



Česká a slovenská společnost pro mutagenezi zevním prostředím
při Československé biologické společnosti

Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Projekt MEDETOX v rámci EU programu LIFE+

Bezpečnostně technologický klastr, z. s.

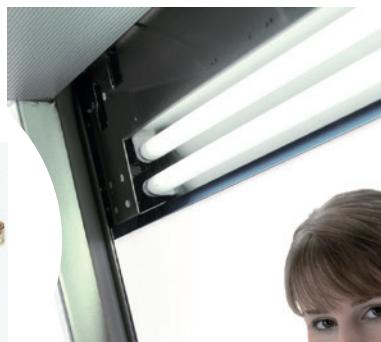
PROGRAM A ABSTRAKTA

GENETICKÁ TOXIKOLOGIE A PREVENCE RAKOVINY

11. - 13. 5. 2016

Univerzitní centrum Masarykovy univerzity Telč





- zařízení pro chov laboratorních zvířat (malých savců)
- zařízení pro chov laboratorních ryb
- analytická zařízení pro zvířecí modely

centrifugy, ultracentrifugy	biohazardy a laminární boxy
termostaty / CO ₂ inkubátory	bezodtahové digestoře
anaerobní a hypoxické boxy	dekontaminační systémy
chladicí, mrazicí a kryo boxy	gel - imaging analýza
systémy pro monitoring teploty	elektroforézy a zdroje
koncentrátor výkroví, lyofilizátory	mikrodestičkové readyry
sterilizátory, autoklávy, myčky	purifikátory DNA/RNA - KingFisher
pipety a laboratorní plast	příprava ultračisté vody
další drobné laboratorní přístroje	zařízení pro chov laboratorních zvířat

Dodáním přístroje naše péče nekončí ...


autorizovaný servis
poradenství / projektová řešení
validace
preventivní služby

akreditovaná
kalibrační laboratoř
TRIGON PLUS
kalibrace měřících řetězců a
indikačních teploměrů

akreditovaná
zkušební laboratoř
TRIGON PLUS

měření zařízení s řízenou čistotou vzduchu

Program konference GENETICKÁ TOXIKOLOGIE A PREVENCE RAKOVINY

11. - 13. 5. 2016, Telč

ČASOVÝ HARMONOGRAM KONFERENCE:

Středa 11. 5. 2016

13.30 Zahájení konference, úvodní slovo organizátorů

Sekce I.: Molekulární biologie nádorů

předsedající: Pavel Vodička, Ludmila Vodičková

- 14.00 – 14.30 L. Vodičková: Vnímání chutí, oxidační poškození a mikroprostředí střeva v kolorektální karcinogenezi: vliv na riziko nemoci, její prognózu a prevenci
- 14.30 – 14.50 M. Kroupa: Studium opravné kapacity dvouretězcových zlomů DNA v periferních lymfocytech u zdravé populace a u pacientů s malignitami prsu a gastrointestinálního traktu
- 14.50 – 15.30 Přestávka
- 15.30 – 15.45 A. Opattová: Přírodní látky a terapie kolorektálního karcinomu
- 15.45 – 15.55 A. Čumová: Vliv přírodních látek na účinek 5-fluouracilu u kolorektálních buněčných linií
- 15.55 – 16.05 S. Vodenková: Vliv přírodních látek na poškození DNA a reparační kapacitu u kolorektálních buněčných linií
- 16.05 – 16.20 V. Vymetálková: Celogenomová analýza metylací u pacientů s rektálním karcinomem
- 16.20 – 16.30 K. Jirásková: Prediktivní a prognostické markery v rámci genetických variant genů DNA reparace u sporadické formy kolorektálního karcinomu
- 16.30 – 16.40 P. Bendová: Vliv polymorfismů ve vazebních místech pro microRNA u mucin genů a jejich asociace s rizikem vzniku a přežíváním u kolorektálního karcinomu
- 16.40 – 16.50 L. Bártů: Regulace genu MUC13 pomocí miRNA u kolorektálního karcinomu: prediktivní faktory a vztah k terapii

Příspěvek zahraničního hosta:

17.00 – 17.30 F. Laffleur (University of Innsbruck, Austria): Nanoparticles in drug delivery

17.30 – 18.30 Posterová sekce, diskuze k posterům

Čtvrtek 12. 5. 2016

Sekce II.: Využití genomiky v genetické toxikologii

předsedající: Helena Líbalová, Andrea Rössnerová

- 8.30 – 9.00 H. Líbalová a kol.: Comparative analysis of the toxic responses of organic extracts from diesel/biodiesel engine emissions in human lung BEAS-2B cells
- 9.00 – 9.30 M. Hýžďalová a kol.: Rozdíly v genové expresi a v indukci přechodu buněk z epitelialního do mesenchymálního stavu v plicních epitelialních buňkách A549 a HBEC.
- 9.30 – 10.00 P. Rössner a kol.: Inhalation of nanoparticles and gene expression changes in mice
- 10.00 – 10.30 Přestávka

Sekce III.: Mechanismy toxicity individuálních kontaminujících látek, chemoprotektivní účinky

předsedající: Miroslav Machala, Alena Gábelová

- 10.30 – 11.00 M. Machala a kol.: Porovnání toxicitních účinků individuálních aromatických kontaminantů ovzduší – polycyclic aromatic hydrocarbons s různou molekulovou hmotností a jejich nitro-, monomethyl- a oxy-derivátů
- 11.00 – 11.30 A. Gábelová a kol.: Biotransformácia a mechanizmus toxicity tkániovovo špecifických karcinogénov zo skupiny heterocylickych aromatickych uhľovodíkov
- 11.30 – 12.00 K. Kozics: Protektívne účinky éterického oleja *Lavandula angustifolia*

12.00 – 12.30	A. Bábelová: Reorganizácia aktínového cytoskeletu podocytov - kľúčový faktor ich poškodenia a straty
12.30 – 12.45	A. Srančíková: Protektívne účinky rastlinných extraktov zo Salvia officinalis and Thymus vulgaris voči poškodeniam DNA indukovaným nanočasticami striebra v bunkám HepG2
12.45 – 13.00	A. Ambrož: The study of processes associated with lipid peroxidation in model human cell lines
13.00 – 14.00	Přestávka na oběd

Sekce IV.: Nanotoxikologie a nanomedicína

předsedající: Pavel Rössner Jr., Jaroslav Turánek

14.00 – 14.45	J. Turánek a kol.: Nanočástice – fyzikálně-chemická charakterizace, in vitro a in vivo modely toxicity a in vivo imaging
14.45 – 15.30	M. Raška a kol.: Nanočástice, zánět a karcinogeneze
15.30 – 16.00	Přestávka
16.00 – 16.15	B. Buliaková: Determinácia internalizovanych nanočastic v bunke; výhody a obmedzenia
16.15 – 16.30	M. Šelc: Vplyv magnetických nanočastic oxidu železa na segregáciu chromozómov v A549 bunkách
16.30 – 16.45	B. Novotná: In vivo effects of mesenchymal stem cells labeled with iron oxide or cobalt-zinc-iron nanoparticles in biological macromolecules of rat brain tissue
16.45 – 17.00	T. Červená: Genotoxicita nanočastic TiO ₂ , SiO ₂ a Ag u plicných epitelálních buniek BEAS-2B: test mikrojader v Lab-Tek™ Chamber Slide systému
17.00 – 17.15	M. Dostál: Vliv expozice ultrajemným prachovým časticím na denní počty hospitalizací. Projekt UFIREG
17.15 – 17.30	A. Pastorková: Asociace ultrajemných a jemných prachových častic s denní úmrtností. Výsledky projektu UFIREG
17.30 – 18.30	Posterová sekce, diskuse k posterům

Večer: Společná večeře

Pátek 13. 5. 2016

**Sekce V.: Toxikologie motorových emisí v reálném provozu
– Workshop k projektu MEDETOX (LIFE+)**

předsedající: Jan Topinka, Michal Vojtíšek



8.30 – 9.00	M. Vojtíšek: Nanočástice ze spalovacích motorů - disparita mezi realitou a technologickými možnostmi
9.00 – 9.30	J. Topinka: Toxicita emisí spalovacích motorů v reálném provozu – výsledky projektu MEDETOX
9.30 – 10.00	J. Sikorová: Effects of bioalcohols in gasoline on PAHs and particle emission from a direct injection spark ignition engine
10.00 – 10.30	Přestávka
10.30 – 11.00	S. Marvanová a kol.: Jak blízko realitě je expozice nanočesticemi izolovanými z ovzduší v modelech in vitro? Chování ultrajemných častic v různém prostředí a během přípravy
11.00 – 11.30	M. Ciganek a kol.: Chemické složení a distribuce toxicity (toxicických potencí) v emisích z dieslových a benzínových motorů.

Sekce VI.: Různé – další aktuální téma z praxe genetické toxikologie, cytogenetiky, atd.

předsedající: Hana Lehocká, Jiří Rubeš

11.30 – 11.50	R. J. Šrám: The adverse effects of air pollution on the nervous system
11.50 – 12.20	A. Rössnerová: Adaptation of humans to the environment – a review of findings from cytogenetics and „omics“ studies
12.20 – 12.45	F. Zölzer: Mikrojádra jako indikátory expozice radonu
12.45 – 13.20	J. Rubeš a kol.: Přestavby chromosomů u onkologických pacientů a pracovníků exponovaných cytostatiky a ionizujícím zářením
13.20 – 13.35	K. Mičieta, G. Murín: Radiation and radioresistance - experiments with <i>Vicia faba</i> L.
13.35	Zakončení konference



ABSTRAKTA

Vnímání chuti, oxidační poškození a mikro prostředí střeva v kolorektální karcinogenezi: vliv na riziko nemoci, její prognózu a prevenci

L. Vodičková^{1,2}, V. Vymetálková^{1,2}, A. Opatová^{1,2}, K. Jirásková^{1,2}, A. Čumová^{1,2}, L. Bártů^{1,2}, A. Rejhová¹,
M. Kroupa¹, S. Vodenková¹, P. Bendová^{1,2}, V. Liška³, K. Klimešová⁴ a P. Vodička^{1,2}

¹Ústav experimentální medicíny, AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

²Ústav biologie a lékařské genetiky, Albertov 4, 1. LF UK 120 00 Praha 2

³Lékařská fakulta Plzeň, LF UK Praha, Plzeň

⁴Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

ludovod@seznam.cz

Současný stav poznání předpokládá, že vznik sporadických solidních nádorů je ovlivněn jak genetickým podkladem, tak mikro prostředím ve střevě. Mikroflóra významně ovlivňuje akumulaci poškození DNA, jejich opravu (udržující genomovou stabilitu a buněčné funkce), jakož i střevní metabolismus, imunologickou aktivitu, a hraje výraznou roli v odpovědi na chemoterapii. V našem příspěvku se pokusíme podat poněkud komplexnější obrázek zahrnující podíl výběru stravy dle chuti, střevní mikroflóry, poškození a opravy DNA na riziku vzniku CRC, především z hlediska genetického pozadí uvedených procesů a možných vzájemných interakcí. Zároveň se zmíníme o nových pohledech ve vztahu excizní opravy DNA, fixací relevantních mutací a rozvoji nádorových procesů.

V našich studiích se budeme zabývat: A) Vnímáním chuti, střevní mikroflórou, poškozením DNA a kapacitou DNA oprav jako faktorů „vlivujících“ vznik CRC (pacienti versus kontrolní osoby); B) Střevní mikroflórou, poškozením DNA a kapacitou DNA oprav jako znaky progrese CRC, účinnosti terapie a přežívání.

Monitorování chuťového vnímání a střevní mikroflóry při současném stanovování kapacity oprav DNA poškození u pacientů s CRC představuje zásadně nový přístup. V naší práci dále zvažujeme integrovat sledované parametry do prognostických a terapeutických úvah, jež v konečném důsledku přispějí k individualizované terapii a zlepšené kvalitě života pacientů.

Poděkování a podpora: grant AZV MzČR 15-27580 A, COST.cz LD 14050

Studium opravné kapacity dvouřetězcových zlomů DNA v periferních lymfocytech u zdravé populace a u pacientů s malignitami prsu a gastrointestinálního traktu

M. Kroupa^{1,2}, Z. Polívková⁴, V. Filipiová⁴, M. Schneiderová¹, T. Büchler^{1,3},
R. Kumar¹, AT. Natarajan¹, P. Vodička^{1,2}

¹Ústav experimentální medicíny AV ČR Praha

²Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta UK v Plzni

³Onkologická klinika 1. LF UK Thomayerovy nemocnice Praha

⁴3. Lékařská fakulta UK v Praze

Klíčová slova: Chromozomální aberace, dvouvláknové zlomy DNA, bleomycin, kolorektální karcinom, karcinom prsu

Přednášející: *misa.kroupa@gmail.com*

Vývodisko: Chromozomální aberace (CAs) jsou prokázaný biomarker spojený s onkologickým onemocněním. Cytogenetické změny v periferních lymfocytech (PBL) odrážejí nejen míru expozice řadě karcinogenních látek, ale také individuální citlivost ke genotoxicitému působení. CAs jsou důsledkem neopraveného nebo chybně opraveného poškození DNA, zvláště dvouvláknových zlomů DNA (DSBs). Kapacita opravy DNA je tudíž rozhodujícím mechanizmem pro udržení genomové stability, zabraňujícím akumulaci mutací v genomu a následné maligní buněčné transformaci.

Cíle: Stanovení frekvence CAs v PBL 75 zdravých osob a 100 incidentních onkologických pacientů (karcinomy prsu a kolorekta (CRC)) s cílem posouzení opravné kapacity DSBs pomocí testu senzitivity na mutagen. Porovnání chemiluminiscenčního měření Gamma-H2AX s cytogenetickou analýzou PBL. Stanovení délky telomer u pacientů i zdravých osob.

Metodika: Ve studii bylo doposud cytogeneticky analyzováno 74 zdravých osob, 87 incidentních a neléčených pacientů s onkologickým onemocněním (50 CRC a 37 nádorů prsu). Ve vzorku každého jedince bylo zhodnoceno 100 metafázních PBL po působení bleomycinu (BLM) a 100 kontrolních buněk bez ovlivnění tímto radiomimetikem. U 15 pacientů odebraných od 1. 6. 2015 byla testována metoda Gamma-H2AX ELISA jako alternativa k cytogenetické analýze. Dále byla izolována DNA pro stanovení délky telomer pomocí Real-Time PCR, která bude provedena pod vedením prof. Rajiva Kumara (German Cancer Research Center).

Výsledky: Neparametrickými testy byl prokázán statisticky významný rozdíl v průměrné hladině CAs vyvolaných BLM v PBL zdravých osob ve srovnání s CRC ($p=0,05$), což naznačuje sníženou opravu DSBs u pacientů s CRC. Prokázali jsme rovněž, že opravná kapacita DSBs je významně vyšší u pacientek s nádory prsu než u pacientů s CRC ($p=0,02$). Dále byl prokázán významný rozdíl mezi nádory prsu a CRC v množství aberantních buněk s CAs vyvolaných pomocí BLM ($p=0,05$). Odhalili jsme rovněž rozdíl mezi zdravými osobami a pacienty s CRC při porovnání množství aberantních buněk s vysokým poškozením (≥ 12 CAs/ buňka; $p=0,03$). Výsledky obdržené metodou Gamma-H2AX ELISA nekorelují s naměřenými daty cytogenetické analýzy.

Závěr: Z našich výsledků vyplývá, že PBL pacientů s CRC vykazují sníženou opravnou kapacitu DSBs ve srovnání se zdravými osobami. Tento nález je o to zajímavější, že koresponduje s nižší kapacitou excizní opravy v souvislosti s onemocněním CRC (Slyskova et al., 2012). Prokázali jsme také významně sníženou opravu DSBs v PBL u pacientů s CRC ve srovnání s nádory prsu, což naznačuje rozdíly v reparační kapacitě DNA u různých typů malignit a podtrhuje nádorovou heterogenicitu.

Tato práce byla podpořena z výzkumného projektu P27/2012PRVOUK Univerzity Karlovy v Praze a projektu GAČR 15-14789S.

Prírodné látky a terapia kolorektálneho karcinómu

A. Opatová^{1,2}, K. Kozics³, A. Čumová^{1,2}, J. Horák¹, D. Sliva⁴, P. Vodička^{1,2}

¹Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha

²Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha,

³ Ústav experimentálnej onkológie, SAV, Bratislava, Slovenská republika

⁴Indiana University School of Medicine, Indianapolis, United States

Email prezentujúceho autora: alenaopattova@gmail.com

Prírodné extrakty z huby *Ganoderma lucidum* (Lesklokorka lesklá, Reishi), sa vďaka svojim blahodarným účinkom na zdravie, používajú v tradičnej Čínskej medicíne už po stáročia. Hlavnými fyziologicky aktívnymi zložkami extraktov *Ganoderma lucidum* (GLC) sú polysacharidy (glukány, glykoproteíny) a triterpény (kyselina ganodermová). Polysacharidy obsiahnuté v GLC majú najmä protizápalový, protinádorový, imunostimulačný a antioxidačný efekt. Triterpény vykazujú najmä cytotoxický efekt, indukujú apoptózu v nádorových bunkových liniách, a zároveň i ovplyvňujú migráciu nádorových buniek a tým môžu pôsobiť na tvorbu metastáz.

Kolorektálny karcinóm (CRC) je jednou z najčastejších onkologickej diagnóz v Českej Republike a na Slovensku. Znepokojujúca je najmä jeho narastajúca incidencia a mortalita. Riziko sa výrazne zvyšuje po 50 roku života. Klasická liečba kolorektálneho karcinómu pozostáva z chirurgickej resekcii nádoru a následnej chemoterapie 5-fluorouracilom. Tento syntetický pyrimidínový analóg, nielenže spomaľuje progres ochorenia, má však aj množstvo negatívnych cytotoxických účinkov.

Predpokladáme, že použitím prírodných zlúčenín so špecifickým účinkom na nádorové bunky, budeme schopní zvýšiť účinnosť chemoterapeutík a zároveň znížiť ich negatívny dopad na ľudský organizmus. Mnohé prírodné zlúčeniny vykazujú protinádorovú aktivitu vytváraním reaktivných oxidatívnych častic (ROS). Nerovnováha medzi prooxidatívnym a antioxidantívnym systémom vedie k akumulácii ROS a následné oxidatívne poškodenie DNA. Keďže nádorové bunky sú náchylnejšie na oxidatívne poškodenie DNA ako nenádorové bunky, mohlo by dochádzať k ich špecifickému poškodeniu. Modulácia tvorby ROS pomocou prírodných zlúčenín by mohla viesť k selektívnej smrti nádorových buniek a taktiež prípadnú senzitivizáciu nádorových buniek na chemoterapeutiká.

Cieľom našej práce bolo detailne objasniť úlohu a reguláciu bunkového antioxidantívneho systému v procese oxidatívneho poškodenia DNA v kolorektálnych nádorových bunkových liniách.

Naše výsledky na kolorektálnych bunkových liniách (HCT116, HT29, SW480) ukazujú po 24 hodinovom pôsobení 0.5 µg/µl extraktu GLC výrazné zníženie aktivity superoxid dizmutázy 1 (25%, p<0.01), ako aj pokles enzymatickej aktivity glutatión peroxidázy (20%, p<0.01). Tento proces vyzval následnú akumuláciu ROS (o 35% oproti kontrole). Navyše dochádza k zníženiu expresie Nrf1 (nuclear respiratory factor 1), transkripcného faktora zodpovedného za expresiu génov zapojených v antioxidantívnej odpovedi bunky. Tento proces vedie k poklesu prežívania nádorových buniek (25%, p<0.05).

Dokázali sme, že extrakty GLC znížujú aktivitu bunkového antioxidantívneho systému, čo vedie k zvýšenému oxidatívnomu poškodeniu DNA a následnej bunkovej smrti kolorektálnych nádorových buniek. Predpokladáme, že tento proces je regulovaný pomocou Nrf1. Využitie prírodných zlúčenín, ako doplnku ku klasickej liečbe nádorových ochorení, by mohlo byť potencionálnym novým prístupom k terapii kolorektálneho karcinómu.

Poďakovanie: táto práca bola podporená projektom AMVIS LH13061 a GACR 15-14789S, AZV 15-27580 A

Natural compounds and their effect on 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines

A. Cumova^{1,2}, A. Opattova^{1,2}, S. Vodenkova^{1,4}, J. Horak¹, D. Sliva³, P. Vodicka^{1,2}

¹Department of the Molecular Biology of Cancer, The Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

²First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

³Indiana University School of Medicine, Indianapolis, United States

⁴Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Presenting author email: *andrea.partlova@gmail.com*

Colorectal cancer (CRC) is the second most common type of cancer and the second most common cause of cancer related deaths in Europe. 5-Fluorouracil (5-FU) is widely used in treatment of various cancers including CRC, but apart from the cytotoxic effect on cancer cells may also cause adverse toxic side effects. 5-FU is an anti-metabolite with chemical structure similar to that of the pyrimidine molecules of DNA and RNA. However, response to chemotherapy is often limited by drug resistance. The p53 protein is one of the most widely studied tumour suppressors and mutations in *TP53* gene are frequently detected in different types of tumours. Anti-cancer activity of 5-FU is partly attributed to its ability to induce p53-dependent cell-cycle arrest and apoptosis. Therefore mutations or deletions of p53 can often cause cancer cells to become resistant to 5-FU which leads to worse response and poor prognosis. *Ganoderma Lucidum*(GLC) is a mushroom used in Traditional Eastern Medicine which exhibits anti-cancer and anti-proliferative effects *in vitro*. Potentiating the anti-cancer effects of conventional chemotherapeutics such as 5-FU by natural compounds may modify their necessary dose and can contribute to decrease of drug resistance and toxic side effects.

The aim of our study is to define the interaction between 5-FU and GLC extract and their simultaneous effect on survival in CRC cell lines.

We have studied the response of several CRC cell lines (HCT116, HCT116 p53^{-/-} and HT29) with different p53 status to 5-FU and GLC treatment alone and in combination. We observed decreased survival in CRC cell lines after combined 5-FU and GLC treatment. Survival of HCT116 after 24h treatment with 5µM 5-FU decreased only insignificantly (by 5%, p=0.5), but after 24h treatment with 5µM 5-FU + 0.5 mg/ml GLC survival decreased by 75% (p<0.05). Our preliminary results suggest that survival of HCT116 p53^{-/-} after 24h treatment of 5µM 5-FU was not significantly decreased, but after 0.5 mg/ml GLC treatment survival decreased by 43.9% and after combined 5µM 5-FU + 0.5 mg/ml GLC treatment survival decreased by 73.4%.

Our results suggest that GLC extract significantly increases cytotoxicity and genotoxicity of 5-FU in CRC lines with different p53 status and may potentially modulate the response of p53 knock-out cells which are less sensitive to 5-FU treatment. Interaction of conventional chemotherapeutics with natural compounds introduces a novel aspect in cancer research and therapy.

Acknowledgement: AMVIS LH13061 and AZV 15-27580 A (Ministry of Health of the Czech Republic)

Vliv přírodních látek na poškození DNA a reparační kapacitu u kolorektálních buněčných linií

S. Vodenková^{1,2}, A. Opatová^{1,2}, A. Čumová^{1,2}, D. Slíva³, P. Vodička^{1,2}

¹Oddělení molekulární biologie nádorů, Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha, Česká republika

²Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha, Česká republika

³Department of Medicine, School of Medicine, Indiana University, Indianapolis, IN, USA

Klíčová slova: poškození DNA, oprava DNA, 5-fluorouracil, *Ganoderma Lucidum*

Email autora prezentace: vodenkova@biomed.cas.cz

Kolorektální karcinom (CRC) představuje celosvětovou zdravotní zátěž s velmi vysokou incidencí i mortalitou. Problematika CRC se potýká s nedostatkem spolehlivých prediktivních a prognostických biomarkerů, pozdní diagnózou a s poměrně nízkou efektivitou léčby (pouze 50 %). Vývoj nádoru je ve většině případů iniciovan defektem v opravě poškození DNA, a zároveň řada cytostatik působí na základě neselektivní indukce poškození DNA a následné apoptózy.

CRC je po dlouhá léta konvenčně léčen 5-fluorouracilem (5-FU), který je i v současné době hlavní složkou kombinačních chemoterapeutických režimů. 5-FU, halogenovaný pyrimidin, je buďto přímo inkorporován do DNA nebo způsobuje narušení syntézy thymidinu z uracilu, který je pak chybně inkorporován do DNA. Oprava těchto poškození DNA vyžaduje účast bázově excizní opravy (BER) a systému opravy chybného párování bazí (MMR).

Navzdory tomu, že chemoterapeutika působí cytotoxicky na nádorové buňky a prodlužují dobu přežívání u pacientů s pokročilými stádii CRC, způsobují též (kvůli jejich neselektivnímu účinku) výrazné vedlejší účinky, včetně toxicity (poškození též zdravé tkáně). Ideálním prostředkem k redukci těchto vedlejších efektů je zahrnutí přírodních látek s prokázaným toxicitním účinkem na nádorové buňky do léčebných programů, což by mohlo vést ke snížení potřebné dávky cytostatik. Velmi nadějnou látkou je extrakt z houby *Ganoderma Lucidum* (GLC), který se užívá v tradiční východní medicíně, a jehož složky vykazují jak přímé (ovlivnění signalizace nádorových buněk, oxidační stres), tak i nepřímé (stimulace imunitní odpovědi) protinádorové účinky.

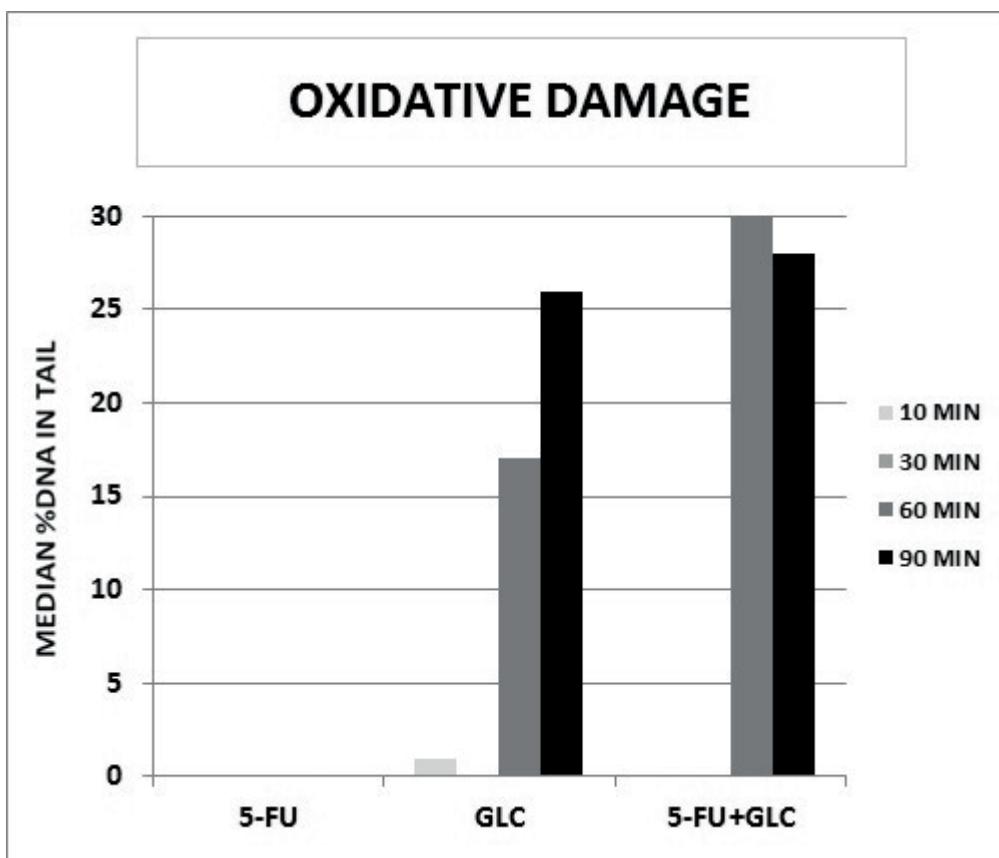
Předpokládáme, že vysoká aktivita DNA opravných mechanismů v cílové tkáni může přispět k velmi nízké účinnosti léčby, v některých případech až k rezistenci nádorových buněk k chemoterapeutikům. Proto může mít cílená modulace aktivity opravy DNA zásadní vliv na efektivitu protinádorové léčby. Cílem této studie je sledování účinků 5-FU, GLC a zároveň jejich kombinace na poškození DNA (především oxidační) a bázově excizní opravu DNA u různých typů buněčných linií kolorektálního karcinomu.

V naší studii jsme použili linie HCT116, HT29, SW480 a NCM460. Buňky byly ovlivňovány po dobu 10, 30, 60 a 90 minut pomocí 5-FU (5µM), GLC (0,5µg/µl) a kombinací 5-FU s GLC. Míra celkového a oxidačního poškození DNA a bázově excizní opravy DNA byly měřeny metodou Comet assay.

