

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie  
4XMGVP



**Mgr. Antonín Ambrož**

Vliv znečištěného ovzduší na biomarkery oxidačního poškození u  
novorozenců

The effect of air pollution on oxidative stress markers in newborns

Disertační práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Pavel Rössner, Ph.D.

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

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08.06.2020

---

Mgr. Antonín Ambrož

## Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat školiteli RNDr. Pavlu Rössnerovi, Jr., PhD, za cenné rady v průběhu studia a za odborné vedení při zpracování disertační práce.

Společně s ním bych chtěl poděkovat MUDr. Radimu J. Šrámovi, DrSc. a Ing. Janu Topinkovi, CSc., DSc. za cenné rady a podporu. Všem třem kolegům bych chtěl hlavně poděkovat za to, že jsem mohl být součástí projektu s názvem Vliv znečištění ovzduší na genom novorozenců (13-13458S) a v dalších jemu podobných projektech HAIE a LIPITOX, v nichž byli hlavními řešiteli a dali mně tak možnost a prostor pro rozvoj mé vědecké činnosti.

Můj dík též patří všem milým, přátelským a pilným kolegům z Oddělení genetické toxikologie a nanotoxikologie ÚEM AV ČR, kteří se podíleli na projektu a umožnili jeho zdárné dokončení.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat rodičům, sourozenci, prarodičům, tetám/strýcům a jejich rodinám za podporu. Mé velké díky patří obzvláště přítelkyni Kristýně a našim synkům Toníkovi a Vítkovi za trpělivost, podporu v životě i při studiu a vytváření rodinného zázemí.

Děkuji!!!

Práce byla podporována Grantovou Agenturou ČR (grant P301/13/13458S)

# Obsah

Poděkování .....	3
Seznam zkratk .....	6
Abstrakt .....	10
Abstract.....	12
1 Úvod.....	14
1.1 Prachové částice (PM).....	16
1.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) .....	18
1.2.1 Adukty DNA .....	22
1.3 Oxidační stres .....	23
1.3.1 Biomarkery oxidačního poškození DNA.....	28
1.3.2 Biomarkery peroxidace lipidů .....	30
1.3.3 Biomarkery expozice tabákovému kouři (ETS) .....	32
2 Cíle .....	34
3 Metodika.....	35
3.1 Design studie a základní charakteristika souboru .....	35
3.2 Koncentrace PM2.5 a B[a]P ve vnějším ovzduší.....	37
3.3 Stanovení 8-oxodG .....	37
3.4 Stanovení 15-F <sub>2</sub> t-IsoP.....	37
3.5 Stanovení kotininu .....	38
3.6 Stanovení celkových aduktů DNA a B[a]P – „like“ aduktů DNA.....	38
3.7 Statistická analýza.....	38
4 Výsledky .....	40
4.1 Dotazníková data.....	40
4.2 Stanovení koncentrací PM2.5 a B[a]P ve vnějším ovzduší.....	40
4.3 Stanovení poškození DNA .....	43
4.3.1 Stanovení hladin 8-oxodG .....	43
4.3.2 Stanovení celkových aduktů DNA a B[a]P – „like“ aduktů DNA .....	44
4.4 Stanovení peroxidace lipidů .....	46
4.5 Oxidační stres ve vztahu k expozici tabákovému kouři .....	47
4.6 Multivariátní regresní analýza.....	48
4.6.1 Identifikace nezávislých faktorů podílejících se na oxidačním stresu bez ohledu na lokalitu .....	48
4.6.2 Identifikace nezávislých faktorů podílejících se na oxidačním stresu v jednotlivých lokalitách .....	50
4.6.3 Peroxidace lipidů u novorozenců v souvislosti s typem porodu .....	52

<b>5</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>56</b>
5.1	Znečištěné ovzduší.....	56
5.2	Hladiny aduktů DNA .....	57
5.3	Hladiny 8-oxodG a 15-F <sub>2</sub> t-IsoP .....	58
5.4	Nezávislé faktory ovlivňující hladiny oxidačních biomarkerů .....	62
5.4.1	<i>Nezávislé faktory: ETS, pohlaví, odběrové období, věk.....</i>	62
5.4.2	<i>Nezávislé faktory: PM<sub>2.5</sub> a B[a]P .....</i>	63
5.4.3	<i>Nezávislé faktory: způsob porodu a typ užití anestezie .....</i>	64
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Prohlášení o podílu činnosti na metodách a na příložených publikacích.....</b>	<b>79</b>
	<b>Příloha I</b>	
	<b>Příloha II</b>	
	<b>Příloha III</b>	
	<b>Příloha IV</b>	
	<b>Příloha V</b>	

## Seznam zkratek

15-F <sub>2t</sub> -IsoP	15-F <sub>2t</sub> -isoprostan	15-F <sub>2t</sub> -isoprostane
5-OHmU	5-hydroxymethyluracil	5-hydroxymethyluracil
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
8-oxoGua	8-oxo-7,8-dihydroguanin	8-oxo-7,8-dihydro-guanine
95%CI	Interval spolehlivosti	Confidential Interval
AhR	Arylhydrokarbonový receptor	Aryl hydrocarbon receptor
AhRR	Represor AhR	Aryl hydrocarbon receptor represor
AKRs	Aldoketoreduktázy	Aldoketoreductases
ANKRA2		Ankyrin repeat family A protein 2
AP-1	Aktivační protein 1	Activator protein 1
ARNT	Jaderný přenašeč AhR	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATSDR	Agentura pro toxické látky a registr nemocí	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
B[a]P	Benzo[a]pyren	Benzo[a]pyrene
BER	Bázová excizní reparace	Base excision repair
BMI	Index tělesné hmotnosti	Body mass index
BTE		Basic transcription element
CAT	Kataláza	Catalase
CIA	Chemiluminiscenční imunologická metoda	Chemiluminescence immunoassay
CHMI	Český hydrometeorologický ústav	Czech Hydrometeorological Institute
CNS	Centrální nervová soustava	Central nervous system
CO	Oxid uhelnatý	Carbon monoxide
COX	Cyklooxygenáza	Cyclooxygenase
CpG	CpG dinukleotid	CpG dinucleotide
CS	Císařský řez	Cesarean section
Cs	Cesium	Cesium
CYP1A1	Cytochrom 1A1	Cytochrome 1A1
CYP3A4	Cytochrom 3A4	Cytochrome 3A4
CYP1B1	Cytochrom 1B1	Cytochrome 1B1
ČB	České Budějovice	Ceske Budejovice
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát	Deoxyribonucleoside triphosphate

DNA	Deoxyribonukleová kyselina	Deoxyribonucleic acid
DRZ	Diagonální radioaktivní zóna	Diagonal radioactive zone
EDTA	kyselina Ethylendiamintetraoctová	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Imunologická metoda sloužící k detekci protilátek	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EOM	Extrahovatelná organická hmota	Extractable organic matter
ETS	Environmentální tabákový kouř	Environmental Tobacco Smoke
EU	Evropská unie	European Union
GPX	Glutathion peroxidáza	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathion – redukováná forma	Reduced glutathione
GSSG	Glutathion – oxidovaná forma	Oxidized glutathione
GST	Glutathion S-transferáza	Glutathione-S-transferase
GSTM1	Glutathion S-transferáza M1	Glutathione-S-transferase M1
HDAC (4,5)	Histon deacetyláza	Histone deacetylase
HEL	Lidské embryonální plicní fibroblasty	Human embryonic lung fibroblasts
HepG2	Lidská jaterní nádorová linie	Human hepatocellular carcinoma cell
HIF-1	transkripční factor	Hypoxia inducible factor
HiVol	Velkoobjemový vzorkovač ovzduší	High Volume Air Sampler
HPLC/ MS-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií	High Performance Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry
HRR	Homologické rekombinační reparační dráha	Homologous recombination repair
HSP90	Protein teplotního šoku o velikosti 90 kDa	Heat shock protein 90
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny	International Agency for Research on Cancer
IUGR	Nitroděložní růstová retardace	Intrauterine Growth Restriction
k-PAU	Karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky	Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons
LBW	Nízká porodní váha	Low Birth Weight
LOX	Lipoxygenáza	Lipoxygenase
MAPK	Proteinkinázy aktivované mitogenem	Mitogen-activated protein kinases
miRNA	microRNA	microRNA

NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid Fosfát	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF- κB	Jaderný faktor κB	Nuclear Factor-κB
NHEJ	Nehomologní rekombinace	Non-homologous end-joining
NER	Nukleotidová excisní reparace	Nucleotide excision repair
NO <sub>2</sub>	Oxid dusičitý	Nitrogen dioxide
NQO1	NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
Nrf-1	transkripční factor	Nuclear factor-E2 related factor 1
OGG1	8-oxoguanin DNA glykosyláza	8-oxoguanine DNA glycosylase
OR	poměr šancí	Odds Ratio
p23	protein p23	protein p23 (co-chaperone)
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PCB	Polychlorované bifenyly	Polychlorinated biphenyls
PCR	Polymerázová řetězová reakce	Polymerase Chain Reaction
PLA2	Fosfolipáza A2	Phospholipase A2
qPCR	Kvantitativní polymerázová reakce	Quantitative Polymerase Chain Reaction
PM	Prachové částice	Particulate Matter
PM0.1	Prachové částice s aerodynamickým průměrem < 0.1 μm	Particulate Matter of aerodynamic diameter < 0.1 μm
PM2.5	Prachové částice s aerodynamickým průměrem < 2.5 μm	Particulate Matter of aerodynamic diameter < 2.5 μm
PM10	Prachové částice s aerodynamickým průměrem < 10 μm	Particulate Matter of aerodynamic diameter < 10 μm
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny	Polyunsaturated fatty acid
Ref-1	transkripční factor	Redox effector factor – 1
RIA	Radioimunologická metoda	Radioimmunoassay
ROS	Reaktivní formy kyslíku	Reactive Oxygen Species
RNA	Ribonukleová kyselina	Ribonucleic acid
SD	Směrodatná odchylka	Standard deviation
SO <sub>2</sub>	Oxid siřičitý	Sulfur dioxide
SOD	Superoxiddismutáza	Superoxide dismutase
SPE	Extrakce na pevné fázi	Solid phase extraction
TEC	Ekvivalentní koncentrace toxicity	Total Toxicity Equivalent Concentration
TEF	Toxický ekvivalenční faktor	Toxic equivalency factor



TGF- $\beta$	Cytokiny regulující dělení buňky	Transforming growth factor $\beta$
ÚEM AV ČR	Ústav experimentální medicíny	Institute of Experimental Medicine
VD	Vaginální porod	Vaginal delivery
WHO	Světová zdravotnická organizace	World Health Organization
Wnt	transkripční faktor	Wingless and integration site for mouse mammary tumor virus
XAP2	x-asociovaný protein 2	Immunophilin-like hepatitis B virus X associated protein
XRCC5	DNA reparační protein 5	X-ray repair complementing Defective repair in Chinese hamster cells (5); DNA repair proteins
XRE	Vazebné místo pro xenobiotika	Xenobiotic responsive element

## Abstrakt

Většina lidské populace je v každodenním životě vystavena toxickým látkám antropogenního původu. Tyto látky jsou rovněž přítomné v ovzduší a jejich účinky představují dlouhodobou zátěž pro lidské zdraví. V současnosti jsou intenzivně studovány prachové částice (PM) s aerodynamickým průměrem  $<2.5 \mu\text{m}$  (PM<sub>2.5</sub>) společně s karcinogenními polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAU), které jsou na ně navázány, jako např. benzo[a]pyren (B[a]P), jenž je považován za referenční karcinogenní PAU. Vzhledem ke svým rozměrům částice PM<sub>2.5</sub> primárně pronikají do organismu dýchacími cestami a v porovnání s většími částicemi představují zvýšené zdravotní riziko. Negativní účinky antropogenních částic PM<sub>2.5</sub>, které jsou produkovány např. spalováním fosilních paliv, souvisí nejen s jejich malou velikostí, ale i s relativně velkým povrchem, na kterém jsou kromě PAU adsorbovány i další látky škodlivé pro lidské zdraví. PAU vznikající v důsledku neúplného spalování organické hmoty mohou do organismu vstoupit požitím kontaminované potravy, vody nebo inhalací částic rozptýlených ve vzduchu. Mohou se projevovat genotoxickými, mutagenními, karcinogenními, embryotoxickými a dalšími nežádoucími účinky. Jedním ze společných jmenovatelů těchto účinků je oxidační stres, jenž je současně považován za hlavní mechanismus působení PM v lidském organismu. Oxidační poškození vyvolané ROS (reaktivní formy kyslíku) může ovlivnit různé typy buněčných makromolekul. PAU mají schopnost procházet placentou a znečištěné ovzduší tak může ovlivnit i vyvíjející se plod. Tato expozice byla již dříve spojena s předčasnými porody, nízkou porodní hmotností spolu s omezením nitroděložního růstu a potenciálně respiračními obtížemi v dětství i v dospělosti. S ohledem na heterogenní složení znečištěného ovzduší je hodnocení expozice a zdůvodnění příčinné souvislosti mezi expozicí a biologickými důsledky těchto látek velmi komplikovanou záležitostí. Navíc je nutné zmínit, že výsledná expozice jednotlivce má multifaktoriální charakter, na němž se podílí též genetická predispozice, životní styl (tj. kouření, strava), socioekonomické a další faktory životního prostředí. Cílem předkládané disertační práce bylo analyzovat dopad znečištění ovzduší na oxidační poškození DNA pomocí detekce 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosinu (8-oxodG), a na peroxidace lipidů prostřednictvím kvantifikace 15-F<sub>2t</sub>-isoprostanu (15-F<sub>2t</sub>-IsoP) v moči a krevní plazmě matek nekuřáček a jejich novorozenců ze dvou lokalit lišících se úrovní znečištění ovzduší: České Budějovice (ČB) a Karviná. Skupina z ČB byla vybrána jako kontrolní, protože v této lokalitě se předpokládala výrazně nižší úroveň znečištění než v Karvině. Odběr biologického materiálu (moče, plazmy) byl proveden ve dvou obdobích s

různými úrovněmi znečištění ovzduší: v létě 2013 (nízká úroveň polutantů) a v zimě 2014 (vysoká úroveň polutantů).

V obou odběrových obdobích byly subjekty z Karviné vystaveny výrazně vyšším koncentracím polutantů než osoby z ČB ( $P < 0.001$ ). Koncentrace polutantů v ovzduší byla v obou lokalitách vyšší v zimní sezóně v porovnání s letním obdobím ( $P < 0.001$ ). Předpokladem studie bylo, že hladiny studovaných biomarkerů (8-oxodG, 15-F<sub>2t</sub>-IsoP) budou mít obecnou tendenci se zvyšovat s rostoucí koncentrací znečišťujících látek v ovzduší. Zatímco v zimě 2014 u novorozenců z Karviné byly hladiny 8-oxodG v porovnání s ČB významně zvýšeny ( $P < 0.001$ ), u matek z Karviné v porovnání s matkami z ČB v témže období došlo k významnému poklesu oxidačního poškození DNA ( $P < 0.05$ ). Tento nesoulad může souviset s přizpůsobením dospělého organismu nepříznivým podmínkám prostředí a vývojem obranných mechanismů. Změny hladin 15-F<sub>2t</sub>-IsoP měly obdobný trend jako koncentrace 8-oxodG. Výjimkou bylo porovnání peroxidace lipidů mezi novorozenci z ČB a Karviné v létě 2013, kdy hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP byly u kontrolních vzorků výrazně vyšší ( $P < 0.001$ ). Tento výsledek by mohl souviset s působením dalších nezávislých faktorů (např. typ porodu, nebo použitá anestezie při porodu). Výsledky multivariátní regresní analýzy vlivu znečištěného ovzduší na oxidační stres novorozenců v Karviné ukázaly, že koncentrace PM<sub>2.5</sub> jsou významným prediktorem hladin 8-oxodG. Expozice PM<sub>2.5</sub> a B[a]P jsou pak významnými prediktory indukce peroxidace lipidů.

Tato práce demonstruje aplikaci 8-oxodG a 15-F<sub>2t</sub>-IsoP jako biomarkerů expozice novorozenců znečištěnému ovzduší. Její výsledky naznačují, že látky znečišťující ovzduší, jako jsou PM<sub>2.5</sub> a B[a]P, mají vliv na oxidační poškození makromolekul u novorozenců ve znečištěné oblasti. Tento účinek však nebyl pozorován u matek.

## Abstract

In everyday life, humans are exposed to toxic substances of anthropogenic origin. These substances can also be found in the ambient air and their impact poses a long-term risk for human health. Respirable particulate matter (PM) of aerodynamic diameter  $< 2.5 \mu\text{m}$  (PM<sub>2.5</sub>) is intensively studied, along with carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), bound to it, such as benzo[a]pyrene (B[a]P), a reference carcinogenic PAH. Owing to small size, PM<sub>2.5</sub> can penetrate the human body primarily via the airways and represent an increased health risk compared to larger particles. The negative health impacts of anthropogenic PM<sub>2.5</sub>, generated e.g. by fossil fuel combustion, are linked with its small size, relatively large surface, as well as with PAHs and other substances adsorbed on PM surface. PAHs, generated by an incomplete combustion of organic matter, can enter organism either via ingestion of contaminated food, water or via inhalation of polluted air. PAHs affect organisms via genotoxic, mutagenic, carcinogenic, embryotoxic and other adverse effects. One of the common denominators of these effects is oxidative stress, which is also considered to be the main mechanism of action caused by PM in the human organism. Oxidative damage induced by reactive oxygen species (ROS) may affect any cellular macromolecule. Since PAHs can cross the placenta, air pollution may impact a developing fetus via maternal exposure. Such exposure has been associated with preterm birth, low birth weight along with intrauterine growth restriction and potentially respiratory problems in childhood and adulthood. Due to the heterogeneous composition of polluted air, exposure evaluation and interpretation of the causal link between exposure and biological consequences is very complicated. Moreover, the resulting exposure of an individual is a multifactorial process that can be influenced by air pollution, genetic predisposition, lifestyle (i.e. smoking, diet), socio-economical and other environmental factors. The aim of this study was to analyze the impact of air pollution on oxidative DNA damage [8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG)] and lipid peroxidation [15-F<sub>2t</sub>-isoprostane (15-F<sub>2t</sub>-IsoP)] in urine and blood plasma from non-smoking mothers and their newborns from two localities differing in the level of air pollution: České Budějovice (ČB) and Karviná. The ČB group was selected as a control, since the levels of pollution in this locality are significantly lower than in Karviná. Sampling of biological material (urine, plasma) was performed in two periods with different levels of air pollution: in summer 2013 (low pollutant levels) and in winter 2014 (high pollutant levels).

In both sampling periods, the subjects in Karviná were exposed to significantly higher concentration of air pollutants than in ČB ( $P < 0.001$ ). In both localities, the concentration of air pollutants was higher in winter season than in summer ( $P < 0.001$ ). Biomarker levels (8-oxodG, 15-F<sub>2</sub>t-IsoP) were expected to increase with increasing concentration of air pollutants. While in newborns from Karvina (winter 2014) the levels of 8-oxodG were significantly increased ( $P < 0.001$ ) in comparison with ČB, in mothers from Karviná oxidative DNA damage levels were significantly decreased in comparison with the control locality ( $P < 0.05$ ) in the same period. This discrepancy may be explained by adaptation of the adult organism to adverse environmental conditions and subsequent development of protective mechanisms. The levels of 15-F<sub>2</sub>t-IsoP generally followed the same trend as 8-oxodG concentrations. The exception was observed for lipid peroxidation in samples from newborns collected in summer 2013, when 15-F<sub>2</sub>t-IsoP levels were significantly higher in the control group ( $P < 0.001$ ). This could be a result of the effect of other independent factors (e.g. type of delivery or anesthesia applied during delivery). Multivariate regression analysis of the effect of air pollution on oxidative stress in newborns from Karvina showed PM<sub>2.5</sub> concentrations to be a significant predictor for 8-oxodG levels. Exposure to PM<sub>2.5</sub> and B[a]P significantly affected lipid peroxidation.

This work demonstrates the application of 8-oxodG and 15-F<sub>2</sub>t-IsoP as biomarkers of exposure to air pollution in newborns. In conclusion, the results suggest that air pollutants such as PM<sub>2.5</sub> and B[a]P affect oxidative damage in newborns in a polluted regions. This effect was not seen in mothers.

# 1 Úvod

Základní potřebou života v obecné rovině, a zároveň z pohledu rodu Homo i znakem vyspělosti lidské společnosti a civilizace jako celku, je neomezený a volný přístup k čistému ovzduší, a to pro všechny obyvatele naší planety. V současnosti, a to zvláště s aktuálním šířením pandemie označované jako COVID-19, se zřetelně ukazuje důležitost dobré kondice lidských plic jako rozhodujícího propojení lidského těla s vnějším prostředím, na které zásadním vlivem působí i stav okolního životního prostředí. Samotný fakt, že člověk se během roku průměrně nadechne cca 10 miliónkrát, znamená těsný kontakt organismu s venkovním prostředím. S touto skutečností pak jednoznačně souvisí značná pravděpodobnost průniku obecně zdraví škodlivých látek do těla člověka. Samostatnou a velmi nebezpečnou kategorií takových látek jsou potenciální mutageny a karcinogeny, jež jsou předmětem hlavního zájmu této disertační práce. Koncentrace škodlivin v ovzduší se činností člověka neustále zvyšuje a jejich působení na lidský organismus je spojeno s významnými zdravotními riziky, což má vliv na funkci životně důležitých orgánů a zhoršení celkového zdraví člověka vedoucí ke snížené obranyschopnosti vůči řadě onemocnění (Loomis et al., 2013; Atkinson et al., 2014). Klíčovým krokem k eliminaci negativních vlivů ovzduší na zdraví člověka je především pochopení základních principů působení a závažnosti dopadů různých polutantů na naše zdraví. Řešení tohoto problému je nezbytným krokem v rozvoji a prosazování aktivní a úspěšné politiky životního prostředí vedoucí k trvalému snižování této pro člověka vysoce rizikové zátěže. Přes všechna již přijatá opatření, ale i z důvodů nepochopení výše rizika, ať již ze subjektivního proklamování možných ekonomických dopadů, či přímému vyhýbání se odpovědnosti za zdraví obyvatelstva, poslední studie naznačují, že stav vnějšího ovzduší stále představuje celosvětově významný problém pro lidské zdraví spojené se sníženou obranyschopností organismu a následně vyšší nemocností, což se negativně projevuje např. na průměrné délce života.

Předkládaná disertační práce, jejíž vypracování je založeno na 5 impaktovaných publikacích, vznikla v Oddělení genetické toxikologie a nanotoxikologie ÚEM AV ČR, v.v.i., které se dlouhodobě zabývá výzkumem vlivu znečištěného ovzduší na zdravotní stav populace. Životní prostředí, jmenovitě zvýšené množství kontaminantů v ovzduší a jejich vliv na zdraví člověka, je předmětem širokého vědeckého zájmu. Studie pojednávající o nepříznivých účincích polutantů na prenatální vývoj a dětskou populaci prokazují zvýšenou vnímavost jedinců k důsledkům expozice (Tab. 1).

**Tab. 1 - Seznam vybraných epidemiologických studií zabývajících se asociací mezi polutanty a biomarkery u matek a novorozenců**

Studie	Oblast	Materiál	Polutant	Biomarker
Cai et al., 2017	Wenzhou (Čína)	placenta (n=220)	PM10, SO <sub>2</sub> , NO <sub>2</sub>	Metylace DNA (quantitative bisulfite-PCR pyrosequencing)
Grevendonk et al., 2016	Genk (Belgie)	žilní krev matek (n=224) a pupečnicková krev (n=293)	PM10, PM2.5	Mitochondriální 8-OHdG (qPCR)
He et al., 2018	Zhengzhou (Čína)	žilní krev matek a pupeč. krev (n=527)	PM10, SO <sub>2</sub> , NO <sub>2</sub>	H19/DMR metylace (real time PCR)
Honkova et al., 2018	Karviná, ČB (Česko)	pupeč. krev (n=202)	k-PAU, PM2.5	Celogenomová analýza (qPCR)
Martens et al., 2017	Flanders (Belgie)	placenta (n=660), pupeč. krev (n=698)	PM2.5	délka telomer (qPCR)
Obolenskaya et al., 2010	Ukrajina, Bělorusko, východní Polsko	placenta (n=143)	Izotop Cs, B[a]P	Adukty DNA (CIA)
O'Callaghan-Gordo et al., 2015	Heraklion (Kréta)	lymfocyty z žilní krve matek (n=181) a z pupeč. krve (n=181)	PM2.5, PM10, NO <sub>2</sub>	Mikrojadérka (cytokinesis-block micronuclei assay)
Pedersen et al., 2009	Kodaň (Dánsko)	žilní krev matek (n=75) pupeč. krev (n=69)	PAU, NO <sub>2</sub>	- Adukty DNA (32P-postlabeling) - Mikrojadérka (cytokinesis - block micronuclei assay)
Rössner et al., 2011	Teplice, Prachatice (Česko)	placenta (n=891)	k-PAU, PM2.5	- 8oxodG (ELISA) - gen. polymorfismy (GoldenGate genotyping assay)
Rössnerova et al., 2011	Praha, ČB (Česko)	žilní krev matek a pupeč. krev (Praha: n=86; ČB: n=92)	k-PAU, PM2.5	mikrojadérka (Metafer 4)
Song et al., 2019	Wuhan (Čína)	pupeč. krev (n=743)	PM2.5, PM10, SO <sub>2</sub> , CO, NO <sub>2</sub>	délka telomer (qPCR)
Topinka et al., 2009	Praha (Česko)	žilní krev matek (n=79) pupečnick. krev (n=80)	PM2.5, k-PAU	- Kotinin (RIA) - Adukty DNA (32P- postlabeling)
Tsamou et al., 2018	Flanders (Belgie)	placenta (n=210)	PM2.5, NO <sub>2</sub>	exprese miRNA (qRT-PCR)
Whyatt et al., 1998	Krakow (Polsko)	pupeč. krev; placenta	PM10	- Adukty DNA (ELISA) - CYP1A1 (PCR-RFPL) - GSTM1 (Genotype -PCR)

Prvním z cílů předložené disertační práce je monitorování úrovně vnější expozice PAU adsorbovaných na povrch PM přítomných v ovzduší dvou lokalit lišících se stupněm znečištění. Hlavní pozornost byla věnována především jemným prachovým částicím PM<sub>2.5</sub> a na ně navázaných karcinogenním PAU, jako je např. benzo[a]pyren (B[a]P), jež vzhledem k jejich výskytu v životním prostředí představují biologicky nejvýznamnější rizikové faktory s mutagenními a karcinogenními účinky. Tyto látky mohou snadno vstupovat a být distribuovány v lidském organismu, a jejich interakce s buňkami a buněčnými komponentami jsou pak spjaty s celou řadou negativních zdravotních dopadů (Oberdörster et al., 2005). Každodenní expozici těmto polutantům je vystavena zejména dýchací a trávicí soustava. Zdrojem kontaminace v potravinách jsou především technologické procesy při jejich zpracování/úpravě (pečení, grilování, uzení, smažení) (Singh et al., 2020).

