

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Yana Bagryantseva

**VYUŽITÍ KOMETOVÉHO TESTU PŘI MĚŘENÍ INTEGRITY DNA V KLINICE
A APLIKOVANÉM VÝZKUMU**

**THE USE OF COMET ASSAY FOR MEASUREMENT OF DNA INTEGRITY
IN CLINICAL AND APPLIED RESEARCH**

Dizertační práce

Školitel: RNDr. Božena Novotná, CSc.
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Praha, 2015

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, 10. července 2015

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Boženě Novotné, CSc. za mimořádnou pomoc při vypracování této práce, odborné vedení, možnost zpracování zajímavého tématu a obětavý přístup.

Dále děkuji MUDr. Radimu J. Šrámovi, DrSc. za podporu v odborných záležitostech a poskytnutí výborných pracovních podmínek, Jolance Vaňkové za přínosnou spolupráci a také všem ostatním kolegům z Oddělení genetické ekotoxikologie ÚEM AV ČR, v.v.i. za ochotu, pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Velký vděk bych ráda vyjádřila i celé mojí rodině, která mě v této práci vždy velmi podporovala a všem přátelům, kteří mi důvěřovali.

Jednotlivé části práce byly podporovány granty:

- A. IGA MZd ČR – NR8265-3/2005 a institucionální granty VZMSM21620808, AV0Z50390512
- B. MŽP ČR – SP/1b3/08/08 a institucionální grant AV0Z50390512
- C. GA ČR – 309/08/H079, 203/09/1242,P304/12/1370 a institucionální granty AV0Z50390703, AV0Z50390512, 1M0538

Abstrakt

Jednobuněčná gelová elektroforéza neboli kometový test je metoda umožňující detekovat poškození DNA a v kombinaci s enzymy excisní opravy odhaluje i oxidační poškození DNA. V první části práce byla pomocí této metody analyzována inefektivní krvetvorba u pacientů s méně pokročilými subtypy MDS. Refrakterní anémie (RA) vykazovaly oproti kontrolám vyšší instabilitu DNA v buňkách kostní dřeně (k.d.) a rozsah fragmentace DNA koreloval s periferní cytopénií. U pacientů s RA s věnečkovými sideroblasty (RARS) však takový vztah prokázán nebyl, i když hladiny zlomů v DNA výrazně převyšovaly i hodnoty detekované u RA. Obě skupiny pacientů měly také v k.d. vysoké hladiny oxidačního poškození DNA, jeho rozsah však nekorespondoval ani s hladinami sérového ferritinu, ani s cytopénií či přidruženým zánětlivým onemocněním. Tyto výsledky naznačily, že oxidační poškození DNA sice není hlavní příčinou rozsáhlé apoptózy buněk v k.d. pacientů s MDS, nepochybně však přispívá k instabilitě genomu a progresi onemocnění.

V další části práce byl kometový test využit při analýze vlivu znečištěného ovzduší a genetických polymorfismů na poškození DNA, lipidů a proteinů řidičů městských autobusů a zaměstnanců garáží. Obě skupiny měly zvýšené hladiny DNA-SB a oxidačního poškození proteinů oproti kontrolám, zvýšená peroxidace lipidů byla zaznamenána pouze u řidičů. Výskyt oxidovaných bází v DNA koreloval s expozicí benzénu. Přítomnost alespoň jedné mutantní alely *hOGG1* (*Cys*) v genotypu zvyšovala riziko oxidačního poškození DNA, zatímco homozygoti s *XPD23* (*Gln/Gln*) byli v porovnání s nositeli standardní alely náchylnější k indukci DNA-SB. Jako hlavní příčina zvýšené oxidace proteinů a lipidů byly identifikovány karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky (k-PAU). Riziko oxidačního poškození lipidů nepříznivě ovlivňoval vyšší věk a zvýšené hladiny LDL cholesterolu, zatímco vysoké hladiny vitamínu C měly protektivní efekt.

V poslední části práce byly studovány biologické účinky různých supeparamagnetických nanočástic oxidů železa na lidské kmenové buňky k.d. získané od dvou dárců. Všechny typy nanočástic bez ohledu na jejich povrchovou úpravu indukovaly v buňkách poškození DNA a dlouhodobý oxidační stres, a to i v případech, kdy klasické testy na viabilitu a buněčnou smrt nenaznačovaly žádné škodlivé účinky. Absence akutních toxických účinků tak nezaručuje bezpečnost testovaných nanočástic pro biomedicínské aplikace.

Abstract

Single cell gel electrophoresis or comet assay combined with enzymes of excision repair is a method for measuring DNA strand breaks and oxidative damage. Using this approach we analysed ineffective hematopoiesis in patients with low-risk MDS. Refractory anemia (RA) exhibited a higher DNA instability in bone marrow cells when compared to controls and the extent of DNA fragmentation correlated with cytopenia. No similar relationship was observed in RA with ring sideroblasts (RARS), although the levels of DNA breaks markedly exceeded even the values detected in RA. Both groups of patients also showed high levels of oxidative damage to DNA. However, there was no clear relationship to the levels of serum ferritin, cytopenia or associated inflammation. This suggested that the oxidative DNA damage *per se* is not responsible for extensive apoptosis in low-risk MDS. In any case, it undoubtedly contributes to genome instability and disease progression.

The second part of thesis was aimed to the impact of air pollution and genetic polymorphisms on oxidative damage to DNA, lipids and proteins of city bus drivers and garagemen. Both groups exhibited a higher level of DNA breaks and oxidative damage to proteins than the controls, while an increased level of lipid peroxidation was detected only in bus drivers. The incidence of oxidized DNA lesions correlated with exposure to benzene. The carriers of at least one variant *hOGG1 (Cys)* allele tended to higher DNA oxidative damage than those with the wild genotype, while *XPD23 (Gln/Gln)* homozygotes were more susceptible to the induction of DNA strand breaks. Oxidative damage to lipids and proteins was associated with exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Advanced age and high levels of LDL cholesterol increased the risk of lipid peroxidation while the high levels of vitamin C had protective effect.

In the last part of thesis, the biological effects of several superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were tested using human bone marrow stem cells from two donors. Regardless of their surface coating, all types of SPIONs induced high levels of DNA damage and long term oxidative stress in cells from both donors. In contrast, the standard tests on cell viability and cell death demonstrated harmful effects of nanoparticles only in cells from one donor. Hence, the absence of acute toxic effects does not warrant the safety of nanoparticles for biomedical applications.

Obsah

	Seznam zkratek	8
1.	Úvod	10
1.1.	Kometový test	10
1.1.1.	Kometový test při hodnocení různých typů poškození DNA	12
1.1.2.	Kometový test a detekce apoptózy	14
1.1.3.	Oblasti využití kometového testu	17
1.1.4.	Nanotoxikologie a kometový test	19
1.1.5.	Klinické aplikace kometového testu	20
1.1.6.	Standardizace kometového testu – současný stav	23
1.2.	Myelodysplastické syndromy	26
1.2.1.	Klasifikace MDS	26
1.2.2.	Etiologie MDS	28
1.2.3.	Mechanismus vzniku a patogeneze MDS	29
1.2.4.	Genetické a epigenetické faktory v etiopatogenezi MDS	30
1.3.	Znečištění ovzduší a poškození DNA	34
1.4.	Magnetické nanočástice v regenerativní medicíně	37
2.	Cíle studie	39
3.	Použité metody	41
4.	Výsledky	44
5.	Diskuse souboru prací	45
5.1.	Hematologie	45
5.1.1.	Instabilita DNA u pacientů s RA a RARS	45
5.1.2.	Oxidační poškození DNA v buňkách k.d. pacientů s RA a RARS	46
5.2.	Biomonitoring	48
5.2.1.	Vliv znečištěného ovzduší a genetických polymorfismů na oxidační poškození biologických makromolekul	48
5.3.	Nanotoxikologie	53
5.3.1.	Oxidační poškození v buňkách značených různými typy magnetických nanočástic	53
6.	Závěr	58
7.	Použitá literatura	61
8.	Přílohy 1-4	77

Příloha 1:

Novotna B, Neuwirtova R, Siskova M, Bagryantseva Y: DNA instability in low-risk myelodysplastic syndromes: refractory anemia with or without ring sideroblasts. Hum Mol Genet 2008, 17:2144-2149.