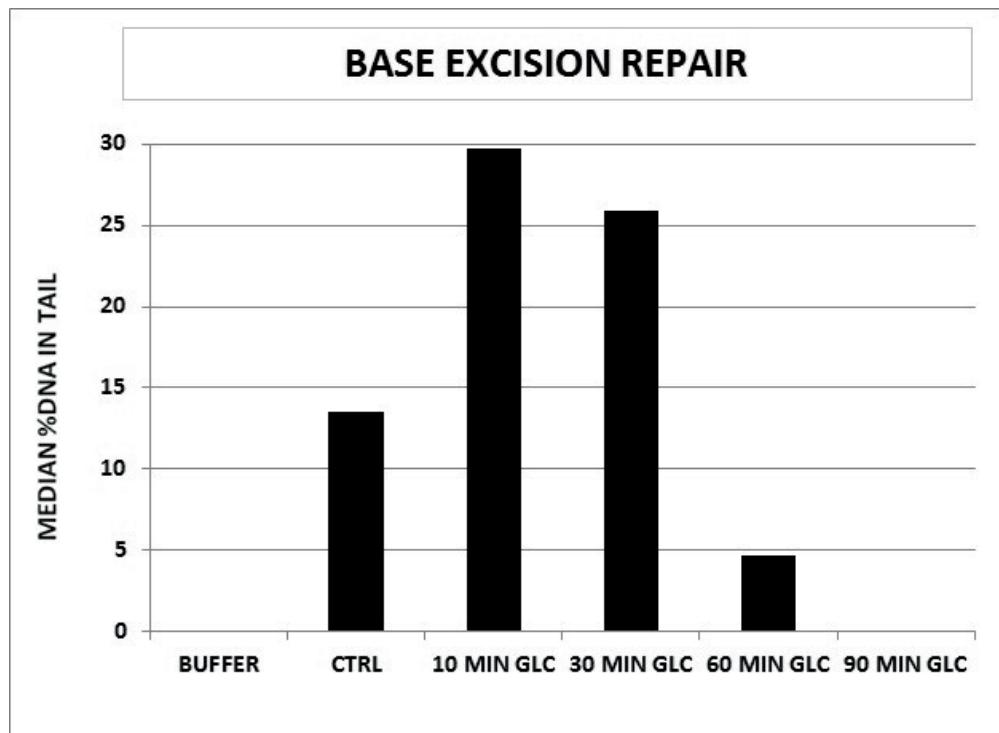
Předběžné výsledky naznačují, že se po přidání jak samotného extraktu z *Ganoderma Lucidum*, tak jeho kombinace s 5-FU ke kolorektálním liniím, zvyšuje oxidační poškození DNA u HCT116 (Obrázek 1) a HT29 buněk v čase. Zároveň tento extrakt výrazně tlumí bázově excizní opravu DNA (Obrázek 2). Tyto výsledky též korelují s dalšími výsledky naší studie, kdy byla pomocí GLC prokázána inhibice genu Nrf1, jehož proteinový produkt hráje důležitou roli při snižování regulace antioxidačních a xenobiotika metabolizujících enzymů během oxidačního stresu.

Modulace reparační aktivity DNA pomocí přírodních extractů představuje nový přístup v protinádorové terapii.

Poděkování: Tato studie byla podpořena projekty AMVIS LH13061 a AZV 15-27580 A.



Obrázek 1. Oxidační poškození HCT116 buněk po jejich ovlivnění 5-FU, GLC a 5-FU+GLC.



Obrázek 2. Bázové excizní oprava DNA HCT116 buněk po jejich ovlivnění GLC.

Genome-wide DNA methylation changes in rectal cancer

V. Vymetalkova^{1,2}, P. Vodicka^{1,2}, B. Pardini³, F. Rosa³, T.K. Nilsson⁴, S.A. Farkas⁵

¹Inst. Exp. Med., ASCR, Prague, Czech Republic

²Inst. Biol. Med. Genet., 1st Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic

³Human Genetics Foundation, Turin, Italy

⁴Dep. Med Biosc./Clin. Chem., Umeå University, Umeå, Sweden

⁵Dep. Lab. Med.; Örebro University; Örebro, Sweden

Presenting author email: vpolakova@biomed.cas.cz

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cause of cancer and the second leading cause of cancer death in Europe. From a clinical point of view, cancers of the colon and the rectum (RC) are 2 distinct entities that require different preventive and treatment strategies. Accordingly, when analyzing the genetics and biology of these tumor entities, they should be treated separately. With respect to CRC, extensive catalogues of genome-wide methylation changes have been identified in the past few years. However, for RC only, very limited data are available, since existing studies usually failed to separate these entities.

We have analysed 32 paired samples using the Human Methylation 450 K Bead chip which interrogates 485,577 CpG sites. The methylation results from our study on RC patients were compared with a publically available, open-access dataset of RC individuals from The Cancer Genome Atlas (TCGA).

We found 5929 CpG sites differentially methylated in RC with majority of them located within the 5'UTR and 3'UTR regions of a gene. These CpG sites are mapped to 1192 different genes mostly found on chromosomes 1, 4, 6-8, and 13.

We aimed to identify genes with the highest quantitative differences in methylation between tumor and healthy tissues. The differential methylation ranged between -0.53 and 0.62 for the selected top ten hypo- and hypermethylated CpG sites.

Our results were confirmed by data on RC individuals from TCGA. We have observed several targets for further evaluation of possible clinical diagnostic and prognostic utility.

Acknowledgements: This work was supported by Czech Science Foundation (P301/12/1585; GA15-08239S).

Non-synonymous functional variants in DNA repair genes in sporadic colorectal cancer: Searching for predictive and prognostic markers.

Katerina Jiraskova^{1,2}, Jana Slyskova², Barbara Pardini³, Cornelia Di Gaetano³, Fabio Rosa³, Veronika Vymetalkova^{1,2}, Pavel Vodicka^{1,2}

¹Institute of Biology and Medical Genetics of the First Faculty of Medicine,
Charles University, Prague, Czech Republic,

²Dept. of the Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine,
Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic,

³Human Genetics Foundation, Torino, Italy

Keywords: Colorectal cancer, DNA repair, functional polymorphisms

Presenting author email: *jiraskova@biomed.cas.cz*

Colorectal cancer (CRC) has one of the highest mortality due to the late diagnosis and a lack of proper predictive and prognostic markers. According to the current knowledge, DNA repair processes are involved both in the onset of CRC and in the treatment efficacy.

In the present study, we analyzed the link between functional genetic polymorphisms (SNPs) in DNA repair genes covering the main DNA repair pathways (relevant for therapy response) in relation with the risk of CRC and clinical outcomes. Our set of candidate polymorphisms was selected according to different functional and genomic databases (FSNP, GAD, Linkage Disequilibrium, Gerp++, SiPhy). FSNP database provides integrated information about the functional effects of SNPs which are predicted and indicated at several levels (protein coding, splicing regulation, transcriptional regulation, post translation). We have focused on those affecting protein coding. We hypothesize that these modified proteins modulate the function/efficiency of DNA repair, and thus may have an effect on CRC.

Sixteen polymorphisms in twelve DNA repair genes (*C19orf40*, *EME1*, *FANCI*, *MUS81*, *NEIL3*, *POLE*, *POLN*, *POLQ*, *RAD51D*, *REV1*, *REV3L*, *RPA1*) were analyzed in DNA samples of 1172 cases and 1831 controls from the Czech Republic. Clinical data at the time of diagnosis and complete information on follow up were provided for all patients.

Preliminary results show that genetic variations in several DNA repair genes were associated with clinical outcome. In particular, CRC patients carrying the AG heterozygous genotype for rs5030755 in *RPA1* gene displayed a longer survival and decreased recurrence risk (Overall Survival (OS): HR 0.74; 95% CI 0.56-0.98; p=0.04 and Event-free survival (EFS): HR 0.72; 95% CI 0.54-0.95; p=0.02). This association with better OS was more pronounced in individuals with colon and sigmoideum cancer (HR 0.58; 95% CI 0.4-0.83; p=0.0035).

Understanding the SNPs effect on the treatment response, resulting ultimately into low-cost and low-invasive markers, is regarded as very important for the possibility to tailor patient specific treatment strategy. Individualized therapy will eventually help to improve therapeutic efficacy and to minimize toxicities. The present results identified plausible candidate DNA repair gene variants potentially affecting clinical outcome in relation to CRC patient's survival.

Acknowledgements: This work was supported by the Grant Agency of the Charles University GAUK 112515 and GA CR 15-14789S.

Role of mucin gene variations in microRNA binding sites in modulating colorectal cancer susceptibility and clinical outcomes

Petra Bendova^{1,2}, Barbara Pardini³, Fabio Rosa³, Katerina Jiraskova^{1,2}, Cornelia Di Gaetano^{3,4}, Miloslav Levy⁵, Veronika Veskrnova⁶, Tomas Buchler⁶, Ludmila Vodickova^{1,2,7}, Alessio Naccarati^{1,3}, Veronika Vymetalkova^{1,2}, Pavel Vodicka^{1,2,7}

¹Dept. of Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²Inst. Biol. Med. Genet., First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

³Human Genetics Foundation, Turin, Italy

⁴Dept of Medical Sciences, University of Turin, Turin, Italy

⁵Dept. of Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and Thomayer University Hospital, Prague, Czech Republic

⁶Department of Oncology, Thomayer Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

⁷Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

Keywords: Mucin genes; Colorectal cancer risk and clinical outcomes; miRNA binding sites; 3'UTR polymorphisms; MUC21; MUC17; Overall survival; Event-free survival.

Presenting author email:petra.bendova@email.cz

Mucins, high molecular weight glycoproteins predominantly expressed at the epithelial surface of tissues, provide protection for colon surface under normal physiological conditions. Mucinous colorectal carcinoma is generally defined as having greater than 50% of the tumor area with a mucinous differentiation by histologic examination.

miRNAs have recently emerged as important regulators for altered mucin expression during malignant development. miRNAs are short non-coding RNAs that regulate gene expression by binding to the 3'untranslated regions (3'UTR) of target mRNA thereby hampering protein translation or inducing mRNA destabilization. Aberrant miRNA expression and/or function are frequently observed in colorectal cancer (CRC). Polymorphisms in miRNA binding sites may affect miRNA binding to target genes, resulting in differential mRNA and protein expression and susceptibility to common diseases. We hypothesize that variations in mucin genes may modulate signaling response affecting cancer susceptibility, cancer survival and efficacy of chemotherapy.

Thirteen polymorphisms in nine mucin genes (MUC6, MUC7, MUC13, MUC14, MUC15, MUC17, MUC20, MUC21 and MUC24) were analyzed in DNA samples of 1111 cases and 1469 controls from the Czech Republic. Investigated variants were also studied in association with clinical outcome in all patients provided with detailed information on follow up.

Genetic variations in mucin genes were associated with clinical outcome. In particular, CRC patients carrying the CC genotype for rs886403 in MUC21 gene displayed a shorter survival and higher recurrence risk (HR 1.69; 95% CI 1.13-2.46; p=0.01 and EFS: HR 1.99; 95% CI 1.38-2.84; p=0.0002, resp.). The observed association was strikingly pronounced in colon cancer patients while individuals with rectal cancer and carrying variant CC genotype of rs4729655 in MUC17 displayed better overall survival (HR 0.27; 95% CI 0.14-0.54; p=0.0002).

Expanding our knowledge on mucin involvement in CRC may help us better understand the etiopathogenesis of this disease and thereby contribute to the development of new treatment strategies. The present results identified plausible candidate SNPs potentially affecting miRNAs that target mucin genes in relation to CRC patients' survival.

Work supported by IGA MZ: NT 15-26535 A and NT 13424

Regulace genu MUC13 pomocí miRNA u kolorektálního karcinomu: prediktivní faktory a vztah k terapii

L. Bártů^{1,2}, V. Vymetálková^{1,2}, A. Opattová^{1,2}, P. Vychytílova³, O. Slabý³, M. Levý⁴, P. Vodička^{1,2}

¹ Department of the Molecular Biology of Cancer, IEM AS CR, Prague, Czech Republic

² Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

³ Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁴ Department of Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and Thomayer University Hospital, Prague, Czech Republic

lindabartu@gmail.com

Kolorektální karcinom (CRC) je druhým nejčastějším rakovinovým onemocněním v rozvinutých zemích. V roce 2008 bylo v Evropě zaznamenáno 436 000 nových případů CRC a 212 000 pacientů během tohoto roku zemřelo v důsledku onemocnění (Ferlay et al., 2010). Česká republika se v Evropě řadí na druhé místo v incidenci CRC, který je druhou nejčastější příčinou úmrtí. Jak bylo ukázáno v našich předešlých studiích, polymorfismy v miRNA vazebných místech u genů pro muciny mohou signifikantně snižovat riziko pro vznik CRC u SNP rs1532602 v genu MUC13 (Vymetalkova et al., 2016).

MUC13 je membránový mucin, který je v normálních buňkách exprimován na nízké úrovni v epiteliálních buňkách gastrointestinálního, respiračního a reprodukčního traktu (Maher et al. 2011, Packer et al., 2004; Gupta et al., 2012). Gupta a kol. (2014, 2012) popisují vliv MUC13 na tumorgenezi a metastazování buněk u karcinomu tlustého střeva. Jeho over-exprese byla prokázána u ovariálního a pankreatického karcinomu jak ve studiích *in vitro*, tak v modelech *in vivo* (Chauchan et al. 2012, 2009). MUC13 je vysoce exprimovaný na povrchu střevní sliznice, kde je spojován se zánětlivým střevním onemocněním (Sheng et al., 2013). Jeho aberantní lokalizace je popisována u nádorů tlustého střeva, kde zároveň zvyšuje buněčný růst, buněčnou migraci a invazivitu tumoru.

miRNA jsou krátké (~22 nucleotidů) nekódující RNA exprimované jak u rostlin, tak u živočichů. Tyto malé molekuly se váží na 3'konec exprimované mRNA čímž spouští degradaci mRNA nebo inhibují její translaci (Shromon, 2010). Aberantní exprese miRNA genů může u člověka vést k řadě onemocnění včetně nádorového bujení (Papagiannakopoulos et al., 2008). Nedávné poznatky poukazují na potenciální vliv miRNA pro vznik, diagnostiku a prognózu u CRC. Proto se miRNA jeví jako logický cíl při výzkumu nové anti-nádorové terapie (Dong, 2001 a Huang, 2009).

Současné práce potvrzují, že miRNA (mir-137, miR-145 and miR-4647) přímo regulují MUC13. Bylo prokázáno, že miR-145 váže mRNA MUC13 čímž suprimuje růst a invazivitu rakovinných buněk pankreatického tumoru (Khan et al., 2014). *In silico* analýzy s využitím MicroSniper (<http://epicenter.ie-freiburg.mpg.de/services/microsniper/>), online algoritmus, poukazují na možné 6-, 7-, 8-mer vazebná místa pro miR-4647 pro rs1532602 na 3' UTR konci mRNA pro MUC13.

miR-137 se může podílet při tumorgenezi (včetně CRC) jako tumorsupresor, a to prostřednictvím regulace genů účastnících se kontroly buněčného cyklu (Liu et al., 2011).

miR-145 je považována za tumorsupresor u mnoha nádorů, včetně CRC. Nedávná studie ukazuje, že miRNA-145 je downregulována u lidského ovariálního karcinomu, čímž dochází ke stimulaci nádoru (Wu et al., 2013).

Výsledky:

Buněčné linie HCT-116 jsme transfekovali pomocí 10 nM pre-miR-137, pre-miR-145 a pre-miR-4647. Po navýšení jejich hladin jsme sledovali vliv těchto miRNA na expresi genu MUC13.

Zajímavě bylo zjištěno, že miRNA-137 netlumí expresi MUC13, ale naopak u transfekovaných buněk došlo k nárustu exprese genu MUC13 a zároveň ke snížené proliferaci, což může být vysvětleno

tumorsupresorovým efektem miRNA-137. MUC13 naopak pravděpodobně díky svým 3 EGFI-III doménám (epidermal growth factor like) zvyšuje expresi a proliferaci buňek.

Nejvýraznější pokles exprese MUC13 byl prokázán u miRNA-4647, a to ve všech sledovaných časech (24h, 48h, 72h, 96h).

Obdobné výsledky jsme získali i při sledování expresních profilů u 200 párových vzorků od CRC pacientů.

Výsledky budou ještě potvrzeny metodou Western Blot, proliferačními a migračními testy.

Tato práce byla financována: NT 13424, Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic AZV MZ 15-26535 A,

Reference:

- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010, 127(12):2893-2917.
- Maher DM, Gupta BK, Nagata S, Jaggi M, Chauhan SC. Mucin 13: structure, function, and potential roles in cancer pathogenesis. *Mol Cancer Res.* 2011, May;9(5):531-7. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0443.
- Packer LM, Williams SJ, Callaghan S, Gotley DC, McGuckin MA. Expression of the cell surface mucin gene family in adenocarcinomas. *Int J Oncol.* 2004 Oct;25(4):1119-26.
- Gupta BK, Maher DM, Ebeling MC, Sundram V, Koch MD, Lynch DW, Bohlmeier T, Watanabe A, Aburatani H, Puumala SE, Jaggi M, Chauhan SC. Increased expression and aberrant localization of mucin 13 in metastatic colon cancer. *J Histochem Cytochem.* 2012 Nov;60(11):822-31. doi: 10.1369/0022155412460678. Epub 2012 Aug 20.
- Gupta BK, Maher DM, Ebeling MC, Stephenson PD, Puumala SE, Koch MR, Aburatani H, Jaggi M, Chauhan SC. Functions and regulation of MUC13 mucin in colon cancer cells. *J Gastroenterol.* 2014 Oct;49(10):1378-91. doi: 10.1007/s00535-013-0885-z. Epub 2013 Oct 7.
- Chauhan SC, Ebeling MC, Maher DM, Koch MD, Watanabe A, Aburatani H, Lio Y, Jaggi M. MUC13 mucin augments pancreatic tumorigenesis. *Mol Cancer Ther.* 2012 Jan;11(1):24-33. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0598. Epub 2011 Oct 25.
- Chauhan SC, Vannatta K, Ebeling MC, Vinayek N, Watanabe A, Pandey KK, Bell MC, Koch MD, Aburatani H, Lio Y, Jaggi M. Expression and functions of transmembrane mucin MUC13 in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2009 Feb 1;69(3):765-74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0587. Epub 2009 Jan 27.
- Sheng YH, Triyana S, Wang R, Das I, Gerloff K, Florin TH, Sutton P, McGuckin MA. MUC1 and MUC13 differentially regulate epithelial inflammation in response to inflammatory and infectious stimuli. *Mucosal Immunol.* 2013 May;6(3):557-68.
- Gupta BK, Maher DM, Ebeling MC, Stephenson PD, Puumala SE, Koch MR, Aburatani H, Jaggi M, Chauhan SC. Functions and regulation of MUC13 mucin in colon cancer cells. *J Gastroenterol.* 2014 Oct;49(10):1378-91.
- Shomron N: MicroRNAs and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2010, 11(5):629-632.
- Papagiannakopoulos T, Kosik KS: MicroRNAs: regulators of oncogenesis and stemness. *BMC Med* 2008, 6:15.
- Dong Y, Wu WK, Wu CW, Sung JJ, Yu J, Ng SS: MicroRNA dysregulation in colorectal cancer: a clinical perspective. *Br J Cancer* 2011, 104(6):893-898.
- Huang ZM, Yang J, Shen XY, Zhang XY, Meng FS, Xu JT, Zhang BF, Gao HJ: MicroRNA expression profile in non-cancerous colonic tissue associated with lymph node metastasis of colon cancer. *J Dig Dis* 2009, 10(3):188-194.
- Khan S, Ebeling MC, Zaman MS, Sikander M, Yallapu MM, Chauhan N, Yacoubian AM3, Behrman SW, Zafar N, Kumar D, Thompson PA, Jaggi M, Chauhan SC. MicroRNA-145 targets MUC13 and suppresses growth and invasion of pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2014 Sep 15;5(17):7599-609.
- Liu M, Lang N, Qiu M, Xu F, Li Q, Tang Q, Chen J, Chen X, Zhang S, Liu Z et al: miR-137 targets Cdc42 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2011, 128(6):1269-1279.
- Wu H, Xiao Z, Wang K, Liu W, Hao Q. MiR-145 is downregulated in human ovarian cancer and modulates cell growth and invasion by targeting p70S6K1 and MUC1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 29;441(4):693-700.

Nanoparticles in drug delivery

F. Laffleur, A. Bernkop-Schnürch

Department of Drug Delivery and Powder Technology, University of Innsbruck, Innsbruck, A-6020, Austria

Presenting author email: *Flavia.Laffleur@uibk.ac.at*

For non-invasive drug administration, nanoparticulate delivery systems offer the advantage of providing a prolonged residence time on mucosal membranes and the possibility to reach greater mucosal surface areas leading to a comparatively higher drug uptake. However, it is believed that the full potential of non-invasive delivery systems for uptake across mucosal barriers has by far not been reached. The development of controlled release systems for drug delivery to mucosal surfaces is of widespread interest.

To gain mechanistic insight to penetrate through mucosa and rationally engineer particles to cross mucus layer, we looked to nature for guidance. The choice of system primarily depends on the therapeutic target and peculiar properties of the target mucosa including thickness of the mucus gel layer, mucus turnover rate and water movement within the mucus. Future trends are heading in the direction of combining both systems to one i.e. mucoadhesive and mucopenetrating properties on the same particles.

Comparative analysis of the toxic responses of organic extracts from diesel/biodiesel engine emissions in human lung BEAS-2 B cells

H. Líbalová¹, K. Vrbová¹, T. Brzicová¹, J. Sikorová¹, M. Vojtíšek-Lom², V. Beránek², M. Cigánek³, J. Neča³, K. Pěnčíková³, M. Machala³ and J. Topinka¹

¹Institute of Experimental Medicine AS CR, Prague, Czech Republic

²Czech Technical University, Prague, Czech Republic

³Veterinary research Institute, Brno, Czech Republic

Presenting author email: *libalova@biomed.cas.cz*

Alternative engine fuels made from renewable sources are currently of great interest and importance due to their growing production and use. Despite their undisputable benefits such as sustainability or energy security and balance, recent findings on the toxicity of their combustion-related emissions are contradictory and give rise to several concerns related to environmental and health risks. In the present study, we compared toxicity of organic compounds extracted from emissions of four different diesel/biodiesel fuels and their blend, respectively (DEPs). Human lung BEAS-2 B cells were incubated 4 and 24 hours with equivalent subtoxic dose of each DEP extract. To detect transcriptional changes and generate gene expression profiles, we used whole-genome microarrays (Illumina). Detailed chemical analysis of DEP extracts was performed to assess the chemical composition possibly associated with the toxicity.

Our results suggest distinct qualitative and quantitative molecular response upon 4h treatment comparing to 24h treatment. After 4h incubation, we observed modulation of many processes and pathways mostly related to oxidative stress response, DNA damage response or apoptosis while 24h incubation resulted in deregulation of genes involved in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons, cell cycle, lipid and steroid hormone metabolisms and many others. We also found differences among individual DEP extracts. NEXBTL100, a low carbon biofuel, exhibited after 4h and 24 incubation modest changes and distinct molecular response comparing to others (conventional fossil diesel fuel, 30% blend with biocomponent and 100% biodiesel fuel).

In conclusion, we used microarray analysis as a robust and high-throughput method to describe a complex molecular response on transcriptional level and to reveal a „fingerprint“ of genome-wide expression changes characteristic for each diesel/biodiesel engine emissions extract. Supported by the Czech Science Foundation, project BIOTOX - Mechanisms of toxicity of biofuel particulate emissions (13-01438S) and by project MEDETOX (LIFE10-ENV-CZ-651).

Rozdíly v genové exprese a v indukci přechodu buněk z epitelálního do mesenchymálního stavu v plicních epitelálních buňkách A549 a HBEC

M. Hýžd'álová¹, S. Strapáčová¹, K. Pěnčíková¹, L. Svržková¹, J. Procházková¹,
H. Líbalová², J. Topinka², J. Vondráček³, M. Machala¹

¹Oddělení chemie a toxikologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, 62100, Česká republika

²Laboratoř genetické toxikologie, Ústav experimentální medicíny AVČR, Praha, 14220, Česká republika

³Oddělení cytokinetiky, Biofyzikální ústav AVČR, Brno, 61200, Česká republika

Presentující autor - email: hyzdalova@vri.cz

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) hraje klíčovou roli v toxicitě persistentních polychlorovaných aromatických sloučenin jako je 2,3,7,8-tetrachlórbenzo-p-dioxin (TCDD) a polycyklických aromatických uhlovodíků, jejichž nejvýznamnějším zástupcem je benzo[a]pyren (BaP). V této práci byly studovány 1) změny genové exprese a vybraných proteinů po krátkodobé expozici TCDD nebo BaP (6-72 hod.), kdy dochází k adaptačním indukcím detoxikačních enzymů a raným změnám genové exprese, které mohou být spojeny s vývojem dioxinové toxicity; 2) procesy přechodu buněk ze statutu epithelialního na mesenchymální (EMT) po 14tidenní a delší expozici TCDD, BaP nebo TGFbeta (modelový induktor EMT); použité metody zahrnovaly změny genové exprese (qRT-PCR), Western blotting markerů EMT, test migrace, sledování morfologie buněk a změn buněčného cyklu a proliferace průtokovou cytometrií. Buněčnými modely byly lidské epithelialní buňky – plicní adenokarcinoma A549 buňky, lidské bronchiální netumorigenní epithelialní buňky HBEC-3KT a HBEC-12KT a také BaP-transformované HBEC-12KT-B1 buňky.

Adaptační geny (CYP1A1, CYP1B1, TIPARP, AHRR, ALDH1A3) byly indukovány shodně ve všech buněčných liniích a jejich exprese byla zvýšena již po 6 hod. expozici TCDD. Další geny, ačkoliv také AhR-dependentní byly deregulovány nepřímo až po 24-72 hod. expozici. Byly sledovány následující možné mechanismy této nepřímé regulace: vliv methylačního/demethylačního statutu sledovaného genu, modulace buněčného cyklu a proliferace a byla uvažována možná AhR-dependentní exprese/regulace jiného transkripčního faktoru. Byla také provedena meta-analýza promotorů vybraných deregulovaných cílových AhR genů (Genomatix). Práce v této oblasti intenzívne pokračuje. Na rozdíl od společné indukce adaptačních genů v různých typech plicních buněk byly nalezeny významné rozdíly mezi změnami genové exprese v buňkách A549, HBEC-3KT a 12KT a to jak po krátkých, tak také 2-6týdenních expozicích. Také exprese genů a proteinů, které souvisejí s EMT, změny v morfologii a migrační aktivitě buněk se významně lišily. V buňkách A549 byla EMT indukována již po 2 týdnech po expozici BaP nebo TGFbeta, nikoliv však po TCDD. Ačkoliv AhR přispíval k řadě raných efektů spojovaných s nádorovou promoci (efekty ligandů AhR - TCDD a BaP), další mechanismy, např. genotoxické, jsou nutné k plné indukci EMT.

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem GAČR č. 14-22016S.

Inhalation of nanoparticles and gene expression changes in mice

P. Rossner¹, K. Vrbova¹, S. Strapacova², A. Rossnerova¹, A. Ambroz¹,
Z. Vecera³, O. Sery³, M. Machala² and J. Topinka¹

¹Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine CAS,
Prague, 14220, Czech Republic

²Department of Chemistry and Toxicology, Veterinary Research Institute, Brno, 62100, Czech Republic

³Department of Environmental Analytical Chemistry, Institute of Analytical Chemistry CAS,
Brno, 60200, Czech Republic

Presenting author email: rossner@biomed.cas.cz

Extensive use of nanomaterials (NM) in industry, medicine, consumer goods and other fields and products creates potential health hazards both for workers in NM-producing plants and users of NM-containing products. Therefore, it is essential to identify the NM with potential negative biological effects and understand mechanisms of their toxicity. In general, toxicity of NM may be modulated by surface modification of nanoparticles (NP), their chemical composition, shape, size, tendency to form aggregates and other physico-chemical properties. The mechanisms of toxicity mostly involve formation of reactive oxygen species (ROS) resulting in oxidative stress induction. ROS production may be induced either primarily due to the presence of reactive compounds on the surface of NP, or as a secondary process associated with inflammatory response induced by the presence of NP in the organism, particularly in the immune cells. Despite the amount of NM produced every year and the number of applications where NM are used, toxicity studies are mostly limited to *in vitro* cell models. Thus, biological impact of NM exposure in complex organisms, including mammals, is not well characterized.

To evaluate possible effects of NM exposure on gene expression we used adult female ICR mice in inhalation experiments with several commonly used NP (CdO, MnO_x, ZnO). The mice were exposed for three time intervals (three days, six weeks or three months) to mimic acute, sub-chronic and chronic NM exposure effects. Gene expression changes were evaluated in mRNA extracted from lung tissue. For analysis, we selected genes whose products are involved in processes most relevant to expected biological effects of NM: oxidative stress, immune response, inflammation, apoptosis, DNA damage and repair, and cell cycle regulation. We used a novel approach based on next-generation sequencing (MiSeq, Illumina) of 298 isoforms of 68 selected genes. Unlike standard Illumina microarray analysis this method allowed us to evaluate gene expression changes of individual transcription variants thus giving us the opportunity to elucidate their role in the response of the organism to the inhalation exposure to NM.

In our presentation we will discuss advantages and disadvantages of the novel approach of gene expression analysis when compared with microarrays. We will explain the steps needed to design targeted RNA expression assay and show the preliminary data of gene expression changes following the exposure of mice to NM.

