

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

4XMGVP



Mgr. Kateřina Hoňková

Využití „omics“ metod v molekulárně-epidemiologické studii novorozenců z různých lokalit České republiky

The use of „omics“ methods in molecular-epidemiologic study in newborns from different localities of the Czech Republic

Typ závěrečné práce:

Disertační práce

Školitel:

RNDr. Pavel Rössner Jr, Ph.D.

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

Praha, 2021

PROHLÁŠENÍ:

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

V Praze, dne _____

Mgr. Kateřina Hoňková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat několika osobnostem, které stály u zrodu, průběhu i finále této práce. Mé nejdůležitější poděkování patří RNDr. Pavlu Rössnerovi, Jr., PhD., který v posledních letech vedl tuto práci. Děkuji především za jeho cenné připomínky, odborné rady v oboru genové exprese a konzultace, díky kterým práce postupně získávala směr a mohla být dokončena v této podobě. Musím rovněž poděkovat i za jeho trpělivost v období, kdy pro mě bylo psaní práce nejnáročnější.

Má činnost a zaměření v oboru molekulární epidemiologie a genetické toxikologie započaly díky MUDr. Radimu J. Šrámovi, DrSc., kterému hluboce vděčím za laskavou možnost stát se součástí projektu „Vliv znečištění ovzduší na genom novorozenců (G-NEW)“ a později i projektu „Ovlivnění novorozenců prostředím“ (Strategie AV 21 – QUALITAS). Přijetím na pozici PhD. studenta na tehdejší Oddělení genetické ekotoxikologie ÚEM AV ČR, v.v.i. jsem mohla být o krok blíže k mému celoživotnímu snu: stát se vědcem. MUDr. Radimu J. Šrámovi, DrSc. vděčím zejména za vytvoření výborného pracovního zázemí, podporu při získávání dalšího vzdělávání a možnosti se účastnit významných zahraničních konferencí. V náročných laboratorních začátcích mě provázela Mgr. Andrea Rössnerová, PhD., která se mi trpělivě věnovala a které vděčím zejména za získání kritického myšlení. Děkuji jí za prohlubování motivace pro vědecké bádání v biologii, neboť vždy dokázala nalézt význam dosažených výsledků i tam, kde nebyl na první pohled patrný. Její nedocenitelné odborné rady byly pro mě pilíři, na kterých jsem stavěla postupy zpracování dat. Spolupráce s Mgr. Andreou Rössnerovou, PhD. si hluboce vážím i v současné době na řadě dalších projektů.

Mé obrovské poděkování patří současnému vedoucímu Oddělení genetické toxikologie a epigenetiky ÚEM AV ČR, v.v.i. Ing. Janu Topinkovi, CSc., DSc., který se zasloužil o dokonalé zázemí pro mou navazující vědeckou práci a díky němuž jsem se mohla zapojit do mnoha zajímavých projektů, účastnit se prestižních konferencí a zahraničních kurzů, které mě naučily nezbytným základům náročné bioinformatické práce s velkoobjemovými daty. Mé hluboké poděkování patří také za jeho lidskou a vlídnou komunikaci při vedení oddělení, na kterou nikdy nezapomenu.

Významné rady k disertační práci, její struktuře a obsahu jsem získala díky pečlivým připomínkám Ing. Hany Barošové, PhD. Z rad, za které jí velmi děkuji, jsem si odnesla mnoho cenných poznatků, které mi utkvěly v paměti i pro další publikační činnost. Srdečné poděkování patří také mým kolegynkám z kanceláře, jmenovitě Mgr. Ing. Táni Závodné, PhD. a Mgr. Tereze Červené, které mě v nejnáročnějším období psychicky podporovaly, a jejichž přátelství si nesmírně vážím. Je pro mě velkou ctí, že mohu pracovat po lidské stránce s tak empatickými a po odborné stránce

inspirativními osobnostmi. Mému kolegovi Mgr. Antonínu Ambrožovi, PhD. děkuji také za mnoho rad, kterými mi velmi ulehčil starost s náležitostmi k formalitám disertační práce.

V poslední řadě mé poděkování patří mému partnerovi, který mi během sepisování disertační práce pravidelně připravoval obědy a večeře, abych během dlouhých hodin, kdy mi psaní zrovna nejlépe šlo, nemusela opouštět klávesnici u počítače. Děkuji mu také za projev trpělivosti a pochopení pro mou vědeckou práci, kterou mám velmi ráda, a proto jsem nebyla vždy ochotna nalézt dostatek času pro osobní život.

Obsah

Seznam zkratk	7
Seznam genů	9
Abstrakt	10
Abstract	12
Úvod	14
Znečištěné ovzduší.....	15
Studované lokality České republiky.....	18
Vybrané „omics“ metody v molekulární epidemiologii.....	25
Celogenomová genová exprese.....	26
Metylace DNA.....	27
Exprese miRNA.....	29
Záměr disertační práce	32
Cíle.....	34
Metodika	35
Studované subjekty a rozdělení studií.....	35
Měření koncentrací látek ve vnějším ovzduší.....	37
Biologický materiál.....	37
Studie 1 - Zpracování RNA.....	37
Studie 2 - Zpracování DNA.....	38
Studie 3 - Zpracování miRNA.....	38
Statistická analýza.....	39
Studie 1 - Analýza celogenomové genové exprese.....	39
Studie 2 - Analýza genově-specifické metylace DNA.....	40
Studie 3 - Analýza exprese miRNA.....	41
Výsledky	42
Charakteristika subjektů.....	42
Hodnocení znečištění ovzduší.....	46
Studie 1 - Hodnocení diferenciálně exprimovaných genů.....	50
Studie 2 - Hodnocení genově-specifické metylace DNA.....	55
Studie 3 - Hodnocení diferenciální exprese miRNA.....	61
Diskuze	65
Charakteristika prostředí a subjektů.....	65
Studie 1 – Celogenomová genová exprese.....	67

Studie 2 – Genově-specifická metylace DNA.....	71
Studie 3 – Diferenciální exprese miRNA.....	74
Závěr.....	78
Literatura.....	80
Prohlášení o podílu činnosti na metodách a na příložených publikacích	95
Příloha I.	
Příloha II.	
Příloha III.	
Příloha IV.	
Doplňková tabulka I. – Seznam odlišně metylovaných CpG míst	
Doplňková tabulka II. – Seznam odlišně exprimovaných miRNA	

SEZNAM ZKRATEK

15-F2t-IsoP	15-F2t-isoprostan	15-F2t-isoprostane
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
Ahr	Arylhydrokarbonový receptor	Arylhydrocarbon receptor
B[a]P	Benzo[a]pyren	Benzo[a]pyrene
BER	Bázová excizní reparace	Base excision repair
BH	Benjamini a Hochberg metoda	Benjamini and Hochberg method
cDNA/RNA	Komplementární DNA/RNA	Complementary DNA/RNA
ČHMÚ	Český hydrometeorologický ústav	Czech Hydrometeorological Institute
CpG	Cytosin-fosfát-guaninový dinukleotid	Cytosine-phosphate-guanin dinucleotide
CHOPN	Chronická obstrukční plicní nemoc	Chronic obstructive pulmonary disease
DEGs	Odlišně exprimované geny	Differentially expressed genes
DE miRNA	Odlišně exprimovaná miRNA	Differentially expressed miRNA
DNMTs	DNA methyltransferázy	DNA methyltransferases
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEA	Evropská agentura pro životní prostředí	European Environmental Agency
EWAS	Asociační studie epigenomu	Epigenome-wide association study
FDR	Korekce pro mnohonásobná testování	False discovery rate correction
gDNA	Genomická DNA	Genomic DNA
HiVol	Velkoobjemový vzorkovač ovzduší	High volume Air sampler
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny	International Agency for Research on Cancer
logFC	Násobek logaritmičké změny při základu 2	Logarithmic fold change to the base 2
MAPE	Magnezium-Perchlorát	Magnesium-Perchlorate
miRISC	Blokační komplex indukovaný microRNA	microRNA-induced silencing complex
miRNA	mikroRNA	microRNA
MSK	Moravskoslezský kraj	Moravian-Silesian region
NER	Nukleotidová excizní reparace	Nucleotide excision repair
NGS	Sekvenování nové generace	Next generation sequencing
NHEJ	Reparace spojením nehomologních konců	Non-homologous end joining
NO _x	Oxidy dusíku	Nitrogen oxides
PAU	Polyaromatické uhlovodíky	Polyaromatic hydrocarbons
PCA	Analýza hlavních komponent	Principal component analysis
piRNA	RNA interagující s proteiny rodu piwi	Piwi-interacting RNA
PM	Pevné prachové částice	Particular matter
PM _x	PM o aerodynamickém průměru menším než X μm	PM with aerodynamic average less than X μm
pre-miRNA	Prekurzor mikroRNA	Precursor microRNA
pri-miRNA	Primární transkript mikroRNA	Primary transcript microRNA
qRT-PCR	Kvantitativní polymerázová	Quantitative real-time polymerase

	řetězová reakce v reálném čase	chain reaction
RIN	Číslo integrity RNA	RNA integrity number
ROS	Reaktivní formy kyslíku	Reactive oxygen species
SAM	S-adenosylmethionin	S-adenosylmethionine
SIDS	Syndrom náhlého úmrtí kojenců	Sudden infant death syndrome
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus	Single nucleotide polymorfism
UMI	Index jedinečných molekul (miRNA)	Unique molecular (miRNA) index
US EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (USA)	United States Environmental Protection Agency
WHO	Světová zdravotnická organizace	World Health Organisation

SEZNAM GENŮ

Geny zmíněné v této práci jsou označovány symbolem. Celý název genů je převzat z databáze GeneCards a ponechán v původním označení v anglickém jazyce.

<i>ACSL3</i>	Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 3
<i>AMPK</i>	AMP-Activated Protein Kinase
<i>BCL2</i>	BCL-2 Like 1 Protein
<i>CAT</i>	Catalase
<i>CTLA4</i>	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
<i>CYP1A1</i>	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1
<i>CYP1B1</i>	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1
<i>CYP4F3</i>	Cytochrome P450 Family 4, Subfamily F, Member 3
<i>EPHX1</i>	Microsomal Epoxide Hydrolase
<i>EP300</i>	E1A Binding Protein P300
<i>FAM13A</i>	Family With Sequence Similarity 13 Member A
<i>FBOX7</i>	F-Box Protein 7
<i>FOXO</i>	Forkhead Box O
<i>GPSM3</i>	G Protein Signaling Modulator 3
<i>HINT3</i>	Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 3
<i>HIVEP2</i>	Human Immunodeficiency Virus Type I Enhancer-Binding Protein 2
<i>IL10</i>	Interleukin 10
<i>LAT</i>	Linker For Activation Of T Cells
<i>MUC6</i>	Mucin 6
<i>NFkB</i>	Nuclear Factor Kappa B
<i>NLRP3</i>	NLR Family Pyrin Domain Containing 3
<i>NOTCH4</i>	Neurogenic Locus Notch Homolog 4
<i>NRF2</i>	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
<i>PDCD1</i>	Programmed Cell Death 1
<i>PHLPP1</i>	PH Domain And Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase 1
<i>PRSS33</i>	Serinproteasa 33
<i>SERPINA13</i>	Serpin family A, member 13
<i>STAT</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<i>TEC</i>	Tec Protein Tyrosine Kinase
<i>TNF-α</i>	Tumor Necrosis Factor α
<i>TPO</i>	Thyroid Peroxidase
<i>TP53INP1</i>	Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1
<i>XPC</i>	Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C

„Omics“ je souhrnné pojmenování biologických disciplín, které se věnují globální charakterizaci a kvantifikaci biomolekul, jež mají zásadní význam pro zajištění základních funkcí organismu. „Omics“ metody jsou využívány například v molekulární epidemiologii, která na základě jejich výsledků vyhodnocuje potenciální biomarkery charakterizující dopad faktorů životního prostředí na lidské zdraví. Předložená disertační práce se zabývá použitím těchto metod u biologických vzorků získaných od novorozenců, kteří se narodili v rozdílných lokalitách České republiky, lišících se zejména mírou průmyslové zátěže. Hlavním záměrem bylo zjistit, zda může vlivem vnějšího prostředí v průběhu prenatálního vývoje novorozenců docházet k významným změnám aktivity genů a jejich regulace, a vyhodnotit míru znečištění ovzduší v době, kdy byl odebrán biologický materiál. S využitím celogenomového přístupu bylo cílem popsat odlišně exprimované geny (DEGs) u novorozenců z Karviné a Českých Budějovic (ČB). U pilotní studie malého souboru novorozenců z Mostu a ČB bylo záměrem identifikovat rozdílně metylovaná CpG místa na DNA, která utlumují genovou aktivitu a mohla by být zodpovědná za dlouhodobé změny na genetické úrovni. Posledním cílem bylo nalézt odlišně exprimované malé nekódující RNA (DE miRNA) mezi novorozenci z Mostu a ČB.

Vzorky pupečnickové krve od 230 novorozenců byly odebrány v porodnicích při porodu a následně zpracovány v laboratoři Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i. „Omics“ metody byly použity pro analýzu celogenomové exprese mRNA a genově-specifické metylace DNA na microarray platformě (iScan, Illumina); exprese miRNA byla vyhodnocena metodou sekvenování nové generace (MiSeq, Illumina). Statistické zpracování všech expresních, metylačních i sekvenačních dat bylo provedeno v R Studiu na základě vlastního skriptování a s použitím balíčků Bioconductor.

Výsledky práce ukázaly, že nejvyšší koncentrace prachových částic o aerodynamickém průměru $\leq 2,5 \mu\text{m}$ (PM_{2.5}) a benzo[a]pyrenu (B[a]P) byly naměřeny v Karviné, a to zejména v zimním období. Ve sledovaných letech docházelo v této lokalitě k překračování ročních imisních limitů polutantů. Oproti tomu mezi Mostem a ČB nebyly rozdíly ve znečištění ovzduší zaznamenány. Nejvíce DEGs bylo nalezeno u vzorků z Karviné v zimním období, přičemž vliv období v obou lokalitách hrál podstatnou roli. DEGs pozorované u karvinských vzorků se účastní zejména buněčné obrany proti oxidačnímu a elektrofilnímu stresu a imunitní odpovědi. DEGs, které jsou začleněny v drahách receptorů T- a B-buněk, byly nalezeny při mezisezónním srovnání v Karviné. Na epigenetické úrovni byly zjištěny rozdíly mezi novorozenci z Mostu a ČB. CpG místa lišící se mezi lokalitami cílí na geny a procesy, které jsou začleněny zejména v drahách T-buněk, imunitní odpovědi, a změny

v jejich regulaci se objevují také u astmatu a alergií. Nejvýznamnější pozorované DE miRNA mohou regulovat aktivitu genů, které souvisí s vážností stavu chronické obstrukční plicní nemoci, či některých atopických či autoimunitních onemocnění, jako jsou ekzém či psoriáza.

Tato práce demonstruje, že odlišný profil exprese mRNA, stejně jako epigenetický vzorec metylace DNA a exprese miRNA, může být pozorován u novorozenců již v době jejich narození. Výsledky naznačují, že začátek života v odlišném prostředí bez ohledu na aktuální úroveň znečištěného ovzduší může být spojen s alterací imunitního systému, zvýšenou vnímavostí k alergiím, astmatu a narušením funkce biochemických procesů ovlivňujících zdravý vývoj jedince. Vliv na úroveň exprese rozdílných genů může mít i období, ve kterém bylo dítě narozeno, pokud je rozdíl mezi obdobími dán odlišnou úrovní znečištěného ovzduší.

ABSTRACT

The „omics“ is a concept of biological disciplines that globally characterizes and quantifies biomolecules involved in the key functions of an organism. The „omics“ methods are used e.g. in molecular epidemiology, where they help to evaluate potential biomarkers that identify the impact of environmental factors for human health. In this thesis, the „omics“ methods were applied in samples collected from newborns born in localities of the Czech Republic mostly differing by pollution levels from industrial sources. The principal aim was to determine whether environmental changes during prenatal development can affect gene expression and its regulation in newborns. The thesis further aimed to evaluate the level of air pollution at the time of biological samples collection. Using the whole genome approach, differentially expressed genes (DEGs) in newborns from districts Karvina and Ceske Budejovice (CB) were identified. In a pilot study of a small group of newborns from districts Most and CB, differentially methylated CpG sites in DNA were assessed. These sites attenuate gene activity and could be responsible for long-term changes at the genetic level. Finally, the aim was to find differentially expressed small non-coding RNA (DE miRNA) in newborns from Most and CB.

Samples of umbilical cord blood from 230 newborns were obtained after delivery and further processed in the Institute of Experimental Medicine Czech Academy of Sciences. “Omics” methods were used to analyze whole genome gene expression and genome-wide gene-specific DNA methylation on a microarray platform (iScan, Illumina); miRNA expression was evaluated using next generation sequencing (MiSeq, Illumina). Statistical processing of gene expression, methylation and sequencing data was performed in RStudio using own scripting and Bioconductor packages.

The highest concentrations of particulate matter of aerodynamic diameter $\leq 2.5 \mu\text{m}$ (PM_{2.5}) and benzo[a]pyrene (B[a]P) were observed in Karvina, especially in the winter season. In all study seasons, the annual air pollution limits of the pollutants were exceeded in this locality. In contrast, no differences in air pollution levels were observed between Most and CB. The highest number of DEGs was identified in samples from Karvina in the winter season, while the effect of season played a key role in both localities. The DEGs identified in Karvina samples are mostly involved in the cellular defense against oxidative and electrophilic stress and the immune response. The DEGs participating in T- ad B-cell receptor pathways were found for a comparison between both seasons in Karvina. A different profile at the epigenetic level was also observed for a comparison between newborns from Most and CB. Here, the CpG sites targeting genes and processes that are involved

mainly in T-cell pathways, immune response, as well as asthma and allergies were found. The most significant DE miRNA detected in these samples may regulate the activity of genes that are associated with chronic obstructive pulmonary disease, or some atopic and autoimmune diseases (eczema, psoriasis).

This work demonstrates that a different gene expression profile and epigenetic pattern of DNA methylation and miRNA expression can be observed in newborns at delivery. The results suggest that the beginning of life in a different environment, regardless of the current level of air pollution, may be associated with alterations in the immune system, increased susceptibility to allergies, asthma and dysfunction of biochemical processes affecting the healthy development of the individual. The level of expression of different genes can be also modulated by a birth season, provided that the difference between the seasons is associated with different levels of air pollution.

Informace o kvalitě vnějšího ovzduší jsou důležité pro ochranu našeho zdraví, protože negativní zdravotní důsledky způsobené znečištěným ovzduším jsou dnes již nezpochybnitelné. Dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) je znečištěné ovzduší od roku 2013 zařazeno jako prokázaný lidský karcinogen (Cohen a kol., 2013). Na znečištění ovzduší stále nahlížíme jako na významný epidemiologický faktor, byť s vývojem moderních technologií a také díky dlouholetému monitoringu se jeho kvalita stále zlepšuje. Mezi hlavní nástroje patří sledování emisí a snaha o dodržování imisních limitů, které jsou politicko-odborným konsensem založeným na dlouholetých výzkumech o vlivu ovzduší na zdraví. Činnost člověka je však nedílně spjata s produkcí škodlivin do ovzduší, například v souvislosti s frekvencí dopravy v hustě osídlených oblastech. V neposlední řadě se na kvalitě ovzduší podílí i příčiny, které jsou mimo vědomý vliv člověka, jako přírodní katastrofy, či meteorologická situace související se specifickými místními podmínkami. Kvalita ovzduší je proto dynamicky ovlivňována jak místně, tak i časově. Obzvláště rok 2020, ve kterém byla převážně psána tato práce, se zdá být v tomto ohledu naprosto výjimečný. Vyhlášením nouzového stavu kvůli pandemickému šíření onemocnění Covid-19 spolu se změnou chování obyvatel, kteří výrazným způsobem omezili cestování a výrobu, se zlepšila i kvalita ovzduší. Na území České republiky (ČR) ve srovnání s průměrem let 2015–2019 došlo během prvních devíti měsíců roku 2020 ke snížení koncentrací částic polévatého prachu (PM), a to u frakcí o aerodynamických průměrech menších než 10 μm a 2,5 μm (PM_{10} a $\text{PM}_{2.5}$) v průměru o 24 % a 30 %, a u oxidů dusíku (NO_x) a NO_2 o 24 % a 21 % (Brzezina, 2020). V případě PM byl pokles nejvýraznější v Moravskoslezském kraji (MSK), který je dlouhodobě studovanou významnou evropskou lokalitou s vysokou mírou znečištěného ovzduší (Leoni a kol., 2018; Pokorna a kol., 2015; Sram a kol., 2011). I přes tato pozitivní měření ze stanic Českého hydro- meteorologického ústavu (ČHMÚ) se však ukazuje také negativní souvislost mezi úrovní znečištěného ovzduší a úmrtností pacientů s onemocněním Covid-19 (Pozzer a kol., 2020). Autoři této studie vyhodnotili, že znečištěné ovzduší přispělo celosvětově k 15 % úmrtí, přičemž právě ČR figuruje mezi sledovanými zeměmi k těm s nejvyšší mírou podílu kvality ovzduší na úmrtí pacientů, a to i přesto, že došlo ve stejném časovém období k jeho výraznému zlepšení.

Z těchto důvodů je na studie, které se věnují znečištění ovzduší, potřeba nahlížet mimořádně kriticky, protože právě tento typ znečištění nikdy nepatřil mezi snadno hodnotitelné faktory ovlivňující lidský organizmus.

Podle Evropské agentury pro životní prostředí (EEA) je znečištěné ovzduší tvořeno látkami (polutanty), které se dostávají do ovzduší buď z přírodních zdrojů (sopečné erupce, lesní požáry, emise těkavých organických látek z rostlin), nebo lidskou činností, zejména spalováním fosilních paliv z dopravy, průmyslovými procesy, těžářského průmyslu, zemědělství či odpadového hospodářství.

Mezi nejčastější polutanty v ovzduší vznikající důsledkem lidské činnosti patří SO_2 ze spalování fosilních paliv, jak v průmyslových procesech, tak domácích topeništích. SO_2 má dráždivé účinky na sliznice dýchacích cest, přispívá k zánětům průdušek a astmatu (Tewari a Shukla, 1991). Dále sem řadíme oxidy dusíku, zejména NO a NO_2 . Jejich emise souvisí se spalováním fosilních paliv, plynu, nafty, biomasy. Podílejí se na kyselých deštích a přízemním ozónu. Mezi producenty patří i mikroorganismy (Blaszczak a Cox, 1999).

Vdechování NO_2 způsobuje dráždění dýchacích cest, protože se jeho rozpuštěním na sliznicích tvoří HNO_3 . Z plic také snadno vstupuje do krevního řečiště, kde se může vázat na hemoglobin (Posin a kol., 1978). Dlouho je také známo, že expozice NO_2 vede ke zvýšené náchylnosti k respiračním infekcím (Samet a Spengler, 1989). NO je látkou, u které jsou popisovány karcinogenní účinky (Reveneau a kol., 1999; Taysi a kol., 2003; Thomsen a kol., 1994), na druhou stranu se objevuje i jako anti-onkogenní agens (Harada a kol., 2004), proto jeho vlivy závisí na koncentraci, načasování a lokalizaci (Choudhari a kol., 2013).

Polutanty, o kterých se tato práce více zmiňuje, jsou zejména $\text{PM}_{2,5}$ a polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), reprezentované benzo[a]pyrenem (B[a]P). Oba polutanty jsou dle IARC prokázány lidskými karcinogeny.

PM, které jsou součástí aerosolu v ovzduší, vznikají spalováním organické hmoty. Z přírodních zdrojů se vytvářejí během sopečných erupcí a lesních požárů. Produkce lidskou činností je dána zejména průmyslovou výrobou, dopravou nebo lokálními topeništi, která spalují tuhá paliva. PM se liší velikostí, tvarem, chemickým složením a zastoupením organických a anorganických látek, které se na ně váží, a závisí na typu emisního zdroje (Hinds, 1999).

Podle aerodynamického průměru částic rozlišujeme PM_{10} , které pronikají do horních částí dýchacích cest (Oberdorster a kol., 2005). Zaznamenávání jejich koncentrací má význam zejména při posuzování historického vývoje znečištění ovzduší. Druhým významným zástupcem jsou částice

PM_{2.5}, které jsou indikátorem rizik znečištěného ovzduší na lidské zdraví¹. Biologicky zajímavé jsou také ultrajemné nanofrakce PM_{0.1} o aerodynamickém průměru menším než 100 nm, které nejsou rutinně měřeny monitorovacími stanicemi stavu ovzduší.

Hlavní negativní význam inhalace PM_{2.5} spočívá v pronikání dýchacími cestami až do plicních sklípků. Modelováním jejich ukládání v jednotlivých částech plic bylo zjištěno, že do bronchiolů proniká 2,8 % - 12,1 % částic PM_{2.5} a k depozici do alveolů dojde u 1,0 % až 6,5 % částic, odkud poté přechází do krevního řečiště a následně do dalších orgánů (Sturm, 2020). Přítomnost PM v krevním oběhu vede ke stimulaci buněk imunitního systému (makrofágů), které je eliminují. Dochází při tom k produkci prozánětlivých mediátorů a tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují oxidační stres, zánět, zkracování délky telomer a poškození DNA, což může vést až ke karcinogenezi (Risom a kol., 2005; Valavanidis a kol., 2013). Studie provedené na velkých lidských kohortách v průběhu mnoha let demonstrují, že expozice PM_{2.5} jsou spojeny s předčasným úmrtím (Beelen a kol., 2014; Pope a kol., 2002). Dlouhodobé expozice zvyšují riziko vzniku celé řady onemocnění, zejména kardiovaskulárních a respiračních (Lim a kol., 2012).

V posledních dvou dekádách jsou studovány také nanofrakce PM_{0.1}, které snadno prostupují napříč epiteliálními a endotelovými buňkami do krevního a lymfatického oběhu, kde jsou cíleny do kostní dřeně, lymfatických uzlin, sleziny, srdce a dalších orgánů. Prostřednictvím translokace podél axonů a dendritů byl také pozorován vliv na centrální nervový systém (Oberdorster a kol., 2005).

PAU jsou organické sloučeniny tvořené dvěma a více benzenovými jádry, které snadno podléhají elektrofilní substituci za vzniku derivátů. Rozmanitá struktura molekul vede k různorodým vlastnostem i rozdílné biologické aktivitě. Izolováno a charakterizováno bylo více než 300 PAU (Gutman a Cyvin, 1989). Americká agentura pro ochranu životního prostředí (US EPA) klasifikovala skupinu 16 PAU, jejichž negativní zdravotní dopad souvisí s kontaminací životního prostředí (Keith, 2015).

V ovzduší jsou PAU nejčastěji adsorbovány na povrchu PM ve formě směsí, mohou se však vyskytovat i v plynné fázi, nebo samostatně. PAU vznikají zejména důsledkem nedokonalého spalování organické hmoty za nedostatečného přístupu vzduchu. Ve směsích jsou zastoupeny ve variabilním poměru s různým složením, které je dáno typem zdroje. Mezi ty patří, kromě průmyslové výroby a dopravy, také domácí topeniště a tabákový kouř, grilování či opékání na ohni

¹ Celosvětová mapa znečištěného ovzduší, která zobrazuje real-time index kvality ovzduší posuzovaný podle hodnot PM_{2.5}: <https://waqi.info/#/c/39.904/10.252/4.6z>

(Khaiwal a kol., 2008), přičemž právě kontaminanty PAU ve stravě mohou tvořit dominantní cestu přenosu do organismu (Polachova a kol., 2020). Popisována je také expozice PAU přes kůži (Lao a kol., 2018).

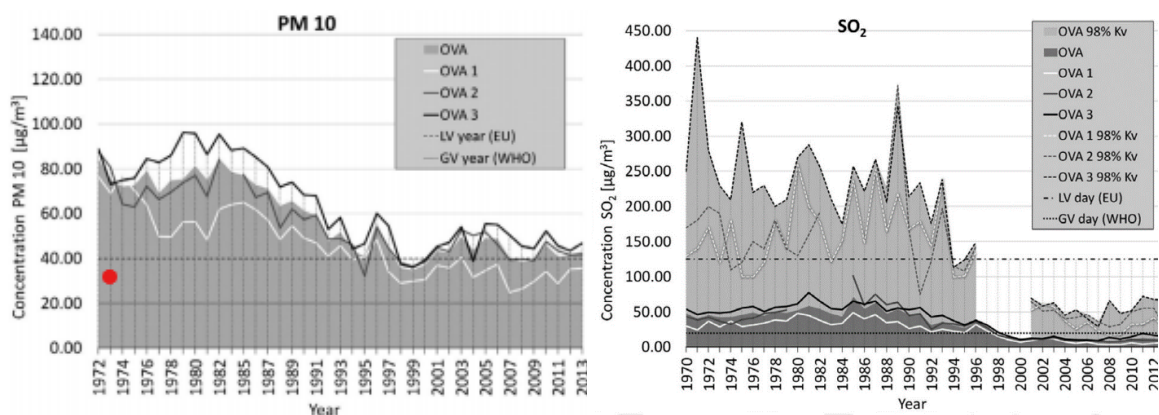
Nejvýznamnějším karcinogenním PAU ve vztahu k životnímu prostředí je B[a]P, který byl charakterizován a izolován téměř před 90 lety (Cook a kol., 1933). O karcinogenitě tehdy ještě neznámé látky se ale vědělo o více než 20 let dříve, kdy byla popisovaná častá rakovina kůže u pracovníků, kteří zpracovávali břidlicový olej, parafín a uhelný dehet (Phillips, 1983).

PAU se vstřebávají do krevního řečiště a jsou dále distribuovány do tkání. V buňkách se váží na arylhydrokarbonový receptor (AhR) v cytosolu buněk a způsobují jeho trvalou aktivaci (Nebert a kol., 2004). AhR jako transkripční faktor významně ovlivňuje expresi genů, které regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci (Bock a Köhle, 2006). Aktivovaný AhR migruje do buněčného jádra, kde interaguje specifickou sekvencí, která je vazebným místem pro xenobiotika, odkud dochází k expresi metabolických enzymů, například cytochromu P450 1A1 (CYP1A1) a cytochromu P450 1B1 (CYP1B1). Cytochromy mají schopnost metabolizovat PAU, vč. B[a]P, na reaktivní metabolity, které mají mutagenní potenciál (Korashy a El-Kadi, 2006) a mohou se vázat přímo na DNA za vzniku genotoxických DNA aduktů (Blaszczuk a Mielzynska-Svach, 2017). Aduktů jsou reparačními mechanismy z DNA odstraňovány, nejčastěji bázovou (BER), či v případě PAU-DNA aduktů nukleotidovou (NER) excizní reparací. Pokud však k odstranění nedojde, mohou v místech, kde se nachází tumor supresorové geny a onkogeny, vznikat mutace, které mohou vést ke karcinogenezi (Choudhuri a kol., 2018).

Limity platné pro látky znečišťující ovzduší jsou v ČR určeny *Směrnici Evropského parlamentu 2008/50/ES* a jsou implementovány do *zákonu o ochraně ovzduší 201/2012 Sb. a vyhlášky 330/2012 Sb. o posuzování a vyhodnocení úrovně znečištění, rozsahu informování veřejnosti o úrovni znečištění a při smogových situacích*. Do roku 2019 byl limit pro PM_{2.5} 25 µg/m³. Od roku 2020 platí hodnota zpřísněna na 20 µg/m³ (ČHMÚ 2020). Pro B[a]P je doporučen limit 1 ng/m³. Z dalších významných polutantů platí roční imisní limit pro NO₂ 40 µg/m³, přičemž pro ochranu lidského zdraví jsou pro oxidy (SO₂ a CO) stanovené pouze denní či hodinové limity. U SO₂ a NO_x platí roční imisní limity pro ochranu ekosystémů a vegetace – 20 µg/m³ a 30 µg/m³.

Pro úplnost, Světová zdravotnická organizace (WHO) má imisní limit pro roční průměrnou koncentraci PM_{2.5} přísnější - 10 µg/m³. Jedná se však pouze o limit doporučující.

Průmyslovým lokalitám České republiky se již několik desítek let věnují epidemiologické studie, které hodnotí vliv faktorů životního prostředí, jako je i znečištěné ovzduší, na lidské zdraví. Historie měření koncentrací znečišťujících látek v ovzduší se v ČR datuje od roku 1964, kdy celonárodní monitoring začal zajišťovat ČHMÚ. První monitorovací stanice, které měřily SO₂, byly umístěny do nejvíce znečištěných oblastí ČR: v roce 1968 do Podkrušnohoří, následující rok do Ostravského regionu (Bohm, 1974; Bubnik a Keder, 1986). Byť za posledních 50 let dochází v Ostravském regionu, potažmo celém MSK, ke zlepšování úrovně znečištěného ovzduší, což reprezentují například koncentrace PM₁₀ a SO₂, které se historicky sledují od 70. let (viz Obr. 1), stále jde o nejvíce zatíženou lokalitu v ČR (Jiřík a kol., 2016). MSK má zároveň i jedny z nejvyšších koncentrací prachových částic ve střední Evropě, jejichž trend byl obdobný jak v době odběrů vzorků popisovaných v této práci (EEA Report 2014), tak i v současnosti (EEA Report 2019). Hlavní příčinou dlouhodobého překračování limitů PM₁₀, PM_{2.5}, benzenu a karcinogenních PAU, reprezentovaných B[a]P, je těžký průmysl, podpovrchová těžba černého uhlí, metalurgie a chemický průmysl, které stále tvoří významnou průmyslovou činnost v MSK. Prostorové a časové rozložení koncentrace polutantů v MSK je rovněž výrazně ovlivněno umístěním kraje do ostravsko-karvinské uhelné pánve. Jedná se o geomorfologickou oblast Severních Vněkarpatských sníženin, která zapříčiňuje častý inverzní charakter počasí v podzimních a zimních měsících.



Obr. 1 Roční průměrná koncentrace PM₁₀ v Ostravě od roku 1972 do roku 2013 a SO₂ od roku 1970 do roku 2012. LV year (EU) značí roční limit dle Nařízení Evropského parlamentu a GV year (WHO) označuje roční limit daný WHO. LV day (EU) a GV day (WHO) značí denní limity. (Obrázek převzat z Jiřík a kol. (2016), vydavatelství Tigis. Použití obrázku povoleno.)

