

NOVÉ POZNATKY O VLIVU ZNEČIŠTĚNÉHO OVZDUŠÍ NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI

Radim J. Šrám

Ústav experimentální medicíny AV ČR
Praha



MŽP ČR, Plzeň, 20. 11. 2013

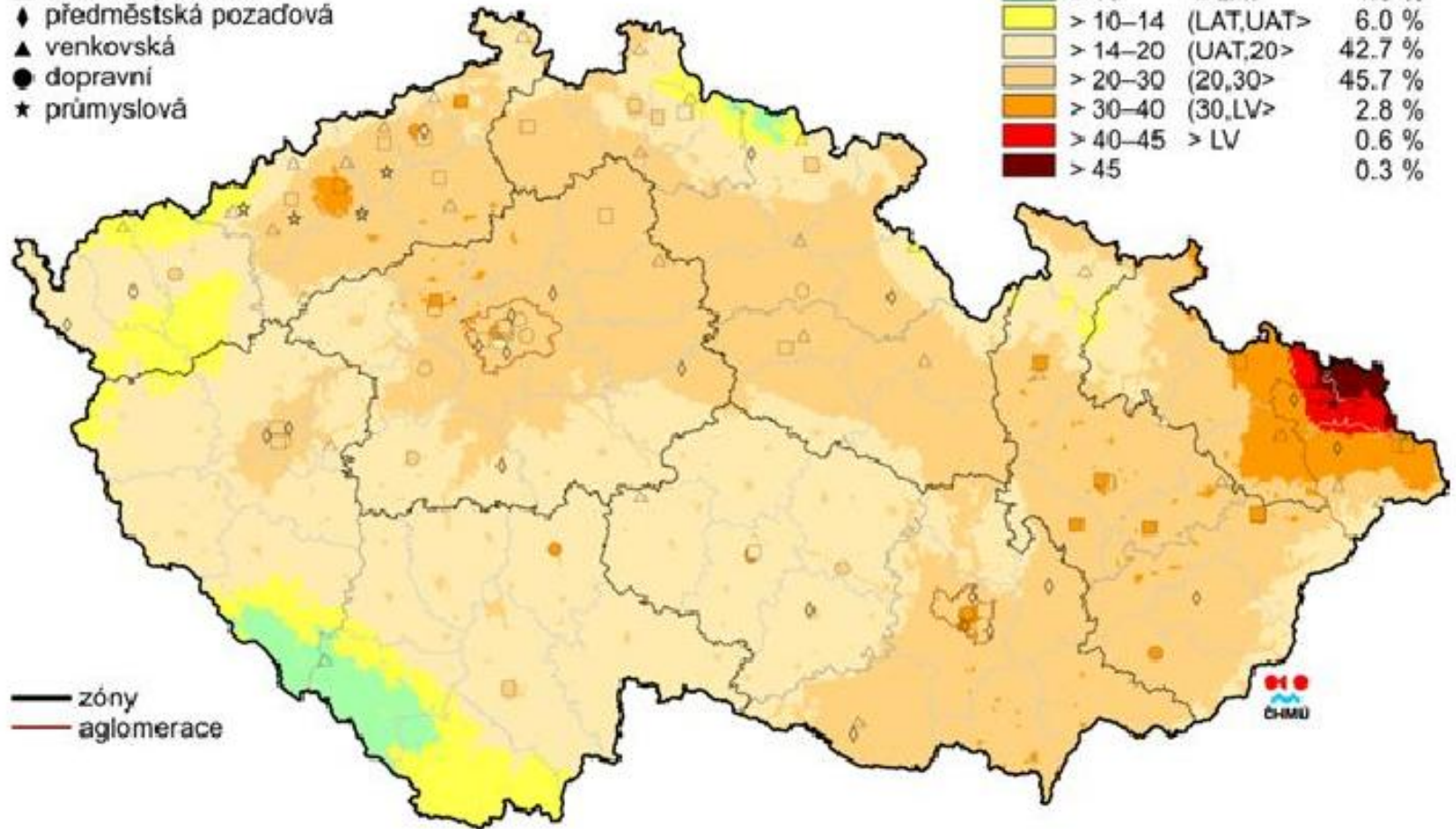
PM10 2012

klasifikace stanic

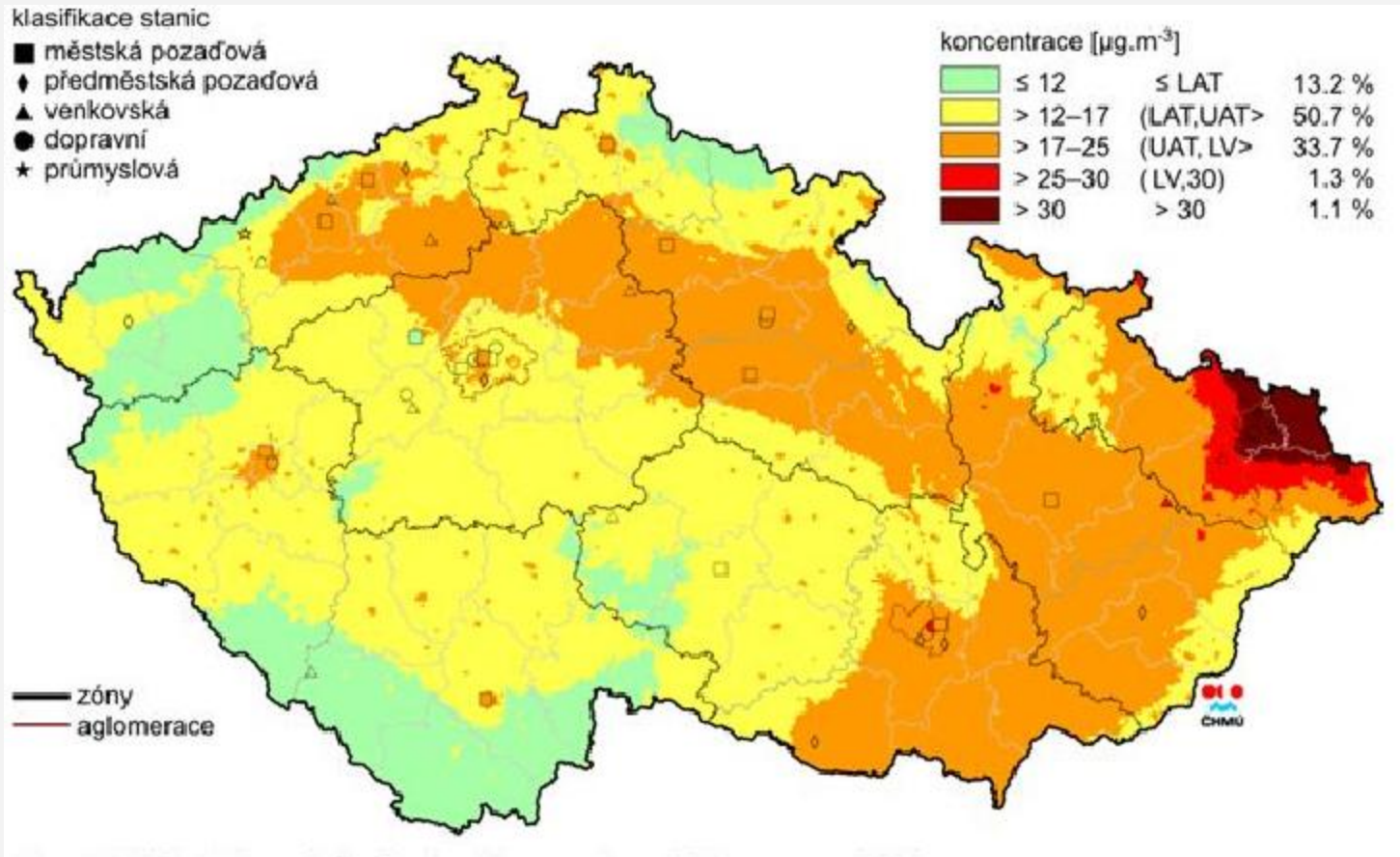
- městská pozadová
- ◆ předměstská pozadová
- ▲ venkovská
- dopravní
- ★ průmyslová

koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$]