Příloha 2:

Novotna B, Bagryantseva Y, Siskova M, Neuwirtova R: Oxidative DNA damage in bone marrow cells of patients with low-risk myelodysplastic syndrome. Leukemia Research 2009 33: 340-343.

Příloha 3:

Bagryantseva Y, Novotna B, Rössner P Jr, Chvatalova I, Milcova A, Svecova V, Lnenickova Z, Solansky I, Sram RJ. Oxidative damage to biological macromolecules in Prague bus drivers and garagemen: Impact of air pollution and genetic polymorphisms. Toxicol Lett 2010, 199: 60-68.

Příloha 4:

Novotna B, Jendelova P, Kapcalova M, Rössner P Jr, Turnovcova K, Bagryantseva Y, Babic M, Horak D, Sykova E. Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles. Toxicol Lett 210 (2012) 53-63

Seznam zkratek

8-oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin
15-F _{2t} -IsoP	15-F _{2t} -isoprostane	15-F _{2t} -isoprostan
A549	Human lung carcinoma cell line	Buněčná linie lidského plicního nádoru
AlkA	3-methyl adenin DNA glykosylase	3-metyl adenin DNA glykosyláza
AML	Acute myeloid leukemia	Akutní myeloidní leukémie
AP site	Apurinic/apyrimidinic site; abasic site	Apurinní/apyrimidinové místo
B[a]P	Benzo[a]pyrene	Benzo[a]pyren
BER	Base excision repair	Excizní oprava bází
BTEX	Benzene, toluene, ethylbenzen, m,p,o-xylene	Benzen, toluen, ethylbenzen, m,p,o-xylen
CMML	Chronic myelomonocytic leukemia	Chronická myelomonocytární leukémie
CYP1A1	Cytochrome P4501A1	Cytochrom P4501A1
CYP2E1	Cytochrome P4502E1	Cytochrom P4502E1
DSBs	Double-strand breaks	Dvouřetězcové zlomy
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	Imunologická metoda sloužící k detekci protilátek
Endo III	Endonuclease III	Endonukleáza III
EPHX 3,4	Epoxide hydrolase 3,4	Epoxidhydroláza 3,4
FAB	French-American-British classification system	
FISH	Fluorescence in situ hybridization	Fluorescenční hybridizace in situ
FPG	Formamidopyrimidine- DNAglycosylase	Formamidopyrimidin DNA glykosyláza
GSTM1	Glutation S Transferase M1	Glutathion-S-transferáza M1
GSTP1	Glutation S Transferase P1	Glutathion-S-transferáza P1
GSTT1	Glutation S Transferase T1	Glutathion-S-transferáza T1
hBMSCs	Human bone marrow mesenchymal stem cells	Mesenchymální kmenové bunky lidské kostní dřevě
HepG2	Human liver carcinoma cell line	Buněčná linie lidského jaterního karcinomu
K.d.	Bone marrow	Kostní dřevě
c-PAH (k-PAU)	Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons	Karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky
LMP agarose	Low melting point agarose	Agaróza s nízkým bodem tání
MDS	Myelodysplastic Syndromes	Myelodysplastické syndromy
MMS	Methyl methane sulfonate	Methyl metan sulfonát
MS	Methionine synthase	Methionin syntáza
MRI	Magnetic resonance imaging	Zobrazování magnetickou rezonancí
mtDNA	Mitochondrial DNA	Mitochondriální DNA
MTHFR	5-methyltetrahydrofolate- homocysteine methyltransferase	5-methyltetrahydrofolát-homocystein methyltransferáza
NER	Nucleotide excision repair	Excisní oprava nukleotidů
NMP agarose	Normal melting point agarose	Agaróza s normálním bodem tání
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	8-oxoguanin DNA glykosyláza
P53	Tumor protein p53	Protein regulující buněčný cyklus v odpovědi na poškození DNA
PBS	Phosphate buffered saline	Fosfátový pufr

PCR	Polymerase Chain Reaction	Polymerázová řetězová reakce
PM	Particulate Matter	Prachové částice
PM2.5	Particulate matter of diameter ≤ 2.5 μm	Aerosolové částice o průměru $\leq 2,5$ μm
RA	Refractory anemia	Refrakterní anémie
RAEB	Refractory anemia with excess of blasts	Refrakterní anémie s excesem blastů
RAEB-t	Refractory anemia with excess of blasts in transformation	Refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci
RARS	Refractory anemia with ring sideroblasts	Refrakterní anémie s věnečkovými sideroblasty
RCMD	Refractory cytopenia with multilineage dysplasia	Refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií
RCUD	Refractory cytopenia with unilineage dysplasia	Refrakterní cytopenie s monolineární dysplázií
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	Polymorfismus délky restričních fragmentů
ROS	Reactive oxygen species	Reaktivní formy kyslíku
SCGE	Single-cell gel electrophoresis	Jednobuněčná gelová elektroforéza
SPIONs	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles	Superparamagnetické nanočástice oxidů železa
SSBs	Single strand breaks	Jednořetězcové zlomy
T4 endonukleáza V	Pyrimidin dimer DNA glycosylase V	Pyrimidin dimer DNA glykosyláza V
TNF- α	Tumor necrosis factor α	Cytokin, reguluje buněčnou proliferaci, diferenciaci a smrt nádorových buněk
TGF- β	Transforming growth factor β	Rodina cytokinů regulujících dělení buňky
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand	Cytokin, způsobuje především apoptózu nádorových buněk
Tris	Trizma base	Trizma báze
TSG	Tumor suppressor gene	Tumor-supresorové geny
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick End Labeling	
UDG	Uracil DNA glycosylase	Uracil DNA glykosyláza
VOC	Volatile organic compounds	Těkavé organické látky
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace
XPD (6, 23)	Xeroderma pigmentosum D; proteins involved in NER	Xeroderma pigmentosum D; proteiny účastníci se NER
XRCC1	DNA repair protein, X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells (1)	DNA opravný protein

