



Borsa di studio attivata ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

Titolo del progetto: Sviluppo di nuovi test rapidi per monitoraggio in vivo dello stress ossidativo in organismi modello esposti in condizioni controllate al particolato atmosferico

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo:
BIOLOGIA AMBIENTALE ED EVOLUZIONISTICA

Responsabile scientifico: Dr.ssa Silvia Canepari

Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN

Numero di mensilità da svolgere in azienda: 6

Numero di mensilità da svolgere all'estero: 6 presso Dipartimento di Chimica Università del Cile

Azienda: Dadolab s.r.l., Cinisiello Balsamo (MI)

Il Dipartimento è disponibile a cofinanziare per un importo pari a euro: 10.000,00 euro

Dipartimento finanziatore: DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA AMBIENTALE con delibera del 21/09/2021

Progetto di ricerca:

Il particolato atmosferico (PM), le cui concentrazioni in alcuni territori italiani sono fra le più alte in Europa, è uno degli inquinanti atmosferici più pericolosi per la salute umana e degli ecosistemi. Per questo, un notevole impegno tecnologico e scientifico è dedicato alla riduzione delle concentrazioni e degli effetti sulla salute del PM in ambienti urbani ed industriali. Per ottenere efficaci politiche di riduzione, è comunque essenziale conoscere le principali sorgenti di emissione di PM ed il peso di ciascuna di esse sugli effetti avversi per la salute. Il PM, infatti, è una miscela molto complessa di particelle che possono essere rilasciate in atmosfera sia da fonti naturali che antropiche e le cui caratteristiche chimico-fisiche sono molto eterogenee. Nonostante sia ben riconosciuto che tali caratteristiche abbiano un ruolo primario nell'influenzare la loro tossicità, non esistono ancora prove sufficienti che colleghino ogni caratteristica a specifici effetti sulla salute. E' bene ricordare che il contributo al PM da ciascuna sorgente varia col tempo, essendo fortemente influenzato dalle condizioni meteorologiche. Per ottenere informazioni rappresentative di una determinata area, è quindi necessario monitorare lunghi periodi di tempo e raccogliere ed analizzare un elevato numero di campioni, con conseguente aumento dei costi per il monitoraggio.

L'attivazione di fenomeni di stress ossidativo è considerata uno dei principali meccanismi attraverso il quale il PM genera effetti negativi sugli organismi viventi. Questo è un fenomeno causato da uno sbilanciamento, nelle cellule e nei tessuti, fra produzione e accumulo di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS/RNS) e le difese antiossidanti degli organismi biologici. Lo sbilanciamento fra la produzione e l'eliminazione di ROS/RNS da parte dei sistemi antiossidanti degli organismi viventi può portare a differenti tipi di danno: danni ai lipidi di membrana, danni alle proteine e danni al DNA. Per questa ragione, mantenere un bilancio appropriato fra produzione e rimozione di ROS/RNS negli organismi viventi è essenziale per le loro funzioni vitali.

A causa dell'elevata capacità dello stress ossidativo di alterare le funzioni vitali degli organismi viventi, diversi studi hanno proposto il potenziale ossidativo (PO) come metrica di esposizione, biologicamente rilevante, per stimare la capacità del PM di indurre effetti negativi sugli organismi viventi. Di conseguenza sono state condotte diverse misurazioni sul campo e in laboratorio per l'identificazione delle componenti del PM che manifestino attività ossidativa. Molti di questi studi si basano su saggi acellulari. I metodi acellulari più comuni per la valutazione del PO del particolato sono i saggi con: il Ditiotritolo (DTT), l'Acido Ascorbico (AA) e la 2',7'-diclorofluorescina (DCFH). Questi saggi possono fornirci informazioni sul potenziale ossidativo di diversi campioni di PM in poco tempo e a costi bassi, ma soffrono di bassa sensibilità e non considerano la complessità di un organismo biologico. Anche se questi metodi

sono spesso applicati per prevedere gli effetti biologici del PM, c'è ancora una lacuna nelle conoscenze circa le associazioni fra risultati del PO ottenuti utilizzando questi test e gli effetti sulla salute nel mondo reale. Inoltre, questi diversi saggi forniscono risultati diversi a parità di campione e questo. Pertanto, nessuno di questi metodi può essere considerato a priori rappresentativo delle vie di generazione di ROS/RNS negli organismi biologici.