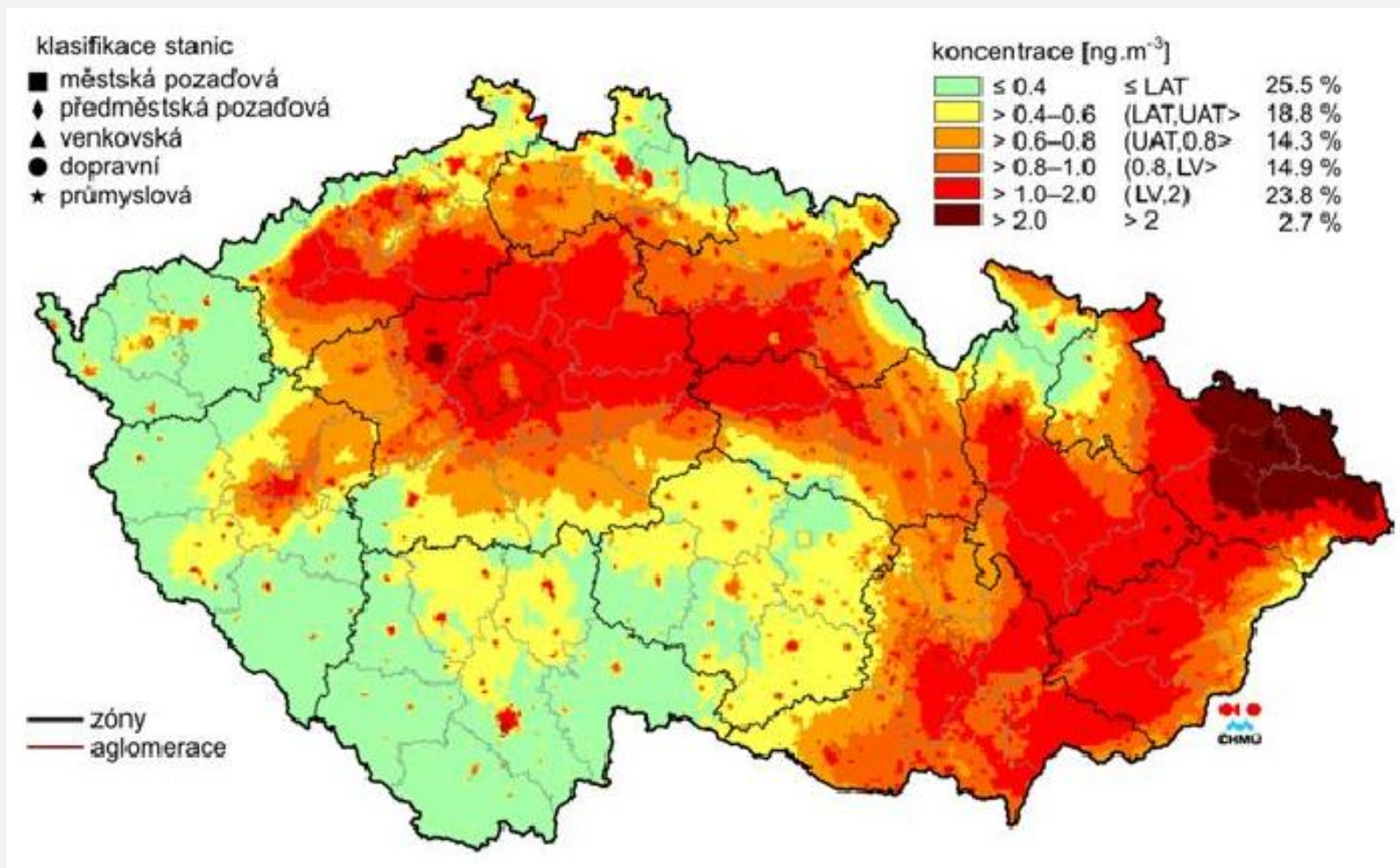
≤ 10	≤ LAT	1.9 %
> 10–14	(LAT,UAT>	6.0 %
> 14–20	(UAT,20>	42.7 %
> 20–30	(20,30>	45.7 %
> 30–40	(30,LV>	2.8 %
> 40–45	> LV	0.6 %
> 45		0.3 %



PM2.5 2012



B[a]P 2012

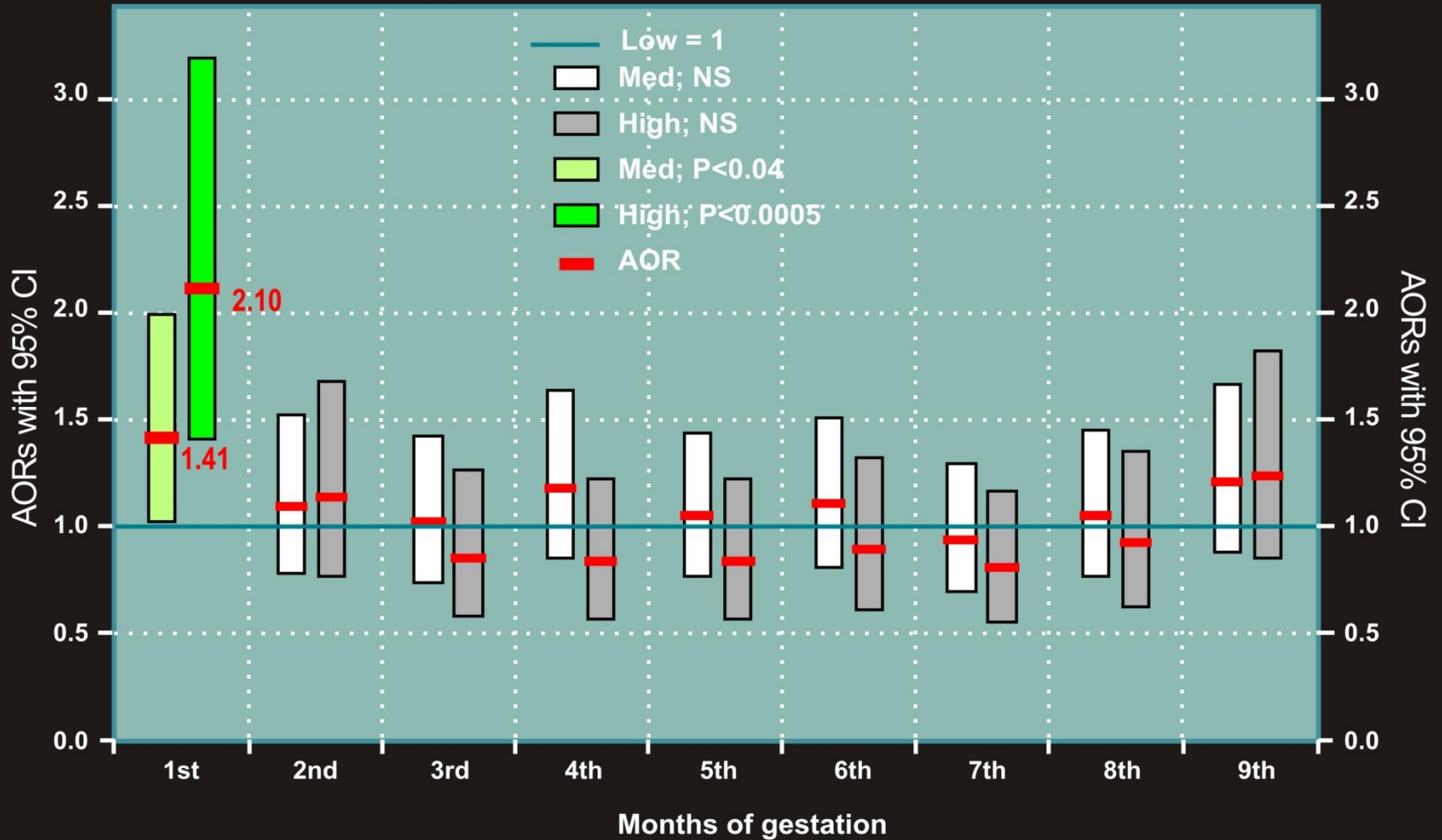




VLIV ZNEČIŠTĚNÉHO OVZDUŠÍ NA VÝSLEDKY V TĚHOTENSTVÍ



IUGR by PM10 during 1994 - 1998 in TEPLICE



AIR PARTICLES (< 10 μm)

(Filtres from HiVol Samplers - Winter, Summer)

→ **DNA binding activities**

in vitro acellular assay

³²P - postlabeling and HPLC analysis of DNA adducts

Binkova et al. 1999

CONTRIBUTION OF THE MAJOR PAH-DNA ADDUCTS TO THE TOTAL DNA ADDUCTS LEVEL FROM URBAN SAMPLES

(Binkova et al. 1999)

