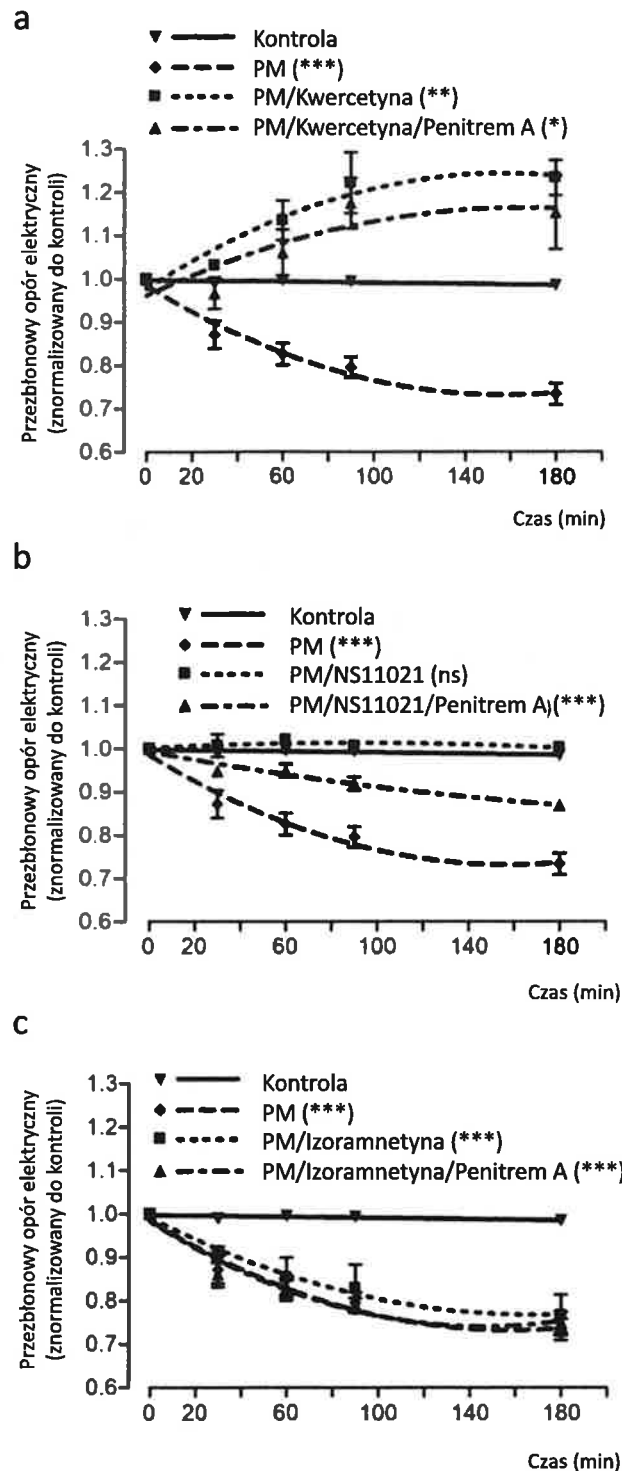
Komórki były hodowane z wykorzystaniem insertów na granicy faz ciecz-ciecz (LLI, *ang. liquid-liquid interface*), a następnie na granicy faz powietrze-ciecz (ALI, *ang. air-liquid interface*) w celu polaryzacji komórek. Przed każdym eksperymentem pożywkę do hodowli komórek zastąpiono sterylnym roztworem Ringera zarówno po wierzchołkowej/apikalnej i podstawno-bocznej stronie monowarstwy komórek. Następnie mierzono opór TEER warstwy. W kolejnym etapie badań, na wyhodowane monowarstwy komórek podawano badane związki - kwercetynę, penitremem A wraz z kwercetyną, izoramnetyny, penitrememu A wraz z izoramnetyną, NS11021, penitrememu A wraz z NS11021 przez 1 godzinę. Następnie dodano

50 $\mu\text{g/ml}$ PM do części apikalnej monowarstwy i wykonano pomiar TEER, a potem mierzono przeznabłonkowy opór monowarstw komórek po 30, 60, 90 i 180 minutach po rozpoczęciu inkubacji z pyłami miejskimi. Schemat podawania substancji po apikalnej stronie monowarstw komórek podczas pomiarów przedstawiono na Rysunku 35.



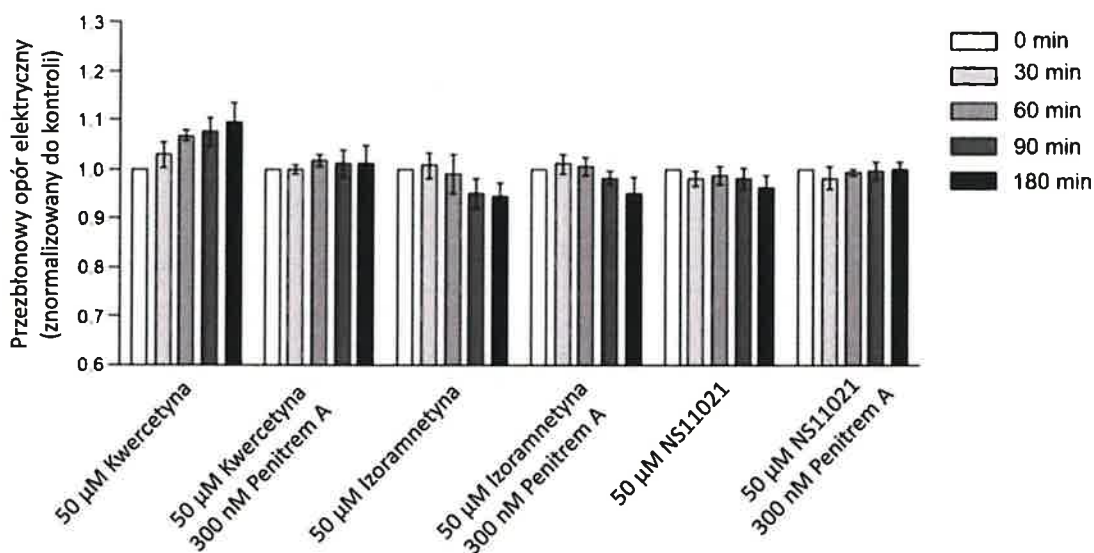
Rysunek 35. Schemat czasowy inkubacji komórek do oceny przeznabłonkowego oporu elektrycznego monowarstwy komórek HBE WT. Komórki inkubowano z 50 $\mu\text{g/ml}$ PM oraz z 50 μM kwercetyną, 50 μM izoramnetyną, 3 μM NS11021, 300 nM penitremem A. PM były podawane w godzinie 0, a badane substancje (kwercetyna, izoramnetyna, NS11021) 30 lub 60 minut przed godziną 0. Pomiary były wykonywane w godzinie 0, po 30, 60, 90 i 180 minutach.

Jak pokazano na Rysunku 36a, ekspozycja na 50 $\mu\text{g/ml}$ PM spowodowała spadek TEER o 27%. Okazało się jednak, że 50 μM kwercetyna odwróciła spadek TEER wywołany PM, a penitrem A (300 nM) częściowo zniósł ten efekt, co sugerowałoby ważną rolę aktywacji kanału mitoBK_{Ca} w formowaniu funkcjonalnej – szczelnej bariery nabłonka oddechowego. Podobnie 3 μM NS11021, syntetyczny aktywator kanału mitoBK_{Ca}, również chronił monowarstwy komórek przed utratą szczelności (25% wyższy poziom TEER niż w przypadku PM), jednak jego działanie nie było tak silne jak obserwowane w przypadku 50 μM kwercetyny (46%) (Rysunek 36b). Aby dodatkowo potwierdzić udział kanału mitoBK_{Ca} w obserwowanych zjawiskach, wykorzystano analog kwercetyny – izoramnetynę. Jak pokazano na Rysunku 36c, izoramnetyna nie wykazywała działania ochronnego na TEER monowarstw komórek HBE WT narażonych na działanie PM. Podsumowując, właściwości ochronne kwercetyny przed uszkodzeniami szczelności warstwy komórek wywołanymi przez PM są powiązane z aktywacją kanałów mitoBK_{Ca}.



Rysunek 36. Zmiany przeznabłonkowego oporu elektrycznego monowarstw komórek HBE WT. Zmiana TEER po ekspozycji na roztwór Ringera (kontrola), 50 $\mu\text{g/ml}$ PM z/bez 50 μM kwercetyny i 300 nM penitremu A. (a) Zmiana TEER po ekspozycji na sam roztwór Ringera (kontrola), 50 $\mu\text{g/ml}$ PM z/bez 3 nM NS11021 i 300 nM penitremu A. (b) Zmiana TEER po ekspozycji na sam roztwór Ringera (kontrola), 50 $\mu\text{g/ml}$ PM z/bez 50 μM izoramnetyny i 300 nM penitremu A. (c) Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD z eksperymentów przeprowadzonych niezależnie ($n = 4$). Istotność statystyczną pomiarów w porównaniu z kontrolami określono przy $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

Dodatkowo wyniki zaprezentowane na Rysunku 37 nie wskazują na efekty uboczne zastosowanych substancji. Zaobserwowane przeznabłonkowe zmiany oporu elektrycznego w obecności kwercetyny, izoramnetyny, NS11021 lub penitremu A nie były istotne statystycznie.



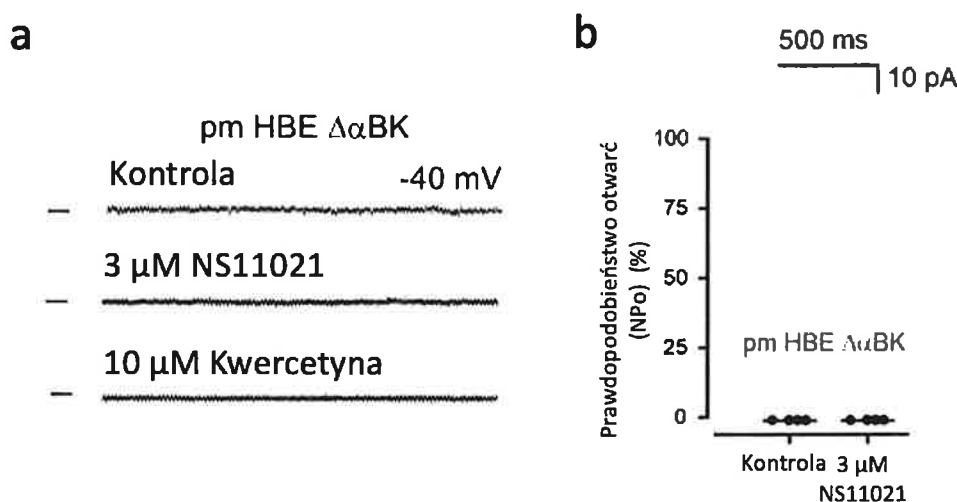
Rysunek 37. Zmiana TEER po ekspozycji na roztwór Ringera uzupełniony 50 μ M kwercetyny, 50 μ M kwercetyny i 300 nM penitremu A, 50 μ M isoramnetyny, 50 μ M isoramnetyny i 300 nM penitremu A oraz 3 nM NS11021, 3 nM NS11021 i 300 nM penitrem A. Białe słupki na wykresie przedstawiają pomiary TEER w czasie 0, szare jasne słupki reprezentują pomiary po 30 minutach, szare słupki – po 60 minutach, ciemne szare słupki to wyniki pomiarów wykonanych po 90 minutach, a czarne – po 180 min. Dane przedstawiono jako średnią $\pm$ SD z eksperymentów przeprowadzonych niezależnie ($n = 4$). Istotność statystyczną pomiarów w porównaniu z kontrolami określono przy $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.7 Pomiar patch-clamp w linii komórek HBE $\Delta\alpha$ BK

Dla potwierdzenia roli kanału BK_{Ca} w fizjologii komórek nabłonka oskrzeli przeprowadzono serię doświadczeń z wykorzystaniem linii z delecją tego kanału - HBE $\Delta\alpha$ BK. Nową, wygenerowaną linię komórkową HBE $\Delta\alpha$ BK opisano w podrozdziale 3.2.2.

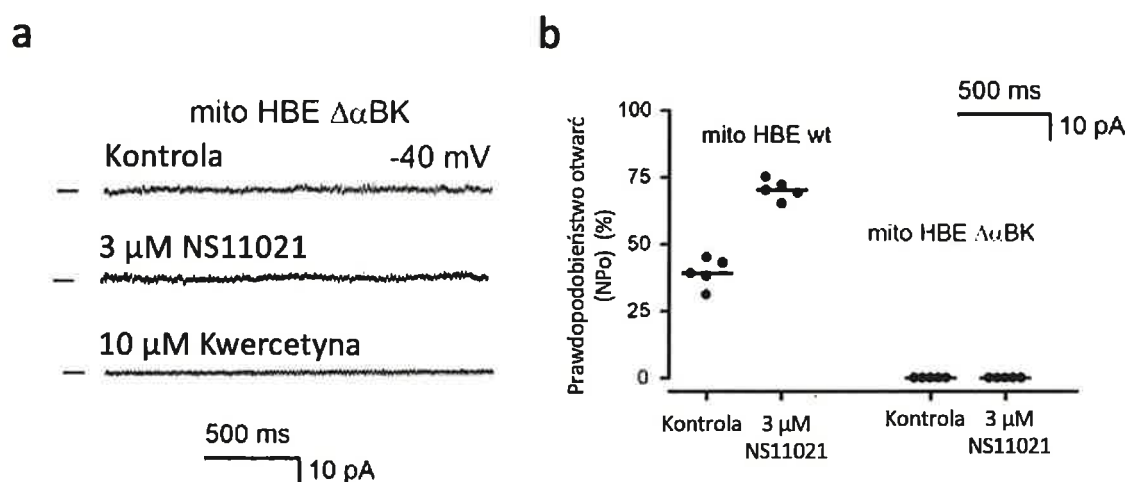
Pierwszym etapem było potwierdzenie, że wyprowadzona linia pozbawiona funkcjonalnego kanału BK_{Ca} - HBE $\Delta\alpha$ BK nie wykazuje jego aktywności. W tym celu wykonano pomiary patch-clamp, które przeprowadzono na błonie komórkowej i wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek HBE $\Delta\alpha$ BK (Rysunek 38a). W tych układach nie obserwowano żadnego prądu jonowego typowego dla kanału BK_{Ca} (Rysunek 38b). Aby

potwierdzić tę obserwację, przetestowaliśmy działanie syntetycznego aktywatora kanału BK_{Ca} - 3 μM NS11021 oraz 10 μM kwercetyny. Co ciekawe, zastosowanie NS11021 w komórkach HBE $\Delta\alpha BK$ nie spowodowało aktywacji żadnego prądu odpowiadającego kanałom potasowym, co skutkowało prawdopodobieństwem otwarcia wynoszącym 0% (Rysunek 38). Podobną obserwację zarejestrowano w obecności kwercetyny. Wyniki te jednoznacznie potwierdzają brak kanału BK_{Ca} w nowej linii komórkowej HBE $\Delta\alpha BK$ zarówno w błonie plazmatycznej jak i w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.



Rysunek 38. Patch-clamp błony plazmatycznej komórek HBE $\Delta\alpha BK$. (a) Przykład sygnału zarejestrowanego w warunkach kontrolnych, po podaniu 3 μM NS11021 i 10 μM kwercetyny dla eksperymentów elektrofizjologicznych patch-clamp z wykorzystaniem błony plazmatycznej komórek $\Delta\alpha BK$ HBE. Wszystkie pomiary prowadzono w 150 mM roztworze KCl ze 100 μM Ca^{2+} przy napięciu -40 mV. (b) Wykres przedstawia analizę prawdopodobieństwa otwarcia kanału (NPo). Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

W przypadku eksperymentu patch-clamp prowadzonego na błonie mitoplastu (wewnętrzna błona mitochondrialna) w mniej niż 7% wszystkich prowadzonych pomiarów zarejestrowaliśmy duże prądy o niskiej kinetyce. Zagadnienia tego nie kontynuowano, ponieważ nie stanowiło to przedmiotu zainteresowania w trakcie prowadzonych badań. Podobnie jak w przypadku doświadczeń przeprowadzonych na błonie plazmatycznej, zapisy uzyskane na wewnętrznej błonie mitochondrialnej w obecności 3 μM NS11021 i 10 μM kwercetyny nie wskazują na obecność kanału BK_{Ca} (Rysunek 39). Analiza prawdopodobieństwa otwarć wynosi 0% w obecności 3 μM NS11021 – aktywatora kanału BK_{Ca} (Rysunek 39b).

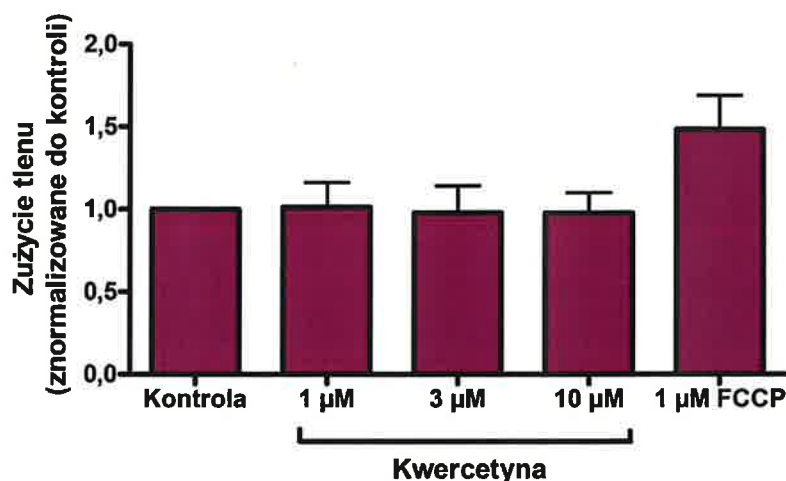


Rysunek 39. Patch-clamp wewnętrznej błony mitochondrialnej dla komórek HBE $\Delta\alpha\text{BK}$. (a) Przykład sygnału zarejestrowanego w warunkach kontrolnych, po podaniu 3 μM NS11021 i 10 μM kwercetyny do eksperymentów elektrofizjologicznych patch-clamp z wykorzystaniem mitoplastów z komórek $\Delta\alpha\text{BK}$ HBE. Wszystkie pomiary prowadzono w 150 mM roztworze KCl ze 100 μM Ca^{2+} przy napięciu -40 mV. (b) Wykres przedstawia analizę prawdopodobieństwa otwarcia kanału (NPo). Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.8 Ocena szybkości zużycia tlenu w komórkach HBE $\Delta\alpha\text{BK}$

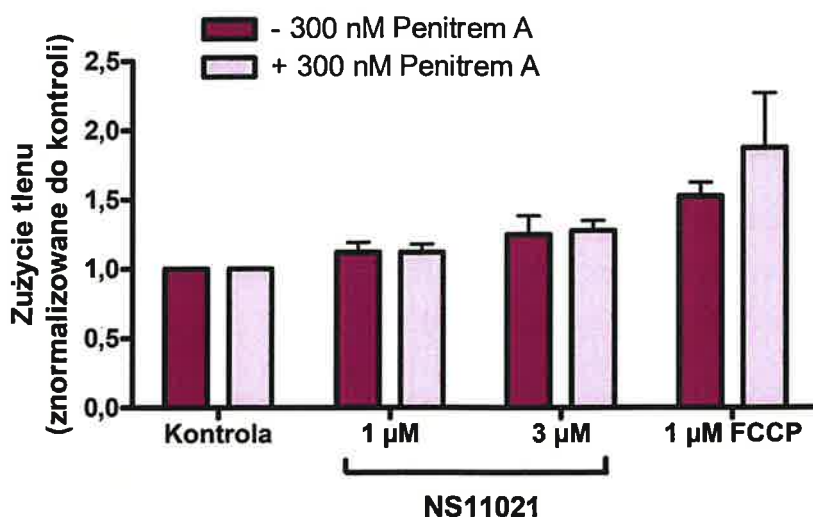
W celu dodatkowego potwierdzenia, że za zwiększenie szybkości oddychania w linii komórkowej HBE WT w obecności kwercetyny odpowiedzialny jest mechanizm związany z aktywacją mitochondrialnego kanału potasowego $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ wykorzystano linię komórkową

HBE $\Delta\alpha$ BK. Komórki i modulatory kanału - kwercetynę podawano do komór pomiarowych podobnie jak w przypadku badań prowadzonych z wykorzystaniem linii HBE WT. W wyniku prowadzonych analiz okazało się, że 1, 3 i 10 μ M kwercetyna nie zwiększała zużycia tlenu przez komórki HBE $\Delta\alpha$ BK niezależnie od dawki. Obserwowane poziomy oddychania komórkowego (Rysunek 40) w każdym badanym stężeniu kwercetyny były podobne, a także różnice wyników nie były istotne statystycznie. Aby uzyskać maksymalny wzrost szybkości oddychania, podawano FCCP w stężeniu 1 μ M.



Rysunek 40. Ocena wpływu kwercetyny na szybkość zużycia tlenu w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK. Słupki przedstawiają wpływ kwercetyny w zadanych stężeniach (1, 3, 10 μ M) na szybkość zużycia tlenu przez komórki HBE $\Delta\alpha$ BK. Kolor fioletowy od tego momentu będzie reprezentował na wykresach uzyskane dane dla komórek HBE $\Delta\alpha$ BK. Pełne rozprężnięcie łańcucha transportu elektronowego wywołano przez dodatek 1 μ M FCCP. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA. Otrzymane zmiany poziomu oddychania tlenowego przy wykorzystaniu kwercetyny nie były istotne statystycznie.

W przypadku pomiaru szybkości oddychania komórkowego z wykorzystaniem syntetycznego aktywatora – NS11021 zaobserwowano nieznaczny wzrost szybkości oddychania komórkowego komórek HBE $\Delta\alpha$ BK, który jednak nie był istotny statystycznie oraz nie różnił się od efektu wywołanego podaniem 300 nM Penitremu A (Rysunek 41).

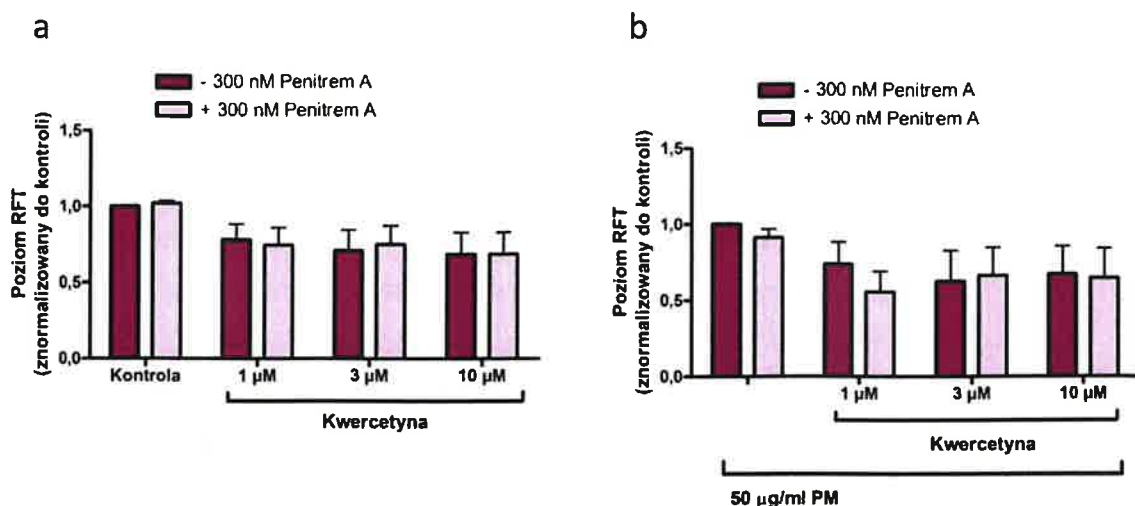


Rysunek 41. Analiza wpływu NS11021 na szybkość zużycia tlenu w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK. Słupki przedstawiają wpływ 1 i 3 μ M NS11021 na szybkość zużycia tlenu przez komórki HBE $\Delta\alpha$ BK. Działanie syntetycznego aktywatora NS11021 (fioletowe słupki) porównano z szybkością zużycia tlenu zmierzoną w obecności 300 nM penitremu A (jasne fioletowe słupki). Pełne rozprężnięcie łańcucha transportu elektronowego wywołano przez dodanie 1 μ M FCCP. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

Wnioskiem dodatkowym, płynącym z tego doświadczenia, jest to, że NS11021 przyspiesza oddychanie niezależnie od obecności inhibitora kanału, dlatego nie można tego efektu korelować z aktywacją kanału mitoBK_{Ca}. Tak jak już wcześniej wspomniano, to niespecyficzny skutek stosowania NS11021.

