



# **Biopaliwa II generacji otrzymane w procesie transestryfikacji tłuszczów odpadowych – porównanie cytotoksyczności ich frakcji rozpuszczalnej w wodzie (WSF) na kolejnych pasażach starzejących się komórek *in vitro***

*Katarzyna Miranowicz-Dzierżawska*  
*Centralny Instytut Ochrony Pracy*  
*– Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa*

## **1. Wstęp**

Jednym z zagrożeń, które nabiera w ostatnich latach coraz większego znaczenia jest oddziaływanie na organizmy żywe biopaliw, mających w zamyśle stanowić dodatek lub wręcz alternatywę dla paliw konwencjonalnych.

Pierwsze na świecie silniki spalinowe zasilane były gazem świetlnym (np. Etienne Lenoir 1860, Nicolaus Otto 1876), a więc paliwem zaliczanym obecnie do alternatywnych. Opanowanie w następnych latach technologii wydobywania i przeróbki ropy naftowej oraz jej znaczne zasoby i niska cena spowodowały, że wkrótce praktycznie zaprzestano używania paliw innych niż ropopochodne. Zainteresowanie paliwami alternatywnymi powróciło w latach 70-tych w dobie kryzysu energetycznego i trwa do dziś wobec wzrostu cen paliw konwencjonalnych, doniesień na temat zmniejszających się zasobów ropy naftowej oraz drastycznego ograniczenia limitów emisji substancji szkodliwych, wymuszonego zanieczyszczeniem środowiska i globalnym ociepleniem klimatu.

Wzrost zainteresowania paliwami alternatywnymi, a dokładnie biopaliwami wynika również z przesłanek gospodarczych i politycznych.

Produkcja biopaliw zmniejsza bowiem uzależnienie kraju od importowanej ropy naftowej, a ponadto stwarza możliwość zagospodarowania nadwyżek plonów oraz terenów odłogowanych i skażonych, a co za tym idzie umożliwi tworzenie nowych miejsc pracy (Merkisz i Kozak 2003).

Z drugiej strony, rozwój niekontrolowanego rynku biopaliw doprowadził do 2,5-krotnego wzrostu cen żywności w sytuacji kiedy ponad 1 mld ludzi głoduje. Zakładane wielkoobszarowe plantacje roślin przeznaczonych na biopaliwa, przyczyniają się do poważnych negatywnych zmian w środowisku w krajach rozwijających się. Co gorsze, ich stosowanie w większości przypadków nie przyczynia się do redukcji emisji CO<sub>2</sub> (Pawłowski 2015).

Potrzeba oceny szkodliwego działania biopaliw na organizmy żywe i środowisko stała się jednak obecnie bardzo aktualna, zwłaszcza, że dalszy rozwój rynku biopaliw w Polsce jest uwarunkowany wymaganiami stawianymi przez UE. Zgodnie z dyrektywą 2009/28/WE, udział energii ze źródeł odnawialnych we wszystkich rodzajach transportu w 2020 r. w każdym z państw członkowskich UE będzie musiał wynosić co najmniej 10% końcowego zużycia energii. Konieczność realizacji rosnącego w kolejnych latach wskaźnika minimalnego udziału biokomponentów i innych paliw odnawialnych w ogólnej ilości paliw ciekłych spowoduje wzrost zużycia biokomponentów i biopaliw, a bezpośrednie i pośrednie oddziaływanie biopaliw, na etapie ich produkcji jak i wykorzystania, na organizmy żywe nie jest dostatecznie rozpoznane i trudno obecnie stwierdzić, czy rozwój proekologicznych biopaliw nie będzie miał wpływu na pogorszenie stanu zdrowia ludzi (Skowroń i Golimowski 2015).

Jednocześnie, uwzględnienie w rozpatrywaniu zagrożeń związanych z biopaliwami badań *in vitro* prowadzonych na starzejących się komórkach i porównanie wyników uzyskanych na komórkach młodych i starych, może stać się dobrym punktem wyjścia do dalszych badań oraz oceny ryzyka dla organizmów w różnym wieku, które stają się coraz bardziej celowe ze względu na postępujące starzenie się społeczeństwa.

Komórki dalekich pasaży były dotąd uważane za mało przydatne do badań, ponieważ ich funkcjonowanie jest upośledzone poprzez zmiany typowe dla starzejącego się organizmu. Linie komórkowe uzyskane z normalnych diploidalnych komórek i tkanek mogą być prowadzone tylko przez określony czas. Posiadają one ograniczoną liczbę pokoleń (tzw. okres przeżywania, ang. life-span), czyli możliwa jest tylko okre-

ślona liczba pasaży, co ogranicza możliwość analizy oddziaływania na nie czynników niebezpiecznych. Starzejące się komórki mogą być utrzymywane przy życiu przez długi okres, ale nie będą podlegały indukcji do dzielenia się przez normalne bodźce mitogenne. Wiadomo jednak, że komórki starzejące się mogą wykazywać odmienne właściwości i inną reaktywność na ksenobiotyki niż komórki młode. W badaniach stilbenów (resweratrolu i jego analogów) prowadzonych na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Mikuła-Pietrasik 2011) stwierdzono np., że 3,3',5,5'-tetrahydroksy-trans-stilben pobudzał biogenezę mitochondriów w komórkach młodych, a obniżał w starych. W badaniach Junga i in. (2009) nad uszkodzeniem białek komórkowych pod wpływem stresu oksydacyjnego zaobserwowano, że starzejące się komórki w porównaniu z komórkami młodymi zawierają mniej lizosomów nie zawierających złogów nierozpuszczalnego materiału określanego jako lipofuscyna, której składowymi są m.in. związki zawierające retinoidy o silnych właściwościach fotouwrażliwiających, przyczyniających się do nasilania i propagacji stresu oksydacyjnego. A ponieważ zmiany w komórkach związane ze starzeniem powodują stopniowe zmniejszenie się aktywności komórki i z jednej strony prowadzą do zmniejszenia się potencjalnych możliwości reagowania na czynniki stymulujące, a jednocześnie przestają w nich funkcjonować procesy naprawcze, co rzutuje na ich odpowiedź na działanie ksenobiotyków, tak *in vivo*, jak *in vitro*, celowe wydaje się prowadzenie badań doświadczalnych także i na takich modelach.

Celem niniejszej pracy była zatem ocena wpływu wybranych biopaliw II generacji produkowanych w procesie transestryfikacji tłuszczów odpadowych na ludzkie komórki starzejących się linii komórkowych i porównanie wyników uzyskanych przy narażeniu na te same biopaliwa w analogicznych stężeniach komórek różnego wieku.

## 2. Materiał i metody

### 2.1. Badane biopaliwa, odczynniki i media hodowlane

Przeprowadzono badania czterech biopaliw otrzymanych w reakcji transestryfikacji z: przeterminowanego oleju rzepakowego (BP I), odpadowego tłuszczu zwierzęcego (BP II), roślinnego oleju posmażalniczego (BP III), które zostały wytworzone na skalę laboratoryjną z wyko-

rzystaniem eksperymentalnej linii produkcyjnej, a także z surowego oleju rzepakowego (BP IV), które otrzymano od producenta biopaliw z oleju rzepakowego. Biopaliwo BP II, czyli biopaliwo z tłuszczu zwierzęcego zawierało największe stężenia estrów kwasów tłuszczowych, oznaczone z wykorzystaniem sprzężonych technik chromatografii gazowej z detekcją spektrometrii mas. Stężenie estrów kwasów tłuszczowych w biopaliwie BPI było o 23%, w biopaliwie BPIII o 29%, a biopaliwie BPIV o 78% niższe w stosunku do biopaliwa BPII.