Mezi další významné průmyslové lokality v MSK patří Karviná. Okres Karviná hraničí s Polskem a žije v něm 246 324 obyvatel s hustotou zalidnění 691,5 obyv./km² (Český statistický úřad 2020). Oblast je významná zejména těžbou černého uhlí, která dodnes probíhá v činném černouhelném

dole Darkov. Z posledního sčítání lidu z roku 2011 vyplynulo, že téměř 12 % domácností v MSK topí pevnými palivy (uhlím, koksem, briketami nebo dřevem). V okrese Karviná je zároveň největší hustota lokálních topenišť na pevná paliva v celém MSK (Český statistický úřad 2011).

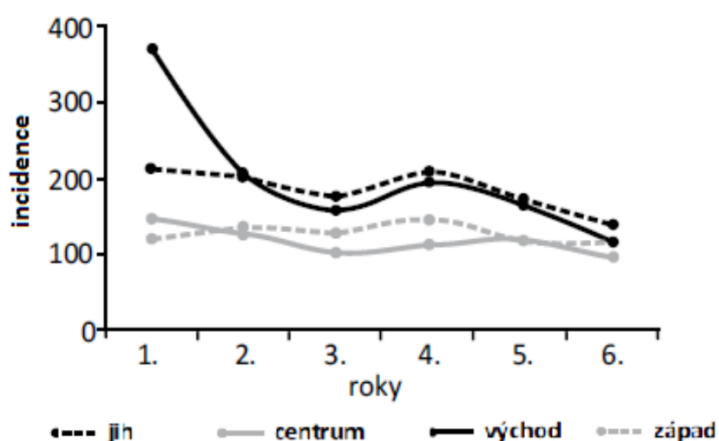
Zejména v 90. letech minulého století byl ve vztahu k ohrožení lidského zdraví intenzivně studovanou průmyslovou oblastí České republiky Severočeský kraj, zvláště pak okres Teplice, ležící v Severočeské hnědouhelné pánvi. V oblasti již tři sta let probíhá důlní činnost, včetně povrchové těžby hnědého uhlí. V dnešním Ústeckém kraji se nachází mnoho tepláren a elektráren podílejících se na znečištění ovzduší, které řadilo severní Čechy v 80. letech minulého století mezi nejznečištěnější oblasti v celé Evropě (Judt, 2018). V důsledku spalování hnědého uhlí byly v ovzduší vysoké koncentrace SO₂, které zapříčinily odumírání lesů a v konečném důsledku vedly i k negativnímu dopadu na lidské zdraví. Okres Most, který sousedí s okresem Teplice, má stejný význam z hlediska těžby hnědého uhlí, a navíc je významným centrem chemického průmyslu. V okrese se nachází největší česká rafinérie ropy. Žije zde 111 708 obyvatel, hustota zalidnění je 239,1 obyv./km² (Český statistický úřad 2020).

České Budějovice (ČB) jsou v environmentálních studiích často uváděny jako kontrolní lokalita s nízkou úrovní znečištění ovzduší. V okrese s velmi nízkou hustotou zalidnění (119,6 obyv./km²) žije 195 903 obyvatel (Český statistický úřad 2020). Převážnou část území tvoří mírně zvlněná pahorkatina, která sousedí se Šumavským podhůřím. Hlavním znakem okresu jsou četné vodní plochy. Více než 50 % tvoří zemědělské pozemky a téměř 40 % celého okresu zaujímá orná půda.

NEMOCNOST VE STUDOVANÝCH LOKALITÁCH

Již v 90. letech byl prokázán vztah mezi prevalencí respiračních onemocnění u dětí a intenzitou dopravy a vytápění tuhými palivy na Ostravsku (Lvoneik a kol., 1998).

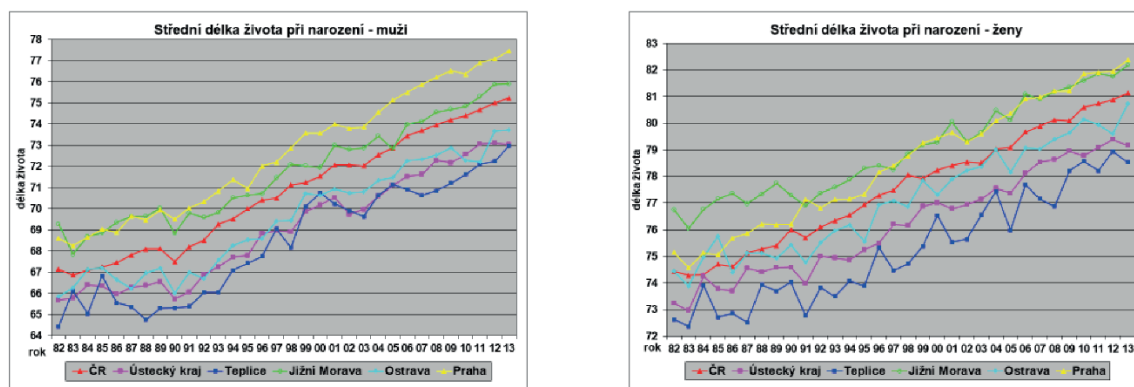
Zdravotní dopady na dětskou populaci žijící na Ostravsku byly zkoumány také v programu Ostrava, jenž byl součástí projektu „AIRGEN“ (SP/1B3/8/08 Studium zdravotních důsledků znečištěného ovzduší na Ostravsku s využitím genomiky). Studováno bylo celkem 1888 dětí středoevropského etnika ze čtyř částí Ostravy (sever, jih, východ, západ), které se narodily mezi lety 2000 a 2004. Do oblasti Ostrava-východ patří nejprůměšnější oblasti Radvanice a Bartovice, Slezská Ostrava a Kunčičky s dlouhodobě nejvyššími koncentracemi znečištěného ovzduší. Na celkové nemocnosti dětí se nejvýznamněji podílela respirační onemocnění, zejména akutní záněty nosohltanu, záněty průdušek a akutní záněty mandlí. Dle rozdílných částí Ostravy byl největší rozdíl pozorován v 1. roce života dítěte (Obr. 2). U dětí žijících v Radvanicích a Bartovicích je také pozorován největší podíl dětí s alergiemi. Více než třetina dětí spadající do této oblasti trpěla astmatem a atopickým ekzémem (Libalova a kol., 2011).



Obr. 2 Incidence zánětů horních cest dýchacích podle věku dětí v jednotlivých částech Ostravy. (Obrázek převzat z Dostal a kol. (2011), vydavatelství Občanské sdružení Ochrana kvality ovzduší. Použití obrázku je povoleno.)

I v současné době je na Ostravsku prevalence respiračních alergií a opakovaných zánětů dýchacích cest vyšší než celorepublikový průměr (Kratěnová a kol., 2018). To bylo potvrzeno v závislosti na oblastech MSK, které mají různou kvalitu ovzduší (Žejglicová a kol., 2019).

Také v jiných regionech ČR byly pozorovány negativní důsledky způsobené znečištěným ovzduším; v Ústeckém kraji začalo přibývat od 80. let alergií, imunodeficiencí, vrozených vývojových vad a incidence nízké porodní hmotnosti novorozenců. Bylo také pozorováno zkrácení průměrné délky života, než byl celostátní průměr (Kaiserová a Kaiser, 1995). Vývoj průměrné střední délky života v několika lokalitách ČR, včetně nejnižších hodnot v Ústeckém kraji a Teplicích, znázorňuje **Obr. 3**.



Obr. 3 Zobrazení střední délky života u mužů a žen z několika lokalit ČR od roku 1982 do roku 2013 (Sram, 2020).

V 90. letech proto vznikl rozsáhlý Program Teplice: „Důsledky znečištění životního prostředí na zdravotní stav populace“ (Teplice I., 1991–1996, Teplice II., 1997–1999), který byl významným vědeckým projektem, zabývajícím se vlivy znečištěného životního prostředí na lidské zdraví (Sram a kol., 1996). V práci byly prokázány negativní vlivy ovzduší na dýchací funkce u dětí, zvýšenou náchylnost k infekcím v nízkém věku dítěte, která byla navíc korelovaná s výskytem imunitních markerů na povrchu lymfocytů. Dále byl pozorován zhoršený neuropsychický vývoj u dětí z Teplic ve srovnání s dětmi z Prachatic a Znojma ve věku 14 let. Ten však nekoreloval s žádnou znečišťující látkou. Znečištěné ovzduší v Teplicích působilo významně i na těhotenství (Dejmek a kol., 2000); výsledky prokázaly zvýšené riziko výskytu nitroděložní růstové retardace, jestliže během prvního měsíce těhotenství překročily PM_{10} koncentraci $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$, nebo karcinogenní PAU koncentraci $15 \text{ng}/\text{m}^3$.

Detailnější pohled přinášejí environmentální studie využívající metod molekulární epidemiologie, které studují vliv životního prostředí na hladiny biomarkerů u lidské populace. Rozlišujeme biomarkery účinku, vnímavosti a expozice. Z biomarkerů účinku jsou významné parametry oxidačního stresu (produkce reaktivních forem kyslíku, aktivita antioxidantních enzymů), či indikátory změn metabolismu. Biologicky zajímavé jsou pak biomarkery expozice, které souvisí s narušením integrity DNA mající za následek např. tvorbu chromozomálních zlomů nebo vznik mikrojader (Ladeira a Smajdova, 2017). Metodami, kterými se hodnotí biomarkery na úrovni genů, jsou získávány znalosti o změnách genové aktivity (genová exprese), které mohou vést k narušení funkce biochemických drah, či o jednonukleotidových polymorfismech genů (SNP), patřících mezi biomarkery vnímavosti. V posledních letech se analyzují biomarkery související s epigenetickými mechanismy, které se podílejí na regulaci genové exprese, jako jsou metylace DNA, či exprese mikroRNA (miRNA). Tyto mechanismy jsou podrobněji popsány v následující kapitole.

Konkrétně Ostrava bývá vzhledem ke znečištěnému ovzduší a významné historii těžkého průmyslu využívána také jako modelová oblast pro hodnocení hladin biomarkerů expozice u lidské populace.

Od roku 1992 do roku 1997 probíhal ve spolupráci mezi US EPA, Ministerstvem životního prostředí a Ministerstvem zdravotnictví ČR projekt SILESIA, který zkoumal vliv $PM_{2.5}$, PAU a B[a]P na hladinu biomarkerů u dospělé populace. Rozsáhlá studie se zaměřovala mimo jiné na hladiny DNA aduktů, přičemž bylo tak poprvé zjištěno, že vyšší míra znečištěného ovzduší na Ostravsku souvisí s vyšší frekvencí mutací v DNA (Williams a kol., 1997).

Naše studie zaměřující se na celogenomovou genovou expresi u dobrovolníků z Ostravy a Prahy zjistila při dlouhodobé expozici znečištěnému ovzduší snížení hladin genové exprese (Rossner a kol. 2015, - příloha 2).

V roce 2013 byla publikována práce, která identifikovala rozdílný profil metylované DNA mezi dětmi z Ostravy a Prachatic, z nichž jedna skupina měla diagnostikované asthma bronchiale (Rossnerova a kol., 2013). Studie ukázala na významný rozdíl v rozložení metylace DNA zejména ve vztahu k lokalitě. Rozdíly v souvislosti s onemocněním nebyly v jednotlivých lokalitách patrné, nicméně děti s diagnostikovaným asthma se z hlediska metylace mezi lokalitami lišily. U těchto dětí byl rovněž sledován profil celogenomové genové exprese a byly identifikovány geny specifické pro obě lokality. Zatímco u dětí z Prachatic byly nalezeny specifické geny, které jsou spojeny s typem alergického astmatu, u dětí z Ostravy byla pozorována zvýšená exprese genů, které ovlivňují

fenotyp nealergické formy tohoto onemocnění. Rozdíly mezi astmatickými dětmi z odlišných lokalit naznačují potenciální příčinu v rozdílné kvalitě ovzduší (Libalova a kol., 2011).

Expozice znečištěnému ovzduší vede k tvorbě ROS a následně k oxidačnímu stresu, u pacientů s bronchitidou, astmatem či chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) (Chung a Marwick, 2010). Na úrovni genů se proto u dětí z Teplic a Prachatic narozených v 90. letech, u kterých byla diagnostikována bronchitida, studovaly SNP v několika významných genech (Ghosh a kol., 2016 - příloha 3), které souvisely s oxidačním stresem, reparacemi DNA a imunitními mechanismy. Byť ČB v podobných studiích vystupují jako vhodná kontrolní oblast, naše nedávná práce (Rossnerova a kol., 2016) byla zaměřena na hodnocení poškození chromozomů na úrovni mikrojader u bývalých pracovníků úpravny uranových rud MAPE Mydlovary, které se nachází v jihočeském kraji. Mapováním faktorů, které by mohly ovlivnit frekvenci mikrojader, a tím i potenciální riziko karcinogeneze a mutageneze, bylo zjištěno, že u osob, které v minulosti pracovaly s uranovými rudami, je po vystavení RTG záření nižší frekvence mikrojader než u osob, které RTG záření vystavené nebyly. Tento efekt lze vysvětlit potenciální adaptací na ionizující záření získanou díky expozici v minulosti.

Další výsledky epidemiologických studií z České republiky jsou shrnuty v **Tab. 1**. Studie se věnovaly vztahu mezi znečištěným ovzduším a vybranými genomickými parametry u lidských dobrovolníků.

Tab. 1 Přehled studií z České republiky, které zkoumaly vlivy znečištěného ovzduší na genomické parametry u lidských dobrovolníků.

Autoři studie	Lokalita	Polutant	Počet studovaných objektů (materiál)	Sledovaný biomarker
(van Leeuwen a kol., 2006)	Teplice, Prachatice	SO ₂ , NO _x , NO ₂ , NO, CO, PM _{2.5} , PM ₁₀ , PAU	47 dětí (žilní krev)	Celogenomová genová exprese
(Rossner a kol., 2011a)	Praha, Ostrava	PM _{2.5} , PAU, benzen	139 strážníků (žilní krev)	Reparační geny BER a NHEJ
(Rossner a kol., 2011b)	Praha, ČB	PM _{2.5} , PAU	891 matek (placenty)	Genetické polymorfismy
(Rossnerova a kol., 2013)	Ostrava, Prachatice	B[a]P, benzen, NO ₂ , PM ₁₀ a PM _{2.5}	200 dětí (žilní krev)	DNA metylace (27k specifických CpG míst)
(Votavova a kol., 2012)	Praha	Tabákový kouř	59 matek a novorozenců (žilní a pupečnicková krev)	Celogenomová genová exprese, qRT-PCR ²
(Rossner a kol., 2015)	Praha, Ostrava	B[a]P, PM _{2.5} , benzen	466 strážníků (žilní krev)	Celogenomová genová exprese, qRT-PCR
(Ghosh a kol., 2016)	Teplice, Prachatice	PM _{2.5} , PAU	626 dětí s bronchitidou (žilní krev)	Genetické polymorfismy
(Honkova a kol., 2018)	Karviná, ČB	PM _{2.5} , PAU	202 novorozenců (pupečnicková krev)	Celogenomová genová exprese, qRT-PCR (vybrané geny imunitních drah)

² kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Výše uvedené studie se věnovaly vlivu znečištěného ovzduší na úrovni exprese jednotlivých genů, skupin genů, či výskytu genetických polymorfismů. Komplexnější data přinesla aplikace celogenomové genové exprese, která se řadí mezi „omics“ metody. „Omics“ je odvětví biologie, které zahrnuje řadu vědeckých disciplín, jako je genomika, proteomika, transkriptomika, epigenomika, metabolomika a další. Hlavní význam „omics“ studií spočívá v globální charakterizaci a kvantifikaci biomolekul, které se překládají do struktury, funkce nebo popisují dynamiku organismu. První „omics“ disciplínou byla genomika, která soustředila bádání komplexně na celý genom. Velkokapacitní genomické technologie, které označujeme jako „high-throughput“, umožnily mapovat celé, či alespoň velké části genomu, které zároveň můžeme i zkoumat na specifické úrovni (Hasin a kol., 2017).

Kapitola pojednává o metodách v molekulární epidemiologii s ohledem na transkriptomiku a epigenomiku, které jsou využity v této disertační práci.

Transkriptomika studuje RNA na celogenomové úrovni (celogenomová genová exprese), a to jak kvalitativně (můžeme identifikovat jednotlivé transkripty), tak i kvantitativně (můžeme zjistit míru exprese daného transkriptu). Je zároveň i praktickou aplikací „dogmatu molekulární biologie“ (Crick, 1970), podle něhož je RNA funkčním prostředníkem mezi DNA a výsledným proteinem. Celogenomová genová exprese zkoumá, jaké procesy a změny se v buňce aktuálně odehrávají (Dunham a kol., 2012), což je výhoda a zároveň i hlavní limit metody, protože naměřený transkripční profil odráží aktuální stav buňky, který trvá krátký časový interval, řádově několik minut (Baudrimont a kol., 2017).

Epigenomika v současnosti intenzivně přispívá k novému pohledu na fungování genové exprese. Epigenetické změny genomu jsou definovány jako změny, které samy nejsou zakódovány v genetické sekvenci, ale významně ovlivňují transkripci genů (Jirtle a Skinner, 2007). Regulace genové exprese epigenetickými mechanismy probíhá na několika úrovních. Je známo, že pouze 1–2 % DNA kóduje bílkovinné produkty a zbytek tvoří tzv. „junk DNA“. S příchodem „high-throughput“ technologií a sekvenování nové generace (NGS) bylo zjištěno, že 90 % genomu je aktivně transkribováno a více jak 60 % těchto sekvencí tvoří geny pro nekódující RNA molekuly (Slabý a Svoboda, 2012), z níž nejvýznamnější jsou molekuly mikroRNA (miRNA), o kterých se podrobněji zmíníme v kapitole *Expresa miRNA*.

Druhým významným epigenetickým mechanismem, který stabilně ovlivňuje regulaci genové exprese, je metylace DNA, ke které dochází na určitých místech genomu nejčastěji v místech, kde

se vyskytuje velká koncentrace cytosinů a guaninů (CpG). Přibližně 75 % CpG dinukleotidů v savčích somatických buňkách může být metylováno (Tost, 2010), což je asi 1,5 % lidské DNA (Lister a kol., 2009). Hlavní funkcí metylace DNA je utlumení aktivity genů. Podrobnosti jsou popsány v kapitole *Metylace DNA*.

CELOGENOMOVÁ GENOVÁ EXPRESE

Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, hodnocení celogenomové genové exprese představuje významný nástroj pro hodnocení procesů probíhajících v organismu. V základním výzkumu má analýza celogenomové genové exprese své nezastupitelné místo, ale stejně tak je důležité vnímat i limity plynoucí z nemožnosti interpretovat signifikantní expresní změnu na dlouhých časových škálách. Zároveň přítomnost snížené, či zvýšené exprese daného transkriptu automaticky neznamená snížení nebo zvýšení množství funkčního produktu. Donedávna využívané metody hodnocení celogenomové genové exprese byly mikročipové („microarray“) technologie založené na hybridizaci vzorku s komplementární DNA/RNA (cDNA/cRNA) sondou. Poslední roky v technologiích celogenomové genové exprese však převládá sekvenační metoda RNA-Seq (Oszolak a Milos, 2011; Wang a kol., 2009).

První velkokapacitní profilování transkriptů založené na microarray technologii probíhalo v 90. letech 20. století. Z jednoho vzorku cDNA bylo možné zjistit expresní hodnoty desítek tisíc transkriptů (Duggan a kol., 1999). Na sklíčku (případně membráně) jsou ukotveny fluorescenčně, nebo radioaktivně značené sondy, na které se hybridizuje vzorek cílové cDNA nebo cRNA. Sklíčko se poté skenuje citlivými lasery a na základě intenzit fluorescenčního signálu je vyhodnocena míra exprese daného transkriptu.

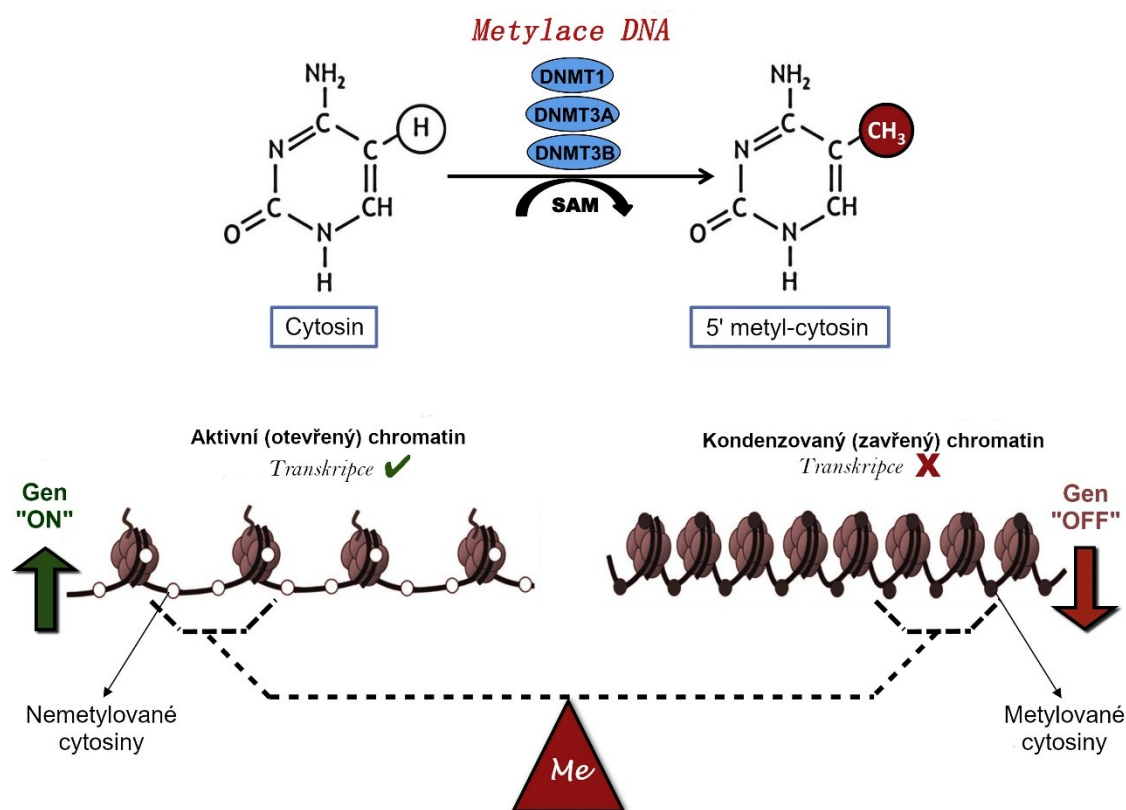
Jednou z platforem pro celogenomovou genovou expresi založenou na microarray technologii byly čipy Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChips (Illumina, CA, USA), které fungovaly na principu hybridizace na oligonukleotidových kuličkách. Na čipech Illumina byla prováděna analýza celogenomové genové exprese, která je představena v této práci.

Jedna pozice na čipu je určena pro jeden biotinem značený vzorek cRNA. Nachází se na ní sondy pro 47 231 transkriptů, z nichž 28 688 jsou anotované kódující transkripty. Dalších 11 121 transkriptů bylo anotováno provizorně a zbytek tvoří nekódující transkripty. Na sklíčku, na které se nanáší 12 vzorků, jsou vytvořeny jamky s uchycenými kuličkami, které obsahují specifickou sekvenci (adresu), díky které je možné během zpracování identifikovat transkripty na konkrétní pozici na čipu. Na adrese je dále navázána sekvence sondy, na kterou se hybridizuje

komplementární úsek cRNA (Shi a kol., 2010). Výroba těchto expresních čipů Illumina skončila v roce 2017 a plně ji nahradila metoda založená na NGS.

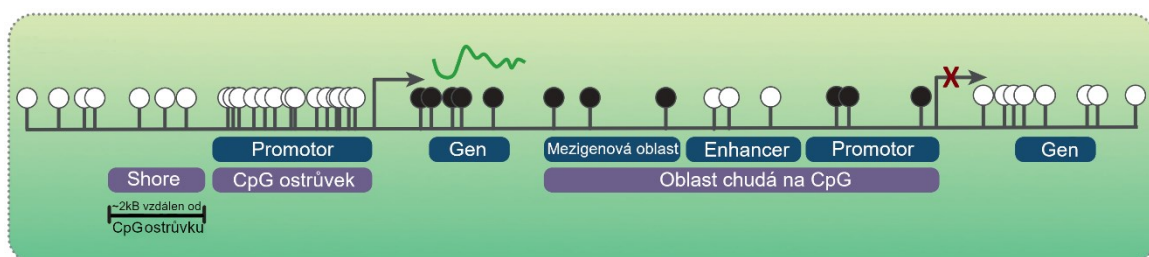
METYLACE DNA

Metylace DNA patří k nejstudovanějším epigenetickým mechanismům, které regulují genovou expresi. Hlavními funkcemi metylace DNA jsou udržování genomické stability a ovlivnění aktivity genů (Curradi a kol., 2002). DNA metyltransferázy (DNMTs) přenáší metylové skupiny z S-adenosylmethioninu (SAM) na 5-pozici cytosinu. Vazba metylové skupiny na cytosin reguluje tvar chromatinu, který je buď „otevřen“ či „zavřen“, což ovlivňuje interakce mezi DNA a proteinem (Obr. 4). Metylové skupiny navázané na DNA změni konformaci chromatinové struktury do pozice „zavřeno“ a DNA tak není přístupná transkripčním faktorům. Dochází k zastavení transkripce a nakonec i k umlčení genů, tzv. „gene silencing“ (Agrawal a kol., 2018).



Obr. 4 K metylaci DNA dochází enzymatickým navázáním metylové skupiny na cytosin. Ty mění konformaci chromatinové struktury, která je kondenzována a brání v navázání transkripčních faktorů. Transkripce genu je umlčena. (Obrázek převzat z Agrawal a kol., 2018, vydavatelství Elsevier Inc. Použití obrázku je povoleno).

Místo na genomu, které je metylováno, se značí jako CpG (Phillips, 2008). Zda dojde, či nedojde k transkripci genu, závisí na umístění CpG místa na genomu, které může být v mezigenové oblasti, v promotoru nebo zesilovači transkripce (enhanceru) genu (Obr. 5). Na genomu se též nacházejí shluky CpG míst, zvané CpG ostrůvky, které jsou nejčastěji lokalizované v promotorech provozních (housekeeping) genů. CpG ostrůvky v promotorech jsou typicky nemetylovány a genová exprese je aktivní. Metylované CpG ostrůvky v promotorech značí genovou represi. Místa pojmenovaná „shores“ jsou oblasti s nižší hustotou CpG míst, vzdálená přibližně 2 kilobáze od CpG ostrůvků. Bývají tkáňově specifická a často asociována s útlumem exprese (Lanata a kol., 2018). Promotory chudé na CpG místa a CpG místa na vzdálených enhancerech genů regulují tkáňově specifické geny (Irizarry a kol., 2009).



Obr. 5 Schématická reprezentace CpG míst na genomu. Bílá místa jsou nemetylovaná, černá jsou metylována. K transkripci může dojít, pokud je nemetylované CpG místo v promotoru genu, nebo se metylované CpG místo nachází uvnitř genu (Stirzaker a kol., 2014, Vydavatelství: Elsevier Incl. Použití obrázku je povoleno).

Výsledky získané z analýz metylace DNA jsou využívány v asociačních studiích epigenomu zvané EWAS (Epigenome-wide association studies). Ty jsou zaměřeny na celogenomové epigenetické modifikace a odvozené asociace mezi epigenetickou variací a fenotypovým projevem. Mezi technologie využívané v EWAS patří i microarray platforma Illumina Methylation Assay (Illumina CA, USA). Před více než deseti lety byly vyvinuty čipy Illumina Infinium HumanMethylation27, které umožnily kvantifikovat úroveň metylace u více než 27 000 CpG míst lokalizovaných v celkem 14 495 genech (Weisenberger a Laird, 2008). O několik let později byly čipy rozšířeny na verzi Illumina HumanMethylation450 BeadChip s více než 450 000 CpG místy, které pokrývají 96 % CpG ostrůvků lidského genomu (Bibikova a kol., 2011; Sandoval a kol., 2011). Poslední variantou jsou čipy MethylationEPIC BeadChip, které zahrnují více než 850 000 CpG míst napříč celým genomem. CpG místa z předchozí verze, na čipu značená jako sondy, byla doplněna o více než 333 000 CpG míst umístěných v oblastech enhancerů genů (Pidsley a kol., 2016).

Modifikaci DNA metylace je možné vyvolat i působením vnějších podmínek, proto mohou být CpG místa charakterizována jako významné environmentální biomarkery. V review autorů Nwanaji-Enwerem a Colicino (2020), byla metodou strojového učení u několika publikovaných studií

identifikována signifikantní CpG místa, která byla interpretována jako biomarkery expozice tabákovému kouři u dospělých kuřáků (Zeilinger a kol., 2013) i těhotných žen (Joubert a kol., 2012; Reese a kol., 2017), biomarkery expozice dlouholetému užívání marihuany (Markunas a kol., 2019) či asociované s konzumací alkoholu (Liu a kol., 2018). Z environmentálních rizik autoři zmiňují CpG místa signifikantně spojená s kumulativní expozicí olovu (Wright a kol., 2010).

I při krátkodobé expozici znečištěnému ovzduší lze pozorovat signifikantní efekty na úrovni metylace DNA (Jiang a kol., 2014). V rámci experimentu bylo 16 nekuřáků s diagnostikovaným asthma bronchiale rozděleno na dvě skupiny. Po dobu 2 hodin byla jedna skupina exponována dieselovým emisím (koncentrace PM_{2.5} 300 µg/m³) a druhá skupina filtrovanému vzduchu. Vzorky krve byly odebrány před expozicí, poté 6 a 30 hodin po expozici. I tato relativně krátká expozice vedla k modifikaci 2827 CpG míst asociovaných s inhalací. Mezi nejvýznamnější z nich patří místa ovlivňující biologické funkce genu *NFκB*, který kóduje transkripční faktor aktivující prozánětlivou odpověď vyvolanou oxidačním stresem. Tento transkripční faktor ovlivňuje prostřednictvím indukce exprese zánětlivých cytokinů, např. i v reakci na expozici dieselovým emisím (Takizawa a kol., 1999). Metylace DNA se v této studii ukazuje jako významná spojka mezi krátkodobou expozicí dieselovým polutantům a aktivitou genu, který na znečištěné ovzduší reaguje změnou exprese.

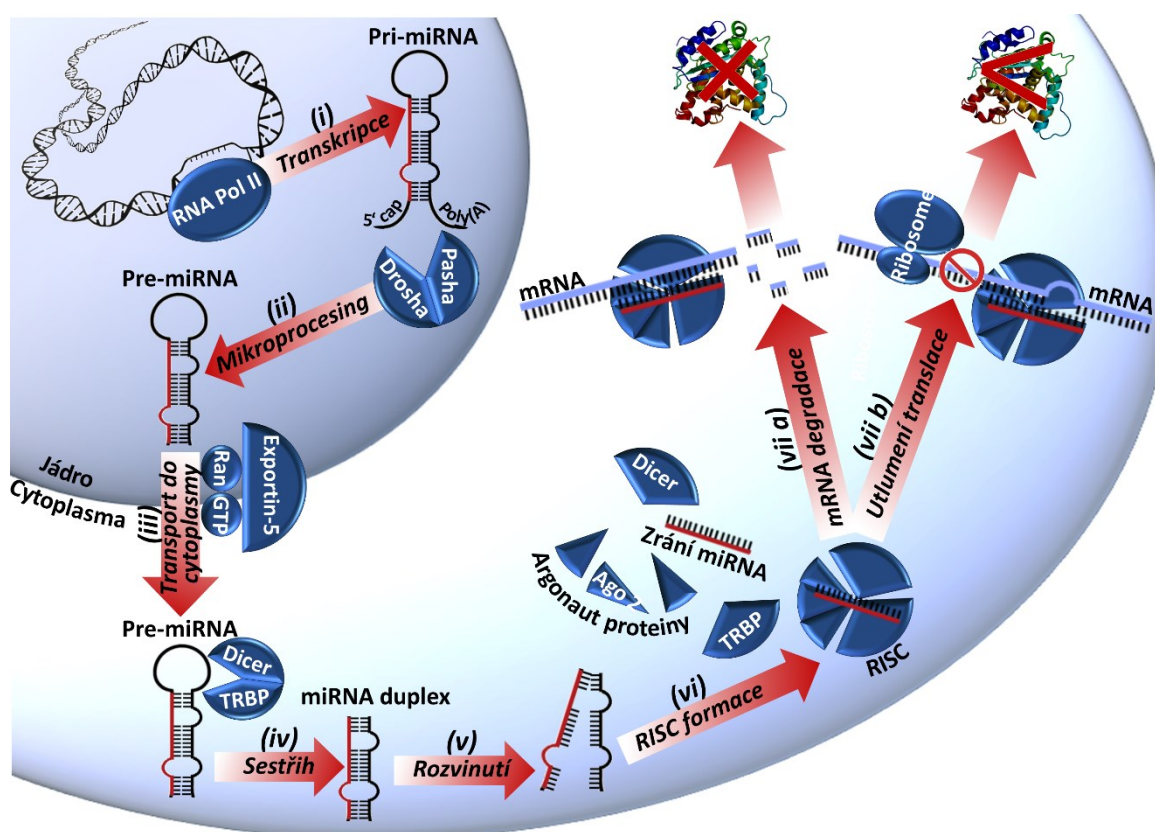
EXPRESE miRNA

Molekuly miRNA jsou malé, 22-25 nukleotidů dlouhé RNA molekuly, které vykonávají regulační funkci. Hlavní úlohou miRNA je posttranskripční regulace genové exprese, ke které dochází navázáním komplexu miRNA na oblast cílové mRNA, a následně k fyziologickému zeslabení či úplnému potlačení exprese konkrétních genů (Williams, 2008).

Až u 80 % eukaryotických mRNA je medián poločasu života méně než 2 minuty a u zbývajících 20 % dochází k degradaci do 10 minut (Baudrimont a kol., 2017). miRNA jsou oproti tomu stabilnější molekuly s průměrným poločasem života okolo 5 dní (Gantier a kol., 2011).

