

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Andrea Málková

2019

Doktorský studijní program
Hygiena, preventivní lékařství

Dermální expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům
(Vybraná rizika Goeckermanovy terapie psoriázy)

Dermal Exposure of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
(Selected Risks of Goeckerman Therapy of Psoriasis)

MUDr. Andrea Málková

Školitel: doc. MUDr. Lenka Borská, Ph.D.
Školitel konzultant: prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc.

Hradec Králové, 2019

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2019

Andrea Málková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. MUDr. Lence Borské, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné informace a konzultace a prof. Ing. Zdeňku Fialovi, CSc. za vytvoření zázemí pro mou práci, četné konzultace a velkou trpělivost.

Dále můj velký dík patří doc. MUDr. Jindře Šmejkalové, CSc. za velkou pomoc a trpělivost při hodnocení chromozomálních aberací, pplk. doc. MUDr. Jaroslavu Pejchalovi, Ph.D. et Ph.D. z Univerzity obrany v Brně, Fakulty vojenského zdravotnictví, Katedry toxikologie a vojenské farmacie za vyškolení v oblasti mikronukleus testu, RNDr. Tomáši Adamusovi, Ph.D. z Ostravské univerzity, Lékařské fakulty, Katedry biomedicínských oborů za konzultace v oblasti mikronukleus testu, MUDr. Lence Kotingové, Ph.D. za konzultace a pomoc s experimenty s využitím epidermálních membrán, prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. a celému jeho týmu z Univerzity Pardubice, Fakulty chemicko-technologické, Katedry biologických a biochemických věd za analýzu receptorové tekutiny získané při testování absorpce polyaromátů *in vitro* a doc. Ing. Janu Kremláčkovi, Ph.D. za pomoc s analýzou dat.

Speciální poděkování patří všem mým kolegům z Ústavu hygieny a preventivního lékařství za pomoc a vytvoření příjemného prostředí pro práci.

Děkuji také všem pacientům zapojeným do studie.

Experimentální práce byly finančně podpořeny Grantem Vnitřní soutěže Lékařské fakulty UK v Hradci Králové (Zavedení a validace *in vitro* metodiky testování trans-epidermální penetrace polycyklických aromatických uhlovodíků), projektem specifického výzkumu SVV-2014-260058 a SVV-260397/2017, projektem Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové PRVOUK P37/09 a projektem Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové PROGRES Q40/09.

Obsah

Použité zkratky	7
Souhrn	8
Summary	11
1 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)	14
1.1 Charakteristika PAU	14
1.2 Expozice PAU ze životního a pracovního prostředí	15
1.3 Distribuce, metabolismus a eliminace PAU	18
1.4 Metabolismus PAU v kůži	21
1.5 Akutní účinky PAU	22
1.6 Chronické účinky PAU	22
1.7 Dermální expozice PAU a odhad míry dermální penetrace PAU	25
1.8 Genotoxicita PAU	27
2 Testování genotoxicity	31
2.1 Mikronukleus test	32
2.2 Test chromosomálních aberací	34
3 Psoriáza a možnosti její léčby	36
4 Cíle disertační práce	39
5 Metody a soubor nemocných	40
5.1 Testování trans-epidermální absorpce vybraných PAU	40
5.1.1 Epidermální membrána	40
5.1.2 Testované PAU	40
5.1.3 Expoziční zařízení a odběry vzorků receptorové tekutiny	41
5.1.4 Analýza vzorků receptorové tekutiny	42
5.1.5 Zpracování dat	43
5.2 Goeckermanova terapie psoriázy	44
5.2.1 Goeckermanova terapie (GT)	44

5.2.2	Sledovaný soubor pacientů s psoriázou léčených GT	45
5.3	Mikronukleus test	46
5.4	Chromozomální aberace	46
5.4.1	Materiál, přístroje a zařízení	46
5.4.2	Laboratorní postup	47
5.4.3	Mikroskopická analýza	48
5.5	Statistické hodnocení	50
6	Výsledky	51
6.1	Trans-epidermální absorpce vybraných PAU	51
6.2	Zavedení mikronukleus testu	54
6.2.1	Materiál, přístroje a zařízení	54
6.2.2	Laboratorní postup	55
6.2.3	Analýza vzorků	56
6.3	Podrobné charakteristiky skupiny pacientů 1	64
6.4	Vliv GT na hladiny mikrojader a chromosomálních aberací skupiny pacientů 1	67
6.5	Porovnání vlivu variant GT na hladinu chromosomálních aberací	70
7	Diskuze	79
7.1	Trans-epidermální absorpce vybraných PAU	79
7.2	Polycyklické aromatické uhlovodíky ve farmaceutickém dehtu	83
7.3	Zavedení mikronukleus testu	84
7.4	Test chromozomálních aberací	92
7.5	Vliv GT na hladiny mikrojader a chromosomálních aberací skupiny pacientů 1	96
7.6	Porovnání vlivu variant GT na hladinu chromosomálních aberací	103
8	Závěry	108
9	Seznam citací použité literatury	111
10	Přílohy	132

Použité zkratky

ABB	celkový počet aberovaných buněk na 100 mitóz
AhR	aryl hydrokarbonový receptor
BaP	benzo[a]pyren
BER	excizní oprava bazí (base excision repair)
BPDE	BaP-7,8-diol-9,10-epoxid
BSA	Body Surface Area
CA	chromozomální aberace
CAT	test chromozomálních aberací
CBMN	„cytokinesis-block“ mikronukleus test
CYP	enzym cytochrom P450
DJB	dvoujaderná buňka
DLQI	Dermatology Life Quality index
DMs	„double minutes“
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EVCAM	Evropské centrum pro validaci alternativních metod (European Centre for the Validation of Alternative Methods)
FD	farmaceutický dehet
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRR	homologní rekombinační oprava (homologous recombination repair)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
IL	interleukin
MN	mikrojádru, mikrojádra
MNT	mikronukleus test
NA	neanalyzováno
NAB	numericky aberované buňky na 100 mitóz
NAP	naftalen
NER	excizní oprava nukleotidů (nucleotide excision repair)
NHEJ	nehomologní spojování konců (non-homologous end joining)
n.s.	nesignifikantní
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development)
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAU-penet	množství PAU nalezené v receptorové tekutině
PEL	přípustný expoziční limit
PHE	fenanthren
PUVA	kombinovaná terapie psoralenem a UVA zářením
PYR	pyren
SAB	strukturálně aberované buňky na 100 mitóz
TER	kožní odpor (transdermal electrical resistance)
TEWL	transepidermální ztráta vody (transepidermal water loss)
TNF	tumor nekrotizující faktor
UV záření	ultra-fialové záření
VSO	výběrová směrodatná odchylka
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

Souhrn

Polycyklické aromatické uhlovodíky představují zdravotně závažnou skupinu látek, které se běžně vyskytují v životním a pracovním prostředí. Dermální forma expozice může představovat velmi významný příspěvek k celkové zátěži organismu a někteří autoři odhadují její podíl u závažných expozic až na téměř polovinu z celkově absorbované dávky PAU. V rozporu s touto skutečností byla dermální expozicím PAU dosud věnována relativně malá pozornost, a proto v současnosti disponujeme jen omezeným množstvím toxikologických údajů o rychlosti a intenzitě prostupu těchto látek do systémové cirkulace, jež by bylo možné využít pro odhady úrovní souvisejících zdravotních rizik.

Specifickou formu dermálních expozic polycyklickým aromatickým uhlovodíkům představují terapie některých kožních onemocnění (například psoriázy), při kterých jsou používány preparáty s jejich vyšším obsahem. Příkladem může být klinicky velmi účinná Goeckermanova terapie psoriázy, jejíž součástí je dermální aplikace farmaceutického kamenouhelného dehtu, obsahujícího polycyklické aromatické uhlovodíky. Hodnocení míry zdravotních rizik, vyplývajících z použití polycyklických aromatických uhlovodíků v Goeckermanově terapii, zatím nevykazují uspokojivou míru konzistence. Někteří autoři zvýšené riziko potvrzují, někteří jej považují za nízké až zanedbatelné.

Cílem předkládané disertační práce bylo přispět k rozšíření poznatků v obou výše uvedených oblastech bádání, týkajících se odhadů míry prostupu (rychlosti a intenzity) vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků přes kůži (trans-epidermální absorpce) při experimentální expozici *in vitro* a odhadů míry genotoxicity (vybrané nebezpečnosti/rizika), souvisejícího s klinickou dermální aplikací farmaceutického dehtu (obsahujícího polycyklické aromatické uhlovodíky) v rámci Goeckermanovy terapie u pacientů s psoriázou. Genotoxický účinek byl vybrán z důvodu jeho mimořádně vysoké úrovně nebezpečnosti.

Pro testování dermální penetrace látek *in vitro* doporučuje OECD dva modely, plnou kůži i epidermální membránu. V předkládaném textu prezentuji výsledky *in vitro* experimentu trans-epidermální penetrace, který naplňuje první cíl disertační práce. Při penetraci vybraných PAU přes epidermální membránu jsme našli, v porovnání s penetrací PAU přes plnou kůži popsanou v předchozí práci, vyšší hodnoty parametru Flux a nižší hodnoty parametru Lag time. Penetrace PAU přes epidermální membránu vykazovala také nižší stupeň variability dat, což snižovalo interindividuální variabilitu výsledků. Z těchto poznatků vyplývá, že použití epidermální membrány by mohlo zpřesňovat jak odhad vnitřní dávky PAU po dermální

expozici, tak i odhad souvisejícího zdravotního rizika v rámci konzervativního expozičního scénáře. Experimenty s epidermální membránou jsou však časově a zejména experimentálně náročné. Dosud nebyly stanoveny hodnoty objektivních parametrů integrity epidermální membrány, analogické k parametrům integrity plné nebo dermatomované kůže (TEWL a TER) a integrity epidermální membrány je posuzována pouze vizuálně. Toto hodnocení není zcela spolehlivé a poškození membrány bývá zjištěno až v průběhu pokusu nebo při analýze receptorové tekutiny. Uvedená negativa přispívají k finanční náročnosti testování, ztrátám vzorků a v neposlední řadě i k nárůstu rozdílů hodnot dat, získaných na různých pracovištích.

Pro účely naplnění druhého cíle disertační práce (odhadů míry genotoxicity vybrané nebezpečnosti) jsem na Ústavu hygieny a preventivního lékařství zavedla test genotoxicity „cytokinesis-block“ mikronukleus test (CBMN) a jeho funkčnost jsem ověřila na vzorcích periferní lymfocytů osob vystavených kombinované terapeutické expozici PAU a UVB záření.

Výsledky CBMN byly porovnávány s výsledky testu chromozomálních aberací (CAT), který je na ústavu dlouhodobě využíván. Oba testy vykazaly srovnatelné výsledky a citlivost v detekci poškození DNA. Kombinaci těchto dvou testů detekce poškození DNA považujeme za velmi vhodnou pro testování smíšených skupin s různými kuřáckými návyky po environmentální i pracovní expozici PAU. Za vhodné považujeme vyjadřovat výsledky obou testů ve formě počtu buněk se sledovanou změnou na celkový počet skórovaných buněk (počet dvoujaderných buněk s mikrojádrem na 1 000 dvoujaderných buněk, počet aberovaných buněk na 100 metafazických buněk).

Pomocí obou testů (CBMN a CAT), provedených na vzorcích krve pacientů s psoriázou léčených GT (klinická dermální aplikace farmaceutického dehtu/PAU a UV záření), jsme zjistili významnou míru genotoxické nebezpečnosti/rizika kombinace 4% farmaceutického dehtu a úzkopásmového UVB 311 nm záření.

Pomocí testu CAT jsme sledovali míru genotoxické nebezpečnosti/rizika několika variant GT (3%, 4% a 5% farmaceutického dehtu v kombinaci se dvěma celotělovými zářiči). Míra genotoxické nebezpečnosti narůstala s rostoucí koncentrací farmaceutického dehtu v masti a při 4% koncentraci pravděpodobně dosáhla svého maxima. Míru genotoxické nebezpečnosti/rizika terapie ovlivňovalo i UV záření, kde jsme prokázali vyšší genotoxickou nebezpečnost/riziko při použití úzkopásmového UVB 311 nm zářiče. Na základě našich výsledků jsme vyslovili domněnku, že PAU mají nejen klastogenní, ale i aneugenní potenciál pro poškozování DNA. U sledované terapie se zřejmě uplatňuje i synergický účinek kombinované expozice PAU a UV

záření na poškození DNA. Vzhledem k poměru rizika a benefitu se zdá být nejvhodnější použití 4% či 5% FD a širokopásmového UV zářiče.

Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons represent a health-related group of substances commonly found in the living and working environment. Dermal form of exposure can make a very significant contribution to the overall burden on the body, and some authors estimate its proportion in severe exposures to almost half of the total absorbed dose of PAH. Contrary to this, dermal PAH exposure has so far received relatively little attention, and therefore we currently have only a limited amount of toxicological data on the rate and intensity of these substances to the systemic circulation, which could be used to estimate the levels of associated health risks.

A specific form of dermal exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons is the treatment of some skin diseases (such as psoriasis) in which preparations with a higher content are used. An example can be the clinically very effective Goeckerman's therapy of psoriasis, which includes dermal administration of pharmaceutical coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons. So far, the assessment of the level of health risks arising from the use of polycyclic aromatic hydrocarbons in Goeckerman's therapy has not yet shown a satisfactory level of consistency. Some authors confirm the increased risk, some consider it low to negligible.

The aim of this dissertation thesis was to contribute to the broadening of knowledge in both of the above-mentioned areas of research concerning estimation of the rate of transmission (velocity and intensity) of selected polycyclic aromatic hydrocarbons through the skin (trans-epidermal absorption) in experimental *in vitro* exposure and estimates of genotoxicity (selected hazards/risks), related to clinical dermal application of pharmaceutical tar (containing polycyclic aromatic hydrocarbons) in Goeckerman's therapy in psoriatic patients. The genotoxic effect was chosen because of its extremely high level of hazard.

For testing *in vitro* dermal penetration, the OECD recommends two models, full skin and epidermal membrane. In the presented text I present the results of an *in vitro* trans-epidermal penetration experiment, which fulfills the first objective of the dissertation. When penetrating selected PAHs through the epidermal membrane, we found higher Flux values and lower Lag time values compared to PAH penetration through the full skin described in the previous work. Penetration of PAHs through the epidermal membrane also showed a lower degree of data variability, which reduced inter-individual variability of results. These findings suggest that the use of the epidermal membrane could refine both the estimate of the internal dose of PAH after dermal exposure and the estimate of the related health risk within a conservative exposure

scenario. However, experiments with the epidermal membrane are time-consuming and especially experimentally demanding. So far, the objective integrity parameters of the epidermal membrane, analogous to the integrity parameters of full or dermatomic skin (TEWL and TER), have not been determined and the integrity of the epidermal membrane is only assessed visually. This assessment is not entirely reliable and membrane damage is only detected during the course of the experiment or in the analysis of the receptor fluid. The aforementioned negatives contribute to the financial cost of testing, the loss of samples and, last but not least, the increase in the differences in data values obtained at different sites.

For the purpose of fulfilling the second objective of the dissertation thesis (estimates of the genotoxicity of the selected hazard), I introduced the cytokinesis-block micronucleus test (CBMN) at the Institute of Hygiene and Preventive Medicine and verified its functionality on samples of peripheral lymphocytes exposed to combined therapeutic PAH exposure and UVB radiation.

The CBMN results were compared with the results of the chromosomal aberration test (CAT), which is used at the Institute for a long time. Both tests showed comparable results and sensitivity in DNA damage detection. We consider the combination of these two DNA damage detection tests to be very suitable for testing mixed groups with different smoking habits after environmental and occupational exposure to PAHs. We consider it appropriate to express the results of both tests in the form of cell counts with a change in the total number of scored cells (number of binucleated cells with micronucleus per 1,000 binuclear cells, number of aberrant cells per 100 metaphase cells).

Using both tests (CBMN and CAT) performed in the blood of patients with psoriasis treated with GT (clinical dermal application of pharmaceutical tar/PAH and UV light), we found a significant level of genotoxic hazard/risk combination of 4% pharmaceutical tar and narrowband UVB 311 nm radiation.

Using the CAT test, we monitored the genotoxic hazard/risk levels of several GT variants (3%, 4% and 5% pharmaceutical tar in combination with two whole body emitters). The genotoxic hazard rate increased with increasing concentrations of pharmaceutical tar in ointment and probably reached its peak at 4% concentration. The degree of genotoxic hazard/therapy risk was also affected by UV radiation, where we demonstrated a higher genotoxic hazard/risk when using narrowband UVB 311 nm emitters. Based on our results, we believe that PAHs have not only clastogenic but also aneugenic potential for DNA damage. A synergistic effect of

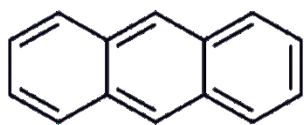
combined exposure of PAHs and UV radiation to DNA damage appears to be observed in the therapy under study. Due to the risk-benefit ratio, the use of 4% or 5% FD and broadband UV emitter seems best.

1 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)

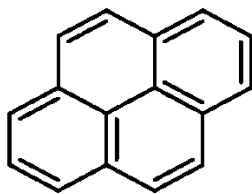
1.1 Charakteristika PAU

PAU představují velkou skupinu látek, které se nacházejí v ovzduší, vodě, půdě, tabákovém kouři, potravinách a farmaceutických produktech, určených k dermálním aplikacím (IARC 2010). V čistém stavu jsou PAU pevné organické sloučeniny (bezbarvé, bílé či světle žluté barvy) a mezi jejich typické charakteristiky patří vysoký bod varu a tání, nízký tlak par a velmi špatná rozpustnost ve vodě. Tlak par a rozpustnost PAU ve vodě klesají se zvyšující se molekulovou hmotností a počtem benzenových jader. Naproti tomu se s rostoucí molekulovou hmotností zvyšuje jejich odolnost vůči oxidaci a redukci. PAU jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a v tucích (nebezpečí kumulace v organismu). Z dalších fyzikálně-chemických vlastností PAU nutno zmínit citlivost na světlo, tepelnou rezistenci, vodivost a schopnost absorbovat UV záření (Abdel-Shafy a Mansour 2016; Kim et al. 2013; WHO 2010).

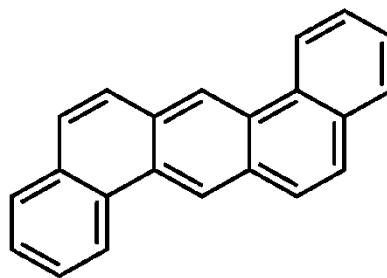
Terminologie PAU není zcela konzistentní. Jako PAU bývají označovány látky skládající se pouze z atomů vodíku a uhlíku, které obsahují dvě a více benzenových jader, uspořádaných lineárně (např. anthracen), do klastru (např. pyren) či do úhlu (např. dibenz(a,h)anthracen) (obrázek 1) (Abdel-Shafy a Mansour 2016). Dle International Agency for Research on Cancer (IARC (2010) však není mezi PAU řazen naftalen, který má dvě benzenová jádra, a za nejmenší PAU je považován až acenaften. Naftalen je také někdy označován jako bicyklický aromatický uhlovodík. PAU obsahující maximálně šest benzenových jader bývají některými autory označovány jako „malé“ PAU, nad šest benzenových jader pak jako „velké“ PAU. Většina vědeckých prací byla dosud provedena na „malých“ PAU (Rengarajan et al. 2015). Kim et al. (2013) rozdělují PAU na skupinu látek s nízkou molekulovou hmotností (maximálně se čtyřmi benzenovými jádry) a na skupinu s vysokou molekulovou hmotností (více než čtyři benzenová jádra).



**Lineární uspořádání
(Anthracen)**



**Uspořádání do klastru
(Pyren)**



**Úhlové uspořádání
(dibenz(a,h)anthracen)**

Obr. 1 Uspořádání benzenových jader v molekulách PAU

1.2 Expozice PAU ze životního a pracovního prostředí

Hlavním zdrojem expozice osob ze životního a pracovního prostředí je spalování materiálů organického charakteru (Kim et al. 2013). PAU se téměř vždy vyskytují ve směsích. Kvalitativní i kvantitativní složení směsí je ovlivňováno typem spalovaného materiálu a podmínkami, za kterých ke spalování dochází (Abdel-Shafy a Mansour 2016; Błaszczuk a Mielżyńska-Švach 2017; Kim et al. 2013; WHO 2010).

PAU pyrogenního původu vznikají při vyšších teplotách (zhruba nad 350 °C) za omezeného přístupu kyslíku. Jedná se například o destruktivní destilaci uhlí na koks a kamenouhelný dehet a nedokonalé spalování pohonných hmot, dřeva či topných olejů. Vysoké koncentrace pyrogenních PAU jsou detekovány v městských oblastech. PAU petrogenního původu vznikají během maturace ropy. Tyto PAU jsou v prostředí široce rozšířené díky transportu, skladování a používání ropy a ropných produktů. PAU biologického původu jsou syntetizovány některými rostlinami či bakteriemi a vznikají také při degradaci rostlinné biomasy (Abdel-Shafy a Mansour 2016).

Z jiného pohledu lze PAU rozdělit na PAU přírodního a antropogenního původu. PAU přírodního původu se objevují při požárech lesů, vulkanické činnosti, syntéze bakteriemi a řasami, při rozkladu rostlinné biomasy, při erozi sedimentárních hornin obsahujících ropné uhlovodíky či jako ropné zbytky. PAU antropogenního původu vznikají při nedokonalém hoření ve spalovnách a průmyslových technologiích a jsou obsaženy v automobilových a leteckých emisích. Závažnými zdroji PAU jsou rovněž lokální topeniště, tabákový kouř, únik ropných produktů, splaškový kal a dehtový a kreosotový odpad (Abdel-Shafy a Mansour 2016; Dat a Chang 2017).

V ovzduší se PAU mohou vyskytovat v pevném a plynném skupenství. Kong et al. (2010) uvádí, že až 90 % všech PAU v pevném skupenství bývá zachyceno na částicích PM_{2,5} (pevné částice s průměrem zrna menším než 2,5 μm). Na povrchu pevných částic adsorbují ve velké míře PAU s nižším tlakem par a vyšší molekulovou hmotností (5 až 6 benzenovými jádry), zatímco PAU s vyšším tlakem par a nižší molekulovou hmotností (2 až 3 benzenovými jádry) se vyskytují převážně v plynné fázi ovzduší. Z hlediska zdravotní nebezpečnosti jsou významnější PAU adsorbované na povrchu jemných částic (Dat a Chang 2017).

Pro pracovní neexponované osoby jsou hlavními expozičními zdroji kontaminované ovzduší (včetně tabákového kouře), kontaminované potraviny a kontaminovaná voda. Expozice mají formu inhalační a perorální (Bansal a Kim 2015; IARC 2010; Kim et al. 2013).

Kontaminace venkovního ovzduší PAU je vyšší v zimních měsících, v období špatných rozptylových podmínek a v lokalitách s vyšší koncentrací průmyslu a dopravy (Albuquerque et al. 2016). V ovzduší interiérů bývají nalézány nižší koncentrace PAU než v ovzduší venkovním. Hlavním zdrojem kontaminace zde bývá lokální vytápění, tabákový kouř (aktivní i pasivní inhalace) a příprava pokrmů WHO (2010).

Obsah PAU v potravinových substrátech je ovlivňován absorpcí PAU plodinami a živočichy z vody, ovzduší a půdy a na způsobu přípravy pokrmu, kde nejrizikovějšími formami jsou uzení, grilování, pečení a smažení (Bansal a Kim 2015; Ciecierska a Obiedziński 2013). Kontaminace pitné vody PAU závisí na míře kontaminace surové vody, na lokalitě a na úrovni vodárenských technologií. Obecně lze očekávat vyšší úroveň kontaminace surové vody v lokalitách s vyšší koncentrací průmyslu a dopravy (WHO (2010)).

V pracovním prostředí dominují expoziční formy PAU inhalační a dermální. Dermální forma expozice může představovat velmi významný příspěvek k celkové zátěži organismu a někteří autoři odhadují (u významných průmyslových expozic) její podíl až na polovinu z celkově absorbované dávky PAU (Błaszczuk a Mielżyńska-Švach 2017). Vysoké úrovně expozice doprovázejí těžbu a spalování fosilních paliv (důlní činnost, koksárny, slévárny), zpracování ropy, spalování ropných produktů a používání materiálů obsahujících PAU v různých odvětvích průmyslu (výstavba silnic, gumárenství, výroba hliníku, tiskařství, pokrývačství, kovoprůmysl, impregnace dřeva a práce na železnici či letištích (IARC 2012; Moustafa et al. 2015; Ramesh et al. 2011; Wagner et al. 2015). IARC (2010) udává jako hlavní zdroj pracovní expozice PAU výrobu a používání kamenouhelného dehtu a produktů z něj získaných. IARC (2012) zařazuje pracovní expoziční formy PAU spojené se zplyňováním uhlí, destilací uhelného dehtu,

používáním dehtových materiálů jako střešní krytiny či povrchu vozovky, výrobou koksu či oceli, čištěním komínů a s výrobou hliníku mezi činnosti skupiny 1, tedy mezi činnosti průkazně karcinogenní pro člověka. Všechny uvedené činnosti jsou dle IARC (2012) spojeny se zvýšeným výskytem karcinomu plic, výroba hliníku je navíc spojena i s karcinomem močového měchýře. Odborná literatura udává též vyšší výskyt nádorů kůže (Alicandro et al. 2016).

PAU našly své uplatnění i v medicínských aplikacích. V dermatologii se požívají dehty ze suché destilace uhlí, dřeva či břidlic, již déle než 2 000 let. První popsal použití dřevěného dehtu k léčebným účelům Hippokrates, ale běžně se v dermatologii začaly používat až koncem 19. století, zásluhou vídeňského profesora Kaposiho (Ditrichová 2014).

V roce 1925 byla Williamem H. Goeckermanem (Mayo Clinic, USA) poprvé popsána metoda léčby psoriázy, zahrnující kombinaci topické aplikace farmaceutického kamenouhelného dehtu s vysokým obsahem PAU v masťovém základu a UV záření (Goeckerman 1925). Goeckermanova terapie je používána téměř sto let a zůstává jednou z nejúčinnějších možností terapie psoriázy (Gupta et al. 2013).

Kamenouhelný dehet je velmi složitou směsí obsahující tisíce složek. Klasifikováno bylo prozatím asi okolo čtyř set látek (Sekhon et al. 2017). Složení dehtu významně ovlivňuje složení výchozí suroviny a teplota destilace (Chalupová et al. 2007). Při vyšších teplotách destilace (1 000 až 1 300 °C) vzniká významně více PAU, než při teplotách nižších (Moustafa et al. 2015). Vysoké zastoupení mají v dehtu PAU, v menší míře jsou přítomny kyslíkaté, dusíkaté a sírné látky a v malé míře alifatické uhlovodíky (Chalupová et al. 2007).

Kamenouhelný dehet má antiinflamatorní, antimikrobiální, antipruriginózní a cytostatické účinky (Moustafa et al. 2015). Kamenouhelný dehet je používán k léčbě chronické stacionární psoriázy, atopické a seboroické dermatitidy, neurodermatitidy a chronické dermatomykózy (Ditrichová 2014). Používán je rovněž k terapii pustulosis palmoplantaris, prurigo simplex (Roelofzen et al. 2007), prurigo nodularis (Sorenson et al. 2015) a uremického pruritu (Nakamura et al. 2016).

Souhrnně lze konstatovat, že nejčastější expoziční cestou pro vstup PAU do organismu je inhalace, nicméně významné mohou být i absorpce perorální a dermální. V životním prostředí převažují expozice inhalační (kontaminované ovzduší) a perorální (kontaminované potraviny a kontaminovaná pitná voda), v pracovním prostředí pak kombinace expozice inhalační a dermální.

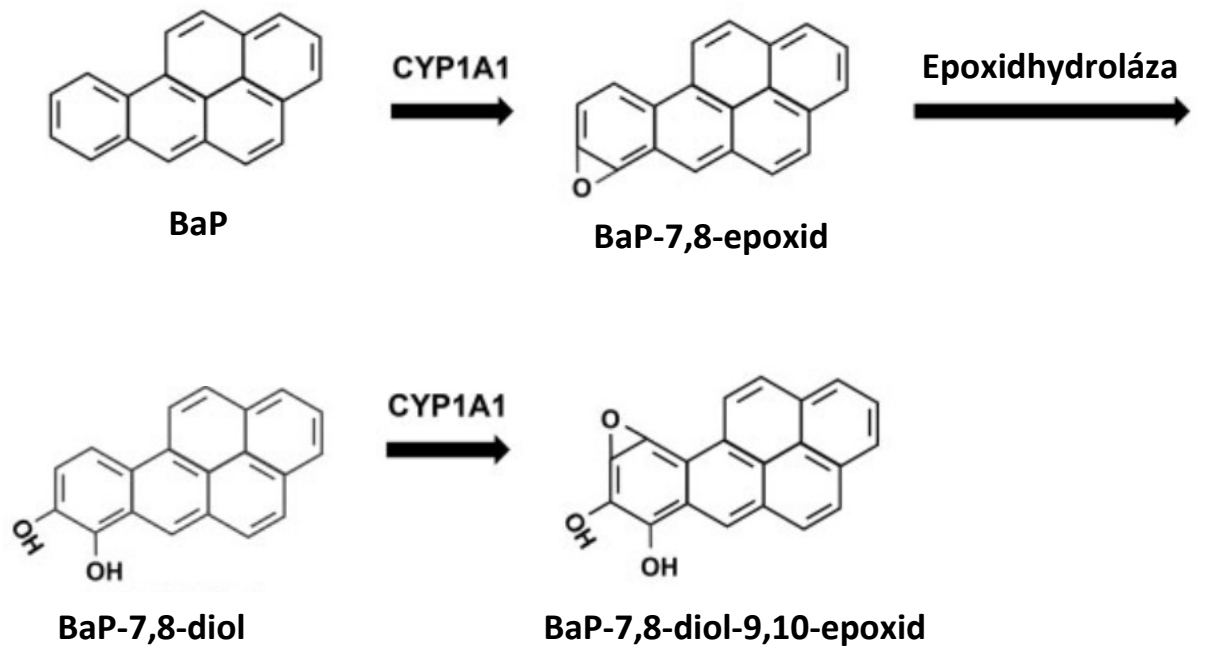
1.3 Distribuce, metabolismus a eliminace PAU

V systémové cirkulaci jsou PAU transportovány ve vazbě na lipoproteiny (Błaszcyk a Mielżyńska-Švach 2017). Distribuce je rychlá a během několika hodin jsou tyto látky detekovatelné ve většině tělních tkání. Vzhledem k vysoké míře lipofility pronikají PAU poměrně snadno biologickými membránami včetně placenty (WHO 2010) a nacházejí se i v mateřském mléce (Pulkrabova et al. 2016). Ke kumulaci PAU dochází v tukové tkáni a v orgánech s vyšším obsahem lipidů a lipoproteinů. Vyšší koncentrace PAU a jejich metabolitů byly nalezeny také v gastrointestinálním traktu (WHO 2010).

Většina PAU podléhá v organismu dvoufázovému metabolismu (Błaszcyk a Mielżyńska-Švach 2017). Největší metabolická kapacita je lokalizována v játrech, následují plíce, intestinální mukóza, kůže a ledviny (WHO 2010). Určitý stupeň metabolické aktivity se nachází i v krevních buňkách (Moustafa et al. 2015), včetně T-lymfocytů (Bellamri et al. 2016), nadledvinách, varlatech a štítné žláze (Jang et al. 2018).

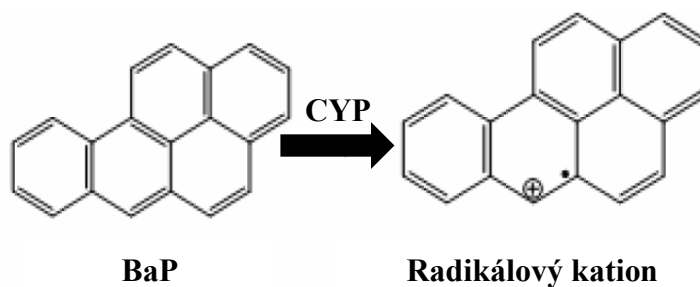
První metabolické fáze PAU se zúčastňují oxidační, redukční a hydrolytické enzymy. Touto cestou vznikají primární metabolity. Ve druhé metabolické fázi dochází na molekulách primárních metabolitů k adici endogenních polárních skupin a vznikají metabolity sekundární, které mají polární charakter a z organismu se snadno vylučují močí a stolicí (Błaszcyk a Mielżyńska-Švach 2017).

Klíčové enzymy první metabolické fáze PAU, která hraje zásadní roli při vzniku nebezpečných reaktivních intermediátů, patří do skupiny enzymů vázaných na cytochrom P450 (CYP). Klasickou ukázkou vzniku velmi nebezpečného reaktivního meziproduktu je metabolismus benzo[a]pyrenu (BaP). Tato látka je transformována za přítomnosti CYP 1A1 nejprve na BaP-7,8-epoxid, ze kterého za přítomnosti epoxidhydrolázy vzniká BaP-7,8-dihydrodiol. Z něho v dalším oxidačním kroku (CYP 1A1) vzniká BaP-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) (obrázek 2) (Moorthy et al. 2015). Předpokládá se, že většina PAU s vyšší molekulovou hmotností, s výjimkami jako je například benzo[b]fluorathen, bude metabolizována obdobným způsobem (WHO 2010).

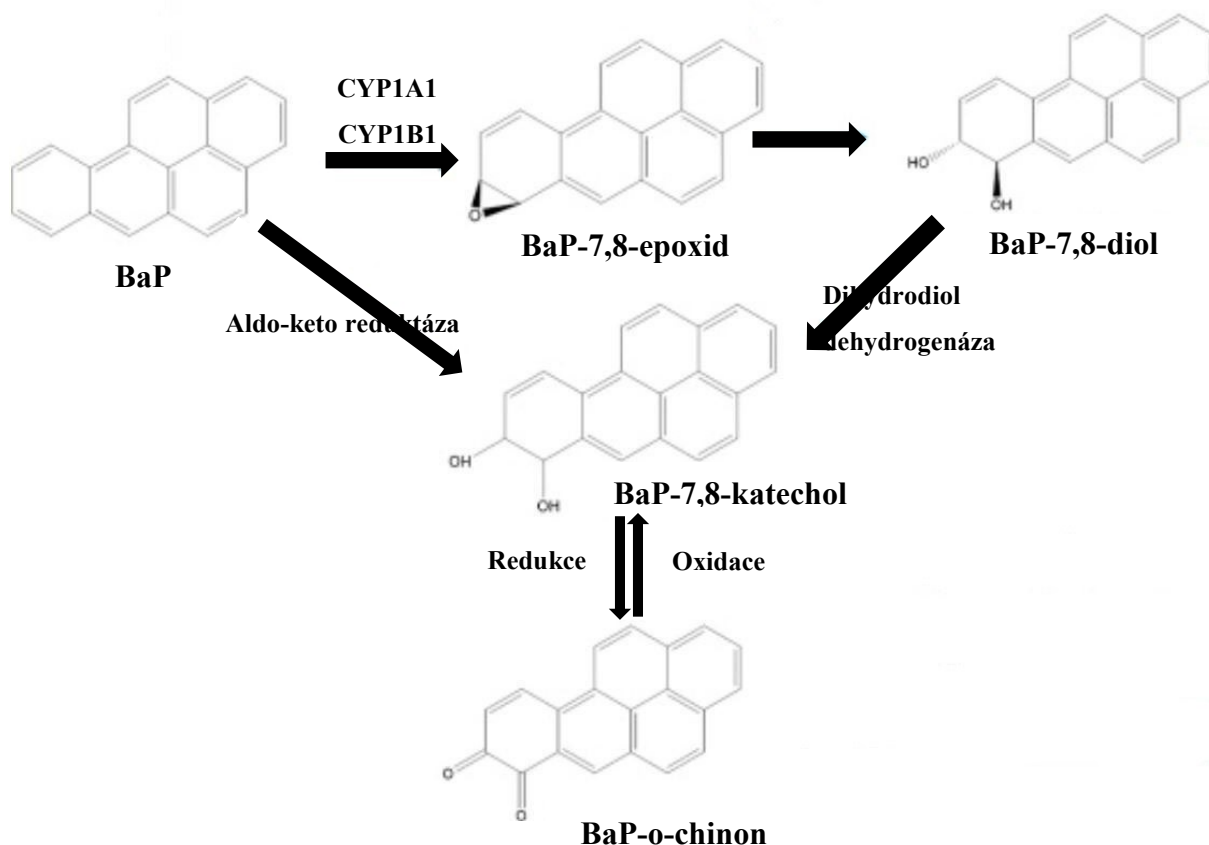


Obr. 2 Metabolismus BaP (převzato z Moorthy et al. (2015))

Vedle diol-epoxidů dochází v metabolickém schématu BaP ještě k tvorbě radikálových kationtů (obrázek 3) (Błaszczuk a Mielżyńska-Švach 2017) a o-chinonů. (obrázek 4) (Moorthy et al. 2015).



Obr. 3 Tvorba radikálových kationtů (převzato z Yu et al. (2006))



Obr. 4 Tvorba orto-chinonů (převzato z Kasala et al. (2015))

Jak bylo uvedeno výše, klíčové enzymy první metabolické fáze PAU patří do skupiny enzymů vázaných na cytochrom P450 (CYP). Jedná se zejména o CYP 1A1, CYP 1A2 a CYP 1B1. Genetický polymorfismus ovlivňuje míru exprese CYP a tím i charakter metabolismu a úroveň toxicity přítomných PAU (WHO 2010). Uppstad et al. (2011) uvádějí, že v plicní tkáni žen se nachází významně vyšší aktivita CYP 1A1 (a významně vyšší hladiny BPDE-DNA-adduktů) v porovnání s muži. V případě CYP 1B1 tento rozdíl pozorován nebyl.

Při indukci exprese uvedených enzymů hraje významnou roli aryl hydrokarbonový receptor (AhR), který je zpětnovazebně ovlivňován přítomností PAU (Błaszczuk a Mielżyńska-Švach 2017; Brinkmann et al. 2013). AhR se nachází téměř ve všech tělních tkáních. Jeho nejvyšší zastoupení lze nalézt v játrech, tukové tkáni a bronchiálních epitelových buňkách. Aktivace receptoru vede k řadě reakcí, jako je například tvorba DNA-adduktů (cestou aktivace CYP 1A1 a CYP 1B1), tumorigeneze, indukce zánětu, buněčná proliferace či ztráta buněčné adheze (Tsay et al. 2013).

S ohledem na skutečnost, že při inhalační a dermální cestě vstupu PAU do organismu je obcházena první detoxikační zóna v játrech, mohou mít takto přijaté PAU výraznější toxické účinky než PAU přijaté cestou orální (WHO 2010).

Druhá fáze metabolismu PAU představuje prakticky vždy redukci toxicity metabolitů fáze první. Finálně vznikají polární deriváty PAU s nízkou toxicitou, které jsou snáze exkretovatelné. Druhou metabolickou fází katalyzují glutathion-S-transferáza, UDP-glukuronosyltransferáza, sulfotransferáza, NADP(H)-chinon oxidoreduktáza-1 a aldo-keto reduktáza. Některé z těchto enzymů mohou být indukovány přítomností PAU, ovšem indukce není tak silná jako v případě CYP (WHO 2010).

1.4 Metabolismus PAU v kůži

Henkler et al. (2012) uvádějí, že v lidské kůži je dostatečná metabolická kapacita pro tvorbu mutagenních metabolitů, a proto i zde dochází k tvorbě PAU-DNA-adduktů a proteinových (např. keratinových) PAU-adduktů. Některé zdroje uvádějí, že exprese CYP 1A1, 1B1 a dalších transkriptů je v kůži (epidermis, dermis a adnexa) dokonce vyšší než v játrech. Naproti tomu exprese CYP 1A2 je velmi nízká (Oesch et al. 2014). Nejvyšší aktivita CYP 1A1 a 1A2 je v keratinocytech epidermis. Aktivita CYP 1A1 je nejvyšší v bazální a suprabazální vrstvě keratinocytů, zatímco CYP 1B1 vykazuje naopak nejvyšší aktivitu v keratinocytech (mimo bazální vrstvu) (Oesch et al. 2014). CYP 1B1 je vysoce exprimován v epidermis i v dermis (Wiegand et al. 2014). Díky tomuto poměru můžeme předpokládat, že v kůži budou aktivní metabolity PAU (reaktivní intermediáty) rychle vznikat s pomalejší detoxikací.

Keratinocyty v plné lidské kůži „*ex vivo*“, komerčně dostupný 3D model kůže i kultura primárních lidských keratinocytů jsou schopné obdobně metabolizovat BaP. Zdá se, že keratinocyty představují hlavní typ kožních buněk, které se podílejí na genotoxickém působení dermální expozice PAU (Brinkmann et al. 2013). Experimenty na myších naznačují, že v metabolismu a genotoxickém působení PAU v kůži mohou svou roli hrát i Langerhansovy buňky a dendritické buňky kůže (Modi et al. 2012). K expresi CYP 1A1 a 1B1 dochází rovněž ve fibroblastech a melanocytech. Monocyty exprimují CYP 1B1, méně pak CYP 1A1 (Oesch et al. 2014).

Kamenouhelný dehet indukoval ve vzorcích lidské kůže expresi CYP 1A1, 1A2 a 1B1. Ve vzorcích psoriatických lézí exponovaných dehtu byla exprese těchto enzymů nižší. Expresi CYP 1B1 v lidských keratinocytech je schopno indukovat též UVB záření (UVB) (Oesch et al. 2014).

Okrajově nutno zmínit, že kromě enzymů z rodiny CYP se v kůži (epidermis, dermis a adnexa) nacházejí i další enzymy první fáze metabolismu škodlivin, jako jsou alkohol dehydrogenázy, aldehyd dehydrogenázy, flavin-dependentní monooxygenázy, epoxid hydrolázy, esterázy a amidázy. Jejich specifická aktivita ovšem dosahuje méně než 10 % celkové jaterní aktivity. Z enzymů druhé fáze jsou v kůži lokalizované glukuronosyltransferáza, glutathion S-transferáza, acetyltransferáza, sulfotransferáza a methyltransferáza (Oesch et al. 2007).

PAU jsou z organismu vylučovány ve formě směsí původních látek a jejich metabolitů. Nejčastěji se jedná o monohydroxylované a dihydroxylované PAU, které jsou vylučovány ve formě glukuronidů a sulfátů (Motorykin et al. 2015; WHO 2010). Hlavními exkrečními cestami jsou stolice a moč. PAU s vyšší molekulovou hmotností jsou vylučovány převážně stolicí, PAU s nižší molekulovou hmotností močí (Campo et al. 2016). Většinu běžných PAU lze považovat za látky se středním biologickým poločasem, řádově v desítkách hodin (Jang et al. 2018).

1.5 Akutní účinky PAU

Akutní účinky PAU závisí primárně na míře jejich toxicity a dále na formě, trvání a intenzitě expozice (Rengarajan et al. 2015). Účinky expozice jsou modifikovány aktuálním zdravotním stavem exponované osoby, jejím věkem a pohlavím (Kim et al. 2013).

Akutní expozice PAU se vyskytují zřídka a vyvolávají podráždění očí, pokožky (až zánětlivé kožní změny) a respiračního traktu, nauzeu, zvracení, průjem a případně i zmatenost (Kim et al. 2013; Rengarajan et al. 2015). Směsi PAU vykazují fototoxické účinky (kůže, oči), které se objevují při expozici v oblasti UVA záření a v oblasti nízkých vlnových délek viditelného světla (340-430 nm) (Roelofzen et al. 2007; WHO 2010).

Benzo[a]pyren, anthracen a naftalen jsou považovány za přímé kožní iritanty, anthracen a benzo[a]pyren působí také jako kožní senzitivizátory, které zvyšují senzitivitu kůže pro následující expozici kožnímu iritantu (Kim et al. 2013; Moustafa et al. 2015). Směsi PAU vykazují hypersenzitivní účinky na kůži vedoucí k alergickým reakcím. Mezi další popsané akutní účinky (při opakované expozici) patří folikulitida či dehtové akné (acne picea), atrofie epidermis a hyperpigmentace (Moustafa et al. 2015; Vohradníková 2010).