PAH-DNA adducts
derived from



9-OH-B[a]P

anti - BPDE

B[b]F

B[k]F

B[j]F

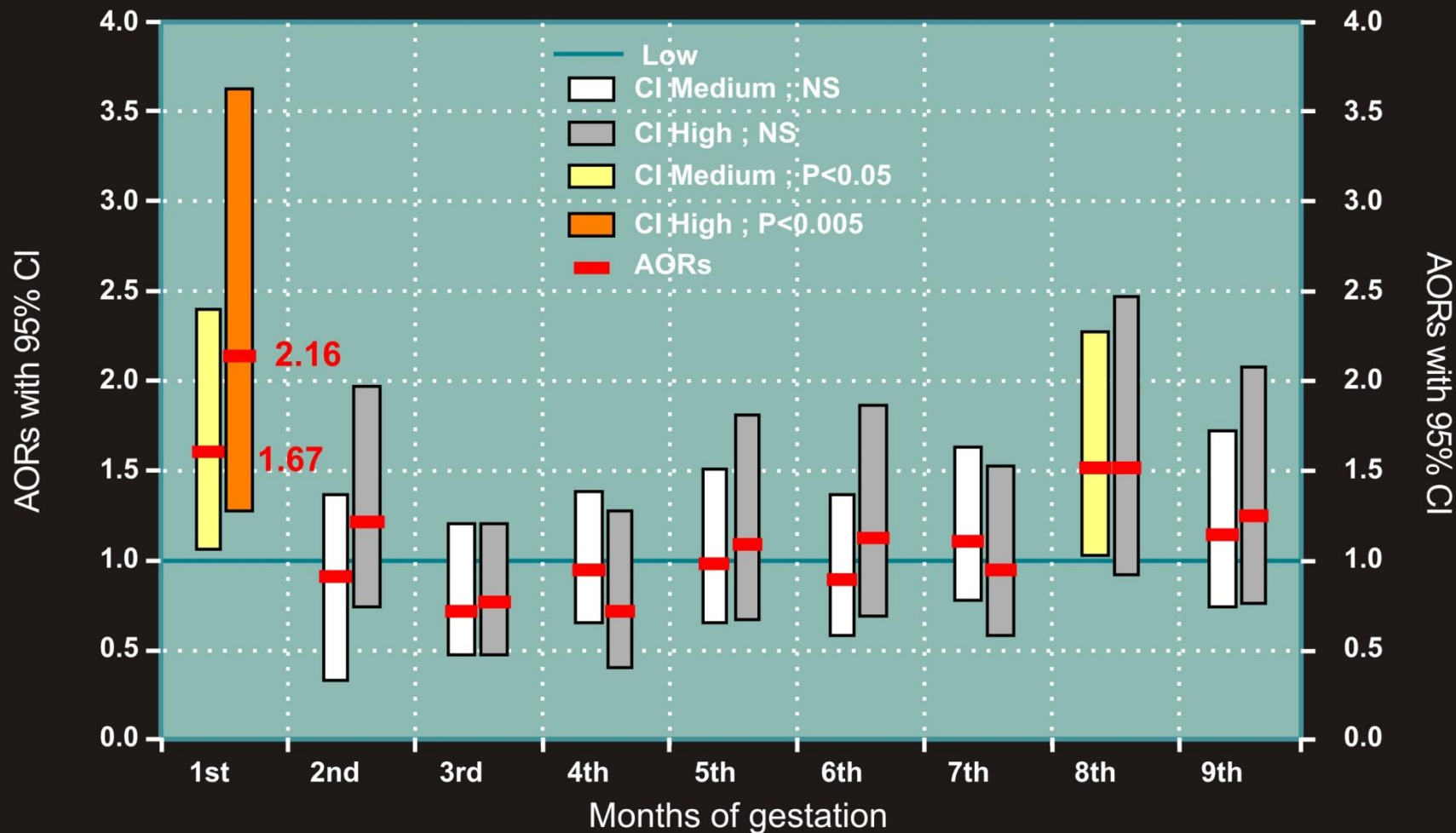
CHRY

B[a]A

I[c,d]P

Total radioactivity from all DNA adducts
detected approx. **50 %**

CARCINOGENIC PAHs & IUGR IN TEPLICE



PREGNANCY OUTCOME - RISK OF c-PAHs

AMBIENT EXPOSURE
to 15 ng c-PAHs/m³/month
(2.8 ng B[a]P/m³)



INDOOR EXPOSURE (50-60%)
approximately to 9 ng c-PAHs/m³/month
(1.7 ng B[a]P/m³)

DŮSLEDKY IUGR

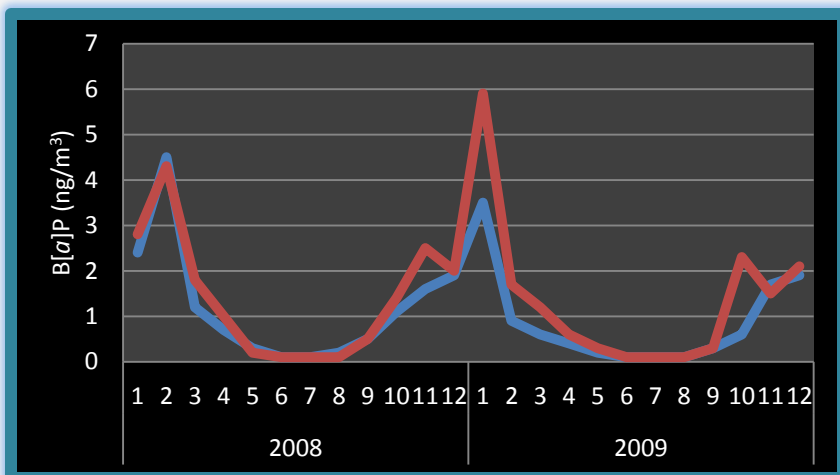
- **Dětská úmrtnost**
- **Dětská nemocnost**
- **Zpoždění vývoje**
- **Cukrovka**
- **Hypertenze**
- **Ischemická choroba srdeční**

A large teal graphic consisting of two curved arrows forming a circle, one pointing clockwise and the other counter-clockwise, framing the central text.

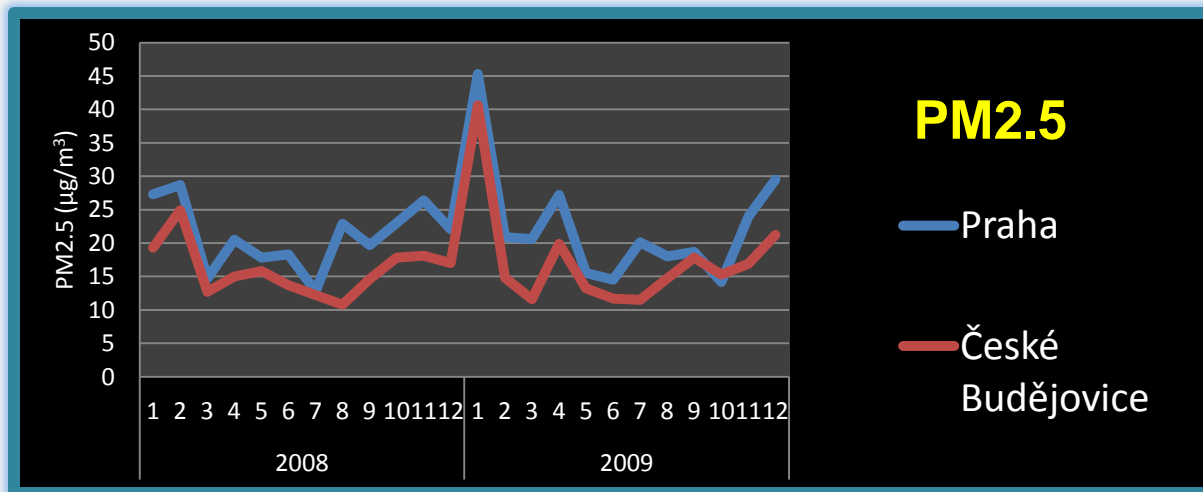
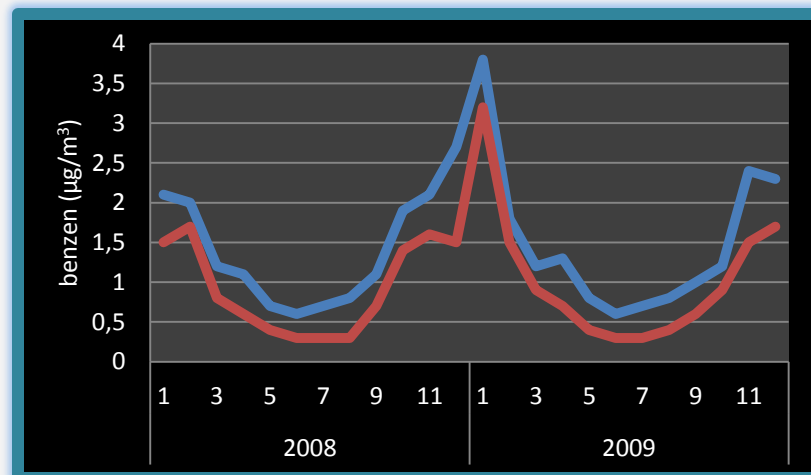
**VLIV B[a]P
NA EXPRESI GENŮ
V TĚHOTENSTVÍ**

Vývoj koncentrací polutantů (měsíce)