Schéma biogeneze miRNA je znázorněno na **Obr. 6**. Geny, které miRNA kódují, jsou v jádře přepisovány RNA polymerázou II do primárních transkriptů (pri-miRNA). Pri-miRNA jsou dále sestříhány na krátké, 70 nukleotidů dlouhé vlásenkové struktury, známé jako pre-miRNA. Tento sestřih obstarává ribonukleáza Drosha a protein DGCR8, který se přímo váže na dvouřetězcovou vlásenku. Poté je pre-miRNA rozpoznána proteinem Exportin 5 a aktivním transportem převedena do cytoplazmy. Zde je pre-miRNA zpracována do dvouřetězcové miRNA endonukleázou Dicer.

Tento proces je spjat se sestřihnutím a rozvinutím dvouřetězcové miRNA, kde jeden řetězec je inkorporován do multiproteinového komplexu miRISC (microRNA-induced silencing complex), zatímco druhý řetězec je degradován (Matkovich a kol., 2011). Obecně platí, že geny pro miRNA produkují pouze jeden dominantní řetězec (Jirtle a Skinner, 2007). miRNA spolu s multiproteinovým komplexem miRISC realizují svou funkci navázáním na 3' nepřekládanou oblast cílové mRNA, a tím zablokují, či jen utlumí translaci konkrétních proteinů (Sevignani a kol., 2006). Tato vazba umožní regulovat množství produktů v závislosti na buněčných podmínkách či tkáňové lokalizaci (Slabý a Svoboda, 2012).



Obr. 6. Schéma biogeneze miRNA od genu po enzymatické štěpení funkční miRNA v cytoplasmě, které následně vede k represi mRNA (Obrázek převzat z publikace (Rossnerova a kol., 2016b), vydavatelství: Jan Medek, Epica.)

I když jsou molekuly miRNA známy již od roku 1993 (Lee a kol., 1993), jako potenciální biomarker v karcinogenezi byly poprvé popsány o téměř deset let později, kdy bylo zjištěno spojení deregulace konkrétních miRNA se vznikem rakoviny (Calin a kol., 2002). Všechny dosud popsané miRNA jsou sdruženy v databázi miRbase (Griffiths-Jones a kol., 2008). V současné době je známo 48 860 miRNA napříč různými organismy, 2 300 je specifických pro člověka a 1115 z nich je anotováno v poslední verzi databáze miRBase (v22, březen 2018) (Alles a kol., 2019).

V genetické toxikologii a molekulární epidemiologii představuje analýza exprese miRNA zajímavý směr výzkumu. Jeden z prvních experimentů, který zkoumal vliv environmentální expozice na expresi miRNA, byl proveden na myších. Dokázal, že exprese miRNA je u původně zdravého jedince změněna po expozici cigaretovému kouři (Izzotti a kol., 2009). Z kumulativních experimentálních údajů vyplývá, že podobné účinky jsou způsobeny i různými environmentálními faktory, včetně PAU (Izzotti a Pulliero, 2014). Změna exprese miRNA je tak obecným mechanismem, který hraje klíčovou roli v propojení expozice environmentálním toxickým agens s jejich patologickými následky. Kromě toho jsou specifické miRNA asociovány s různými onemocněními, včetně plicních nemocí či astmatu (Sessa a Hata, 2013). Jiná epidemiologická studie sledovala 153 mužů, kteří byli exponováni od 4 hod po 28 dní PM_{2.5} a dalším polutantům. Nejsilnější asociace byla mezi 7-denní expozicí PM_{2.5} a expresí miRNA, které se účastní drah, souvisejících s imunitní odpovědí (Fossati a kol., 2014). Nedávno byl publikován souhrnný článek (Tumolo a kol., 2020), ve kterém jsou uvedeny miRNA jako biomarkery expozice znečištěnému ovzduší, zejména prachovým částicím, dieselovým emisím, ozónu, PAU, polychlorovaným bifenylům, pesticidům a těžkým kovům. V současném review (Sima a kol., 2021) autoři popsali specifické miRNA, které jsou deregulované působením znečištěného ovzduší a zároveň je jejich odlišná exprese spojena i s rakovinou plic.

Disertační práce vznikla v Oddělení genetické toxikologie a epigenetiky Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i. (ÚEM AV ČR) a je založena na čtyřech impaktovaných publikacích, které popisují vliv expozice znečištěnému ovzduší a jiných polutantů na realizaci genetické informace u člověka. Práce se věnuje změnám genové exprese a epigenetického profilu u novorozenců z rozdílných lokalit ČR, které se liší environmentální zátěží.

V letech 2013-2016 byl v ÚEM AV ČR řešen projekt Grantové agentury ČR „Dopady znečištění ovzduší na genom novorozenců“ (13-13458S), v rámci něhož byl u matek a novorozenců z Karviné a z ČB sledován vliv znečištěného ovzduší, rozdílného prostředí a typů porodu na oxidační poškození DNA a peroxidaci lipidů (Ambroz a kol., 2016). Byly též analyzovány hladiny PAU v moči, mateřském mléce a stravě (Sram a kol., 2016). U studovaného podsouboru novorozenců, na kterém je založena tato práce, byla hodnocena celogenomová genová exprese (Honkova a kol., 2018 - příloha 1). Na studii v roce 2016 navázal projekt AV ČR s názvem „Ovlivnění novorozenců prostředím“ (Strategie AV 21 – QUALITAS), díky kterému bylo možné do disertační práce zahrnout i výsledky získané z epigenetických analýz u novorozenců narozených v Mostě.

Protože byly lokality primárně zvoleny na základě odlišné úrovně znečištěného ovzduší, bylo jedním z prvních cílů vyhodnotit kvalitu ovzduší ve sledovaných lokalitách a odběrových obdobích. Prostor, v jakém těhotná žena žije, může mít významný vliv na vývoj novorozence a posléze i zdravotní stav v průběhu života. Látky, které znečišťují ovzduší, jsou v této práci reprezentovány $PM_{2.5}$ a B[a]P. Při zvýšené koncentraci těchto látek a překračování imisních limitů jsou polutanty v ovzduší značnými rizikovými faktory, které prokazatelně zhoršují zdravotní stav člověka a mohou vést až ke karcinogenezi.

Disertační práce má několik částí, a proto i několik odlišných cílů. Ke zjištění nových poznatků bylo využito metod molekulární biologie na dvou úrovních:

- 1) na úrovni mRNA molekul (transkriptů), které odráží právě probíhající děje v buňce a přepisují geny do funkčních jednotek (uváděná jako celogenomová genová exprese);
- 2) na úrovni epigenetické, do které je zahrnuta metylace DNA a exprese miRNA, které regulují genovou expresi a odráží tak změnu v potenciálně ovlivněných biologických procesech.

Ve výše zmíněné publikaci (Honkova a kol., 2018 - příloha 1) bylo hlavním záměrem vyhodnotit změny celogenomové genové exprese novorozenců z Karviné a ČB narozených v letech 2013 a

2014. Kromě kvantifikace DEGs bylo cílem nalézt i nejvýznamnější DEGs, které mohou indikovat změnu aktivity biologických procesů, popsat jejich funkce a zařadit je do biochemických drah, které mohou být u novorozenců funkčně ovlivněny. Protože microarray analýzy umožňují zjistit rozdílnou aktivitu téměř celé známé funkční oblasti genomu, bylo rovněž cílem zaměřit se na hledání odlišně exprimovaných transkriptů, které řídí imunitní odpověď, reparační mechanismy DNA nebo buněčný cyklus.

Hlavním záměrem druhé části, která vychází z dosud nepublikovaných výsledků, bylo vyhodnotit změny v epigenetickém profilu novorozenců z Mostu, narozených v roce 2016, a novorozenců z ČB, kteří jsou podsouborem z první části práce. Cílem bylo porovnání odlišného epigenetického profilu, který bude vázan na danou lokalitu. Na úrovni genově-specifické metylace DNA, která cílí na více než 850 000 potenciálně metylovaných míst genomu, je možné identifikovat specifická metylovaná místa na DNA, která posléze regulují expresi určitého genu (nebo skupin genů), a tím vyvolává změnu fyziologické funkce. Při hodnocení exprese miRNA je cílem nalézt DE miRNA mezi novorozenci z Mostu a ČB. Tyto molekuly rovněž genovou expresi regulují a mohou tak zvýšit nebo snížit expresi konkrétních genů. V případě celogenomové genové exprese a metylace DNA byly analyzovány i genové sady a genové dráhy, jejichž funkce může být těmito regulačními mechanismy ovlivněna.

Disertační práce řeší také několik dílčích cílů, které doplňují výše zmíněné. Další publikace, ze které disertační práce vychází, dává možnost diskutovat rozdíly v celogenomové genové expresi mezi novorozenci a dospělými jedinci, kteří byli dlouhodobě exponováni rozdílné úrovni znečištěného ovzduší a rovněž pocházejí z různých lokalit ČR (Rossner a kol., 2015 - příloha 2). Dále bude diskutován výskyt SNP u genů, které ovlivňují metabolismus xenobiotik, imunitní odpověď a opravné mechanismy DNA u velkého souboru dětí s bronchitidou, žijících v oblasti se znečištěným ovzduším (Ghosh a kol., 2016 - příloha 3). V metodické části disertační práce, která popisuje statistické zpracování dat metylace DNA microarray platformy, jsou dále diskutována data z použité statistických přístupů získaná u kohorty osob exponovaných nanočásticím v pracovním prostředí (Rossnerova a kol., 2020a - příloha 4).

Pilotní výzkum, který je v disertační práci prezentován, je směřován k hledání interakcí v regulaci genové exprese.

Stěžejním cílem disertační práce bylo ověření hypotézy, že v rozdílném prostředí několika lokalit České republiky dochází v průběhu prenatálního vývoje novorozenců k významným genetickým změnám, které se projevují na molekulární úrovni.

Disertační práce má tyto cíle:

- Charakterizovat populační rozdíly u studovaných párů matka-novorozenec žijících v různých lokalitách ČR a vyhodnotit vztah ke znečištění ovzduší v době, kdy byl odebrán biologický materiál.
- S využitím celogenomového přístupu popsat DEGs u novorozenců z Karviné a ČB, četnost těchto genů, ovlivnění jejich aktivity a funkci v biologických procesech.
- Identifikovat rozdílné profily genově-specifické metylace DNA u novorozenců narozených v Mostě a ČB a nalézt biomarkery, reprezentované rozdílně metylovanými CpG místy na genomu, které jsou specifické pro jednotlivé lokality.
- Nalézt diferenciálně exprimované miRNA u novorozenců z Mostu a ČB, které by mohly indikovat dlouhodobé změny na genetické úrovni.

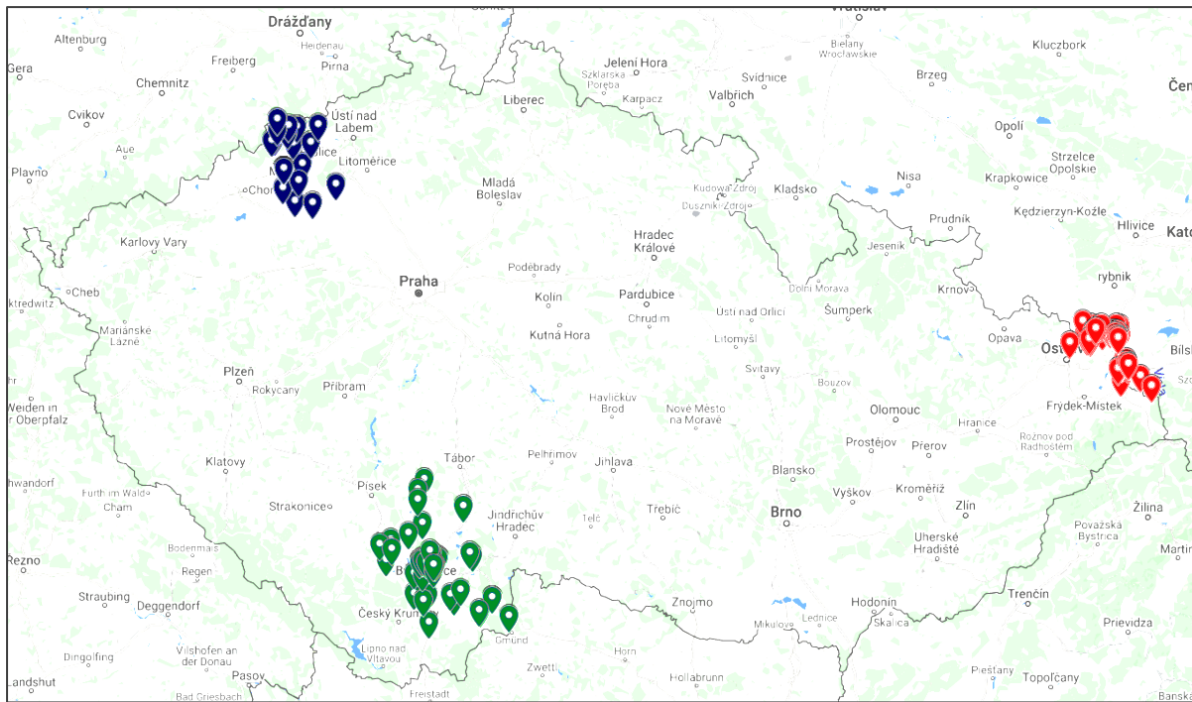
Sledování novorozenci se narodili v Nemocnici s poliklinikou Karviná-Ráj, Nemocnici České Budějovice, a.s. a v Krajské zdravotní a.s. Nemocnice Most, o.z. Studie byla schválena Etickou komisí ÚEM AV ČR, etickými komisemi zúčastněných nemocnic, a matky novorozenců souhlasily s poskytnutím biologického materiálu a podrobných údajů o sobě i dítěti podpisem informovaného souhlasu o dobrovolné účasti ve studii. Podmínkou zapojení do studie byly matky nekuřačky, které porodily v termínu (37. – 41. týden). Součástí odběrů byly podrobné mateřské dotazníky. Do analýz byl taktéž zahrnut lékařský novorozenecký dotazník se zdravotnickými údaji o průběhu porodu a o dítěti.

Pro zpřehlednění studovaných subjektů z Karviné, Mostu a ČB (**Obr. 7**) a zvolených metod byla disertační práce rozdělena na tři studie (Studie 1, 2 a 3; **Obr. 8**). Použité metody byly prováděny v rámci výzkumných projektů uvedených v úvodu práce, přičemž pro pilotní výzkum se počet vzorků v každé studii lišil dle dostupnosti a kvality biologického materiálu.

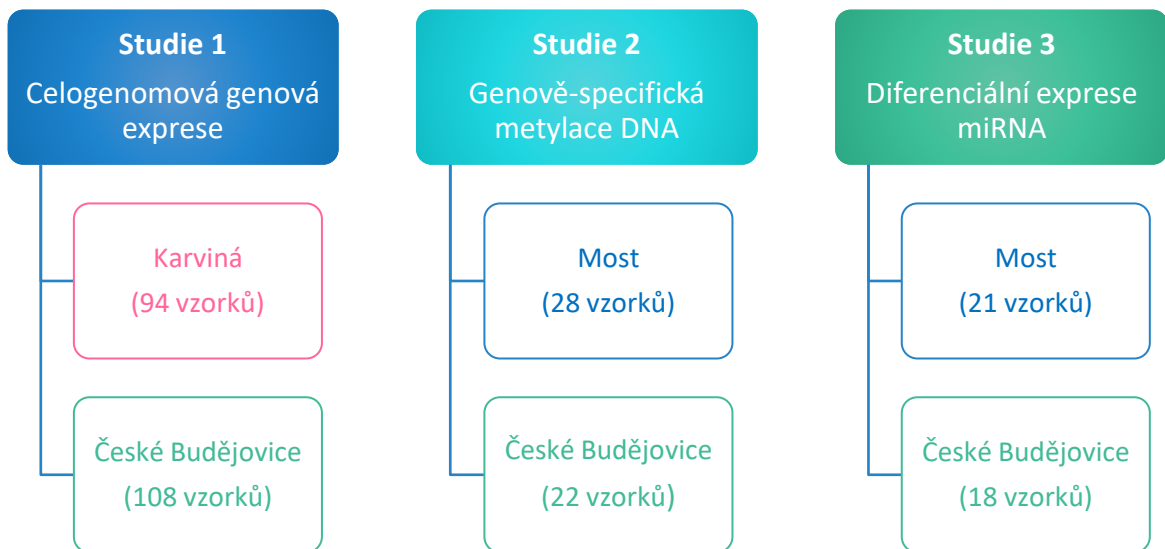
Studie 1 zahrnovala novorozence z Karviné a ČB. Novorozenci z Karviné narození od srpna 2013 do října 2013 (období L) a poté od ledna 2014 do května 2014 (období Z) byli srovnáváni s novorozenci z ČB narozenými ve stejném období. Studie byla zaměřena na diferenciální celogenomovou genovou expresi.

Studie 2 se věnovala genově-specifické metylaci DNA u vzorků novorozenců z Mostu, kteří byli narozeni od března do srpna 2017, ve srovnání se vzorky novorozenců z ČB narozenými od ledna do března 2014 (podsoubor Studie 1, pro nějž je k dispozici i miRNA pro sjednocení souborů všech tří studií).

Studie 3 popisuje diferenciální expresi miRNA u souboru novorozenců, kteří tvoří podsoubor ze Studie 2. Z důvodu rozdílného období odběrů vzorků byly ve Studii 2 a 3 srovnávány pouze lokality.



Obr. 7 Mapa ČR s vyznačením bydliště matek zahrnutých do studie.



Obr. 8 Přehled studií, které rozdělují disertační práci do více celků podle provedených analýz.

MĚŘENÍ KONCENTRACÍ LÁTEK VE VNĚJŠÍM OVZDUŠÍ

Data naměřených koncentrací PM_{2.5} a B[a]P během období porodů ve Studii 1 byla získána ze stacionárních vzorkovačů High Volume (HiVol) 3000 Air Sampler (model ECO-HVS3000, Ecotech, Australia) v reprezentativních lokacích studovaných lokalit. Vzorky z frakcí PM_{2.5} byly sbírány na membránové filtry (Pallflex EMFAB, TX40H120-WW) a vyměňovány nejpozději každých 72 hod. Způsob odběru vzorků ovzduší, extrakce hmotnostních frakcí z filtrů a chemické analýzy PAU s použitím chromatografie (GC-MS/MS) byly popsány v [Topinka a kol. \(2011\)](#).

Protože data získaná z HiVol signifikantně korelovala ($r=0,86$, $p < 0,001$) s hodnotami získanými z jednotlivých měření z blízkých stanic ČHMÚ, byly oba datasety spojeny pro zvýšení pokrytí expozice polutantům v období porodů. Informace o průměrné roční koncentraci vybraných polutantů (B[a]P, PM_{2.5}, SO₂, NO_x a NO₂) byly získány z tabelárních ročenek ČHMÚ³.

BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Biologickým materiálem od novorozenců byla pupečnicková krev, odebíraná ihned po porodu do dvou zkumavek VACUETTE obsahujících etylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA). Jedna zkumavka byla v porodnicích předzpracována stabilizační částí kitu LeukoLOCK Total RNA Isolation System (Ambion, TX, USA), který filtrací plné krve přes filtr LeukoLOCK a následným promytím stabilizačním roztokem zajistí po zmrazení zachování integrity RNA. Do laboratoře ÚEM byly doručeny zamražené filtry LeukoLOCK se zachycenými leukocyty stabilizovanými v roztoku RNA*later*. Druhá zkumavka krve (s částečně separovanou plazmou) sloužila pro izolaci DNA a po odběru z pupečnicku byla ihned zamražena při -20 °C.

STUDIE 1 - ZPRACOVÁNÍ RNA

Celková RNA byla izolována z leukocytů separací na magnetických kuličkách izolační částí kitu LeukoLOCK Total RNA Isolation System (Ambion, TX, USA). Koncentrace byla měřena na přístroji Nanodrop ND1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Ve výtěžcích izolované

³ http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/tab_roc/tab_roc_CZ.html

RNA nebyl mezi studovanými lokalitami pozorován signifikantní rozdíl. Integrita RNA (RIN) byla hodnocena na Agilent 2100 Bioanalyzeru (Agilent Technologies, CA, USA).

Celkem 202 vzorků s průměrnou hodnotou RNA Integrity Number (RIN) $7,31 \pm 1,13$ bylo uchováno při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další analýzu.

RNA v množství 200 ng byla reverzně přepsána do cDNA a poté *in vitro* transkripcí převedena na cRNA použitím kitu IlluminaTotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, TX, USA). Celkem 750 ng cRNA značené biotinem bylo hybridizováno na čípech Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChips (Illumina, CA, USA). Hybridizační postup byl přesně dodržován dle protokolu předepsaného výrobcem. Hybridizované čipy byly naskenovány pomocí systému iScan (Illumina, CA, USA) v celkovém počtu 18 čipů (12 vzorků na 1 čipu). Každý naskenovaný vzorek obsahuje hodnoty intenzit u 47 324 sond pro více než 31 000 anotovaných genů odvozených z National Center for Biotechnology Information (NCBI), RefSeq Release 38.

STUDIE 2 - ZPRACOVÁNÍ DNA

Genomická DNA (gDNA) byla izolována vysolovací Milerovou metodou (Miller a kol., 1988), modifikovanou dle Schmuczerova a kol. (2009).

DNA v množství 1000 ng u 50 vzorků (22 z Mostu a 28 z ČB) byla upravena hydrogensířičitanem sodným použitím kitu EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, CA, USA) pro konverzi nemetylovaných cytosinů na uracily, zatímco metylované cytosiny zůstaly nezměněny. Konvertovaná DNA byla po denuraci, fragmentaci a precipitaci hybridizována na čípech Infinium MethylationEPIC Kit (Illumina, CA, USA). Každý čip obsahuje 8 vzorků a je skenován na přístroji iScan (Illumina, CA, USA). V každém slotu se nachází více než 850 000 metylačních míst s rozlišením na jeden nukleotid. Metylační status každého CpG místa je hodnocen dvoukanálově měřením intenzit páru metylované a nemetylované sondy.

STUDIE 3 - ZPRACOVÁNÍ miRNA

Celkem 39 vzorků (21 z Mostu a 18 z ČB) bylo zpracováno alternativním postupem LeukoLOCK Total RNA Isolation System (Ambion, TX, USA), který na separaci RNA využívá kombinaci kolonek a TRI Reagent. Důvodem použití tohoto protokolu byla možnost vycytání i krátkých molekul RNA, které se na magnetické kuličky využívané pro izolaci RNA nenaváží. Knihovny malých RNA byly připraveny ze 150 ng celkové RNA použitím Qiaseq miRNA Library Kit (Qiagen Manchester Ltd; UK). Kit separuje veškeré malé RNA, včetně miRNA a piRNA. Knihovny miRNA o velikosti fragmentů cca 180 bází byly ověřeny pomocí Fragment Analyzeru (Agilent Technologies, CA, USA) s použitím High

Sensitivity NGS Kit. Sekvenování knihoven (o koncentraci 4 nmol) v počtu osmi vzorků v jednom sekvenačním běhu bylo provedeno na MiSeq systému (Illumina, CA, USA) s využitím MiSeq Reagent Kitu v3 (Illumina, CA, USA).

STATISTICKÁ ANALÝZA

Epidemiologická data získaná z dotazníkových šetření u studovaných skupin byla zpracována v prostředí R základními metodami popisné statistiky. V závislosti na rozložení dat byl pro porovnání mezi jednotlivými lokalitami, případně obdobími, proveden buď *t-test* nebo neparametrický Mann-Whitney Sum *U-test*. Test ANOVA byl použit při porovnávání více faktorů získaných z dotazníků.

STUDIE 1 - ANALÝZA CELOGENOMOVÉ GENOVÉ EXPRESE

Naskenovaná primární data z hybridizace na čípech Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChips (Illumina) byla nejprve importována do nástroje Genome Studio (Illumina) a výstupní matice byla nahrána do prostředí R s hodnotami průměrných intenzit fluorescenčního signálu a detekčních p-hodnot každého transkriptu. Data genové exprese byla očištěna od pozadí, normalizována kvantilovou normalizací a zlogaritmována. Přibližně 30 % hodnot se nacházelo pod detekčním limitem (detekční p-hodnota < 0,05). Batch efekt, který byl způsoben čipem (na každém čipu se nacházelo 12 vzorků), byl odstraněn funkcí *ComBat* (balíček *sva*). Pro kompletní vyhlazení batch efektu byl parametr čipu zahrnut jako jeden z faktorů do lineárního modelu, který byl použit pro detekci specifických DEGs. Dalšími faktory aplikovanými v lineárním modelu byly věk matky, pohlaví dítěte a hodnota RIN. Faktory byly vybrány na základě ANOVA testování, které hodnotilo efekt přidání potenciálního nového faktoru do lineárního modelu. Tento efekt byl kvantifikován rozložením p-hodnot, které byly asociovány s jednotlivými transkripty od signifikantních k nesignifikantním a obráceně. Diferenciálně exprimované geny byly identifikovány použitím funkce *topTable* (balíček *limma*). p-hodnoty byly upraveny metodou pro mnohočetné testování Benjamini-Hochberg (BH) (Benjamini a Hochberg, 1995) a adjustovány korekcí typu FDR (false discovery rate). Transkripty s BH q-value < 0,05 byly považovány za signifikantní.

Hodnoty \log_2FC popisují násobky rozdílu v diferenciální expresi, přičemž limit pro signifikanci byl nastaven na $\log_2FC > 0,8$ pro up-regulované a $\log_2FC < -0,8$ pro down-regulované transkripty. Analýza obohacených genových sad (geneset enrichment) byla provedena nástrojem Enrichrwebtool (Chen a kol., 2013; Kuleshov a kol., 2016). Jako signifikantně ovlivněné biochemické dráhy z databází KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) a WikiPathways

2015 byly považovány dráhy s $p < 0,05$. Dráhy byly dále charakterizované pomocí Z-skóre, které je definováno jako rozdíl mezi odchylkou z váženého průměru expresních hodnot genů v každé dráze a odchylkou z váženého průměru všech genů po normalizaci.

STUDIE 2 - ANALÝZA GENOVĚ-SPECIFICKÉ METYLACE DNA

Primární data z čipů Infinium MethylationEPIC Kit (Illumina) charakterizována intenzitami fluorescenčního signálu byla importována do prostředí R. Primární analýza dat byla provedena balíčkem *minfi*. Data byla očištěna od pozadí, normalizována kvantilovou normalizací a zlogaritmována. Z více než jednoho milionů sond hybridizovaných na čipech bylo postupnou filtrací získáno 765 106 sond, které byly následně analyzovány. Z metylačního setu byly odstraněny sondy s nízkou detekční p-hodnotou, sondy na pohlavních chromozomech, cross-reaktivní sondy a sondy se známými SNPs v CpG místech.

Beta hodnoty (získané funkcí *getBeta* z balíčku *minfi*) reprezentují úroveň metylace a jsou poměrem fluorescenčního signálu metylovaných a nemetylovaných míst. Signifikantní β hodnoty metylovaných míst $< 0,2$ jsou považovány za hypometylovaná, zatímco $\beta > 0,8$ za hypermetylovaná. Pro analýzu byly také získány *M* hodnoty ($\log\beta$ hodnot).

Batch efekt, který byl detekován u některých čipů (na každý čip se nanáší 8 vzorků) na základě vykreslení hlavních komponent, byl následně odstraněn funkcí *ComBat* z balíčku *sva*. Označení čipu bylo rovněž použito jako faktor v lineárním modelu. Seznam diferenciálně hypo- a hypermetylovaných míst byl získán použitím funkce *topTable* (*limma*).

Pro zpracování microarray dat je nejvyužívanější korekce p-hodnot metodou mnohočetného testování BH (Benjamini a Hochberg, 1995), která byla použita například v naší nedávné studii (Rossnerova a kol., 2020a - příloha 4). Nicméně při použití BH metody ve Studii 2 bylo získáno několik desítek tisíc diferenciálně metylovaných míst. Proto pro zesílení významnosti nalezených CpG míst byla použita robustnější korekce na mnohočetné testování, které bylo v této studii provedeno přísnější metodou Holm (Holm, 1979). Diferenciálně metylovaná místa s adjustovanou p-hodnotou $< 0,01$ byla považována za signifikantní.

Použitím anotačního balíčku *AnnotationDbi* byly získány kompletní anotace, včetně funkčního přiřazení CpG místa ke konkrétnímu genu a pozici místa na genu. U nalezených diferenciálně metylovaných míst byla na základě známých ENTREZID a s využitím funkcí knihoven *enrichplot* a *clusterProfiler* provedena statistická a funkční analýza obohacených genových sad a popsána

genová ontologie u potenciálně ovlivněných biologických procesů. Vykreslení genů v KEGG drahách bylo použito v nástroji KEGG mapper (Kanehisa a Sato, 2020).

STUDIE 3 - ANALÝZA EXPRESE miRNA

FASTQ soubory z osmi sekvenačních běhů byly nahrány do online nástroje GeneGlobe (Qiagen) pro provedení primární analýzy. Analýzou byla zjištěna distribuce sekvenovaných typů RNA a počtu miRNA. V datech bylo identifikováno v průměru 2 284 201 čtení miRNA molekul, které průměrně tvořily více než 60 % celkového počtu sekvenačního čtení. V GeneGlobe byly identifikovány počty UMI sekvencí miRNA (Unique Molecular Index), které kompenzují sekvenační bias. Poměr počtu celkových čtení a UMI čtení se neliší o více než 10 %. Molekuly piRNA do sekundární analýzy nebyly zahrnuty.

Sekundární analýza pro detekci diferenciólně exprimovaných miRNA byla provedena s použitím knihovny DESeq2 v programu R (Love a kol., 2014) na UMI čteních. Pro párové porovnání mezi lokalitami byl použit Waldův test (Chen a kol., 2011), který je vhodný pro testování sekvenačních dat, pro korekci na multičetné testování byla použita BH metoda (Benjamini a Hochberg, 1995). Rovnice modelu počítala s rozdílem mezi lokalitami, kde byl ovlivňujícím faktorem zařazen batch sedmi sekvenačních běhů, které by mohly ovlivnit biologický rozdíl.

Hodnoty \log_2FC popisují stejně jako ve Studii 1 násobky rozdílu v diferenciólní expresi, přičemž limit pro signifikanci byl nastaven na $\log_2FC > 0$ pro up-regulované a $\log_2FC < 0$ pro down-regulované miRNA.

Některé z vybraných diferenciólně exprimovaných miRNA byly anotovány v open-source platformě miRWalk pro predikci cílů známých genů, které miRNA regulují (Sticht a kol., 2018). Interakce a uvedené biologické procesy jsou získány z databáze miRTarBase (Hsu a kol., 2011).

CHARAKTERISTIKA SUBJEKTŮ

Největší soubor novorozenců byl sledován ve Studii 1, kterou tvořilo celkem 202 párů matka-novorozenec z Karviné a ČB. Do Studie 2 bylo zahrnuto 50 párů z Mostu a ČB a Studie 3 se zabývala 39 páry matka-novorozenec z Mostu a ČB.

Základní charakteristiky matek a novorozenců byly založeny na mateřském a lékařském dotazníku. Nejdůležitější parametry jsou uvedeny v **Tab. 2** (Studie 1), **Tab. 3** (Studie 2) a **Tab. 4** (Studie 3).

Ve Studii 1 byly soubory rozděleny na dvě odběrová období, která byla charakterizována datem narození novorozenců. I když několik matek kouřilo v prvním trimestru těhotenství, signifikantní vliv na výsledky Studie 1 nebyl zaznamenán a vzorky byly v analyzovaném souboru ponechány.

Některé parametry se mezi studovanými skupinami mírně lišily. Pasivní kouření v domácnosti a aktivní kouření matek před těhotenstvím ($p < 0,05$) a v 1. trimestru bylo častější u matek z Karviné. Statistická významnost ($p < 0,05$) byla pozorována u dosaženého vzdělání a věku matky: v Karviné byl vyšší podíl mladších matek se základním vzděláním.

Všech 28 párů z ČB hodnocených ve Studii 2 bylo zároveň součástí Studie 1. U matek žijících v okrese Most pozorujeme vyšší podíl kuřaček před těhotenstvím (50 %) a vyšší počet žen se základním vzděláním (9 %). Statisticky významná ($p < 0,01$) je nižší porodní váha novorozenců z Mostu (3456 ± 515 g) oproti porodní váze novorozenců z ČB (3602 ± 459 g).

Studie 3 zahrnovala novorozence z Mostu a ČB, kteří tvořili podsoubor Studie 2. Protože bylo několik vzorků vyřazeno kvůli špatné kvalitě miRNA knihoven a v souboru je tedy zařazeno méně subjektů než ve Studii 2, je charakteristika Studie 3 uvedena samostatně v **Tab. 4**. Rozdíly mezi oběma lokalitami jsou obdobné jako ve Studii 2.

Tab. 2 Základní charakteristiky párů matka-novorozenec pro Studii 1 získané z mateřských a lékařských dotazníků.

	Karviná		ČB	
	Období L (N=43)	Období Z (N=51)	Období L (N=34)	Období Z (N=74)
	<i>průměr; SD nebo N (%)</i>	<i>průměr; SD nebo N (%)</i>	<i>průměr; SD nebo N (%)</i>	<i>průměr; SD nebo N (%)</i>
Matky – základní charakteristiky				
Věk ($p < 0,05$ při srovnání lokalit)	28,9; 4,8	30,6; 4,6	32,3; 3,9	32,4; 4,4
BMI	24,1; 4,0	24,2; 4,5	23,6; 3,9	24,0; 5,0
Typ porodu				
Vaginální	26 (60 %)	30 (59 %)	24 (71 %)	38 (51 %)
Císařský řez	17 (40 %)	15 (29 %)	9 (26 %)	31 (42 %)
Jiný*	0 (0 %)	6 (12 %)	1 (3 %)	5 (7 %)
Faktory životního stylu				
Vzdělání matky				
Základní ($p < 0,05$ při srovnání lokalit)	6 (14 %)	1 (2 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Středoškolské	22 (51 %)	27 (53 %)	21 (62 %)	43 (58 %)
Vysokoškolské	15 (35 %)	20 (40 %)	11 (32 %)	28 (38 %)
Neznámé	0 (0 %)	3 (6 %)	2 (6 %)	3 (4 %)
Aktivní kouření				
Před těhotenstvím ($p < 0,05$ při srovnání lokalit)	6 (14 %)	11 (21 %)	4 (12 %)	5 (7 %)
V 1. trimestru	5 (12 %)	4 (8 %)	1 (3 %)	3 (4 %)
Ve 3. trimestru	0 (0 %)	2 (4 %)	1 (3 %)	0 (0 %)
Pasivní kouření v domácnosti	7 (16 %)	10 (20 %)	6 (18 %)	10 (14 %)
Konzumace alkoholu v těhotenství*	7 (16 %)	5 (10 %)	6 (18 %)	9 (12 %)
Užívání vitaminů během těhotenství	27 (63 %)	33 (65 %)	22 (65 %)	57 (77 %)
Novorozenci – základní charakteristiky				
Pohlaví				
Chlapec	22 (51 %)	20 (39 %)	14 (41 %)	38 (51 %)
Děvče	21 (49 %)	31 (61 %)	20 (59 %)	36 (49 %)
Porodní váha (g)	3340; 469	3373; 419	3413; 448	3491; 438

*Klešťový porod či porod vakuumextrakcí.

