

Slutrapport - Hälsoeffekter av exponering för biodieselavgaser

Projektledare - Anders Blomberg

Projektets genomförande i relation till tid, resurser och ekonomi

De planerade exponeringarna för biodieselavgaser, fossila dieselavgaser samt "filtrerad" luft som planerats inom projektet är samtliga genomförda. Sammanfattningsvis har studierna genererat mycket intressanta data, som nu sammanställts, redovisats på ett flertal internationella/nationella kongresser och i de flesta fall inskickats för publicering. Då studier med immunhistokemi liksom metabolomik är mycket tidskrävande, har data nyligen färdigställts, och manus med de inflammatoriska luftvägseffekterna och viss metabolomik är ännu inte helt klara. Vidare se beskrivning nedan.

Uppnådda resultat

Introduktion

På grund av miljömässiga skäl har intresset att utveckla nya förnyelsebara och koldioxidneutrala bränslen till bilar och andra fordon ökat klart de senaste åren. Biobränslen är förnyelsebara och har miljömässiga fördelar, och man har föreslagit att de vid förbränning producerar ämnen som är mindre toxiska än vid förbränning av fossila bränslen. Rapsmetylester (RME) är en av flera fettsyremetylestrar, som kan användas som fordonsbränslen och som också rutinmässigt blandas i fossil diesel i många länder.

Partikelkaraktisering

Partikelinsamlingar och analys av avgaserna i exponeringskammaren har gjorts för att karakterisera de olika avgasernas kemiska sammansättning och fysikaliska egenskaper, t ex partikelstorlek. Jämfört med fossila dieselavgaser, innehöll avgaserna från både ren biodiesel och RME 30 (30% inblandning av rapsmetylester (RME) i fossil diesel) fler men mindre partiklar, mindre elementärt kol och färre polyaromatiska kolväten. I gasfasen av RME-avgaserna fanns högre halter av NO_x och lägre halter av kolväten.

Kardiovaskulära endpoints

Undersökning med venös underarmspletysmografi som genomförts i två delstudier visade identiska svar vid infusion av vasoaktiva ämnen i brachialartären efter exponering för såväl rena biodieselavgaser, avgaser från RME 30 som fossila dieselavgaser. Vidare var trombbildningen *ex vivo* i Badimonkammaren likvärdig. Inte heller påverkan på endogen fibrinolys, trombocytaktivering mätt med flödescytometri eller systemiska inflammatoriska markörer skilde sig mellan exponering för biodieselavgaser/RME och fossila dieselavgaser. Sammanfattningsvis tyder de kardiovaskulära data som hittills generats på att biodieselavgaser ger likartade negativa effekter på blodkärlens funktion, endogen fibrinolys och trombbildning som fossila dieselavgaser. Data från båda dessa studier har presenterats på flera nationella och internationella kongresser och är nu sammanställda till ett manus som insänts till Environmental Health Perspectives (EHP) - *Jenny A Bosson, Jon Unosson, Mikael Kabele et al.*
Biodiesel Exhaust Exposure Causes Vascular Dysfunction in Man.

PExA

Insamling av utandningskondensat för att erhålla koncentrerad "respiratory tract lining fluid" (RTLFL) har genomförts med en nyutvecklad utrustning (PExA, Particles in Exhaled Air) före och efter exponering. Metodutveckling pågår för att förutom surfaktantproteiner förhoppningsvis kunna mäta andra metaboliter. Detta är att anses som en pilotundersökning, och några färdiga data från detta delprojekt har ännu ej erhållits.

Luftvägsinflammation

Målsättningen med följande delstudie var att utvärdera om exponering för RME 100 % (jämfört med filtrerad luft) orsakade en akut luftvägsinflammation i likhet med exponering för fossila dieselavgaser. Sex timmar efter avslutade exponeringar genomfördes bronkoskopi med provtagning av endobronkiella slemhinnebiopsier samt sköljning av luftrören (bronchial wash (BW) med 2 x 20 ml och bronkoalveolärt lavage (BAL) med 3 x 60 ml). I BW såg man i likhet med resultaten efter exponering för fossila dieselavgaser, en distinkt ökning av inflammatoriska celler, ff a neutrofila granulocyter men även makrofager. Dessa resultat har redovisats som abstract vid American Thoracic Society (ATS) i Denver, maj 2015. Under det senaste året har även inflammationsmarkörer analyserats i bronksköljvätska, och de endobronkiella slemhinnebiopsierna har analyserats med immunhistokemiska färgningar av inflammatoriska celler, adhesionsmolekyler, cytokiner och transkriptionsfaktorer, för att ytterligare kartlägga luftvägsinflammationen efter exponering för biodieselavgaser. Dessa analyser visar att exponering för biodiesel ger en uttalad inflammation i luftvägsslemhinnan med ökning av neutrofiler, mastceller och makrofager tillsammans med en ökning av kvoten CD4+/CD8+lymfocyter. Därtill ökade exponering för biodieselavgaser även adhesionsmolekylen P-Selectin, av vikt för rekrytering av inflammatoriska celler från blodet till luftvägsslemhinnan. Inflammatoriska markörer i luftvägarna som myeloperoxidas (MPO) samt matrixmetalloproteinaser och deras hämmare (MMP-9, MMP-12 och TIMP 1&2) skiljde sig dock inte mellan biodiesel/luft vid denna tidpunkt. Den inflammatoriska bilden påminner delvis om den bild som tidigare rapporterats efter exponering för "vanliga" dieselavgaser, men med några viktiga skillnader. Ökning av makrofager i slemhinna och BW har inte noterats efter exponering för "vanliga" fossila dieselavgaser. Dessa data sammanställs för närvarande till ett manuskript.