Do badań cytotoksyczności zostały użyte frakcje biopaliw rozpuszczalne w wodzie. Zgodnie z metodą opisaną przez Chou i in. (2003) dla węglowodorów aromatycznych nierozpuszczalnych w wodzie, badane biopaliwa wytrząsano z medium hodowlanym właściwym dla danej linii komórkowej (w stosunku 3:1 (v/v) w kolbach o pojemności 50 ml przez 18 h w temperaturze pokojowej przy prędkości obrotowej 400 rpm. Następnie górną warstwę olejową wraz z powstałą emulsją po odwirowaniu odciągano, a komórki narażano na warstwę medium hodowlanego, będącego roztworem nasyconym estrów kwasów tłuszczowych, które odpowiednio rozcieńczano, przyjmując roztwór badanego biopaliwa w medium jako 100%, aby otrzymać zakres stężeń do ustalenia zależności stężenie-skutek. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w medium hodowlanym pozbawionym ksenobiotyków.

## **2.2. Linie komórkowe**

Badania cytotoksyczności wykonano na dwóch starzejących się liniach komórkowych zakupionych w amerykańskiej kolekcji ATCC (Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych): linii diploidalnych fibroblastów skórnych CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) wyprowadzonej ze skóry pobranej z kończyny dolnej 36-letniego mężczyzny zmarłego w wyniku wypadku motocyklowego oraz linii diploidalnych fibroblastów płucnych CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) wyprowadzonej z tkanki 48-letniego mężczyzny zmarłego w wyniku zakrzepicy naczyń mózgowych.

Do hodowli komórek stosowano: medium hodowlane Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (ATCC® 30-2003™) (nr kat. 30-2003) oraz Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (ATCC® 30-2005™) zakupione za pośrednictwem firmy LGC Standards, wyłącznego europejskiego dystrybutora produktów firmy ATCC; płodową surowicę bydlęcą (Foetal Bovine Serum) (nr kat. 10084-150) firmy Gibco BRL

(Life Technologies Ltd. Paisley, Scotland) oraz roztwór trypsyny (0,25%) i EDTA (nr kat. T-4049) firmy Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo USA).

### 2.3. Metody oceny cytotoksyczności

Do oceny cytotoksycznego działania badanych ekstraktów biopaliw zastosowano następujące metody: test redukcji soli tetrazolowej MTT określający aktywność metaboliczną komórek (test MTT) oraz test pochłaniania czerwieni obojętnej oceniający integralność błon komórkowych (test NRU) (Neutral Red Uptake Assay).

Test MTT polega na ocenie aktywności metabolicznej komórek wyrażonej zdolnością pochłaniania barwnika – żółtej soli tetrazolowej (MTT) i redukcji go głównie w mitochondriach, przy udziale dehydrogenazy bursztynianowej do związku formazanowego o fioletowo - granatowym zabarwieniu. Komórki poddaje się najpierw działaniu szeregu różnych stężeń badanej substancji, a następnie inkubuje się w roztworze MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazolu]. Stężenie zredukowanego przez żywe komórki barwnika, po rozpuszczeniu w DMSO, oznacza się kolorymetrycznie. Na podstawie uzyskanych wyników określa się stężenie badanej substancji powodujące spadek aktywności metabolicznej komórek o 50% w porównaniu z kontrolą ( $IC_{50}$ ).

Zasada testu NRU jest oparta na zdolności żywych, nieuszkodzonych komórek do pochłaniania barwnika - czerwieni obojętnej (chlorowodorek 3-amino-7-dimetylo-amino-2-metylofenazyny), który gromadzi się w lizosomach. Najpierw komórki poddaje się działaniu różnych stężeń badanej substancji przez określony czas, a następnie po jej usunięciu, komórki inkubuje się przez 3 h w roztworze barwnika w medium hodowlanym. Następnie niszczy się błony komórkowe nieuszkodzonych komórek w celu uwolnienia barwnika. Stężenie barwnika oznacza się kolorymetrycznie. Na podstawie uzyskanych wyników określa się stężenie badanej substancji hamujące zdolność komórek do absorbowania barwnika o 50% w porównaniu z kontrolą ( $IC_{50}$ ).

Wartości  $IC_{50}$  dla każdego związku obliczono stosując program komputerowy wykorzystujący interpolacje krzywymi (logistyka czteroparametrowa) Gen5™ Data Analysis, firmy BIO-TEK INSTRUMENTS, INC.

## **2.4. Metodyka analiz statystycznych wyników**

Z uwagi na występowanie w eksperymencie dwóch czynników: pasaż i stężenie substancji, w analizie danych wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji. Dodatkowo oceniano efekty proste, tzn. porównywano wartości żywotności komórek między pasażami w poszczególnych stężeniach. W porównaniach tych stosowano testy porównań wielokrotnych, aby ocenić różnice między konkretnymi pasażami. Do testowania ogólnych hipotez w analizie wariancji wykorzystywany był test F-Snedecora, a w porównaniach wielokrotnych dla efektów prostych test Bonferroniego.

## **3. Wyniki**

Uzyskane wartości  $IC_{50}$  dla badanych biopaliw na ludzkich fibroblastach skórnych i płucnych przedstawiono odpowiednio w tabeli 1 i 2. Najbardziej cytotoksyczny (osiągający najniższe wartości  $IC_{50}$ ) dla komórek obu typów okazał się ekstrakt wodny biopaliwa otrzymanego z odpadowego tłuszczu zwierzęcego (BPII), w którym oznaczono największe stężenie estrów kwasów tłuszczowych. Z kolei najmniej cytotoksyczna była frakcja wodna biopaliwa otrzymanego z surowego oleju rzepakowego (BPIV) o najmniejszej zawartości estrów kwasów tłuszczowych.

Rozpatrując porównanie cytotoksycznego działania biopaliw na młodsze i starsze pasażę komórkowe oceniane testami MTT i NRU stwierdzono, że badane biopaliwa działały słabiej na komórki CC-1136Sk wczesnych pasaży (komórki młode charakteryzowały się większą odpornością na cytotoksyczne działanie badanych biopaliw), co było szczególnie widoczne w środkowym zakresie stosowanych stężeń. W miarę starzenia się komórek występowało zjawisko ich zwiększonej wrażliwości na działanie badanych biopaliw. Wyraźne zwiększenie toksycznego działania biopaliw na starsze komórki w porównaniu z ich oddziaływaniem na komórki młodsze zaobserwowano przy narażeniu komórek na wszystkie badane biopaliwa II generacji: BPI, BPII (rys. 1 i 2) oraz BPIII. Tendencję nasilenia działania cytotoksycznego badanych biopaliw na komórki w miarę ich starzenia się zaobserwowano również w przypadku narażenia komórek CCD-8Lu na BPI, BPIII i BPIV. Należy jednak podkreślić, że z kolei analiza przebiegu krzywych zależności żywotności komórek CCD-8Lu od stężenia biopaliwa BPII ocenianej te-

stem MTT (rys. 3) wskazuje, iż fibroblasty płucne w miarę starzenia się mogą także stawać się mniej wrażliwe (zjawisko odwrotne niż w przypadku fibroblastów pochodzenia skórniego).