*Konzumace alkoholických nápojů častější než 1x týdně.

Tab. 3. Základní charakteristiky párů matka-novorozenec pro Studii 2 získané z mateřských a lékařských dotazníků.

	Most	ČB
	N = 22	N = 28
	průměr; SD nebo N (%)	průměr; SD nebo N (%)
Matky – základní charakteristiky		
Věk	31,3; 5,0	32,8; 3,9
BMI	24,1; 4,7	24,4; 3,8
Typ porodu		
Vaginální	14 (64 %)	22 (71 %)
Císařský řez	7 (32 %)	6 (29 %)
Jiný ^x	1 (5 %)	0 (0 %)
Faktory životního stylu		
Vzdělání matky		
Základní	2 (9 %)	0 (0 %)
Středoškolské	12 (55 %)	17 (61 %)
Vysokoškolské	8 (36 %)	8 (29 %)
Neznámé	0 (0 %)	2 (7 %)
Aktivní kouření		
Před těhotenstvím (p < 0,05)	11 (50 %)	8 (29 %)
V 1. trimestru	1 (5 %)	1 (4 %)
Ve 3. trimestru	0 (0 %)	0 (0 %)
Pasivní kouření v domácnosti (p < 0,05)	7 (32 %)	5 (18 %)
Konzumace alkoholu v těhotenství*	2 (9 %)	2 (7 %)
Užívání vitaminů během těhotenství	16 (73 %)	20 (71 %)
Novorozenci – základní charakteristiky		
Pohlaví		
Chlapec	10 (45 %)	15 (54 %)
Děvče	12 (55 %)	13 (46 %)
Porodní váha (g) (p < 0,05)	3456; 515	3602; 459

^xKlešťový porod či porod vakuumextrakcí.

*Konzumace alkoholických nápojů častější než 1x týdně.

Tab. 4. Základní charakteristiky párů matka-novorozenec pro Studii 3 získané z mateřských a lékařských dotazníků.

	Most	ČB
	N = 21	N = 18
	<i>průměr; SD nebo N (%)</i>	<i>průměr; SD nebo N (%)</i>
Matky – základní charakteristiky		
Věk	31,2; 5,1	33,6; 3,4
BMI	24,4; 4,5	23,6; 3,5
Typ porodu		
Vaginální	13 (62 %)	17 (94 %)
Císařský řez	7 (33 %)	1 (6 %)
Jiný*	1 (1 %)	0 (0 %)
Faktory životního stylu		
Vzdělání matky		
Základní	2 (10 %)	0 (0 %)
Středoškolské	12 (57 %)	10 (56 %)
Vysokoškolské	7 (33 %)	6 (18 %)
Neznámé	0 (0 %)	2 (18 %)
Aktivní kouření		
Před těhotenstvím ($p < 0,05$)	10 (48 %)	5 (28 %)
V 1. trimestru	1 (1 %)	1 (6 %)
Ve 3. trimestru	0 (0 %)	0 (0 %)
Pasivní kouření v domácnosti ($p < 0,05$)	7 (33 %)	3 (17 %)
Konzumace alkoholu v těhotenství*	2 (10 %)	0 (0 %)
Užívání vitaminů během těhotenství	15 (71 %)	13 (72 %)
Novorozenci – základní charakteristiky		
Pohlaví		
Chlapec	10 (48 %)	8 (44 %)
Děvče	11 (52 %)	10 (56 %)
Novorozenecká hmotnost (g) ($p < 0,05$)	3495; 494	3664; 526

*Klešťový porod či porod vakuumextrakcí.

*Konzumace alkoholických nápojů častější než 1x týdně.

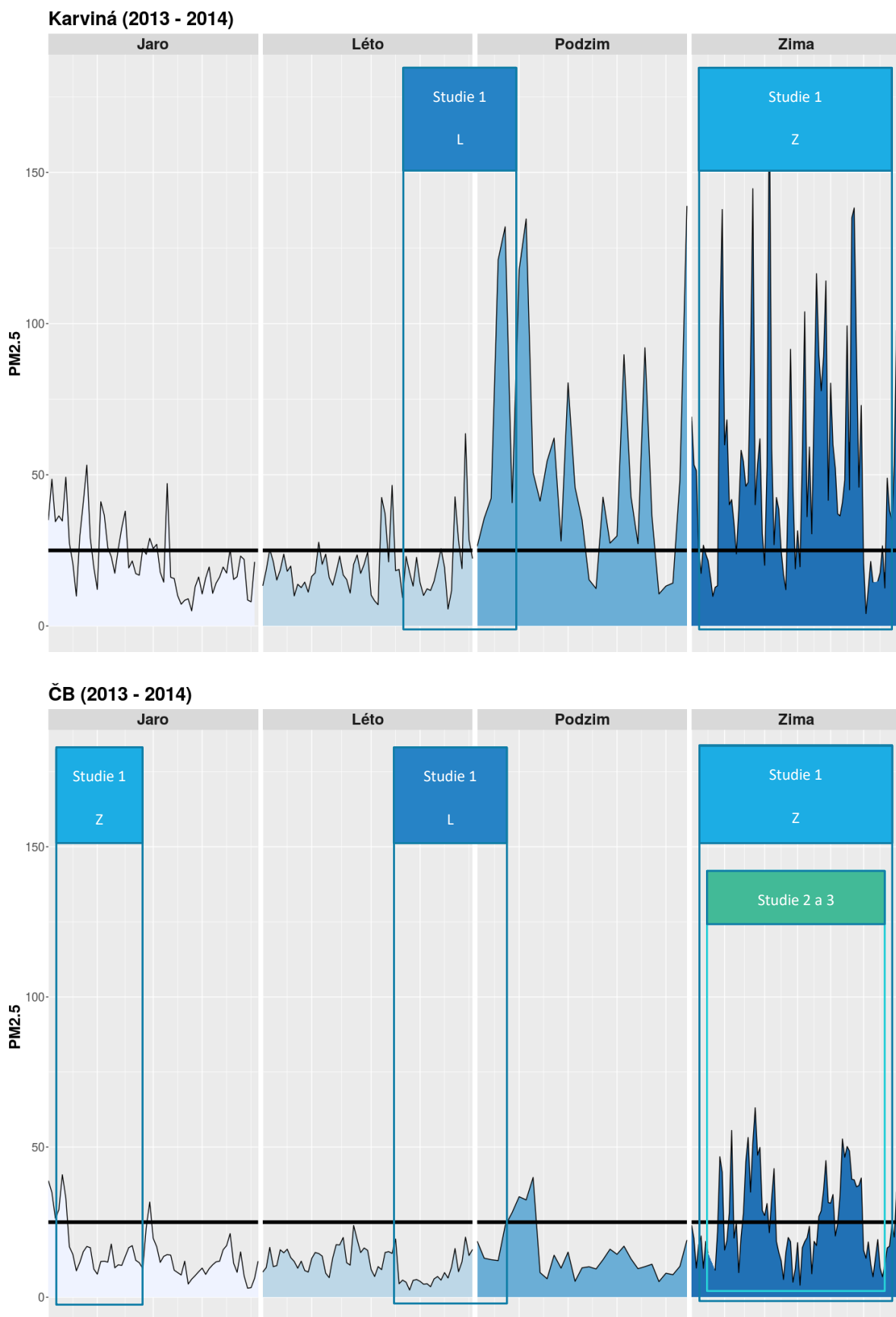
Protože byla ve Studii 1 porovnávána dvě období ve dvou následujících letech (2013 a 2014) a ve Studii 2 a 3 v rozdílných letech (2014 a 2016), jsou na **Obr. 9** a **Obr. 10** vyznačena časová okna jednotlivých studií.

Naměřené koncentrace polutantů PM_{2.5} a B[a]P v době narození novorozenců ve Studii 1 byly dominantním a signifikantním faktorem ($p < 0,001$), který rozdělil lokality a období. Nejvyšší naměřené koncentrace (průměr \pm SD) byly v Karviné během období Z: PM_{2.5}: 40,3 \pm 31,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; B[a]P: 5,2 \pm 5,5 ng/m^3 . Nejnižší úroveň znečištění ovzduší byla detekována v ČB v období L: PM_{2.5}: 12,5 \pm 6,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; B[a]P: 0,5 \pm 0,6 ng/m^3 . Průměrné hodnoty pro jednotlivá období v Karviné a ČB jsou uvedeny v **Tab. 5**.

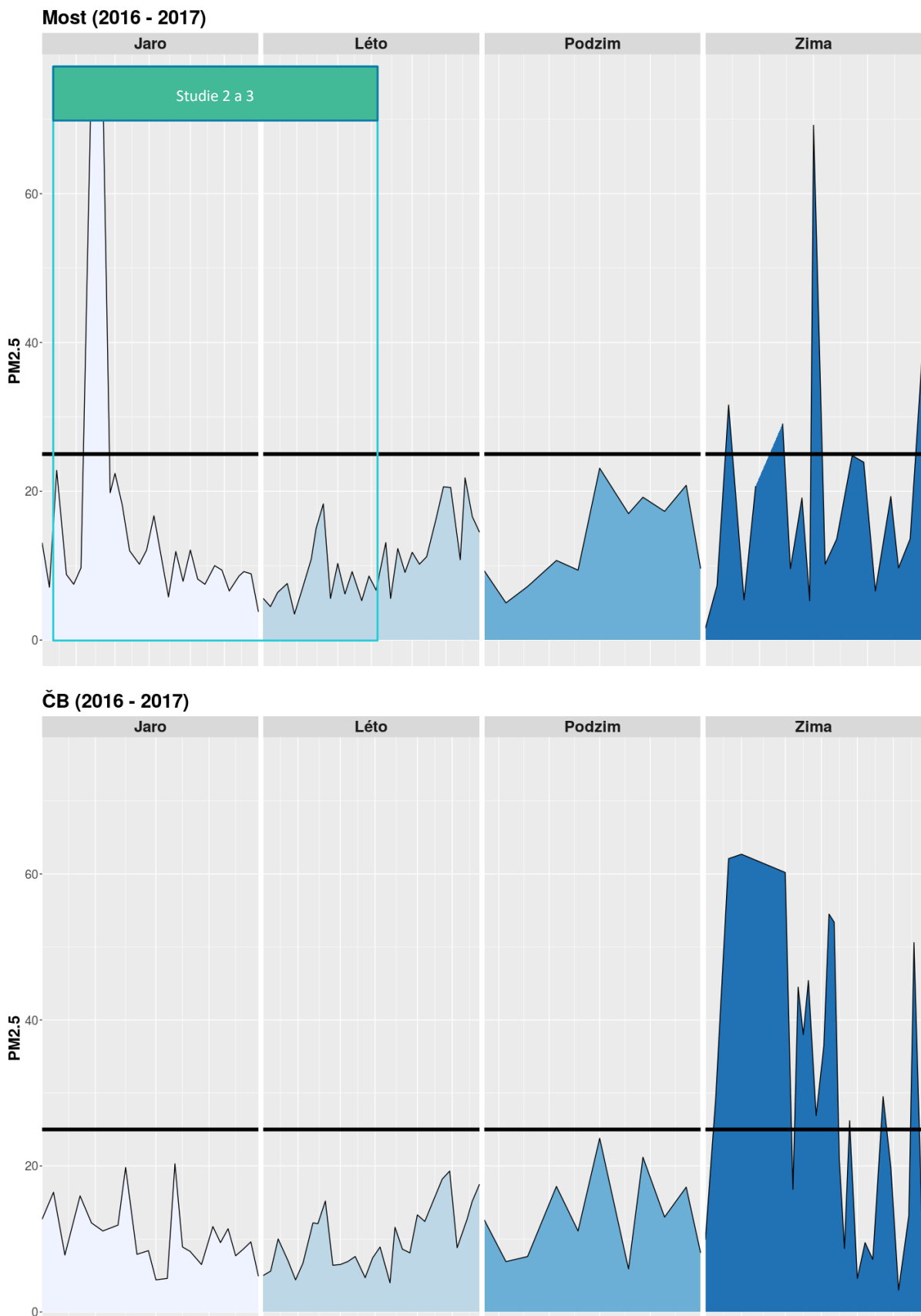
U Studie 2 a 3, ve kterých byly porovnávány lokality Most a ČB, není možné provést posouzení vlivu úrovně znečištěného ovzduší během odběru vzorků, protože se novorozenci nenarodili ani ve stejném období, ani ve stejném roce. Naměřené koncentrace polutantů v časových oknech v ČB jsou navíc vyšší než v Mostě, protože v případě ČB se jednalo o zimní a v případě Mostu o letní období.

Ve sledovaném období nebylo možné posuzovat překračování imisních limitů, protože ty jsou definované pro roční průměrné koncentrace polutantů a ve studii byly srovnávány pouze části roků. Proto byly pro úplnost průměrné roční koncentrace vybraných polutantů (B[a]P, PM_{2.5}, SO₂, NO_x, NO₂) mezi lety 2013-2017 ve studovaných lokalitách zkompletovány z tabelárních ročenek ČHMÚ (**Tab. 6**).

K dlouholetému překračování ročních imisních limitů docházelo zejména u B[a]P ve všech třech lokalitách, přičemž v Mostě nebyla koncentrace B[a]P měřena a nejbližší stanice byla umístěna v nedalekých Teplicích. Znečištění zde však bylo nižší než v ČB, zejména ve studovaných letech 2016 a 2017. V případě PM_{2.5} byly překračovány limity každoročně v Karviné. V Mostě došlo k překročení limitů v letech 2013 a 2014. V letech 2016 a 2017 bylo znečištění v Mostě a ČB srovnatelné a nepřekračovalo roční imisní limity. U dalších polutantů nebyly až na výjimky (NO_x v letech 2014 a 2015 v Karviné) roční limity překročeny. Obecně bylo však znečištění v Mostě dané koncentracemi SO₂ a NO₂ mírně vyšší oproti ČB, zatímco u NO_x byly roční koncentrace v Mostě nižší než v ČB. Nejvyšší naměřené hodnoty byly ve všech letech naměřeny v Karviné.



Obr. 9. Koncentrace PM_{2.5} pro Karvinou a ČB v letech 2013-2014 s vyznačenými obdobími roku a časovými okny jednotlivých studií. Čarou je vyznačen roční imisní limit pro PM_{2.5} 25 µg/m³, který platil do roku 2019.



Obr. 10 Koncentrace $PM_{2.5}$ pro Most a ČB v letech 2016-2017 s vyznačenými obdobími roku a časovými okny jednotlivých studií. Čarou je vyznačen roční imisní limit pro $PM_{2.5}$ $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$, který platil do roku 2019.

Tab. 5 Průměrné hodnoty (\pm SD) polutantů pro jednotlivá období lokalit Karviné a ČB ve Studii 1.

Polutant	Karviná – L	Karviná – Z	ČB – L	ČB – Z
PM _{2.5} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	31,4 \pm 28,7	40,3 \pm 31,5	12,5 \pm 6,5	21,1 \pm 13,2
B[a]P (ng/m^3)	2,9 \pm 4,4	5,2 \pm 5,5	0,5 \pm 0,6	1,6 \pm 1,2

Tab. 6 Průměrné roční koncentrace polutantů pro lokality Most, ČB a Karviná od roku 2013 do 2017. Překročené roční imisní limity dané EU jsou označeny tučně (Zdroj: Tabulární ročenky ČHMÚ).

B[a]P (ng/m^3)										
Limit 1 ng/m^3	2013		2014		2015		2016		2017	
ČB	1,5	\pm 1,6	1,2	\pm 1,3	1,4	\pm 1,4	1,8	\pm 2,9	1,3	\pm 1,8
Most (Teplice)	1,3	\pm 1,7	1,1	\pm 1,2	1,1	\pm 1,5	0,9	\pm 1,2	0,9	\pm 1,4
Karviná	4,5	\pm 6,7	3,6	\pm 5,5	3,5	\pm 4,5	3,3	\pm 4,3	4,2	\pm 7,9

PM _{2.5} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)										
Limit 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	2013		2014		2015		2016		2017	
ČB	18,3	\pm 14,7	16,9	\pm 10,4	14,3	\pm 8,6	18,5	\pm 14,5	14,6	\pm 15,0
Most	21,8	\pm 14,9	22,4	\pm 14,2	18,7	\pm 13,8	18,4	\pm 12,5	18,3	\pm 18,0
Karviná	38,1	\pm 36,6	36,2	\pm 30,3	33,1	\pm 27,6	27,1	\pm 21,8	27,0	\pm 30,0

SO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)										
Limit 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	2013		2014		2015		2016		2017	
ČB	4,8	\pm 3,0	4,3	\pm 3,4	3,8	\pm 2,1	2,1	\pm 1,1	3,0	\pm 1,6
Most	9,8	\pm 6,4	6,7	\pm 5,0	8,4	\pm 4,7	8,8	\pm 5,7	9,1	\pm 5,7
Karviná	12,0	\pm 9,5	9,9	\pm 7,8	9,2	\pm 5,8	9,2	\pm 5,9	10,0	\pm 9,4

NO _x ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)										
Limit 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	2013		2014		2015		2016		2017	
ČB	-	-	22,5	\pm 17,3	26,0	\pm 21,5	25,6	\pm 29,6	-	-
Most	16,4	\pm 9,4	16,6	\pm 9,1	16,5	\pm 10,3	15,9	\pm 9,1	16,1	\pm 11,1
Karviná	21,2	\pm 13,4	32,2	\pm 19,2	30,4	\pm 17,8	29,4	\pm 16,7	21,9	\pm 16,9

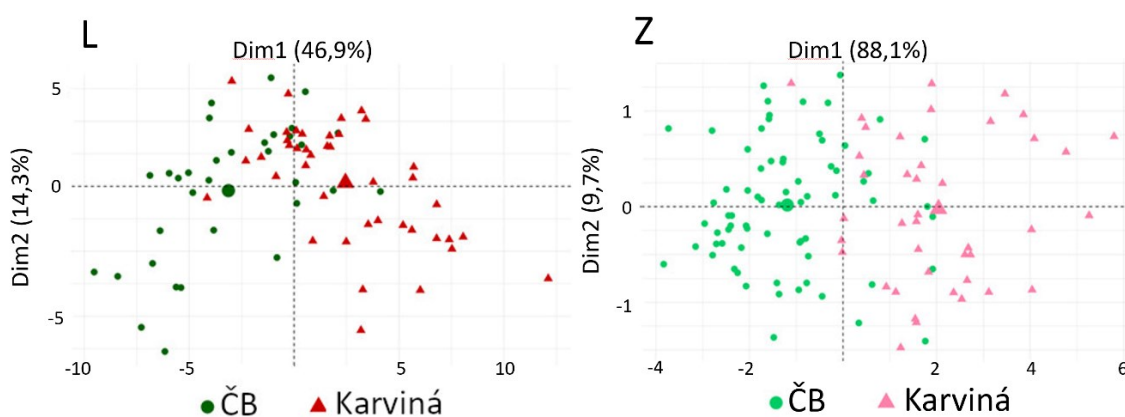
NO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)										
Limit 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	2013		2014		2015		2016		2017	
ČB	15,6	\pm 7,2	15,1	\pm 7,1	16,8	\pm 6,93	15,7	\pm 8,34	15,4	\pm 8,25
Most	21,5	\pm 8,84	22,5	\pm 8,95	20,7	\pm 9,61	20,8	\pm 8,89	20,8	\pm 12,24
Karviná	24,0	\pm 9,83	23,1	\pm 8,45	22,7	\pm 8,97	21,1	\pm 8,12	21,2	\pm 10,91

Srovnáním všech vzorků z Karviné s kontrolní lokalitou ČB bylo nalezeno několik desítek DEGs v letním (L) a zimním (Z) období. V analýze hlavních komponent (PCA) je mezi prvními dvěma hlavními komponentami všech detekovaných DEGs patrný rozdílný profil v genové expresi mezi lokalitami v obou obdobích (**Obr. 11**).

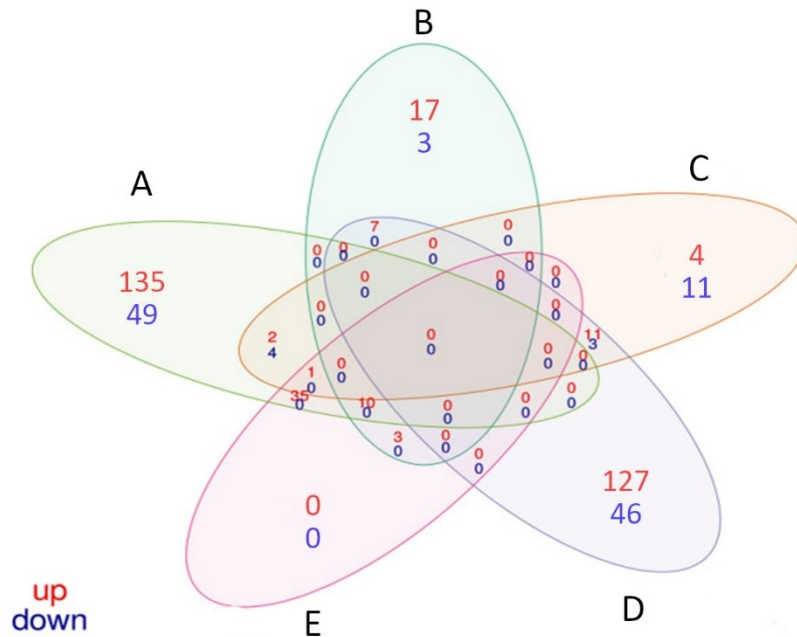
Nejvyšší počet DEGs byl pozorován u vzorků z Karviné v Z období při srovnání se vzorky z ČB ve stejném období: 135 genů se zvýšenou expresí (up-regulovaných) a 49 genů se sníženou expresí (down-regulovaných). V L období bylo u skupiny z Karviné nalezeno 17 up a 3 down-regulované geny ve srovnání se stejným obdobím v ČB.

Rozdílně exprimované geny specifické pro vzorky z ČB byly nalezeny srovnáním Z a L období porodu: Celkem 127 up- a 46 down-regulovaných genů. Stejným sezónním srovnáním u vzorků z Karviné byly identifikovány celkem 4 up- a 11 down-regulovaných genů. Počty unikátních a společných DEGs pro jednotlivé skupiny jsou uvedeny na **Obr. 12**.

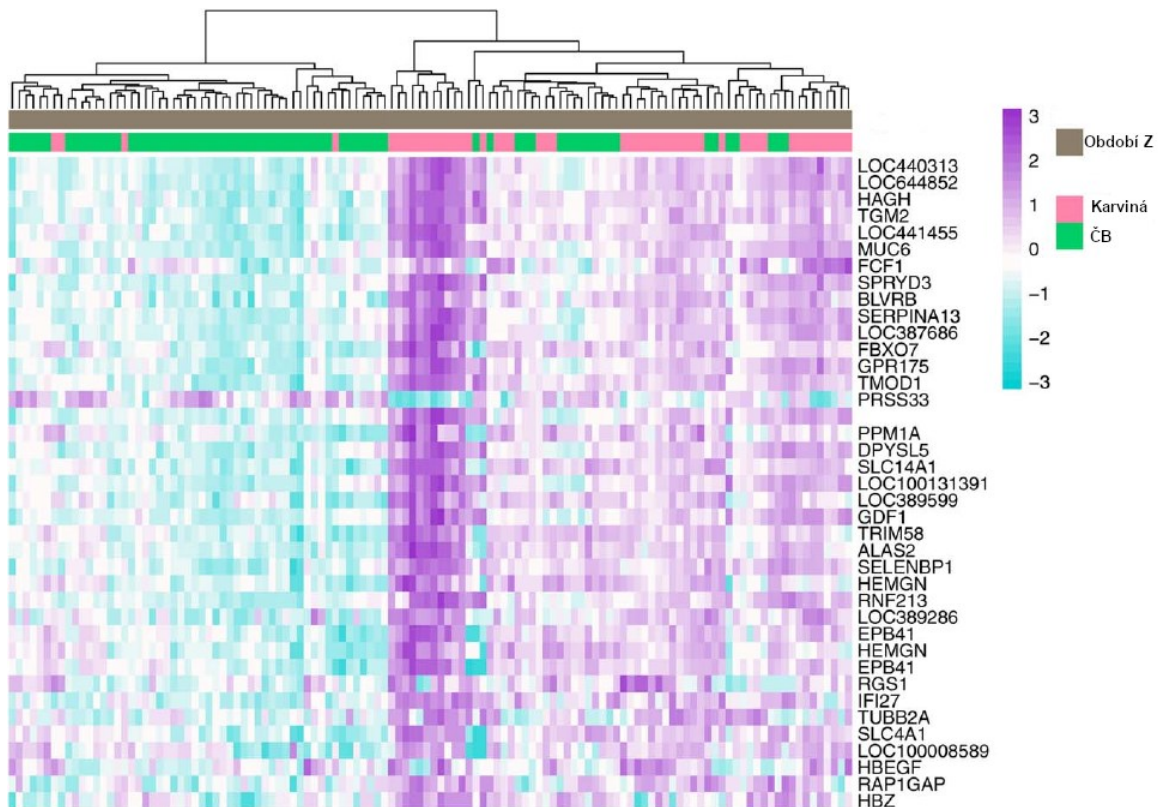
Podrobnější výsledky se zaměřují na nejvýznamnější diferenciálně exprimované geny u vzorků z Karviné během zimního období porodu ve srovnání se stejným obdobím v ČB. Hierarchické klastrování mezi oběma lokalitami u nejvýznamnějších DEGs je ukázáno na **Obr. 13**.



Obr. 11 Na hlavních komponentách je patrná signifikantní separace mezi Karvinou a ČB v L a Z období. Zvýrazněný symbol u každého klastru značí medián hodnot log-intenzit studovaných skupin.

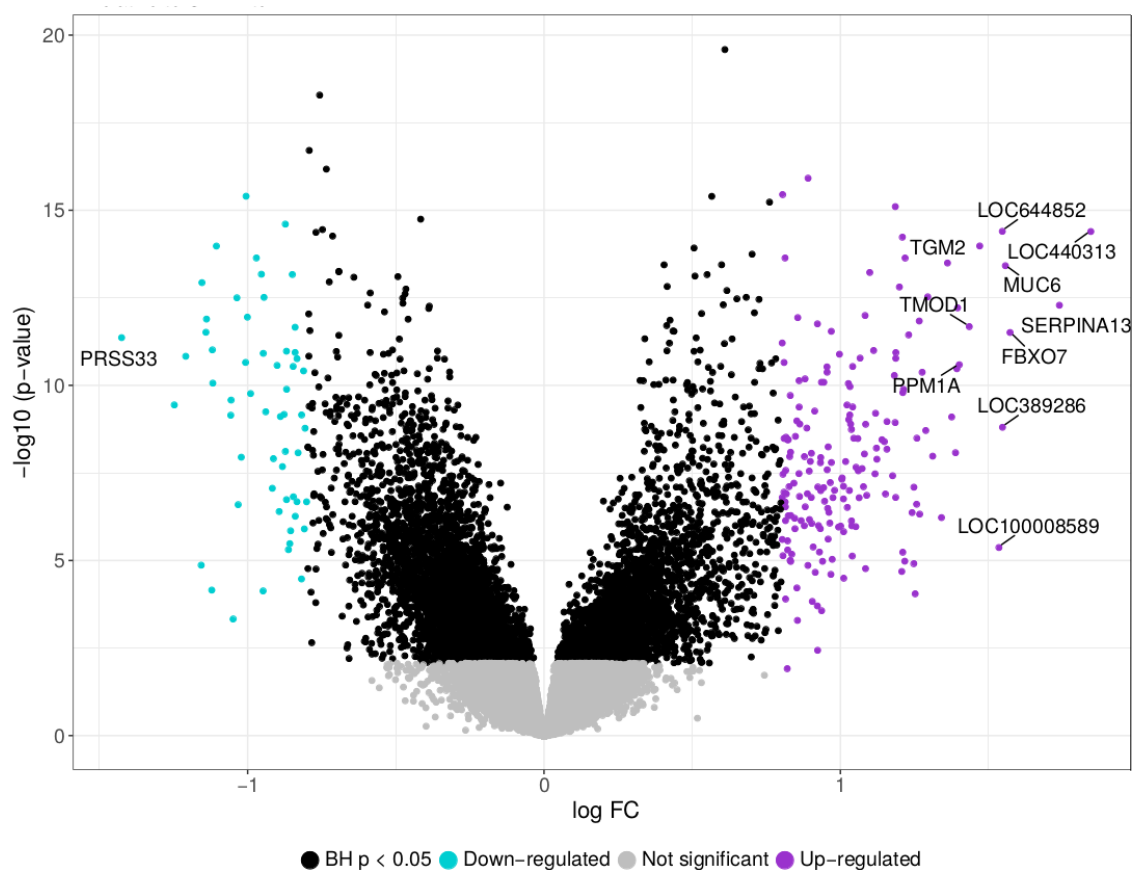


Obr. 12 Vennův diagram reportuje počty DEGs specifických ve studovaných skupinách. (A) Karviná vs. ČB v zimním období; (B) Karviná vs. ČB v letním období; (C) Srovnání Karviné mezi oběma obdobími; (D) Srovnání ČB mezi oběma obdobími; (E) Karviná vs. ČB nezávisle na období.



Obr. 13 Mapa nejvýznamnějších DEGs nalezených u vzorků z Karviné v zimním období (season 2) ve srovnání se zimním obdobím ČB. Individuální vzorky jsou znázorněny ve sloupcích, řádky reprezentují log-intenzitu jednotlivých genů.

Diferenciálně exprimované geny specifické pro vzorky z Karviné odebrané v zimním období jsou zobrazeny také na **Obr. 14**. Geny s hodnotami $|\log_2FC| > 1,4$ jsou označeny symbolem a vybrané z nich jsou popsány níže.



Obr. 14 Individuální DEGs specifické pro karvinské vzorky odebrané v zimním období. Graf zobrazuje signifikantní geny (p -hodnota $< 0,05$; černě), up-regulované geny ($\log_2FC > 0,8$; fialově) a down-regulované geny ($\log_2FC < -0,8$, modře). Geny s $\log_2FC > 1,4$ a $\log_2FC < -1,4$ jsou vyznačeny symbolem.

Mezi nejvýrazněji down-regulované geny nalezené ve vzorcích z Karviné v zimním období patří *PRSS33* ($\log_2FC = -1,46$, $p < 0,001$). Gen byl zároveň up-regulován ve vzorcích z ČB při srovnání zimního a letního období. Z výrazně up-regulovaných genů u karvinských vzorků ze zimního období byl pozorován pseudogen *SERPINA13* ($\log_2FC = 1,74$, $p < 0,001$), gen *FBXO7* ($\log_2FC = 1,58$, $p < 0,001$) a *MUC6* ($\log_2FC = 1,56$, $p < 0,001$).

Při srovnání vzorků z letních období byla u vzorků z Karviné pozorována up-regulace genů *BCL2L1* ($\log_2FC = 1,42$, $p < 0,001$) a *CYP4F3* ($\log_2FC = 0,92$, $p < 0,001$).

Z deregulovaných transkriptů specifických pro vzorky z ČB byla identifikována up-regulace *EP300* ($\log_2FC = 1,47$, $p < 0,001$) a down-regulace genu *HINT3* ($\log_2FC = -1,60$, $p < 0,001$).

Nízký počet nalezených DEGs neumožňoval provést plnohodnotnou analýzu. Pro přehled jsou uvedeny pouze statisticky signifikantní dráhy ($p < 0,05$), které zahrnují více než dva DEGs. Celkem 28 deregulovaných drah bylo pozorováno u vzorků z Karviné při srovnání zimního a letního období. Šestnáct drah bylo signifikantně deregulováno ve vzorcích odebraných v zimním období bez ohledu na lokalitu. Odpovědí na znečištěné ovzduší v Karviné v zimním období oproti letnímu může být signifikantní ovlivnění funkce některých drah imunitních procesů ($p < 0,001$), jako je signální dráha pro receptor B-buněk (*hsa:04662 B-cell receptor signalling pathway*) a signální dráha pro receptor T-buněk (*hsa: 04660 T-cell receptor signaling pathway*).

U vzorků z Karviné, které byly porovnány se vzorky z ČB v zimním období, bylo nalezeno 12 deregulovaných drah. Mezi nejvíce ovlivněné ($p < 0,001$) patřila dráha metabolismu porfyrinu a chlorofylu (*map:00860 Porphyrin and chlorophyll metabolism*) a dále dráha NRF2 (*WP: NRF2 pathway*, $p < 0,02$).

U vzorků z ČB bylo nalezeno při srovnání zimního a letního období deset potenciálně ovlivněných drah. Nejvýznamněji ovlivněná ($p < 0,01$) byla signální dráha FOXO (*map:04068 FoxO signaling pathway*).

Při srovnání vzorků z Karviné a ČB v letním období byla identifikována potenciálně ovlivněná dráha amyotrofické laterální sklerózy (*hsa:05014 Amyotrophic lateral sclerosis*, $p < 0,001$) a signální dráha pro TNF α (*WP: TNF- α Signaling Pathway*, $p < 0,01$).

Přehled signifikantně deregulovaných biochemických drah získaných srovnáním vzorků z Karviné a ČB je uveden v **Tab. 7**. Ostatní přehledy drah jsou uvedeny v publikaci (Honkova a kol., 2018 - příloha 1).

Tab. 7. Signifikantní biochemické dráhy, které zahrnují dva a více diferenciólně exprimované geny, identifikované při srovnání lokalit pro jednotlivá období. Dráhy jsou uvedené v původním pojmenování.