1. Úvod

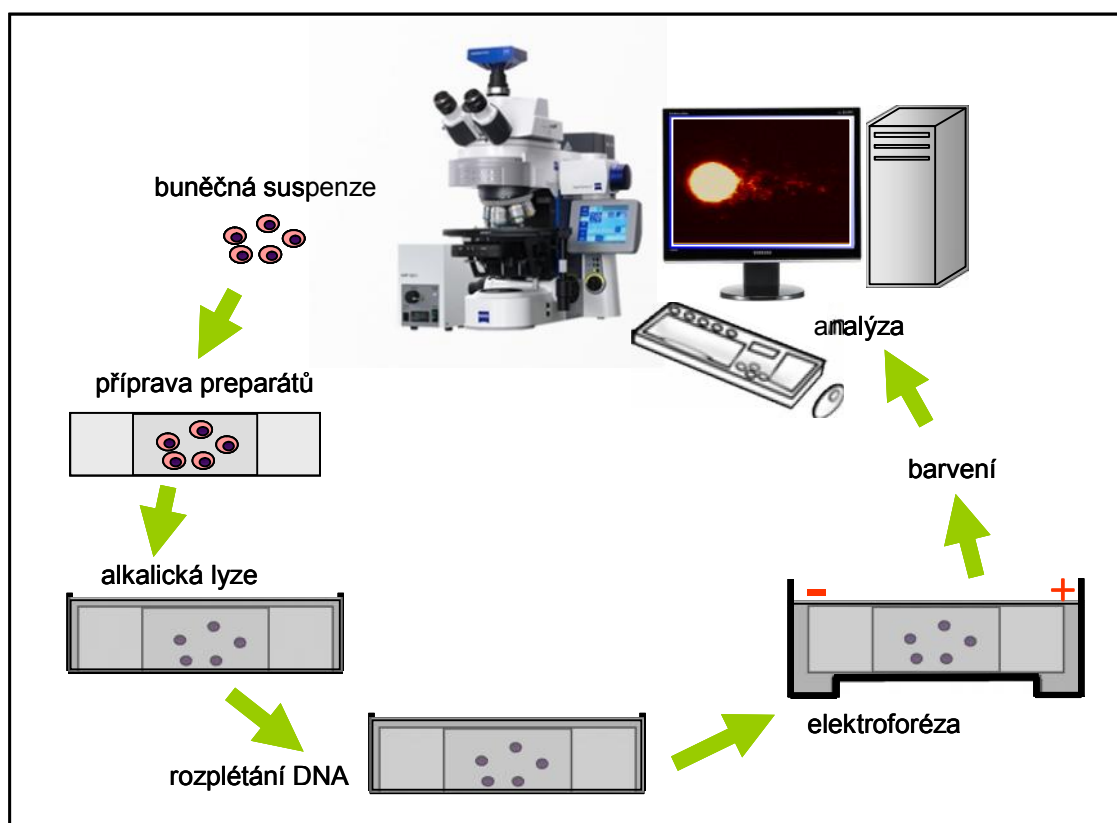
1.1. Kometový test

Jednobuněčná gelová elektroforéza (SCGE; single cell gel electrophoresis) neboli kometový test (comet assay) je metoda, která umožňuje detekovat a kvantifikovat zlomy v DNA na úrovni jednotlivých buněk. Tyto zlomy mohou vznikat v důsledku přímé interakce genotoxických látek s DNA nebo v průběhu opravy vzniklých lézí, kdy jsou poškozené báze z DNA odstraňovány. Neúspěšná nebo chybná oprava pak zpravidla vede ke spuštění apoptotického procesu, jehož exekuční fáze je rovněž charakterizována štěpením DNA na specifické fragmenty.

Uplynulo již téměř 40 lety od doby, kdy Rydberg a Johanson (1978) poprvé publikovali výsledky měření poškození DNA v jednotlivých buňkách. Postup zahrnoval nanesení buněčné suspenze v agaróze na podložní sklo, lyzi v mírně alkalickém prostředí, neutralizaci a barvení akridinovou oranží. Rozsah poškození DNA vyvolaný ozářením buněk paprsky X ještě před vlastní přípravou preparátů byl následně stanoven na základě poměru zelené (dvouvláknová DNA) a červené (jednovláknová DNA) fluorescence. O šest let později byl postup doplněn o lyzi a elektroforézu při pH 9,5, který umožnil migraci poškozené DNA k anodě v důsledku uvolnění nadšroubovice po ovlivnění buněk γ zářením (Östling a Johanson, 1984). V podstatě dnešní podobu metoda získala dalšími drobnými úpravami a zejména navýšením pH (>13) při elektroforéze (Singh et al, 1988). Jednoduchost, nepatrné nároky na množství analyzovaného materiálu (méně než 10 000 buněk ve vzorku), vysoká citlivost a nízké finanční náklady byly hlavní příčinou doslova expanzivního nárůstu oblíbenosti kometového testu v druhé polovině 90. let, zejména v oblasti genetické toxikologie, což vedlo k prvním snahám o definování určitých pravidel při aplikaci metody (Tice et al, 2000). Zhruba ve stejném období byla neutrální verze kometového testu využívána v onkologii ke stanovení hypoxické frakce determinující citlivost nádoru k terapii a ke sledování účinnosti terapie (Olive et al, 1993a; Olive 1995; Olive et al, 1996; 1999).

Princip kometového testu zjednodušeně znázorňuje Obr. 1. Buněčná suspenze rozmíchaná v agaróze je nanesena na podložní sklo a podrobena alkalické lyzi v roztoku obsahujícím Triton X-100 k odstranění buněčných a jaderných membrán, což umožňuje vyplavení všech

Obr. 1: Schéma kometového testu



rozpuštěných buněčných komponent. Další důležitou složkou lyzujícího roztoku je 2,5M NaCl, jehož přítomnost vede k odstranění histonů z DNA. V gelu pak zůstávají tělíska velikostí i tvarem připomínající jádra, která jsou označována jako nukleoidy. Odstraněním histonů je narušena nukleosomální struktura DNA. Nadšroubovicové (supercoiling) uspořádání DNA navozené ovíjením DNA kolem histonového jádra však zůstává zachováno, pokud je DNA intaktní. Model struktury nukleoidů (Cook et al, 1976) totiž předpokládá, že každá molekula DNA je v intervalech připojena k jaderné matrix (scaffold, lešení) tak, že vytváří sérii smyček, z nichž každá představuje nezávislou topologickou jednotku. Pokud je nadšroubovice v jedné smyčce uvolněna v důsledku přítomnosti zlomu, v elektrickém poli dochází k vytažení této smyčky z nukleoidu směrem ke kladné elektrodě. Čím více zlomů je v DNA přítomno, tím více smyček DNA se uvolňuje a migruje ven z nukleoidu. Vznikající objekty připomínají svým tvarem komety, kdy v hlavě komety zůstává intaktní, neporušená DNA a v ocasu komety DNA poškozená. Po obarvení vhodným barvivem pak relativní intenzita fluorescence ocasu komety odráží množství zlomů v DNA dané buňky (Collins et al, 2008; Azqueta a Collins, 2013).

Pomocí kometového testu lze analyzovat v podstatě jakýkoliv typ jaderných eukaryotických buněk, pokud jej lze získat v podobě jednotlivých buněk nebo převést do

suspenze. Metoda tak byla aplikována na buněčné kultury, krevní buňky živočišné i lidské, buňky hemolymfy měkkýšů a hmyzu, spermie, disagregované živočišné tkáně či jádra uvolněná z rostlinných tkání. Komety byly dokonce připraveny z jednotlivých chromozómů izolovaných z HeLa buněk (Cortés-Gutiérrez et al, 2011) a bakteriálního genomu (Singh et al, 1999).

1.1.1. Kometový test při hodnocení různých typů poškození DNA

Již od 90. let minulého století většina autorů při interpretaci výsledků vycházela z předpokladu, že neutrální verze kometového testu umožňuje detekci dvouřetězcových zlomů v DNA (double strand breaks, DSB), alkalická verze odhaluje i zlomy jednořetězcové (single strand breaks, SSB) a po navýšení pH nad 12,6 naměřené hodnoty zahrnují i alkalilabilní léze (Miyamae et al, 1997). Podle Collinse a kol. (2008) se jedná o mylnou představu, která pravděpodobně vznikla na základě porovnání kometového testu s dalšími metodami na měření zlomů v DNA, jako je např. alkalická eluce a alkalické rozplétání. V těchto metodách interval alkalického působení umožňuje denaturaci DNA, která začíná v místech zlomů, ať už jde o SSB nebo DSB. U alkalické eluce kusy nerozpletené DNA projdou filtrem s pravděpodobností tím větší, čím jsou menší. Přitom vysoké pH je aplikováno po relativně krátkou dobu, takže dochází jen k částečnému rozpletení DNA. Rozsah separace řetězců, a tím i rychlost eluce, tak závisí na množství DSB i SSB v DNA přítomných. Naproti tomu u neutrální verze této metody chybí denaturační krok a rychlost eluce závisí pouze na množství DSB. V případě kometového testu je však klíčovým faktorem rozhodujícím o tom, zda se segment DNA objeví spíše v ocase než hlavě komety, uvolnění nadšroubovice způsobené přítomností zlomu v konkrétní smyčce a dochází k němu bez ohledu na pH (Collins 2004; Collins et al, 2008). Olive a kol. však vypracovali odlišnou variantu neutrálního kometového testu, která zahrnuje prodloužené působení vysokých teplot (50°C). Přitom zřejmě dochází ke zborcení jaderné matrix, takže tento postup s největší pravděpodobností skutečně odráží chování DSB-DNA (Olive et al, 1993a). Při hodnocení genotoxicity je třeba si uvědomit, že poškození DNA je tvořeno převážně přechodnými lézemi a měřené hodnoty tak představují dynamický stav mezi vznikem těchto lézí a jejich odstraněním/opravou. Nejčastěji používaná alkalická verze kometového testu detekuje celou řadu různých typů poškození DNA zahrnující jedno- a dvouřetězcové zlomy v DNA, apurinní/apyrimidinová místa (AP sites), přechodné gapy objevující se při