**Tabela 1.** Wartości  $IC_{50}$  wyznaczone dla badanych frakcji wodnych biopaliw na kolejnych pasażach komórek CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) w teście MTT i NRU. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe z trzech niezależnych eksperymentów; „-”, – brak możliwości wyznaczenia wartości  $IC_{50}$  ze względu na śmierć wszystkich badanych komórek

**Table 1.** The  $IC_{50}$  values of water soluble fraction of tested biofuels appointed on consecutive passages of CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) cells in the MTT and NRU assays. Each value represents the mean ( $\pm$  standard deviation) of three independent experiments; “-“ – no possibility of  $IC_{50}$  value determination due to the death of all tested cells

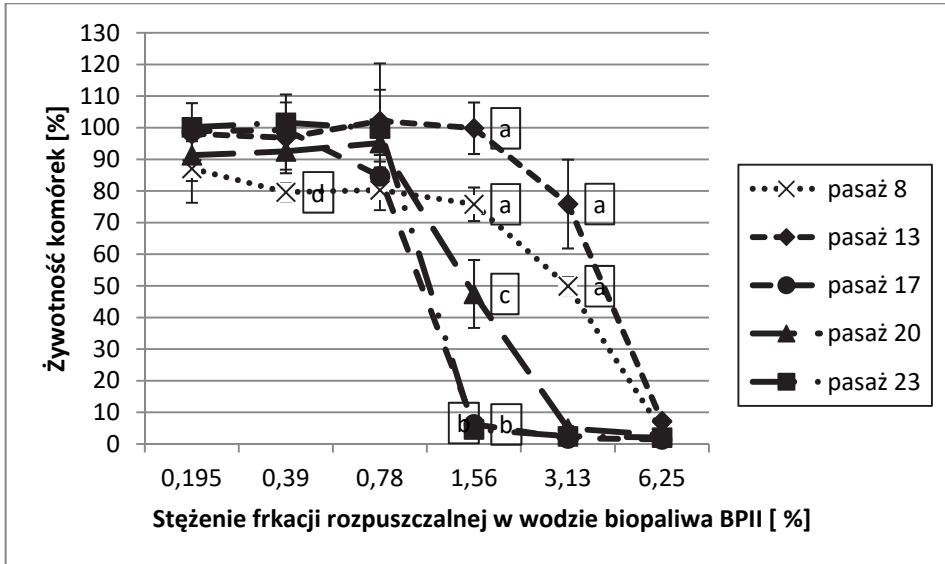
Numer pasażu	Wartość $IC_{50}$ [% frakcji wodnej biopaliwa w medium hodowlanym]							
	BPI		BPII		BPIII		BPIV	
	MTT	NRU	MTT	NRU	MTT	NRU	MTT	NRU
pasaż 8	12,15 $\pm$ 0,17	8,94 $\pm$ 0,88	3,16 $\pm$ 0,06	2,78 $\pm$ 0,06	5,06 $\pm$ 0,31	3,78 $\pm$ 0,57	25,83 $\pm$ 1,16	18,01 $\pm$ 0,41
pasaż 13	12,52 $\pm$ 0,01	9,56 $\pm$ 1,59	3,80 $\pm$ 0,94	2,80 $\pm$ 0,30	4,66 $\pm$ 0,40	3,82 $\pm$ 0,71	26,51 $\pm$ 0,61	16,23 $\pm$ 0,51
pasaż 17	2,81 $\pm$ 0,22	2,02 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,00	0,92 $\pm$ 0,00	–	–	19,58 $\pm$ 0,10	14,30 $\pm$ 0,01
pasaż 20	5,69 $\pm$ 0,37	4,46 $\pm$ 0,15	1,55 $\pm$ 0,01	1,45 $\pm$ 0,00	–	–	10,08 $\pm$ 1,80	5,76 $\pm$ 0,00
pasaż 23	3,61 $\pm$ 0,13	2,95 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,17	1,41 $\pm$ 0,00	–	–	18,37 $\pm$ 0,04	14,69 $\pm$ 0,48

**Tabela 2.** Wartości  $IC_{50}$  wyznaczone dla badanych frakcji wodnych biopaliw na kolejnych pasażach komórek CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) w teście MTT I NRU. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe z trzech niezależnych eksperymentów; „-”, – brak możliwości wyznaczenia  $IC_{50}$  ze względu na śmierć wszystkich badanych komórek

**Table 2.** The  $IC_{50}$  values of water soluble fraction of tested biofuels appointed on consecutive passages of CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) cells in the MTT and NRU assays. Each value represents the mean ( $\pm$  standard deviation) of three independent experiments

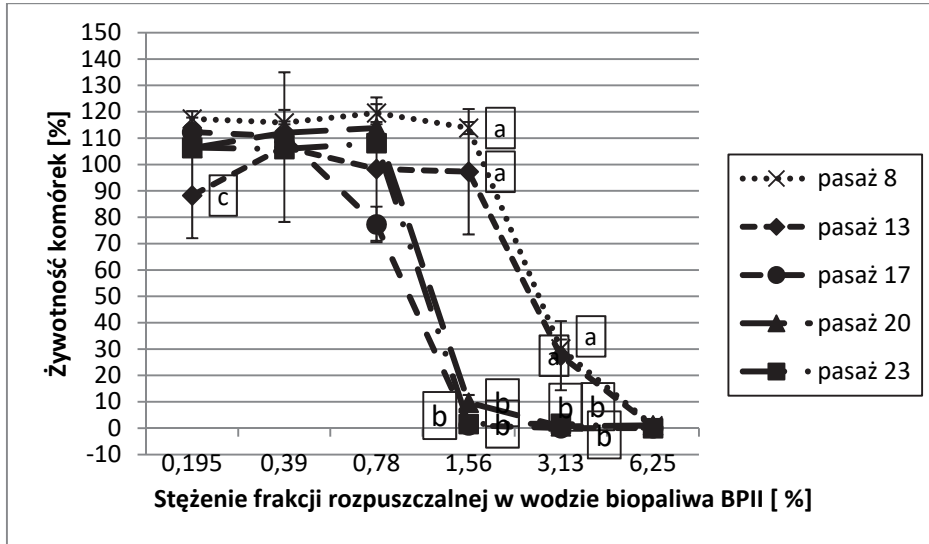
Numer pasażu	Wartość $IC_{50}$ [% frakcji wodnej biopaliwa w medium hodowlanym]							
	BPI		BPII		BPIII		BPIV	
	MTT	NRU	MTT	NRU	MTT	NRU	MTT	NRU
pasaż 15	–	–	3,57 $\pm$ 0,36	4,11 $\pm$ 0,06	7,28 $\pm$ 0,09	7,65 $\pm$ 0,25	29,80 $\pm$ 0,40	27,63 $\pm$ 1,35
pasaż 17	10,70 $\pm$ 1,16	8,05 $\pm$ 1,35	2,69 $\pm$ 0,27	2,77 $\pm$ 0,17	5,58 $\pm$ 0,11	4,03 $\pm$ 1,04	26,16 $\pm$ 0,40	25,16 $\pm$ 0,47
pasaż 22	15,39 $\pm$ 0,43	9,89 $\pm$ 0,83	4,13 $\pm$ 0,37	3,34 $\pm$ 0,25	5,20 $\pm$ 0,48	3,38 $\pm$ 0,04	22,62 $\pm$ 1,70	17,18 $\pm$ 0,57
pasaż 26	8,37 $\pm$ 0,32	7,88 $\pm$ 0,50	2,69 $\pm$ 0,27	2,04 $\pm$ 0,01	3,27 $\pm$ 0,01	–	24,51 $\pm$ 0,46	16,41 $\pm$ 0,05