1.6 Chronické účinky PAU

Literární zdroje uvádějí, že PAU mohou při chronické expozici indukovat vznik a rozvoj nádorových onemocnění plic (Hong et al. 2016), trachey (Pauk et al. 2013) a laryngu (Wagner et al. 2015), močového měchýře (Bosetti et al. 2007), ledvin (Daniel et al. 2011), kůže (Yu et

al. 2006), žaludku (Liao et al. 2014), kolorekta (Sinha et al. 2005), pankreatu (Anderson et al. 2005) a prsu (White et al. 2016).

Velmi významnými chronickými účinky PAU jsou účinky genotoxické. Protože na tyto účinky byla zaměřena předkládaná disertační práce, byla jim věnována podrobnější samostatná kapitola (viz dále).

Expozice PAU vykazuje imunomodulační účinky a je schopna alterovat vývoj imunitního systému in utero. Imunotoxické účinky vyžadují metabolickou přeměnu PAU v buňkách na diol-epoxydy a chinony, které následně ovlivňují buněčnou signalizaci lymfoidních a nelymfoidních buněk (IARC 2012). Nejvýznamnější imunomodulační/imunosupresivní účinky byly pozorovány u benzo[a]pyrenu, 7,12-dimethylbenz[a]anthracenu, 3-methylcholanthrenu a dibenzo[d,e,f,p]chrysenu (Gao a Burchiel 2014).

Gao et al. (2014) zjistili významně zvýšené sérové hladiny IgG a IgA imunoglobulinů u skupiny pracovníků koksáren. Borska et al. (2006) popsali významný pokles hladin IgM, IgE, α 2-makroglobulinu a β 2-mikroglobulinu po terapeutické dermální expozici farmaceutickému dehtu. Hew et al. (2015) pozorovali signifikantní asociaci mezi expozicí dětí PAU a zvýšenou metylací genového lokusu pro „forkhead box protein 3“, což vedlo k dysfunkci Treg lymfocytů a zvýšení plasmatického IgE. S rostoucí expozicí PAU došlo též ke zvýšení hladin interferonu IFN- γ a k poklesu hladin interleukinu IL-10. Autoři tak předpokládají souvislost mezi množstvím PAU v ovzduší a nárůstem prevalence alergických onemocnění v dětské populaci.

Autorský kolektiv Dai et al. (2018) našli snížené hladiny koncentrací makrofágového zánětlivého proteinu MIP-1 β , IL-8 a monocytového chemotaktického proteinu MCP-1 po pracovní expozici osob dieselovým výfukovým plynům. Vzhledem k tomu, že tyto chemokiny hrají důležitou roli v zapojení imunokompetentních buněk v protinádorové imunitě, lze předpokládat i možnou potenciaci karcinogenního působení PAU imunotoxickým mechanismem.

Expozice PAU podporuje rovněž vznik a rozvoj nenádorových plicních onemocnění a astmatu (Karimi et al. 2015; Pauk et al. 2013). PAU akcelerují tvorbu aterosklerotických plátů (Marinković et al. 2013). Při expozici BaP nad 273 ng/m³ (ve srovnání s expozicí do 68 ng/m³) bylo zaznamenáno téměř dvojnásobně vyšší riziko úmrtí v důsledku ischemické choroby srdeční (Burstyn et al. 2005). Expozice přispívá též ke vzniku metabolického syndromu, rozvoji

inzulínové rezistence a insuficience β -buněk Langerhansových ostrůvků (Hu et al. 2015). PAU vykazují hepatotoxické a nefrotoxické účinky a přispívají ke vzniku katarakty (Rengarajan et al. 2015).

Bylo prokázáno, že expozice PAU narušuje spermiogenezi (Han et al. 2011) a má negativní vliv na růst a vývoj plodu (Polanska et al. 2014). Byla popsána souvislost mezi pracovní expozicí matek a výskytem gastroschízy u novorozenců (Lupo et al. 2012). Při vysokých koncentracích PAU v placentě bylo popsáno riziko vzniku defektu neurální trubice, riziko vzniku anencefalie a spiny bifidy (Ren et al. 2011).

Literatura uvádí výskyt neurotoxických účinků PAU během prenatálního a časného postnatálního vývoje (Perera et al. 2014) a v dospělosti (Patri et al. 2009). Vysoká prenatální expozice PAU je spojována s nižším IQ a kognitivními problémy u dětí ve věku pěti (Edwards et al. 2010) a sedmi let (Jedrychowski et al. 2015).

Byla popsána dávková závislost změn v červené krevní řadě na rozsahu expozice PAU (Wang et al. 2015). Nicméně, u pracovníků exponovaných dlouhodobě PAU nebyl prokázán zvýšený výskyt Hodgkinova lymfomu, non-Hodgkinova lymfomu, leukémie či mnohočetného myelomu (Alicandro et al. 2016).

PAU mohou vykazovat estrogení i antiestrogení aktivitu. Zda konkrétní PAU bude vykazovat estrogení či antiestrogení aktivitu závisí na příslušných vazebných receptorech. Například ER β receptor vykazuje estrogení aktivitu, zatímco receptor ER α vykazuje aktivitu antiestrogení (Zhang et al. 2016).

Loreto et al. (2007) popsali změny morfologie kůže po chronické dermální expozici silničních dělníků PAU. Na exponovaných kožních kompartmentech bylo zjištěno ztenčení epidermis (zejména redukce stratum spinosum), oploštění dermálních papil, morfologická heterogenita, hyperchromie cytoplasmy a ztráta intercelulárních spojů buněk stratum basale, sraštění buněk, narušení vyzrávání buněk ve stratum spinosum a granulosum a oddělení stratum corneum od stratum lucidum. Autoři dále zjistili vyšší expresi bax proteinu a nižší expresi bcl-2 proteinu ve stratum basale svědčící o aktivaci apoptózy.

Expozice PAU rovněž urychluje proces stárnutí kůže, pravděpodobně cestou indukce oxidačního stresu (Borska et al. 2016). Stenehjem et al. (2017) popisují asociaci mezi dermální expozicí PAU a kožními melanomy a nemelanomovými nádory lokalizovanými na horních končetinách. Autoři se domnívají, že souběžná expozice UV záření může potencovat

karcinogenní účinky dermální expozice PAU. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny považuje za prokázanou souvislost mezi dermální expozicí PAU a nemelanomovými kožními nádory (IARC 2012; IARC 2018).

1.7 Dermální expozice PAU a odhad míry dermální penetrace PAU

Wu et al. (2016) uvádí, že respiračním traktem dospělého člověka projde během 24 hodin přibližně 36 m³ vzduchu, zatímco kůže (celková plocha se u dospělého člověka pohybuje mezi 1,5 až 2,3 m²) může za stejnou dobu přijít do styku zhruba s 260 m³ vzduchu. Některé studie přisuzují dermální expozici stejný nebo dokonce i vyšší význam v porovnání s expozicí inhalační. Například VanRooij et al. (1993) uvádějí, že téměř 75 % z celkově absorbované dávky pyrenu mohlo být v případě koksárenských pracovníků přijato transdermální cestou. Rovněž Borak et al. (2002) předpokládají, že 90 až 99 % 1-hydroxypyrenu v moči u pracovníků impregnujících dřevo kreozotem (inhalační a dermální expozice), vzniklo z pyrenu přijatého dermálně. K obdobnému závěru došli i Walter a Knecht (2007), kteří provedli inhalačně-dermální experiment na dobrovolnících exponovaných živičných výparům a aerosolu. Z výsledků vyplývá, že přibližně 50-60 % celkově absorbovaného pyrenu, chrysenu a anthracenu bylo absorbováno kůží. Payan et al. (2008) udávají, že hlavní formou vstupu tetracyklických a pentacyklických aromatických uhlovodíků z pracovního prostředí je forma dermální. Fent et al. (2014) našli zvýšené hodnoty metabolitů PAU v moči u hasičů, kteří během zásahů používali dýchací přístroje. Svůj náález odůvodňují dermální expozicí PAU přes nechráněnou kůži na krku exponovaných osob. Zajímavý poznatek zaznamenali Wu et al. (2015), kteří odhadli, že vlivem expozice dýmům PAU při grilování potravin bylo za jednu hodinu inhalačně absorbováno 2,8 až 27 ng ekvivalentu BaP, zatímco dermálně absorpce činila 0,2 až 50 ng ekvivalentu BaP.

Pokud není kontaminovaná kůže po ukončení expozice dostatečně očištěna, absorpce PAU pokračuje. Na dlouhodobější kontaminaci povrchu kůže se může podílet i znečištěný oděv (Wu et al. 2016). Je pravděpodobné, že perkutánní absorpce PAU je zvyšována i „wash-in“ efektem, který v důsledku hydratace strata cornea usnadňuje prostup PAU ze strata cornea do hlubších vrstev kůže (Chan et al. 2013; Zhu et al. 2016).

Řada látek se při dermální expozici váže na proteiny a lipidy strata cornea a vytváří tak rezervoár, ze kterého jsou tyto látky pak následně uvolňovány do systémové cirkulace (Hafeez et al. 2016). Payan et al. (2008) uvádějí, že tento rezervoár vytvářejí i PAU.

Základními vrstvami kůže jsou epidermis, dermis a hypodermis (Horký a Čech 2011). Epidermální membrána je tvořena všemi vrstvami epidermis, tedy čtyřmi až pěti vrstvami: stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum a stratum corneum (Horký a Čech 2011). Svrchní vrstva epidermis (stratum corneum) je bohatá na lipidy a její hmotu tvoří především ceramidy (45-50 %) a látky s cholesterolovou strukturou (přibližně 25 %). Dalšími složkami jsou volné mastné kyseliny (10-15 %) a ostatní lipidy, z nichž významnou roli hrají zejména cholesterol-sulfát (Madison 2003).

Ostatní vrstvy epidermis jsou tvořeny vodným prostředím s enzymatickou aktivitou (Oesch et al. 2014). S ohledem na lipofilní charakter PAU lze předpokládat, že v epidermis budou tyto látky intenzivněji prostupovat ve vrstvě strata cornea. Ve vodném prostředí ostatních vrstev epidermis lze (v důsledku lipofily PAU) očekávat prostup pomalejší. Důležitým faktem je skutečnost, že ve vodném prostředí epidermis dochází k biotransformaci PAU, při které vznikají reaktivní intermediáty a volné radikály (bioaktivace), které mohou dále reagovat s makromolekulárními složkami tkání organismu (proteiny, DNA a RNA).

Na hranici mezi epidermis a dermis se nachází subpapilární arteriální a venózní pleteň. V situaci, kdy je tato pleteň dilatovaná, pronikají molekuly PAU a jejich metabolitů přes cévní stěny do systémové cirkulace a dále do tělních tkání (Cross a Roberts 2008). Zde pokračuje jejich biotransformace, včetně pochodů bioaktivačních (Nishifuji a Yoon 2013). V případech, kdy je subpapilární pleteň ve vazokonstrikci, procházejí PAU a jejich metabolity přes dermis až do oblasti podkožní cévní pleteně a teprve zde vstupují do systémové cirkulace (Cross a Roberts 2008; Jang et al. 2018).

Z uvedeného stručného přehledu vyplývá, že pro odhad množství PAU, které transdermálně proniklo do systémové cirkulace (a následně do tkání) je významným údajem odhad množství (PAU), které prostoupilo epidermis a dosáhlo hranice mezi epidermis a dermis (primární kontakt se subpapilární arteriální a venózní pleteně). Většina experimentů popisovaných v odborné literatuře je však založena na testování míry penetrace látek přes plnou kůži, prezentovanou komplexem epidermis, dermis a hypodermis (dosažení systémové cirkulace až v oblasti podkožní cévní pleteně). Je zřejmé, že testovací model s plnou kůží představuje, v porovnání s modelem samotné epidermis, výrazně silnější bariéru, která zpomaluje rychlost a intenzitu prostupu PAU do systémové cirkulace (Frasch et al. 2007; Kotingová et al. 2012).

Tloušťka lidské plné kůže se pohybuje v závislosti na lokalizaci mezi 0,4 až 4 mm, zatímco tloušťka lidské epidermis se pohybuje mezi 75 až 150 μm . Tloušťka epidermis prasečího boltece

se pohybuje mezi 60 a 85 μm (průměr 72 μm) (Jacobi et al. 2007). Na tloušťku plné kůže má vliv i přesnost její preparace od pod ní ležících struktur. V případě použití epidermální membrány je vliv preparace poměrně dobře potlačen.

V experimentech *in vitro* je míra a rychlost penetrace látek přes kožní bariéru vyjadřována veličinami Flux a Lag time. Flux představuje množství látky, které projde přes jednotkovou plochu kožní bariéry za jednotku času ($\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$), Lag time je doba za kterou se testovaná látka objeví v receptorové tekutině (látka prošla přes kožní bariéru a dosáhla oblastí cirkulace) (Forster et al. 2009).

Z pohledu odhadu zdravotních rizik dermální expozice PAU, založeného na odhadu množství PAU, které transdermálně pronikne do systémové cirkulace (vnitřní dávka), mohou data zjištěná na modelu plné kůže úroveň rizika podhodnocovat a zvyšovat tak stupeň nejistoty odhadu. Pro účely konzervativního odhadu zdravotního rizika, pracujícího s nejvýše možným, ale ještě reálným expozičním scénářem, by tedy měl mít vyšší výpovědní hodnotu údaj o množství PAU, které v reálném časovém horizontu může dosáhnout primární hranice systémové cirkulace (subpapilární arteriální a venózní pleteně) na rozhraní epidermis a dermis.

V odborné literatuře lze nalézt jen velmi omezené množství údajů o míře a rychlosti transdermální penetrace PAU. Přispět k diskusi k této problematice bylo jedním z cílů předkládané disertační práce.

1.8 Genotoxicita PAU

Poškození genetické informace (DNA) buněk, hraje důležitou roli v procesu karcinogenity a může být jednou z forem projevu toxicity obecně (Kim et al. 2013). Vzrůstající poškození DNA lze vidět v lidské populaci exponované znečištěnému ovzduší, radiaci a pesticidům. Mnoho studií popsalo vzrůstající poškození DNA v krevních buňkách pracovníků exponovaných organickým látkám, výfukovým plynům, azbestu, minerálním vláknům, kovům a pesticidům (Collins et al. 2014).

Poškození DNA, vedoucí k tvorbě dvouřetězcových zlomů, může vznikat přímou interakcí daného faktoru s vláknem DNA (ionizující záření) nebo nepřímo (UVC záření, alkylační látky) nebo v důsledku poruch enzymatických reparačních procesů. Během těchto procesů může docházet i ke konverzi jednořetězcových zlomů na dvouřetězcové (Natarajan a Palitti 2008).

Alkylační látky způsobují častěji vznik aberací v heterochromatinových regionech, přičemž alkylace může probíhat na bázích či fosfátu v molekule DNA. Kromě alkylace může být

poškození DNA způsobeno i inhibitory syntézy deoxyribonukleotidů (například cytosin arabinosidem), denaturací či degradací DNA (například aktinomycinem D), tvorbou labilní DNA a inkorporací cizorodých molekul (například PAU) (Natarajan 2002).

V závislosti na působícím inzultu se uplatňují různé cesty reparace DNA, jako je například: (1) excizní oprava nukleotidů či bází (nucleotide excision repair NER, base excision repair BER), (2) nehomologní spojování konců (non-homologous end joining NHEJ) či (3) homologní rekombinační oprava (homologous recombination repair HRR). Majoritní cesty reparace dvouřetězcových zlomů DNA v savčích buňkách zahrnují NHEJ a HRR. V případě reparace poškození DNA po expozici PAU (například atak BPDE a tvorba odpovídajících adduktů) se zdají být nejdůležitější cesty reparace DNA NER a HRR, přičemž NER zřejmě reprezentuje hlavní reparační mechanismus (Natarajan a Palitti 2008).

Obecně lze genotoxické látky rozdělit do dvou hlavních skupin: na klastogeny, které způsobují zlomy chromozomů, a na aneugeny, které ovlivňují dělení buněk a dělicí vřeténka a vedou k aneuploidii (Luzhna et al. 2013).

Klastogeny podle potřeby proběhnutí S fáze buněčného cyklu lze rozdělit na S-independentní, které ke vzniku chromozomálních zlomů nepotřebují S fázi (ionizující záření, bleomycin) a S-dependentní, po jejichž působení se zlomy objevují až během následujícího dělení po proběhnutí S fáze (UVC záření, alkylační látky, PAU) (Natarajan a Palitti 2008).

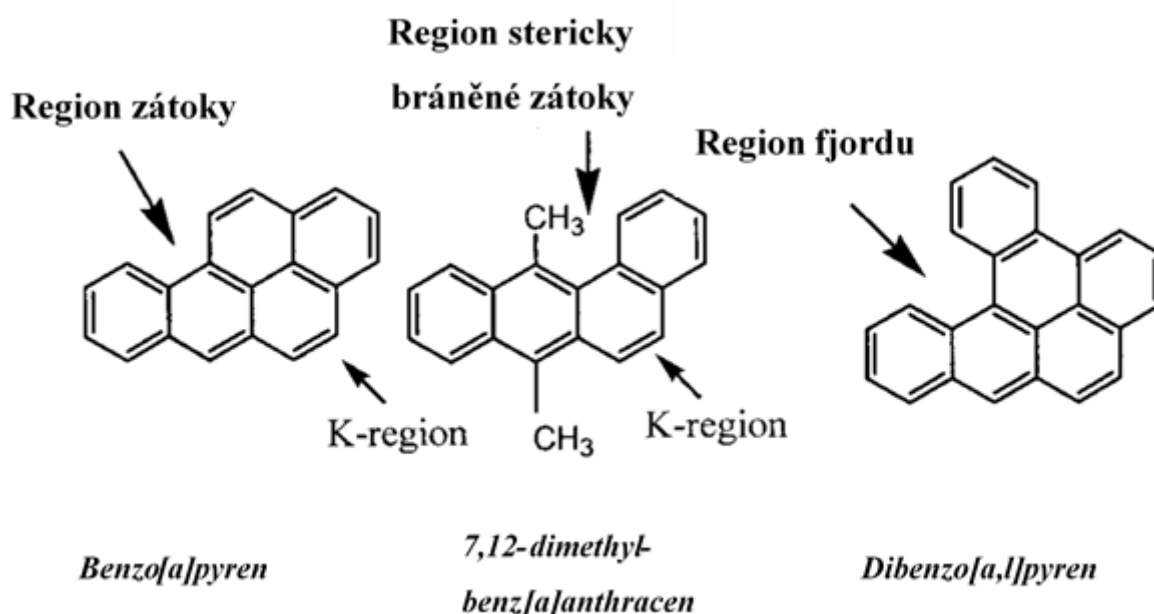
Mutace v genech, které se podílejí na reparaci DNA či tumor supresorových genech, představují hlavní příčinu hereditárních i sporadických nádorových onemocnění. Osudem buňky s chromozomální abnormalitou je (v závislosti na závažnosti poškození) smrt nebo méně pravděpodobně maligní transformace (Venkatesan et al. 2015).

Genotoxicita úzce souvisí s procesem karcinogeneze. Výzkum genotoxicity/karcinogenity PAU začal v třicátých letech 20. století, kdy Cook et al. (1933) úspěšně izolovali benzo[a]pyren (BaP) z kamenouhelného dehtu a demonstrovali, že sám indukuje nádory po opakované aplikaci na kůži myši. V šedesátých letech Brookes a Lawley (1964) popsali vztah mezi interakcí karcinogenních PAU s DNA. V sedmdesátých letech pak Baird a Brookes (1973) izolovali úspěšně PAU-DNA-addukty po enzymatické digesci DNA izolované z myši exponovaných tritiem značeným PAU.

Pro karcinogenní potenciál PAU je nezbytná jejich metabolická transformace (Flesher a Lehner 2016). S rostoucí molekulovou hmotností PAU klesá jejich akutní toxicita a roste karcinogenní

potenciál, jehož úroveň je významně závislá na struktuře molekuly (Kim et al. 2013). Bylo zjištěno (obrázek 5), že PAU s regionem zátoky, PAU s regionem fjordu a PAU s regionem stericky bráněné zátoky jsou látky s velmi silným karcinogenním potenciálem (Baird et al. 2005).

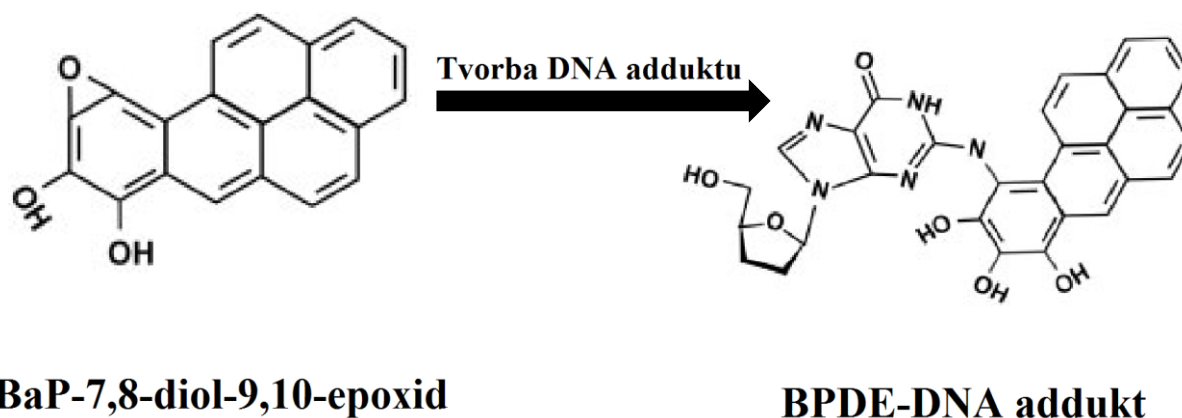
Geometrický tvar PAU ovlivňuje distribuci povrchového náboje a tím i reaktivitu dané molekuly. Molekuly s regionem fjordu nejsou planární a preferenčně se váží na adeninové nukleotidy, zatímco molekuly s regionem zátoky jsou planární a váží se na guaninové nukleotidy. Neplanární molekuly PAU mají nižší úroveň metabolické transformace, což snižuje jejich schopnost vazby na DNA a tvorby DNA-adduktů (Błaszczuk a Mielżyńska-Švach 2017).



Obr. 5 Struktury typu zátoka, stericky bráněná zátoka a fjord v molekule PAU (převzato z Baird et al. (2005))

Mezi PAU s prokázaným (skupina 1), pravděpodobným (skupina 2A) či možným (skupina 2B) karcinogenním potenciálem pro člověka jsou dle IARC řazeny benzo[a]pyren (1) (IARC 2012), dibenz[a,h]anthracen (2A), dibenzo[a,l]pyren (2A), cyklopenta[cd]pyren (2A) (IARC 2010), naftalen (2B) (IARC 2002), benz[a]anthracen (2B), benzo[b]fluoranthren (2B), benzo[j]fluoranthren (2B), benzo[k]fluoranthren (2B), benzo[c]phenanthren (2B), chrysen (2B), dibenzo[a,h]pyren (2B), dibenzo[a,i]pyren (2B), indeno[1,2,3-c,d]pyren (2B), 7H-dibenzo[c,g]karbazol (2B), 5-methylchrysen (2B) a benz[j]aceanthrylen (2B) (IARC 2010; IARC 2018). PAU mohou být kompletními karcinogeny, ale i iniciátory či promotory nádorů (Baird et al. 2005).

Schopnost látek vázat se na DNA buď přímo, nebo po metabolické aktivaci je považována za důkaz jejich mutagenního/karcinogenního potenciálu (Błaszczyk a Mielżyńska-Švach 2017). Především diol-epoxydy PAU jsou schopné vázat se kovalentně na atomy dusíku v molekule guaninu (méně pak adeninu a cytosinu) za vzniku cis i trans stabilních DNA-adduktů (obrázek 6) (Błaszczyk a Mielżyńska-Švach 2017; WHO 2010).



Obr. 6 Vazba BPDE na DNA (převzato z Moorthy et al. (2015))

Tvorba DNA-adduktů představuje premutační změnu. Většina adduktů je rozpoznána a odstraněna reparačním systémem. Neodstraněné addukty představují iniciaci bodové mutace (obvykle substituce či delece), která může být prvním krokem v rozvoji nádoru v důsledku aktivace pro-onkogenů (například KRAS onkogen) či inaktivace tumor-supresorových genů (například p53 tumor supresorový gen) (Błaszczyk a Mielżyńska-Švach 2017; Moorthy et al. 2015).

Přítomnost DNA-adduktů blokuje replikaci (blokace polymeráz) a redukuje reparaci DNA. Chyby v replikaci a reparaci DNA mohou vést ke vzniku mutace, která se po buněčném dělení může fixovat (Chakravarti et al. 2008). Obecně se udává, že redukce v množství DNA-adduktů vede k redukci rizika rakoviny (Flesher a Lehner 2016).

Při aplikaci PAU ve směsi může docházet k additivnímu, synergistickému nebo antagonistickému působení (Błaszczyk a Mielżyńska-Švach 2017). WHO (2010) uvádí, že dochází spíše ke snížení tvorby DNA-adduktů a také toxicity na základě antagonistických účinků jednotlivých PAU obsažených ve směsi a tím ke snížení karcinogenního i toxického potenciálu. Výsledný efekt významně závisí na složení směsi a na zastoupení jednotlivých

PAU. Je ovšem zřejmé, že predikce výsledného účinku směsi PAU na základě výsledků pokusů s jednotlivými PAU má omezenou spolehlivost (WHO 2010).

V experimentech byl prokázán karcinogenní účinek PAU po dermálním, perorálním, intraperitoneálním, intramamillárním a inhalačním podání, ovšem místo vzniku tumoru neodpovídalo vždy místu aplikace. Například po aplikaci PAU na kůži byl popsán nález nejen kožních papilomů a karcinomů, ale i nádorů jater (WHO 2010).

PAU s nízkým genotoxickým potenciálem pravděpodobně působí jako promotory ve vývoji nádorů negenotoxickým mechanismem. Např. fluoranthen se ukázal být silným inhibitorem gap-junction intercelulární inhibice, čímž umožňuje buňkám uniknout ze suprese růstu a působí jako promotor buněčné proliferace (Blaha et al. 2002).

Na základě řady epidemiologických studií WHO (2010) uvádí, že expozice BaP nad 1 ng/m^3 indukuje fragmentaci DNA. Genotoxické účinky BaP jsou závislé na dávce a se zvyšující se inhalační expozicí BaP se zvyšuje množství DNA-adduktů (Poirier 2016). Hladinu specifických DNA-adduktů lze použít nejen jako bioukazatel biologicky efektivní dávky, ale i jako biomarker účinku (Błaszczuk a Mielżyńska-Švach 2017). Guo et al. (2014) uvádějí, že ženy jsou za stejných expozičních podmínek citlivější ke genotoxickým účinkům PAU.

2 Testování genotoxicity

Pro testování genotoxicity se v humánních studiích používá nejčastěji periferní krev. Tu lze odebrat jako žilní krev, či ji získat z vpichu do bříška prstu jako kapilární krev. Využívá se buď plná krev, nebo frakce leukocytů izolovaná centrifugací pomocí hustotního gradientu. Použití lymfocytů je velmi výhodné v rámci biomonitoringu osob, protože životnost lymfocytů je tři až šest měsíců a cirkulují skrze všechny tkáně těla (Villarini et al. 2012). Jiní autoři uvádějí dobu života lymfocytů v případě nativních jeden až osm let a paměťových jeden až dvanáct měsíců (Farber et al. 2014). Některé subtypy např. $\text{CD8}^+\text{CD45RA}^+\text{CCR7}^-\text{CD28}^- \text{T}_{\text{EMRA}}$ mohou žít v průměru i 9762 dní (tedy více než 26 let) (Ladell et al. 2008). Lymfocytů je v lidském těle asi $500 \cdot 10^9$ ale pouze přibližně 2 % z tohoto počtu se nacházejí v periferní krvi. Neustále však dochází k cirkulaci lymfocytů mezi krví a lymfoidními orgány, což je velmi důležité při hodnocení expozice genotoxickým agens *in vivo*, kdy mohou být lymfocyty poškozeny v kterékoli části těla a následně zachyceny a analyzovány při odběru periferní krve. Běžně se lymfocyty nachází v krvi v G_0 fázi a nedělí se. Proto je k dělení lymfocytů potřeba stimulace mitogenem. B a T lymfocyty lze stimulovat k mitóze „pokeweed mitogenem“, T lymfocyty

fytohemagglutininem či konkanavalinem A (Johannes a Obe 2013). V kulturách periferních lymfocytů lze provádět testy detekující poškození DNA. Mezi nejčastěji používané testy patří test chromozomálních aberací, mikronukleus test, kometový test a test výměny sesterských chromatid (Johannes a Obe 2013).

Omezení výpovědnosti testů hodnotících genotoxický potenciál představují fenomény adaptivní odpovědi a chromozomální nestability, které se objevují jak v podmínkách *in vitro*, tak i v podmínkách *in vivo* (Natarajan 2002). Adaptivní odpověď je charakterizována jako stav, kdy dlouhodobá expozice prokazatelně genotoxickému faktoru není spojena s výrazným nárůstem poškození DNA. *In vivo* mechanismus adaptivní odpovědi popsali například Rossnerova et al. (2017), kteří pozorovali obdobné hladiny poškození DNA u osob trvale žijících v silně znečištěném prostředí (Ostravsko) v porovnání s osobami žijícími v běžně znečištěném prostředí (Praha). Přemístění osoby žijící v běžně znečištěném prostředí do prostředí silně znečištěného mělo za následek významný nárůst poškození DNA. Obdobné pozorování s nižší úrovní poškození DNA bylo popsáno i u skupiny bývalých pracovníků technologie zpracování uranu MAPE Mydlovary, ve srovnání s neexponovanou populací (Rossnerova et al. 2016). Autoři předpokládají, že na adaptivní odpovědi se podílejí epigenetické mechanismy (například methylace DNA), které se mohou vyvíjet již během prenatálního období (Rossnerova et al. 2017).

Chromozomální nestabilita je definována jako přetrvávání numerické anebo strukturální chromozomální abnormality v buňkách. Potenciální mechanismy vedoucí ke vzniku chromozomální (genomové) nestability zahrnují: (1) chybovou či neefektivní reparaci DNA, (2) defekty segregace chromozomu, (3) poruchy dělicího vřeténka, (4) DNA replikační stres a (5) zkrácení či dysfunkce telomer. Například poškození telomerických regionů DNA způsobené UV zářením či oxidačním stresem je refrakterní vůči reparaci (Venkatesan et al. 2015).

V předkládané disertační práci byl pro testování genotoxického potenciálu dermální expozice PAU použit mikronukleus test (MNT) a test chromosomálních aberací (CAT). Jejich detailní charakteristiky jsou uvedeny v kapitolách Metodika a Diskuse.

2.1 Mikronukleus test

MNT je považován za univerzální test, který lze použít při biomonitoringu osob s použitím různých cílových buněk, jako jsou lymfocyty, fibroblasty, epiteliální buňky (například buňky nosní či urinální) (Mateuca et al. 2012; Sabharwal et al. 2015). Mezi jeho výhody patří

rychlost, možnost automatizace a statistická výpovědní hodnota (Mateuca et al. 2006). Automatizace metody umožňuje analýzu velkého počtu buněk a odstraňuje chyby subjektivního hodnocení. Na druhou stranu však automatické systémy vyžadují rozsáhlou validaci, než mohou být plně využity v lidských biomonitorovacích studiích (Mateuca et al. 2012).

Hodnocení mikrojader (MN) ve dvoujaderných buňkách (DJB) pomocí „cytokinesis-block“ mikronukleus test (CBMN) představuje lepší indikátor zlomů vláken DNA (a dalšího poškození DNA), které se kumuluje v lymfocytech během G_0 fáze v podmínkách *in vivo*, ve srovnání s hodnocením MN v jednojaderných buňkách. Zatímco hodnocení MN v jednojaderných buňkách poskytuje informaci o nestabilitě genomu kumulované po mnoho let v kmenových buňkách a cirkulujících lymfocytech, hodnocení MN v DJB informuje o lézích, které se hromadily v buňce od poslední replikace *in vivo* (Kirsch-Volders a Fenech 2001).

CBMN test prováděný na periferních lymfocytech se stal nejlepším a preferovaným biomarkerovým testem pro hodnocení poškození lidské DNA *in vivo* (Fenech a Bonassi 2011; Speit et al. 2011) i proto, že skórování probíhá na buňkách, které prodělaly právě jednu mitózu po stimulaci mitogenem (Mateuca et al. 2012). CBMN je používán i v rámci genotoxického screeningu nových látek, materiálů a postupů v biologii, medicíně a nanotechnologiích (Luzhna et al. 2013). Představuje tak nejlépe validovanou a nejčastěji používanou metodu pro hodnocení MN v lidských buňkách nejen v rámci *in vitro* a *in vivo* genotoxických studií, ale i při hodnocení vlivu věku, pohlaví, environmentální expozice genotoxickým látkám, vlivu výživy a faktorů životního stylu (Fenech a Bonassi 2011). K jeho širokému rozšíření přispěla také relativně nízká cena, jednoduchost provedení i hodnocení a v základní verzi také možnost nefluorescenčního barvení (Rossnerova et al. 2016).

Zvýšení základní frekvence MN v periferních lymfocytech bylo v řadě studií (včetně International Human Micronucleus – HUMN Project) identifikováno jako prediktivní biomarker rizika rakoviny (Bonassi et al. 2011; Maffei et al. 2014; Nelson et al. 2017). Tvorba mikrojader má významné důsledky pro plasticitu genů nádorových buněk (Sabharwal et al. 2015). Právě indukce genomické nestability představuje klíčový prvek časně karcinogeneze, protože díky zvýšené proliferační kapacitě usnadňuje progresi poškozených buněk na buňky nádorové (Zhang et al. 2015). Odborná literatura rovněž uvádí, že počet MN v nádorových buňkách lze využít i jako marker radiosenzitivity nádorů (Huang et al. 2011). Někteří autoři

nalezli souvislost mezi hladinou MN a výskytem kardiovaskulárních chorob (Federici et al. 2008; Murgia et al. 2007).

Výhodou mikronukleus testu (ve srovnání s jinými testy detekujícími poškození DNA) je: (1) CBMN umožňuje hodnotit jakoukoli populaci buněk bez ohledu na karyotyp, (2) konečný bod je jednoduše identifikovatelný (dvoujaderná buňka), což poskytuje poměrně přesná data, (3) odpověď může být zjišťována po delší době, (4) je možné detekovat i látky, které poškozují mikrotubuly dělicího vřeténka (aneugenní látky) a (5) bazální frekvence MN je obvykle stabilní (Hayashi 2016). Další výhodou CBMN je i relativně dlouhé přetrvávání poškození DNA a simultánní detekci více molekulárních událostí, které vedou k poškození chromozomů a jejich nestabilitě. Například u testu γ -H2AX mizí „focusy“ z hlavních jader zhruba během šesti hodin po iradiaci γ -zářením, zatímco MN přetrvávají více než dvacet čtyři hodin (Crasta et al. 2012). Výhodou CBMN testu s použitím lymfocytů od exponované populace představuje dlouhá životnost některých lymfocytů umožňující kumulaci DNA lézí a jejich neschopnost se za běžných okolností dělit (Speit et al. 2011). Mezi nevýhody testu patří výskyt pseudo-mikrojader (Hayashi 2016) a dále možnost částečné reparace *in vivo* vzniklého DNA poškození během *ex-vivo* kultivace před transformací v MN. Může tedy docházet k redukci množství MN během *ex-vivo* kultivace (Speit et al. 2011).

Kromě detekce samotných MN je možné během CBMN detekovat i další jevy jako jsou chromatinové můstky a jaderné pupeny. Literární zdroje uvádějí, že zvýšení formace chromatinových můstků může být způsobeno například expozicí endogenním oxidantům (Umegaki a Fenech 2000), PAU (Duan et al. 2009), karcinogenům v cigaretovém kouři (El-Zein et al. 2008), ionizujícímu záření (Fenech 2010), oxidu vanadičného (Ehrlich et al. 2008) a objevují se také při deficitech selenu (Wu et al. 2009) či folátu (Fenech a Crott 2002).

Duan et al. (2009) uvádějí, že chromatinové můstky a jaderné pupeny v lymfocytech periferní krve mohou být použity jako indikátory poškození DNA v populaci exponované PAU. Zhang et al. (2015) popsali asociaci mezi výskytem MN, chromatinových můstků a jaderných pupenů v periferních lymfocytech a rizikem vzniku nádorového onemocnění.

2.2 Test chromosomálních aberací

CAT se používá jako biomarker expozice a účinku při hodnocení možného genotoxického působení různých látek v pracovním i environmentálním prostředí jak u skupin, tak i u jednotlivců. Zejména u směsí různorodých látek je výhodou nespecifičnost CAT, kdy počet

chromozomálních aberací (CA) odráží i interakce směsí xenobiotik s DNA buněk a je tak jediným důkazem přítomnosti a účinku xenobiotik při dlouhodobější expozici (AHEM 2007).

Sram et al. (2004) uvádí, že CAT provedený na periferních lymfocytech odráží expozici klastogenním agens zpětně za dobu tří až šesti měsíců. CAT lze použít i pro ověření správného stanovení přípustných pracovních expozičních limitů (PEL) (Sram et al. 2004). CA mohou pomoci predikovat prognózu onemocnění či stárnutí organismu, pokud jsou zkombinovány s dalšími molekulárními či fyziologickými parametry (Venkatesan et al. 2015). Mateuca et al. (2012) předpokládá, že vyšší frekvence strukturálních CA může sloužit pro predikci zvýšeného rizika nádorových onemocnění, bez ohledu na to, co je příčinou tohoto nárůstu. Rovněž Vodenkova et al. (2015) předpokládají, že CA mohou sloužit jako ukazatel rizika vzniku a rozvoje nádorového onemocnění. Detekce CA (zejména u dicentrických chromozomů) v periferních lymfocytech se celosvětově úspěšně používá i k odhadu absorbované dávky při radiačních nehodách. Nejúspěšnější je při dávkách mezi 0,5 až 1,5 Gy (Natarajan 2002).

Při skupinovém hodnocení (minimálně 10 osob) je průměrná hladina aberovaných buněk do 2 % považována za spontánní frekvenci. Hodnoty mezi 2 a 4 % indikují zvýšenou expozici genotoxickým faktorům a při nálezů nad 4 % aberovaných buněk můžeme mluvit o vysoké expozici genotoxickým faktorům, která pro vnímavého jedince představuje zvýšené riziko vzniku maligních onemocnění či teratogenních účinků pro jeho potomky (AHEM 2007).

Při individuálním hodnocení svědčí opakované překračování 5% hladiny aberovaných buněk o vysoké expozici genotoxickým faktorům nebo o zvýšené vnímavosti jedince vlivem genetického polymorfismu, o snížené kapacitě reparačních mechanismů nebo o poruše aktivity imunitního systému (AHEM 2007). Zvýšený výskyt polyploidii a dalších forem aneuploidii tak nemusí být nutně spjat pouze s genotoxickým působením vnějšího faktoru (Registre a Proudlock 2016).

CAT je metoda relativně levná, ale náročná na čas a zkušenosti hodnotitele. Při hodnocení CAT se uplatňuje i subjektivní komponenta hodnotitele, kdy i zkušení hodnotitelé se liší v interpretaci stejné metafazické buňky (Registre a Proudlock 2016). CAT není vhodná pro detekci numerických aberací ve smyslu aneuploidii, kde se může jednat o arteficiální ztrátu chromozomu/ů v důsledku zpracování. Proto lze standardní verzi CAT použít pouze pro detekci polyploidii (Registre a Proudlock 2016). Rovněž při standardním provedení nelze detekovat balancované translokace (Clare 2012). Dosud se nepodařilo vytvořit metodu automatického hodnocení. Je možné pouze semiautomatické hodnocení pomocí vyhledávače metafazických

buněk. Možnou nevýhodou je také omezená specificita testu, kdy CAT není schopen odlišit účinky jednotlivých typů mutagenů (Mateuca et al. 2012).

3 Psoriáza a možnosti její léčby

Psoriáza je chronické neinfekční relabující a remitující imunitně zprostředkované zánětlivé onemocnění, které postihuje 0,5 až 11,4 % dospělého obyvatelstva západních zemí bez predilekce pohlaví (Michalek et al. 2017; Parisi et al. 2013). Psoriáza se nevyskytuje u Eskymáků a domorodých indiánských kmenů ve Střední a Jižní Americe (Drlík 2015). V České republice bylo v roce 2015 celkem 95 797 osob trpících psoriázou (48 257 mužů a 47 540 žen) (Národní zdravotnický informační systém - ambulantní péče 2016) avšak klinici odhadují na 200 tisíc pacientů (Drlík 2015).

Onemocnění postihuje kůži, nehty a klouby (Michalek et al. 2017) a je spojeno s řadou komorbidit (kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus, metabolický syndrom, non-alkoholická steatohepatitida, nespecifické střevní záněty, nádorová onemocnění, deprese a úzkost) (Ni a Chiu 2014). Obdobně jako diabetu se i první příznaky psoriázy nejčastěji objevují u osob ve věku 16 až 22 let a 57 až 60 let. U první skupiny je pozorována asociace s Human Leukocyte Antigen (HLA; zejména HLA-Cw6), zatímco u druhé skupiny nikoli (Drlík 2015). Conrad a Gilliet (2018) uvádí, že až 90 % pacientů první skupiny je HLA-Cw6 pozitivních.

V patogenezi stabilní plakovité formy se uplatňuje produkce tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) a interleukinu IL-23 aktivovanými kožními dendritickými buňkami, což následně aktivuje Th₁₇ a Tc₁₇ lymfocyty. Aktivované T-lymfocyty prolifерují a migrují do epidermis, kde rozpoznají epidermální autoantigeny, jako je keratin 7, antimikrobiální peptid LL₃₇ exprimovaný keratinocyty a melanocytární antigen ADAMTSL₅, což má za následek expresi IL-17 a IL-22. Cytokiny produkované Th₁₇ lymfocyty pak indukují hyperproliferaci epidermis a aktivaci keratinocytů produkujících chemokiny a antimikrobiální peptidy, které se podílejí na udržení zánětlivého procesu (Conrad a Gilliet 2018). Výsledkem uvedeného procesu je hyperkeratóza a parakeratóza, které klinicky vedou k tvorbě ostře ohraničených, kulatých či oválných, suchých, červených a vyvýšených plaků, pokrytých v případě stabilní plakovité formy stříbřitě bílými šupinami (Chandra et al. 2015). Intenzitu a rozsah onemocnění lze hodnotit na základě indexu PASI (Psoriasis Area and Severity Index, rozsah 0–72), BSA (Body

Surface Area, rozsah 0–100%) či DLQI (Dermatology Life Quality index, rozsah 0–30) (Drlík 2015).

V léčbě psoriázy se v prvním kroku uplatňuje topická léčba a fototerapie. Bývají používány dehtové přípravky (s vysokým obsahem PAU), dithranol, steroidy, analogy vitamínů D a A, lokální imunomodulátory a excimerový laser (308 nm) (Drlík 2015; Obstová 2016).

Levnou, osvědčenou a vysoce účinnou metodou léčby je Goeckermanova terapie (GT), která kombinuje topickou aplikaci farmaceutického dehtu s expozicí UVA a UVB záření. Problémem jsou možné vedlejší účinky léčby, ke kterým patří zejména účinky genotoxické a imunotoxické. Za tyto účinky jsou zodpovědné jak PAU, tak i UV záření. Jak bylo uvedeno v kapitole o genotoxicitě PAU, velký počet PAU patří dle IARC do skupiny 2A (pravděpodobné lidské karcinogeny), benzo[a]pyren dokonce do skupiny 1 (prokázané lidské karcinogeny (IARC 2010; IARC 2018)). Rovněž UV záření bylo dle IARC zařazeno do skupiny 1 (IARC 2018). Závěry odborné literatury o míře rizika genotoxických účinků vysoce účinné GT zatím nejsou jednotné. Některé studie toto riziko potvrzují, jiné jej považují za akceptovatelné. Přispět k diskusi k této problematice bylo jedním z cílů předkládané disertační práce.

V praxi se také osvědčila fototerapie úzkopásmovým UVB zářičem (UVB 311 nm) navozující delší remisi než širokopásmový UVB záření a mající méně nežádoucích účinků (Drlík 2015). Tuto terapii lze kombinovat s topickou aplikací dehtu, cignolinu, ichtamolu, analogů vitamínu D či etretinátu, případně i se solnou koupelí (balneofototerapie) (Drlík 2015; Obstová 2016).