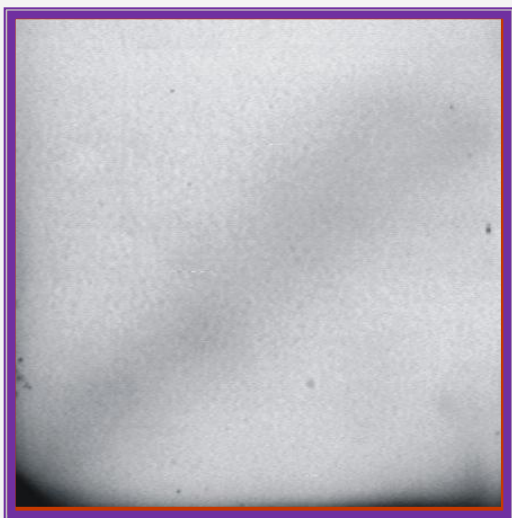
B[a]P



benzen



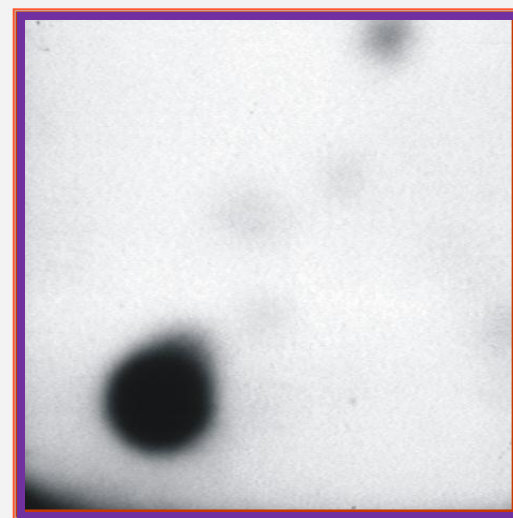
Autoradiographs of thin layer chromatograms with DNA adduct pattern of:



**DNA isolated from lymphocytes
of subject sampled
in January 2004
(1st sampling period)**



Water blank



**Positive control
(DNA isolated from the lung of rats
intraperitoneally treated
with 100 mgB[a]P/kg b.w.)**

Výsledky stanovení DNA aduktů v žilní a pupečnickové krvi a v placentě

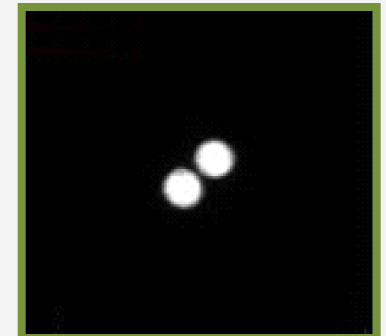
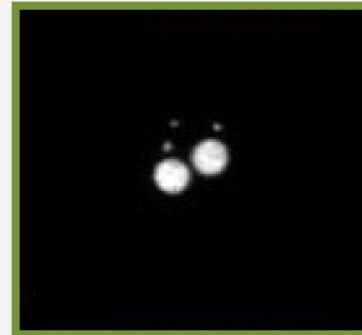
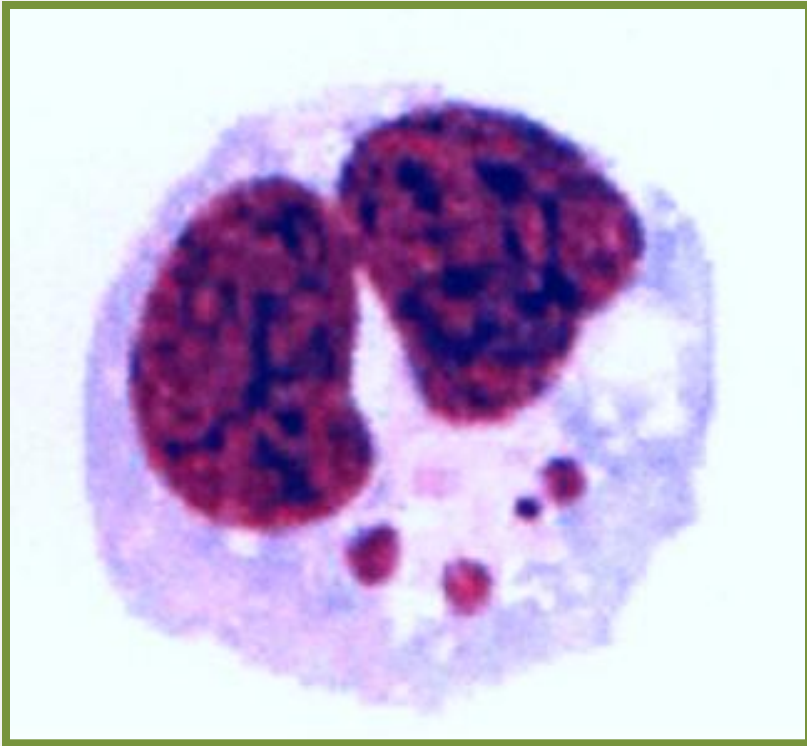
(Porovnání - Praha a České Budějovice)

Adukty/10 ⁸ nukl.	N	Žilní krev matky		Pupečnicková krev		Placenta	
		Průměr ± S.D.		Průměr ± S.D.		Průměr ± S.D.	
		B[a]P-like	Celkové	B[a]P-like	Celkové	B[a]P-like	Celkové
Praha	80	0.24±0.18	1.23±1.09	0.23±0.18	0.98±0.89	0.24±0.18	1.15±1.06
Čes. Budějovice	76	0.44*±0.39	1.59*±1.46	0.41*±0.41	1.40*±1.31	0.54*±0.48	1.94* #±1.46

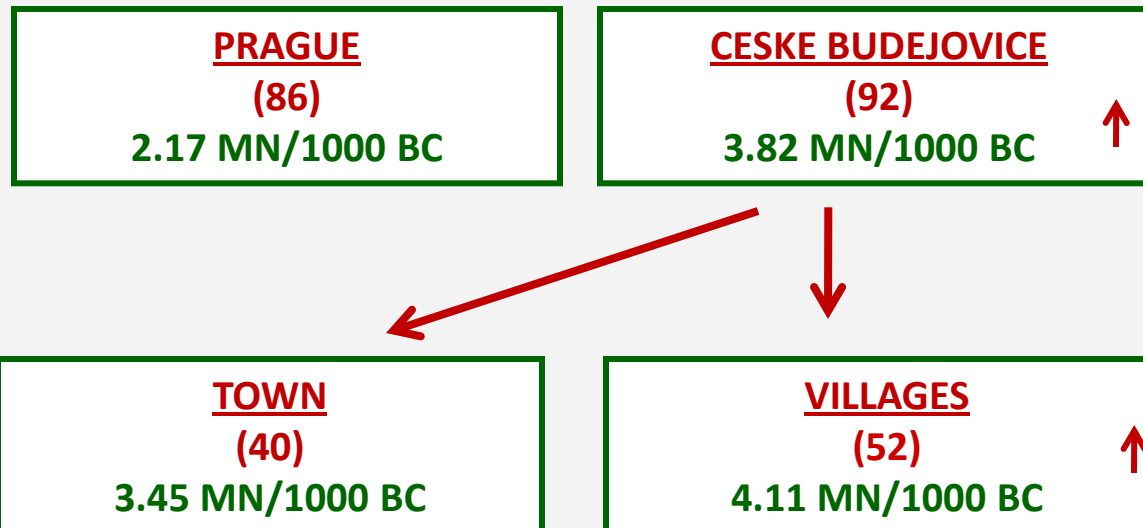
*p<0.001 – významně vyšší hladiny celkových i tzv. B[a]P specifických DNA aduktů ve všech tkáních byly nalezeny u matek a dětí z Českých Budějovic

#p<0.001 – významně vyšší hladiny DNA aduktů v placentě než v žilní a pupečnickové krvi u matek a dětí z Českých Budějovic