L'applicazione di metodi basati sull'utilizzo di organismi modello per la valutazione degli effetti da stress indotti da campioni di PM, con differenti caratteristiche chimico-fisiche, potrebbe agevolare la valutazione della capacità effettiva dei test di PO di prevedere gli effetti tossicologici del PM sugli organismi viventi. Inoltre, l'applicazione di questi metodi potrebbe consentire lo sviluppo di nuovi test, rapidi e a bassi costi, che potrebbero sostituire o affiancare i dosaggi di PO. L'uso di organismi modello può inoltre aiutare a capire i meccanismi attraverso i quali ogni fonte di PM genera stress ossidativo nei sistemi biologici.

L'obiettivo principale di questo progetto è pertanto l'ottimizzazione di test rapidi e semplici, applicabili a campagne intensive di monitoraggio della qualità dell'aria, che possano fornire informazioni sulla capacità effettiva del PM di innescare stress ossidativo negli organismi viventi. Per raggiungere questo obiettivo si intende procedere in due fasi. In una prima fase si procederà all'identificazione, attraverso ricerca bibliografica, dei principali marcatori di stress ossidativo e dei migliori organismi modello per lo studio degli effetti da stress generato dall'esposizione al PM. Ad esempio, si prevede di utilizzare *A. thaliana*, una pianta modello ampiamente usata per questo tipo di studi grazie alla facilità con la quale essa può essere cresciuta in condizioni controllate. Inoltre, come riportato in Piacentini et al. 2019, la morfologia e lo sviluppo dell'apparato radicale di *A. thaliana* possono essere gravemente danneggiati da metalli ed elementi tossici associati al PM, con effetti dose-dipendenti. Altri possibili candidati sono *Oryza sativa* o *Nicotiana tabacum* per i quali non è stata ancora studiata la tossicità legata all'esposizione al PM.

Gli organismi modello verranno esposti a differenti polveri certificate standard, somministrate a concentrazioni differenti. L'utilizzo di polveri certificate di particolato urbano (NIST1648a), di diesel (NIST1649a) e di altri tipi di polveri atmosferiche diffuse (polveri dei freni, stradali, di suolo e sahariane, ceneri di pellet e coke dust), con composizioni chimiche e effetti sulla salute molto diversi, ci consentirà di correlare gli effetti ossidativi di determinati componenti del PM con gli organismi modello testati.

Nella seconda fase del progetto, gli organismi modello e i protocolli che si saranno rivelati più affidabili saranno applicati a campagne di misura su campo. Saranno campionate in parallelo un minimo di 50-60 coppie di campioni di PM in siti differenti (ambiente urbano, industriale e siti di background). A questo scopo, la scelta dei dispositivi di campionamento è fondamentale, e sarà necessario adattare i campionatori commerciali. È infatti necessario che la composizione dei campioni di PM non venga alterata durante il campionamento e il tempo di stoccaggio; dovranno quindi essere integrati nei campionatori di PM uno scrubber di ozono e dei regolatori di temperatura. Questa parte del progetto verrà supportata da un'azienda specializzata nello sviluppo di dispositivi per il monitoraggio della qualità dell'aria. Ogni coppia di campioni di PM verrà caratterizzata chimicamente per i macro e micro componenti e per i traccianti selettivi di sorgenti di PM (carbonio organico ed elementare, ioni, elementi, oligoelementi frazionati chimicamente, levoglucosano) al fine di ottenere la ripartizione delle fonti di PM e la chiusura del bilancio di massa chimico. Successivamente, i campioni di PM verranno somministrati agli organismi modello per misurare gli effetti da stress ossidativo. La ripartizione delle fonti di PM è uno degli strumenti più efficienti per la formulazione di migliori strategie di controllo degli inquinanti atmosferici e rappresenta uno strumento importante per identificare il ruolo delle diverse fonti di emissione di particolato. Il data set sarà elaborato da uno strumento statistico (positive matrix factorization) per determinare il contributo di ciascuna fonte identificata al PO e allo stress ossidativo negli organismi viventi. L'obiettivo principale di questo studio è quello di proporre un nuovo approccio per valutare la capacità dei componenti del PM di generare stress ossidativo, che possa essere replicato in altri studi di campo per ottenere una conoscenza più approfondita degli effetti sulla salute dovuti a singole fonti di PM, fornendo informazioni preziose per aiutare i decisori a progettare politiche di risanamento efficaci.