Dalším cílem práce je vyhodnotit biologické účinky sledovaných polutantů na vybrané skupiny novorozenců a jejich matek žijících v Karvině a v Českých Budějovicích (ČB). Dopad expozice PAU na lidský organismus lze analyzovat pomocí molekulárně epidemiologických metod, které umožňují změřit hladiny biomarkerů, tzn. měřitelných biologických parametrů (Sram and Binkova, 2000). V souvislosti s expozicí PAU může docházet k nadměrné tvorbě ROS a následně k indukci oxidačního stresu v organismu. ROS reagují s řadou biologicky významných molekul, včetně DNA a lipidů. Analýza takto modifikovaných makromolekul (biomarkerů) by měla být vhodným přístupem v rámci preventivních opatření u populací žijících ve znečištěných oblastech, protože jejich sledováním můžeme získat informace, např. o poškození genetického materiálu (DNA), nebo dalších makromolekul, v dostatečném časovém předstihu před patrnými prvními klinickými změnami.

Stěžejním cílem této disertační práce je tedy ověřit hypotézu, že vlivem znečištěného ovzduší dojde ke změnám na makromolekulární úrovni v průběhu prenatálního vývoje dítěte, a odpovědět tak na otázky, zda expozice kontaminantům představují významný prediktor pro zvýšené hladiny biomarkerů oxidačního poškození makromolekul.

## **1.1 Prachové částice (PM)**

Jak již bylo zmíněno, PM jsou významnou složkou znečištěného ovzduší. Člověk je vystaven působení PM z ovzduší po celou dobu svého života. PM jsou součástí atmosférického aerosolu a vznikají spalováním organické hmoty. Mezi přírodní zdroje těchto

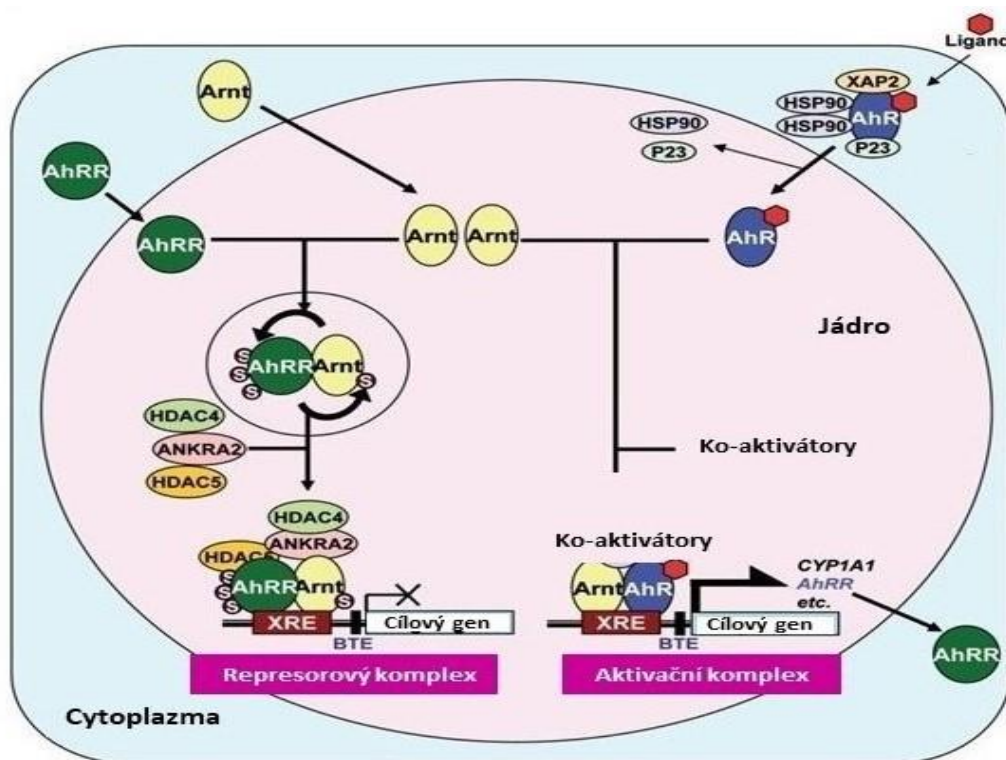


polutantů patří požáry a vulkány (Heinrich and Slama, 2007). Lidskou činností došlo k výraznému navýšení jejich množství v prostředí v souvislosti s průmyslovými procesy, nadměrnou dopravou nebo lokálními topeništi, která spalují tuhá paliva. Negativní působení PM na člověka souvisí s jejich koncentrací, velikostí, tvarem, chemickým složením samotných částic, stejně tak jako zastoupením organických a anorganických látek vázaných na jejich povrch, což je předurčeno konkrétním zdrojem emisí a chemickými procesy probíhajícími v ovzduší. PM v atmosféře přetrvávají poměrně dlouho a jejich distribuce je závislá na geografických a klimatických podmínkách (Pöschl, 2005). International Agency for Research on Cancer (IARC) považuje PM za prokázaný lidský karcinogen a doporučuje používat koncentrace PM<sub>2.5</sub> jako indikátor rizika pro lidské zdraví (viz kapitola 4.2). PM<sub>2.5</sub> jsou součástí jemné frakce atmosférického aerosolu a jsou nejčastěji studovanými prachovými částicemi. Podle velikosti rozlišujeme další frakce, např. PM<sub>10</sub> (částice menší než 10 µm), nebo ultrajemnou frakci PM<sub>0.1</sub> (částice menší než 100 nm) (Murr and Garza, 2009). PM<sub>2.5</sub> a PM<sub>0.1</sub> mohou pronikat dýchacími cestami hluboko do plicního parenchymu a intersticia, kde dochází k jejich depozici (Hinds, 1999). Jejich malé rozměry jim usnadňují i přechod do krevního oběhu a šíření do dalších potenciálně citlivých orgánů, např. kostní dřeně a lymfatických uzlin (Oberdörster et al., 2005). Obrana organismu v dolních cestách respiračního systému vůči proniknuvším PM je zprostředkována nespecifickou imunitní odpovědí, jíž se účastní fagocytující alveolární makrofágy. V průběhu eliminace PM prostřednictvím makrofágů dochází k uvolňování prozánětlivých i dalších mediátorů a k tvorbě ROS. Ty jsou pak spojeny s oxidačním stresem v plicích (Valavanidis et al., 2013). Prozánětlivé působení PM je dále asociováno s astmatem, tj. chronickým zánětlivým onemocněním postihujícím dolní cesty dýchací (Li et al., 2003). Produkce ROS vede k poškození DNA a následně karcinogenezi. Vysoké koncentrace PM<sub>2.5</sub> v ovzduší též způsobují další zdravotní komplikace, např. zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění (Lee et al., 2014). Předpokládá se, že prozánětlivé mediátory uvolněné při fagocytóze PM v plicních alveolech se mohou posléze dostávat do krevního řečiště a způsobovat systémový zánět a oxidační stres (Mills et al., 2009). V krevním oběhu pak ovlivňují mimo jiné i shlukování trombocytů a hemokoagulaci, čímž zvyšují riziko vzniku trombózy s následným infarktem myokardu (Shebuski and Kilgore, 2002). PM rovněž zvyšují pravděpodobnost vzniku aterosklerózy (Araujo and Nel, 2009). Účinky prozánětlivých mediátorů, jež byly uvolněny při fagocytóze v alveolech a jež se posléze dostaly do krevního řečiště, se za specifických podmínek projevují i v centrální nervové soustavě (CNS) a jsou asociovány s neurodegenerativními onemocněními (Block and Calderon-Garcidueñas, 2009). Ve

studiiích na hlodavcích bylo zjištěno, že ultrajemné částice se mohou dostávat z čichového ústrojí přímo do CNS prostřednictvím čichových sensorických neuronů propojujících svými axony epitel dutiny nosní s bulbus olfactorius, jež je umístěn v dutině lebeční nad lamina cribrosa kosti čichové. U takto exponovaných hlodavců pak byly detekovány zvýšené hladiny zánětlivých markerů v CNS (Shou et al., 2019). V případě vlivu PM na výsledky těhotenství se opět předpokládá významná role systémového zánětu. Při maternální expozici PM<sub>2.5</sub> v průběhu těhotenství může zánět ovlivnit růst, vývoj a funkce placenty (van den Hooven et al., 2012). Studie na potkanech naznačují, že expozice PM<sub>2.5</sub> během těhotenství může vyvolat placentární zánět (de Melo et al., 2015). Expozice PM je prostřednictvím tvorby ROS asociována i s neplodností (Ruder et al., 2008). Genotoxický účinek PM<sub>2.5</sub> je navíc zvýrazněn jejich velkým specifickým povrchem adsorbujícím významná množství toxických látek, včetně PAU a jejich derivátů (Binkova and Sram, 2004). Na povrch PM mohou být adsorbovány i bakterie a viry (Shou et al., 2019).

## 1.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)

PAU jsou tvořeny dvěma nebo více kondenzovanými benzenovými jádry v charakteristickém uspořádání, které předurčuje jejich stabilitu. Benzenová jádra mohou podléhat elektrofilní substituci za vzniku alkyl-, amino-, nitro-, halogen- a sulfo- derivátů. Počet a typ uspořádání jader nebo poloha substituce predikují strukturní rozmanitost této skupiny látek, jež je za přispění dalších faktorů příčinou rozdílné biologické aktivity PAU a jejich derivátů. PAU patří mezi ligandy vážící se na cytosolický arylhydrokarbonový receptor (AhR), jež je v komplexu s několika chaperony. Z Obr. 1 je patrné, že interakcí PAU s AhR dochází k uvolnění dalších proteinů z komplexu, jež má za následek translokaci komplexu PAU – AhR do jádra a následný vznik heterodimeru tvořeného komplexem PAU – AhR a nukleárním translokačním proteinem (ARNT). Heterodimer pak interaguje s DNA prostřednictvím faktoru xenobiotic response element (XRE) umístěného v promotorové oblasti genů (Fujii-Kuriyama and Kawajiri, 2010), jež kodují biotransformační enzymy uplatňující se při detoxifikaci a bioaktivaci PAU (Fujii-Kuriyama and Mimura, 2005). AhR ovlivňuje expresi dalších genů regulujících rozmanité procesy v buňce, jako např. buněčnou



**Obr. 1 – Mechanismy regulace AhR dependentních genů např. *CYP1A1*** (Toto je neoficiální úprava obrázku, jehož originál se nalézá v publikaci s DOI: [10.2183/pjab.86.40](https://doi.org/10.2183/pjab.86.40). Pro nekomerční výzkumné a vzdělávací účely je možné obrázek použít.)

proliferaci, diferenciaci, senescenci nebo apoptózu (Bock and Kohle 2006). Dlouhodobá expozice PAU způsobuje trvalou aktivaci AhR s možným důsledkem narušení signálních drah (TGF- $\beta$ , Wnt), jež jsou asociovány se vznikem nádorů (Marlowe and Puga, 2005; Yao and Mishra et al., 2009).

Metabolická aktivace PAU prostřednictvím AhR zahrnuje indukci exprese enzymů podílejících se na I. fázi (cytochrom P450 (CYP) monooxygenáz, např. CYP1A1/2 a 1B1 a 3A4) a II. fáze biotransformace (glutathion S-transferázy a dalších). V I. fázi působením CYP vznikají z obecně lipofilních PAU reaktivnější intermediáty, jež v II. fázi mohou podstupovat např. konjugaci s glutathionem katalyzovanou glutathion-S-transferasou za účelem zvýšení rozpustnosti hydrofobních PAU a jejich následné snazší exkrece z organismu (Xu et al., 2005). Vzniklé reaktivní metabolity I. fáze však nemusejí podléhat pouze konjugaci, ale mohou se kovalentně vázat např. na DNA a působit tak genotoxickým účinkem prostřednictvím vzniku aduktů DNA (Dipple, 1995; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004). Enzymy CYP primárně katalyzují epoxidaci PAU. Vzniklý epoxid je následně hydrolyzován epoxid hydrolázou na dihydrodioly a následně diolepoxydy, které se díky

specifické struktury, jejíž charakteristickou součástí je tzv. "bay" nebo "fjord" oblast, snadno váží zejména na purinové báze (Lin et al., 2001). Vzniklý adukt DNA svou strukturou pak sféricky znemožňuje působení enzymů II. fáze biotransformace a nedojde tak k detoxifikaci konjugací reaktivního intermediátu (Baird et al., 2005). Adukty indukované PAU jsou z DNA odstraňovány nukleotidovou excisní reparací (NER). Pokud nedojde k jejich odstranění, mohou při replikaci DNA v oblasti tumor supresorových genů a onkogenů vznikat bodové mutace, jejichž kumulace může vést až ke vzniku nádorového onemocnění (Godschalk et al., 2003).

Řada PAU vykazuje, nebo se u nich předpokládají, karcinogenní a mutagenní účinky (Lewtas and Gallagher, 1990), které mohou ovlivňovat zdravotní stav populace. IARC kategorizovala sloučeniny dle jejich rakovinotvorných účinků u člověka do několika skupin: 1, 2A, 2B, 3 a 4 (Cogliano et al., 2011). Na základě této klasifikace byl B[a]P zařazen do skupiny 1 (prokázaný lidský karcinogen) (IARC, 2012). B[a]P je při hodnocení lidské expozice znečištěnému ovzduší nejčastěji sledovaným PAU. Jeho doporučená roční průměrná koncentrace 1 ng/m<sup>3</sup> v ovzduší je považována za hraniční dávku (WHO, 2000), přičemž jsou navrhovány i nižší limity z důvodu neexistující bezpečné koncentrace (Boström et al., 2002). Mnoho dalších PAU bylo zařazeno do skupiny 2A, jež zahrnuje sloučeniny, jejichž karcinogenní potenciál byl potvrzen na zvířecích modelech, a jsou tak pravděpodobnými lidskými karcinogeny. Do skupiny 2B byly zařazeny sloučeniny, u nichž nebyly rakovinotvorné účinky zatím dostatečně jasně prokázány ani u zvířecích modelů. Sloučeniny ze skupiny 3 a 4 jsou buď v současnosti stále neklasifikované, anebo pravděpodobně nejsou lidskými karcinogeny. Kromě výše zmiňované klasifikace PAU dle IARC je rovněž hojně používána i klasifikace dle US Environmental Protection Agency (US EPA), která definovala skupinu 16 konkrétních PAU označovaných 16 US EPA PAU, jež jsou považovány za nejčastější kontaminanty životního prostředí, a jež jsou spojeny s vážnými zdravotními problémy (Pulkrabova et al., 2016). Jednou z mnoha možností odhadu relativní karcinogenní potence PAU je stanovení toxického ekvivalenčního faktoru (TEF), kterým je porovnáván účinek daného PAU s účinkem referenčního toxikantu B[a]P (Nisbet and Lagoy, 1992). B[a]P byl vybrán za referenční sloučeninu, protože je prokázaným lidským karcinogenem a jeho toxické účinky jsou dobře charakterizovány. TEF pro B[a]P je vyjádřen hodnotou jedna. Individuální příspěvek jednotlivých PAU vyskytujících se a podílejících se různou měrou na celkové karcinogenitě směsi lze pak stanovit prostřednictvím hodnoty TEC (Toxicity Equivalent Concentration) (Hussar et al., 2012).

Jistou komplikací při hodnocení toxicity je skutečnost, že PAU nacházející se ve směsích mohou mezi sebou interagovat a výsledná biologická aktivita směsi tak nemusí být dána součtem jejich účinků. Mezi jednotlivými PAU může docházet k interakcím, jež mohou mít synergický, antagonistický anebo aditivní účinek (Binkova and Sram, 2004). Nic to ale nemění na faktu, že PAU jsou v důsledku toxicity potenciální hrozbou pro lidské zdraví. Tuto skutečnost potvrzuje např. i Agentura pro toxické látky a registr nemocí (ATDSR), jež v roce 2019 zařadila PAU na deváté místo v Priority List of Hazardous Substances (ATSDR, 2019).

V ovzduší jsou PAU adsorbované na prachové částice, a většinou jsou součástí komplexní směsi organických látek. Identifikací jednotlivých PAU v takové směsi pak lze získat poznatky o charakteru emisního zdroje. Mezi významné zdroje PAU patří nejen průmyslová výroba, automobilová doprava, emise z domácího topení, ale i požáry a přírodní katastrofy. Dalším zdrojem je např. tabákový kouř, jenž je prokázaným lidským karcinogenem a byl zařazen do skupiny 1 (IARC, 2012), a některé postupy při tepelné úpravě potravin, např. grilování, opékání na ohni, uzení atd. Společným znakem zmíněných zdrojů je proces nedokonalého spalování, ke kterému dochází při hoření směsi organických látek za nedostatečného přístupu vzduchu (Ravindra et al., 2008).

PAU se do organismu dostávají hlavně prostřednictvím kontaminované stravy a inhalací znečištěného ovzduší. Ingestce kontaminované potravy pravděpodobně představuje většinou cestu příjmu, ale v lokalitách s vysokým stupněm kontaminace PAU v ovzduší je vstup respirační cestou dominantní (Pulkrabova et al., 2016 - příloha 2; Polachova et al., 2020). Byl rovněž popsán i transdermální vstup PAU do lidského organismu. Jedná se především o profesionální expozice některým PAU např. při výrobě ohnivzdorného kamene (Gündel et al., 2000) nebo expozice PAU u dermatologických pacientů, k jejichž léčbě se používají prostředky obsahující uhelný dehet (Jongeneelen et al., 1986). V souvislosti s touto disertační prací je nutné zmínit, že může docházet k prenatální i postnatální expozici dítěte prostřednictvím exponované matky. Míra takové expozice se pak odvíjí nejen od trvalého pobytu matky ve znečištěném prostředí, ale i od jejího životního stylu (strava, kouření). Tento typ expozice může být podmíněn, jak schopností PAU propustovat placentou (Manchester et al., 1992), tak přítomností PAU v mateřském mléce exponovaných matek (Pulkrabova et al., 2016 - příloha 2). Cílové místo distribuce PAU v organismu je podmíněno typem expozice (místem vstupu a dobou trvání) a mírou lipofilního charakteru jednotlivých PAU. Jsou tedy rozdíly v rychlosti vstřebávání PAU v plicní tkáni, sliznici zažívacího ústrojí

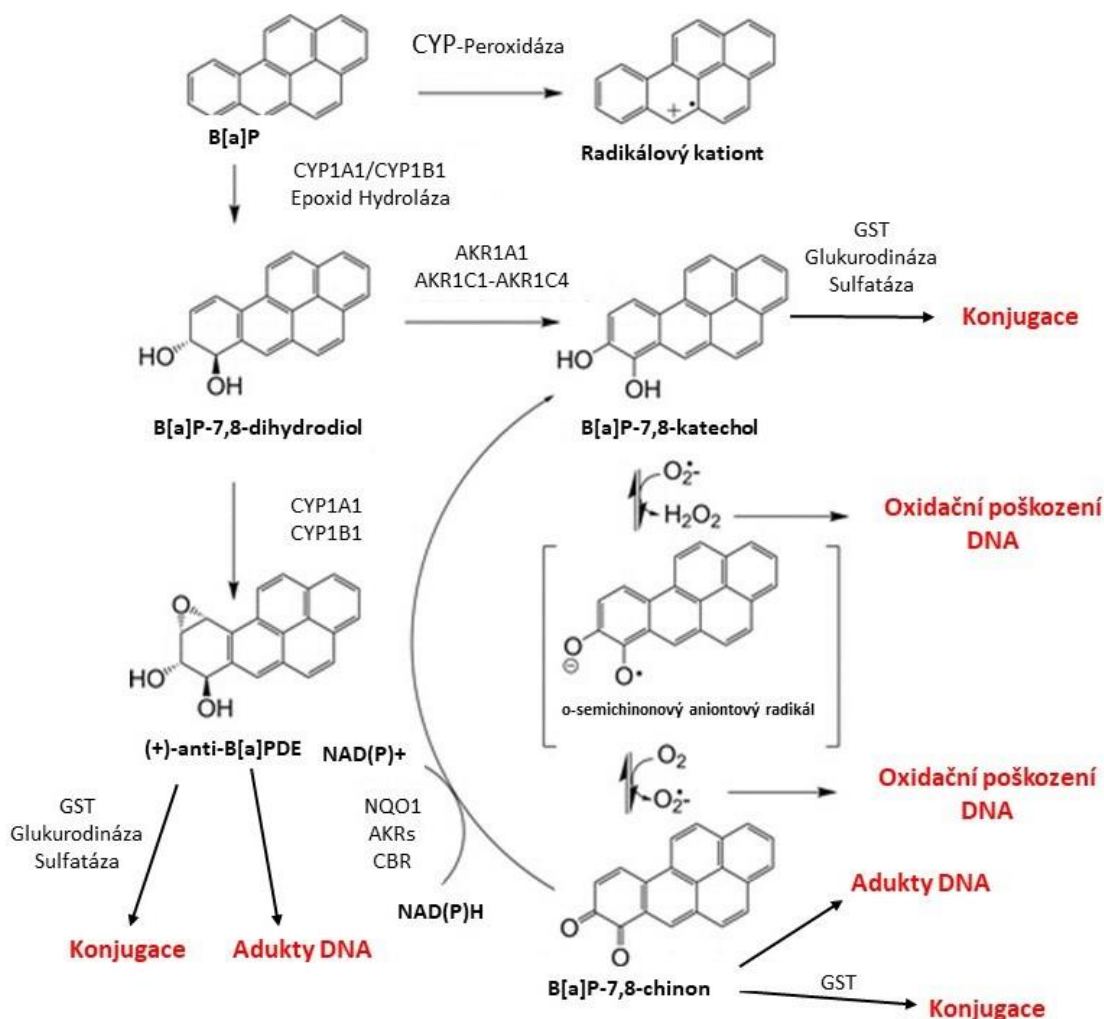
a kůži. Po vstřebání vstupují PAU do krevního oběhu, odkud jsou rychle distribuovány téměř do všech tkání, přičemž je upřednostňována distribuce do tkání s vyšším obsahem tukových látek (IARC, 2010). Z důvodu rychle proběhnuvší metabolické aktivace většinou nedochází k jejich hromadění v buňkách, avšak při nadměrné dlouhodobé expozici může docházet k jejich kumulaci v játrech a tukových tkáních (Modica et al., 1983). PAU a jejich metabolity jsou z organismu nejčastěji vylučovány játry prostřednictvím žluče do tenkého střeva, přes tlusté střevo do stolice. Další možností exkrece je moč, do které se dostávají přes ledviny (WHO, 2010).

### **1.2.1 Aduktý DNA**

Hladiny aduktů DNA vypovídají o úrovni environmentální expozice PAU a jsou považovány za biomarkery biologicky účinné dávky v souvislosti s karcinogenezí. Jsou tedy jakýmsi spojovacím článkem mezi prvotní expozicí organismu karcinogenu, jeho následnou metabolickou aktivací v organismu, navázáním na DNA a potenciálním karcinogenním účinkem, jenž se může projevit až poté, jestliže dojde k nahromadění aduktů DNA z důvodu nadměrné expozice a vyčerpání reparační kapacity NER. Samotná analýza aduktů DNA nám poskytuje informaci o množství aduktů DNA, které v důsledku nedostačující reparační kapacity nebyly opraveny. Mezi stejně exponovanými jedinci mohou existovat významné rozdíly v reaktivitě PAU na DNA, a tím i rozdíly v úrovni buněčné odpovědi. Důvodem jsou odlišné individuální genetické (metabolické genotypy, DNA reparační genotypy, nebo genová exprese) a socioekonomické faktory (životní styl: stres, kouření, strava). Díky těmto skutečnostem pak může být persistence aduktů DNA v organismu u jednotlivců variabilní, přičemž se může lišit v rozmezí dnů až měsíců. Analýza aduktů DNA (např. celkových aduktů DNA nebo B[a]P „like“ aduktů DNA) u zdravých osob např. metodou <sup>32</sup>P-postlabelingu nebo imunochemickou metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je tedy vhodným přístupem pro prediktivní posouzení karcinogenního rizika v dostatečném časovém předstihu před klinickou manifestací onemocnění (Sram et al., 2007).

### 1.3 Oxidační stres

Dalším z mechanismů metabolické aktivace PAU, při němž se uplatňuje působení CYP a peroxidázy, je tvorba kationtového radikálu. Z hlediska indukce oxidačního poškození je však důležitý mechanismus, jež vede k metabolické aktivaci PAU za tvorby o-chinonů (Obr. 2). Při této reakci se dihydrodioly vzniklé působením CYP, stávají substrátem pro aldo-ketoreduktázy (AKRs), přičemž jsou oxidovány na ketoly. Ketoly jsou přeměněny na katecholy, které jsou neenzymaticky oxidovány za vzniku o-semichinonových aniontových radikálů a následně velmi reaktivních o-chinonů (Penning, 2014) Tato redoxní reakce je spjata se vznikem ROS, které mohou atakovat makromolekuly (DNA, lipidy, proteiny), což může vést nejen k jejich oxidačnímu poškození.



**Obr. 2 - Metabolická aktivace a detoxifikace B[a]P** (Toto je neoficiální úprava obrázku, jehož originál se nalézá v ACS publikaci s DOI: [10.1021/tx500298n](https://doi.org/10.1021/tx500298n). ACS neschválil obsah této úpravy ani kontext jejího použití. Pro nekomerční výzkumné a vzdělávací účely je možné obrázek použít.)