Karviná vs. ČB, období Z	Databáze	p-hodnota	Z-skóre
Porphyrin and chlorophyll metabolism	KEGG	0,0011	-1,89
SIDS Susceptibility Pathways	WP	0,0018	-2,01
Biosynthesis of amino acids	KEGG	0,0083	-1,74
Glycine, serine and threonine metabolism	KEGG	0,0090	-1,83
Nitrogen metabolism	KEGG	0,0141	-1,2
NRF2 pathway	WP	0,0209	-1,9
Interleukin1 and megakaryocytes in obesity	WP	0,0272	-1,66
Glycolysis / Gluconeogenesis	KEGG	0,0355	-1,88
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	KEGG	0,0362	-1,25
Pentose phosphate pathway	KEGG	0,0386	-1,2
Leishmaniasis	KEGG	0,0440	-1,64
AMPK signaling pathway	KEGG	0,0450	-1,59

Karviná vs. ČB, období L	Databáze	p-hodnota	Z-skóre
Amyotrophic lateral sclerosis	KEGG, WP	0,0001	-1,86
TNF- α Signaling Pathway	WP	0,0132	-1,93
Integrin-mediated Cell Adhesion	WP	0,0158	-1,84
Senescence and Autophagy in Cancer	WP	0,0170	-1,82
Toxoplasmosis	KEGG	0,0211	-1,9
Phagosome	KEGG	0,0346	-1,66

Genově-specifická metylace DNA analyzovaná v 776 000 CpG místech byla hodnocena u 50 novorozenců z Mostu a ČB. Po odfiltrování sond, které se nacházejí na pohlavních chromozomech, byl vykreslením hlavních komponent pozorován rozdílný profil metylace DNA s viditelnou tendencí separace mezi studovanými lokalitami (**Obr. 15**). Protože nemohl být hodnocen vliv rozdílného období, jsou v této kapitole analyzovány pouze rozdíly mezi lokalitami, kde exponovanou skupinou jsou novorozenci z Mostu a kontrolou novorozenci z ČB.

Výstupem lineárního modelu byla identifikace 868 CpG míst, jejichž metylace se liší u vzorků z Mostu a ČB ($p < 0,01$). Z těchto míst bylo u vzorků z Mostu 238 hypometylováno a 630 hypermetylováno.

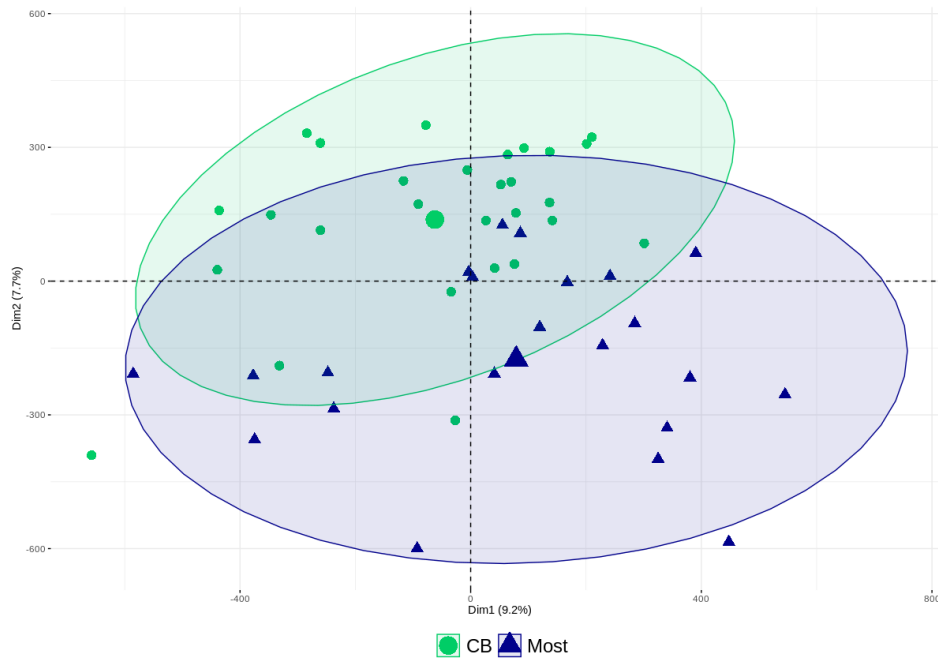
Výsledkem hierarchického klastrování je výrazný trend separace obou lokalit. Šest CpG míst s největšími rozdíly v hypermetylaci u vzorků z Mostu s $\log_2FC > 1$, je znázorněno v **Obr. 16**.

Distribuce a četnost CpG míst v genomu je rozdělena mezi oblasti známé jako Open Sea⁴, které tvoří největší zastoupení nalezených CpG míst (84 % pro hypermetylovaná a 63 % pro hypometylovaná CpG), a dále CpG ostrůvky, které byly pozorovány pouze u hypometylovaných míst (7 % CpG ostrůvků).

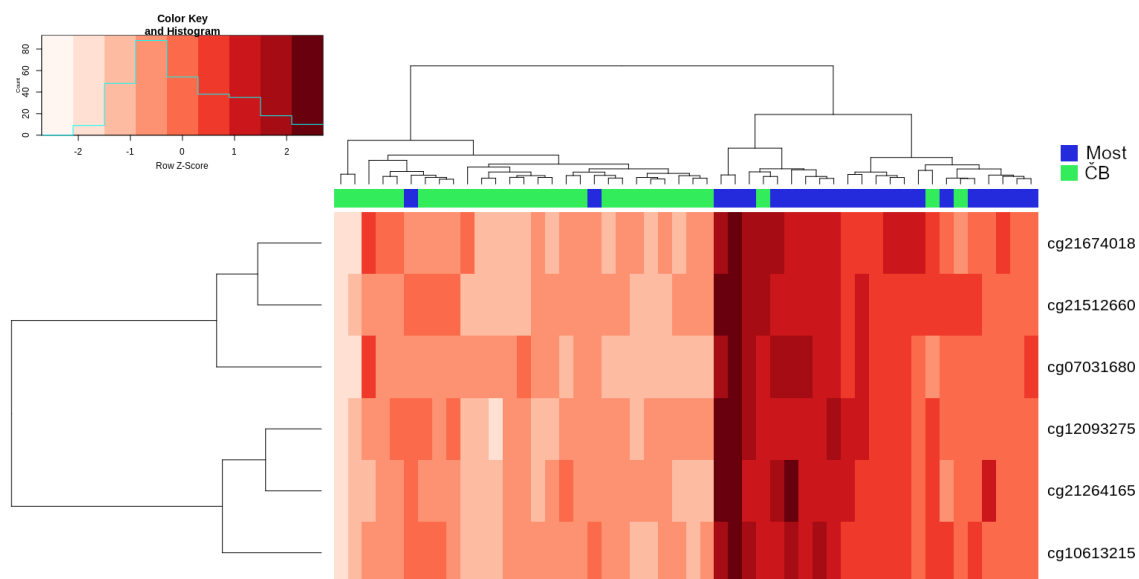
Dvanáct nejvýznamnějších odlišně hypo- a hypermetylovaných CpG míst je uvedených v **Tab. 8**.

Nejvýraznější je hypermetylace místa cg10613215 ($\log_2FC = 1,13$, $p = 2,30E-05$), které se nachází na chromozomu 6 a reguluje aktivitu genu *HIVEP2*. Ta je spojována i s dalším signifikantním CpG (cg06770429, $\log_2FC = 0,52$, $p = 7,0E-03$). Z hypometylovaných CpG míst je třeba zmínit cg11747349 ($\log_2FC = -0,97$, $p = 1,2E-03$) nacházející se také na 6. chromozomu, které ovlivňuje aktivitu genů *GPSM3* a *NOTCH4*. Všechna nalezená odlišně metylovaná místa jsou uvedena v **Doplňkové tabulce I**.

⁴ V žádné publikované literatuře dosud nebyly oficiálně použity české překlady pojmů „Open Sea“, „Shelf“ a „Shore“, proto jsou použita originální označení.



Obr. 15 Profil metylace DNA vykreslený mezi dvěma hlavními komponentami u log-intenzit všech 776 000 CpG míst zobrazuje oddělené skupiny z Mostu a ČB.



Obr. 16 Hierarchické klastrování šesti nejrozdílněji metylovaných CpG míst ($\log_2FC > 1$) mezi vzorky z Mostu a ČB. Sloupce značí jednotlivé vzorky, řádky reprezentují log-intenzity nejvýznamnějších CpG míst.

Tab. 8 Přehled nejvíce diferenciálně metylovaných CpG míst ($\log_2FC < -0,9$ a > 1) ve vzorcích z Mostu ve srovnání se vzorky z ČB.

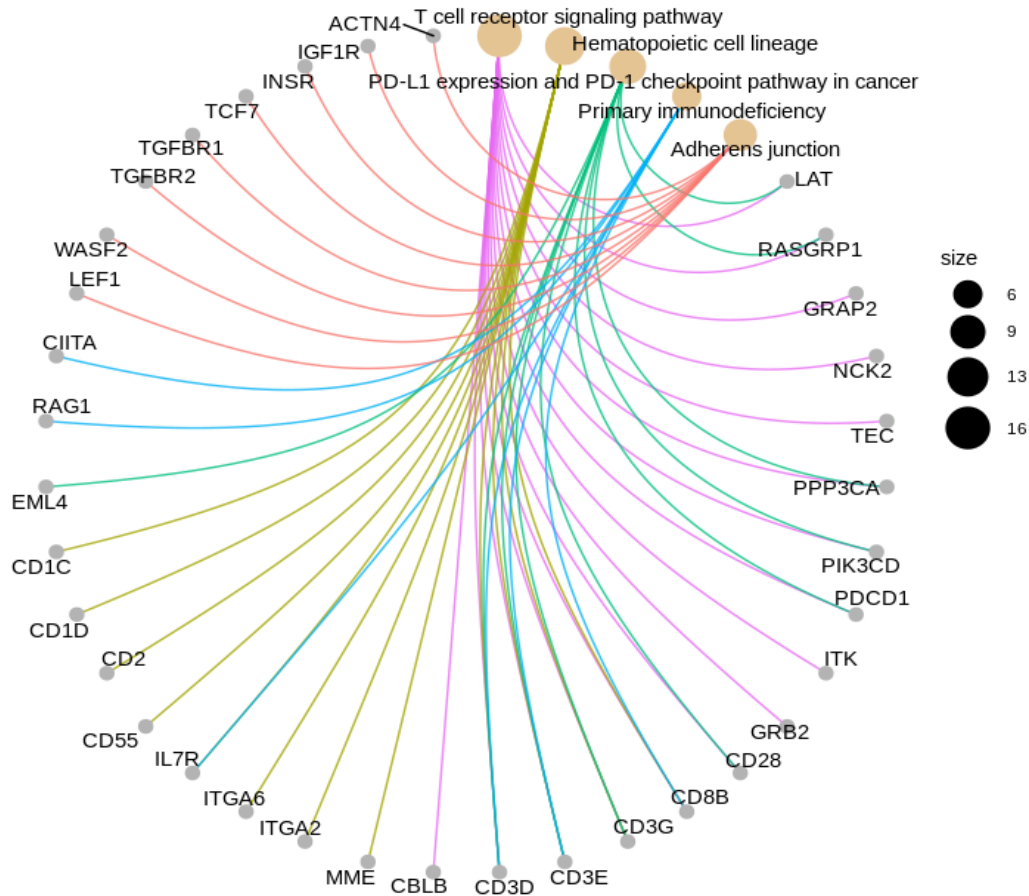
CpG	Chromosom	Umístění na genomu	Gen	\log_2FC	adj. p-hodnota
Hypermetylace					
cg10613215	6	OpenSea	<i>HIVEP2</i>	1,13	2,3E-05
cg07031680	3	OpenSea	<i>BTLA</i>	1,05	4,3E-05
cg21264165	12	OpenSea	<i>PTPRO</i>	1,04	2,2E-04
cg21512660	19	OpenSea	--	1,04	2,4E-03
cg12093275	2	OpenSea	<i>EML4</i>	1,02	6,9E-04
cg21674018	18	OpenSea	<i>FECH</i>	1,01	8,9E-03
Hypometylace					
cg11747349	6	S Shore	<i>GPSM3 & NOTCH4</i>	-0,97	1,2E-03
cg08376705	16	OpenSea	--	-0,96	5,8E-04
cg19149957	4	OpenSea	<i>TEC</i>	-0,96	8,4E-03
cg21279706	3	N Shore	<i>KIAA1257</i>	-0,95	1,7E-03
cg01761758	17	N Shore	<i>TIMP2</i>	-0,92	2,2E-04
cg04306184	6	OpenSea	<i>ARID1B</i>	-0,91	8,4E-03

U 868 diferenciálně metylovaných CpG míst bylo anotováno 559 známých genů, které byly podkladem pro analýzu geneset enrichment. Nalezeno bylo 9 signifikantních biochemických drah, z nichž pět nejvýznamnějších s označením genů a genovým překryvem je znázorněno na **Obr. 17**.

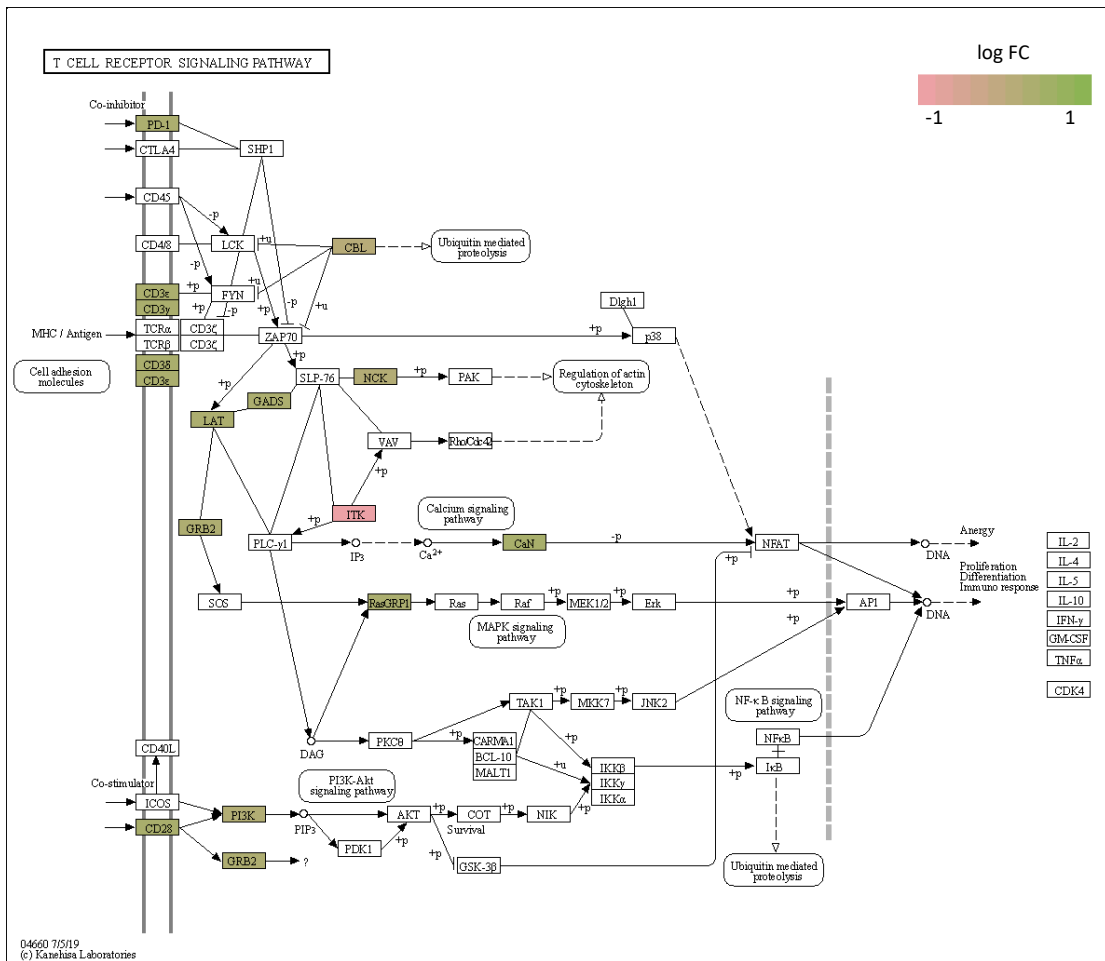
Geny v uvedených procesech mohou být regulovány nalezenými demetylovanými CpG místy, proto byly do signální dráhy receptoru T-buněk (*hsa:04660 T-Cell receptor signaling pathway*) a dráhy primární imunodeficiency (*hsa: 05340 Primary immunodeficiency*) zakresleny geny potenciálně deregulované hypo- či hypermetylací, které způsobují zvýšenou či sníženou aktivitu jejich exprese (**Obr. 18** a **Obr. 19**). V signální dráze receptoru T-buněk bylo nalezeno celkem 23 demetylovaných CpG míst, která mohou ovlivňovat funkci 16 genů, přičemž tři hypermetylovaná CpG místa (cg03889044, cg00795812, cg20805133), která se nacházejí ve shodné oblasti genomu, regulují gen *PDCD1*. Podobně může být regulována i aktivita genu *LAT* (cg16462073, cg16704586, cg25147847). V dráze se také nachází gen *TEC*, jehož aktivita může být ovlivněna výraznou hypometylací (cg19149957, $\log_2FC = -0.96$, $p = 8,4E-03$).

V testech genové ontologie bylo nalezeno 155 biologických procesů, z nichž většina souvisí s regulací v T buňkách imunitního systému a buněčné adheze. Přehled dvaceti nejvýznamnějších je znázorněn na **Obr. 20**.

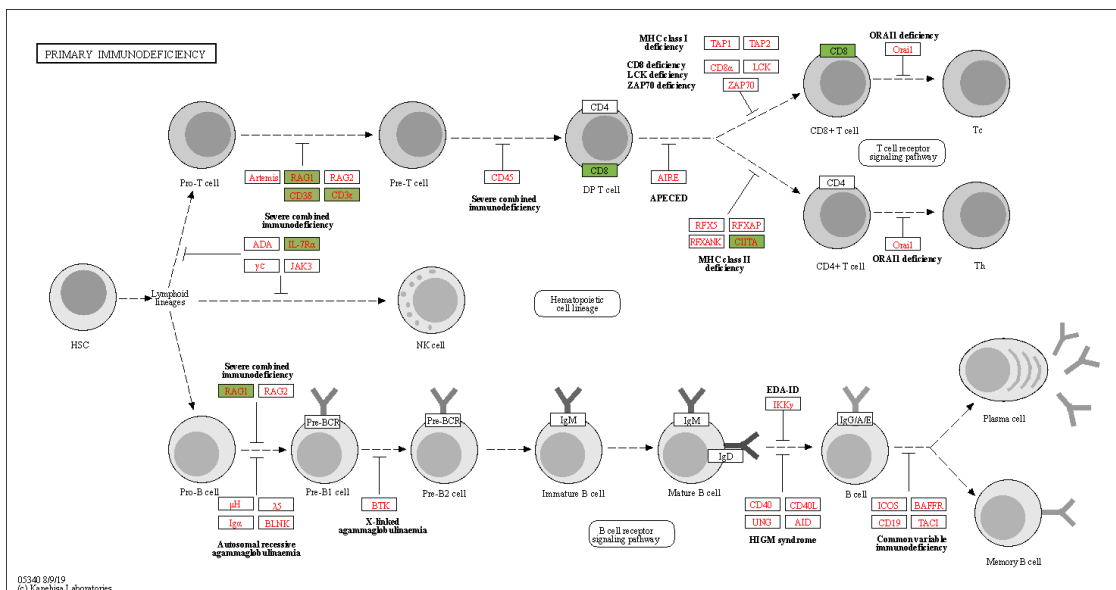
Závěrečnou funkční analýzou, která shrnuje předchozí výstupy genových sad, je enrichment mapa (**Obr. 21**), která znázorňuje vzdálenosti biologických procesů příbuzné genové ontologie mezi jednotlivými genovými sadami. Největší funkční celek tvoří procesy, které se účastní regulace aktivity T buněk imunitního systému a signální transdukce.



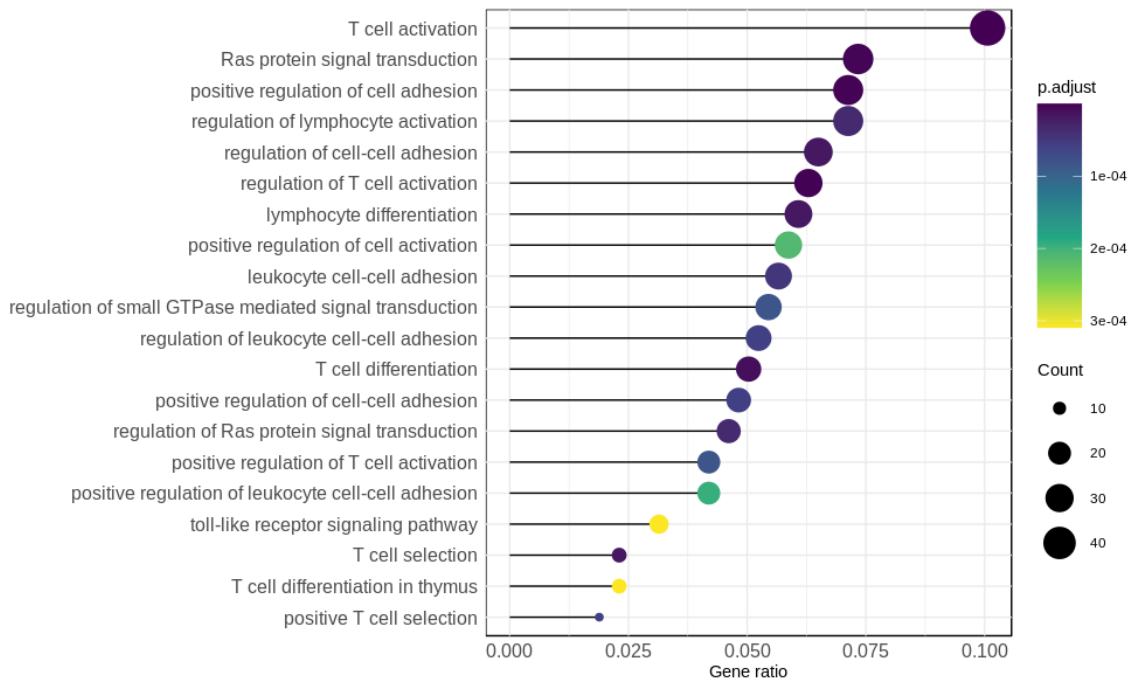
Obr. 17 Pět nejvýznamnějších procesů s popsávanými geny, které jsou potenciálně regulovány diferencielně metylovanými místy. Velikost kruhu každé kategorie značí počet genů, které se účastní dané dráhy.



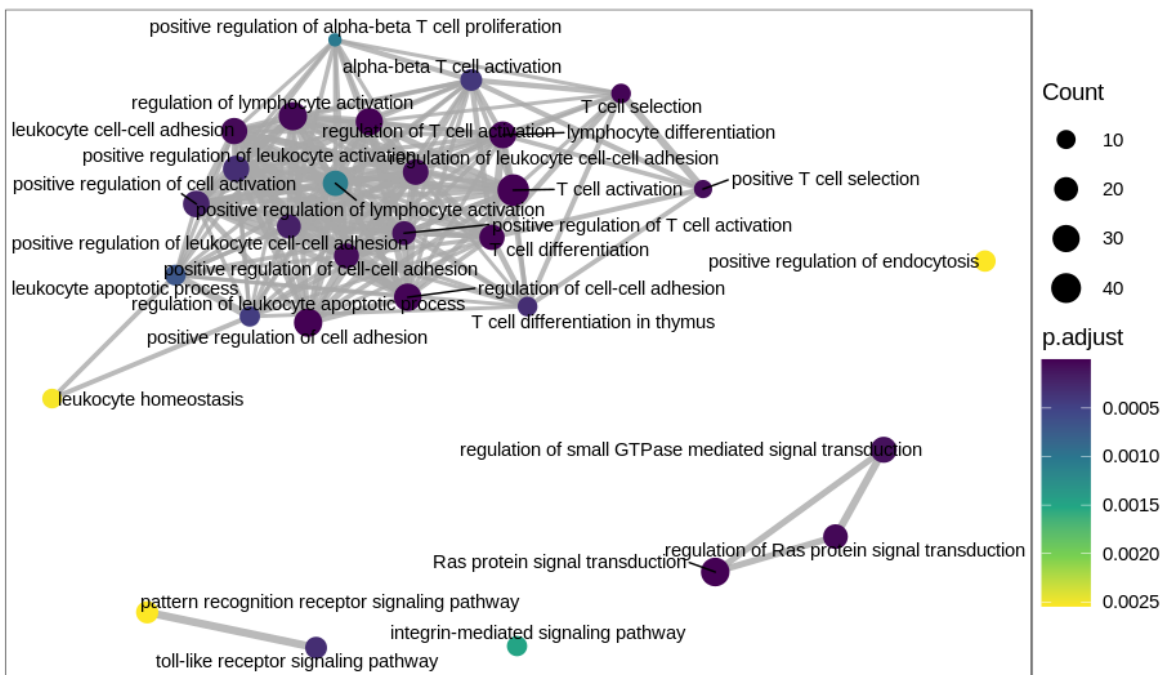
Obr. 18 KEGG dráha (*hsa:4660 T-cell receptor pathway*) s vyznačením genů uvedených v **Obr. 17** a jejich začlenění v dráze. Barevnou škálou je označena hypo- a hypermetylace CpG míst, které mohou dané geny regulovat.



Obr. 19 KEGG dráha (*hsa:05340 Primary immunodeficiency*) s vyznačením genů uvedených v **Obr. 17** a jejich začlenění v biologickém procesu. Zeleně jsou označeny hypermetylace CpG míst, které mohou dané geny regulovat.



Obr. 20 Výběr 20 nejvýznamnějších biologických procesů genové ontologie. *p*-hodnota je znázorněná škálou barev a velikost kotoučů určuje počet genů účastnící se biologického procesu.



Obr. 21 Propojení genových sad se vzájemným překryvem do větších funkčních celků. *p*-hodnota je vyznačena barevnou škálou, velikost kotoučů je počet genů v daném procesu.

Diferenciální exprese molekul miRNA byla hodnocena jako pilotní experiment u souboru 39 novorozenců z Mostu a ČB, který byl podsouborem Studie 2. Výstupem primární analýzy byla identifikace 899 molekul miRNA. Nalezeno bylo i 150 molekul piRNA, které však analyzovány nebyly. Rozdílný profil exprese miRNA s viditelnou separací mezi studovanými lokalitami je uveden na **Obr. 22**. Stejně jako ve Studii 2 byl z důvodu malého souboru i zde hodnocen pouze rozdíl mezi studovanými lokalitami.

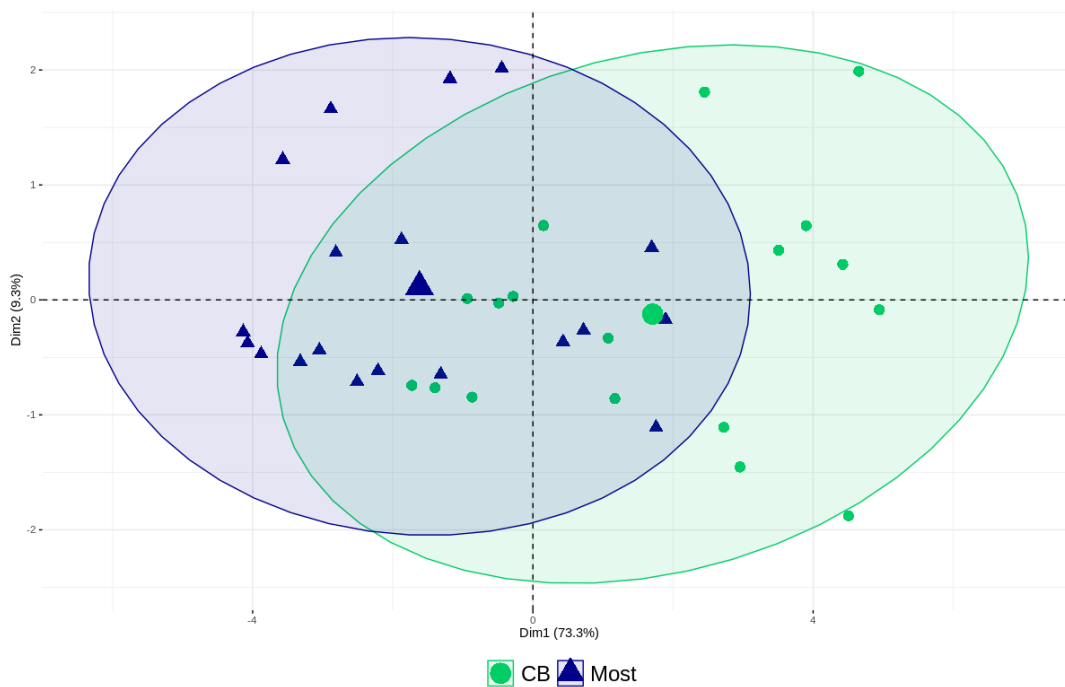
Výstupem lineárního modelu bylo 139 DE miRNA, z nichž bylo 64 up-regulováno a 75 down-regulováno ($p < 0,05$ BH). Jejich seznam je uveden v **Doplňkové tabulce II**.

Hierarchickým klastrováním vzorků není patrný příliš výrazný trend separace obou lokalit. Deset nejvýraznějších DE miRNA mezi vzorky z Mostu a ČB $|\log_2FC| > 1,5$ s vyznačením klastrováním skupin je znázorněno na **Obr. 23**.

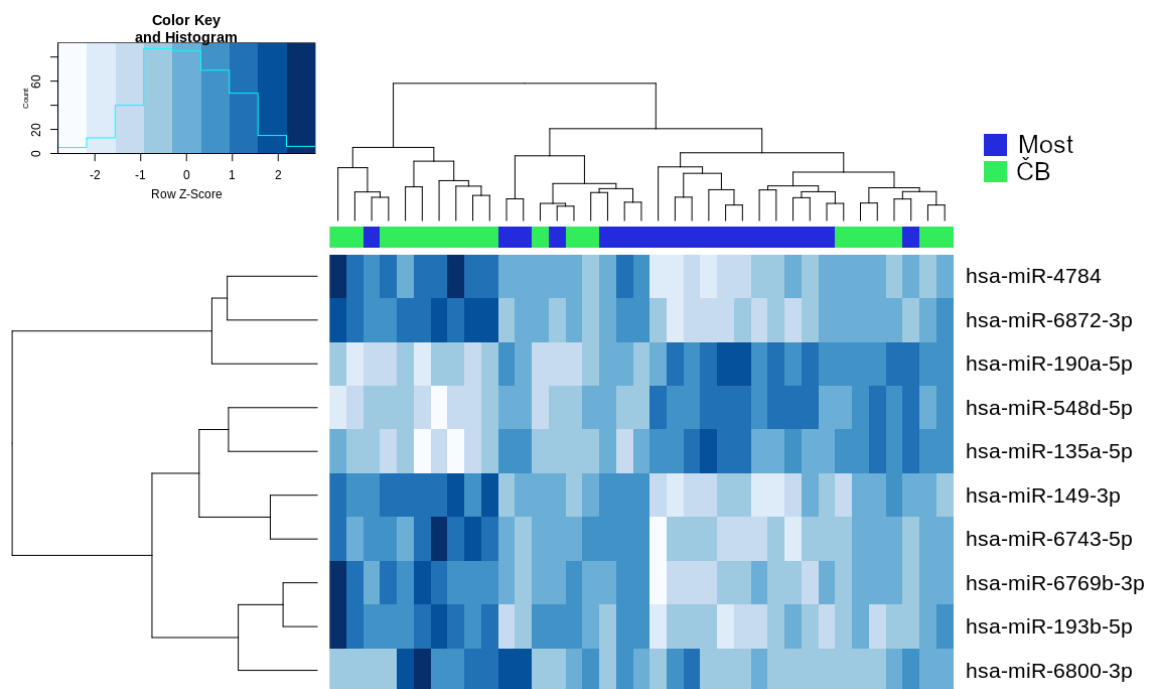
Nejvýraznější DE miRNA byly down-regulovány: *miR-6800-3p* ($\log_2FC = -2,30$, $p = 1,9E-02$) a *miR-193b-5p* ($\log_2FC = -2,13$, $p = 5,4E-04$). Z up-regulovaných DE miRNA byla pozorována *miR-190a-5p* ($\log_2FC = 1,86$, $p = 1,0E-03$) a *miR-548d-5p* ($\log_2FC = 1,80$, $p = 5,0E-04$).

Každá miRNA může regulovat expresi desítek až stovek genů, proto v této práci nebylo možné provést funkční analýzu cílových molekul při neznalosti výsledků celogenomové genové exprese. Nicméně propojením dat získaných ve Studii 2 se Studií 3 byla nalezena možná spojitost mezi sníženou expresí *miR-1268a* ($\log_2FC = -0,93$, $p = 2,7E-02$) a hypermetylací CpG místa cg05564644 ($\log_2FC = 0,72$, $p = 4,0E-03$), které reguluje aktivitu této miRNA. Potenciální interakce *miR-1268a* s mRNA cílových genů znázorňuje **Obr. 24**.