excisní opravě DNA a v proliferujících buňkách také replikační gapy (Dušinská a Collins, 2008). Kromě zlomů jsou častým výsledkem působení genotoxických agens na DNA modifikace bází. Pro zvýšení citlivosti a specifity kometového testu jsou proto používány specifické enzymy opravných drah, vykazující aktivitu proti určitým typům lézí. Tyto enzymy jsou zpravidla aplikovány na nukleoidy po působení lyzujícího roztoku a výsledkem jejich aktivity je vznik zlomu v místě poškozené báze. Jako první byla použita endonukleáza III (Endo III) z *Escherichie coli* k průkazu oxidovaných pyrimidinů, zejména thymin glykolu a uracil glykolu (Collins et al, 1993). Formamidopyrimidin DNA glykosyláza (Fpg) rozpoznává oxidované puriny, zejména 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoGua), ale také 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPyGua) a 4,6-diamino-5-formamidopyrimidin (FaPyAde) a další puriny s otevřeným kruhem (Dušinská a Collins, 1996; Smith et al, 2006). Další pokusy však odhalily schopnost tohoto enzymu detekovat i alkylované báze (N7-methylGua) (Speit et al, 2004). K průkazu jiného typu alkylačního poškození DNA, konkrétně 3-methyl adeninu, v buňkách ovlivněných nízkými dávkami methyl metan sulfonátu (MMS) byla použita 3-methyl adenin DNA glykosyláza (AlkA). Abázická cukerná složka zbývající po odstranění poškozené báze je alkalilabilní, takže v podmínkách kometového testu se poškození projevilo jako DNA-SB (Collins et al, 2001). Větší substrátovou specifikou než Fpg vykazuje savčí analog tohoto enzymu – 8-oxoGua DNA glykosyláza (OGG1), neboť rozpoznává pouze 8-oxoGua a methyl-fapy-guanin (MeFaPyGua) (Smith et al, 2006). Chybně inkorporovaný uracil do DNA byl detekován pomocí uracil DNA glykosylázy (UDG) (Duthie a McMillan, 1997). Pyrimidinové dimery, indukované v DNA UV zářením, lze převést na zlomy působením pyrimidin dimer DNA glykosylázy (T4 endonukleáza V) (Azqueta a Collins, 2013). V případě vzniku křížových vazeb (cross-links) DNA-DNA nebo DNA-protein dochází k opačnému efektu než u DNA-SB, neboť křížové vazby brání vytažení smyček DNA se zlomy do ocasu komety. Efekt látek vyvolávajících toto poškození je proto studován na základě jejich schopnosti blokovat normální migraci DNA v buňkách ovlivněných ionizující radiací nebo jinou látkou vyvolávající DNA-SB. Čím nižší je množství detekovaných DNA-SB, tím větší množství křížových vazeb testovaná látka v DNA vyvolala (Tice et al, 1992; Jošt et al, 2015).

Ke studiu replikační integrity DNA na úrovni jednotlivých buněk byl kometový test kombinován s pulsním značením replikující DNA analogem thymidinu 5-bromo-2-deoxyuridinem (BrdU) a jeho imunologickou lokalizací v kometách pomocí anti-BrdU

protilátky (McGlynn et al, 1999). V souladu s ostatními biochemickými metodami výsledky ukázaly přítomnost diskontinuit v aktuálně replikujících doménách DNA a chemicky indukované léze a blokáda DNA polymerázy prodlužují trvání těchto diskontinuit.

Další, i když zatím poměrně málo využívanou verzí je kombinace kometového testu s fluorescenční hybridizací *in situ* (comet assay/FISH) umožňující identifikovat poškození DNA v konkrétních chromozómech, určitých oblastech DNA (centroméry, teloméry) nebo specifických genech (Santos et al, 1997; McKelvey-Martin et al, 1998; Rapp et al, 1999).

Jednoduché modifikace kometového testu umožňují měřit průběh opravy poškození DNA. Nejjednodušší postup obnáší sledování reparační kinetiky DNA-SB indukovaných radiací nebo H₂O₂. Protože v typických savčích buňkách je velké množství zlomů opravováno velmi rychle, již v průběhu půlhodiny, doporučuje se ovlivňovat buňky již nanesené v gelu na podložní sklo a expozici provádět při 4°C. Jeden preparát je ihned po ovlivnění přenesen do lyzujícího roztoku, ostatní jsou umístěny do 37°C a v pravidelných intervalech přenášeny do lyzujícího roztoku. Ke studiu excisní opravy oxidovaných bází (base excision repair, BER) je třeba postup doplnit specifickými enzymy (Collins 2009). Vhodným agens indukujícím převážně 8-oxoGua je např. viditelné světlo za přítomnosti „fotosenzitizéru“ Ro-8023 (Collins a Horvathova, 2001). Excisní oprava nukleotidů (NER) je proces opravující léze narušující dvoušroubovici. Zatímco opravu dimerů pyrimidinů probíhající tímto mechanismem lze studovat pomocí T4 endonukleázy V, pro sledování opravy velkých aduktů zatím není k dispozici vhodný enzym (Azqueta a Collins, 2013). Podobně při studiu opravy křížových vazeb v DNA buněk ovlivněných nejprve látkou vyvolávající toto poškození a následně ozářených nebo podrobených působení H₂O₂ před vlastním provedením kometového testu, zvyšující se %Tail DNA v čase naznačuje postupnou opravu křížových vazeb (Spanswick et al, 2010; Jošt et al, 2015).

1.1.2. Kometový test a detekce apoptózy

Apoptóza představuje specifickou cestu programované buněčné smrti, ostře ohraničenou nejen od patologické nekrózy spojené se zánětem, ale i od jiných forem destrukce buňky. Z biologického hlediska se jedná o velmi významný proces, neboť se uplatňuje v průběhu celé ontogeneze při odstraňování nadpočetných, poškozených či přestárých buněk a jako protipól proliferace přispívá v organismu k udržení tkáňové homeostáze. Terminální fáze apoptózy jsou charakterizovány fragmentací DNA, která probíhá ve dvou fázích. Během tzv.

„doménové“ fragmentace je genom štěpen v místech přichycení chromatinových klíčků k jaderné matrix na fragmenty o velikosti 200-300 kb a posléze 30-50 kb. Působením nukleáz je následně DNA fragmentována na úseky čítající kolem 180 párů bazí a jejich násobky (Willie et al, 1980; Darzynkiewicz et al, 1992). Vzniká tak otázka, do jaké míry mohou být výsledky testování genotoxicity kometovým testem zkrusleny apoptotickou fragmentací DNA.

Již v roce 1993 bylo zjištěno, že kometový test je schopen detekovat apoptotické buňky a v porovnání s klasickým barvením buněk Hoechstem 333 42 je dokonce citlivější (Olive et al, 1993b). Posléze bylo publikováno, že alkalická verze kometového testu zachycuje i buňky nekrotické, zatímco neutrální verze se zdála být specifitější pro buňky apoptotické a navíc byla schopna tyto buňky odhalit dříve než průtoková cytometrie nebo klasická elektroforéza, při které oligonukleotidy a jejich násobky vytvářejí v gelu charakteristický žebříček (ladder) (Fairbairn a O'Neill, 1996). Někteří autoři se však domnívali, že vzhledem ke své vysoké citlivosti není kometový test schopen vysoce fragmentovanou DNA apoptotických buněk detekovat (Peddie et al, 1997). Proto byla citlivost kometového testu porovnávána s tradičními metodami využívanými k detekci apoptózy. Jednalo se především o metodu TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) a značení buněk FITC-konjugátem annexinu V, které identifikuje translokovaný fosfatidylserin na vnější straně buněčné membrány jako marker časně apoptózy. V buňkách CHOK 1 odhalil kometový test apoptózu vyvolanou stauroporinem později než annexin V, ale dříve než TUNEL. Buňky v pozdních stádiích apoptózy charakterizované simultánním značením annexinem V a propidium jodidem však kometový test, na rozdíl od metody TUNEL, nedetekoval (Goddard et al, 1999). Na základě představy, že malé fragmenty DNA jsou během elektroforézy „vyředěny“ v gelu, byla metoda kometového testu modifikována vyřazením elektroforézy. Tato verze, tzv. „halo assay“, pak vykazovala vysokou citlivost i při detekci pozdních stádií apoptózy (Singh 2000).