Oxidační stres vzniká porušením rovnováhy prooxidantů a antioxidantů ve vnitřním prostředí buňky, tzn. zvýšením hladiny intracelulárních reaktivních forem kyslíku (ROS) a snížením schopnosti biologického systému detoxikovat reaktivní intermediáty, anebo snížením hladiny antioxidantů (Pollack and Leeuwenburgh, 1999). ROS běžně vznikají během přirozeného buněčného metabolismu v aerobních organismech, ale i vlivem exogenních faktorů, mezi které patří i působení životního prostředí a životní styl. Jedná se především o hydroxylový radikál ( $\text{OH}\cdot$ ) a superoxidový anion ( $\text{O}_2^-\cdot$ ), pro něž je charakteristická vysoká reaktivita z důvodu přítomnosti nespárovaného elektronu v jejich struktuře (Halliwell and Gutteridge, 2015). Mezi reaktivní formy kyslíku řadíme i neradikálový peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Za normálních podmínek je buňka schopna vypořádat se s oxidačním stresem bez následků prostřednictvím antioxidantních mechanismů, jež udržují tvorbu ROS na fyziologické úrovni (Sies et al., 2017). Existují tři typy antioxidantní odpovědi. Složky prvního typu (např. transferrin, ferritin, albumin, ceruloplasmin) zajišťují eliminaci volných iontů přechodných kovů potřebných k tvorbě ROS. Složky druhého antioxidantního typu zachytávají a odstraňují již vytvořené ROS. Podle mechanismu působení jsou rozdělovány na tzv. scavengery, trappery a quencherly. Dále mohou být kategorizovány podle biologické funkce, a to na antioxidantní enzymy (superoxiddismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza aj.) a na nízkomolekulární neenzymatické antioxidantní molekuly (kyselina askorbová, kyselina močová, glutathion, tokoferoly, karotenoidy, ubiquinon, flavonoidy aj.), jež se do organismu většinou dostávají konzumací ovoce a zeleniny. Mezi složky třetího typu, jež odstraňují/opravují biomolekuly modifikované oxidačním stresem, patří enzymy uplatňující se při reparaci oxidačního poškození DNA, lipofilní enzymy a proteázy. Účinný antioxidant by měl (i) zachytávat a odstraňovat volné radikály; (ii) mít tzv. chelatační schopnost za účelem navázání iontů přechodných kovů; (iii) interagovat s jinými antioxidanty v rámci celkového antioxidantního systému; (iv) pozitivně ovlivňovat expresi relevantních genů; (v) být snadno absorbován; (vi) mít fyziologické zastoupení v tkáních a v buněčných tekutinách; (vii) být schopen fungovat jak v hydrofilním cytosolu, tak v hydrofobním prostředí buněčných membrán (Valko et al., 2006).

Mezi hlavní enzymatické antioxidanty patří superoxiddismutáza (SOD), která katalyzuje přeměnu  $\text{O}_2^-\cdot$  na  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a kataláza (CAT) a glutathionperoxidáza (GPX), jež katalyzují přeměnu  $\text{H}_2\text{O}_2$  na vodu. Polymorfismy v genech kódujících tyto antioxidantní enzymy, ale i v genech kódujících další enzymy asociované s oxidačním stresem (např. enzymy CYP, enzym glutathion S-transferáza, enzym 8-oxoguanin DNA glykosyláza, který



se podílí na odstranění 8-oxoguaninu z DNA, aj.) mohou mít vliv na obrannou reakci vůči expozici PAU, působení ROS v organismu a v konečném důsledku na zdraví jedince. Genetické polymorfismy byly předmětem zájmu v následujících studiích: (i) v genu *SOD* (Rosenblum et al., 1996); (ii) v genu *CAT* (Kessel et al., 2002); (iii) v genu *OGGI* (Lee et al., 2005). Studie prokázaly, že některé polymorfismy ovlivňují enzymovou aktivitu, a tím i míru oxidačního stresu. Ve studiích Šrám et al. (2006) a Topinka et al. (1997) byl pozorován efekt polymorfismu v genech *CYP1A1* a *GSTM1* na porodní hmotnost. Genetické polymorfismy jsou považovány za tzv. biomarkery vnímavosti. Vnílavost každého jedince k expozici toxické látky je tedy podmíněna genetickou predispozicí. Při srovnatelné expozici může tak být u různých jedinců v cílové tkáni odlišné množství toxikantu, a tím i odlišná úroveň odezvy na oxidační stres (Sram et al., 2007).

Nízkomolekulární neenzymatické antioxidanty lze rozdělit podle místa působení na látky působící v hydrofilním prostředí (např. kyselina askorbová, kyselina močová, glutathion aj.), na antioxidanty lipofilního prostředí (např. tokoferoly, karotenoidy, ubiquinon, flavonoidy aj.) a na sloučeniny působící jak v hydrofilním prostředí cytosolu, tak v lipofilním prostoru membrán (kyselina lipoová). Součástí antioxidantního systému jsou rovněž enzymy podílející se na redukci oxidovaných forem nízkomolekulárních antioxidantů (GSH reduktáza, dehydroaskorbát reduktáza), nebo enzymy odpovědné za udržování proteinových thiolů (thioredoxin reduktáza), stejně jako enzymy udržující redoxní stav buňky, např. glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, která regeneruje NADPH (Beckman and Ames, 1998).

Nadměrný oxidační stres je typický pro období těhotenství, které je z důvodu vyšších nároků na energii charakterizováno zvýšenou metabolickou aktivitou placentárních mitochondrií, a tím i vyšší produkcí ROS (Wisdom et al., 1991; Myatt and Cui, 2004). Plod je zásobován prostřednictvím pupečníku a placenty, která je zdrojem ROS vzniklých v důsledku působení následujících enzymatických drah: (i) elektronového transportního řetězce v mitochondriích; (ii) tvorby superoxidu v podmínkách hypoxie působením xanthin oxidoreduktázy; (iii) vzniku ROS v placentárních makrofázích působením NADPH oxidázy; (iv) produkce peroxynitritu v makrofázích placenty účinkem nitric oxid syntázy; (v) působení hem oxygenázy (Myatt and Cui, 2004). Při nadměrné produkci ROS dochází nejen k přímému poškození a s ním souvisejícím změnám fyziologických vlastností buněčných složek, ale i k iniciaci celé řady procesů. V případě (i) peroxidace membránových lipidů se jedná např. o změny ve fluiditě biologických membrán, inaktivaci membránových receptorů

(ii) oxidačního poškození proteinů dochází např. ke změnám v enzymové aktivitě, v jejich signální funkci aj.; (iii) oxidačního poškození DNA může být indukována mutageneze, karcinogeneze (Stipek et al., 2000). ROS dále plní funkci signálních molekul (tzv. intracelulárních posílů) aktivujících transkripci genů, včetně těch, které kodují transkripční faktory. Aktivace může proběhnout přímo (např. NF- $\kappa$ B a AP-1, jež přímo interagují se specifickými DNA motivy na promotorech genů kódujících prozánětlivé cytokiny), nebo nepřímo prostřednictvím MAPK kaskád indukujících transkripci dalších cílových genů (Scandalios, 2005). Příklady dalších transkripčních faktorů aktivovaných ROS jsou uvedeny v Tab. 2.

Lze tedy shrnout, že oxidační stres vede k poškození buněčných makromolekul a následně buněk, což může vyústit až v jejich zánik nekrózou, nebo apoptózou. To v konečném důsledku může vést ke vzniku řady onemocnění. V perinatálním období bývá plod vystaven nadměrné produkci ROS způsobené hypoxií, zánětem, infekcí, nebo jinými vlivy (Marseglia et al., 2014). Tyto změny mohou vést až k předčasným porodům, porodům s nízkou porodní váhou (LBW) anebo k nitroděložní růstové retardaci (IUGR) (Dejmek et al. 2000; Choi et al., 2008). Novorozenci s IUGR nebo s LBW mohou mít opožděný psychický vývoj (van Wassenaer, 2005), narušené plicní funkce (Lipsett et al., 2006), zvýšený výskyt astmatických symptomů v dětství (Nepomnyaschy and Reichman 2006), nebo narušený imunitní systém (Sparfel et al. 2010). Negativní důsledky indukované v těhotenství se mohou projevit až ve vyšším středním věku ve formě aterosklerózy, hypertenze, diabetes mellitus II. typu (Martin-Gronert and Ozanne, 2007). Samotný přechod z intrauterinního hypoxického prostředí do extrauterinního novorozeneckého prostředí, které obsahuje až 5x vyšší množství kyslíku, je rovněž spjat se zvýšenou tvorbou ROS (Gitto et al., 2009). Adaptace novorozenců na nové podmínky též souvisí se zvýšenou náchylností k oxidačnímu stresu, jež je podmíněna nejen působením vysokých koncentrací kyslíku na novorozenecký organismus, ale i sníženou kapacitou nezralé antioxidační obrany a vysokou koncentrací volného železa, jež v organismu Fentonovou reakcí katalyzuje redukci  $H_2O_2$  za vzniku vysoce toxického hydroxylového radikálu (Perrone et al., 2019). V závěru tohoto odstavce je nutné opět připomenout, že celková expozice jedince působení ROS je multifaktoriální záležitostí, která je ovlivňována nejen znečištěným ovzduším, ale i genetickou predispozicí daného jedince a socio-ekonomickými faktory.

**Tab. 2 - Příklady transkripčních faktorů aktivovaných signálními ROS** (převzato z článku Dennerly, 2007; nakladatelství Wiley – Liss, Inc.; <https://doi.org/10.1002/bdrc.20098>)

Transkripční faktor	symbol	induktor	Vliv
<b>Hypoxia inducible factor</b>	HIF – 1	hypoxie	angiogeneze, erytropoéza
<b>Nuclear factor - <math>\kappa</math>B</b>	NF- $\kappa$ B	oxidační stres	apoptóza, proliferace
<b>Activator protein 1</b>	AP-1	oxidační stres	apoptóza, antioxidační geny
<b>Redox effector factor – 1</b>	Ref-1	oxidační stres	reparace DNA
<b>Nuclear factor-E2 related factor 1</b>	Nrf-1	oxidační stres	apoptóza, redoxní rovnováha, antioxidační geny
<b>Wingless and integration site for mouse mammary tumor virus</b>	Wnt	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	organogeneze

Existuje několik typů metod stanovení prooxidačních a antioxidačních změn v organismu. Patří mezi ně přímé měření reaktivních forem kyslíku, hodnocení hladin antioxidantů a měření buněčné redoxní rovnováhy, a stanovení modifikovaných makromolekul vzniklých působením oxidačního stresu. Společným znakem prvních tří zmiňovaných typů je, že nejsou vhodné pro analýzy v tekutinách lidského těla. ROS jsou nestabilní a mají krátký poločas rozpadu. Antioxidanty jsou většinou lokalizovány uvnitř buněk a jejich koncentrace v plazmě musí být posuzovány obezřetně. Měřením buněčné redoxní rovnováhy se stanovuje poměr redoxních párů, např. redukovaný a oxidovaný glutathion (tj. GSH / GSSG). U této metody bývá rovněž problematická rozdílná koncentrace glutathionu mezi buňkou, kde je mnohonásobně vyšší, a extracelulárním prostředím. Měření modifikovaných makromolekul se používá především jako měřítko schopnosti organismu se s oxidačním stresem vyrovnat. Toto stanovení je často prováděno v tělních tekutinách (moč, plazma). Vysoké koncentrace modifikovaných makromolekul (nukleových kyselin, lipidů, proteinů) jsou pak ukazatelem zvýšeného oxidačního stresu, jenž indukuje oxidační poškození (Larsen et al., 2019). Dalším typem měření oxidačního stresu je stanovení změn exprese genů kódujících např. antioxidační enzymy.

Nejzávažnějším důsledkem oxidačního stresu je poškození DNA, které může vést ke vzniku oxidovaných bází, abazických míst, jedno- nebo dvou-řetězcových zlomů v DNA.

Proces změny genetického materiálu může vyústit v transformaci normální buňky v nádorovou (Stiborova and Miksanova, 1999). Dusíkaté báze modifikované působením ROS jsou opravovány většinou prostřednictvím báze excisní reparace (BER). Zlomy řetězců DNA jsou považovány za jeden z nejnebezpečnějších typů poškození DNA. Mohou indukovat apoptózu, inaktivovat geny nebo vést ke vzniku chromozomálních aberací (Barzilai and Yamamoto, 2004). Oprava zlomů v DNA je uskutečňována jednak prostřednictvím nehomologického spojování konců molekul (NHEJ), anebo homologickou rekombinační reparační dráhou (HRR) (Lieber et al., 2006; Natarajan and Palitti, 2008).

Oxidační poškození dalších makromolekul má rovněž pro organismus negativní důsledky. Peroxidace lipidů vyvolává vznik reaktivních intermediátů, které mohou oxidovat další molekuly (proteiny, DNA) v buňkách (Niki, 2009), a tím přispívají k šíření oxidačního poškození. Oxidace proteinů poškozuje jak postranní řetězce aminokyselin, tak proteinovou kostru, a narušuje jejich stavební a enzymatickou funkci. Zatímco v závislosti na typu a rozsahu poškození DNA se aktivují různé opravné mechanismy, jejichž úlohou je identifikovat a eliminovat poškození v molekule DNA, oprava oxidovaných lipidů a proteinů spočívá v jejich rozpoznání, degradování a v následné „*de novo*“ syntéze (Davies et al., 2000). Oxidační stres kromě poškození makromolekul způsobuje i změny v genové expresi, která ovlivňuje chování celé buňky (např. buněčný cyklus, proliferaci, diferenciaci, apoptózu atd.) (Bock and Kohle 2006).

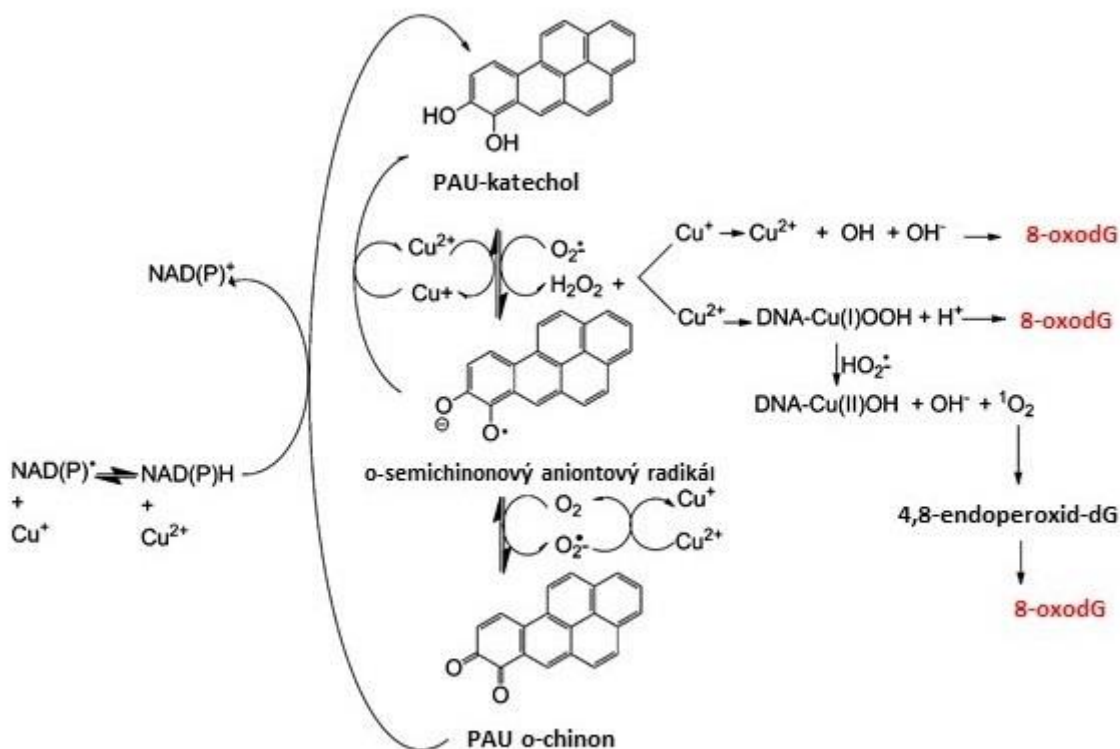
### **1.3.1 Biomarkery oxidačního poškození DNA**

Kovalentní vazba reaktivních meziproductů biotransformace PAU na DNA je jen jedním z mnoha typů poškození DNA. Působením vnějších a vnitřních faktorů může docházet např. k chybnému párování bází, replikačním chybám, ztrátám bází a oxidaci (Christmann et al., 2003). Procesem oxidace, tzn. působením ROS na DNA, dochází ke vzniku široké škály oxidovaných nukleosidů a bází: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8-oxodG), 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoGua), thymin glykol (Tg), thymidin glykol (dTg) a 5-hydroxymethyluracil (5-OHmU) (Loft and Poulsen, 1999). Mohou být též indukovány i jedno- nebo dvouřetězcové zlomy DNA, anebo tvorba DNA-proteinových křížových vazeb (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012), které zabraňují rozvinutí chromatinu, replikaci a v konečném důsledku transkripci. Oxidační poškození DNA se pak může projevat apoptózou, mutagenezí, karcinogenezí a urychlením procesu stárnutí

(Evans et al., 2004; Kryston et al., 2011; Halliwell and Gutteridge, 2015). Nejčastěji analyzovanou oxidovanou bází v moči je 8-oxoGua, a především pak její deoxyribonukleosidový ekvivalent 8-oxodG (Barregard et al., 2013). Jejich množství se v DNA zvyšuje přímou oxidací guaninu, jež má mezi bázemi nejnižší redoxní potenciál a je nejlepším donorem elektronů (Poulsen et al., 2014). Guanin je oxidován ROS vzniklými v důsledku o-chinonového mechanismu za přítomnosti dalších složek (NADPH a iontů mědi) redoxního cyklického systému. Dochází ke vzniku komplexu DNA - Cu (I) OOH, jehož další oxidací vzniká singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ).  $^1\text{O}_2$  reaguje s guaninem za vzniku 4,8-endoperoxidu-dG, jež je prekurzorem pro vznik 8-oxodG (Penning, 2014). Proces oxidačního poškození DNA je schématicky znázorněn na Obr. 3. Nedojde-li k včasné identifikaci a opravě 8-oxoGua v DNA prostřednictvím BER, tak dochází k jeho nekomplementárnímu párování s adeninem druhého řetězce a k indukci transverzí GC-TA a AT-GC. Tato změna je v následujícím replikačním cyklu uložena a může být počátkem karcinogenního onemocnění (Weiss et al., 2005). BER je primární opravný proces pro odstranění genomického 8-oxoGua, ve kterém se převážně uplatňuje 8-oxoguanin DNA glykosyláza (OGG1) a tím přispívá k jeho výskytu v moči (Evans et al., 2016). 8-oxodG je obecně vnímán jako ukazatel celkové kapacity excisního reparačního mechanismu DNA a celkového poškození DNA (Loft and Poulsen, 1999; Sørensen et al., 2003). Výskyt 8-oxodG v moči není zcela objasněn. Předpokládaným zdrojem by mohla být oxidace dGTP v tzv. nukleotidovém poolu (Evans et al., 2010).

Koncentrace 8-oxodG v moči je nejčastěji stanovována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC–MS/MS) a s využitím metody ELISA. Chromatografie je považována za standardní metodu analýzy 8-oxodG, jelikož je velmi citlivá a zajišťuje vysokou specifitu stanovení. Je nutné ale zmínit, že je i velmi finančně náročná na přístrojové vybavení a její obsluha vyžaduje přítomnost vysoce kvalifikovaného personálu. Naopak ELISA představuje metodu, která je rychlá, vysoce výkonná a nevyžaduje pořízení specializovaných přístrojů. Její nevýhoda spočívá v nižší citlivosti a specifitě. V této disertační práci byla pro stanovení hladin 8-oxodG použita modifikovaná kompetitivní ELISA, jež v jedné z našich předchozích studií vykazovala zvýšenou specifitu kvantifikace 8-oxodG v moči srovnatelnou/korelující s výsledky z analýzy HPLC–MS/MS (Rössner et al., 2016 - příloha 3). Stanovením hladin 8-oxodG prostřednictvím zmíněných metod lze v rámci epidemiologických studií posuzovat míru oxidačního poškození makromolekul v souvislosti s expozicí lidského organismu

potenciálnímu kauzálnímu agens, v našem případě znečištěnému ovzduší, nebo posuzovat souvislosti mezi oxidačním poškozením makromolekul vyvolaným dlouhodobým pobytem v prostředí se znečištěným ovzduším a nemocností.



**Obr. 3 - O-chinonový mechanismus a oxidační poškození DNA** (Toto je neoficiální úprava obrázku, jehož originál se nalézá v ACS publikaci s DOI: [10.1021/tx500298n](https://doi.org/10.1021/tx500298n). ACS neschválil obsah této úpravy ani kontext jejího použití. Pro nekomerční výzkumné a vzdělávací účely je možné obrázek použít.)

### 1.3.2 Biomarkery peroxidace lipidů

Peroxidace lipidů je oxidační poškození polynenasycených mastných kyselin (PUFA). V současnosti jsou známy tři typy mechanismů indukce oxidačního poškození lipidů: oxidace vyvolaná ROS, neenzymatická oxidace nezávislá na ROS a enzymatická oxidace. První dva mechanismy nevyžadují enzymy k vyvolání peroxidace. Enzymatická tvorba peroxidovaných lipidů je závislá na enzymech lipoxygenáze (LOX) a cyklooxygenáze (COX), které katalyzují oxidaci kyseliny arachidonové. Z té vzniká celá řada produktů, např. hydroperoxyeikosatetraenová kyselina, prostaglandiny, prostacyklin, tromboxan nebo leukotrieny (Niki, 2009). V současné době jsou známy dvě formy COX.

COX-1 je konstitutivně exprimována v cytoplasmě většiny buněk, zatímco COX-2 je vysoce indukovatelný enzym aktivovaný v reakci na různé podněty (Tsatsanis et al., 2006). COX-2 je zvýšeně exprimována v průběhu zánětu a předpokládá se asociace oxidačního stresu a aktivace NF- $\kappa$ B (Lu and Wahl, 2005), klíčovým transkripčním faktorem, který se uplatňuje v procesech jako je zánět, stresová reakce, buněčná diferenciaci nebo proliferace a apoptóza. Může být aktivován četnými podněty a reguluje celou řadu cílových genů, včetně cytokinů, růstových faktorů, adhezních molekul, intracelulárních signálních molekul, transkripčních faktorů, jakož i miRNA (Hoesel and Schmid, 2013).

Jedním z prvních cílů působení ROS jsou buněčné, popř. organelové membrány a v nich lokalizované PUFA. V důsledku vzniku peroxidů lipidů, jež se posléze mohou rozkládat na širokou škálu produktů (alkany s krátkým řetězcem, aldehydy, alkenyly, isoprostany aj.), tak dochází ke změně vlastností biologických membrán (Ayala et al., 2014). Za spolehlivý biomarker poškození membránových lipidů v podmínkách *in vivo* je vzhledem ke stabilitě považován 15-F<sub>2t</sub>-isoprostan (15-F<sub>2t</sub>-IsoP) (Roberts and Morrow, 2000). Vzniká neenzymatickou oxidací působením ROS na kyselinu arachidonovou, která je nejhojněji zastoupena v membránách (Morrow et al., 1990). Z místa vzniku je posléze 15-F<sub>2t</sub>-IsoP odstraňován působením fosfolipázy A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) a následně jej lze kvantifikovat v tělních tekutinách: v moči nebo v plazmě (Morrow et al., 1992; Yan et al., 2007; Klawitter et al., 2011). I když je odběr moči snadno dostupnou a neinvazivní metodou, poskytuje stanovení 15-F<sub>2t</sub>-IsoP v plazmě přesnější pohled na celkové oxidační poškození organismu (Lee et al., 2016). Podobně jako u 8-oxodG je možné hladinu 15-F<sub>2t</sub>-IsoP stanovit pomocí metody ELISA. Ovšem na rozdíl od 8-oxodG nejsou hladiny isoprostanu ovlivňovány vlivem reparačních mechanismů, a tak představují přesnější ukazatel expozice organismu oxidačnímu stresu.

Zatímco se hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP jeví být vhodným biomarkerem peroxidace lipidů v populačních studiích, tak v *in vitro* podmínkách tomu tak být nemusí. Hanzalová et al. (2010) analyzovala oxidaci makromolekul vyvolanou jednotlivými PAU a extrahovatelnou organickou hmotou (EOM) ve dvou buněčných liniích (lidských buňkách hepatomu HepG2, lidských embryonálních plicních fibroblastech HEL) a poukázala na dosud nepopsaný mechanismus, který zejména u linie HEL vystavené EOM neočekávaně způsobil významný pokles hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP v buněčném lyzátu v porovnání s kontrolou. Tato skutečnost se stala předmětem dalšího zkoumání ve studii Rössner et al. (2019, - příloha 4). Stěžejním cílem této studie bylo potvrdit hypotézu, že EOM/PAU indukují NF- $\kappa$ B, a to buď přímo,

nebo prostřednictvím aktivace AhR. NF- $\kappa$ B pak následně aktivuje COX-2, jež způsobí snížení hladiny kyseliny arachidonové v důsledku její přeměny na prostaglandiny. Pokles hladin kyseliny arachidonové v buňkách by pak mohl souviset se snížením koncentrací 15-F<sub>2t</sub>-IsoP v lyzátech. Jinak škodlivé EOM/PAU by tak v *in vitro* podmínkách vykazovaly zdánlivé "antioxidační" účinky. Jedním ze závěrů studie bylo, že 15-F<sub>2t</sub>-IsoP nebude v uvedených buněčných liniích vhodným ukazatelem peroxidace lipidů v *in vitro* podmínkách. Mezi další faktory ovlivňující hladiny sledovaných biomarkerů oxidačního poškození buněčných makromolekul (15-F<sub>2t</sub>-Isop, 8-oxodG) patří kromě doposud zmiňovaného znečištěného ovzduší (PAU/EOM, PM<sub>2.5</sub>) i tabákový kouř.

### **1.3.3 Biomarkery expozice tabákovému kouři (ETS)**

Tabákový kouř je komplexní směs plyných složek a částic, včetně mnoha známých rakovinotvorných a toxických látek. ETS bývá nejčastěji zjišťována stanovením kotininu jako velmi specifického a citlivého biomarkeru. Jde o hlavní metabolit nikotinu, jehož hladiny reflektují úroveň akutní, nikoliv chronické expozice. Lze jej stanovovat v různých biologických materiálech, např. v krevní plazmě, moči, slinách a ve vlasech. V tělních tekutinách bývá jeho biologický poločas v rozmezí 770 až 1130 minut (Hukkanen et al., 2005). Ten může být v průběhu těhotenství až o polovinu kratší, proto naměřené hodnoty kotininu u těhotných žen bývají nižší (Dempsey et al. 2002). Opět je zapotřebí zmínit, že hladiny kotininu, stejně jako hladiny jiných biomarkerů v tělních tekutinách, mohou být ovlivněny individuálními metabolickými rozdíly. V případě metabolismu nikotinu i kotininu může hrát roli např. polymorfismus v *CYP2A6*, průtok krve játry aj. (Berkman et al., 1995; Messina et al., 1997).