Acknowledgements: This work was supported by the Ministry of Youth, Education and Sports of the Czech Republic (LO1508) and Czech Science Foundation (P503/12/G147).

Porovnání toxických efektů individuálních aromatických kontaminantů ovzduší – polycyclických aromatických uhlovodíků s různou molekulovou hmotností a jejich nitro-, monomethyl- a oxy-derivátů

M. Machala¹, K. Pěnčíková¹, M. Ciganek¹, J. Neča¹, L. Švihálková-Šindlerová², S. Marvanová¹, L. Trilecová¹, L. Pálková¹, S. Strapáčová¹, A. Milcová³, Z. Nováková³, J. Topinka³, Z. Dvořák⁴, J. Vondráček²

¹Oddělení chemie a toxikologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, 62100, Česká republika

²Oddělení cytokinetiky, Biofyzikální ústav AVČR, Brno, 61200, Česká republika

³Laboratoř genetické toxikologie, Ústav experimentální medicíny AVČR, Praha, 14220, Česká republika

⁴Katedra buněčné biologie a genetiky PřF, Universita Palackého, Olomouc, 77900, Česká republika

Presentující autor - email: machala@vri.cz

Studium toxicitních vlastností PAHs je tématem mnoha desetiletí. Toxicita a karcinogenita PAHs je výsledkem několika mechanismů a vzájemných interakcí. Sledované parametry toxicity rozdělit do několika skupin: 1) aktivace genové exprese kontrolované aryluhlovodíkovým receptorem (AhR) spojená s tzv. „dioxinovou“ toxicitou; 2) genotoxicita a mutagenita (produkce stabilních DNA aduktů s metabolity PAHs, oxidativní poškození DNA, chromosomální aberace, mutagenita v bakteriálních a savčích modelech atd.); 3) nádorově promoční vlastnosti PAHs (inhibice mezibuněčných mezerových spojení – GJIC, nádorová promoce v modelech *in vivo*); 4) karcinogenita v rodentech a nověji buněčná transformace v jaterních a plicních buňkách; 5) další efekty jako imunotoxicita, endokrinní disruptce (např. estrogenita) a jiné. Velmi diskutovaných a často sledovaným mechanismem je vznik oxidativního stresu a oxidačního poškození DNA, fosfolipidů a proteinů. Zdá se ovšem, že tyto procesy nejsou až na výjimky hlavním mechanismem toxicity PAHs a jejich derivátů.

Systematická kvantitativní data pro velké série PAHs jsou ovšem k dispozici jen pro AhR aktivaci v jaterních *in vitro* modelech (DR-CALUX, AZ-AhR, indukce CYP1A1), mutagenitu PAHs v Amesově testu (která ovšem neposkytuje příliš relevantní informaci, např. pro nitroderiváty PAHs), mutagenitu v lymfoblastoma buňkách transfekovaných bioaktivacním enzymem CYP1A1 a dále pro inhibici GJIC a sumární data pro karcinogenní potence PAHs. Byly publikovány relativní efektivní potence (REP) nebo tzv. toxicité ekvivalentní faktory (TEF), které porovnávají efekty individuálních látek s referenčním toxikantem, nejčastěji benzo[a]pyrenem (BaP), v případě aktivace AhR s 2,3,7,8-tetrachlórbenzo-p-dioxinem (TCDD).

Aktivace AhR, která je klíčová jak pro tzv. dioxinovou toxicitu (spojenou především s negenotoxicitními procesy - změnou genové exprese a signální transdukce), tak i pro metabolickou aktivaci PAHs, je však bezesporu jedním z hlavních parametrů toxicity a karcinogenity PAHs. V současné době byla dokončena studie sledující potence velké skupiny PAHs a jejich derivátů aktivovat AhR v modelu lidských hepatoma buněk HepG2 stabilně transfekovaných luciferázovým reportérovým genem pod kontrolou aktivovaným AhR. Porovnáním s REP hodnotami získanými v potkaních modelech jako je systém DR-CALUX ukazuje v některých případech velké mezidruhové rozdíly.

Extrémně vysoké mutagenní a karcinogenní potence byly stanoveny v různých modelech *in vivo* a *in vitro* pro dibenzo[a,l]pyren. Také cyklopenta[c,d]pyren je silný mutagen. Řada dalších PAHs naopak vykazuje jen nízkou genotoxicitu a mutagenitu v savčích buňkách a jejich efekty jsou převážně negenotoxicitní. Benzo[a]pyren a také např. další silný karcinogen 5-methylchrysen jsou relativně potentními induktory AhR, genotoxiny a inhibitory GJIC.

Velmi významným faktorem je koncentrace individuálních látek. Je zřejmé, že i velmi toxicke sloučeniny nemohou hrát významnou roli, pokud se vyskytují pouze ve stopových množstvích (to je příklad silného genotoxinu 3-nitrobenzanthronu). Použití toxicitních ekvivalentů (TEF x koncentrace jednotlivé látky) má své limity (především nedochází k adititivitě toxicitní odpověď ve směsích), nicméně je to nástroj, který ukazuje relativní příspěvek individuálních látek k toxicitě směsi.

Různé složení komplexních směsí motorových emisí a látek vázaných na vzdušný aerosol rozhoduje o různé toxicitě těchto směsí. V emisích ze vznětového (dieselového) motoru převládají PAHs s nízkou molekulovou hmotností 178 a 202 (fenantren, anthracen, fluoranthen, pyren), které vykazují minimální dioxinovou aktivitu a genotoxicitu; tyto látky při vyšších koncentracích inhibují GJIC. Emise z benzínových motorů obsahují významná množství PAHs s molekulovou hmotností 228 (chrysen, benz[a]anthracen) a také PAHs s molekulovou hmotností 252 (benzo[a]pyren, benzo[k]fluoranthen) a 276 (indenopyren), které mají vysokou dioxinovou aktivitu a vyšší genotoxicitu. Vzorky vzdušného aerosolu obsahují asi 10x vyšší množství PAHs s molekulovou hmotností 252; nejvýznamnější příspěvky dioxinové toxicity vykazují benzo[k]fluoranthen, indenopyren, dibenzo[a,h]anthracen a benzo[j]fluoranthen. Tyto efekty, predikované z dat o potencích individuálních látek, byly potvrzeny měřením dioxinové aktivity v testech DR-CALUX a AZ-AhR.

Tyto testy také odhalily vysokou dioxinovou aktivitu polární aromatická frakce, která obsahuje oxy-PAHs; individuální oxy-PAHs identifikované ve vyšších koncentracích však v těchto testech vykazovaly velmi nízkou indukci AhR a účinné toxikanty dosud nebyly identifikovány. Naopak středně polární aromáty včetně nitro-PAHs mají velmi nízkou dioxinovou aktivitu a genotoxicitu, ale produkují nízké, ale signifikantní oxidativní poškození DNA a membránových fosfolipidů.

Porovnáním karcinogenních potencí s dalšími toxicitními parametry se ovšem ukázalo, že jednotlivým parametrem nelze predikovat karcinogenitu individuálních látek nebo směsí. Proto je nutné sledovat více parametrů a usilovat o získání dalších systematických dat pro velké série PAHs a jejich derivátů, pokud možno v humánních modelech.

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem GAČR č. 14-22016S.

Biotransformácia a mechanizmus toxicity tkanivovo špecifických karcinogénov zo skupiny heterocyklickych aromatickych uhľovodíkov

A. Gábelová¹, Z. Valovičová¹ T. Farkašová¹, G. Prochazka², M. Mesárošová¹, J. Vondráček^{3,4}, M. Machala³, J. Topinka⁵

¹Oddelenie genetiky, Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, 845 05 Bratislava, SR

²Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institute, Novum, SE-141 83 Huddinge, Sweden

³Oddelenie chémie a toxikológie, Výskumný ústav veterinárnej medicíny, 621 00 Brno, ČR

⁴Labortórium cytokinetiky, Biofyzikálny ústav, AV ČR, 612 65 Brno, ČR

⁵Oddelenie genetickej ekotoxikológie, Ústav experimentálnej medicíny, AV ČR, v. v. i., 142 20 Praha, ČR

Presenting author email: alena.gabelova@savba.sk

Heterocyklické aromatické uhľovodíky (HAH) sú súčasťou mnohých komplexných zmesí organických látok, ktoré vznikajú pri nedokonalom spaľovaní organických materiálov. Napriek tomu, že v týchto zmesiach HAH tvoria relatívne malú frakciu, mnohé z nich sú mutagénne a karcinogénne, a predstavujú potenciálne riziko pre ľudí. Do skupiny HAH patrí aj 7H-dibenzo[c,g]karbazol (DBC) a jeho tkanivovo špecifické derivaty, N-metyl DBC a 5,9-dimetyl DBC. DBC sa bežne vyskytuje v znečistenom životnom prostredí ako sú výfukové plyny alebo cigaretový dym. Je to lokálny a systémový karcinogén; ktorý vyvoláva nádory v mnohých experimentálnych zvieratách ako je myš, potkan, škrečok alebo pes. V súčasnosti je DBC zaradený do skupiny 2 B, t.j. možný karcinogén pre človeka. DBC je silná lipofilná zlúčenina, ktorá extrémne rýchlo preniká cez modelovú cytoplazmatickú membranu. Navyše DBC je substrátom pre ľudské cytochrómy P450 (CYP) a v procese biotransformácie sa tvoria rovnaké metabolity, hlavne fenoly, ako po aktivácii u potkana alebo myši. Na základe výsledkov z *in vivo* experimentov boli navrhnuté dve dráhy biotransformácie: i) na aromatickej kostre, podobne ako v prípade PAH zlúčenín a ii) na heterocyklickom dusíku ako pri metabolizme aromatických amínov. Predpokladá sa, že heterocyklický dusík zohráva dôležitú úlohu v hepatokarcinogénnej aktivite tohto karcinogénu. Aktivácia DBC a jeho tkanivovo špecifických derivátov, DiMeDBC and N-MeDBC, rovnakými ľudskými CYP enzýmami, vyvolávajú rozdielnu biologickú odpoveď v cicavčích bunkách. Biologická aktívita a mechanizmus toxicity týchto dibenzokarbazolov úzko súvisí s expresiou aktivačných enzýmov v cielovom tkanive.

Fotoprotektívny účinok éterického oleja *Lavandula angustifolia*

K. Kozics¹, J. Harsányiová², A. Srančíková

¹ Ústav experimentálnej onkológie BMC, SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava,
katarina.kozics@savba.sk

² Prírodovedecká fakulta UK, Oddelenie genetiky, Mlynská dolina, Bratislava

V poslednom období stúpa záujem o využitie prírodných látok, bud' čistých zlúčenín alebo komplexných rastlinných extraktov, ktoré by boli schopné vychytávať voľné radikály. Rastlinné extrakty sú bohaté na zlúčeniny označované ako sekundárne metabolity a rastline slúžia napr. na ochranu proti biologickým agensom alebo voči UV žiareniu. Najvýznamnejším rizikovým faktorom vzniku rakoviny kože všeobecne, ako aj konkrétnie melanómu, je UV žiarenie a jeho nadmerné pôsobenie na pokožku. Jednou z možností ochrany kože pred škodlivým pôsobením UV žiarenia sú opaľovacie krémy obohatené o antioxidanty alebo látky, ktoré pohlcujú alebo odrážajú UV lúče. Éterický olej z levandule (*Lavandula angustifolia*) sa dlhodobo využíva v ľudovej medicíne, kozmetike a aromaterapii. Informácie o jeho chemoprotektívnych a fotoprotektívnych účinkoch a mechanizme pôsobenia sú však nedostatočné. Našim cieľom bolo štúdium cytotoxicity, genotoxicity a fotoprotektívneho účinku éterického oleja získaného z *Lavandula angustifolia* voči UVA žiareniu na bunkových líniach HaCaT (ľudské nénádorové keratinocyty) a HMB-2 (ľudské melanómové bunky). Cytotoxicita bola stanovená pomocou MTT testu, genotoxicita a fotoprotektívny účinok - pomocou metódy SCGE (jednobunkovej gélovej elektroforézy). Bola detegovaná aj aktivita a expresia antioxidačných enzýmov. Zo získaných výsledkov vyplýva, že éterický olej *Lavandula angustifolia* má významné fotoprotektívne účinky voči UVA žiareniu v sledovaných zdravých a nádorových bunkových líniach.

Táto štúdia vznikla vďaka podpore grantov VEGA, 2/0012/12 a v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: TRANSMED, ITMS: 26240120008 a projekt: ITMS: 26240220071 a TRANSMED 2, ITMS: 26240120030, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Reorganizácia aktínového cytoskeletu podocytov - klúčový faktor ich poškodenia a straty.

A. Bábelová¹, R. P. Brandes² and A. Gábelová¹

¹Cancer Research Institute BMC SAS, 845 05 Bratislava, Slovakia

²Physiology I, Goethe-University, 60 590 Frankfurt am Main, Germany

Presenting author email: andrea.babelova@savba.sk

Obličky patria k životne dôležitým orgánom a sú najdôležitejším orgánom vylučovacieho systému. Filtrácia krvnej plazmy cez obličkový filter je kritickým procesom, ktorý ak je narušený vedie ku zlyhávaniu rovnováhy celého organizmu. Filtračná kapacita obličiek je veľmi závislá od zdravých a nepoškodených epitelových buniek glomerulárneho filtra – podocytov. Podocyty, ako vysoko špecializované epiteliálne bunky prisadnuté ku glomerulárnej bazálnej membráne sú esenciálnou zložkou glomerulárnej filtračnej bariéry a zabraňujú úniku proteínov z krvi do moču. Aj malé zmeny aktínového cytoskeletu podocytov vedú ku ich poškodeniu, ku strate ich funkcie a tým aj vážnemu poškodeniu funkcie obličky.

Jedným z prvých znakov poškodenia podocytov je zmena ich cytoskeletu spojená s aktiváciou RhoA a Rac-1 z Rho-rodiny GTPáz. Zvýšený glomerulárny tlak môže byť takisto príčinou, ktorá vzniká pri chronickom zlyhávaní obličiek. Takto zvýšený mechanický stres aktivuje bunky podocytov, dochádza k ich poškodeniu a častokrát aj ku strate, ktoré v konečnom dôsledku vedú ku zlyhávaniu filtračnej schopnosti obličiek (1). Procesy straty podocytov sú spojené so vzrastom apoptózy týchto buniek v dôsledku aktivácie signálnych dráh TGFb (2). Ďalším mechanizmom, ktorý prispieva ku znižovaniu počtu podocytov je aktivácia lokálneho angiotenzínového systému ako odpovedi na mechanický stres (3). RhoA a Rac-1 sú potrebné pre normálne fungujúce bunkové procesy, avšak ich nadmerná aktivita vyvolaná napríklad reakciou na zvýšený angiotenzín II prispieva ku chorobným procesom nielen vaskulárneho, ale aj renálneho systému. Potvrdenie pozitívneho účinku Rac-1 a ROCK (RhoA kináza) inhibítormov v rozvoji chronickej choroby obličiek sa ukázalo na znížení albuminúrie u SV129 myší, ktoré podstúpili 5/6-nefrektómiu. Navyše, kladné účinky oboch inhibítormov sa potvrdili aj konkrétnie pre podocyty, kde mechanickým stresom indukovaná aktivácia TGFb a epithelialno-mezenchymálny fenotypový prechod boli za prítomnosti týchto inhibítormov oddialené a oslabené, a tým podocyty vykazovali menšie poškodenie (4).

Avšak aj nanočastice kovov, by mohli mať podobné účinky atakujúce cytoskelet podocytov. Anorganické nanočasticie ako napr. oxid železa alebo zlato sú sľubné a perspektívne diagnostické a terapeutické prostriedky v medicíne (5). A hoci benefity z využitia nanomateriálov v klinickej praxi sú nesporné (zníženie toxických účinkov cytostatík podávaných formou nanočastic, zabránenie predčasnej degradácie liečiva a ī.), pri aplikácii nanomateriálov do organizmu sú nanoliečivami exponované aj zdravé tkaniá a orgány. Viaceré štúdie potvrdili, že nanočasticie sa akumulujú v obličkách a majú nefrotoxickej efekt, napriek tomu sú informácie o vplyve nanočastic na jednotlivé špecializované typy buniek obličky, na ich morfológiu, štruktúru a funkciu stále nedostatočné. Preto v našom ďalšom výskume sa chceme venovať komplexnému posúdeniu nefrotoxicity vybraných nanočastic zlata a oxidu železa s použitím rôznych typov špecializovaných buniek obličky, a to modelových bunkových línii aj primárnych bunkových kultúr.

Acknowledgements: This work was supported by the Goethe University and a grant from Sanofi-Aventis and will further be supported by VEGA 2/0113/15 and SASPRO_0084-01-02.

References:

1. Kriz W., Elger M., Nagata M., Kretzler M., Uicker S. et al. (1994) *Kidney Int. Suppl.* 45, S64-S72.
2. Schiffer M., Bitzer M., Roberts I.S., Kopp J.B., ten D.P. et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 807-816.
3. Durvasula R. V., Petermann A.T., Hiromura K., Blonski M., Pippin J. et al. (2004) *Kidney Int.* 65, 30-39.
4. Babelova A., Jansen F., Sander K., Löhn M. et al. (2013) *PLoS. One.* 8, (11) p1.
5. Kumar A., Zhang X., Liang X.J. (2013) *Biotechnol. Adv.* 31, 593.

Protektívne účinky rastlinných extraktov zo *Salvia officinalis* a *Thymus vulgaris* voči poškodeniam DNA indukovaným nanočasticami striebra v bunkám HepG2

A.Srančíková¹, K. Kozics¹, M. Dušinská², A. Gábelová¹

¹Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, Dúbravská cesta 9
845 05 Bratislava

² Nórsky inštitút pre výskum ovzdušia (NILU), Kjeller, Nórsko

annamaria.srancikova@savba.sk

Salvia officinalis a *Thymus vulgaris*, rastliny z čeľade Hluchavkovité, sú známe liečivé bylinky, ktoré sa používali po stáročia nielen v tradičnej ľudovej medicíne na liečbu rôznych ochorení, ale aj ako koreniny pri príprave jedál. Antioxidačný potenciál týchto extraktov sa potvrdil v *in vitro* ako aj *in vivo* experimentoch (Berrington a kol., 2012; Kozics a kol., 2013).

Unikatné vlastnosti nanomateriálov nachádzajú čoraz širšie uplatnenie v rôznych odvetviach priemyslu, vrátane molekulárnej biológie a medicíny. Antimikrobiálne vlastnosti nanočastic striebra (AgNPs) sa využívajú v potravinárskom a kozmetickom priemysle ako aj v medicíne. Zvýšená expozícia AgNPs vyžaduje dôkladné posúdenie ich biologickej bezpečnosti pre ľudí. Viaceré *in vitro* a *in vivo* štúdie povrdili cytotoxicitu a genotoxicitu AgNPs. Oxidačný stres sa považuje za hlavnú príčinu genotoxického účinku AgNPs.

Cieľom našej práce bolo zistiť, či extrakty šalvie a tymiánu, ktoré majú antioxidačnú aktivitu, sú schopné znížiť toxicitu AgNPs v HepG2 bunkách. V experimentoch sme použili AgNPs s priemerom 20 nm. Bunky HepG2 sme predovplyvnili 24 h rastlinnými extraktami (šalvia 2 mg/ml, tymián 0,5 mg/ml) a potom ovplyvňovali 2 h rôznymi koncentráciami AgNPs (10-50 µg/ml). Naše predbežné výsledky ukazujú, že rastlinné extrakty nedokázali znížiť hladiny zlomov DNA a ani oxidačných poškodení vyvolaných AgNPs.

V práci diskutujeme dôvody, ktoré mohli byť príčinou, že sa neprejavili protektívne účinky týchto rastlinných extraktov voči pôsobeniu AgNPs.

Moje podávanie patrí prof. Mučajovi z Farmaceutickej fakulty, Univerzity Komenského za stanovenie antioxidačnej aktivity rastlinných extraktov. Táto práca vznikla za podpory grantu VEGA 2/0012/12 a projektu Quality Nano Transnational Access, NILU-TAF-33.

Použitá literatúra:

- Berrington, D., Lall, N. (2012). *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2012: 1-11.
Kozics, K., Klusova, V., Srancikova, A., Mucaji, P., Slamenova, D., Hunakova, L., Kusznierewicz, B., Horvathova, E. (2013). *Food Chem.* 141: 2198-2206.

The study of processes associated with lipid peroxidation in model human cell lines

A. Ambroz, T. Cervena, H. Libalova, A. Rossnerova and P. Rossner, Jr.

Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Prague 4, 142 00, Czech Republic

Presenting author email: ambroz@biomed.cas.cz

Air pollution poses a long-term problem for human health. Effects of respirable particles, particularly those of aerodynamic diameter < 2.5 µm (PM2.5), are being intensively studied along with carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) bound to them. A whole range of negative health issues are linked to high exposure to these pollutants. Some PAHs are carcinogenic (IARC 2012), genotoxic (Topinka et al., 2000) and embryotoxic (Binkova et al., 1999). Their harmful impact on human body manifests itself often after metabolic activation (Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004). There are several mechanisms of metabolic activation of PAHs, one of them gives rise to reactive oxygen species - ROS (Park et al., 2006). High levels of ROS lead to oxidative stress in the body, which results in oxidative damage to macromolecules (DNA, proteins, lipids), subsequently in tissue damage and cell death, and may ultimately cause disease (Dalle-Donne et al., 2003).

Although there is no comprehensive study comparing a potential of PAHs to produce ROS, available data suggests that the ability to induce oxidative stress may vary depending on the particular compound. Furthermore, organic extracts (EOMs) derived from PM, that contain complex mixtures of various chemicals (e.g. nitro, and oxo-PAH derivatives, reactive aldehydes, quinones etc.), were proved to be more effective oxidative stress inducers than PAHs alone. Oxidative DNA damage induced by EOMs, but not by individual PAHs, in HepG2 and HEL cells was observed in our previous study (Hanzalova et al., 2010). Inflammatory processes are other contributors to the induction of oxidative stress and ROS production. It was found that increased production of ROS is closely connected with a release of proinflammatory cytokines through the activation of nuclear factor kB (NF-kB) (Yao et al., 2007).

Lipids are also important target for ROS. Lipid peroxidation is a process where ROS attack lipids containing unsaturated bonds, particularly in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Ayala et al., 2014). Three different mechanisms of peroxidation were described: 1. a free radical-mediated oxidation; 2. a free-radical-independent nonenzymatic oxidation; and 3. an enzymatic oxidation (Niki, 2009). The first two mechanisms do not require enzymes to induce peroxidation. Enzymatic formation of oxidized lipids is based on lipoxygenase and cyclooxygenases (COX), which catalyze the oxidation of arachidonic acid. This yields a range of products, including, for example, hydroperoxyeicosatetraenoic acid, prostaglandins, prostacyclin, thromboxane or leukotriene (Niki, 2009). Two forms of COX were identified: COX-1, which is constitutively expressed in cytoplasm of most cells, and COX-2 which is a highly inducible enzyme, activated in response to various stimuli (Tsatsanis et al., 2006). COX-2 is overexpressed during inflammation and the association of increased oxidative stress and the activation of NF-kB (Lu and Wahl, 2005) is assumed. NF-kB is a key transcription factor participating in processes such as inflammation, stress response, cell differentiation and proliferation, or cell death. It can be activated by numerous stimuli and regulates a wide range of target genes such as: cytokines, growth factors, adhesion molecules, intracellular signalling molecules, transcription factors and miRNAs (Hoesel and Schnid, 2013).

Arachidonic acid, a polyunsaturated fatty acid, abundant in cell membranes, is one of the first targets of ROS during the oxidative stress. Arachidonic acid can serve as a substrate for COX, which transform this compound into prostaglandins. However, peroxidation of arachidonic acid mediated by free radicals, which does not require COX or other enzyme has also been documented (Morrow et al., 1990). This process leads to the formation of F2-isoprostanes (ISOP) in cell membranes. ISOP are cleaved off the membranes by the effect of phospholipases and circulate in the blood plasma. From there, they are filtered in the kidneys and excreted in urine. ISOP levels, namely 15-F2t-ISOP, in plasma and/or urine have become a reliable biomarker of lipid peroxidation in population studies.

The rate of lipid peroxidation can also be determined by measuring the products formed by decomposition of lipid peroxides. Such secondary products of peroxidation include e.g. acrolein, malondialdehyde (MDA)

and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (Esterbauer et al., 1991). MDA is an often monitored biomarker of lipid peroxidation. Its presence can easily be determined by reaction with thiobarbituric acid (TBARS). The disadvantage of this type of analysis is a relatively low specificity and also the fact that MDA represents only a very small amount (ca. 1%) of the products resulting from the disintegration of lipid peroxides. Yet, it is still the most frequently used approach to the analysis of lipid peroxidation (Lykkesfeldt, 2007). The specificity of the test is increased by the acid precipitation of lipoproteins in samples.

In our previous *in vitro* study, the oxidation of macromolecules, induced by individual PAHs and EOMs in HepG2 and HEL cells, has been analyzed (Hanzalova et al., 2010). Unexpectedly, lipid peroxidation, determined by measuring the levels of 15-F2t-ISOP in cell lysates, has significantly decreased below the control levels, particularly in HEL cells exposed to EOMs. We assume that the levels of 15-F2t-ISOP were affected by the activity of COX-2, which reduced the concentration of arachidonic acid in the cells. COX-2 expression can be induced by the aryl hydrocarbon receptor (AHR), that serves as a ligand for polycyclic aromatic hydrocarbons (Dalton et al., 2002). Moreover, our recent transcriptomic data (Libalova et al., 2014) showed that in A549 cells, EOMs are effective activators of NF- κ B and subsequently of COX-2. This represents another potential course for activation of COX-2. However, the exact mechanism of NF- κ B activation using EOMs is still unclear. Previous studies have shown that PAHs and EOMs, being AhR inducers, may interact with NF- κ B (Vogel et al., 2014; Pei et al., 2002).

In short, EOMs and PAHs in some cell lines reduce the levels of 15-F2t-ISOP through an unknown mechanism. We assume that EOMs/PAHs induce NF- κ B, either directly or through the activation of Ahr. NF- κ B then induces COX-2 activity that leads to a decrease in the level of arachidonic acid due to its conversion into prostaglandins. A limited amount of arachidonic acid leads to a reduction in the concentration of 15-F2t-ISOP. EOMs/PAHs, otherwise harmful, thus show "antioxidant" effects *in vitro*. To explain this phenomenon, we plan to study the processes linked with lipid peroxidation in human lung model cells after their exposure to PAHs and EOMs. We are going to analyze ROS production, selected products of lipid peroxidation and the possible relationship between lipid peroxidation and other processes affected by PAHs and EOMs, including an analysis of changes in the expression of relevant genes.

Acknowledgements: Supported by Czech Science Foundation (16-14631S).

References:

- Ayala, A., Munoz, M.F., Arguelles, S. (2014): "Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal.", *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014: 360438.
- Binkova, B., Vesely, D., Vesela, D., Jelinek, R., Sram, R. J. (1999): "Genotoxicity andembryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic." *Mutat.Res.* 440(1): 45-58
- Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A.(2003): "Protein carbonylation in human diseases." *Trend. Mol. Med.*, 9 (4), 169
- Dalton, T.P., Puga, A., Shertzer, H.G. (2002):" Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation." *Chem. Biol. Interact.*, 141: 77-95.
- Esterbauer H., Schaur, R. J., Zollner, H. (1991): "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal,malonaldehyde and related aldehydes." *Free Radic. Biol.Med.*, 11: 81-128.
- Hanzalova, K., Rossner, P., Jr., Sram, R. J. (2010): "Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter." *Mutat.Res.*, 696: 114-121.
- Hoesel, B., Schmid, J.A. (2013): "The complexity of NF- κ appaB signaling in inflammation and cancer." *Molecular Cancer*, 12: 86.
- IARC, IARC monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans.Chemical Agents and Related Occupations, IARC Publications, Lyon, France, 2012
- Libalova, H., Krckova, S., Uhlirova, K., Klema, J., Ciganek, M., Rossner, P., Jr., Sram, R. J., Vondracek, J., Machala, M., Topinka, J. (2014): "Analysis of gene expression changes in A549 cells induced by organic compounds from respirable air particles." *Mutat. Res.*, 770: 94-105.
- Lu, Y., Wahl, L.M. (2005): "Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase 2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF- κ appa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes." *J. Immunol.*, 175: 5423-5429.
- Lykkesfeldt, J. (2007): "Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking." *Clin.Chim.Acta*, 380: 50-58.
- Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R. F., Nammour, T.M., Badr, K.F., Roberts, L.J. (1990): "A series of prostaglandin F2-like compounds are produced *in vivo* in humans by a noncyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism." *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A*, 87(23): 9383-9387.
- Niki, E. (2009): "Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects." *Free Radic. Biol. Med.*, 47: 469 484.
- Park, J.H., Troxel, A.B., Harvey, R. G., Penning, T.M. (2006): "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species." *Chem.Res.Toxicol.* 19(5): 719-728.