Bibliografia

Kim and al., Environ. Int. 74 (2015) 136.

Crobeddu et al., Environ. Poll. 230 (2017) 125.

Øvrevik et al., Biomolecules 5(3) (2015) 1399

Daellenbach et al. *Nature*, 587(7834) (2020) 414.
Hedayat et al. *Chem. Ind. Chem. Eng. Quar.* 21(1-2) (2015) 201.
Bates et al. *Environ. Sci. Tech.* 53(8) (2019) 4003.
Ficociello et al., *Environ. Res.* 191 (2019) 110209.
Marcoccia et al. *Chemosphere* 173 (2017) 124.
Massimi et al. *Atmos. Res.* 239 (2020) 104904.
Kumagai et al. *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 483–489.

Titolo del progetto (inglese): Development of new cost-effective assays for monitoring oxidative stress in model organisms exposed to particulate matter in in-vivo controlled conditions

Progetto di ricerca (inglese):

Airborne particulate matter (PM), whose concentration in some Italian areas is among the highest in Europe, is one of the air pollutants causing the most serious effects on human health and ecosystems. For this reason, considerable technical and scientific efforts are made to reduce concentrations and health effects of PM in urban and industrial settings. To get to effective reduction policies, it is strictly necessary knowing which are the main sources of PM emission and how much each of them contributes to build up the overall health concerns. PM is in fact a very complex mixture of particles, whose chemical composition and physical characteristic are very heterogeneous, which can be released into atmosphere by both natural and anthropic source. Although it is well recognized that physical and chemical characteristic of particles have a primary influence on their toxicity capabilities, there is not yet sufficient evidence linking each characteristic to specific health outcomes. It is worth noting that the contribute to PM from each source is highly variable with time, being strongly affected by meteorological conditions. To obtain representative information for a given area, long periods should be then monitored, and a high number of PM samples must be collected and analyzed, thus causing very high costs of real-world monitoring campaigns.

The activation of oxidative stress processes is considered one of the main mechanisms by which these effects are generated in organisms exposed to particulate matter. It is a phenomenon caused by an imbalance between the production and accumulation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) in cells and tissues and the ability of the antioxidant defense systems of the biological system to cope with them. In aerobic organisms the presence of oxidizing agents triggers reactions whose main products are the ROS. The imbalance between ROS/RNS production and their detoxification by the antioxidant systems of a living organisms can lead to different types of damages that can be grouped in three categories: damage to membrane lipids, damage to proteins and damage to DNA. For this reason, maintaining a proper balance between the production and the removal of ROS and RNS in living organisms is essential to maintain their vital functions.

Due to the high capability of oxidative stress in altering the vital functions of living organisms, several studies have proposed oxidative potential (OP) as a biologically relevant exposure metric for estimating PM capacity to induce adverse health effects on living organisms. As a result, considerable field and laboratory measurements have been devoted to the identification of PM components, with different physical-chemical, manifesting an oxidative activity. Many of these studies are based on acellular assays. The most commonly used acellular methods for the evaluation of the oxidative potential of PM are: Dithiothreitol (DTT), ascorbic acid (AA), 2,7-dichlorofluorescein (DCFH) and glutathione (GSH). These assays can provide the oxidative potential of several PM samples in a short time and keeping costs relatively low; however, they have a relatively low sensitivity and do not consider the biological complexity of living organisms. Although these methods are frequently applied to predict PM biological effects, there is still a gap of knowledge about the associations between the OP results obtained using these assays and health endpoints. In addition, they provide very different results for the same PM. Therefore, none of the methods can be a-priori considered as representative of ROS and RNS generation pathways in biological organisms.