Studie prokázaly, že jedním z důsledků expozice matek tabákovému kouři během těhotenství je i oxidační stres u novorozenců (Gallo et al., 2010; Lin et al., 2014). Samotný plod je rovněž ovlivňován nejen aktivním, ale i pasivním kouřením (Ogawa et al., 1991). Škodlivé komponenty tabákového kouře mohou pronikat přes placentu a ukázalo se, že při expozici tabákovému kouři „*in utero*“ (z aktivního i pasivního kouření) může u novorozenců docházet k tvorbě aduktů DNA, chromosomální nestabilitě a změnám v metylaci DNA (Vande Loock et al., 2012). Z toho plyne, že ETS může ovlivňovat i novorozenecké hladiny biomarkerů (15-F<sub>2t</sub>-Isop, 8-oxodG), kterými byl v této práci zjišťován vliv znečištěného ovzduší na novorozenecký organismus. Pro objektivní posouzení ETS a z důvodu



minimalizace nežádoucí interference vlivu polutantů s ETS bylo v rámci této disertační práce provedeno i stanovení hladin kotininu v plazmě matek. Taková analýza měřených biologických efektů tabákového kouře je více vypovídající než získaná dotazníková data, která dostatečně nereflektují případné změny způsobené ETS v hladinách biomarkerů (15-F<sub>2t</sub>-Isop, 8-oxodG). Měřením byla získána data reflektující ETS u matek a zároveň plodů na konci těhotenství.

## 2 Cíle

Stěžejním cílem této disertační práce bylo ověřit hypotézu, že působením znečištěného ovzduší dojde ke změnám v průběhu prenatálního vývoje dítěte na makromolekulární úrovni, a tím odpovědět na otázku, zda expozice prachovým částicím PM<sub>2.5</sub> a na ně navázaným karcinogenním PAU představují významný prediktor zvýšených hladin biomarkerů biologicky efektivní dávky, tj. oxidačního poškození DNA (stanovení 8-oxodG) a peroxidace lipidů (stanovení 15-F<sub>2t</sub>-IsoP). V rámci ověření hypotézy byly řešeny tyto cíle:

- 1) Hodnocení koncentrací PM<sub>2.5</sub> a B[a]P ve vnějším ovzduší pomocí stacionárního měření
- 2) Stanovení biomarkerů expozice (tj. celkových aduktů DNA popř. B[a]P „like“ aduktů DNA) u novorozenců
- 3) Stanovení biomarkerů oxidačního stresu (8-oxodG, 15-F<sub>2t</sub>-IsoP) u matek a jejich novorozenců.
- 4) Vyhodnocení vztahu mezi koncentracemi sledovaných polutantů (PM<sub>2.5</sub>, B[a]P) a hladinami biomarkerů oxidačního stresu (8-oxodG, 15-F<sub>2t</sub>-IsoP).

## 3 Metodika

### 3.1 Design studie a základní charakteristika souboru

Odběry biologického materiálu byly provedeny u matek a jejich novorozenců v období od srpna do října roku 2013 (v textu označené „léto 2013“) a od ledna do dubna roku 2014 (v textu označené „zima 2014“) na Porodnickém a neonatologickém oddělení Nemocnice České Budějovice (skupina „ČB“) a na Porodnickém a neonatologickém oddělení Nemocnice s poliklinikou Karviná-Ráj (skupina „Karviná“). Biologickým materiálem byla žilní krev a moč matek a pupečnicková krev a moč novorozenců. Lokality a období byly zvoleny tak, aby byl zohledněn rozdíl ve znečištění ovzduší. Do souboru vyšetřovaných jedinců, jejichž počty shrnuje Tab. 3, byly zahrnuty pouze zdravé matky a jejich novorozenci, kteří se narodili mezi 36. - 42. týdnem gestace. Jedinou podmínkou, pro vstup do studie bylo nekuřáctví matek. Zdravotní stav matek byl hodnocen na základě osobního a lékařského dotazníku. Byly tak získány např. informace o věku, indexu tělesné hmotnosti (BMI), vzdělání, stravovacích návycích, kouření před a během těhotenství, kouření partnerů, druhu porodu, porodní hmotnosti, nebo pohlaví dětí. Základní charakteristiky studovaných skupin jsou uvedeny v Tab. 3. Všechny účastnice studie byly předem seznámeny s cíli výzkumu a před odběrem biologického materiálu podepsaly informovaný souhlas. Studie byla schválena Etickými komisemi obou nemocnic a Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i. (ÚEM AV ČR) v Praze. Vzorky krve byly odebírány do zkumavek s obsahem EDTA jako antikoagulans a bezprostředně po odběru z nich byla izolována plazma, která byla společně se vzorky moči, jež byly odebírány do zkumavek o objemu 50 ml (Greiner Bio-one), skladována při teplotě -20°C. Biologický materiál byl nejprve uložen v nemocnicích a následně transportován na suchém ledu do Oddělení genetické toxikologie a nanotoxikologie ÚEM AV ČR, kde byly vzorky plazmy uskladněny při -80°C. Vzorky moče byly rozděleny do alikvotů (1 – 2 ml) a následně rovněž skladovány při teplotě -80 °C až do doby provedení jednotlivých analýz. Expozice tabákovému kouři byla stanovena měřením kotininu. Oxidační stres byl zjišťován stanovením hladin 8-oxodG a 15-F<sub>2</sub>t-IsoP. U novorozenců byly hodnoceny také hladiny aduktů DNA.

**Tab. 3 – Základní charakteristiky analyzovaných vzorků**

	Lokalita – období			
	Karviná léto 2013	Karviná zima 2014	ČB léto 2013	ČB zima 2014
<b>Matky (N)</b>	64	74	99	99
<b>Novorozenci (N)</b>	64	75	99	99
<b>Chlapci (N)</b>	34 (53.1%)	31 (41.3%)	46 (46.5%)	47 (47.5%)
<b>Dívky (N)</b>	30 (46.9%)	41 (54.7%)	51 (51.5%)	48 (48.5%)
<b>Věk matek (roky)</b>				
Průměr ± SD	29.7 ± 4.6	30.3 ± 4.6	31.8 ± 3.9	32.8 ± 4.4
Medián Min - Max	29.8 19.3 - 42.4	30.5 21.0 - 41.8	31.3 23.4 - 41.4	32.6 21.4 - 43.9
<b>Vzdělání matek (N)</b>				
Neuvedeno	0	3 (4%)	3 (3%)	3 (3%)
Základní	5 (7.8%)	1 (1.4%)	2 (2%)	0
Střední – vyučen	13 (20.3%)	12 (16.2%)	6 (6.1%)	11 (11.1%)
Střední - s maturitou	26 (40.6%)	31 (41.9%)	52 (52.5%)	48 (48.5%)
Vysokoškolské	20 (31.3%)	27 (36.5%)	36 (36.4%)	37 (37.4%)
<b>Kouření matek – před těhotenstvím (N)</b>				
Ano	21 (32.8%)	22 (29.7%)	28 (28.3%)	33 (33.3%)
Ne	42 (65.6%)	50 (67.6%)	70 (70.7%)	62 (62.6%)
Neuvedeno	1 (1.6%)	2 (2.7%)	1 (1%)	4 (4.1%)
<b>Kouřící partner v domácnosti (N)</b>				
Ano	18 (28.1%)	20 (27%)	15 (15.2%)	14 (14.1%)
Ne	46 (71.9%)	49 (66.2%)	82 (82.8%)	81 (81.8%)
Neuvedeno	0	5 (6.8%)	2 (2%)	4 (4.1%)
<b>Délka těhotenství (týdny)</b>				
Průměr ± SD	40.7 ± 2.0	39.8 ± 1.3	39.6 ± 1.0	39.2 ± 1.2
Medián (Min - Max)	40 (36-42)	40 (36-42)	40 (37-42)	39 (36-41)
<b>Porodní váha dětí (g)</b>				
Průměr ± SD	3393 ± 428	3363 ± 419	3477 ± 448	3456 ± 440
Medián Min - Max	3360 2440 - 4570	3330 2540 - 4210	3480 2550 - 4450	3385 2360 - 4910

### **3.2 Koncentrace PM<sub>2.5</sub> a B[a]P ve vnějším ovzduší**

Úroveň expozice PM<sub>2.5</sub> byla stanovována stacionárním monitoringem. Vzorkování bylo uskutečněno v ČB (od 02. 08. do 17. 10. (23 měření); od 18. 01. do 29. 04. (35 měření)) a v Karviné (od 07. 08. do 21. 10. (26 měření); od 13. 01. do 26. 04. (46 měření)) pomocí odběrových zařízení High Air 3000 Air Sampler (model ECO-HVS3000, Ecotech, Austrálie; HiVol). Pokud nedošlo k zanesení membránového filtru Pallflex (EMFAB, TX40HI20-WW), který byl součástí vzorkovače, docházelo k jeho obměně jednou za 72 hodin. Za účelem stanovení hmoty navzorkovaných prachových částic byly filtry před a po expozici váženy na analytických vahách a následně uchovávány při -18°C. Metodika odběru vzorků ozduší, extrakce EOM z filtrů a chemické analýzy PAU adsorbovaných na PM<sub>2.5</sub> použitím GC-MS/MS chromatografie je popsána v publikaci Topinka et al. (2011).

### **3.3 Stanovení 8-oxodG**

Před stanovením koncentrace 8-oxodG v moči, jež bylo provedeno s využitím Highly Sensitive 8-OhdG Check ELISA kitu (JaICA, Shizuoka, Japonsko), proběhla purifikace vzorků metodou extrakce na pevné fázi (SPE) popsanou v publikaci Rössner et al. (2013; 2016 – příloha 3). Kompetivní ELISA byla provedena dle doporučení výrobce se zahrnutím následujících modifikací: vzorky byly přes noc inkubovány s primární protilátkou při 4 ° C; každý vzorek byl analyzován v triplikátu; koncentrace 8-oxodG byly vztaženy na obsah kreatininu a vyjádřeny v nmol 8-oxodG/mmol kreatininu. Ke stanovení hladin kreatininu byla použita metoda založená na Jaffeho reakci (Jaffe, 1886; Delanghe and Speeckaert, 2011), během níž kreatinin vytváří s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí (NaOH) oranžové zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci kreatininu. Při stanovování kreatininu byly vzorky analyzovány v triplikátech a koncentrace kreatininu byla vyjádřena v mmol/l.

### **3.4 Stanovení 15-F<sub>2t</sub>-IsoP**

Koncentrace 15-F<sub>2t</sub>-IsoP v krevní plazmě byly analyzovány dle instrukcí výrobce kitu (8-Isoprostane ELISA Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Pro stanovení bylo použito 125 µl krevní plazmy, která byla nejprve hydrolyzována a dále purifikována pomocí 8-Isoprostane Affinity Sorbent (Ann Arbor, MI, USA). Po odpaření elučního roztoku byl každý vzorek rozpuštěn v ředícím pufru a analyzován v duplikátu. Koncentrace 15-F<sub>2t</sub>-IsoP byla vyjádřena v pg 15-F<sub>2t</sub>-IsoP/ml plazmy.

### 3.5 Stanovení kotininu

Koncentrace kotininu v krevní plazmě byla stanovena radioimunologickou metodou popsanou v publikaci Langone and Vanvunakis, 1982. Metoda je založena na kompetici mezi radioaktivně značeným a neznačeným kotininem při tvorbě vazby s omezeným množstvím vazebných míst specifické protilátky. Analýza každého vzorku byla provedena v duplikátu. Koncentrace kotininu v plazmě byla vyjádřena v ng/ml plazmy. Hladiny kotininu > 50 ng/ml indikovaly aktivní kouření, hladiny mezi 10 až 50 ng/ml pasivní kouření.

### 3.6 Stanovení celkových aduktů DNA a B[a]P – „like“ aduktů DNA

Hladiny celkových a B[a]P „like“ aduktů DNA byly stanovovány z leukocytů pupečnickové krve novorozenců metodou <sup>32</sup>P-postlabeling (Binkova et al., 1996). DNA byla nejdříve enzymaticky hydrolyzována směsí mikrokokální nukleázy (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) a fosfodiesterázy (MP Biomedicals, USA). K separaci nukleotidů s navázanými adukty od nemodifikovaných nukleotidů byla použita inkubace s nukleázou P1 (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA). Následně bylo provedeno radioaktivní označení modifikovaných nukleotidů. Označené <sup>32</sup>P – adukty DNA byly dále separovány vícerozměrnou tenkovrstvou chromatografií (TLC) na polyethylenimin-celulosových foliích (Macherey-Nagel, Německo). Fólie byly exponovány na roentgenové filmy Kodak X-OMAT (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) při teplotě -80°C po dobu 72 hodin. Autoradiogramy s diagonální radioaktivní zónou (DRZ) identifikující adukty DNA byly využity pro stanovení radioaktivity na kapalném scintilačním počítači. Hladiny aduktů DNA byly vztaženy na celkovou koncentraci nukleotidů v měřených vzorcích stanovovanou pomocí HPLC s UV detekcí. Kromě celkových aduktů DNA byly vyhodnoceny tzv. B[a]P-like adukty DNA. Jedná se o adukty, jejichž pozice v DRZ odpovídá pohyblivosti modifikovaných nukleotidů po ovlivnění DNA benzo[a]pyrenem.

### 3.7 Statistická analýza

Pro statistickou analýzu oxidačního poškození DNA a peroxidace lipidů byl použit software Statistica (verze 7.0, StatSoft, Dell, Tulsa, USA) a software SAS (verze 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Porovnání spojitých dat, která nemají normální rozložení, bylo provedeno neparametrickým Mann-Whitney *U*-testem. Za statisticky významnou byla považována hladina významnosti 5 % ( $P < 0.05$ ). K současnému porovnání více parametrů byly spojitě hodnoty transformovány do binární škály (1/0) s použitím mediánu dané

distribuce a aplikována logistická regrese. Hodnoty znečištění ovzduší a dalších spojitých nebo diskrétních faktorů byly zpracovány vícerozměrnou lineární regresí. Pro odhad účinků znečištěného ovzduší na markery oxidačního stresu byly použity průměrné koncentrace PM2.5 nebo B[a]P měřené 7 dní před narozením dítěte.

## 4 Výsledky

### 4.1 Dotazníková data

Na základě osobního a lékařského dotazníku byly od matek získány např. informace o věku, BMI, vzdělání, stravovacích návycích, kouření před a během těhotenství, kouření partnerů, druhu porodu a použité anestezie, porodní hmotnosti, nebo pohlaví dětí. Z široké škály získaných osobních dat jsou na základě statistické analýzy zmiňovány v této práci jen ty nezávislé faktory (např. ETS, pohlaví, typ porodu a užitá anestezie), které buď přímo nebo v kombinaci s účinky studovaných polutantů významně ovlivnily hladiny biomarkerů oxidačního poškození makromolekul. Základní charakteristiky studovaných skupin jsou uvedeny v Tab. 3 a v případě porodů/anestezí v Tab. 12 a Tab. 14.

### 4.2 Stanovení koncentrací PM<sub>2.5</sub> a B[a]P ve vnějším ovzduší

Výsledky stacionárního monitorování prachových částic PM<sub>2.5</sub> a B[a]P odebraných s využitím systému HiVol jsou uvedeny v Tab. 4 a Tab. 5.

**Tab. 4 – Koncentrace PM<sub>2.5</sub> v ovzduší studovaných lokalit během odběrových období**

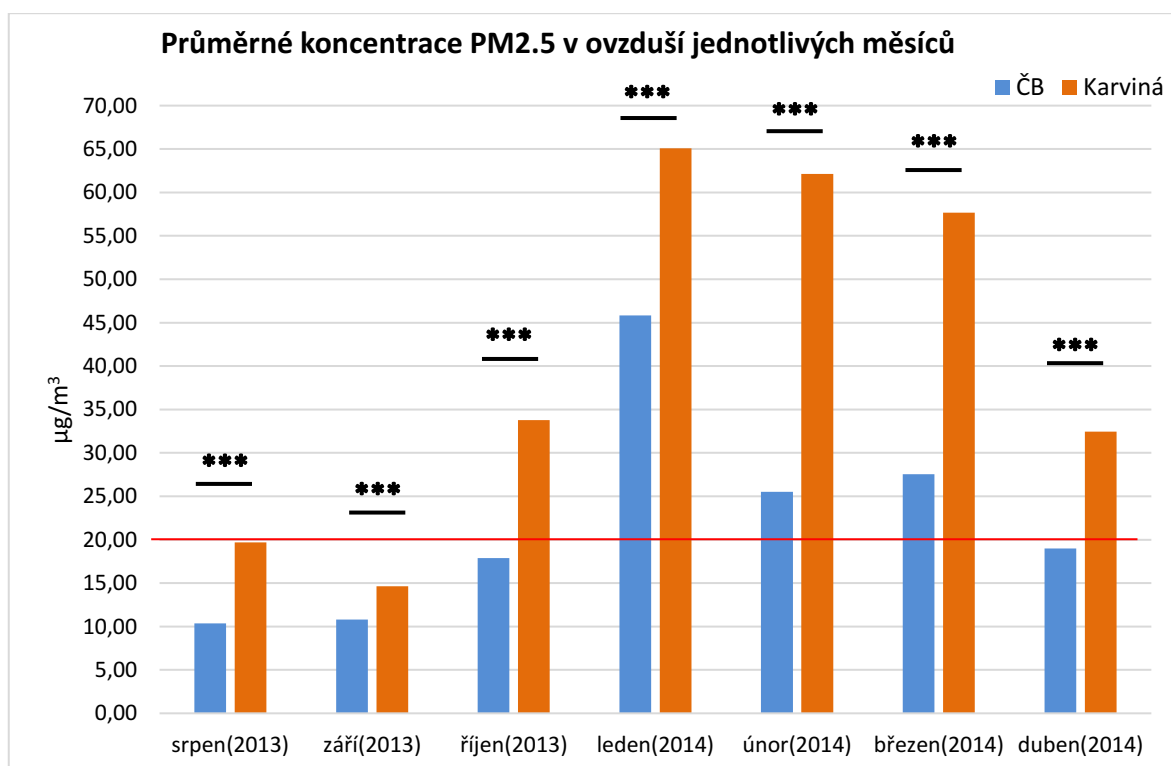
	Období	ČB		Karviná		U-test
		Průměr ± SD	Medián (Min – Max)	Průměr	Medián (Min – Max)	
PM <sub>2.5</sub> (μg/m <sup>3</sup> )	2013	9.45 ± 3.62	8.85 (5.36 – 27.86)	20.41 ± 6.28	18.89 (11.90 – 44.16)	P < 0.001
	2014	27.96 ± 12.34	26.58 (10.75 – 65.10)	53.67 ± 19.76	52.34 (17.68 – 98.52)	P < 0.001



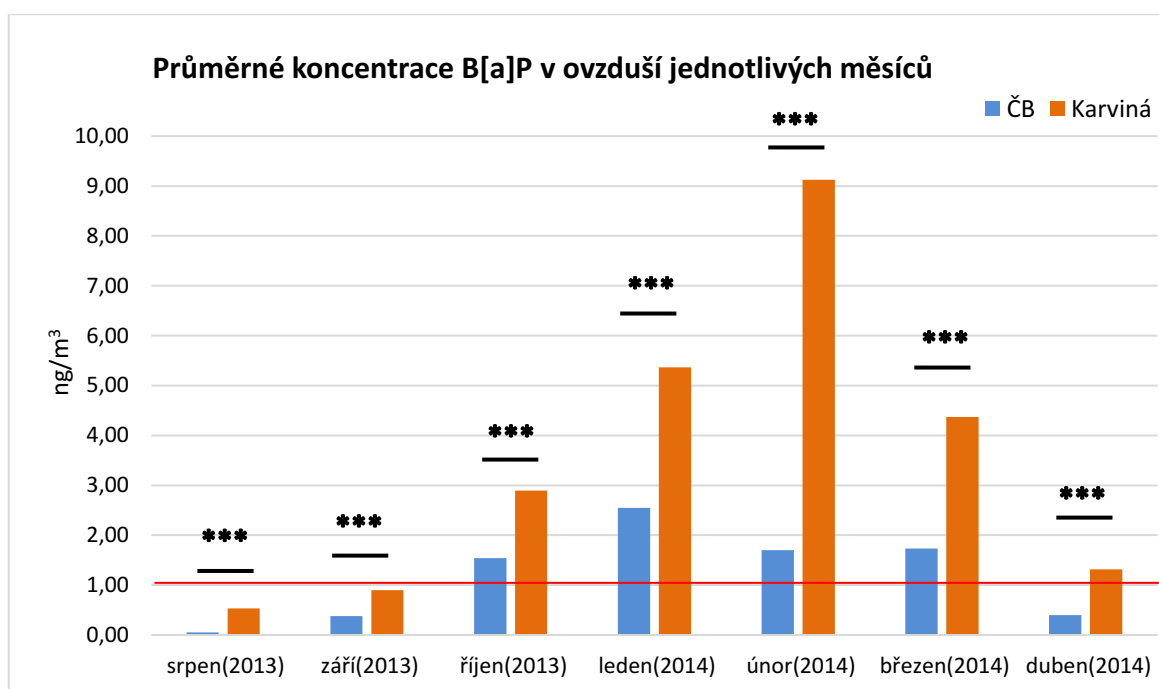
**Tab. 5 - Koncentrace B[a]P v ovzduší studovaných lokalit během odběrových období**

B[a]P (ng/m <sup>3</sup> )	Období	ČB		Karviná		U-test
		Průměr ± SD	Medián (Min - Max)	Průměr	Medián (Min - Max)	
	2013	0.16 ± 0.26	0.07 (0.01 – 1.88)	1.16 ± 0.91	0.76 (0.21 – 3.44)	P < 0.001
	2014	1.45 ± 1.19	0.93 (0.13 – 3.98)	5.36 ± 3.64	4.20 (0.47 – 15.48)	P < 0.001

Průměrné koncentrace PM<sub>2.5</sub> a B[a]P v jednotlivých měsících byly významně vyšší v Karviné v obou odběrových obdobích (Obr. 4 a Obr. 5), přičemž koncentrace zmiňovaných polutantů v ovzduší byly v důsledku meteorologických podmínek a spalování fosilních paliv vždy vyšší v zimním období. Koncentrace zjištěné v Karviné v letních měsících byly zhruba na úrovni zimních koncentrací polutantů v ČB.



**Obr. 4 – Porovnání průměrných měsíčních koncentrací PM<sub>2.5</sub> (HiVol) mezi studovanými lokalitami v jednotlivých měsících (\*\*\*) významné změny P < 0.001 byly stanoveny Mann-Whitney U testem; červenou čarou je označen doporučený imisní limit 20 µg/m<sup>3</sup>)**



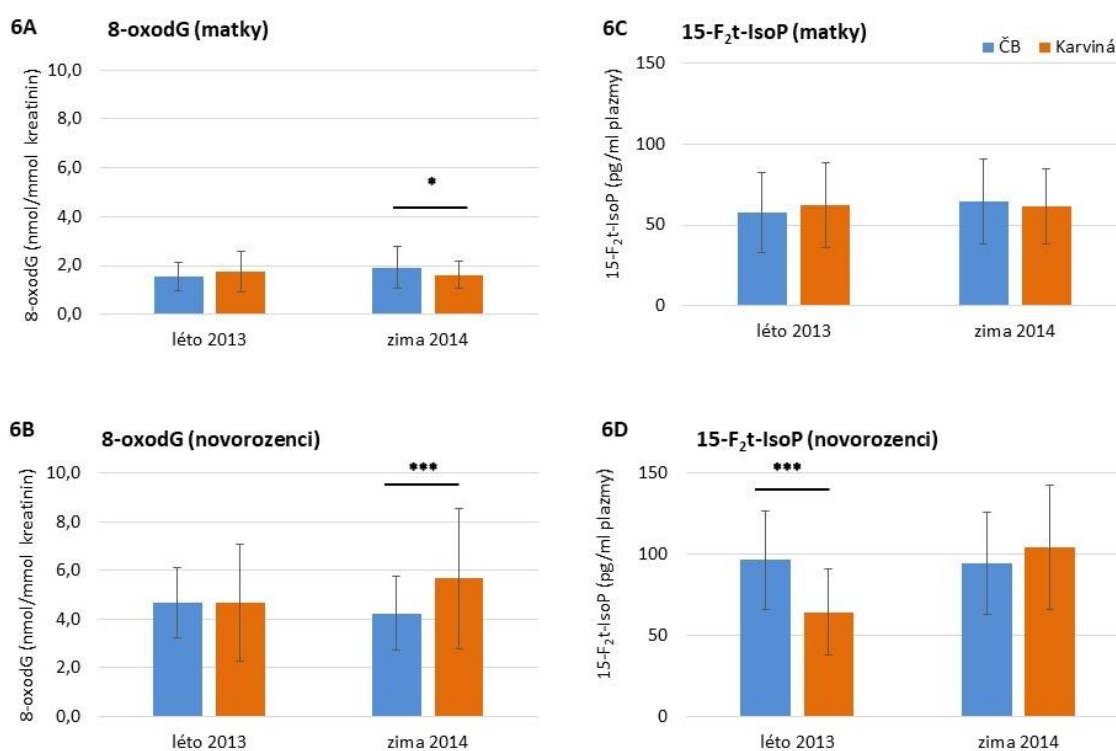
**Obr. 5 – Porovnání průměrných měsíčních koncentrací B[a]P (HiVol) mezi studovanými lokalitami v jednotlivých měsících (\*\*\*) významné změny  $P < 0.001$  byly stanoveny Mann-Whitney  $U$  testem; červenou čarou je označen doporučený imisní limit  $1 \text{ ng/m}^3$ )**

V rámci monitoringu koncentrací  $\text{PM}_{2.5}$  a B[a]P byla pozornost rovněž věnována překračování povolených imisních limitů u obou monitorovaných polutantů vzhledem k ochraně lidského zdraví. Doporučená imisní koncentrace  $\text{PM}_{2.5}$ , jež by neměla být překračována, představuje výrazně zvýšené riziko na lidské zdraví. WHO doporučuje, aby standardní imisní limit pro roční průměrnou koncentraci  $\text{PM}_{2.5}$  byl nižší než  $10 \text{ } \mu\text{g/m}^3$  (WHO, 2006). Každá legislativa si však jeho výši určuje sama. V Evropské Unii (EU) je limit určen Směrnicí Evropského parlamentu 2008/50/ES. Ve směrnici 2008/50/ES je přímo zmíněno, že pro  $\text{PM}_{2.5}$  neexistuje bezpečná koncentrace, a proto stanovený limit neposkytuje záruku bezpečnosti. Česká republika jako člen EU tento limit přijala zákonem o ochraně ovzduší 201/2012 Sb a vyhláškou 330/2012 Sb o posuzování a vyhodnocení úrovně znečištění pro  $\text{PM}_{2.5}$ . V ČR platila hodnota  $25 \text{ } \mu\text{g.m}^{-3}$  imisního limitu pro  $\text{PM}_{2.5}$  do roku 2019. Od roku 2020 se hodnota limitu snížila a činí  $20 \text{ } \mu\text{g.m}^{-3}$  (CHMI, 2020). Obdobně je tomu i u B[a]P, u kterého evropská (Směrnice 2004/107/ES) a následně i česká legislativa (Zákon č. 201/2012 Sb; vyhláška 330/2012 Sb), přijala imisní limit v hodnotě  $1 \text{ ng/m}^3$ . Podle směrnic EU by tedy hodnoty průměrné roční koncentrace neměly překročit  $20 \text{ } \mu\text{g/m}^3$  pro  $\text{PM}_{2.5}$  a  $1 \text{ ng/m}^3$  pro B[a]P. Jak je z Obr. 4 a Obr. 5 patrné, imisní limity byly překračovány v obou lokalitách, častěji a výrazněji však v Karviné.