- Pei, X.H., Nakanishi, Y., Inoue, H., Takayama, K., Bai, F., Hara, N. (2002): "Polycyclic aromatic hydrocarbons induce IL-8 expression through nuclear factor kappaB activation in A549 cell line." *Cytokine*, 19: 236-241
- Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y. (2004): "Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1." *Cancer Sci* 95(1): 1-6.
- Topinka, J., Schwarz, L.R., Wiebel, F.J., Černá, M., Woff, T. (2000): "Genotoxicity of urban air pollution in the Czech Republic Part II: DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter." *Mutat.Res.* 469(1): 83-93
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., Margioris, A.N. (2006): "Signalling networks regulating cyclooxygenase-2." *Int.J. Biochem. Cell. Biol.*, 38: 1654-1661.
- Yao, H., Yang, S.R., Kode, A., Rajendrasozhan, S., Caito, S., Adenuga, D., Henry, R., Edirisinghe, I., Rahman, I. (2007): "Redox regulation of lung inflammation: role of NADPH oxidase and NF-kappaB signalling." *Biochem. Soc. Trans.*, 35: 1151-1155.
- Vogel, C.F., Khan, E.M., Leung, P.S., Gershwin, M.E., Chang, W.L., Wu, D., Haarmann-Stemmann, T., Hoffmann, A., Denison, M.S. (2014): "Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor-kappaB." *J. Biol. Chem.*, 289: 1866-1875.

Nanoparticles: physical-chemical characterisation, in vitro and in vivo nanotoxicological models and in vivo imaging

J.Turánek

Department of Pharmacology and Immunotherapy, Veterinary Research Institute,
Hudcova 70, 62100 Brno,

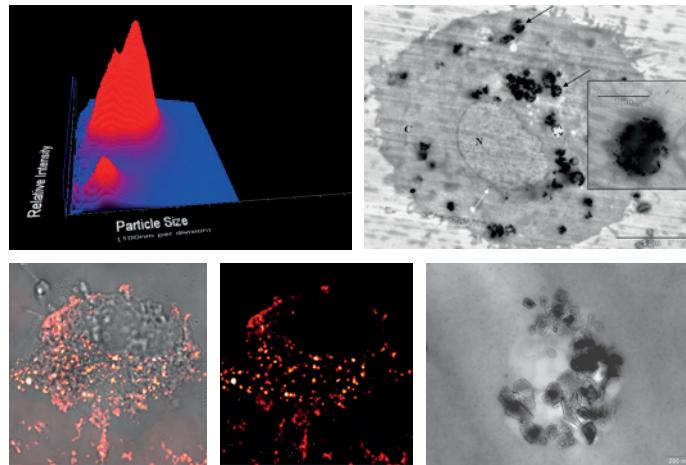
e-mail: turanek@vri.cz

The presentation is focused on several important areas of nanotoxicology. In the introduction we will discuss general aspects of nanotoxicology and its importance in the era of global application of products produced by nanotechnological industry. Some examples of global health risk will be presented.

Second part will deal with the importance of physical-chemical characterisation of nanoparticles and application of advanced methods to understand behaviour of nanoparticles in environment and organisms. Effect of nanoparticle size, morphology, composition and surface charge will be considered with respect to their ability to penetrate into organisms and accumulate within various body compartments.

Third part will be aimed to in vitro models for screening toxicological properties of nanoparticles. Relatively new area of "organ on chip" technology and genetically engineered cell models will be presented. Experimental data of our study with nanodiamonds will be presented as an example of application of modern methods in nanotoxicology.

In vivo imaging methods is the topic of fourth. Modern sensitive and high resolution methods like µCT, SPECT/PET, whole body luminiscence, MRI will be presented to demonstrate the power of in vivo imaging in nanotoxicological studies on animal models.



Characterisation of nanodiamonds by Nanoparticle Tracking Analysis methods (NanoSight 500 instrument, Malvern); Confocal microscopy analyses of localization of fluorescence nanodiamonds in HeLa cells; Subcellular localization of NDs in the A 549 cell viewed by TEM. NDs (black points) are localized in the cytoplasm outside the nucleus. Clusters of NDs are formed around vesicles (black arrows); Detail of nanodiamonds localised onto the surface of cellular vesicles.

Acknowledgement: This work was supported by the project CENATOX (the Czech Science Foundation GAP503/12/G147); and by the project RO0516 (the Czech Ministry of Agriculture).



Nanoparticles, inflammation and carcinogenesis

M. Raska

Department of Immunology, Palacky University Olomouc, Hnevotinska 3, 77900 Olomouc
Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 62100 Brno

Presenting author e-mail: raskamil@uab.edu

Nanoparticles exhibit broad spectrum of applications in current medicine. Growing concern of nanotechnology represents potential toxicity of nanoparticles associated for example with induction of ROS production and oxidative stress, hepatic, splenic, central nervous system, kidney, and lung toxicity, ER stress, lung interstitial inflammation and in general inflammatory activation of several subpopulations of immune cells. Furthermore DNA damage and cell death could be outcome of nanoparticles toxicity.

Cancer initiation, promotion, malignant conversion, invasion, and metastasis is interconnected with inflammation. Therefore, due to their potential to trigger inflammation, nanoparticles should be considered as potential tumor promoter and cancerogenesis associated with nanoparticles should be considered and thoroughly explored for each individual formulation.

The presentation will summarize dominant immune cell populations generally involved in the tumor surveillance and in tumor promotion such as CD8+ T cells, Th1, Th2, Th17 and Treg cells, macrophages M1 and M2 sub-populations, myeloid-derived suppressor cells, Nk and Nk T cells, B cells and neutrophils. Furthermore, dominant cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-11, IL-21, IL-23, TGF- β , BAFF, etc.), chemokines (CCL1, CCL2, CCL9, CCL19, CCL21, CCL22, CXCL1, CXCL8, CXCL12), transcription factors (STAT3, AP-1, NF- κ B) and other factors (VEGFs, HIF1 α) involved in tumor-promotion, metastasizing, and angiogenesis will be reviewed. Examples of such immune factors promoted by various nanoparticle preparations will be discussed.

Acknowledgements: This work was supported by the grant IGA_LF_2016_011 of Palacky University, Olomouc and by the grant AZV 15-32198 A of the Ministry of Health, Czech Republic.

Determinácia internalizovaných nanočastíc v bunke; výhody a obmedzenia

B.Buliaková¹, M. Šelc¹, K. Kozics¹, M. Ursínyiová², A. Gábelová¹

¹Oddelenie Genetiky, Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, Bratislava, 845 05, Slovensko

²Oddelenie metalomiky, Slovenská Zdravotnícka Univerzita, Bratislava, 833 03, Slovensko

Email prezentujúceho autora: barbora.buliakova@savba.sk

Superparamagnetické nanočastice oxidu železa ako napr. nanočastice magnetitu (MNPs) sú perspektívne multifunkčné teranostiká, ktoré umožnia cielene dopraviť liečivá do nádoru, sledovať ich akumuláciu v nádore, a tým monitorovať účinnosť zvolenej liečby (Gobbo a kol., 2015). Fyzikálno-chemické vlastnosti nanočastíc ako sú veľkosť, tvar, povrchové vlastnosti a náboj determinujú interakcie MNPs s biologickým materiálom ako aj spôsob ich internalizácie (Iversen a kol., 2011). Stanovenie množstva internalizovaných MNPs je klúčové pre posúdenie ich bezpečnosti/toxicity (Friedrich a kol., 2015). Mechanizmus transportu MNPs do bunky je dôležitým faktorom pri ich syntéze a funkcionálizácii ako aj pre výpočet dávkowania pri cielenej terapii (Yang a kol., 2011). MNPs vstupujú do bunky niektorou zo špecifických dráh endocytózy ako je klatrín- (CME) alebo kaveolín-sprostredkována endocytóza (CavME), lipidické rafty, či fagocytóza. CME aj CavME sú závislé na dynamíni GTPáze, ktorá zabezpečí oddelenie transportnej vezikuly od membrány (McMahon a Boucrot, 2011; Mosesson a kol., 2008). Dôležitú úlohu v endocytózy zohráva aj cytoskelet bunky (aktínové a tubulínové filamenty) (Doherty a McMahon, 2009).

Cieľom našej práce bolo zistiť vhodnosť analytickej metód kolorimetrie (KSCN-K), ultrafialovej spektroskopie (UVS), atómovej absorpcnej spektrometrie (AAS) a prietokovej cytomerie na kvalitatívne/kvantitatívne stanovenie MNPs v bunkách a mechanizmus internalizácie. MNPs (magnetitové jadro Ø 10 nm) s hydrofilným obalom oleát sodný (SO) a polyetylén glykol (PEG) [SO-PEG-MNPs] boli syntetizované a detailne charakterizované rôznymi fyzikálnymi a chemickými metódami na Ústave experimentálnej fyziky SAV v Košiciach. Ich stabilita a hydrodynamický rozmer v médiu boli stanovené DLS (dynamic light scattering). Prítomnosť MNPs v alveolárnych adenokarcinómových bunkách A549 sme sledovali po 1h expozícii. Na štúdium mechanizmu endocytózy MNPs boli použité rôzne metabolické inhibitory endocytózy.

Zistili sme, že všetky použité analytickej metódy je možné použiť na kvalitatívne stanovenie prítomnosti MNPs v bunkách. Na rozdiel od prietokovej cytometrie, KSCN-K, UVS a AAS metódy umožňujú aj kvantifikovať množstvo internalizovaných MNPs. AAS je veľmi citlivá analytická metóda, ale vzhľadom na finančnú náročnosť analýz, nie je bežne dostupnou metódou. Presná kvantifikácia MNPs vyžaduje pomerne veľké množstvo buniek, najmä v prípade nízkej internalizácie MNPs. KSCN-K je relatívne jednoduchá, kolorimetrická, časovo nenáročná metóda. Zistili sme však rozdiely v stanovenom internalizovanom množstve železa medzi KSCN-K a AAS, ktoré mohli byť spôsobené tým, že kým KSCN-K deteguje iba Fe^{3+} , AAS stanovuje celkové množstvo železa v bunke. Magnetit je tvorený ako Fe^{3+} tak aj Fe^{2+} iónmi železa (Gorski a Scherer, 2010). Vzhľadom na citlivosť a finančnú nenáročnosť UVS, by práve táto metóda mohla byť perspektívnu technikou na kvantifikáciu MNPs v bunkách. Napriek tomu, že prietoková cytometria neumožňuje kvantifikovať internizované množstvo MNPs, metóda je vhodná na sledovanie mechanizmu internalizácie MNPs. Nakolko efektívnosť internalizácie MNPs ovplyvňuje taktiež denzitu exponovaných buniek, pri kvalitatívnych/kvantitatívnych stanoveniach ako aj mechanizme vstupu MNPs do buniek je nevyhnutné ovplyvňovať rovnaké inokulum buniek.

Podávanie patrí Ing. Filipovi Rázgovi, PhD. a Mgr. Dominike Némethovej za UV-VIS spektrofotometriu. Táto práca vznikla za podpory VEGA grantu 2/0143/13 a grantu EEA FM a NFM (projekt SK0020).

Zoznam použitej literatúry

- Gobbo O.L., Sjaastad K., Radomski M.W., et al. (2015) Theranostics 5 (11), 1249-1263
Iversen T., Skotland T., Sandvig K. (2011) Nano Today 6, 176–185
Friedrich R. P., Janko C., Poettler M., et al. (2015) Int J Nanomed 10, 4185-4201
Yang C., Tai M., Lin C., et al. (2011) PloS ONE 6(9)
McMahon H.T., Boucrot E. (2011). Mol Cell Biol 12, 517-533

Mosesson Y., Mills G., Yarden Y. (2008) Nature 8, 835-850
Doherty G.J., McMahon H.T. (2009) Annu Rev Biochem 78, 857-902
Gorski C.A., Scherer M.M. (2010) Am Mineral 95, 1017-1026

Vplyv magnetických nanočastíc oxidu železa na segregáciu chromozómov v bunkách A549.

M. Šelc¹, B. Buliaková¹, I. Chalupa¹, A. Bábelová¹, A. Gábelová¹

¹Ústav experimentálnej onkологии, Biomedicínske centrum SAV,
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko

email: michal.selc@savba.sk

V posledných rokoch sa dostáva do popredia skúmanie nových možnosti liečby rakoviny. Štúdium nanočastíc je jedným z potenciálnych možností pre diagnostické a terapeutické účely. Spomedzi rôznych typov nanočastíc sa ako najslúbenejšie pre tieto účely považujú nanočasticie oxidov železa, napríklad nanočasticie magnetitu (MNPs). Ľahko sa syntetizujú, sú biokompaktné a netoxické, lebo metabolizmus železa je v tele pod striknou kontrolou. Nakoľko prínosy MNPs sú pre biomedicínske aplikácie zrejmé, expozičia ľudí sa bude zvyšovať, preto je potrebné stanovenie ich biologickej bezpečnosti.

Cieľom našej práce bolo zistiť schopnosť MNPs vyvolať poškodenia na úrovni chromozómov. MNPs použité v experimentoch boli charakterizované rôznymi fyzikálnymi a chemickými metódami. Ich stabilita a hydrodynamická veľkosť v kultivačnom médiu bola stanovená DLS (dynamic light scattering). Ľudské nádorové plúcne bunky A549 boli ovplyvnené rôznymi koncentráciami povrchovo upravených nanočastíc po dobu 24 hodín. Tvorba mikrojadier a chromozomálne aberácie boli hodnotené v niekoľkých časových intervaloch po ovplyvnení. Okrem toho vplyv nanočastíc na mitotické vretienko bol hodnotený porovnaním farbenia β -tubulínu a progres bunkového cyklu bol sledovaný prietokovou cytometriou. Ovplyvnené bunky boli tiež charakterizované pomocou western blot analýzy na zmeny v expresii proteínov p-Aurora A/B/C, β -tubulínu a p-53.

Všetky typy nanočastíc mierne zvýšili hladiny mikrojadier v ovplyvnených bunkách v porovnaní s neovplyvnenými bunkami. Za rovnakých podmienok ovplyvnenia však nebolo pozorované žiadne výrazné zvýšenie chromozomálnych aberácií. Na druhej strane, zvýšenie počtu endoreplikácií, polyploidných a viacjadrových buniek naznačilo, že MNPs by mohli ovplyvňovať distribúciu chromozómov do dcérskych buniek. Narušenie tubulínových vláken, spolu so zníženou expresiou p-Aurora A/B/C a p53 poukazuje na to, že MNPs môžu ovplyvňovať komplex, ktorý kontroluje segregáciu chromozómov (chromosome passenger complex) alebo maturáciu centrozómov.

Naše výsledky ukazujú, že MNPs majú aneugénnu aktivitu, t.j. ich biologické efekty nie sú spôsobené priamou interakciou s DNA. MNPs pôsobia ako tzv. vretienkový jed, nakoľko bráňia polymerizáciu tubulínu. Tieto výsledky vzbudzujú obavy týkajúce sa bezpečnosti MNPs pre ľudské zdravie. Z toho dôvodu sú potrebné ďalšie toxikologické štúdie na podrobnejší preskúmanie ich možných negatívnych účinkov na ľudské zdravie.

Kľúčové slová: nanočasticie oxidu železa, bunková línia A549, mikrotubuly.

Moje podávanie patrí Ústavu experimentálnej fyziky SAV, Košice za syntézu a charakteristiku nanočastíc a Filipovi Rázgovi, PhD. a Mgr. Veronike Némethovej z Ústavu polymérov SAV, za vyhodnotenie distribúcie veľkosti častíc a zeta potenciálu v médiu.

Táto práca vznikla za podporu projektov VEGA 2/0143/13; 2/0113/15 a SASPRO_0084-01-02.

In vivo effects of mesenchymal stem cells labeled with iron oxide or cobalt-zinc-iron nanoparticles in biological macromolecules of rat brain tissue.

B. Novotná¹, P. Rössner¹, K. Turnovcová², P. Jendelová²

¹Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine AS CR, v. v. i.,
Prague, 142 20 Czech Republic

²Department of Neuroscience, Institute of Experimental Medicine AS CR, v. v. i.,
Prague, 142 20 Czech Republic

Presenting author email: novotna@biomed.cas.cz

Rat mesenchymal stem cells (rMSCs) labeled with (1) superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with poly-L-lysine (SPION) or (2) silica-coated cobalt-zinc-iron nanoparticles (CZF-NP) were implanted into brains of rats with the aim to assess their effects on the levels of oxidative damage to biological macromolecules in brain tissue.

The rMSCs were cultured for 48 h in D-MEM medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with the SPIONs or CZF-NPs at concentration 0.11 mM. Then, the cells were harvested, washed and diluted in D-MEM to a concentration of 100,000 cells /2 µl D-MEM. Rats (males of Lewis strain) were anaesthetised with 2 % of isoflurane and 2 ml of cell suspension was implanted into the left striatum (coordinates from bregma A-P 0.5 mm, 3 mm lateral, D-V 5 mm from dura). The suspension of unlabeled cells was used as a positive control. Two rats from each group were sacrificed next day by intracardial injection of T61, the brains were removed and the implantation site with surrounding tissue (5 x 5 x 5 mm fragment) was isolated. In parallel, the samples from the right untreated hemisphere were taken as a negative control. Subsequently, the tissue samples were mechanically and enzymatically (trypsin and collagenase) processed to prepare cell suspension (800,000 cells /1 ml D-MEM with 10% FBS). Sampling and processing of samples from the remaining animals were performed in the same manner 1 month after implantation of rMSCs. The comet assay with enzymes of excision DNA repair (ENDO III and FPG) was used to analyze breaks and oxidative damage to DNA. From each hemisphere, 2 x 100 cells were measured and the median was calculated from each hundred of cells. Values between the two animals in the group did not differ and they were therefore pooled. Hence, 4 medians per group were obtained for statistical analysis. Oxidative damage to proteins and lipids was determined by measuring the levels of carbonyl groups and 15 F_{2t}-Isoprostanate (ELISA). Each sample was divided into thirds so that 6 values per group were yielded for statistical analysis. Differences between the groups were evaluated by T-test.

None of the brain samples with implant of labeled rMSCs exhibited an increase of oxidative damage to biological macromolecules over the control values either in short (24 h) or long (1 month) interval after the treatment. No effect was noticed even in the case when SPION-labeled cells were used for implantation, although in previous *in vitro* experiments these cells had showed significant damage to DNA, proteins and lipids. The measurement of DNA integrity (DNA strand breaks) 24 h after implantation indicated some increase of DNA fragmentation in the brain tissues with the SPION-labeled implants compared to positive control, i.e. the samples treated with pure rMSCs. However, no differences between the samples were demonstrated one month after the treatment.

The results of this pilot *in vivo* study suggest that the implantation of rMSCs labeled with SPIONs or CZF-NPs does not induce oxidative stress in brain tissue. From the viewpoint of long-term effects, not only CZF nanoparticles, but also SPIONs coated with poly-L-lysine appear as prospective label for tracking of transplanted cells by magnetic resonance.

Acknowledgements: The authors acknowledge the assistance provided by the Research Infrastructure NanoEnviCz, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LM2015073. The work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LO1309.

Genotoxicita nanočástic TiO_2 , SiO_2 a Ag u plicních epiteliálních buněk BEAS-2 B: test mikrojader v Lab-Tek™ Chamber Slide systému

T. Červená^{1,2}, T. Brzicová^{1,3}, K. Vrbová¹, J. Sikorová¹, P. Rössner¹

¹Oddělení genetické ekotoxikologie, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i., Praha, 142 20, Česká republika

²Katedra antropologie a genetiky člověka, Univerzita Karlova v Praze, Praha, 128 43, Česká republika

³Laboratoř výzkumu a managementu rizik, VŠB – Technická univerzita Ostrava, Ostrava, 708 33, Česká republika

Email prezentujícího autora: tereza.cervena@biomed.cas.cz

S rozvojem mikroskopie a nových technologií se od 80. let 20. století zvyšuje poptávka a výroba nanomateriálů, tj. materiálů s velikostí částic mezi 1 – 100 nm. Nanomateriály mají unikátní vlastnosti dané jejich tvarem, velikostí a velkým povrchem a jejich využití u věcí denní potřeby stále stoupá. Mezi nejčastěji používané nanomateriály patří kovy a jejich oxidy, uhlíkové sloučeniny a křemík.

Nanočástice, které byly v našem případě vybrány pro testování genotoxicity, zahrnují TiO_2 [forma anatas; velikost částice tvaru sféroidu 5-6 nm; kód materiálu NM-101 (Joint Research Centre)], SiO_2 [syntetický amorfní křemík vyrobený precipitací; velikost částice 14-23 nm; kód materiálu NM200 (Fraunhofer)] a Ag [disperze tyčinek (8,6% w/w) ve směsi polyvinylpyrrolidonu (<1% w/w), akryl/akrylátových kopolymerů (< 2% w/w), polykarboxylát éteru (< 2% w/w) v deionizované vodě s odporem 18,2 MΩ; velikost částice 100-200 nm šíře, 5-10 µm délka; kód materiálu NM302 (Fraunhofer)]. Všechny nanočástice byly opatřeny v rámci projektu NanoReg.

Míra genotoxicity nanočástic TiO_2 i SiO_2 je nejednoznačná, přičemž hlavní rozdíl ve výsledcích je způsoben formou TiO_2 (anatas či rutil) a velikostí testovaných nanočástic. Samotná toxicita TiO_2 je nejasná, některé práce udávají jako původce pozorovaných toxicitních efektů přímou vazbu nanočástic na biomolekuly v buňce způsobující její disbalanci. Oproti tomu nanočástice stříbra přímo uvolňují reaktivní ionty Ag^+ , které prokazatelně způsobují zánětlivou reakci při inhalačních i *in vitro* studiích (Gonzalez et al., 2011; Sung et al., 2009). efforts have been made to evaluate the adequacy of Organisation for Economic Co-operation and Development-standardised tests to assess the genotoxicity of nanomaterials. The aim of this review was to examine whether the current guideline for the *in vitro* micronucleus (MN).

Test mikrojader za použití cytochalasinu-B představuje spolehlivou a na vybavení nenáročnou metodu stanovení nespecifického poškození DNA buněk. V našem případě byla tato metoda, která je standardně používána pro lidské periferní lymfocyty (Fenech, 2007), upravena pro použití v Lab-Tek™ Chamber Slide systému. Tento přístup několikanásobně snížil spotřebu kultivačního média BEGM a laboratorního plastiku. Buněčná linie BEAS-2 B (lidská nenádorová plicní epiteliální linie) již pro analýzu mikrojader využita byla a i naše pilotní studie ukazují, že se jedná o vhodný model testování genotoxicity, který je časově i koncentračně senzitivní (Ruosaari et al., 2008) and our previous studies have suggested that specific chromosomal regions, such as 19p13, are preferentially aberrant in lung tumours of asbestos-exposed patients. Here, we further examined the association between the 19p region and exposure to asbestos using array comparative genomic hybridization and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Buňky byly vystaveny 3 koncentracím (25, 10, 1 µg/ml) po dobu 28 a 48 hodin a dále pak byly testovány nízké koncentrace po dobu 72 hodin (10, 5, 1 µg/ml). Žádný nanomateriál nebyl v testované koncentraci cytotoxický a konkrétní výsledky genotoxicity budou uvedeny v prezentaci.

Poděkování: The authors acknowledge the assistance provided by the Research Infrastructure NanoEnviCz, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LM2015073 and LO1508.

Odkazy:

- Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104.
- Gonzalez L., Sanderson B. J. S. & Kirsch-Volders M. (2011). Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis*, 26(1), 185–191.
- Ruosaari S. T., Nymark P. E. H., Aavikko M. M., Kettunen E., Knuutila S., Hollmén J., Norppa H. & Anttila S. L. (2008). Aberrations of chromosome 19 in asbestos-associated lung cancer and in asbestos-induced micronuclei of bronchial epithelial cells in vitro. *Carcinogenesis*, 29(5), 913–7.
- Sung J. H., Ji J. H., Park J. D., Yoon J. U., Kim D. S., Jeon K. S., Song M. Y., Jeong J., Han B. S., Han J. H., Chung Y. H., Chang H. K., Lee J. H., Cho M. H., Kelman B. J. & Yu I. J. (2009). Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 108(2), 452–461.

Vliv expozice ultrajemným prachovým částicím na denní počty hospitalizací. Projekt UFIREG.

M. Dostál¹, S. Lanzinger², A. Pastorková¹, R. J. Šrám¹

¹Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Prague, 14220, Czech Republic

²Helmholtz Zentrum München-German Research Center for Environmental Health,
Institute of Epidemiology II, Neuherberg, Germany.

Presenting author email: dostal@biomed.cas.cz

Úvod: Důkazy negativních účinků krátkodobé expozice ultrajemným částicím na naše zdraví nejsou konzistentní. I proto, že především v Evropě, bylo dosud provedeno jenom málo srovnatelných studií.

Cíle: V rámci projektu UFIREG byly sledovány asociace krátkodobé ultrajemným (UFP, <100 µm) a jemným prachovým částicím (<2.5µm, PM_{2.5}) na příčiny a denní počty hospitalizací v pěti evropských městech.

Metody: Denní počty hospitalizací pro definované diagnózy kardiovaskulárních a respiračních onemocnění v průběhu dvou let byly k dispozici pro pět evropských měst: Augsburg a Drážďany (Německo, 2011-2012), Černovice (Ukrajina, 2013-březen 2014), Lublaň (Slovinsko) a Praha (ČR) v letech 2012-2013. Znečištění ovzduší a další meteorologická data byly měřeny na městských pozadových monitorovacích stanících ve všech pěti městech. Pro jednotlivá města byla použita Poissonova regrese adjustovaná pro konfoundery pro hodnocení vztahu znečištěného ovzduší a denních počtů hospitalizací. Vypočtené odhady asociací pro jednotlivá města byly poolovány a vyhodnoceny s použitím meta-analýzy.

Hlavní výsledky: Vzestup koncentrace UFP o 2750 částic/cm³ (průměrné interquartilové rozpětí v pěti městech) vedlo k opožděnému protrahovanému zvýšení poolovaného relativního rizika respiračních hospitalizací (pro 6denní průměr vzestup o 3.4% [95%-konfidenční interval: -1.7; 8.8]).

Rovněž zvýšení koncentrace PM_{2.5} 12.4 µg/m³ bylo asociováno se zvýšením relativního rizika kardiovaskulárních hospitalizací: průměrný lag 2-5: 1.8% [0.1; 3.4]). Respirační hospitalizace při tomto zvýšení průměru předchozích 6dnů byly vyšší o 7.5% [4.9; 10.2]).

Závěry: Naše výsledky naznačují odložený účinek prolongované expozice UFP na denní počet hospitalizací pro respirační onemocnění ve sledovaných městech. Kardiovaskulární a respirační hospitalizace měly rovněž významně vyšší poolované riziko v souvislosti s expozicí PM_{2.5}. Tyto výsledky studie UFIREG zaslouží další harmonizované monitorování koncentrací UFP a jejich zdravotních účinků v dalších lokalitách.

Poděkování: Strategie AV21 – Qualitas, GAČR 13_134585. Projekt UFIREG byl finančně podpořen Programem CENTRAL EUROPE kofinancovaným fondem European Regional Development Fund (ERDF), grant agreement no.: 3CE288P3.



Asociace ultrajemných a jemných prachových částic s denní úmrtností. Výsledky projektu UFIREG.

A. Pastorková¹, M. Dostál¹, S. Lanzinger², R. J. Šrám¹

¹Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Prague, 14220, Czech Republic

²Helmholtz Zentrum München–German Research Center for Environmental Health,
Institute of Epidemiology II, Neuherberg, Germany.

Presenting author email: apastor@biomed.cas.cz

Úvod: Dosud existuje jenom málo důkazů o vlivu ultrajemných prachových částic (ultrafine particles – UFP, < 100 nm) na naše zdraví, protože UFP jsou zřídka rutinně monitorovány.

Cíle: Hlavním cílem projektu UFIREG bylo analyzovat asociaci krátkodobé expozice UFP jemným prachovým částicím (PM2.5, t.j. PM=<2.5 µm) a PM10 (<10 µm) s respirační a kardiovaskulární úmrtností v pěti evropských městech.

Metody: UFP (20–100 nm), PM a meteorologické údaje byly monitorovány v pěti evropských městech - v Drážďanech, v Augsburgu, v Praze, v Lublani a v Černovicích (Ukrajina). V těchto městech byly sledovány denní počty úmrtí z přirozených a kardiorespiračních příčin. Z důvodů dostupnosti dat se analyzovaná časová rozmezí lišila: Augsburg a Drážďany 2011–2012, Lublaň a Praha 2012–2013, Černovice 2013–březen 2014. Asociace denní úmrtnosti s koncentrací polutantů byly hodnoceny Poissonovou regresí, s adjustací pro konfoundery, pro jednoduchá zpoždění - lagy účinku (lag 0 až lag 5) a kumulativní zpoždění (lag 0–1, lag 2–5, a lag 0–5). Modelované odhady hodnot pro jednotlivá města byly poolovány s použitím metod pro metaanalýzu.

Hlavní výsledky: Respirační mortalita: Výsledky naznačují časově zpožděnou asociaci prolongované koncentrace UFP a respirační mortality. Při zvýšení 6denního průměru o 2750 častic/cm³ byla respirační mortalita zvýšena o 9.9% [95% konfidenční interval: -6.3%; 28.8%]. Kardiovaskulární mortalita: stoupala o 3.0% [95% CI; -2.7%; 9.1%] při zvýšení průměrné koncentrace PM2.5 o 12.4 µg/m³ s lagem 2–5.

Závěry: Výsledky dosavadních analýz ukazují statisticky nevýznamné zvýšení rizika kardiovaskulární úmrtnosti při zvýšené koncentraci PM2.5 a statisticky nevýznamnou korelací respirační mortality s expozicí UFP. Potvrzení negativních důsledků expozice UFP na zdravotní stav vyžaduje další studie.