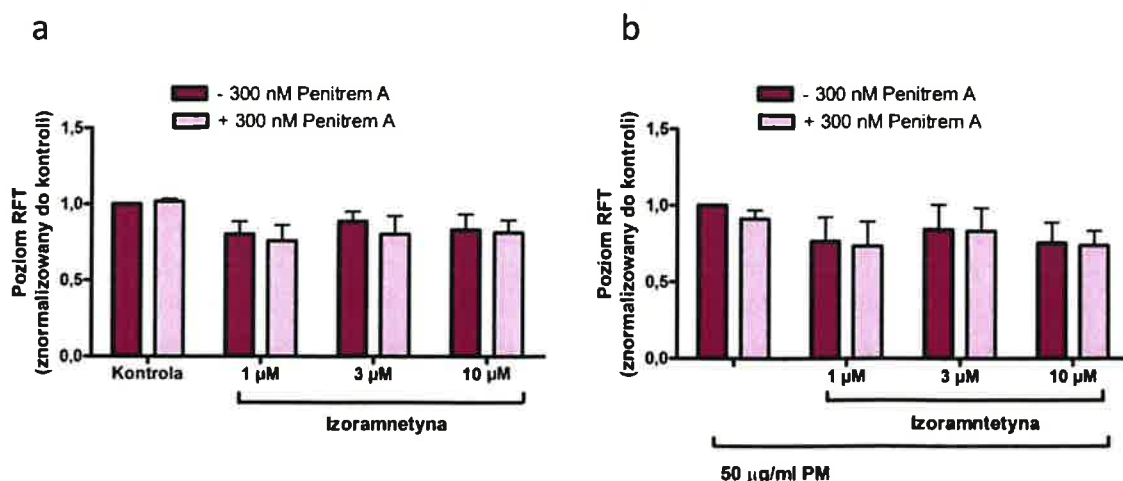
4.9 Całkowity poziom reaktywnych form tlenu w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK

Do określenia poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach z delecją kanału BK_{Ca} linii HBE $\Delta\alpha$ BK zastosowano metodę barwienia fluorescencyjnego sondą H2DCFDA. Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy obok efektu przeciwutleniającego kwercetyny i izoramnetyny brak obecności kanału w tej nowo wygenerowanej linii komórkowej może wpływać na poziom reaktywnych form tlenu po ekspozycji na pyły miejskie w stężeniu 50 μ g/ml PM. Jak pokazano na Rysunku 42, bazowy poziom reaktywnych form tlenu w komórkach linii HBE $\Delta\alpha$ BK niepoddanych działaniu PM przy podaniu kwercetyny oraz izoramnetyny również spada w porównaniu z komórkami z grupy kontrolnej, jednak ta różnica nie jest istotna statystycznie.



Rysunek 42. Analiza wpływu kwercetyny na wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK. Fioletowe słupki przedstawiają wpływ kwercetyny (1, 3, 10 μ M) na wewnątrzkomórkowy poziom RFT (a) oraz pyłów miejskich i kwercetyny (1, 3, 10 μ M) (b). Fioletowy jasny słupek wskazuje na poziom reaktywnych form tlenu w tym samym układzie, ale z wykorzystaniem penitremu A 300 nM. Dane zostały znormalizowane do wartości kontrolnych i wyrażane jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono jako nieistotny statystycznie za pomocą jednokierunkowej ANOVA.

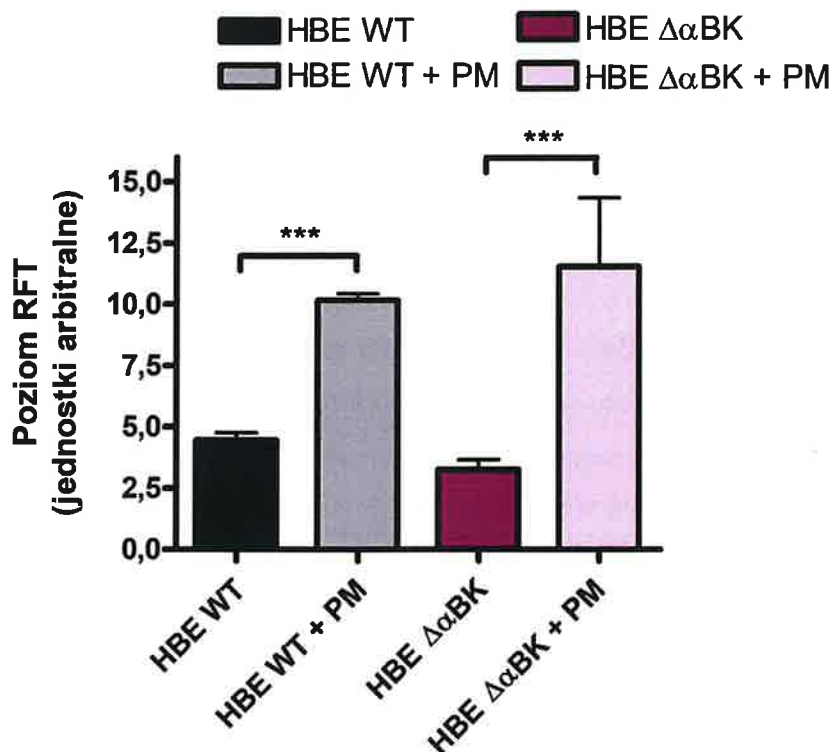
W obecności pyłów miejskich poziom reaktywnych form tlenu również ulegał obniżeniu pod wpływem badanych związków – kwercetyny oraz jej analogu – izoramnetyny (Rysunek 43), również w tym przypadku różnica nie była istotna statystycznie. Większy efekt ochronny przed uszkodzeniami na drodze powstawiania reaktywnych form tlenu w przypadku kwercetyny dla linii HBE WT niż HBE $\Delta\alpha$ BK wskazuje na udział kanału BK_{Ca} w tym zjawisku (Rysunek 44).



Rysunek 43. Analiza wpływu izoramnetyny na wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK. Fioletowe słupki przedstawiają wpływ izoramnetyny (1, 3, 10 μ M) na wewnątrzkomórkowy poziom RFT (a) oraz pyłów miejskich wraz z izoramnetyną (1, 3, 10 μ M) (b). Fioletowy jasny słupek wskazuje na poziom reaktywnych form tlenu w tym samym układzie, ale w

obecności penitremu A 300 nM – inhibitora kanału BK_{Ca}. Dane zostały znormalizowane do wartości kontrolnych i wyrażane jako średnie $\pm$ SD, n = 3. Istotność statystyczną określono jako nieistotny statystycznie przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

Na Rysunku 44 przedstawiono efekt ekspozycji na 50 μ g/ml PM na całkowity poziom RFT w komórkach HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK. Przeprowadzone badania wykazały, że narażenie na pyły miejskie powoduje znaczny wzrost całkowitego poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach linii HBE WT jak i komórkach linii z delecją HBE $\Delta\alpha$ BK ($p < 0,001$). Co ciekawe, wzrost RFT w komórkach linii HBE $\Delta\alpha$ BK po ekspozycji na 50 μ g/ml PM jest wyższy niż ma to miejsce w linii typu dzikiego, jednak różnica ta nie jest istotna statystycznie.

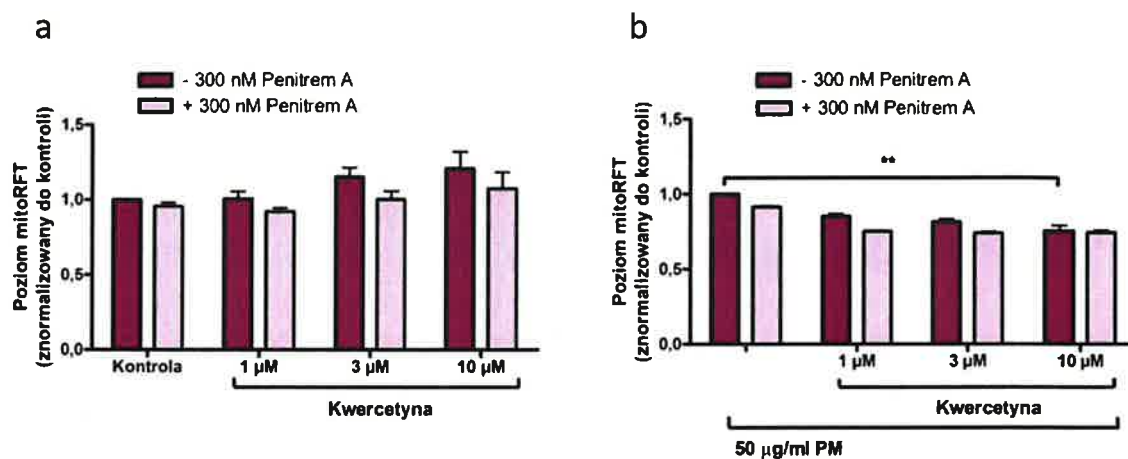


Rysunek 44. Wpływ 50 μ g/ml PM na całkowity poziom RFT w komórkach HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK. Czarne słupki przedstawiają kontrolny poziom RFT w komórkach HBE WT, a fioletowe ciemne - HBE $\Delta\alpha$ BK. Szare słupki (HBE WT) i fioletowe jasne słupki (HBE $\Delta\alpha$ BK) przedstawiają dane po zastosowaniu inkubacji komórek z 50 μ g/ml PM. Dane zostały znormalizowane do wartości kontrolnych i wyrażane jako średnie $\pm$ SD, n = 3. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.10 Poziom mitochondrialnych reaktywnych form tlenu w komórkach HBE

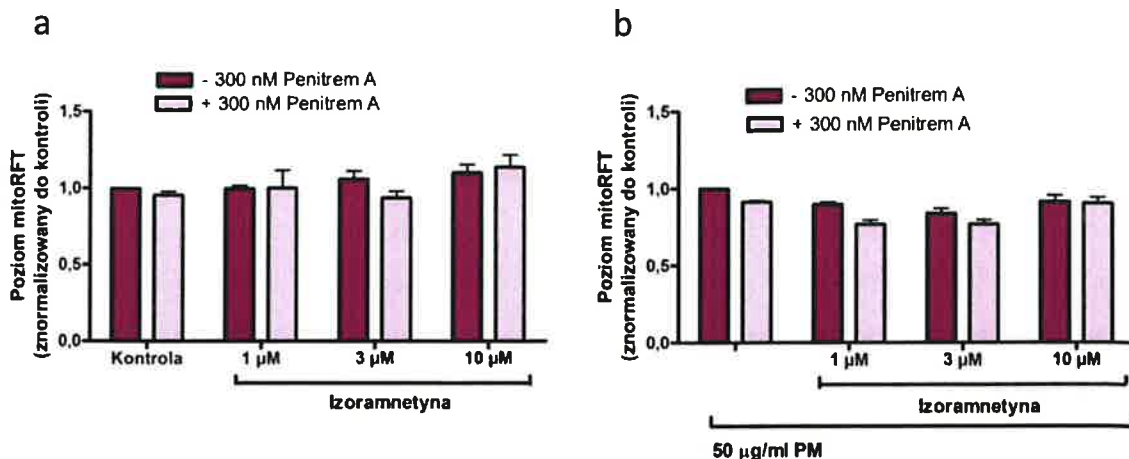
$\Delta\alpha\text{BK}$

W pracy doktorskiej oceniłam zmiany w syntezie mitochondrialnych RFT. W ten sposób podjęta została próba wyjaśnienia udziału aktywacji kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ oraz efektu przeciwutleniającego kwercetyny i izoramnetyny w nowo wygenerowanej linii komórkowej. Badania poziomu mitochondrialnych reaktywnych form tlenu wykonano z wykorzystaniem sondy MitoSOX. Poziom RFT mierzono w komórkach delecją HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ nie traktowanych oraz traktowanych 50 $\mu\text{g/ml}$ PM. Rysunek 45 i 46 przedstawia, że kwercetyna oraz izoramnetyna w stężeniach 1, 3, 10 μM nie wykazała działania antyoksydacyjnego. Efekty w obecności penitremu A były nie istotne statystycznie.



Rysunek 45. Analiza wpływu kwercetyny na poziom reaktywnych form tlenu pochodzenia mitochondrialnego w komórkach HBE $\Delta\alpha\text{BK}$. Fioletowe słupki przedstawiają wpływ kwercetyny (1, 3, 10 μM) na mitochondrialny poziom RFT (a), oraz kwercetyny (1, 3, 10 μM) i pyłów miejskich (b). Fioletowy jasny słupek wskazuje na poziom reaktywnych form tlenu w tym samym schemacie, ale z wykorzystaniem penitremu A 300 nM. Dane zostały znormalizowane do wartości kontrolnych i wyrażane jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,01$ (**) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

Kwercetyna i izoramnetyna wykazały właściwości antyoksydacyjne w mitochondriach komórek HBE WT w przypadku uszkodzeń oksydacyjnych wywołanych PM w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Właściwości przeciwutleniające kwercetyny były silniejsze niż izoramnetyny (wynik w przypadku izoramnetyny nie był istotny statystycznie). Wynik ten jest tożsamy z wynikiem otrzymanym dla linii z funkcjonalnym kanałem BK_{Ca} , w której również kwercetyna wywołała silniejszy efekt antyoksydacyjny. Znaczny efekt w porównaniu obydwu linii może wskazywać, że właściwości antyoksydacyjne badanego polifenolu w stosunku do RFT pochodzenia mitochondrialnego nie są związane z aktywacją przez kwercetynę kanału.



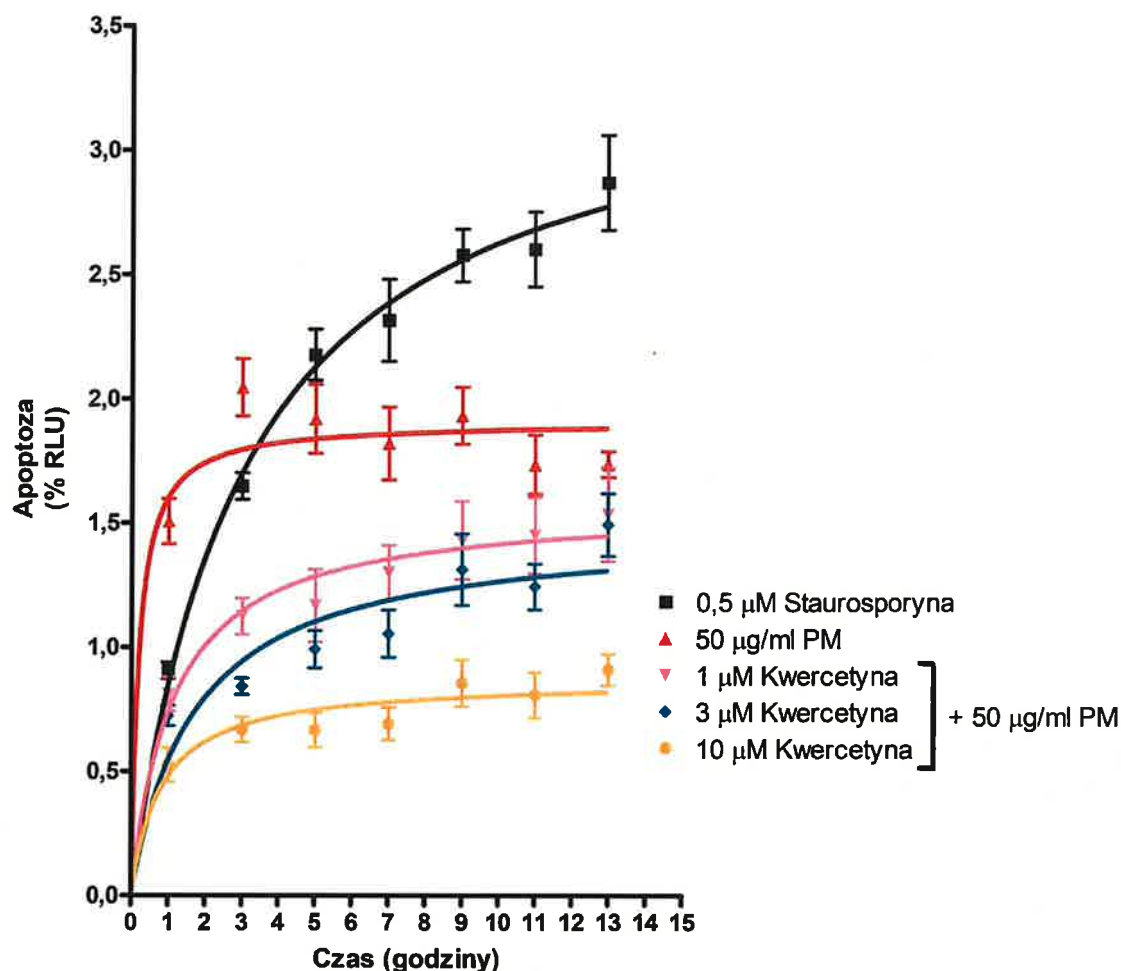
Rysunek 46. Wpływ izoramnetyny na poziom reaktywnych form tlenu pochodzenia mitochondrialnego w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK. Fioletowe słupki przedstawiają wpływ izoramnetyny (1, 3, 10 μ M) na wewnątrzkomórkowy poziom RFT (a) oraz izoramnetyny (1, 3, 10 μ M) i pyłów miejskich (b). Fioletowy jasny słupek wskazuje na poziom reaktywnych form tlenu w tym samym schemacie, ale z wykorzystaniem penitremu A 300 nM. Dane zostały znormalizowane do wartości kontrolnych i wyrażane jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.11 Przeżywalność komórek

Podwyższony poziom reaktywnych form tlenu w komórkach, a także zaburzenia funkcjonowania łańcucha transportu elektronów przyczyniają się do ogólnego pogorszenia funkcjonowania komórek. Jeśli te zmiany występują są zaawansowane, mogą również prowadzić do śmierci komórek. Dlatego, zaplanowane zostały doświadczenia dotyczące oceny przeżywalności komórek w badanych układach doświadczalnych. Ten typ doświadczeń był wykonany na wstępnym etapie doktoratu, a umieszczenie tych wyników tutaj wynika z planu przedstawienia danych w doktoracie.

4.11.1 Przeżywalność mierzona za pomocą testu apoptoza-nekroza

W celu określenia przeżywalności badanych linii komórkowych w pierwszej kolejności zastosowano komercyjny test umożliwiający badanie poziomu śmierci komórkowej na drodze apoptozy według protokołu opisanego w podrozdziale 3.6.2. Wykazano, że komórki HBE WT w obecności 50 μ g/ml PM wykazują wyższy poziom apoptozy niż komórki kontrolne. Inkubacja komórek z 1, 3, 10 μ M kwercetyną przywraca żywotność komórek w sposób zależny od dawki (Rysunek 47). Zastosowanie staurosporyny w stężeniu 0,5 μ M miało na celu wskazanie maksymalnego stopnia uszkodzeń.

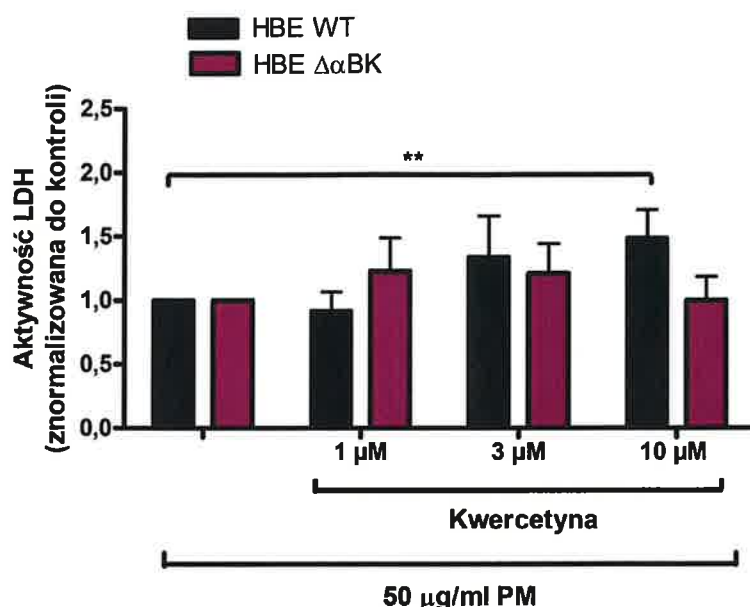


Rysunek 47. Analiza poziomu apoptozy komórek linii HBE WT po inkubacji z PM oraz kwercetyną (1, 3, 10 μ M) wyrażoną zmianą luminescencji w czasie (1-13 h). Na wykresie przedstawiono poziom apoptozy wyrażony jako znormalizowaną luminescencję (% RLU) względem kontroli (komórki nieindukowane), 0,5 μ M staurosporyny (STS; induktor apoptozy), 50 μ g/ml PM, 1, 3, 10 μ M kwercetyny + 50 μ g/ml PM. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, n = 3.

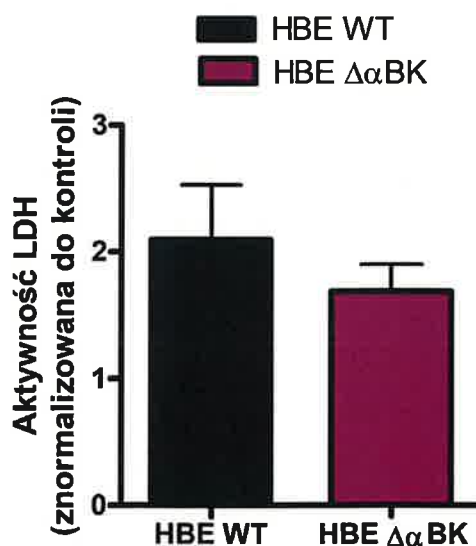
4.11.2 Przeżywalność mierzona za pomocą pomiaru wycieku LDH

Kolejną metodą pomiaru przeżywalności komórek HBE WT oraz HBE $\Delta\alpha$ BK był pomiar poziomu LDH zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.6.3. Im wyższy poziom wycieku LDH z komórki, tym wyższy poziom uszkodzenia komórek. Sprawdzono ten efekt dla pyłów miejskich, a także PM wraz z kwercetyną. Okazało się, że kwercetyna wykazuje właściwości ochronne przed zwiększonym uszkodzeniem błon komórkowych po podaniu PM – 10 μ M kwercetyna podana wraz z pyłami miejskimi skutkowała zmniejszeniem wycieku LDH w porównaniu do komórek inkubowanych z pyłami miejskimi (o 48,5%) (Rysunek 48)

w komórkach HBE WT. Efekt ochronny nie został wykazany w przypadku komórek z delecją - HBE $\Delta\alpha\text{BK}$, zmniejszenie wycieku LDH było w tym przypadku nieistotne statystycznie.



Rysunek 48. Ocena wpływu PM i kwercetyny na przeżywalność komórek HBE WT oraz HBE $\Delta\alpha\text{BK}$. Słupki czarne przedstawiają zmiany aktywności LDH w obecności 50 $\mu\text{g/ml}$ PM i kwercetyny (1, 3, 10 μM) dla linii HBE WT, słupki fioletowe ciemne odpowiadają danym otrzymanym dla linii HBE $\Delta\alpha\text{BK}$. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,01$ przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.