V jiných případech lze použít fotochemoterapii s topickým či systémovým podáním fotosenzibilizátoru psoralenu a UVA záření (PUVA), kterou lze kombinovat s dithranolem, etretinátem, topicky steroidy či calcipotriolem. V případě nedostatečné odpovědi je možná i kombinace PUVA a UVB 311 nm či methotrexátem (Drlík 2015). V současné době se ovšem v důsledku vedlejších nežádoucích účinků použití PUVA omezuje (Obstová 2016). Účinná je také klimaterapie, zejména thalassoterapie (přímořská léčba), kde se uplatňuje kombinace pobytu na čistém vzduchu, slunečního záření, změny stravy, psychického a fyzického odpočinku případně i s koupáním v mořské vodě (Drlík 2015; Obstová 2016).

Systémová terapie je využívána až při selhání topické léčby či fototerapie nebo u pacientů s velkým rozsahem onemocnění, psoriatickou erythrodermií, pustulózní či artropatickou psoriázou. K systémové terapii psoriázy se používá methotrexát, retinoidy či cyklosporin A (Obstová 2016). Systémové podávání kortikosteroidů se využívá pouze u generalizované

pustulózní psoriázy, nekontrolované erythrodermie a těžké psoriatické arthropatie. V našich podmínkách se spíše výjimečně používají fumaráty, azathioprin, mycofenolát mofitin, sulfasalazin, tacrolimuc a pimecrolimus (Drlík 2015).

Při neúčinnosti či netoleranci jiných metod léčby lze aplikovat biologickou léčbu. Při terapii psoriázy se využívají preparáty s účinkem proti TNF- α či selektivně působící proti interleukinům IL-12, IL-23 či IL-17 (Drlík 2015). Dále se začínají využívat i preparáty působící proti IL-22, IL-1 či IL-36 (Conrad a Gilliet 2018). Ve všech případech je ale velmi důležitá komplexní léčba zahrnující úpravu životosprávy, psychologické a sociální aspekty a fyzický odpočinek (Obstová 2016).

4 Cíle disertační práce

STÁVAJÍCÍ STAV: Polycyklické aromatické uhlovodíky představují zdravotně závažnou skupinu látek, které se běžně vyskytují v životním a pracovním prostředí. Dermální forma expozice může představovat velmi významný příspěvek k celkové zátěži organismu a někteří autoři odhadují její podíl u závažných expozic až na téměř polovinu z celkově absorbované dávky PAU. V rozporu s touto skutečností byla dermálním expozicím PAU dosud věnována relativně malá pozornost, a proto v současnosti **disponujeme jen omezeným množstvím toxikologických údajů o rychlosti a intenzitě prostupu těchto látek do systémové cirkulace, jež by bylo možné využít pro odhady úrovní souvisejících zdravotních rizik.**

Specifickou formu dermálních expozic polycyklickým aromatickým uhlovodíkům představují terapie některých kožních onemocnění (například psoriázy), při kterých jsou používány preparáty s jejich vyšším obsahem. Příkladem může být klinicky velmi účinná Goeckermanova terapie psoriázy, jejíž součástí je dermální aplikace farmaceutického kamenouhelného dehtu, obsahujícího polycyklické aromatické uhlovodíky. **Hodnocení míry zdravotních rizik, vyplývajících z použití polycyklických aromatických uhlovodíků v Goeckermanově terapii, zatím nevykazují uspokojivou míru konzistence.** Někteří autoři zvýšené riziko potvrzují, někteří jej považují za nízké až zanedbatelné.

CÍLE: Cílem předkládané disertační práce bylo přispět k rozšíření poznatků v obou výše uvedených oblastech bádání, týkajících se **(1) odhadů míry prostupu (rychlosti a intenzity) vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků přes kůži** (trans-epidermální absorpce) při experimentální expozici *in vitro* a **(2) odhadů míry genotoxicity** (vybrané nebezpečnosti/rizika), souvisejícího s klinickou dermální aplikací farmaceutického dehtu (obsahujícího polycyklické aromatické uhlovodíky) v rámci Goeckermanovy terapie u pacientů s psoriázou. Genotoxický účinek byl vybrán z důvodu jeho mimořádně vysoké úrovně nebezpečnosti.

5 Metody a soubor nemocných

5.1 Testování trans-epidermální absorpce vybraných PAU

5.1.1 Epidermální membrána

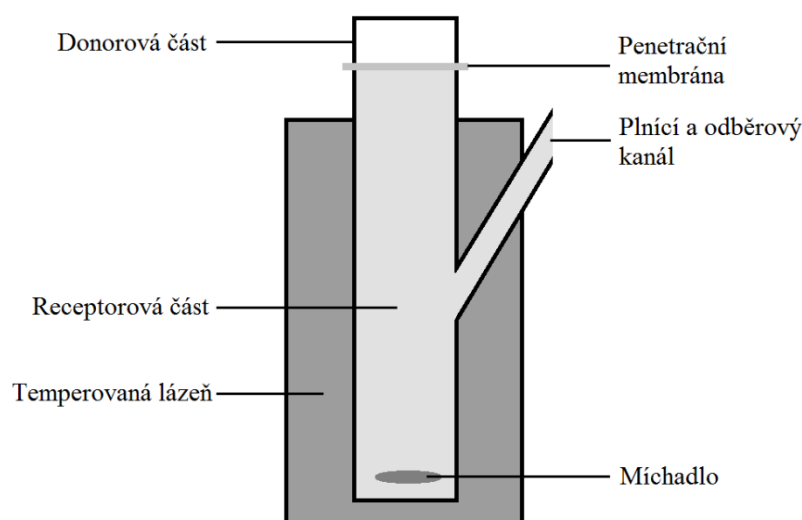
V experimentech byla použita epidermální membrána z dorzální strany ušního boltce prasete domácího, která je považována za vhodnou náhradu lidské epidermální membrány (Szura et al. 2014). Nespařené ušní boltce byly získány v místních jatkách a zpracovány během 24 hodin od usmrcení zvířete (do laboratoře byly transportovány na ledu). Boltce byly omyty vlažnou (tekoucí) vodou a ostříháním zbaveny viditelných chlupů. Skalpelem a pinzetou byla na dorzální straně boltce odpreparována kůže od chrupavky. Z částí kůže bez viditelného poškození (exkoriace, erytém) byly nastříhány vzorky 4x4 cm, které byly ihned na dvě minuty ponořeny do destilované vody o teplotě 61 °C (Esposito et al. 2014). Po vyjmutí z lázně byly ze vzorků odpreparovány epidermální membrány o tloušťce okolo 70 μm, zabaleny do tenké hliníkové folie a do doby zpracování (do 24 hodin) uskladněny při 4 °C. Dosud nebyly stanoveny hodnoty objektivních parametrů integrity epidermální membrány, analogické k parametrům integrity plné nebo dermatomované kůže, jako je například transepidermální ztráta vody (transepidermal water loss; TEWL) nebo změny kožního odporu (transdermal electrical resistance; TER), a proto bylo posouzení zachování integrity epidermální membrány pouze vizuální.

5.1.2 Testované PAU

Pro experimenty byly vybrány naftalen (NAP), fenanthren (PHE), pyren (PYR) a benzo[a]pyren (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo). Výběr byl řízen závažností a/nebo mírou zastoupení daného uhlovodíku v běžně se vyskytujících směsích PAU. Na povrch vzorků epidermální membrány byly PAU aplikovány ve formě přesycených roztoků (maximální dávky), připravovaných postupným rozpouštěním příslušného uhlovodíku ve dvou mililitrech isopropyl-myristátu (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo). Rozpouštění probíhalo za laboratorní teploty s použitím laboratorní třepačky (1500 rpm; 2 min). Takto připravené donorové roztoky byly uchovávány do doby aplikace (do 24 hod) v temnu při laboratorní teplotě. Bezprostředně před aplikací (analýzou) byly donorové roztoky odstředěny ve skleněných kónických zkumavkách (650 x g; 10 min) a supernatant byl zfiltrován skrze teflonový filtr o porozitě 0,2 μm.

5.1.3 Expoziční zařízení a odběry vzorků receptorové tekutiny

V experimentu byly použity 10ml vertikální statické difúzní komůrky dle Franze (obrázek 7), vybavené magnetickým míchadlem (Franz 1975). Vzorky epidermální membrány byly vkládány do horní části komůrky, zatímco spodní část komůrky byla naplněna receptorovou tekutinou (4% albumin v PBS s přidavkem 1 % penicilinu a streptomycinu). V experimentu byl použit bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo), penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo) a PBS pufr (Merck, Darmstadt, Německo). Absorpční plocha vzorku epidermální membrány byla omezena výřezem v horní části komůrky a činila 1,77 cm².



Obr. 7 Schéma vertikální statické difúzní komůrky dle Franze

V souladu s požadavky European Food and Safety Authority (EFSA) (2012) a European Commission - Scientific Committee on Consumer Safety (SCCP) (2010) byly v jednotlivých pokusech použity epidermální membrány od čtyř dárců. Každý PAU byl testován ve vícenásobném opakování (2–3) na čtyřech různých vzorcích epidermálních membrán (celkem 10 komůrek pro každý PAU). Před aplikací donorového roztoku byly komůrky s membránami temperovány 60 min ve vodní lázni z důvodu zajištění jejich hydratace a teploty 32±1 °C.

Na povrch membrán bylo aplikováno 100 µl příslušného donorového roztoku (experiment byl prováděn bez okluze). Receptorová tekutina byla v pravidelných intervalech odebírána injekční stříkačkou (jehla 0,8x12 cm; objem stříkačky 2 ml) přes boční raménko ve spodní části komůrky. Pro každou komůrku byla použita nová jehla i stříkačka. Při každém odběru bylo odebráno 0,6 ml receptorové tekutiny, která byla ihned zamrazena na -20 °C v tmavých skleněných „vialkách“. Odebraný objem tekutiny byl nahrazen stejným objemem čisté

receptorové tekutiny. V komůrkách testujících absorpci naftalenu, fenanthrenu a pyrenu byly odběry prováděny v časech 10 min, 30 min, 1 hod, 4 hod a 24 hod od aplikace donorového roztoku. V komůrkách testujících benzo[a]pyren byly odběry prováděny v časech 1 hod, 4 hod, 22 hod, 26 hod a 48 hod od aplikace donorového roztoku.

5.1.4 Analýza vzorků receptorové tekutiny

Koncentrace testovaných PAU ve vzorcích receptorové tekutiny byly stanoveny vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s fluorescenční detekcí. Chromatografické analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu Shimadzu (Kjóto, Japonsko), složeného z čerpadla LC-20AD, opatřeného čtyřcestným nízkotlakým ventilem a vakuovým odplyňovačem DGU-20A5, autosampleru SIL-20AC, termostatu kolon CTO-20AC, fluorescenčního detektoru RF-20AXL a řídicího systému CBM-20A. Pro řízení, záznam a vyhodnocení dat byl použit software LC-solution.

Pro přípravu vzorků bylo použito odmaštěné skleněné laboratorní nádobí (pro odmaštění byl použit 5% roztok hydroxidu sodného v methanolu) a 1,5ml polypropylenové zkumavky Eppendorf PP-3810X (Eppendorf AG, Hamburk, Německo).

Zásobní roztoky naftalenu (10 mg/25 ml), fenanthrenu (13 mg/25 ml), pyrenu (15 mg/50 ml) a benzo[a]pyrenu (9 mg/25 ml) byly připraveny rozpuštěním jednotlivých PAU v acetonitrilu pro HPLC (Merck, Darmstadt, Německo). Stabilita roztoků umožňovala jejich použitelnost po dobu jednoho týdne (skladování při 4 °C). Pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků 50% roztokem acetonitrilu v destilované vodě. Standardy pro sestavení kalibračních křivek byly připraveny ředěním pracovních roztoků receptorovou tekutinou. Vzorky standardů a kontrolní vzorky byly zpracovány a analyzovány obdobně jako dále popsané vzorky receptorové tekutiny.

Odebrané vzorky receptorové tekutiny byly skladovány při teplotě -20 °C. Před zpracováním byly temperovány na laboratorní teplotu (30 min) a následně po dobu dvou minut třepány intenzitou 1500 rpm (třepačka Benchmark, Edison, USA). Do polypropylenových zkumavek (1,5ml) bylo pipetováno 20 µl vzorku receptorové tekutiny a 1000 µl acetonitrilu. Obsah zkumavky byl promíchán na laboratorní třepačce (Heidolph, REAX Control, Německo; 30 s) a inkubován 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byl obsah zkumavky odstředěn (Hettich, Rotina 380, Německo; 11 290 x g, 20 min, 22 °C) a 300 µl supernatantu bylo přeneseno do insertu šroubovací „vialky“ s teflonovým septem.

Pro vlastní analýzu byla použita kapalinová chromatografie (HPLC). PAU byly separovány na koloně Nucleodur 100-3 C18 ec, 125 x 3 mm, 3 µm (Macherey-Nagel, Düren, Německo) při 25 °C za použití gradientové eluce. Mobilní fázi A byla směs acetonitrilu a vody (25:75, v/v), mobilní fázi B byl 100% acetonitril s přidavkem koncentrované kyseliny octové (100:0,2, v/v). Objem dávkovaného vzorku byl 10 µl, průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min. PAU byly monitorovány fluorescenčním detektorem, koncentrace byly určeny z kalibrační křivky. Parametry průběhu HPLC analýz shrnuje tabulka 1.

Tab. 1 Parametry průběhu HPLC analýz

Naftalen		Fenanthren	
λ (excitace)	275 nm	λ (excitace)	248 nm
λ (emise)	330 nm	λ (emise)	370 nm
0,01 min	48 % B	0,01 min	48 % B
5,00 min	48 % B	5,00 min	48 % B
10,00 min	92 % B	25,00 min	92 % B
15,00 min	92 % B	28,00 min	92 % B
15,01 min	48 % B	28,50 min	48 % B
20,00 min	STOP	38,00 min	STOP
Pyren		Benzo[a]pyren	
λ (excitace)	270 nm	λ (excitace)	248 nm
λ (emise)	390 nm	λ (emise)	410 nm
0,01 min	48 % B	0,01 min	48 % B
5,00 min	48 % B	5,00 min	48 % B
17,00 min	92 % B	25,00 min	92 % B
22,00 min	92 % B	28,00 min	92 % B
22,01 min	48 % B	28,50 min	48 % B
26,00 min	STOP	38,00 min	STOP

5.1.5 Zpracování dat

Základní statistické výpočty byly provedeny v programu MS Excel 2013. K výpočtu charakteristik absorpce (Flux a Lag time) z experimentálních dat byl použit námi vytvořený počítačový program SAMPA (Bezrouk et al. 2017).

5.2 Goeckermanova terapie psoriázy

5.2.1 Goeckermanova terapie (GT)

GT zahrnuje kombinaci topické aplikace farmaceutického kamenouhelného dehtu s vysokým obsahem PAU v masťovém základu (FD) s celotělovou iradiací UV zářením. V rámci studie, popisované disertační prací byly použity tři koncentrace FD v masťovém základu (5%, 4% a 3%) a dva celotělové UV zářiče. Celotělový UV1 zářič (Chirana 397, Chirana Group a.s., Česká Republika) emitoval UVA (320–400 nm) a UVB (280–320 nm) záření, zatímco celotělový UV2 zářič (Kabinový zářič UV 7002, Waldmann, Německo) emitoval UVB záření o vlnové délce 310–315 nm.

Dehet byl na psoriatická ložiska aplikován v odpoledních nebo večerních hodinách, ráno byl odstraněn pomocí olejové koupele a pacient byl celotělově ozářen po dobu 1–20 minut, v závislosti na pokročilosti a snášenlivosti terapie. Závažnost onemocnění byla hodnocena na základě PASI skóre (Malkic Salihbegovic et al. 2015).

Byly stanoveny koncentrace 16 vybraných PAU ve směsném vzorku farmaceutických dehtů (FD), které byly použity v popisované studii. PAU byly vybrány dle doporučení US EPA a jejich analýza byla provedena pomocí plynové chromatografie (GLC). Detaily analýzy jsou popsány v publikaci Borska et al. (2014). Výsledky shrnuje tabulka 2. Bylo zjištěno, že 1 g FD obsahuje v průměru 9,546 mg PAU (součet 16 vybraných PAU). Ve 100 g 5% FD bylo tedy obsaženo v průměru 47,7 mg vybraných PAU, ve 100 g 4% FD 38,2 mg vybraných PAU a ve 100 g 3% FD 28,6 mg vybraných PAU.

Tab. 2 Obsah 16 vybraných PAU v použitém farmaceutickém dehtu a jejich klasifikace dle IARC (2018)

PAU	IARC klasifikace	mg/g	PAU	IARC klasifikace	mg/g
Benzo(a)pyren	1	0,008	Acenaften	3	0,104
Dibenz(a,h,)anthracen	2A	0	Anthracen	3	2,494
Benz(a)anthracen	2B	0	Benzo(g,h,i)perylene	3	0
Benzo(b)fluoranthen	2B	0	Fluoranthen	3	0,413
Benzo(k)fluoranthen	2B	0	Fluoren	3	0,299
Chrysen	2B	0,028	Fenanthren	3	2,520
Indeno(1,2,3-c,d)pyren	2B	0	Pyren	3	0,241
Naftalen	2B	3,286	Acenafthylen	-	0,153

5.2.2 Sledovaný soubor pacientů s psoriázou léčených GT

Studie se zúčastnilo celkem 173 pacientů (99 mužů a 74 žen) ve věku 18 až 82 let, trpících chronickou stabilní plakovitou formou psoriázy. Pacienti byli léčeni GT v letech 2004 až 2017 na Klinice nemocí kožních a pohlavních, Fakultní nemocnice Hradec Králové. Do studie nebyli zahrnuti pacienti, kteří byli v posledních třech měsících před hospitalizací vystaveni významné expozici PAU, UV či radiačnímu záření, genotoxickým látkám či v této době prodělali virózu. Fakta, související s touto kontraindikací, byla zjišťována pohovorem s vyplněním dotazníku. Studie probíhala v rámci programů UK PRVOUK P37/09 a PROGRES Q40/09 a byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové. Každému pacientovi byly poskytnuty informace o studii a každý pacient, zařazený do studie, poskytl podepsaný informovaný souhlas. Participace pacientů ve studii byla zcela dobrovolná (s možností okamžitého ukončení účasti ve studii bez udání důvodu).

Pacienti byli rozděleni (podle použité formy GT) do čtyř skupin. Skupinu 1 tvořilo 32 pacientů (15 mužů a 17 žen, průměrný věk 47,15±16,45 let, 13 kuřáků) léčených 4% FD a UV2 zářičem po dobu 3 až 18 dní. Rozsah postižení psoriázou na počátku GT byl 18 až 58 % tělesného povrchu. Pacienti byli přijímáni v lednu až červnu. U této skupiny byl proveden CAT i MNT.

Skupinu 2 tvořilo 20 pacientů (13 mužů a 7 žen, průměrný věk 44,30±14,26 let, 12 kuřáků) léčených 4% FD a UV1 zářičem po dobu 3 až 18 dní. UV záření bylo aplikováno celkem po dobu 3 až 112 min. Rozsah postižení psoriázou na počátku GT byl 23 až 58 % tělesného povrchu. Pacienti byli přijímáni v září až květnu. U této skupiny byl proveden CAT.

Skupinu 3 tvořilo 72 pacientů (45 mužů a 27 žen, průměrný věk 41,58±17,09, 36 kuřáků) léčených 5% FD a UV1 zářičem 3 až 31 dní. UV záření bylo aplikováno celkem po dobu 6 až 240 min. Rozsah postižení psoriázou na počátku GT byl 11 až 76 % tělesného povrchu. Pacienti byli přijímáni v září až červnu. U této skupiny byl proveden CAT.

Skupinu 4 tvořilo 49 pacientů (26 mužů a 23 žen, průměrný věk 44,34±18,75 let, 20 kuřáků) léčených 3% FD a UV1 zářičem po dobu 3 až 22 dní. UV záření bylo aplikováno celkem po dobu 5 až 220 min. Rozsah postižení psoriázou na počátku GT byl 11 až 66 % tělesného povrchu. Pacienti byli přijímáni v září až červnu. U této skupiny byl proveden CAT.

Podrobně jsou vztahy mezi charakteristikami skupin popsány v kapitole Výsledky.

Od všech pacientů odebrány vzorky periferní krve z kubitální žíly (4 ml) před zahájením a po ukončení GT. Vzorky byly odebírány do vakuových zkumavek s heparinátém litným (VACUETTE® TUBE 4 ml LH Lithium Heparin, Greiner Bio-One GmbH, Rakousko). Vzorky krve byly označeny a uchovávány v chladu (+4 °C až +8 °C) do doby analýzy (do 24 hodin po odběru).

5.3 Mikronukleus test

Mikronukleus test byl prováděn dle modifikace metody AHEM (2003) a metody Kmochova et al. (2016). Test byl na Ústavu hygieny a preventivního lékařství zaveden jako test zcela nový (jako součást jednoho z cílů disertační práce) a z tohoto důvodu byl detailní popis námi modifikované metodiky zařazen do kapitoly Výsledky.

5.4 Chromozomální aberace

Test chromozomálních aberací (CAT) byl prováděn dle modifikované metodiky (AHEM 2007).

5.4.1 Materiál, přístroje a zařízení

Pro realizaci CAT byly použity následující chemikálie a spotřební materiál. RPMI 1640 (with L-glutamine and sodium bicarbonate) (kat.č. R8758, Sigma-Aldrich, USA), Phytohemagglutinin, M form (PHA-M) (kat. č. 10576015, Gibco™ by Life technologies, USA), Bovinní sérum pro TK (Bioveta, Ivanovice na Hané), Colcemid roztok 10 µg/ml, sterile filtered (kat. č. 47253.01, Serva, Německo). Methanol, p.a. (Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové), Kyselina octová 99%, p.a. (Penta, Praha), Chlorid draselný, p.a. (Lachema, Brno), Giemsa-Romanowski roztok (Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové), kyselina sírová min. 95%, p.a. (Lachema, Brno), dichroman draselný, p.a. (Lachema, Brno), demineralizovaná voda.

Injekční stříkačky 20 ml, injekční jehly 1,2x40 mm (růžové), špičky k automatickým pipetám 100-1000 μ l a 1-10 ml, Pasteurova pipeta 3 ml plastová, podložní skla, skleněné zkumavky s kónickým dnem o objemu asi 10 ml, skleněné kádinky, zásobníky na mikroskopické preparáty.

Z přístrojů a zařízení byly použity kombinovaná chladnička (4 °C až 10 °C) s mrazničkou (od -20 °C) (BEKO, Turecko), biohazard box TelStar Bio-II-A/G (TelStar, Španělsko), stolní centrifuga EBA 270 (Hettich, Německo), biologický termostat (Biological thermostat BT 50), Autokláv PS 20A (Chirana), analytické váhy HM-120 (AND, Japonsko), automatické pipety Proline plus 100-1000 μ l a 1-10 ml (Biohit-Sartorius, Německo), mikroskop B-383Pli (Optika Microscopes, Itálie), kamera k mikroskopu OPTIKAM PRO 5LT (Optika Microscopes, Itálie) a germicidní zářivky.

K mytí skla byla použita směs připravená smícháním 100 g dichromanu draselného a 1 000 ml kyseliny sírové. Ke kultivaci lymfocytů bylo použito 7,5 ml kultivačního média, skládajícího se z RPMI 1640 média, 24,7 % fetálního bovinního séra pro tkáňové kultury a 2,7 % fytohemaglutininu. Ke zpracování kultur byl použit hypotonický roztok chloridu draselného, připravený rozpuštěním 0,55 g KCl ve 100 ml demineralizované vody. Fixace buněk byla provedena pomocí fixačního roztoku č. 1, skládajícího se z 92 ml demineralizované vody, 3 ml methanolu a 5 ml kyseliny octové, fixačního roztoku č. 2 (methanolu) a fixačního roztoku č. 3, připraveného z 9 ml methanolu a 3 ml kyseliny octové. Suché preparáty pak byly obarveny 5% roztokem Giemsa-Romanowski v demineralizované vodě.

5.4.2 Laboratorní postup

Mytí podložních skel bylo shodné s mytím skel pro MNT. Podložní skla byla po dobu minimálně 24 hod ponořena do chromsírové směsi, následně byla třikrát propláchnuta kohoutkovou vodou a pod touto (tekoucí) vodou ponechána minimálně 2 hodiny. Poté byla třikrát opláchnuta v demineralizované vodě a ponechána v čisté demineralizované vodě do druhého dne, kdy byla vyjmuta, vyleštěna látkou nepouštějící vlákna, uložena do boxu na mikroskopické preparáty a uchována v mrazničce do doby použití.

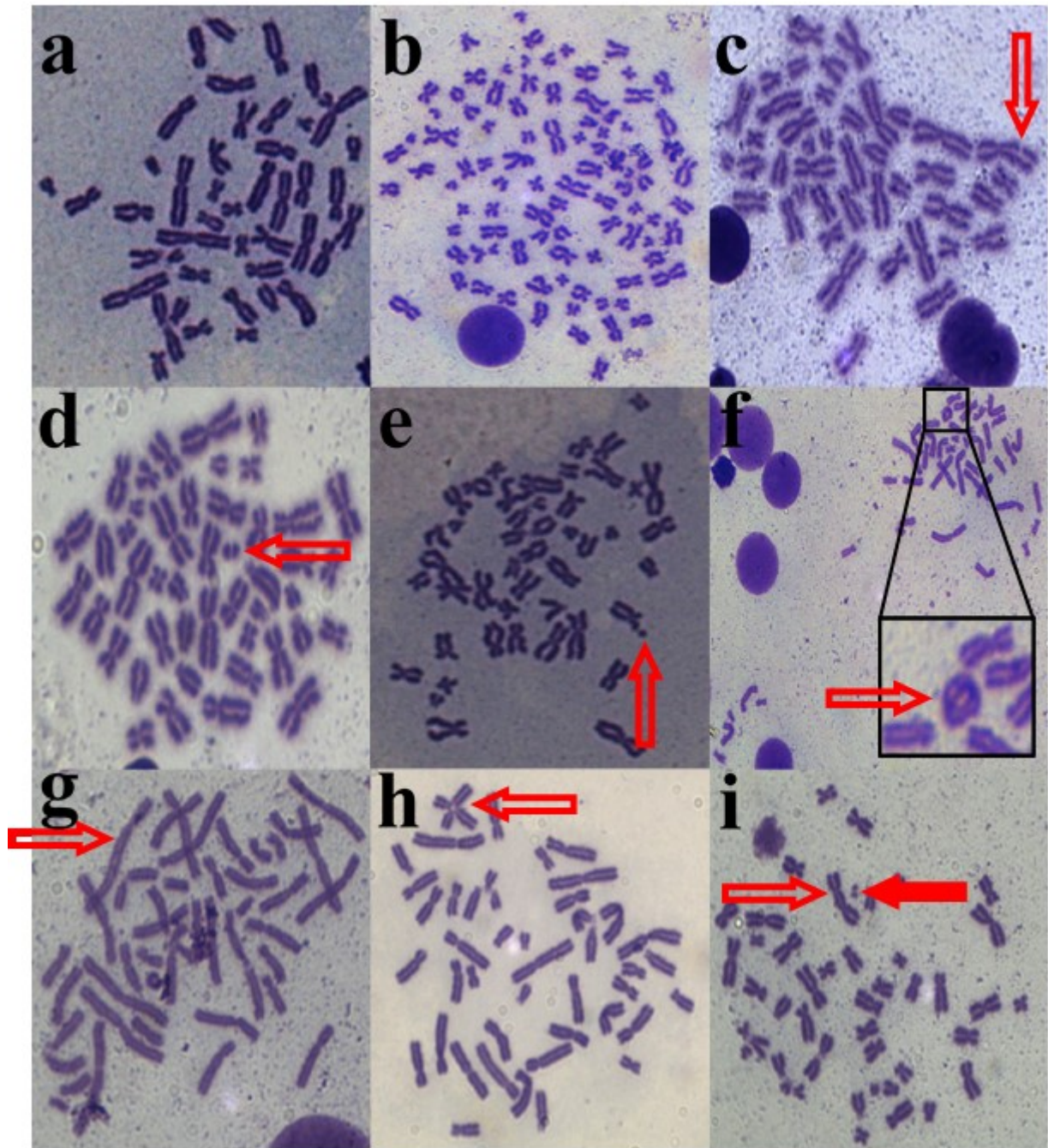
Kultivace byly zahajovány do 24 hod po odběru krve. Do 7,5 ml připraveného kultivačního média v 20 ml injekční stříkačce s injekční jehlou bylo přidáno 0,8 ml heparinizované plné periferní krve a obsah byl šetrně promíchán krouživým pohybem. Kultura byla následně umístěna do biologického termostatu a kultivována při $37\pm 0,5$ °C po dobu celkem 50 hod.

Ve čtyřicáté osmé hodině kultivace byl přidán roztok colcemidu ve finální koncentraci 0,241 µg/ml kultury. V padesáté hodině byla kultivace ukončena a zahájena fixace lymfocytární kultury. Kultura byla přemístěna do skleněné zkumavky s kónickým dnem o objemu 10 ml a odstředována při 2 000 otáček/min (asi 300 g) po dobu 3 minut. Supernatant byl odstraněn a Pasterovou pipetou byl přidán hypotonizační roztok chloridu draselného, přehřátý na 37±0,5 °C. Hypotonizace byla prováděna za pokojové teploty po dobu 10 min. Mezi každým následujícím krokem bylo zařazeno odstředování při 2 000 otáček/min po dobu 3 min a odstraňování supernatantu. Následovala fixace roztokem č. 1., č. 2 a č. 3. Po posledním odstředění byl ve zkumavce ponechán zhruba 1 cm supernatantu, ve kterém byla resuspendována peleta buněk. Na dvě chlazená navlhčená podložní sklíčka bylo ve vodorovné pozici nakapáno 4 až 6 kapek suspenze buněk, označeno a ponecháno do druhého dne zaschnout při pokojové teplotě.

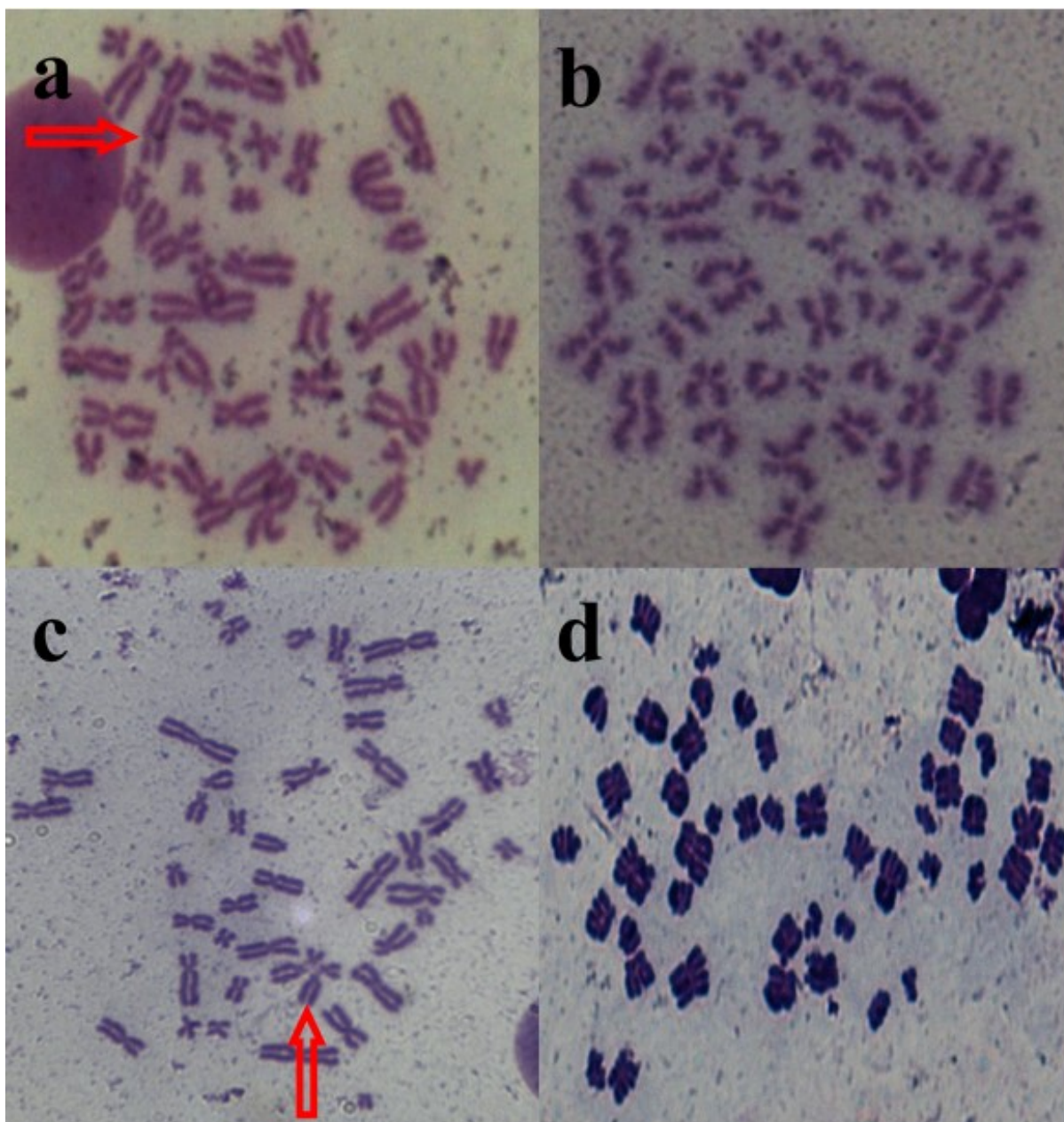
Následující den byly vzorky obarvovány 5% roztokem Giemsa-Romanowski (po dobu 5 min) a opláchnuty v demineralizované vodě. Do doby mikroskopické analýzy byly vzorky uloženy při pokojové teplotě v zásobníku na preparáty.

5.4.3 Mikroskopická analýza

Analýzy byly prováděny na mikroskopu Optika (B-383Pli) při 1 000násobném zvětšení s použitím imerzního oleje. Hodnoceno bylo 100 dobře rozestoupených mitotických buněk s 46±2 chromozomy (hodnoceno na základě počtu centromer). Záznam nálezů byl proveden do standardního protokolu (viz příloha 1). K záznamu obrazu byla použita kamera Optikam a software Optika Vision PRO 4.3 (Optika Science, Itálie). K hodnocení byla použita skórovací kritéria dle (AHM 2007). Vzorky byly hodnoceny slepě pod číselným kódem. Obrázky 8 a 9 ukazují příklady skórovaných a neskórovaných nálezů.



Obr. 8 Příklady skórovaných nálezů: (a) normální mitotická buňka, (b) polyploidní buňka, (c) zlom (označen šipkou), (d) dvojitý fragment (označen šipkou), (e) minute (označeno šipkou), (f) prstencitý (ring) chromozom (označen šipkou), (g) translokace (označeno šipkou), (h) mezichromozomová výměna (označeno šipkou), (i) dicentrický chromozom (označeno prázdnou šipkou) a dvojitý fragment (označeno plnou šipkou)



Obr. 9 Příklady neskórovaných nálezů: (a) gap (označeno šipkou), (b) rozestup centromer, (c) satelitová asociace (označeno šipkou), (d) endoreduplikace

5.5 Statistické hodnocení

Statistická analýza dat byla provedena v programovém prostředí R (<https://www.r-project.org/> R Development Core Team (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput.). Normalita dat byla hodnocena na základě Anderson-Darling testu, porovnání dat před a po GT bylo provedeno pomocí neparametrického párového Wilcoxonova testu či párového t-testu. Analýza korelací byla provedena pomocí Spearmanova nebo Pearsonova testu, volba byla podle normality dat. Při hodnocení rozdílu mezi skupinami dělenými více než dvěma hladinami faktorů byl výběr testu určován na základě hodnocení

homogenity rozptylu (Bartlettův test). Ve všech případech použití Bartlettova testu byla homogenita zamítnuta, a proto byl použit neparametrický Kruskal-Wallis Rank Sum Test. Pokud byl jeho výsledek statisticky významný, bylo pro další srovnání použito Wilcoxonova testu, kde mnohočetná srovnání byla korigována použitím Holm-Bonferroniho korekce.

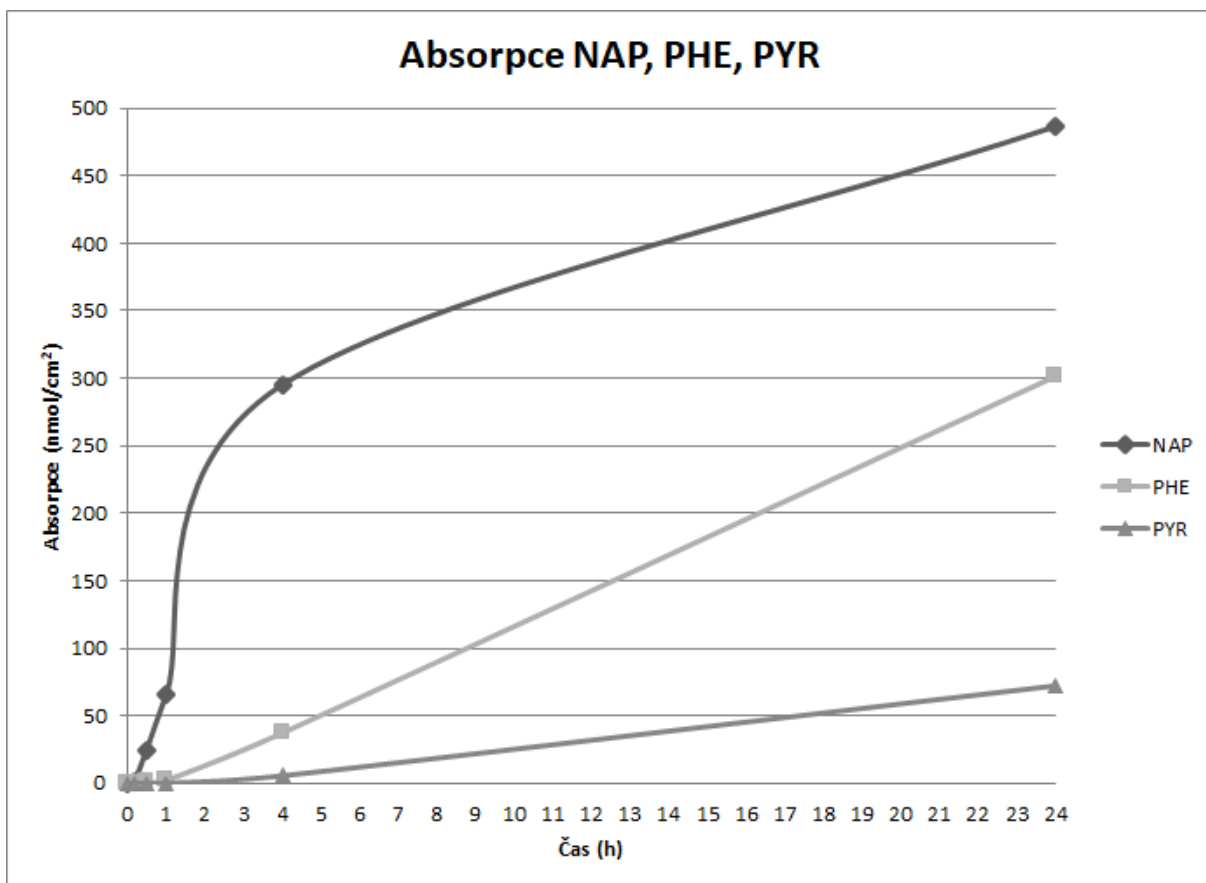
6 Výsledky

6.1 Trans-epidermální absorpce vybraných PAU

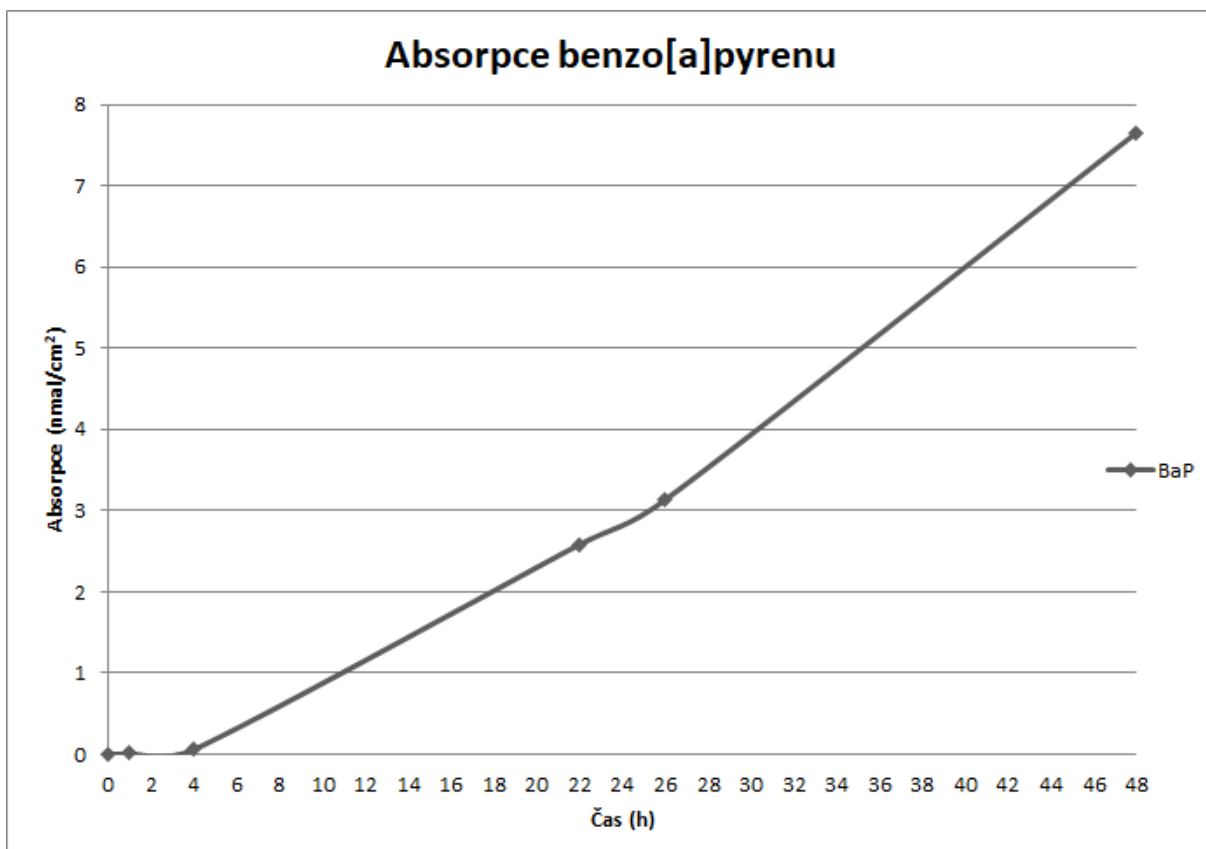
Experimenty s trans-epidermální absorpcí byly prováděny ve 40 komůrkách (10 komůrek pro každý testovaný PAU). Pro výpočet míry a rychlosti penetrace látek přes kožní bariéru bylo možné využít údaje celkem z 32 komůrek (naftalen 7, fenanthren 8, pyren 10, benzo[a]pyren 7). Ostatní data musela být vyřazena, neboť extrémní výše jejich hodnot svědčila o skrytém poškození epidermální membrány, které nebylo možno před experimentem zjistit vizuálně.

Jak vyplývá z tabulky 3, koncentrace přesycených roztoků testovaných PAU v isopropylmyristátu se vlivem rozdílné rozpustnosti snižovaly s molekulovou hmotností uhlovodíků od 1 099 mmol/l (naftalen) do 55,9 mmol/l (benzo[a]pyren). Množství PAU v objemu 100 μ l takto připravených roztoků (aplikovaných na povrch membrány) se pohybovalo od 109 900 nmol naftalenu do 55,9 nmol benzo[a]pyrenu.

Množství PAU nalezené v receptorové tekutině (PAU-penet) charakterizovalo celkové množství PAU, které penetrovalo přes membránu za zvolené časové úseky (naftalen, fenanthren a pyren 24 hod, benzo[a]pyren 48 hod). Toto množství (aritmetický průměr/medián) se snižovalo s rostoucí molekulovou hmotností od 861,3/709,0 nmol naftalenu do 13,5/12,4 nmol benzo[a]pyrenu. Průběh trans-epidermální absorpce sledovaných látek je zachycen na obrázcích 10 a 11. Uvedená množství PAU, nalezená v receptorové tekutině (PAU-penet), představovala 0,24 % (benzo[a]pyren) až 0,84 % (fenanthren) aplikované dávky (100 μ l roztoku).