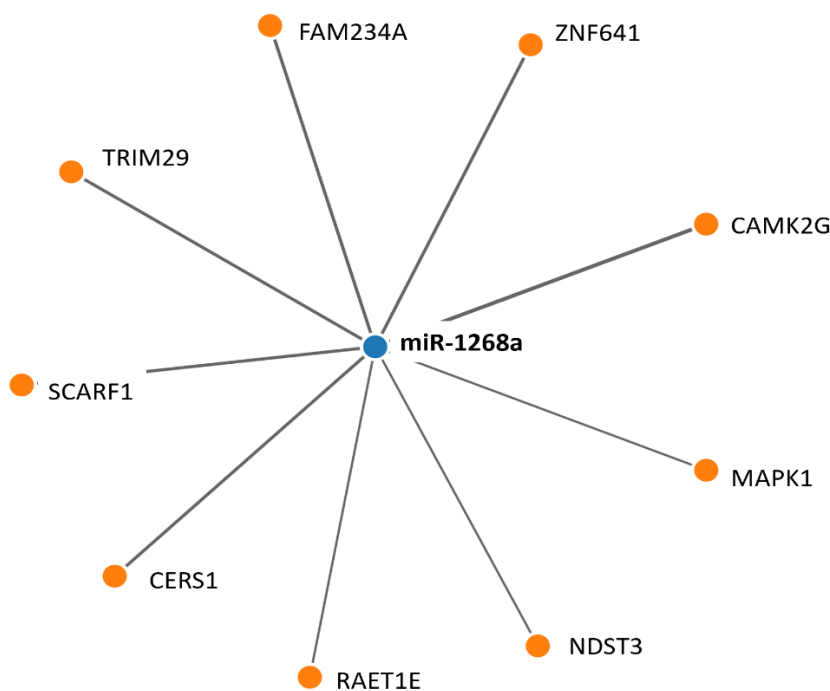
Nejzastoupenější DE miRNA, *miR-548*, byla deregulovaná v 7 variantách, z toho v šesti případech up-regulovaná, a jedna varianta (*miR-548ao-3p*) byla down-regulovaná. Pět z nich, které mají shodné cílové geny, jsou vykresleny na **Obr. 25**.



Obr. 22 Profil exprese miRNA vykreslený mezi dvěma hlavními komponentami u odlišně exprimovaných miRNA zobrazuje oddělené skupiny z Mostu a ČB.

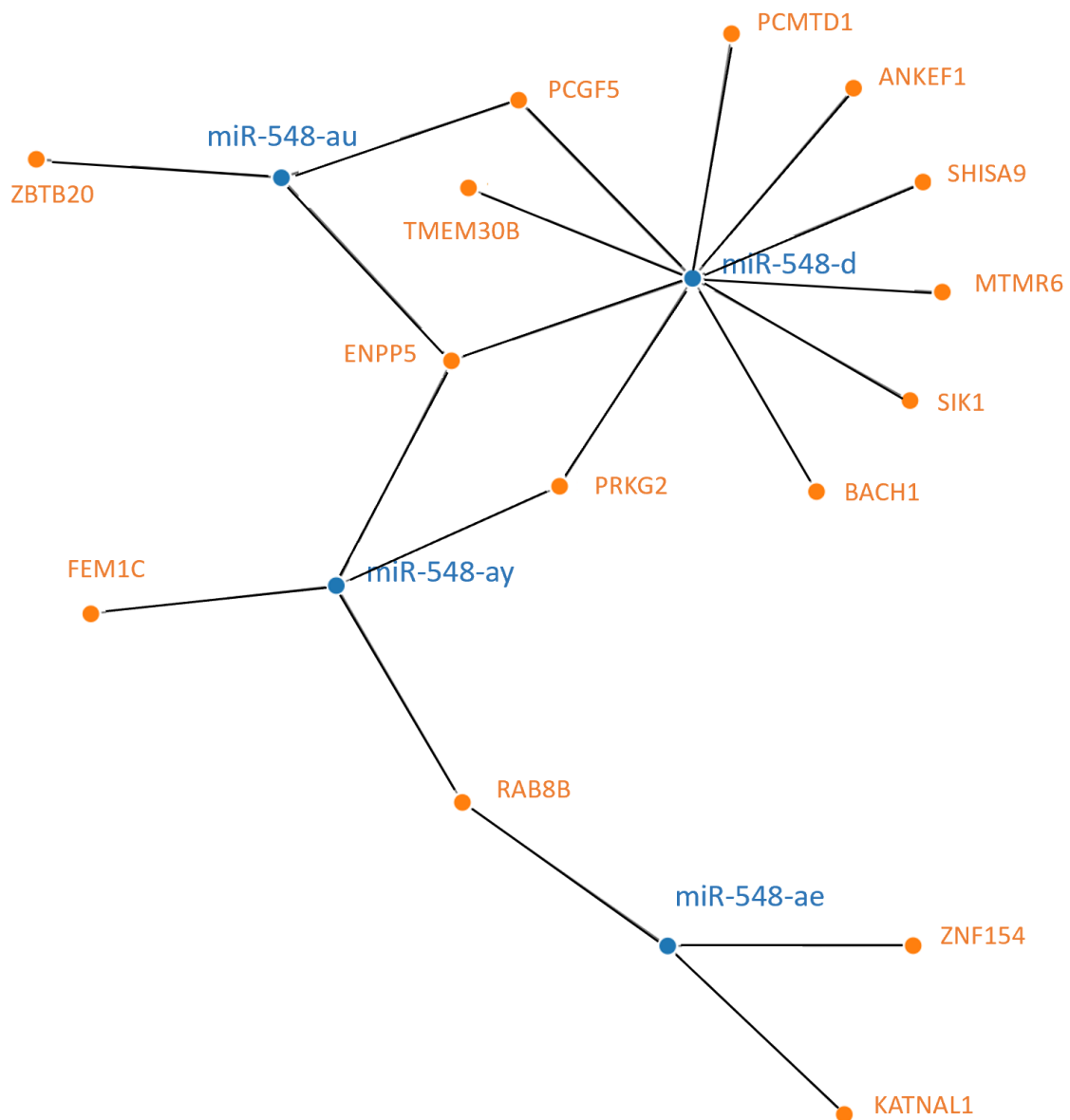


Obr. 23 Hierarchické klastrování deseti nejvýrazněji odlišně exprimovaných miRNA ($|\log_2FC| > 1,5$) mezi vzorky z Mostu a ČB. Sloupce značí jednotlivé vzorky, řádky reprezentují log-čtení nejvýznamnějších miRNA.



ENTREZID	SYMBOL	POPIS GENU
135250	RAET1E	Retinoic acid early transcript 1E (RAET1E), transcript variant X4, mRNA.
818	CAMK2G	Calcium/calmodulin dependent protein kinase II gamma (CAMK2G), transcript variant 4, mRNA.
23650	TRIM29	Tripartite motif containing 29 (TRIM29), transcript variant 2, mRNA.
121274	ZNF641	Zinc finger protein 641 (ZNF641), transcript variant X9, mRNA.
83986	FAM234A	Family with sequence similarity 234 member A(FAM234A), transcript variant 1, mRNA.
8578	SCARF1	Scavenger receptor class F member 1 (SCARF1), transcript variant 3, mRNA.
10715	CERS1	Ceramide synthase 1 (CERS1), transcript variant 1, mRNA.
5594	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), transcript variant 1, mRNA.

Obr. 24 Interakce miR-1268a s cílovými geny, které mohou být regulovány. V tabulce je uveden seznam genů s jejich popisem (uveden originální popis). Výstup byl získán z database miRWalk (Sticht a kol., 2018).



Obr. 25 Interakce čtyř sekvenčních variant miR-548 s cílovými geny získanými z databáze miRWalk (Sticht a kol., 2018).

Původním cílem této disertační práce bylo vyhodnotit vliv prenatální expozice znečištěnému ovzduší na aktivitu celogenomové genové exprese novorozenců. Díky navazujícím studiím byly do disertační práce zahrnuty i další genomické postupy, jako metylace DNA či exprese miRNA.

V disertační práci byly studovány tři lokality České republiky (Karviná, Most a ČB), které se liší mírou znečištění ovzduší. Vzájemné srovnání bylo provedeno zejména mezi lokalitami Karviná a ČB (Studie 1), a to i ve vztahu k období. Následné pilotní studie v Mostu a v ČB (Studie 2 a 3) byly vzhledem k odlišným odběrovým obdobím zaměřeny výhradně na hodnocení vlivu lokality. Navíc v posledních letech došlo k výraznému zlepšení stavu ovzduší v Ústeckém kraji. Nelze proto dělat závěry z paradoxního zjištění, že v „čistší“ lokalitě ČB je horší kvalita ovzduší než v okrese Most, jelikož vzorky v ČB byly odebírány zimních měsících, zatímco v Mostu v letním období. Vliv znečištěného ovzduší v době odběru vzorků však může hrát minoritní roli, protože na zdravotní stav novorozence má vliv i expozice znečištěnému ovzduší v prenatálním období, v závislosti na lokalitě, v níž matka žila. Na srovnání mezi novorozenci z různých lokalit ČR tak bylo nahlíženo jako na komplex interakce prostředí a životního stylu, který je pro sledované lokality specifický.

Stěžejní cílem disertační práce proto bylo vyhodnotit, v jakém rozsahu může rozdílné prostředí několika lokalit ČR ovlivnit prenatální vývoj novorozenců, který lze pozorovat na molekulární úrovni.

CHARAKTERISTIKA PROSTŘEDÍ A SUBJEKTŮ

Znečištěné ovzduší charakterizované koncentracemi $PM_{2.5}$ a B[a]P v Karviné v letním a zimním období v letech 2013-2014 (Studie 1) bylo majoritním faktorem pro srovnání novorozenců narozených v Karviné a ČB (**Tab. 5**). Hodnoty zjištěné v ČB v zimním období jsou srovnatelné s letním obdobím v Karviné. Výrazné znečištění ovzduší v MSK oproti okresu ČB je však zjevné i z koncentrací dalších polutantů, jako jsou například kovy (Rossnerova a kol., 2013). Studie o znečištěném ovzduší v této lokalitě prokazují signifikantní dopad na incidenci asthma bronchiale u dětí (Sram a kol., 2013).

Ve Studii 1 bylo sledováno 202 novorozenců. U matek byly zjištěny rozdílné faktory životního stylu, jako je aktivní kouření matek před těhotenstvím. V případě socioekonomických parametrů byla zaznamenána nižší úroveň vzdělání matek z okresu Karviná (**Tab. 2**).

U novorozenců z Karviné bylo zjištěno větší oxidační poškození makromolekul oproti novorozencům z ČB (Ambroz a kol., 2016). Autoři uvádějí, že naměřené koncentrace PM_{2.5} jsou významným prediktorem hladin biomarkeru oxidačního poškození DNA 8-oxodG (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosinu). To se může projevit zvýšenou nemocností dětí v průběhu dospívání (Sram a kol., 2017).

Zajímavostí u studie Ambroz a kol. (2016) je, že u matek z Karviné byly zjištěny statisticky významně nižší hladiny markeru 8-oxodG oproti matkám z ČB, což může být způsobeno přizpůsobením dospělého organismu nepříznivým podmínkám prostředí a vývojem obranných mechanismů, na což bylo v jiné studii také poukázáno (Rossnerova a kol., 2020b). Protože bylo téma předložené disertační práce pilotním výzkumem, nebyla celogenomová genová exprese u matek z Karviné a ČB hodnocena. Nicméně v navazujícím a v současné době probíhajícím projektu HAIE („Zdravé stárnutí v průmyslovém prostředí“, 2018-2022), na kterém spolupracuje i ÚEM AV ČR, v.v.i., je plánována genomická analýza u novorozenců i jejich matek.

U dětí narozených v Karviné a ČB, kterým je nyní již sedm let, byl v nedávné době zkoumán vliv typu porodu na výsledky psychologických testů, i když vliv odlišných lokalit zde studován nebyl (Blazkova a kol., 2020a). U pětiletých dětí, které se narodily císařským řezem, byl pozorován signifikantně snížený vývoj kognitivních funkcí. U těchto dětí byl rovněž studován efekt prenatální expozice PAU a PM_{2.5} na kognitivní vývoj. I vliv PAU prokázán nebyl, avšak vyšší koncentrace PM_{2.5}, naměřené během třetího trimestru těhotenství, ovlivnily kognitivní vývoj dívek z Karviné (Blazkova a kol., 2020b).

U novorozenců z okresů Most a ČB (Studie 2 a 3) nebyl hodnocen rozdíl v koncentracích PM_{2.5} a B[a]P, protože byly obě lokality studovány v jiné části roku. Rozdíl ve znečištěném ovzduší mezi těmito lokalitami však nebyl pozorován ani ve srovnatelných obdobích (Obr. 10). Nicméně zdravotní stav populace v pánevních okresech se stále liší od obyvatelstva ČB. V Ústeckém kraji, podobně jako v MSK, je dlouhodobě nejnižší standardizovaná střední délka života mužů i žen (Obr. 3), ale také největší potratovost v ČR (Český statistický úřad 2014). Tato pozorování podtrhují již zmíněný fakt, že vliv aktuálních hladin polutantů v ovzduší má na celkový zdravotní stav populace pouze částečný vliv.

V Mostu a ČB bylo sledováno 50 a 39 subjektů. U matek z Mostu byl zjištěn statisticky vyšší podíl kouření v domácnosti a aktivní kouření před těhotenstvím. Pozorováno bylo také vyšší procento matek s nižším vzděláním, ale kvůli malému počtu nebylo možné statistickou významnost spolehlivě vyhodnotit. Statisticky významná byla v Mostě nižší novorozenecká hmotnost oproti novorozencům z ČB (Tab. 3 a Tab. 4).

V navazující studii byly při analýze koncentrací metabolitů PAU v moči novorozenců z Mostu zjištěny 2x vyšší koncentrace studovaných látek než v ČB (Urbancova a kol., 2020). Proto se také odhaduje, že změny v metabolismu PAU mohou být důsledkem předchozí dlouhodobé zátěže faktorům životního prostředí (Sram, 2020).

I když došlo v posledních letech v Ústeckém kraji ke zlepšení stavu životního prostředí, a tedy i stavu ovzduší, dopady na zdraví populace přetrvávají. Změny, které mohla indukovat špatná kvalita ovzduší v 70. a 80. letech minulého století, se tak pravděpodobně přenáší i do dalších generací.

Velkým handicapem v průmyslových lokalitách (MSK, Ústecký kraj) je i obecně nižší vzdělání obyvatel, které je spojeno s horším životním stylem. Rovněž větší množství sociálně vyloučených lokalit a vyšší nezaměstnanost mohou být faktory, které zvyšují pravděpodobnost negativního vlivu na zdraví (Český statistický úřad 2020).

STUDIE 1 – CELOGENOMOVÁ GENOVÁ EXPRESE

Studie hodnotí celogenomovou genovou expresi u novorozenců a je unikátní svým rozsahem, protože porovnávala více než 200 novorozenců narozených ve dvou srovnatelných obdobích v průběhu roku.

První studie z ČR, která vyhodnocovala stejnou metodikou úroveň genové exprese jako odpověď na znečištěné ovzduší, byla provedena u malého souboru dětí z Teplic a Prachatic (van Leeuwen a kol., 2006). Počet deregulovaných genů byl korelovan s frekvencí mikrojader.

Analýza transkriptomu u novorozenců byla dále provedena při srovnání vzorků z Prahy a ČB (Votavova a kol., 2012). Ve studii bylo identifikováno 104 diferenciálně exprimovaných genů podílejících se na buněčných procesech a drahách souvisejících s imunitní odpovědi, negativní regulaci proliferace, apoptózy nebo MAPkinázové signální dráhy. Mezi up-regulované geny patřil např. *SERPINA1*, který je spojován s genotoxicitou (Gupta, 2019).

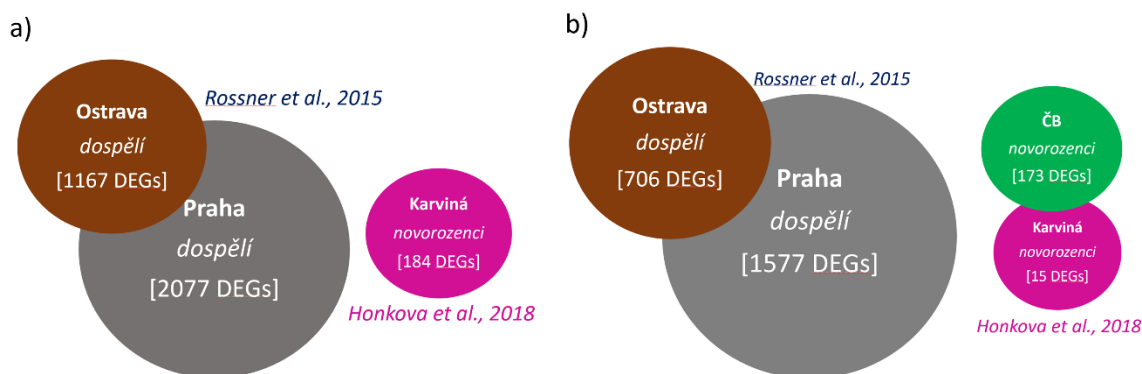
Součástí studie Votavova a kol. (2012) byl i podsoubor 25 matek kuřáček a 34 nekuřáček. Změny exprese genů na celogenomové úrovni byly sledovány v pupečnickové krvi a v placentě. Expozice tabákovému kouři ovlivnila expresi genů kódující adhezní molekuly a regulaci imunologické odpovědi.

Ve Studii 1 bylo také několik matek kuřáček, ale na prezentované výsledky nemělo jejich zařazení žádný vliv. Důvodem byl nejspíše jejich nízký počet (9,6 % u matek z Karviné a 3,7 % u matek z ČB).

Nejvíce DEGs (184) bylo nalezeno u vzorků z Karviné v zimním období ve srovnání s ČB, zatímco v letním období byl rozdíl zjištěn pouze pro 20 DEG. Překvapujícím bylo poměrně nízké množství deregulovaných genů ve srovnání s výsledky získanými stejnou metodou na environmentálně exponované dospělé populaci (Rossner a kol., 2015 - příloha 2). Počet DEGs zde byl řádově v tisících, konkrétně 4270 DEGs u subjektů z Prahy a 3360 u subjektů z Ostravy, přičemž 2077 bylo specifických pro pražské vzorky (nižší úroveň znečištění) a 1167 specifických pro ostravské vzorky (vyšší koncentrace polutantů). Vysvětlením řádového rozdílu v počtu DEGs mezi novorozenci a dospělými jedinci může být fakt, že novorozenci mají z principu nižší odpověď na environmentální zátěž než dospělí. Pozoruhodné však je, že vysoká úroveň znečištění ovzduší v Ostravě u dospělých jedinců korespondovala paradoxně s menším množstvím DEGs, kdežto u novorozenců narozených v Karviné tomu bylo naopak. Tato zjištění mohou poukazovat na možnost určité adaptace na znečištěné ovzduší, kterou dospělí jedinci získají v průběhu svého života, jak již bylo diskutováno v dřívější studii (Ambroz a kol., 2016). I přes nízký počet DEGs detekovaný u novorozenců je vhodné poukázat na efekt období znázorněný mimo jiné i na Obr. 12, při kterém je mezi zimním a letním obdobím u vzorků z ČB pozorován větší rozdíl v počtu DEGs (173 DEGs) než při srovnání u vzorků z Karviné (15 DEGs). Podobný trend popisuje i diskutovaná studie (Rossner a kol., 2015 - příloha 2), kdy je počet DEGs mezi dvěma obdobími vyšší v kontrolní než ve znečištěné lokalitě. Schématické srovnání je uvedeno na Obr. 26. Je však potřeba dodat, že v případě studie na novorozencích (Honkova a kol., 2018) byl hodnocen rozdíl mezi zimním a letním obdobím, kdežto v předchozí práci (Rossner a kol., 2015 - příloha 2) byla srovnávána dvě zimní období.

Možné mechanismy vedoucí ke snížení genové exprese u dospělé populace žijící ve znečištěném prostředí MSK důsledkem potenciálních adaptačních mechanismů byly shrnuty v nedávné studii (Rossnerova a kol., 2020b). Konkrétním příkladem je studie, kde byla pozorována zvýšená exprese reparačního genu *XRCC5*⁵, který ovlivňuje aktivitu proteinů reparační dráhy NHEJ, opravující zlomy DNA nehomologním spojováním volných konců (Rossner a kol., 2011b). Na druhou stranu bylo v této studii také zjištěno, že dobrovolníci z Ostravy měli vyšší hladinu vitamínů A a E v plasmě, což mohlo způsobit zároveň i nižší hladinu oxidačního poškození DNA.

⁵ Zvýšená exprese *XRCC5* u jedinců žijících na Ostravsku se stala natolik pozoruhodná, že gen získal i mediální zájem v podobě populárního označení „Ostragen“, zavedeného písničkářem Jaromírem Nohavicou (*Nohavica vymyslel název genu proti smogu. Ostragen, 2011*).



Obr. 26 Srovnání lokálně-specifických unikátních DEGs (a) a DEGs získaných mezisezónním srovnáním (b) u studie na dospělé populaci (Rossner a kol., 2015) a studie na novorozencích (Honkova a kol., 2018).

Ve Studii 1 byly identifikované up-regulované DEGs s největší změnou exprese ($\log_2FC > 1,4$) zejména u vzorků z Karviné v zimním období, kde byla pozorována např. změna exprese genu *SERPINA13*. Ta byla naopak down-regulována v mezisezónním srovnání u vzorků z ČB. Gen by mohl být tedy považován za potenciální biomarker, jehož aktivita je zvýšena zejména v lokalitách s vyšší hladinou znečištěného ovzduší. *SERPINA13* kóduje serin peptidázový inhibitor, který reguluje aktivitu serin proteinázy předcházející nekontrolované proteolýze. Serpiny obecně patří do rozsáhlé superrodiny proteinů, které kontrolují procesy, které vyžadují regulaci krevní koagulace, zánětlivé odpovědi a fibrinolýzu (Huntington, 2011).

Dalším z výrazně up-regulovaných genů byl *FBOX7*, který kóduje F-box protein 7 negativně regulující zánik neuronů indukovaný oxidačním stresem. Dysfunkce Fbxo7 proteinu může vyústit v nedostatečnou funkci ubiquitin-proteázomového systému způsobujícího neuronální degeneraci (Nelson a kol., 2013).

Ve vztahu k respiračnímu systému byla pozorována up-regulace *MUC6* u vzorků z Karviné v zimním období a jeho down-regulace u vzorků z ČB v mezisezónním srovnání. Protein *MUC6* hraje klíčovou roli v ochraně epitelálních buněk a ve výzkumu je používán jako tumorový marker řady nádorových onemocnění. Muciny se také účastní imunitní obrany, která chrání jedince proti patogenům a environmentálním toxinům. Zánětlivá či imunitní odpověď, která vede k nadprodukci hlenu, charakterizuje chronické onemocnění dýchacích cest, jako je asthma, CHOPN či cystická fibróza (Rose a Vaynow, 2006).

Ve vzorcích z Karviné odebraných v letním období byla pozorována také zvýšená exprese genu *CYP4F3*. Jak již bylo zmíněno v Úvodu, proteiny cychochromu P450 katalyzují reakce, které se účastní metabolismu xenobiotik. Enzym *CYP4F3* zahajuje inaktivaci leukotrienu B4, který je potenciální mediátor zánětu (Hardwick, 2015). Pozoruhodné je, že tento gen byl up-regulován u

vzorků odebraných v letním období, kdy byla koncentrace polutantů významně nižší než v zimním období. Nabízí se proto úvaha, že faktory, které mohly mít vliv na změny genové exprese, působily v prvním trimestru těhotenství, který v případě těchto vzorků připadl na zimní období.

Autoři studie [Michikawa a kol. \(2017\)](#) zjistili, že efekt prenatální expozice polutantům v ovzduší na negativní vývoj plodu má nejvýraznější vliv právě v průběhu prvního trimestru těhotenství. Vzhledem k designu Studie 1 a omezené metodice založené na expresi mRNA molekul však nebylo možné vyhodnotit vliv jednotlivých trimestrů těhotenství na aktivitu genové exprese.

Nízký počet deregulovaných genů znemožňoval provést podrobnou analýzu biochemických drah. Bylo však možné identifikovat několik signifikantních drah, zahrnujících více než 2 deregulované geny, jejichž funkce může být u studovaných vzorků ovlivněna.

Statisticky nejvýznamnější biochemickou dráhou pozorovanou u vzorků z Karviné ze zimního období je dráha *Metabolismu porfyrinu a chlorofylu* (hsa: 04662), která řídí syntézu hemu, jeho transport a metabolismus ([Salim a kol., 2001](#)). Z dalších významných drah v tomto srovnání je dráha NRF2 (WP: *NRF2 pathway*), která hraje roli v buněčné obraně proti oxidačnímu a elektrofilnímu stresu ([Kaspar a kol., 2009](#)). Dráha SIDS (WP: *SIDS Susceptibility Pathways*) zahrnuje deregulované geny asociované s neurální signalizací, zánětlivou odpovědí, včetně syntézy serotoninu ([Kinney & Thach, 2009](#)). Tato dráha byla signifikantní také u vzorků z ČB při mezisezónním srovnání.

Dráha amyotrofické laterální sklerózy (hsa:05014 *Amyotrophic lateral sclerosis*) a Signální dráha TNF- α (WP: *TNF- α Signaling Pathway*), které ovlivňují indukci oxidačního stresu tvorbou reaktivních forem kyslíku ([Borjesson a kol., 2013](#)), byly identifikovány u vzorků z Karviné v letním období.

Mezisezónní srovnání u vzorků z Karviné vedlo k detekci drah, které jsou zásadní pro imunitní odpověď organismu, jako jsou signální dráhy pro receptory B- (hsa:04662) a T-buněk (hsa: 04660).

Ve studii [Ghosh a kol. \(2016\)](#) - příloha 3 byl analyzován výskyt SNP v několika genech (*EPHX1*, *IL10*, *STAT4* a *XPC*) u dětí ve věku 0-2 let, které se narodily v Teplicích a Prachaticích v 90. letech a byly u nich diagnostikovány opakované epizody bronchitidy a bronchiolitidy. Cílem studie bylo zjistit interakce koncentrací PAU a PM_{2.5} s výskytem vybraných SNP. Geny a genetické polymorfismy pro tuto studii byly vybrány na základě jejich biologického významu, kam se řadí obrana proti oxidačnímu poškození a ovlivnění metabolismu xenobiotik (*EPHX1*), modulace imunitní a protizánětlivé odpovědi (*IL10*, *STAT4*) a reparační mechanismy DNA (*XPC*). *EPHX1* je exprimován v buňkách bronchiálního epitelu a metabolizuje reaktivní kyslíkové formy vyvolané např. expozicí

polutantům (Smith a Harrison, 1997). Aktivita *EPHX1* je asociována s řadou respiračních onemocnění (Ghosh a kol., 2012). Při poškození DNA indukovaného expozicí genotoxickým polutantům je rolí *XPC* zahájení opravných procesů DNA (Melis a kol., 2013). *IL10* kóduje hlavní protizánětlivý cytokin, jehož exprese ve stadiu zánětu je nezbytná k regulaci produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Sun a kol., 2013). V reakci na různé cytokiny včetně IL10 jsou aktivovány členové proteinové rodiny, kódovaných genem *STAT*. Jeden z významných zástupců, *STAT4*, se podílí na dozrávání T-buněk. U pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem byly pozorovány zvýšené hladiny aktivovaného *STAT4* (Di Stefano a kol., 2004) a snížená produkce *IL10* (Hackett a kol., 2008).

Statisticky významné interakce SNP s koncentracemi PAU byly nalezeny u čtyř variant [*EPHX1*, (rs2854461), *STAT4* (rs16833215), *XPC* (rs2228001 a rs2733532)], které ale po korekci na mnohočetné testování nebyly signifikantní. Významná však byla interakce koncentrací $PM_{2.5}$ se dvěma SNP v genu *XPC* (rs2228001 and rs2733532), jejichž výskyt souvisel s nárůstem koncentrace $PM_{2.5}$ o 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Role polymorfismů *XPC* v alteraci kapacity reparace DNA byla pozorována u studie, která hodnotila rakovinu plic (He a kol., 2013). V rámci reparačního mechanismu NER se *XPC* také podílí na odstraňování DNA aduktů vzniklých z produktů biotransformace B[a]P (Melis a kol., 2011).

STUDIE 2 – GENOVĚ-SPECIFICKÁ METYLACE DNA

Hlavním limitem studií zaměřujících se na celogenomovou expresi na úrovni genů je krátký poločas života mRNA, proto může být posuzování vlivu dlouhodobých expozic hůře průkazné a biologické mechanismy konkrétních procesů, které by byly důsledkem prenatální expozice genotoxickým agens, tak bývají nedostatečně prostudovány. Naproti tomu epigenetické mechanismy jsou prozkoumány lépe, protože mohou stabilněji odrážet dlouhodobé efekty.

Metylace DNA hraje klíčovou roli v udržení genomické stability a regulace exprese genů. Je považována za významný mechanismus, který po expozici znečištěnému ovzduší působí na vývoj plodu a později může negativně ovlivnit zdravotní stav jedince v průběhu života (Koukoura a kol., 2012). Nepříznivé efekty environmentálních rizik se projevují i při expozici *in utero* (Barouki a kol., 2018). Dlouhodobé změny genové exprese a ovlivnění funkce buněk vyvolané epigenetickými modifikacemi mohou být zjištěny perinatálně, ale vztahují se k prenatální expozici znečištěnému ovzduší během těhotenství matky (Desai a kol., 2017). U novorozenců byla metylace genomické DNA pozitivně asociována také s úrovní B[a]P-DNA aduktů v pupečnickové krvi (Subach a kol., 2007).

Rozsáhlá meta-analýza několika evropských kohort novorozenců a dětí byla zaměřena na hodnocení vlivu prenatální expozice oxidu dusičitému na úroveň metylace DNA ve vzorcích pupečnickové krve. Ve studii byly vyhodnoceny geny *CAT* a *TPO*, jejichž odlišná metylace měla vztah k expozici NO₂ (Gruzieva a kol., 2017). Stejní autoři se později zaměřili také na hodnocení PM_{2,5} a PM₁₀ u stejných kohort. Ze signifikantních CpG byla identifikována místa regulující aktivitů genů *FAM13A* a *NOTCH4*, jejichž funkce je asociována s astmatem a plicními onemocněními (Gruzieva a kol., 2019).

Znečištěné ovzduší je často spojováno s vyšším výskytem astmatu a alergií u dětí, byť některé studie tento vztah přímo neprokazují (Gruzieva a kol., 2014). Studie Perera a kol. (2009) uvádí, že vysoká prevalence astmatu u dětí z New Yorku může souviset s transplacentární expozicí PAU, proto v pilotní studii 20 dětí autoři zkoumali sekvence metylované DNA u vzorků pupečnickové krve. Metylační status u více než 30 sekvencí DNA souvisel s expozicí PAU. Metylace v CpG ostrůvku genu *ACSL3* byla významně asociována nejen s prenatální expozicí PAU, ale i s výskytem symptomů astmatu u dětí do věku 5 let.

Expozice zvýšeným koncentracím PAU může být asociována také s výskytem atopického ekzému u dětí. Studie Hew a kol. (2015) našla epigenetické modifikace v lokusu *FOXP3*, který ovlivňuje výskyt atopie.

Jedna z prvních molekulárně-epidemiologických studií v ČR, která měla za cíl analyzovat profil metylace DNA v lidské populaci, se věnovala 200 dětem ve věku 7 – 15 let ze dvou regionů, lišících se úrovní znečištěného ovzduší – Prachatic a Ostravsko (Rossnerova a kol., 2013). Analýzou 27 000 CpG míst bylo nalezeno 58 signifikantně metylovaných CpG (s rozdílem větším než 10 %). Všechny 58 CpG míst bylo u ostravských dětí v porovnání s dětmi z Prachatic hypometylováno. Autoři studie popisují lokusy cg08460026 (*CTLA4*) a cg02901679 (*IL10*) ve vztahu k imunitní odpovědi.

Ve studii 2 byla hodnocena kohorta 50 novorozenců z Mostu a ČB na microarray platformě, která umožňuje analýzu 850 000 CpG míst. Ve studii bylo nalezeno 868 rozdílně metylovaných CpG míst a pozorovaný výrazný klastr mezi genově-specifickými CpG místy byl dán zejména odlišnou lokalitou. Více CpG míst bylo hypermetylováno (630 hyper- vs. 238 hypometylovaných CpG míst), přičemž u statisticky nejvýznamnějších míst byla pozorována hypermetylace DNA, která může vést k útlumu aktivity metylací regulovaných genů. Většina zjištěných CpG míst (84 % u hyper- a 63 % u hypometylovaných míst) se nachází v genomu roztroušeně (Open Sea oblasti), proto nejsou v této práci hodnoceny oblasti CpG ostrůvků.

Nejvýrazněji hypermetylované CpG místo cg10613215 se nachází v promotoru genu *HIVEP2*, jehož aktivita může být ovlivněna také hypermetylací cg06770429, které se nachází ve stejném oblasti

na chromosomu 6. Hypermetylace cg10613215 byla nalezena také nalezena u jednoho z monozygotních dvojčat s rakovinou vaječníků ve srovnání se zdravým sourozencem (Erdogan a kol., 2020). *HIVEP2* kóduje stejnojmenný transkripční faktor, který se podílí na regulaci genů ovlivňujících imunitní odpověď, buněčnou proliferaci a metastázování buněk. Výrazné snížení jeho exprese (o 96 %) bylo pozorováno například u buněk karcinomu prsu ve srovnání s normální tkání (Fujii a kol., 2005). Pro úplnost je třeba dodat, že mutace *HIVEP2* je spojována s opožděným vývojem a mentálním postižením (Steinfeld a kol., 2016).

Nejvýraznější hypometylace byla pozorována u cg11747349, který reguluje aktivitu genů *GPSM3* a *NOTCH4*. U T-buněk se metylace CpG místa objevuje u CD4+ a CD8+ (Reinius a kol., 2012).

GPSM3 reguluje stavbu a funkci G-proteinu a inhibuje inflamázovou aktivitu NLRP3 (Giguere a kol., 2014). *GPSM3* je výrazně exprimován v buněčné linii THP-1 odvozené od pacientů s leukémií a jeho snížená exprese je spojována s protektivním působením při akutní artritidě (Giguere a kol., 2013). *NOTCH4* byl identifikován jako genetický marker u astmatu (Li a kol., 2013). Exprese *NOTCH4* může hrát roli také při zánětu plic vyvolaným ozónem, kterému byly exponovány myši. Up-regulace *NOTCH4* může též chránit proti zánětům (Verhein a kol., 2015).

Mapování odlišně metylovaných CpG míst na genom umožnilo identifikaci několika biochemických drah, kterými mohou být popsány biologické efekty u hodnocených vzorků, byť s určitou mírou nejistoty, neboť bez verifikační analýzy není možné spolehlivě vyhodnotit, zda tato signifikantní CpG místa geny u studovaných vzorků skutečně regulují. Pět statisticky významných biochemických drah obsahovalo poměrně vysoké množství genů anotovaných přes CpG místa (Obr. 17).

Nejvýznamnější dráhou byla signální dráha receptoru T-buněk (*hsa:4660*), která byla identifikována také ve Studii 1 při mezisezónním srovnání vzorků z Karviné.