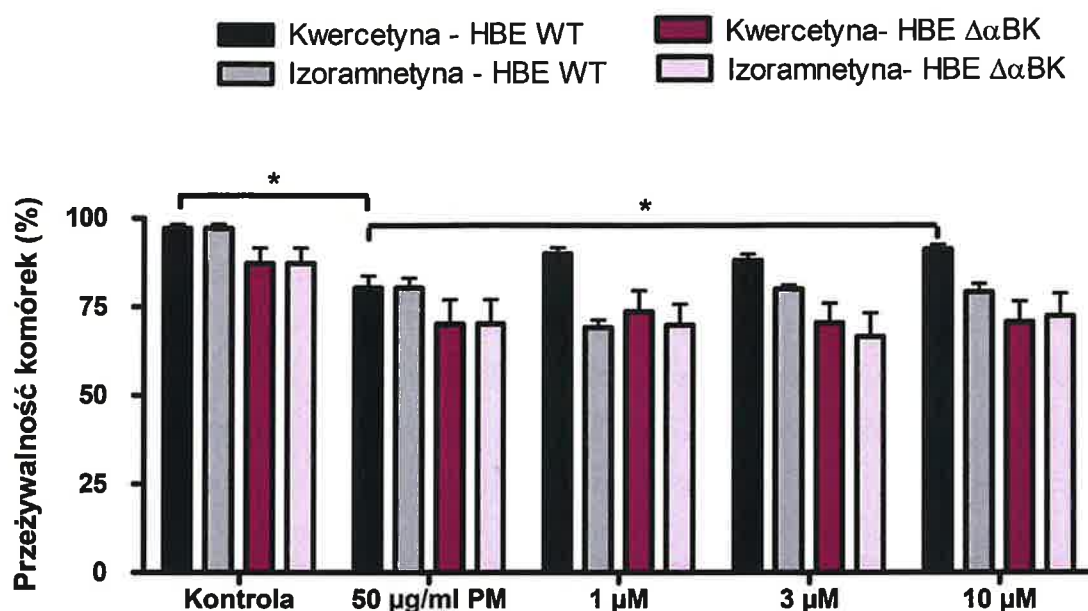
Rysunek 49. Porównanie przeżywalności komórek HBE WT oraz HBE $\Delta\alpha\text{BK}_{Ca}$ na podstawie niskiego wycieku LDH. Słupki czarne przedstawiają przeżywalność komórek mierzoną za pomocą pomiaru poziomu LDH w komórkach HBE WT, a fioletowe słupki wskazują przeżywalność komórek HBE

$\Delta\alpha$ BK. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną jako nieistotną przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.11.3 Przeżywalność mierzona za pomocą barwienia Trypan Blue

W celu sprawdzenia przeżywalności komórek HBE WT po ekspozycji na PM (50 μ g/ml), kwercetynę (1, 3, 10, 30 μ M) i izoramnetynę (1, 3, 10, 30 μ M), przeprowadzono barwienie błękitem trypanu. Komórki inkubowano z odpowiednimi związkami przez 24 godziny przed barwieniem. Jak pokazano na Rysunku 49, ekspozycja na PM w dawce 50 μ g/ml zmniejszała żywotność komórek HBE WT o 17%. Kwercetyna częściowo zniósła ten efekt, a przywrócenie żywotności komórek było najbardziej widoczne po inkubacji z 10 μ M kwercetyny – wzrost przeżywalności o 11% w porównaniu do PM. Analog kwercetyny, izoramnetyna, nie odwracała uszkodzeń spowodowanych przez 50 μ g/ml PM.

W celu weryfikacji roli aktywacji kanału BK_{Ca} w przeżywalności komórek linii HBE porównano przeżywalność komórek HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK mierzona za pomocą barwienia błękitem trypanu. Jak pokazano na Rysunku 50, komórki linii HBE $\Delta\alpha$ BK wykazują niższą bazową przeżywalność niż komórki typu dzikiego, jednak zmiana ta nie jest istotna statystycznie. Z kolei ekspozycja na PM w dawce 50 μ g/ml zmniejszała przeżywalność także komórek pozbawionych funkcjonalnego kanału BK_{Ca} o 19,6%, jednak co ciekawe kwercetyna częściowo zniósła ten efekt (zmiana nie była istotna statystycznie), ale nie w tak wysokim stopniu, jak było to widoczne w przypadku komórek HBE WT. Może to wskazywać, że poprawa przeżywalności komórek narażonych na działanie pyłów miejskich z wykorzystaniem kwercetyny jest częściowo zależna od aktywacji kanału BK_{Ca} , a częściowo od innych mechanizmów, przykładowo właściwości antyoksydacyjnych kwercetyny. Analog kwercetyny, izoramnetyna, nie odwracała uszkodzeń spowodowanych przez 50 μ g/ml PM w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK.

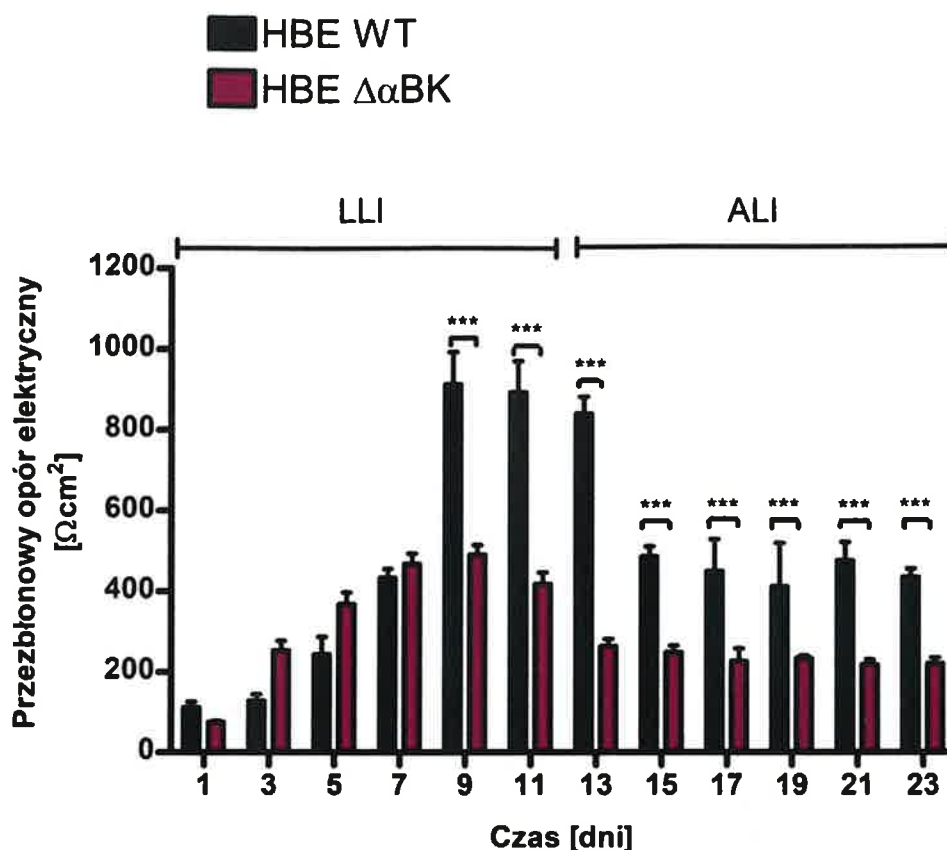


Rysunek 50. Ocena wpływu PM, kwercetyny i izoramnetyny na przeżywalność komórek HBE WT oraz HBE ΔαBK. Słupki czarne przedstawiają wpływ 50 μg/ml PM i kwercetyny (1, 3, 10 μM) w linii HBE WT, słupki fioletowe (ciemne) w linii HBE ΔαBK, z kolei słupki szare – izoramnetyny (1, 3, 10 μM) w komórkach HBE WT oraz jasne fioletowe słupki w komórkach HBE ΔαBK na przeżywalność komórek mierzoną za pomocą barwienia błękitem trypanu. Pomiar wykonany był po 24 godzinach inkubacji z badanymi związkami. Efekt porównany został z przeżywalnością kontrolną nietraktowanych komórek HBE oraz ΔαBK. Dane nie są normalizowane. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD (n = 3). Istotność statystyczną określono przy p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.12 Pomiar TEER w komórkach HBE WT i HBE ΔαBK

W kolejnej części doktoratu, pomiar elektrycznego oporu przez nabłonkowy został wykorzystany w celu sprawdzenia, jak brak funkcjonalnego kanału BK_{Ca} wpłynie na możliwość tworzenia połączeń między komórkami monowarstwy nabłonka oddechowego. Zbadano zależne od czasu zmiany TEER w komórkach HBE WT i komórkach HBE ΔαBK hodowanych na porowatym podłożu. Opis znajduje się w podrozdziale 3.9. Pomiary TEER prowadzono przez kilka dni, aby ocenić rozwój monowarstw nabłonka. Początkowo komórki hodowano w warunkach granicy faz ciecz-ciecz (LLI), aż osiągnęły stabilny i wysoki poziom TEER (około 9 dni). Następnie komórki prowadzono w hodowli na granicy faz powietrze-ciecz (ALI), aby indukować polaryzację monowarstw komórkowych. Jak pokazano na Rysunku 51, obie linie komórkowe były zdolne do tworzenia szczelnych monowarstw nabłonkowych. Jednakże komórki HBE ΔαBK wykazywały znacznie niższy opór elektryczny TEER w porównaniu z komórkami HBE WT. Wartości TEER monowarstwy złożonej z komórek

HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ były 1,9 razy niższe niż monowarstw komórek HBE WT po 9 dniach hodowli komórkowej.



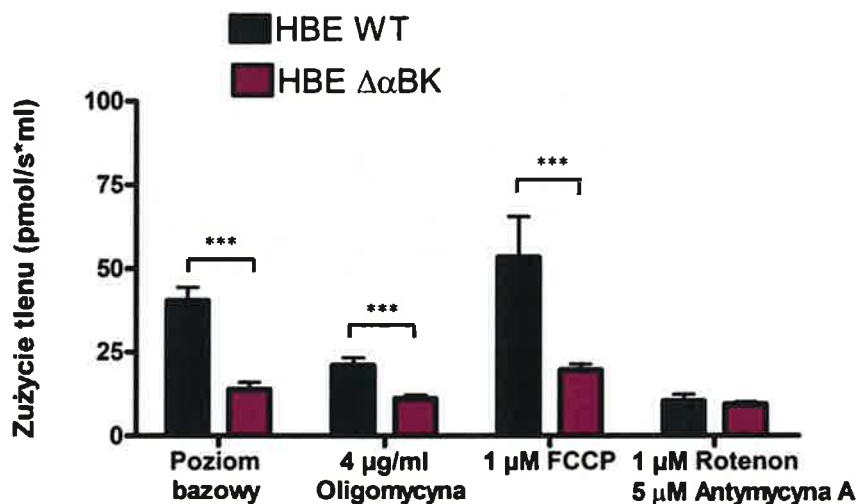
Rysunek 51. Analiza zmian elektrycznego oporu przebłonowego (TEER) w komórkach HBE WT i HBE $\Delta\alpha\text{BK}$. Początkowo, komórki hodowano na granicy faz ciecz-ciecz (LLI), a następnie na granicy faz powietrze-ciecz (ALI). Wartości oporu TEER monowarstw komórek mierzono co drugi dzień. Dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ SD (dla $n = 6$ w przypadku każdej linii komórkowej). Istotność statystyczną określono przy $p < 0,05$ (*) i $p < 0,001$ (***) z wykorzystaniem analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.13 Kontrola oddechowa- komórki HBE $\Delta\alpha\text{BK}$

Mimo, że aktywacja kanału przez kwercetynę nie przywróciła prawidłowego funkcjonowania mitochondriów po inkubacji 24-godzinnej z pyłami miejskimi, zdecydowano się podjąć próbę sprawdzenia obecności kanału BK_{Ca} na funkcję mitochondriów w komórkach HBE WT. Z tego względu wykonano pomiary z wykorzystaniem metody respirometrii wysokiej rozdzielczości. Opis metody znajduje się w podrozdziale 3.4.2. W badaniu zastosowano oligomycynę ($4 \mu\text{g/ml}$) jako inhibitor syntazy ATP, aby określić wyciek niefosforylujący. Aby zmierzyć maksymalną aktywność łańcucha transportu elektronów

(ETS), użyto 1 μ M cyjanku karbonylowego-p-trifluorometoksyfenylohydrazonu (FCCP). Pomiar zużycia tlenu resztkowego (ROX) przeprowadzono na końcu eksperymentu, wykorzystując rotenon (2,5 μ M) i antymycynę A (0,5 μ M).

Wyniki tego doświadczenia przedstawiono na Rysunku 52 w zestawieniu z wynikami otrzymanymi w przypadku linii typu dzikiego. Oddychanie podstawowe zmniejszyło się z $40,6 \pm 3,8$ do $13,9 \pm 2$ [pmol/s*ml] w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK w porównaniu z komórkami HBE WT. Ponadto oddychanie stymulowane rozpręgaczem FCCP w komórkach HBE WT wynosiło od $53,5 \pm 12$ do $19,7 \pm 1,6$ [pmol/s*ml], a w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK było niższe. Odkrycia te wskazują na upośledzoną funkcję mitochondriów w komórkach pozbawionych funkcjonalnego kanału mitoBK_{Ca}/BK_{Ca}. Warto zauważyć, że zmiany w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK są bardzo podobne, do tych obserwowanych w uszkodzeniach wywołanych przez inkubację z pyłami miejskimi.

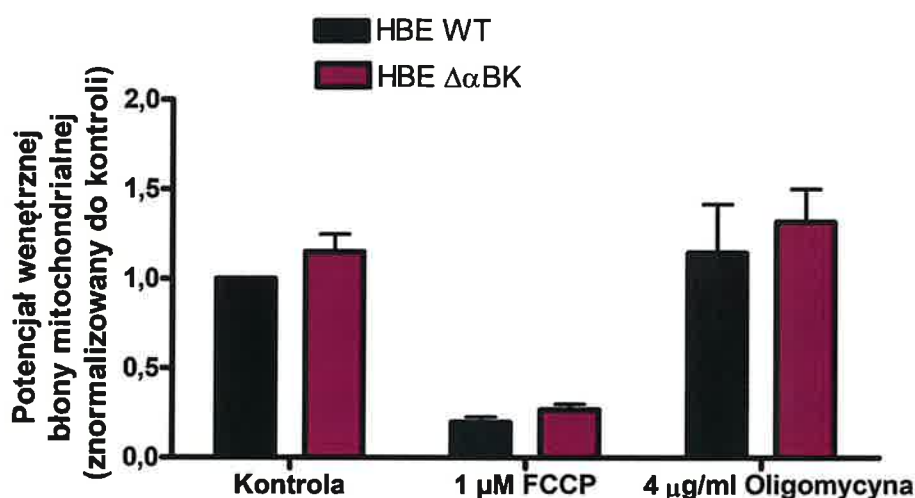


Rysunek 52. Analiza funkcji mitochondriów w komórkach HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK. Komórki HBE WT (czarne słupki) i komórki HBE $\Delta\alpha$ BK (fioletowe słupki) poddano działaniu 4 μ g/ml oligomycyny, 1 μ M FCCP, 1 μ M rotenonu z 5 μ M antymycyny A w celu pomiaru oddychania komorkowego. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM, n = 6. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,05$ (*) i $p < 0,001$ (***) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.14 Określenie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej z wykorzystaniem JC-1

Ze względu na bardzo niski poziom podstawowego oddychania w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK po podaniu digitoniny, nie udało się uzyskać wyników pomiaru potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej w linii z delecją z wykorzystaniem pomiaru sondą rodamina 123. Z tego względu postanowiono wykonać pomiar z wykorzystaniem sondy JC-1 jak opisano

w podrozdziale 3.5.2. Wyniki zobrazowano na wykresie w Rysunku 53. W porównaniu z komórkami HBE WT, linia HBE $\Delta\alpha$ BK wykazuje wyższy potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej, zarówno w przypadku poziomu bazowego, jak i przy podaniu rozpręgacza – FCCP oraz inhibitora pompy protonowej – oligomycyny. Obserwowane zmiany są jednak niewielkie i w analizie statystycznej nie wykazano ich istotności (zarówno w kontroli jak i w przypadku FCCP i oligomycyny).



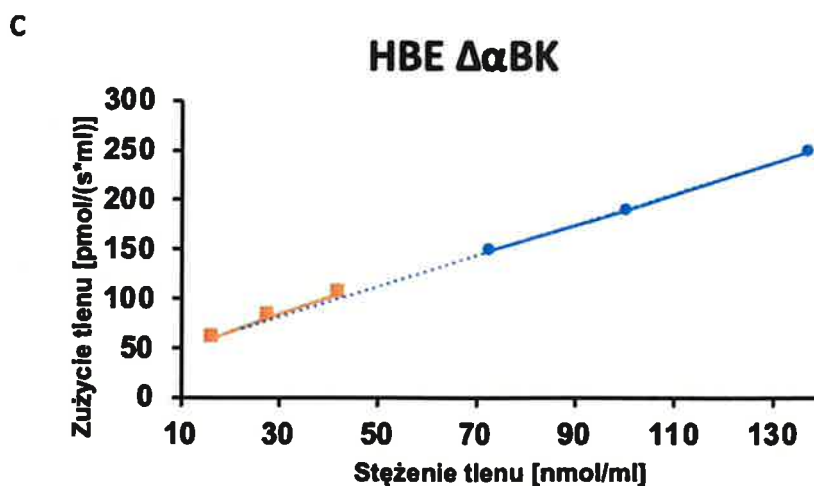
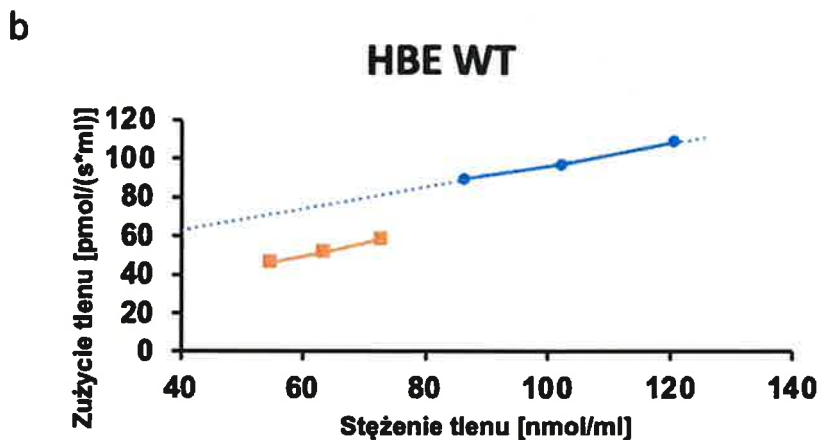
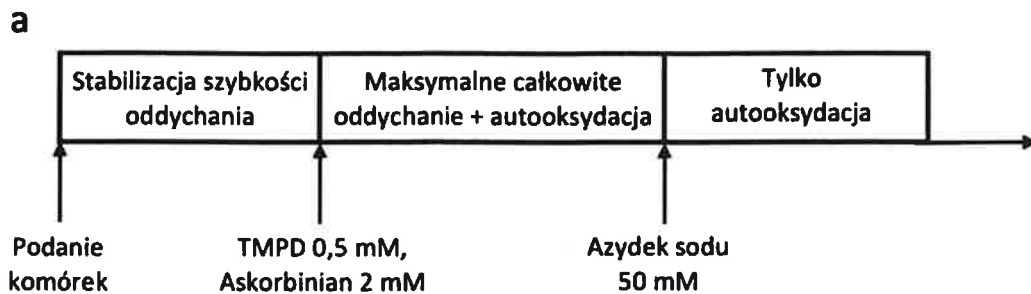
Rysunek 53. Ocena potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej w komórkach HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK. Na wykresie czarne słupki przedstawiają potencjał błony mitochondrialnej w komórkach HBE WT, a słupki fioletowe w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.15 Aktywność kompleksu IV łańcucha oddechowego

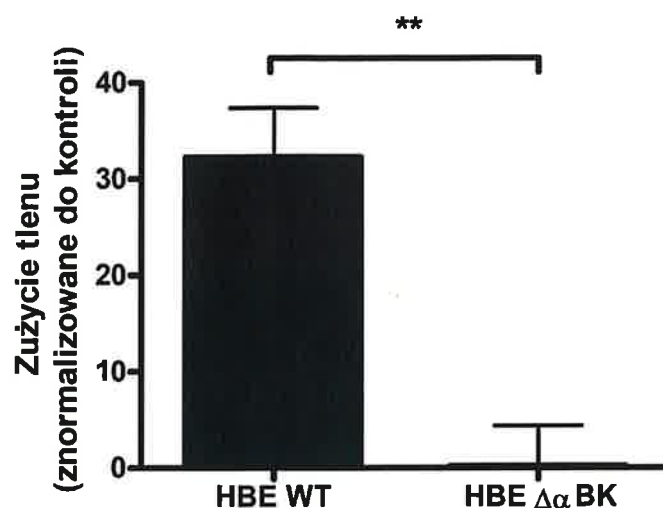
Z uwagi na różnice w poziomie oddychania komórkowego oraz kontroli oddechowej, które nie korespondowały ze zmianami potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej postanowiono sprawdzić, czy zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów w komórkach HBE WT i linii z delecją kanału BK - HBE $\Delta\alpha$ BK wynikają ze zmian w aktywności kompleksu IV łańcucha oddechowego. W tym celu wykonano pomiary z wykorzystaniem systemu Oxygraph-2k. W eksperymencie do komory reakcyjnej wprowadzono 2 mM askorbinianu w połączeniu z 0,5 mM TMPD (N,N,N',N'-Tetrametyloparafenyldiamina dichlorowodorek). Celem tego działania było bezpośrednie dostarczenie elektronów do czwartego kompleksu łańcucha oddechowego. Proces autooksydacji askorbinianu prowadzi do zużycia tlenu, które jest bezpośrednio związane ze stężeniem tlenu obecnym w komorze. Aby móc rozróżnić procesy autooksydacji od procesów oddychania zależnych od aktywności czwartego kompleksu,

zastosowano 50 mM azydku sodu, który blokuje działanie tego kompleksu. Schemat podawania związków został opisany w podrozdziale 3.4.4 oraz przedstawiony schematycznie na Rysunku 54a.

W wyniku przeprowadzonych pomiarów okazało się, że aktywność kompleksu IV łańcucha oddechowego w komórkach linii HBE $\Delta\alpha$ BK jest znacząco niższa, niż w komórkach HBE WT, co może wskazywać na interakcję między funkcjonowaniem tego kompleksu, a mitochondrialnym kanałem mitoBK_{Ca} (Rysunek 54b i c, 55).



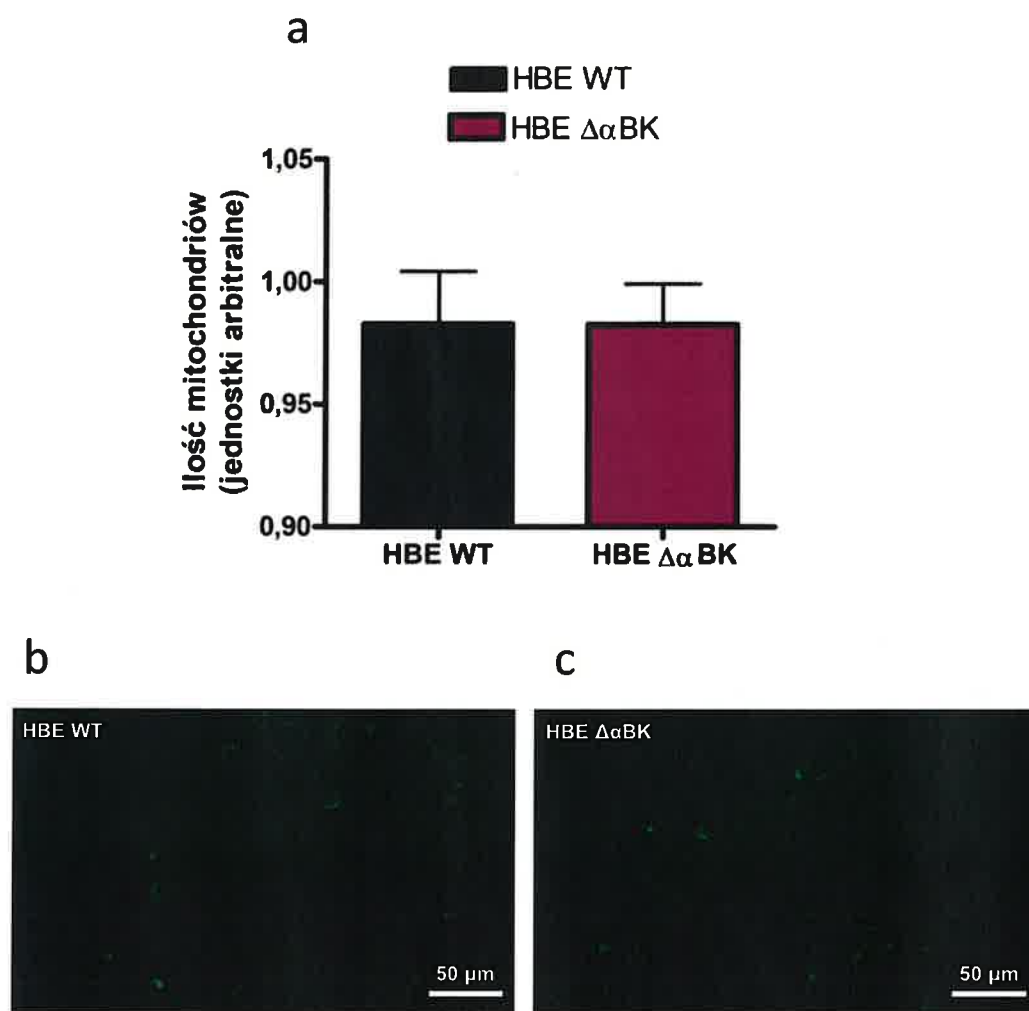
Rysunek 54. Aktywność kompleksu IV w komórkach HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK. Schemat doświadczenia przedstawiony jest w panelu (a). Wykresy pokazują reprezentatywne wyniki aktywności kompleksu IV w komórkach HBE WT (b) oraz HBE $\Delta\alpha$ BK (c). Dodanie 2 mM askorbinianu i 0,5 mM TMPD skutkuje osiągnięciem poziomu maksymalnego szybkości oddychania wraz z autooksydacją (niebieskie linie). Dodatek 50 mM azydku sodu powoduje zużycie tlenu jedynie w procesie autooksydacji (linie pomarańczowe). Odległość między pomarańczowymi liniami a niebieskimi liniami reprezentuje aktywność kompleksu IV.