Obr. 10 Průběh trans-epidermální absorpce naftalen (NAP), fenanthrenu (PHE) a pyrenu (PYR)



Obr. 11 Průběh trans-epidermální absorpce benzo[a]pyrenu

Množství látky, které prošlo přes jednotkovou plochu kožní bariéry za jednotku času (Flux; aritmetický průměr/medián), se snižovalo s rostoucí molekulovou hmotností od 95,7/94,0 nmol/cm²/hod (naftalen) do 0,21/0,18 nmol/cm²/hod (benzo[a]pyren). Doba, za kterou PAU procházely přes kožní bariéru a dosahovaly oblastí cirkulace (Lag time; aritmetický průměr/medián), se naopak s jejich rostoucí molekulovou hmotností prodlužovala od 0,17/0,32 hod (naftalen) do 11,2/9,53 hod (benzo[a]pyren).

Tab. 3 Parametry trans-epidermální absorpce PAU

		Naftalen	Fenanthren	Pyren	Benzo[a]pyren	
Donorový roztok	PAU (mmol/l)	1099	635	246	55,9	
	PAU v aplikované dávce 100 µl (nmol)	109 900	63 500	24 600	5 590	
	PAU v aplikované dávce 100 µl (nmol/cm ²)	62 090	35 876	13 898	3 158	
Receptorová tekutina	Počet vzorků (doba odběru)	n = 7 (24h)	n = 8 (24h)	n = 10 (24h)	n = 7 (48h)	
	PAU-penet (nmol)	AP	861,3	533,1	128,2	13,5
		VSO	521,2	216,9	60,4	4,5
		MED	709	496,1	136,3	12,4
		Min	196	222,1	34,9	8,6
		Max	1647,1	801,8	249,9	20,4
		% AD	0,78	0,84	0,52	0,24
Flux (nmol/cm ² /hod)	AP	95,7	19,5	4,38	0,21	
	VSO	45,5	8,7	1,98	0,08	
	MED	94	15,8	4,38	0,18	
	Min	30,7	10,2	1,34	0,13	
	Max	157,8	33,5	8,28	0,34	
Lag time (hod)	AP	0,26	2,12	3,25	11,2	
	VSO	0,17	0,41	0,5	4,08	
	MED	0,32	2,13	3,26	9,53	
	Min	0	1,38	2,46	7,32	
	Max	0,44	2,84	4,21	17,2	

AP aritmetický průměr
VSO výběrová směrodatná odchylka
MED medián
MIN minimum
MAX maximum

6.2 Zavedení mikronukleus testu

Mikronukleus test (MNT) byl prováděn dle modifikace metody AHEM (2003) a metody Kmochova et al. (2016).

6.2.1 Materiál, přístroje a zařízení

Pro realizaci MNT byly použity následující chemikálie a spotřební materiál. RPMI 1640 (with L-glutamine and sodium bicarbonate) (kat.č. R8758, Sigma-Aldrich, USA), phytohemagglutinin, M form (PHA-M) (kat. č. 10576015, Gibco™ by Life technologies,

USA), bovinní sérum pro TK (Bioveta, Ivanovice na Hané), penicillin-Streptomycin (kat.č. P4333, Sigma-Aldrich, USA), cytochalasin B (kat. č. A7657.0005, AppliChem GmbH, Německo) a dimethyl sulfoxid $\geq 99.9\%$ (kat. č. 276855-100ML, Sigma-Aldrich, USA). Dále byly použity methanol, p.a. (Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové), kyselina octová 99%, p.a. (Penta, Praha), formaldehyd 36-38%, p.a. (Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové), chlorid draselný, p.a. (Lachema, Brno), Giemsa-Romanowski roztok (Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové), kyselina sírová min. 95%, p.a. (Lachema, Brno), dichroman draselný, p.a. (Lachema, Brno) a demineralizovaná voda.

Z oblasti spotřebního materiálu byly použity injekční stříkačky 20 ml, injekční jehly 1,2x40 mm (růžové), špičky k automatickým pipetám 10-100 μ l, 100-1000 μ l a 1-10 ml, Pasteurova pipeta 3 ml plastová, podložní skla, skleněné zkumavky s kónickým dnem o objemu asi 10 ml, skleněné kádinky a zásobníky na mikroskopické preparáty.

Z přístrojů a zařízení byly použity kombinovaná chladnička (4 °C až 10 °C) s mrazničkou (od -20 °C) (BEKO, Turecko), biohazard box TelStar Bio-II-A/G (TelStar, Španělsko), stolní centrifuga EBA 270 (Hettich, Německo), biologický termostat (Biological thermostat BT 50), Autokláv PS 20A (Chirana, Česká republika), analytické váhy HM-120 (AND, Japonsko), automatické pipety Proline plus 10-100 μ l, 100-1000 μ l a 1-10 ml (Biohit-Sartorius, Německo), mikroskop B-383Pli (Optika Microscopes, Itálie), kamera k mikroskopu OPTIKAM PRO 5LT (Optika Microscopes, Itálie), germicidní zářivky a ruční čítač.

K mytí skla byla použita chromsírová směs připravená smícháním 100 g dichromanu draselného a 1 000 ml kyseliny sírové. Ke kultivaci lymfocytů bylo použito 7,5 ml kultivačního média skládajícího se z RPMI 1640 média, 24,7 % fetálního bovinního séra pro tkáňové kultury, 2,7 % fytohemaglutininu a 1 % penicillin-streptomycinu. K zastavení cytokineze byl použit roztok cytochalasinu B 5 mg v 2,5 ml dimethyl sulfoxidu. Ke zpracování kultur byl použit hypotonický roztok chloridu draselného připravený rozpuštěním 0,55 g KCl ve 100 ml demineralizované vody. Fixace buněk byla provedena pomocí fixačního roztoku č. 1 skládajícího se z 6 ml methanolu, 2 ml kyseliny octové a 225 μ l formaldehydu a fixačního roztoku č. 2, složeného z 12 ml methanolu a 4 ml kyseliny octové na jeden vzorek. Suché preparáty pak byly obarveny 5% roztokem Giemsa-Romanowski v demineralizované vodě.

6.2.2 Laboratorní postup

Podložní skla byla po dobu minimálně 24 hod ponořena do chromsírové směsi, následně byla třikrát propláchnuta kohoutkovou vodou a pod touto (tekoucí) vodou ponechána minimálně

2 hodiny. Poté byla třikrát opláchnuta v demineralizované vodě a ponechána v čisté demineralizované vodě do druhého dne, kdy byla vyjmuta, vyleštěna látkou nepouštějící vlákna, uložena do boxu na mikroskopické preparáty a uchována v mrazničce do doby použití.

Kultivace byla zahájena do 24 hod po odběru krve. Do 7,5 ml připraveného kultivačního média v 20 ml injekční stříkačce s injekční jehlou byl přidán 1 ml heparinizované plné periferní krve a obsah byl šetrně promíchán krouživým pohybem. Řádně označená kultura byla umístěna do biologického termostatu a kultivována při $37\pm 0,5$ °C po dobu celkem 72 hod.

Ve čtyřicáté čtvrté hodině kultivace byl přidán roztok cytochalasinu B ve finální koncentraci 5,33 µg/ml kultury.

V sedmdesáté druhé hodině byla kultivace ukončena a zahájena fixace lymfocytární kultury. Kultura byla přemístěna do skleněné zkumavky s kónickým dnem o objemu asi 10 ml a odstředována při 1 600 otáček/min (asi 200 g) po dobu 8 minut. Supernatant byl odstraněn a Pasterovou pipetou byl přidán hypotonizační roztok chloridu draselného předeřátý na $37\pm 0,5$ °C. Hypotonizace byla prováděna za pokojové teploty po dobu 5 minut. Mezi každým následujícím krokem bylo zařazeno odstředování při 1 600 otáček/min (asi 200 g) po dobu 8 minut a odstraňování supernatantu. V následujících krocích proběhla fixace fixačním roztokem č. 1 a dvakrát fixačním roztokem č. 2. Po posledním odstředění byl ve zkumavce ponechán zhruba 1 cm supernatantu, ve kterém byla resuspendována peleta. Na dvě chlazená navlhčená podložní sklíčka bylo ve vodorovné pozici nakapáno 4 až 6 kapek suspenze buněk, označeno a ponecháno do druhého dne zaschnout při pokojové teplotě.

Následující den byly vzorky obarveny 5% roztokem Giemsa-Romanowski (po dobu 10 min) a opláchnuty v demineralizované vodě. Do doby mikroskopické analýzy byly vzorky uloženy při pokojové teplotě v zásobníku na preparáty.

6.2.3 Analýza vzorků

Analýza vzorků byla provedena pomocí mikroskopu Optika (B-383Pli) při 400násobném zvětšení. Hodnoceno bylo 1 000 dvoujaderných buněk (DJB). K počítání DJB byl použit ruční čítač. Záznam nálezů byl proveden do nově vytvořeného protokolu, který lze najít v příloze (příloha 2). K záznamu obrazu byla použita kamera Optikam a software Optika Vision PRO 4.3 (Optika Science, Itálie). K hodnocení byla použita skórovací kritéria dle Fenech (2007) mírně modifikována dle AHEM (2003). V rámci interní kontroly kvality bylo provedeno opakované

skórování deseti náhodně vybraných vzorků. Vzorky byly hodnoceny slepě pod číselným kódem. Dále uvádím klíčová skórovací kritéria a základní charakteristiky nálezů.

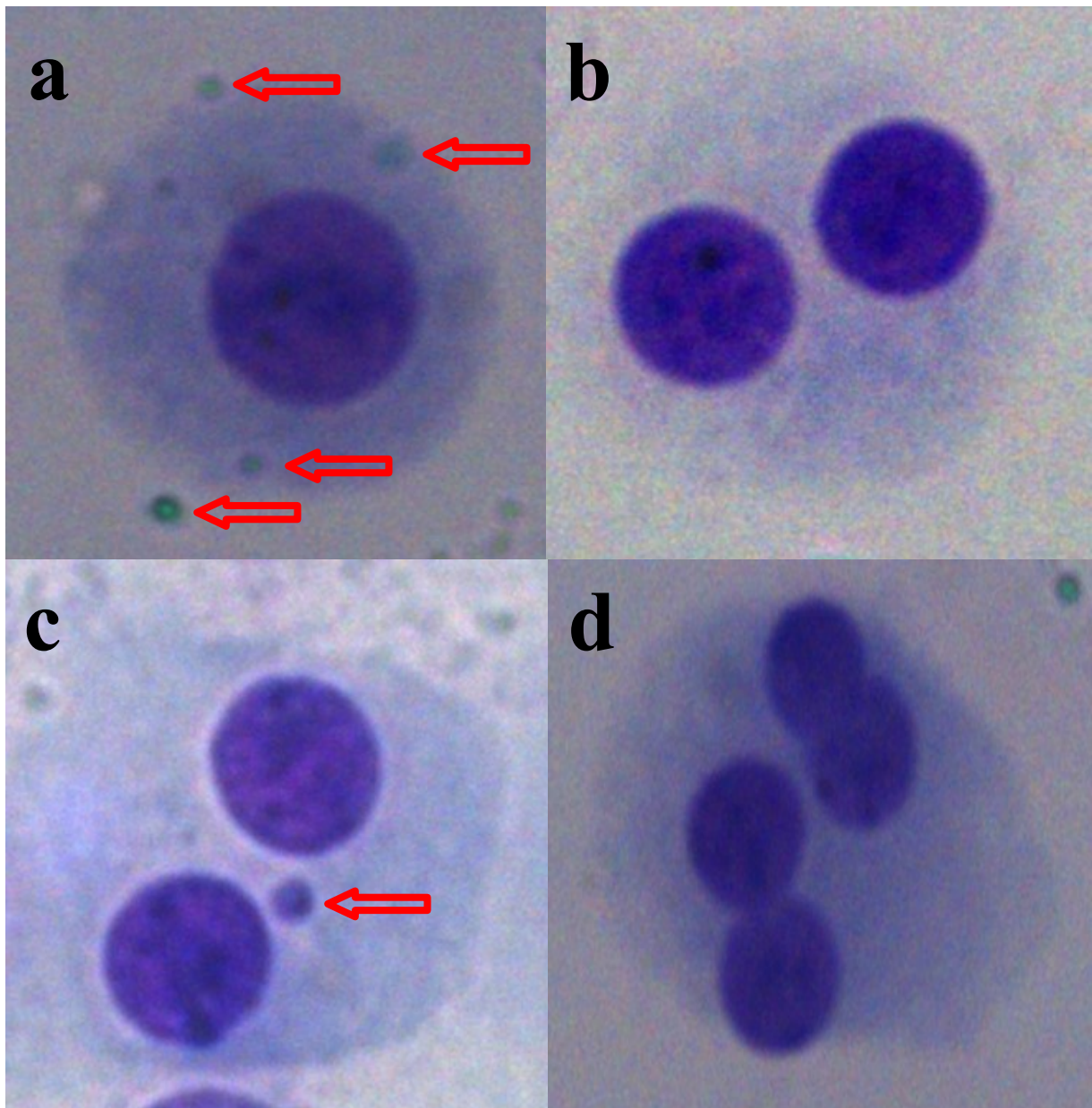
Skórovací kritéria **pro hodnocení dvoujaderných buněk** dle Fenech (2007)

Dvoujaderné buňky, vzniklé v důsledku cytokinetického bloku po přidání Cytochalasinu B, jsou vhodné pro hodnocení přítomnosti MN, chromatinových můstků a jaderných pupenů.

Nálezy by měly splňovat níže uvedená kritéria:

- Obě jádra ve DJB mají intaktní jadernou membránu a jsou umístěna v cytoplasmě stejné buňky ohraničené buněčnou membránou.
- Obě jádra ve DJB mají přibližně stejnou velikost, strukturu a barvitelnost.
- Jádra mohou být spojena chromatinovým můstkem, který ovšem nesmí být širší než 1/4 průměru jádra.
- Obě jádra se mohou dotýkat, ale neměla by se překrývat. Pokud se překrývají, lze je skórovat, pouze pokud jsou jasné hranice každého jádra.
- Cytoplasmatická membrána DJB je intaktní a buňka je jasně odlišitelná od sousedních buněk.

Příklady skórovaných a neskórovaných nálezů zachycuje obrázek 12.



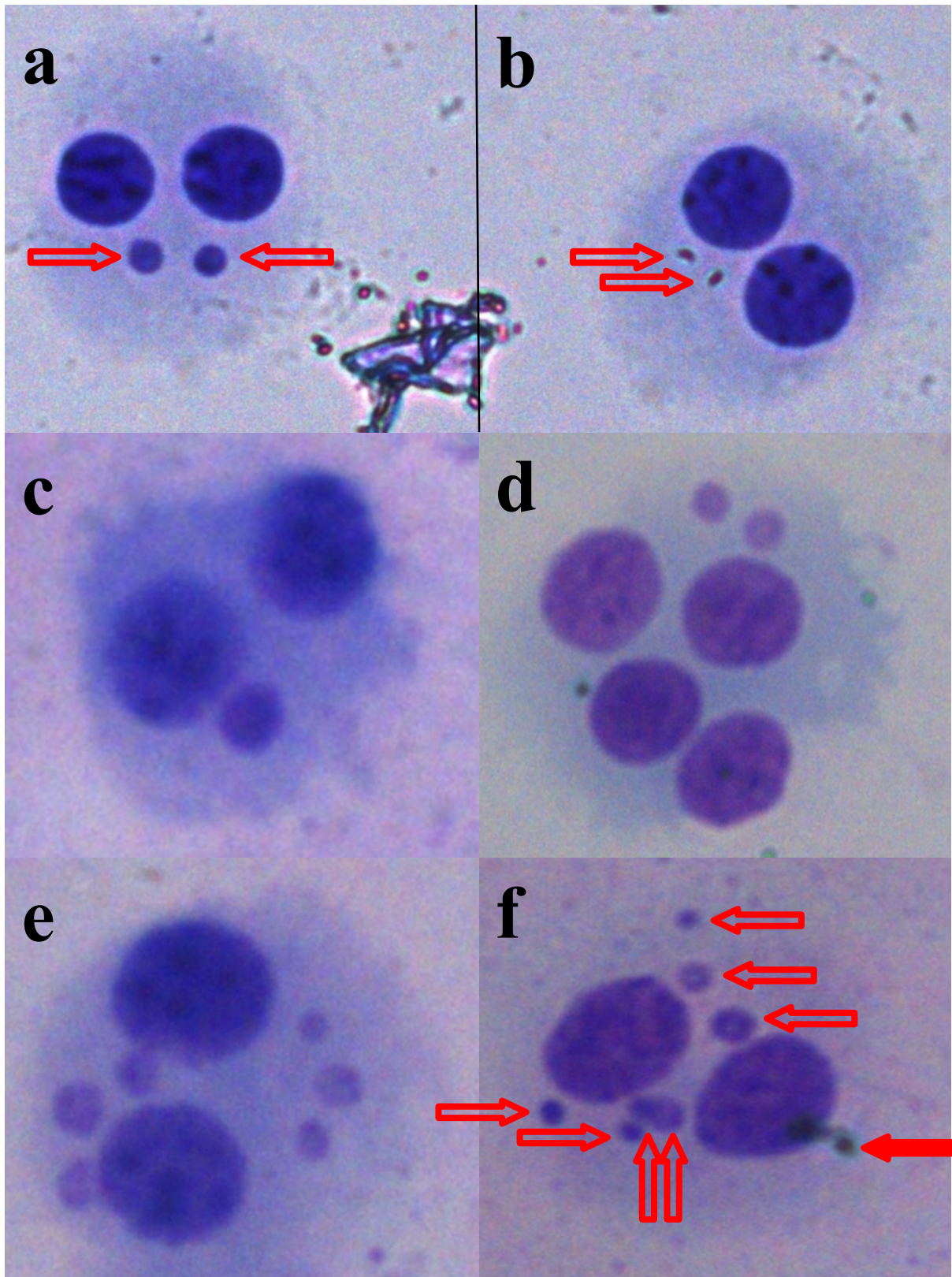
Obr. 12 Příklady skórovaných a neskórovaných nálezů: (a) jednojaderná buňka s artefakty (označené šipkami), (b) dvoujaderná buňka, (c) dvoujaderná buňka s jedním mikrojádroem (označeno šipkou), (d) čtyřjaderná buňka (nehodnotí se)

Skórovací kritéria pro **hodnocení mikrojadra** dle Fenech (2007)

Mikrojadra mají shodnou morfologii s hlavními jádry, ale jsou menší než jádra hlavní. Nálezy by měly splňovat níže uvedená kritéria:

- Průměr MN se pohybuje mezi $1/3$ až $1/16$ průměru jednoho hlavního jádra, což odpovídá $1/9$ až $1/256$ plochy jednoho hlavního jádra DJB.
- MN nejsou refrakterní a mohou být proto odlišena od artefaktů, jako jsou partikule barviva.
- MN nejsou spojena s hlavním jádrem.
- MN se mohou dotýkat, ale nesmí se překrývat s hlavními jádry. Hranice MN musí být jasně odlišitelná od hranice hlavních jader.
- MN mají obvykle stejnou barvitelnost jako hlavní jádro, ale občas mohou být více (Fenech 2007) i méně barvitelná (AHEM 2003).
- V jedné DJB může být maximálně šest MN (AHEM 2003).

Příklady skórovaných a neskórovaných nálezů zachycuje obrázek 13.



Obr. 13 Příklady skórovaných a neskórovaných nálezů: (a) DJB se dvěma MN (označena šipkami), (b) DJB s dvěma artefakty (označeny šipkami, nehodnotí se), (c) DJB s MN s průměrem nad 1/3 průměru hlavního jádra (nehodnotí se), (d) čtyř jaderná buňka s dvěma

mikrojádry (nehodnotí se), (e) DJB se šesti mikrojádry, (f) DJB se sedmi mikrojádry (prázdné šipky) a artefaktem (plná šipka) (nehodnotí se)

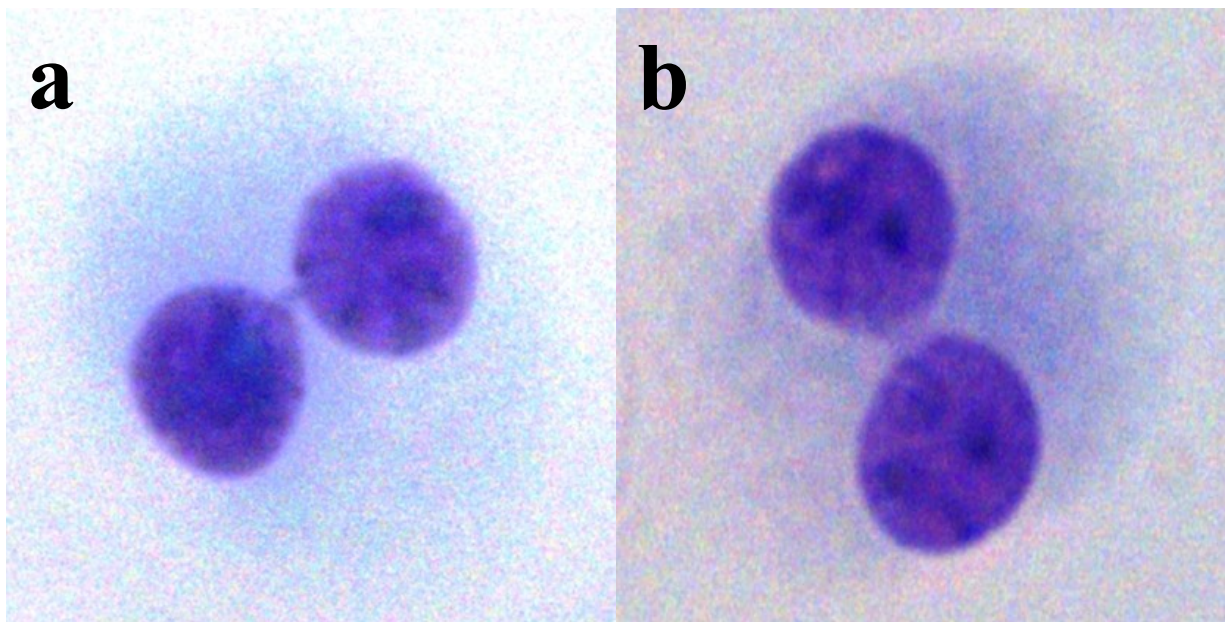
Skórovací kritéria pro **hodnocení chromatinových můstků** dle Fenech (2007)

Chromatinový můstek je nepřerušovaná struktura obsahující DNA, která spojuje hlavní jádra ve DJB. Může pocházet z dicentrických chromozomů, které vznikají v důsledku chybné reparace DNA zlomů nebo v důsledku spojení konce telomer („telomere end fusion“), jejichž centromery putovaly během anafáze k opačným pólům nově vznikající buňky. Nálezy by měly splňovat následující kritéria:

- Šířka chromatinového můstku obvykle nepřesahuje 1/4 průměru jader.
- Chromatinové můstky mají obvykle stejnou barvitelnost jako jádra.
- Vzácně se mohou vyskytovat dva a více chromatinové můstky v jedné DJB.
- Ve DJB s chromatinovým můstkem se může vyskytovat jedno nebo více MN.
- Ve DJB s jedním nebo více chromatinovými můstky se nemusí vyskytovat žádné MN.

Vzhledem k tomu, že přítomnost chromatinových můstků je obtížně hodnotitelná ve DJB, kde se hlavní jádra dotýkají, doporučuje se jejich hodnocení ve DJB, kde se jádra nedotýkají.

Příklady skórovaných a neskórovaných nálezů zachycuje obrázek 14.



Obr. 14 Příklady skórovaných a neskórovaných nálezů: (a) DJB s chromatinovým můstkem, (b) DJB s chromatinovým můstkem širším než 1/4 průměru jádra (nehodnotí se)

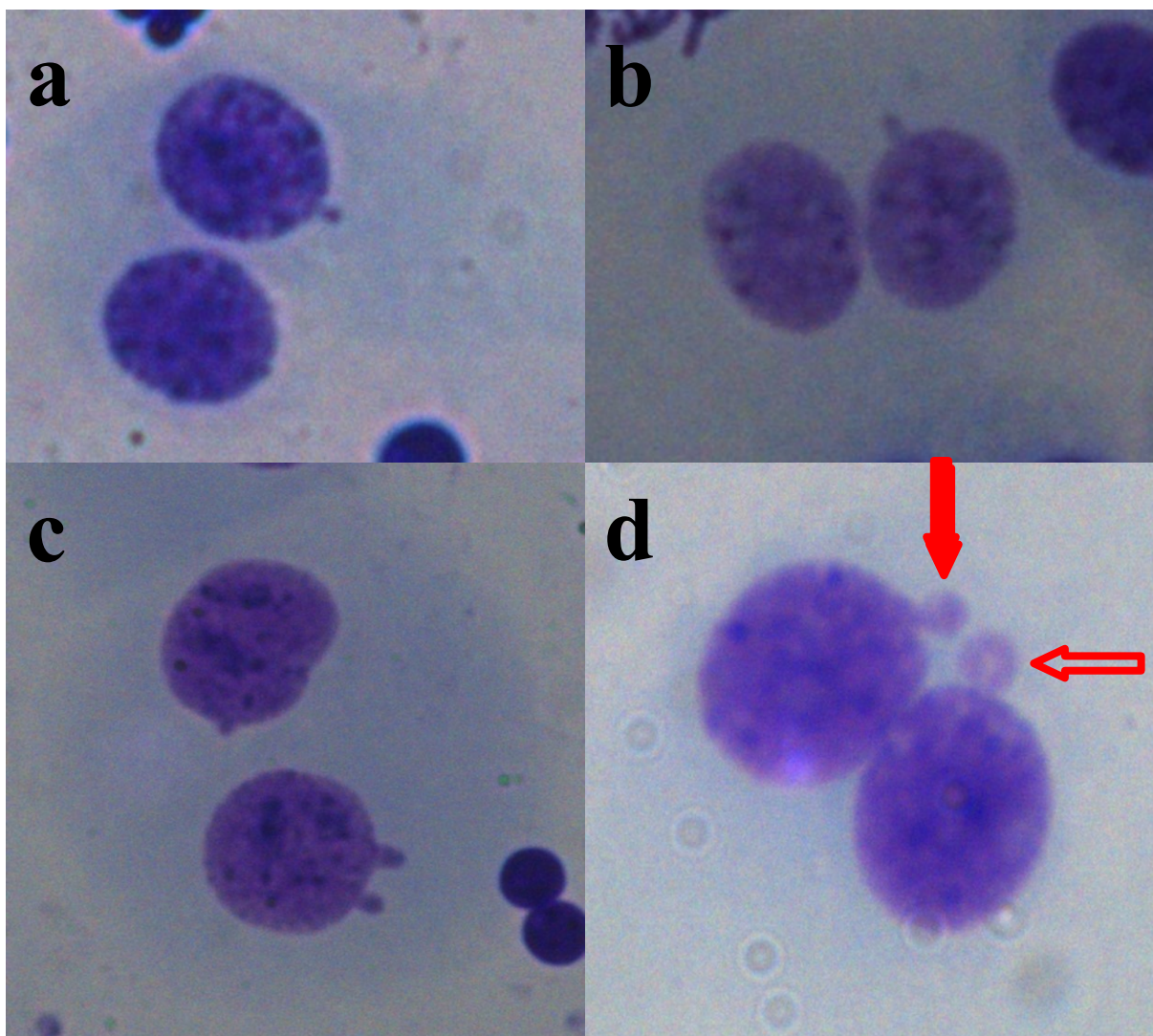
Skórovací kritéria pro **hodnocení jaderných pupenů** dle Fenech (2007)

Jaderné pupeny vznikají v důsledku snahy jádra o eliminaci amplifikované DNA a DNA reparačních komplexů. Nálezy by měly splňovat následující kritéria:

- Jaderné pupeny vypadají obdobně jako MN, ale jsou spojeny s jedním z hlavních jader pomocí můstku, který je užší, než je průměr pupenu (až velmi jemný), v závislosti na stádiu procesu extruze (pučení).
- Jaderné pupeny mají obvykle stejnou barvitelnost jako MN.
- Příležitostně se může zdát, že jsou jaderné pupeny umístěny ve vakuole přiléhající k hlavnímu jádru.

Malá protruze jaderného materiálu bez zřetelného zúžení mezi jádrem a protruhujícím jaderným materiálem nemůže být klasifikována jako jaderný pupen. Tento typ změny se označuje jako jaderný puchýř (bleb). Význam tohoto útvaru je zatím nejasný. Někteří autoři zaměňují označení jaderný pupen (nuclear bud) a jaderný puchýř (nuclear bleb), ale je nutno zdůraznit, že se jedná se o dva různé jaderné útvary (Fenech 2007).

Příklady skórovaných a neskórovaných nálezů zachycuje obrázek 15.



Obr. 15 Příklady skórovaných a neskórovaných nálezů: (a) DJB s jaderným pupenem, (b) DJB s jaderným puchýřem (můstek širší než je průměr pupenu (nehodnotí se), (c) DJB se třemi jadernými puchýři (nehodnotí se), (d) DJB s jedním MN (prázdná šipka) a jedním jaderným pupenem (plná šipka)

Interní kontrola kvality při použití párového testu neodhalila systematickou chybu. Rozdíly mezi re-skórovanými preparáty pro všechny sledované parametry se pohybovaly pod hladinou významnosti ($\alpha=0,05$).

6.3 Podrobné charakteristiky skupiny pacientů 1

Mezi muži a ženami této skupiny nebyl prokázán signifikantní rozdíl v počtu kuřáků a intenzitě kuřáctví (počtu vykouřených cigaret), věku, měsíci přijetí k hospitalizaci, povrchu těla, rozsahu postižení kůže psoriázou, době aplikace dehtu, době a dávce UV záření a PASI skóre před a po GT. Významné nebyly ani rozdíly hladin ABB, SAB a NAB před a po GT či DJB s MN, s 1 MN, 2 MN, 3 a více MN, chromatinovými můstky, jadernými pupeny ani MN na 1 000 DJB před a po GT. U žen byly hodnoty těchto parametrů (s výjimkou ABB, SAB, NAB před GT, chromatinových můstek po GT a jaderných pupenů) nevýznamně vyšší než u mužů (tabulka 4).

Tab. 4 Porovnání sledovaných parametrů mezi muži a ženami skupiny 1

	Muži (n=15)				Ženy (n=17)				P
	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	
Cigaret/den	0	0	7,5	4,93±8,46	0	0	10	3,59±5,20	n.s.
Věk (roky)	26	39	55,5	41,40±17,20	41	55	62	52,88±15,71	p=0,059
Povrch těla (m ²)	1,92	1,99	2,06	1,99±0,11	1,83	1,87	7,98	1,91±0,25	n.s.
Rozsah postižení (%)	29,75	32,5	36,25	35,37±8,60	26	20	28	30,88±9,52	n.s.
Doba aplikace dehtu (dny)	9	12	14	11,67±3,15	8	11	13	9,82±4,33	n.s.
Doba UV (dny)	10	13	14,5	12,40±3,07	10	12	15	11,88±3,95	n.s.
Dávka UV (J/cm ²)	2,99	4	4,26	3,71±1,09	3,02	3,71	4,4	3,60±1,49	n.s.
PASI před GT	14,2	19,4	21,85	19,61±7,73	14,4	16,8	21,6	19,02±7,15	n.s.
PASI po GT	4,4	5,2	5,9	5,51±2,26	3,8	4,8	6,4	4,96±2,10	n.s.
ABB před GT (%)	3	4	4	3,27±1,22	2	3	4	3,00±1,87	n.s.
ABB po GT (%)	5	6	7	5,93±1,49	4	6	7	5,41±2,24	n.s.
SAB před GT (%)	3	3	4	3,20±1,21	2	3	4	2,94±1,92	n.s.
SAB po GT (%)	5	6	7	5,87±1,46	4	5	7	5,29±2,26	n.s.
NAB před GT (%)	0	0	0	0,07±0,26	0	0	0	0,06±0,24	n.s.
NAB po GT (%)	0	0	0	0,07±0,26	0	0	0	0,12±0,49	n.s.
DJB s MN před GT (‰)	5,5	8	16	10,13±6,57	10	12	16	13,82±9,04	n.s.
DJB s MN po GT (‰)	14	17	22,5	19,67±10,36	13	17	29	22,47±16,53	n.s.
DJB s 1 MN před GT (‰)	5,5	8	13,5	9,60±6,31	8	11	15	12,24±7,48	n.s.
DJB s 1 MN po GT (‰)	13	16	21,5	17,93±9,77	11	16	23	18,94±12,18	n.s.
DJB s 2 MN před GT (‰)	0	0	1	0,53±0,64	0	1	2	1,53±1,94	p=0,065
DJB s 2 MN po GT (‰)	1	1	2,5	1,47±1,25	0	1	3	2,76±4,31	n.s.
DJB s 3 MN před GT (‰)	0	0	0	0,00±0,00	0	0	0	0,06±0,24	n.s.
DJB s 3 MN po GT (‰)	0	0	0,5	0,27±0,46	0	0	1	0,76±1,92	n.s.
Můstky před GT (‰)	0	0	2	0,80±0,94	0	1	2	1,29±1,53	n.s.
Můstky po GT (‰)	1	1	2	1,67±1,84	0	1	1	0,94±1,14	n.s.
Pupeny před GT (‰)	1,5	13	17	12,93±8,27	7	8	11	9,41±5,78	n.s.
Pupeny po GT (‰)	9	13	19,5	14,60±6,95	5	10	17	11,53±11,54	n.s.
MN před GT (‰)	5,5	8	16,5	10,67±6,87	10	12	18	15,47±10,74	n.s.
MN po GT (‰)	15	18	26,5	21,93±11,81	15	22	30	27,24±24,30	n.s.
Efekt terapie (%)	71,04	72,73	76,54	71,07±8,58	66,46	71,85	77,99	72,73±9,86	n.s.

Legenda:

ABB celkový počet aberovaných buněk

SAB	strukturálně aberované buňky
NAB	numericky aberované buňky
DJB s MN	dvoujaderné buňky s mikrojádry (bez ohledu na počet mikrojader v dvoujaderné buňce)
DJB s 1 MN	dvoujaderné buňky s 1 mikrojádrem
DJB s 2 MN	dvoujaderné buňky se 2 mikrojádry
DJB s 3 MN	dvoujaderné buňky s 3 a více mikrojádry
n. s.	nesignifikantní

Mezi kuřáky a nekuřáky skupiny 1 jsme u sledovaných parametrů našli jediný významný rozdíl, a to v případě počtu ABB před terapií ($p < 0,05$). Na tomto rozdílu se podílel jak vyšší počet SAB, tak i NAB (tabulka 5).

Tab. 5 Porovnání sledovaných parametrů mezi kuřáky a nekuřáky skupiny 1

	Kuřáci (n=13)				Nekuřáci (n=19)				P
	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	
Cigaret/den	5	10	10	10,38±7,16	0	0	0	0,00±0,00	p<0,001
Věk (roky)	35	53	58	45,92±15,06	36	55	62,5	48,58±18,80	n.s.
Povrch těla (m ²)	1,83	1,92	1,99	1,93±0,13	1,88	1,97	2,06	1,96±0,23	n.s.
Rozsah postižení (%)	28,5	32,5	38	35,85±9,86	27	31	36,25	31,03±8,5	n.s.
Doba aplikace dehtu (dny)	10	12	14	11,23±3,52	8	12	12,5	10,32±4,16	n.s.
Doba UV (dny)	11	13	14	11,62±3,93	10	13	15	12,47±3,27	n.s.
Dávka UV (J/cm ²)	3,07	3,85	4,29	3,61±1,52	2,73	3,91	4,35	3,68±1,17	n.s.
PASI před GT	14	16,8	25	20,06±9,03	15	19,4	21,15	18,77±6,09	n.s.
PASI po GT	4,1	4,8	6,8	5,67±2,66	4,1	5,2	5,5	4,91±1,75	n.s.
ABB před GT (%)	3	4	4	3,85±1,68	2	3	3,5	2,63±1,34	p<0,05
ABB po GT (%)	6	6	7	6,23±1,54	4	5	6,5	5,26±2,08	n.s.
SAB před GT (%)	3	4	4	3,69±1,80	2	3	3,5	2,63±1,34	p=0,085
SAB po GT (%)	5	6	7	6,00±1,63	4	5	6,5	5,26±2,08	n.s.
NAB před GT (%)	0	0	0	0,15±0,38	0	0	0	0,00±0,00	p=0,091
NAB po GT (%)	0	0	0	0,23±0,60	0	0	0	0,00±0,00	p=0,091
DJB s MN před GT (‰)	7	10	16	11,38±6,70	7	10	14,5	12,58±9,03	n.s.
DJB s MN po GT (‰)	15	17	21	18,08±10,21	13,5	17	29,5	23,26±15,78	n.s.
DJB s 1 MN před GT (‰)	6	9	15	10,62±6,29	7	10	12,5	11,26±7,56	n.s.
DJB s 1 MN po GT (‰)	13	16	17	16,23±9,61	11,5	16	25,5	20,00±11,79	n.s.
DJB s 2 MN před GT (‰)	0	0	1	0,77±1,01	0	1	2	1,26±1,82	n.s.
DJB s 2 MN po GT (‰)	0	1	3	1,38±1,39	1	1	3	2,68±4,06	n.s.
DJB s 3 MN před GT (‰)	0	0	0	0,00±0,00	0	0	0	0,05±0,23	n.s.
DJB s 3 MN po GT (‰)	0	0	1	0,46±0,52	0	0	0	0,58±1,84	n.s.
Můstky před GT (‰)	0	1	2	1,46±1,71	0	1	1,5	0,79±0,85	n.s.
Můstky po GT (‰)	1	1	2	1,62±1,85	0	1	1	1,05±1,27	n.s.
Pupeny před GT (‰)	8	10	15	12,15±6,03	4	8	15,5	10,32±7,92	n.s.
Pupeny po GT (‰)	8	10	15	11,77±7,32	7	13	15	13,79±11,08	n.s.
MN před GT (‰)	7	11	17	12,15±7,23	7	11	17	13,95±10,64	n.s.
MN po GT (‰)	16	22	24	20,77±12,00	14,5	18	33,5	27,47±23,03	n.s.
Efekt terapie (%)	68,42	71,43	75,6	71,02±8,55	66,73	73,91	77,36	72,59±9,75	n.s.

Legenda:

- ABB celkový počet aberovaných buněk
- SAB strukturálně aberované buňky
- NAB numericky aberované buňky
- DJB s MN dvoujaderné buňky s mikrojádry (bez ohledu na počet mikrojader v dvoujaderné buňce)
- DJB s 1 MN dvoujaderné buňky s 1 mikrojádrem
- DJB s 2 MN dvoujaderné buňky se 2 mikrojádry
- DJB s 3 MN dvoujaderné buňky s 3 a více mikrojádry
- n. s. nesignifikantní

Byla potvrzena vysoká účinnost terapie ve smyslu redukce PASI skóre ($p < 0,001$). V účinnosti terapie nebyl zaznamenán významný rozdíl mezi muži a ženami ani mezi kuřáky a nekuřáky.

6.4 Vliv GT na hladiny mikrojadra a chromosomálních aberací skupiny pacientů 1

GT terapie s použitím 4% FD a UV2 celotělového zářiče (skupina 1) vedla k signifikantnímu nárůstu celkového počtu DJB s mikrojadry (DJB s MN, $p < 0,001$). Tento nárůst byl způsoben nárůstem počtu DJB s 1 MN ($p < 0,001$), DJB se 2 MN ($p < 0,05$) a DJB se 3 a více MN (DJB s 3 MN, $p < 0,01$). V případě počtu chromatinových můstků a jaderných pupenů byl po GT zaznamenán mírný nárůst, který však nebyl statisticky signifikantní. Průměrně bylo před GT zaznamenáno 1,2 % buněk s MN a po GT 2,1 % buněk s MN. V případě MN jsme po terapii zaznamenali jejich signifikantní nárůst ($p < 0,001$). Před GT jsme našli (aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka) $13,22 \pm 9,32$ MN na 1 000 DJB a po GT $24,75 \pm 19,36$ MN na 1 000 DJB. Rovněž jsme po GT pozorovali signifikantní nárůst celkového počtu aberovaných buněk (ABB, $p < 0,001$), a to zejména strukturálně aberovaných buněk (SAB, $p < 0,001$), nikoli však numericky aberovaných buněk (NAB, $p > 0,05$). Průměrný ABB před léčbou byl 3,12 % a po GT 5,66 %. Výsledky jsou podrobně uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6 Počty mikrojadern a chromozomálních aberací před a po GT

		Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	Min	Max	p
ABB před GT (%)	(n=32)	2	3	4	3,12±1,58	0	8	p<0,001
ABB po GT (%)		4	6	7	5,66±1,91	1	10	
SAB před GT (%)	(n=32)	2	3	4	3,06±1,61	0	8	p<0,001
SAB po GT (%)		4	6	7	5,56±1,92	1	10	
NAB před GT (%)	(n=32)	0	0	0	0,06±0,25	0	1	n.s.
NAB po GT (%)		0	0	0	0,09±0,39	0	2	
DJB s MN před GT (‰)	(n=32)	7	10	15,25	12,09±8,07	3	41	p<0,001
DJB s MN po GT (‰)		13,75	17	24	21,16±13,84	4	62	
DJB s 1 MN před GT (‰)	(n=32)	6,75	9,5	14,25	11,00±6,97	2	33	p<0,001
DJB s 1 MN po GT (‰)		11,75	16	23	18,47±10,95	4	52	
DJB s 2 MN před GT (‰)	(n=32)	0	1	3	1,06±1,54	0	8	p<0,05
DJB s 2 MN po GT (‰)		0,75	1	3	2,16±3,27	0	17	
DJB s 3 MN před GT (‰)	(n=32)	0	0	0	0,03±0,18	0	1	p<0,01
DJB s 3 MN po GT (‰)		0	0	1	0,53±1,44	0	8	
Můstky před GT (‰)	(n=32)	0	1	2	1,06±1,29	0	6	n.s.
Můstky po GT (‰)		0	1	1,25	1,28±1,53	0	7	
Pupeny před GT (‰)	(n=32)	7	9	15,25	11,06±7,16	0	29	n.s.
Pupeny po GT (‰)		7,5	12	15,25	12,97±9,64	1	51	
MN před GT (‰)	(n=32)	7	11	17,25	13,22±9,32	3	49	p<0,001
MN po GT (‰)		14,75	19	27,25	24,75±19,36	4	101	
PASI před GT	(n=32)	14,3	18,4	21,95	19,3±7,31	8,8	42,4	p<0,001
PASI po GT		4,07	4,85	6,25	5,22±2,16	1,5	12,4	

Legenda:

Q1, Q3 1. kvartil, 3. kvartil

VSO výběrová směrodatná odchylka

Min, Max minimum, maximum

ABB celkový počet aberovaných buněk

SAB strukturálně aberované buňky

NAB numericky aberované buňky

DJB s MN dvoujaderné buňky s mikrojádry (bez ohledu na počet mikrojadern v dvoujaderné buňce)

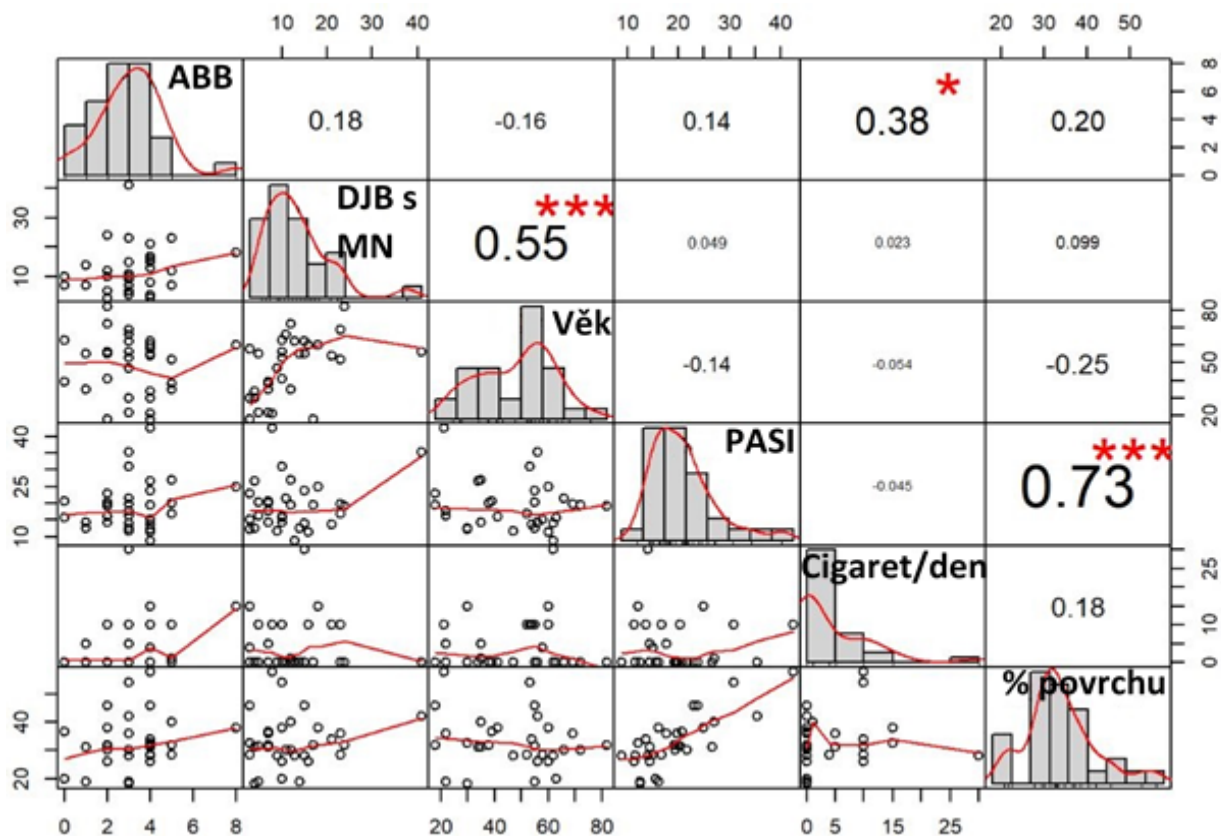
DJB s 1 MN dvoujaderné buňky s 1 mikrojádem

DJB s 2 MN dvoujaderné buňky se 2 mikrojádry

DJB s 3 MN dvoujaderné buňky s 3 a více mikrojádry

n. s. nesignifikantní

Výsledky korelační analýzy dat získaných před terapií souhrnně zobrazuje obrázek 16. V levé části obrázku je znázorněno rozložení jednotlivých parametrů ve skupině 1, v pravé části jsou výsledky korelační analýzy, vyjádřené hodnotou odpovídajícího korelačního koeficientu. Analýza prokázala významnou souvislost mezi věkem a počtem DJB s MN ($p < 0,001$) u pacientů před zahájením terapie. Dále jsme před terapií našli významnou souvislost mezi počtem vykouřených cigaret a ABB ($p < 0,05$). Logický byl nález významné souvislosti mezi PASI skóre a procentem tělesného povrchu postiženého psoriázou ($p < 0,001$).