### 4.3 Stanovení poškození DNA

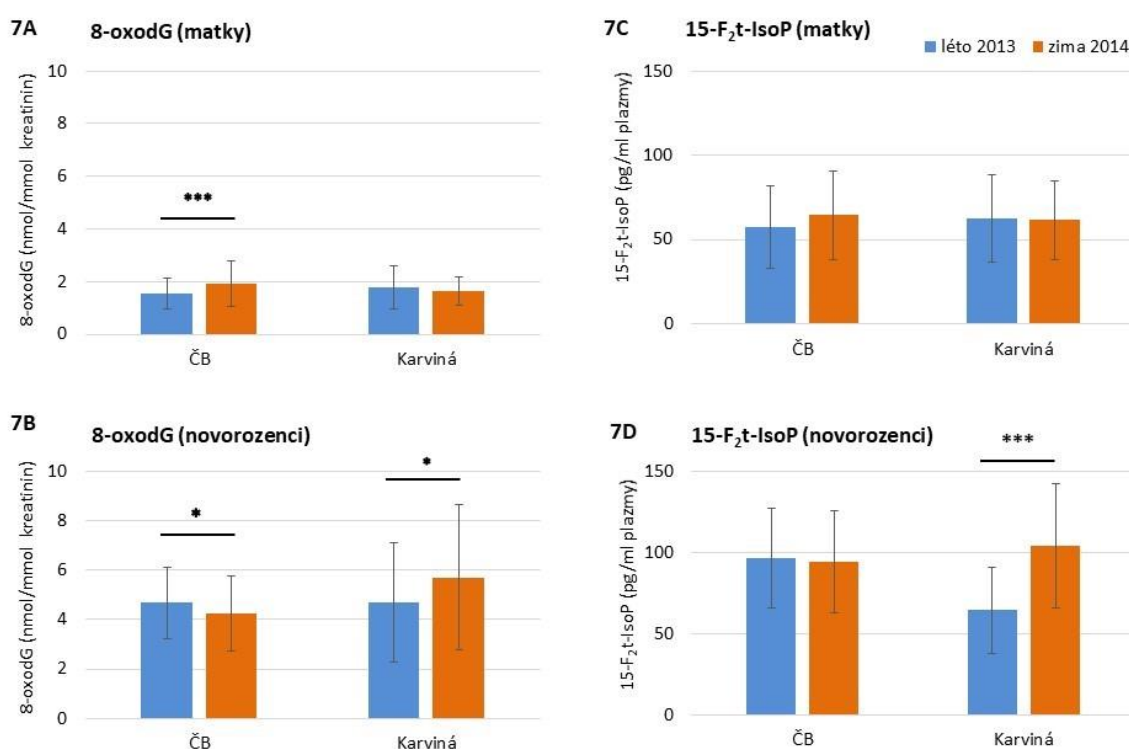
#### 4.3.1 Stanovení hladin 8-oxodG

U matek a jejich novorozenců byly patrné významné rozdíly v oxidaci DNA mezi lokalitami jen v zimním období (Obr. 6A a Obr. 6B). Toto zjištění podporuje hypotézu, že hladiny 8-oxodG v moči se zvyšují v souvislosti s rostoucími koncentracemi znečišťujících látek v ovzduší (Tab. 4 a Tab. 5). Zatímco hladiny 8-oxodG v moči byly signifikantně zvýšené u novorozenců z Karviné v porovnání se subjekty z ČB (průměr  $\pm$  SD:  $5.70 \pm 2.94$  vs.  $4.23 \pm 1.51$  nmol 8-oxodG/mmol kreatinin;  $P < 0.001$ ), u matek byl trend opačný (průměr  $\pm$  SD:  $1.92 \pm 0.86$  vs.  $1.64 \pm 0.54$  nmol 8-oxodG/mmol kreatinin;  $P < 0.05$ ). Tento výsledek může souviset s adaptací dospělého organismu na nepříznivé podmínky prostředí.



Obr. 6(A, B, C, D) - Srovnání průměrných hladin biomarkerů mezi lokalitami pro jednotlivá odběrová období (\* významné změny  $P < 0.05$  a \*\*\* významné změny  $P < 0.001$  byly stanoveny Mann-Whitney  $U$  testem)

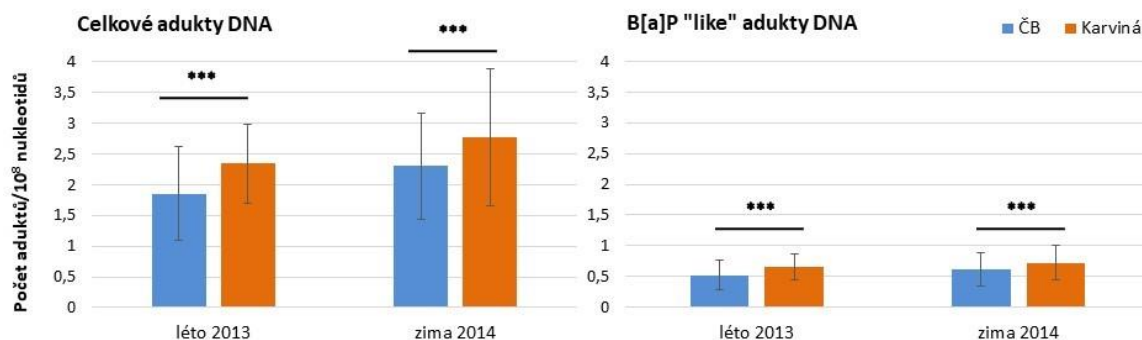
U matek z ČB došlo v zimním období k významnému zvýšení hladin oxidačního poškození DNA v porovnání s létem 2013 (průměr  $\pm$  SD:  $1.92 \pm 0.86$  vs.  $1.54 \pm 0.58$  nmol 8-oxodG/mmol kreatinin;  $P < 0.001$ ; Obr. 7A). Obdobné výsledky byly pozorovány u novorozenců z Karviné (průměr  $\pm$  SD:  $5.70 \pm 2.94$  vs.  $4.69 \pm 2.40$  nmol 8-oxodG/mmol kreatinin;  $P < 0.05$ ; Obr. 7B). Lze předpokládat, že tyto výsledky souvisí se zvyšujícími se koncentracemi polutantů v ovzduší v zimním období. Naopak u novorozenců z ČB bylo vyšší oxidační poškození naměřeno u vzorků odebraných v letním období (průměr  $\pm$  SD:  $4.68 \pm 1.44$  vs.  $4.23 \pm 1.51$  nmol 8-oxodG/mmol kreatinin;  $P < 0.05$ ).



**Obr. 7(A, B, C, D) – Srovnání průměrných hladin biomarkerů mezi obdobími pro jednotlivé lokality (\* významné změny  $P < 0.05$  a \*\*\* významné změny  $P < 0.001$  byly stanoveny Mann-Whitney  $U$  testem)**

#### 4.3.2 Stanovení celkových aduktů DNA a B[a]P – „like“ aduktů DNA

Zvýšené koncentrace B[a]P v Karviné v porovnání s ČB se signifikantně projevíly při poškození DNA z pohledu tvorby celkových a B[a]P – „like“ aduktů DNA. Při srovnání hladin celkových aduktů DNA a B[a]P – „like“ aduktů DNA u novorozenců mezi lokalitami pro jednotlivá období jsme vyzorovali konzistentně vyšší hladiny, jak je ukázáno v Obr. 8 a Tab. 6.

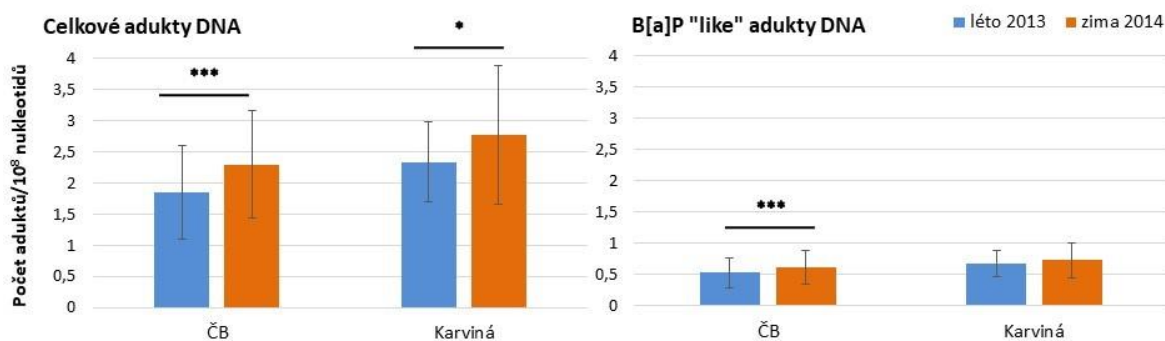


**Obr. 8 - Srovnání průměrných hladin aduktů DNA u novorozenců mezi lokalitami pro jednotlivá odběrová období (\*\*\*) významné změny  $P < 0.001$  byly stanoveny Mann-Whitney  $U$  testem)**

**Tab. 6 – Srovnání hladin aduktů DNA u novorozenců mezi lokalitami pro jednotlivá odběrová období**

Počet aduktů/10 <sup>8</sup> nukleotidů	období	ČB		Karviná		U - test
		Průměr ± SD	Medián (Min – Max)	Průměr ± SD	Medián (Min – Max)	
Celkové adukty DNA	2013	1.85 ± 0.76	1.75 (0.75 - 5.10)	2.34 ± 0.64	2.30 (0.85 - 4.35)	$P < 0.001$
	2014	2.30 ± 0.86	2.02 (0.82 - 5.00)	2.77 ± 1.11	2.51 (1.44 - 8.08)	$P < 0.001$
B[a]P – „like“ adukty DNA	2013	0.52 ± 0.24	0.47 (0.23-1.45)	0.66 ± 0.21	0.65 (0.21-1.35)	$P < 0.001$
	2014	0.61 ± 0.27	0,54 (0.18-1.82)	0.72 ± 0.28	0.71 (0.24-1.56)	$P < 0.001$

Horší kvalita ovzduší v zimním období se též odrazila na vyšších hladinách celkových aduktů DNA i při porovnání vzorků mezi obdobími pro jednotlivé lokality. Naopak hladiny B[a]P – „like“ aduktů DNA byly zvýšeny pouze u vzorků z ČB (Obr. 9 a Tab. 7).



**Obr. 9 - Srovnání průměrných hladin aduktů DNA u novorozenců mezi obdobími pro jednotlivé lokality (\* významné změny  $P < 0.05$  a \*\*\* významné změny  $P < 0.001$  byly stanoveny Mann-Whitney  $U$  testem)**

**Tab. 7 – Srovnání hladin aduktů DNA u novorozenců mezi obdobími pro jednotlivé lokality**

Počet aduktů/ $10^8$ nukleotidů	období	2013		2014		U - test
		Průměr $\pm$ SD	Medián (Min – Max)	Průměr $\pm$ SD	Medián (Min – Max)	
Celkové adukty DNA	ČB	1.85 $\pm$ 0.76	1.75 (0.75-5.10)	2.30 $\pm$ 0.86	2.02 (0.82 - 5.00)	$P < 0.001$
	Karviná	2.34 $\pm$ 0.64	2.30 (0.85 – 4.35)	2.77 $\pm$ 1.11	2.51 (1.44 - 8.08)	$P < 0.05$
B[a]P – „like“ adukty DNA	ČB	0.52 $\pm$ 0.24	0.47 (0.23-1.45)	0.61 $\pm$ 0.27	0.54 (0.18-1.82)	$P < 0.001$
	Karviná	0.66 $\pm$ 0.21	0.65 (0.21-1.35)	0.72 $\pm$ 0.28	0,71 (0.24-1.56)	$P = 0.28$

#### 4.4 Stanovení peroxidace lipidů

V hladinách peroxidovaných lipidů nebyly u matek zjištěny významné rozdíly jak při srovnání lokalit, tak při srovnání letního a zimního období (ČB vs. Karviná: letní období 2013 - průměr  $\pm$  SD: 57.62  $\pm$  24.55 vs. 62.45  $\pm$  26.06 pg/ml plazmy,  $P = 0.26$ ; zimní období 2014 – průměr  $\pm$  SD: 64.38  $\pm$  26.21 vs. 61.46  $\pm$  23.47 pg/ml plazmy,  $P = 0.40$ ). Avšak trendy změn byly porovnatelné s oxidačním poškozením DNA u těchto skupin (Obr. 6C a Obr. 6A).

U novorozenců z ČB došlo v letním období 2013 k významnému zvýšení hladin peroxidace lipidů v porovnání se vzorky z Karviné (průměr  $\pm$  SD:  $96.28 \pm 30.59$  vs.  $64.24 \pm 26.75$  pg/ml plazma,  $P < 0.001$ ; Obr. 6D). Statisticky významně vyšší hladiny peroxidace lipidů měly pro tyto skupiny opačný trend než hladiny 8-oxodG (Obr. 6B). Výsledek by mohl souviset s typem porodu a anestezie v kombinaci s úrovní znečištěného ovzduší. V zimním období 2014 nebyly zjištěny žádné významné rozdíly (ČB vs. Karviná: zimní období 2014 - průměr  $\pm$  SD:  $94.32 \pm 31.27$  vs.  $104.26 \pm 38.18$  pg/ml plazma,  $P = 0.13$ ; Obr. 6D). Trendy změn byly též obdobné jako při stanovení oxidačního poškození DNA (Obr. 6B).

U matek z ČB (15-F<sub>2t</sub>-IsoP, průměr  $\pm$  SD:  $57.62 \pm 24.55$  vs.  $64.38 \pm 26.21$  pg/ml plazmy,  $P = 0.06$ ; Obr. 7C), ani u matek z Karviné (15-F<sub>2t</sub>-IsoP, průměr  $\pm$  SD:  $62.45 \pm 26.06$  vs.  $61.46 \pm 23.47$  pg/ml plazmy,  $P = 0.92$ ; Obr. 7C) nebyla zjištěna významná sezónní variabilita hladin peroxidovaných lipidů. Změny opět kopírovaly trendy zjištěné pro hladiny 8-oxodG (Obr. 7A).

Signifikantní variabilita v peroxidaci lipidů mezi odběrovými obdobími nebyla zaznamenána ani u novorozenců z ČB (průměr  $\pm$  SD:  $96.28 \pm 30.59$  vs.  $94.32 \pm 31.27$  pg/ml plazmy,  $P = 0.81$ ; Obr. 7D). Toto zjištění však nekorespondovalo s trendem změn hladin 8-oxodG (Obr. 7B). Hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP v zimním období 2014 (průměr  $\pm$  SD:  $104.26 \pm 38.18$  vs.  $64.24 \pm 26.75$  pg/ml plazmy,  $P < 0.001$ ; Obr. 7D) byly v porovnání s letním obdobím významně zvýšeny u novorozenců narozených v Karviné, což odpovídá hladinám polutantů v ovzduší (Tabulka 3 a 4). Toto pozorování nebylo potvrzeno pro vzorky z ČB.

#### **4.5 Oxidační stres ve vztahu k expozici tabákovému kouři**

I když se studie měly zúčastnit matky nekuřačky, z dotazníkových dat vyplývá, že některé účastnice studie před těhotenstvím kouřily. Počty kouřících matek a kouřících partnerů ve společné domácnosti jsou uvedeny v Tab. 3 (kapitola Metodika). Data ukazují, že novorozenci z Karviné byli více vystaveni tabákovému kouři než novorozenci z ČB. Nicméně v rámci obou lokalit se hladiny biomarkerů oxidačního stresu v novorozeneckých vzorcích v souvislosti s koncentrací kotininu v plazmě matek významně neměnily (Tab. 8).

**Tab. 8 – Oxidační stres u novorozenců způsobený expozicí matek tabákovému kouři (převzato Ambroz et al., 2016; příloha 1)**

	Kotinin u matek (ng/ml)	Pool data			U – test
		N	Průměr ± SD	Medián (Min - Max)	
8-oxodG	≤ 1	306	4.69 ± 1.94	4.38 (0.20 - 15.17)	P = 0.82
	> 1	22	5.54 ± 3.65	4.11 (2.77 - 16.57)	
	≤ 10	315	4.70 ± 1.99	4.37 (0.20 - 15.17)	P = 0.27
	> 10	13	5.97 ± 3.79	4.21 (3.24 - 16.57)	
	≤ 50	324	4.74 ± 2.11	4.37 (0.20 - 16.57)	P = 0.50
	> 50	4	4.92 ± 1.11	4.51 (4.13 - 6.52)	
15-F <sub>2t</sub> -IsoP	≤ 1	320	91.10 ± 34.88	88.86 (25.82 - 237.01)	P = 0.51
	> 1	22	85.90 ± 32.00	83.72 (31.96 - 156.84)	
	≤ 10	329	91.03 ± 34.68	88.67 (25.82 - 237.01)	P = 0.54
	> 10	13	83.98 ± 35.43	85.60 (31.96 - 141.68)	
	≤ 50	338	90.84 ± 34.72	88.32 (25.82 - 237.01)	P = 0.82
	> 50	4	84.65 ± 35.23	87.0 (39.31 - 125.29)	

## 4.6 Multivariátní regresní analýza

### 4.6.1 Identifikace nezávislých faktorů podílejících se na oxidačním stresu bez ohledu na lokalitu

Pro odhad asociace znečištěného ovzduší s markery oxidačního stresu byly použity hladiny PM<sub>2.5</sub> a B[a]P vypočtené jako průměrné koncentrace příslušné znečišťující látky měřené 7 dní před porodem. V analýze byl sledován vliv proměnných potenciálně ovlivňujících oxidační stres (expozice tabákovému kouři, pohlaví dítěte, věk matek, počet porodů, způsob porodu) bez ohledu na lokalitu. Vzhledem k velkému objemu dat jsou v Tab. 9 a Tab. 10 uvedeny pouze signifikantní výsledky analýzy.

Významný vliv expozice PM<sub>2.5</sub> na oxidační poškození DNA byl zaznamenán pouze u matek (Tab. 9). Věk matek v kombinaci s expozicí PM<sub>2.5</sub> ovlivnil hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP: u mladších matek byla zjištěna vyšší pravděpodobnost zvýšených hladin tohoto biomarkeru (Tab. 9). Dále byl zjištěn statisticky významný vliv expozice PM<sub>2.5</sub> v zimní sezóně na peroxidaci lipidů u novorozenců (Tab. 10). Hladiny 8-oxodG v moči novorozenců byly zvýšeny v důsledku vyšší expozice tabákovému kouři v kombinaci s expozicí PM<sub>2.5</sub> u matek (Tab. 10). S expozicí PM<sub>2.5</sub> u matek byla také spojena vyšší pravděpodobnost zvýšených hladin 8-oxodG u novorozených dívek (Tab. 10). U novorozenců z Karviné bylo



zaznamenáno signifikantně vyšší poškození DNA v podobě celkových aduktů DNA a B[a]P – „like“ aduktů DNA, jež bylo asociováno s expozicí organismu PM2.5 (Tab. 10).

Expozice B[a]P neměla statisticky významný vliv na biomarkery oxidačního stresu u žádné sledované skupiny. Byl však pozorován významný vliv zimní sezóny a regionu na hladiny 8-oxodG u matek (Tab. 9) a vliv zimní sezóny na hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u novorozenců (Tab. 10). Neočekávaně stejně jako v případě expozice PM2.5 byla významně vyšší peroxidace lipidů u mladších matek v kombinaci s expozicí B[a]P (Tab. 9). Obdobně pak s expozicí B[a]P u matek byla spojena i vyšší pravděpodobnost zvýšených hladin 8-oxodG u novorozeneckých dívek (Tab. 10). U novorozenců z Karviné bylo též zjištěno signifikantně vyšší poškození DNA ve formě celkových a B[a]P – „like“ aduktů, jež bylo asociováno s expozicí organismu B[a]P (Tab. 10).

**Tab. 9 – Faktory signifikantně ovlivňující biomarkery oxidačního stresu u matek** (upraveno a převzato z Ambroz et al., 2016; příloha 1)

		Oxidační stres u matek		* OR (95%CI)	U - test
<b>PM2.5</b> <b>HiVol</b>	<b>8-oxodG</b>	PM2.5	HiVol	1.68 (1.05 - 2.69)	P < 0.05
	<b>15-F<sub>2t</sub>-IsoP</b>	Věk matky	Vysoký/Nízký	0.56 (0.35 - 0.90)	P < 0.05
<b>B[a]P</b> <b>HiVol</b>	<b>8-oxodG</b>	Oblast	Karviná/ČB	1.76 (0.99 - 3.11)	P = 0.05
		Období	Zima2014/Léto2013	2.44 (1.41 - 4.21)	P < 0.01
	<b>15-F<sub>2t</sub>-IsoP</b>	Věk matky	Vysoký/Nízký	0.60 (0.37 - 1.00)	P < 0.05

\* OR – Odds ratio; 95%CI – interval spolehlivosti

**Tab. 10 - Faktory signifikantně ovlivňující biomarkery oxidačního stresu u novorozenců**  
(upraveno a převzato z Ambroz et al., 2016; příloha 1)

		Oxidační stres u novorozenců		* OR (95%CI)	U - test
<b>PM2.5 HiVol</b>	<b>8-oxodG</b>	ETS	Vysoká/Nízká expozice	2.59 (1.12 - 5.96)	P < 0.05
		Pohlaví (dítě)	Chlapec/Dívka	0.51 (0.32 - 0.79)	P < 0.01
	<b>15-F<sub>2t</sub>-IsoP</b>	Období	Zima 2014/Léto2013	3.25 (1.81 - 5.83)	P < 0.001
	<b>Celkové adukty DNA</b>	Oblast	Karviná/ČB	3.00 (1.81 – 4.99)	P < 0.001
	<b>B[a]P – „like“ adukty DNA</b>	Oblast	Karviná/ČB	3.55 (2.10 – 6.00)	P < 0.001
<b>B[a]P HiVol</b>	<b>8-oxodG</b>	Pohlaví (dítě)	Chlapec/Dívka	0.51 (0.32 - 0.82)	P < 0.01
	<b>15-F<sub>2t</sub>-IsoP</b>	Období	Zima 2014/Léto2013	2.87 (1.65 - 4.99)	P < 0.001
	<b>Celkové adukty DNA</b>	Oblast	Karviná/ČB	3.37 (1.92 – 5.91)	P < 0.001
	<b>B[a]P – „like“ adukty DNA</b>	Oblast	Karviná/ČB	2.31 (1.34 – 4.01)	P < 0.01

\* OR – Odds ratio; 95%CI – interval spolehlivosti

#### 4.6.2 Identifikace nezávislých faktorů podílejících se na oxidačním stresu v jednotlivých lokalitách

Multivariátní regresní analýzou byly následně identifikovány nezávislé faktory ovlivňující oxidační poškození makromolekul v jednotlivých lokalitách. Analýza byla provedena obdobným způsobem popsaným v kapitole 4.6.1 v tomto případě s ohledem na lokalitu. Výsledky uvedené v Tab. 11A a Tab. 11B ukazují, že expozice PM2.5 u matek z Karviné je spojená se signifikantně zvýšenými hladinami 8-oxodG a 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u jejich novorozenců. V případě expozice B[a]P u matek z této lokality dochází pouze ke statisticky významnému zvýšení hladin 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u jejich novorozenců. Naopak u novorozenců z ČB byl zaznamenán pouze statisticky významný vliv maternální expozice PM2.5 na hladiny 8-oxodG u novorozenců. Signifikantně zvýšené hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u novorozenců z ČB byly ovlivněny maternální expozicí PM2.5 i B[a]P v kombinaci se způsobem porodu.

**Tab. 11A – Faktory ovlivňující hladiny 8-oxodG u novorozenců v jednotlivých lokalitách** (signifikantní výsledky jsou označeny tučným písmem; upraveno a převzato z Ambroz et al., 2016; příloha 1)

Biomarker	Oxidační stres novorozenců			České Budějovice		Karviná	
				OR (95%CI)	p-level	OR (95%CI)	p-level
8-oxodG	PM2.5 Hivol	PM2.5	Hivol	0.50 (0.26–0.95)	<b>0.0355</b>	2.23 (1.06-4.66)	<b>0.0340</b>
		ETS	Vyšší/Nižší	2.20 (0.41–11.87)	0.36	0.93 (0.32-2.71)	0.90
		Pohlaví (dítě)	Chlapec/ Dívka	0.54 (0.29–1.03)	0.0615	0.51 (0.25-1.08)	0.0775
		Věk matky	Vyšší/Nižší	1.24 (0.63–2.47)	0.54	1.27 (0.56-2.87)	0.57
		Počet porodů	Primipara/ Jiné	1.04 (0.52–2.06)	0.92	1.00 (0.44-2.28)	1.00
		Typ porodu	Císař/jiné	1.34 (0.67–2.65)	0.41	1.19 (0.54-2.65)	0.66
		B[a]P	B[a]P	Hivol	0.79 (0.59–1.06)	0.11	1.03 (0.92-1.16)
	ETS		Vyšší/Nižší	2.48 (0.47–13.13)	0.29	1.03 (0.36–2.95)	0.95
	Pohlaví (dítě)		Chlapec/ Dívka	0.54 (0.29–1.01)	0.0531	0.52 (0.25– 1.09)	0.0814
	Věk matky		Vyšší/Nižší	1.16 (0.59–2.28)	0.67	1.25 (0.55–2.84)	0.60
	Počet porodů		Primipara/ Jiné	1.04 (0.53–2.05)	0.91	1.01 (0.45–2.25)	0.99
	Typ porodu		Císař/jiné	1.18 (0.61–2.28)	0.62	1.13 (0.52-2.47)	0.76

\* OR – Odds ratio; 95%CI – interval spolehlivosti

**Tab. 11B – Faktory ovlivňující hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u novorozenců v jednotlivých lokalitách** (signifikantní výsledky jsou označeny tučným písmem; upraveno a převzato z Ambroz et al., 2016; příloha 1)

Biomarker	Oxidační stres novorozenců			České Budějovice		Karviná	
				OR (95%CI)	p-level	OR (95%CI)	p-level
15-F <sub>2t</sub> -IsoP	PM2.5 Hivol	PM2.5	Hivol	1.36 (0.70–2.61)	0.36	4.80 (2.27–10.15)	<b>0.0001</b>
		ETS	Vyšší/Nižší	0.32 (0.06–1.74)	0.19	0.62 (0.21–1.85)	0.40
		Pohlaví (dítě)	Chlapec/ Dívka	1.45 (0.76–2.76)	0.26	0.95 (0.46–1.98)	0.89
		Věk matky	Vyšší/Nižší	1.21 (0.61–2.41)	0.59	1.05 (0.48–2.30)	0.91
		Počet porodů	Primipara/ Jiné	1.64 (0.82–3.30)	0.16	1.53 (0.70–3.32)	0.28
		Typ porodu	Císař/jiné	0.35 (0.17–0.69)	<b>0.0028</b>	1.93 (0.88–4.26)	0.10
		B[a]P	B[a]P	Hivol	0.79 (0.59–1.06)	0.11	1.15 (1.03–1.28)
	ETS		Vyšší/Nižší	0.28 (0.05–1.54)	0.14	0.70 (0.25–1.99)	0.51
	Pohlaví (dítě)		Chlapec/ Dívka	1.38 (0.73–2.61)	0.32	1.04 (0.52–2.11)	0.91
	Věk matky		Vyšší/Nižší	1.15 (0.58–2.27)	0.69	0.89 (0.41–1.92)	0.76
	Počet porodů		Primipara/ Jiné	1.52 (0.76–3.02)	0.23	1.41 (0.67–2.96)	0.36
	Typ porodu		Císař/jiné	0.41 (0.21–0.79)	<b>0.0082</b>	1.68 (0.80–3.53)	0.17

\* OR – Odds ratio; 95%CI – interval spolehlivosti

#### 4.6.3 Peroxidace lipidů u novorozenců v souvislosti s typem porodu

U novorozenců z ČB v období 2013 byla pozorována statisticky významně vyšší hladina peroxidace lipidů (Obr. 6D). Porovnáním četnosti jednotlivých typů porodů (Tab. 12) bylo zjištěno, že v obou lokalitách byl preferován vaginální způsob porodu (VD) před císařským řezem (CS). V ČB byl jeho podíl na celkovém počtu porodů vyšší než v Karviné.