Poděkování: Strategie AV21 – Qualitas, GAČR 13_134585. Projekt UFIREG byl finančně podpořen Programem CENTRAL EUROPE kofinancovaným fondem European Regional Development Fund (ERDF), grant agreement no.: 3CE288P3.



Kvalitní život
ve zdraví i nemoci



Akademie věd
České republiky

Strategie AV21

Špičkový výzkum ve veřejném zájmu



Nanočástice ze spalovacích motorů - disparita mezi realitou a technologickými možnostmi

M. Vojtíšek^{1,2}, M. Pechout², M. Fenkl², V. Beránek¹, J. Štolcpartová³, J. Topinka³

¹Centrum vozidel udržitelné mobility, ČVUT v Praze, Roztoky, 25263, Česká republika

²Fakulta strojní, Technická univerzita Liberec, Liberec, 46117, Česká republika

³Laboratoř genetické toxikologie, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i., Praha, 14220, Česká republika

Presentující autor - email: michal.vojtisek@fs.cvut.cz

Spalovací motory, hojně využívané pro pohon silničních dopravních prostředků a mobilních strojů, s sebou přináší dvě podstatná rizika. Oxid uhličitý uvolněný spalováním fosilních paliv, spolu s elementárním uhlíkem, metanem a oxidem dusným, přispívají ke skleníkovému efektu a tím ke globálním klimatickým změnám. Uhlíkaté nanočástice v první řadě a oxidy dusíku v řadě druhé mají významný negativní dopad na lidské zdraví. Zatímco doprava se podílí na celkové hmotnosti emitovaných částic několika desítkami procent, díky tomu, že spalovací motory vypouštějí emise v bezprostřední blízkosti občanů, naprostá většina nanočástic nalezených v dýchatelné výšce ve více lokalitách byla jednoznačně spojena s výfukovými emisemi spalovacích motorů (Štolcpartová 2015).

Většina částic byla historicky přiřazována vznětovým (naftovým) motorům. Zavedením technologie filtrů částic se však koncentrace částic ve výfukových plynech naftových motorů snížily natolik, že jsou mnohdy nižší, než koncentrace částic ve vzduchu, který si motor nasává. Filtry však nejsou instalovány na starších vozidlech, a i z těch novějších jsou různými pokoutnými, leč veřejně nabízenými, praktikami filtry odstraňovány. Spolu se zanedbáváním údržby a rovněž nezákonými praktikami přečipovávání motorů na vyšší výkon se emise naftových motorů výrazně (odhadem o dva až tři řády, mnohdy i více) zvyšují. Tyto vozy následně procházejí neúčinným a často obcházeným systémem pravidelných kontrol na stanicích měření emisí, jehož cílem by mělo být právě nalezení a následná oprava vozidel s nadmernými emisemi, která se nepoměrně velkou měrou podílí na celkových emisích.

Nezanedbatelné množství částic produkují také benzínové motory, a to zvláště motory s poměrně novou technologií přímého vstřiku paliva. I klasické benzínové motory s nepřímým vstříkem pak produkují velmi vysoké emise částic při provozu na bohatou směs, tj. s přebytkem paliva. U mnohých evropských automobilů se obohacení využívá pro chlazení výfukových plynů a dosažení vyššího výkonu při plném zatížení. V USA byla tato praktika federálním úřadem pro životní prostředí (EPA) zakázána. Velmi vysoké emise částic pak zpravidla produkují malé motory v zahradní technice a dalších strojích, na které se nevztahuje, a to dosud nikde na světě, žádný emisní limit na částice. Jeden krovinořez tak může produkovat více částic než jeden až několik desítek autobusů s funkčními filtry částic.

Problém nanočástic lze řešit kombinací dostupné technologie (například filtry částic pro vznětové motory a elektrické pohony pro malá vozítka a zařízení) a organizačních opatření (snížení nároků na přepravu osob a nákladu, zvýšení podílu nemotorizované a hromadné dopravy na přepravě osob, přesun přepravy nákladů ze silnice na železnici). Taková opatření však musí mít oporu v povědomí občanů (technologická kázeň při využívání spalovacích motorů), v legislativě a zejména v jejím dodržování (netrpělivá inzerce demontáže filtrů částic a podvodů na stanicích měření emisí), a v rozhodnutích místní, regionální a státní správy (například branění v potaz otázky kapacity dopravní infrastruktury a výfukových emisí při územním plánování a územních řízeních).

Poděkování: Tato práce byla podpořena finančním nástrojem EU LIFE: LIFE10- ENV-CZ- 651 (Projekt MEDETOX).

Literatura:

Štolcpartová, J., Pechout, M., Dittrich, L., Mazac, M., Fenkl, M., Vrbova, K., Ondracek, J., Vojtíšek-Lom, M.: Internal combustion engines as the main source of ultrafine particles in residential neighborhoods: Field measurements in the Czech Republic. (2015) Atmosphere, 6 (11), pp. 1714 1735.



Toxicita emisí spalovacích motorů v reálném provozu – výsledky projektu MEDETOX

J. Topinka¹, M. Vojtíšek^{2,3}, J. Štolcpartová¹, P. Rossner¹, A. Milcová¹, J. Schmuczerová¹, Z. Nováková¹, M. Pokorná¹, A. Rossnerová¹, M. Pechout², M. Fenkl², V. Beránek³, M. Ciganek⁴, J. Neča⁴, L. Trilecová⁴, L. Pálková⁴, S. Strapáčová⁴, M. Machala⁴

¹Laboratoř genetické toxikologie, Ústav experimentální medicíny AVČR, Praha, 14220, Česká republika

²Fakulta strojní, Technická univerzita Liberec, Liberec, 46117, Česká republika

³Centrum vozidel udržitelné mobility, Roztoky, 25263, Česká republika

⁴Oddělení chemie a toxikologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, 62100, Česká republika

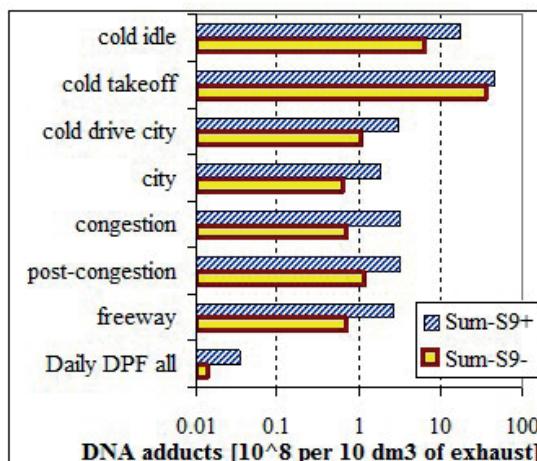
Presentující autor - email: jtopinka@biomed.cas.cz

Hlavním cílem projektu MEDETOX je využití existujících metod analýzy toxicity komplexních směsí pro hodnocení motorových emisí v reálném provozu. Aplikace jeho výsledků by měla vést ke zlepšení legislativy Evropské unie v oblasti regulace motorových emisí.

Projekt se skládá z 5 hlavních akcí: 1. Optimalizace odběrů přenosným zařízením v reálném provozu. 2. Optimalizace testů toxicity na reálných vzorcích pomocí acelulárních a *in vitro* pokusů. 3. Verifikace odběrů a testů toxicity – srovnání vzorků z laboratorních a reálných odběrů. 4. Měření automobilových emisí a jejich toxicity v reálném provozu v Praze. 5. Pilotní studie vlivu vybraných palivových příměsí (biopaliv) na toxicitu naftových zplodin v reálném provozu.

V prezentaci budou ukázány nejdůležitější příklady použití optimalizovaných protokolů pro vzorkování a testování toxicity motorových emisí za různých reálných provozních a laboratorních podmínek a s použitím různých motorů a paliv jako nástroj identifikace a hodnocení rizik toxických účinků automobilových emisí. Tyto testy jsou podrobně popsány na www.medetox.cz/methods a zahrnují: vzorkování, stanovení cytotoxicity, stanovení DNA aduktů, mikrojádrový test, stanovení oxidačního stresu, kometový test

Acelulární testy stanovení DNA aduktů a oxidačního poškození může v budoucnosti sloužit jako rychlá metoda posouzení toxických účinků motorových emisí, která může být alternativou detailní chemické charakterizace emisí. Její využití pro hodnocení genotoxicity emisí za různých provozních podmínek motoru je demonstrováno na Obr. 1.



Obr. 1: Indukce aduktů v DNA inkubované po dobu 24 h s organickými extrakty (EOM) z pevných motorových emisí za podmínek s metabolickou aktivací PAU (+S9) a bez metabolické aktivace PAU (-S9).

Výsledky ukazují značné rozdíly v genotoxicitě emisí mezi různými provozními režimy motoru a též vysokou účinnost použití filtru částic (DPF) ke snížení genotoxicity.

Aplikace a rozšíření metod používaných pro těžká naftová vozidla na benzínové motory, na malé a nesilniční motory a domácí kotly je detailně naplánováno v dalších navrhovaných projektech včetně dvou návrhů projektů LIFE.

Poděkování: Tato práce byla podpořena finančním nástrojem EU LIFE: LIFE10- ENV-CZ- 651 (Projekt MEDETOX).

Effects of bioalcohols in gasoline on PAHs and particle emission from a direct injection spark ignition engine

J. Sikorová^{1,2}, V. Beranek³, M. Machala⁴, M. Ciganek⁴ and M. Vojtisek³

¹Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine CAS,
Prague 4, 142 20, Czech Republic

²Institute for Environmental Studies, Charles University, Prague 2, 128 01, Czech Republic

³Department of Automotive, Combustion Engine and Railway Engineering,
Czech Technical University, Prague 6, 166 07, Czech Republic

⁴Department of Chemistry and Toxicology, Veterinary Research Institute, Brno, 621 00, Czech Republic

Presenting author email: jitka.stolcpartova@biomed.cas.cz

Internal combustion engines are often a dominant source of fine particles in urban air, which cause several times more premature deaths than traffic accidents (Caiazzo *et al* 2013, EEA 2013). Direct injection (DI) engine technology overwhelmingly predominates in new gasoline cars, among others, due to lower CO₂ emissions. Combination of biofuels and DI engines has ability to reduce CO₂ production; however, it could have implications for emission of other pollutants harmful for human health such as ultrafine particles and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). This work investigates particle production of a car with DI engine as well as amount of PAHs on the particles.

Ford Focus with a direct injection 1.0-liter EcoBoost was mounted on a dynamometer. The car was driven through Worldwide harmonized Light vehicles Test Procedures (WLTP, cold and hot start), a global harmonized standard for determining the levels of pollutants, and Common Artemis Driving Cycles (CADC). CADC were driven through its three parts: Urban (Art Ur), Rural (Art Ru), Motorway 130 (Art 130). Four types of fuels were used: gasoline, gasoline + 15% ethanol, Gasoline + 25% nbutanol, and gasoline + 25% iso-butanol. Gases were diluted by constant volume sampler (set on 11 m³min⁻¹). Diluted exhaust gases were then sampled on 20 x 25 cm PTFE coated borosilicate glass filters (68 m³h⁻¹). As control, particulate mass was sampled simultaneously on 47 mm filter of the same type (45 l·min⁻¹).

The large filters were used for further chemical analysis. Samples were used for fractionation into four fractions using low-pressure silica gel column chromatography. Fractionation was performed to facilitate the chemical analysis of complex mixtures of polar and nonpolar contaminants of the air samples. Aliquots of these fractions were redissolved in the required volume of acetonitrile for HPLC/DAD, LC/MSMS and in 2,2,4-trimethylpentane for GC/MS analysis.

Both butanols decreased particle emissions of particulate mass for all cycles. N-butanol was more effective than iso-butanol except WLTP with cold start (Figure 1). The results were confirmed by particulate mass according to the 47 mm filters. cPAHs (carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons) concentrations per kilometer suggested strong decrease in butanol containing fuels. This is important finding for potential health effects.

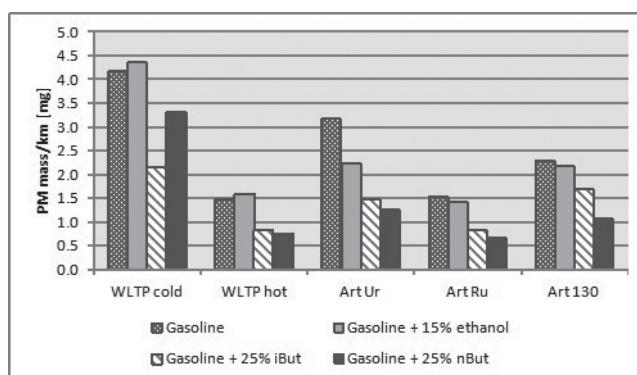


Figure 1. Particle mass per cycle in dependence on cycle and used fuel.

Acknowledgements: The authors acknowledge the assistance provided by the Research Infrastructure NanoEnviCz, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LM2015073

References:

- Caiazzo, F., Ashok, A., Waitz, I.A., Yim, S.H.L., and Barrett S.R. H. (2013). *Atmos. Environ.* 79: 198–208.
EEA (European Environment Agency), *Air quality in Europe – 2013 report*,
Online: <http://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2013> (accessed 3rd September 2014).

Jak blízko realitě je expozice nanočásticemi izolovanými z ovzduší v modelech *in vitro*? Chování jemné frakce aerosolových částic v různém prostředí a během přípravy

S. Marvanová¹, P. Kulich¹, F. Hubatka², M. Ciganek¹, J. Bendl³, J. Hovorka³ and M. Machala¹

¹ Oddělení chemie a toxikologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, 621 00

² Oddělení farmakologie a imunoterapie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, 621 00

³ Ústav pro životní prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 2, Praha 2, 128 43

Prezentující autor: marvanova@vri.cz

Aerosolové částice znečišťující ovzduší způsobují kardiovaskulární a respirační choroby (WHO, 2004) a v roce 2015 byly Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) zařazeny do skupiny 1 jako karcinogenní pro člověka (IARC, 2015). Zejména ultrajemné částice menší než 100 nm nejenom snadno vstupují a jsou distribuovány v živých organismech, ale jejich interakce s buňkami a buněčnými komponenty vede k řadě toxicických odpovědí (Oberdorster, 2005). Příprava reálného vzorku aerosolových částic pro toxikologické studie *in vitro* však narází na určité problémy vyplývající z charakteru vzorku. Cílem této práce bylo sledovat chování vzorků reálných částic atmosférického aerosolu v jednotlivých krocích přípravy, které předcházejí *in vitro* studiím na buněčných kulturách, zejména se zaměřením na jejich agregaci.

Aerosolové částice ovzduší byly odebrány v centru Prahy na přelomu února a března 2015 vysokoobjemovým kaskádním impaktorem BGI-900, v němž se částice rozdělují podle aerodynamického průměru do 5 velikostních frakcí (Demokritou, 2002). V jednotlivých patrech impaktu jsou umístěny impakní substráty z polyurethanové pěny (PUF), na něž jsou zachytávány částice rozdělené do frakcí < 10 µm (v naší práci označeno jako A), 10 - 1 µm (frakce B), 1 - 0,5 µm (frakce C) a 0,5 - 0,17 µm (D, jemná frakce). Koncový filtr ze skelných vláken pokrytých Teflonem zachycuje ultrajemnou frakci častic o aerodynamickém průměru < 170 nm (ultrajemná frakce E). Byly odebrány dva vzorky po integrační době 20 hodin a 10 dní; u dvacetihodinového odběru pro mikroskopické hodnocení byly na jednotlivá patra také umístěny měděné mřížky pro elektronovou mikroskopii.

Všechny frakce na filtroch i mřížkách byly charakterizovány skenovací a transmisní elektronovou mikroskopí, včetně stanovení velikosti častic. Částice jemné frakce (D) z PUF substrátu a ultrajemné frakce (E) z teflonového filtru po desetidenním odběru byly extrauhovány do vody působením ultrazvukové lázně 3 x 20 min (Gaultieri, 2009); ve vzorku byla stanovena hmotnost častic, vzorek byl rozdělen do alikvotů a zamrazen při -20 °C. Po rozmrazení byly částice ve vodě homogenizovány ultrazvukem. Velikost častic a jejich agregátů byla stanovena po extrakci, po rozmrazení před a po ultrazvukové homogenizaci pomocí elektronové mikroskopie a metody Dynamic Light Scattering (DLS). Metoda DLS byla dále použita pro charakterizaci chování častic v kultivačním médiu bez přítomnosti fetálního bovinního séra (FBS) a při jeho koncentraci 1 nebo 5 % v médiu.

Mikroskopickým hodnocením geometrického průměru individuálních prachových častic frakcí B a C bylo zjištěno, že obsahují výrazné množství častic menších, než je odpovídající spodní hranice frakce. Přičinou může být jednak vyšší hustota častic, která navýšuje jejich aerodynamický průměr, nebo se primární částice shlukují do agregátů či aglomerátů s dalšími česticemi. V B a C frakcích se také vyskytovaly shluky zřetězených častic dosahujících velikosti až několik mikrometrů, přičemž velikost primárních častic v těchto shlucích se pohybovala v rozmezí cca 80 - 120 nm. Dle charakteristické struktury předpokládáme, že se jedná o uhlíkaté částice, v některých případech byly na povrchu těchto častic nalezeny ještě menší částice o velikosti 10 - 25 nm. Jemná frakce D také obsahovala menší částice vyskytující se ve shlucích. Ultrajemná E frakce menší než 170 nm obsahovala především řetízky uhlíkových častic. Po desetidenním odběru častic bylo na PUF a teflonovém filtru zřejmé, že dochází k agregaci a koalescenci častic. Zejména u frakce E až 40 % častic a jejich shluků mělo geometrický průměr větší než 170 nm. Nicméně aggregace uhlíkových nanočastic probíhá přirozeně i v ovzduší.

Převedení (extrakce) prachových častic do vody pomocí ultrazvukové lázně mělo v případě substrátu PUF vysokou (odhadem 95%) účinnost na rozdíl od extrakce teflonového filtru, ze kterého se uvolnilo

jen velmi málo částic. Ani použití metanolu pro extrakci částic z teflonového filtru nebylo účinné. Při předchozích experimentech s extrakcemi do metanolu po jeho odpaření docházelo k výrazné, okem viditelné agregaci částic, přičemž některé aggregáty nebylo možno homogenizovat po resuspenzi ve vodě ani pomocí ultrazvuku. Přímou extrakcí částic do vody s vynecháním odpařování k takto masivní agregaci nedocházelo. Extrakce prachových částic do vody pomocí ultrazvuku je vhodná pro částice vzorkované na PUF, zatímco v případě teflonového filtru je nutno hledat alternativní extrakční metodu nebo spíše jiný způsob odběru ultrajemné frakce.

Metodou DLS byla stanovena velikostní distribuce prachových částic suspendovaných ve vodě. Jako parametry srovnávající charakteristiky distribucí byly použity Z-average a index polydisperzity (Pdl). Z-average je hydrodynamický parametr používaný jako souhrnná průměrná velikost. Index polydisperzity je bezrozměrný parametr, který je používán jako míra šířky velikostní distribuce. Homogenita frakce D a E po extrakci částic do vody byla podobná, jediný rozdíl byl v koncentraci částic, která byla v případě frakce E velmi nízká. Zmrazením a rozmrazením frakce D došlo ke zvýšení Z-average a Pdl, tedy ke shlukování částic. Působením ultrazvuku došlo naopak k poklesu obou těchto parametrů, tedy k homogenizaci vzorku. V případě vodní suspenze ultrajemné frakce E nedošlo zmrazením a rozmrazením ke shlukování částic.

Dále byla metodou DLS sledována stabilita suspenze aerosolových částic v kultivačním médiu během 24 hod při 37 °C se zaměřením na možný vliv přítomnosti a koncentrace FBS. U frakce D i E došlo k agregaci částic (zvýšení Z-average) v médiu bez FBS, zatímco v médiu s 1% a 5% FBS k agregaci nedocházelo. Použití FBS v kultivačním médiu pro tento typ vzorku je proto vhodné.

Naše data ukazují, že vlastnosti jemných a ultrajemných aerosolových částic mohou být významně změněny během extrakce a přípravy těchto vzorků pro testování *in vitro*.

Poděkování: Tato práce byla finančně podpořena v rámci Centra studií toxicických vlastností nanočástic CENATOX (GAČR, č. P503-12-G147).

Reference:

- Demokritou, P., Kavouras, I.G., Ferguson, S. T., and Koutrakis P. (2002) *Aerosol Science and Technology* 36, 925-933.
Gualtieri, M., Mantecca, P., Corvaja, V., Longhin, E., Perrone, M. G., Bolzacchini, E., and Camatini M. (2009) *Toxicology Letters* 188, 52-62.
IARC (2015) *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 109.
Oberdorster, G., Oberdorster, E., and Oberdorster, J. (2005) *Environmental Health Perspectives* 113, 823-839.
WHO (2004) *Health aspects of air pollution. Results from the WHO project "Systematic review of health aspects of air pollution in Europe"*.

Chemické složení a distribuce toxicity (toxických potencí) v emisích z dieselových a benzínových motorů

M. Ciganek¹, J. Neča¹, K. Pěnčíková¹, M. Machala¹, M. Vojtíšek² a J. Topinka³

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, 62100, ČR

²Fakulta strojní, České vysoké učení technické, Praha, 16607, ČR

³Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i., Praha, 14220, ČR

Prezentující autor email: ciganek@vri.cz

Úvod: Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a některé jejich deriváty jsou toxické sloučeniny negativně působící na člověka i životní prostředí (Oeder *et al*, 2015, Vojtíšek-Lom *et al*, 2015). S ohledem na nárůst emisí z dopravy proto významně roste potřeba jejich chemické a toxikologické charakterizace.

V této studii byly porovnány chemické složení a distribuce toxicity v emisích dieselového a benzínových motorů. Chemická charakterizace emisí byla provedena pomocí analýzy extraktů emitovaného aerosolu plynovou a kapalinovou chromatografií s detekcí hmotnostním spektrometrem (GC/MS a LC/MS-MS). Toxikologická charakterizace emisí byla provedena prostřednictvím *in vitro* testu dioxinové toxicity (DR-CALUX, H4IIE.Luc) a pomocí výpočtů z chemických dat a toxických ekvivalentů mutagenity, karcinogenní potence a dioxinové toxicity.

Materiál a metody: Všechny používané chemikálie a materiály byly čistoty pro stopovou analýzu. Při studii byl použit jeden vznětový motor testovaný v režimu WHTC (World Harmonized Transient Cycle) a tři zážehové motory, jeden typu TSI (Twincharged Stratified Injection, přeplňovaný motor s přímým vstříkem paliva) objemu 1,4 dm³ a dva typu MPI (Multi Point Injection, vícebodové vstříkovaní paliva) objemu 1,4 dm³, z nichž jeden měl ujeto 208 tisíc km. Tyto motory byly testovány v režimu WLTP (Worldwide harmonized light vehicles test procedure). Emisemi exponované filtry byly extrahovány v automatickém extraktoru pomocí dichlormethanu 2 hod. ve vroucím rozpouštědle a 1 hod. v jeho kondenzujících parách. Hrubý extrakt nebo jeho nepolární a polární LC frakce byly použity pro chemickou analýzu pomocí GC/MS a LC/MS-MS a pro toxikologickou charakterizaci pomocí *in vitro* testu DR-CALUX (BD, Amsterdam), viz Ciganek *et al* (2004). Použité standardní operační postupy jsou k dispozici u autorů.

PAU, jejich deriváty a n-alkany byly kvantifikovány pomocí autentických standardů, ostatní skupiny sloučeniny byly identifikovány pomocí jejich charakteristických fragmentových iontů v systému GC/MS a kvantifikovány prostřednictvím standardů s podobnou chemickou strukturou (semi-kvantifikace).

Toxické ekvivalenční faktory (TEF) byly vyvinuty v agentuře pro ochranu životního prostředí USA (US-EPA) pro hodnocení toxicity a posuzování rizik směsi strukturně příbuzných chemických sloučenin se společným mechanismem účinku. TEF je odhad relativní toxicity chemické sloučeniny ve srovnání s referenčním toxikantem. V případě dioxinové toxicity je referenční látkou 2,3,7,8tetrachlórdibeno-p-dioxin (TCDD) a v případě mutagenity a karcinogenity benzo[a]pyren (BaP). Tyto parametry byly vypočteny podle následující vzorců:

$$\text{Dioxinová aktivita: } \text{IEQ} [\text{ng TCDD eq./g}] = \text{IEF} \times \text{konz. [ng/g]}$$

$$\text{Mutagenita: } \text{MEQ} [\text{ng BaP eq./g}] = \text{RMF} \times \text{konz. [ng/g]}$$

$$\text{Karcinogenita: } \text{CEQ} [\text{ng BaP eq./g}] = \text{RF (RPF)} \times \text{konz. [ng/g]}$$

Pomocí těchto faktorů a koncentrace dané sloučeniny v reálných vzorcích může být odhadnuta jejich celková toxicita. Jedná se tedy o aditivní model. Kromě toho může být také určen kontaminant, který vykazuje nejvyšší podíl na daném typu toxického efektu.

Výsledky:

1. Chemické složení emisí

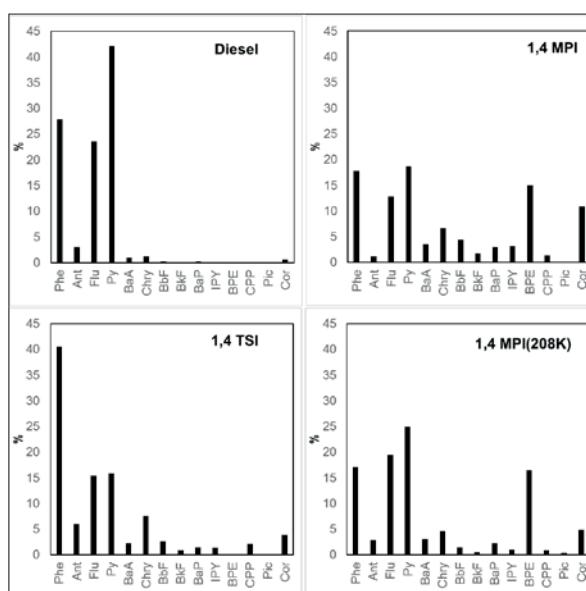
Výsledky chemických analýz použité pro chemickou charakterizaci emisí jsou uvedeny v tab. 1. Obsahy jednotlivých skupin i individuálních sloučenin byly stanoveny v ng/mg emitovaného aerosolu. Celkem byly sledovány čtyři typy polycyklických aromatických sloučenin a třináct skupin dalších uhlovodíků.

Název sloučenin [ng/mg]	Diesel	1,4 TSI	1,4 MPI	1,4 MPI(208K)
US EPA PAU	282	206	75	2667
Ostatní PAU	13	65	38	822
Všechny PAU	295	271	113	3489ⁱ
Alkylované PAU	48	36	4.9	27
Oxidované PAU	49	12	3.0	117
Nitrované PAU	0,49	0,32	0,08	0,45
Součet všech PAU	393	318	121	3634
PAU [%]	75,2	85,1	93,4	96,0ⁱ
UCM (Unresolved Complex Mixture)	16586	235133	232342	45619
n-Alkany	73	1447	4747	1415
Alkiny, alkenyly, cykloalkenyly	1572	2422	743	605 ⁱ
Alkany, isoalkany, aldehydy a ketony	1481	2411	759	579 ⁱ
Aldehydy a ketony	1124	1414	420	336 ⁱ
Alkeny, cykloalkeny	520	507	257	229 ⁱ
Nitrily	323	437	139	125 ⁱ
Dialkylbenzeny	259	1190	848	222 ⁱ
Monoalkylbenzeny	216	742	123	158 ⁱ
Benzeny	151	491	84	55
Aminy	145	179	46	67
Thioly, sulfidy	116	381	93	58 ⁱ
Alkoholy, ethery, kyseliny, estery, amidy	93	138	74	35 ⁱ

Tab. 1: Koncentrace skupin kontaminantů v emisích z testovaných motorů

Nejvyšší koncentrace byly zjištěny pro uhlovodíky, hlavně skupinu označenou UCM. Tuto skupinu tvoří stovky až tisíce rozvětvených a cyklických struktur uhlovodíků, které nejsou, díky jejich velkému počtu, rozděleny ani pomocí kapilární plynové chromatografie. Tato skupina sloučenin nevykazuje žádný z typů sledované toxicity. Další skupinou byly PAU a jejich deriváty. Nejvyšší koncentrace byly zjištěny pro MPI s vysokým počtem ujetých km (1,4 MPI (208k)), které byly asi 10x vyšší než u ostatních testovaných motorů. Například v porovnání se stejným typem motoru s nízkým počtem najetých km byly koncentrace 30x vyšší. Významně také vzrostla koncentrace oxidovaných forem PAU. Emise PAU byly srovnatelné pro vznětový a zážehový motor 1,4 TSI. Emise PAU z 1,4 MPI, který měl podobný počet najetých km jako 1,4 TSI byla asi poloviční.

Vzhledem k rozdílnostem ve složení paliva a principu spalování se dalo předpokládat, že bude i rozdílné zastoupení PAU v emisích. Tato rozdílnost je patrná z jejich relativního obsahu v emisích uvedeného na obr. 1.