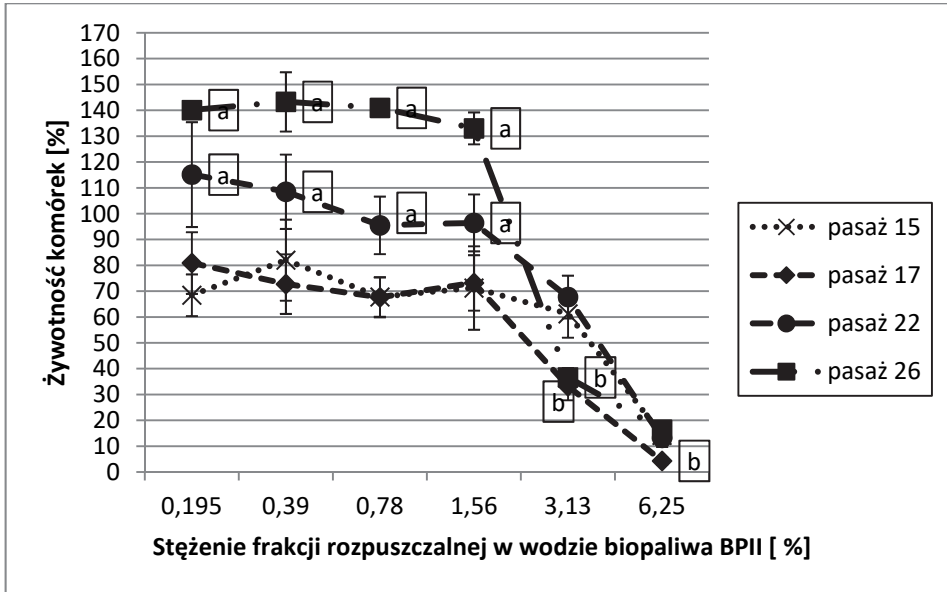
**Rys. 1.** Wpływ frakcji rozpuszczalnej w wodzie BP II na żywotność komórek CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) ocenianą testem MTT. Każdy punkt reprezentuje średnią i odchylenie standardowe z 9 pomiarów w 3 niezależnych eksperymentach. Zaznaczono średnie istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ); a – średnie w pasażach 8 i 13 są istotnie wyższe niż w pasażach późniejszych; b – średnie w pasażu 17 i 23 są istotnie mniejsze niż średnie w pozostałych pasażach; c – średnia pasażu 20 różni się istotnie od średnich pozostałych pasaży; d – średnia pasażu 8 jest istotnie mniejsza od pozostałych, które nie różnią się między sobą

**Fig. 1.** The impact of water-soluble fraction of BPII on CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) cells viability in MTT assay. Each point represents the mean ( $\pm$  standard deviation, SD) of three independent experiments, each performed in triplicate. Only statistically significant differences are marked ( $P < 0.05$ ); a – the means in the passages 8 and 13 are significantly higher than in the subsequent passages; b – the means in the passage 17 and 23 are significantly lower than the means in other passages; c – the mean in the passage 20 differ significantly from means of other passages; d – the mean of passage 8 is significantly lower than means of other passages



**Rys. 2.** Wpływ frakcji rozpuszczalnej w wodzie BP II na żywotność komórek CCD-1136Sk (ATCC<sup>®</sup> CRL-2697<sup>TM</sup>) ocenianą testem NRU. Każdy punkt reprezentuje średnią i odchylenie standardowe z 9 pomiarów w 3 niezależnych eksperymentach. Zaznaczono średnie istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ); a – średnie w pasażach 8 i 13 są istotnie wyższe niż w pasażach późniejszych; b – średnie w pasażu 17, 20 i 23 są istotnie mniejsze niż średnie we wcześniejszych pasażach; c – średnia pasażu 13 jest istotnie mniejsza od pozostałych, które nie różnią się między sobą

**Fig. 2.** The impact of water-soluble fraction of BPII on CCD-1136Sk (ATCC<sup>®</sup> CRL-2697<sup>TM</sup>) cells viability in NRU assay. Each point represents the mean ( $\pm$  standard deviation, SD) of three independent experiments, each performed in triplicate. Only statistically significant differences are marked ( $P < 0.05$ ); a – the means in the passages 8 and 13 are significantly higher than in the subsequent passages; b – the means in the passage 17, 20 and 23 are significantly lower than the means in earlier passages; c – the mean of passage 13 is significantly lower than means of other passage.



**Rys. 3.** Wpływ frakcji rozpuszczalnej w wodzie BP II na żywotność komórek CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) ocenianą testem MTT. Każdy punkt reprezentuje średnią i odchylenie standardowe z 9 pomiarów w 3 niezależnych eksperymentach. Zaznaczono średnie istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ); a – średnie w pasażach 22 i 26 są istotnie wyższe niż w pasażach wcześniejszych; b – średnie w pasażach 17 i 26 nie różniąc się między sobą, są istotnie mniejsze niż średnie w pozostałych pasażach

**Fig. 3.** The impact of water-soluble fraction of BP II on CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) cells viability in MTT assay. Each point represents the mean ( $\pm$  standard deviation, SD) of three independent experiments, each performed in triplicate. Only statistically significant differences are marked ( $P < 0.05$ ); a – the means in the passages 22 and 26 are significantly higher than means in the earlier passages; b – the means in the passages 17 and 26 are significantly lower than the means in other passages

## 4. Dyskusja

W pracy zostały przeprowadzone badania porównawcze *in vitro* wrażliwości późnych, przyjętych jako model starzejącego się organizmu, oraz wczesnych pasażerów ludzkich komórek diploidalnych na cytotoksyczne działanie frakcji rozpuszczalnej w wodzie czterech biopaliw.

Została oceniona cytotoksyczność ww. frakcji biopaliw, które zostały otrzymane w procesie transestryfikacji tłuszczów odpadowych, takich jak: przeterminowany olej rzepakowy (BP I), odpadowy tłuszcz zwierzęcy (BP II), roślinny olej posmażalniczy (BP III), a także surowego oleju rzepakowego (BP IV).