Obr. 16 Výsledky statistické analýzy vztahů sledovaných parametrů před terapií

ABB celkový počet aberovaných buněk před GT na 100 metafazických buněk

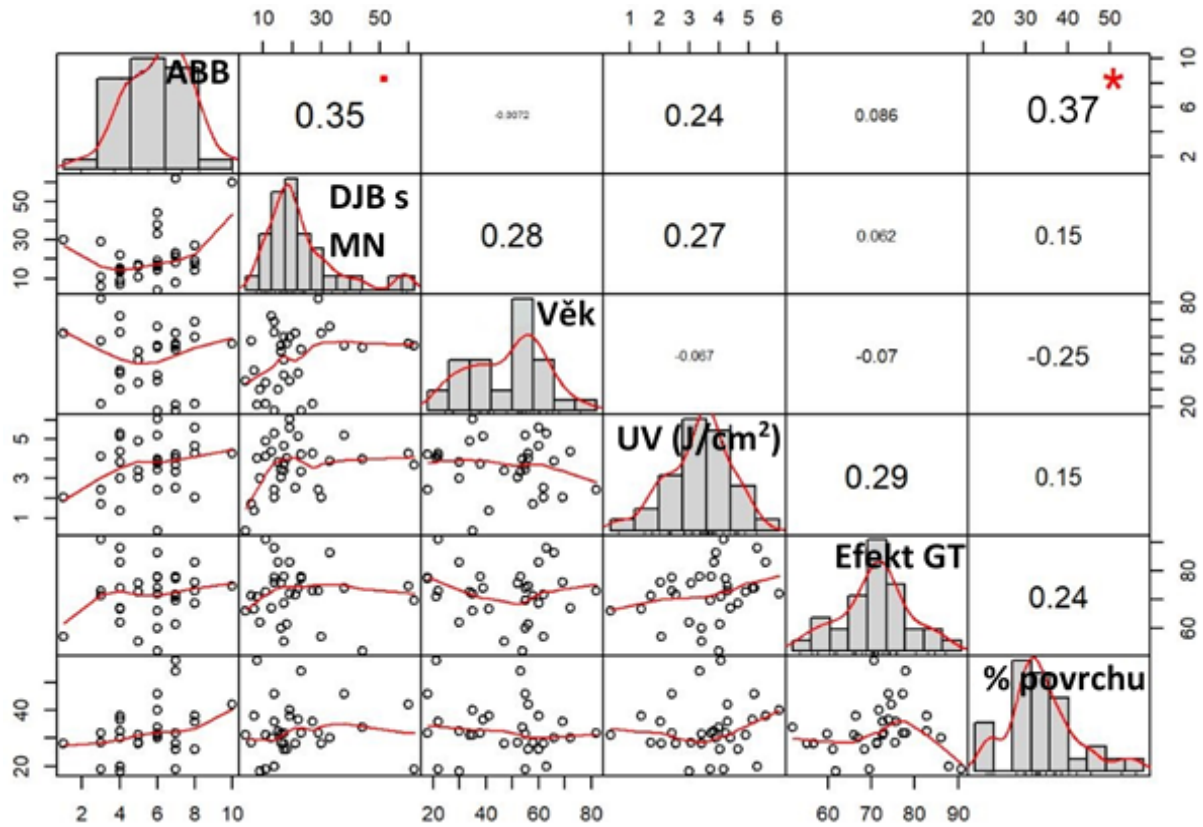
DJB s MN počet dvoujaderných buněk s mikrojádrem na 1 000 DJB

% povrchu % tělesného povrchu postiženého psoriázou

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Výsledky korelační analýzy dat získaných po terapii souhrnně zobrazuje obrázek 17. V levé části obrázku je znázorněno rozložení jednotlivých parametrů ve skupině 1, v pravé části jsou

výsledky korelační analýzy, vyjádřené hodnotou odpovídajícího korelačního koeficientu. Analýza prokázala významnou souvislost mezi celkovým počtem ABB a rozsahem povrchu kůže postiženým psoriázou, na který byl aplikován FD ($p < 0,05$). Na hranici významnosti se pohybovala souvislost mezi celkovým počtem DJB s MN na 1 000 DJB a celkovým počtem ABB na 100 mitotických buněk ($p = 0,05$).



Obr. 17 Výsledky statistické analýzy vztahů sledovaných parametrů po terapii

ABB celkový počet aberovaných buněk na 100 metafazických buněk

DJB s MN počet dvoujaderných buněk s mikrojádroem na 1 000 DJB

UV (J/cm²) dávka UVB záření v J/cm²

Efekt GT účinnost GT v %

% povrchu % tělesného povrchu postiženého psoriázou

* $p < 0,05$

6.5 Porovnání vlivu variant GT na hladinu chromosomálních aberací

Tabulka 7 shrnuje údaje o rozsahu postižení, době aplikace FD, dávce UV záření, hladinách ABB, SAB a NAB a o účinku terapie u všech čtyř sledovaných skupin pacientů (variant GT).

Nejrozsáhlejší postižení tělesného povrchu psoriázou bylo zaznamenáno ve skupině 2, nejdelší aplikace FD i UV ve skupině 3 a nejvyšší nárůst ABB ve skupině 1, kde jsme pozorovali i nejvyšší nárůst SAB, a naopak nejnižší nárůst NAB. Nejnižší genotoxický účinek potenciál byl pozorován u skupiny/varianty GT 4.

Tab. 7 Porovnání sledovaných parametrů mezi skupinami

	Skup. 1: 4% FD + UV2 (n=32)				Skup. 2: 4% FD + UV1 (n=20)			
	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO
Věk (roky)	34,75	53,50	60,00	47,50±17,17	31,50	46,00	55,25	44,30±14,26
Povrch těla (m ²)	1,86	1,96	2,03	1,95±0,19	1,79	1,90	2,00	1,92±0,18
Rozsah postižení (%)	28,00	31,75	36,88	32,98±9,24	29,50	34,75	42,63	36,90±10,14
Doba aplikace dehtu (dny)	8,00	12,00	13,25	10,69±3,88	10,75	11,00	13,00	11,30±3,53
Doba UV (dny)	10,00	13,00	15,00	12,13±3,52	10,00	11,50	13,25	11,35±3,30
Dávka UV (J/cm ²) ^A či (min)	2,90	3,88	4,32	3,65±1,30	44,75	52,00	79,00	58,05±28,85
Nárůst ABB po GT (n)	1,00	3,00	4,00	2,58±2,21	1,00	2,00	3,00	1,95±1,57
Nárůst SAB po GT (n)	1,00	3,00	4,00	2,55±2,18	0,00	1,00	2,25	1,55±1,76
Nárůst NAB po GT (n)	0,00	0,00	0,00	0,03±0,30	0,00	0,00	1,00	0,40±0,75
PASI před GT	14,30	18,40	21,95	19,30±7,31	11,98	17,85	22,65	19,07±8,59
PASI po GT	4,08	4,85	6,25	5,22±2,16	4,40	6,50	7,75	6,56±3,47
Efekt GT (%)	66,46	72,56	77,32	71,76±9,09	59,95	65,96	70,40	66,08±8,29
	Skup. 3: 5% FD + UV1 (n=72)				Skup. 4: 3% FD + UV1 (n=49)			
	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO
Věk (roky)	26,75	40,50	55,00	41,58±17,09	29,00	41,00	60,00	44,34±18,75
Povrch těla (m ²)	1,76	1,89	2,03	1,89±0,18	1,70	1,87	1,99	1,87±0,23
Rozsah postižení (%)	30,00	32,25	38,00	35,17±11,63	25,00	30,00	38,00	31,92±11,02
Doba aplikace dehtu (dny)	12,00	15,00	18,00	15,43±5,27	9,00	13,00	15,00	12,49±4,46
Doba UV (dny)	11,00	15,00	17,00	14,72±5,03	11,00	13,00	15,00	12,86±4,29
Dávka UV (min)	55,00	90,50	125,00	92,38±54,96	58,00	91,00	120,00	92,12±49,13
Nárůst ABB po GT (n)	1,00	2,00	3,00	1,67±1,30	0,00	1,00	1,00	0,69±0,71
Nárůst SAB po GT (n)	0,00	1,00	2,00	1,03±1,20	0,00	1,00	1,00	0,65±0,66
Nárůst NAB po GT (n)	0,00	1,00	1,00	0,64±0,83	0,00	0,00	0,00	0,04±0,61
PASI před GT	16,43	19,65	22,85	20,70±8,01	13,20	16,80	21,00	18,13±6,97
PASI po GT	3,00	5,45	8,33	6,08±3,64	6,30	7,90	10,50	8,93±6,10
Efekt GT (%)	55,99	70,79	82,07	69,80±15,81	44,44	20,88	59,70	51,57±14,76

Legenda:

ABB celkový počet aberovaných buněk

SAB strukturálně aberované buňky

NAB numericky aberované buňky

Při porovnání jednotlivých skupin mezi sebou byly nalezeny signifikantní rozdíly v hladinách ABB mezi skupinou 4 a všemi ostatními skupinami ($p < 0,001$; ve všech případech byl vyšší

počet ABB ve skupině 1) a rovněž mezi skupinou 1 a 3 ($p < 0,05$), kdy významnější nárůst ABB byl ve skupině 1 (tabulka 8, obrázek 18)

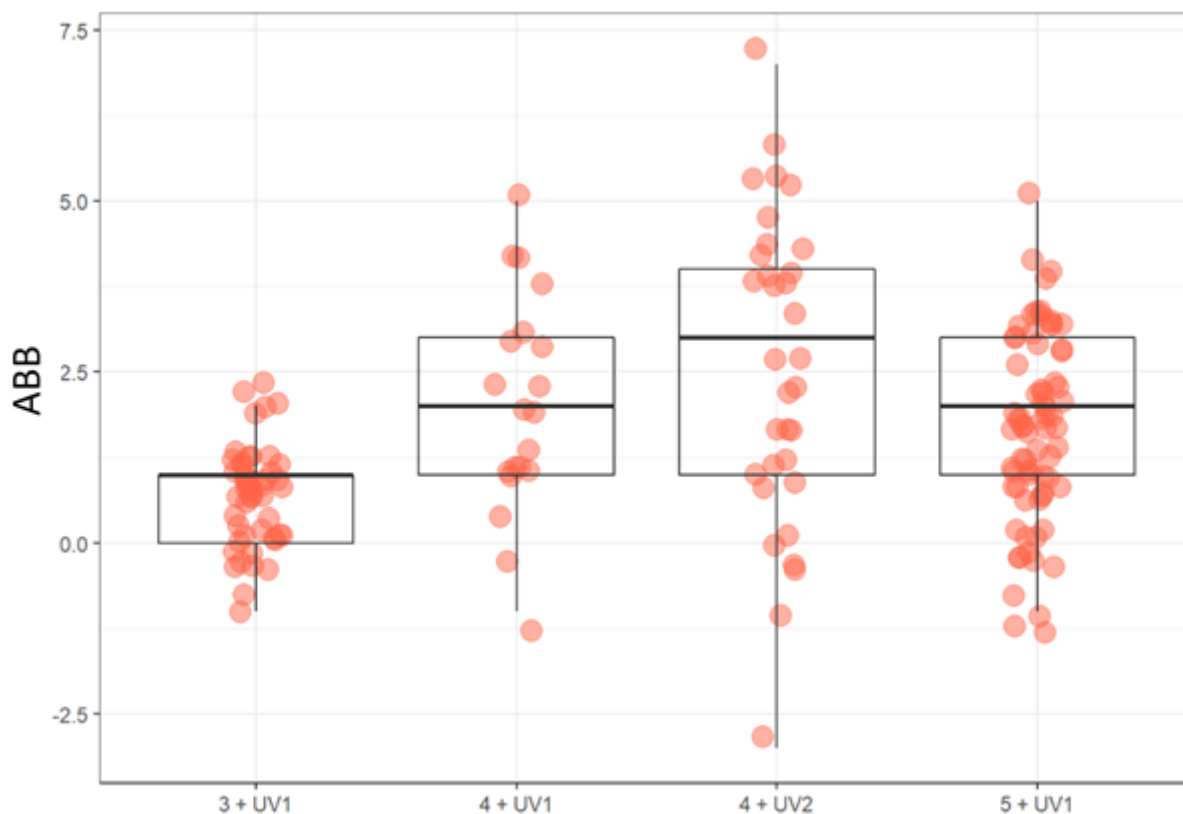
Tab. 8 Porovnání hladin celkového počtu aberovaných buněk (ABB) mezi skupinami

Nárůst ABB			
	Skup. 4: 3% FD + UV1	Skupi. 2: 4% FD + UV1	Skup. 1: 4% FD + UV2
Skup. 2: 4% FD + UV1	$p < 0,001$	NA	NA
Skup. 1: 4% FD + UV2	$p < 0,001$	n.s.	NA
Skup. 3: 5% FD + UV1	$p < 0,001$	n.s.	$p < 0,05$

Legenda:

n. s. nesignifikantní

NA neanalyzováno



Obr. 18 Porovnání rozdílů hladin celkového počtu aberovaných buněk (ABB) mezi skupinami (individuální data)

Na ose y jsou udávány změny počtu ABB po GT vůči stavu před GT

3 + UV1 skupina pacientů 4 – GT 3% FD a UV1 zářičem

4 + UV1 skupina pacientů 2 – GT 4% FD a UV1 zářičem

4 + UV2 skupina pacientů 1 – GT 4% FD a UV2 zářičem

5 + UV1 skupina pacientů 3 – GT 5% FD a UV1 zářičem

Při porovnání jednotlivých skupin mezi sebou byly nalezeny signifikantní rozdíly v hladinách SAB mezi skupinou 1 a skupinami 3 a 4 ($p < 0,001$). Ve všech případech byl vyšší počet SAB ve skupině 1. K hranici významnosti se blížil rozdíl mezi skupinou 4 a oběma zbývajících skupinami ($p = 0,056$) (tabulka 9, obrázek 19).

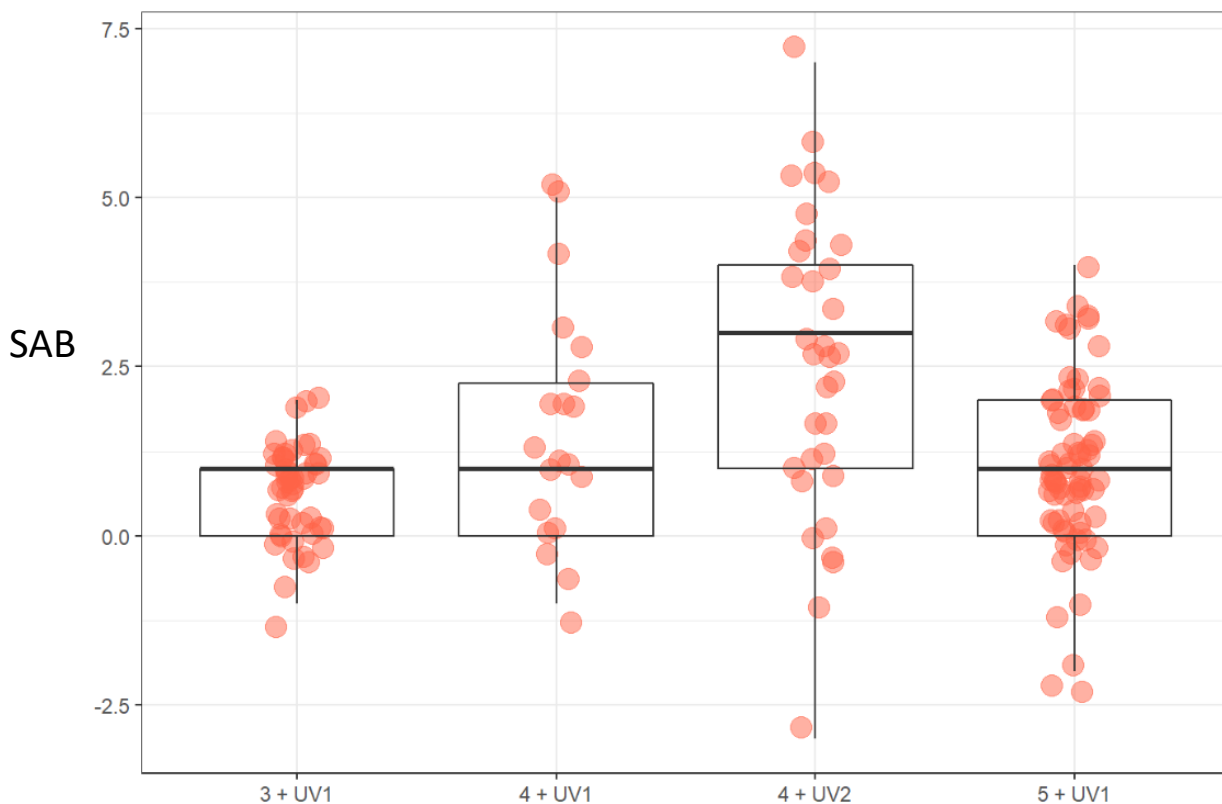
Tab. 9 Porovnání rozdílu hladin strukturálně aberovaných buněk (SAB) mezi skupinami

Nárůst SAB			
	Skup. 4: 3% FD + UV1	Skupi. 2: 4% FD + UV1	Skup. 1: 4% FD + UV2
Skup. 2: 4% FD + UV1	$p = 0,056$	NA	NA
Skup. 1: 4% FD + UV2	$p < 0,001$	$p = 0,083$	NA
Skup. 3: 5% FD + UV1	$p = 0,056$	n.s.	$p < 0,001$

Legenda:

n. s. nesignifikantní

NA neanalyzováno



Obr. 19 Porovnání rozdílů hladin strukturálně aberovaných buněk (SAB) mezi skupinami (individuální data)

Na ose y jsou udávány změny počtu SAB po GT vůči stavu před GT

3 + UV1 skupina pacientů 4 – GT 3% FD a UV1 zářičem

4 + UV1 skupina pacientů 2 – GT 4% FD a UV1 zářičem

4 + UV2 skupina pacientů 1 – GT 4% FD a UV2 zářičem

5 + UV1 skupina pacientů 3 – GT 5% FD a UV1 zářičem

Při porovnání jednotlivých skupin mezi sebou byly nalezeny signifikantní rozdíly v hladinách NAB mezi skupinami 3 a 1 ($p < 0,001$) a skupinami 3 a 4 ($p < 0,001$) a dále mezi skupinami 1 a 2 ($p < 0,05$). Nejvyšší nárůst NAB byl zaznamenán ve skupině 3, nejnižší naopak ve skupině 1 (tabulka 10, obrázek 20).

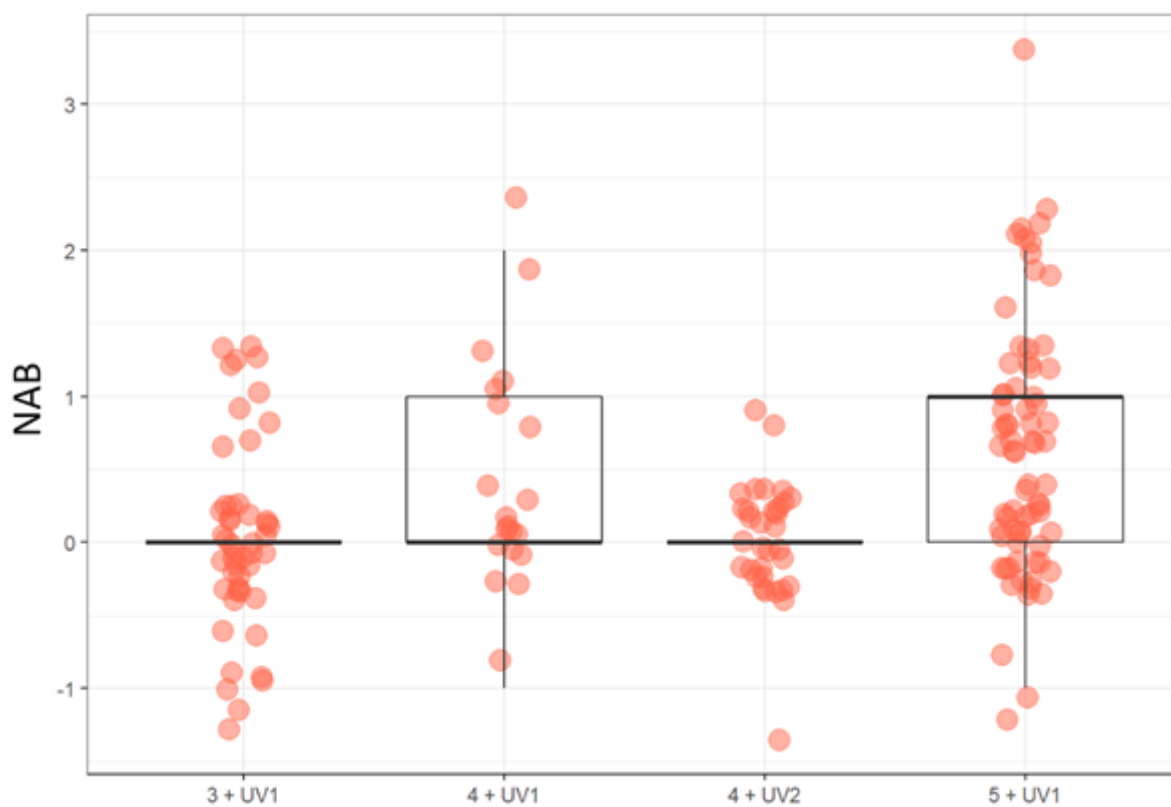
Tab. 10 Porovnání rozdílu hladin numericky aberovaných buněk (NAB) mezi skupinami

Nárůst NAB			
	Skup. 4: 3% FD + UV1	Skupi. 2: 4% FD + UV1	Skup. 1: 4% FD + UV2
Skup. 2: 4% FD + UV1	p=0,123	NA	NA
Skup. 1: 4% FD + UV2	n.s.	p<0,05	NA
Skup. 3: 5% FD + UV1	p<0,001	n.s.	p<0,001

Legenda:

n. s. nesignifikantní

NA neanalyzováno



Obr. 20 Porovnání rozdílu hladin numericky aberovaných buněk (NAB) mezi skupinami (individuální data)

Na ose y jsou udávány změny počtu NAB po GT vůči stavu před GT

3 + UV1 skupina pacientů 4 – GT 3% FD a UV1 zářičem

4 + UV1 skupina pacientů 2 – GT 4% FD a UV1 zářičem

4 + UV2 skupina pacientů 1 – GT 4% FD a UV2 zářičem

5 + UV1 skupina pacientů 3 – GT 5% FD a UV1 zářičem

V rámci celé studované skupiny (všechny čtyři skupiny dohromady) jsme mezi muži a ženami nezaznamenali signifikantní rozdíly v hladinách ABB, SAB ani NAB. Rovněž nebyl zaznamenán rozdíl v účinnosti GT (tabulka 11).

Tab. 11 Porovnání vybraných parametrů mezi skupinou mužů a žen

	Muži (n=99)				Ženy (n=74)				p
	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	
Věk (roky)	28,00	40,00	55,00	41,86±16,22	31,00	45,00	61,00	46,15±18,39	p=0,13
Nárůst ABB	1,00	1,00	3,00	1,58±1,52	1,00	1,00	2,00	1,63±1,63	n.s.
Nárůst SAB	0,00	1,00	2,00	1,26±1,51	0,50	1,00	2,00	1,28±1,60	n.s.
Nárůst NAB	0,00	0,00	1,00	0,31±0,72	0,00	0,00	1,00	0,35±0,76	n.s.
Efekt GT (%)	54,91	63,64	75,75	64,60±16,18	52,92	65,82	75,74	64,62±15,81	n.s.

Legenda:

ABB celkový počet aberovaných buněk

SAB strukturálně aberované buňky

NAB numericky aberované buňky

n. s. nesignifikantní

V rámci celé studované skupiny (všechny čtyři skupiny dohromady) jsme našli signifikantně vyšší hladinu NAB ve skupině kuřáků ($p < 0,05$). Kuřáci byli významně mladší než nekuřáci ($p < 0,001$) (tabulka 12).

Tab. 12 Porovnání vybraných parametrů mezi kuřáky a nekuřáky

	Kuřáci (n=81)				Nekuřáci (n=92)				p
	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	Q1	Medián	Q3	Průměr±VSO	
Věk (roky)	28,00	36,00	52,00	38,69±14,50	31,00	52,00	62,00	48,08±18,34	p<0,001
Nárůst ABB	0,00	1,00	3,00	1,59±1,57	1,00	1,00	2,00	1,60±1,56	n.s.
Nárůst SAB	0,00	1,00	2,00	1,14±1,54	1,00	1,00	2,00	1,39±1,55	n.s.
Nárůst NAB	0,00	0,00	1,00	0,46±0,76	0,00	0,00	1,00	0,22±0,70	p<0,05
Efekt GT (%)	55,56	65,38	73,08	65,35±15,25	51,35	62,32	76,25	63,97±9,38	n.s.

Legenda:

ABB celkový počet aberovaných buněk

SAB strukturálně aberované buňky

NAB numericky aberované buňky

n. s. nesignifikantní

Terapie měla nejvyšší účinnost ve skupině 1, nejnižší pak ve skupině 4 (tabulka 13, obrázek 21).

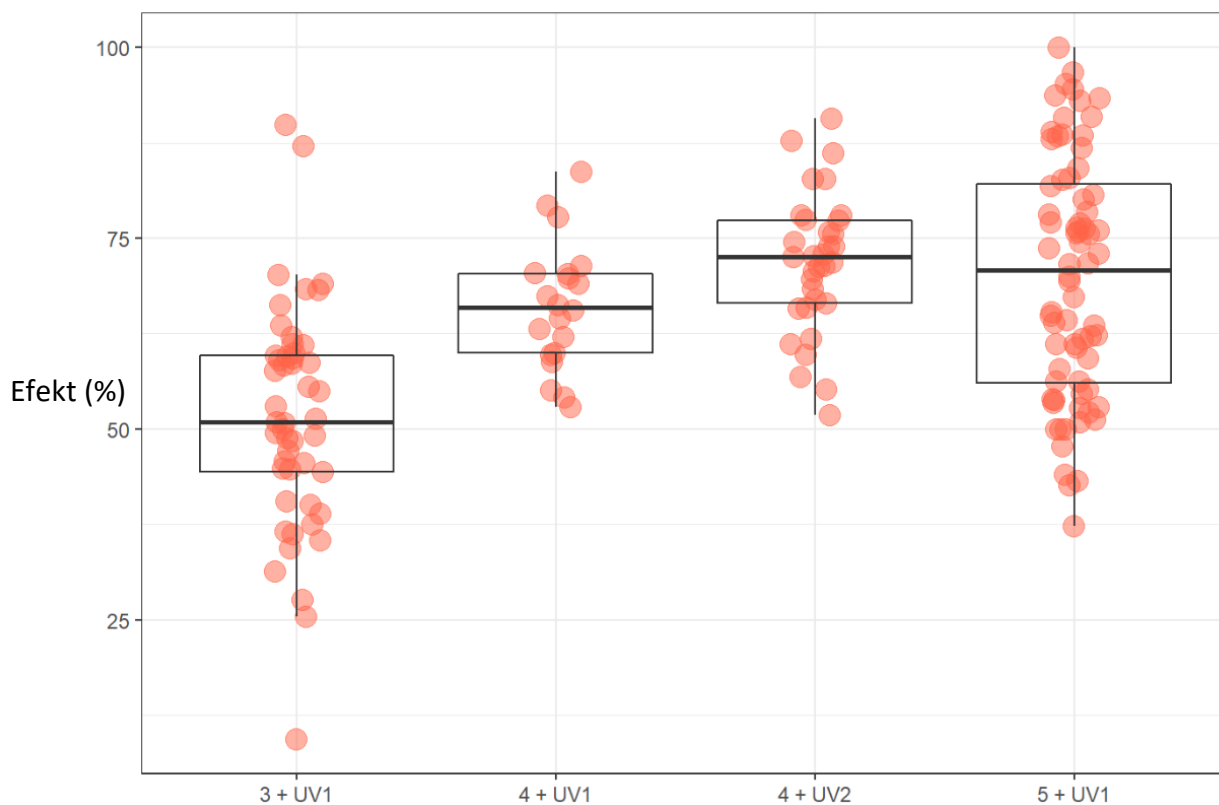
Tab. 13 Porovnání efektivity jednotlivých variant terapie

Efekt terapie			
	Skup. 4: 3% FD + UV1	Skup. 2: 4% FD + UV1	Skup. 1: 4% FD + UV2
Skup. 2: 4% FD + UV1	p<0,001	NA	NA
Skup. 1: 4% FD + UV2	p<0,001	p<0,05	NA
Skup. 3: 5% FD + UV1	p<0,001	n.s.	n.s.

Legenda:

n. s. nesignifikantní

NA neanalyzováno



Obr. 21 Porovnání efektivity jednotlivých variant terapie

Na ose y je udávána efektivita terapie v procentech

- 3 + UV1 skupina pacientů 4 – GT 3% FD a UV1 zářičem
- 4 + UV1 skupina pacientů 2 – GT 4% FD a UV1 zářičem
- 4 + UV2 skupina pacientů 1 – GT 4% FD a UV2 zářičem
- 5 + UV1 skupina pacientů 3 – GT 5% FD a UV1 zářičem

7 Diskuze

7.1 Trans-epidermální absorpce vybraných PAU

Experimenty popsané v prezentované disertační práci byly prováděny na epidermální membráně, která byla odebrána z dorzální strany ušního boltce prasete. Kůže ušního boltce prasete domácího je svou strukturou blízká kůži lidské a je považována za její vhodnou experimentální náhradu (Jacobi et al. 2007). Lze ji poměrně snadno získat a její použití je z etického hlediska méně komplikované než použití kůže lidské.

Jako vhodné rozpouštědlo pro přípravu donorového roztoku ve vodě špatně rozpustných látek (např. PAU) bývá v literatuře uváděn aceton (Kotingová et al. 2012; Sartorelli et al. 1999; Sartorelli et al. 2001) nebo ethanol (Payan et al. 2008). Implementace takto získaných výsledků do oblasti reálných dermálních expozičních (převážně v pracovním prostředí) je však poněkud diskutabilní, protože aceton ani ethanol nepatří k běžným matricím s vyšším obsahem PAU. Běžnými matricemi bývají minerální oleje, maziva, ropné meziproducty a odpady a dehtové výrobky. Kamenouhelný (farmaceutický) dehet v masťovém základu „*unguentum leniens*“ je používám i v dermatologii (Kotingová et al. 2012). Z uvedených důvodů jsme pro přípravu donorového roztoku použili v našem experimentu metodiku US-Environmental Protection Agency (US-EPA), která k dermálnímu testování látek špatně rozpustných ve vodě (kam patří i PAU) doporučuje jako rozpouštědlo isopropyl-myristát (EPA 2004).

Experiment popisuje dermální penetraci nekonečné (maximální) dávky několika vybraných PAU. Nutnou podmínkou pro aplikaci nekonečné dávky je stav, kdy přes membránu penetruje méně než 10 % z nabídnuté dávky (Chilcott a Price 2008). Vzhledem k tomu, že v našem experimentu penetrovalo přes membránu maximálně 0,84 % nabídnuté dávky, lze podmínku scénáře nekonečné dávky považovat za splněnou.

Je známo, že vyhodnocení dat z dermálních experimentů může být zatíženo chybami ve výpočtech hodnot Flux a Lag time v důsledku nerespektování dosažení pseudo-ustáleného stavu (pseudo-steady-state). Pro redukci/eliminaci tohoto rizika bývá doporučována doba trvání experimentu delší než 2,7 násobek průměrné hodnoty Lag time (Williams 2003). Z uvedeného důvodu jsme pro naftalen, fenanthren a pyren zvolili délku experimentu 24 hod a pro benzo[a]pyren délku 48 hod. Průměrné hodnoty Lag time se u naftalenu, fenanthrenu a pyrenu pohybovaly mezi 0,26, až 3,25 hod. Po jejich vynásobení výše uvedeným násobkem 2,7 dostáváme hodnoty 0,7 až 8,8 hod. Průměrná hodnota Lag time benzo[a]pyrenu byla 11,2 hod,

po vynásobení násobkem 2,7 dostáváme hodnotu 30,2 hod. Je zřejmé, že v obou případech (24 hod, resp. 48 hod) byla splněna podmínka dosažení pseudo-ustáleného stavu.

Při zhodnocení variability množství jednotlivých PAU v isopropyl-myristátu, které penetrovalo přes epidermální membránu za daný časový úsek (PAU-penet), jsme zjistili, že variační koeficient (VK; podíl výběrové směrodatné odchylky VSO a průměru hodnot; %) PAU-penet dosahoval hodnot 61 % u naftalenu, 41 % u fenanthrenu, 47 % u pyrenu a 33 % u benzo[a]pyrenu. Míra rozptylu parametrů Flux a Lag time dosahovala hodnot 48 % a 65 % u naftalenu, 45 % a 19 % u fenanthrenu, 45 % a 15 % u pyrenu a 38 % a 36 % u benzo[a]pyrenu. V našich předcházejících dermálních experimentech, které byly zaměřeny na penetraci jednotlivých PAU a směsí PAU v acetonu přes plnou kůži (Kotingová 2015), dosáhl variační koeficient PAU-penet hodnot 36 % u naftalenu, 82 % u fenanthrenu, 107 % u pyrenu a 51 % u benzo[a]pyrenu. V případě testování směsi čtyř PAU (naftalen, fenanthren, pyren a benzo[a]pyren) dosahoval VK PAU-penet hodnot 63 % u naftalenu, 84 % u fenanthrenu a 94 % u pyrenu (koncentrace benzo[a]pyrenu ve směsi PAU se nacházela pod mezí detekce). Z uvedeného vyplývá, že experimenty prováděné na membráně vykazují (s výjimkou naftalenu) nižší variabilitu PAU-penet.

Průměrné hodnoty parametru Flux ($\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{hod}$) v prezentované studii, prováděné na epidermální membráně z prasečího ucha, dosahovaly úrovně $95,7 \pm 45,5$ u naftalenu, $19,5 \pm 8,7$ u fenanthrenu, $4,38 \pm 1,98$ u pyrenu a $0,21 \pm 0,08$ u benzo[a]pyrenu. Průměrné hodnoty parametru Lag time (hod) dosahovaly úrovně $0,26 \pm 0,17$ u naftalenu, $2,12 \pm 0,41$ u fenanthrenu, $3,25 \pm 0,50$ u pyrenu a $11,2 \pm 4,08$ u benzo[a]pyrenu. Hodnota parametru Flux klesala s molární hmotností PAU, zatímco hodnota parametru Lag time s molární hmotností PAU rostla. Je zřejmé, že v prostředí s difuzní kinetikou pronikající molekuly a s omezenou přítomností aktivních transportních mechanismů hraje molekulová hmotnost látky významnou úlohu. Tento trend popisují i ostatní autoři (Kotingová 2015; Sartorelli et al. 1998; Sartorelli et al. 1999).

V odborné literatuře jsme našli jen velmi omezené množství informací o experimentálních penetracích PAU přes epidermální membránu, se kterými bychom mohli porovnávat naše výsledky. Sartorelli et al. (1998) sledovali dermální penetraci osmi PAU, mezi nimi i naftalenu, fenanthrenu a pyrenu, přes plnou kůži kočkodana obecného. Jako rozpouštědlo byl použit aceton. Experiment byl prováděn bez okluze a bylo při něm aplikováno $147,5 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ naftalenu, $11,5 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ fenanthrenu a $8,8 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ pyrenu, tedy dávky mnohonásobně nižší, než které byly použity v našem experimentu s prasečí epidermální membránou (62 090, 35 876

a 13 898 nmol/cm²). Autoři našli hodnoty parametru Lag time naftalenu 2,17±3,80 hod (VK 175 %), fenanthrenu 12,39±5,05 hod (VK 41 %) a pyrenu 17,41±8,25 hod (VK 47 %). Porovnáme-li tyto hodnoty s našimi výsledky uvedenými v předchozím odstavci, zjistíme, že doba průchodu plnou kůží byla zhruba osmkrát delší u naftalenu, šestkrát delší u fenanthrenu a pětkrát delší u pyrenu. Rozptyl hodnot Lag time byl přitom zhruba dvakrát až třikrát vyšší v případě experimentu na plné kůži. Při těchto úvahách si však musíme být vědomi značných rozdílů v druhu experimentálního zvířete, tloušťce kůže, rozpouštědla a výši aplikované dávky.

V další práci hodnotili Sartorelli et al. (1999) dermální penetraci směsi třinácti PAU, mezi nimi i naftalenu, fenanthrenu, pyrenu a benzo[a]pyrenu přes plnou kůži kočkodana obecného. Jako rozpouštědlo PAU byl použit aceton a komerčně dodávaný syntetický motorový mazací olej. Vedle roztoků PAU byl na povrch kůže aplikován též umělý pot pro napodobení podmínek reálných situací v pracovním prostředí. Při experimentu bylo jako součást směsi aplikováno i 160,0 nmol/cm² naftalenu, 12,1 nmol/cm² fenanthrenu, 8,3 nmol/cm² pyrenu a 3,1 nmol/cm² benzo[a]pyrenu. Opět se tedy jednalo o dávky mnohonásobně nižší, než které byly použity v našem experimentu s prasečí epidermální membránou (62 090, 35 876, 13 898 a 3 158 nmol/cm²).

Parametr Flux PAU (v acetonu) dosahoval ve výše uvedené práci Sartorelli et al. (1999) hodnot 1,01±0,40 nmol/cm²/hod pro naftalen (VK 39 %), 0,03±0,01 nmol/cm²/hod pro fenanthren (VK 28 %), 0,04±0,041 nmol/cm²/hod pro pyren (VK 107 %) a 0,0014±0,0012 nmol/cm²/hod pro benzo[a]pyren (VK 86 %). Při porovnání těchto dat s našimi výsledky uvedenými v tabulce 3 je zřejmé, že hodnoty parametru Flux v experimentu Sartorelli et al. byly o jeden a více řádů nižší. Rozptyl hodnot Flux byl při srovnání s naším experimentem na membráně zhruba dvojnásobný.

Parametr Lag time PAU (v acetonu) dosahoval ve výše uvedené práci Sartorelli et al. (1999) hodnot 1,18±0,01 hod pro naftalen (VK 1 %), 10,95±7,62 hod pro fenanthren (VK 70 %), 24,46±2,68 hod pro pyren (VK 11 %) a 31,21±10,81 hod pro benzo[a]pyren (VK 35 %). Tyto hodnoty sice byly několikanásobně vyšší než naše výsledky, nicméně rozdíly nedosáhly řádových hodnot, tak jak tomu bylo u rozdílů v hodnotách parametru Flux. Rozptyl hodnot Lag time byl při srovnání s naším experimentem na membráně zhruba dvojnásobný.

Parametr Flux PAU dosahoval ve výše uvedené práci Sartorelli et al. (1999) při použití roztoků PAU v motorovém mazacím oleji hodnot 0,27±0,22 nmol/cm²/h pro naftalen (VK 80 %), 0,006±0,0035 nmol/cm²/h pro fenanthren (VK 58 %) a 0,0015±0,0003 nmol/cm²/h pro pyren

(VK 20 %). Obdobně jako u acetonových roztoků PAU, hodnoty parametru Flux v oleji byly o jeden a více řádů nižší (s obdobným rozptylem jako u acetonových roztoků) než hodnoty v námi prezentované studii na membráně.

Parametr Lag time PAU dosahoval ve výše uvedené práci Sartorelli et al. (1999) při použití roztoků PAU v motorovém mazacím oleji hodnot $4,86 \pm 7,99$ hod pro naftalen (VK 164 %), $15,15 \pm 3,10$ hod pro fenanthren (VK 20 %) a $13,38 \pm 8,91$ hod pro pyren (VK 67 %). Absorpce benzo[a]pyrenu byla při použití motorového mazacího oleje pod hranicí detekce (Sartorelli et al. 1999). Je evidentní, že hodnoty byly opět několikanásobně vyšší než naše výsledky, nicméně, obdobně jako u acetonových roztoků, rozdíly nedosahovaly řádových hodnot. Ke všem výše uvedeným porovnáním s prací Sartorelli et al. (1999) je nutno upozornit na značné rozdíly v podmínkách experimentů, konkrétně na rozdíly v druhu experimentálního zvířete, tloušťce kůže, rozpouštědla a ve výši a formě (individuálně, ve směsi) aplikované dávky PAU.

Kotingová et al. (2012) porovnávali vliv koncentrace donorového roztoku a vliv rozpouštědla (acetonu a slunečnicového oleje) na dermální absorpci pyrenu přes plnou kůži dorzální strany boltce prasečího ucha. Pyren v acetonu byl aplikován v koncentracích 209 nmol/cm^2 a $2\,095 \text{ nmol/cm}^2$, pyren v oleji v koncentracích 235 nmol/cm^2 a $2\,347 \text{ nmol/cm}^2$. V našem experimentu jsme aplikovali dávku výrazně vyšší $13\,898 \text{ nmol/cm}^2$.

V experimentu Kotingová et al. (2012) byla po aplikaci acetonového roztoku pyrenu (209 nmol/cm^2) nalezena hodnota parametru Flux $0,0192 \pm 0,0181 \text{ nmol/cm}^2/\text{hod}$ (VK 95 %) a parametru Lag time $15,38 \pm 10,04$ hod (VK 65 %). Po aplikaci pyrenu v oleji (209 nmol/cm^2) byla nalezena hodnota parametru Flux $0,0088 \pm 0,0089 \text{ nmol/cm}^2/\text{hod}$ (VK 101 %) a parametru Lag time $17,36 \pm 13,43$ hod (VK 77 %) (Kotingová et al. 2012).

Po aplikaci pyrenu v acetonu ($2\,095 \text{ nmol/cm}^2$) byla nalezena hodnota parametru Flux $0,0150 \pm 0,0139 \text{ nmol/cm}^2/\text{hod}$ (VK 93 %) a parametru Lag time $13,16 \pm 6,37$ hod (VK 48 %). Po aplikaci pyrenu v oleji ($2\,095 \text{ nmol/cm}^2$) byla nalezena hodnota parametru Flux $0,0119 \pm 0,0063 \text{ nmol/cm}^2/\text{hod}$ (VK 50 %) a parametru Lag time $18,09 \pm 10,54$ hod (VK 58 %) (Kotingová et al. 2012).