Originálním způsobem porovnali kometový a annexinový test Bacsó a kol (2000). Na preparátu nejprve v živých buňkách značených annexinem V identifikovali apoptotické buňky a zaznamenali jejich souřadnice. Následně byly preparáty podrobeny alkalické lyzi a elektroforéze a ve stejných buňkách byl měřen stupeň fragmentace DNA. Buňky značené pouze annexinem V a nikoliv propidium jodidem měly silně fragmentovanou DNA a po aplikaci kometového testu vytvářely komety charakteristického tvaru označované jako

„hedgehogs“, tj. komety s minimálním množstvím DNA v hlavě (<20%). Řada autorů byla proto přesvědčena, že „hedgehogs“ představují apoptotické buňky a někteří se dokonce domnívali, že takové buňky by měly být při hodnocení genotoxických účinků vyřazeny (Hartmann a Speit, 1997).

Arsenit sodný (NaAsO_2) může vyvolávat jak genotoxické účinky, tak apoptózu. Buňky myšího lymfomu L5178Y byly inkubovány s touto látkou a ve 30 min. intervalech byl pomocí kometového testu sledován výskyt buněk s různým stupněm fragmentace DNA. V paralelních kulturách byla analyzována apoptóza pomocí značení annexinem V a průtokovou cytometrií a na preparátech byly apoptotické buňky vizualizovány barvením Hoechstem 333 42. Již po první půlhodině byl detekován zvýšený počet annexin V- pozitivních buněk oproti kontrole, zatímco v kometovém testu se buňky s mírnou fragmentací DNA objevily až v následujícím intervalu. Za dalších 30 min. pak byly na preparátech pozorovány vedle středně velkých komet i „hedgehogs“. Barvení Hoechstem 333 42 prokazovalo přítomnost apoptotických buněk až v intervalech > 120 min. Autoři experimentu proto uzavřeli, že i středně velké komety objevující se až po značení buněk annexinem V odrážejí apoptotické štěpení DNA a nikoliv genotoxické poškození. Samotné použití kometového testu by tak mohlo vést k mylnému považování účinků za genotoxické i po vyřazení „hedgehogs“ (Brink et al, 2006). K podobným závěrům vedly i experimenty s buňkami linie Jurkat, ve kterých byla indukována apoptóza protilátkou proti antigenu Fas (Choucroun et al, 2001). Po provedení kometového testu byly v kulturách pozorovány vedle klasických „hedgehogs“ i středně velké komety, kterých bylo daleko více a vzhledem se velmi podobaly kometám vznikajícím po působení genotoxických látek.

Na druhé straně pokusy s peroxidem vodíku prokázaly, že i buňky s extrémně vysokým stupněm fragmentace DNA nemusí být umírající (Lorenzo et al, 2013). HeLa buňky byly nejprve nanесeny v agaróze na podložní sklo a pak krátce ovlivněny nízkou dávkou H_2O_2 při 4°C. Po promytí v PBS byl jeden preparát přenesen do lyzujícího roztoku, zatímco další, stejně ovlivněné preparáty byly ponořeny do kultivačního média a po 15, 30 a 45 min. inkubace při 37°C byly postupně přenášeny do lyzujícího roztoku. Ačkoliv po ovlivnění buňky vykazovaly v průměru kolem 80% tail DNA, rozsah poškození DNA dramaticky klesal s prodlužující se inkubací v médiu a po 45 min. dosáhl kontrolní úrovně. Počet buněk v gelu se přitom nezměnil, což potvrdilo, že pokles poškození DNA bylo výsledkem jeho opravy a nikoliv ztráty poškozených apoptotických buněk.

Lze tedy shrnout, že podle morfologie komet nelze odlišit genotoxický efekt od apoptotické fragmentace DNA. Středně velké komety i komety typu „hedgehogs“ mohou odrážet jak různý stupeň poškození DNA, tak různé fáze apoptotického štěpení DNA. Terminální fáze apoptózy již není možné kometovým testem zachytit.

1.1.3. Oblasti využití kometového testu

V současné době je kometový test využíván zejména v genotoxikologii, především při testování nových léků, kosmetických přípravků a dalších chemikálií s potenciálně karcinogenním účinkem. Tyto testy lze provádět *in vivo*, kdy jsou analyzovány buňky různých tkání experimentálních zvířat, i *in vitro*, s využitím periferních leukocytů nebo vhodných buněčných linií. Jako příklad testování léků lze uvést studii genotoxických účinků preparátu Glucantime (derivát antimonu), tradičně používaného k léčbě leishmaniózy. Analýza makrofágů peritoneálního exudátu a leukocytů periferní krve po intraperitoneální aplikaci preparátu myším linie Swiss prokázala signifikantní poškození DNA oproti kontrolám, i když lidské leukocyty ovlivněné *in vitro* genotoxický potenciál Glucantimu nenaznačovaly. Autoři proto Glucantime charakterizovali jako promutagenní látku, která v podmínkách *in vivo* indukuje poškození DNA v důsledku redukce pětimocného antimonu na jeho toxičtější trojmocnou formu (Lima et al, 2010).

V podstatě stejné, ne-li větší oblibě se těší kometový test v lidském biomonitoringu při hodnocení rizika poškození DNA po profesionální nebo environmentální expozici škodlivým látkám. V tomto případě jsou kometovým testem vyšetřovány biologické vzorky (nejčastěji periferní leukocyty) odebrané jedincům žijícím ve znečištěných oblastech či pracujícím v rizikových provozech a výsledky jsou porovnávány s hladinami poškození DNA zjištěnými u kontrolních osob s cílem identifikovat a minimalizovat rizikové faktory. V továrně na výrobu polyakrylu v Íránu, kde jsou pracovníci dlouhodobě vystaveni organickým rozpouštědlům (toluén, chloroform), benzénu, akrylonitrilu, ale také arzenu a chromu (tedy látkám s prokázaným genotoxickým potenciálem), byl detekován zvýšený výskyt zlomů v DNA leukocytů u dělníků pracujících v pěti různých provozech (výroba polyesteru, dvě linky na výrobu polyakrylu, elektrárna a údržba) oproti kontrolní skupině úředníků ze stejné továrny. Vysoké hladiny poškození DNA vykazovali zejména dělníci z výroby polyesteru a toto poškození bylo ještě vyšší, pokud se jednalo o kuřáky. Nejvíce

však byly ohroženi jedinci pracující souběžně v údržbě a některé z výrobních linek (Etebari et al, 2014).

Alternativním přístupem může být testování škodlivých účinků látek znečišťujících určité prostředí na vhodných buněčných liniích v podmínkách *in vitro*. V pěti průmyslových zónách v Indii (cementárna, chemička, tepelná elektrárna, ocelárna, železárna) byly sbírány polévaté prachové částice (particulate matter, PM) a analyzovány z hlediska jejich velikosti, obsahu kovů a polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU). Genotoxický potenciál vzorků PM a jejich organické složky byl následně testován na linii lidského plicního nádoru (A549) a lidského jaterního karcinomu (HepG2). V podstatě všechny vzorky PM ve vysokých dávkách poškozovaly DNA. Při porovnání vzorků odebraných v nižších a vyšších patrech ovzduší daných lokalit, nejvyšší hladiny zlomů v DNA (DNA-SB) indukovaly vzorky z nižšího patra ovzduší u železárně a ocelárny, které byly současně charakterizovány vysokým obsahem PAU a těžkých kovů. Předchozí ovlivnění buněk linie A549 vitamínem C nebo quercetinem výrazně snižovalo poškození DNA vyvolané testovanými vzorky PM (Senthilkumar et al, 2014).

Kometový test je také často využíván při studiu vlivu určitých onemocnění na kvalitu DNA, při výzkumu individuální variability např. v kapacitě opravných mechanismů DNA nebo při monitorování změn vyvolaných dietními zásahy, např. podáváním antioxidantů. Pomocí této metody tak byla ověřována schopnost extraktu z jablečného odpadu příznivě ovlivňovat klíčové fáze kolorektální karcinogeneze (McCann et al, 2007). Studie na buněčných liniích odvozených z nádorů tlustého střeva prokázala, že fenolové sloučeniny přítomné v extraktu v podmínkách *in vitro* snižovaly poškození DNA buněk (marker iniciace nádoru), zlepšovaly funkci střevní bariéry (marker propagace nádoru) a inhibovaly invazivitu (marker metastatického potenciálu nádoru).