Ze względu na niebezpieczeństwo asfiksji komórek, do której mogłoby dojść przy narażeniu ich na biopaliwa jako takie, komórki narażano na frakcję otrzymaną przez wytrząsanie każdego z biopaliw z medium hodowlanym właściwym dla danej linii komórkowej w stosunku 3:1 (v/v) przez 18 h, zgodnie z metodą opisaną przez Chou i in. (2003). Analizie poddawano więc tę część biopaliw, która w wyniku wielogodzinnego wytrząsania była w stanie rozpuścić się lub ulec dyspersji w warstwie medium hodowlanego opartego na wodzie. Jest to powszechną praktyką (Fakness i in. 2015, Hansen i in. 2011, Holth i in. 2014, Jiang i in. 2010, Lei i in. 2016, Perrichon i in. 2016, Won i in. 2013) przy ocenie preparatów słabo rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie. Niektórzy autorzy piśmiennictwa temu uzyskaną w ten sposób warstwę określają mianem „water accommodated fraction (WAF)” w odróżnieniu od „frakcji rozpuszczalnej w wodzie, water soluble fraction (WSF)”, gdyż WAF może zawierać także małe krople oleju i niewielkie stężenia związków w nim rozpuszczalnych (Bluhm i in. 2016). W niniejszej pracy uzyskana warstwa została nazwana „frakcją rozpuszczalną w wodzie”. Toksyczność BPII i BPIV określona na podstawie uzyskanych wartości  $IC_{50}$  była odzwierciedleniem zawartości w nich estrów kwasów tłuszczowych: najbardziej cytotoksyczny okazał się ekstrakt wodny BPII, w którym oznaczono największe stężenie estrów kwasów tłuszczowych, podczas gdy najmniej cytotoksyczny był ekstrakt BPIV o najmniejszej zawartości tych związków.

Trzeba zaznaczyć, że istniejące w literaturze wyniki badań dotyczących zarówno toksyczności, jak i ekotoksyczności biopaliw różnią się w szerokim zakresie, także w porównaniu z paliwami konwencjonalnymi-

mi. Niektóre wyniki badań działania ostrego biopaliw, jak również mechanizmów ich toksycznego działania wskazują na słabsze lub porównywalne z tradycyjnym paliwem diesla skutki działania, inne badania natomiast pokazują szereg negatywnych skutków zarówno działania samego biopaliwa, jak i produktów jego emisji (Leite i in. 2011).

W niniejszej pracy w składzie najbardziej toksycznego dla ludzkich fibroblastów pochodzących z tkanki płucnej oraz skóry biopaliwa (BPII), otrzymanego z odpadowego tłuszczu zwierzęcego, przeważają nasycone kwasy tłuszczowe, m.in.: kwas kaprynowy, laurynowy, stearynowy i palmitynowy, natomiast najmniej toksyczne biopaliwo otrzymane z surowego oleju rzepakowego (BPIV) zawiera głównie kwasy jednonienasycone: kwas oktadekenowy i eikozenowy. Z kolei Ruffing i Trahan (Ruffing & Trahan 2014) w badaniach na trzech modelach szczepów sinic: *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803 oraz *Synechococcus* sp. PCC 7002 stwierdzili, że alkohole krótkołańcuchowe: etanol i izobutanol hamowały wzrost wszystkich trzech szczepów, natomiast toksyczność długołańcuchowych wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) była zależna od stopnia uwodornienia wiązań. Kwasy nasycone: kwas heksadekanowy (palmitynowy) i oktadekanowy (stearynowy), nie wykazywały efektu hamującego na wzrost żadnego z badanych modeli sinic, podczas gdy kwas wielonienasycony:  $\alpha$ -linolenowy (zawierający trzy wiązania podwójne) hamował wzrost komórek w przypadku wszystkich trzech cyjanobakterii. Stwierdzono, że długołańcuchowe alkohole, nasycone kwasy tłuszczowe oraz alkany/alkeny wpływały w sposób znikomy na wzrost i fizjologię sinic. Wyniki uzyskane przez Ruffing i Trahan (2014) wskazują, że za toksyczność krótkołańcuchowych alkoholi oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych są odpowiedzialne różne mechanizmy działania. Wykazano ponadto, że toksyczność biopaliw może być obserwowana w stężeniach przekraczających ich granice rozpuszczalności, co mogło mieć znaczenie również w badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy.

Leite i in. (2011) w badaniach toksyczności frakcji rozpuszczalnych w wodzie (WSF) trzech paliw biodiesla uzyskanych w procesie transestryfikacji metanolem oleju rycynowego (CO), oleju palmowego (PO) i zużytego oleju spożywczego (WCO) na algach i jeżowcach stwierdzili, że najbardziej toksyczne okazało się biopaliwo z oleju rycynowego, zawierające głównie estry kwasu (R)-12-hydrokso-(Z)-9-

oktadekenowego zwanego zwyczajowo rycynolowym, a najmniej toksyczne paliwo z oleju palmowego, którego głównym składnikiem są kwasy nasycone: kwas palmitynowy i oleinowy (Kowalska i in. 2012).

W interpretacji wyników badań należy brać pod uwagę również pochodzenie surowca do produkcji biopaliw – w badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy za toksyczność biopaliwa BPIII z roślinnego oleju posmażalniczego odpowiadać mogą jego zanieczyszczenia powstałe podczas używania oleju w gastronomii, podczas smażenia. Podobnie, Leme i in. (2012) stwierdzili mutagenne i genotoksyczne działanie rozpuszczalnej w wodzie frakcji biodiesla, ale uzyskanych wyników nie łączą z działaniem biodiesla jako takiego, ale z obecnością zanieczyszczeń wtórnych, pochodzących z surowca do jego produkcji, szczególnie soi. Należy pamiętać, że produktami termicznego rozkładu olejów posmażalniczych mogą być wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) o działaniu mutagennym, kancerogennym i genotoksycznym, a nawet mogą one występować w olejach i tłuszczach jadalnych niepoddawanych obróbce termicznej. Ich obecność może być już konsekwencją procesów przetwarzania roślin oleistych (suszenia surowców roślinnych przed właściwą ekstrakcją oraz użycia zanieczyszczonych rozpuszczalników ekstrakcyjnych (Ciecierska i Obiedziński, 2006).

Rozpatrując porównanie wrażliwości na cytotoksyczne działanie biopaliw młodszych pasaży komórkowych z pasażami starszymi stwierdzono, że komórki CC-1136Sk wczesnych pasaży charakteryzowały się większą odpornością na cytotoksyczne działanie badanych biopaliw, co było szczególnie widoczne w środkowym zakresie stosowanych stężeń ksenobiotyków. Natomiast w miarę starzenia się komórek występowało zjawisko ich zwiększonej wrażliwości na działanie badanych biopaliw. Wyraźne zwiększenie wrażliwości starszych pasaży komórkowych zaobserwowano przy narażeniu komórek na BPI, BPII (rys. 1 i 2) i BPIII. Tendencję wzrostu wrażliwości komórek na działanie badanych biopaliw w miarę ich starzenia się zaobserwowano również w przypadku narażenia komórek CCD-8Lu na BPI, BPIII i BPIV.

Obserwowany wzrost wrażliwości komórek starszych na działanie ksenobiotyków wynikać może z upośledzenia mechanizmów obronnych, nagromadzenia produktów przemiany materii czy skutków narażenia komórek np. na stres oksydacyjny.

Należy podkreślić, że z kolei analiza przebiegu krzywych zależności żywotności komórek CCD-8Lu od stężenia biopaliwa BPII ocenianej testem MTT (rys. 3) wskazuje, iż fibroblasty płucne w miarę starzenia się mogą także stawać się mniej wrażliwe (zjawisko odwrotne niż w przypadku fibroblastów pochodzenia skórniego).