Metabolomik

I den andra delstudien (exponering för ren biodiesel vs. fossil diesel) har oxylipiner och endokannabinoider analyserats i plasma vid fem tidpunkter före och efter exponering. Resultaten avslöjade en ökning av 20-HETE, som är en arakidonsyremetabolit och som har associerats med trombocyttaggregation, högt blodtryck och ökad kardiovaskulär risk, således data som mycket väl kan relateras till resultaten från våra egna studier med kardiovaskulära endpoints. Dessa data är sammanställda till ett manus som för närvarande genomgår slutlig justering inför submission: *Sandra Gouveia-Figueira, Masoumeh Karimpour, Jenny A Bosson, Anders Blomberg et al. **Effect of controlled exposure to biodiesel exhaust on human plasma bioactive lipid profiles.***

Som nämnts ovan samlades i den tredje delstudien BW och BAL in efter exponering för rena biodieselavgaser och filtrerad luft. I BW/BAL har oxylipiner, endocannabinoider och N-acyletanolaminer analyserats med nyutvecklad

metodik inkluderande kvantitativ masspektrometri (MS) i kombination med vätskekromatografi (LC). Studien visade att det i luftvägarna finns ett komplext nätverk av bioaktiva lipider som svarar på olika signaler för skada, som exponering för biodieselasvger, och att graden av respons skiljer sig mellan olika markörer och mellan lungans olika compartments. Framför allt var här fynden av ökade nivåer av prostaglandin E2 i BAL något som kan indikera antiinflammatoriska signaler distalt i luftvägarna. Dessa data är sammanställda i ett manus om inskickats till PLoS ONE: *Sandra Gouveia-Figueira, Masoumeh Karimpour, Jenny A Bosson, Anders Blomberg et al. **Mass spectrometry profiling of oxylipins, endocannabinoids and N-acyl ethanolamines in human lung lavage fluids reveals responsiveness of prostaglandin E2 and associated lipid metabolites to biodiesel exhaust exposure.***

I detta arbete som bygger på delstudie tre har metaboliter i luftvägarna (BW och BAL) analyserats med "cutting-edge"-metodik, dvs. med gas- eller vätskekromatografi (GC respektive LC) kopplade till såväl masspektrometri (MS) som kärnmagnetisk resonans (NMR). Genom att använda denna teknik kunde vi detektera fler unika metaboliter i BW/BAL än som tidigare beskrivits, totalt 82 stycken. Alla metabolomikassays indikerade att den metaboliska profilen i BW och BAL skiljer sig avsevärt, med 46 metaboliter som uppvisade signifikanta skillnader mellan de båda lungcompartments. Vidare avslöjade GC-MS en effekt av biodieselexponering på nivåerna av flera metaboliter (t ex sukros, inosin och etanolamin) i BAL, medan NMR i BAL indikerade en förändring i niacinamid. Sammanfattningsvis stödjer våra data att den föreslagna multi-plattformen kan användas för metabolomikscreening av BW och BAL och därigenom facilitera kartläggningen av metaboliter som är känsliga för exponering för biodieselasvger. Dessa data är inskickade till Analytical and Bioanalytical Chemistry, och i dagarna är manus i princip accepterat förutsatt minor revision: *Izabella Surowiec, Masoumeh Karimpour, Sandra Gouveia-Figueira, Junfang Wu, Jon Unosson, Jenny A Bosson, Anders Blomberg, Jamshid Pourazar et al. **Multi-platform metabolomics assays for human lung lavage fluids in an air pollution exposure study.***

Sammanfattning

Exponering för avgaser från biodiesel i form av 100 % RME hos friska forskningspersoner gav upphov till akut inflammation i luftvägarna, såväl i endobronkiella slemhinnebiopsier som i bronchial wash (BW), sex timmar efter avslutad exponering. Rekryteringen av inflammatoriska celler såsom neutrofiler och mastceller till luftvägarna motsvarar den som tidigare setts efter exponering för fossila dieselasvger, dock gav exponering för biodiesel även upphov till rekrytering av makrofager, något som ej tidigare noterats efter "vanlig" dieselasvgerexponering. Likaså gav exponering för biodieselasvger från såväl ren RME som RME 30 upphov till en rad negativa kardiovaskulära effekter i form av minskad vasomotorrespons, försämrad endogen fibrinolys samt ökad trombbildning *ex vivo* i Badimonkammaren, kardiovaskulära svar som var i stort sett identiska med dem som noterats efter exponering för fossila dieselasvger. Vidare har studier med sofistikerad metabolomik med multi-plattformsteknik inneburit ett helt nytt koncept att studera fordonsavgasens negativa hälsoeffekter. Ett antal potentiella metaboliska biomarkörer har identifierats, vars effekter stämmer med vaskulära och inflammatoriska svar som noterats i studierna, men fler studier krävs för att ytterligare verifiera dessa data.

Slutligen är vår konklusion av resultaten av detta projekt att det sannolikt inte innebär en hälsovinst att byta ut fossil diesel mot biodiesel av RME-typ. Här behövs ytterligare forskning av de potentiella hälsoeffekterna av andra typer av biobränslen samt hur de interagerar med fossilt dieselbränsle vid förbränning i olika blandningar. På grund av fossila bränslets negativa miljöeffekter och påverkan på koldioxidnivåerna, pågår för närvarande en utveckling av en rad nya alternativa biobränslen med helt olika ursprung. Något av de mest intressanta att studera vidare är bränslen producerade av mikroalger. Vidare behövs forskning huruvida individer med olika typer av hjärt-lungsjukdomar är mer känsliga för de negativa effekterna av biodieselavgaser än friska individer.