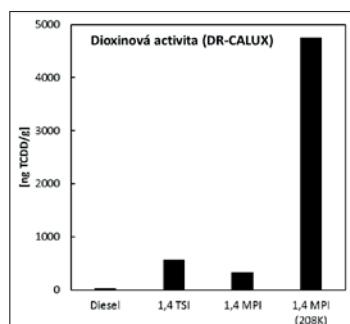


Obr. 1: Relativní obsah vybraných PAU v emisích z testovaných motorů

Podstatný rozdíl v emisích PAU ze vznětového a zážehových motorů spočíval v tom, že ze vznětového motoru převládala emise nízkomolekulárních polycylických aromatických uhlovodíků s molekulovou hmotností 178 a 202 g/mol. (fenantrén (Phe), antracén (Ant), fluorantén (Flu) a pyren (Py)). V případě benzínových motorů byly navíc významně zastoupena také sloučeniny s vyšší molekulovou hmotností 228, 252, 278 a 300 g/mol. Hlavně v případě 1,4 MPI byly významné emise benzo[ghi]perylenu (BPE) a koronenu (Cor). Tato skutečnost má také vliv na rozdílnou toxicitu emisí z těchto dvou typů motorů. Charakteristickou sloučeninou emisí ze zážehových motorů byl cyklopenta[cd]pyren (CPP), který nebyl detekován v emisích ze vznětového motoru.

2. Porovnání toxických potencí extraktů emitovaného aerosolu v in vitro testu dioxinové toxicity

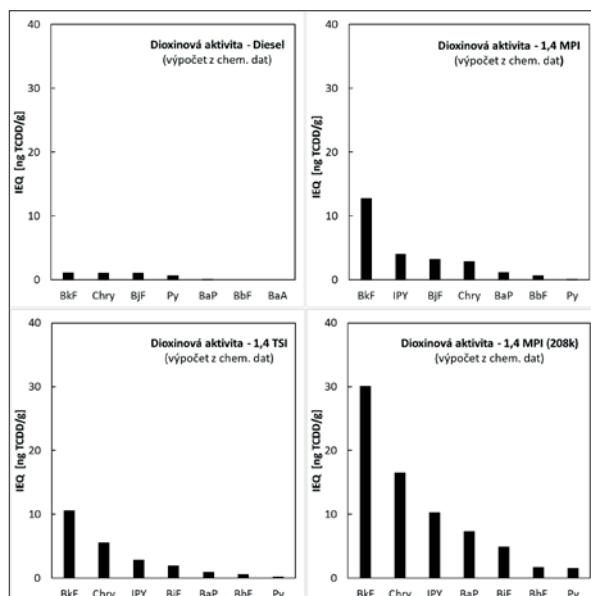
Dioxinová toxicita emisí byla testována pomocí in vitro testu (DR-CALUX). Tento test umožňuje pouze stanovení celkové toxicity vzorku, nemohou být stanoveny přispěvky individuálních látek přítomných ve vzorcích emisí. Výsledky testu jsou uvedeny v obr. 2. Nejvyšší toxicita byla zjištěna podle očekávání pro 1,4 MPI (208k), pak následoval 1,4 TSI a 1,4 MPI. Nejnižší toxicita byla zjištěna pro vznětový motor, která byla o jeden až dva řády nižší než u zážehových motorů. Tato skutečnost souvisí s absencí PAU s vyšší molekulovou hmotností v emisích ze vznětového motoru.



Obr. 2: Dioxinová toxicita emisí z testovaných motorů stanovená pomocí testu DR-CALUX

3. Metodika toxických ekvivalentních faktorů (TEF)

Celková dioxinová toxicita, mutagenní a karcinogenní potence vzorků emisí byly stanoveny z koncentračních dat a již dříve publikovaných relativních efektivních potencí jednotlivých PAU v modelech pro dioxinovou toxicitu



Obr. 3: Dioxinová toxicita individuálních PAU stanovená pomocí toxických ekvivalentů a chemických dat

(Machala *et al*, 2010), mutagenní potenci (Durant *et al*, 1996, 1999) a karcinogenní potenci (USEPA, 2010). Dále byly určeny individuální PAU s nejvyššími toxicckými potenciály v emitovaném aerosolu z testovaných motorů.

Nejvyšší dioxinovou toxicitu, stanovenou z chemických dat, vykazovaly benzo[k]fluorantén (BkF), chrysen (Chry), indeno[1,2,3 cd]pyren (IPY), benzo[j]fluorantén (BjF) a benzo[a]pyren (obr. 3). Nejvyšší mutagenní potenci vykazoval cyklopenta[cd]pyren, kromě emise ze vznětového motoru, ve které nebyl detekován. Dále následovaly benzo[a]pyren, benzo[b]fluorantén (BbF) a benzo[j]fluorantén. V případě karcinogenní potence to byl fluorantén (Flu), benzo[a]pyren a benzo[b]fluorantén.

Závěry:

- Byl vypracován postup pro současnou chemickou a toxikologickou charakterizaci emisí motorů
- Byly zjištěny rozdíly v zastoupení jednotlivých PAU v závislosti na typu motoru a počtu ujetých kilometrů
- Emise PAU z motoru 1,4 MPI (najeto 208 tis. km) byly asi o jeden až dva řády vyšší a obsahovaly větší podíl PAU s molekulovou hmotností 302 g/mol, které vykazují větší mutagenní a karcinogenní potenci a dioxinovou toxicitu
- Nejvyšší emise PAU a toxiccké potence vykazoval motor 1,4 MPI s vysokým počtem ujetých kilometrů
- Charakteristickou sloučeninou emisí ze zážehových motorů byl cyklopenta[cd]pyren, který má vysokou reaktivitu a tím i toxicitu; tato sloučenina v emisích z dieselových motorů nebyla detekována.

Poděkování: Studie byla finančně podpořena projekty GAČR 13-0148S (JT, MV) a P503/12/G147 (MC, JN, KP, MM).

References:

- Oder S. *et al* (2015) *PLoS ONE*, 10(6), 1-17.
VojtisekLom M. *et al* (2015) *Atmos. Environ.*, 109, 918.
Ciganek M. *et al* (2004) *Sci. Total Environ.*, 334335, 141148
Machala M. *et al* (2001) *Mutat. Res.* 497, 49-62.
Durant J. L. *et al* (1996) *Mutat. Res.*, 371, 123-157.
Durant J. L. *et al* (1999) *Mutat. Res.*, 446, 1-14.
US-EPA (2010) *EPA/635/R-08/012 A*.

The adverse effects of air pollution on the nervous system

R. J. Sram

Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine AS CR,
Prague 4, 142 20, Czech Republic

sram@biomed.cas.cz

Recent epidemiological studies indicate the potential impact of air pollution on central nervous system (CNS) health and disease.

Increased PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) exposure in the third trimester reduced white matter surface in later childhood. Reduced left hemisphere white matter was associated with slower information processing speed during intelligence testing and with more severe externalizing behavioral problems, including attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms (Peterson et al. 2015). Perera et al. studied repeatedly impact of PAHs exposure to cognitive dysfunction in children in Krakow, Poland. They observed depressed verbal IQ index, related to PAH-DNA adducts in cord blood. They concluded that PAHs are harmful to the developing fetal brain with effects extending through childhood (Jedrychowski et al. 2015).

Human studies have shown that living in conditions with elevated air pollution is linked to decrease cognitive function, lower neurobehavioral testing scores in children, decline in neuropsychological development in the first 4 years of life, increased stroke incidence, and elevated autism risk (Block et al. 2012).

Recent studies in Sweden observed the impact of air pollution to dementia incidence in Sweden (Oudin et al. 2016) and Parkinson's disease in Denmark (Ritz et al. 2016).

Study in China analyzed the relationship between PAH-DNA adducts and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a protein involved in neuronal growth, in cord blood. They followed two cohorts, before and after the closure of a coal burning power plant. At age two was tested the development of these children. The closure of power plant resulted in the reduction of PAH-DNA adducts in newborns and increased BDNF protein levels, which were positively associated with neurocognitive development (Tang et al. 2014).

In utero PM2.5 exposure during the first trimester of pregnancy ($15.8 \pm 6.6 \text{ mg/m}^3$) was negatively associated with the placental transcription of genes *BDNF* and *SYN1* (synapsin1) implicated in neural development (Saenen et al. 2015). Therefore they believe, that placenta might be a useful surrogate tissue to explore fetal brain development.

Epigenetic factors may influence how air pollution can induce adverse effects on brain. Epigenetic factors may also account for the enhanced susceptibility of certain subpopulations including alterations in gene function during development or senescence.

Acknowledgments: This work was supported by the Czech Grant Agency 13-13458S.

References:

- Peterson, B.S., Raugh, V. A., Bansai, R., et al. (2015) *JAMA Psychiatry* 72, 531-540.
Jedrychowski, W.A., Perera, F.P., Camann, D., et al. (2015) *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 3631-3639.
Block, M.L., Eldre, A., Auten, R. L., et al. (2012) *Neurotoxicology* 33, 972-984.
Oudin, A., Forsberg, B., Adolfsson, A.N., et al. (2016) *Environ Health Perspect* 124, 306-312.
Ritz, B., Lee, P-C., Hansen, J., et al. (2016) *Environ Health Perspect* 124, 351-356.
Tang, D., Lee, J., Muirhead L., et al. (2014) *PLoS ONE* 9 (3), e91966.
Saenen, N.D., Plusquin, M., Bijnens, E., et al. (2015) *Environ Health Perspect* 123, 834-840.

Adaptation of humans to the environment – a review of findings from cytogenetics and “omics” studies

A. Rossnerová¹, E. Tulupová¹, M. Spatová¹, M. Pokorná¹, V. Svecová¹, J. Topinka¹, P. Rossner Jr.¹, F. Zölzer², H. Gmuender³, and R. J. Sram¹

¹Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine CAS, Prague, 14220, Czech Republic

²Institute of Radiology, Toxicology and Civil Protection, Faculty of Health and Social Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, 37001, Czech Republic

³Genedata AG, Basel, Switzerland

Presenting author email: andreasr@biomed.cas.cz

The level of DNA damage in human population is a result of many factors. Among them chemical or radiation exposure from the environment plays crucial role.

During the last decade Czech biomonitoring research focused on the investigation of genetic damage in populations living in locations with various levels and sources of air pollution: in Prague (P) (moderate levels of pollutants due to traffic), Southern Bohemia (SB) (moderate levels of pollutants due to local heating), and Moravian-Silesian Region (MS) (a highly polluted region due to steel industry). E.g., in 2011, average concentration of benzo[a]pyrene (B[a]P) in the air was 0.9 ng/m³, 1.3 ng/m³, 10.1 ng/m³, in P, SB and MS respectively. Another research focused also on the effect of radiation exposure in a group of former uranium processing plant workers from SB.

As some results of biomarker analyzes were unexpected, we revised cytogenetics and -omics findings with the aim to suggest mechanisms of the effect of air pollution on the integrity of DNA and function of genes and also the effect of former uranium exposure on the sensitivity to new radiation exposure. We found that: (i) DNA damage increased with elevated concentration of B[a]P in subjects living in P; (ii) DNA damage in subjects from MS had different trend and in general did not increase with exposure to B[a]P; (iii) Subjects that lived in P, temporarily moved to MS and were exposed to very high concentrations of B[a]P exhibited significant increase of DNA damage; (iv) Subjects from studied locations differed by gene expression and DNA methylation pattern; (v) Increased exposure during prenatal development significantly impacted function of genes and DNA damage later in life; (vi) Former uranium exposure can lead to lower DNA damage level after radiation exposure in future life.

We suggest, that prenatal and early life exposure is critical for sensitivity to negative factors later in life and that it specifically programs the organism for survival in the conditions in which the prenatal development was completed. Subjects living in MS seem to be adapted to the increased level of air pollution, probably due to changes in DNA methylation pattern during the prenatal development and its impact on gene expression levels. Also long time exposure during the life (e.g. uranium exposure in the presented study) can be hypothetically connected with reprogramming of gene functions.

Acknowledgements: This work was supported by the Grant Agency CR 13-13458S, by Ministry of Education Youth and Sports CR LO1508, EU program FP7/ENV-2012-308524-2/CITI-SENSE and by the Research Grant Faculty of Health and Social Studies, University of South Bohemia EPZ2012_003.

References:

- Rossnerová, A., Spatová, M., Rossner, P., Solansky, I., Sram, R. J. (2009) *Mutation Research* 669, 42-47.
- Rossner Jr., P., Rossnerová, A., Spatová, M., Beskid, O., Uhlirova, K., Libalova, H., Solansky, I., Topinka, J., R. J. Sram, R. J. (2013) *Mutagenesis* 28, 97-106.
- Rossnerová, A., Spatová, M., Schunck, C., R. J. Sram, R. J. (2011) *Mutagenesis* 26, 169-175.
- Rossnerová, A., Tulupová, E., Tabashidze, N., Schmuczerová, J., Dostál, M., Rossner Jr., P., Gmuender, H., Sram, R. J. (2013) *Mutation Research* 741-742, 18-26.
- Rossner Jr., P., Uhlirova, K., Beskid, O., Rossnerová, A., Svecová, V., Sram, R. J. (2011) *Mutation Research* 713, 76-82.
- Rossner Jr., P., Tulupová, E., Rossnerová, A., Libalova, H., Honkova, K., Gmuender, H., Uhlirova, K., Pastorkova, A., Svecová, V., Topinka, J., Sram, R. J. (2015) *Mutatation Research* 780, 60-70.
- Zölzer, F., Havránková, R., FreitingerSkalická, Z., Rössnerová, A., Šrám, R. J. (2015) *Cytogenetic and Genome Research* 147, 17-23.

Micronuclei as indicators of radon exposure

F. Zölzer¹, Z. Freitinger Skalická¹, R. Havránková¹, A. Rössnerová² and R. J.Šrám²

¹Institute of Radiology, Toxicology and Civil Protection, Faculty of Health and Social Sciences,
University of South Bohemia, České Budějovice, 37001, Czech Republic

²Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine ČAS,
Prague, 14220, Czech Republic

Presenting author email: zzelzer@zsf.jcu.cz

Radiation exposure can be retrospectively assessed with the help of certain biological indicators; the most commonly used being based on radiation induced damage to the DNA. Micronuclei are structures in the cytoplasm which stain similarly to the main nucleus but are typically an order of magnitude smaller in diameter. They contain whole chromosomes or chromosome fragments, and it is the latter that typically appear after radiation exposure, probably due to the processing of DNA double strand breaks. Distinguishing between spontaneous and radiation induced micronuclei with the help of centromere-specific labelling has greatly increased the sensitivity of the micronucleus test. Here we tested its applicability in uranium miners and radon spa personnel.

We earlier reported a significant increase in the frequency of micronucleus-containing cells as well as the percentage of centromere-free micronuclei (micronuclei with chromosomal fragments) in the lymphocytes of both uranium miners and radon spa personnel when compared with a control group. For the miners, both parameters correlated with the effective dose received during work, which was in the order of several tens of mSv (Zölzer et al., 2012a). No individual dosimetry data were available for the spa personnel, but a comparison with the results from uranium miners suggested that accumulated effective doses were very similar in both cases (Zölzer et al. 2013). We conclude that the micronucleus-centromere test is able to pick up relatively small effective doses which are due preferentially to the inhalation of radionuclides.

In a more recent study, we assessed micronuclei and their content in lymphocytes of 98 men from Southern Bohemia. 46 of them had worked at the uranium processing plant, "MAPE Mydlovary", which has been defunct since 1991; 52 men were controls from the same area. No differences were found between formerly exposed workers and the control group, neither in the total frequency of cells with micronuclei per 1000 cells (mean levels \pm standard deviation were 9.1 ± 3.1 and 9.8 ± 2.5 , resp.), nor in the percentage of centromere negative micronuclei was nearly equal for both groups (50 ± 18 and 49 ± 17 , resp.). Also, there was no difference between individuals living in the three villages closest to the uranium processing plant and those living further away (9.1 ± 3.0 and 9.6 ± 2.8 , resp., for the frequency of cells with micronucleus per 1000 cells and 50 ± 20 and 50 ± 17 , resp., for the percentage of centromere negative micronuclei).

Considering the fact that effective doses of the workers at MAPE Mydlovary were overall similar to those of former uranium miners (Zölzer et al., 2012 b) with whom higher frequencies of centromere negative micronuclei have been found more than 10 years after they had finished work underground, these results are somewhat surprising. A more detailed analysis of the exposures indicates that uranium miners received a greater percentage of their effective dose from the inhalation of radon and its daughters, whereas uranium processing workers received it from the incorporation of long-lived radioactive nuclides such as uranium. If, as has been suggested before, the higher level of DNA damage in miners is due to induced genomic instability, then this phenomenon may be related to radon exposure rather than exposure to uranium.

Acknowledgements: This work was supported by the Faculty of Health and Social Studies, University of South Bohemia (Research Grant EPZ2012_003)

References:

- Zölzer, F., Hon, Z., Freitinger Skalická, Z., Havránková, R., Navrátil, L., Rosina, J., Škopek, J. (2012a) Micronuclei in lymphocytes from currently active uranium miners. *Radiat Environ Biophys* 51, 277-282.
- Zölzer, F., Hon, Z., Freitinger Skalická, Z., Havránková, R., Navrátil, L., Rosina, J., Škopek, J. (2012 b) Persistence of genetic damage in lymphocytes from former uranium miners. *Cytogenet Genome Res.* 136, 288-294.
- Zölzer, F., Hon, Z., Freitinger Skalická, Z., Havránková, R., Navrátil, L., Rosina, J., Škopek, J. (2013) Micronuclei in lymphocytes from radon spa personnel in the Czech Republic. *Int Arch Occup Environ Health.* 86, 629-633.

Přestavby chromosomů u onkologických pacientů a pracovníků exponovaných cytostatiky a ionizujícím zářením

Jiří Rubeš¹, Petra Musilová¹, Hana Šebestová¹ Miluše Vozdová¹, Markéta Petrovová², Marek Svoboda²

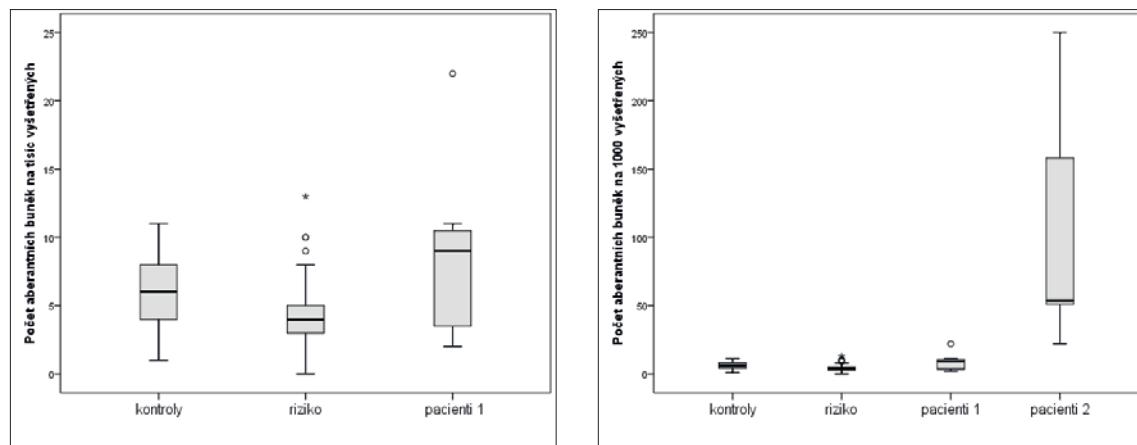
¹Oddělení genetiky a reprodukce, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno,

²Masarykův onkologický ústav, Brno

rubes@vri.cz

Cytostatika a ionizující záření jsou známé svým karcinogenním, mutagenním a teratogenním působením. Zdravotníčtí pracovníci a pacienti, kteří s nimi přicházejí do kontaktu, jsou tak v potenciálním riziku vzniku nádorového onemocnění a/nebo problémů s plodností. Chromozomové aberace (ChA) lymfocytů jsou biomarkerem expozice genotoxickým faktorům (GF) a mohou predikovat její důsledky. Bohužel, běžně používané standardní cytogenetické metody zaměřující se na nestabilní změny genomu mají značné limity, které způsobují, že výsledky těchto metod odráží spíše krátkodobou expozici GF. Nepřesnost testu může vést ke zbytečnému stažení zaměstnance z pracovního procesu nebo naopak k podhodnocení rizika malignity. Detekce stabilních ChA metodou FISH je přesnější k vyšetření kumulativní (dlouhodobé) expozice GF. Cílem realizace celého projektu je zjistit, 1. zda je tato metoda použitelná k biologické dozimetrii u pracovníků v rizikových provozech a 2. zda existují rozdíly ve výskytu chromozomálních aberací u pacientů po různé protinádorové léčbě, kterých by bylo možné využít k predikci rizika vzniku sekundárních malignit. Z předchozí studie víme, že vysoká frekvence přestaveb chromosomů přetrává několik let po ukončení léčby a v jejích poklesu jsou inter individuální rozdíly.

Pro FISH je použita červeně značená malovací sonda pro chromosom 1 a zeleně značené sondy pro chromosomy 2 a 4. Sonda jsou smíchány tak, aby všechny 3 páry chromosomů byly dobře viditelné pod double-filtrem (pro červenou a zelenou) ve fluorescenčním mikroskopu. Jednotlivé vzorky jsou zakódovány a slepě analyzovány. Preparáty jsou předhledány pomocí mikroskopu s automatickým vyhledáváním metafázních buněk (Metafer, MetaSystems). Všechny metafázní buňky, které se v mikroskopu jeví jako aberantní nebo potenciálně aberantní byly pomocí kamery nasnímány a hodnoceny v programu pro analýzu obrazu (ISIS, MetaSystems) dvěma hodnotiteli. U vybraných jedinců jsou výsledky získané FISH s třemi chromosomy a extrapolovanými na genom ověřovány pomocí multicolor FISH, využívající barevné značení všech chromosomů.



Obráz 1. Boxploty znázorňují počet aberantních buněk u kontrol, zaměstnanců v riziku práce s cytostatiky nebo radiací (riziko), pacienty před chemo nebo radioterapií (pacienti 1) a pacienty s metastázemi, kteří dostávají více než tři roky chemoterapii (pacienti 2). Současné kontroly jsou lidé, kteří přijdou na skríninové vyšetření do MOÚ. Bude doplněno kontrolou zaměstnanců ústavu, kteří nejsou v riziku expozice. * znázorňuje extrémní hodnoty, o odlehle hodnoty. Výsledky zatím nejsou extrapolovanými na celý genom. Aberantní buňky představují události na 38 % genomu.

Závěr: Předběžné výsledky ukazují, že použitá metoda umožňuje identifikovat pracovníky v riziku práce se cytostatiky nebo radiací, kteří mají odlehlé nebo extrémní hodnoty narušení chromosomů. U pacientů, kteří podstupují chemoterapii je vysoký výskyt chromozomálních přestaveb, který vykazuje extrémní inter individuální rozdíly v reakci na chemoterapii.

Oznámení: Tato práce je podporována Agenturou pro zdravotnický výzkum ČR reg. č. 15-33968 A

Radiation and radioresistance - experiments with *Vicia faba* L.

K. Mičieta¹, G. Murín¹

¹Department of Botany, Comenius University, Révová 39, Bratislava, Slovakia

Keywords: seeds, crop production, induction of mutagenesis by radiation

Presenting author email: gustavmurin@yahoo.com

Crop plants under radiation were intensively studied in the past in the former Czechoslovakia and a significant sensitivity of *Vicia faba* L. to irradiation was reported. It is known that there is no direct relation between irradiation and cancer processes. Furthermore, in our previous study a significant radio-resistance of wild plants for a higher radioactivity around NPP Jaslovské Bohunice was confirmed (Murín and Mičieta, 2009). It is well known from the Chernobyl case that plants not only are able to resist high doses radioactivity, but after years may develop a significant adaptability to radiation (Klubicová, et al. 2010). Our aim was to find a scale of doses to show this effect at seeds of *Vicia faba* L. using seeds of different age (expecting higher sensitivity of older ones). Our results showed that plant seeds can resist very high doses of irradiation by ⁶⁰Co up to 10 kGy, especially in their dry stage.

Cultivar and time of storage	Treatment dose (Gy)	Length of roots (mm)			number of evaluated ana-telophase	Chromosomal aberrations after 96 hours			
		after 48 hours	after 72 hours	after 96 hours		F	B	F+B	frequency of aberrations (%)
Inovec (21 years)	0.5	5.78 ± 0.92	14.67 ± 3.60	18.44 ± 4.54	84	3	3	0	7.14 + 1.44
	1.0	4.00 ± 0.58	9.67 ± 2.87	13.22 ± 4.38	338	3	9	0	3.55 + 0.76
	2.5	6.67 ± 1.14	14.00 ± 3.82	20.89 ± 5.98	364	7	5	1	3.57 + 1.33
Inovec (18 years)	0.5	4.22 ± 0.74	7.89 ± 2.49	9.89 ± 3.81	181	7	5	0	6.63 + 2.01
	1.0	5.67 ± 1.04	13.00 ± 3.89	19.22 ± 6.34	286	1	1	0	0.70 + 0.22
	2.5	4.56 ± 0.84	6.55 ± 2.43	8.44 ± 4.20	122	1	1	0	1.64 + 0.45
Inovec (13 years)	0.5	9.89 ± 0.96	22.44 ± 2.48	36.00 ± 4.15	500	3	3	0	1.20 + 0.38
	1.0	7.78 ± 0.74	18.33 ± 3.14	25.89 ± 4.87	500	3	2	0	1.00 + 0.07
	2.5	7.56 ± 0.73	20.22 ± 3.10	33.00 ± 5.57	500	1	0	0	0.20 + 0.11
Liber (4 years)	0.5	8.89 ± 0.75	24.00 ± 2.92	34.89 ± 5.01	500	1	1	0	0.40 + 0.08
	1.0	9.56 ± 0.88	23.89 ± 2.75	35.89 ± 5.04	500	0	1	0	0.20 + 0.06
	2.5	8.11 ± 0.70	22.67 ± 3.61	38.67 ± 6.25	500	2	1	0	0.60 + 0.28
Liber (2 years)	0.5	15.33 ± 0.50	33.78 ± 2.23	52.00 ± 4.01	500	3	3	0	1.20 + 0.64
	1.0	13.89 ± 0.75	30.33 ± 2.02	46.22 ± 3.84	500	1	1	0	0.40 + 0.22
	2.5	11.89 ± 0.84	26.33 ± 1.28	42.00 ± 2.29	500	0	1	0	0.20 + 0.06
control		14.00 ± 0.80	28.89 ± 0.93	44.44 ± 2.26	500	2	0	0	0.40 + 0.09

Table 1: Vitality and frequency of chromosomal aberrations for *Vicia faba* L. seeds sets different in cultivars, time of storage and doses of irradiation

Acknowledgements: This study was supported by VEGA grant No. 1/0885/16, and is also partially the result of the project implementation: Comenius University in Bratislava Science Park supported by the Research and Development Operational Programme funded by the ERDF Grant number: ITMS 26240220086.

References:

- Klubicová, K., Danchenko, M., Škultéty, Ľ., Miernyk, J.A., Rashydov, N.M., Berezhna, V.V., Prečová, A., Hajdúch, M. (2010) *Environmental science & technology* 44 (18), 6940-6946.
- Murín, G., Mičieta, K. (2009) In: Robert V. Steinberg, (Ed.). *Contaminated Soils: Environmental Impact, Disposal and Treatment*. New York: Nova Science Publ., 433-448.



POSTERY

Effect of two retinoic acid isomers on the expression of selected nuclear retinoid receptors and protein pattern in human MCF-7 breast cancer cell line

J. Brtko¹, L. Toporova¹, D. Macejova¹, L. Bialesova¹, D. Flodrova², J. Bobalova²

¹Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, 845 05 Bratislava, Slovakia

²Institute of Analytical Chemistry of the CAS, v. v. i., 602 00 Brno, Czech Republic

Presenting author e-mail: julius.brtko@savba.sk

Nuclear retinoid X/retinoid receptor heterodimers (RXR/RAR) are considered to be ligand-activated, DNA-binding, trans-acting, transcription-modulating proteins involved in a general molecular mechanism responsible for transcriptional responses in target genes. Retinoids and also retinoid receptor X natural or synthetic ligands are known to inhibit carcinogenesis, suppress tumour growth and invasion in a variety of tumour tissues. Both natural and synthetic retinoids have therapeutic effects due to their antiproliferative and apoptosis-inducing effects (Brtko and Thalhamer, 2003; Brtko and Dvořák, 2011).

In the current presentation, the effect of all-trans retinoic acid and 9-cis retinoic acid or their combination on RARalpha, RARgamma, RXRalpha, RXRbeta expression and protein profile in human MCF-7 breast cancer line were investigated. The expression of the retinoid/rexinoid nuclear receptor subtypes has been analyzed by the RT-PCR technique. The proteins after SDS-PAGE separation were digested in-gel by trypsin and identified by matrix assisted laser desorption ionization technique with time of flight mass analyzer (MALDI-TOF/TOF). In MCF-7 cells, we have found significantly decreased expression of RARalpha when cells were treated with 10 µmol.l⁻¹ all-trans retinoic acid for 48 h. Significantly decreased expression of RARalpha, RARgamma, RXRalpha, RXRbeta was detected when MCF-7 cells were treated by the combination of 10 µmol.l⁻¹ all-trans retinoic acid and 0.1 µmol.l⁻¹ 9-cis retinoic acid for 48 h (Table 1).