Při porovnání dat experimentu Kotingové et al. (2012), prováděné na plné prasečí kůži, s daty námi prezentovaného experimentu na epidermální membráně z prasečí kůže je zřejmý výrazný pokles hodnoty parametru Flux (o dva až tři řády) a tři až pětinašobný nárůst parametru Lag time u experimentů s plnou kůží. Opět však upozornujeme na rozdílné podmínky experimentu

Kotingová et al. (2012) a prezentovaného experimentu (v tloušťce kůže, rozpouštědle a ve výši aplikované dávky). Rozptyl hodnot parametru Flux pyrenu na plné kůži byl (v porovnání s experimentem na membráně) zhruba dvojnásobný, rozptyl hodnot parametru Lag time byl trojnásobný až pětinasobný. Tato skutečnost naznačuje, že použití epidermální membrány (namísto plné kůže) by snad mohlo částečně redukovat rozptyl dat, který s sebou přináší použití kůže z různých oblastí těla od různých jedinců. Oprávněnost této domněnky však bude muset být potvrzena dalšími studii.

Experimenty s PAU na epidermální membráně dosud popsány nebyly. Z ostatních látek sledovali van de Sandt et al. (2000) penetraci pesticidu propoxuru (2-isopropoxyfenyl N-methylkarbamát) přes epidermální membránu získanou z lidské kůže břicha a potkaní kůže zad (Sprague-Dawley rat). Propoxur byl aplikován v 60% vodném ethanolu. Hodnota parametru Flux při použití lidské epidermální membrány byla $4,9 \pm 1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hod}$ a hodnota parametru Lag time 1,1 hod. Při použití potkaní epidermální membrány byla hodnota parametru Flux $7,2 \pm 1,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hod}$ a parametru Lag time 1,2 hod. Autoři rovněž hodnotili penetraci propoxuru přes plnou lidskou a plnou potkaní kůži. V obou případech byly hodnoty parametru Flux nižší a Lag time vyšší u plné kůže. Hodnota parametru Flux přes plnou lidskou kůži byla $1,7 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hod}$ a parametru Lag time 2,3 hod. V případě potkaní plné kůže byla hodnota parametru Flux $1,0 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hod}$ a parametru Lag time 2,3 hod.

Kanikkannan et al. (2001) hodnotili perkutánní penetraci tryskového paliva (JP-8), které obsahuje i naftalen, přes dermatomovanou kůži prasečího ucha a dermatomovanou lidskou kadaverózní kůži (tloušťka v obou případech 500 μm). Hodnoty parametru Flux naftalenu na obou typech kůže byly srovnatelné, konkrétně $0,3761 \pm 0,0174 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hod}$ u prasečí kůže a $0,4514 \pm 0,0223 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hod}$ u kůže lidské. Chilcott et al. (2001) popsali penetraci yperitu přes epidermální membránu z kůže prasečího ucha a lidského břicha. Byla použita maximální/nekonečná dávka ($100 \text{ mg}/\text{cm}^2$). Parametr Flux dosáhl při použití epidermální membrány z prasečího ucha hodnoty $411 \pm 175 \cdot 10^{-6} \text{ g}/\text{cm}^2/\text{hod}$, parametr Lag time hodnoty $5,7 \pm 3,2 \text{ hod}$. V případě epidermální membrány z kůže lidského břicha byla hodnota parametru Flux $157 \pm 66 \cdot 10^{-6} \text{ g}/\text{cm}^2/\text{hod}$ a parametru Lag time $5,1 \pm 2,3 \text{ hod}$.

7.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky ve farmaceutickém dehtu

Bylo zjištěno, že 100 g masti s 5% FD obsahovalo 0,04 mg PAU s prokázanou karcinogenitou pro člověka (prokázané karcinogeny, IARC skupina 1) a 16,57 mg PAU u kterých lze karcinogenitu pro člověka předpokládat (možné karcinogeny, IARC skupina 2B). Mast (100g)

se 4% FD obsahovala 0,032 mg karcinogenních PAU a 13,264 mg PAU ze skupiny možných karcinogenů a mast (100g) se 3% FD obsahovala 0,024 mg karcinogenních PAU a 9,948 mg PAU ze skupiny možných karcinogenů.

Borska et al. (2016) uvádí průměrný tělesný povrch 1,6 až 1,8 m². Povrch těla souboru našich pacientů se pohyboval mezi 1,24 až 2,50 m² a psoriázou bylo postiženo 11 až 76 % tělesného povrchu. Při GT byly aplikovány zhruba 4 mg FD na cm² psoriatických lézí. Na základě výše uvedených údajů lze odhadovat, že v případě použití masti se 4% FD bylo na kůži pacienta aplikováno v průměru 8,269 µg prokázaných a 3,427 mg možných karcinogenů (a celkově 9,867 mg námi vybraných 16 PAU). Množství BaP aplikovaného v případě 4% FD odpovídá při jedné aplikaci přibližně 32 balíčkům vykouřených cigaret (Moorthy et al. 2015) a je zhruba 28 násobně vyšší ve srovnání s množstvím PAU přijatých za stejnou dobu z běžné diety (EFSA 2008). Pokud vezmeme v úvahu údaje udávané Wu et al. (2016) a IARC (2012) zjistíme, že celotělová dermální expozice PAU při výrobě hliníku se za osmihodinovou pracovní dobu pohybuje okolo 8,67 mg PAU a je zcela srovnatelná s jedním dnem aplikace GT s použitím masti se 4% FD.

7.3 Zavedení mikronukleus testu

Zavedení a ověření mikronukleus testu bylo jedním z klíčových úkolů této disertační práce, a proto mu je v diskusi věnována značná pozornost. První popis MN pochází z konce 19. století, kdy Howell a Jolly našli drobné inkluze v kočičí a myší krvi. Obdobné drobné inkluze byly také pozorovány v erytrocytech pacientů trpících těžkou anémií a později byly nazvány Howell-Jollyho tělíska (Hayashi 2016).

Evans et al. (1959) popsali MN v kořenových čepičkách fazolí vystavených gama záření a pokusili se kvantifikovat vyvolané chromosomální poškození. Jednalo se o první pokus hodnocení chromosomálního poškození pomocí frekvence MN. Autoři odhadovali, že asi 60 % fragmentů chromozomů má za následek formaci MN. V roce 1970 vyvinuli Boller a Schmid (1970) (za použití buněk kostní dřeně a periferní krve křečička čínského vystavené alkylačnímu agens trenimonu) metodu hodnocení frekvence MN v erytrocytech, kterou poprvé označili jako „Mikrokern-Test“ (mikronukleus test, MNT) (Boller a Schmid (1970). Poprvé byl MNT test použit na lidských lymfocytech v roce 1976 (Countryman a Heddle 1976). Zatím se jednalo o hodnocení MN v jednojaderných buňkách.

MacGregor et al. (1980) popsali metodu detekce MN v erytrocytech myší. Autoři zjistili, že u myší se erytrocyty s MN vyskytují v cirkulaci zcela běžně. Dále uvádějí, že detekce MN v

buňkách kostní dřeně umožňuje hodnotit akutní efekt chemikálií, zatímco detekce MN v periferních erythrocytech hodnotí spíše účinky chronické. V letech 1981 a 1983 bylo publikováno několik metodik detekce MN v samčích zárodečných buňkách savců, které umožňují hodnocení potencionálního nepříznivého účinku různých faktorů na následující generace (Lahdetie a Parvinen 1981; Tates et al. 1983).

V roce 1983 byla Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD) vytvořena směrnice pro testování genotoxických účinků chemických látek *in vivo* pomocí detekce MN v savčích erythrocytech. V průběhu let byla mnohokrát revidována. Poslední revize této směrnice proběhla v roce 2016 (OECD 2016b).

Obecným problémem byla standardizace techniky při použití jiných buněk než erythrocytů, tak aby MN byla hodnocena v buňkách, které prodělaly právě jednu mitózu. Odlišení buněk, které prodělaly právě jednu mitózu od ostatních buněk populace, bylo při použití jednojaderných buněk obtížné. Fenech a Morley (1985) zkoušeli rozlišení pomocí autoradiografické techniky s použitím pulsu ³H-thymidinu ve čtyřicáté osmé hodině kultivace mitogenem stimulovaných lidských periferních lymfocytů a následné detekce MN v lymfocytech po jedné mitóze mezi sedmdesátou druhou a osmdesátou čtvrtou hodinou. Komplikací byla volba vhodné koncentrace radio-značeného thymidinu, která by sama nezpůsobovala nárůst v počtu MN. Druhou zkoušenou technikou byla detekce MN v kulturách mitogenem stimulovaných lidských periferních dvoujaderných lymfocytů, vzniklých po přidání 3,0 µg/ml cytochalasinu B ve čtyřicáté čtvrté hodině kultivace a následné skórování MN v sedmdesáté druhé hodině. Bylo zjištěno, že cytochalasin B nezpůsobil nárůst v bazální hladině MN. V roce 1985 tak byla Fenechem a Moleym vytvořena modifikace s použitím cytochalasinu B, která je jednouchou a v současnosti rozšířenou metodou využívanou k sledování poškození DNA u lidí exponovaných různým xenobiotikům s potencionálně genotoxickým účinkem.

V roce 1988 se podařilo vyvinout modifikaci metody umožňující detekci kinetochor pomocí speciálního barvení s použitím protilátek (Degrassi a Tanzarella 1988). Díky této modifikaci je možné odlišit MN vznikající v důsledku poškození DNA od MN vznikajících poškozením mikrotubulů dělicího vřeténka. Tím lze odlišit účinky látek klastogenních (poškození DNA) a aneugenních (poškození mikrotubulů dělicího vřeténka).

V roce 2004 OECD vydalo směrnici pro testování genotoxického účinku chemických látek *in vitro*, působících na savčí a lidské buněčné linie či lidské periferní lymfocyty od zdravého dárce,

s následnou detekcí MN (OECD 2004). Tato směrnice byla naposledy revidována v roce 2016 (OECD 2016c).

V roce 2008 byl MNT úspěšně validován a formálně schválen vědeckým poradním výborem Evropského centra pro validaci alternativních metod (European Centre for the Validation of Alternative Methods; ECVAM) jako alternativa ke standardizované metodě *in vitro* testu chromozomálních aberací (Corvi et al. 2008).

Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.1, MNT je založený na detekci MN v cytoplazmě interfazických buněk (OECD 2016c) a je využíván jako indikátor expozice genotoxinům a genomické stability při monitorování lidské populace. Mikrojádra jsou malá extranukleární tělíška většinou obklopená jadernou membránou (Hintzsche et al. 2017). Vznikají v dělicích se buňkách z (1) acentrických chromozomálních fragmentů, (2) z celých chromozomů neschopných migrovat k pólům během anafáze (OECD 2016c), (3) z destruovaných chromatinových můstků spojujících oddělené anafazické chromozomy nebo (4) z agregátu extrachromozomálních chromatinových elementů, jako jsou „double minutes“ (DMs) chromatinová tělíška (Okamoto et al. 2012). Navíc mohou MN vznikat i během interfáze prostřednictvím jaderného pučení („nuclear budding“) (Utani et al. 2011). Díky rozvoji modifikace mikronukleus testu s použitím cytochalasinu B, označované jako „cytokinesis-block“ mikronukleus test (CBMN), se nejen formace MN, ale i další asociované biomarkery poškození DNA (jako jsou chromatinové můstky a jaderné pupeny) a také buněčná smrt a cytostáza staly lépe hodnotitelné (Fenech et al. 2011). Cytochalasin B je inhibitor polymerizace aktinu. Blokuje cytokinezi a umožňuje tak rozlišit dvoujaderné buňky, které prodělaly právě jedno dělení v kultuře, od jednojaderných buněk, které se nerozdělily či unikly z cytokinetického bloku (Mateuca et al. 2012).

MN z acentrických chromozomových či chromatidových fragmentů vznikají z nereparovaných nebo špatně reparovaných zlomů DNA. K zaostávání celých chromozomů za ostatními chromozomy během anafáze může docházet v důsledku hypomethylace opakujících se sekvencí DNA v oblasti centromery, při defektech v kinotochorových proteinech, při dysfunkci dělicího vřeténka či při defektech v genech regulujících anafázi (Fenech et al. 2011; Mateuca et al. 2012).

Chromatinové můstky se objevují v důsledku přítomnosti dicentrických chromozomů, se kterými se setkáváme při poruše reparace zlomů DNA, kdy dochází ke spojování telomer, a dále se objevují i při poruše separace sesterských chromatid během anafáze, kdy dochází k poruše

dekatenace (Fenech et al. 2011). Situace, kdy dochází k rozlomení během anafáze či telofáze, mohou vést ke vzniku jednoho i více MN (Hoffelder et al. 2004) a destabilizaci chromozomů (Fenech et al. 2011; Utani et al. 2011).

DMs představují cytogenetický projev genové amplifikace (Okamoto et al. 2012). Amplifikovaná DNA může být eliminována z chromozomů díky rekombinaci mezi homologními oblastmi, kdy amplifikované sekvence tvoří acentrické a atelomerické kroužky DNA (Shimizu et al. 2000). Agregované DMs se oddělují od chromozomů mezi metafází a anafází a tvoří MN na konci mitózy (Utani et al. 2011).

Jaderné pupeny se formují v důsledku pučení cytoplazmatické membrány („cytoplasmic blebbing“) a jaderného obsahu („nuclear budding“) skrze poškozenou jadernou membránu. K pučení cytoplazmatické membrány dochází v důsledku lokálních změn osmolarity, které vedou ke změně hydrostatického tlaku v buňce. Změny osmolarity mohou následně vytahovat chromatin ven z jádra za vzniku pupenů, ovšem pouze za předpokladu, že jaderná membrána je poškozená. K pučení jaderného obsahu dochází zejména během S fáze buněčného cyklu, kdy se jaderný obsah zdvojnásobuje. Protein lamin B je syntetizován na začátku S fáze buněčného cyklu a představuje významnou součást jaderné membrány, která ovlivňuje její pevnost. Pokud je syntéza laminu B nedostatečná vzhledem k nárůstu jaderného obsahu, jaderná membrána může být částečně narušena a dochází k pučení jaderného obsahu skrze tuto oslabenou oblast během S fáze. Lamin B negativní mikrojádra, tedy mikrojádra bez jaderné membrány, se tak mohou tvořit i z nukleárních pupenů (Utani et al. 2011).

Intersticiální DNA bez centromery či telomery se mnohem častěji objevují v jaderných pupenech, které jsou spojeny s jádrem tenkou chromatinovou stopkou než v mikrojádrech zcela oddělených od hlavního jádra (Utani et al. 2011). Podle jiných literárních zdrojů jsou jaderné pupeny projevem procesu eliminace amplifikované DNA, komplexů reparace DNA a pravděpodobně i nadbytečných chromozomů v aneuploidních buňkách (Fenech et al. 2011). Jaderné pupeny mají stejnou morfologii jako MN, ale jsou s hlavním jádrem spojeny užší či širší stopkou z nukleo-plazmatického materiálu. Mohou vznikat i po rozlomení chromatinového můstku, kdy se zbytky jaderného materiálu stahují zpět k jádrům. Většina jaderných pupenů vzniká z intersticiální DNA, či z terminálních acentrických fragmentů (Fenech et al. 2011). MN vznikající z acentrických chromozomů, celých chromozomů zaostávajících za ostatními chromozomy během anafáze a DMs jsou obklopeny laminem B a tedy i jadernou membránou,

zatímco MN vznikající z destruovaných chromatinových můstků a jaderným pučením jsou lamin B negativní a tedy bez jaderného obalu (Utani et al. 2011).

MN mohou vznikat také v důsledku hypomethylace DNA, tedy epigenetickým mechanismem. Pokud dojde k hypomethylaci heterochromatinu pericentromerických oblastí, dochází k dekonduzaci chromatinu, což je spojeno s poruchou segregace chromozomů, které pak tvoří MN obsahující celé chromozomy či chromatidy (Luzhna et al. 2013). Poměr mezi MN objevujícími se během profáze druhé mitózy a chromozomy a chromatidami opožděujícími se během první mitózy je asi 1:1,5–2, což naznačuje, že polovina až tři čtvrtiny opožděných chromozomů a chromatid z první mitózy vede ke vzniku MN, která pak přetrvávají do další mitózy (Hintzsche et al. 2017). Pokud se hypomethylace objeví v celém chromozomu, chromatin je více relaxovaný a dochází ke zvýšení genové exprese. Současně narůstá míra poškození DNA a chromozomální zlomy, které přispívají k tvorbě MN obsahujících pouze fragmenty DNA (Luzhna et al. 2013).

V lymfocytech zdravých osob bez abnormální expozice genotoxickým látkám pocházejí MN obvykle z acetrických fragmentů a celých chromozomů v poměru asi 30:70 % v jednom extrému až v poměru 70:30 % v extrému druhém, v závislosti na věku a pohlaví (Fenech et al. 2011). Jiné literární zdroje uvádějí, že v neexponované populaci až 90 % MN obsahuje celé chromozomy (Wojda et al. 2007). Spontánní frekvence MN se zvyšuje se stoupajícím věkem, což je dááno do souvislosti s věkem narůstajícím výskytem dysfunkce kinetochor (Wojda et al. 2007). Nefic a Handzic (2013) udávají, že statisticky signifikantní nárůst MN se objevuje u skupiny lidí nad 40 let věku a týká se nejen počtu MN, ale i počtu jaderných pupenů. Fenech a Bonassi (2011) se domnívají, že nárůst počtu MN s věkem je způsoben kombinací (1) kumulativního efektu získaných mutací genů účastnících se opravy DNA, segregace chromozomů a kontrolujících buněčný cyklus a (2) numerických a strukturálních aberací chromozomů způsobených expozicí endogenním, environmetálním a pracovním genotoxinům, neadekvátní nutricí a dalšími faktory životního stylu. Obecně je vyšší výskyt MN v lymfocytech u žen než u mužů (Fenech 2007), což se dává do souvislosti s inaktivací jednoho X chromozomu (Fenech a Bonassi 2011). U žen bez abnormální expozice genotoxickým látkám až 72 % MN obsahuje právě X chromozom (Hando et al. 1994) a až 37 % těchto MN je způsobeno poruchami funkce kinetochor (Fenech et al. 2011). Z autosomů se nejčastěji v MN objevují chromozomy 9, 1 a 16 v důsledku zlomů v heterochromatinových oblastech (Norppa a Falck 2003).

MNT tak umožňuje detekovat poškození chromozomů způsobené klastogenně i aneugenně působícími látkami v podmínkách *in vitro* i *in vivo*. Klastogeny mohou způsobovat vznik chromozomálních fragmentů, zatímco aneugeny interferují s mitotickým aparátem buněk a mohou v průběhu mitózy vést k poruše segregace celých chromatid či chromozomů (Hintzsche et al. 2017). Na rozdíl od testu chromozomálních aberací detekuje MNT změny DNA, které jsou přenášeny do dceřiných buněk (OECD 2016c).

Dosud nebylo uspokojivě objasněno, zda při expozici mutagenu vznikají MN již *in vivo* nebo se formují až během *ex vivo* kultivace v důsledku přetrvávajícího poškození DNA. MN se mohou formovat *in vivo* během dělení lymfocytů v kostní dřeni, slezině či lymfatických uzlinách a následně perzistovat v krvi, která je později odebrána k analýze. Ovšem vzhledem k tomu, že CBMN je limitován na DJB, tedy na buňky, které prodělaly jedno mitotické dělení v kultuře, lze očekávat, že většina MN při této metodě vzniká až *in vitro* (Kirsch-Volders a Fenech 2001). K obdobnému závěru došli i Arsoy et al. (2009), kteří našli významný nárůst počtu MN ve DJB po 72h kultivaci lymfocytů od pacientů postupujících chemoterapii ve srovnání s kultivací pouze 24h a hodnocením MN v jednojaderných buňkách. V případě, že většina MN vzniká až *ex vivo*, účinek CBMN závisí na třech faktorech: (1) typu poškození DNA způsobeném *in vivo*, (2) možném hromadění poškození DNA *in vivo* a na (3) schopnosti lymfocytů reparovat poškození DNA. K tvorbě MN *ex vivo* tedy může docházet buď v důsledku expozice mutagenu *in vivo*, pokud indukované poškození DNA perzistuje v periferních lymfocytech a není reparováno, či přímým přenosem preexistujícího MN do dceřiné DJB, pokud je daná buňka schopná dělení (Speit et al. 2011).

Také nebyl zcela objasněn osud MN a mikrojaderných buněk po mitóze. Bylo popsáno celkem šest teorií postmitotického osudu MN a mikrojaderných buněk: (1) degradace MN či mikrojaderných buněk, (2) reinkorporace do hlavního jádra, (3) vypuzení MN z buňky, (4) perzistence MN v cytoplasmě, (5) předčasná kondenzace chromozomu v MN (objevuje se, pokud chromozom v MN není synchronní s chromozomy hlavního jádra) či chromozotripse (destrukce chromozomu na více místech v důsledku mnoha zlomů DNA při nekompletní syntéze DNA, která vede k masivnímu přeuspořádání genetické informace omezenému na jeden chromozom) a (6) eliminace mikrojaderné buňky apoptózou. Z uvedených teorií jsou první čtyři považovány za vysoce pravděpodobné a byly hlouběji studovány. Naprostá většina MN perzistuje beze změn nejméně do další mitózy, ale pravděpodobně i mnohem déle. Poměrně často se také objevuje reinkorporace do hlavního jádra během další mitózy, což může znamenat, že formace MN není pouze indikátorem nestability genomu, ale může i přímo

způsobovat nestabilitu, když se MN inkorporuje zpět do nesprávného hlavního jádra. Vzácně a pouze za specifických okolností (jako je typ buněk či agens indukující vznik MN atd.) se pak objevuje degradace a vypuzení MN. Tvorba MN může přispívat k počátečním a pozdějším krokům maligní transformace buněk (Hintzsche et al. 2017).

Na lidských buněčných liniích i primárních buňkách bylo zjištěno, že většina mikrojaderných buněk prochází normální mitózou a poškození DNA tedy nemá signifikantní efekt na proliferaci (Hintzsche et al. 2017). MN mají defektní replikační i reparační mechanismy a rovněž limitovanou transportní kapacitu (Hintzsche et al. 2017). Replikační kapacita MN nezávisí na buňce, ale spíše na MN. Pokud MN obsahuje lamin B, je schopné se replikovat během jednoho buněčného cyklu, naopak pokud lamin B chybí, MN není schopné replikace (Okamoto et al. 2012). Dosud nedošlo ke shodě, zda replikace MN probíhá synchronně (Luzhna et al. 2013) či asynchronně (Cresta et al. 2012) s replikací hlavního jádra.

Rovněž je pravděpodobné, že mikrojaderná DNA je schopna transkripce, což opět závisí především na obsahu MN. Pokud je MN tvořeno celým chromozomem, obecně se transkripce mikrojaderné DNA objevuje, naopak pokud se v MN nacházejí pouze acentrické fragmenty, k transkripci nedochází. Výjimku pak představují MN obsahující DMs, které jsou transkripčně kompetentní. Rovněž transkripční aktivita MN je asociována s přítomností laminu B (Utani et al. 2007). Zdá se, že poškození DNA v MN nevede k mitotickému arestu ani aktivaci apoptózy (Hintzsche et al. 2017).

Frekvenci MN ovlivňují v první řadě genetické faktory, jako jsou např. defekty metabolismu DNA a její reparace (Nefic a Handzic 2013). Bonassi et al. (2003) uvádějí, že kouření do 30 cigaret za den nevede k významnému zvýšení počtu MN. Sram et al. (2016) se také domnívají, že frekvence MN není signifikantně ovlivněna kouřením. Tento závěr však nesdílejí jiní autoři, kteří dokladují, že kouření již 20 krabiček za rok (tedy asi 1 cigarety/den) signifikantně zvyšuje počet MN ve srovnání jak s nekuřáky, tak s kouřením do 20 krabiček/rok (Huang et al. 2009). Nefic a Handzic (2013) našli vyšší frekvenci MN u kuřáků ve srovnání s kuřáčkami. Autoři rovněž popisují významnou souvislost mezi počtem buněk s MN, počtem MN, počtem jaderných pupenů a množstvím vykouřených cigaret za den a počtem let kouření.

Odborná literatura se shoduje, že nadměrná konzumace alkoholu je spojena s vyšším rizikem vzniku maligních onemocnění a také výskytem nejen MN (Maffei et al. 2002; Nefic a Handzic 2013), ale i chromozomálních aberací v lymfocytech periferní krve (Santovito et al. 2015). Při hlubší analýze původu MN pomocí centromerických sond bylo zjištěno, že počet MN

neobsahujících centromeru je u alkoholiků obdobný jako u kontrol, ale výskyt MN obsahujících centromeru, a tedy celý chromozom, je u alkoholiků signifikantně vyšší (Maffei et al. 2000).

Cvičení střední intenzity může u trénovaných osob vést ke snižování počtu MN (Huang et al. 2009; Pittaluga et al. 2006). Náhlé intenzivní cvičení u netrénovaných jedinců může být naopak spojeno s nárůstem počtu MN v lymfocytech periferní krve po dobu 24 až 48 h od ukončení cvičení (Pittaluga et al. 2006; Schiffel et al. 1997).

Řada studií prokázala signifikantní vztah mezi příjmem či plasmatickou hladinou některých vitamínů a počtem MN v periferních lymfocytech (Ladeira et al. 2015; Ni et al. 2012; Thomas et al. 2011). Fenech et al. (2005) dokumentovali, že vyšší příjem vitamínu E, retinolu, folátu, kyseliny nikotinové a kalcia je spojen se signifikantní redukcí počtu MN o -28, -31, -33, -46 a -49 %, a naopak vyšší příjem β -karotenu, riboflavinu, kyseliny pantotenové a biotinu byl spojen s nárůstem počtu MN o +18, +36, +51 a +65 %. Battershill et al. (2008) proto doporučují sledovat ve studiích zabývajících se genotoxikologickým biomonitoringem osob rovněž jejich folátový a vitamin B₁₂ status (kromě věku, pohlaví a kuřáctví). Oba uvedené vitamíny jsou asociovány s přesností syntézy a reparace DNA. Kyselina listová slouží jako donor methylové skupiny při syntéze a reparaci DNA a vitamin B₁₂ je nutný při přeměně homocysteinu na methionin při tvorbě S-adenosyl methioninu, potřebného pro DNA metylaci (Fenech 2001).

Vztah mezi zneužíváním drog a počtem NM byl hodnocen např. u methamfetaminu (Li et al. 2003), kde byl prokázán vztah mezi celkovou dávkou methamfetaminu a počtem MN a sesterských chromatid. Hodnocen byl rovněž u kokainu (de Freitas et al. 2014), kde byl zjištěn statisticky signifikantní nárůst v počtu MN a jaderných pupenů, ale nikoli chromatinových můstků u uživatelů kokainu ve srovnání s kontrolní skupinou. Možný genotoxický potenciál marihuany byl dosud hodnocen pouze *in vitro*. Po expozici periferních lymfocytů od čtyř zdravých dárců syntetickým kanabinoidům došlo k na dávce závislému nárůstu procenta DNA v ohonu v alkalické verzi comet assay a také na dávce závislému poklesu Cytokinesis-Block Proliferation Indexu a signifikantnímu nárůstu počtu buněk s MN a chromatinovými můstkami při dávkách nad 50 μ M, respektive nad 75 μ M syntetických kanabinoidů. K nesignifikantnímu nárůstu pak došlo v počtu jaderných pupenů (Koller et al. 2015).

Nefic a Handzic (2013) uvádějí, že frekvence MN je ovlivňována klimatickými vlivy, především změnami atmosférického ozonu a z toho plynoucí expozicí ultra-fialovému záření. Rovněž Rossnerova et al. (2016) udávají statisticky nesignifikantní změny ve frekvenci MN v průběhu kalendářního roku s vyšším výskytem na podzim než na jaře. Na podzim byl nalezen

významně vyšší výskyt centromer (a tedy celých chromozomů) v MN. Tyto změny autoři dávají do souvislosti se změnami množství PAU v ovzduší v průběhu roku.

7.4 Test chromozomálních aberací

Poprvé chromozomy pozoroval v roce 1842 švýcarský botanik Karl Wilhelm von Nägeli. Jejich detailnější popis a chování v buňce během dělení (mitózy) poskytl v roce 1882 německý lékař Walther Flemming. Označení chromozom ovšem použil až v roce 1888 německý anatom Heindrich Wilhelm von Waldeyer (Khanna 2010).

V roce 1914 popsal německý biolog Theodor Boveri jako první ve svém díle „Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“ vztah mezi chromozomálními změnami a vznikem nádorových onemocnění (Natarajan 2002). Již více než sto let je známo, že chromozomální aberace mohou sloužit jako marker expozice radiaci či chemickým látkám s genotoxickým účinkem (Registre a Proudlock 2016).

Ford a Hamerton (1956) jako první použili kolchicin k zastavení buněčného dělení v metafázi, kdy jsou chromozomy nejlépe viditelné. Byl použit společně s hypotonizačním roztokem, který umožnil lepší oddělení chromozomů a fixaci buněk v suspenzi. V tomto případě se ještě jednalo o *in vivo* experimenty na myších, kdy kolchicin byl aplikován intraperitoneálně, myš byla jednu hodinu po aplikaci usmrcena a byla jí odebrána kostní dřev.

Rothfels a Siminovitch (1958) publikovali modifikaci metody s fixací pomocí směsi alkoholu a kyseliny octové (3:1) a následnou aplikací buněčné suspenze na sklíčko s usušením na vzduchu. Tento postup umožnil vytvořit permanentní preparáty. K vývoji této metody byly použity izolované buňky z kůry ledvin makaka rhesus. Ovlivnění kolchicinem již probíhalo *in vitro*. Moorhead et al. (1960) poprvé popsali kultivaci lidských lymfocytů s použitím fytohemaglutininu, který stimuloval lymfocyty k dělení.

V Československu byl CAT zaveden mezi kontrolní testy preventivního lékařství již v letech 1976–1977. Cílem jeho použití byl odhad úrovně pracovních expozičních limitů na hladinu zamezující vzniku genetického poškození (nádorová onemocnění, poškození potomků) (Sram et al. 2004).

OECD vydala oficiální doporučení pro použití testu chromozomálních aberací k hodnocení genotoxického potenciálu chemických látek v roce 1983. Toto doporučení bylo několikrát revidováno. Poslední revize proběhla v roce 2016 (OECD 2016a).

Asymetrické výměny (dicentrické a ring chromozomy) lze jednoduše detekovat po obarvení Giemsa Romanowski, ale dlouhou dobu byl problém s jednoduchou technikou detekce translokací (symetrické výměny). Tento problém vyřešili Pinkel et al. (1986), kterým se podařilo pomocí metody fluorescenční in situ hybridizace (FISH) označit jednotlivé chromozomy (konkrétně Y chromozom) a tím usnadnit detekci translokací.

Jako chromozomální aberace (CA) jsou označovány změny struktury či počtu chromozomů. Mohou se objevovat spontánně či v důsledku působení radiace nebo chemických látek (Mateuca et al. 2012).

Při použití barvení CAT pomocí Giemsa Romanowski lze detekovat zlomy, gapy, dicentrické chromozomy, acentrické fragmenty či výměny. Technika G-pruhování je více informativní a umožňuje i detekci místa, kde zlomy vznikají častěji. Metoda FISH, umožňující detekci repetitivních sekvencí DNA v oblasti satelitů či telomer, jednokomponentních DNA sekvencí a jedinečných sekvencí typických pro konkrétní chromozomy, představuje pak nejcitlivější variantu identifikace CAT (Grujicic et al. 2016).

Registre a Proudlock (2016) rozlišují dvě hlavní skupiny strukturálních aberací: (1) zlomy (včetně delecí), které vznikají v důsledku neopravených dvou-řetězcových zlomů DNA a (2) výměny, které vznikají chybnou opravou či spojením dvou a více dvou-řetězcových zlomů mezi dvěma a více chromozomy.

Dále se strukturální aberace dělí na chromozomové, kde dochází k poškození obou chromatid, a chromatidové, kde je poškozena pouze jedna chromatida (Mateuca et al. 2012). Celkově tak rozlišujeme čtyři základní kategorie strukturálních aberací: (1) chromatidové zlomy (podílejí se obvykle 50–60 % na celkově pozorovaných aberacích), (2) chromozomové zlomy (podílejí se obvykle 25–35 %), (3) chromatidové výměny a (4) chromozomové výměny (kategorie 3 a 4 se vyskytuje asi v 5–10 %). Rovněž lze zaznamenávat „gapy“, které se ovšem neskórují. Jejich frekvence se pohybuje do 10 % (Sram et al. 2004). Také Danford (2012) uvádí, že vzhledem k obvyklému trvání kultivace, jeden a půl buněčného cyklu, je většina aberací chromatidového typu, ale lze pozorovat i chromozomové, které vznikly *in vivo*. Mezi chromatidové a chromozomové zlomy lze řadit i „minute“ zlomy a „double minute“ zlomy, které vznikají odlomením malých koncových částí chromatid. Nelze je zaměňovat s agregáty extrachromozomálních chromatinových elementů označovaných jako „double minutes“ (DMs), která jsou manifestací amplifikace genu (Danford 2012). Dále lze pozorovat komplexní strukturální změny, jako jsou mnohočetné aberace (více než pět aberací v jedné buňce) či

pulverizace (fragmentace chromozomu, která může vznikat i v důsledku předčasné kondenzace chromozomu nejen poškozením chromozomu) (Registre a Proudlock 2016).

Hlavní příčinou vzniku strukturálních CA je poškození obou řetězců DNA, které může být způsobeno přímo, ale častěji vzniká nepřímo jako následek chyby v replikaci či reparaci DNA. Většina chemických klastogenů způsobuje lézi pouze jednoho řetězce, která je během reparační přeměněna na zlom obou řetězců DNA za vzniku chromatidového zlomu. Pokud pak zůstane chromatidový zlom neopravený, může být během syntézy DNA replikován za vzniku chromozomového zlomu (Registre a Proudlock 2016). Chemické mutageny a UVC záření obvykle poškozují DNA nepřímo a vedou ke vzniku chromatidových zlomů bez ohledu na fázi buněčného cyklu (G1, S a G2 fáze), kdy působí. Aberace se pak objevují až během dalšího cyklu, a proto se zdá pravděpodobné, že k jejich vzniku je potřeba, aby proběhla S fáze buněčného cyklu (Natarajan a Palitti 2008). Mateuca et al. (2012) udává, že dvou-řetězcové zlomy při selhání reparační před syntézou DNA vedou ke vzniku chromozomových zlomů, zatímco jedno-řetězcové zlomy vedou ke vzniku chromatidových zlomů.

Při zlomu obou vláken DNA se objevují tzv. „lepivé“ konce, které se mohou spojovat. Pokud je v buňce přítomen pouze jeden zlom může buď zůstat nespojený, a je detekovatelný jako chromatidový zlom či delece, nebo se spojí bez detekovatelné aberace. Pokud se ovšem v buňce objeví více dvouřetězcových zlomů a je v ní tedy i dvakrát více „lepivých“ konců než zlomů, mohou se tyto „lepivé“ konce vzájemně náhodně spojovat za vzniku výměn pozorovatelných v mikroskopu (Danford 2012).

Vzhledem k tomu, že některé chromozomy jsou více citlivé vůči poškození, nemusí být distribuce poškození DNA v genomu náhodná. Typ a frekvence aberací jsou dány dynamikou chromatinu, fází buněčného cyklu, kdy dochází k inzultu a genetickou či epigenetickou alterací (Venkatesan et al. 2015).

DNA zlomy mohou být opraveny bez následků pro buňku nebo mohou být opraveny chybně či zůstanou zcela neopraveny a pak jsou pozorovatelné jako strukturální aberace v metafazických buňkách. Buňky obsahující nestabilní aberace, jako jsou např. dicentrické a prstenčité (ring) chromozomy či fragmenty, obvykle podstupují p53 dependentní cestu apoptózy. Buňky se stabilními strukturálními aberacemi, jako jsou například balancované translokace, méně efektivně navozují apoptózu, a proto mohou vést k poškození organismu (Mateuca et al. 2012).

Jako numerické aberace jsou označovány změny v počtu chromozomů (polyploidie či aneuploidie), které vznikají v důsledku abnormální segregace chromozomů. Mohou vznikat spontánně nebo v důsledku působení aneugenů (Mateuca et al. 2006). Ve standardní verzi CAT nemusí být nutně způsobeny genotoxickým působením agens, ale mohou vznikat arteficiálně během zpracování materiálu (Registre a Proudlock 2016).

Jsou rozlišovány dvě hlavní skupiny numerických aberací: (1) polyploidie (změny v počtu celých chromozomových sad), které se dále dělí na jednoduché polyploidie a endoreduplikace a (2) aneuploidie (změny v počtu jednotlivých chromozomů), které se dělí na hyperploidie (přebývání chromozomu/ů) a hypoploidie (chybění chromozomu/ů) (Danford 2012).

Po expozici chemických látek se mohou objevovat i další změny, které ovšem nejsou zahrnovány mezi aberace. Příkladem může být rozestup centromer (disociace sesterských chromatid), která může značit cytostatický či cytotoxický účinek, či endoreduplikace, tedy stav, kdy homologní chromozomy leží těsně vedle sebe a je jich tetraploidní počet (AHEM 2007; Registre a Proudlock 2016).

Zvýšený výskyt CA je spojen s urychlením stárnutí buněk a progresí degenerativních onemocnění, vznikem maligních onemocnění a teratogenním působením (AHEM 2007). V literatuře nepanuje jednotný názor na vztah věku a pohlaví a počtu CA. Kopjar et al. (2006) udává, že není signifikantní rozdíl v bazální hladině počtu aberovaných buněk mezi muži a ženami a ani se neobjevují signifikantní změny v závislosti na věku. Ovšem Farkas et al. (2016) popsali téměř lineární vztah mezi věkem a narůstajícím výskytem aneuploidií, přičemž největší nárůst se objevuje po padesátém pátém roce života. V případě strukturálních CA našli signifikantně vyšší výskyt chromozomových zlomů ve skupině 35–55 let a nad 55 let ve srovnání se skupinou do 35 let (Farkas et al. 2015). Mírný nárůst CA s věkem našli i Chaves et al. (2017), Sree Devi et al. (2009) či Sram et al. (2007). Farkas et al. (2016) pozorovali signifikantně vyšší výskyt CA (zejména chromatidových zlomů) u mužů.

Výsledky studií zaměřených (mimo jiné) na vztah mezi kouřením a hladinou CA nejsou příliš konzistentní. Například Farkas et al. (2016) a Kopjar et al. (2006) dokumentovali signifikantně vyšší počet aberovaných buněk ve skupině kuřáků ve srovnání s nekuřáky, ale Minina et al. (2018) či Hristova et al. (2013) rozdíl v počtu aberovaných buněk nezaznamenali.

Maffei et al. (2002) popsali signifikantně vyšší počet aberovaných buněk ve skupině alkoholiků ve srovnání se skupinou abstinujících alkoholiků a kontrolní skupinou. K obdobným

výsledkům došli i Santovito et al. (2015), kteří našli signifikantní vyšší počet CA u skupiny nekouřících alkoholiků než ve skupině nekuřáků abstinentů. Nejvíce se objevovaly chromatidové zlomy, následované chromozomovými zlomy. V této práci byl popsán i nález korelace mezi frekvencí CA a trváním abúzu alkoholu. Existují i práce s opačnými výsledky. Například Hristova et al. (2013) vztah mezi konzumací alkoholu a počtem CA nezaznamenali.

Literární údaje týkající se vztahu mezi vitamínovým statutem a počtem aberovaných buněk, jsou poměrně omezené. Například Anderson et al. (1997) nepozorovali signifikantní rozdíl v celkovém počtu aberovaných buněk mezi skupinou osob užívající placebo a vitamin C v dávkách 6 a 60 mg/den po dobu 14 dní. Naopak po *in vitro* expozici vzorků krve od osob užívajících 6 a 60 mg vitaminu C denně bleomycinu (33 µg/ml) došlo k signifikantnímu nárůstu celkového počtu aberovaných buněk ve srovnání s exponovanými vzorky krve osob užívajících placebo. Sidneva et al. (2005) studovali účinek vitamino-minerálových přípravků obsahujících ginkgo bilobu, česnekový extrakt, koenzym Q10, guaranu, echinaceu, spirulinu a chlorelu u dobrovolníků. V jejich krvi byly po 30 dnech užívání nalezeny signifikantně vyšší hladiny vitaminů C, E a karotenoidů a signifikantně nižší počet spontánně aberovaných buněk. Sram et al. (2007) rovněž popsali protektivní vliv vitaminu C a folátu na hladinu CA. V práci Alzoubi et al. (2012) nebyl pozorován vliv vitaminu B₁₂ na hladinu CA.

Údaje o vlivu ročního období na hladinu aberovaných buněk jsou velmi omezené. Chebotarev et al. (2001) zaznamenali nejvyšší výskyt spontánních CA v kontrolní skupině v zimě a v létě a pokles CA na jaře a na podzim.

7.5 Vliv GT na hladiny mikrojaderných a chromosomálních aberací skupiny pacientů 1

Ve skupině 1 (4% FD+UV2) vedla GT k signifikantnímu nárůstu DJB s MN ($p < 0,001$). Došlo k signifikantnímu nárůstu počtu DJB s 1 MN, 2 MN i 3 a více MN. Průměrně obsahovalo alespoň 1 MN 12,1 DJB na 1 000 DJB před GT a 21,2 DJB na 1 000 DJB po GT. Průměrný počet (\pm VSO) MN na 1 000 DJB byl 13,22 ($\pm 9,32$) před GT a 24,75 ($\pm 19,36$) po GT. V případě chromatinových můstků a jaderných pupenů byl zaznamenán mírný nárůst, který ale nebyl signifikantní. Medián počtu chromatinových můstků před i po léčbě byl 1 můstek na 1 000 DJB a 9 jaderných pupenů před a 12 po GT na 1 000 DJB.

Fenech (2007) uvádí, že celkové počty změn na 1 000 DJB během CBMN provedeném na normálních periferních lymfocytech od dárce (bez známé expozice genotoxickým látkám) lze očekávat v případě MN v rozmezí 0–30, v případě chromatinových můstků v rozmezí 0–10 a v případě jaderných pupenů v rozmezí 0–5. Počty DJB s MN a chromatinových můstků před i po GT tak odpovídají očekávanému rozmezí pro neexponovanou dospělou populaci.

V případě jaderných pupenů jsme našli vyšší hodnoty před i po GT. Nefic a Handzic (2013) ve skupině 100 dobrovolníků z běžné nepříbuzné populace (Bosna Hercegovina) ve věku 16 až 75 let (37 kuřáků), detekovali $7,94 \pm 8,44$ buněk s MN, $7,01 \pm 6,98$ buněk s 1 MN, $0,73 \pm 1,31$ buněk s 2 MN, $0,30 \pm 1,23$ buněk s 3 a více MN na 1 000 DJB a $9,07 \pm 10,59$ MN na 1 000 DJB. Průměrně se u jedné osoby na 1 000 hodnocených DJB vyskytovalo $5,18 \pm 5,39$ chromatinových můstků a $6,37 \pm 9,34$ jaderných pupenů. Hodnoty jsou srovnatelné s námi studovanou skupinou před GT. Vyšší počty jaderných pupenů ($5,83 \pm 2,55$ %) a nižší chromatinových můstků ($2,36 \pm 1,27$ %) udávají i Sinitsky et al. (2016). Počty jaderných pupenů jsou rovněž vyšší než chromatinových můstků a než rozmezí, které uvádí Fenech (2007). Uvedené rozdíly mohou být zčásti připisovány na vrub odlišnostem studovaných populací, určitý podíl může mít i nižší počet zaznamenaných chromatinových můstků, po jejichž rozlomení mohou jaderné pupeny přetrvávat (Fenech et al. 2011).

Vzhledem ke skutečnosti, že jsme hodnotili i distribuci MN mezi DJB považujeme za vhodnější používat parametr celkového počtu DJB s MN, který lépe odpovídá parametru ABB a tím i metodice doporučené (Danford 2012). Bohužel se v odborné literatuře doposud více používá parametr počet MN na 1 000 DJB. Z důvodu možnosti porovnání našich výsledků s výsledky ostatních autorů byl v textu použit i tento parametr.