Wyniki uzyskane w niniejszym projekcie potwierdzają konstatacje wielu autorów piśmiennictwa tematu o niejednorodności i zmienności wyników badań prowadzonych na komórkach różnego wieku czy pochodzenia. Przegląd literatury na temat wpływu numeru pasaży na linie komórkowe wskazuje, że wpływ ten jest złożony i silnie zależny od wielu czynników, takich jak typ linii komórkowej, tkanka i gatunek jej pochodzenia, warunki hodowli (temperatura, pH, właściwe media i dodatki hodowlane czy powierzchnia wzrostowa) oraz zastosowania, do których dana linia komórkowa jest używana. Stwierdzono na przykład (niepublikowane dane ATCC), że starsze pasaże komórek Caco-2 wykazywały wzrost ekspresji genu białka reporterowego GFP (zielone białko fluorescencyjne) po transfekcji, podczas gdy starsze pasaże linii MCF7 w porównaniu z młodszymi wykazują spadek poziomów GFP (Tech Bulletin of ATCC 2010).

Zaobserwowana w niniejszych badaniach odmienna reaktywność fibroblastów pochodzących z różnych anatomicznie miejsc na cytotoksyczne działanie tych samych ksenobiotyków jest spójna z badaniami Chang i in. (2002), którzy badali różnice na 50 pierwotnych liniach komórkowych fibroblastów wyprowadzonych z 10 miejsc u 16 dawców i obserwowali znaczące różnice między nimi.

Podobnie różną reaktywność komórek w zależności od ich pochodzenia stwierdzili Hetzel i in. (2005), którzy zaobserwowali, że fibroblasty pochodzące z płuc prawidłowych oraz płuc objętych włóknieniem różnią się pod względem reakcji na czynniki wzrostu.

W badaniach Palaiologou i in. (2001) badane trzy rodzaje fibroblastów zachowywały się inaczej i charakteryzowały się różną ekspresją receptorów macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM).

Wykazano także (Gron i in. 2002), że fibroblasty pochodzące z błony śluzowej jamy ustnej proliferują szybciej i mają większą zdolność podwojeń populacji niż fibroblasty skórne. Stwierdzono, że fibroblasty pochodzące z błony śluzowej jamy ustnej wydzielają więcej czyn-

nika wzrostu hepatocytów (HGF) oraz keratynocytów (KGF) niż fibroblasty skórne.

Nawet w komórkach linii ustalonych (unieśmiertelnionych), które są utrzymywane przez długi okres czasu mogą występować mutacje, które zmieniają charakterystykę komórek, jaka była stwierdzona we wczesnych pasażach danej linii (Wenger i in. 20014). Stwierdzono m.in. zmiany (aberracje) w kariotypie komórek (zestaw chromosomów komórki): duplikacje (powielenia odcinka chromosomu) oraz powielenia całych chromosomów. Autorzy podkreślają, że potwierdzenie pochodzenia linii komórkowej, jak również dokładna jej charakterystyka (z podaniem numeru pasażu) jest warunkiem niezbędnym do uzyskiwania wiarygodnych wyników doświadczeń, które tylko pod tym warunkiem mogą być przydatne dla innych badaczy.

Numer pasażu, przy którym dochodzi do zmian w komórkach jest charakterystyczny dla danej linii komórkowej. Dla komórek zarodka chomika syryjskiego (SHE) stwierdzono (Chang-Liu i Woloschak 1997) „kryzys” pojawiający się przy pasażu nr 37 i trwający do pasażu 49, który charakteryzował się gwałtownymi zmianami liczby kolonii powstających z pojedynczej komórki („plating efficiency”) oraz zmianami parametrów wzrostu komórek. W badaniach prowadzonych w ramach niniejszego projektu zjawisko zahamowania proliferacji zarówno komórek CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697<sup>TM</sup>), jak i CCD-8Lu (ATCC® CCL-201<sup>TM</sup>) obserwowano przy pasażu nr 27.

Chipev i Simon (2002) stwierdzili, że fibroblasty pochodzące z różnych miejsc ciała mogą różnić się wielkością: fibroblasty pochodzące ze skóry dłoni są mniejsze niż fibroblasty pochodzące ze skóry owłosionej. W przypadku niniejszego projektu takich różnic w odniesieniu do badanych fibroblastów wyprowadzonych z tkanki płucnej oraz skóry w obrazie mikroskopowym (Nikon TMS-F, 100x) nie obserwowano.

Ponadto, badania przeprowadzone w laboratorium Sorrell i Caplan (2004) wskazują na istnienie różnych morfologicznych i biochemicznych fibroblastów pochodzących nawet z tej samej tkanki. Dwie główne populacje fibroblastów wykryto w skórze, płucach i nerkach: mitotycznie czynne, tj. replikacyjne fibroblasty progenitorowe (MF) oraz postmitotyczne fibrocyty (PMF).

Również i badania Schneider i in. (1977) fibroblastów pochodzących ze skóry i płuc tych samych płodów ludzkich wykazały istotne róż-



nice *in vitro*. Fibroblasty z płuc w porównaniu z fibroblastami skórnymi charakteryzowały się większą szybkością replikacji komórek, większym wbudowywaniem [<sup>3</sup>H]tymidyny do DNA, większą liczbą komórek w konfluencji, mniejszą objętością, oraz mniejszą zawartością komórkowego RNA oraz białek. Ponadto, hodowle te reagowały odmiennie na dodanie hydrokortyzonu do pożywki hodowlanej.

Wszystkie przedstawione obserwacje wskazują, iż nawet pomimo podobieństwa morfologicznego fibroblasty pochodzące z różnych tkanek może przejawiać różnice w ich zachowaniu w hodowli tkankowej, jak również odpowiedzi na oddziaływanie ksenobiotyków, co znalazło odzwierciedlenie także w wynikach niniejszej pracy.

Podsumowując można stwierdzić, że bezpośrednio i pośrednio oddziaływanie na organizmy żywe (w tym starzejące się) biopaliw na etapie ich produkcji jak i wykorzystania nie jest dostatecznie rozpoznane. Biorąc pod uwagę, że nie można wykluczyć ryzyka dla zdrowia człowieka i środowiska związanego z wyciekami czy nawet stosowaniem biopaliw konieczne są dodatkowe badania eksperymentalne, aby zapewnić bardziej kompleksowy zestaw danych do identyfikacji przyszłych alternatywnych paliw o niskim wpływie na człowieka i środowisko (Bluhm i in. 2012). Jest to szczególnie istotne, zwłaszcza biorąc pod uwagę, że dalszy rozwój rynku biopaliw w Polsce jest uwarunkowany wymaganiami stawianymi przez UE. Dodatkowo, z analizy piśmiennictwa tematu wynika, że istnieje istotna różnica pomiędzy toksycznością samych paliw (i kopalnych, i biopaliw) jako takich, a toksycznością produktów ich spalania. Zagadnienie to powinno być brane pod uwagę przy kompleksowej ocenie ryzyka związanej ze stosowaniem biopaliw.

Przedstawione powyżej przykłady różnic obserwowanych przez autorów piśmiennictwa przedmiotu, jak również uzyskanych w niniejszej pracy, wskazują na niezwykle złożony charakter reaktywności komórek wynikający zarówno z ich wieku, jak i tkanki, z której zostały wyprowadzone. Konieczne zatem jest uwzględnianie przy interpretacji wyników badań nad oddziaływaniem ksenobiotyków na żywy organizm również możliwości odmiennej reaktywności komórek starszych i młodszych, co może znajdować też odzwierciedlenie w funkcjonowaniu osób starszych i młodszych zatrudnionych w przemyśle.