Další velkou oblastí využití kometového testu je ekogenotoxikologie, kde je sledován vliv faktorů životního prostředí na genetický materiál divoce žijících organismů, popř. jsou monitorovány změny v hladinách poškození DNA v souvislosti se změnami ekologických podmínek (Møller, 2005). Při testování kontaminace vodních ploch jsou jako indikátorové organismy využívány perloočky (*Daphnia magna*), slávka jedlá (*Mytilus edulis*), sladkovodní hlemýžď (*Lymnaea luteola* L), kapr obecný (*Cyprinus carpio*), apod. (Wilson et al, 1998; García-Medina et al, 2011; Ali et al, 2012; Pellegrini et al, 2014). Ze suchozemských

živočichů byly použity např. tarbíkomyš (*Dipodomys merriami*) nebo žížaly (Rajaguru et al, 2003; Reinecke a Reinecke, 2004; Espinosa-Reyes et al, 2010).

1.1.4. Nanotoxikologie a kometový test

Obecně jsou nanočástice definovány jako struktury, které alespoň v jednom rozměru mají méně než 100 μm (Kroll et al, 2009). Uměle konstruované nanočástice (engineered nanoparticles) se vyznačují řadou potenciálně užitečných vlastností a proto jsou dnes nanotechnologie považovány za technologie budoucnosti v celé řadě oborů, včetně farmakologie a medicíny. S postupující komercializací nanotechnologických produktů dramaticky narůstá i expozice lidské populace nanočásticím. S tím vyvstává i akutní potřeba hodnocení jejich toxického potenciálu (Landsiedel et al, 2010). Pozornost je věnována také genotoxickým účinkům (Dusinska et al, 2009; Kroll et al, 2009; Soenen et al, 2011).

V nedávné době byly identifikovány primární a sekundární mechanismy toxicity nanočástic, přičemž primární účinky lze dále dělit na přímé a nepřímé (Donaldson et al, 2010; Magdolenova et al, 2014). Primární genotoxicita nanočástic souvisí s indukcí genetického poškození při absenci zánětu (Schins a Knaapen, 2007). Za přímou primární genotoxicitu jsou zodpovědné mechanismy zahrnující přímou interakci nanočástic s genomovou DNA nebo asociovanými komponentami (enzymy opravných mechanismů DNA), které zajišťují integritu DNA. Alternativně může být poškození těchto mechanismů zprostředkováno atakem oxidantů přítomných na povrchu nanočástic (Fubini 1998). Přímá genotoxicita nanočástic se ale může realizovat i v různých fázích buněčného dělení na základě chemické nebo fyzikální interference s procesy jako je např. segregace chromozómů v průběhu mitózy (Gonzales et al, 2008).

Nepřímá primární genotoxicita může být vyvolána zvýšenou produkcí ROS buněčnými složkami (mitochondrie a NADPH oxidázy vázané na membránách) v důsledku jejich interakce s nanočásticemi a/nebo vyčerpání antioxidantů (např. glutathionu) v buňce. Zvýšená endogenní produkce reaktivních radikálů nebo narušená antioxidační obrana pak vede k oxidačnímu stresu a následné indukci oxidačního poškození DNA (Donaldson et al, 2010).

Sekundární genotoxicita nanočástic je řízena zánětlivými buňkami, především makrofágy a polymorfonukleárními neutrofilními leukocyty, které migrují k místům uložení nanočástic

v rámci přirozené zánětlivé odpovědi spojené s tvorbou ROS. Dlouhodobý oxidační stres spojený s chronickým zánětem může vést k akumulaci genetického poškození a následné maligní transformaci buňky (Azad et al, 2008).

Hlavním problémem při testování škodlivých účinků nanočástic představují jejich specifické vlastnosti, tj. extrémně malý rozměr díky kterému snadno pronikají nejen do buněk, ale i do jádra a mitochondrií, a extrémně velký povrch. Ukázalo se, že díky těmto vlastnostem mohou nanočástice interferovat s testy založenými na spektrofotometrii a spektrofluorometrii. Nanočástice se totiž mohou vázat na proteiny a barviva, které jsou součástí těchto testů a vyvolávat změny v aktivitě enzymů, fluorescenci a/nebo absorbančních charakteristikách indikátorových molekul (Ong et al, 2014). To by mohlo negativně ovlivňovat i výsledky detekce oxidačního poškození DNA pomocí specifických enzymů. V kometovém testu však přítomnost nanočástic v agaróze neměla žádný efekt na schopnost Fpg rozpoznávat oxidované báze (Magdolenova et al, 2012). Následující podrobná analýza vyloučila riziko vzniku arteficiálního poškození DNA při testování genotoxicity nanočástic touto metodou, pokud je dodržen standardní protokol (Karlsson et al, 2015). Studie navíc prokázala značnou shodu ve výsledcích získaných kometovým testem a mikronukleus testem při testování genotoxicity různých typů nanočástic.

1.1.5. Klinické aplikace kometového testu

Zvýšené hladiny poškození DNA a neefektivní opravné mechanismy hrají důležitou roli v patogenezi celé řady život ohrožujících onemocnění jako jsou nádory a degenerativní choroby. Zdroje poškození DNA mohou být exogenního i endogenního původu. Endogenní původci poškození DNA vznikají intracelulárně v průběhu normálních metabolických procesů, ale také patologicky (např. při zánětu) jako následek nerovnováhy mezi oxidanty a antioxidanty, který vede ke zvýšené produkci reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species, ROS). Nejnovější výsledky naznačují, že některé typy nádorových buněk mohou mít dokonce zvýšenou kapacitu opravných mechanismů, což způsobuje jejich resistenci k terapeutickým preparátům a selhání léčby (Gunasekara et al, 2015).

Velkou výhodou kometového testu při klinických aplikacích jsou nejen nízké nároky na množství analyzovaného materiálu, ale také možnost využít celou škálu buněčných typů. Zdrojem materiálu pro vyšetření bývají zpravidla leukocyty periferní krve, buňky z bukalní a nosní sliznice, epitelální buňky slzných kanálků, spermie, ale také tkáňové aspiráty, popř.

výplachy, výškraby a výpotky. Dostatečný počet buněk lze vesměs získat neinvazivním způsobem, např. stěrem sliznic, „fine needle“ biopsií u solidních tkání, punkcí kostní dřeně apod. (Novotná et al, 2001; Gunasekarana et al, 2015).

Již v 90. letech minulého století lze zaznamenat snahy o využití kometového testu při studiu a léčbě nádorových onemocnění. V solidních nádorech jsou okysličené buňky citlivější k radiační terapii než buňky hypoxické. Kometový test byl proto využit ke stanovení proporce hypoxických buněk v nádoru ve snaze určit optimální terapeutické dávky záření (Olive et al, 1993a; Olive et al, 1996). Další variantou bylo monitorování poškození DNA u onkologických pacientů v průběhu léčby k posouzení efektivity terapie či doporučení změn individuálního terapeutického režimu podle aktuálního stavu pacienta nebo testování různých terapeutických preparátů na vhodných lidských nádorových liniích s cílem vybrat ten nejúčinnější, popř. nejvhodnější kombinaci účinných látek (Muller et al, 1997; Alapetite et al, 1999; Zoli et al, 2004; Guan et al. 2006; McKenna et al, 2008). Dále bylo zjištěno, že hladina poškození DNA v lymfocytech neléčených pacientů s různými typy nádorů je vyšší v porovnání se zdravými osobami (Vaghef et al, 1997; Smith et al, 2003; Lin et al, 2007; Lou et al, 2007). Jiné práce prokázaly vyšší poškození DNA i v lymfocytech zatím zdravých příbuzných pacientek s rakovinou prsu (Rajeswari 1995; Rajeswari et al, 2000). V souvislosti s možností vyhledávání jedinců s predispozicí ke kancerogenezi je u onkologických pacientů pomocí kometového testu studována i účinnost opravných mechanismů DNA (Rajae-Bebahani et al, 2001; Smith et al, 2003; Lou et al, 2007; Herrero et al, 2015, atd.), popř. jsou tito jedinci identifikováni ve zdravé populaci na základě analýzy asociací mezi genetickým polymorfismem v genech kódujících opravné enzymy a účinností opravy radiačního a oxidačního poškození DNA (Vodička et al, 2007). V neposlední řadě je metoda často využívána při studiu vlivu různých dietních faktorů na vznik genotoxického poškození a karcinogenezi (Wasson et al, 2008).