Ve skupině mužů před GT jsme zaznamenali $10,67 \pm 6,87$ MN na 1 000 DJB, což je v souladu se zjištěním Rossnerova et al. (2016), kteří provedli studii na 95 českých mužích s průměrným věkem $68,0 \pm 6,8$ roku (jaro 2014 $10,93 \pm 3,46$ a podzim 2014 $11,26 \pm 3,30$ MN na 1 000 DJB). U žen jsme před GT našli $15,47 \pm 10,74$ MN na 1 000 DJB. Oba údaje se shodují s polskou studií Wojda et al. (2007), kteří u mužů udávají procento buněk s MN mezi 0,5 a 1,4 % v závislosti na věku, u žen pak mezi 0,9 a 1,8 % rovněž v závislosti na věku. Celkově ve studované populaci byl zaznamenán 1,3násobně vyšší výskyt MN u žen než u mužů ($p=0,04$) (Wojda et al. 2007), což jsme rovněž pozorovali ($1,45$ násobně nesignifikantně vyšší počet MN na 1 000 DJB u žen ve srovnání s muži).

Fortin et al. (2015) našli ve vzorcích 20 zdravých neexponovaných dárců (10 mužů, 10 žen, 20–30 let) $9,9 \pm 1,2$ MN na 1 000 DJB ($9,4 \pm 1,6$ muži, $10,4 \pm 1,8$ ženy), tedy méně MN na 1 000 DJB, než bylo zaznamenáno před GT v naší skupině. Tento rozdíl bychom mohli vysvětlovat na základě asociace hladiny MN s věkem respondentů. Průměrný věk studované skupiny psoriatiků byl $47,5 \pm 17,2$ let a našli jsme významnou souvislost mezi věkem a hladinou MN ($\rho=0,55$; $p<0,001$). Nefic a Handzic (2013) popsali signifikantní nárůst počtu MN zhruba od věku 40 let. Wojda et al. (2007) uvádějí, že tento nárůst pokračuje přibližně do 70 let věku, což koresponduje i s věkem narůstajícím výskytem hypoploidních metafazických lymfocytů (Wojda et al. 2006). Potom následuje na věku závislý pokles v počtu MN, který lze vysvětlovat zvýšenou eliminací buněk s MN procesem apoptózy (Wojda et al. 2007) a výskytem „plateau“ fáze v hladině hypoploidních lymfocytů. „Plateau fáze“ byla ovšem pozorována pouze u žen starších 70 let, nikoli u mužů stejného věku (Wojda et al. 2006). Při sledování počtu MN je tedy nutné vždy, zejména pak u osob nad 40 let, brát v úvahu i věk sledovaných osob.

Dle literárních zdrojů dosud nikdo nehodnotil genotoxický potenciál GT psoriázy pomocí CBMN (počty MN, včetně chromatinových můstků a jaderných pupenů). Celkově byl počet DJB s MN detekovaných ve studované skupině ($12,09 \pm 8,07$ ‰ před GT a $21,16 \pm 13,84$ ‰ po GT) obdobný jako ve skupině 26 tureckých asfaltérů (DJB s MN v pondělí ráno $1,98 \pm 0,21$ ‰ a pátek večer $2,16 \pm 0,25$ ‰) (Karaman a Pirim 2009). Nalezený počet DJB s MN byl ovšem nižší než například u 34 pracovníků pařížských kanalizací s expozicí PAU a dalším genotoxickým látkám ($38,02 \pm 7,16$ ‰), kde ovšem i u kontrol byly zaznamenány relativně vysoké hladiny ($28,30 \pm 3,74$ ‰) (Al Zabadi et al. 2011). Naopak vyšší počty MN na 1 000 DJB jsme zaznamenali ve srovnání například se studií pražských městských policistů ($7,32 \pm 3,42$ MN na 1 000 DJB) (Rossnerova et al. 2009), se studií zahrnující 49 pracovníků tureckých koksáren (medián 12 MN na 1 000 DJB), kde ovšem i medián počtu ABB byl nízký (0,5 ‰) (Ada et al. 2013), s čínskou studií zahrnující 141 pracovníků koksárny (MN $9,54 \pm 0,56$ ‰), kde v kontrolní skupině byl počet MN $3,98 \pm 0,44$ ‰ (Duan et al. 2009), či ve srovnání se skupinou 143 ruských horníků uhelných dolů ($11,15 \pm 3,81$ ‰) a jejich kontrolní skupinou ($7,51 \pm 1,83$ ‰) (Sinitsky et al. 2016). Dokumentovali jsme zhruba dvojnásobný nárůst v počtu MN ve DJB i počtu DJB s MN po GT. Obdobný nárůst pozorovali ve srovnání s kontrolní skupinou rovněž Zhang et al. (2015) u 117 pracovníků ve výrobě diesellových motorů, Ada et al. (2013) u 49 pracovníků turecké ocelárny, Sureshkumar et al. (2013) ve skupině 27 indických pracovníků koksáren a Kumar et al. (2011) u skupiny 115 indických silničních dělníků.

Z uvedeného je zřejmé, že studovaná GT má obdobný genotoxický účinek jako závažné průmyslové expozice.

Fortin et al. (2015) *in vitro* exponovali lymfocyty od 20 zdravých neexponovaných dárců známé koncentraci BaP po dobu 24 hodin bez S9 frakce enzymů. Námi detekované počty MN po GT ($24,75 \pm 19,36$ ‰) odpovídají přibližně počtu MN po expozici lymfocytů $20 \mu\text{M}$ BaP *in vitro* ($20,0 \pm 1,9$ ‰) (Fortin et al. 2015). Zdá se tedy, že reaktivní metabolity BaP nevznikají pouze při prostupu PAU kůží, ale mohou vnikat i přímo v lymfocytech.

Literární údaje o vlivu úzkopásmového UVB (311 nm) záření na výskyt MN v periferních lymfocytech jsou značně omezené. Ferahbas et al. (2004) sledovali vliv monoterapie UVB 311 nm na počet MN v periferních lymfocytech ve skupině 36 dermatologických pacientů a našli signifikantně vyšší frekvenci MN po expozici UVB 311 nm již při dávce (průměr \pm VSO) $0,86 \pm 0,23 \text{ J/cm}^2$ (nárůst MN z $1,07 \pm 0,65$ ‰ na $1,47 \pm 0,92$ ‰), přičemž s narůstající dávkou UVB 311 nm se již absolutní počet MN neměnil (při dávce UVB 311 nm $5,68 \pm 1,47 \text{ J/cm}^2$, frekvence MN $1,41 \pm 0,30$ ‰). V naší skupině psoriatických pacientů byla aplikována průměrná dávka $3,65 (\pm 1,30) \text{ J/cm}^2$ a počet MN po terapii byl téměř dvojnásobný. Očekávaná významná souvislost mezi expozicí UVB záření a hladinou MN nicméně potvrzena nebyla ($p=0,272$; $p=0,132$). Domníváme se tedy, že v případě GT dochází k biologickým interakcím mezi účinky PAU a UVB záření, které ve výsledku zvyšují genotoxický potenciál této kombinované expozice. Tuto domněnku potvrzuje nález vysoké hladiny MN v periferních lymfocytech psoriaticků ve srovnání s literárními údaji o pracovní expozici PAU. Na druhou stranu je však nutno zdůraznit, že expozice psoriatických lézí úzkopásmovému UVB záření je spojena s vyšší frekvencí apoptózy lymfocytů v lézích (Bianchi et al. 2003; Ozawa et al. 1999). Otázkou tedy zůstává, zda poškození DNA lymfocytů v průběhu GT není ještě masivnější, než jsme zaznamenali, a zda část lymfocytů s DNA poškozenou PAU neprodělává apoptózu po expozici UVB 311 nm a neuniká tím hodnocení. Mechanismus odstraňování lymfocytů s poškozenou DNA je pochopitelně velmi prospěšný, protože chrání organismus před kumulací poškozených buněk a tím i před jejich maligní transformací.

Po GT jsme pozorovali změny v distribuci MN v DJB. Před GT DJB s 1 MN tvořili 91,0 %, s 2 MN 8,8 % a se 3 a více MN 0,2 % všech DJB s MN. Po GT jsme zaznamenali 87,3 % s 1 MN, 10,2 % se 2 MN a 2,5 % se 3 a více MN. Z uvedeného je zřejmé, že po expozici GT se zvyšuje podíl buněk obsahujících 2 a více MN.

Studie Sinitsky et al. (2016), zaměřená na expozici PAU z uhelného prachu (uhelné doly), popsala podobné distribuce frekvence MN u skupiny exponované (90,4 %; 8,5 %; 1,1 %) i kontrolní (90,9 %; 8,3 %; 0,8 %). Pracovníci uhelných dolů byli ale pouze muži. Ve skupině mužů jsme po GT našli hodnoty 91,1 % DJB s 1 MN, 7,5 % s 2 MN a 1,4 % s 3 a více MN, zatímco u žen byly tyto hodnoty 84,3 %, 12,3 % a 3,4 %. Rozdíl v distribuci NM mezi psoriatiky a horníky by tedy mohl být vysvětlován i vyšším výskytem DJB s 2 a více MN u žen a tím celkovým zvýšením DJB s více MN ve studované skupině, a nikoli pouze expozicí UVB záření. U žen jsme před GT našli 88,5 % DJB s 1 MN, 11,1 % s 2 MN a 0,4 % s 3 a více MN. Zdá se, že u žen vede expozice PAU k častějšímu výskytu vícečetného poškození DNA v jedné buňce.

Uppstad et al. (2011) či Guo et al. (2014) předpokládají, že ženy mají při stejné expozici PAU signifikantně vyšší počty MN než muži (1,4násobně). Také v naší studii jsme u žen (v porovnání s muži) našli po terapii vyšší počet NM na 1 000 DJB (1,24násobně), DJB s MN (1,14násobně) a to jak s 1MN (1,06násobně), tak se 2 MN (1,9násobně) a 3 a více MN (2,8násobně). Rozdíly však nebyly signifikantní. Domníváme se, že příčinou nevýznamného rozdílu by mohl být větší rozsah postižení těla psoriatickými lézemi (a tím i větší rozsah aplikace FD) a celkově delší doba terapie u mužů. Uppstad et al. (2011) udává, že rozdíl v počtu MN mezi muži a ženami může být způsoben jednak bazálně vyšším počtem MN u žen i bez expozice genotoxickým látkám (což se potvrdilo i v naší studii), a jednak i možnou vyšší metabolickou aktivitou CYP 1A1, která vede k rychlejší a masivnější tvorbě reaktivních metabolitů PAU poškozujících DNA.

Duan et al. (2009) ve své studii sledovali u pracovníků koksáren a kontrol počty chromatinových můstků ($9,56 \pm 0,32$ %; $1,86 \pm 0,18$ %) a jaderných pupenů ($7,25 \pm 0,33$ %; $2,20 \pm 0,22$ %). U psoriatiků jsme po terapii zaznamenali významný nárůst jaderných pupenů, což mohlo být zčásti zapříčiněno i rozpadem můstků (za vzniku pupenů). Obdobně nižší počty chromatinových můstků ($1,71 \pm 1,28$ %) a vyšší pupenů ($5,11 \pm 3,63$ %) zaznamenali i Zhang et al. (2015) u skupiny 117 mužů pracujících ve výrobě diesellových motorů či Sinitsky et al. (2016) u 143 ruských horníků uhelných dolů ($4,04 \pm 2,82$ % a $7,23 \pm 2,54$ %).

U mužů jsme po GT našli nesignifikantně vyšší počty chromatinových můstků a jaderných pupenů než u žen. K obdobnému, ovšem významnému zjištění došli i Duan et al. (2009), kteří navíc předpokládají, že chromatinové můstky a jaderné pupeny senzitivněji odrážejí závislost

dávky na účinku expozice PAU než počet MN. Rovněž na základě tohoto tvrzení bychom mohli usuzovat na vyšší expozici PAU u mužů (při GT).

V případě kuřáků jsme našli (poněkud překvapivě) nesignifikantně nižší počty MN na 1 000 DJB a DJB s MN před i po GT. Obdobně nesignifikantně nižší počet MN však našli u kuřáků kontrolní i exponované skupiny i Duan et al. (2009). Tento jev by bylo možné vysvětlovat adaptací organismu na dlouhodobou expozici genotoxicky působícím látkám v cigaretovém kouři, jak popisují Kirsch-Volders a Fenech (2001), kteří tvrdí, že takto adaptované buňky pak při akutní expozici genotoxické látky (stejně i různé) jsou více náchylné k indukci apoptózy nebo k prodloužení buněčného cyklu s cílem reparace nově vzniklého poškození DNA. Z tohoto důvodu při standardně provedeném CBMN testu (zejména při 72hodinové kultivaci) nemusí docházet k nárůstu počtu MN ve DJB. Opačný trend pozorovali například Welge et al. (2011) ve skupině 235 německých silničních dělníků, či Sureshkumar et al. (2013) u 27 pracovníků indické koksárny, kde kuřáci po směně měli vyšší počet MN na 1 000 DJB ve srovnání s nekuřáky. Vyšší počty MN u kuřáků bez známé další expozice genotoxickým noxám (ve srovnání s kontrolní skupinou) našli i Christobher et al. (2017). Rossnerova et al. (2016) výrazný rozdíl v počtu MN mezi kuřáky a nekuřáky neuvádějí.

Rossnerova et al. (2009) našli pozitivní asociaci mezi směsí karcinogenních PAU (benz[a]anthracenu, benzo[b]fluoranthenu, benzo[k]fluoranthenu, benzo[ghi]perylenu, benzo[a]pyrenu, chrysenu, dibenz[ah]anthracenu a indeno[cd]pyrenu) a benzo[a]pyrenu samostatně a frekvencí MN. Rovněž uvádějí, že k indukci MN dochází po třech dnech expozice PAU a tento efekt přetrvává po dobu asi 60 dní. V naší skupině aplikace FD trvala v průměru $10,7 \pm 3,9$ dne a odběr krve byl proveden ihned po ukončení GT.

Ve skupině 1 jsme našli také významný nárůst hladiny ABB ($p < 0,001$). Jednalo se především o nárůst SAB ($p < 0,001$), nikoli však NAB ($p = 0,77$). Průměrný počet ABB po GT byl 5,66 %, což je téměř 2,5násobně vyšší než v případě skupinového hodnocení zdravé dospělé české populace bez známé expozice genotoxickým agens (2,32 %) (AHEM 2007) a více než 3násobně vyšší než průměr zdravé české dospělé neexponované populace (1,73 %) (Cerna et al. 2012).

Nutno však doplnit, že i průměrné hodnoty ABB před GT (3,12 %) byly u pacientů výrazně vyšší než hodnoty běžné populace. Tento jev by snad do určité míry bylo možné vysvětlovat ročním obdobím hospitalizace (leden–květen), kdy se v ovzduší životního prostředí v důsledku topné sezóny vyskytují vyšší koncentrace PAU (Albuquerque et al. 2016) a BaP (Český hydrometeorologický ústav 2016). Jak uvádějí Rossnerova et al., genetické poškození může

přetrvávat i 60 dní (Rossnerova et al. 2009). Další možnou příčinou by mohla být chromozomální nestabilita psoriatických pacientů (Karaman et al. 2008), která přispívá k vyššímu poškození DNA.

Studie v odborné literatuře rozlišují (Christobher et al. 2017; Sureshkumar et al. 2013) či nerozlišují (Ada et al. 2013; Fortin et al. 2015) počty chromatidových a chromozomových aberací a případně gapů (Burgaz et al. 2002; Cavallo et al. 2006), nicméně velmi malá pozornost je věnována hodnocení polyploidií, které v naší studii tvoří většinu NAB. Na základě doporučení Danford (2012) a na základě vlastních (v rámci výzkumné skupiny dlouholetých) zkušeností jsme se rozhodli upřednostňovat rozdělování ABB na SAB a NAB. V řadě případů lze jednoznačně prohlásit pouze to, že buňka je aberovaná, nicméně přesnější určení konkrétní aberace může být obtížné a subjektivní.

Ve sledované skupině psoriaticků jsme u mužů (v porovnání se ženami) našli před GT nesignifikantně vyšší počet ABB, SAB i NAB (zhruba 1,1násobný). Obdobný, ovšem signifikantně vyšší výskyt ABB a SAB (1,2násobný) v kontrolní skupině mužů (ve srovnání s ženami) dokumentovali Farkas et al. (2016) a 1,2násobný nesignifikantně vyšší výskyt SAB u mužů popsali i Kopjar et al. (2006).

Podobné hodnoty SAB, jaké jsme u psoriaticků našli před GT, popsali i Sree Devi et al. (2009) v kontrolní skupině nekuřáků ($3,35 \pm 1,21$ % SAB). U kuřáků byly hodnoty ještě vyšší ($4,30 \pm 1,24$ % SAB). Vyšší hodnoty SAB u kuřáků popsali také Kopjar et al. (2006). Obdobný rozdíl mezi nekuřáky a kuřáky jsme zaznamenali i my v našem souboru psoriaticků ($2,63 \pm 1,34$ % SAB nekuřáci, $3,69 \pm 1,80$ % kuřáci, $p=0,085$). Obdobně jako my ($0,00 \pm 0,00$ % nekuřáci, $0,15 \pm 0,38$ % kuřáci, $p=0,091$) našli Sree Devi et al. (2009) rozdíly i v případě NAB ($0,00$ % nekuřáci, $0,21$ % kuřáci). Nutno však zmínit, že Rossnerova et al. (2016) rozdíly v počtech aberovaných buněk u kuřáků a nekuřáků nezaznamenali.

Při posouzení úrovně postterapeutické hladiny CA našich pacientů můžeme konstatovat, že srovnatelné hodnoty hladin CA našli Sureshkumar et al. (2013) ve skupině 15 indických pracovníků koksáren starších 35 let s více než 12 lety expozice ($4,6 \pm 1,4$ % SAB) či Cavallo et al. (2006) u 17 pracovníků římského letiště se střední expozicí PAU ($4,13$ % SAB). Výrazně nižší hodnoty CA dokumentovali Sram et al. (2007) ve skupině 61 pražských městských policistů (leden 2004 $2,07 \pm 1,48$ % SAB a březen 2004 $1,84 \pm 1,28$ % SAB) či Ada et al. (2013) u 48 pracovníků turecké ocelárny (medián $0,5$ % SAB). Vyšší hodnoty SAB i NAB

zaznamenali Sree Devi et al. (2009) ve skupině 78 indických dopravních policistů nekuřáků ($6,48 \pm 1,67$ % SAB a 0,68 % NAB) i 58 kuřáků ($8,96 \pm 1,87$ % SAB a 0,73 % NAB).

Při statistické analýze vztahu obou metod detekce poškození DNA (MNT a CAT) byla zjištěna hraniční významnost mezi celkovým počtem DJB s MN na 1 000 DJB a celkovým počtem ABB na 100 metafazických buněk ($p=0,35$; $p=0,05$). Po GT došlo k 1,75násobnému zvýšení počtu DJB s MN a 1,81násobnému zvýšení počtu ABB.

Souhrnně lze konstatovat, že obě metody byly v našem případě přibližně stejně citlivé pro detekci poškození DNA a u obou byla v literatuře popsána zvyšující se frekvence detekovaných událostí s věkem. Naše výsledky prokázaly, v souladu s literaturou, vyšší výskyt DJB s MN u žen, zatímco v případě CA byl zaznamenán vyšší výskyt u mužů. Z těchto důvodů považujeme kombinaci obou metod za vhodnou pro detekci poškození DNA u smíšených skupin. U skupin kuřáků jsme v souladu s literaturou našli nižší počty DJB s MN a vyšší počty ABB (ve srovnání s nekuřáky). Z těchto důvodů považujeme kombinaci obou metod za vhodnou pro detekci poškození DNA u skupin složených z osob s odlišnými kuřáckými návyky v běžné i pracovní exponované populaci.

Výhodou společného použití obou metod je také skutečnost, že každá z metod je schopna detekovat rozdílné poškození DNA. Například dicentrické chromozomy, které jsou řazeny mezi SAB, se v případě CBMN objevují jako chromatinové můstky, pokud každá z centromer směřuje k opačnému pólu buňky, či se nemusí projevit vůbec, pokud obě centromery směřují ke stejnému pólu. Zaostávající chromozomy v případě CBMN vedou ke vzniku MN a jsou detekovány, a naopak v případě CAT, kdy je hodnoceno 46 ± 2 chromozomy, zaostávání jednoho chromozomu nelze zaznamenat.

7.6 Porovnání vlivu variant GT na hladinu chromosomálních aberací

Dle literárních zdrojů dosud nikdo neporovnával genotoxický potenciál různých variant GT (různé koncentrace FD a různé UV zářiče). Nejrozsáhlejší postižení tělesného povrchu (psoriázou) bylo zaznamenáno ve skupině 2 (4% FD+UV1) a nejdelší aplikace FD i UV byla ve skupině 3 (5% FD+UV1). Nicméně, nejvyšší nárůst ABB (1,5násobný ve srovnání se skupinou 3) byl zaznamenán ve skupině 1 (4% FD+UV2). Tento nárůst byl signifikantní ve srovnání se skupinou 3 ($p < 0,05$) nikoli však při porovnání se skupinou 2, jak by se vzhledem k nižší koncentraci použitého FD a kratší době GT v porovnání se skupinou 3 dalo očekávat. Domníváme se, že tento nález byl způsoben nižším počtem osob ($n=20$) zahrnutých do skupiny 2.

Nenalezli jsme signifikantní rozdíl hladin ABB, SAB a NAB mezi muži a ženami a hladin ABB a SAB mezi kuřáky a nekuřáky. Nutno doplnit, že skupina kuřáků byla signifikantně mladší než skupina nekuřáků.

Při bližším pohledu na oba základní typy aberací byl celkový nárůst ABB způsoben především nárůstem SAB, nikoli NAB. Nejvíce se NAB podílely na nárůstu ABB ve skupině 3 (38 % CA představovaly NAB), nejméně pak ve skupině 1 (1,2 % CA tvořily NAB).

Signifikantní rozdíl v hladinách SAB byl zjištěn mezi skupinou 1 a skupinami 3 a 4. U skupiny 2 se rozdíl blížil k hranici významnosti. Mezi skupinami 2 a 3 signifikantní rozdíl v nárůstu počtu SAB zaznamenán nebyl. Z uvedeného je zřejmé, že delší doba GT (jak stejného UV záření, tak aplikace FD) a použití vyšší koncentrace FD nevedly k nárůstu SAB. Nesignifikantně vyšší nárůst SAB jsme naopak zaznamenali ve skupině 2 (4% FD). Obdobné změny, tedy mírný pokles v počtu buněk s poškozením DNA při vysoké expozici PAU, zaznamenali i Cavallo et al. (2006) či Fortin et al. (2015).

V případě *in vitro* experimentů s periferními lymfocyty se zdá, že hraniční koncentrací, u které dochází ke zlomu v nárůstu poškození DNA je 20 μM BaP (Fortin et al. 2015). Příčinou tohoto jevu může být nasycení kapacity metabolických enzymů, indukujících tvorbu reaktivních metabolitů (Slikker et al. 2004), účinnější odstraňování buněk s masivněji poškozenou DNA pomocí apoptózy (Roos a Kaina 2006) a/nebo prodloužení buněčného cyklu buněk s poškozenou DNA které při standardní době kultivace (50 hod) nedosáhly metafáze (Fenech 2007).

Aplikace UVB záření o vlnové délce 311 nm byla spojena s výrazným nárůstem počtu SAB ve skupině 1 i přes nejkratší průměrnou dobu aplikace FD a druhou nejkratší dobu aplikace UV záření (ve dnech). Při použití úzkopásmového UVB 311 nm zářiče obdržel průměrný pacient (ve skupině 1) dávku UVB 71,175 kJ (povrch těla průměrného pacienta 1,95 m^2 * průměrná dávka UVB 3,65 J/cm^2). Při využití údajů o povrchu těla průměrného pacienta v kombinaci s průměrnou délkou terapie a hustotou výkonu UVA (131,8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) a UVB (249,75 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) záření (Malkova et al. 2016) (výpočet: povrch těla v cm^2 * hustota výkonu záření v $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ * doba terapie v sekundách; 1 J = 1 Ws) zjistíme, že při použití širokopásmového UVA a UVB zářiče průměrný pacient ve skupině 2 obdržel dávku 25,494 kJ UVA+UVB (16,687 kJ UVB), ve skupině 3 pak 39,972 kJ UVA+UVB (26,164 kJ UVB) a ve skupině 4 39,436 kJ UVA+UVB (25,814 kJ UVB). Dávka UVB záření je v případě použití úzkopásmového UVB 311 nm v průměru více než 2,7násobně vyšší než u ostatních skupin (u

skupiny 2 dokonce téměř 4,3násobná). U skupiny 1 a 2 nebyl zaznamenán rozdíl v celkovém povrchu těla a rozsah postižení byl mírně vyšší u skupiny 2. V obou případech byl aplikován 4% FD, přesto byl počet SAB 1,6násobně vyšší ve skupině 1. Při porovnání se skupinou 3, kde byl aplikován 5% FD a průměrně 2,7násobně nižší dávka UVB, byl zaznamenán dokonce téměř 2,5násobný nižší nárůst SAB ve srovnání se skupinou 1. Silva et al. (2013) sledovali genotoxické parametry ve skupině 6 psoriatických léčených acitretinem a UVB 311±2 nm. Celková průměrná dávka UVB záření během 12 týdenní aplikace byla 29,53±3,33 J/cm² (tedy zhruba 8násobná ve srovnání s naší skupinou 1), přesto však žádný signifikantní nárůst poškození DNA nedokumentovali. K opačným závěrům však došli Ferahbas et al. (2004). Můžeme se tedy domnívat, že kombinovaná expozice UVB a PAU má vyšší genotoxický potenciál na lidské lymfocyty *in vivo* než pouhá expozice UVB.

V literatuře lze nalézt několik prací popisujících synergický účinek UVA záření a PAU (zejména BaP) na poškození DNA (Burke a Wei 2009; Toyooka a Ibuki 2007), avšak informace o synergickém působení PAU a UVB záření jsou velmi omezené. Oba typy záření jsou přitom pokládány za prokázané karcinogeny při dermální expozici (IARC 2018).

Dle Sage et al. (2012) by UVB záření mělo být zachycováno v povrchových vrstvách epidermis a nepronikat až k lymfocytům v krevním řečišti ve vrchních vrstvách dermis. Z tohoto důvodu je zájem soustředěn především na působení UV záření na kožní buňky (Ali et al. 2011). Otázkou zůstává, zda UVB neproniká kůží až na úroveň vaskulárního řečiště a nepoškozuje přímo DNA lymfocytů. Na pozorovaném účinku na lymfocyty se může rovněž uplatňovat fotoaktivace PAU za vzniku reaktivních kyslíkatých intermediátů (Fu et al. 2012) a UVB indukovaná vyšší exprese CYP 1B1 v lidských keratinocytech, jak popisují Oesch et al. (2014).

Tuchinda et al. (2007) uvádí, že UVB má vyšší potenciál indukovat apoptózu než UVA záření. Předpoklad Ozawa et al. (1999), že úzkopásmové UVB záření je potentnější induktor apoptózy T-lymfocytů než širokopásmové UVB záření se v naší studii nepotvrdil. Masivnější expozice úzkopásmovému UVB záření by měla indukovat efektivněji apoptózu a tedy lymfocyty s poškozenou DNA by měly častěji podléhat p53 dependentní cestě apoptózy v následujícím buněčném cyklu. Za normálních okolností by dělení periferních lymfocytů mělo být velmi zřídka. Při kultivaci jsou ale lymfocyty stimulovány k dělení fytohemaglutininem a zastaveny v metafázi, tedy až za kontrolním bodem p53. Přesto jsme našli vyšší frekvenci SAB lymfocytů po expozici úzkopásmovému UVB 311 nm ve srovnání se širokopásmovým kombinovaným UVA a UVB zářením. Otázkou tak zůstává, zda je kombinovaná expozice PAU

a UVB 311 nm schopná indukovat tak časté poškození DNA, že i přes probíhající indukci apoptózy přetrvává velký počet SAB, či zda nedochází i k narušení indukce apoptózy.

V případě NAB jsme signifikantní rozdíl pozorovali mezi skupinou 3 a 1 ($p < 0,001$) a 4 ($p < 0,001$) a rovněž mezi skupinou 1 a 2 ($p < 0,05$). Nejvyšší hladina NAB byla zaznamenána ve skupině 3 a byla následována skupinou 2. Naopak nejnižší počet byl detekován ve skupině 1. Můžeme tedy předpokládat, že FD, a tedy i PAU v něm obsažené, mají vyšší potenciál způsobovat NAB než úzkopásmové UVB 311 nm záření, které naopak indukuje vyšší výskyt SAB.

Přestože je BaP řazen mezi klastogeny (OECD 2016a), mohou mít PAU potenciál narušovat i správné dělení buňky a působit aneugenně, zatímco UVB 311 nm záření způsobuje spíše vznik zlomů a působí tedy především klastogenně. V případě PAU jsme s rostoucí koncentrací pozorovali i nárůst NAB a tedy i možného aneugenního potenciálu. Nárůst v počtu polyploidii naznačuje, že PAU mohou inhibovat mitotický proces (OECD 2016a).

Zdá se tedy, že úzkopásmový UVB 311 nm zářič má vyšší potenciál ke klastogenní formě poškození DNA lymfocytů než vyšší (5%) koncentrace FD a to i při aplikaci FD po delší dobu na větší povrch kůže. Účinnost obou variant GT (4% FD+UVB 311 nm a 5% FD + širokopásmové UVA a UVB) je velmi podobná, s rozdílem necelých 2%. Vzhledem k poměru rizika a benefitu pro pacienty se tedy zdá vhodnější používání kombinace 4% či 5% FD a širokopásmového UV zářiče.

Závěry experimentálních studií jsou běžně zatíženy řadou interpretačních nejistot. Jednou z významných nejistot naší studie je absence objektivizace míry expozice PAU formou hydroxy-metabolitů PAU v moči či lymfocytárních DNA-adduktů. Tyto ukazatele byly vzhledem k finanční náročnosti stanovovány pouze u části studované skupiny a nejsou součástí předkládané disertační práci. Publikovány byly podrobně v pracích Beranek et al. (2016); Borska et al. (2010); Borska et al. (2016); Fiala et al. (2006); Ranna et al. (2014) a umožní čtenáři rámcovou orientaci o úrovni metabolických hladin PAU po dermální expozici FD.

Další nejistotou může být přítomnost vazodilatace v oblasti psoriatických plaků, která by mohla přispívat k větší absorpci PAU z FD při GT (Drlik 2015). Na druhou stranu lze ale v této situaci spatřovat i jistou výhodu při odhadu maximálního, ale ještě reálného zdravotního rizika v rámci konzervativního expozičního scénáře.

Nejistotou je i skutečnost, že nebyly hodnoceny nutriční faktory u pacientů, zejména hladiny vitamínu B₁₂ a folátu, které mohou mít vliv na syntézu a reparaci DNA a tím i na hladiny MN a ABB. Nejistotu představuje též absence údajů o konzumaci alkoholu či drog a o celkovém životním stylu účastníků.

Závěrem nutno zmínit, že v průběhu GT nedochází pouze k dermální expozici PAU, ale částečně též i k expozici inhalační PAU z aplikovaného dehtu. Exponování jsou jak pacienti, tak i zdravotní personál. Scheepers et al. (2009) považují inhalační expozici zdravotního personálu za nízkou až zanedbatelnou. Nalezené hodnoty pyrenu a BaP ve vzorcích vzduchu v dýchací zóně sester aplikujících dehet na pokožku pacientů byly pod limitem detekce (pyren 0,5 ng/m³ v plynné a 0,02 ng/m³ v pevné fázi, BaP 1,0 ng/m³ v plynné a 0,04 ng/m³ v pevné fázi). Na druhou stranu ale u sester (aplikujících dehtovou mast) zjistili významnou dermální expozici, a to i přes použití polyetylenových rukavic. K výrazné redukci expozice (o více než 97 %) došlo při použití polyvinyl-chloridových rukavic v kombinaci s úzkými rukávy Tyvek[®] délky 50 cm s gumičkou přes zápěstí.

8 Závěry

Cílem předkládané disertační práce bylo přispět k rozšíření poznatků ve dvou oblastech bádání, které se týkají:

(1) odhadů míry prostupu (rychlosti a intenzity) vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků přes kůži (trans-epidermální absorpce) při experimentální expozici *in vitro* a

(2) odhadů míry genotoxicity (vybrané nebezpečnosti/rizika), souvisejícího s klinickou dermální aplikací farmaceutického dehtu (obsahujícího polycyklické aromatické uhlovodíky) v rámci Goeckermanovy terapie u pacientů s psoriázou. Genotoxický účinek byl vybrán z důvodu jeho mimořádně vysoké úrovně nebezpečnosti.

OECD doporučuje pro testování dermální penetrace látek *in vitro* oba modely, plnou kůži i epidermální membránu. V předkládaném textu prezentuji výsledky *in vitro* experimentu trans-epidermální penetrace, který naplňuje **první cíl disertační práce**. Při penetraci vybraných PAU přes epidermální membránu jsme našli, v porovnání s penetrací PAU přes plnou kůži popsanou v předchozí práci, vyšší hodnoty parametru Flux a nižší hodnoty parametru Lag time. Penetrace PAU přes epidermální membránu vykazovala také nižší stupeň variability dat, což snižovalo interindividuální variabilitu výsledků. Z těchto poznatků vyplývá, že použití epidermální membrány by mohlo zpřesňovat jak odhad vnitřní dávky PAU po dermální expozici, tak i odhad souvisejícího zdravotního rizika v rámci konzervativního expozičního scénáře. Experimenty s epidermální membránou jsou však časově a zejména experimentálně náročné. Dosud nebyly stanoveny hodnoty objektivních parametrů integrity epidermální membrány analogické k parametrům integrity plné nebo dermatomované kůže (TEWL a TER) a integrity epidermální membrány je posuzována pouze vizuálně. Toto hodnocení není zcela spolehlivé a poškození membrány bývá zjištěno až v průběhu pokusu nebo při analýze receptorové tekutiny. Uvedená negativa přispívají k finanční náročnosti testování, ztrátám vzorků a v neposlední řadě i k nárůstu rozdílů hodnot dat získaných na různých pracovištích. **Na provedení a vyhodnocení prezentovaného *in vitro* experimentu jsem měla majoritní podíl a byla jsem první autorkou recenzované publikace popisující výsledky tohoto experimentu.**

Pro účely naplnění **druhého cíle disertační práce** (odhadů míry genotoxicity vybrané nebezpečnosti) jsem na Ústavu hygieny a preventivního lékařství **zavedla test genotoxicity „cytokinesis-block“ mikronukleus test (CBMN) a jeho funkčnost jsem ověřila** na vzorcích periferní lymfocytů osob vystavených kombinované terapeutické expozici PAU a UVB záření.

Výsledky CBMN byly porovnávány s výsledky testu chromozomálních aberací (CAT), který je na ústavu dlouhodobě využíván. Oba testy vykázaly srovnatelné výsledky a citlivost v detekci poškození DNA. Kombinaci těchto dvou testů detekce poškození DNA považujeme za velmi vhodnou pro testování smíšených skupin s různými kuřáckými návyky po environmentální i pracovní expozici PAU. Za vhodné považujeme vyjadřovat výsledky obou testů ve formě počtu buněk se sledovanou změnou na celkový počet skórovaných buněk (počet dvoujaderných buněk s mikrojádrem na 1 000 dvoujaderných buněk, počet aberovaných buněk na 100 metafazických buněk).

Pomocí obou testů (CBMN a CAT), provedených na vzorcích krve pacientů s psoriázou léčených GT (klinická dermální aplikace farmaceutického dehtu/PAU a UV záření), jsme zjistili významnou míru genotoxické nebezpečnosti/rizika kombinace 4% farmaceutického dehtu a úzkopásmového UVB 311 nm záření. **Na provedení a vyhodnocení výsledků testů jsem měla majoritní podíl.**

Pomocí testu CAT jsme sledovali míru genotoxické nebezpečnosti/rizika několika variant GT (3%, 4% a 5% farmaceutického dehtu v kombinaci se dvěma celotělovými zářiči). Míra genotoxické nebezpečnosti narůstala s rostoucí koncentrací farmaceutického dehtu v masti a při 4% koncentraci pravděpodobně dosáhla svého maxima. Míru genotoxické nebezpečnosti/rizika terapie ovlivňovalo i UV záření, kde jsme prokázali vyšší genotoxickou nebezpečnost/riziko při použití úzkopásmového UVB 311 nm zářiče. **Na provedení a vyhodnocení výsledků testů jsem měla majoritní podíl a byla jsem první autorkou impaktované publikace popisující část výsledků studie.**

Na základě našich výsledků jsme vyslovili domněnku, že PAU mají nejen klastogenní, ale i aneugenní potenciál pro poškození DNA. U sledované terapie se zřejmě uplatňuje i synergický účinek kombinované expozice PAU a UV záření na poškození DNA. Vzhledem k poměru rizika a benefitu se zdá být nejvhodnější použití 4% či 5% FD a širokopásmového UV zářiče.

Prezentované studie přispěly k rozšíření poznatků v oblasti odhadů míry prostupu vybraných PAU přes kůži při experimentální expozici *in vitro* a v oblasti odhadů míry genotoxicity klinické dermální aplikace farmaceutického dehtu obsahujícího PAU. Výzkumné práce pokračují v obou zájmových oblastech. V současnosti plánujeme *in vitro* experimenty s dalšími

zástupci skupiny PAU v podobě individuálních i směsných expozic. Získáme tak velmi cenná data pro proceduru odhadů zdravotních rizik pracovních dermálních expozic PAU, kterou bychom chtěli následně realizovat v rozsáhlejší epidemiologické studii. V oblasti testování genotoxických účinků pracujeme v současné době na zavedení tří modifikovaných forem testu Comet Assay (alkalická, neutrální a enzymatická forma), který rozšíří stávající baterii testů MNT a CAT a přispěje k dalšímu zpřesnění našich odhadů míry genotoxicity expozice PAU a dalších škodlivin. Všechny výzkumné práce jsou finančně zabezpečovány z univerzitního programu UK PROGRES Q40-09 a projektu TAČR.

9 Seznam citací použité literatury

- ABDEL-SHAIFY, H. I. a M. S. M. MANSOUR. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 2016, 25(1), 107-123.
- ADA, A. O., C. DEMIROGLU, M. YILMAZER, H. S. SUZEN, et al. Cytogenetic damage in Turkish coke oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons: Association with CYP1A1, CYP1B1, EPHX1, GSTM1, GSTT1, and GSTP1 gene polymorphisms. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2013, 64(3), 359-369.
- AHEM. Standardní operační postupy pro biologické monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí *Acta Hygienica, Epidemiologica et Microbiologica*, 2003, 3.
- AHEM. Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí. Cytogenetická analýza periferních lymfocytů. *Acta Hygienica, Epidemiologica et Microbiologica*, 2007, 1.
- AL ZABADI, H., L. FERRARI, I. SARI-MINODIER, M. A. KERAUTRET, et al. Integrated exposure assessment of sewage workers to genotoxicants: an urinary biomarker approach and oxidative stress evaluation. *Environ Health*, 2011, 10, 23.
- ALBUQUERQUE, M., M. COUTINHO a C. BORREGO. Long-term monitoring and seasonal analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) measured over a decade in the ambient air of Porto, Portugal. *Science of The Total Environment*, 2016, 543(Part A), 439-448.
- ALI, D., A. VERMA, F. MUJTABA, A. DWIVEDI, et al. UVB-induced apoptosis and DNA damaging potential of chrysene via reactive oxygen species in human keratinocytes. *Toxicology Letters*, 2011, 204(2), 199-207.
- ALICANDRO, G., M. ROTA, P. BOFFETTA a C. LA VECCHIA. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and lymphatic and hematopoietic neoplasms: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Arch Toxicol*, 2016, 90(11), 2643-2656.
- ALZOUBI, K., O. KHABOUR, N. HUSSAIN, S. AL-AZZAM, et al. Evaluation of vitamin B12 effects on DNA damage induced by pioglitazone. *Mutat Res*, 2012, 748(1-2), 48-51.
- ANDERSON, D., B. J. PHILLIPS, T. W. YU, A. J. EDWARDS, et al. The effects of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with "low" or "high" cholesterol levels. *Environ Mol Mutagen*, 1997, 30(2), 161-174.
- ANDERSON, K. E., F. F. KADLUBAR, M. KULLDORFF, L. HARNACK, et al. Dietary intake of heterocyclic amines and benzo(a)pyrene: associations with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(9), 2261-2265.

ARSOY, N. S., S. NEUSS, S. WESSENDORF, M. BOMMER, et al. Micronuclei in peripheral blood from patients after cytostatic therapy mainly arise ex vivo from persistent damage. *Mutagenesis*, 2009, 24(4), 351-357.

BAIRD, W. M. a P. BROOKES. Isolation of the hydrocarbon-deoxyribonucleoside products from the DNA of mouse embryo cells treated in culture with 7-methylbenz(a)anthracene-3H. *Cancer Res*, 1973, 33(10), 2378-2385.

BAIRD, W. M., L. A. HOOVEN a B. MAHADEVAN. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen*, 2005, 45(2-3), 106-114.

BANSAL, V. a K. H. KIM. Review of PAH contamination in food products and their health hazards. *Environ Int*, 2015, 84, 26-38.

BATTERSHILL, J. M., K. BURNETT a S. BULL. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis*, 2008, 23(6), 423-437.

BELLAMRI, M., L. LE HEGARAT, L. VERNHET, G. BAFFET, et al. Human T lymphocytes Bioactivate Heterocyclic Aromatic Amines by Forming DNA adducts. *Environ Mol Mutagen*, 2016, 57(9), 656-667.

BERANEK, M., Z. FIALA, J. KREMLACEK, C. ANDRYS, et al. Genetic polymorphisms in biotransformation enzymes for benzo[a]pyrene and related levels of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts in Goeckerman therapy. *Toxicol Lett*, 2016, 255, 47-51.

BEZROUK, A., Z. FIALA, L. KOTINGOVA, I. S. KRULICHOVA, et al. SAMPA: A free software tool for skin and membrane permeation data analysis. *Toxicol In Vitro*, 2017, 44, 361-371.

BIANCHI, B., P. CAMPOLMI, L. MAVILIA, A. DANESI, et al. Monochromatic excimer light (308 nm): an immunohistochemical study of cutaneous T cells and apoptosis-related molecules in psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2003, 17(4), 408-413.

BLAHA, L., P. KAPPLOVA, J. VONDRACEK, B. UPHAM, et al. Inhibition of gap-junctional intercellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Sci*, 2002, 65(1), 43-51.

BŁASZCZYK, E. a D. MIELŻYŃSKA-ŠVACH. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J Appl Genet*, 2017, 58(3), 321-330.

BOLLER, K. a W. SCHMID. [Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon]. *Humangenetik*, 1970, 11(1), 35-54.

BONASSI, S., R. EL-ZEIN, C. BOLOGNESI a M. FENECH. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 2011, 26(1), 93-100.

BONASSI, S., M. NERI, C. LANDO, M. CEPPI, et al. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res*, 2003, 543(2), 155-166.

BORAK, J., G. SIRIANNI, H. COHEN, S. CHEMERYNSKI, et al. Biological versus ambient exposure monitoring of creosote facility workers. *J Occup Environ Med*, 2002, 44(4), 310-319.

BORSKA, L., C. ANDRYS, J. KREJSEK, K. HAMAKOVA, et al. Genotoxic and apoptotic effects of Goeckerman therapy for psoriasis. *Int J Dermatol*, 2010, 49(3), 289-294.

BORSKA, L., C. ANDRYS, J. KREJSEK, V. PALICKA, et al. Oxidative Damage to Nucleic Acids and Benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA Adducts and Chromosomal Aberration in Children with Psoriasis Repeatedly Exposed to Crude Coal Tar Ointment and UV Radiation. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014, 10.

BORSKA, L., C. ANDRYS, J. KREJSEK, V. PALICKA, et al. Influence of dermal exposure to ultraviolet radiation and coal tar (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the skin aging process. *J Dermatol Sci*, 2016, 81(3), 192-202.

BORSKA, L., Z. FIALA, J. KREJSEK, K. HAMAKOVA, et al. Cytogenetic and immunological changes after dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UV radiation. *Physiol Res*, 2006, 55(3), 317-323.

BOSETTI, C., P. BOFFETTA a C. LA VECCHIA. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol*, 2007, 18(3), 431-446.