**Tab. 12 – Četnost užitých typů porodů a porovnání mezi lokalitami**

Období	Oblast Typ porodu	ČB		* OR (95% CI; p-level)	Karviná	
		N	%		N	%
2013	Neznámý	0	0.0		1	1.6
	Vaginální	77	77.8	0.45 (0.22 - 0.89; P = 0.02)	39	60.9
	Císařský řez	21	21.2	2.23 (1.11 - 4.48; P = 0.02)	24	37.5
	Ostatní	1	1.0		0	0.0
2014	Neznámý	2	2.0		1	1.4
	Vaginální	52	52.5		43	58.1
	Císařský	43	43.4		23	31.1
	Ostatní	2	2.0		7	9.5
Celkem	Neznámý	2	1.0		2	1.4
	Vaginální	129	65.2		82	59.4
	Císařský	64	32.3		47	34.1
	Ostatní	3	1.5		7	5.1

\* OR – Odds ratio; 95%CI – interval spolehlivosti

Selekcí dat z celkového souboru peroxidace lipidů novorozenců byly zjištěny rozdíly v úrovni hladin 15-F<sub>2t</sub>-IsoP v závislosti na typu porodu v dané lokalitě (Tab. 13). Dle literatury je VD spjat s vyššími hladinami lipidových peroxidů, což neplatí pro CS (Inanc et al., 2005; Vakilian et al., 2009; Adekanle et al., 2013). Tato skutečnost korespondovala s výsledky získanými pro skupinu ČB, zatímco u subjektů z Karviné byly naměřeny vyšší hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP po provedení CS a nižší hladiny v případě VD. I když byl rozdíl statisticky nevýznamný, mohl by naznačovat vliv znečištěného ovzduší anebo typ anestezie.

**Tab. 13 - Peroxidace lipidů u novorozenců v závislosti na typu porodu (upraveno a převzato z Velemínský et al., 2016; příloha 5)**

Typ porodu	Vaginální		Císařský řez		U – test
	N	15-F <sub>2t</sub> -IsoP (pg/ ml plazma) průměr ± SD	N	15-F <sub>2t</sub> -IsoP (pg/ ml plazma) průměr ± SD	
ČB	129	101.7 ± 31.0	64	83.9 ± 26.9	P < 0.001
Karviná	82	78.3 ± 34.5	47	91.7 ± 42.6	P = 0.0896

Obdobně bylo zjištěno, že v ČB byla nejčastěji upřednostňována lokální anestezie, zatímco v Karviné byly prováděny vaginální porody bez užití anestezie. Častější používání spinální anestezie bylo zaznamenáno v Karviné (Tab. 14).

**Tab. 14 – Četnost užitých anestezií a porovnání mezi lokalitami**

Období	Oblast Typ anestezie	ČB		OR (95% CI; p-level)	Karviná	
		N	%		N	%
2013	Neznámý	1	1.0		3	4.7
	Celková	19	19.2		7	10.9
	Epidurální	9	9.1		2	3.1
	Spinální	4	4.0	10.03 (3.22 - 31.20; P = 0.0001)	19	29.7
	Lokální	41	41.4	0.15 (0.06 - 0.37; P = 0.0001)	6	9.4
	Žádná	25	25.3	2.16 (1.10 - 4.23; P = 0.02)	27	42.2
2014	Neznámý	2	2.0		1	1.4
	Celková	32	32.3	0.15 (0.06 - 0.42; P = 0.0002)	5	6.8
	Epidurální	4	4.0		8	10.8
	Spinální	11	11.1	2.82 (1.24 - 6.37; P = 0.01)	19	25.7
	Lokální	37	37.4	0.15 (0.06 - 0.38; P = 0.0001)	7	9.5
	Žádná	13	13.1	5.77 (2.74 - 12.12; P = 0.0001)	34	45.9
Celkem	Neznámý	3	1.5		4	2.9
	Celková	51	25.8	0.28 (0.14 - 0.54; P = 0.0002)	12	8.7
	Epidurální	13	6.6		10	7.2
	Spinální	15	7.6	4.68 (2.46 - 8.93; P = 0.0001)	38	27.5
	Lokální	78	39.4	0.15 (0.08 - 0.29; P = 0.0001)	13	9.4
	Žádná	38	19.2	3.38 (2.07 - 5.51; P = 0.0001)	61	44.2

\* OR – Odds ratio; 95%CI – interval spolehlivosti

Multivariátní regresní analýza ukázala, že peroxidace lipidů u novorozenců z ČB byla významně nižší po císařském řezu v celkové anestezii (OR = 0.40; 0.21 – 0.77; P < 0.01) a významně vyšší u vaginálního porodu s použitím lokální anestezie. Zahrnutím B[a]P do multivariátního modelu nebyl pozorován vliv typu porodu, ale bylo zaznamenáno významné zvýšení peroxidace lipidů způsobené lokální anestezii (OR = 2.47; 1.12 - 5.43; P < 0.05). Obdobné zvýšení hladin 15-F<sub>2</sub>t-IsoP bylo pozorováno po zohlednění PM<sub>2.5</sub> jako proměnné ve statistickém modelu (OR = 2.67; 1.15 – 6.20; P < 0.05). V případě karvinských novorozenců byla peroxidace lipidů vyšší po císařském řezu (OR = 3.67; 1.15 – 11.77; P <

0.05) s použitím spinální anestezie a dále ve spojení s expozicí B[a]P (OR = 1.22; 1.02 – 1.46; P < 0.05). Přidání dalších proměnných do modelu mělo též statisticky významný vliv na novorozence z Karviné: expozice PM2.5 a typ porodu (císařský řez) zvyšovaly peroxidaci lipidů, zatímco spinální anestezie vedla k jejímu snížení (Tab. 15).

**Tab. 15 – Multivariátní modely – faktory ovlivňující peroxidaci lipidů u novorozenců v průběhu porodu** (signifikantní výsledky jsou označeny tučným písmem; upraveno a převzato z Veleminsky et al., 2016; příloha 5)

model	České Budějovice * OR (95%CI, p-level)		Karviná * OR (95%CI, p-level)	
	Bez polutantů	CS vs VD	0.40 (0.21 – 0.77; P < <b>0.01</b> )	CS vs VD
s B[a]P	B[a]P	0.83(0.62-1.13; P = 0.23)	B[a]P	1.22 (1.02 – 1.46; P < <b>0.05</b> )
	CS vs VD	0.73 (0.33 – 1.64; P = 0.45)	CS vs VD	3.00 (0.89 – 10.14; P = 0.076)
	Lokální anestezie	2.47 (1.12 – 5.43; P < <b>0.05</b> )	Spinální anestezie	0.06 (0.00 – 1.06; P = 0.0546)
s PM2.5	PM2.5	1.37 (0.68 – 2.75; P = 0.38)	PM2.5	5.21 (1.61 – 16.85; P < <b>0.01</b> )
	CS vs VD	0.71 (0.29 – 1.76; P = 0.46)	CS vs VD	5.40 (1.33 – 21.99; P < <b>0.05</b> )
	Lokální anestezie	2.67 (1.15 – 6.20; P < <b>0.05</b> )	Spinální anestezie	0.06 (0.01 – 0.65; P < <b>0.05</b> )

\* OR – Odds ratio; 95%CI – interval spolehlivosti

## 5 Diskuze

Klinické a epidemiologické studie i testy na zvířatech prokázaly, že zvyšující se koncentrace environmentálních polutantů mají nepříznivé zdravotní důsledky (Backes et al., 2013). Z tohoto důvodu je žádoucí monitorování biomarkerů oxidačního stresu, jednoho z mechanismů biologického účinku polutantů, za účelem hodnocení zdravotního stavu populace exponované znečištěnému ovzduší. V mnoha studiích byla prokázána vhodnost použití těchto biomarkerů pro environmentálně a profesně exponované dospělé populace (Møller and Loft, 2010). Současně byly podány důkazy o nepříznivých dopadech prenatální expozice novorozenců polutantům (Proietti et al. 2012). V databázi PubMed se po zadání klíčového slova „prenatal exposure to air pollution“ objevilo 1539 (květen 2020) publikací zabývajících se tímto tématem. Nicméně neúspěch hledání studií zabývajících se prenatální expozicí novorozenců vybraným polutantům (PM<sub>2.5</sub>, PAU) s využitím námi zvolených biomarkerů oxidačního stresu (8-oxodG, 15-F<sub>2t</sub>-IsoP) naznačuje, že počet studií tohoto typu provedených u novorozenců je minimální. Část těchto studií pochází z České republiky (Topinka et al., 2009; Svecova et al. 2009; Rössnerova et al., 2011; Rössner et al., 2011; Honkova et al., 2018), avšak v žádné z nich nebyly paralelně využity uvedené dva biomarkery. V podobné studii (Svecova et al., 2009) byl hodnocen biomarker oxidačního poškození DNA a studie se týkala dětí předškolního věku. Výsledky zmíněných prací prokazovaly zvýšenou vnímavost novorozenců i dětí k působení polutantů.

### 5.1 Znečištěné ovzduší

Výsledky ukazují vyšší zatížení osob znečištěným ovzduším v Karviné, a to hlavně v zimním období. V porovnání s nejvyšší koncentrací PM<sub>2.5</sub> zjištěné prostřednictvím stacionárního monitoringu HiVol v letním období 2013 (44.16  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), byla nejvyšší koncentrace PM<sub>2.5</sub> v zimním období 2014 více než dvojnásobná (98.52  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ). WHO však doporučuje denní limit pro ochranu lidského zdraví 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Koncentrace PM<sub>2.5</sub> pozorované v ČB v zimních měsících v ovzduší odpovídaly zhruba úrovni letních koncentrací PM<sub>2.5</sub> v Karviné. Zmíněný limit byl v ČB v zimním období 2014 překračován v podstatně menší míře než v Karviné. Obdobně tomu bylo i v případě úrovně znečištění karcinogenním B[a]P v Karviné v zimním období 2014, kdy nejvyšší hodnoty byly i patnáctkrát vyšší než doporučená hodnota 1  $\text{ng}/\text{m}^3$ . V ČB se v některých obdobích koncentrace B[a]P blížily pětinasobku této normy. Koncentrace PM<sub>2.5</sub> a B[a]P byly tedy



významně vyšší v Karviné ( $P < 0.001$ ) a dle očekávání koncentrace sledovaných kontaminantů byly vždy zvýšené v zimním období v obou lokalitách. V případě Karviné hraje zásadní roli její lokalizace v Ostravské pánvi, která patří mezi hlavní průmyslová centra ČR s vysokými koncentracemi atmosferických polutantů. Charakter Ostravské pánve, jejíž tvar může v zimním období přispívat k tvorbě inverzních situací trvajícím i několika týdny, a její těsné geografické sousedství s podobně znečištěným polským Slezskem řadí tuto oblast mezi nejvíce znečištěné v ČR. Hlavní zdroje znečištění zahrnují specifickou regionální průmyslovou výrobu (hlubinná těžba koksovatelného uhlí, hutnictví železa, energetika, chemické provozy aj.), velkou hustotu zástavby s lokálním vytápěním tuhými palivy, rozsáhlou dopravní infrastrukturu, a znečištění z Polska. To jsou pravděpodobné příčiny soustavného porušování státních předpisů a mezinárodních závazků, podle kterých by Česká republika měla zajistit na svém území dodržování stanovených imisních limitů kontaminantů v ovzduší.

## 5.2 Hladiny aduktů DNA

V souvislosti s vyššími koncentracemi PAU byly předpokládány i vyšší hladiny aduktů DNA u novorozenců. Nutné je však dodat, že ty jsou ovlivněny nejen expozicí polycyklickým aromatickým uhlovodíkům, ale i individuálními rozdíly mezi exponovanými subjekty, např. absorbcí dané noxy, její metabolickou aktivací, distribucí v těle, efektivitou detoxifikačních mechanismů, rychlostí a kapacitou reparačních mechanismů (Topinka et al., 2005). Hladiny celkových a B[a]P „like“ aduktů DNA jsou považovány za kvantitativní vyjádření expozice matek polycyklickým aromatickým uhlovodíkům (Tab. 6 a Tab. 7). Nepříliš výrazný signifikantní rozdíl mezi hladinami celkových aduktů DNA při porovnání odběrových období v rámci lokality Karviná (Tab. 7) lze pak vysvětlit tím, že vztah při vyšších expozicích PAU v zimním období a hladinou vzniklých aduktů není lineární. Takovou závislost lze předpokládat pouze při nízkých expozicích (Binkova et al., 1998). Nežádoucí interference vlivu PAU z ovzduší s vlivem kouření byla na počátku studie minimalizována podmínkou, kterou bylo nekuřáctví nastávajících matek. Dále pak ze studie Polachová et al. (2020) vyplynulo, že v letních měsících PAU do organismu vstupují především prostřednictvím stravy, nikoliv dýchací cestou. S blížící se zimou se strava a ovzduší začaly podílet na přísunu PAU přibližně stejnou měrou, aby v zimním období převládla expozice PAU z ovzduší. V Karviné byl tedy pravděpodobně po většinu období přísun PAU do organismu významně vyšší z ovzduší než ze stravy. Z toho kromě jiného

vyplývá, že expozice organismu polycyklickým aromatickým uhlovodíkům nebyla zásadně ovlivněna jinými zdroji než primárně sledovaným znečištěným ovzduším.

### 5.3 Hladiny 8-oxodG a 15-F<sub>2</sub>t-IsoP

Několikanásobné překračování zmíněných limitů se pravděpodobně projevilo v úrovních hladin biomarkerů oxidačního poškození makromolekul. U matek a jejich novorozenců byly patrné významné rozdíly v oxidaci DNA mezi lokalitami jen v zimním období. Tento poznatek podporuje teorii, že hladiny 8-oxodG v moči se zvyšují v souvislosti s rostoucími koncentracemi znečišťujících látek v ovzduší (Tab. 4 a Tab. 5). Zatímco hladiny 8-oxodG v moči byly signifikantně zvýšené u novorozenců z Karviné v porovnání s ČB ( $P < 0.001$ ; Obr. 6B), tak u jejich matek byl trend i přes lepší kvalitu ovzduší v ČB neočekávaně opačný ( $P < 0.05$ ; Obr. 6A). Tato skutečnost může souviset s adaptací dospělého organismu na nepříznivé podmínky prostředí. Výsledek byl podpořen i studii Rössner et al. (2013a; 2013b), ve kterých byly zkoumány i další biomarkery (celkové adukty DNA, chromosomální změny, frekvence mikrojader aj.) v populaci exponované vysokým koncentracím znečišťujících látek v ovzduší, ale stejně jako hladiny 8-oxodG v této disertační práci ani tyto nekorespondovaly s vysokou expozicí znečištěnému ovzduší. To může souviset se změnami v genové expresi u osob exponovaných vyšším hladinám polutantů v ovzduší, jež indukují vyšší aktivitu reparačních mechanismů, a tím snižují hladiny biomarkerů. V návaznosti na studie Rössner et al. (2013a; 2013b) bylo v článku Rössner et al. (2015) zjištěno, že vysoké koncentrace znečišťujících látek nezvyšují počet deregulovaných genů, což může souviset s adaptací lidského organismu na dlouhodobou expozici znečištěnému ovzduší. Na základě poznatků získaných ve zmíněných studiích byla v publikaci Rössnerova et al. (2017) formulována hypotéza mechanismu adaptace na environmentální stresory prostřednictvím nastavení methylace DNA, k němuž může docházet již v prenatálním období.

V případě námi zjištěných zvýšených hladin 8-oxodG u karvinských novorozenců v zimě 2014 ( $P < 0.001$ ; Obr. 6B) hraje roli i fakt, že se z plodu stává novorozenec s nezralým antioxidačním systémem, přičemž dochází k přerušované hypoxii a s ní spjaté nadprodukci ROS (Marseglia et al., 2014). Novorozenci jsou tedy již při porodu a priori vystaveni většímu riziku oxidačního poškození makromolekul, jež může být umocněno působením environmentálních polutantů v důsledku nedokonale vyvinutého dýchacího a imunitního

systemu. To se může projevit zvýšenou nemocností dětí v průběhu dospívání (Sram et al., 2017).

Schopnost buněk adaptovat se na působení škodlivých látek byla prokázána u mnoha organismů. Poprvé byla pozorována u *Escherichia coli* po expozici alkylačním činidlem (Jeggo et al., 1977). Mezi další typy adaptivní odpovědi, jež byly identifikovány u bakterií, patří reakce na tepelný šok a reakce na oxidační stres (Ashburner, 1982). Adaptivní odpověď byla rovněž popsána u mlže *Mytilus edulis* žijících ve vodách kontaminovaných PAU a PM. *Mytilus edulis* z těchto vod vykazovaly podobné úrovně zlomů řetězce DNA jako mlži z jezera, v němž koncentrace PAU byly sedmkrát nižší (Large et al., 2002). Schopnost adaptace byla zjištěna i u tresky *Microgadus tomcod* žijící v řece Hudson s vysokou úrovní znečištění PCB. Ryby vykazovaly po expozici  $^3\text{H}$ - B[a]P pětkrát až desetkrát nižší radioaktivitu vázanou na DNA než ryby z nekontaminovaného místa. Příčinou byla mutace v genu *AHR2*, která způsobila rezistenci vůči genotoxickým účinkům B[a]P u ryb ze znečištěné řeky (Sorrentino et al., 2004). Rovněž potkani, kteří byli po dobu čtyř týdnů exponováni částicím výfukových plynů z diesellových motorů, nevykazovali žádné nepříznivé zdravotní důsledky. Závěrem studie bylo, že dlouhodobé vystavení PM souvisejícím s automobilovým provozem nemusí být škodlivé z důvodu indukce mechanismů adaptivní reakce (Gerlofs-Nijland et al., 2010). Olivieri et al. (1984) pozorovali lidské lymfocyty vystavené nízkým dávkám záření beta ve formě inkorporovaného tritiového thymidinu a došli k závěru, že lymfocyty jsou odolnější vůči chromozomálnímu poškození způsobenému vysokými dávkami rentgenového záření. Autoři předpokládali, že za tuto adaptaci je odpovědná indukce v opravě DNA. V souladu s principem adaptivní odpovědi, kdy dochází ke zvýšení rezistence organismu vůči vyšší dávce kontaminantu po předchozí opakované expozici jeho nízkým dávkám, je i závěr studie Rössner et al. (2011) v níž bylo zjištěno, že lidé na Ostravsku, kteří jsou dlouhodobě vystaveni vysokým koncentracím PAU, se dokázali těmto škodlivým látkám přizpůsobit. Poškození DNA u ostravské populace bylo menší než u kontrolní skupiny vystavené nižším hladinám znečištění ovzduší. Pomocí analýzy genové exprese pak bylo zjištěno, že adaptace ostravské populace v porovnání s kontrolní skupinou spočívala pravděpodobně ve zvýšené aktivitě reparačního genu *XRCC5*, který se podílí na opravě DNA. Z dlouhodobého hlediska je však adaptivní odpověď pravděpodobně pro organismus škodlivá, protože může být spojená se zvýšenou nemocností a úmrtností ve vyšším věku. Hypotéza této disertační práce, podle níž expozice vyšším koncentracím polutantů bude mít za následek indukci oxidačního

poškození DNA, se při porovnání hladin 8-oxodG u matek mezi lokalitami nepotvrdil. Výsledek ukazující nižší hladiny 8-oxodG u osob z Karviné (Obr. 6A) může souviset se zmíněnou adaptací dospělého organismu na znečištěné ovzduší. Pro potvrzení tohoto závěru by však bylo nutné provést další molekulárně biologické analýzy, které by mohly být součástí navazujícího projektu.

I když u matek nebyly mezi lokalitami zaznamenány signifikantní rozdíly v hladinách 15-F<sub>2t</sub>-IsoP, trend změn hladin tohoto biomarkeru byl analogický s hladinami 8-oxodG (Obr. 6C a Obr. 6A). V plazmě novorozenců z ČB byly v letním období 2013 naměřeny významně vyšší hodnoty 15-F<sub>2t</sub>-IsoP než u novorozenců z Karviné ( $P < 0.001$ ; Obr. 6D). Statisticky významně vyšší peroxidace lipidů by v tomto případě mohla souviset s užitím dané anestezie, v jejichž preferenci se porodnice obou lokalit významně odlišovaly (Tab. 14; Tab. 15). Ke srovnatelnému zvýšení hladin 8-oxodG u této skupiny novorozenců však v období léto 2013 nedošlo (Obr. 6B). Zjištěnou diskrepanci lze vysvětlit tím, že placenta, bohatá na PUFA, je primárním cílem působení ROS. 15-F<sub>2t</sub>-IsoP uvolněné z placenty vstupuje do pupečnickové krve, v níž byl biomarker stanovován. Samotná antioxidační kapacita plodu/novorozence je nedostatečná a je podmíněna především stravovacími návyky matky (příjmem nízkomolekulárních antioxidantů, např. kyselina askorbová, tokoferol,  $\beta$ -karoten, ubichinon) (Robles et al., 2001; Upadhyaya et al., 2005). Primární efekt ROS na organismus plodu/novorozence může být eliminován prostřednictvím maternální antioxidační aktivity, jež je během porodu sdílena mezi matkou a plodem (Arikan et al., 2001). Při působení ROS na DNA novorozenců jsou již jejich hladiny nižší, což vede ke sníženým hladinám 8-oxodG ve srovnání s 15-F<sub>2t</sub>-IsoP. V zimě 2014 byl však trend hladin obou parametrů oxidačního poškození srovnatelný. Lze se domnívat, že významnou úlohu hrálo v tomto období znečištěné ovzduší, v jehož důsledku došlo ke zvýšené produkci ROS, které vyčerpaly kapacitu maternálních antioxidačních mechanismů. Výsledkem je vyšší míra oxidace DNA. K výraznějšímu nárůstu hladin 15-F<sub>2t</sub>-IsoP pravděpodobně nedošlo v důsledku rychlého metabolismu této látky ve srovnání s 8-oxodG, jehož hladiny souvisí s pomalejšími procesy odbourávání nukleotidového poolu v buňkách. (Kato et al., 2006). Jiná studie naznačuje, že ačkoli dojde k oxidačnímu poškození makromolekul, rozsah a časové průběhy změn jejich hladin se mohou lišit (England et al., 2000).

Je třeba též zmínit nevýznamný rozdíl v peroxidaci lipidů u novorozenců mezi lokalitami v zimním období 2014 (Obr. 6D). Změny v peroxidaci lipidů však měly stejný trend jako u signifikantního oxidačního poškození DNA u stejných novorozenců v témže

období (Obr. 6B). Porovnání peroxidace lipidů karvinských matek mezi odběrovými obdobími naznačilo nevýznamnou sezonní variabilitu 15-F<sub>2t</sub>-IsoP (Obr. 7C) kopírující trend změn oxidačního poškození DNA (Obr. 7A). Toto zjištění může být opět dáno do souvislosti s přizpůsobením se dospělého organismu vysoké míře znečištění ovzduší a vývojem ochranných mechanismů. Signifikantní variabilita v peroxidaci lipidů mezi odběrovými obdobími nebyla zaznamenána ani u novorozenců z ČB (Obr. 7D). Toto zjištění bylo v rozporu s údaji získanými pro oxidační poškození DNA u této skupiny (Obr. 7B). Vysvětlením může být úroveň znečištění ovzduší v letním období 2013 a v zimním období 2014 v ČB, jež se sice významně lišila, ale koncentrace PM<sub>2.5</sub> a B[a]P pravděpodobně nedosahovaly hodnot, jež by se projeví u obou biomarkerů současně. V Karviné se koncentrace polutantů pohybovaly v obou obdobích na podstatně vyšších úrovních (Tab. 4 a Tab. 5), a i přes nižší sezonní nárůst významně ovlivnily hladiny jak 8-oxodG, tak 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u novorozenců v zimě 2014 (Obr. 7B a Obr. 7D). K vyššímu oxidačnímu poškození makromolekul tedy docházelo u novorozenců narozených v Karviné v období, kdy koncentrace sledovaných polutantů pravidelně dosahovaly vysoce nadlimitních hodnot.