Opracowano w ramach III etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2014-2016 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy  
– Państwowy Instytut Badawczy.

## Literatura

- Bluhm, K., Heger, S., Seiler, T.-B., Hallare, A.V., Schäffer, A., Hollert, H. (2012) Toxicological and ecotoxicological potencies of biofuels used for the transport sector: a literature review. *Energy Environ. Sci.*, 5, 7381-7392. <https://doi.org/10.1039/c2ee03033k>
- Bluhm, K., Seiler, T.-B., Nico Anders, N., Klankermayer, J., Schaeffer, A., Hollert, H. (2016) Acute embryo toxicity and teratogenicity of three potential biofuels also used as flavor or solvent. *Science of the Total Environment*, 566-567, 786-795. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.055>
- Chang, H.Y., Chi, J.T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., et al. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99, 12877-82. <https://doi.org/10.1073/pnas.162488599>
- Chang-Liu, C.M., Woloschak, G.E. (1997). Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Letters*, 26(113), 77-86. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)04599-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)04599-0)
- Chipev, C. C., Simon, M. (2002). Phenotypic differences between dermal fibroblasts from different body sites determine their responses to tension and TGFbeta1. *BMC Dermatol.*, 2, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-5945-2-13>
- Chou, C. C., Riviere, J. E., Monteiro-Riviere, N. A. (2003). The cytotoxicity of jet fuel aromatic hydrocarbons and dose-related interleukin-8 release from human epidermal keratinocytes. *Arch Toxicol.*, 77, 384-391. <https://doi.org/10.1007/s00204-003-0461-z>
- Ciecierska, M., Obiedziński, M. (2006). Zanieczyszczenie olejów roślinnych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2(47) Supl., 48-55.
- Fakness, L-G., Altin, D., Nordtug, T., Daling, P.S., Hansen, B.H. (2015). Chemical comparison and acute toxicity of water accommodated fraction (WAF) of source and field collected Macondo oils from the Deepwater Horizon spill. *Marine Pollution Bulletin*, 91(1), 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.002>

- Gron, B., Stoltze, K., Andersson, A., Dabelsteen, E. (2002). Oral fibroblasts produce more HGF and KGF than skin fibroblasts in response to co-culture with keratinocytes. *APMIS*. 110, 892-898. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2002.1101208.x>
- Hansen, B.H., Altin, D., Rørvik, S.F., Øverjordet, I.B., Olsen, A.J., Nordtug T. (2011). Comparative study on acute effects of water accommodated fractions of an artificially weathered crude oil on *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* (Crustacea: Copepoda). *Science of The Total Environment*, 409, 4, 704-709. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.035>
- Hetzel, M., Bachem, M., Anders, D., Trischler, G., Faehling, M. (2005). Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung*. 183, 225-237. <https://doi.org/10.1007/s00408-004-2534-z>
- Holth, T.F., Eidsvoll, D.P., Farmen, E., Sanders, M.B., Martínez-Gómez, C., Budzinski, H., Burgeot, T., Guilhermino, L., Hylland, K. (2014). Effects of water accommodated fractions of crude oils and diesel on a suite of biomarkers in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat Toxicol.*, 154, 240-252. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.013>
- Jiang, Z., Huang, Y., Xu, X., Liao, Y., Shou, L., Liu, J., Chen, Q., Zeng J. (2010). Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. *Acta Ecologica Sinica.*, 30(1), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2009.12.002>
- Jung, T., Höhn, A., Catalgol, B., Grune, T. (2009). Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483, 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.007>
- Kowalska, M., Aljewicz, M., Mroczek, E., Cichosz, G. (2012). Olej palmowy – tańsza i zdrowsza alternatywa. *Bromat. Chem. Toksykol.* XLV, 2, 171-180.
- Lei, L., Shen, X., Jiang, M. (2016). Effect of water accommodated fraction of 0# diesel oil and crude oil on EROD activity of liver of *Sparus macrocephalus* and its mRNA expression *Ecotox. Environ. Safe.* 134(1), 250-255. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.027>
- Leite, M. B. N. L., de Araújo, M. M. S., Nascimento, I. A., da Cruz, A. C. S., Pereira, S. A. and do Nascimento, N. C. (2011). Toxicity of water-soluble fractions of biodiesel fuels derived from castor oil, palm oil, and waste cooking oil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 893-897. <https://doi.org/10.1002/etc.444>

- Leme, D.M., Grummt, T., Palma de Oliveira, D., Sehr, A., Renz, S., Reinel, S., Ferraz, E. R. A., Rodrigues de Marchi, M.R., Machado, M.C., Zocolo, G.J., Marin-Morales, M.A. (2012) Genotoxicity assessment of water soluble fractions of biodiesel and its diesel blends using the Salmonella assay and the in vitro MicroFlowkit (Litron) assay. *Chemosphere*, 86, 512-520. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.017>
- Merkisz, J., Kozak, M. (2003). Wpływ składu mieszanek biopaliw z paliwami konwencjonalnymi na emisję toksycznych składników spalin. *Eksploatacja i Niezawodność - Maintenance and Reliability*, 3, 12-18.
- Mikuła-Pietrasik, J. (2011). Wpływ stilbenów (resweratrolu i jego analogów) na molekularne i czynnościowe wykładniki starzenia się ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego in vitro. Rozprawa doktorska z Katedry i Zakładu Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.
- Palaiologou, A. A., Yukna, R. A., Moses, R. & Lallier, T. E. (2001). Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. *J. Periodontol.* 72, 798-807. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.6.798>
- Pawłowski, L. (2015). Dokąd zmierza świat? Kryzys społeczny stworzony przez promocję biopaliw i współczesny liberalny kapitalizm. *Rocznik Ochrona Środowiska*, 17, 26-39.
- Perrichon, P., Le Menach, K., Akcha, F., Cachot, J., Budzinski, H., Bustamante, P. (2016). Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach. *Sci.Total Environ.* 568(15), 952-966. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.186>
- Ruffing, A.M., Trahan, C.A. (2014). Biofuel toxicity and mechanisms of biofuel tolerance in three model cyanobacteria. *Algal Research*. 5, 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.07.006>
- Schneider, E.L., Mitsui, Y., Au, K.S., Shorr, S. (1977). Tissue-specific differences in cultured human diploid fibroblasts. *Experimental Cell Research*. 108(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(77\)80002-5](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(77)80002-5)
- Skowroń, J., Golimowski, W. (2015). Produkcja biopaliw – priorytetowy kierunek badań naukowych. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy*. 2(84), 5-15. <https://doi.org/10.5604/1231868x.1164521>
- Sorrell, J.M., Caplan, A.I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci.* 117, 667-675. <https://doi.org/10.1242/jcs.01005>
- Tech Bulletin of ATCC (2010). Passage number effects in cell lines. No. 7. <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb07.ashx>

- Wenger, S.L., Senft, J.R., Sargent, L.M., Bamezai, R., Bairwa, N., Grant, S.G. (2004). Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Bioscience Reports*, 24(6), 631-639. <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2797-5>
- Won, E-J., Rhee, J-S., Shin, K-H., Jung, J-H., Shim, W-J., Lee, Y-M., Lee, J-S. (2013). Expression of three novel cytochrome P450 (CYP) and antioxidative genes from the polychaete, *Perinereis nuntia* exposed to water accommodated fraction (WAF) of Iranian crude oil and Benzo[*a*]pyrene. *Marine Environmental Research*, 90, 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.05.014>

## **Second-generation Biofuels – Products of Waste Fats Transesterification: a Comparison of Their Water-soluble Fraction (WSF) Cytotoxicity on Subsequent Passages of Senescent Cells *in vitro***

### **Abstract**

The aim of the study was to compare the cytotoxic action of selected second generation biofuels water-soluble fraction (WSF) and susceptibility of old and young passages of human diploid fibroblasts.