Chromozomální instabilita a vysoké riziko maligního zvratu patří k charakteristickým znakům některých dědičných onemocnění podmíněných defektem opravných mechanismů DNA (např. Bloomův syndrom, Fanconiho anémie, Ataxia teleangiectatica, apod.). Kometový test byl již použit při studiu defektu opravy DNA u těchto pacientů a k prenatalní diagnostice postižených jedinců (Alapetite et al, 1997; Djuzenova et al, 2001). Kometový test se také osvědčil jako vhodná metoda k detekci oxidačního poškození u pacientů s některými chronickými a neurodegenerativními onemocněními jako jsou

diabetes mellitus, rheumatoidní artritída, Alzheimerova a Parkinsonova choroba. Experimenty prokázaly u těchto pacientů zvýšenou citlivost k působení reaktivních volných radikálů a nižší účinnost opravných mechanismů (pro přehled viz: Collins et al, 2014). Detailně byli studováni i pacienti s Fabryho nemocí (FD), což je vrozená porucha metabolismu glykosfingolipidů vázaná na chromozóm X (Biancini et al, 2015). Absence nebo snížená aktivita α -galaktosidázy A v důsledku mutace v kódujícím genu vede u pacientů k progresivní akumulaci substrátů tohoto enzymu v lysosómech různých buněčných typů a tělních tekutinách. Kromě toho pacienti vykazují vysoké hladiny oxidačního poškození proteinů a lipidů, provázené sníženou antioxidační obranou a vyššími hladinami pro-zánětlivých cytokinů (Biancini et al, 2012). Pomocí kometového testu byly u pacientů detekovány vysoké hladiny DNA-SB a oxidovaných purinů přesto, že opravné mechanismy DNA byly aktivovány díky chronické expozici volným radikálům (Biancini et al, 2015).

Velký ohlas z hlediska klinických aplikací získal kometový test také v oblasti reprodukční medicíny při hodnocení integrity DNA ve spermiích. Poměrně značné procento mužů má totiž problémy s fertilitou, i když standartní vyšetření jejich spermií podle doporučení Světové zdravotnické organizace (tj. koncentrace, motilita a morfologie) vykazuje normální nebo jen lehce abnormální hodnoty. Tyto případy tzv. idiopathických infertilit mají v porovnání s fertilními muži zvýšené hladiny ROS v ejakulátu, nižší antioxidační potenciál a narušenou integritu chromatinu (Pasqualotto et al, 2001; Bungum et al, 2011). Navíc bylo prokázáno, že snížená integrita DNA ve spermiích snižuje úspěšnost fertilizace a normálního vývoje zárodku (Benchaib et al, 2007; Collins JA et al, 2008). Vysoká fragmentace DNA ve spermiích byla popsána i u pacientů s varikokélou (Peluso et al, 2013), leukocytospermií (Alvarez et al, 2002) a některými typy malignit jako jsou testikulární nádory, Hodgkinova nemoc a non-hodgkinské lymfomy (Kobayashi et al, 2001). Rizikovým faktorem poškozujícím integritu DNA spermií může být i vyšší věk (Singh et al, 2003; Rybar et al, 2011) a sezónní expozice silně znečištěnému ovzduší (Rubes et al, 2005). Ve snaze zpřesnit diagnostiku neplodnosti a zlepšit výsledky technik asistované reprodukce je proto v současné době patrná snaha vyšetřovat spermie nejen standardními postupy, ale také metodami umožňujícími detekovat poškození struktury chromatinu a/nebo DNA (Singh a Agarwal, 2011; Evgeni et al, 2014). Často je přitom doporučován kometový test (Gunasekarana et al, 2015) pro svoji vysokou citlivost v porovnání s dalšími

metodami jako je TUNEL, HALO assay a průtoková cytometrie (Evenson et al, 2007; Lewis a Agbaje 2008; Simon et al, 2014).

1.1.6. Standardizace kometového testu – současný stav

Podle současné bibliometrické studie bylo v období 1990 – 2013 publikováno kolem 7 670 studií využívajících kometový test od autorů ze 78 zemí (Neri et al, 2015). Přesto tato metoda dosud není součástí oficiální baterie testů na genotoxicitu a rutinně není využívána ani v klinických oborech. Přitom již v roce 1999 vypracoval tým expertů v rámci mezinárodního workshopu zaměřeného na testy genotoxicity (International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, IWGTP) protokol pro jednobuněčnou gelovou elektroforézu *in vitro* a *in vivo* podle doporučení Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD). Jako optimální metoda pro testování genotoxicity byla doporučena alkalická verze kometového testu podle Singha a spolupracovníků z roku 1988 (Tice et al, 2000).

S cílem minimalizovat variabilitu v rámci experimentů bylo belgickou skupinou navrženo hodnotit v každé elektroforéze současně s testovaným materiálem i definovaný interní standard a kalibrovat výsledky měření z jednotlivých elektroforéz proti tomuto internímu standardu. Jako nejvhodnější parametr k vyjádření detekovaného poškození DNA bylo doporučeno procento DNA v ocasu (%Tail DNA), neboť variabilita tohoto parametru mezi jednotlivými elektroforézami i hodnotiteli byla výrazně nižší v porovnání s měřením délky ocasu (De Boeck et al, 2000).

V r. 1997 byla v Evropě ustanovena komise pro standardizaci detekce oxidačního poškození DNA (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage, ESCODD), jejímž cílem bylo validovat metody pro stanovení tohoto poškození a dosáhnout konsensu ohledně skutečných bazálních hladin oxidačního poškození ve zdravých lidských buňkách. Jak enzymatická detekce (kometový test s Fpg), tak chromatografické metody vykazovaly obdobnou účinnost při detekci oxidačního poškození DNA (tj. stejný sklon křivky vyjadřující závislost odpovědi na dávce), pomocí HPLC však byly naměřeny výrazně vyšší bazální hladiny poškození, zřejmě v důsledku arteficiálního poškození DNA v průběhu zpracování materiálu (ESCODD et al, 2005).

Na identifikaci příčin variability ve výsledcích kometového testu při detekci SB-DNA a oxidačního poškození se zaměřila evropská skupina pro validaci kometového testu (European Comet Assay Validation Group, ECVAG) (Møller et al, 2010). Větší rozdíly ve

výsledcích byly zaznamenány mezi jednotlivými laboratořemi než v rámci těchto laboratoří (Ersson et al, 2013). Jako kritické faktory ovlivňující výsledky kometového testu byly identifikovány koncentrace agarózy, délka alkalického rozplétání DNA a podmínky elektroforézy (napětí, délka a teplota); při analýze oxidačního poškození hraje důležitou roli i koncentrace a délka působení enzymů (Ersson a Møller 2011; Azqueta et al, 2011). Při hodnocení komet může k variabilitě naměřených hodnot přispívat volba fluorescenčního barviva, typ a výbava fluorescenčního mikroskopu, stárnutí UV lampy a nastavení prahování při hodnocení komet obrazovou analýzou (Ersson et al, 2013). Dále se řešila otázka vhodných statistických metod při hodnocení výsledků (Lovel a Omori, 2008) a používání „skutečného“ interního standardu, neboť výsledky ovlivňuje i poloha gelu v rámci téže elektroforézy (Zainol et al, 2009). Kritické analýze byl podroben i způsob vyjadřování výsledků kometového testu (Møller et al, 2014).