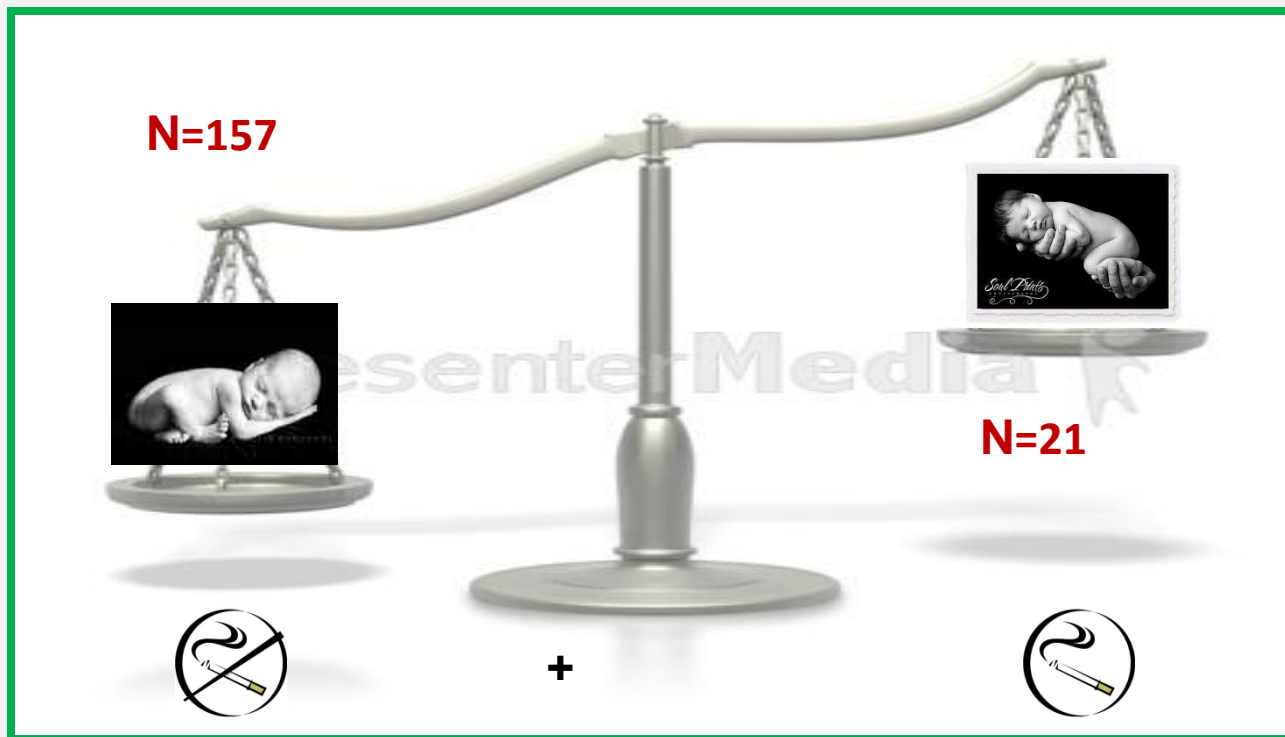
MICRONUCLEI



MICRONUCLEI IN NEWBORNS



Vliv kouření matek na novorozence



↓ 2,95 MN/1000DB
↑ 3 465 g

$p < 0.05$
 $p < 0.05$

3,52 MN/1000 DB ↑
3 208 g ↓

Děti kuřaček (hladina kotininu v krevní plasmě > 3 ng/ml) měly signifikantně zvýšenou frekvenci mikrojadér a nižší porodní váhu o 257 g (7,4 %).

Multivariátní analýza – vliv na MN

	OR (95% CI)	p
Matky		
Benzen	2.11 (1.14 – 3.91)	<0.05
Věk	1.80 (0.95 – 3.39)	=0.07
Vzdělání	0.59 (0.29 – 1.21)	=0.15
Kotinin	1.02 (0.39 – 2.72)	=0.96
Novorozenci		
B[a]P	3.07 (1.63 – 5.77)	<0.001
Věk	0.78 (0.41 – 1.50)	=0.45
Vzdělání	1.06 (0.52 – 2.18)	=0.87
Kotinin	3.14 (0.96 – 10.31)	=0.06



Frekvence MN u matek byla ovlivněna především hladinou benzenu a věkem (18-49 let), u novorozenců se projevil vliv B[a]P a kouření matek

Microarray analýza genové exprese - metodika

Odběr vzorků

- stabilizace expresního profilu (RNAlater, PAX system, LeukoLOCK)

Izolace RNA a ověření kvality (Agilent Bioanalyzer)

Gene expression profiling

- přepis RNA do cRNA (Ambion)
- hybridizace na HumanRef-8 Expression BeadArrays
- skenování (Illumina ArrayReader)

Statistická analýza dat

- (Illumina BeadStudio Software, R program)



HumanRef-8 and HumanWG-6

Změny v transkriptomu těhotných žen v Praze vs. Českých Budějovicích

Soubor: 35 nekuřáček z Prahy vs. 52 nekuřáček z Č. Budějovic
- periferní krev (PB), placenta (PL), pupečnicková krev (UCB)

- ③ Množství polycyklických aromatických uhlovodíků v ovzduší v Praze se začíná významně snižovat
- ③ Zvýšená hladina DNA aduktů ve všech typech tkání matek z Č. Budějovic v porovnání s Prahou
- ③ Vyšší hladina peroxidovaných lipidů u vzorků z Prahy



Cíl: srovnání expresních profilů vzorků PB, PL a UCB získaných od těhotných žen z obou lokalit vzhledem k odlišnému působení genotoxických látek v těchto lokalitách

DEREGULATION OF GENES

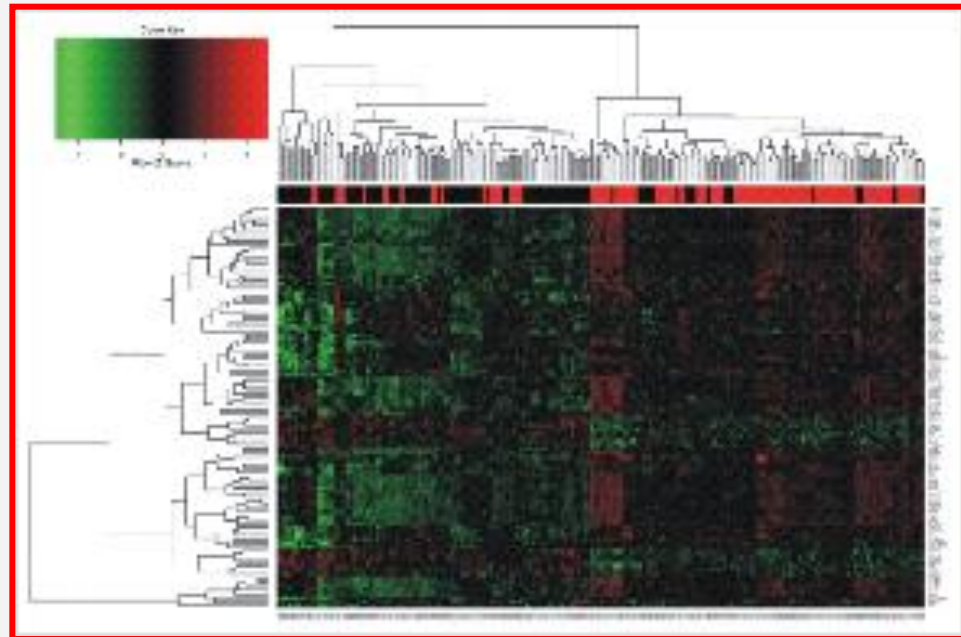
Peripheral blood

Change: **418** genes

255 **↑**

CB

163 **↓**



Increased expression in CB:

Genes related to metabolism of xenobiotics

Immune response, autoimmune diseases

DEREGULATION OF GENES

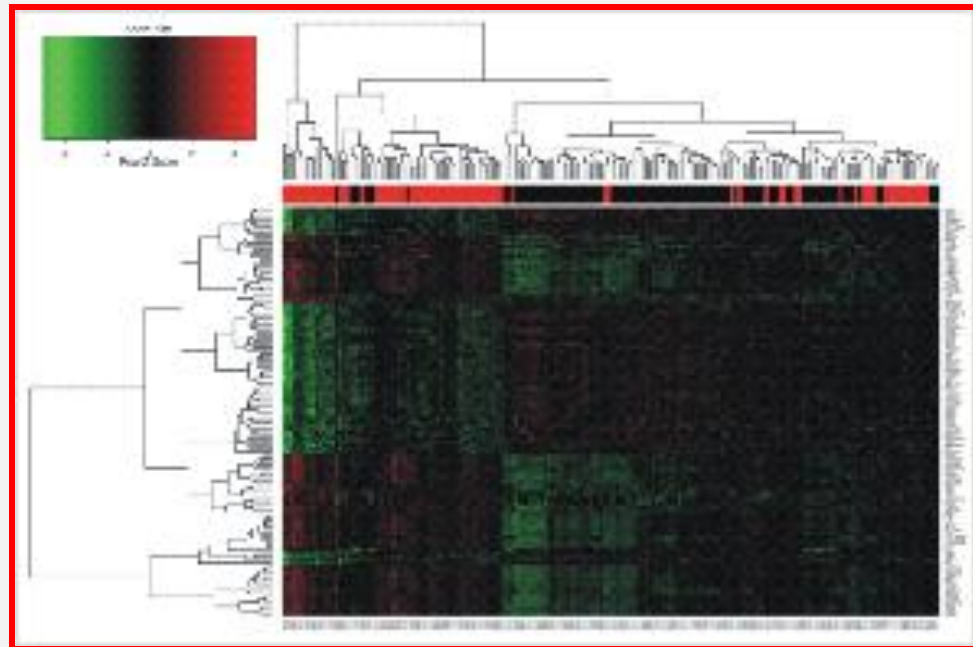
Placenta

Change: **1170** genes

669 **↑**

CB

501 **↓**



Increased expression in CB:
genes related to metabolism of xenobiotics,
oxidative stress, inflammation,
vascular system