For this reason, the application of methods based on the employment of model organisms for the evaluation of stress effects induced by PM samples with different physical-chemical characteristics is essential for the assessment of the

effective capacity of the OP assays to predict PM toxicological effects on living organisms. In addition, the application of these methods could allow the development of new cost-effective tests which could replace the OP assays, or which could be combined with these. The use of model organisms may help to understand the mechanisms through which each PM source generates oxidative stress in biological systems.

The main objective of this project is the optimization of rapid and simple tests, applicable to air quality monitoring campaigns, which can provide information on the ability of PM to trigger stress in living organisms. To achieve this objective, it is intended to proceed in two phases. In a first phase, we will proceed with the identification, through bibliographic research, of the main markers of oxidative stress and to the research of the best model organisms for the study of the effects of the stress generated by the exposure to PM. As an example, it is envisaged to use *Arabidopsis thaliana*, a model plant widely used for this type of studies because of its ease of growing in laboratory conditions. In addition, the morphology and development of *A. thaliana* root system may be severely damaged by heavy metals and toxic elements associated with PM, in a dose dependent manner. Other possible plant model candidates are *Oryza sativa* or *Nicotiana tabacum* to which the PM-related toxicity has not been studied yet

Model organisms will be exposed to different standard certified dusts supplied at different concentrations. The use of urban particulate matter (NIST 1648a) and diesel dust (NIST 1649a) certified materials, along with the use of other types of widespread atmospheric dusts (brake dust, pellet ash, road dust, soil dust, coke dust and Saharan dust), characterized by very different chemical compositions as well as by different adverse health effects [15], will allow us to correlate the oxidative effects of selected PM components to the model organisms tested.

In the second phase of the project, the most reliable model organisms and protocols will be applied to field measurement campaigns. A minimum of 50-60 pair of PM samples will be collected in parallel at different sites (urban, industrial and background sites). To this aim, the choice of PM sampling device is very crucial, and the adaptation of commercial samplers will be needed. It is in fact necessary the PM sample composition is not altered during sampling or storage time; ozone scrubber and temperature controllers should be then integrated in the PM samplers. This part of the project will be supported by a company specialized in developing air quality monitoring devices. Each pair of PM samples will be chemically characterized for macro- and micro- components of PM and for selective PM source tracers (organic carbon, elemental carbon, ions, elements, chemically fractionated trace elements, levoglucosan etc.) in order to achieve PM source apportionment and chemical mass balance closure. Then, the same PM samples will be administered to model organisms to measure the oxidative stress outcomes. PM source apportionment is one of the most efficient tools for the formulation of better control strategies for atmospheric pollutant and represent a relevant instrument to identify the role of different particulate matter emission sources. The data set will be elaborated by statistical tool (such as positive matrix factorization) to apportion the contribute of each identified source to OP and to oxidative stress in living organism. Exposure of in situ bioindicators shall be combined with sampling where possible. The main objective of this study is to propose of a new approach for evaluating the ability of PM components in generating oxidative stress, which can be replicated in other field studies to obtain a deeper knowledge of health effects due to individual PM sources, thus furnishing precious information to help decision makers in projecting effective remediation policies.

Bibliography

- Kim and al., *Environ. Int.* 74 (2015) 136.
Crobeddu et al., *Environ. Poll.* 230 (2017) 125.
Øvrevik et al., *Biomolecules* 5(3) (2015) 1399
Daellenbach et al. *Nature*, 587(7834) (2020) 414.
Hedayat et al. *Chem. Ind. Chem. Eng. Quar.* 21(1-2) (2015) 201.
Bates et al. *Environ. Sci. Tech.* 53(8) (2019) 4003.
Ficociello et al., *Environ. Res.* 191 (2019) 110209.
Marcoccia et al. *Chemosphere* 173 (2017) 124.
Massimi et al. *Atmos. Res.* 239 (2020) 104904.
Kumagai et al. *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 483–489.