The study was performed on two senescent diploid cell lines: pulmonary fibroblasts CCD-8Lu (ATCC<sup>®</sup> CCL-201<sup>™</sup>) and skin fibroblasts CCD-1136Sk (ATCC<sup>®</sup> CRL-2697<sup>™</sup>). The cytotoxicity of WSF of the four biofuels obtained from the transesterification of expired rapeseed oil (BPI), waste animal fat (BPII), used for frying vegetable oil (BPIII) or crude rapeseed oil (BPIV) was assessed. The MTT test determining metabolic activity and the NRU test, evaluating the integrity of cell membranes were used to assess the cytotoxic activity of tested biofuels WAF.

The most cytotoxic (reaching the lowest IC<sub>50</sub> values) for both types of cells was the water extract of biofuel obtained from animal waste (BPII) concerning the highest concentration of fatty acid esters. Saturated fatty acids, such as capric, lauric, stearic and palmitic acids were dominant in its composition. In turn, the least cytotoxic was water fraction of the biofuel obtained from crude rapeseed oil (BPIV) with the lowest content of fatty acid esters, mainly consisting of monounsaturated acids: octadecenoic acid and eicosenoic acid. Young passages of CCD-1136Sk cells were more insusceptible to the cytotoxic effects of the tested biofuels. The phenomenon of increased CCD-1136Sk cells susceptibility to the BPI, BPII and BPIII was observed starting from the passage No.

17. The trend of increased cells susceptibility to the tested biofuels was also observed in the case of exposure of CCD-8Lu cells on BPI, BPIII and BPIV.

The cytotoxicity of the most toxic and the least toxic water fraction of the tested biofuels was a reflection of the content of fatty acid esters in them. The water-soluble fraction with the highest content of fatty acid esters (BPII) exhibited the strongest cytotoxic effect on both types of fibroblasts (both on CCD-1136Sk and CCD-8Lu cells), whereas BPIV with the lowest content of fatty acid esters was the least toxic. The results indicate that the susceptibility of senescent cells to the cytotoxic action of biofuels WSF may change during their senescence – the older cells become more sensitive to the cytotoxic effect of tested xenobiotics as compared to younger cells in the most cases. The key role in the cytotoxic action of compounds on the younger and older cell passages may also have a concentration of tested compounds.

## **Streszczenie**

Celem badań było porównanie cytotoksycznego działania biopaliw II generacji otrzymanych w procesie transestryfikacji tłuszczów odpadowych na wczesne oraz późne pasaża ludzkich komórek diploidalnych.

Przeprowadzono badania czterech biopaliw otrzymanych w reakcji transestryfikacji z: przeterminowanego oleju rzepakowego (BP I), odpadowego tłuszczu zwierzęcego (BP II), roślinnego oleju posmażalniczego (BP III), które zostały wytworzone na skalę laboratoryjną z wykorzystaniem eksperymentalnej linii produkcyjnej, a także z surowego oleju rzepakowego (BP IV), które otrzymano od producenta biopaliw z oleju rzepakowego. Biopaliwo BP II, czyli biopaliwo z tłuszczu zwierzęcego zawierało największe stężenia estrów kwasów tłuszczowych, oznaczone z wykorzystaniem sprzężonych technik chromatografii gazowej z detekcją spektrometrii mas. Stężenie estrów kwasów tłuszczowych w biopaliwie BPI było o 23%, w biopaliwie BPIII o 29%, a biopaliwie BPIV o 78% niższe w stosunku do biopaliwa BPII. Badania wykonano na dwóch starszejących się diploidalnych liniach komórkowych: fibroblastach płucnych CCD-8Lu (ATCC<sup>®</sup> CCL-201<sup>TM</sup>) oraz skórnych CCD-1136Sk (ATCC<sup>®</sup> CRL-2697<sup>TM</sup>). Do oceny cytotoksycznego działania zastosowano test MTT, który określa aktywność metaboliczną komórek oraz test pochłaniania czerwieni obojętnej oceniający integralność błon komórkowych (test NRU).

Najbardziej cytotoksyczny (osiągający najniższe wartości IC<sub>50</sub>) dla komórek obu typów okazał się ekstrakt wodny biopaliwa otrzymanego z odpadowego tłuszczu zwierzęcego (BPII), w którym oznaczono największe stężenie estrów kwasów tłuszczowych. W jego składzie przeważają nasycone kwasy tłuszczowe, m.in.: kwas kaprynowy, laurynowy, stearynowy i palmitynowy. Z kolei najmniej cytotoksyczna była frakcja wodna biopaliwa otrzymanego z surowego oleju rze-

pakowego (BPIV) o najmniejszej zawartości estrów kwasów tłuszczowych, zawierający głównie kwasy jednonienasycone: kwas oktadekenowy i eikozenowy. Komórki CCD-1136Sk wczesnych pasaży (8 i 13) charakteryzowały się większą odpornością na cytotoksyczne działanie badanych biopaliw, co było szczególnie widoczne w środkowym zakresie stosowanych stężeń ksenobiotyków. Począwszy od pasażu nr 17 występowało zjawisko zwiększonej wrażliwości komórek CCD-1136Sk na działanie BPI, BPII i BPIII. Tendencję wzrostu wrażliwości komórek na działanie badanych biopaliw w miarę ich starzenia się zaobserwowano również w przypadku narażenia komórek CCD-8Lu na BPI, BPIII i BPIV.

Cytotoksyczność frakcji rozpuszczalnej w wodzie najbardziej i najmniej toksycznej z badanych biopaliw II generacji była odzwierciedleniem zawartości w nich estrów kwasów tłuszczowych. Frakcja rozpuszczalna w wodzie biopaliwa o największej zawartości estrów kwasów tłuszczowych (BPII) wykazywała najsilniejsze działanie cytotoksyczne na obu typach fibroblastów (zarówno na komórkach CCD-1136Sk, jak i CCD-8Lu), natomiast BPIV o najmniejszej zawartości estrów kwasów tłuszczowych było najmniej toksyczne. Uzyskane wyniki wskazują, że wrażliwość starzejących się komórek na cytotoksyczne działanie biopaliw może zmieniać się w miarę ich starzenia się – w przeważającej większości przypadków komórki starsze stawały się bardziej wrażliwe w porównaniu z młodszymi na cytotoksyczne działanie badanych ksenobiotyków. Kluczowe znaczenie w cytotoksycznym działaniu związków chemicznych na młodsze i starsze pasaży komórkowe może mieć także stężenie badanego związku.

**Słowa kluczowe:**

biopaliwa, II generacja, WSF, cytotoksyczność, starzejące się komórki, *in vitro*

**Keywords:**

biofuels, 2<sup>nd</sup> generation, WSF, cytotoxicity, senescent cells, *in vitro*