Tato dráha aktivuje T-lymfocyty a je klíčovým procesem účinné odpovědi imunitního systému (Obr. 18). V dráze bylo identifikováno 23 CpG míst v 16 genech. Nachází se v ní gen *TEC*, jehož exprese může být ovlivněna CpG místem cg19149957, které je uvedeno v Tab. 8 jako jedno z nejvíce hypometylovaných CpG míst. *TEC* kóduje tyrosin-kinázu ITK. Tyrosin-kinázy hrají klíčovou roli v regulaci adaptivní imunitní odpovědi, regulují vývoj, funkci a diferenciaci T-buněk (Andreotti a kol., 2010; Readinger a kol., 2009).

U genu *PDCD1*, který je též součástí této dráhy, byla pozorována 3 hypermetylovaná CpG místa ve shodné oblasti genomu. Gen kóduje protein PD1, který se vyskytuje na povrchu buněk, kde reguluje reakci imunitního systému vůči vlastním buňkám snižováním imunity a podporou

tolerance potlačením zánětlivé aktivity T-buněk. Tím se zabraňuje autoimunitnímu onemocnění, ale zároveň i zabíjení rakovinných buněk (Syn a kol., 2017). V dráze se nachází i gen *LAT*, u kterého byla nalezena rovněž tři hypermetylovaná CpG místa, která mohou vést k útlumu jeho exprese. Exprese genu *LAT* a jím kódovaného proteinu byla snížena v periferní krvi u T-buněk astmatických pacientů ve srovnání se zdravými jedinci (Li a kol., 2013).

Regulační aktivita v T-buňkách má významný vliv i na vývoj alergií. Pozměněná aktivita buněk CD4+ CD25+ může u novorozenců zvyšovat vnímavost k alergiím (Smith a kol., 2008).

Geny *PDCD1* a *LAT* jsou také součástí dráhy exprese PD-L1 (*hsa05235: PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer*), která má se signální dráhou receptoru T-buněk osm společných genů asociovaných s nalezenými CpG místy.

Studie, která byla publikována v letošním roce (Merid a kol., 2021), integrovala data z evropských kohort 656 dětí a adolescentů z analýzy transkriptomu s DNA metylací. Autoři identifikovali několik funkčních modulů (genů *NR1I2*, *MAPK6*, *TAF8* and *SCARA3*) ve vztahu k expozici PM_{2.5} udávané při narození dětí.

Studie EWAS hodnotící stovky a tisíce metylovaných míst na genomu jsou obvykle prováděny na vzorcích z plné krve, což je i případ vzorků analyzovaných v této práci. Je nutno zmínit, že genově-specifická metylace DNA na microarray platformě bývá z plné krve často hodnocena komplexně, byť krev obsahuje mnoho funkčně a vývojově odlišných typů buněk. Příkladem je 8 252 metylačních míst, která pokrývají 343 genů, hrajících roli v imunitních onemocněních, přičemž 22 % z nich je odlišně metylováno u mononukleárních buněk a u granulocytů. Na úrovni jednotlivých genů je většinou metylační vzorec pro různé typy krevních buněk podobný, nicméně některá CpG místa v regulačních oblastech mohou mít metylační vzorec opačný. Při hodnocení, interpretaci a zejména při srovnávání s jinými studiemi je proto třeba vzít v úvahu rozdíly vyplývající z podílu odlišných typů bílých krvinek (Reinius a kol., 2012).

Na základě zjištěných výsledků, které byly součástí pilotní Studie 2, je nyní v navazujícím projektu HAIE hodnocena metylace DNA u stovek novorozenců z Karviné a ČB opět u vzorků z pupečnickové krve. Hodnocení metylačního vzorce CpG míst bude vztaženo k jednotlivým buněčným typům v krvi.

STUDIE 3 – DIFERENCIÁLNÍ EXPRESE miRNA

V posledních deseti letech je o studii, které hodnotí působení celé řady faktorů na expresi miRNA, velký zájem, zejména ve spojitosti miRNA jako biomarkeru, prediktoru onemocnění i

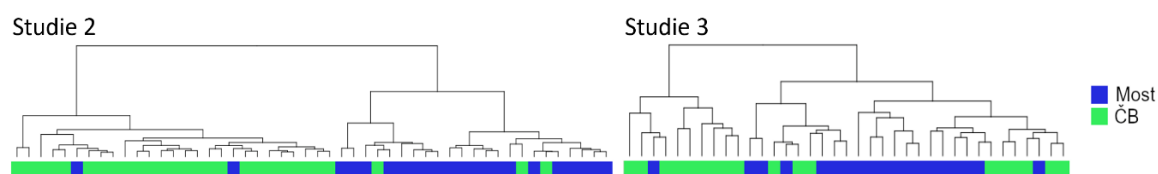
potenciálního terapeutika. Zadáním klíčových slov „cancer“ a „miRNA“ do databáze PubMed je nalezeno 54 706 záznamů (k lednu 2021), přičemž poslední roky počet publikovaných prací mírně klesá. Podobný trend se týká i studií hodnotících miRNA jako biomarker znečištěného ovzduší (148 záznamů) s prudkým poklesem nových publikací za poslední tři roky.

Review zaměřující se na miRNA ovlivněné environmentální expozici *in utero* bylo publikováno již v roce 2014 (Kappil & Chen, 2014). Například s astmatem jsou asociovány miRNA či jejich SNPs varianty ve studiích Tan a kol. (2007) a Su a kol. (2011). Příkladem hodnocení vlivu xenobiotik na hladiny exprese miRNA je *in utero* expozice alkoholu (Sathyan a kol., 2007) či kouření matek v průběhu těhotenství analyzované ve vzorcích pupečnickové krve, kde autoři pozorovali efekt změny exprese miRNA na počet T-buněk a následně i na zvýšené riziko alergií (Herberth a kol., 2014).

Ovlivnění exprese konkrétních miRNA jako biomarkerů expozice PM_{2.5} bylo pozorováno *in utero* v placentě v závislosti na období těhotenství. Nejvýznamnější expresní změny byly zjištěny v 2. trimestru těhotenství, a to u miRNA, které regulují dráhy imunitní odpovědi a karcinogeneze (Tsamou a kol., 2018).

Poslední metodou, která tak byla do disertační práce přidána, byla analýza exprese miRNA provedená pomocí NGS. Hodnocení proběhlo u novorozenců, kteří tvořili podsoubor Studie 2. V této pilotní studii (celkem 39 vzorků), bylo statistické hodnocení zaměřeno na srovnání rozdílné exprese mezi dvěma lokalitami.

Hierarchickým klastrováním mezi vzorky z Mostu a ČB u získaných DE miRNA byla pozorována méně výrazná separace vzorků mezi lokalitami než u Studie 2 (Obr. 27). Důvodem může být menší počet vzorků, který je na hranici pro statistické vyhodnocení molekulárně-epidemiologických studií.



Obr. 27 Hierarchické klastrování mezi vzorky hodnocené genově-specifickou metylací DNA (Studie 2) a DE miRNA (Studie3).

Propojení mezi odlišně metylovanými CpG místy a DE miRNA ukázalo down-regulaci *miR-1268a*, jejíž exprese je zároveň regulovaná CpG místem cg05564644, u kterého byla pozorována hypermetylace.

Jelikož geny kódující molekuly miRNA mohou být stejně jako geny pro proteiny modifikovány metylací DNA, jeden typ epigenetického mechanismu může být v principu regulován jiným epigenetickým mechanismem. Propojení metylace DNA s miRNomem může vést k posílení regulace genové exprese (Oltra a kol., 2018) a případná dysregulace následně k významným fyziologickým a patologickým projevům (Bannister a Kouzarides, 2011; Piletic a Kunej, 2016).

Ve studii Oltra a kol. (2018), která se zaměřovala na mladé ženy s karcinomem prsu, autoři s využitím Infinium MethylationEPIC BeadChips hodnotili 6 567 CpG míst, které regulují expresi genů kódujících miRNA. Ve studii je popsána i *miR-1268a*, jejíž exprese je však regulována jinými CpG místy, než bylo pozorováno v rámci disertační práce. Informace z dostupné literatury o *miR-1268a* jsou prozatím nedostatečné. Silná up-regulace této miRNA byla popsána například ve studii, která hodnotila vliv velkých dávek ionizujícího záření na mononukleární buňky (Beer a kol., 2014). *miR-1268a* se také zdá být specifická pro těhotenskou cukrovku, ale autoři studie pro vyhodnocení miRNA biomarkerů použili velmi malý vzorek žen (Santangelo a kol., 2016).

Nejvýrazněji up-regulovanou miRNA byla *miR-190a*. Její role bývá spojována s pulmonární hypertenzí a byla pozorována také korelace zvýšené exprese s vážností stavu CHOPN (Jiang a kol., 2018). V *in vitro* studii (Chanyshev a kol., 2019) byla up-regulace *miR-190a* nejvíce ovlivněna působením B[a]P u primárních buněčných kultur, kde vedla ke snížení exprese genů *TP53INP1* a *PHLPP1*. Autoři se domnívají, že *miR-190a* je součástí klíčových buněčných procesů, které jsou indukovány v odpovědi na působení B[a]P. Ve Studii 3 byla pozorována statisticky významná hypermethylace CpG místa cg01824466, které reguluje gen *TP53INP1*. Down-regulace *miR-190a* byla v jiné studii asociována s expozicí cigaretovému kouři *in vitro* (Wang a kol., 2019).

Nejvýrazněji down-regulovaná miRNA ve Studii 3 byla nově identifikována *miR-6800*. Down-regulace další miRNA (*miR-193b*) byla popsána u atopického ekzému (Specjalski a Jassem, 2019). Její změněná exprese byla rovněž pozorována u dalších autoimunitních onemocněních, jako je roztroušená skleróza či psoriáza (Honardoost a kol., 2015; Zhao a kol., 2014). Komplexnější náhled na mechanismus této odpovědi přinesla nedávná studie Shirani a kol. (2020), která popisuje nově objevený typ imunitních buněk Th-17, které se účastní právě autoimunitních onemocnění. *miR-193b* je zde popsána jako významný marker, který inhibuje expresi negativních regulátorů diferenciaci Th-17.

Největší zastoupení DE miRNA ve Studii 3 tvořilo sedm variant *miR-548*, z nichž šest bylo up-regulováno a jedna down-regulována. Z databáze miRBase vyplývá, že rodinu *miR-548* tvoří celkem 121 sekvenčních typů, které jsou roztroušené po celém genomu. Rodina *miR-548* hraje

důležitou roli v rozličných biologických procesech, včetně řady onemocnění. Výsledky enrichment analýzy včetně miRNA:miRNA interakcí členů rodiny jsou uvedeny v další studii [Liang a kol. \(2012\)](#). Z drah zjištěných ve Studii 3 je možné zmínit dráhy *T-cell receptor pathway* či *Adherens junction*, které byly zároveň i nejvíce signifikantní u cílových genů CpG míst zjištěných ve Studii 2. Geny v drahách, na které cílí miRNA rodiny *miR-548*, jsou však jiné než ty, na které cílí významně metylovaná CpG místa ve Studii 2.

V předkládané disertační práci byl u novorozenců ze tří lokalit České republiky (Karviná, České Budějovice a Most), které se liší průmyslovým zatížením, studován vliv prostředí na aktivitu celogenomové genové exprese a epigenetický profil. Závěry práce je možné rozdělit do tří tematických celků:

V první části byla analyzována úroveň znečištění ovzduší ve sledovaných lokalitách a populační rozdíly u matek a novorozenců.

Ve druhé části (Studie 1) byla provedena celogenomová expresní analýza u více než 200 novorozenců z Karviné a ČB ve dvou obdobích (letní a zimní období).

Ve třetí části (Studie 2 a 3) byla hodnocena pilotní skupina novorozenců z Mostu a ČB, u kterých byl sledován epigenetický profil reprezentovaný genově-specifickou metylací DNA a expresí miRNA.

Hlavní poznatky první části práce:

- Nejvyšší koncentrace polutantů $PM_{2.5}$ a B[a]P byly naměřeny v Karviné v zimním období. V této lokalitě byly hodnoty z letního období srovnatelné se zimními koncentracemi v ČB.
- V Karviné v letech 2013-2017 docházelo ke každoročnímu překračování ročních imisních limitů $PM_{2.5}$. V případě B[a]P byl roční imisní limit překračován ve všech třech lokalitách. Mezi Mostem a ČB nebyl pozorován rozdíl v úrovni znečištěného ovzduší ani ve sledovaném období, ani při meziročním srovnání.
- Populační rozdíly u studovaných matek z různých lokalit byly pouze minimální. Menší rozdíly se týkaly častějšího kouření v domácnosti a v období před těhotenstvím u matek z průmyslových lokalit Karviné a Mostu. Matky z Karviné byly mladší a častěji dosáhly pouze základního vzdělání. U novorozenců z Mostu byla pozorována nižší porodní váha než u novorozenců z ČB. Je však nutné dodat, že zmíněná charakteristika se týká pouze omezeného souboru matek ze studovaných lokalit.

Hlavní poznatky druhé části práce:

- Bylo popsáno několik odlišně exprimovaných genů specifických pro vzorky z Karviné a ČB, jejichž aktivita byla ovlivněna především obdobím porodu. Rozdíly mezi lokalitami bez vlivu období byly minimální.
- Nejvíce deregulovaných genů bylo pozorováno u vzorků z Karviné v zimním období.

- Odlišně exprimované geny nalezené u vzorků z Karviné se nejčastěji účastnily buněčné obrany proti oxidačnímu a elektrofilnímu stresu a imunitní odpovědi. U mezisezónního srovnání byly rozdílně exprimované zejména geny zúčastněné v signálních drahách receptorů T- a B- buněk.
- Výsledky celogenomové genové exprese u lidských dobrovolníků naznačují i možnost adaptivní odpovědi u jedinců žijících ve znečištěném prostředí.

Hlavní poznatky třetí části práce:

- Mezi novorozenci z Mostu a ČB byl pozorováno 868 odlišně metylovaných CpG míst analyzovaných na široké oblasti genomu.
- Odlišně metylovaná CpG místa mohou ovlivňovat cílové geny, které souvisí především s regulací T-buněk a celkově imunitní odpovědi. Nejvýznamnějšími biochemickými drahami, jejichž funkce může být pozměněna metylací příslušných genů, je signální dráha receptoru T-buněk a primární imunodeficience.
- Několik statisticky významných CpG míst je přímo spojeno s výskytem astmatu a alergiemi.
- Mezi vzorky z Mostu a ČB byly nalezené rozdílně exprimované molekuly miRNA. Mezi ně patří *miR-190a*, *miR-193b* a *miR-548*. U poslední jmenované molekuly bylo pozorováno několik odlišně exprimovaných sekvenčních variant.
- Byly také identifikovány potenciální interakce miRNA:CpG. Nejvýznamnější je up-regulace *miR-190a*, která může být ovlivněna hypermetylací CpG místa cg01824466. Uvedená miRNA ovlivňuje aktivitu genu *TP53INP1*, jehož exprese je spojena s expozicí B[a]P.
- Výsledky této pilotní studie zkoumající rozdíly v epigenetických profilech novorozenců z různých lokalit ČR jsou nyní předmětem navazujících výzkumů, které v současné době probíhají v ÚEM AV ČR, v.v.i.

- Agrawal, K., Das, V., Vyas, P., & Hajduch, M. (2018). Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs – A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacology Therapeutics*, *188*, 45–79. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.006>
- Air quality in Europe 2019 - European Environment Agency*. (b.r.). [Publication]. Získáno 15. září 2020, z <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2019>
- Air quality in Europe 2014 - European Environment Agency*. (b.r.). [Publication]. Získáno 21. červenec 2020, z <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2014>
- Alles, J., Fehlmann, T., Fischer, U., Backes, Ch., Galata, V., Minet, M., Hart, M., Abu-Halima, M., Grässer, F. A., Lenhof, H. P., Keller, A., & Meese, E. (2019). An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Research*, *47*(7), 3353–3364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz097>
- Ambroz, A., Vlkova, V., Rossner, P., Rossnerova, A., Svecova, V., Milcova, A., Pulkrabova, J., Hajslova, J., Veleminsky, M., Solansky, I., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.05.010>
- Andreotti, A. H., Schwartzberg, P. L., Joseph, R. E., & Berg, L. J. (2010). T-Cell Signaling Regulated by the Tec Family Kinase, Itk. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002287>
- Bannister, A. J. a Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barouki, R., Melén, E., Herceg, Z., Beckers, J., Chen, J., Karagas, M., Puga, A., Xia, Y., Chadwick, L., Yan, W., Audouze, K., Slama, R., Heindel, J., Grandjean, P., Kawamoto, T., & Nohara, K. (2018). Epigenetics as a mechanism linking developmental exposures to long-term toxicity. *Environment international*, *114*, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.014>
- Baudrimont, A., Voegeli, S., Viloria, E. C., Stritt, F., Lenon, M., Wada, T., Jaquet, V., & Becskei, A. (2017). Multiplexed gene control reveals rapid mRNA turnover. *Science Advances*, *3*(7), e1700006. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700006>
- Beelen, R., Raaschou-Nielsen, O., Stafoggia, M., Andersen, Z. J., Weinmayr, G., Hoffmann, B., Wolf, K., Samoli, E., Fischer, P., Nieuwenhuijsen, M., Vineis, P., Xun, W. W., Katsouyanni, K., Dimakopoulou, K., Oudin, A., Forsberg, B., Modig, L., Havulinna, A. S., Lanki, T., Hoek, G. (2014). Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: An analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *The Lancet*, *383*(9919), 785–795. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62158-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62158-3)
- Beer, L., Seemann, R., Ristl, R., Ellinger, A., Kasiri, M. M., Mitterbauer, A., Zimmermann, M., Gabriel, C., Gyöngyösi, M., Klepetko, W., Mildner, M., & Ankersmit, H. J. (2014). High dose ionizing radiation regulates micro RNA and gene expression changes in human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-814>
- Benjamini, Y. a Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, *57*(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, Ch., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., Delano, D., Zhang, L., Schroth, G. P., Gunderson, K. L., Fan, J. B., & Shen, R. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, *98*(4), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.07.007>

- Blaszczak, R. a Cox, L. (1999). *Nitrogen oxides (NOx): Why and how they are controlled* (EPA-456/F-99-006). U.S. Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards, Information Transfer and Program Integration Division, Clean Air Technology Center.
- Blaszczyk, E. a Mielzynska-Svach, D. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *Journal of Applied Genetics*, 58(3), 321–330. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>
- Blazkova, B., Pastorkova, A., Solansky, I., Veleminsky, M., Veleminsky, M., Rossnerova, A., Honkova, K., Rossner, P., & Sram, R. J. (2020). The Impact of Cesarean and Vaginal Delivery on Results of Psychological Cognitive Test in 5 Year Old Children. *Medicina*, 56(10). <https://doi.org/10.3390/medicina56100554>
- Blazkova, B., Pastorkova, A., Solansky, I., Veleminsky, M., Veleminsky, M., Urbancova, K., Vondraskova, V., Hajslova, J., Pulkrabova, J., & Sram, R. J. (2020). Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposure on Cognitive Development in 5 Years Old Children. *Brain Sciences*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/brainsci10090619>
- Bock, K. W. a Köhle, C. (2006). Ah receptor: Dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochemical Pharmacology*, 72(4), 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.01.017>
- Bohm, B. (1974). *Znečištění ovzduší v Podkrušnohoří* (1.). Hydrometeorologický ústav Praha.
- Borjesson, A., Grundmark, B., Olaiisson, H., & Waldenlind, L. (2013). Is there a link between amyotrophic lateral sclerosis and treatment with TNF-alpha inhibitors? *Upsala Journal of Medical Sciences*, 118(3), 199–200. <https://doi.org/10.3109/03009734.2013.785999>
- Brzezina, J. (2020, říjen 9). Výjimečně nízké koncentrace suspendovaných částic a oxidů dusíku v prvních 9 měsících roku 2020. *ČHMÚ Brno*. <https://chmibrno.org/blog/2020/10/09/vyjimecne-nizke-koncentrace-suspendovanych-castic-a-oxidu-dusiku-v-prvnich-9-mesicich-roku-2020/>
- Bubnik, J. a Keder, J. (1986). Prognózní a signální systémy ochrany ovzduší v ČR. *Meteor. Zpr.*, 39, 169–171.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Cohen, A. J., Samet, J. M., Straif, K., & International Agency for Research on Cancer. (2013). *Air pollution and cancer*. International Agency for Research on Cancer. <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Scientific-Publications/Air-Pollution-And-Cancer-2013>
- Cook, J. W., Hewett, C. L., & Hieger, I. (1933). 106. The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II, and III. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 0, 395–405. <https://doi.org/10.1039/JR9330000395>
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258), 561–563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>
- Curradi, M., Izzo, A., Badaracco, G., & Landsberger, N. (2002). Molecular Mechanisms of Gene Silencing Mediated by DNA Methylation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(9), 3157–3173. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.9.3157-3173.2002>
- Český statistický úřad. (2020a). Počet obyvatel v obcích - k 1.1.2020. <https://www.czso.cz/csu/czso/pocet-obyvatel-v-obcich-k-112019>

- Český statistický úřad. (2020b). Trh práce v ČR - časové řady - 1993-2019. <https://www.czso.cz/csu/czso/trh-prace-v-cr-casove-rady-1993-2019>
- Český statistický úřad. (2014). Vývoj potratovosti v České republice—2003—2014. (b.r.). Vývoj potratovosti v České republice - 2003 - 2014. Získáno 26. listopad 2020, z <https://www.czso.cz/csu/czso/vyvoj-potratovosti-v-ceske-republice-2003-az-2014>
- Český statistický úřad. (2011). Byty podle Sčítání lidu, domů a bytů - Moravskoslezský kraj - 2011. <https://www.czso.cz/csu/czso/byty-podle-scitani-lidu-domu-a-bytu-2011-moravskoslezsky-kraj-2011-71lhzoiae8>
- ČHMÚ. (2020). ISKO limity. http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/info/limity_CZ.html
- Dejmek, J., Selevan, S. G., Benes, I., Solansky, I., & Sram, R. J. (2000). Expozice matky prachovým částicím v těhotenství a růst plodu ve dvou regionech s rozdílnou úrovní znečištěného ovzduší. *Časopis lékařů českých*, 139(6), 177–182.
- Desai, G., Chu, L., Guo, Y., Myneni, A. A., & Mu, L. (2017). Biomarkers used in studying air pollution exposure during pregnancy and perinatal outcomes: A review. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 22(6), 489–501. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2017.1339294>
- Di Stefano, A., Caramori, G., Capelli, A., Gnemmi, I., Ricciardolo, Oates, T., Donner, C. F., Chung, K. F., Barnes, P. J., & Adcock, M. (2004, červenec). *STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease*. The European Respiratory Journal; Eur Respir J. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00080303>
- Dostal, M., Pastorkova, A., Rychlik, S., Svecova, V., Rychlikova, E., & Sram, R. J. (2011). Nemocnost dětí v Ostravě 2001—2009. *Ochrana ovzduší*, 5–6, 7–9.
- Dostal, M., Pastorkova, A., Rychlik, S., Rychlikova, E., Svecova, V., Schallerova, E., & Sram, R. J. (2013). Comparison of child morbidity in regions of Ostrava, Czech Republic, with different degrees of pollution: A retrospective cohort study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 12(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-74>
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., & Trent, J. M. (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics*, 21(1 Suppl), 10–14. <https://doi.org/10.1038/4434>
- Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., Epstein, C. B., Frietze, S., Harrow, J., Kaul, R., Khatun, J., Lajoie, B. R., Landt, S. G., Lee, B.-K., Pauli, F., Rosenbloom, K. R., Sabo, P., Safi, A., Sanyal, A. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Erdogan, O. S., Tuncer, S. B., Kilic, S., Odemis, D. A., Turkcan, G. K., Celik, B., Avsar, M., & Yazici, H. (2020). Genome-wide methylation profiles in monozygotic twins with discordance for ovarian carcinoma. *Oncology Letters*, 20(6). <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12221>
- Fossati, S., Baccarelli, A., Zanobetti, A., Hoxha, M., Vokonas, P. S., Wright, R. O., & Schwartz, J. (2014). Ambient particulate air pollution and microRNAs in elderly men. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 25(1), 68–78. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000026>
- Fujii, H., Gabrielson, E., Takagaki, T., Ohtsujii, M., Ohtsujii, N., & Hino, O. (2005). Frequent down-regulation of HIVEP2 in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 91(2), 103–112. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-5779-6>
- Gantier, M. P., McCoy, C. E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A. T., Behlke, M. A., Hertzog, P. J., Mackay, F., & Williams, B. R. G. (2011). Analysis of microRNA turnover in mammalian cells

- following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Research*, 39(13), 5692–5703.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr148>
- Ghosh, R., Joad, J., Benes, I., Dostal, M., Sram, R. J., & Hertz-Picciotto, I. (2012). Ambient nitrogen oxides exposure and early childhood respiratory illnesses. *Environment International*, 39(1), 96–102.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.10.001>
- Ghosh, R., Rossner, P., Honkova, K., Dostal, M., Sram, R. J., & Hertz-Picciotto, I. (2016). Air pollution and childhood bronchitis: Interaction with xenobiotic, immune regulatory and DNA repair genes. *Environment International*, 87, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.002>
- Giguere, P. M., Billard, M. J., Laroche, G., Buckley, B. K., Timoshchenko, R. G., McGinnis, M. W., Esserman, D., Foreman, O., Liu, P., Siderovski, D. P., & Tarrant, T. K. (2013). G-protein signaling modulator-3, a gene linked to autoimmune diseases, regulates monocyte function and its deficiency protects from inflammatory arthritis. *Molecular Immunology*, 54(2), 193–198.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.12.001>
- Giguere, P. M., Gall, B. J., Ezekwe, E. A. D., Laroche, G., Buckley, B. K., Kebaier, Ch., Wilson, J. E., Ting, J. P., Siderovski, D. P., & Duncan, J. A. (2014). G Protein signaling modulator-3 inhibits the inflammasome activity of NLRP3. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(48), 33245–33257.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578393>
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl_1), D154–D158. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm952>
- Gruzieva, O., Gehring, U., Aalberse, R., Agius, R., Beelen, R., Behrendt, H., Bellander, T., Birk, M., de Jongste, J. C., Fuertes, E., Heinrich, J., Hoek, G., Klümper, C., Koppelman, G., Korek, M., Krämer, U., Lindley, S., Mölter, A., Simpson, A., ... Pershagen, G. (2014). Meta-analysis of air pollution exposure association with allergic sensitization in European birth cohorts. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(3), 767–776.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.048>
- Gruzieva, O., Xu, C.-J., Breton, C. V., Annesi-Maesano, I., Antó, J. M., Auffray, C., Ballereau, S., Bellander, T., Bousquet, J., Bustamante, M., Charles, M.-A., de Kluizenaar, Y., den Dekker, H. T., Duijts, L., Felix, J. F., Gehring, U., Guxens, M., Jaddoe, V. V. W., Jankipersadsing, S. A., ... Melén, E. (2017). Epigenome-Wide Meta-Analysis of Methylation in Children Related to Prenatal NO₂ Air Pollution Exposure. *Environmental Health Perspectives*, 125(1), 104–110. <https://doi.org/10.1289/EHP36>
- Gruzieva, O., Xu, C.-J., Yousefi, P., Relton, C., Merid, S. K., Breton, C. V., Gao, L., Volk, H. E., Feinberg, J. I., Ladd-Acosta, C., Bakulski, K., Auffray, C., Lemonnier, N., Plusquin, M., Ghantous, A., Herceg, Z., Nawrot, T. S., Pizzi, C., Richiardi, L., ... Melén, E. (2019). Prenatal Particulate Air Pollution and DNA Methylation in Newborns: An Epigenome-Wide Meta-Analysis. *Environmental Health Perspectives*, 127(5), 57012. <https://doi.org/10.1289/EHP4522>
- Gupta, R. C. (2019). *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press.
- Gutman, I. a Cyvin, S. J. (1989). *Introduction to the Theory of Benzenoid Hydrocarbons*. Springer-Verlag.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-87143-6>
- Hackett, T. L., Holloway, R., Holgate, S. T., & Warner, J. A. (2008). Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: An ex vivo study. *Respiratory Research*, 9, 47. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-47>
- Hajarnis, S., Lakhia, R., & Patel, V. (2015). MicroRNAs and Polycystic Kidney Disease. In X. Li (Ed.), *Polycystic Kidney Disease*. Codon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK373371/>
- Harada, K., Supriatno, Kawaguchi, S.-I., Tomitaro, O., Yoshida, H., & Sato, M. (2004). Overexpression of iNOS Gene Suppresses the Tumorigenicity and Metastasis of Oral Cancer Cells. *In Vivo*, 18(4), 449–455.

- Hardwick, J. P. (2015). Cytochrome P450 Function and Pharmacological Roles in Inflammation and Cancer. Preface. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 74, xv–xxxii. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(15\)00047-2](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(15)00047-2)
- Hasin, Y., Seldin, M., & Lusic, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology*, 18(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>
- He, J., Shi, T.-Y., Zhu, M.-L., Wang, M.-Y., Li, Q.-X., & Wei, Q.-Y. (2013). Associations of Lys939Gln and Ala499Val polymorphisms of the XPC gene with cancer susceptibility: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 133(8), 1765–1775. <https://doi.org/10.1002/ijc.28089>
- Herberth, G., Bauer, M., Gasch, M., Hinz, D., Röder, S., Olek, S., Kohajda, T., Rolle-Kampczyk, U., von Bergen, M., Sack, U., Borte, M., Lehmann, I., & Lifestyle and Environmental Factors and Their Influence on Newborns Allergy Risk study group. (2014). Maternal and cord blood miR-223 expression associates with prenatal tobacco smoke exposure and low regulatory T-cell numbers. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.036>
- Hew, K. M., Walker, A. I., Kohli, A., Garcia, M., Syed, A., McDonald-Hyman, C., Noth, E. M., Mann, J. K., Pratt, B., Balmes, J., Hammond, S. K., Eisen, E. A., & Nadeau, K. C. (2015). Childhood exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons is linked to epigenetic modifications and impaired systemic immunity in T cells. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 45(1), 238–248. <https://doi.org/10.1111/cea.12377>
- Hinds, W. C. (1999). *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles* (2nd edition). Wiley-Interscience.
- Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6(2), 65–70. JSTOR.
- Honardoost, M. A., Naghavian, R., Ahmadinejad, F., Hosseini, A., & Ghaedi, K. (2015). Integrative computational mRNA-miRNA interaction analyses of the autoimmune-deregulated miRNAs and well-known Th17 differentiation regulators: An attempt to discover new potential miRNAs involved in Th17 differentiation. *Gene*, 572(2), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.043>
- Honkova, K., Rossnerova, A., Pavlikova, J., Svecova, V., Klema, J., Topinka, J., Milcova, A., Libalova, H., Choi, H., Veleminsky, M., Sram, R. J., & Rossner, P. (2018). Gene expression profiling in healthy newborns from diverse localities of the Czech Republic. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59(5), 401–415. <https://doi.org/10.1002/em.22184>
- Hsu, S.-D., Lin, F.-M., Wu, W.-Y., Liang, C., Huang, W.-C., Chan, W.-L., Tsai, W.-T., Chen, G.-Z., Lee, C.-J., Chiu, C.-M., Chien, C.-H., Wu, M.-C., Huang, C.-Y., Tsou, A.-P., & Huang, H.-D. (2011). miRTarBase: A database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue), D163-169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1107>
- Huntington, J. A. (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 9 Suppl 1, 26–34. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04360.x>
- Chanyshv, M. D., Koval, O. A., Nushtaeva, A. A., & Gulyaeva, L. F. (2019). Effect of benzo[a]pyrene on the expression of miR-126, miR-190a and their target genes EGFL7, TP53INP1 and PHLPP1 in primary endometrial cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33(6), e22314. <https://doi.org/10.1002/jbt.22314>
- Chen, E. Y., Tan, Ch. M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G. Z., Clark, N. R., & Ma'ayan, A. (2013). Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*, 14(1), 128. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128>

- Chen, Z., Liu, J., Ng, H. K. T., Nadarajah, S., Kaufman, H. L., Yang, J. Y., & Deng, Y. (2011). Statistical methods on detecting differentially expressed genes for RNA-seq data. *BMC Systems Biology*, 5(Suppl 3), S1. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-S3-S1>
- Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadgil, A. R., & Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: A review. *World Journal of Surgical Oncology*, 11, 118. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>
- Choudhuri, S., Chanderbhan, R., & Mattia, A. (2018). Chapter 20 - Carcinogenesis: Mechanisms and Models*. In R. C. Gupta (Ed.), *Veterinary Toxicology (Third Edition)* (s. 339–354). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00020-9>
- Chung, K. F. a Marwick, J. A. (2010). Molecular mechanisms of oxidative stress in airways and lungs with reference to asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1203, 85–91. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05600.x>
- Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, Ch., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., Ji, H., Potash, J., Sabunciyani, S., & Feinberg, A. P. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature Genetics*, 41(2), 178–186. <https://doi.org/10.1038/ng.298>
- Izzotti, A., Calin, G. A., Arrigo, P., Steele, V. E., Croce, C. M., & De Flora, S. (2009). Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(3), 806–812. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121384>
- Izzotti, A. a Pulliero, A. (2014). The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(6), 601–627. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.01.001>
- Jiang, J., Xia, Y., Liang, Y., Yang, M., Zeng, W., & Zeng, X. (2018). MiR-190a-5p participates in the regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by targeting KLF15 and can serve as a biomarker of diagnosis and prognosis in chronic obstructive pulmonary disease complicated with pulmonary hypertension. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 13, 3777–3790. <https://doi.org/10.2147/COPD.S182504>
- Jiang, R., Jones, M. J., Sava, F., Kobor, M. S., & Carlsten, Ch. (2014). Short-term diesel exhaust inhalation in a controlled human crossover study is associated with changes in DNA methylation of circulating mononuclear cells in asthmatics. *Particle and Fibre Toxicology*, 11, 71. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0071-3>
- Jiřík, V., Machaczka, O., Miturová, H., Tomášek, I., Šlachťová, H., Janoutová, J., Velička, H., & Janout, V. (2016). Air Pollution and Potential Health Risk in Ostrava Region—A Review. *Central European Journal of Public Health*, 24 Suppl, S4–S17. <https://doi.org/10.21101/cejph.a4533>
- Jirtle, R. L. a Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 253–262. <https://doi.org/10.1038/nrg2045>
- Joubert, B. R., Håberg, S. E., Nilsen, R. M., Wang, X., Vollset, S. E., Murphy, S. K., Huang, Z., Hoyo, C., Middtun, Ø., Cupul-Uicab, L. A., Ueland, P. M., Wu, M. C., Nystad, W., Bell, D. A., Peddada, S. D., & London, S. J. (2012). 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 120(10), 1425–1431. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205412>
- Judt, T. (2018). *Poválečná Evropa—Její historie od roku 1945*. Prostor. <https://www.booktook.cz/p/povalecna-evropa-jeji-historie-od-roku-1945/>
- Kaiserová, K. a Kaiser, V. (1995). *DĚJINY MĚSTA ÚSTÍ NAD LABEM*. <https://www.usti-nad-labem.cz/dejiny/>