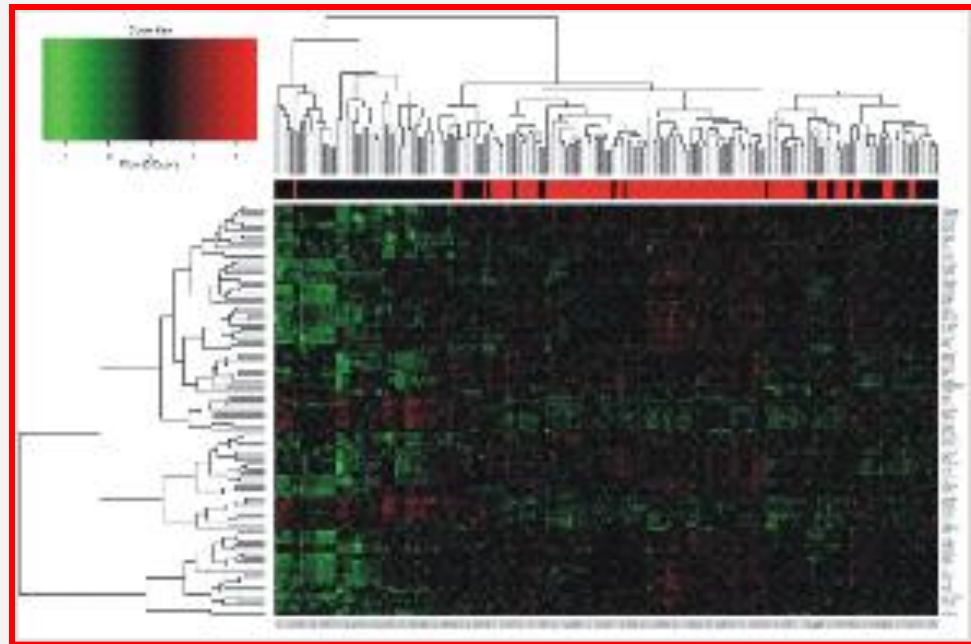
Decreased expression in CB
genes regulated placenta
function

DEREGULATION OF GENES

Cord blood

Change: **104** genes

37 **↑**
67 **↓** CB



Increased expression in CB:
genes related to metabolism
of xenobiotics

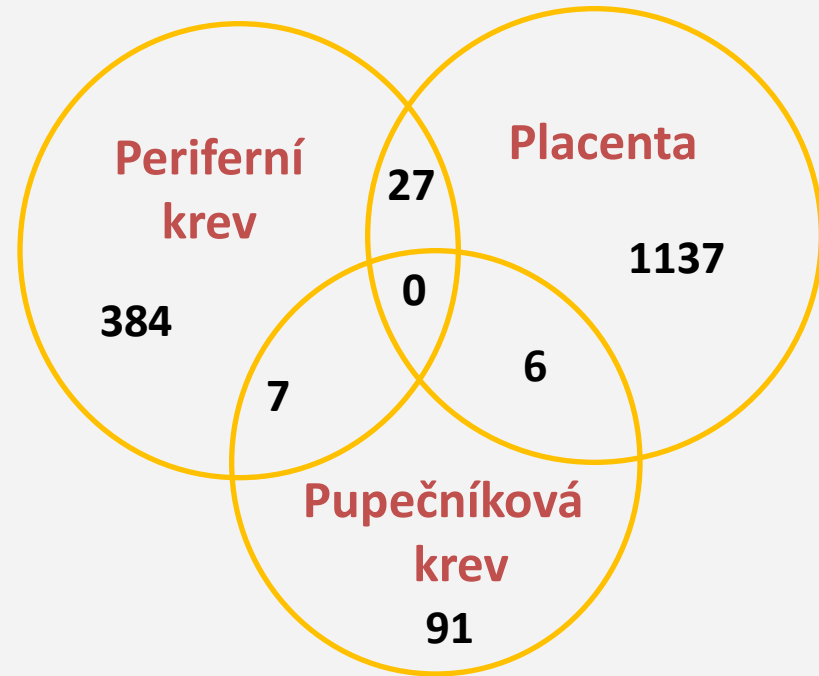
Decreased expression in CB
genes related to immune response
and autoimmune diseases

ZÁVĚRY

1. Detekce zvýšené exprese genů spojených s působením genotoxických látek ve všech tkáních z ČB je v souladu s vyšší expozicí genotoxickým látkám naměřenou v této lokalitě.

vysoká míra tkáňové specifity (zejména u pupečnickové krve)

opačný trend deregulace některých buněčných drah mezi vzorky periferní a pupečnickové krve (specifické imunitní procesy a s nimi asociované autoimunitní choroby aktivované u periferní a naopak suprimované u pupečnickové krve z ČB)



2. Vysoký počet genů detekovaný u PL a naopak nízký u UCB, malý překryv deregulovaných genů mezi UCB a ostatními tkáněmi a opačná regulace imunitních procesů jsou známky, které poukazují alespoň na částečnou detoxifikační funkci placenty.

EFFECT OF SMOKING ON FETUS

Gene deregulation

Ion transport
Neuronal system
Immunity
Graft vs. Host disease
Asthma pathway



Deregulation of genes affecting the development of brain

ETS exposure and active smoking in pregnancy partly employ the same molecular mechanism

Znečištěné ovzduší ovlivňuje metylaci DNA u dětí

Mutation Research xxx (2013) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect
Mutation Research/Fundamental and Molecular
Mechanisms of Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molmut
Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Factors affecting the 27K DNA methylation pattern in asthmatic and healthy children from locations with various environments

Andrea Rossnerova^a, Elena Tulupova^{a,b}, Nana Tabashidze^a, Jana Schmuczerova^a, Miroslav Dostal^a, Pavel Rossner Jr^a, Hans Gmuender^c, Radim J. Sram^{a,*}

Studované skupiny

Celkem 200 dětí (7–15 let):

- 100 - Ostrava Bartovice a Radvanice
- 100 - Prachaticko
- odběr krve - březen 2010

Znečištění B(a)P - 3/2010

- stacionární monitoring:



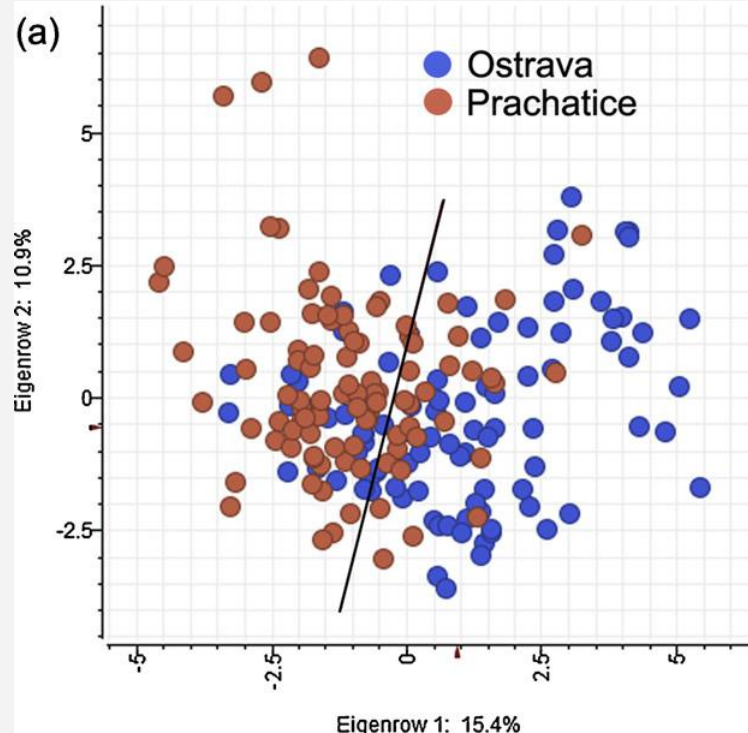
10.1 ng/m³



1.8 ng/m³

Výsledky

- Analýza 27 578 metylovaných míst ve více než 14 000 genech
- 9 916 míst bylo rozdílně metylovaných