Rysunek 55. Ocena aktywności kompleksu IV w komórkach HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK mierzona metodą respirometrii. Słupki przedstawiają średnią aktywność kompleksu IV komórek HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK określoną na podstawie obliczenia różnicy między poziomem maksymalnej szybkości oddychania wraz z autooksydacją a poziomem zużycia tlenu jedynie w procesie autooksydacji. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, $n = 3-5$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,01$ (**) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

4.16 Ocena liczby mitochondriów

Różnice w poziomie oddychania komórkowego, kontroli oddechowej, a także efekt aktywatora kanału BK_{Ca} – kwercetyny na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej mierzonym z pomocą rodaminy 123 skłoniły do poszukiwania powodu tych różnic, w szczególności widocznych w porównaniu komórek HBE WT oraz HBE $\Delta\alpha$ BK. Pierwszą postawioną hipotezą było to, że różnice między dwoma liniami dotyczące poziomu oddychania komórkowego oraz kontroli oddechowej są spowodowane różną liczbą mitochondriów. W celu weryfikacji, wykonano pomiary z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye jak opisano w podrozdziale 3.8. Wyniki przeprowadzonych pomiarów wskazują jednak, że ilość mitochondriów w komórkach HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK nie różni się jak wskazują dane na wykresie (Rysunek 56). Zostało to również dodatkowo potwierdzone z wykorzystaniem obrazowania mikroskopowego przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica SP5.



Rysunek 56. Analiza liczby mitochondriów w komórkach HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK. Liczba mitochondriów w komórkach HBE WT jest zobrazowana na wykresie w postaci czarnych słupków, a w HBE $\Delta\alpha$ BK w postaci słupków fioletowych (a). Dane zostały wyrażane jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono jako nieistotny statystycznie przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA. Zdjęcia zostały przygotowane z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego (Leica SP5). Po lewej stronie przedstawiono barwienie z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye dla komórek HBE WT (b), po prawej HBE $\Delta\alpha$ BK (c).

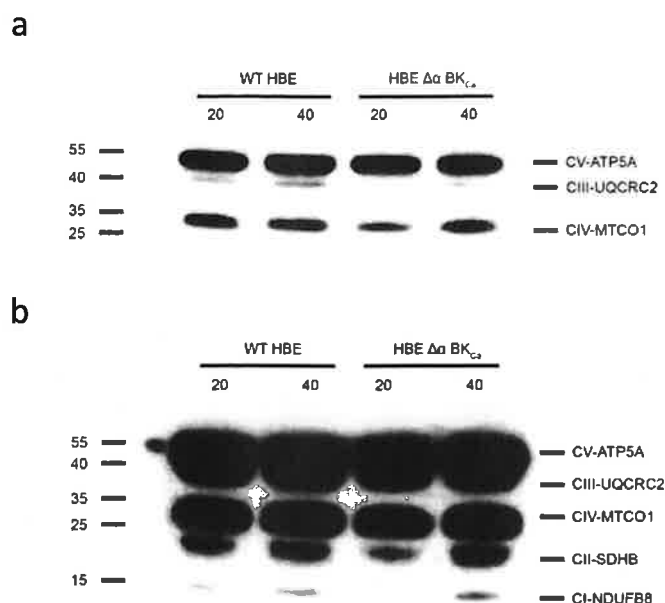
4.17 Analiza poziomu białek kompleksów łańcucha oddechowego

Ze względu na brak obserwowanych różnic w pomiarze liczby mitochondriów pomiędzy HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK postawiono hipotezę, że to nie liczba mitochondriów, a poziom białek odpowiedzialnych za tworzenie kompleksów łańcucha oddechowego może różnić się między poszczególnymi badanymi liniami i potencjalnie być odpowiedzialny za różnice w poziomie oddychania tlenowego oraz w potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej. W celu weryfikacji tej hipotezy wykonano identyfikację białek tworzących

kompleksy łańcucha oddechowego w komórkach HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK a także porównano poziom reprezentacyjnych białek łańcucha oddechowego na podstawie otrzymanych wyników za pomocą analizy densytometrycznej.

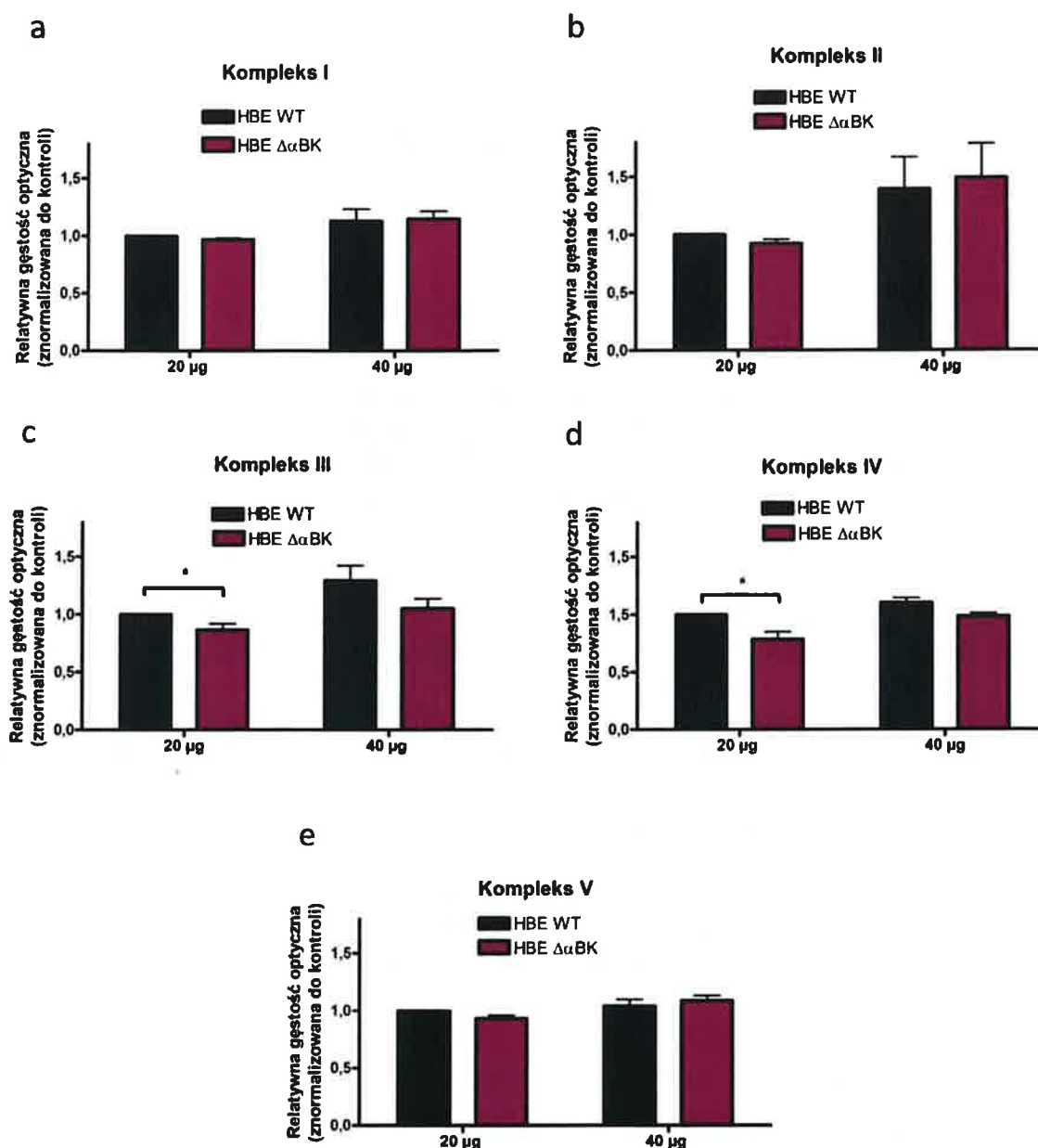
W doświadczeniach wykorzystano do identyfikacji kompleksów łańcucha oddechowego przeciwciała takie jak: CI-NDFB8 - NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial - białko kodowane przez gen *NDFB8* tworzące kompleks I łańcucha oddechowego, CII-SDHB - succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial - białko kodowane przez gen *SDHB* tworzące kompleks II łańcucha oddechowego, CIII-UQCRC2 - cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial - białko kodowane przez gen *UQCRC2* tworzące kompleks III łańcucha oddechowego, CIV-MTCO1 - Cytochrome c oxidase subunit 1 - białko kodowane przez gen *ATP5A* tworzące kompleks IV łańcucha oddechowego, CV-ATP5A - ATP synthase lipid-binding protein – białko kodowane przez gen *ATP5A* tworzące kompleks V łańcucha oddechowego.

Wykorzystując metodę Western blot wykonano doświadczenia na podstawie których oceniono poziom białek łańcucha oddechowego. Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.10. Przygotowano frakcje białkowe komórek HBE WT i HBE $\Delta\alpha$ BK, rozdzielono je na żelu poliakrylamidowym. Następnie znakowano za pomocą przeciwciał reprezentatywne białka umożliwiające identyfikację i ocenę poziomu wszystkich pięciu kompleksów łańcucha oddechowego. Jak widać na przykładowych zdjęciach, przy czasie ekspozycji 15 sekund udało się wyeksponować białka kompleksów III, IV, V (Rysunek 57a), a przy dłuższych czasach ekspozycji (30 minut) wyeksponowane zostały wszystkie kompleksy łańcucha oddechowego (Rysunek 57b).



Rysunek 57. Analiza poziomu białek tworzących kompleksy łańcucha oddechowego: CI-NDFB8 - NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial - białko kodowane przez gen *NDFB8* tworzące kompleks I łańcucha oddechowego, CII-SDHB - Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial - białko kodowane przez gen *SDHB* tworzące kompleks II łańcucha oddechowego, CIII-UQCRC2 - Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial - białko kodowane przez gen *UQCRC2* tworzące kompleks III łańcucha oddechowego, CIV-MTCO1 - Cytochrome c oxidase subunit 1 - białko kodowane przez gen *ATP5A* tworzące kompleks IV łańcucha oddechowego, CV-ATP5A - ATP synthase lipid-binding protein – białko kodowane przez gen *ATP5A* tworzące kompleks V łańcucha oddechowego. Przykładowe zdjęcia klisz z wyznakowanymi białkami tworzącymi kompleksy łańcucha oddechowego przy czasie ekspozycji 30 sekund (a) oraz 15 minut (b). Do oceny poziomu białek tworzących kompleksy łańcucha oddechowego wykorzystano metodę Western blot.

Wyniki analizy densytometrycznej – relatywnej optycznej gęstości wykazały, że komórki typu dzikiego – HBE WT zawierają więcej białek kompleksów III oraz IV niż komórki linii HBE ΔαBK, co mogłoby wyjaśniać różnice między aktywnością kompleksu IV między tymi liniami. Ilość białek innych kompleksów (I, II, V) nie różniła się (Rysunek 58).



Rysunek 58. Relatywna gęstość optyczna z analizy poziomu białek tworzących kompleksy łańcucha oddechowego. Wyniki zostały uzyskane dla frakcji homogenatu komórkowego (H: 20 μg i 40 μg), (a-e) Pomiary densytometryczne poziomów białek tworzących kompleksy łańcucha oddechowego odpowiednio dla CI-NDFB8 - NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial - białko kodowane przez gen *NDFB8* tworzące kompleks I łańcucha oddechowego, CII-SDHB - Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial - białko kodowane przez gen *SDHB* tworzące kompleks II łańcucha oddechowego, CIII-UQCRC2 - Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial - białko kodowane przez gen *UQCRC2* tworzące kompleks III łańcucha oddechowego, CIV-MTCO1 - Cytochrome c oxidase subunit 1 - białko kodowane przez gen *ATP5A* tworzące kompleks IV łańcucha oddechowego, CV-ATP5A - ATP synthase lipid-binding protein – białko kodowane przez gen *ATP5A* tworzące kompleks V łańcucha oddechowego. Wyniki

przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, $n = 3$. Istotność statystyczną określono przy $p < 0,05$ (*) przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA.

Uzyskane wyniki w ramach rozprawy doktorskiej są inspiracją do kolejnych badań. Z uwagi na to, że praca jest częścią realizowanego projektu OPUS 18 w konsorcjum z Instytutem Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, to wciąż trwają prace nad wyjaśnieniem pojawiających się pytań, na które odpowiedzi będą zawarte w kolejnej rozprawie doktorskiej.

5. Dyskusja

Skutki zdrowotne zanieczyszczenia powietrza stanowią kluczowy problem na całym świecie, szczególnie w krajach szybko rozwijających się (Goobie et al. 2022). Pyły miejskie (PM), będące głównym składnikiem zanieczyszczeń powietrza, są istotnym czynnikiem powodującym przedwczesną śmiertelność czy choroby sercowo-płucne (Thangavel et al. 2022; K. Liu et al. 2022; Quezada-Maldonado et al. 2021). Nabłonek dróg oddechowych jako główne miejsce osadzania się pyłów zawieszonych, odgrywa kluczową rolę w efektach wywoływanych przez PM. Głównym mechanizmem, za pomocą którego PM wywiera swoje działanie, jest generowanie reaktywnych form tlenu (RTF), które indukują odpowiedzi antyoksydacyjne i zapalne w narażonych komórkach nabłonka. Badano również udział kanałów jonowych błony komórkowej na uszkodzenia wywołane przez PM. Na przykład wykazano, że kanały jonowe TRPV1 odgrywają istotną rolę w przypadku ekspozycji na PM w modelu astmy u myszy (Song et al. 2017). Ostatnie badania sugerują, że dysfunkcja mitochondriów może być zaangażowana w cytotoksyczność wywołaną przez PM. W związku z tym indukcja mechanizmów prowadzących do zachowania funkcji mitochondriów może być obiecującą strategią cytoprotekcyjną przeciwko uszkodzeniom komórek i tkanek wywołanym przez różne czynniki szkodliwe, w tym pyły miejskie.

Potas jest bardzo ważnym jonem w organizmie, kluczowym zarówno dla utrzymania prawidłowych funkcji komórek czy utrzymania homeostazy jonowej (Palmer 2015). Przepływ jonów potasu ma ogromne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania serca oraz odgrywa kluczową rolę w skurczu mięśni szkieletowych i gładkich (Jinarat et al. 2025). Co ciekawe, coraz więcej dowodów wskazuje na to, że kanały potasowe biorą udział w regulacji migracji i proliferacji komórek, które są kluczowymi procesami np. w przypadku naprawy nabłonka (Girault i Brochiero 2014). W ostatnim czasie liczne badania skupiają się na wewnątrzkomórkowym transporcie jonów potasu, ze szczególnym uwzględnieniem mitochondrialnych szlaków transportu K^+ (Szabo i Zoratti 2014). Zaobserwowano, że zmiany w przepuszczalności K^+ w wewnętrznej błonie mitochondrialnej są istotne dla indukcji mechanizmów ochronnych zmniejszających uszkodzenia tkanek spowodowane niedokrwieniem/reperfuzją lub stresem oksydacyjnym (Facundo et al. 2006; Perrelli et al. 2013; Kampa et al. 2021). Liczne obserwacje sugerują, że kluczową rolę w tych zjawiskach cytoprotekcji odgrywają mitochondrialne kanały potasowe (mitoK) (Facundo et al. 2006; Goswami et al. 2018). Aktywacja mitochondrialnego kanału potasowego wrażliwego na ATP

(mitoK_{ATP}) oraz mitochondrialnego kanału potasowego o dużej przewodności regulowanego przez Ca²⁺ (mitoBK_{Ca}) jest kluczowym krokiem w indukcji mechanizmów kardioprotekcji (Hao et al. 2016; Laskowski et al. 2016; Xu et al. 2002). Oba te kanały uczestniczą również w cytoprotekcji tkanki mózgowej przed uszkodzeniami wywołanymi udarem (Douglas et al. 2006; Laskowski et al. 2016). Wykazano, że kanały mitoK wpływają na zmiany objętości macierzy mitochondrialnej, oddychanie mitochondrialne i potencjał błonowy ($\Delta\Psi$). Wszystkie te zdarzenia prowadzą do udziału kanałów mitoK w modulacji syntezy mitochondrialnych reaktywnych form tlenu (RFT) (Kulawiak et al. 2008; Laskowski et al. 2016). Udowodniono, że aktywacja obu kanałów zachowuje funkcje mitochondriów, co prowadzi do zwiększonego przeżycia komórek. W związku z tym farmakologiczna modulacja mitochondrialnych kanałów potasowych stała się obiecującym nowym podejściem do leczenia chorób sercowo-naczyniowych, neurodegeneracyjnych lub płucnych. Niemniej jednak charakterystyka biofizyczna i farmakologiczna mitochondrialnych kanałów potasowych w wielu tkankach jest nadal niekompletna. Ponieważ tkanka nabłonkowa jest głównym miejscem osadzania się cząstek stałych (np. pyłów miejskich), kanały mitoK w komórkach nabłonkowych mogą być potencjalnymi kandydatami pełniącymi ważne funkcje w inicjacji mechanizmu cytoprotekcji przed uszkodzeniami wywołanymi przez pyły zawieszone. Niestety, jak dotąd, nasza wiedza na temat kanałów mitoK w tej tkance jest bardzo ograniczona, ponieważ ten temat nie był szczegółowo badany. Otrzymane dane sugerują, że komórki nabłonkowe zawierają funkcjonalne kanały mitoK (Sek et al. 2021). Jednak rola kanałów mitochondrialnych w cytoprotekcji nabłonka nie jest znana, szczególnie w kontekście uszkodzeń spowodowanych przez miejskie pyły miejskie lub stres oksydacyjny.

Aby zweryfikować rolę mitochondrialnych kanałów potasowych w fizjologii oraz cytoprotekcji komórek nabłonkowych, zaplanowane zostały doświadczenia z wykorzystaniem różnych modeli komórkowych. Obejmują one ludzkie komórki nabłonkowe HBE WT oraz nowo wygenerowane linie komórkowe, takie jak komórki HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ z delecją kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego wapniem (BK_{Ca}).

Okazuje się, że niektóre związki pochodzenia naturalnego mogą regulować aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych. Polifenole oraz należące do nich flawanoidy są przedmiotem wielu badań, ponieważ wykazują działanie ochronne przed uszkodzeniem komórek. Jednym z najlepiej zbadanych flawonoidów jest kwercetyna, która wykazuje wiele efektów ochronnych, np. przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym (Javadinia et al. 2022), chorobami neurodegeneracyjnymi (L. G. Costa et al. 2016; Khan et al. 2019) czy

nowotworami (Tang et al. 2020). Ponadto kwercetyna wykazuje działanie cytoprotekcyjne wobec komórek w tkance kostnej (Wong et al. 2020), a także hepatocytów (García-Mediavilla et al. 2007).

Ostatnie badania wskazują, że kwercetyna może chronić przed środowiskowymi czynnikami uszkadzającymi komórki. Ten flawonoid wykazuje działanie ochronne wobec błon biologicznych erytrocytów narażonych na składniki dymu tytoniowego (Begum i Terao 2002). Podobnie w modelu wykorzystanym w tej pracy – komórkach nabłonka oskrzelowego HBE WT – narażenie na PM zaburzyło integralność nabłonka, a obecność kwercetyny wspomagała odbudowę przelnabłonkowego oporu elektrycznego. Podobne efekty zaobserwowano w doświadczeniach przeprowadzonych na komórkach śródbłonka (Wang et al. 2017). Dalej, badania prowadzone w trakcie mojej pracy doktorskiej wykazały, że efekt ten może być związany z aktywacją mitochondrialnego kanału potasowego mitoBK_{Ca}. W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że kanał ten może być aktywowany przez kwercetynę, ale nie przez jej analog izoramnetynę. Dlatego, izoramnetyna wykorzystywana była jako analog kwercetyny w dalszych etapach doświadczeń ale jako ten związek, który nie zmienia aktywności kanału mitoBK_{Ca}. Możliwy związek między kwercetyną, PM i mitoBK_{Ca} został dalej zbadany. Aby potwierdzić otrzymane wyniki, użyto również klasycznie stosowanego, syntetycznego aktywatora kanału BK_{Ca} - NS11021.

Aktywacja kanału mitoBK_{Ca} wykazuje działanie cytoprotekcyjne, na przykład jest zaangażowana w ochronę przed uszkodzeniem serca (Xu et al. 2002). W trakcie badań przedstawionych w pracy po raz pierwszy wykazano, że kanał mitoBK_{Ca} jest obecny w wewnętrznej błonie mitochondrialnej linii komórek nabłonka oskrzeli ludzkich (HBE WT) (Sek et al. 2021). W moich badaniach, wykazałam również, że aktywność kanału jest modulowana przez kwercetynę (Dabrowska et al. 2023), co jest to w linii z innymi wynikami badań, według których aktywacja kanału mitoBK_{Ca} przez flawonoidy została opisana na przykład w mitochondriach komórek śródbłonka (Kampa et al. 2021). W wynikach otrzymanych w trakcie pracy zaobserwowano również, że izoramnetyna nie aktywowała mitochondrialnego kanału mitoBK_{Ca} (Dabrowska et al. 2023). Wskazana zdolność kwercetyny do zwiększania prawdopodobieństwa otwarcia kanału skłoniła do zbadania funkcji mitochondriów w innych doświadczeniach z wykorzystaniem modelu komórek HBE WT.

Podstawową funkcją mitochondriów jest synteza ATP przy jednoczesnym zużyciu tlenu. W związku z tym zbadano wpływ kwercetyny na zużycie tlenu przez komórki HBE WT. Jak dotąd wyniki uzyskane z innych laboratoriów są niejednoznaczne. Opisano, że kwercetyna

zwiększa oddychanie w stanie 3, ale nie ma wpływu na oddychanie w stanie 4 izolowanych mitochondriów z wątroby szczura (Dorta et al. 2005). W tej pracy wykorzystano model całych komórek i zaobserwowano wzrost zużycia tlenu przez komórki HBE WT po podaniu kwercetyny, jak również syntetycznego aktywatora kanału BK_{Ca} – NS11021. Zakładamy, że wzrost szybkości zużycia tlenu jest związany z aktywacją kanału mitoBK_{Ca}, ponieważ w obecności penitremu A (inhibitora kanału) podawanie kwercetyny nie zmieniało poziomu tlenu. Mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska można wyjaśnić w ten sposób: zwiększony napływ potasu do macierzy mitochondrialnej po aktywacji kanału, skutkuje częściowym rozproszeniem potencjału mitochondrialnego i zwiększoną aktywnością łańcucha transportu elektronów. Dodatkowo, potwierdzono efekt kwercetyny, mierząc potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej za pomocą sondy fluorescencyjnej rodaminy 123 (która nie wchodziła w interakcje ze związkami stosowanymi w eksperymentach) i wykazując, że kwercetyna zmniejszała potencjał błony mitochondrialnej w sposób zależny od dawki. Poprzednie badania z użyciem sondy fluorescencyjnej (JC-1) wskazały na niewielki spadek potencjału błony mitochondrialnej po podaniu 8 μ M kwercetyny (Jin et al. 2016). Z kolei analog kwercetyny, izoramnetyna, która była wykorzystana jako próba kontrolna w doświadczeniach, nie zmieniła szybkości zużycia tlenu ani potencjału błony mitochondrialnej. Jednak inne wyniki otrzymano w doświadczeniach prowadzonych na płytkach krwi, które wskazują, że izoramnetyna zmniejsza potencjał błony mitochondrialnej (Rodríguez et al. 2021). Te rozbieżności mogą wynikać z różnych metod i modeli komórkowych zastosowanych w badaniach. Badanie płytek krwi obejmowało metodę z wykorzystaniem sondy TMRE i mierzonej fluorescencji w zawiesinie całych komórek. Natomiast w ramach tej pracy środowisko eksperymentu było ściśle kontrolowane (stosując inhibitory kompleksu I i syntazy ATP oraz bursztynian jako substratu), eliminując w ten sposób aktywność białek, które mogłyby wpłynąć na wyniki. Inne dane wskazywały na możliwą rolę kwercetyny w odwróceniu wywołanego przez PM spadku potencjału błony mitochondrialnej (Jin et al. 2016), co skłoniło do zbadania mechanizmów, które mogą być zaangażowane w efekt ochronny i skorelowane z aktywnością mitochondriów. W tym celu zbadano poziom reaktywnych form tlenu pochodzenia komórkowego i mitochondrialnego.