Nuclear receptor subtype	Mock treated samples	All-trans RA 1.0 µmol/l ± SD	All-trans RA 10.0 µmol/l ± SD	9-cis RA 0.1 µmol/l ± SD	All-trans RA 10.0 µmol/l + 9-cis RA 0.1 µmol/l ± SD
RARalpha	1.000	1.041±0.094	0.931±0.082	1.033±0.276	0.712±0.122
RARgamma	1.000	1.201±0.279	0.912±0.142	0.813±0.212	0.580±0.047
RXRalpha	1.000	1.051±0.194	0.474±0.036	1.030±0.330	0.450±0.013
RXRbeta	1.000	1.154±0.096	0.943±0.199	0.890±0.239	0.756±0.116
P < 0.05					

Table 1. Effect of retinoic acids on the expression of selected nuclear retinoic acid receptors subtypes (RARalpha, RARgamma, RXRalpha, RXRbeta) mRNAs

Minor qualitative (about 70 kDa and 44 kDa proteins) together with some quantitative differences were found in the gel of MCF 7 lines after treatment with retinoids. Among the important proteins, with regard to treatment of the cells with retinoids, there are mainly quantitative changes in heat shock protein HSP 90-beta and heat shock cognate 71 kDa protein (Table 2).

In conclusion, our data offer basic information about RAR and RXR subtype expression and the representation of proteins that belong to the specific breast cancer biomarkers after the treatment of MCF-7 cells with retinoic acid isomers.

line	protein	gi number	mass (Da)	peptide matches	coverage (%)	function
1.	heat shock protein HSP 90-beta	gi 20149594	83554	11	17	molecular chaperon, protein binding/folding
	heat shock protein HSP 90-alpha isoform 1	gi 153792590	98670	5	7	molecular chaperon, protein binding/folding
	tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein TRAP-1 - human	gi 1082886	75694	1	2	apoptosis process, ATP binding
2.	heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1	gi 5729877	71082	6	14	molecular chaperon, protein binding/folding
	chain A, atpase domain of human heat shock 70kDa protein 1	gi 6729803	41973	6	20	molecular chaperon, protein binding/folding
	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant	gi 62897129	71083	8	16	molecular chaperon, protein binding/folding
3.	cytokeratin 18 (424 AA)	gi 30311	47305	3	7	structural constituent of cytoskeleton, protein binding
4.	keratin, type I cytoskeletal 19	gi 24234699	44079	5	14	structural constituent of cytoskeleton, protein binding
5.	14-3-3 protein zeta/delta	gi 4507953	27899	3	16	regulation of signaling pathways
	chain A, binary complex of 14-3-3 sigma and P53 Pt387-peptide	gi 291463695	28225	2	8	regulation of signaling pathways

Table 2. Summary of identified proteins

Acknowledgements: This work was supported by APVV-0160-11, VEGA 2/0171/14, institutional support RVO: 68081715 of the Institute of Analytical Chemistry of the CAS, v. v. i., SAV-15-01 and SAV-AVCR-15-01 grants.

References:

- Brtko, J., Thalhamer, J. (2003) Curr. Pharm. Design 9, 2067-2077.
 Brtko, J., Dvorak, Z. (2011) Curr. Drug Metab. 12, 71-88.

Immunotoxic and immunomodulatory effects of subchronic inhalation exposure to zinc oxide nanoparticles on splenocytes in mice

T. Brzicová¹, E. Javorková², A. Zajícová², V. Holáň², Z. Večeřa³, O. Šerý³, K. Vrbová¹, J. Topinka¹, P. Rössner¹

¹Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Prague, 142 20, Czech Republic

²Department of Transplantation Immunology, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Prague, 142 20, Czech Republic

³Department of Environmental Analytical Chemistry, Institute of Analytical Chemistry, Czech Academy of Sciences, Brno, 602 00, Czech Republic

Presenting author email: tana.brzicova@biomed.cas.cz

Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) represent one of the most widely used nanomaterials. Due to their specific chemical, mechanical, optical and electrical properties, ZnO-NPs are being applied in solar cells, sensors, UV filters, drug delivery systems, electronics and many other fields (Kołodziejczak-Radzimska and Jesionowski, 2014).

As it is the case of nanomaterials in general, the unique nanoscale-related properties of ZnO-NPs may be associated with enhanced or unexpected toxicity. Toxicity of ZnO-NPs has been extensively investigated (Pandurangan and Kim, 2015), however *in vivo* studies evaluating potential effects of ZnO-NPs on immune system are scarce. Immune system plays a crucial role in eliminating potentially dangerous agents, including nanomaterials, from the body, on the other hand, exaggerated activation of immune responses may lead to harmful consequences (Luo *et al.*, 2015). Interactions of nanomaterials with immune cells may thus determine potential adverse health effects of nanomaterial exposure.

In the present work, spleens of mice exposed to ZnO-NPs were used to study potential immunotoxic and immunomodulatory effects of subchronic (90-day) inhalation exposure to ZnO-NPs. Mice (8 per group) were exposed to ZnO-NPs (geometric mean diameter <10 nm) in a whole-body inhalation chamber in concentrations of 6×10^4 particles/cm³ and 2×10^6 particles/cm³, corresponding to 20 and 625 µg/m³, respectively. Mice exposed to filtered air served as a control group. ZnO-NPs were continuously synthetized using an evaporation-condensation-oxidation technique. Particle concentration and particle size distribution in the whole-body inhalation chamber were monitored throughout the whole experiment by scanning mobility particle size analyzer. Generated nanoparticles were sampled for further physico-chemical analyses (transmission electron microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy).

Spleens of the exposed mice did not exhibit any signs of pathology and no difference in spleen size between mouse groups was observed. Analyses of zinc content in mouse organs are ongoing.

Alterations in composition of spleen cell populations were evaluated by phenotyping different immune cell subtypes by flow cytometry. The proportions of T-lymphocytes and their subpopulations (CD3+, CD4+, CD8+) and B-lymphocytes (CD19+) in fresh splenocytes did not differ between exposed and control mice. However, a significant decrease in granulocytes in exposed mice was observed, namely in eosinophils (CD11b+ CD193+) and neutrophils (CD11b+ Gr1+). Similarly, antigen presenting cell counts were reduced in spleens from both higher and lower dose exposed mice. Using ELISA, production of selected cytokines (pro-inflammatory IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, IFN-γ, and anti-inflammatory IL-10) was measured in non-stimulated and lipopolysaccharide- or concanavalin A-stimulated spleen cells. Overall, ZnO-NPs did not significantly affect cytokine concentrations.

The results suggest that subchronic inhalation exposure of mice to Zn-ONPs in concentrations of 20 and 625 µg/m³ did not cause profound changes in immune response. However, slightly decreased neutrophils and antigen presenting cell populations may indicate potential immunosuppressive effects of ZnO-NPs and related increased host susceptibility towards infections or cancerous diseases.

Acknowledgements: This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project No. LO1508). The authors acknowledge the assistance provided by the Research Infrastructure NanoEnviCz, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under Project No. LM2015073.

References:

- Pandurangan, M., Kim, D. H. (2015) *J. Nanopart. Res.* 17(3), 1-8.
Luo, Y. H., Chang, L. W., Lin, P. (2015) *BioMed Res. Int.* 2015, 143720.
Kołodziejczak-Radzimska, A., Jesionowski, T. (2014) *Materials* 7(4), 2833-2881.

The effect of prenatal exposure of air pollution to gene expression profile - preliminary preview of G-NEW study

K. Honkova¹, A. Rossnerova¹, P. Rossner, Jr.¹, J. Pavlikova¹, H. Gmuender², V. Svecová¹, J. Pulkrabova³, J. Hajsova³, M. Veleminsky⁴, R. J. Sram¹

¹Institute of Experimental Medicine Academy of Science of the Czech Republic

²Genedata, Basel, Switzerland.

³University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic.

⁴University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic.

Presenting author email: katerina.honkova@biomed.cas.cz

The Northern Moravia Region is the most polluted region in the Czech Republic by particulate matter (PM 2.5) and benzo[a]pyrene (B[a]P) mainly by heavy industry. This specific situation was used to study the impact of air pollution to newborns in the exposed district Karvina and control district Ceske Budejovice.

In the present study, we focused on the effects of prenatal exposure to air pollution to modulate the gene expression in newborns. The aim was to determine differently expressed transcripts (DETs) related to different localities and seasons.

340 children from the regions of the CR with different level of air pollution (Karvina and Ceske Budejovice) were born on summer 2013 and winter 2014 period. Sample groups are defined by different concentrations of air pollutants. The highest concentration of air pollutants was detected in winter 2014 when mothers were exposed to: PM2.5 (55.35 ± 11.50 vs. $26.39 \pm 5.79 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and B[a]P (5.15 ± 1.62 vs. $1.43 \pm 0.47 \text{ ng}/\text{m}^3$) in Karvina and Ceske Budejovice, respectively. Summer values from Karvina were similar to winter values in Ceske Budejovice.

RNA from frozen leucocytes of cord blood samples was isolated. Quantity and quality was tested. Only samples with RNA integrity number (RIN) > 5 were processed. cRNA of 231 samples was prepared by in vitro transcription. The biotinylated cRNA was hybridized to Human Expression Beadchips and chips were scanned on the iScan (Illumina). The arrays were processed in R environment and Genedata Expressionist software. Each array targets more than 20,000 annotated genes with more than 47,000 probes derived from the NCBI. Global gene expression profile was performed using Illumina Human Expression BeadChips microarrays.

3865 differentially expressed transcripts were correlated with the exposure data. Differentially regulated biological processes in Gene Ontology categories for fold change values were analyzed using the Functional classification analysis in the DAVID v6.7 tool. A higher number of DETs and affected KEGG pathways was found in newborns from Ceske Budejovice. Some affected pathways for winter season in both locations were primary immunodeficiency and neurotrophin signalization pathways. For Karvina T-Cell receptor signaling pathway was found. Affected KEGG pathways for Ceske Budejovice are long-term potentiation, non-small cell lung cancer or B-cell receptor signaling pathways.

The study is still in process. We have tested reference (housekeeping) genes for normalization of qPCR method which will be used for verification of 8 selected genes of significant pathways.

The study is supported by the Grant Agency of the Czech Republic (13-13458S).

Oxidative stress-causing potential of paracetamol in barley (*Hordeum vulgare* L.)

P. Babula^{1,6}, C. Fernandez², M. Kepinska³, Naser A. Anjum⁴, H. Milnerowicz³, E. Pereira⁴ and R. Kizek^{3,5}

¹Department of Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno,
Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic

²School of Pharmacy and Life Sciences, Robert Gordon University,
Garth Road, Aberdeen AB107GJ United Kingdom

³Department of Biomedical and Environmental Analyses,
Wroclaw Medical University, Borowska 211, 50-556 Wroclaw, Poland

⁴CESAM-Centre for Environmental & Marine Studies and Department of Chemistry,
University of Aveiro, Aveiro, Portugal

⁵Department of Human Pharmacology and Toxicology and ⁶Department of Natural Drugs,
Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno,
Palackého 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic

Presenting author email: kizek@sci.muni.cz

Paracetamol (acetaminophen; PCA) is a common analgesic and antipyretic drug extensively used in pharmaceutical formulations including in the treatment of mild to moderate pain and fever. PCA has been studied taking into account mainly animal/human models, where PCA effects on cardiovascular, gastrointestinal, and renal systems were studied (Roberts et al. 2016). Earlier, the possible effect of PCA to renal cells and its ability to influence neoplastic transformation were also investigated (McCredie et al. 1993). Additionally, literature is also available on the role of PCA in the reduction of incidence of cancerogenesis including epithelial ovarian cancer (Rodriguez et al. 1998; Bonovas et al. 2006; Baandrup et al. 2014). However, exhaustive investigation is warranted on the potential toxicity of PCA on plants, essential base component of all ecosystem because of obvious entry of PCA in environmental compartments due to its wide use in human health-protection and its availability in the market without a prescription (Kocak 2015)). Employing important toxicological biomarkers, this study aimed to reveal oxidative stress-causing potential of PCA in the seedlings of food crop model - barley (*Hordeum vulgare* L.). In addition, efforts were also made to minimize the toxic effect of PCA on *H. vulgare* seedlings with the supplementation of PCA-exposed seedlings with acetylcysteine, used so far in animal/human models against PCA overdose (Chiew et al. 2016).

Methods: Paracetamol (acetaminophen; PCA) and all other chemicals were purchased from the Sigma-Aldrich, unless stated otherwise. Prior to their germination, the caryopses of barley (*Hordeum vulgare* L.) were surface-sterilized in 5% (v/v) calcium hypochlorite for 10 min and then rinsed three times with deionized water. After 10 days, the barley plants were transferred into hydroponic solution. The concentrations of PCA tested in half-strength Hoagland nutrient solution were 0, 500, and 2000 µM. Acetylcysteine (AC; 500 µM) was used as a reference compound and antioxidant in order to evaluate its possible role against PCA-accrued oxidative stress/phytotoxicity. Sodium nitroprusside (100 µM), donor of nitric oxide (NO) was used as a second reference compound. Ten-day old seedlings of *H. vulgare* were exposed to PCA for 7 days in two concentrations (500 and 2000 µM). Treatment combinations were as follows: PCA + 500 µM acetylcysteine (AC; reactive oxygen species, ROS-scavenger) and PCA + 100 µM NS. Important parameters studied were: shoot/root length, fresh weight, viability (MTT and TTC assays)/"intactness" (Evans blue dye accumulation) of root tissues, content of total (soluble) proteins, total (soluble) thiols, phenols, hydrogen peroxide, and malondialdehyde (MDA). New analytical techniques were designed and tested for the studying PCA in plant material (electrochemistry and photometry; I_p (μ A) = $5.8345x+172.93$ µM). All the probes used in the study were purchased from Life Technologies, USA. Voltammetric measurements were carried out using a μ -AutolabIII (Eco Chemie, Amsterdam, The Netherlands) potentiostat/galvanostat controlled by Autolab GPES software. The cyclic voltammetric parameters were as follows: initial potential of 0 V; vertex potential 1.5 V; end potential 0 V; step potential 5 mV (Fernandez et al. (2015). Absorption spectra of paracetamol were measured with an WWR Germany spectrophotometer (Thumar et al. (2012).

Results: Though few studies are available in literature on PCA phytotoxicity (An et al. (2009; Huber et al. (2009; Kummerova et al. (2016) exhaustive reports unveiling the major insights into PCA phytotoxicity are meagre. Herein, all PCA concentrations alone led to significant depression of growth; however, both AC and NS alleviated PCA-induced growth depression as well as improved cell viability and intactness of the roots. The content of total (soluble) proteins was higher in shoots compared to roots (132 % of amount in roots). Amount of total (soluble) phenolics increased in the PCA variants in both shoots (150 and 216 % of the control, respectively) and roots (120 and 201 % of the control, respectively). Compared to PCA variants themselves, addition of AC led to the increase in total (soluble) phenolics to a lesser extent that remained 100 and 158 % of the control in shoots, and 115 and 155 % of the control in roots. NS changed the amount of total (soluble) phenolics to 112 and 122 % of the control in shoots and to 87 and 112 % of the control in roots. All these changes were critically discussed especially in the light of uptake and possible metabolism of PCA. Application of PCA led to a significant increase in ROS and MDA; where, application of AC and NS alleviated ROS and MDA productions. In the case of MDA, PCA induced an increase to 168 and 343 % of the control in shoots and to 176 and 549 % of the control in roots. Notably, AC alleviated MDA production to 99 and 160 % of the control in shoots and to 123 and 259 % of the control in roots. Additionally, application of NS reduced the amounts of MDA to 135 and 208 % of the control in shoots and to 132 and 252 % of the control in roots. Application of PCA also caused significant changes in the levels of (soluble) thiols. The amounts of (soluble) thiols increased to 157 and 216 % of the control in shoots and to 222 and 556 % of the control in roots under PCA alone exposure. AC slightly reduced the content of root total (soluble) thiols in the variant of 500 μ M PCA (79 % of the control); whereas, the variant of 2000 mM PCA slightly increased amount of root total (soluble) thiols (to 141 % of the control). Moreover, the content of total (soluble) thiols in combined PCA-AC treatment increased slightly (to 115 and 269 % of the control). NS reduced amount of total (soluble) thiols in shoots (78 % of the control) exposed to with the concentration of 500 μ M PCA; whereas, under higher concentration of PCA (2000 μ M), NS increased amount of total (soluble) thiols in shoots to 153 % of the control. On the other hand, the content of total (soluble) thiols in roots after PCA+NS combined treatment was significantly increased (128 and 250 % of the control). All the highlighted above results were well-supported by the light/fluorescence microscopy (Figure 1). Obtained experimental data point toward the severe phytotoxicity and genotoxicity potential of PCA.

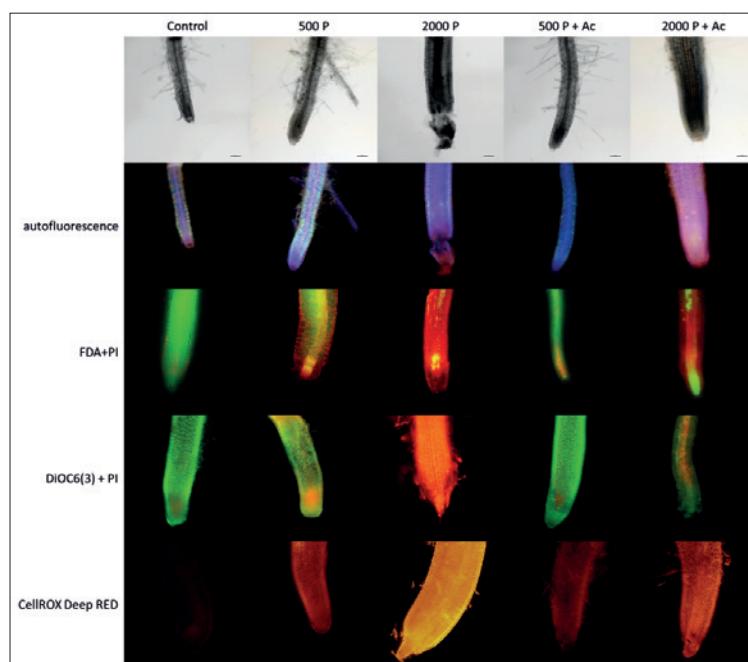


Figure 1. Effect of Paracetamol (acetaminophen; PCA; 500 and 2000 mM) in combination with reactive oxygen species (ROS)-scavenger acetylcysteine (AC; 500 μ M) on the experimental *Hordeum vulgare* L. seedlings. Light microscopy (first row) revealed ability of PCA to induce damage of root cap. Observed changes included changes in autofluorescence, viability (FDA + PI staining, living cells – green fluorescence, dead cells – red fluorescence), ER stress (DiOC6(3) in combination with PI – green, respectively red fluorescence), and creation of ROS (CellROX Deep RED reagent, red fluorescence). Combination of PCA with AC showed protective effect of AC against PCA-induced phytotoxicity and possible involvement of ROS in this toxicity. The bar represents 100 μ m.

Acknowledgements: This work was supported by the project for conceptual development of research organization.

References:

- An J., Zhou Q. X., Sun F. H., et al. (2009) *J. Hazard. Mater.* 169, 751-757.
Baandrup L., Friis S., Dehlendorff C., et al. (2014) *JNCI-J. Natl. Cancer Inst.* 106.
Bonovas S., Filioussi K., Sitaras N. M. (2006) *Br. J. Clin. Pharmacol.* 62, 113-121.
Fernandez C., Heger Z., Kizek R., et al. (2015) *Int. J. Electrochem. Sci.* 10, 7440-7452.
Huber C., Bartha B., Harpaintner R., et al. (2009) *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 206-213.
Chiew A. L., Isbister G. K., Duffull S. B., et al. (2016) *Br. J. Clin. Pharmacol.* 81, 471-481.
Kocak E. (2015) *J. Environ. Health Sci. Eng* 13.
Kummerova M., Zezulka S., Babula P., et al. (2016) *J. Hazard. Mater.* 302, 351-361.
McCredie M., Stewart J. H., Day N. E. (1993) *Int. J. Cancer* 53, 245-249.
Roberts E., Nunes V. D., Buckner S., et al. (2016) *Ann. Rheum. Dis.* 75, 552-559.
Rodriguez C., Henley S. J., Calle E. E., et al. (1998) *Lancet* 352, 1354-1355.
Thumar R., Savaliya P., Boda J., et al. (2012) *Inventi Rapid: Pharm Ana & Qual Assur* 8, 79-89.

The results of interconnection of the Evidence of Professional Exposure to Genotoxic Factors (REGEX) and Cancer Registry in Moravian - Silesian Region of the Czech Republic (Evaluation of occupational exposure to genotoxic factors in relation to cancer)

Hana Lehocká², Ivona Závacká¹, Jana Vavrošová³, Vladimír Janout⁴

¹Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine University of Ostrava

²Department of Work Physiology, Institute of Public Health in Ostrava

³Department od Emergency Medicine and Forensic Studies, Faculty of Medicine University of Ostrava

⁴Department of Epidemiology and Public Health, Faculty of Medicine University of Ostrava

This study aims to analyze the genotoxic risks in Moravian – Silesian Region and assess the significance of genotoxic factors in the etiology of cancer by bringing together Registry of Occupational Exposure to genotoxic factors and Cancer Registry and compare the rate of detected cancer in persons occupationally exposed to genotoxic factors in Moravian – Silesian Region with the occurrence of cancer in the population of the Czech Republic.

The set of individuals consisted of 748 subjects whose records of occupational exposure have been available since the year 2005 and have been updated at least once. The most common carcinogens were polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), particularly benzo[a]pyrene, benzo[d,e,f]chrysene and cytostatics applied in healthcare facilities. The file has been linked to Cancer Registry in Ostrava in June 2009 and again in June 2011 and there was found 22 cases of cancer in the year 2008 and 27 cases of cancer in 2011.

The incidence of 22 tumor diseases in the set of 748 individuals professionally exposed to genotoxic agents between the years 1996 and 2009 represents the incidence rate of 210/100000 per year. For simplified comparison, in 2009 the incidence of neoplasms in the Czech Republic was 751.5 /100 000 per year. The incidence in the occupationally exposed individuals was therefore more than 3 times lower in comparison with the situation in the country.

Cytogenetic analysis was performed on 492 individuals out of 748 subjects, where 151 persons were examined (30.7%) within the reference values (up to 2.0% AB.C.), in the group of increased exposure to genotoxic agents (2.0 to 4.0% AB.C.) there was 263 examined subjects (53.5%) and in the group with high exposure to genotoxic substances ≥ 4 was 78 examined subjects (15.8%).

The reasons for the relatively low incidence of cancer in people exposed to genotoxic agents may be related to reducing exposure to genotoxic agents as a result of measures ordered by the Public Health Authority after demonstrating increased levels of chromosomal aberrations in high-risk environments.

Ganoderma lucidum a její vliv na přežívání a migraci buněk kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu

P. Mačinga¹, A. Opattová², A. Čumová², J. Horák², D. Sliva³, T. Hucl¹, P. Vodička²

¹ Klinika hepatogastroenterologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha,

² Institut experimentální medicíny, AV ČR, Praha

³ Indiana University School of Medicine, Indianapolis, United States

Email autora prezentace: alenaopattova@gmail.com

Kolorektální karcinom (CRC) a karcinom pankreatu patří mezi nejčastější zhoubné nádory trávicího traktu. Oba mají v pokročilém stádiu nepříznivou prognózu. Pacienti ve IV. stádiu onemocnění (metastatický CRC) mají 5-leté relativní přežití 11% a pacienti s karcinomem pankreatu pouze 5%. Oba typy karcinomu nejčastěji metastazují do jater, plic a pobřišnice. Důležitým mechanismem progrese onemocnění a rozvoje metastáz je buněčná migrace.

Identifikace látek s antimetastatickým působením může vést ke zpomalení rozvoje onemocnění a prodloužit relativní přežívání pacientů se zhoubným nádorem. *Ganoderma lucidum* (GLC), v českém názvosloví lesklokorka lesklá, je houba užívaná v tradiční čínské medicíně, u které byly *in vitro* prokázány protinádorové účinky.

Cílem naší práce bylo blíže popsát anti-proliferační a anti-migrační účinky přírodní sloučeniny GLC na buněčných liniích kolorektálního a pankreatického karcinomu.

U linií kolorektálního karcinomu (HCT116, HT29) a karcinomu pankreatu (MiaPaca2, Panc1) jsme sledovali přežívání buněk a jejich schopnost migrace po ovlivnění extraktem GLC. V koncentraci 0,5µg/µl snižovala GLC přežívání linií HCT116 o 25% ($p<0.05$), HT29 o 15% ($p<0.05$), MiaPaca2 o 36% ($p<0.01$) a Panc1 o 48% ($p<0.05$). Navíc GLC snižovala schopnost migrace kolorektálních i pankreatických linií (HCT 116, 64%, $p<0.05$ a HT29 52%, $p<0.05$).

Prokázali jsme, že extrakt GLC signifikantně snižuje přežívání buněk a zároveň jejich migraci u linií karcinomu pankreatu i kolorektálního karcinomu. Přírodní sloučeny, jako je např. *Ganoderma Lucidum*, by mohly najít uplatnění jako doplněk standardní protinádorové léčby s výrazným vlivem na rozvoj metastáz.

Poděkování: tato práce byla podpořena projekty AMVIS LH13061 and GACR 15-14789S

Management zdravotních rizik na pracovišti: Profesionální expozice částicím aerosolu, empirický fyzikálně – chemický model versus experiment.

V. Mička¹, O. Zavila², Š. Bernatíková², Z. Kaličáková², E. Ježo¹, K. Lach¹

¹Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Ostrava, 702 00, Česká republika

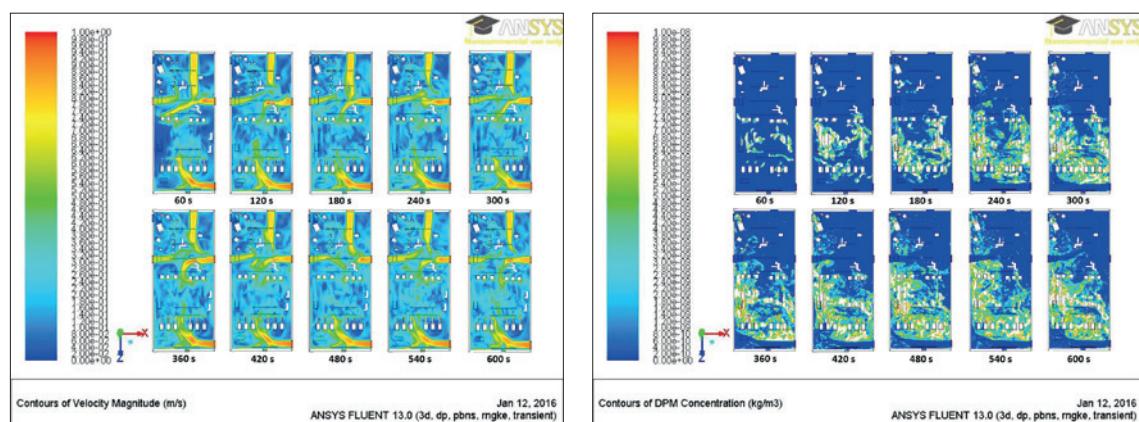
²Fakulta bezpečnostního inženýrství, Vysoká škola báňská – Technická Univerzita Ostrava,
708 33 Ostrava -Poruba, Česká republika

Klíčová slova: Polétavý aerosol, inhalační expozice, model, proudění.

Email prezentujícího autora: vladimir.micka@zuova.cz

Modelování expozic v pracovním prostředí jako prostředku zlepšení odhadu úrovně rizik souvisejících s expozicí chemickým látkám a aerosolům na pracovišti se s rozvojem výpočetní techniky v posledním desetiletí postupně objevuje a uvádí do praxe jako nástroj rovnocenný experimentálním měřením, případně se modelované výsledky s terénními výsledky a výsledky biologických expozičních testů srovnávají či kombinují. V současné době je k dispozici několik typů softwarových produktů různého stupně propracovanosti pro odhad inhalační (a také dermální) expozice v několika desítkách typů průmyslových situací, přičemž stejným kriteriem pro kvalitu očekávaného výstupu – modelu a následné interpretace výsledku, je dostupnost a kvalita vstupních dat o chemických látkách v provozu používaných, prostorovém uspořádání pracoviště a parametrech větrání a odsávání nezáměrně produkovaných emisí látek unikajících do pracovního ovzduší.

Ač může být model expozice chemickým látkám zatížen mnoha chybami a nejistotami plynoucími ze vstupních údajů, v industriální hygieně a potažmo v praxi hygienických laboratoří mohou nastat situace, kdy model může být jediným nástrojem poskytujícím alespoň nějakou informaci o úrovni hladin expozic, např. při šetření podmínek vzniku nemoci z povolání v původních pracovních podmírkách na technologicky inovovaném pracovišti, další typickou situací je odhad expozičních hladin budoucích obsluh projektovaných provozů nejen ve vztahu k obsluze pracoviště, ale i k okolí, tzn. pozadové koncentrace očekávané v halách, vnitřních komunikačních prostorech, nebo zhodnocení možného přenosu látek na místa s nepředpokládaným výskytem těchto látek. S rozvojem nanotechnologií pak možnost prospektivního odhadu expozic nanorozměrným či ultrajemným aerosolům, ať už záměrně či nezáměrně produkovaným, nabývá obzvláštního významu (obr. 1a, b).