- Kanehisa, M. a Sato, Y. (2020). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 29(1), 28–35. <https://doi.org/10.1002/pro.3711>
- Kappil, M. a Chen, J. (2014). Environmental exposures in utero and microRNA. *Current Opinion in Pediatrics*, 26(2), 243–251. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000073>
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(9), 1304–1309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035>
- Keith, L. (2015). The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.892886>
- Khaiwal, R., Sokhi, R., & Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42, 2895–2921. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>
- Kinney, H. C. a Thach, B. T. (2009). The sudden infant death syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 361(8), 795–805. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0803836>
- Korashy, H. M. a El-Kadi, A. O. S. (2006). The role of aryl hydrocarbon receptor in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Drug Metabolism Reviews*, 38(3), 411–450. <https://doi.org/10.1080/03602530600632063>
- Koukoura, O., Sifakis, S., & Spandidos, D. A. (2012). DNA methylation in the human placenta and fetal growth (Review). *Molecular Medicine Reports*, 5(4), 883–889. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.763>
- Kratěnová, J., Žejglicová, K., & Puklová, V. (2018). Respirační onemocnění u dětí v Moravskoslezském kraji ve srovnání s výsledky celostátního monitoringu. *Hygiena*, 63(4), 116–121. <https://doi.org/10.21101/hygiena.a1633>
- Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S. L., Jagodnik, K. M., Lachmann, A., McDermott, M. G., Monteiro, C. D., Gundersen, G. W., & Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: A comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W90–W97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>
- Ladeira, C. a Smajdova, L. (2017). The use of genotoxicity biomarkers in molecular epidemiology: Applications in environmental, occupational and dietary studies. *AIMS Genetics*, 4(3), 166–191. <https://doi.org/10.3934/genet.2017.3.166>
- Lanata, C. M., Chung, S. A., & Criswell, L. A. (2018). DNA methylation 101: What is important to know about DNA methylation and its role in SLE risk and disease heterogeneity. *Lupus Science & Medicine*, 5(1), e000285. <https://doi.org/10.1136/lupus-2018-000285>
- Lao, J. Y., Xie, S. Y., Wu, C. C., Bao, L. J., Tao, S., & Zeng, E. Y. (2018). Importance of Dermal Absorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Derived from Barbecue Fumes. *Environmental Science & Technology*, 52(15), 8330–8338. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01689>
- Lee, RC., Feinbaum, RL., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Leoni, C., Pokorna, P., Hovorka, J., Masiol, M., Topinka, J., Zhao, Y., Krupal, K., Cliff, S., Mikuska, P., & Hopke, P. K. (2018). Source apportionment of aerosol particles at a European air pollution hot spot using particle number size distributions and chemical composition. *Environmental Pollution*, 234, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.097>

- Li, Ch., Peng, J., Ren, L., Gan, L., Lu, X., Liu, Q., Gu, W., & Guo, X. (2013). Roles of histone hypoacetylation in LAT expression on T cells and Th2 polarization in allergic asthma. *Journal of Translational Medicine*, 11, 26. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-26>
- Li, X., Hawkins, G. A., Ampleford, E. J., Moore, W. C., Li, H., Hastie, A. T., Howard, T. D., Boushey, H. A., Busse, W. W., Calhoun, W. J., Castro, M., Erzurum, S. C., Israel, E., Lemanske, R. F., Szefer, S. J., Wasserman, S. I., Wenzel, S. E., Peters, S. P., Meyers, D. A., & Bleeker, E. R. (2013). Genome-wide association study identifies TH1 pathway genes associated with lung function in asthmatic patients. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(2), 313-320.e15. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.051>
- Liang, T., Guo, L., & Liu, Ch. (2012, říjen 2). *Genome-Wide Analysis of mir-548 Gene Family Reveals Evolutionary and Functional Implications* [Research Article]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2012/679563>
- Libalova, H., Dostal, M., & Sram, R. J. (2011). Study of gene expression in asthmatic children living in localities with different extent of air pollution. *Ochrana ovzduší*, 5–6, 37–41.
- Lim, S. S., Vos, T., Flaxman, A. D., Danaei, G., Shibuya, K., Adair-Rohani, H., AlMazroa, M. A., Amann, M., Anderson, H. R., Andrews, K. G., Aryee, M., Atkinson, C., Bacchus, L. J., Bahalim, A. N., Balakrishnan, K., Balmes, J., Barker-Collo, S., Baxter, A., Bell, M. L., ... Ezzati, M. (2012). A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2224–2260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61766-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61766-8)
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B., & Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315–322. <https://doi.org/10.1038/nature08514>
- Liu, C., Marioni, R. E., Hedman, Å. K., Pfeiffer, L., Tsai, P.-C., Reynolds, L. M., Just, A. C., Duan, Q., Boer, C. G., Tanaka, T., Elks, C. E., Aslibekyan, S., Brody, J. A., Kühnel, B., Herder, C., Almlí, L. M., Zhi, D., Wang, Y., Huan, T., ... Levy, D. (2018). A DNA methylation biomarker of alcohol consumption. *Molecular Psychiatry*, 23(2), 422–433. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.192>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lvoneik, S., Splichalova, A., Tomaskova, H., Tomasek, I., Tvrdik, J., & Volf, J. (1998). Multilevel comparison of selected results from the CESAR/PHARE study—National results from the Czech republic—Impact of selected factors to respiratory health. *Epidemiology*, 9(4), S161.
- Markunas, Ch. A., Hancock, D. B., Xu, Z., Quach, B., Sandler, D. P., Johnson, E. O., & Taylor, J. A. (2019). Epigenome-wide analysis uncovers a blood-based DNA methylation biomarker of lifetime cannabis use. *BioRxiv*, 620641. <https://doi.org/10.1101/620641>
- Matkovich, S. J., Booven, D. J., Eschenbacher, W. H., & Dorn, G. W. (2011). RISC RNA Sequencing for Context-Specific Identification of In Vivo MicroRNA Targets. *Circulation Research*, 108(1), 18–26. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.233528>
- Melis, J. P. M., Kuiper, R. V., Zwart, E., Robinson, J., Pennings, J. L. A., van Oostrom, C. T. M., Luijten, M., & van Steeg, H. (2013). Slow accumulation of mutations in Xpc^{-/-} mice upon induction of oxidative stress. *DNA Repair*, 12(12), 1081–1086. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.08.019>

- Melis, J. P. M., Luijten, M., Mullenders, L. H. F., & van Steeg, H. (2011). The role of XPC: Implications in cancer and oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 728(3), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.07.001>
- Merid, S. K., Bustamante, M., Standl, M., Sunyer, J., Heinrich, J., Lemonnier, N., Aguilar, D., Antó, J. M., Bousquet, J., Santa-Marina, L., Lertxundi, A., Bergström, A., Kull, I., Wheelock, A. M., Koppelman, G. H., Melen, E., & Gruzieva, O. (2021). Integration of gene expression and DNA methylation identifies epigenetically controlled modules related to PM2.5 exposure. *Environment International*, 146, 106248. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106248>
- Michikawa, T., Morokuma, S., Fukushima, K., Kato, K., Nitta, H., & Yamazaki, S. (2017). Maternal exposure to air pollutants during the first trimester and foetal growth in Japanese term infants. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 230, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.069>
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.
- Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., & Gonzalez, F. J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 23847–23850. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400004200>
- Nelson, D. E., Randle, S. J., & Laman, H. (2013). Beyond ubiquitination: The atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins. *Open Biology*, 3(10), 130131. <https://doi.org/10.1098/rsob.130131>
- Nohavica vymyslel název genu proti smogu. Ostragen.* (2011). Parlamentní Listy. <http://www.parlamentnilisty.cz/zpravy/Nohavica-vymyslel-nazev-genu-proti-smogu-Ostragen-214924>
- Nwanaji-Enwerem, J. C., & Colicino, E. (2020). DNA Methylation-Based Biomarkers of Environmental Exposures for Human Population Studies. *Current Environmental Health Reports*, 7(2), 121–128. <https://doi.org/10.1007/s40572-020-00269-2>
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., & Oberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Oltra, S. S., Peña-Chilet, M., Vidal-Tomas, V., Flower, K., Martinez, M. T., Alonso, E., Burgues, O., Lluch, A., Flanagan, J. M., & Ribas, G. (2018). Methylation deregulation of miRNA promoters identifies miR124-2 as a survival biomarker in Breast Cancer in very young women. *Scientific Reports*, 8(1), 14373. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32393-3>
- Ozsolak, F. a Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: Advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews. Genetics*, 12(2), 87–98. <https://doi.org/10.1038/nrg2934>
- Perera, F., Tang, W., Herbstman, J., Tang, D., Levin, L., Miller, R., & Ho, S. (2009). Relation of DNA Methylation of 5'-CpG Island of ACSL3 to Transplacental Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Childhood Asthma. *PLOS ONE*, 4(2), e4488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004488>
- Phillips, D. H. (1983). Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature*, 303(5917), 468–472. <https://doi.org/10.1038/303468a0>
- Phillips, T. (2008). The Role of Methylation in Gene Expression. *Nature Education*, 1(1):116.
- Pidsley, R., Zotenko, E., Peters, T. J., Lawrence, M. G., Risbridger, G. P., Molloy, P., Van Djik, S., Muhlhauser, B., Stirzaker, C., & Clark, S. J. (2016). Critical evaluation of the Illumina

- MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biology*, 17. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1066-1>
- Piletic, K. a Kunej, T. (2016). MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Archives of Toxicology*, 90(10), 2405–2419. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1815-7>
- Pokorna, P., Hovorka, J., Klan, M., & Hopke, P. K. (2015). Source apportionment of size resolved particulate matter at a European air pollution hot spot. *Science of The Total Environment*, 502, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.021>
- 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. *Environmental Research*, 182, 108977. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108977>
- Pope, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287(9), 1132–1141. <https://doi.org/10.1001/jama.287.9.1132>
- Posin, C., Buckley, R. D., Clark, K., Hackney, J. D., Jones, M. P., & Patterson, J. V. (1978). Nitrogen dioxide inhalation and human blood biochemistry. *Archives of Environmental Health*, 33(6), 318–324. <https://doi.org/10.1080/00039896.1978.10667355>
- Pozzer, A., Dominici, F., Haines, A., Witt, C., Münzel, T., & Lelieveld, J. (2020). Regional and global contributions of air pollution to risk of death from COVID-19. *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa288>
- Readinger, J. A., Mueller, K. L., Venegas, A. M., Horai, R., & Schwartzberg, P. L. (2009). Tec kinases regulate T-lymphocyte development and function: New insights into the roles of Itk and Rlk/Txk. *Immunological reviews*, 228(1), 93–114. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00757.x>
- Reese, S. E., Zhao, S., Wu, M. C., Joubert, B. R., Parr, C. L., Håberg, S. E., Ueland, P. M., Nilsen, R. M., Middtun, Ø., Vollset, S. E., Peddada, S. D., Nystad, W., & London, S. J. (2017). DNA Methylation Score as a Biomarker in Newborns for Sustained Maternal Smoking during Pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 125(4), 760–766. <https://doi.org/10.1289/EHP333>
- Reinius, L. E., Acevedo, N., Joerink, M., Pershagen, G., Dahlén, S. E., Greco, D., Söderhäll, C., Scheynius, A., & Kere, J. (2012). Differential DNA Methylation in Purified Human Blood Cells: Implications for Cell Lineage and Studies on Disease Susceptibility. *PLOS ONE*, 7(7), e41361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041361>
- Reveanu, S., Arnould, L., Jolimoy, G., Hilpert, S., Lejeune, P., Saint-Giorgio, V., Belichard, C., & Jeannin, J. F. (1999). Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 79(10), 1215–1225.
- Risom, L., Møller, P., & Loft, S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research*, 592(1–2), 119–137. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012>
- Rose, M. C., & Voynow, J. A. (2006). Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiological Reviews*, 86(1), 245–278. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2005>
- Rossner, P., Tabashidze, N., Dostal, M., Novakova, Z., Chvatalova, I., Spatova, M., & Sram, R. J. (2011a). Genetic, biochemical, and environmental factors associated with pregnancy outcomes in newborns from the Czech Republic. *Environmental Health Perspectives*, 119(2), 265–271. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002470>

- Rossner, P., Uhlirova, K., Beskid, O., Rossnerova, A., Svecova, V., & Sram, R. J. (2011b). Expression of XRCC5 in peripheral blood lymphocytes is upregulated in subjects from a heavily polluted region in the Czech Republic. *Mutation Research*, 713(1–2), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.06.001>
- Rossner, P., Tulupova, E., Rossnerova, 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. *Mutation Research*, 780, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.08.001>
- Rossnerova, A., Tulupova, E., Tabashidze, N., Schmuczerova, J., Dostal, M., Rossner, P., Gmuender, H., & Sram, R. J. (2013). Factors affecting the 27K DNA methylation pattern in asthmatic and healthy children from locations with various environments. *Mutation Research*, 741–742, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.02.003>
- Rossnerova, A., Honkova, K., Pavlikova, J., Skalicka, Z., Havrankova, R., Solansky, I., Rossner, P., Sram, R., & Zölzer, F. (2016a). Mapping the factors affecting the frequency and types of micronuclei in an elderly population from Southern Bohemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 793–794. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.10.004>
- Rossnerova, A., Vrbova, K., Brzicova, T., & Rossner, P. Jr. (2016b). Effect of nanoparticles exposure on miRNA expression: A mini-review of current knowledge. In *Novel Biomaterials in Regenerative Medicine* (1. vyd.). Jan Medek, Epica.
- Rossnerova, A., Honkova, K., Pelclova, D., Zdimal, V., Hubacek, J. A., Chvojkova, I., Vrbova, K., Rossner, P., Topinka, J., Vlckova, S., Fenclova, Z., Lischkova, L., Klusackova, P., Schwarz, J., Ondracek, J., Ondrackova, L., Kostejn, M., Klema, J., & Dvorackova, S. (2020a). DNA Methylation Profiles in a Group of Workers Occupationally Exposed to Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072420>
- Rossnerova, A., Izzotti, A., Pulliero, A., Bast, A., Rattan, S. I. S., & Rossner, P. (2020b). The Molecular Mechanisms of Adaptive Response Related to Environmental Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19). <https://doi.org/10.3390/ijms21197053>
- Salim, M., Brown-Kipphut, B. A., & Maines, M. D. (2001). Human biliverdin reductase is autophosphorylated, and phosphorylation is required for bilirubin formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10929–10934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010753200>
- Samet, J. M. & Spengler, J. D. (1989). Nitrogen dioxide and respiratory infection: Pilot investigations. *Research Report (Health Effects Institute)*, 28, 1–32.
- Sandoval, J., Heyn, H., Moran, S., Serra-Musach, J., Pujana, M. A., Bibikova, M., & Esteller, M. (2011). Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*, 6(6), 692–702. <https://doi.org/10.4161/epi.6.6.16196>
- Santangelo, C., Zicari, A., Mandosi, E., Scazzocchio, B., Mari, E., Morano, S., & Masella, R. (2016). Could gestational diabetes mellitus be managed through dietary bioactive compounds? Current knowledge and future perspectives. *The British Journal of Nutrition*, 115(7), 1129–1144. <https://doi.org/10.1017/S0007114516000222>
- Sathyan, P., Golden, H. B., & Miranda, R. C. (2007). Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: Evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(32), 8546–8557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1269-07.2007>

- Sessa, R. a Hata, A. (2013). Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases. *Pulmonary Circulation*, 3(2), 315–328. <https://doi.org/10.4103/2045-8932.114758>
- Sevignani, C., Calin, G. A., Siracusa, L. D., & Croce, C. M. (2006). Mammalian microRNAs: A small world for fine-tuning gene expression. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 17(3), 189–202. <https://doi.org/10.1007/s00335-005-0066-3>
- Shi, W., de Graaf, C. A., Kinkel, S. A., Achtman, A. H., Baldwin, T., Schofield, L., Scott, H. S., Hilton, D. J., & Smyth, G. K. (2010). Estimating the proportion of microarray probes expressed in an RNA sample. *Nucleic Acids Research*, 38(7), 2168–2176. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1204>
- Shirani, F., Baghi, M., Rostamian Delavar, M., Shoaraye Nejati, A., Eshaghiyan, A., Nasr-Esfahani, M. H., Peymani, M., & Ghaedi, K. (2020). Upregulation of miR-9 and miR-193b over human Th17 cell differentiation. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 8(12). <https://doi.org/10.1002/mgg3.1538>
- Schmuczerova, J., Brdicka, R., Dostal, M., Sram, R. J., & Topinka, J. (2009). Genetic variability of HVRII mtDNA in cord blood and respiratory morbidity in children. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 666(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.03.002>
- Sima, M., Rossnerova, A., Simova, Z., & Rossner, P. (2021). The Impact of Air Pollution Exposure on the MicroRNA Machinery and Lung Cancer Development. *Journal of Personalized Medicine*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/jpm11010060>
- Slabý, O. a Svoboda, M. (2012). *MikroRNA v onkologii*. <http://www.medvik.cz/link/MED00178949>
- Smith, C. A. a Harrison, D. J. (1997). Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet (London, England)*, 350(9078), 630–633. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)08061-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)08061-0)
- Smith, M., Tourigny, M. R., Noakes, P., Thornton, C. A., Tulic, M. K., & Prescott, S. L. (2008). Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4(+)CD25(+)CD127(lo/-) regulatory T cell function. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1460–1466, 1466.e1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.03.025>
- Specjalski, K., & Jassem, E. (2019). MicroRNAs: Potential Biomarkers and Targets of Therapy in Allergic Diseases? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 67(4), 213–223. <https://doi.org/10.1007/s00005-019-00547-4>
- Sram, R. J., Benes, I., Binková, B., Dejmek, J., Horstman, D., Kotesovec, F., Otto, D., Perreault, S. D., Rubes, J., Selevan, S. G., Skalík, I., Stevens, R. K., & Lewtas, J. (1996). Teplice program—The impact of air pollution on human health. *Environmental Health Perspectives*, 104(Suppl 4), 699–714.
- Sram, R. J., Milcova, A., Pastorkova, A., Rossner, P., Rossnerova, A., Schmuczerova, J., Spatova, M., Svecova, V., & Topinka, J. (2011). European Hot Spot of Air Pollution by PM2.5 and Bap: Ostrava, Czech Republic. *Epidemiology*, 22(1), S232. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000392401.66783.9d>
- Sram, R. J., Binkova, B., Dostal, M., Merkerova-Dostalova, M., Libalova, H., Milcova, A., Rossner, P., Rossnerova, A., Schmuczerova, J., Svecova, V., Topinka, J., & Votavova, H. (2013). Health impact of air pollution to children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(5), 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.12.001>
- Sram, R. J., Rossner, P., Rossnerova, A., Dostal, M., Milcova, A., Svecova, V., Pulkrabova, J., Hajslova, J., & Velemínský, M. (2016). Impact of Air Pollution to Genome of Newborns. *Central European Journal of Public Health*, 24(Supplement), S40–S44. <https://doi.org/10.21101/cejph.a4536>

- Sram, R. J., Ambroz, A., Dostal, M., Honkova, K., Hajslova, J., Pulkrabova, J., Urbancova, K., Kosek, V., Velemínský Jr., M. (2017). The Ostrava region, Czech Republic: Impact of air pollution on children's health. *Public Health Panorama*, 03(02), 156–164.
- Sram, R.J. (2020). *Poškozené zdraví populace v Ústeckém kraji*. AVEX 5/2020 - expertní stanovisko AV ČR. <http://www.avcr.cz/opencms/export/sites/avcr.cz/cs/veda-a-vyzkum/avex/files/2020-05-AVex-Poskozene-zdravi-v-panevnicich-oblastech.pdf?fbclid=IwAR36c63yRTrDZEG1pzaaW6VCWJ-qSvaDOR6YT5jwmdgY6K9ddx3O72b9WUI>
- Steinfeld, H., Cho, M. T., Retterer, K., Person, R., Schaefer, G. B., Danylchuk, N., Malik, S., Wechsler, S. B., Wheeler, P., van Gassen, K. L. I., Terhal, P. A., Verhoeven, V. J. M., van Slegtenhorst, M., Monaghan, K. G., Henderson, L. B., & Chung, W. K. (2016). Mutations in HIVEP2 are associated with developmental delay, intellectual disability, and dysmorphic features. *Neurogenetics*, 17(3), 159–164. <https://doi.org/10.1007/s10048-016-0479-z>
- Sticht, C., Torre, C. D. L., Parveen, A., & Gretz, N. (2018). miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLOS ONE*, 13(10), e0206239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239>
- Stirzaker, C., Taberlay, P. C., Statham, A. L., & Clark, S. J. (2014). Mining cancer methylomes: Prospects and challenges. *Trends in Genetics*, 30(2), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.11.004>
- Sturm, R. (2020). Modelling the deposition of fine particulate matter (PM2.5) in the human respiratory tract. *AME Medical Journal*, 5(0), Article 0. <https://doi.org/10.21037/amj.2020.03.04>
- Su, X.-W., Yang, Y., Lv, M.-L., Li, L.-J., Dong, W., Miao-Liao, null, Gao, L.-B., Luo, H.-B., Yun-Liu, null, Cong, R.-J., Liang, W.-B., & Li, Y.-B. (2011). Association between single-nucleotide polymorphisms in pre-miRNAs and the risk of asthma in a Chinese population. *DNA and Cell Biology*, 30(11), 919–923. <https://doi.org/10.1089/dna.2010.1164>
- Subach, O. M., Maltseva, D. V., Shastry, A., Kolbanovskiy, A., Klimasauskas, S., Geacintov, N. E., & Gromova, E. S. (2007). The stereochemistry of benzo[a]pyrene-2'-deoxyguanosine adducts affects DNA methylation by SssI and HhaI DNA methyltransferases. *The FEBS Journal*, 274(8), 2121–2134. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05754.x>
- Sun, L., Cornell, T. T., LeVine, A., Berlin, A. A., Hinkovska-Galcheva, V., Fleszar, A. J., Lukacs, N. W., & Shanley, T. P. (2013). Dual role of interleukin-10 in the regulation of respiratory syncytial virus (RSV)-induced lung inflammation. *Clinical & Experimental Immunology*, 172(2), 263–279. <https://doi.org/10.1111/cei.12059>
- Syn, N. L., Teng, M. W. L., Mok, T. S. K., & Soo, R. A. (2017). De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet. Oncology*, 18(12), e731–e741. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30607-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30607-1)
- Takizawa, H., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Kohyama, T., Desaki, M., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakahara, K., Yamamoto, K., Matsushima, K., & Kudoh, S. (1999). Diesel exhaust particles induce NF-kappa B activation in human bronchial epithelial cells in vitro: Importance in cytokine transcription. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(8), 4705–4711.
- Tan, Z., Randall, G., Fan, J., Camoretti-Mercado, B., Brockman-Schneider, R., Pan, L., Solway, J., Gern, J. E., Lemanske, R. F., Nicolae, D., & Ober, C. (2007). Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *American Journal of Human Genetics*, 81(4), 829–834. <https://doi.org/10.1086/521200>
- Taysi, S., Uslu, C., Akcay, F., & Sutbeyaz, M. Y. (2003). Malondialdehyde and nitric oxide levels in the plasma of patients with advanced laryngeal cancer. *Surgery Today*, 33(9), 651–654. <https://doi.org/10.1007/s00595-002-2562-3>

- Tewari, A., & Shukla, N. P. (1991). Air pollution—Adverse effects of sulfur dioxide. *Reviews on Environmental Health*, 9(1), 39–46. <https://doi.org/10.1515/reveh.1991.9.1.39>
- Thomsen, L. L., Lawton, F. G., Knowles, R. G., Beesley, J. E., Riveros-Moreno, V., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Research*, 54(5), 1352–1354.
- Topinka, J., Rossner, P., Milcova, A., Schmuczerova, J., Svecova, V., & Sram, R. J. (2011). DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM2.5 in an acellular assay. *Toxicology Letters*, 202(3), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.02.005>
- Tost, J. (2010). DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker. *Molecular Biotechnology*, 44(1), 71–81. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9216-2>
- 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. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1155012>
- Tumolo, M. R., Panico, A., Donno, A. D., Mincarone, P., Leo, C. G., Guarino, R., Bagordo, F., Serio, F., Idolo, A., Grassi, T., & Sabina, S. (2020). The expression of microRNAs and exposure to environmental contaminants related to human health: A review. *International Journal of Environmental Health Research*, 0(0), 1–23. <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1757043>
- Urbancova, K., Dvorakova, D., Gramblicka, T., Sram, R. J., Hajslova, J., & Pulkrabova, J. (2020). Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolite concentrations in urine of mothers and their newborns. *Science of The Total Environment*, 723, 138116. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138116>
- 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. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 3886–3907. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093886>
- van Leeuwen, D. M., van Herwijnen, M. H. M., Pedersen, M., Knudsen, L. E., Kirsch-Volders, M., Sram, R. J., Staal, Y. C. M., Bajak, E., van Delft, J. H. M., & Kleinjans, J. C. S. (2006). Genome-wide differential gene expression in children exposed to air pollution in the Czech Republic. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.032>
- Verhein, K. C., McCaw, Z., Gladwell, W., Trivedi, S., Bushel, P. R., & Kleeberger, S. R. (2015). Novel Roles for Notch3 and Notch4 Receptors in Gene Expression and Susceptibility to Ozone-Induced Lung Inflammation in Mice. *Environmental Health Perspectives*, 123(8), 799–805. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408852>
- Votavova, H., Dostalova Merkerova, M., Krejcik, Z., Fejglova, K., Vasikova, A., Pastorkova, A., Tabashidze, N., Topinka, J., Balascak, I., Sram, R. J., & Brdicka, R. (2012). Deregulation of gene expression induced by environmental tobacco smoke exposure in pregnancy. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 14(9), 1073–1082. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntr325>
- Wang, J., Yu, X., Ouyang, N., Zhao, S., Yao, H., Guan, X., Tong, J., Chen, T., & Li, J. (2019). MicroRNA and mRNA Interaction Network Regulates the Malignant Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells Induced by Cigarette Smoke. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01029>

- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Weisenberger, C. D. J., & Laird, P. W. (2008). *Comprehensive DNA Methylation Analysis on the Illumina® Infinium® Assay Platform*. 4.
- Williams, A. (2008). Functional aspects of animal microRNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(4), 545–562. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7355-9>
- Williams, R., Watts, R., Hartlage, T., Phillips, L., & Lewtas, J. (1997). *Ostrava Human Exposure and Biomarker Study* (EPA-68-D50049; EPA/600/R-97/069; s. 72). US EPA.
- Wright, R. O., Schwartz, J., Wright, R. J., Bollati, V., Tarantini, L., Park, S., Hu, H., Sparrow, D., Vokonas, P., & Baccarelli, A. (2010). Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons. *Environmental Health Perspectives*, 118(6), 790–795. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901429>
- Zeilinger, S., Kühnel, B., Klopp, N., Baurecht, H., Kleinschmidt, A., Gieger, Ch., Weidinger, S., Lattka, E., Adamski, J., Peters, A., Strauch, K., Waldenberger, M., & Illig, T. (2013). Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One*, 8(5), e63812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063812>
- Žejglicová, K., Puklová, V., Kratěnová, J., Brabec, M., Malý, M., Tomek, M., Urban, F., & Kubinová, R. (2019). Prevalence alergických onemocnění a respiračních obtíží u dětí v souvislosti s kvalitou ovzduší v Moravskoslezském kraji. *Hygiena*, 64(2), 45–51. <https://doi.org/10.21101/hygiena.a1705>
- Zhao, M., Wang, L., Liang, G., Zhang, P., Deng, X., Tang, Q., Zhai, H., Chang, C. C., Su, Y., & Lu, Q. (2014). Up-regulation of microRNA-210 induces immune dysfunction via targeting FOXP3 in CD4(+) T cells of psoriasis vulgaris. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 150(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.10.009>

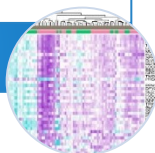
PROHLÁŠENÍ O PODÍLU ČINNOSTI NA METODÁCH A NA PŘILOŽENÝCH PUBLIKACÍCH

Prvotorský článek **Gene expression profiling in healthy newborns from diverse localities of the Czech Republic** byl podkladem pro napsání disertační práce, která byla rozšířená o dosud nepublikované výsledky metylace DNA a miRNA.

• **Honkova, Katerina**, Andrea Rossnerova, Jitka Pavlikova, Vlasta Svecova, Jiri Klema, Jan Topinka, Alena Milcova, a kol. 2018. „Gene Expression Profiling in Healthy Newborns from Diverse Localities of the Czech Republic“. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 59 (5): 401–15. <https://doi.org/10.1002/em.22184>.

- Prohlašuji, že se Kateřina Hoňková podílela na organizaci a databázování biologického materiálu z porodnic, izolovala RNA, prováděla přepis do cRNA, hybridizaci na čípech, statisticky vyhodnotila expresní data a sepsala prvoautorskou publikaci.

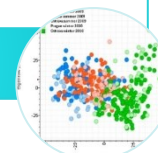
Příloha 1



• Rossner, Pavel, Elena Tulupova, Andrea Rossnerova, Helena Libalova, **Katerina Honkova**, Hans Gmuender, Anna Pastorkova, Vlasta Svecova, Jan Topinka, a Radim J. Sram. 2015. „Reduced Gene Expression Levels after Chronic Exposure to High Concentrations of Air Pollutants“. *Mutation Research* 780 (říjen): 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.08.001>.

- Prohlašuji, že z důvodu nástupu na pracoviště po konci laboratorních analýz byl podíl Kateřiny Hoňkové v konečné fázi studie, kdy se podílela na teoretické části a korekturách publikace.

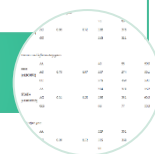
Příloha 2



• Ghosh, Rakesh, Pavel Rossner, **Katerina Honkova**, Miroslav Dostal, Radim J. Sram, a Irva Hertz-Picciotto. 2016. „Air Pollution and Childhood Bronchitis: Interaction with Xenobiotic, Immune Regulatory and DNA Repair Genes“. *Environment International* 87 (únor): 94–100.

- Prohlašuji, že se Kateřina Hoňková podílela na teoretické části a rešerši biologického významu studovaných SNPs u genů a korekturách publikace.

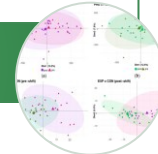
Příloha 3



• Rossnerova, Andrea, **Katerina Honkova**, Daniela Pelcova, Vladimír Zdimal, Jaroslav A. Hubacek, Irena Chvojkova, Kristyna Vrbova, a kol. 2020. „DNA Methylation Profiles in a Group of Workers Occupationally Exposed to Nanoparticles“. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072420>

- Prohlašuji, že Kateřina Hoňková zpracovávala DNA v laboratoři (bisulfidická konverze, hybridizace na čípech), statisticky vyhodnocovala data a podílela se na interpretaci výsledků.

Příloha 4



RNDr. Pavel Rössner Jr., Ph.D.

Příloha 1

Honkova Katerina, Rossnerova Andrea, Pavlikova Jitka, Svecova Vlasta,
Klema Jiri, Topinka Jan, Milcova Alena, Libalova Helena, Choi Hyunok,
Veleminsky Milos, Sram Radim J, Rossner Pavel Jr.

Gene expression profiling in healthy newborns from diverse localities of the Czech Republic

Environmental and Molecular Mutagenesis. **2018**, 59(5), 401-415

<https://doi.org/10.1002/em.22184>

John Wiley & Sons, 111 River St, Hoboken, 07030 New Jersey, USA

ISSN 0893-6692

PMID: 29602183

Příloha 2

Rossner Pavel, Tulupova Elena, Rossnerova Andrea, Libalova Helena,
Honkova Katerina, Gmuender Hans, Pastorkova Anna, Svecova Vlasta,
Topinka Jan a Sram Radim J.

Reduced Gene Expression Levels after Chronic Exposure to High Concentrations of Air Pollutants

Mutation Research. **2015**, 780, 60-70

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.08.001>

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, Nizozemí

ISSN 0027-5107

PMID: 26298100

Příloha 3

Ghosh Rakesh, Rossner Pavel, **Honkova Katerina**, Dostal Miroslav, Sram
Radim J. a Hertz-Picciotto Irva

**Air Pollution and Childhood Bronchitis: Interaction with Xenobiotic,
Immune Regulatory and DNA Repair Genes**

Environment International. **2016**, 87, 94-100

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.002>

Elsevier Ltd., The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford
OX51GB, Velká Británie

ISSN 0160-4120

PMID: 26655675

Příloha 4

Rossnerova Andrea, **Honkova Honkova**, Pelclova Daniela, Zdimal Vladimir,
Hubacek Jaroslav A., Chvojkova Irena, Vrbova Kristyna, Rossner Pavel Jr.,
Topinka Jan, Vlckova Stepanka, Fenclova Zdenka, Lischkova Lucie,
Klusackova Pavlina, Schwarz Jaroslav, Ondracek Jakub, Ondrackova Lucie,
Kostejn Martin, Klema Jiri a Dvorackova Stepanka

DNA Methylation Profiles in a Group of Workers Occupationally Exposed to Nanoparticles

International Journal of Molecular Sciences. **2020**, 21 (7), 2420.

<https://doi.org/10.3390/ijms21072420>

MDPI AG, St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Švýcarsko

ISSN 1422-0067

PMID: 32244494

Doplňková tabulka I.

Seznam odlišně metylovaných CpG míst

Doplňková tabulka II.

Seznam odlišně exprimovaných miRNA