Uszkodzenia komórek wywołane przez PM są silnie związane ze zmianą poziomu reaktywnych form tlenu, która prowadzi do odpowiedzi zapalnej i rozwoju i/lub zaostrzenia chorób takich jak astma, nowotwory, infekcje płuc i choroby sercowo-naczyniowe (Thangavel et al. 2022; K. Liu et al. 2022; Quezada-Maldonado et al. 2021). Ostatnie badania wykazały, że

kwercetyna zmniejsza indukowaną przez PM syntezę RFT, która była mierzona jako całkowity poziom reaktywnych form tlenu wytwarzany w komórce (Jin et al. 2016). Ponadto w trakcie pracy wykazano, że zarówno kwercetyna, jak i izoramnetyna powodowały spadek poziomów RFT, zarówno na poziomie podstawowym, jak i wywołanym przez PM na poziomie komórkowym. Biorąc pod uwagę fakt, że kwercetyna aktywowała mitochondrialny kanał mitoBK_{Ca}, kluczowe jest zbadanie wpływu kwercetyny na RFT pochodzące z mitochondriów. Wcześniej donoszono, że kwercetyna ma działanie antyoksydacyjne na lipidy błonowe, które uległy peroksydacji w izolowanych mitochondriach (Dorta et al. 2008). Wyniki otrzymane w trakcie tej pracy pokazują, że kwercetyna w wyższych stężeniach może zwiększyć podstawowy poziom RFT w mitochondriach w komórkach HBE WT. Obserwowany efekt może być związany ze szkodliwymi działaniami kwercetyny i jej metabolitów w wysokich stężeniach (Metodiewa et al. 1999). Niektóre badania wskazują, że kwercetyna może wchodzić w interakcje z mPTP (ang. mitochondrial permeability transition pore) i działać zarówno jako inhibitor mPTP (przy niskich stężeniach, ~5 μ M) oraz jak aktywator mPTP (przy wysokich stężeniach > 40 μ M) (De Marchi et al. 2009). Obserwowane zjawisko może wyjaśniać wzrost poziomu RFT w mitochondriach po podaniu wysokich stężeń kwercetyny do komórek kontrolnych nietraktowanych PM. Z kolei w komórkach poddanych inkubacji z PM kwercetyna miała większy udział w zmniejszaniu RFT niż izoramnetyna. Jednakże efekt ten nie został odwrócony przez penitrem A, co sugeruje inne mechanizmy działania izoramnetyny w zakresie antyoksydacji, które nie są związane z aktywacją kanału mitoBK_{Ca}.

Obserwowana aktywność antyoksydacyjna kwercetyny w komórkach traktowanych pyłami miejskimi i jej zdolność do aktywowania mitoBK_{Ca} mogą wyjaśniać obserwacje, że kwercetyna przywraca żywotność komórek HBE inkubowanych z PM. Co ciekawe, PM silnie zmniejszyło kontrolę oddechową mitochondriów mierzoną przez szybkością zużycia tlenu. Zgodnie z badaniami innych grup, kwercetyna, zwiększa oddychanie mitochondrialne (Fukaya et al. 2021), a efekt ten nie był widoczny w przypadku izoramnetyny. W badaniach prowadzonych w ramach tej pracy ani kwercetyna, ani izoramnetyna nie przywróciły funkcji mitochondriów po podaniu PM.

Musimy również spojrzeć na pewne ograniczenia przeprowadzonych badań. Na przykład, nabłonek oskrzeli składa się z różnych typów komórek, z których każda pełni inne funkcje. W doktoracie, do doświadczeń wybrano powszechnie stosowany w badaniach różnych procesów fizjologicznych i chorobowych nabłonek model komórek 16HBE14o (HBE WT), ponieważ zachowuje on wiele funkcji i morfologię zróżnicowanego prawidłowego nabłonka

oskrzeli. Należy jednak zauważyć, że unieśmiertelnione linie komórkowe mogą mieć inne cechy niż komórki pierwotne, a efekty kwerceiny na różne typy komórek obecnych w nabłonku dróg oddechowych, w tym komórki macierzyste/progenitorowe (Zhao et al. 2022) pozostają przedmiotem ciągłych badań.

W dalszych etapach prowadzonych badań, sprawdzono jaką rolę kanał potasowy BK_{Ca} pełni w fizjologii komórek nabłonka oskrzelowego. W tym celu wykorzystano linię komórkową z uszkodzonym genem *KCNMA1*, w której białko kanału BK_{Ca} było nieobecne zarówno w błonie plazmatycznej, jak i wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Maliszewska-Olejniczak et al. 2024). Potwierdzeniem tego faktu były przeprowadzone doświadczenia patch-clamp na błonie plazmatycznej jak i wewnętrznej błonie mitochondrialnej nowo wygenerowanego modelu komórek nabłonka HBE ΔαBK.

Nieobecność kanału BK_{Ca} w komórkach linii HBE ΔαBK spowodowała zmianę funkcji mitochondriów widoczne w zaburzonej kontroli oddechowej. Nastąpiło zmniejszenie maksymalnego tempa zużycia tlenu, co sugeruje zaburzenia metabolizmu mitochondriów. Z opublikowanych danych wiemy, że mitochondrialne kanały potasowe biorą udział w regulacji mitochondrialnego poziomu potasu, który jest zaangażowany w regulację funkcji mitochondriów (A. D. T. Costa i Garlid 2009; Kulawiak et al. 2021; Szabo i Szewczyk 2023). Dlatego, wyniki otrzymane w pracy wskazują na relację między obecnością kanału a aktywnością łańcucha oddechowego w komórkach nabłonka. Czyli, nieobecność kanału prowadzi do dysfunkcji łańcucha oddechowego a aktywacja kanału powoduje depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej, wywołując reakcję łańcucha oddechowego do odbudowy potencjału błonowego. To bezpośrednio skutkuje zwiększonym zużyciem tlenu. W mitochondriach, w przypadku braku kanału, czyli białka wykazującego aktywność rozprężającą, konieczność odbudowy potencjału wewnętrznej błony może być zmniejszona. Może to wskazywać na niższy poziom białek łańcucha oddechowego i/lub zmniejszoną aktywność enzymów cyklu Krebsa lub innych czynników zaangażowanych w metabolizm mitochondriów. Podobną dysfunkcję mitochondriów zaobserwowano w komórkach mięśnia sercowego we włóknach z niższym poziomem białka mitoBK_{Ca} i w komórkach mięśni szkieletowych pozbawionych mitoK_{ATP} (Soltysinska et al. 2014; Di Marco et al. 2024). Funkcjonalne połączenie między kanałem mitoBK_{Ca} a łańcuchem oddechowym wykazano w mitochondriach glejaka wielopostaciowego (Bednarczyk, Wieckowski, et al. 2013; H. Singh et al. 2016; Kulawiak et al. 2023). W tkance mózgowej z kolei aktywacja mitoBK_{Ca} reguluje syntezę mitochondrialnych reaktywnych form tlenu przez łańcuch oddechowy (Kulawiak et al.

2023; Brand 2016), a utrata kanału zmienia stan redoks mitochondriów w komórkach glejaka (Kulawiak et al. 2023). Obecność mitoBK_{Ca} wiąże się również ze zmianami metabolizmu mitochondrialnego w komórkach raka piersi (Bischof et al. 2024). Z uwagi na bardzo ciekawy i wciąż nie jednoznaczny sposób interakcji białka kanału z białkami łańcucha oddechowego potrzebne są dalsze badania, aby w pełni zrozumieć to powiązanie.

Uszkodzenie genu *KCNMA1*, kanału BK_{Ca} przełożyła się również na dysfunkcję monowarstwy komórek nabłonka oskrzeli. Zaobserwowano spadek zdolności komórek HBE ΔαBK do tworzenia ścisłej warstwy komórek mierzonej na podstawie pomiaru przelnabłonkowego oporu elektrycznego. Pomiar TEER, opierający się na oporze transkomórkowym (błona wierzchołkowa i boczno-podstawna) i parakomórkowym (komórka-podłoże i kontakt komórka-komórka), pozwala na oszacowanie jakości i kondycji nabłonka (Zajac i Dolowy 2017; Chen et al. 2015). Zarówno linia komórkowa HBET WT, jak i HBE ΔαBK wykazywały zdolność do tworzenia szczelnych monowarstw nabłonka. Jednakże istniała znacząca różnica w wartościach TEER między tymi dwiema liniami komórkowymi. Komórki ΔαBK wykazywały około 50% niższy poziom oporu przelnabłonkowego niż komórki HBE WT. Co ciekawe, tej różnicy w TEER nie można przypisać wyłącznie zmianie oporności transkomórkowej, ponieważ badania prowadzone na początku pracy z wykorzystaniem linii komórkowej HBE WT wykazały, że hamowanie kanału BK_{Ca} za pomocą penitremu A nie powodowało zmiany wartości TEER (Dabrowska et al. 2023). Wyniki te sugerują, że niższy TEER w komórkach HBE ΔαBK_{Ca} może wynikać przede wszystkim ze zmian oporności parakomórkowej, a nie oporności transkomórkowej. Opublikowane badania wskazują bezpośrednie i pośrednie interakcje kanałów BK_{Ca} z cytoszkieletem aktynowym, który kontroluje integralność bariery nabłonkowej (H. Kim i Oh 2016; Lechuga i Ivanov 2021). Dlatego usunięcie kanału BK_{Ca} może wpływać na samoorganizację, stabilność i przebudowę połączeń nabłonkowych i skutkować obniżonymi wartościami TEER, jak zaobserwowano w monowarstwach komórek HBE ΔαBK.

Podsumowując, wykazaliśmy, że jednym z celów działania kwercetyny jest mitochondrialny kanał potasowy mitoBK_{Ca}, a niektóre funkcje mitochondrialne są związane z tym zjawiskiem. Należy jednak zauważyć, że w komórce występuje wiele celów kwercetyny. Wykazano, że kwercetyna może hamować lub otwierać mPTP, w zależności od stężenia (De Marchi et al. 2009). Może również brać udział w hamowaniu ATP-azy, ale nie aktywności syntazy ATP kompleksu V w mitochondriach (Zheng i Ramirez 2000). Ponadto doniesiono, że kwercetyna może hamować kompleks I w mitochondriach (Lagoa et al. 2011) lub przywracać

jego funkcję (Sandoval-Acuña et al. 2012). W dalszych badaniach istotne jest uwzględnienie wszystkich znanych celów komórkowych działania kwercetyny, biorąc pod uwagę możliwe efekty związane z aktywacją mitoBK_{Ca}.

Pomimo że potencjał błony mitochondrialnej nie różnił się między badanymi liniami komórkowymi, w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK zaobserwowano znacząco niższą aktywność kompleksu IV łańcucha oddechowego. Może to wskazywać na specyficzną zależność pomiędzy funkcjonowaniem kanału mitoBK_{Ca} a aktywnością oksydazy cytochromowej. Utrzymanie niezmiennego potencjału błony sugeruje, że podstawowa integralność i funkcja mitochondriów nie zostały zaburzone, jednak brak kanału BK_{Ca} wpływa na końcowy etap transportu elektronów. Obniżenie ilości białek kompleksów III i IV w komórkach HBE $\Delta\alpha$ BK może dodatkowo tłumaczyć zaobserwowany spadek aktywności kompleksu IV i obniżoną szybkość oddychania. Wyniki te wskazują, że kanał mitoBK_{Ca} może pośrednio wpływać na ekspresję lub stabilność składników łańcucha oddechowego, zwłaszcza kompleksów biorących udział w końcowych etapach fosforylacji oksydacyjnej. Brak różnic w ilości kompleksów I, II i V sugeruje, że wpływ kanału BK_{Ca} jest selektywny i dotyczy tylko wybranych elementów łańcucha oddechowego.

Z powyższych rozważań jednoznacznie wynika, że uzyskane dane potwierdzają istotną rolę mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w utrzymaniu prawidłowej aktywności oddechowej komórek nabłonka oskrzeli. Kanał ten może uczestniczyć w regulacji pracy kompleksów III i IV, wpływając tym samym na wydajność transportu elektronów i poziom oddychania komórkowego. Dalsze badania powinny skupić się na określeniu molekularnego mechanizmu tej interakcji oraz ewentualnym znaczeniu sygnałów wapniowych i potencjału redoks w modulacji aktywności kanału mitoBK_{Ca}.

Podsumowując, po raz pierwszy, wykazano również, że kanał BK_{Ca} jest ważny z punktu widzenia fizjologii komórek nabłonka oskrzelowego. Ten kanał jest ważny w fizjologii mitochondriów i odpowiada za formowanie monowarstwy komórek HBE WT, a jego aktywacja inicjuje procesy ochronne w efekcie uszkodzeń wywołanych przez pyły miejskie.

Co więcej, lepsze zrozumienie zależności między metabolizmem mitochondrialnym a fizjologią komórki może pomóc w poszukiwaniu skutecznych strategii cytoprotekcji. Być może, będąc na tropie jednego z najstarszych ewolucyjnie endogennych mechanizmów ochrony komórek, nauczymy się wspierać i indukować te mechanizmy przeciwdziałający konsekwencjom uszkodzeń wywołanych przez pyły miejskie.

6. Wnioski

Wyniki otrzymane w ramach rozprawy doktorskiej wskazują, że mitochondrialny kanał BK_{Ca} pełni ważną rolę w fizjologii komórek nabłonka oddechowego, szczególnie w procesach takich jak oddychanie komórkowe, potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej, czy utrzymanie prawidłowej szczelności monowarstwy komórek nabłonka. Dodatkowo, otrzymane wyniki, w których wykorzystano pyły miejskie PM_{4,0} wskazują, że aktywacja mitochondrialnego kanału BK_{Ca} jest istotnym elementem ochrony w uszkodzeniach komórek nabłonka oddechowego wywołanych przez pyły miejskie w zakresie przeżywalności czy utrzymania prawidłowej oporności warstwy nabłonka. Wnioski te stanowią potwierdzenie hipotez postawionych w zrealizowanej pracy doktorskiej.

Wnioski szczegółowe:

- Prawdopodobieństwo otwarcia kanału mitoBK_{Ca} wzrasta po dodaniu 10 μ M kwercetyny, a po podaniu 300 nM penitremu A obserwowano całkowite zamknięcie kanału. Kwercetyna jest aktywatorem, a penitrem A inhibitorem kanału mitoBK_{Ca}.
- Izoramnetyna nie wpływa na zmiany prawdopodobieństwa otwarcia kanału mitoBK_{Ca}.
- Kwercetyna zwiększa szybkość oddychania komórek HBE WT zależnie od stężenia. Analog kwercetyny – izoramnetyna nie powoduje tego efektu. Z kolei podanie inhibitora kanału mitoBK_{Ca} – penitremu A przed aplikacją kwercetyny odwraca efekt kwercetyny co wskazuje, że wzrost szybkości oddychania komórek HBE WT przez kwercetynę jest związane z aktywacją kanału mitoBK_{Ca}.
- NS11021 (syntetyczny aktywator kanału mitoBK_{Ca}) powodował wzrost szybkości oddychania komórek HBE WT zależnie od stężenia, a ten efekt był znoszony w obecności inhibitora kanału (penitremu A).
- Aktywacja kanału mitoBK_{Ca} przez kwercetynę powoduje depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej w sposób zależny od stężenia. Izoramnetyna nie wywołała tego efektu.
- PM w stężeniu 50 μ g/ml zaburza morfologię oraz strukturę monowarstwy komórek HBE WT, zmniejsza poziom oddychania komórek HBE WT, zaburza kontrolę oddechową, co wskazuje na negatywne oddziaływanie pyłów miejskich na nabłonek dróg oddechowych oraz możliwe uszkodzenia funkcji mitochondriów.

- Pyły miejskie (50 $\mu\text{g/ml}$) indukują stres oksydacyjny w ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli. W obecności 10 μM kwercetyny i penitremu A obserwowano udział aktywacji kanału mitoBK_{Ca} w regulacji poziomu RFT. Izoramnetyna wykazuje działanie przeciwutleniające w komórkach HBE WT jednak ten efekt nie jest skorelowany z aktywacją kanału.
- Na poziomie syntezy mitochondrialnych RFT kwercetyna i izoramnetyna wykazały właściwości antyoksydacyjne w przypadku uszkodzeń oksydacyjnych wywołanych PM w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Właściwości przeciwutleniające kwercetyny były silniejsze niż izoramnetyny. 300 nM penitrem A nie odwracał efektu kwercetyny, zatem aktywacja kanału mitoBK_{Ca} nie jest wprost powiązana z właściwościami przeciwutleniającymi kwercetyny w mitochondriach.
- 50 $\mu\text{g/ml}$ PM spowodował spadek przeznabłonkowego oporu elektrycznego (TEER) w komórkach HBE WT. 50 μM kwercetyna odwróciła spadek TEER wywołany PM, a penitrem A (300 nM) częściowo odwrócił ten efekt. Dlatego udział aktywacji kanału BK_{Ca} odgrywa ważną rolę w formowaniu szczelnej bariery nabłonka oddechowego.
- Nowo wygenerowana linia komórek (HBE $\Delta\alpha\text{BK}$) z delecją kanału BK_{Ca} nie wykazuje aktywności tego kanału w błonie plazmatycznej i w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.
- 1, 3 i 10 μM kwercetyna nie zwiększała zużycia tlenu przez komórki HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ niezależnie od dawki. To dodatkowo potwierdza, że za wzrost szybkości oddychania w komórkach HBE WT w obecności kwercetyny skorelowany jest z aktywacją mitochondrialnego kanału potasowego (mitoBK_{Ca}).
- Kwercetyna i izoramnetyna wykazały właściwości antyoksydacyjne zarówno w całych komórkach jak i w mitochondriach komórek HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ w przypadku uszkodzeń oksydacyjnych wywołanych PM w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Wyższy efekt ochronny przed uszkodzeniami na drodze powstawiania reaktywnych form tlenu w przypadku kwercetyny dla komórek HBE WT niż HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ wskazuje na udział kanału mitoBK_{Ca} w tym zjawisku.
- Komórki HBE WT w obecności 50 $\mu\text{g/ml}$ PM wykazują podwyższony poziom apoptozy. 1, 3, 10 μM kwercetyna przywraca przeżywalność komórek w sposób zależny od dawki.

- Komórki HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ wykazywały znacznie niższy opór elektryczny TEER w porównaniu z komórkami HBE WT. To podkreśla znaczenie kanału BK_{Ca} w formowaniu szczelnej bariery nabłonka oddechowego.
- Szybkość oddychania komórkowego w komórkach HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ w porównaniu z komórkami HBE WT zmienia się: w komórkach linii z delecją kanału obserwowano znaczne obniżenie szybkości oddychania. To wskazuje na ważną rolę kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w procesie oddychania komórkowego.
- Potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej nie różni się w komórkach HBE WT i linii z delecją kanału BK_{Ca} - HBE $\Delta\alpha\text{BK}$. Z kolei aktywność kompleksu IV łańcucha oddechowego w komórkach linii HBE $\Delta\alpha\text{BK}$ jest znacząco niższa niż w komórkach HBE WT, co wskazuje na interakcję między funkcjonowaniem tego kompleksu, a mitochondrialnym kanałem BK_{Ca} . Różnica w aktywności IV kompleksu nie wynika z różnicy liczby mitochondriów w porównywanych liniach komórkowych.
- W komórkach HBE WT oznaczono wyższy poziom białek kompleksów III oraz IV łańcucha oddechowego niż w komórkach HBE $\Delta\alpha\text{BK}$. Ten wynik wyjaśnia obserwowaną różnicę w aktywności kompleksu IV w porównywanych modelach komórkowych. Poziom białek innych kompleksów (I, II, V) nie zmienia się.

7. Spis publikacji naukowych i wskaźniki naukometryczne

7.1 Publikacje naukowe

- **Dabrowska A**, Zajac M, Bednarczyk P, Lukasiak A. Effect of Quercetin on mitoBK_{Ca} Channel and Mitochondrial Function in Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to Particulate Matter. *Int J Mol Sci.* 2022; 24:638. doi: 10.3390/ijms24010638, **140** pkt. MNiSW, IF = **4,9**.
- Hoser J, **Dabrowska A**, Zajac M, Bednarczyk P. Changes in Ion Transport across Biological Membranes Exposed to Particulate Matter. *Membranes (Basel)*. 2023; 13:763. doi: 10.3390/membranes13090763, **100** pkt. MNiSW, IF = **3,6**.
- Maliszewska-Olejniczak K, Pytlak K, **Dabrowska A**, Zochowska M, Hoser J, Lukasiak A, Zajac M, Kulawiak B, Bednarczyk P. Deficiency of the BK_{Ca} potassium channel displayed significant implications for the physiology of the human bronchial epithelium. *Mitochondrion*. 2024; 76:101880. doi: 10.1016/j.mito.2024.101880, **100** pkt. MNiSW, IF = **4,5**.
- Maliszewska-Olejniczak K, Kustra A, Szymański W, **Dabrowska-Hulka A**, Żochowska M, Kulawiak B, Bednarczyk P. BK_{Ca} channel as a novel regulator of cellular DNA damage response in human bronchial epithelial cells in the presence of particulate matter. *Sci Rep.* 2025, 15:22789. doi: 10.1038/s41598-025-03824-9, **140** pkt. MNiSW, IF = **3,9**.

7.2 Konferencje, kursy, szkolenia

7.2.1. Konferencje:

- 9th MITOCHONDRION 2021 Conference on-line, Polish Biophysical Society, Nencki Institute. 27.01.2021
- Kopernikańskim Seminarium Doktoranckim w Toruniu organizowane przez Wydział Chemii UMK w Toruniu. 20-22.06.2022
- 18th Congress of the Polish Biophysical Society (PTBF), organizowany przez Polskie Towarzystwo Biofizyczne w Warszawie 6-9.09.2022
- 10th Mitochondrion 2022 online, organizowane przez Polskie Towarzystwo Biofizyczne 10.2022

7.2.2. Kursy i szkolenia:

- „Good practices in writing of scientific articles” Platinum Open Access Journal. 18-19.11.2020 r.
- „Graficzna prezentacja danych w publikacjach naukowych” Rada Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. 01.02.2021 r.
- „Jakość wody w badaniach analitycznych. Dlaczego woda może stanowić zagrożenie?” Merck. 15.03.2021 r.
- „Sprawniej i szybciej w chromatografii cieczowej -współczesne technologie kolumn HPLC w portfolio Merck” Merck. 22.03.2021 r.
- „Dobór właściwej surowicy w procesie hodowli komórek” Merck. 26.03.2021 r.
- „Dobór właściwych membran i rozwiązań w różnych aplikacjach filtracji analitycznej i przygotowania prób” Merck. 29.03.2021 r.
- „Zastosowanie nowatorskich metod cytometrycznych w wieloparametrycznej analizie komórek” Merck. 12.04.2021 r.
- „Jakość wody w hodowlach komórkowych. Dlaczego woda może stanowić zagrożenie?” Merck. 19.04.2021 r.
- „Hodowle komórek w 3D” Merck. 23.04.2021 r.
- „Strategie analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) z wykorzystaniem cytometrii przepływowej” Merck. 14.05.2021 r.
- „Smart up your lab” - rozwiązania ułatwiające pracę i poprawiające bezpieczeństwo w laboratoriach chemicznych” Merck. 17.05.2021 r.
- „Cytometria przepływowa z obrazowaniem Amnis ImageStream. Warsztaty z analizy danych z wykorzystaniem modułów sztucznej inteligencji” Merck. 18.05.2022 r.