Obr. 1a, 1 b: Vyplňené kontury rychlosti proudění vzduchu a koncentrace částic v rozsahu 0–1 m/s a 0–1 e-08 kg/m³ ve výšce 1,5 m nad podlahou v čase 0–600 s v průmyslové hale (ANSYS Fluent 13.0, numerický model proudění, RNG k-ε model, model turbulence, DiscretePhase model).

Poděkování: Tato práce vznikla za podpory projektu VŠB – TU Ostrava pod č. SP2015/169.

Literatura:

Fiala, Z., et al. (2012) Hygiena, 57(3), 110-116.

Čarnogurská, M., Příhoda, M., & Popčáková, D. (2010). Journal of Mechanical Science and Technology, 24(12), 2479-2486.

Chemical characterization and genotoxicity of emissions from diesel and gasoline fuels

M. Pokorna¹, A. Milcova¹, A. Ambroz¹, J. Stolcpartova¹, A. Rossnerova¹, M. Ciganek²,
J. Necá², M. Vojtisek-Lom^{3,4}, J. Topinka¹, P. Rossner¹, Jr.

¹Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

²Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

³Center of Vehicles for Sustainable Mobility, Faculty of Mechanical Engineering,
Czech Technical University, Prague, Czech Republic

⁴Department of Vehicles and Engines, Faculty of Mechanical Engineering,
Technical University of Liberec, Czech Republic

Presenting author email: *michaela.pokorna@biomed.cas.cz*

Biofuels and their blends with standard fuels became a popular alternative to diesel and gasoline. We compared chemical composition and genotoxicity of organic extracts from extractable organic matter (EOM) obtained from emissions from various blends of biofuels with diesel and gasoline.

For diesel engines, we studied emissions from standard diesel (B0), diesel fuel with 30% biodiesel (B30), biodiesel only (B100) and a new generation biodiesel (NEXBTL100). We tested two types of gasoline engines: Direct Injection Spark Ignition (DISI; operated using standard gasoline, gasoline with 15% ethanol (E15), 25% n-butanol and 25% iso-butanol) and Multi-Point Injection engine (MPI; operated using standard gasoline and E15).

For the diesel fuels, the highest content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), their oxy-, nitro- and dinitro- derivatives/mg EOM was found for B30 and B100; the lowest PAHs concentrations were observed for NEXBTL100.

For gasoline-operated engines, the lowest PAH content was detected in EOMs from MPI/standard gasoline; MPI/E15 produced highest levels of both PAHs and oxy-PAHs. EOMs from DISI/standard gasoline were characterized by low PAH-derivatives content.

Genotoxicity was tested in calf thymus DNA (CT-DNA) acellular system in the presence of rat liver microsomal S9 fraction. Levels of bulky DNA adducts and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in CT-DNA after 24-h treatment with EOMs (50, 100, 250 µg/mL) were analyzed.

All diesel emission EOMs induced similar DNA adduct levels. Oxidative DNA damage was also comparable, with the exception of B100 where no induction of oxidative damage was observed. EOMs from emissions from all DISI fuels had 2-3-fold higher genotoxicity than EOMs from MPI emissions. On the contrary the MPI engines generated EOMs with slightly higher oxidative potential than the DISI emissions.

All results were evaluated per mg of extract and do not take into the account changes in the total mass of the emitted particulate matter as a function of the fuel used.

In summary, EOMs from the biofuels contained comparable or higher PAHs levels than standard fuel. The highest genotoxicity was observed for EOMs generated by the DISI engines regardless the fuel used.

Acknowledgements: This work was supported by the Czech Science Foundation (13-01438S), EU LIFE+ (LIFE10 ENV/CZ/65Grant for Research HJ123.

Protective effects of *Vitis vinifera* extract to reduce oxidative DNA damage

Z. Rybková¹ and K. Malachová¹

Institute of Environmental Technologies, Department of Biology and Ecology, Faculty of Science,
University of Ostrava, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, Czech Republic

Presenting author email: zuzana.rybkova@osu.cz

Introduction:

Plants have long been considered a valuable source of compounds beneficial for humans. Many compounds that are found in plants exhibit a biological activity such as antimicrobial, antioxidative, antiviral, antiinflammatory, antimutagenic and anticarcinogenic (Boubaker *et al.*, 2010). Polyphenolics in medicinal and fragrant plants, fruit and vegetables belong to such compounds. Their broad protective effect consists in a number of individual complementary actions contributing to the upbuilding and maintenance of homeostasis. *Vitis vinifera* L. is a species of *Vitis*, its production is widespread throughout the world for fresh consumption and industrial processing (Fernandes *et al.*, 2013). This plant has been used for the production of food and beverage as well as a remedy against various complaints in traditional medicine (Orhan *et al.*, 2006). The varied chemical composition of *Vitis vinifera* grapes appears to contribute to their biological potential. The grapes are rich in polyphenolic compounds such as anthocyanins, flavanols, flavonols, proanthocyanidins, stilbenes (resveratrol), and phenolic acids (Liang *et al.*, 2011; Perestrelo *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2010). Phenolic compounds are important phytochemicals in grape because they possess many biological activities and health-promoting benefits (Iacopini *et al.*, 2008; Thiruchenduran *et al.*, 2011).

The above findings led us to investigate the antimutagenic and DNA protective abilities of the grape extract VinOserae from *Vitis vinifera* applicable as a promising supplement with effective biological potential. In this work, in order to detect a protective effect of the grape extract that prevents induction of oxidative DNA damages, a molecular biology method based on detection of changes in the topological state of the pBluescript II SK(-) plasmid was used. A different electrophoretic mobility of topological DNA forms was measured by the agarose gel electrophoresis. In the plasmid DNA test, the protective effect of the extract was determined on the basis of its capability to inhibit formation of DNA strand breaks in the plasmid DNA induced by hydrogen peroxide in the presence of transition metal ions.

The protective effect of the extract was independently evaluated with the Ames test using *Salmonella typhimurium* His^r TA102 suitable to detect mutagenic effects of oxidative compounds. The evaluation of antimutagenic effects of the extract included detection of the ability to inhibit a mutagenic effect induced by hydrogen peroxide or tert-butyl hydroperoxide. These *in vitro* tests are useful to screen the antigenotoxic potential of plant extracts and to search potential bioactive compounds for possible application in food industry. To the best of our knowledge this is the first report on DNA strand scission inhibitory and antimutagenic activities of the VinOserae extract.

Material and methods:

Chemicals and material

The chemical reagents D-glucose-6-phosphate sodium salt, hydrogen peroxide, L-histidine, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), agarose and ethidium bromide from Serva Electrophoresis (Heidelberg, Germany). All reagents used were of analytical grade. The dry grape extract was obtained from Favea, spol. s r. o. (Kopřivnice, Czech Republic). In the extract, phenolic compounds such as oligomeric proanthocyanidins and trans-resveratrol were identified.

Bacterial strain and plasmid DNA

Plasmid pBluescript II SK(-) DNA was isolated from the bacterial strain *Escherichia coli* TOP10. The isolation of plasmid pBluescript II SK(-) was carried out using columns Qiagen (QIAGEN Plasmid Mini Kit). The obtained plasmid DNA was dissolved in TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) and stored at -20 °C. Detection of mutagenic and antimutagenic activities of the plant extract was investigated using the auxotrophic bacterial strain *Salmonella typhimurium* His⁻ TA102. For each experiment, a frozen stock of the tester strain culture was grown overnight in Oxoid nutrient broth No. 2 using the procedure of Mortelmans and Zeiger (2000).

Antimutagenicity test

The Ames test standard plate incorporation procedure was used for the assessment of antimutagenicity of the grape extract (Ames *et al*, 1975). In order to detect the effect of the extract on tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) or hydrogen peroxide (H₂O₂), an induced mutagenicity assay was employed using the *Salmonella typhimurium* His⁻ TA102 strain sensitive to oxidant mutagens (Levin *et al*, 1982; 1984). A volume of 100 µl of a bacterial culture (prepared as described by Mortelmans and Zeiger, 2000), 50 µl of the test sample (50-300 µg/plate), 50 µl of a mutagen (t-BHP or H₂O₂, 100 µg/plate) and 500 µl of phosphate buffer (0.1 mM, pH 7.4) were added to 2 ml of the top agar that was supplemented with 0.05 mM histidine. The mixture was poured on minimal agar plates that were subsequently incubated at 37 °C for 48 h and then histidine-revertant colonies on each plate were counted.

The number of induced revertants was obtained by subtracting the number of spontaneous revertants from the number of revertants on the plates containing mutagen and antioxidant. The inhibition rate of mutagenicity (%) was calculated as follows: percent inhibititon (%) = [1 - (number of revertants on plates with oxidant and test compound - number of spontaneous revertants)/(number of revertants on plates with oxidant alone - number of spontaneous revertants)] x 100 (Stagos *et al*, 2006). The results were analyzed with the statistical software "R" (R Development Core Team, 2011).

DNA strand scission assay

The plasmid pBluescript II SK(-) DNA was used to study the protective effect of the VinOserae extract on DNA damage induced by hydroxyl radicals. The method using plasmid DNA is based on different electrophoretic mobility of topological forms of the plasmid DNA. DNA strand breaks were measured by a conversion of supercoiled (Sc) form to open circular (Oc) and linear (Lin) forms of DNA (Cao *et al*, 2008; Russo *et al*, 2000). Plasmid DNA (0.5 µg) was incubated with various concentrations of the extract (0.02-0.4 µg/µl), 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM FeSO₄, and 0.3% H₂O₂ in an Eppendorf tube (37 °C, 30 min). The final volume of the mixture was 10 µl. DNA conformation changes were analyzed by agarose gel electrophoresis in 1xTAE buffer (1% agarose, 7 V/cm, 80 min, room temperature). The gels were stained with ethidium bromide for 30 min, followed by 30 min destaining in water. Photos of the gels were taken in UV light (transilluminator GeneGenius, SynGene, Cambridge, UK) and the bands were quantified using the software ImageJ (Abràmoff *et al*, 2004).

Results:

Detection of the antimutagenic activity of the extract was carried out using the Ames test with *Salmonella typhimurium* His⁻ TA102. The antimutagenic effect of compounds can be evaluated on the basis of their ability to inhibit mutagen's mutagenicity. In order to measure an antimutagenic effect of the extract, both H₂O₂ and tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) were used at a concentration of 100 µg per plate to ensure a sufficient amount of revertants compared to the negative control. The extract was tested at a range of 50-300 µg sample per plate. The results showed that a significant antimutagenic effect of the extract was detected with both oxidative mutagens used (Fig. 1). The maximal decrease in the revertant numbers was found when the highest concentration of the extract was used with the two mutagens. The

respective percentages of the inhibition of mutagenicity with t-BHP and H₂O₂ when a concentration of 300 µg of the extract per plate was used were 44.2 and 67.0 %.

We were interested to find out whether the extract itself did not exhibit a mutagenic activity. Using the VinOserae extract (50-300 µg/plate), no mutagenic effect was detected with the strain TA102.

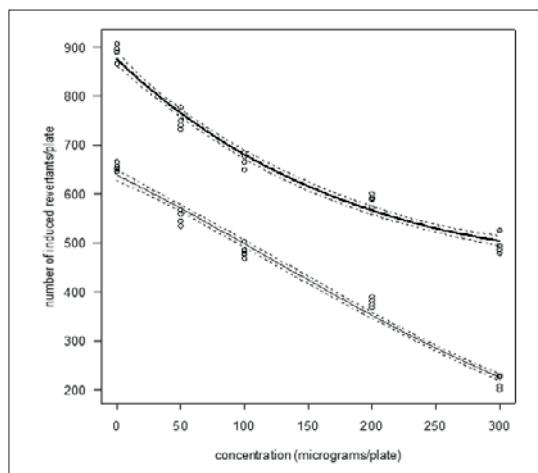


Figure 1. Antimutagenic activity of VinOserae extract in Ames test (without metabolic activation, strain TA102).

Mutations were induced by t-BHP or H₂O₂ (100 µg/plate).

The amount of spontaneous revertants is subtracted.

Line ——: t-BHP; line ——: H₂O₂; line - - -: standard error

The ability of the extract to inhibit oxidative damage of DNA was further investigated using the DNA strand scission assay where the protective effect of the extract was evaluated on the basis of its capability to inhibit formation of strand breaks in the plasmid pBluescript II SK(-) DNA. The principle of detection includes electrophoretic evaluation of changes in the topological state of the plasmid DNA. In its native form the double strand DNA of the plasmid pBluescript II SK(-) is in a compact supercoiled (Sc) conformation and has a relatively high electrophoretic mobility (Fig. 2, lane 1). After a single strand break is introduced in the DNA, the supercoiled tertiary structure is impaired and results in the formation of an open circular (Oc) DNA form with a decreased electrophoretic mobility in the agarose gel. The linear (Lin) DNA form whose formation is induced by double strand breaks has a medium electrophoretic mobility between those of the supercoiled (Sc) and open circular (Oc) forms of plasmid DNA.

Figure 2 shows how the extract affected the formation of DNA strand breaks induced by H₂O₂ in the presence of FeSO₄ (Oc and Lin forms of DNA, lane 3). The sample was tested in a concentration range of 0.02-0.4 µg/µl. When the smallest dose of 0.02 µg/µl was applied, no inhibition of the formation of the open circular (Oc) and linear (Lin) DNA forms was observed (lane 4). The protective effect was observed when a dose of 0.05 µg/µl was used (lane 5). The strongest effect of inhibition of DNA strand breaks formation was found in lanes 7-10 when 0.15-0.4 µg/µl sample was applied. The protective effect measured probably reflected the presence of these compounds in the extract since the ability to inhibit damage of plasmid DNA had been proven for many polyphenolic compounds.

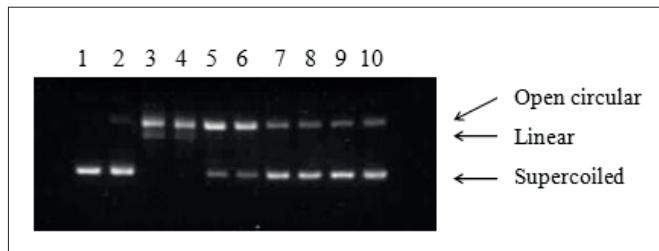


Figure 2. Electrophoretic pattern of pBluescript II SK(-) plasmid where DNA strand breaks were induced by 0.3% H_2O_2 and 0.1 mM FeSO_4 in the presence of VinOserae extract.

Lane 1: control DNA; **lane 2:** H_2O_2 treatment alone; **lane 3:** H_2O_2 and FeSO_4 ; **lanes 4-10:** H_2O_2 and FeSO_4 in the presence of the extract (**4:** 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **5:** 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **6:** 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **7:** 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **8:** 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **9:** 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **10:** 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Figure 3 shows results of quantitative measurement of the protective activity of the VinOserae extract capable to inhibit formation of DNA strand breaks in the plasmid pBluescript II SK(-). In the case of any extract concentration tested, a quantitative measurement of the content of supercoiled (Sc) DNA form was made using software ImageJ. The value obtained for the supercoiled DNA form was related to that of the control. In a concentration range of 0.05-0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ used an increasing rate of the protective activity of the extract was found, expressed by per cent value of the presence of supercoiled (Sc) form of the plasmid pBluescript II SK(-). The experiments showed no potential genotoxicity of the extract when applied to the plasmid pBluescript II SK(-).

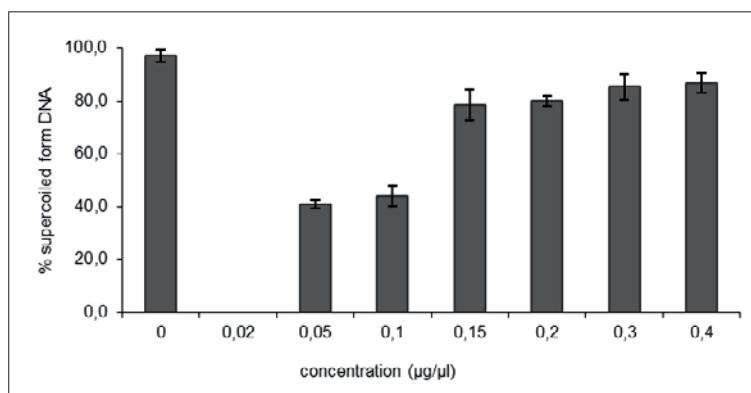


Figure 3. Analysis of supercoiled form of the plasmid pBluescript II SK(-) after oxidative DNA damage in the presence of VinOserae extract (0.02-0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Conclusions:

Using DNA strand scission assay and the Ames test with *Salmonella typhimurium* His⁻, an ability of the extract from *Vitis vinifera* grapes to efficiently inhibit oxidative damage of DNA was documented. No potential genotoxicity of the extract was detected. The results extend the knowledge of beneficial biological effects of compounds isolated from natural raw materials and bring further evidence of the extract to be an interesting source of compounds with protective biological effect and applicability at food industry.

Acknowledgements: The work was supported by the project CZ.1.05/2. 1. 00/03.0100 (IET) financed by the Structural Funds of the Europe Union and project LO1208 of the National Feasibility Programme I of the Czech Republic.

References:

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J., Ram, S.J. (2004) *Biophotonics Int.* 11, 36-42.
- Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E. (1975) *Mutat. Res.* 31, 347-364.
- Boubaker, J., Skandani, I., Bouhlel, I., Ben Sghaier, M., Neffati, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. (2010) *Food Chem. Toxicol.* 48, 2283-2290.
- Cao, W., Chen, W.J., Suo, Z.R., Yao, Y.P. (2008) *Food Res. Int.* 41, 924-929.
- Fernandes, F., Ramalhosa, E., Pires, P., Verdial, J., Valentao, P., Andrade, P., Bento, A., Pereira, J.A. (2013) *Ind. Crops. Prod.* 43, 434-440.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L. (2008) *J. Food Compost. Anal.* 21, 589-598.
- Liang, Z., Owens, C.L., Zhong, G.-Y., Cheng, L. (2011) *Food Chem.* 129, 940-950.
- Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A., Ames, B.N. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7445-7449.
- Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Ames, B.N. (1984) *Methods Enzymol.* 105, 249-254.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000) *Mutat. Res.* 455, 29-60.
- Orhan, N., Aslan, M., Deliorman Orhan, D., Ergun, F., Yesilada, E. (2006) *J. Ethnopharmacol.* 108, 280-286.
- Perestrelo, R., Lu, Y., Santos, S.A.O., Silvestre, A.J.D. et al. (2012) *Food Chem.* 135, 94-104.
- R Development Core Team (2011) *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L., Vanella, A. (2000) *Cell Biol. Toxicol.* 16, 91-98.
- Stagos, D., Kazantzoglou, G., Theofanidou, D., Kakalopoulou, G., Magiatis, P., Mitaku, S., Kouretas, D. (2006) *Mutat. Res.* 609, 165-175.
- Thiruchenduran, M., Vijayan, N.A., Sawaminathan, J.K., Devaraj, S.N. (2011) *Cardiovasc. Pathology* 20, 361-368.
- Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., Li, H.-B. (2010) *Int. J. Mol. Sci.* 11, 622-646.

Personal exposure to PM_{2.5} and benzo[a]pyrene in Ostrava, Czech Republic

V. Svecova¹, I. Solansky¹, T. Cole-Hunter², the CITI-SENSE Consortium³, R. J. Sram¹, A. Bartonova⁴

¹ Institute of Experimental Medicine, CAS, Prague, Czech Republic

² Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain

³ <http://www.citi-sense.eu/Project/Consortium.aspx>

⁴ NILU Norwegian Institute for Air Research, Oslo, Norway

Key words: Air pollution, personal exposure, PM_{2.5}, benzo[a]pyrene, citizen participation

Presenting author email: svecova@biomed.cas.cz

Introduction: Benzo[a]pyrene (B[a]P) is a proven human carcinogen. In the air, it is associated with particulate matter $\leq 2.5 \mu\text{m}$ (PM_{2.5}). High concentrations of both compounds found in the Ostrava region, CZ, have led to concern in the local population. To support the local needs for a communication platform, we started a case study of the CITI-SENSE project „Citizen Observatories for Quality of Life“, with a special study on personal exposure.

Methods: Twenty non-smoking adult volunteers were recruited in the most polluted part of Ostrava to participate in three biomonitoring campaigns. All participants completed a personal questionnaire and time-location-activity diary. High precision personal monitors for PM_{2.5} were used next to the new sensor technology for NO_x assessment. Outdoor concentrations of PM_{2.5} and B[a]P were measured using High Volume Air Sampler.

Results: The campaigns were held in winter 2013, summer 2015 and winter 2016. Average two-day personal exposures to PM_{2.5} were 68.8, 45.3 and 33.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectively. Personal exposures to B[a]P were 5.5, 1.3 and 3 ng/m^3 , respectively. The outdoor concentrations for 2013 and 2015 were 35.4 and 17.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ of PM_{2.5} and 5.3 and 1.2 ng/m^3 for B[a]P in two weeks period during the campaigns. Correlation between outdoor PM_{2.5} and B[a]P in 2013 was significant R=0.8, P<0.001. High correlation was found also between personal B[a]P exposure and PM₁₀ from stationary outdoor monitoring R=0.8, P<0.001.

Conclusions: With use of low-cost sensors, we created a Citizens' Observatory to boost the cooperation between scientists, citizens and other stakeholders, to increase opportunities for environmental health governance. To improve relevance to local population, we combined low-cost online measurements, with high precision instrumentation, and with measurements and information campaigns in schools, all in cooperation with city authorities. Such activities provide context necessary for communicating the results of the biomonitoring study to citizens as well as authorities.

Acknowledgement: This work was supported by the Grant for Research FP7/ENV-2012-308524-2/CITI-SENSE.

Binding characteristics of selected triorganotin compounds - nuclear retinoid X receptors agonists

L. Toporova, D. Macejova, J. Brtko

Institute of Experimental Endocrinology, BMC, Slovak Academy of Sciences, 84505 Bratislava, Slovakia

Presenting author e-mail: *lucia.toporova@savba.sk*

Organisms are continuously exposed to external structures (xenobiotics), specifically environmental pollutants. The excessive usage of these compounds by industrial processes have resulted in their incorporation into the environment. Consequent exposure to organisms causes numerous toxic effects: endocrine-disruptive, immunosuppressive, metabolic, reproductive or developmental disorders. Majority of these chemicals belong to the structurally heterogeneous group of chemicals that trigger adverse health effects by mimicking or antagonizing the action of endogenous signalling molecules (Schug, et al., 2011). Plenty of experimental and epidemiological studies have underlined an important role of nuclear receptors in transducing of the noxious effects of these chemicals (Swedenborg, et al., 2009). Nuclear receptors belong to a superfamily of evolutionally related transcription factors regulating complex gene networks that are involved in signalling pathways governing vital processes such as cell differentiation, growth, reproduction, or death. According to nuclear receptor's canonical structure, they contain a ligand-binding domain (LBD) that responds to a wide variety of endogenous hormonal and metabolic ligands. Thus, retinoic acid (RA) is the natural ligand that can modulate gene expression through binding to two families of nuclear receptors, retinoic acid receptors (RAR) and retinoid X receptors (RXR). While RARs are activated by all-trans retinoic acid (ATRA) and 9-cis retinoic acid (9cRA), RXRs are activated only by 9cRA (Brtko and Thalhamer, 2003). Moreover, RXRs serve also as heterodimeric partners for a wide range of other nuclear receptors such as vitamin D receptor, thyroid hormone receptors, peroxisome proliferator-activated receptors, liver X receptors, pregnan X receptor, farnesoid X receptor or constitutive androstan receptor. This versatility could contribute to cross-talk among various hormone receptor networks (Evans and Mangelsdorf, 2014).

As we have previously reported, the endocrine-disrupting action of several chemicals relies on their ability to substitute natural nuclear receptor ligands, and thus deregulate nuclear receptor signalling (Brtko and Dvorak, 2011; Brtko and Dvorak, 2015). Triorganotins, organic compounds widely produced in industry as antifouling agents in paints, repellents against insect and rodents, as well as agricultural fungicides, are considered to be high-affinity ligands for nuclear retinoid X receptors acting predominantly in agonistic manner. Trialkyltins and triaryltins, specifically tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) are capable to bind to the ligand-binding domain of RXR subtypes and function as transcriptional activators.

In our laboratory, we have established the radioligand binding assay for accurate determination of nuclear retinoid X receptors, taking experience from our previously established radioligand binding assay for all-trans retinoic acid receptors (Brtko, 1994). We demonstrated one type of high affinity and limited capacity RXR specific binding sites with the K_a value ranging from 1.011 to 1.727×10^9 l/mol and the B_{max} value ranging from 0.346 to 0.567 pmol/mg. These data based on radioligand binding assay has clearly confirmed the property of TBT-Cl, TPT-Cl and several other TBTs or TPTs to bind to a high affinity and limited capacity RXR binding sites. Obtained data enabled us to calculate maximal binding capacity (B_{max}) and affinity (K_a) values for these compounds. This study provides an original RXR radioligand binding assay that can be employed for investigation of novel RXR ligands that might play a role as nuclear retinoid X signalling disrupting chemicals.

Acknowledgements: This work was supported by APVV-0160-11 and VEGA 2/0171/14 grants.

References:

- Brtko, J., (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., 204: 439-445.
Brtko, J., Thalhamer, J. (2003) Curr. Pharm. Design 9, 2067-2077.
Brtko, J., Dvorak, Z. (2011) Curr. Drug Metab. 12, 71-88.

- Brtko, J., Dvorak, Z. (2015) Toxicol. Lett. 234, 50-58.
Evans, R. M., Mangelsdorf, D.J., (2014) Cell 157, 255-266.
Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., Heindel, J. J. (2011) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 127, 204-215.
Swedenborg, E., Ruegg, J., Makela, S., Pongratz, I., (2009) J. Mol. Endocrinol. 43, 1-10

Odborná garance konference:

RNDr. Pavel Rössner, PhD. (Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i., Praha), místopředseda Společnosti
RNDr. Alena Gábelová, CSc. (Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava), předsedkyně Společnosti
Ing. Jan Topinka, DrSc. (Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i., Praha)
RNDr. Miroslav Machala, CSc. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno)
MUDr. Hana Lehocká, Ph.D. (Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě)

Organizační zajištění konference:

Bezpečnostně technologický klastr, z. s., Mgr. Simona Guzdková (e-mail: simona.guzdkova@btklastr.cz)

Genetická toxikologie a prevence rakoviny

Kolektiv autorů

Vydavatel: Anna Vavrušová - Alisa Group

Grafika a předtisková příprava: Mgr. Jiří Kučatý

Vyšlo: květen 2016

Vydání: první

Počet stran: 80

Výtiskl: Anna Vavrušová - Alisa Group

Tato publikace neprošla redakční ani jazykovou úpravou.

Titulní foto: Scotch Mist (Vlastní dílo) [CC BY-SA 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)], prostřednictvím Wikimedia Commons

© 2016

ISBN: 978-80-88038-04-7



BEZPEČNOSTNĚ
TECHNOLOGICKÝ
KLASTR

Bezpečnostně technologický klastr, z. s.
Pikartská 1337/7, 716 00 Ostrava - Radvanice
Mobil: 734 232 532, e-mail: info@btklastr.cz
www.btklastr.cz

MOBILNÍ MĚŘICÍ LABORATOŘ (MĚŘICÍ VŮZ)

NABÍZÍ AKREDITOVANÉ MĚŘENÍ IMISNÍCH KONCENTRACÍ V ROZSAHU:

- kontinuální měření koncentrací částic frakcí PM_{10} , PM_4 , $PM_{2,5}$ a PM_1
- nízkoobjemové sekvenční odběry a stanovení koncentrací částic frakcí PM_{10} a $PM_{2,5}$
- vysokoobjemové odběry a stanovení koncentrací částic frakcí PM_{10} a $PM_{2,5}$
- kontinuální měření koncentrací oxidů dusíku (NO_x , NO a NO_2)
- kontinuální měření koncentrací ozónu (O_3)
- kontinuální měření koncentrací oxidu siřičitého (SO_2)
- kontinuální měření koncentrací oxidu uhelnatého (CO)

DALŠÍ ČINNOSTI V OBLASTI MĚŘENÍ IMISNÍCH KONCENTRACÍ:

- kontinuální stanovení koncentrací BTX (benzen, toluen a xylyny)
- stanovení imisních koncentrací persistentních organických látek (PCDD/F, PAH a PCB) rozborem z filtrů
- stanovení imisních koncentrací těžkých kovů (As, Hg, Cd, Tl, Pb apod.) rozborem z filtrů
- stanovení prekurzorů vzniku ozónu do speciálních odběrových kanystrů

MĚŘENÍ METEOROLOGICKÝCH A DOPROVODNÝCH VELIČIN:

- stanovení intenzity slunečního záření
- stanovení směru a rychlosti větru
- stanovení množství srážek
- stanovení teploty a barometrického tlaku
- stanovení intenzity dopravy pomocí čítače dopravy
- speciální odběry průmyslových emisí odběrovou aparaturou pro odběr mikročástic (emise PM_{10} a $PM_{2,5}$)