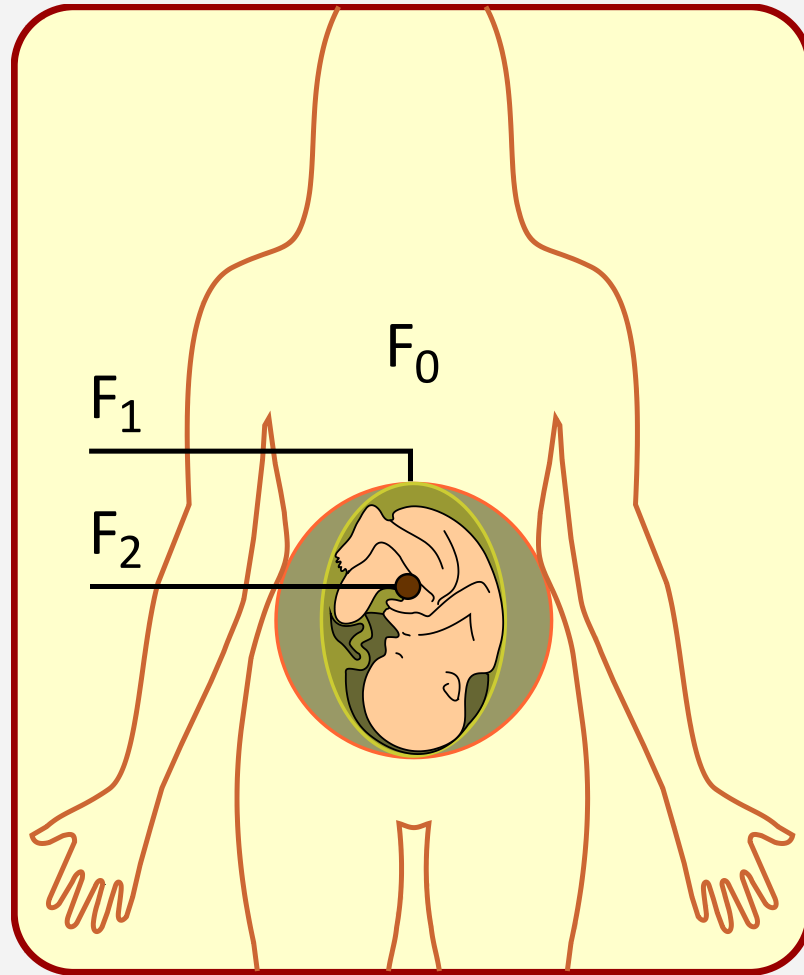


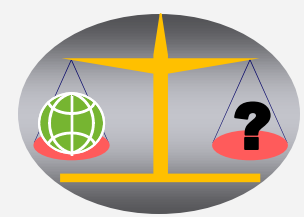


**GAMETICKÉ
MUTACE**

Uncertain Inheritance

Transgenerational Effects *of* Environmental Exposures





MUTAGEN

AGENS

chemického, fyzikálního, nebo biologického původu
indukující

GENETICKÉ MUTACE



**Trvalá, přenosná
změna v genetické informaci buňky.**

Mutace somatická

v somatických buňkách
exponovaného jedince

teratogenní proces – intrauterinní poškození,
nepřenosné na další generace

proces – post partem poškození, vznik
malignity u dospělého karcinogenní

stárnutí buněk, tkání a orgánů – post partem
poškození, degenerativní procesy, snížená
kvalita života dospělého ???

MUTAGEN

Mutace gametická

v zárodečných buňkách rodičů –
geneticky podmíněná poškození

sterilita

spontánní aborty

vrozené vady

malformace

metabolické

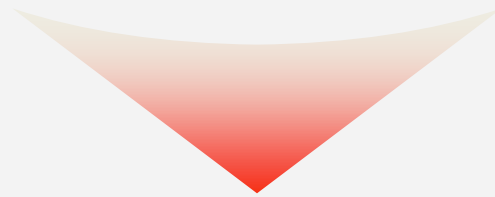
chybná reparace

dispozice ke vzniku nádorů

POŠKOZENÍ GENOMU



POČÁTEK NEMOCI



NUTNOST PREVENCE !

ZNEČIŠTĚNÍ OVZDUŠÍ 2012

(ČHMÚ)

Lokalita	PM10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	PM2.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	B[a]P ng/m^3
Ostrava-Poruba	35.1 \pm 31.2	27.3 \pm 27.6	3.3 \pm 5.0
Ostrava-Radvanice	49.5 \pm 40.3	39.4 \pm 31.2	10.8 \pm 13.7
Karviná	45.8 \pm 44.7	X	8.2 \pm 11.1
Havířov	44.3 \pm 43.7	X	X
Praha-Smíchov	30.2 \pm 15.6	14.8 \pm 8.8	X
Praha-Libuš	27.8 \pm 14.5	17.3 \pm 12.6	1.1 \pm 1.5
České Budějovice	22.8 \pm 16.0	18.6 \pm 13.7	1.7 \pm 2.0