7.2.3 Seminaria

- „Rola mitochondrialnego kanału potasowego w uszkodzeniach wywołanych pyłami miejskimi (PM) – poszukiwanie nowej strategii cytoprotekcji” Seminarium doktoranckie 28.05.2020 r.
- „Rola mitochondrialnego kanału potasowego BK_{Ca} w uszkodzeniach wywołanych pyłami miejskimi (PM) – poszukiwanie nowej strategii cytoprotekcji” Seminarium doktoranckie 28.05.2021 r.

- „Rola mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w fizjologii i uszkodzeniach komórek nabłonka oddechowego wywołanych przez pyły miejskie” Seminarium doktoranckie 11.05.2023 r.
- „Rola mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w fizjologii i uszkodzeniach komórek nabłonka oddechowego wywołanych przez pyły miejskie” Seminarium doktoranckie 23.04.2024 r.

7.2.4. Wskaźniki naukometryczne

Opublikowane prace: **4**

Liczba punktów MNiSW: **480**

Sumaryczny Impact Factor: **16,9**

8. Bibliografia

- Adhami, Vaqar M., Deebea N. Syed, Naghma Khan, i Farrukh Afaq. 2008. „Phytochemicals for Prevention of Solar Ultraviolet Radiation-Induced Damages”. *Photochemistry and Photobiology* 84 (2): 489–500. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00293.x>.
- Ahmad, Naseem Saud, Muhammad Farman, Muzammil Hasan Najmi, Kouser Bashir Mian, i Aurangzeb Hasan. 2008. „Pharmacological Basis for Use of Pistacia Integerrima Leaves in Hyperuricemia and Gout”. *Journal of Ethnopharmacology* 117 (3): 478–82. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.02.031>.
- Ailshire, Jennifer, Amelia Karraker, i Philippa Clarke. 2017. „Neighborhood Social Stressors, Fine Particulate Matter Air Pollution, and Cognitive Function among Older U.S. Adults”. *Social Science & Medicine* (1982) 172 (stycznia): 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2016.11.019>.
- Akan, Zafer, i Ayse Inhan Garip. 2013. „Antioxidants May Protect Cancer Cells from Apoptosis Signals and Enhance Cell Viability”. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 14 (8): 4611–14. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.8.4611>.
- Akao, M., A. Ohler, B. O'Rourke, i E. Marbán. 2001. „Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels Inhibit Apoptosis Induced by Oxidative Stress in Cardiac Cells”. *Circulation Research* 88 (12): 1267–75. <https://doi.org/10.1161/hh1201.092094>.
- Akopova, Olga, Liudmila Kolchinskaya, Valentina Nosar, Iryna Mankovska, i Vadim Sagach. 2020. „Diazoxide Affects Mitochondrial Bioenergetics by the Opening of mKATP Channel on Submicromolar Scale”. *BMC Molecular and Cell Biology* 21 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00275-0>.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, i Peter Walter. 2002. „Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes”. W *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition*. Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26910/>.
- Al-Karagholi, Mohammad Al-Mahdi. 2023. „Involvement of Potassium Channel Signalling in Migraine Pathophysiology”. *Pharmaceuticals* 16 (marca): 438. <https://doi.org/10.3390/ph16030438>.
- Allegra, Mario, Paul Georg Furtmüller, Walter Jantschko, et al. 2005. „Mechanism of Interaction of Betanin and Indicaxanthin with Human Myeloperoxidase and Hypochlorous Acid”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332 (3): 837–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.031>.
- Alscher, Ruth G., i John L. Hess. 2017. *Antioxidants in higher plants*. CRC press.
- Anand David, Alexander Victor, Radhakrishnan Arulmoli, i Subramani Parasuraman. 2016. „Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid”. *Pharmacognosy Reviews* 10 (20): 84–89. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>.

- Asano, Shinichi, Ian N. Bratz, Zachary C. Berwick, Ibra S. Fancher, Johnathan D. Tune, i Gregory M. Dick. 2012. „Penitrem A as a Tool for Understanding the Role of Large Conductance Ca^{2+} /Voltage-Sensitive K^{+} Channels in Vascular Function”. *Cardiovascular. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 342 (2): 453–60. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.191072>.
- Atkinson, Richard W., Gary W. Fuller, H. Ross Anderson, Roy M. Harrison, i Ben Armstrong. 2010. „Urban Ambient Particle Metrics and Health: A Time-Series Analysis”. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 21 (4): 501–11. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181debc88>.
- Augustynek, Bartłomiej, Piotr Koprowski, Daria Rotko, Wolfram S. Kunz, Adam Szewczyk, i Bogusz Kulawiak. 2018. „Mitochondrial BK Channel Openers CGS7181 and CGS7184 Exhibit Cytotoxic Properties”. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2): 353. <https://doi.org/10.3390/ijms19020353>.
- Avtanski, Dimiter, i Leonid Poretsky. 2018. „Phyto-polyphenols as potential inhibitors of breast cancer metastasis”. *Molecular Medicine* 24 (czerwca). <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0032-7>.
- Balasubramanian, Sivaprakasam, Tatiana Efimova, i Richard L. Eckert. 2002. „Green Tea Polyphenol Stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and P38 Cascade to Increase Activator Protein 1 Factor-Dependent Involucrin Gene Expression in Normal Human Keratinocytes”. *Journal of Biological Chemistry* 277 (3): 1828–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110376200>.
- Balić, Anamaria, i Mislav Mokos. 2019. „Do We Utilize Our Knowledge of the Skin Protective Effects of Carotenoids Enough?” *Antioxidants* 8 (8): 8. <https://doi.org/10.3390/antiox8080259>.
- Bednarczyk, Piotr, Agnieszka Koziel, Wiesława Jarmuszkiewicz, i Adam Szewczyk. 2013. „Large-Conductance Ca^{2+} -Activated Potassium Channel in Mitochondria of Endothelial EA.Hy926 Cells”. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 304 (11): H1415–1427. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00976.2012>.
- Bednarczyk, Piotr, Mariusz R. Wieckowski, Malgorzata Broszkiewicz, Krzysztof Skowronek, Detlef Siemen, i Adam Szewczyk. 2013. „Putative Structural and Functional Coupling of the Mitochondrial BKCa Channel to the Respiratory Chain”. *PloS One* 8 (6): e68125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068125>.
- Begum, Aynun Nahar, i Junji Terao. 2002. „Protective Effect of Quercetin against Cigarette Tar Extract-Induced Impairment of Erythrocyte Deformability”. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (5): 265–72. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(01\)00219-4](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(01)00219-4).
- Berlett, B. S., i E. R. Stadtman. 1997. „Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress”. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (33): 20313–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313>.
- Bilmen, Jonathan G., Laura L. Wootton, i Francesco Michelangeli. 2002. „The Mechanism of Inhibition of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase by Paxilline”. *Archives*

of Biochemistry and Biophysics 406 (1): 55–64. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00240-0](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00240-0).

- Bischof, Helmut, Selina Maier, Piotr Koprowski, et al. 2024. „mitoBKCa Is Functionally Expressed in Murine and Human Breast Cancer Cells and Potentially Contributes to Metabolic Reprogramming”. *eLife* 12 (maja): RP92511. <https://doi.org/10.7554/eLife.92511>.
- Borchert, Gudrun H., Markéta Hlaváčková, i František Kolář. 2013. „Pharmacological Activation of Mitochondrial BKCa Channels Protects Isolated Cardiomyocytes against Simulated Reperfusion-Induced Injury”. *Experimental Biology and Medicine* 238 (2): 233–41. <https://doi.org/10.1177/1535370212474596>.
- Brand, Martin D. 2016. „Mitochondrial Generation of Superoxide and Hydrogen Peroxide as the Source of Mitochondrial Redox Signaling”. *Free Radical Biology & Medicine* 100 (listopada): 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>.
- Breton, Carrie V., Ashley Y. Song, Jialin Xiao, et al. 2019. „Effects of Air Pollution on Mitochondrial Function, Mitochondrial DNA Methylation, and Mitochondrial Peptide Expression”. *Mitochondrion* 46 (maja): 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.04.001>.
- Cadelis, Gilbert, Rachel Tourres, i Jack Molinie. 2014. „Short-Term Effects of the Particulate Pollutants Contained in Saharan Dust on the Visits of Children to the Emergency Department Due to Asthmatic Conditions in Guadeloupe (French Archipelago of the Caribbean)”. *PloS One* 9 (3): e91136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091136>.
- Calderón-Garcidueñas, Lilian, Angélica González-Maciel, Partha S. Mukherjee, et al. 2019. „Combustion- and Friction-Derived Magnetic Air Pollution Nanoparticles in Human Hearts”. *Environmental Research* 176 (wrzesień): 108567. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108567>.
- Calderón-Garcidueñas, Lilian, Anna C. Solt, Carlos Henríquez-Roldán, et al. 2008. „Long-Term Air Pollution Exposure Is Associated with Neuroinflammation, an Altered Innate Immune Response, Disruption of the Blood-Brain Barrier, Ultrafine Particulate Deposition, and Accumulation of Amyloid Beta-42 and Alpha-Synuclein in Children and Young Adults”. *Toxicologic Pathology* 36 (2): 289–310. <https://doi.org/10.1177/0192623307313011>.
- Cavalieri, E. L., i E. G. Rogan. 1995. „Central Role of Radical Cations in Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 25 (7): 677–88. <https://doi.org/10.3109/00498259509061885>.
- Cecchini, Gary. 2003. „Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain”. *Annual Review of Biochemistry* 72: 77–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700>.
- Checchetto, Vanessa, Enrico Teardo, Luca Carraretto, Luigi Leanza, i Ildiko Szabo. 2016. „Physiology of Intracellular Potassium Channels: A Unifying Role as Mediators of Counterion Fluxes?” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1857 (8): 1258–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.011>.

- Chen, Shuai, Ralf Einspanier, i Jennifer Schoen. 2015. „Transepithelial Electrical Resistance (TEER): A Functional Parameter to Monitor the Quality of Oviduct Epithelial Cells Cultured on Filter Supports”. *Histochemistry and Cell Biology* 144 (5): 509–15.
<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1351-1>.
- Cheung, Kalam, Nancy Daher, Winnie Kam, Zhi Ning, i James Schauer. 2011. „Spatial and temporal variation of chemical composition and mass closure of ambient coarse particulate matter (PM 10–2.5) in the Los Angeles area”. *Atmospheric Environment - ATMOS ENVIRON* 45 (maja): 2651–62.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.02.066>.
- Chew, Sweelin, Natalia Kolosowska, Liudmila Saveleva, Tarja Malm, i Katja M. Kanninen. 2020. „Impairment of Mitochondrial Function by Particulate Matter: Implications for the Brain”. *Neurochemistry International* 135 (maja): 104694.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104694>.
- Chinembiri, Tawona N., Lissinda H. du Plessis, Minja Gerber, Josias H. Hamman, i Jeanetta du Plessis. 2014. „Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment”. *Molecules (Basel, Switzerland)* 19 (8): 11679–721.
<https://doi.org/10.3390/molecules190811679>.
- Chondrogianni, Niki, Isabelle Petropoulos, Stefanie Grimm, et al. 2014. „Protein Damage, Repair and Proteolysis”. *Molecular Aspects of Medicine* 35 (lutego): 1–71.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.09.001>.
- Chuang, Kai-Jen, Yuan-Horng Yan, Shu-Yi Chiu, i Tsun-Jen Cheng. 2011. „Long-Term Air Pollution Exposure and Risk Factors for Cardiovascular Diseases among the Elderly in Taiwan”. *Occupational and Environmental Medicine* 68 (1): 64–68.
<https://doi.org/10.1136/oem.2009.052704>.
- Clapham, David E. 2007. „Calcium Signaling”. *Cell* 131 (6): 1047–58.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>.
- Correia, Andrew W., C. Arden Pope, Douglas W. Dockery, Yun Wang, Majid Ezzati, i Francesca Dominici. 2013. „Effect of Air Pollution Control on Life Expectancy in the United States: An Analysis of 545 U.S. Counties for the Period from 2000 to 2007”. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 24 (1): 23–31.
<https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182770237>.
- Costa, Alexandre D. T., i Keith D. Garlid. 2009. „MitoKATP Activity in Healthy and Ischemic Hearts”. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 41 (2): 123–26.
<https://doi.org/10.1007/s10863-009-9213-y>.
- Costa, Lucio G., Toby B. Cole, Jacki Coburn, Yu-Chi Chang, Khoi Dao, i Pamela J. Roqué. 2017. „Neurotoxicity of traffic-related air pollution”. *NeuroToxicology* 59 (marca): 133–39. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.11.008>.
- Costa, Lucio G., Jacqueline M. Garrick, Pamela J. Roqué, i Claudia Pellacani. 2016. „Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 2986796.
<https://doi.org/10.1155/2016/2986796>.

- Cox, Daniel H. 2011. „Ca(2+)-Regulated Ion Channels”. *BMB Reports* 44 (10): 635–46. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2011.44.10.635>.
- Cruz-Correa, Marcia, Daniel A. Shoskes, Patricia Sanchez, et al. 2006. „Combination Treatment with Curcumin and Quercetin of Adenomas in Familial Adenomatous Polyposis”. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 4 (8): 1035–38. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.03.020>.
- Cushnie, T. P. Tim, i Andrew J. Lamb. 2005. „Antimicrobial Activity of Flavonoids”. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26 (5): 343–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>.
- Dabrowska, Adrianna, Mirosław Zajac, Piotr Bednarczyk, i Agnieszka Lukasiak. 2023. „Effect of Quercetin on mitoBKCa Channel and Mitochondrial Function in Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to Particulate Matter”. *International Journal of Molecular Sciences* 24 (1): 1. <https://doi.org/10.3390/ijms24010638>.
- Dalecká, Andrea, Claudia Wigmann, Sara Kress, et al. 2021. „The mediating role of lung function on air pollution-induced cardiopulmonary mortality in elderly women: The SALIA cohort study with 22-year mortality follow-up”. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 233 (kwiecień): 113705. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113705>.
- Dąbrowska, Adrianna. 2020. „ROLA WYBRANYCH ZWIĄZKÓW BIOAKTYWNYCH O DZIAŁANIU FOTOPROTEKCYJNYM. | Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego | EBSCOhost”. lipiec 1. <https://openurl.ebsco.com/contentitem/gcd:151480959?sid=ebsco:plink:crawler&id=ebsco:gcd:151480959>.
- De Marchi, Umberto, Lucia Biasutto, Spiridione Garbisa, Antonio Toninello, i Mario Zoratti. 2009. „Quercetin Can Act Either as an Inhibitor or an Inducer of the Mitochondrial Permeability Transition Pore: A Demonstration of the Ambivalent Redox Character of Polyphenols”. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1787 (12): 1425–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.06.002>.
- Denissenko, M. F., A. Pao, M. Tang, i G. P. Pfeifer. 1996. „Preferential Formation of Benzo[a]Pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53”. *Science (New York, N.Y.)* 274 (5286): 430–32. <https://doi.org/10.1126/science.274.5286.430>.
- Di Marco, Giulia, Gaia Gherardi, Agnese De Mario, et al. 2024. „The Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channel (mitoKATP) Controls Skeletal Muscle Structure and Function”. *Cell Death & Disease* 15 (1): 58. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06426-x>.
- Di Mascio, P., S. Kaiser, i H. Sies. 1989. „Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 274 (2): 532–38. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90467-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90467-0).
- Dinkova-Kostova, Albena T., i Paul Talalay. 2008. „Direct and Indirect Antioxidant Properties of Inducers of Cytoprotective Proteins”. *Molecular Nutrition & Food Research* 52 Suppl 1 (czerwiec): S128–138. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700195>.

- Diwanay, Sham, Manish Gautam, i Bhushan Patwardhan. 2004. „Cytoprotection and Immunomodulation in Cancer Therapy”. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents* 4 (6): 479–90. <https://doi.org/10.2174/1568011043352704>.
- Dorta, Daniel J., Acácio A. Pigoso, Fábio E. Mingatto, et al. 2005. „The Interaction of Flavonoids with Mitochondria: Effects on Energetic Processes”. *Chemico-Biological Interactions* 152 (2–3): 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.02.004>.
- Dorta, Daniel J., Acácio A. Pigoso, Fábio E. Mingatto, et al. 2008. „Antioxidant Activity of Flavonoids in Isolated Mitochondria”. *Phytotherapy Research: PTR* 22 (9): 1213–18. <https://doi.org/10.1002/ptr.2441>.
- Douglas, R. M., J. C. K. Lai, S. Bian, L. Cummins, E. Moczydlowski, i G. G. Haddad. 2006. „The Calcium-Sensitive Large-Conductance Potassium Channel (BK/MAXI K) Is Present in the Inner Mitochondrial Membrane of Rat Brain”. *Neuroscience* 139 (4): 1249–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.01.061>.
- Eichler, Olaf, Helmut Sies, i Wilhelm Stahl. 2002. „Divergent Optimum Levels of Lycopene, β -Carotene and Lutein Protecting Against UVB Irradiation in Human Fibroblasts”. *Photochemistry and photobiology* 75 (5): 503–6.
- Eroglu, Abdulkerim, Damian P. Hruszkewycz, Carlo dela Sena, et al. 2012. „Naturally Occurring Eccentric Cleavage Products of Provitamin A β -Carotene Function as Antagonists of Retinoic Acid Receptors”. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (19): 15886–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325142>.
- Esworthy, R. 2014. *Air quality: EPA'S 2013 changes to the particulate matter (PM) standard*.
- Evangelopoulos, Dimitris, Roman Perez-Velasco, Heather Walton, et al. 2020. „The Role of Burden of Disease Assessment in Tracking Progress towards Achieving WHO Global Air Quality Guidelines”. *International Journal of Public Health* 65 (8): 1455–65. <https://doi.org/10.1007/s00038-020-01479-z>.
- Faber, E. S. Louise, i Pankaj Sah. 2003. „Calcium-Activated Potassium Channels: Multiple Contributions to Neuronal Function”. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 9 (3): 181–94. <https://doi.org/10.1177/1073858403009003011>.
- Facundo, Hebert T. F., Maynara Fornazari, i Alicia J. Kowaltowski. 2006. „Tissue Protection Mediated by Mitochondrial K⁺ Channels”. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1762 (2): 202–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.06.003>.
- Fang, Yuanyuan, Vaishali Naik, Larry Horowitz, i Denise Mauzerall. 2013. „Air pollution and associated human mortality: The role of air pollutant emissions, climate change and methane concentration increases from the preindustrial period to present”. *Atmospheric Chemistry and Physics* 13 (lutego): 1377–94. <https://doi.org/10.5194/acp-13-1377-2013>.
- Ferguson, S. J. 2000. „ATP Synthase: What Dictates the Size of a Ring?” *Current Biology: CB* 10 (21): R804–808. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00765-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00765-x).

- Fernández-García, Elisabet. 2014. „Skin Protection against UV Light by Dietary Antioxidants”. *Food & Function* 5 (9): 1994–2003. <https://doi.org/10.1039/c4fo00280f>.
- Flood-Garibay, Jessica Andrea, Aracely Angulo-Molina, i Miguel Ángel Méndez-Rojas. 2023. „Particulate Matter and Ultrafine Particles in Urban Air Pollution and Their Effect on the Nervous System”. *Environmental Science: Processes & Impacts* 25 (4): 704–26. <https://doi.org/10.1039/D2EM00276K>.
- Flowers, L., W. F. Bleczynski, M. E. Burczynski, R. G. Harvey, i T. M. Penning. 1996. „Disposition and Biological Activity of Benzo[a]Pyrene-7,8-Dione. A Genotoxic Metabolite Generated by Dihydrodiol Dehydrogenase”. *Biochemistry* 35 (42): 13664–72. <https://doi.org/10.1021/bi961077w>.
- Forbes, Ben, Atiya Shah, Gary P. Martin, i Alison B. Lansley. 2003. „The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o– as a model system of the airways for studying drug transport”. *International Journal of Pharmaceutics* 257 (1): 161–67. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00129-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00129-7).
- Frey, T. G., i C. A. Mannella. 2000. „The Internal Structure of Mitochondria”. *Trends in Biochemical Sciences* 25 (7): 319–24. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01609-1).
- Fukaya, Misato, Yoriko Sato, Shinji Kondo, Shin-Ichi Adachi, Fumiaki Yoshizawa, i Yusuke Sato. 2021. „Quercetin Enhances Fatty Acid β -Oxidation by Inducing Lipophagy in AML12 Hepatocytes”. *Heliyon* 7 (6): e07324. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07324>.
- Gao, Rui, Tingting Ku, Xiaotong Ji, Yingying Zhang, Guangke Li, i Nan Sang. 2017. „Abnormal Energy Metabolism and Tau Phosphorylation in the Brains of Middle-Aged Mice in Response to Atmospheric PM_{2.5} Exposure”. *Journal of Environmental Sciences (China)* 62 (grudnia): 145–53. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.06.037>.
- Gao, Xin, Huadong Xu, Jing Shang, et al. 2017. „Ozonized Carbon Black Induces Mitochondrial Dysfunction and DNA Damage”. *Environmental Toxicology* 32 (3): 944–55. <https://doi.org/10.1002/tox.22295>.
- García-Mediavilla, Victoria, Irene Crespo, Pilar S. Collado, et al. 2007. „The Anti-Inflammatory Flavones Quercetin and Kaempferol Cause Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase, Cyclooxygenase-2 and Reactive C-Protein, and down-Regulation of the Nuclear Factor kappaB Pathway in Chang Liver Cells”. *European Journal of Pharmacology* 557 (2–3): 221–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.014>.
- Ghio, A. J., J. Stonehuerner, L. A. Dailey, i J. D. Carter. 1999. „Metals Associated with Both the Water-Soluble and Insoluble Fractions of an Ambient Air Pollution Particle Catalyze an Oxidative Stress”. *Inhalation Toxicology* 11 (1): 37–49. <https://doi.org/10.1080/089583799197258>.
- Gincel, D., H. Zaid, i V. Shoshan-Barmatz. 2001. „Calcium Binding and Translocation by the Voltage-Dependent Anion Channel: A Possible Regulatory Mechanism in

- Mitochondrial Function". *The Biochemical Journal* 358 (Pt 1): 147–55.
<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580147>.
- Girault, Alban, i Emmanuelle Brochiero. 2014. „Evidence of K⁺ channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair". *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 306 (4): C307–19.
- Gong, Gang, Ying-Yun Guan, Zhong-Lin Zhang, et al. 2020. „Isorhamnetin: A review of pharmacological effects". *Biomedicine & Pharmacotherapy* 128 (sierpnia): 110301.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110301>.
- Goobie, Gillian C., Christopher Carlsten, Kerri A. Johansson, et al. 2022. „Association of Particulate Matter Exposure With Lung Function and Mortality Among Patients With Fibrotic Interstitial Lung Disease". *JAMA Internal Medicine* 182 (12): 1248–59.
<https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2022.4696>.
- Goswami, Sumanta Kumar, Devasena Ponnalagu, Ahmed T. Hussain, et al. 2018. „Expression and Activation of BKCa Channels in Mice Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury of Isolated Hearts by Modulating Mitochondrial Function". *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5: 194.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00194>.
- Gómez Del Val, Alfonso, Cristina Contreras, Mercedes Muñoz, et al. 2024. „Activation of mitoKATP Channels Induces Penile Vasodilation and Inhibits Mitochondrial Respiration and ROS Production: Role of NO". *Free Radical Biology & Medicine* 217 (maja): 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.03.007>.
- Gray, M. W. 1992. „The Endosymbiont Hypothesis Revisited". *International Review of Cytology* 141: 233–357. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62068-9](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62068-9).
- Grevendonk, Lotte, Bram G. Janssen, Charlotte Vanpoucke, et al. 2016. „Mitochondrial Oxidative DNA Damage and Exposure to Particulate Air Pollution in Mother-Newborn Pairs". *Environmental Health: A Global Access Science Source* 15 (stycznia): 10. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0095-2>.
- Guaita, Rosana, Miryam Pichiule, Tomás Maté, Cristina Linares, i Julio Díaz. 2011. „Short-Term Impact of Particulate Matter (PM_{2.5}) on Respiratory Mortality in Madrid". *International Journal of Environmental Health Research* 21 (4): 260–74.
<https://doi.org/10.1080/09603123.2010.544033>.
- Guardia, T., A. E. Rotelli, A. O. Juarez, i L. E. Pelzer. 2001. „Anti-Inflammatory Properties of Plant Flavonoids. Effects of Rutin, Quercetin and Hesperidin on Adjuvant Arthritis in Rat". *Farmaco (Societa Chimica Italiana: 1989)* 56 (9): 683–87.
[https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(01\)01111-9](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(01)01111-9).
- Guo, Zhiqiang, Zhicong Hong, Weiyang Dong, et al. 2017. „PM_{2.5}-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in the Nasal Mucosa of Rats". *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14 (2): 134.
<https://doi.org/10.3390/ijerph14020134>.