Relevance výsledků je podpořena skutečností, že trendy změn hladin 15-F<sub>2t</sub>-IsoP byly téměř totožné jako koncentrace 8-oxodG. Příčinou několika diskrepancí pak mohou být, kromě výše zmíněných mechanismů, i jiné nezávislé faktory potenciálně indukující epigenetické změny. Mezi ně patří např. životní styl těhotných žen (kouření, stres, psychika, strava), který může ovlivňovat plod (Kanherkar et al., 2014). Epigenetická dispozice je dále podmíněna faktory ze strany otců (Hughes, 2014). Nejvíce studovanou epigenetickou změnou je metylace DNA (Sharma et al. 2010). Tento proces hraje důležitou roli v regulaci genové exprese v důsledku přítomnosti CpG míst v promotorových oblastech genů. Je obvykle spojen s deacetylací histonu, kondenzací chromatinu a následným snížením genové exprese (Donkena et al., 2010). To je způsobeno buď zneprístupněním vazebných míst, jež jsou určena pro transkripční aktivátory (Prendergast and Ziff, 1991), nebo podporou vazby proteinů vážících se na metylovou skupinu, které mohou zprostředkovat represi prostřednictvím interakce s histon deacetylázami (HDAC), jež podporují kondenzaci chromatinu na transkripčně inaktivní konformace (Jones et al., 1998). Rozmístění metylačních skupin na DNA je pro každého člověka charakteristické a jejich množství se liší. Metylace DNA probíhá v prenatálním období, kdy po oplození dochází ke globální demetylaci genomu a následně k „*de novo*“ metylaci, jež má zásadní význam pro diferenciaci buněk a může být ovlivněna celou řadou vnějších faktorů, např. kvalitou

ovzduší, stravovacími návyky, životním stylem, stresem. Nově nastavená úroveň metylace v prenatálním období se v průběhu života může měnit. Změny jsou ale většinou jen velmi pozvolné a mohou být i vratné. Jak již bylo zmíněno, úroveň se může měnit i v souvislosti s různým stupněm znečištění ovzduší, resp. oxidačním stresem, např. epigenetickou inaktivací pomocí metylace promotoru genu *OGGI*, jež kóduje glykosylázu OGG1 uplatňující se při odstranění 8-oxodG (Lahtz and Pfeifer, 2011). Analýza metylace DNA je tedy vhodným přístupem, jenž může objasnit rozdíly v expresi jednotlivých genů u jedinců/novorozenců žijících v různě znečištěných oblastech. Výsledky analýzy však nejsou součástí této disertační práce.

## 5.4 Nezávislé faktory ovlivňující hladiny oxidačních biomarkerů

Pro vyhodnocení asociací mezi oxidačním stresem, koncentracemi znečišťujících látek v ovzduší a významnými nezávislými faktory v rámci obou lokalit byla použita multivariátní regresní analýza. Výsledky u novorozenců ukázaly, že hladiny 8-oxodG byly ovlivněny vybranými proměnnými v kombinaci s expozicí matek PM2.5 a B[a]P mnohem častěji než hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP.

### 5.4.1 Nezávislé faktory: ETS, pohlaví, odběrové období, věk

Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující sledované biomarkery u matek patřilo pasivní kouření v kombinaci s PM2.5, které vedlo ke zvýšení hladin 8-oxodG u novorozenců (Tab. 10). Zde se tak pravděpodobně projevil synergický účinek škodlivých látek, jehož obdoba byla popsána dříve (Perera et al. 2004) u kombinované expozice B[a]P a tabákovému kouři. U matek multivariátní logistická regresní analýza ukázala, že expozice tabákovému kouři v rámci obou lokalit neměla významný vliv na hladiny 8-oxodG a 15-F<sub>2t</sub>-IsoP. Je však třeba zmínit, že do studie byly vybrány pouze nekuřačky. Mezi účastnicemi studie byly však identifikovány matky, které kouřily před těhotenstvím, nebo žily s partnerem-kuřákem ve společné domácnosti. Mezi subjekty z Karviné byla pozorována souvislost mezi hladinami 15-F<sub>2t</sub>-IsoP a expozicí tabákovému kouři (Ambroz et al., 2016, - Tab. 5C a Tab. 5D v příloze 1). Důvodem může být významnější vliv pasivního kouření u osob z této lokality. Případné dopady pasivního kouření se však neprojevily na hladinách 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u novorozenců z Karviné. Aktivní či pasivní kouření i tak významnou měrou ovlivňuje hodnoty sledovaných biomarkerů, kterými je zjišťován vliv znečištěného ovzduší na organismus. Z literatury je

známo, že PAU a další složky tabákového kouře mají schopnost prostupovat přes placentu, a tyto látky byly detekovány ve fetálních a plodových tekutinách (Vande Loock et al., 2012). Stanovení aktivní a pasivní expozice tabákovému kouři bylo v této disertační práci provedeno s cílem ověřit, že případné pozorované změny v hladinách biomarkerů nejsou ovlivněny kouřením.

Dalším faktorem potenciálně ovlivňujícím hladiny 8-oxodG je pohlaví novorozence. U dívek byla pozorována větší pravděpodobnost detekce vyšších hladin 8-oxodG po expozici jejich matek PM<sub>2.5</sub> a B[a]P (Tab. 10). Současná literatura však nepodává vysvětlení tohoto neočekávaného výsledku. Přehledový článek (Ghosh et al., 2007) uvádí, že: (i) plody mužského pohlaví mohou být zvláště citlivé na nitroděložní infekce, protože jejich amniotické membrány jsou náchylnější v důsledku pomalejšího imunologického vývoje ve srovnání s ženskými plody (Hall and Carr-Hill, 1982; Perni et al., 2005); (ii) zvýšená viskozita krve působením PM může mít výraznější účinek na placentu mužského plodu, protože je u těchto plodů častěji pozorována placentární dysfunkce než u ženských plodů (Edwards et al., 2000; Ghidini and Salafia, 2005); (iii) u mužských plodů dochází k pomalejšímu zrání plic (Torday et al., 1981; Catlin et al., 1990). Jelikož PM způsobují oxidační stres a zvyšují propustnost plicního epitelu (Carter et al., 1997; Donaldson et al., 2001), může u mužského plodu docházet k vyššímu oxidačnímu stresu. Další přehledový článek (Lavoie and Tremblay, 2018), který se rovněž zabývá vlivem pohlaví na oxidační stres u novorozenců, vliv pohlaví na hladiny 8-oxodG neuvádí.

Zvýšení hladin 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u novorozenců pak bylo pravděpodobně podmíněno zimní sezónou, a tím vyšší expozicí mateřského organismu polutantům PM<sub>2.5</sub> a B[a]P (Tab. 10). Obdobná analýza provedená u matek naznačuje adaptaci dospělého organismu na negativní působení znečišťujících látek v ovzduší: zvýšené hladiny biomarkerů oxidačního stresu po expozici PM<sub>2.5</sub> a B[a]P byly pozorovány u mladších matek (Tab. 9).

#### **5.4.2 Nezávislé faktory: PM<sub>2.5</sub> a B[a]P**

Multivariátní regresní analýzou byly následně identifikovány nezávislé faktory ovlivňující oxidační poškození makromolekul u novorozenců odděleně v každé lokalitě. Expozice PM<sub>2.5</sub> u matek z Karviné vedla k signifikantně zvýšeným hladinám 8-oxodG a 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u novorozenců. Expozice B[a]P u stejných matek byla spojena se zvýšením hladin 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u novorozenců (Tab. 11A a 11B). To platí pro prostředí s

vysokými koncentracemi atmosferických polutantů. V ČB, i přes zjištěnou signifikantní variabilitu znečištěného ovzduší, nebyl zaznamenán významný vliv expozice PM<sub>2.5</sub> a B[a]P na oxidační poškození makromolekul u novorozenců. Koncentrace PM<sub>2.5</sub> a B[a]P pravděpodobně nedosahovaly hodnot, které by měly biologické dopady.

#### **5.4.3 Nezávislé faktory: způsob porodu a typ užití anestezie**

Statistická analýza dále naznačila možný vliv typu porodu na hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP u novorozenců z ČB (Tab. 11B). U těchto vzorků byla pozorována statisticky významně nižší peroxidace lipidů po porodu císařským řezem (Tab. 13). U subjektů z Karviné byla naopak zjištěna u tohoto typu porodu peroxidace lipidů vyšší. Závěry byly publikovány a porovnány s dalšími studii v článku Velemínský et al. (2016; - příloha 5). Výsledky pozorované u vzorků z ČB byly v souladu s daty jiných autorů. Vysoká míra znečištění ovzduší v Karviné by tak mohla být jediným faktorem, který ovlivňuje peroxidaci lipidů u novorozenců. Při bližší identifikaci nezávislých faktorů bylo však zjištěno, že na peroxidaci lipidů by se mohl podílet i typ aplikované anestezie při porodu, jehož užívání se v rámci lokalit rovněž statisticky významně lišilo (Tab. 14). Multivariátní regresní analýza ukázala, že peroxidace lipidů u novorozenců z ČB byla významně nižší po císařském řezu, jež byl prováděn v celkové anestezii, a významně vyšší u vaginálního porodu nejčastěji realizovaném v lokální anestezii. V případě karvinských novorozenců byla peroxidace lipidů vyšší po císařském řezu s regionálně častěji používanou spinální anestézií a nižší při vaginálním porodu, jež byl v Karviné prováděn bez aplikace anestezie. Odpověď na otázku, který typ porodu nebo typ anestezie představuje vyšší riziko oxidačního poškození lipidů u novorozenců, není na základě existujících dat možné. K tomu by bylo nutné sjednocení lékařských postupů při provádění porodů a použití anestezie.

## **6 Závěr**

V předložené disertační práci byly v souvislosti se znečištěným ovzduším analyzovány biomarkery oxidačního poškození makromolekul (DNA a lipidů) u novorozenců a jejich matek ve dvou lokalitách České republiky lišících se kvalitou ovzduší (Karviná a České Budějovice) a ve dvou odběrových obdobích (léto 2013 a zima 2014). Ve studii byla hodnocena kvalita ovzduší (koncentrace PM<sub>2.5</sub> a B[a]P ve jmenovaných



oblastech) a po stanovení úrovně expozice novorozenců prostřednictvím aduktů DNA byly sledovány jednak hladiny biomarkerů oxidačního poškození makromolekul (8-oxodG, 15-F<sub>2t</sub>-IsoP), a dále pak faktory ovlivňující úrovně zmiňovaných biomarkerů (ETS, pohlaví, typ porodu/anestezie).

Hlavní poznatky jsou:

- Podle očekávání byly vyšší koncentrace polutantů naměřeny v ovzduší v Karviné a v zimním období v obou lokalitách.
- Vyšší oxidační poškození DNA (8-oxodG) bylo pozorováno v zimním období, kdy byly též zjištěny rozdíly mezi lokalitami. U dětí z Karviné byly hladiny 8-oxodG nejvyšší. Expozice PM<sub>2.5</sub> byla významným prediktorem indukce oxidačního poškození DNA u novorozenců.
- Oxidační poškození lipidů (15-F<sub>2t</sub>-IsoP) bylo u matek z obou lokalit srovnatelné v obou odběrových obdobích. Pozorovaný trend změn byl obdobný jako pro oxidační poškození DNA u této skupiny. Nejvyšší oxidační poškození lipidů bylo zjištěno u novorozenců z Karviné v zimním období. Expozice PM<sub>2.5</sub> i B[a]P je významným prediktorem indukce oxidačního poškození lipidů u této skupiny v souvislosti s výrazně znečištěným ovzduším.
- Vliv expozice PM<sub>2.5</sub> a B[a]P na studované biomarkery byly u matek minimální. U karvinských matek je možným vysvětlením indukce adaptivní odpovědi.
- Poškození DNA ve formě celkových aduktů DNA bylo významně vyšší u novorozenců z Karviné v obou odběrových obdobích. Hladiny tohoto biomarkeru biologicky efektivní dávky mohou tak u novorozenců být považovány za kvantitativní vyjádření expozice matek PAU.
- Rozdíly v oxidačním stresu vyvolaném způsobem porodu (císařský řez vs. vaginální) byly pravděpodobně ovlivněny nejen znečištěným ovzduším, ale i typem použité anestezie.
- V této studii byl pro stanovení hladin 8-oxodG použit protokol, jenž byl v paralelní studii modifikován za účelem co nejvyšší shody s metodou HPLC – MS / MS.

## 7 Literatura

- Adekanle, D. A., Oparinde, D. P., Atiba, A. S., Akitayo, A. A. (2013). Effect of different modes of delivery on cord blood oxidative stress markers. *Int J Biomed Sci*, 9(4), 249.
- Ambroz, A., Vlkova, V., Rössner, P. Jr., Rössnerova, A., Svecova, V., Milcova, A., Pulkrabova, J., Hajslova, J., Veleminsky, M. Jr., Solansky, I., Sram, R. J. (2016). Impact of air pollution on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in mothers and their newborns. *Int J Hyg Environ Health*, 219(6), 545-556.
- Araujo, J. A., Nel, A. E. (2009). Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. *Part Fibre Toxicol*, 6(1), 24.
- Arikan, S., Konukoğlu, D., Arikan, Ç., Akçay, T., Davas, I. (2001). Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Maternal and Cord Blood. *Gynecol Obstet Invest*, 51(3), 145–149.
- Ashburner M. (1982). The effects of heat shock and other stress on gene activity: an introduction. In: Schlesinger M. J., Ashburner M., Tissières A. (eds) *Heat shock proteins: From bacteria to man*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1–9
- Atkinson, R. W., Kang, S., Anderson, H. R., Mills, I. C., Walton, H. A. (2014). Epidemiological time series studies of PM<sub>2.5</sub> and daily mortality and hospital admissions: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*, 69(7), 660–665.
- ATSDR (2019). The ATSDR 2019 Substance Priority List [updated 2020 January 17; cited 2020 April 5]. Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2019spl>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 360438
- Backes, C. H., Nelin, T., Gorr, M. W., Wold, L. E. (2013). Early life exposure to air pollution: how bad is it?. *Toxicol Lett*, 216(1), 47-53.
- Baird, W. M., Hooven, L. A., Mahadevan, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen*, 45(2-3), 106-114.
- Barregard, L., Møller, P., Henriksen, T., Mistry, V., Koppen, G., Rossner, P., Jr, Sram, R. J., Weimann, A., Poulsen, H. E., Nataf, R., Andreoli, R., Manini, P., Marczylo, T., Lam, P., Evans, M. D., Kasai, H., Kawai, K., Li, Y. S., Sakai, K., Singh, R., ... Cooke, M. S. (2013). Human and methodological sources of variability in the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Antioxid Redox Signal*, 18(18), 2377–2391.
- Barzilai, A., Yamamoto, K. I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), 1109-1115.
- Beckman, K. B., Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 78(2), 547-581.
- Berkman, C. E., Park, S. B., Wrighton, S. A., Cashman, J. R. (1995). In vitro-in vivo correlations of human (S)-nicotine metabolism. *Biochem Pharmacol*, 50(4), 565-570.

- Binkova, B., Lewtas, J., Miskova, I., Rössner, P., Cerna, M., Mrackova, G., Peterkova, K., Mumford, J., Sram, R. J. (1996). Biomarker studies in northern Bohemia. *Environ Health Perspect*, 104(3), 591-597.
- Binkova, B., Topinka, J., Mrackova, G., Gajdosova, D., Vidova, P., Stavkova, Z., Peterka, V., Pilcik, T., Rimar, V., Dobias, L., Farmer, P. B., Sram, R. J. (1998). Coke oven workers study: the effect of exposure and GSTM1 and NAT2 genotypes on DNA adduct levels in white blood cells and lymphocytes as determined by 32P-postlabelling. *Mutat Res*, 416(1-2), 67-84.
- Binkova, B., Sram, R. J. (2004). The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat Res*, 547(1-2), 109-121.
- Block, M. L., Calderón-Garcidueñas, L. (2009). Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends Neurosci*, 32(9), 506-516.
- Bock, K. W., Köhle, C. (2006). Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol*, 72(4), 393-404.
- Bonassi, S., Taioli, E., Vermeulen, R. (2013). Omics in population studies: a molecular epidemiology perspective. *Environ Mol Mutagen*, 54(7), 455-460.
- Boström, C. E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., Westerholm, R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect*, 110 (Suppl 3), 451-488.
- Cai, J., Zhao, Y., Liu, P., Xia, B., Zhu, Q., Wang, X., Song, Q., Kan, H., Zhang, Y. (2017). Exposure to particulate air pollution during early pregnancy is associated with placental DNA methylation. *Sci Total Environ*, 607, 1103-1108.
- Carter, J. D., Ghio, A. J., Samet, J. M., Devlin, R. B. (1997). Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol*, 146(2), 180-188.
- Catlin, E. A., Powell, S. M., Manganaro, T. F., Hudson, P. L., Ragin, R. C., Epstein, J., Donahoe, P. K. (1990). Sex-specific fetal lung development and müllerian inhibiting substance. *Am Rev Respir Dis*, 141(2), 466-470.
- Choi, H., Rauh, V., Garfinkel, R., Tu, Y., Perera, F. P. (2008). Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. *Environ Health Perspect*, 116(5), 658-665.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2), 3-34.
- CHMI (2020). Dostupné z:  
[http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/info/limity\\_CZ.html](http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/info/limity_CZ.html)
- Cogliano, V. J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Wild, C. P. (2011). Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 103(24), 1827-1839.
- Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*, 50(4-5), 279-289.

- de Melo, J. O., Soto, S. F., Katayama, I. A., Wenceslau, C. F., Pires, A. G., Veras, M. M., Furukawa, L. N., de Castro, I., Saldiva, P. H., Heimann, J. C. (2015). Inhalation of fine particulate matter during pregnancy increased IL-4 cytokine levels in the fetal portion of the placenta. *Toxicol Lett*, 232(2), 475-480.
- Dejmek, J., Solansky, I., Benes, I., Lenicek, J., Sram, R. J. (2000). The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ Health Perspect*, 108(12), 1159-1164.
- Delanghe, J. R., Speeckaert, M. M. (2011). Creatinine determination according to Jaffe—what does it stand for? *NDT Plus*, 4(2), 83-86.
- Dempsey, D., Jacob, P., Benowitz, N. L. (2002). Accelerated metabolism of nicotine and cotinine in pregnant smokers. *J Pharmacol Exp Ther*, 301(2), 594-598.
- Dennerly, P. A. (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 81(3), 155-162.
- Dipple, A. (1995). DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 16(3), 437-441.
- Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett*, 327(1-2), 26-47.
- Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A., MacNee, W. (2001). Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect*, 109(4), 523-527.
- Donkena, K. V., Young, C. Y., Tindall, D. J. (2010). Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. *Obstet Gynecol Int*, 2010:302051
- Edwards, A., Megens, A., Peek, M., Wallace, E. M. (2000). Sexual origins of placental dysfunction. *Lancet*, 355(9199), 203-204.
- England, T., Beatty, E., Rehman, A., Nourooz-Zadeh, J., Pereira, P., O'Reilly, J., Wiseman, H., Geissler, C., Halliwell, B. (2000). The steady-state levels of oxidative DNA damage and of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) are not correlated in healthy human subjects. *Free Radic Res*, 32(4), 355-362.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*, 567(1), 1-61.
- Evans, M. D., Saporbaev, M., Cooke, M. S. (2010). DNA repair and the origins of urinary oxidized 2'-deoxyribonucleosides. *Mutagenesis*, 25(5), 433-442.
- Evans, M. D., Mistry, V., Singh, R., Gackowski, D., Róžalski, R., Siomek-Gorecka, A., Phillips, D. H., Zuo, J., Mullenders, L., Pines, A., Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sekiguchi, M., Tsuzuki, T., Bignami, M., Olinski, R., Cooke, M. S. (2016). Nucleotide excision repair of oxidised genomic DNA is not a source of urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Free Radic Biol Med*, 99, 385-391.
- Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J. (2005). Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 338(1), 311-317.
- Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K. (2010). Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86(1), 40-53.

- Gallo, C., Renzi, P., Loizzo, S., Loizzo, A., Piacente, S., Festa, M., Caputo, M., Tecce, M. F., Capasso, A. (2010). Potential therapeutic effects of vitamin E and C on placental oxidative stress induced by nicotine: an in vitro evidence. *Open Biochem J*, 4, 77.
- Gerlofs-Nijland, M. E., Totlandsdal, A. I., Kiliç, E., Boere, A. J. F., Fokkens, P. H., Leseman, D. L., Sioutas, C., Schwarze, P. E., Spronk, H. M., Hadoke, P. W., Miller, M. R., Cassee, F. R. (2010). Pulmonary and cardiovascular effects of traffic-related particulate matter: 4-week exposure of rats to roadside and diesel engine exhaust particles. *Inhal Toxicol*, 22(14), 1162-1173.
- Ghidini, A., Salafia, C. M. (2005). Gender differences of placental dysfunction in severe prematurity. *BJOG*, 112(2), 140-144.
- Ghosh, R., Rankin, J., Pless-Mullooli, T., Glinianaia, S. (2007). Does the effect of air pollution on pregnancy outcomes differ by gender? A systematic review. *Environ Res*, 105(3), 400-408.
- Gitto, E., Pellegrino, S., Gitto, P., Barberi, I., Reiter, R. J. (2009). Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res*, 46(2), 128-139.
- Godschalk, R. W., Van Schooten, F. J., Bartsch, H. (2003). A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds. *J Biochem Mol Biol*, 36(1), 1-11.
- Grevendonk, L., Janssen, B. G., Vanpoucke, C., Lefebvre, W., Hoxha, M., Bollati, V., Nawrot, T. S. (2016). Mitochondrial oxidative DNA damage and exposure to particulate air pollution in mother-newborn pairs. *Environ Health*, 15(1), 10.
- Gündel, J., Schaller, K. H., Angerer, J. (2000). Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a fireproof stone producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3- and 4-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxybenzo (a) anthracene and 3-hydroxybenzo (a) pyrene. *Int Arch Occup Environ Health*, 73(4), 270-274.
- Hall, M. H., Carr-Hill, R. (1982). Impact of sex ratio on onset and management of labour. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 285(6339), 401-403.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2015). Free radicals in biology and medicine (Fifth Edition). *Oxford University Press, USA*, ISBN: 978-0-19-871747-8
- Hanzalova, K., Rössner, P. Jr., Sram, R. J. (2010). Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter. *Mutat Res*, 696(2), 114-121.
- He, T., Zhu, J., Wang, J., Ren, X., Cheng, G., Liu, X., Ma, Q., Zhang, Y., Li, Z., Ba, Y. (2018). Ambient air pollution, H19/DMR methylation in cord blood and newborn size: A pilot study in Zhengzhou City, China. *Chemosphere*, 212, 863-871.
- Heinrich, J., Slama, R. (2007). Fine particles, a major threat to children. *Int J Hyg Environ Health*, 210(5), 617-622.
- Hinds, W. C. (1999). Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles (Second Edition). *John Wiley & Sons Inc., NY*, ISBN: 978-0-471-19410-1
- Hoesel, B., Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*, 12(1), 86.

- Honkova, K., Rössnerova, A., Pavlikova, J., Svecova, V., Klema, J., Topinka, J., Milcova, A., Libalova, H., Choi, H., Veleminsky, M., Sram, R. J., Rössner, P. Jr. (2018). Gene expression profiling in healthy newborns from diverse localities of the Czech Republic. *Environ Mol Mutagen*, 59(5), 401-415.
- Hughes, V. (2014). Epigenetics: The sins of the father. *Nature*, 507(7490), 22-24.
- Hukkanen, J., Jacob, P., Benowitz, N. L. (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*, 57(1), 79-115.
- Hussar, E., Richards, S., Lin, Z. Q., Dixon, R. P., Johnson, K. A. (2012). Human health risk assessment of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of Chattanooga, Tennessee, USA. *Water Air Soil Pollut*, 223(9), 5535-5548.
- IARC (2010). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human. Some Nonheterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures (Vol. 92). Dostupné z: <http://publications.iarc.fr/110>
- IARC (2012). Monographs on the Identification of Carcinogenic hazards to humans. [updated 2020 March 03; cited 2020 April 05]. Dostupné z: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- Inanc, F., Kilinc, M., Kiran, G., Guven, A., Kurutas, E. B., Cikim, I. G., Akyol, O. (2005). Relationship between oxidative stress in cord blood and route of delivery. *Fetal Diagn Ther*, 20(5), 450-453.
- Jaffe, M. (1886). Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 10(5), 391-400.
- Jeggo, P., Defais, M., Samson, L., Schendel, P. (1977). An adaptive response of E. coli to low levels of alkylating agent: comparison with previously characterised DNA repair pathways. *Mol Gen Genet*, 157(1), 1-9.
- Jongeneelen, F. J., Bos, R. P., Anzion, R. B., Theuws, J. L., Henderson, P. T. (1986). Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolites in urine. *Scand J Work Environ Health*, 12(2), 137-143.
- Jones, P. L., Veenstra, G. C. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, 19(2), 187-191.
- Kanherkar, R. R., Bhatia-Dey, N., Csoka, A. B. (2014). Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol*, 2, 49.
- Kato, I., Ren, J., Heilbrun, L. K., Djuric, Z. (2006). Intra-and inter-individual variability in measurements of biomarkers for oxidative damage in vivo: Nutrition and Breast Health Study. *Biomarkers*, 11(2), 143-152.
- Kessel, M., Liu, S. X., Xu, A., Santella, R., Hei, T. K. (2002). Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mol Cell Biochem*, 234-235(1-2), 301-8
- Klawitter, J., Haschke, M., Shokati, T., Klawitter, J., Christians, U. (2011). Quantification of 15-F<sub>2</sub>t-isoprostane in human plasma and urine: results from enzyme-linked immunoassay and liquid chromatography/tandem mass spectrometry cannot be compared. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 25(4), 463-468.
- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res*, 711(1-2), 193-201.

- Lahtz, C., Pfeifer, G. P. (2011). Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J Mol Cell Biol*, 3(1), 51-58.
- Langone, J. J., Vanvunakis, H. (1982). Radioimmunoassay of nicotine, cotinine, and  $\gamma$ -(3-Pyridyl)- $\gamma$ -oxo-N-methylbutyramide. *Methods Enzymol*, 84, 628-640.
- Large, A. T., Shaw, J. P., Peters, L. D., McIntosh, A. D., Webster, L., Mally, A., Chipman, J. K. (2002). Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Res*, 54(3-5), 493-497.
- Larsen, E. L., Weimann, A., Poulsen, H. E. (2019). Interventions targeted at oxidatively generated modifications of nucleic acids focused on urine and plasma markers. *Free Radic Biol Med*, 145, 256-283
- Lavoie, J. C., Tremblay, A. (2018). Sex-specificity of oxidative stress in newborns leading to a personalized antioxidant nutritive strategy. *Antioxidants*, 7(4), 49.
- Lee, A. J., Hodges, N. J., Chipman, J. K. (2005). Interindividual Variability in Response to Sodium Dichromate-Induced Oxidative DNA Damage: Role of the Ser326Cys Polymorphism in the DNA-Repair Protein of 8-Oxo-7, 8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine DNA Glycosylase 1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(2), 497-505.
- Lee, B. J., Kim, B., Lee, K. (2014). Air pollution exposure and cardiovascular disease. *Toxicol Res*, 30(2), 71-75.
- Lee, Y. Y., Galano, J. M., Oger, C., Vigor, C., Guillaume, R., Roy, J., Le Guennec, J. Y., Durand, T., Lee, J. C. (2016). Assessment of isoprostanes in human plasma: technical considerations and the use of mass spectrometry. *Lipids*, 51(11), 1217-1229.
- Lewtas, J., Gallagher, J. (1990). Complex mixtures of urban air pollutants: identification and comparative assessment of mutagenic and tumorigenic chemicals and emission sources. *IARC Sci Publ*, (104), 252-260.
- Li, N., Hao, M., Phalen, R. F., Hinds, W. C., Nel, A. E. (2003). Particulate air pollutants and asthma: a paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol*, 109(3), 250-265.
- Lieber, M. R., Yu, K., Raghavan, S. C. (2006). Roles of nonhomologous DNA end joining, V (D) J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)*, 5(9-10), 1234-1245.
- Lin, C., Yon, J. M., Hong, J. T., Lee, J. K., Jeong, J., Baek, I. J., Lee, B. J., Yun, Y. W., Nam, S. Y. (2014). 4-O-methylhonokiol Inhibits Serious Embryo Anomalies Caused by Nicotine via Modulations of Oxidative Stress, Apoptosis, and Inflammation. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 101(2), 125-134.
- Lin, C. H., Huang, X., Kolbanovskii, A., Hingerty, B. E., Amin, S., Broyde, S., Geacintov, N. E., Patel, D. J. (2001). Molecular topology of polycyclic aromatic carcinogens determines DNA adduct conformation: a link to tumorigenic activity. *J Mol Biol*, 306(5), 1059-1080.
- Lipsett, J., Tamblyn, M., Madigan, K., Roberts, P., Cool, J. C., Runciman, S. I., McMillen, I. C., Robinson, J., Owens, J. A. (2006). Restricted fetal growth and lung development: a morphometric analysis of pulmonary structure. *Pediatr Pulmonol*, 41(12), 1138-1145.