x - neměřeno



Image © 2008 GEODIS Brno

© 2008 Tele Atlas

výš. 226 m

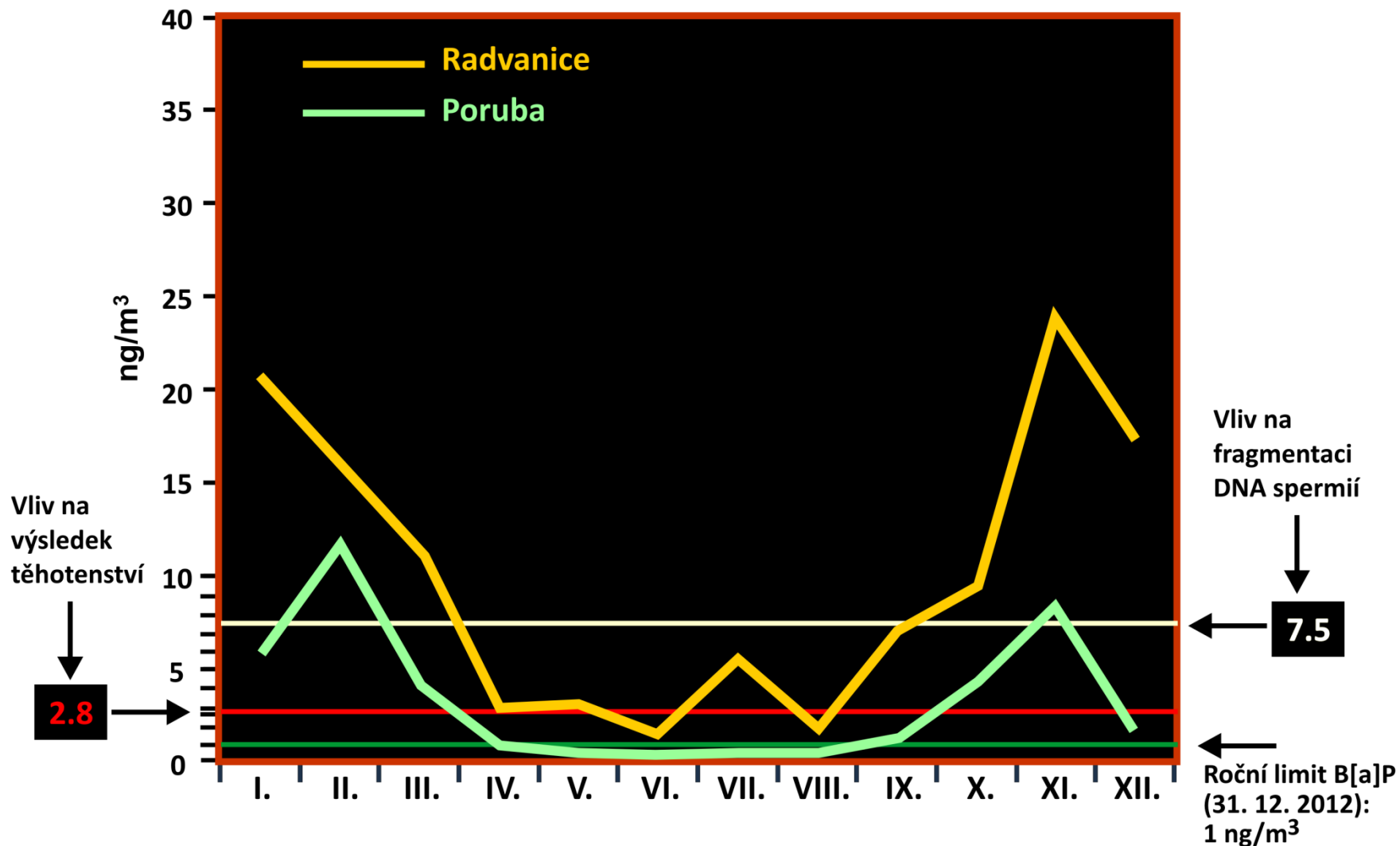
2004

©2008 Google™

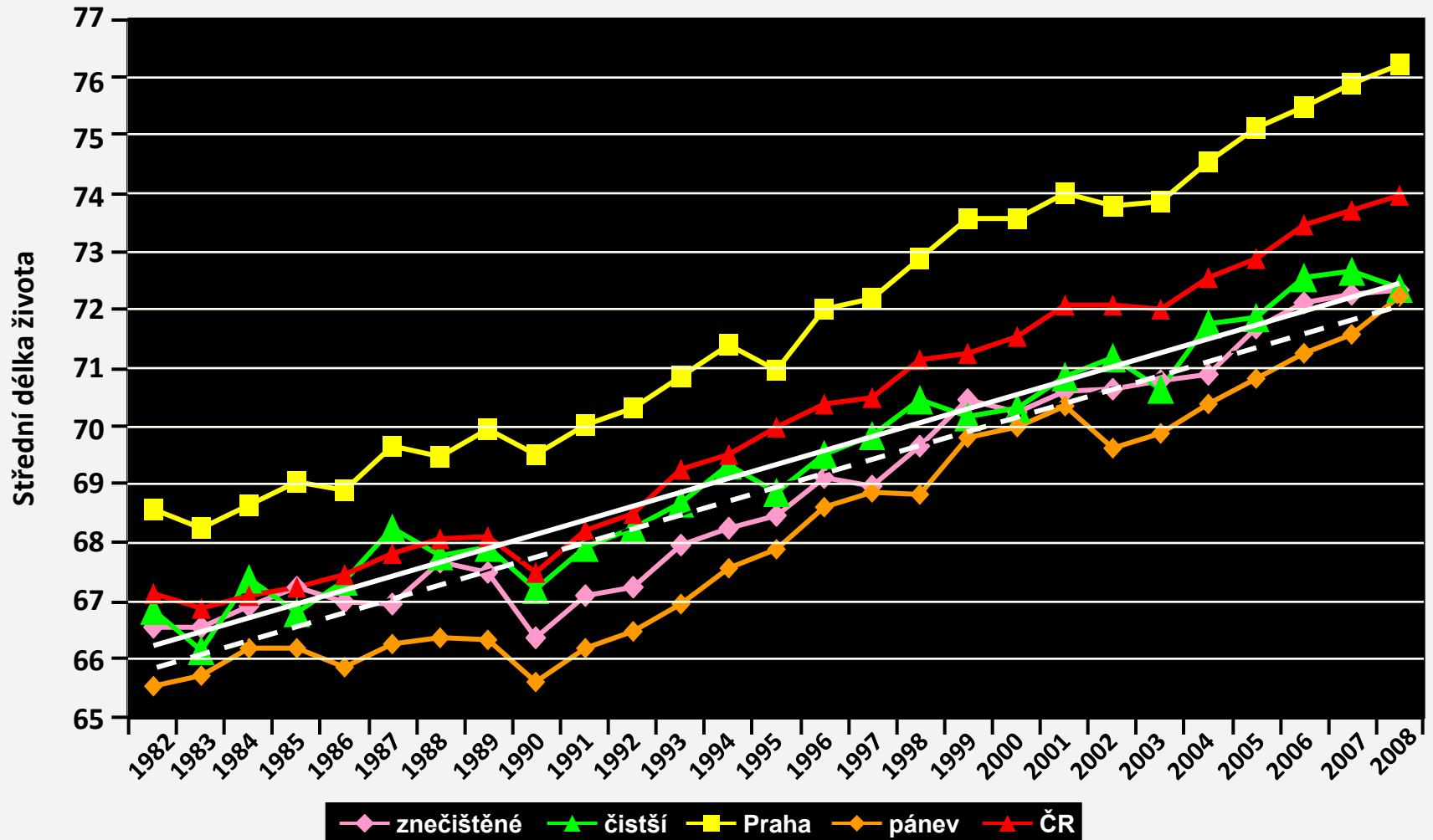
Výška pohledu 4.41 km

49°47'47.02" S 18°19'39.57" V

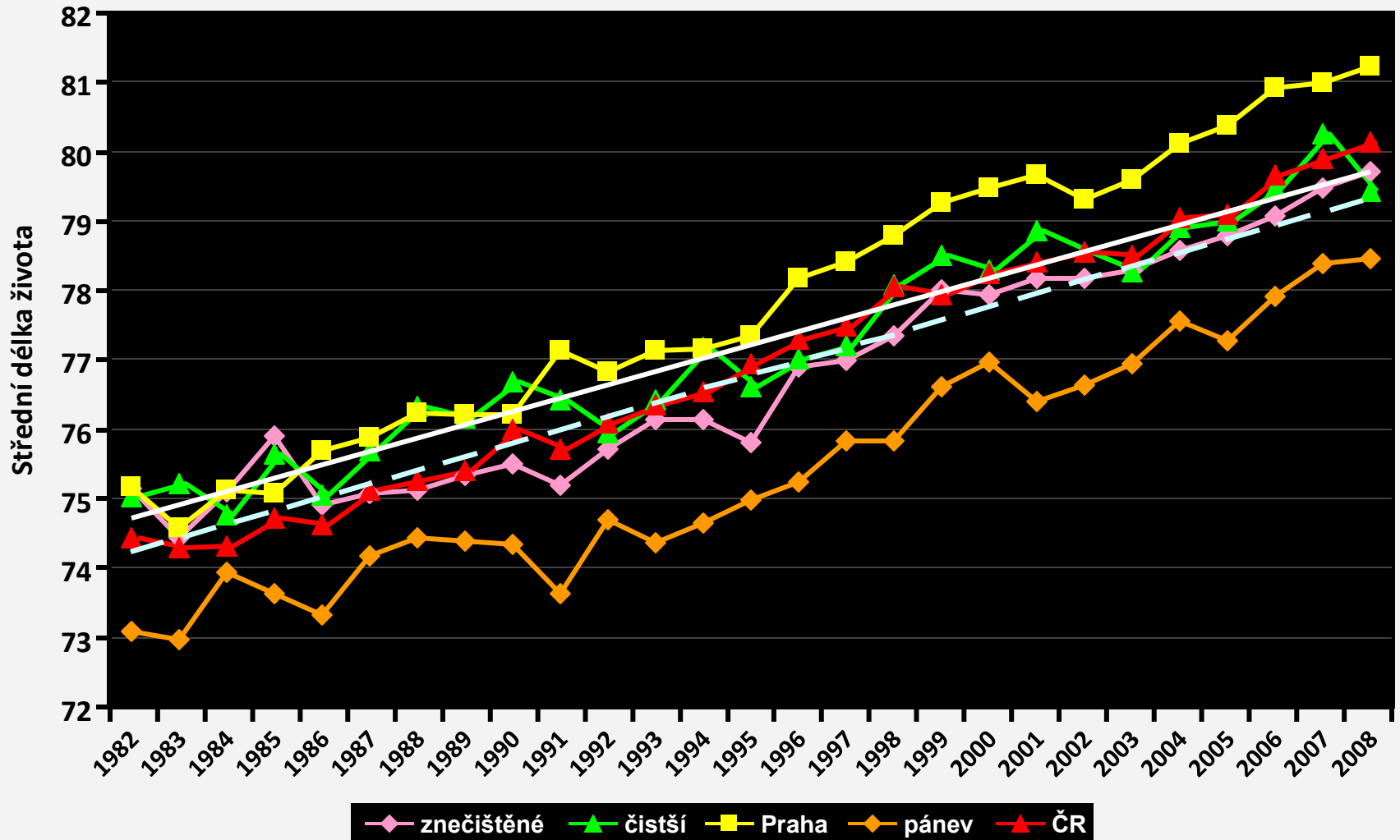
MĚSÍČNÍ KONCENTRACE BENZO[A]PYRENU (2011)



Střední délka života ve zneč. a čistší oblasti MSK, v Praze, v pánvi ÚK a ČR – muži



Střední délka života při narození ve zneč. a čistší oblasti MSK, v Praze, pánvi ÚK a ČR – ženy



STŘEDNÍ DÉLKA ŽIVOTA A ZNEČIŠTĚNÍ OVZDUŠÍ V USA

545 Counties

	2000	2007
	76.7 ± 1.7	77.5 ± 2.0
PM2.5	13.2 ± 3.4	11.6 ± 2.8

Snížení koncentrace PM2.5 o 1.6 µg/m³ →



prodloužení střední délky života o 0.8 roku

(Correi A. et al., Epidemiology 24:23-31, 2013)

NOVÉ POZNATKY Z USA

(B.Ritz 2013)

vliv na CNS:

autismus

demence

Parkinsonova nemoc

mozkové příhody

Alzheimerova choroba

ZNEČIŠTĚNÍ OVZDUŠÍ V ČR

(HODNOCENÍ RIZIKA)

- 1) Koncentrace B[a]P > 1 ng/m³/rok (standard EU) jsou dlouhodobě překračovány
- 2) Pro většinu oblastí ČR představují největší zátěž B[a]P lokální topeniště, v Praze doprava, pro MSK průmyslové zdroje
- 3) Novým poznatkem jsou výsledky, které prokazují vliv B[a]P na deregulaci genů u novorozenců (specificky genů ovlivňujících imunitu)
- 4) Prokázaným důsledkem současného znečištění ovzduší je zvýšená nemocnost dětí předškolního věku, asthma bronchiale u dětí a kardiovaskulární úmrtnosti
- 5) Současná nepříznivá environmentální zátěž bude ovlivňovat zdravotní stav populace MSK patrně i příštích 20-30 let

VÝZNAM k-PAU VE ZNEČIŠTĚNÉM OVZDUŠÍ



výsledky

těhotenství

(IUGR, LBW,

působí jako ED)



plodnost

mužů



respirační

nemocnost dětí,

psychický

vývoj



kardiovaskulární

onemocnění,

cukrovka,

nádory



RIZIKO PRO LIDSKÉ ZDRAVÍ



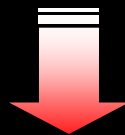
VÝSLEDKY MOLEKULÁRNĚ EPIDEMIOLOGICKÝCH STUDIÍ

(genomová frekvence translokací-FISH, mikrojadérka, fragmentace DNA
ve spermiích)

koncentrace
> 1 ng B[a]P/m³
v ovzduší



RIZIKO PRO LIDSKÉ ZDRAVÍ



(WHO Bonn 6. 11. 2009)

PODĚKOVÁNÍ

Podpořeno granty

MŽP ČR

Projekt AIRGEN (SP/1b3/8/08)

MŠMT ČR

Projekt ENVIRONGEN (2B06088)

GAČR #P503/11/0084

GAČR #P30113-13458S