- Hadipour, Elham, Akram Taleghani, Nilufar Tayarani-Najaran, i Zahra Tayarani-Najaran. 2020. „Biological effects of red beetroot and betalains: A review”. *Phytotherapy Research*.
- Halder, Babli, Udayan Bhattacharya, Sibabrata Mukhopadhyay, i Ashok K. Giri. 2008. „Molecular Mechanism of Black Tea Polyphenols Induced Apoptosis in Human Skin Cancer Cells: Involvement of Bax Translocation and Mitochondria Mediated Death Cascade”. *Carcinogenesis* 29 (1): 129–38. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm233>.
- Hall, Arnaldur, i S. Moein Moghimi. 2019. „Determination of Polycation-Mediated Perturbation of Mitochondrial Respiration in Intact Cells by High-Resolution Respirometry (Oxygraph-2k, OROBOROS)”. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1943: 313–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9092-4_20.
- Hannigan, K. I., R. J. Large, E. Bradley, et al. 2016. „Effect of a Novel BKCa Opener on BKCa Currents and Contractility of the Rabbit Corpus Cavernosum”. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 310 (4): C284-292. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00273.2015>.
- Hao, Jie, Wei-Wei Li, Hong Du, et al. 2016. „Role of Vitamin C in Cardioprotection of Ischemia/Reperfusion Injury by Activation of Mitochondrial KATP Channel”. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 64 (6): 548–57. <https://doi.org/10.1248/cpb.c15-00693>.
- Harrison, Roy M., i Jianxin Yin. 2000. „Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health?” *Science of The Total Environment* 249 (1): 85–101. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00513-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00513-6).
- Hasheminassab, Sina, Nancy Daher, i James Schauer. 2013. „Source apportionment and organic compound characterization of ambient ultrafine particulate matter (PM) in the Los Angeles Basin”. *Atmospheric Environment* 79 (listopada): 529–39. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.07.040>.
- Hausenloy, Derek J., Derek M. Yellon, Siva Mani-Babu, i Michael R. Duchen. 2004. „Preconditioning Protects by Inhibiting the Mitochondrial Permeability Transition”. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 287 (2): H841-849. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00678.2003>.
- Hensley, Kenneth, i Robert A. Floyd. 2002. „Reactive Oxygen Species and Protein Oxidation in Aging: A Look Back, a Look Ahead”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397 (2): 377–83. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2630>.
- Hirakawa, Kazutaka, Shinji Oikawa, Yusuke Hiraku, Iwao Hirosawa, i Shosuke Kawanishi. 2002. „Catechol and Hydroquinone Have Different Redox Properties Responsible for Their Differential DNA-Damaging Ability”. *Chemical Research in Toxicology* 15 (1): 76–82. <https://doi.org/10.1021/tx010121s>.
- Horsefield, Rob, So Iwata, i Bernadette Byrne. 2004. „Complex II from a Structural Perspective”. *Current Protein & Peptide Science* 5 (2): 107–18. <https://doi.org/10.2174/1389203043486847>.

- „Ion channel families | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY”. b.d. Dostęp 15 września 2024.
<https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ReceptorFamiliesForward?type=IC>.
- Ishii, T. M., C. Silvia, B. Hirschberg, C. T. Bond, J. P. Adelman, i J. Maylie. 1997. „A Human Intermediate Conductance Calcium-Activated Potassium Channel”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (21): 11651–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11651>.
- Iwata, S., J. W. Lee, K. Okada, et al. 1998. „Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex”. *Science (New York, N.Y.)* 281 (5373): 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.64>.
- Izzotti, Alberto, Paola Spatera, Zumama Khalid, i Alessandra Pulliero. 2022. „Importance of Punctual Monitoring to Evaluate the Health Effects of Airborne Particulate Matter”. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (17): 17. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710587>.
- Jagtap, Smita, Kesavan Meganathan, Vilas Wagh, Johannes Winkler, Jürgen Hescheler, i Agapios Sachinidis. 2009. „Chemoprotective Mechanism of the Natural Compounds, Epigallocatechin-3-O-Gallate, Quercetin and Curcumin against Cancer and Cardiovascular Diseases”. *Current Medicinal Chemistry* 16 (12): 1451–62. <https://doi.org/10.2174/092986709787909578>.
- Javadinia, Sara Sadat, Kazem Abbaszadeh-Goudarzi, Davood Mahdian, Azar Hosseini, Mina Ghalehovi, i Roghayeh Javan. 2022. „A Review of the Protective Effects of Quercetin-Rich Natural Compounds for Treating Ischemia-Reperfusion Injury”. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission* 97 (4): 237–46. <https://doi.org/10.1080/10520295.2021.1937701>.
- Jin, Xiaoting, Ruijun Su, Ruijin Li, et al. 2016. „Amelioration of Particulate Matter-Induced Oxidative Damage by Vitamin c and Quercetin in Human Bronchial Epithelial Cells”. *Chemosphere* 144 (lutego): 459–66. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.023>.
- Jinarat, Damrongsak, Krekwit Shinlapawittayatorn, Siriporn C. Chattipakorn, i Nipon Chattipakorn. 2025. „Particulate Matter and Cardiac Arrhythmias: From Clinical Observation to Mechanistic Insights at cardiac ion channels”. *Environmental Pollution*, 126168.
- Johansson, Christer, Michael Norman, i Lars Gidhagen. 2007. „Spatial & Temporal Variations of PM₁₀ and Particle Number Concentrations in Urban Air”. *Environmental Monitoring and Assessment* 127 (1–3): 477–87. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9296-4>.
- Johari, Jefree, Aynaz Kianmehr, Mohd Rais Mustafa, Sazaly Abubakar, i Keivan Zandi. 2012. „Antiviral Activity of Baicalein and Quercetin against the Japanese Encephalitis Virus”. *International Journal of Molecular Sciences* 13 (12): 16785–95. <https://doi.org/10.3390/ijms131216785>.
- Juhaszova, Magdalena, Dmitry B. Zorov, Suhn-Hee Kim, et al. 2004. „Glycogen Synthase Kinase-3 β Mediates Convergence of Protection Signaling to Inhibit the

- Mitochondrial Permeability Transition Pore". *The Journal of Clinical Investigation* 113 (11): 1535–49. <https://doi.org/10.1172/JCI19906>.
- Kampa, Rafał Paweł, Aleksandra Gliździńska, Adam Szewczyk, Piotr Bednarczyk, i Sławomir Filipek. 2022. „Flavonoid Quercetin Abolish Paxilline Inhibition of the Mitochondrial BKCa Channel". *Mitochondrion* 65 (lipca): 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2022.04.005>.
- Kampa, Rafał Paweł, Aleksandra Sęk, Adam Szewczyk, i Piotr Bednarczyk. 2021. „Cytoprotective effects of the flavonoid quercetin by activating mitochondrial BKCa channels in endothelial cells." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 142 (października): 112039. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112039>.
- Kanninen, Katja M., Yuriy Pomeschchik, Hanna Leinonen, Tarja Malm, Jari Koistinaho, i Anna-Liisa Levonen. 2015. „Applications of the Keap1-Nrf2 System for Gene and Cell Therapy". *Free Radical Biology & Medicine* 88 (Pt B): 350–61. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.037>.
- Kasprzak, Kazimierz S. 2002. „Oxidative DNA and Protein Damage in Metal-Induced Toxicity and Carcinogenesis". *Free Radical Biology & Medicine* 32 (10): 958–67. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00809-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00809-2).
- Kaur, Charanjit, Wallace S. Foulds, i Eng-Ang Ling. 2008. „Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage". *Clinical Ophthalmology* 2 (4): 879–89. <https://doi.org/10.2147/opth.s3361>.
- Keinan, Nurit, Hadas Pahima, Danya Ben-Hail, i Varda Shoshan-Barmatz. 2013. „The Role of Calcium in VDAC1 Oligomerization and Mitochondria-Mediated Apoptosis". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (7): 1745–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.017>.
- Keller, J. N., M. S. Kindy, F. W. Holtsberg, et al. 1998. „Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Prevents Neural Apoptosis and Reduces Ischemic Brain Injury: Suppression of Peroxynitrite Production, Lipid Peroxidation, and Mitochondrial Dysfunction". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (2): 687–97. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-02-00687.1998>.
- Kelly, Frank J., i Julia C. Fussell. 2015. „Linking Ambient Particulate Matter Pollution Effects with Oxidative Biology and Immune Responses". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1340 (marca): 84–94. <https://doi.org/10.1111/nyas.12720>.
- Khan, Haroon, Hammad Ullah, Michael Aschner, Wai San Cheang, i Esra Küpeli Akkol. 2019. „Neuroprotective Effects of Quercetin in Alzheimer's Disease". *Biomolecules* 10 (1): 59. <https://doi.org/10.3390/biom10010059>.
- Khoo, Hock-Eng, K. Nagendra Prasad, Kin-Weng Kong, Yueming Jiang, i Amin Ismail. 2011. „Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables". *Molecules* 16 (2): 1710–38. <https://doi.org/10.3390/molecules16021710>.
- Kia'i, Nakisa, i Tushar Bajaj. 2024. „Histology, Respiratory Epithelium". W *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541061/>.

- Kim, H., i K. H. Oh. 2016. „Protein Network Interacting with BK Channels”. *International Review of Neurobiology* 128: 127–61. <https://doi.org/10.1016/bs.irm.2016.03.003>.
- Kim, Hae-Suk, Michael J. Quon, i Jeong-a Kim. 2014. „New Insights into the Mechanisms of Polyphenols beyond Antioxidant Properties; Lessons from the Green Tea Polyphenol, Epigallocatechin 3-Gallate”. *Redox Biology* 2 (styczeń): 187–95. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.022>.
- Kim, Ki-Hyun, Ehsanul Kabir, i Shamin Kabir. 2015. „A Review on the Human Health Impact of Airborne Particulate Matter”. *Environment International* 74 (styczeń): 136–43. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005>.
- Kinney, Patrick L. 2008. „Climate Change, Air Quality, and Human Health”. *American Journal of Preventive Medicine* 35 (5): 459–67. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2008.08.025>.
- Klewicka, Elżbieta. 2010. „Fermented beetroot juice as a factor limiting chemical mutations induced by MNNG in Salmonella typhimurium TA98 and TA100 strains”. *Food Technology and Biotechnology* 48 (2): 229–33.
- Kłyszewko-Stefanowicz, Leokadia. 2015. *Cytobiochemia: biochemia niektórych struktur komórkowych*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Knaapen, Ad M., Tingming Shi, Paul J. A. Borm, i Roel P. F. Schins. 2002. „Soluble Metals as Well as the Insoluble Particle Fraction Are Involved in Cellular DNA Damage Induced by Particulate Matter”. *Molecular and Cellular Biochemistry* 234–235 (1–2): 317–26.
- Knight, Darryl A., i Stephen T. Holgate. 2003. „The Airway Epithelium: Structural and Functional Properties in Health and Disease”. *Respirology (Carlton, Vic.)* 8 (4): 432–46. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x>.
- Koopman, Werner J. H., Leo G. J. Nijtmans, Cindy E. J. Dieteren, et al. 2010. „Mammalian Mitochondrial Complex I: Biogenesis, Regulation, and Reactive Oxygen Species Generation”. *Antioxidants & Redox Signaling* 12 (12): 1431–70. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2743>.
- Körper, Sixten, Florian Nolte, Markus Thomas Rojewski, Eckhard Thiel, i Hubert Schrezenmeier. 2003. „The K⁺ Channel Openers Diazoxide and NS1619 Induce Depolarization of Mitochondria and Have Differential Effects on Cell Ca²⁺ in CD34⁺ Cell Line KG-1a”. *Experimental Hematology* 31 (9): 815–23. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(03\)00199-1](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(03)00199-1).
- Krajka-Kuźniak, Violetta, Jarosław Paluszczak, Hanna Szafer, i Wanda Baer-Dubowska. 2013. „Betanin, a Beetroot Component, Induces Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2-Mediated Expression of Detoxifying/Antioxidant Enzymes in Human Liver Cell Lines”. *The British Journal of Nutrition* 110 (12): 2138–49. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001645>.
- Kulawiak, Bogusz, Piotr Bednarczyk, i Adam Szewczyk. 2021. „Multidimensional Regulation of Cardiac Mitochondrial Potassium Channels”. *Cells* 10 (6): 1554. <https://doi.org/10.3390/cells10061554>.

- Kulawiak, Bogusz, Alexei P. Kudin, Adam Szewczyk, i Wolfram S. Kunz. 2008. „BK Channel Openers Inhibit ROS Production of Isolated Rat Brain Mitochondria”. *Experimental Neurology* 212 (2): 543–47. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.05.004>.
- Kulawiak, Bogusz, Monika Żochowska, Piotr Bednarczyk, Andrzej Galuba, David A. Stroud, i Adam Szewczyk. 2023. „Loss of the Large Conductance Calcium-Activated Potassium Channel Causes an Increase in Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Glioblastoma Cells”. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 475 (9): 1045–60. <https://doi.org/10.1007/s00424-023-02833-9>.
- Kun, A., V. V. Matchkov, E. Stankevicius, et al. 2009. „NS11021, a Novel Opener of Large-Conductance Ca(2+)-Activated K(+) Channels, Enhances Erectile Responses in Rats”. *British Journal of Pharmacology* 158 (6): 1465–76. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00404.x>.
- Kuźma, Łukasz, Emil Julian Dąbrowski, Anna Kurasz, Hanna Bachórzewska-Gajewska, i Sławomir Dobrzycki. 2020. „The 10-Year Study of the Impact of Particulate Matters on Mortality in Two Transit Cities in North-Eastern Poland (PL-PARTICLES)”. *Journal of Clinical Medicine* 9 (11): 3445. <https://doi.org/10.3390/jcm9113445>.
- Kyung, Sun Young, i Sung Hwan Jeong. 2020. „Particulate-Matter Related Respiratory Diseases”. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 83 (2): 116–21. <https://doi.org/10.4046/trd.2019.0025>.
- Lagoa, Ricardo, Ilaria Graziani, Carmen Lopez-Sanchez, Virginio Garcia-Martinez, i Carlos Gutierrez-Merino. 2011. „Complex I and Cytochrome c Are Molecular Targets of Flavonoids That Inhibit Hydrogen Peroxide Production by Mitochondria”. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1807 (12): 1562–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.09.022>.
- Lakhanpal, Parul. 2007. „Quercetin: A Versatile Flavonoid”. *Internet Journal of Medical Update* 2 (listopada). <https://doi.org/10.4314/ijmu.v2i2.39851>.
- Laskowski, Michał, Bartłomiej Augustynek, Bogusz Kulawiak, et al. 2016. „What Do We Not Know about Mitochondrial Potassium Channels?” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1857 (8): 1247–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.007>.
- Leanza, Luigi, Vanessa Checchetto, Lucia Biasutto, et al. 2019. „Pharmacological Modulation of Mitochondrial Ion Channels”. *British Journal of Pharmacology* 176 (22): 4258–83. <https://doi.org/10.1111/bph.14544>.
- Lechuga, Susana, i Andrei I. Ivanov. 2021. „Actin Cytoskeleton Dynamics during Mucosal Inflammation: A View from Broken Epithelial Barriers”. *Current Opinion in Physiology* 19 (lutego): 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.06.012>.
- Lei, Jiaming, Jianbao Yang, Cuiyu Bao, et al. 2024. „Isorhamnetin: What Is the in Vitro Evidence for Its Antitumor Potential and Beyond?” *Frontiers in Pharmacology* 15 (kwietnia). <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1309178>.
- Leikauf, George D., Sang-Heon Kim, i An-Soo Jang. 2020. „Mechanisms of Ultrafine Particle-Induced Respiratory Health Effects”. *Experimental & Molecular Medicine* 52 (3): 329–37. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0394-0>.

- Lenaz, Giorgio, Romana Fato, Maria Luisa Genova, Christian Bergamini, Cristina Bianchi, i Annalisa Biondi. 2006. „Mitochondrial Complex I: Structural and Functional Aspects”. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1757 (9–10): 1406–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.05.007>.
- Levy, J I, J. K. Hammitt, i J. D. Spengler. 2000. „Estimating the mortality impacts of particulate matter: what can be learned from between-study variability?” *Environmental Health Perspectives* 108 (2): 109–17.
- Levy, Jonathan I., i Steven R. Hanna. 2011. „Spatial and Temporal Variability in Urban Fine Particulate Matter Concentrations”. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 159 (8–9): 2009–15. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.11.013>.
- Li, Ning, Constantinos Sioutas, Arthur Cho, et al. 2003. „Ultrafine Particulate Pollutants Induce Oxidative Stress and Mitochondrial Damage”. *Environmental Health Perspectives* 111 (4): 455–60. <https://doi.org/10.1289/ehp.6000>.
- Li, Ruijin, Xiaojing Kou, Hong Geng, et al. 2015. „Effect of Ambient PM(2.5) on Lung Mitochondrial Damage and Fusion/Fission Gene Expression in Rats”. *Chemical Research in Toxicology* 28 (3): 408–18. <https://doi.org/10.1021/tx5003723>.
- Li, Tao, Rong Hu, Zi Chen, et al. 2018. „Fine Particulate Matter (PM2.5): The Culprit for Chronic Lung Diseases in China”. *Chronic Diseases and Translational Medicine* 4 (3): 176–86. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2018.07.002>.
- Li, Xiaobo, Chengcheng Zhang, Xin Zhang, et al. 2016. „An Acetyl-L-Carnitine Switch on Mitochondrial Dysfunction and Rescue in the Metabolomics Study on Aluminum Oxide Nanoparticles”. *Particle and Fibre Toxicology* 13 (stycznia): 4. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0115-y>.
- Lipfert, Frederick W. 2017. „A critical review of the ESCAPE project for estimating long-term health effects of air pollution”. *Environment International* 99 (lutego): 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.028>.
- Liu, Chang, Xiaoman Cheng, Yifang Wu, et al. 2023. „Antioxidant Activity of Quercetin-Containing Liposomes-in-Gel and Its Effect on Prevention and Treatment of Cutaneous Eczema”. *Pharmaceuticals* 16 (8): 8. <https://doi.org/10.3390/ph16081184>.
- Liu, Hui, Xiaolan Guo, Yi Chu, i Shaoping Lu. 2014. „Heart Protective Effects and Mechanism of Quercetin Preconditioning on Anti-Myocardial Ischemia Reperfusion (IR) Injuries in Rats”. *Gene* 545 (1): 149–55. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.043>.
- Liu, Kaimeng, Shucheng Hua, i Lei Song. 2022. „PM2.5 Exposure and Asthma Development: The Key Role of Oxidative Stress”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2022: 3618806. <https://doi.org/10.1155/2022/3618806>.
- Liu, Norrice M., Lisa Miyashita, Barbara A. Maher, et al. 2021. „Evidence for the presence of air pollution nanoparticles in placental tissue cells”. *Science of The Total Environment* 751 (stycznia): 142235. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142235>.

- Lodovici, Maura, i Elisabetta Bigagli. 2011. „Oxidative Stress and Air Pollution Exposure”. *Journal of Toxicology* 2011: 487074. <https://doi.org/10.1155/2011/487074>.
- Löndahl, Jakob, Joakim Pagels, Erik Swietlicki, et al. 2006. „A set-up for field studies of respiratory tract deposition of fine and ultrafine particles in humans”. *Journal of Aerosol Science* 37 (wrzesień): 1152–63. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2005.11.004>.
- Longland, C. L., J. L. Dyer, i F. Michelangeli. 2000. „The Mycotoxin Paxilline Inhibits the Cerebellar Inositol 1,4, 5-Trisphosphate Receptor”. *European Journal of Pharmacology* 408 (3): 219–25. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00775-5](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00775-5).
- Maher, B. A., A. González-Maciel, R. Reynoso-Robles, R. Torres-Jardón, i L. Calderón-Garcidueñas. 2020. „Iron-rich air pollution nanoparticles: An unrecognised environmental risk factor for myocardial mitochondrial dysfunction and cardiac oxidative stress”. *Environmental Research* 188 (wrzesień): 109816. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109816>.
- Makarova, Kira S., Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, et al. 2011. „Evolution and Classification of the CRISPR-Cas Systems”. *Nature Reviews. Microbiology* 9 (6): 467–77. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- Makarova, Kira S., Yuri I. Wolf, Sagi Snir, i Eugene V. Koonin. 2011. „Defense Islands in Bacterial and Archaeal Genomes and Prediction of Novel Defense Systems”. *Journal of Bacteriology* 193 (21): 6039–56. <https://doi.org/10.1128/JB.05535-11>.
- Maliszewska-Olejniczak, Kamila, Agata Kustra, Wojciech Szymański, et al. 2025. „BKCa channel as a novel regulator of cellular DNA damage response in human bronchial epithelial cells in the presence of particulate matter”. *Scientific Reports* 15 (1): 22789.
- Maliszewska-Olejniczak, Kamila, Karolina Pytlak, Adrianna Dabrowska, et al. 2024. „Deficiency of the BKCa Potassium Channel Displayed Significant Implications for the Physiology of the Human Bronchial Epithelium”. *Mitochondrion* 76 (maja): 101880. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2024.101880>.
- Mamani-Matsuda, Maria, Tina Kauss, Abir Al-Kharrat, et al. 2006. „Therapeutic and Preventive Properties of Quercetin in Experimental Arthritis Correlate with Decreased Macrophage Inflammatory Mediators”. *Biochemical Pharmacology* 72 (10): 1304–10. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.08.001>.
- Manach, Claudine, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, i Liliana Jiménez. 2004. „Polyphenols: Food Sources and Bioavailability”. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (5): 727–47. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.
- Manisalidis, Ioannis, Elisavet Stavropoulou, Agathangelos Stavropoulos, i Eugenia Bezirtzoglou. 2020. „Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review”. *Frontiers in Public Health* 8 (lutego): 14. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00014>.
- Martin, B. W., U. Ackermann-Liebrich, P. Leuenberger, et al. 1997. „SAPALDIA: Methods and Participation in the Cross-Sectional Part of the Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults”. *Sozial- Und Präventivmedizin* 42 (2): 67–84. <https://doi.org/10.1007/BF01318136>.