- Loft, S., Poulsen, H. E. (1999). Markers of oxidative damage to DNA: antioxidants and molecular damage. *Methods Enzymol*, 300, 166-184.
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., & International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC (2013). The carcinogenicity of outdoor air pollution. *The Lancet. Oncology*, 14(13), 1262–1263.
- Lu, Y., Wahl, L. M. (2005). Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J Immunol*, 175(8), 5423-5429.
- Manchester, D. K., Bowman, E. D., Parker, N. B., Caporaso, N. E., Weston, A. (1992). Determinants of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta. *Cancer Res*, 52(6), 1499-1503.
- Marlowe, J. L., Puga, A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *Cell Biochem*, 96(6), 1174-1184.
- Marseglia, L., D'Angelo, G., Manti, S., Arrigo, T., Barberi, I., Reiter, R. J., Gitto, E. (2014). Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 358375.
- Martens, D. S., Cox, B., Janssen, B. G., Clemente, D. B., Gasparini, A., Vanpoucke, C., Lefebvre, W., Roels, H. A., Plusquin, M., Nawrot, T. S. (2017). Prenatal air pollution and newborns' predisposition to accelerated biological aging. *JAMA Pediatr*, 171(12), 1160-1167.
- Martin-Gronert, M. S., Ozanne, S. E. (2007). Experimental IUGR and later diabetes. *J Intern Med*, 261(5), 437-452.
- Messina, E. S., Tyndale, R. F., Sellers, E. M. (1997). A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*, 282(3), 1608-1614.
- Mills, N. L., Donaldson, K., Hadoke, P. W., Boon, N. A., MacNee, W., Cassee, F. R., Sandström, T., Blomberg, A., Newby, D. E. (2009). Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 6(1), 36-44.
- Modica, R., Fiume, M., Guaitani, A., Bartosek, I. (1983). Comparative kinetics of benz (a) anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration: I. Study with single compounds. *Toxicol Lett*, 18(1-2), 103-109.
- Møller, P., Loft, S. (2010). Oxidative damage to DNA and lipids as biomarkers of exposure to air pollution. *Environ Health Perspect*, 118(8), 1126-1136.
- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F., Roberts, L. J. 2nd (1990). A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(23), 9383-9387.
- Morrow, J. D., Awad, J. A., Boss, H. J., Blair, I. A., Roberts, L. J. (1992). Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(22), 10721-10725.



- Murr, L. E., Garza, K. M. (2009). Natural and anthropogenic environmental nanoparticulates: Their microstructural characterization and respiratory health implications. *Atmos Environ*, 43(17), 2683-2692.
- Myatt, L., Cui, X. (2004). Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*, 122(4), 369-382.
- Natarajan, A. T., Palitti, F. (2008). DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat Res*, 657(1), 3-7.
- Nepomnyaschy, L., Reichman, N. E. (2006). Low birthweight and asthma among young urban children. *Am J Public Health*, 96(9), 1604-1610.
- Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med*, 47(5), 469-484.
- Nisbet, I. C., Lagoy, P. K. (1992). Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul Toxicol Pharmacol*, 16(3), 290-300.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113(7), 823-839.
- Obolenskaya, M. Y., Teplyuk, N. M., Divi, R. L., Poirier, M. C., Filimonova, N. B., Zadrozna, M., Pasanen, M. J. (2010). Human placental glutathione S-transferase activity and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts as biomarkers for environmental oxidative stress in placentas from pregnant women living in radioactivity-and chemically-polluted regions. *Toxicol Lett*, 196(2), 80-86.
- O'Callaghan-Gordo, C., Fthenou, E., Pedersen, M., Espinosa, A., Chatzi, L., Beelen, R., Chalkiadaki, G., Decordier, I., Hoek, G., Merlo, D. F., Nieuwenhuijsen, M., Roumeliotaki, T., Vafeidai, M., Vande Loock, K., Kleinjans, J., Stephanou, E., Kirsch-Volders, M., Kogevinas, M. (2015). Outdoor air pollution exposures and micronuclei frequencies in lymphocytes from pregnant women and newborns in Crete, Greece (Rhea cohort). *Environ Res*, 143, 170-176.
- Ogawa, H., Tominaga, S., Hori, K., Noguchi, K., Kanou, I., Matsubara, M. (1991). Passive smoking by pregnant women and fetal growth. *J Epidemiol Community Health*, 45(2), 164-168.
- Olivieri, G., Bodycote, J., Wolff, S. (1984). Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science*, 223(4636), 594-597.
- Pedersen, M., Wichmann, J., Autrup, H., Dang, D. A., Decordier, I., Hvidberg, M., Bossi, R., Jakobsen, J., Loft, S., Knudsen, L. E. (2009). Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. *Environ Res*, 109(8), 1012-1020.
- Penning, T. M. (2014). Human aldo-keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol*, 27(11), 1901-1917.
- Perera, F. P., Rauh, V., Whyatt, R. M., Tsai, W. Y., Bernert, J. T., Tu, Y. H., Andrews, H., Ramirez, J., Qu, L., Tang, D. (2004). Molecular evidence of an interaction between prenatal environmental exposures and birth outcomes in a multiethnic population. *Environ Health Perspect*, 112(5), 626-630.

- Perni, S. C., Vardhana, S., Kalish, R., Chasen, S., Witkin, S. S. (2005). Clara cell protein 16 concentration in mid-trimester amniotic fluid: association with fetal gender, fetal G>A+ 38 CC16 gene polymorphism and pregnancy outcome. *J Reprod Immunol*, 68(1-2), 85-90.
- Perrone, S., Laschi, E., Buonocore, G. (2019). Biomarkers of oxidative stress in the fetus and in the newborn. *Free Radic Biol Med*, 142, 23-31
- Polachova, A., Gramblicka, T., Parizek, O., Sram, R. J., Stupak, M., Hajslova, J., Pulkrabova, J. (2020). Estimation of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) based on the dietary and outdoor atmospheric monitoring in the Czech Republic. *Environ Res*, 182, 108977.
- Pollack, M., Leeuwenburgh, C. (1999). Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease. In: Sen C. K., Packer, L., Hänninen O. (eds) *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier Science BV, 881-923.
- Pöschl, U. (2005). Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(46), 7520-7540.
- Poulsen, H. E., Nadal, L. L., Broedbaek, K., Nielsen, P. E., Weimann, A. (2014). Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta*, 1840(2), 801-808.
- Prendergast, G. C., Ziff, E. B. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science*, 251(4990), 186-189.
- Proietti, E., Rösli, M., Frey, U., Latzin, P. (2013). Air pollution during pregnancy and neonatal outcome: a review. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 26(1), 9-23.
- Pulkrabova, J., Stupak, M., Svarcova, A., Rössner, P., Rössnerova, A., **Ambroz, A.**, Sram, R. J., Hajslova, J. (2016). Relationship between atmospheric pollution in the residential area and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human breast milk. *Sci Total Environ*, 562, 640-647.
- Ravindra, K., Sokhi, R., Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ*, 42(13), 2895-2921.
- Roberts II, L. J., Morrow, J. D. (2000). Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med*, 28(4), 505-513.
- Robles, R., Palomino, N., Robles, A. (2001). Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev*, 65, S75-81.
- Rosenblum, J. S., Gilula, N. B., Lerner, R. A. (1996). On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9), 4471-4473.
- Rössner, P. Jr., Tabashidze, N., Dostal, M., Novakova, Z., Chvatalova, I., Spatova, M., Sram, R. J. (2011). Genetic, biochemical, and environmental factors associated with pregnancy outcomes in newborns from the Czech Republic. *Environ Health Perspect*, 119(2), 265-271.
- Rössner, P. Jr., Uhlirova, K., Beskid, O., Rössnerova, A., Svecova, V., Sram, R. J. (2011). Expression of XRCC5 in peripheral blood lymphocytes is upregulated in subjects from a heavily polluted region in the Czech Republic. *Mutat Res*, 713(1-2), 76-82.

- Rössner, P. Jr., Mistry, V., Singh, R., Sram, R. J., Cooke, M. S. (2013). Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine values determined by a modified ELISA improves agreement with HPLC–MS/MS. *Biochem Biophys Res Commun*, 440(4), 725-730.
- Rössner, P. Jr., Svecova, V., Schmuczerova, J., Milcova, A., Tabashidze, N., Topinka, J., Pastorkova, A., Sram, R. J. (2013a). Analysis of biomarkers in a Czech population exposed to heavy air pollution. Part I: bulky DNA adducts. *Mutagenesis*, 28(1), 89-95.
- Rössner, P. Jr., Rössnerova, A., Spatova, M., Beskid, O., Uhlirova, K., Libalova, H., Solansky, I., Topinka, J., Sram, R. J. (2013b). Analysis of biomarkers in a Czech population exposed to heavy air pollution. Part II: chromosomal aberrations and oxidative stress. *Mutagenesis*, 28(1), 97-106.
- Rössner, P. Jr., Tulupova, E., Rössnerova, A., Libalova, H., Honkova, K., Gmuender, H., Pastorkova, A., Svecova, V., Topinka, J., Sram, R. J. (2015). Reduced gene expression levels after chronic exposure to high concentrations of air pollutants. *Mutat Res*, 780, 60-70.
- Rössner, P. Jr., Orhan, H., Koppen, G., Sakai, K., Santella, R. M., **Ambroz, A.**, Rössnerova, A., Sram, R. J., Ciganek, M., Neca, J., Arzuk, E., Mutlu, N., Cook, M. S. (2016). Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine analysis by an improved ELISA: an inter-laboratory comparison study. *Free Radic Biol Med*, 95, 169-179.
- Rössner, P. Jr., Libalova, H., Cervena, T., Vrbova, K., Elzeinova, F., Milcova, A., Rössnerova, A., Novakova, Z., Ciganek, M., Pokorna, M., **Ambroz, A.**, Topinka J. (2019). The processes associated with lipid peroxidation in human embryonic lung fibroblasts, treated with polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extract from particulate matter. *Mutagenesis*, 34(2), 153-164.
- Rössnerova, A., Spatova, M., Pastorkova, A., Tabashidze, N., Veleminsky Jr, M., Balascak, I., Solansky, I., Sram, R. J. (2011). Micronuclei levels in mothers and their newborns from regions with different types of air pollution. *Mutat Res*, 715(1-2), 72-78.
- Rössnerova, A., Pokorna, M., Svecova, V., Sram, R. J., Topinka, J., Zölzer, F., Rössner P. Jr. (2017). Adaptation of the human population to the environment: Current knowledge, clues from Czech cytogenetic and “omics” biomonitoring studies and possible mechanisms. *Mutat Res*, 773, 188-203.
- Ruder, E. H., Hartman, T. J., Blumberg, J., Goldman, M. B. (2008). Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update*, 14(4), 345-357.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, 38(7), 995-1014.
- Sharma, S., Kelly, T. K., Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36.
- Shebuski, R. J., Kilgore, K. S. (2002). Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(3), 729-735.
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annu Rev Biochem*, 86, 715-748.
- Singh, L., Agarwal, T., Simal-Gandara, J. (2020). PAHs, diet and cancer prevention: Cooking process driven-strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 487-506

- Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci*, 95(1), 1-6.
- Shou, Y., Huang, Y., Zhu, X., Liu, C., Hu, Y., Wang, H. (2019). A review of the possible associations between ambient PM<sub>2.5</sub> exposures and the development of Alzheimer's disease. *Ecotoxicol Environ Saf*, 174, 344-352.
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2004/107/ES o obsahu arsenu, kadmia, rtuti, niklu a polycyklických aromatických uhlovodíků ve vnějším ovzduší. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?qid=1586073024363&uri=CELEX%3A32004L0107>
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/50/ES o kvalitě vnějšího ovzduší a čistším ovzduší pro Evropu. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32008L0050>
- Song, L., Zhang, B., Liu, B., Wu, M., Zhang, L., Wang, L., Xu, S., Cao, Z., Wang, Y. (2019). Effects of maternal exposure to ambient air pollution on newborn telomere length. *Environ Int*, 128, 254-260.
- Sørensen, M., Autrup, H., Møller, P., Hertel, O., Jensen, S. S., Vinzents, P., Knudsen, L. E., Loft, S. (2003). Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res*, 544(2-3), 255-271.
- Sorrentino, C., Roy, N. K., Chambers, R. C., Courtenay, S. C., Wirgin, I. (2004). B[a]P-DNA binding in early life-stages of Atlantic tomcod: population differences and chromium modulation. *Mar Environ Res*, 58(2-5), 383-388.
- Sparfel, L., Pinel-Marie, M. L., Boize, M., Koscielny, S., Desmots, S., Pery, A., Fardel, O. (2010). Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo (a) pyrene. *Toxicol Sci*, 114(2), 247-259.
- Sram, R. J., Binkova, B. (2000). Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997-1999. *Environ Health Perspect*, 108(1), 57-70.
- Sram, R. J., Binkova, B., Dejmek, J., Chvatalova, I., Solansky, I., Topinka, J. (2006). Association of DNA adducts and genotypes with birth weight. *Mutat Res*, 608(2), 121-128.
- Sram, R. J., Binkova, B., Rössner P. (2007). Využití biomarkerů pro hodnocení genotoxicity a karcinogenity chemických látek. *Ochrana ovzduší*, 5-6, s. 24-28.
- Sram, R. J., Ambroz, A., Dostal, M., Honkova, K., Hajslova, J., Pulkrabova, J., Urbancová, K., Kosek, V., Veleminsky, M. Jr., (2017) The Ostrava region, Czech Republic: Impact of air pollution on children's health. *Public Health Panorama*, 3(02), 156-164.
- Stiborova M., Miksanova M. (1999). Molekulární mechanismus kancerogeneze, *Živa*, 4, 146
- Stipek S. (2000). Volné radikály a antioxidanty ve zdraví i nemoci; Grada, Praha, ISBN 80-7169-704-4
- Svecova, V., Rossner, P., Jr, Dostal, M., Topinka, J., Solansky, I., Sram, R. J. (2009). Urinary 8-oxodeoxyguanosine levels in children exposed to air pollutants. *Mutat Res*, 662(1-2), 37-43.

- Topinka, J., Binkova, B., Mrackova, G., Stavkova, Z., Peterka, V., Benes, I., Dejmek, J., Lenicek, J., Pilcik, T., Sram, R. J. (1997). Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on placental DNA adducts in an environmentally exposed population. *Environ Mol Mutagen*, 30(2), 184-195.
- Topinka, J., Binkova, B., Chvatalova, I., Lnenickova, I., Milcova, A., Sevastyanova, O., Solansky, I., Novakova, Z., Sram, R. J. (2005). Možnosti využití DNA aduktů jako biomarkeru expozice karcinogenům v ovzduší: Studie na městských strážnicích v Praze. *Ochrana ovzduší*, 5-6, s. 26-31
- Topinka, J., Milcova, A., Libalova, H., Novakova, Z., Rössner, P. Jr., Balascak, I., Sram, R. J. (2009). Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part I: bulky DNA adducts. *Mutat Res*, 669(1-2), 13-19.
- Topinka, J., Rössner, P. Jr., Milcova, A., Schmučerova, J., Svecova, V., Sram, R. J. (2011). DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM<sub>2.5</sub> in an acellular assay. *Toxicol Lett*, 202(3), 186-192.
- Torday, J. S., Nielsen, H. C., Fencl, M. D. M., Avery, M. E. (1981). Sex differences in fetal lung maturation. *Am Rev Respir Dis*, 123(2), 205-208.
- Tsamou, M., Vrijens, K., Madhloum, N., Lefebvre, W., Vanpoucke, C., Nawrot, T. S. (2018). Air pollution-induced placental epigenetic alterations in early life: a candidate miRNA approach. *Epigenetics*, 13(2), 135-146.
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., Margioris, A. N. (2006). Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(10), 1654-1661.
- Upadhyaya, C., Mishra, S., Singh, P. P., Sharma, P. (2005). Antioxidant status and peroxidative stress in mother and newborn — A pilot study. *Indian J Clin Biochem*, 20(1), 30–34.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1), 1-40.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., Loridas, S. (2013). Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*, 10(9), 3886-3907.
- van den Hooven, E. H., Pierik, F. H., de Kluizenaar, Y., Hofman, A., van Ratingen, S. W., Zandveld, P. Y., Russcher, H., Lindemans, J., Miedema, H. M., Steegers, E. A., Jaddoe, V. W. (2012). Air pollution exposure and markers of placental growth and function: the generation R study. *Environ Health Perspect*, 120(12), 1753–1759.
- van Wassenaer, A. (2005). Neurodevelopmental consequences of being born SGA. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2(3), 372-377.
- Vande Loock, K., Ciardelli, R., Decordier, I., Plas, G., Haumont, D., Kirsch-Volders, M. (2012). Preterm newborns show slower repair of oxidative damage and paternal smoking associated DNA damage. *Mutagenesis*, 27(5), 573-580.
- Velemínský, M. Jr., Ambroz, A., Rössner, P. Jr., Rössnerová, A., Svecova, V., Milcova, A., Dostal, M., Pastorkova, A., Pulkrabova, J., Hajslova, J., Solansky, I., Hanzl, M., Sram R. J. (2016). Oxidative stress in newborns by different modes of delivery. *Neuro Endocrinol Lett*, 37(6), 445-451.

- Weiss, J. M., Goode, E. L., Ladiges, W. C., Ulrich, C. M. (2005). Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog*, 42(3), 127-141.
- Whyatt, R. M., Santella, R. M., Jedrychowski, W., Garte, S. J., Bell, D. A., Ottman, R., Gladek-Yarborough, A., Cosma, G., Young, T. L., Cooper, T. B., Randall, M. C., Manchester, D. K., Perera, F. P. (1998). Relationship between ambient air pollution and DNA damage in Polish mothers and newborns. *Environ Health Perspect*, 106(3), 821-826.
- WHO (2000). Air quality guidelines for Europe. *WHO Regional Publications, European Series*, No. 91
- WHO Occupational and Environmental Health Team (2006). Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide: global update 2005: summary of risk assessment. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69477>
- WHO (2010). WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants. *WHO Regional Office for Europe*, 289-346.
- Wisdom, S. J., Wilson, R., McKillop, J. H., Walker, J. J. (1991). Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol*, 165(6), 1701-1704.
- Xu, C., Li, C. Y. T., Kong, A. N. T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res*, 28(3), 249-268.
- Yao, Z., Mishra, L. (2009). Cancer stem cells and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 8(18), 1691-1698.
- Yan, W., Byrd, G. D., Ogden, M. W. (2007). Quantitation of isoprostane isomers in human urine from smokers and nonsmokers by LC-MS/MS. *J Lipid Res*, 48(7), 1607-1617.
- Vakilian, K., Ranjbar, A., Zarganjfard, A., Mortazavi, M., Vosough-Ghanbari, S., Mashaiee, S., Abdollahi, M. (2009). On the relation of oxidative stress in delivery mode in pregnant women; a toxicological concern. *Toxicol Mech Methods*, 19(2), 94-99.
- Zákon o ochraně ovzduší 201/2012 Sb; vyhláška 330/2012 Sb. Dostupné z: <https://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?cz=201&r=2012>

## 8 Prohlášení o podílu činnosti na metodách a na přiložených publikacích

### *Příloha 1*

**Ambroz, A.**, Vlkova, V., Rössner P. Jr., Rössnerova, A., Svecova, V., Milcova, A., ... & Sram, R. J. (2016). Impact of air pollution on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in mothers and their newborns. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(6), 545-556.

Prohlašuji, že Antonín Ambrož se podílel na organizaci experimentu, alikvotoval a purifikoval biologické vzorky, stanovoval hladiny biomarkerů oxidačního poškození makromolekul a hladiny biomarkeru aktivního/pasivního kouření, stanovoval hladiny kreatininu. To vše prostřednictvím metody ELISA. Rovněž se podílel se na zpracování hrubých dat pro statistické vyhodnocení. Výsledky pak jím byly ústně či formou posteru prezentovány na několika konferencích. Významně se podílel na napsání rukopisu, jež je jeho prvoautorským.

### *Příloha 2*

Pulkrabova, J., Stupak, M., Svarcova, A., Rössner, P. Jr., Rössnerova, A., **Ambroz, A.**, ... & Hajslova, J. (2016). Relationship between atmospheric pollution in the residential area and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human breast milk. *Science of The Total Environment*, 562, 640-647.

Prohlašuji, že Antonín Ambrož se podílel na preanalytickém zpracování biologického materiálu (moče) určeného k analýzám prováděným na VŠCHT.

### ***Příloha 3***

Rössner, P. Jr., Orhan, H., Koppen, G., Sakai, K., Santella, R. M., **Ambroz, A.**, ... & Cooke, M. S. (2016). Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine analysis by an improved ELISA: an inter-laboratory comparison study. *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 169-179.

Prohlašuji, že Antonín Ambrož analyzoval hladiny 8-oxodG prostřednictvím modifikované metody ELISA, aby pak jím zjištěné hodnoty mohly být porovnány s hodnotami stanovenými v jiných laboratořích. Zodpovídal tedy za výsledky naměřené v laboratoři OGTN. V publikaci se pak podílel na revizi a korekci textu.

### ***Příloha 4***

Rössner, P. Jr., Libalova, H., Cervena, T., Vrbova, K., Elzeinova, F., Milcova, A., Rössnerova, A., Novakova, Z., Ciganek, M., Pokorna, M., **Ambroz, A.**, Topinka J. (2019). The processes associated with lipid peroxidation in human embryonic lung fibroblasts, treated with polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extract from particulate matter. *Mutagenesis*, 34(2), 153-164.

Prohlašuji, že Antonín Ambrož analyzoval hladiny 15-F<sub>2t</sub>-IsoP prostřednictvím metody ELISA. V kontextu všech prováděných analýz (nejen 15-F<sub>2t</sub>-IsoP) pak prezentoval výstupy z publikace na konferencích. V publikaci se podílel na revizi a korekci textu.

### ***Příloha 5***

Veleminsky Jr, M., **Ambroz, A.**, Rössner, P. Jr., Rössnerova, A., Svecova, V., Milcova, A., ... & Sram, R. J. (2016). Oxidative stress in newborns by different modes of delivery. *Neuroendocrinology Letters*, 37(6), 445-451.

Prohlašuji, že Antonín Ambrož se podílel na organizaci metodické části studie, alikvotoval a purifikoval biologické vzorky, stanovoval hladiny biomarkeru oxidačního poškození lipidů (15-F<sub>2t</sub>-IsoP) a hladiny biomarkeru aktivního/pasivního kouření (kotlinin) prostřednictvím metody ELISA. Rovněž se podílel se na zpracování hrubých dat pro statistické vyhodnocení. Prvoutorský článek *Impact of air pollution on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in mothers and their newborns* byl podkladem pro napsání tohoto rukopisu.

RNDr. Pavel Rössner, Ph.D. (školitel)



## **Příloha 1**

**Ambroz, A.,** Vlkova, V., Rössner, P. Jr., Rössnerova, A., Svecova, V., Milcova, A.,  
Pulkrabova, J., Hajslova., J., Veleminsky, M. Jr., Solansky, I., Sram, R. J.

Impact of air pollution on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in mothers and  
their newborns.

*International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2016, 219(6), 545-556.

<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.05.010>

ELSEVIER GMBH, HACKERBRUCKE 6, 80335 MUNICH, GERMANY

ISSN: 1438-4639  
eISSN: 1618-131X

## **Příloha 2**

Pulkrabova, J., Stupak, M., Svarcova, A., Rössner, P. Jr., Rössnerova, A., **Ambroz, A.**,  
Sram, R. J., Hajslova, J.

Relationship between atmospheric pollution in the residential area and concentrations of  
polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human breast milk.

*Science of The Total Environment*, 2016, 562, 640-647.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.013>

ELSEVIER SCIENCE BV, PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS

ISSN: 0048-9697  
eISSN: 1879-1026

### **Příloha 3**

Rössner, P. Jr., Orhan, H., Koppen, G., Sakai, K., Santella, R. M., **Ambroz, A.**,  
Rössnerrova, A., Sram, R. J., Ciganek, M., Neca, J., Arzuk, E., Mutlu, N., Cooke, M. S.

Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine analysis by an improved ELISA: an inter-laboratory comparison study.

*Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 95, 169-179.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.016>

ELSEVIER IRELAND LTD, ELSEVIER HOUSE, BROOKVALE PLAZA, EAST PARK  
SHANNON, CO, CLARE, 00000, IRELAND

ISSN: 0378-4274  
eISSN: 1879-3169

## Příloha 4

Rössner, P. Jr., Libalova, H., Cervena, T., Vrbova, K., Elzeinova, F., Milcova, A., Rössnerova, A., Novakova, Z., Ciganek, M., Pokorna, M., **Ambroz, A.**, Topinka J. (2019).

The processes associated with lipid peroxidation in human embryonic lung fibroblasts, treated with polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extract from particulate matter.

*Mutagenesis*, 2019, 34(2), 153-164.

<https://d360prx.biomed.cas.cz:2589/10.1093/mutage/gez004>

OXFORD UNIV PRESS, GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND

ISSN: 0267-8357

eISSN: 1464-3804

## **Příloha 5**

Veleminsky, M. Jr., **Ambroz, A.**, Rössner, P. Jr., Rössnerova, A., Svecova, V., Milcova, A., Dostal, M., Pastorkova, A., Pulkrabova, J., Hajslova, J., Solansky, I., Hanzl, M., Sram, R. J

Oxidative stress in newborns by different modes of delivery.

*Neuroendocrinology Letters*, 2016, 37(6), 445-451.

<http://www.nel.edu/oxidative-stress-in-newborns-by-different-modes-of-delivery-63/>

MAGHIRA & MAAS PUBLICATIONS, PO BOX 26132, S-100 41 STOCKHOLM,  
SWEDEN

ISSN: 0172-780X