BRINKMANN, J., K. STOLPMANN, S. TRAPPE, T. OTTER, et al. Metabolically Competent Human Skin Models: Activation and Genotoxicity of Benzo[a]pyrene. *Toxicological Sciences*, 2013, 131(2), 351-359.

BROOKES, P. a P. D. LAWLEY. Evidence for the Binding of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons to the Nucleic Acids of Mouse Skin : Relation between Carcinogenic Power of Hydrocarbons and their Binding to Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, 1964, 202, 781-784.

BURGAZ, S., G. C. DEMIRCIGIL, B. KARAHALIL a A. E. KARAKAYA. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of traffic policemen and taxi drivers exposed to urban air pollution. *Chemosphere*, 2002, 47(1), 57-64.

BURKE, K. E. a H. WEI. Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. *Toxicol Ind Health*, 2009, 25(4-5), 219-224.

BURSTYN, I., H. KROMHOUT, T. PARTANEN, O. SVANE, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and fatal ischemic heart disease. *Epidemiology*, 2005, 16(6), 744-750.

CAMPO, L., M. HANCHI, L. OLGATI, E. POLLEDRI, et al. Biological Monitoring of Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at an Electric Steel Foundry in Tunisia. *Ann Occup Hyg*, 2016, 60(6), 700-716.

CAVALLO, D., C. L. URSINI, G. CARELLI, I. IAVICOLI, et al. Occupational exposure in airport personnel: characterization and evaluation of genotoxic and oxidative effects. *Toxicology*, 2006, 223(1-2), 26-35.

CERNA, M., A. KRŠKOVÁ, M. CEJCHANOVA a V. SPEVACKOVÁ. Human biomonitoring in the Czech Republic: an overview. *Int J Hyg Environ Health*, 2012, 215(2), 109-119.

CIECIERSKA, M. a M. W. OBIEDZIŃSKI. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bakery chain. *Food Chemistry*, 2013, 141(1), 1-9.

CLARE, G. The In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. In J.M. PARRY A E.M. PARRY eds. *Genetic Toxicology: Principles and Methods*. New York, NY: Springer New York, 2012, p. 69-91.

COLLINS, A., G. KOPPEN, V. VALDIGLESIAS, M. DUSINSKA, et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2014, 759(0), 27-39.

CONRAD, C. a M. GILLIET. Psoriasis: from Pathogenesis to Targeted Therapies. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2018, 54(1), 102-113.

COOK, J. W., C. L. HEWETT a I. HIEGER The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II, and III. *Journal of the Chemical Society*, 1933, 395-405.

CORVI, R., S. ALBERTINI, T. HARTUNG, S. HOFFMANN, et al. ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT). *Mutagenesis*, 2008, 23(4), 271-283.

COUNTRYMAN, P. I. a J. A. HEDDLE. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*, 1976, 41(2-3), 321-332.

CRASTA, K., N. J. GANEM, R. DAGHER, A. B. LANTERMANN, et al. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*, 2012, 482(7383), 53-58.

CROSS, S. E. a M. S. ROBERTS. Use of in vitro human skin membranes to model and predict the effect of changing blood flow on the flux and retention of topically applied solutes. *J Pharm Sci*, 2008, 97(8), 3442-3450.

Český hydrometeorologický ústav: Tabelární ročenka 2016. 12. Benzo(a)pyren BaP - měsíční a roční imisní charakteristiky, Královehradecký kraj [online]. 2016. [cit. 12.10.2017]. Dostupné z:

http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/tab_roc/2016_enh/pollution_my/CZHHK_BaP_CZ.html

DAI, Y., D. REN, B. A. BASSIG, R. VERMEULEN, et al. Occupational exposure to diesel engine exhaust and serum cytokine levels. *Environ Mol Mutagen*, 2018, 59(2), 144-150.

DANFORD, N. The interpretation and analysis of cytogenetic data. *Methods Mol Biol*, 2012, 817, 93-120.

DANIEL, C. R., K. L. SCHWARTZ, J. S. COLT, L. M. DONG, et al. Meat-cooking mutagens and risk of renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 2011, 105(7), 1096-1104.

DAT, N. D. a M. B. CHANG. Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies. *Sci Total Environ*, 2017, 609, 682-693.

DE FREITAS, T. A., R. P. PALAZZO, F. M. DE ANDRADE, C. L. REICHERT, et al. Genomic instability in human lymphocytes from male users of crack cocaine. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11(10), 10003-10015.

DEGRASSI, F. a C. TANZARELLA. Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutat Res*, 1988, 203(5), 339-345.

DITRICOVÁ, D. Návrat k dehtovým externům. *Dermatologie pro praxi*, 2014, 8(4), 138-139.

DRLÍK, L. Možnosti terapie těžkých forem psoriázy. *Dermatologie pro praxi*, 2015, 9(4), 152-156.

DUAN, H., S. LENG, Z. PAN, Y. DAI, et al. Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res*, 2009, 677(1-2), 93-99.

EDWARDS, S. C., W. JEDRYCHOWSKI, M. BUTSCHER, D. CAMANN, et al. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. *Environ Health Perspect*, 2010, 118(9), 1326-1331.

EFSA. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. In *EFSA Journal*. 2008, vol. 6, p. 724-n/a.

EFSA. Scientific opinion - Guidance on Dermal Absorption. *EFSA Journal*, 2012, 10(4).

EHRlich, V. A., A. K. NERSESYAN, K. ATEFIE, C. HOELZL, et al. Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: results of a multiple end point study. *Environ Health Perspect*, 2008, 116(12), 1689-1693.

EL-ZEIN, R. A., M. FENECH, M. S. LOPEZ, M. R. SPITZ, et al. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(5), 1111-1119.

EPA. In vitro dermal absorption rate testing of certain chemicals of interest to the occupational safety and health administration. *Federal Register*, 2004, 69(80), 22402-22441.

ESPOSITO, E., L. RAVANI, P. MARIANI, N. HUANG, et al. Effect of nanostructured lipid vehicles on percutaneous absorption of curcumin. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 86(2), 121-132.

EVANS, H. J., G. J. NEARY a F. S. WILLIAMSON. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1959, 1, 216-229.

FARBER, D. L., N. A. YUDANIN a N. P. RESTIFO. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature reviews. Immunology*, 2014, 14(1), 24-35.

FARKAS, G., Z. JURANYI, G. SZEKELY, Z. S. KOCSIS, et al. Relationship between spontaneous frequency of aneuploidy and cancer risk in 2145 healthy Hungarian subjects. *Mutagenesis*, 2016, 31(5), 583-588.

FARKAS, G., G. SZEKELY, N. VASS, K. KISS, et al. [Frequency of spontaneous aneuploidy in the healthy Hungarian population]. *Magy Onkol*, 2015, 59(3), 198-204.

FEDERICI, C., N. BOTTO, S. MANFREDI, A. RIZZA, et al. Relation of increased chromosomal damage to future adverse cardiac events in patients with known coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 2008, 102(10), 1296-1300.

FENECH, M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res*, 2001, 475(1-2), 57-67.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*, 2007, 2(5), 1084-1104.

FENECH, M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys*, 2010, 98(2), 234-243.

FENECH, M., P. BAGHURST, W. LUDERER, J. TURNER, et al. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability--results

from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis*, 2005, 26(5), 991-999.

FENECH, M. a S. BONASSI. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 2011, 26(1), 43-49.

FENECH, M. a J. W. CROTT. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res*, 2002, 504(1-2), 131-136.

FENECH, M., M. KIRSCH-VOLDERS, A. T. NATARAJAN, J. SURRALLES, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 2011, 26(1), 125-132.

FENECH, M. a A. A. MORLEY. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*, 1985, 147(1-2), 29-36.

FENT, K. W., J. EISENBERG, J. SNAWDER, D. SAMMONS, et al. Systemic exposure to PAHs and benzene in firefighters suppressing controlled structure fires. *Ann Occup Hyg*, 2014, 58(7), 830-845.

FERAHBAS, A., H. DONMEZ-ALTUNTAS, Z. HAMURCU, E. AKTAS, et al. Micronucleus evaluation in mitogen-stimulated lymphocytes of narrow-band (311 nm TL01) UVB-treated patients. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2004, 20(2), 81-85.

FIALA, Z., L. BORSKA, A. PASTORKOVA, J. KREMLACEK, et al. Genotoxic effect of Goeckerman regimen of psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 2006, 298(5), 243-251.

FLESHER, J. W. a A. F. LEHNER. Structure, function and carcinogenicity of metabolites of methylated and non-methylated polycyclic aromatic hydrocarbons: a comprehensive review. *Toxicol Mech Methods*, 2016, 26(3), 151-179.

FORD, C. E. a J. L. HAMERTON. A Colchicine, Hypotonic Citrate, Squash Sequence for Mammalian Chromosomes. *Stain Technology*, 1956, 31(6), 247-251.

FORSTER, M., M. A. BOLZINGER, H. FESSI a S. BRIANCON. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. *Eur J Dermatol*, 2009, 19(4), 309-323.

FORTIN, F., Y. BONVALOT, T. C. V. PHAM, N. OUELLT, et al. Biomarkers of genotoxicity measured in human lymphocytes exposed to benzo[a]pyrene: Aneugenic effect, and involvement multiple primary DNA lesions. *Integrative Pharmacology, Toxicology and Genotoxicology*, 2015, 1(1).

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*, 1975, 64(3), 190-195.

FRASCH, H. F., A. M. BARBERO, H. ALACHKAR a J. N. MCDUGAL. Skin penetration and lag times of neat and aqueous diethyl phthalate, 1,2-dichloroethane and naphthalene. *Cutan Ocul Toxicol*, 2007, 26(2), 147-160.

FU, P. P., Q. XIA, X. SUN a H. YU. Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2012, 30(1), 1-41.

GAO, J. a S. W. BURCHIEL. Genotoxic Mechanisms of PAH-Induced Immunotoxicity. In *Molecular Immunotoxicology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014, p. 245-262.

GAO, M., Y. LI, A. ZHENG, X. XUE, et al. Lymphocyte oxidative stress/genotoxic effects are related to serum IgG and IgA levels in coke oven workers. *ScientificWorldJournal*, 2014, 2014, 801346.

GOECKERMAN, W. H. The Treatment of Psoriasis. *Northwest Med*, 1925, 24(May), 229-231.

GRUJICIC, D., M. RADOVIC, S. ARSENIJEVIC a O. MILOSEVIC-DJORDJEVIC. Cytogenetic biomarkers in detection of genotoxic effects of gestagens in peripheral blood lymphocytes in vitro and in vivo. *Eur J Med Genet*, 2016, 59(12), 624-633.

GUO, H., K. HUANG, X. ZHANG, W. ZHANG, et al. Women are more susceptible than men to oxidative stress and chromosome damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons exposure. *Environ Mol Mutagen*, 2014, 55(6), 472-481.

GUPTA, R., M. DEBBANEH, D. BUTLER, M. HUYNH, et al. The Goeckerman regimen for the treatment of moderate to severe psoriasis. *J Vis Exp*, 2013, (77), e50509.

HAFEEZ, F., A. CHIANG, X. HUI, H. ZHU, et al. Stratum corneum reservoir as a predictive method for in vitro percutaneous absorption. *J Appl Toxicol*, 2016, 36(8), 1003-1010.

HAN, X., N. ZHOU, Z. CUI, M. MA, et al. Association between Urinary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites and Sperm DNA Damage: A Population Study in Chongqing, China. *Environ Health Perspect*, 2011, 119(5), 652-657.

HANDO, J. C., J. NATH a J. D. TUCKER. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma*, 1994, 103(3), 186-192.

HAYASHI, M. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes Environ*, 2016, 38, 18.

HENKLER, F., K. STOLPMANN a A. LUCH. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. *Exs*, 2012, 101, 107-131.

HEW, K. M., A. I. WALKER, A. KOHLI, M. GARCIA, et al. Childhood exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons is linked to epigenetic modifications and impaired systemic immunity in T cells. *Clinical & Experimental Allergy*, 2015, 45(1), 238-248.

HINTZSCHE, H., U. HEMMANN, A. POTH, D. UTESCH, et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutat Res*, 2017, 771, 85-98.

HOFFELDER, D. R., L. LUO, N. A. BURKE, S. C. WATKINS, et al. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma*, 2004, 112(8), 389-397.

HONG, W.-J., H. JIA, W.-L. MA, R. K. SINHA, et al. Distribution, Fate, Inhalation Exposure and Lung Cancer Risk of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Some Asian Countries. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(13), 7163-7174.

HORKÝ, D. a S. ČECH. *Mikroskopická anatomie*. Edition ed. Brno: Masarykova univerzita, 2011. 129-146 p. ISBN 978-80-210-5544-5.

HRISTOVA, R., V. HADJIDEKOVA, M. GRIGOROVA, T. NIKOLOVA, et al. Chromosome analysis of nuclear power plant workers using fluorescence in situ hybridization and Giemsa assay. *J Radiat Res*, 2013, 54(5), 832-839.

HU, H., H. KAN, G. D. KEARNEY a X. XU. Associations between exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and glucose homeostasis as well as metabolic syndrome in nondiabetic adults. *Science of The Total Environment*, 2015, 505(Supplement C), 56-64.

HUANG, P., B. HUANG, H. WENG, K. NAKAYAMA, et al. Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. *Prev Med*, 2009, 48(4), 383-388.

HUANG, Y., H. HOU, Q. YI, Y. ZHANG, et al. The fate of micronucleated cells post X-irradiation detected by live cell imaging. *DNA Repair (Amst)*, 2011, 10(6), 629-638.

CHAKRAVARTI, D., D. VENUGOPAL, P. C. MAILANDER, J. L. MEZA, et al. The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutat Res*, 2008, 649(1-2), 161-178.

CHALUPOVÁ, Z., R. MASTEIKOVÁ, M. RABIŠKOVÁ a E. KOVÁŘOVÁ. Použití dispergační látky při zpracování dehtu do topických hydrofobních a hydrofilních přípravků. *Praktické lékařství*, 2007, 3, 123-125.

CHAN, H. P., H. ZHAI, X. HUI a H. I. MAIBACH. Skin decontamination: principles and perspectives. *Toxicol Ind Health*, 2013, 29(10), 955-968.

CHANDRA, A., A. RAY, S. SENAPATI a R. CHATTERJEE. Genetic and epigenetic basis of psoriasis pathogenesis. *Molecular Immunology*, 2015, 64(2), 313-323.

CHAVES, T. V. S., M. T. ISLAM, M. O. DE MORAES, M. DE ALENCAR, et al. Occupational and life-style factors-acquired mutagenicity in agric-workers of northeastern Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24(18), 15454-15461.

CHEBOTAREV, A. N., N. P. BOCHKOV, L. D. KATOSOVA a V. I. PLATONOVA. Variation of Chromosome Aberration Rate in the Culture of Human Blood Lymphocytes with Time. *Russian Journal of Genetics*, 2001, 37(6), 699-703.

CHILCOTT, R. P., J. JENNER, S. A. HOTCHKISS a P. RICE. In vitro skin absorption and decontamination of sulphur mustard: comparison of human and pig-ear skin. *Journal of Applied Toxicology*, 2001, 21(4), 279-283.

CHILCOTT, R. P. a S. PRICE. *Principles and Practice of Skin Toxicology*. Edition ed.: John Wiley & Sons, 2008. 392 p. ISBN 978-0-470-51172-5.

CHRISTOBHER, S., M. PERIYASAMY, H. E. SYED MOHAMED, A. SADIQ BUKHARI, et al. Cytogenetical analysis in blood lymphocytes of cigarette smokers in Tiruchirappalli district, Tamil Nadu, India. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 2017, 18(2), 147-152.

IARC. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. In., 2002, vol. Volume 82.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human - Volume 92 – Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures In., 2010.

IARC. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human - Volume 100F – Chemical Agents and Related Occupations. In. Lyon, France: IARC Publications, 2012.

IARC. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–120. In., 2018.

JACOBI, U., M. KAISER, R. TOLL, S. MANGELSDORF, et al. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res Technol*, 2007, 13(1), 19-24.

JANG, T.-W., Y. KIM, J.-U. WON, J.-S. LEE, et al. The standards for recognition of occupational cancers related with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Korea. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 2018, 30(1), 13.

JEDRYCHOWSKI, W. A., F. P. PERERA, D. CAMANN, J. SPENGLER, et al. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and cognitive dysfunction in children. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 22(5), 3631-3639.

JOHANNES, C. a G. OBE. Chromosomal aberration test in human lymphocytes. *Methods Mol Biol*, 2013, 1044, 165-178.

KANIKKANNAN, N., R. PATEL, T. JACKSON, M. S. SHAIK, et al. Percutaneous absorption and skin irritation of JP-8 (jet fuel). *Toxicology*, 2001, 161(1-2), 1-11.

KARAMAN, A., C. ALIAGAOGLU a I. PIRIM. Sister chromatid exchange analysis in patients with psoriasis. *Exp Dermatol*, 2008, 17(6), 524-529.

KARAMAN, A. a I. PIRIM. Exposure to bitumen fumes and genotoxic effects on Turkish asphalt workers. *Clin Toxicol (Phila)*, 2009, 47(4), 321-326.

KARIMI, P., K. O. PETERS, K. BIDAD a P. T. STRICKLAND. Polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *Eur J Epidemiol*, 2015.

KASALA, E. R., L. N. BODDULURU, C. C. BARUA, C. S. SRIRAM, et al. Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacological Reports*, 2015, 67(5), 996-1009.

KHANNA, P. *Essentials of Genetics*. Edition ed.: I.K. International Publishing House Pvt. Limited, 2010. ISBN 9789380026343.

KIM, K. H., S. A. JAHAN, E. KABIR a R. J. BROWN. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int*, 2013, 60, 71-80.

KIRSCH-VOLDERS, M. a M. FENECH. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 2001, 16(1), 51-58.

KMOCHOVA, A., A. TICHY, L. ZARYBNICKA, Z. SINKOROVA, et al. Modulation of ionizing radiation-induced effects by NU7441, KU55933 and VE821 in peripheral blood lymphocytes. *Journal of Applied Biomedicine*, 2016, 14(1), 19-24.

KOLLER, V. J., F. FERK, H. AL-SERORI, M. MISIK, et al. Genotoxic properties of representatives of alkylindazoles and aminoalkyl-indoles which are consumed as synthetic cannabinoids. *Food Chem Toxicol*, 2015, 80, 130-136.

KONG, S., X. DING, Z. BAI, B. HAN, et al. A seasonal study of polycyclic aromatic hydrocarbons in PM(2.5) and PM(2.5-10) in five typical cities of Liaoning Province, China. *J Hazard Mater*, 2010, 183(1-3), 70-80.

KOPJAR, N., D. ZELJEZIC a V. GARAJ-VRHOVAC. Evaluation of DNA damage in white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochim Pol*, 2006, 53(2), 321-336.

KOTINGOVÁ, L. Kinetika vybraných látek při dermální expozici (Polycyklické aromatické uhlovodíky). disertační práce Univerzita Karlova, 2015.

KOTINGOVÁ, L., V. VOŘÍŠEK, L. BORSKÁ, E. ČERMÁKOVÁ, et al. Vliv rozpouštědla na dermální absorpci pyrenu in vitro. *Hygiena*, 2012, 57(2), 50-55.

KUMAR, A., A. YADAV, S. K. GIRI, K. DEV, et al. Influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes and confounding factors on the frequency of sister chromatid exchange and micronucleus among road construction workers. *Chemosphere*, 2011, 84(5), 564-570.

LADEIRA, C., M. PADUA, L. VEIGA, S. VIEGAS, et al. Influence of Serum Levels of Vitamins A, D, and E as well as Vitamin D Receptor Polymorphisms on Micronucleus Frequencies and Other Biomarkers of Genotoxicity in Workers Exposed to Formaldehyde. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 2015, 8(4-6), 205-214.

LADELL, K., M. K. HELLERSTEIN, D. CESAR, R. BUSCH, et al. Central memory CD8(+) T cells have a shorter lifespan and reduced abundance as a function of HIV disease progression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2008, 180(12), 7907-7918.

LAHDETIE, J. a M. PARVINEN. Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rat. *Mutat Res*, 1981, 81(1), 103-115.

LI, J. H., H. C. HU, W. B. CHEN a S. K. LIN. Genetic toxicity of methamphetamine in vitro and in human abusers. *Environ Mol Mutagen*, 2003, 42(4), 233-242.

LIAO, L. M., J. N. HOFMANN, F. KAMANGAR, P. T. STRICKLAND, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of gastric cancer in the Shanghai Women's Health Study. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 2014, 5(3), 140-144.

LORETO, C., V. RAPISARDA, M. L. CARNAZZA, G. MUSUMECI, et al. Bitumen products alter bax, bcl-2 and cytokeratin expression: An in vivo study of chronically exposed road pavers. *Journal of Cutaneous Pathology*, 2007, 34(9), 699-704.

LUPO, P. J., P. H. LANGLOIS, J. REEFHUIS, C. C. LAWSON, et al. Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: effects on gastroschisis among offspring in the National Birth Defects Prevention Study. *Environ Health Perspect*, 2012, 120(6), 910-915.

LUZHNA, L., P. KATHIRIA a O. KOVALCHUK. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics*, 2013, 4, 131.

MACGREGOR, J. T., C. M. WEHR a D. H. GOULD. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environ Mutagen*, 1980, 2(4), 509-514.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 2003, 121(2), 231-241.

MAFFEI, F., C. FIMOGNARI, E. CASTELLI, G. F. STEFANINI, et al. Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis*, 2000, 15(6), 517-523.

MAFFEI, F., G. C. FORTI, E. CASTELLI, G. F. STEFANINI, et al. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat Res*, 2002, 514(1-2), 49-58.

MAFFEI, F., J. M. ZOLEZZI MORAGA, S. ANGELINI, C. ZENESINI, et al. Micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes as a biomarker for the early detection of colorectal cancer risk. *Mutagenesis*, 2014, 29(3), 221-225.

MALKIC SALIHBEGOVIĆ, E., N. HADZIGRAHIĆ a A. J. CICKUSIĆ. Psoriasis and metabolic syndrome. *Med Arch*, 2015, 69(2), 85-87.

MALKOVA, A., R. KOHLEROVA, Z. FIALA, K. HAMAKOVA, et al. Genotoxic changes in peripheral lymphocytes after therapeutic exposure to crude coal tar and ultraviolet radiation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2016, 160(4), 553-558.

MARINKOVIĆ, N., D. PAŠALIĆ a S. POTOČKI. Polymorphisms of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons' biotransformation and atherosclerosis. *Biochemia Medica*, 2013, 23(3), 255-265.

MATEUCA, R., N. LOMBAERT, P. V. AKA, I. DECORDER, et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 2006, 88(11), 1515-1531.

MATEUCA, R. A., I. DECORDER a M. KIRSCH-VOLDERS. Cytogenetic methods in human biomonitoring: principles and uses. *Methods Mol Biol*, 2012, 817, 305-334.

MICHALEK, I. M., B. LORING a S. M. JOHN. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2017, 31(2), 205-212.

MININA, V. I., M. Y. SINITSKY, V. G. DRUZHININ, A. FUCIC, et al. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution. *Eur J Cancer Prev*, 2018, 27(1), 6-12.

MODI, B. G., J. NEUSTADTER, E. BINDA, J. LEWIS, et al. Langerhans Cells Facilitate Epithelial DNA Damage and Squamous Cell Carcinoma. *Science*, 2012, 335(6064), 104-108.

MOORHEAD, P. S., P. C. NOWELL, W. J. MELLMAN, D. M. BATTIPS, et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*, 1960, 20(3), 613-616.

MOORTHY, B., C. CHU a D. J. CARLIN. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci*, 2015, 145(1), 5-15.

MOTORYKIN, O., L. SANTIAGO-DELGADO, D. ROHLMAN, J. E. SCHRLAU, et al. Metabolism and excretion rates of parent and hydroxy-PAHs in urine collected after

consumption of traditionally smoked salmon for Native American volunteers. *Sci Total Environ*, 2015, 514C, 170-177.

MOUSTAFA, G. A., E. XANTHOPOULOU, E. RIZA a A. LINOS. Skin disease after occupational dermal exposure to coal tar: a review of the scientific literature. *Int J Dermatol*, 2015, 54(8), 868-879.

MURGIA, E., V. MAGGINI, R. BARALE a A. M. ROSSI. Micronuclei, genetic polymorphisms and cardiovascular disease mortality in a nested case-control study in Italy. *Mutat Res*, 2007, 621(1-2), 113-118.

NAKAMURA, M., J. KOO a T. BHUTANI. Uremic pruritus treated successfully with the Goeckerman Program. *Dermatol Online J*, 2016, 22(8).

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: ZDRAVOTNICTVÍ ČR: Stručný přehled činnosti oboru dermatovenerologie za období 2007–2015 NZIS REPORT č. K/12 (09/2016) [online]. 2016. [cit. 26.3.2018]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/publikace/zdravotnictvi-cr-strucny-prehled-cinnosti-oboru-dermatovenerologie-za-obdobi-2007-2015>

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2002, 504(1), 3-16.

NATARAJAN, A. T. a F. PALITTI. DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat Res*, 2008, 657(1), 3-7.

NEFIC, H. a I. HANDZIC. The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutat Res*, 2013, 753(1), 1-11.

NELSON, B. C., C. W. WRIGHT, Y. IBUKI, M. MORENO-VILLANUEVA, et al. Emerging metrology for high-throughput nanomaterial genotoxicology. *Mutagenesis*, 2017, 32(1), 215-232.

NI, C. a M. W. CHIU. Psoriasis and comorbidities: links and risks. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2014, 7, 119-132.

NI, J., Z. LIANG, T. ZHOU, N. CAO, et al. A decreased micronucleus frequency in human lymphocytes after folate and vitamin B12 intervention: a preliminary study in a Yunnan population. *Int J Vitam Nutr Res*, 2012, 82(6), 374-382.

NISHIFUJI, K. a J. S. YOON. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet Dermatol*, 2013, 24(1), 60-72.e15-66.

NORPPA, H. a G. C. FALCK. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 2003, 18(3), 221-233.

OBSTOVÁ, I. Terapie psoriázy. *Praktické lékařství*, 2016, 12(1), 12-15.

OECD. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS; DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 487: In Vitro Micronucleus Test. In., 2004.

OECD. *Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test*. Edition ed.: OECD Publishing, Paris, 2016a.

OECD. *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. In.: OECD Publishing, 2016b.

OECD. *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. In.: OECD Publishing, Paris, 2016c.

OESCH, F., E. FABIAN, K. GUTH a R. LANDSIEDEL. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology*, 2014, 88(12), 2135-2190.

OESCH, F., E. FABIAN, B. OESCH-BARTLOMOWICZ, C. WERNER, et al. Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metab Rev*, 2007, 39(4), 659-698.

OKAMOTO, A., K. UTANI a N. SHIMIZU. DNA replication occurs in all lamina positive micronuclei, but never in lamina negative micronuclei. *Mutagenesis*, 2012, 27(3), 323-327.

OZAWA, M., K. FERENCZI, T. KIKUCHI, I. CARDINALE, et al. 312-nanometer Ultraviolet B Light (Narrow-Band UVB) Induces Apoptosis of T Cells within Psoriatic Lesions. *The Journal of Experimental Medicine*, 1999, 189(4), 711-718.

PARISI, R., D. P. M. SYMMONS, C. E. M. GRIFFITHS a D. M. ASHCROFT. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, 133(2), 377-385.

PATRI, M., A. PADMINI a P. P. BABU. Polycyclic aromatic hydrocarbons in air and their neurotoxic potency in association with oxidative stress: A brief perspective. *Annals of Neurosciences*, 2009, 16(01), 22-30.

PAUK, N., S. KLIMESOVA, J. KARA, J. TOPINKA, et al. The relevance of monitoring of antibodies against the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and PAH-DNA adducts in serum in relation to lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Neoplasma*, 2013, 60(2), 182-187.

PAYAN, J. P., M. LAFONTAINE, P. SIMON, F. MARQUET, et al. In vivo and in vitro percutaneous absorption of [¹⁴C]pyrene in Sprague Dawley male rats: skin reservoir effect and consequence on urinary 1-OH pyrene excretion. *Arch Toxicol*, 2008, 82(10), 739-747.

PERERA, F., K. WEILAND, M. NEIDELL a S. WANG. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and IQ: estimated benefit of pollution reduction. *J Public Health Policy*, 2014, 35(3), 327-336.

PINKEL, D., T. STRAUME a J. W. GRAY. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(9), 2934-2938.

PITTALUGA, M., P. PARISI, S. SABATINI, R. CECI, et al. Cellular and biochemical parameters of exercise-induced oxidative stress: relationship with training levels. *Free Radic Res*, 2006, 40(6), 607-614.

POIRIER, M. C. Linking DNA adduct formation and human cancer risk in chemical carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen*, 2016, 57(7), 499-507.

POLANSKA, K., G. DETTBARN, J. JUREWICZ, W. SOBALA, et al. Effect of Prenatal Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposure on Birth Outcomes: The Polish Mother and Child Cohort Study. *BioMed Research International*, 2014, 2014, 10.

PULKRABOVA, J., M. STUPAK, A. SVARCOVA, P. ROSSNER, et al. Relationship between atmospheric pollution in the residential area and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human breast milk. *Sci Total Environ*, 2016, 562, 640-647.

RAMESH, A., A. E. ARCHIBONG, D. B. HOOD, Z. A. GUO, et al. Global Environmental Distribution and Human Health Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In B.G. LOGANATHAN A P.K.S. LAM eds. *Global Contamination Trends of Persistent Organic Chemicals*. CRC Press, 2011, p. 95-125.

RANNA, D., C. ANDRYS, J. KREJSEK, K. HAMAKOVA, et al. Elevated levels of circulating biomarkers of cell death (nucleosomes) in the patients with plaque psoriasis treated with the Goeckerman regimen. *Bratisl Lek Listy*, 2014, 115(4), 229-232.

REGISTRE, M. a R. PROUDLOCK. Chapter 7 - The In Vitro Chromosome Aberration Test. In *Genetic Toxicology Testing*. Boston: Academic Press, 2016, p. 207-267.

REN, A., X. QIU, L. JIN, J. MA, et al. Association of selected persistent organic pollutants in the placenta with the risk of neural tube defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(31), 12770-12775.

RENGARAJAN, T., P. RAJENDRAN, N. NANDAKUMAR, B. LOKESHKUMAR, et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015, 5(3), 182-189.

ROELOFZEN, J. H., K. K. ABEN, P. G. VAN DER VALK, J. L. VAN HOUTUM, et al. Coal tar in dermatology. *J Dermatolog Treat*, 2007, 18(6), 329-334.

ROOS, W. P. a B. KAINA. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine*, 2006, 12(9), 440-450.

ROSSNEROVA, A., K. HONKOVA, J. PAVLIKOVA, Z. F. SKALICKA, et al. Mapping the factors affecting the frequency and types of micronuclei in an elderly population from Southern Bohemia. *Mutat Res*, 2016, 793-794, 32-40.

ROSSNEROVA, A., M. POKORNA, V. SVECOVA, R. J. SRAM, et al. Adaptation of the human population to the environment: Current knowledge, clues from Czech cytogenetic and "omics" biomonitoring studies and possible mechanisms. *Mutat Res*, 2017, 773, 188-203.

ROSSNEROVA, A., M. SPATOVA, P. ROSSNER, I. SOLANSKY, et al. The impact of air pollution on the levels of micronuclei measured by automated image analysis. *Mutat Res*, 2009, 669(1-2), 42-47.

ROTHFELS, K. H. a L. SIMINOVITCH. An Air-Drying Technique for Flattening Chromosomes in Mammalian Cells Grown In Vitro. *Stain Technology*, 1958, 33(2), 73-77.

SABHARWAL, R., P. VERMA, M. A. SYED, T. SHARMA, et al. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. *Indian J Med Paediatr Oncol*, 2015, 36(4), 212-218.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. 2010. ISBN 978-92-79-12747-2.

SAGE, E., P. M. GIRARD a S. FRANCESCONI. Unravelling UVA-induced mutagenesis. *Photochem Photobiol Sci*, 2012, 11(1), 74-80.

SANTOVITO, A., P. CERVELLA a M. DELPERO. Evidence of genotoxicity in lymphocytes of non-smoking alcoholics. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(1), 53-59.

SARTORELLI, P., C. APREA, A. CENNI, M. T. NOVELLI, et al. Prediction of percutaneous absorption from physicochemical data: a model based on data of in vitro experiments. *Ann Occup Hyg*, 1998, 42(4), 267-276.

SARTORELLI, P., A. CENNI, G. MATTEUCCI, L. MONTOMOLI, et al. Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: in vitro percutaneous penetration from lubricating oil. *Int Arch Occup Environ Health*, 1999, 72(8), 528-532.

SARTORELLI, P., L. MONTOMOLI, A. G. SISINNI, R. BUSSANI, et al. Dermal exposure assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: in vitro percutaneous penetration from coal dust. *Toxicol Ind Health*, 2001, 17(1), 17-21.

SEKHON, S., C. JEON, M. NAKAMURA, L. AFIFI, et al. Review of the mechanism of action of coal tar in psoriasis. *J Dermatolog Treat*, 2017, 1-3.

SHIMIZU, N., T. SHIMURA a T. TANAKA. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat Res*, 2000, 448(1), 81-90.

SCHEEPERS, P. T., J. VAN HOUTUM, R. B. ANZION, C. CHAMPMARTIN, et al. The occupational exposure of dermatology nurses to polycyclic aromatic hydrocarbons - evaluating the effectiveness of better skin protection. *Scand J Work Environ Health*, 2009, 35(3), 212-221.

SCHIFFL, C., C. ZIERES a H. ZANKL. Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei. *Mutat Res*, 1997, 389(2-3), 243-246.

SIDNEVA, E. S., L. D. KATOSOVA, V. I. PLATONOVA, N. A. BEKETOVA, et al. Effects of vitamin supply on spontaneous and chemically induced mutagenesis in human cells. *Bull Exp Biol Med*, 2005, 139(2), 230-234.

SILVA, F. S. G., H. OLIVEIRA, A. MOREIRAS, J. C. FERNANDES, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of acitretin, alone or in combination with psoralen-ultraviolet A or narrow-band ultraviolet B-therapy in psoriatic patients. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2013, 753(1), 42-47.

SINHA, R., M. KULLDORFF, M. J. GUNTER, P. STRICKLAND, et al. Dietary benzo[a]pyrene intake and risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(8), 2030-2034.

SINITSKY, M. Y., V. I. MININA, N. I. GAFAROV, M. A. ASANOV, et al. Assessment of DNA damage in underground coal miners using the cytokinesis-block micronucleus assay in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 2016, 31(6), 669-675.

SLIKKER, W., JR., M. E. ANDERSEN, M. S. BOGDANFFY, J. S. BUS, et al. Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 201(3), 203-225.

SORENSEN, E., E. LEVIN, J. KOO a T. G. BERGER. Successful use of a modified Goeckerman regimen in the treatment of generalized prurigo nodularis. *J Am Acad Dermatol*, 2015, 72(1), e40-e42.

SPEIT, G., J. ZELLER a S. NEUSS. The in vivo or ex vivo origin of micronuclei measured in human biomonitoring studies. *Mutagenesis*, 2011, 26(1), 107-110.

SRAM, R. J., O. BESKID, A. ROSSNEROVA, P. ROSSNER, et al. Environmental exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons--the interpretation of cytogenetic analysis by FISH. *Toxicol Lett*, 2007, 172(1-2), 12-20.

SRAM, R. J., P. ROSSNER a Z. SMERHOVSKY. Cytogenetic analysis and occupational health in the Czech Republic. *Mutat Res*, 2004, 566(1), 21-48.

SRAM, R. J., V. SVECOVA a A. ROSSNEROVA. Systematic review of the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay to measure DNA damage induced by exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res*, 2016, 770(Pt A), 162-169.

SREE DEVI, V., V. DURGA RAO, V. V. HARA GOPAL, B. SIVA PRASAD, et al. Cytogenetic evaluation of traffic policemen occupationally exposed to vehicular exhaust. *Indian J Med Res*, 2009, 130(5), 520-525.

STENEHJEM, J. S., T. E. ROBSAHM, M. BRÅTVEIT, S. O. SAMUELSEN, et al. Aromatic hydrocarbons and risk of skin cancer by anatomical site in 25 000 male offshore petroleum workers. *Am J Ind Med*, 2017, 60(8), 679-688.

SURESHKUMAR, S., V. BALACHANDAR, S. M. DEVI, M. ARUN, et al. Estimation of cytogenetic risk among coke oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Acta Biochim Pol*, 2013, 60(3), 375-379.

SZURA, D., L. OZIMEK, M. PRZYBYLO, K. KARLOWICZ-BODALSKA, et al. The impact of liposomes on transdermal permeation of naproxen--in vitro studies. *Acta Pol Pharm*, 2014, 71(1), 145-151.

TATES, A. D., A. J. DIETRICH, N. DE VOGEL, I. NEUTEBOOM, et al. A micronucleus method for detection of meiotic micronuclei in male germ cells of mammals. *Mutat Res*, 1983, 121(2), 131-138.

THOMAS, P., J. WU, V. DHILLON a M. FENECH. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, 2011, 26(1), 69-76.

TOYOOKA, T. a Y. IBUKI. DNA damage induced by coexposure to PAHs and light. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2007, 23(2), 256-263.

TSAY, J. J., K.-M. TCHOU-WONG, A. K. GREENBERG, H. PASS, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor and Lung Cancer. *Anticancer research*, 2013, 33(4), 1247-1256.

TUCHINDA, C., H. W. LIM, F. M. STRICKLAND, E. A. GUZMAN, et al. Comparison of broadband UVB, narrowband UVB, broadband UVA and UVA1 on activation of apoptotic pathways in human peripheral blood mononuclear cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2007, 23(1), 2-9.

UMEGAKI, K. a M. FENECH. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*, 2000, 15(3), 261-269.

UPPSTAD, H., G. H. OSNES, K. J. COLE, D. H. PHILLIPS, et al. Sex differences in susceptibility to PAHs is an intrinsic property of human lung adenocarcinoma cells. *Lung Cancer*, 2011, 71(3), 264-270.

UTANI, K., J. K. KAWAMOTO a N. SHIMIZU. Micronuclei bearing acentric extrachromosomal chromatin are transcriptionally competent and may perturb the cancer cell phenotype. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(7), 695-704.

UTANI, K., A. OKAMOTO a N. SHIMIZU. Generation of micronuclei during interphase by coupling between cytoplasmic membrane blebbing and nuclear budding. *PLoS ONE*, 2011, 6(11), e27233.

VAN DE SANDT, J. J., W. J. MEULING, G. R. ELLIOTT, N. H. CNUBBEN, et al. Comparative in vitro-in vivo percutaneous absorption of the pesticide propoxur. *Toxicol Sci*, 2000, 58(1), 15-22.

VANROOIJ, J. G., M. M. BODELIER-BADE a F. J. JONGENEELLEN. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. *Br J Ind Med*, 1993, 50(7), 623-632.

VENKATESAN, S., A. T. NATARAJAN a M. P. HANDE. Chromosomal instability--mechanisms and consequences. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015, 793, 176-184.

VILLARINI, M., L. DOMINICI, C. FATIGONI, G. MUZI, et al. Biological effect monitoring in peripheral blood lymphocytes from subjects occupationally exposed to antineoplastic drugs: assessment of micronuclei frequency. *J Occup Health*, 2012, 54(6), 405-415.

VODENKOVA, S., Z. POLIVKOVA, L. MUSAK, Z. SMERHOVSKY, et al. Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients. *Mutagenesis*, 2015, 30(4), 557-563.

VOHRADNÍKOVÁ, O. Acne vulgaris. *Dermatologie pro praxi*, 2010, 4(1), 51-54.

WAGNER, M., U. BOLM-AUDORFF, J. HEGEWALD, A. FISHTA, et al. Occupational polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and risk of larynx cancer: a systematic review and meta-analysis. *Occup Environ Med*, 2015, 72(3), 226-233.

WALTER, D. a U. KNECHT. Standardized Investigation of Percutaneous Absorption of Bitumen Emission in Humans. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 2007, 4(sup1), 144-153.

WANG, L., Y. ZHAO, X. LIU, T. HUANG, et al. Cancer risk of petrochemical workers exposed to airborne PAHs in industrial Lanzhou City, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(24), 19793-19803.

WELGE, P., B. MARCZYNSKI, M. RAULF-HEIMSOTH, A. SPICKENHEUER, et al. Assessment of micronuclei in lymphocytes from workers exposed to vapours and aerosols of bitumen. *Arch Toxicol*, 2011, 85 Suppl 1, S65-71.

WHITE, A. J., P. T. BRADSHAW, A. H. HERRING, S. L. TEITELBAUM, et al. Exposure to multiple sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer incidence. *Environ Int*, 2016, 89-90, 185-192.

WHO. Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants. In. Bonn WHO Regional Office for Europe, 2010.

WIEGAND, C., N. J. HEWITT, H. F. MERK a K. REISINGER. Dermal Xenobiotic Metabolism: A Comparison between Native Human Skin, Four in vitro Skin Test Systems and a Liver System. *Skin Pharmacol Physiol*, 2014, 27(5), 263-275.

WILLIAMS, A. C. *Transdermal and topical drug delivery*. Edition ed. London: Pharmaceutical Press, 2003. ISBN 0-85369-489-3.

WOJDA, A., E. ZIETKIEWICZ, M. MOSSAKOWSKA, W. PAWLOWSKI, et al. Correlation between the level of cytogenetic aberrations in cultured human lymphocytes and the age and gender of donors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006, 61(8), 763-772.

WOJDA, A., E. ZIETKIEWICZ a M. WITT. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis*, 2007, 22(3), 195-200.

WU, C.-C., L.-J. BAO, Y. GUO, S.-M. LI, et al. Barbecue Fumes: An Overlooked Source of Health Hazards in Outdoor Settings? *Environ Sci Technol*, 2015, 49(17), 10607-10615.

WU, C. C., L. J. BAO, S. TAO a E. Y. ZENG. Dermal Uptake from Airborne Organics as an Important Route of Human Exposure to E-Waste Combustion Fumes. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(13), 6599-6605.

WU, J., G. H. LYONS, R. D. GRAHAM a M. F. FENECH. The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutagenesis*, 2009, 24(3), 225-232.

YU, H., Q. XIA, J. YAN, D. HERRENO-SAENZ, et al. Photoirradiation of polycyclic aromatic hydrocarbons with UVA light - a pathway leading to the generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and dna damage. *Int J Environ Res Public Health*, 2006, 3(4), 348-354.

ZHANG, X., H. DUAN, F. GAO, Y. LI, et al. Increased micronucleus, nucleoplasmic bridge, and nuclear bud frequencies in the peripheral blood lymphocytes of diesel engine exhaust-exposed workers. *Toxicol Sci*, 2015, 143(2), 408-417.

ZHANG, Y., S. DONG, H. WANG, S. TAO, et al. Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. *Environ Pollut*, 2016, 213, 809-824.

ZHU, H., E. C. JUNG, C. PHUONG, X. HUI, et al. Effects of soap-water wash on human epidermal penetration. *J Appl Toxicol*, 2016, 36(8), 997-1002.

Příloha 2 Nový protokol CBMN použitý pro záznam nálezů (BNC = DJB)

PROTOKOL MIKRONUKLEUS TEST

Druh rizika:

Číslo preparátu:

Analyzoval(a):

Počet mikrojadér na 1000 buněk:

Počet mikrojadér %:

Počet BN buněk s mikrojádroem:

Počet BN buněk s 1 MN:

Počet BN buněk s 2 MN:

Počet BN buněk s 3 a více MN:

Buds na 1000 BNC

Bridges na 1000 BNC

Počet MN:

5	45	85	125	165	205	245	285	325
10	50	90	130	170	210	250	290	330
15	55	95	135	175	215	255	295	335
20	60	100	140	180	220	260	300	340
25	65	105	145	185	225	265	305	345
30	70	110	150	190	230	270	310	350
35	75	115	155	195	235	275	315	355
40	80	120	160	200	240	280	320	360

Počet BN buněk s 1 MN:

5	30	55	80	105	130	155	180	205
10	35	60	85	110	135	160	185	210
15	40	65	90	115	140	165	190	215
20	45	70	95	120	145	170	195	220
25	50	75	100	125	150	175	200	225

Počet BN buněk se 2 MN:

5	25	45	65	85	105	125	145	165
10	30	50	70	90	110	130	150	170
15	35	55	75	95	115	135	155	175
20	40	60	80	100	120	140	160	180

Počet BN buněk s 3 a více MN

5	15	25	35	45	55	65	75	85
10	20	30	40	50	60	70	80	90

Bud

Bridge