- Martin, William, i Marek Mentel. 2010. „The origin of mitochondria”. *Nature Education* 3 (styczeń).
- Matsushita, Kenji, Craig N. Morrell, Beatrice Cambien, et al. 2003. „Nitric Oxide Regulates Exocytosis by S-Nitrosylation of N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor”. *Cell* 115 (2): 139–50. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00803-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00803-1).
- Mattson, Mark P., i Dong Liu. 2003. „Mitochondrial potassium channels and uncoupling proteins in synaptic plasticity and neuronal cell death”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304 (3): 539–49. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00627-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00627-2).
- Mehta, Jay, Srujana Rayalam, i Xinyu Wang. 2018. „Cytoprotective Effects of Natural Compounds against Oxidative Stress”. *Antioxidants* 7 (10): 10. <https://doi.org/10.3390/antiox7100147>.
- Meister, Kadri, Christer Johansson, i Bertil Forsberg. 2012. „Estimated Short-Term Effects of Coarse Particles on Daily Mortality in Stockholm, Sweden”. *Environmental Health Perspectives* 120 (3): 431–36. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103995>.
- Metodiewa, D., A. K. Jaiswal, N. Cenas, E. Dickancaitė, i J. Segura-Aguilar. 1999. „Quercetin May Act as a Cytotoxic Prooxidant after Its Metabolic Activation to Semiquinone and Quinoidal Product”. *Free Radical Biology & Medicine* 26 (1–2): 107–16. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00167-1](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00167-1).
- Milani, Alireza, Marzieh Basirnejad, Sepideh Shahbazi, i Azam Bolhassani. 2017. „Carotenoids: Biochemistry, Pharmacology and Treatment”. *British Journal of Pharmacology* 174 (11): 1290–324. <https://doi.org/10.1111/bph.13625>.
- Miller, Margaret A., i James F. Zachary. 2017. „Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death”. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 2–43.e19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1>.
- Misra, C., M. D. Geller, P. Shah, C. Sioutas, i P. A. Solomon. 2001. „Development and Evaluation of a Continuous Coarse (PM10-PM2.5) Particle Monitor”. *Journal of the Air & Waste Management Association (1995)* 51 (9): 1309–17. <https://doi.org/10.1080/10473289.2001.10464360>.
- Mittal, A., C. A. Elmets, i S. K. Katiyar. 2003. „Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: Relationship to decreased fat and lipid peroxidation”. *Carcinogenesis* 24 (8): 1379–88. Scopus. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg095>.
- Morciano, Giampaolo, Carlotta Giorgi, Massimo Bonora, et al. 2015. „Molecular Identity of the Mitochondrial Permeability Transition Pore and Its Role in Ischemia-Reperfusion Injury”. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 78 (styczeń): 142–53. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.08.015>.
- Murphy, Michael P. 2009. „How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species”. *The Biochemical Journal* 417 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.

- Nel, Andre, Tian Xia, Lutz Mädler, i Ning Li. 2006. „Toxic Potential of Materials at the Nanolevel”. *Science (New York, N.Y.)* 311 (5761): 622–27. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>.
- Nichols, Joi A., i Santosh K. Katiyar. 2010. „Skin Photoprotection by Natural Polyphenols: Anti-Inflammatory, Antioxidant and DNA Repair Mechanisms”. *Archives of Dermatological Research* 302 (2): 71–83. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3>.
- Nouri, Ali, Esfandiar Heidarian, Hossein Amini-Khoei, Saber Abbaszadeh, i Gholam Basati. 2019. „Quercetin through mitigation of inflammatory response and oxidative stress exerts protective effects in rat model of diclofenac-induced liver toxicity”. *J Pharm Pharmacogn Res* 7 (3): 200–212.
- Ohnishi, Shiho, i Shosuke Kawanishi. 2002. „Double Base Lesions of DNA by a Metabolite of Carcinogenic Benzo[a]pyrene”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290 (2): 778–82. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6249>.
- Organization, World Health. 2021. *WHO Global Air Quality Guidelines: Particulate Matter (PM_{2.5} and PM₁₀), Ozone, Nitrogen Dioxide, Sulfur Dioxide and Carbon Monoxide*. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/345329>.
- O'Rourke, Brian, Sonia Cortassa, i Miguel A. Aon. 2005. „Mitochondrial Ion Channels: Gatekeepers of Life and Death”. *Physiology (Bethesda, Md.)* 20 (października): 303–15. <https://doi.org/10.1152/physiol.00020.2005>.
- Orrenius, Sten, Vladimir Gogvadze, i Boris Zhivotovsky. 2015. „Calcium and Mitochondria in the Regulation of Cell Death”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460 (1): 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.137>.
- Palmer, Biff F. 2015. „Regulation of Potassium Homeostasis”. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 10 (6): 1050–60. <https://doi.org/10.2215/CJN.08580813>.
- Pardo, Michal, Fanfan Xu, Michal Shemesh, et al. 2019. „Nrf2 Protects against Diverse PM_{2.5} Components-Induced Mitochondrial Oxidative Damage in Lung Cells”. *The Science of the Total Environment* 669 (czerwca): 303–13. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.436>.
- Pearson, John F., Chethan Bachireddy, Sangameswaran Shyamprasad, Allison B. Goldfine, i John S. Brownstein. 2010. „Association between Fine Particulate Matter and Diabetes Prevalence in the U.S”. *Diabetes Care* 33 (10): 2196–201. <https://doi.org/10.2337/dc10-0698>.
- Perrelli, Maria-Giulia, Francesca Tullio, Carmelina Angotti, et al. 2013. „Catestatin Reduces Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury: Involvement of PI3K/Akt, PKCs, Mitochondrial KATP Channels and ROS Signalling”. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 465 (7): 1031–40. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1217-0>.
- Perron, Nathan R., i Julia L. Brumaghim. 2009. „A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding”. *Cell Biochemistry and Biophysics* 53 (2): 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>.

- Pocernich, C. B., M. L. Bader Lange, R. Sultana, i D. A. Butterfield. 2011. „Nutritional Approaches to Modulate Oxidative Stress in Alzheimer’s Disease”. *Current Alzheimer Research* 8 (5): 452–69. <https://doi.org/10.2174/156720511796391908>.
- Pradelli, Ludivine A., Marie Bénétteau, i Jean-Ehrland Ricci. 2010. „Mitochondrial Control of Caspase-Dependent and -Independent Cell Death”. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (10): 1589–97. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0285-y>.
- Pratiwi, Yolanda Edith, Feni Fitriani Taufik, Januar Habibi, i Adityo Wibowo. 2023. „The Impact of Particulate Matter on the Respiratory System”. *Jurnal Respirasi* 9 (3): 3. <https://doi.org/10.20473/jr.v9-I.3.2023.237-245>.
- Qiu, X. B., i E. Cadenas. 1997. „The Role of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase in Quinone-Mediated P21 Induction in Human Colon Carcinoma Cells”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346 (2): 241–51. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0329>.
- Quezada-Maldonado, Ericka Marel, Yesennia Sánchez-Pérez, Yolanda I. Chirino, i Claudia M. García-Cuellar. 2021. „Airborne Particulate Matter Induces Oxidative Damage, DNA Adduct Formation and Alterations in DNA Repair Pathways”. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 287 (października): 117313. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117313>.
- Rackley, Craig R., i Barry R. Stripp. 2012. „Building and Maintaining the Epithelium of the Lung”. *The Journal of Clinical Investigation* 122 (8): 2724–30. <https://doi.org/10.1172/JCI60519>.
- Ramos, Freddy A., Yoshihisa Takaishi, Miki Shirotori, et al. 2006. „Antibacterial and Antioxidant Activities of Quercetin Oxidation Products from Yellow Onion (*Allium Cepa*) Skin”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (10): 3551–57. <https://doi.org/10.1021/jf060251c>.
- Ran, F. Ann, Patrick D. Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A. Scott, i Feng Zhang. 2013. „Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System”. *Nature Protocols* 8 (11): 2281–308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
- Rao, Xiaoquan, Jixin Zhong, Robert D. Brook, i Sanjay Rajagopalan. 2018. „Effect of Particulate Matter Air Pollution on Cardiovascular Oxidative Stress Pathways”. *Antioxidants & Redox Signaling* 28 (9): 797–818. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7394>.
- Riva, D. R., C. B. Magalhães, A. A. Lopes, et al. 2011. „Low Dose of Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) Can Induce Acute Oxidative Stress, Inflammation and Pulmonary Impairment in Healthy Mice”. *Inhalation Toxicology* 23 (5): 257–67. <https://doi.org/10.3109/08958378.2011.566290>.
- Rizwan, M., I. Rodriguez-Blanco, A. Harbottle, M. A. Birch-Machin, R. E. B. Watson, i L. E. Rhodes. 2011. „Tomato Paste Rich in Lycopene Protects against Cutaneous Photodamage in Humans in Vivo: A Randomized Controlled Trial”. *The British Journal of Dermatology* 164 (1): 154–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.10057.x>.

- Rodríguez, Lyanne, Lina Badimon, Diego Méndez, et al. 2021. „Antiplatelet Activity of Isorhamnetin via Mitochondrial Regulation”. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (5): 666. <https://doi.org/10.3390/antiox10050666>.
- Rogula-Kozłowska, Wioletta, Krzysztof Klejnowski, Patrycja Rogula-Kopiec, et al. 2014. „Spatial and Seasonal Variability of the Mass Concentration and Chemical Composition of PM_{2.5} in Poland”. *Air Quality, Atmosphere, & Health* 7 (1): 41–58. <https://doi.org/10.1007/s11869-013-0222-y>.
- Rokicki, Wojciech, Marek Rokicki, Jacek Wojtacha, i Agata Dżelji. 2016. „The Role and Importance of Club Cells (Clara Cells) in the Pathogenesis of Some Respiratory Diseases”. *Kardiologia i Torakochirurgia Polska = Polish Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 13 (1): 26–30. <https://doi.org/10.5114/kitp.2016.58961>.
- Rubinstein, John L., John E. Walker, i Richard Henderson. 2003. „Structure of the Mitochondrial ATP Synthase by Electron Cryomicroscopy”. *The EMBO Journal* 22 (23): 6182–92. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg608>.
- Ryan, Lisa, i Stuart L. Prescott. 2010. „Stability of the Antioxidant Capacity of Twenty-Five Commercially Available Fruit Juices Subjected to an in Vitro Digestion”. *International Journal of Food Science & Technology* 45 (6): 1191–97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02254.x>.
- Sakai, Yoshihisa, Margaret Harvey, i Bernd Sokolowski. 2011. „Identification and Quantification of Full-Length BK Channel Variants in the Developing Mouse Cochlea”. *Journal of Neuroscience Research* 89 (11): 1747–60. <https://doi.org/10.1002/jnr.22713>.
- Salvamani, Shamala, Baskaran Gunasekaran, Noor Azmi Shaharuddin, Siti Aqlima Ahmad, i Mohd Yunus Shukor. 2014. „Antiatherosclerotic Effects of Plant Flavonoids”. *BioMed Research International* 2014: 480258. <https://doi.org/10.1155/2014/480258>.
- Sandoval-Acuña, Cristian, Camilo Lopez-Alarcón, Margarita E. Aliaga, i Hernán Speisky. 2012. „Inhibition of Mitochondrial Complex I by Various Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Its Protection by Quercetin via a Coenzyme Q-like Action”. *Chemico-Biological Interactions* 199 (1): 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.05.006>.
- Santoso, Muhayatun, Diah Lestiani, Endah Damastuti, et al. 2020. „Long term characteristics of atmospheric particulate matter and compositions in Jakarta, Indonesia”. *Atmospheric Pollution Research* 11 (grudnia): 2215–25. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2020.09.006>.
- Santoso, Muhayatun, Diah Lestiani, S. Kurniawati, et al. 2019. „Elemental Composition of Particulate Matter Air Pollution Collected Around Industrial Area in East Java”. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 303 (sierpnia): 012036. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/303/1/012036>.
- Sato, Toshiaki, Tomoaki Saito, Noriko Saegusa, i Haruaki Nakaya. 2005. „Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A”. *Circulation* 111 (2): 198–203.

- Schantz, Michele M., Danielle Cleveland, N. Alan Heckert, et al. 2016. „Development of Two Fine Particulate Matter Standard Reference Materials (<4 Mm and <10 Mm) for the Determination of Organic and Inorganic Constituents”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (16): 4257–66. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9519-7>.
- Schaumann, Frank, Paul J. A. Borm, Andreas Herbrich, et al. 2004. „Metal-Rich Ambient Particles (Particulate Matter 2.5) Cause Airway Inflammation in Healthy Subjects”. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170 (8): 898–903. <https://doi.org/10.1164/rccm.200403-423OC>.
- Schikowski, Tamara, i Hicran Altuğ. 2020. „The Role of Air Pollution in Cognitive Impairment and Decline”. *Neurochemistry International* 136 (czerwca): 104708. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104708>.
- Schraufnagel, Dean E., John R. Balmes, Clayton T. Cowl, et al. 2019. „Air Pollution and Noncommunicable Diseases: A Review by the Forum of International Respiratory Societies’ Environmental Committee, Part 1: The Damaging Effects of Air Pollution”. *Chest* 155 (2): 409–16. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.10.042>.
- Sek, Aleksandra, Rafal P. Kampa, Bogusz Kulawiak, Adam Szewczyk, i Piotr Bednarczyk. 2021. „Identification of the Large-Conductance Ca²⁺-Regulated Potassium Channel in Mitochondria of Human Bronchial Epithelial Cells”. *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (11): 3233. <https://doi.org/10.3390/molecules26113233>.
- Shah, Anoop S. V., Jeremy P. Langrish, Harish Nair, et al. 2013. „Global Association of Air Pollution and Heart Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Lancet (London, England)* 382 (9897): 1039–48. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60898-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60898-3).
- Shah, Kunal R., Xin Guan, i Jiusheng Yan. 2021. „Structural and Functional Coupling of Calcium-Activated BK Channels and Calcium-Permeable Channels Within Nanodomain Signaling Complexes”. *Frontiers in Physiology* 12: 796540. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.796540>.
- Simcox, Eve, i Amy Reeve. 2016. „An Introduction to Mitochondria, Their Structure and Functions”. W *Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Disorders: Second Edition*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28637-2_1.
- Singh, H., M. Li, L. Hall, et al. 2016. „MaxiK Channel Interactome Reveals Its Interaction with GABA Transporter 3 and Heat Shock Protein 60 in the Mammalian Brain”. *Neuroscience* 317 (marca): 76–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.058>.
- Singh, Harpreet, Rong Lu, Jean C. Bopassa, Andrea L. Meredith, Enrico Stefani, i Ligia Toro. 2013. „MitoBK(Ca) Is Encoded by the Kcnma1 Gene, and a Splicing Sequence Defines Its Mitochondrial Location”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (26): 10836–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302028110>.
- Singh, Nishtha, i Sheetu Singh. 2021. „Interstitial Lung Diseases and Air Pollution: Narrative Review of Literature”. *Pulmonary Therapy* 7 (1): 89–100. <https://doi.org/10.1007/s41030-021-00148-7>.

- Singh, Tripti, i Santosh K. Katiyar. 2013. „Green Tea Polyphenol, (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, Induces Toxicity in Human Skin Cancer Cells by Targeting β -Catenin Signaling”. *Toxicology and Applied Pharmacology* 273 (2): 418–24. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.09.021>.
- Soberanes, Saul, Alexander V. Misharin, Amit Jairaman, et al. 2019. „Metformin Targets Mitochondrial Electron Transport to Reduce Air-Pollution-Induced Thrombosis”. *Cell Metabolism* 29 (2): 335–347.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.019>.
- Soltysinska, Ewa, Bo Hjorth Bentzen, Maria Barthmes, et al. 2014. „KCNMA1 Encoded Cardiac BK Channels Afford Protection against Ischemia-Reperfusion Injury”. *PloS One* 9 (7): e103402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103402>.
- Song, Jing, Jun Kang, Bencheng Lin, et al. 2017. „Mediating Role of TRPV1 Ion Channels in the Co-Exposure to PM2.5 and Formaldehyde of Balb/c Mice Asthma Model”. *Scientific Reports* 7 (1): 11926. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11833-6>.
- Srimuruganandam, B., i S. M. Shiva Nagendra. 2012. „Source Characterization of PM10 and PM2.5 Mass Using a Chemical Mass Balance Model at Urban Roadside”. *The Science of the Total Environment* 433 (wrzesnia): 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.082>.
- Stahl, Wilhelm, i Helmut Sies. 2012. „ β -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight”. *The American journal of clinical nutrition* 96 (5): 1179S–1184S.
- St-Pierre, Julie, Stavit Drori, Marc Uldry, et al. 2006. „Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators”. *Cell* 127 (2): 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>.
- Sultana, Bushra, i Farooq Anwar. 2008. „Flavonols (Kaempferol, Quercetin, Myricetin) Contents of Selected Fruits, Vegetables and Medicinal Plants”. *Food Chemistry* 108 (3): 879–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.053>.
- Sun, Hong-shuo, i Zhong-ping Feng. 2013. „Neuroprotective role of ATP-sensitive potassium channels in cerebral ischemia”. *Acta Pharmacologica Sinica* 34 (1): 24–32.
- Szabo, Ildiko, i Adam Szewczyk. 2023. „Mitochondrial Ion Channels”. *Annual Review of Biophysics* 52 (maja): 229–54. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-092622-094853>.
- Szabo, Ildiko, i Mario Zoratti. 2014. „Mitochondrial Channels: Ion Fluxes and More”. *Physiological Reviews* 94 (2): 519–608. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2013>.
- Tang, Si-Min, Xue-Ting Deng, Jian Zhou, Quan-Peng Li, Xian-Xiu Ge, i Lin Miao. 2020. „Pharmacological Basis and New Insights of Quercetin Action in Respect to Its Anti-Cancer Effects”. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 121 (stycznia): 109604. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109604>.
- Testai, L., A. Martelli, A. Marino, et al. 2013. „The Activation of Mitochondrial BK Potassium Channels Contributes to the Protective Effects of Naringenin against

- Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury". *Biochemical Pharmacology* 85 (11): 1634–43. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.018>.
- Thangavel, Prakash, Duckshin Park, i Young-Chul Lee. 2022. „Recent Insights into Particulate Matter (PM_{2.5})-Mediated Toxicity in Humans: An Overview". *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (12): 7511. <https://doi.org/10.3390/ijerph19127511>.
- Traboulsi, Hussein, Nicola Guerrina, Matthew Iu, Dusica Maysinger, Parisa Ariya, i Carolyn J. Baglole. 2017. „Inhaled Pollutants: The Molecular Scene behind Respiratory and Systemic Diseases Associated with Ultrafine Particulate Matter". *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2): 243. <https://doi.org/10.3390/ijms18020243>.
- Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, et al. 1996. „The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å". *Science (New York, N.Y.)* 272 (5265): 1136–44. <https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1136>.
- Unterberger, Ursula, Till Voigtländer, i Herbert Budka. 2005. „Pathogenesis of Prion Diseases". *Acta Neuropathologica* 109 (1): 32–48. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0953-9>.
- Valavanidis, Athanasios, Konstantinos Fiotakis, i Thomais Vlachogianni. 2008. „Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms". *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 26 (4): 339–62. <https://doi.org/10.1080/10590500802494538>.
- Van Den Heuvel, Rosette, Elly Den Hond, Eva Govarts, et al. 2016. „Identification of PM₁₀ Characteristics Involved in Cellular Responses in Human Bronchial Epithelial Cells (Beas-2B)". *Environmental Research* 149 (sierpnia): 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.04.029>.
- Vásquez-Garzón, Verónica R., Jaime Arellanes-Robledo, Rebeca García-Román, Diana I. Aparicio-Rautista, i Saúl Villa-Treviño. 2009. „Inhibition of Reactive Oxygen Species and Pre-Neoplastic Lesions by Quercetin through an Antioxidant Defense Mechanism". *Free Radical Research* 43 (2): 128–37. <https://doi.org/10.1080/10715760802626535>.
- Vomund, Sandra, Anne Schäfer, Michael J. Parnham, Bernhard Brüne, i Andreas von Knethen. 2017. „Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses". *International Journal of Molecular Sciences* 18 (12): 2772. <https://doi.org/10.3390/ijms18122772>.
- Walewska, Agnieszka, Bogusz Kulawiak, Adam Szewczyk, i Piotr Koprowski. 2018. „Mechanosensitivity of Mitochondrial Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels". *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics* 1859 (9): 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.006>.
- Wan, H., H. L. Winton, C. Soeller, et al. 2000. „Tight Junction Properties of the Immortalized Human Bronchial Epithelial Cell Lines Calu-3 and 16HBE14o-". *Original Articles*.

- European Respiratory Journal* 15 (6): 1058–68. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.01514.x>.
- Wang, Ting, Yuka Shimizu, Xiaomin Wu, et al. 2017. „Particulate Matter Disrupts Human Lung Endothelial Cell Barrier Integrity via Rho-Dependent Pathways”. *Pulmonary Circulation* 7 (3): 617–23. <https://doi.org/10.1086/689906>.
- Warren, Cynthia A., Kimberly J. Paulhill, Laurie A. Davidson, et al. 2009. „Quercetin May Suppress Rat Aberrant Crypt Foci Formation by Suppressing Inflammatory Mediators That Influence Proliferation and Apoptosis”. *The Journal of Nutrition* 139 (1): 101–5. <https://doi.org/10.3945/jn.108.096271>.
- Wei, Tingting, i Meng Tang. 2018. „Biological Effects of Airborne Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) Exposure on Pulmonary Immune System”. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 60 (czerwca): 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.004>.
- Weisthal, Shira, Nurit Keinan, Danya Ben-Hail, Tasleem Arif, i Varda Shoshan-Barmatz. 2014. „Ca(2+)-Mediated Regulation of VDAC1 Expression Levels Is Associated with Cell Death Induction”. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (10): 2270–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.021>.
- Wertz, Karin, Petra Buchwald Hunziker, Nicole Seifert, et al. 2005. „β-carotene interferes with ultraviolet light A-induced gene expression by multiple pathways”. *Journal of investigative dermatology* 124 (2): 428–34.
- Wertz, Karin, Nicole Seifert, Petra Buchwald Hunziker, et al. 2004. „β-carotene inhibits UVA-induced matrix metalloprotease 1 and 10 expression in keratinocytes by a singlet oxygen-dependent mechanism”. *Free Radical Biology and Medicine* 37 (5): 654–70.
- Wheaton, William W., i Navdeep S. Chandel. 2011. „Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism”. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300 (3): C385–93. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010>.
- Wong, Sok Kuan, Kok-Yong Chin, i Soelaiman Ima-Nirwana. 2020. „Quercetin as an Agent for Protecting the Bone: A Review of the Current Evidence”. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (17): 6448. <https://doi.org/10.3390/ijms21176448>.
- World Health Organization. 2013. „Health Effects of Particulate Matter: Policy implications for countries in eastern Europe, Caucasus and central Asia”. W *Health effects of particulate matter: policy implications for countries in eastern Europe, Caucasus and central Asia*.
- Xiao, Xiangsheng, Dingbo Shi, Liquan Liu, et al. 2011. „Quercetin Suppresses Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenesis through Inactivation of P300 Signaling”. *PloS One* 6 (8): e22934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022934>.
- Xu, Wenhong, Yongge Liu, Sheng Wang, et al. 2002. „Cytoprotective Role of Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in the Cardiac Inner Mitochondrial Membrane”. *Science (New York, N.Y.)* 298 (5595): 1029–33. <https://doi.org/10.1126/science.1074360>.

- Yankovskaya, Victoria, Rob Horsefield, Susanna Törnroth, et al. 2003. „Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation”. *Science (New York, N.Y.)* 299 (5607): 700–704. <https://doi.org/10.1126/science.1079605>.
- Yokozawa, T., E. Dong, Z. W. Liu, et al. 1997. „Magnesium Lithospermate B Ameliorates Cephaloridine-Induced Renal Injury”. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie* 49 (5): 337–41. [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(97\)80100-5](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(97)80100-5).
- Yoshida, M., E. Muneyuki, i T. Hisabori. 2001. „ATP Synthase--a Marvellous Rotary Engine of the Cell”. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (9): 669–77. <https://doi.org/10.1038/35089509>.
- Yu, Frank H., i William A. Catterall. 2004. „The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis”. *Science's STKE* 2004 (253): re15. <https://doi.org/10.1126/stke.2532004re15>.
- Zajac, Mirosław, i Krzysztof Dolowy. 2017. „Measurement of Ion Fluxes across Epithelia”. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 127 (sierpnia): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.03.003>.
- Zhao, Fuxiaonan, Qingwen Ma, Qing Yue, i Huaiyong Chen. 2022. „SARS-CoV-2 Infection and Lung Regeneration”. *Clinical Microbiology Reviews* 35 (2): e0018821. <https://doi.org/10.1128/cmr.00188-21>.
- Zhen, Ao Xuan, Mei Jing Piao, Yu Jae Hyun, et al. 2019. „Diphlorethohydroxycarmalol Attenuates Fine Particulate Matter-Induced Subcellular Skin Dysfunction”. *Marine Drugs* 17 (2): 95. <https://doi.org/10.3390/md17020095>.
- Zheng, J., i V. D. Ramirez. 2000. „Inhibition of Mitochondrial Proton F0F1-ATPase/ATP Synthase by Polyphenolic Phytochemicals”. *British Journal of Pharmacology* 130 (5): 1115–23. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703397>.
- Zhong, Jia, Oskar Karlsson, Guan Wang, et al. 2017. „B Vitamins Attenuate the Epigenetic Effects of Ambient Fine Particles in a Pilot Human Intervention Trial”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (13): 3503–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618545114>.