V centru pozornosti je dále snaha zvýšit výkonnost kometového testu zejména pro potřeby biomonitoringu. Je to sice relativně jednoduchá a levná metoda pokud se jedná o chemikálie a vybavení, je však časově náročná, neboť je limitována počtem vzorků, které je možné zpracovat v jednom experimentu. Ve snaze překonat tento problém je v současné době rozpracováno několik postupů kombinujících více gelů na jedné platformě (vícejamkové destičky, „GelBond film“, velká podložní skla) se zmenšováním objemu gelu pro jeden vzorek (Azqueta et al, 2013; Gutzkow et al, 2013; Ge et al, 2014). Dalším limitujícím faktorem je časově náročné hodnocení velkého množství vzorků. Sice již existují komerční plně automatizované systémy pro kometový test, zatím ale nejsou příliš efektivní, protože výsledky automatického měření je nutné manuálně kontrolovat (Azqueta a Collins, 2013).

Kromě těchto aktivit byl při příležitosti mezinárodního workshopu konaného v roce 2011 v Turecku zahájen projekt ComNet (comet network) s cílem (a) standardizovat kometový test pro účely lidského biomonitoringu a (b) definovat význam poškození DNA měřeného kometovým testem pro lidské zdraví a nemoc (Collins et al, 2012).

V rámci tohoto projektu účastníci pokračují v identifikaci proměnných přispívajících k variabilitě mezilaboratorních výsledků. Použití standardizovaného protokolu výrazně snížilo tuto variabilitu hlavně při detekci Fpg-senzitivních míst (Forchhammer et al, 2012).

Další studie se věnovala rozboru dosud publikovaných prací zaměřených na biomonitoring a vztahy mezi poškozením DNA a chorobami jako základ pro vymezení bazálních hladin

poškození DNA v lidské populaci a významu kometového testu při identifikaci vlivu environmentálních faktorů a chorobných stavů na integritu DNA (Collins et al, 2014).

1.2. Myelodysplastické syndromy

Myelodysplastický syndrom (MDS) nebo přesněji řečeno myelodysplastické syndromy je heterogenní skupina onemocnění vznikající na základě poškození genetického materiálu kmenové hematopoetické buňky. Buňky si sice zachovávají proliferační aktivitu, ale podléhají předčasné apoptóze ještě v kostní dřeni, tj. před dosažením terminálního stádia diferenciace. Předčasná apoptóza je příčinou paradoxu typického pro tato onemocnění, tj. pancytopenie v periferní krvi při normo- až hypercelulární kostní dřeni (k.d.). Charakteristickým nálezem jsou i různé morfologické a funkční dysplázie buněk a pacienti mají zvýšené riziko leukemické transformace. Ve většině případů jde o onemocnění s neznámou etiologií.

MDS byl poprvé popsán počátkem 30. let minulého století jako preleukemický stav a až do roku 1976 nebylo toto onemocnění považováno za samostatnou skupinu hematologických abnormalit. V průměru postihuje 3-4 osoby/100 000 obyvatel ročně. Velmi vzácně se vyskytuje ve věku pod 40 let, ale s přibývajícím věkem jeho výskyt dramaticky stoupá. v šesté dekádě života je kolem 7 případů/100 000 obyvatel, zatímco u osob nad 70 let dosahuje 20 až 40 případů/100 000 obyvatel (Rollison et al, 2008).

1.2.1. Klasifikace MDS

Mimořádná heterogenita MDS s sebou přináší diagnostické obtíže. Na základě tzv. klasifikace FAB (**F**rench-**A**merican-**B**ritish Cooperative Group) z roku 1982 byly MDS členěny do 4 hlavních skupin a jako odlišující kritérium bylo stanoveno procento blastů v k.d., přítomnost tzv. věnečkových sideroblastů a počet blastů nebo monocytů v periferní krvi (Tab. 1). Refrakterní anémie (RA) je charakterizovaná těžkou anémií, která je u některých pacientů provázena i postižením myeloidní linie, tj. leukopénií a trombocytopénií. Novější klasifikace WHO proto bere v úvahu i počet krevních řad postižených dysplázií a tuto skupinu pacientů označuje jako RCMD – refrakterní cytopénie s multilineární dysplázií. Pro refrakterní anémii s věnečkovými sideroblasty (RARS) je charakteristická přítomnost sideroblastů s depozity železa v mitochondriích. Podobně jako u RA může být postižena pouze erytroidní řada nebo více typů krevních buněk (podle WHO – RCMD-RS). U refrakterních anémií s excesem blastů (RAEB) je v kostní dřeni přítomno 5-19% blastů a u refrakterních anémií s excesem blastů v transformaci (RAEB-t) se tento počet zvyšuje na 20-30% a více jak 5% blastů se nachází v periferní krvi. Podle

Tabulka č. 1: FAB klasifikace MDS (upraveno podle Greenberg et al, 2011).

Subtyp MDS	% blastů v krvi	% blastů v k.d.
Refrakterní anémie (RA)	< 1	< 5
Refrakterní anémie s věnečkovými sideroblasty (RARS)	< 1	< 5
Refrakterní anémie s přebytkem blastů (RAEB)	< 5	5 - 20
Refrakterní anémie s přebytkem blastů v transformaci (RAEB-t)	≥ 5	21 - 30
CMML (>1000 monocytů/μl krve)	< 5	5 - 20

Tabulka č. 2: Klasifikace MDS podle WHO (upraveno podle Greenberg et al, 2011).

Subtyp MDS	Periferní krev	Kostní dřeň
Refrakterní cytopenie s monolineární dysplázií (RCUD)	Cytopenie (jednoduchá či bicytopenie)	dysplázie v ≥10% buněk jedné linie < 5% blastů
Refrakterní anémie s věnečkovými sideroblasty (RARS)	anémie žádné blasty	≥15% věnečkových sideroblastů pouze erytroidní dysplázie < 5% blastů
Refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií (RCMD)	cytopenie < 1 x 10 ⁹ /l monocytů	dysplázie v ≥10% buněk dvou či více myeloidních linií ± 15% věnečkových sideroblastů < 5% blastů
Refrakterní anémie s excesem blastů-1 (RAEB-1)	cytopenie ≤2%-4 % blastů < 1 x 10 ⁹ /l monocytů	monolineární nebo multilineární dysplázie nejsou Auerovy tyče 5% - 9% blastů
Refrakterní anémie s excesem blastů-2 (RAEB-2)	cytopenie 5%-19% blastů < 1 x 10 ⁹ /l monocytů	monolineární nebo multilineární dysplázie Auerovy tyče ± 10% - 19% blastů
MDS neklasifikovaný (MDS-U)	cytopenie	jednolineární nebo žádná dysplázie charakteristická cytogenetika < 5% blastů
MDS asociovaný s izolovanou del(5q)	cytopenie normální či zvýšený počet destiček	monolineární erytroidní dysplázie izolovaný del(5q) < 5% blastů

klasifikace WHO již tato skupina patří do leukemických forem onemocnění. Do kategorie MDS byla původně řazena i chronická myelomonocytární leukémie (CMML), myeloproliferativní onemocnění s dysplastickými rysy (Bennett et al, 1982; Vallespi et al, 1998).

V roce 1999 vypracovala skupina odborníků Světové zdravotnické organizace (WHO) klasifikaci novou (Tab. 2), ve které byla zásadní změnou hranice 20 % blastů v kostní dřeni, definující rozlišení mezi MDS (<20%) a AML (>20%). Rovněž RA s výraznými dysplastickými změnami, které postihují kromě erytroidní řady i granulocyty a megakaryocyty, byly zařazeny do samostatné kategorie. Problematické případy CMML byly reklasifikovány jako myelodysplastická/myeloproliferativní onemocnění (MDS/MPS) a z kategorie MDS vyčleněny. Poprvé se v klasifikaci samostatně objevila jednotka cytogeneticky definovaná, tj. syndrom 5q- (Germing et al, 2000). V roce 2008 doznává původní klasifikace ještě několika změn, a její aktuální verze je tato:

- Refrakterní cytopenie s dysplázií jedné řady (refrakterní anemie, refrakterní neutropenie a refrakterní trombocytopenie) – RCUD
- Refrakterní anemie s věnečkovými sideroblasty – RARS
- Refrakterní cytopenie s dysplázií několika řad – RCMD
- Refrakterní anemie s excesem blastů – RAEB
- Myelodysplastický syndrom s izolovanou delecí 5q – MDS del(5q)

1.2.2. Etiologie MDS

Skupina MDS je někdy dělena na primární (*de novo*) a sekundární („therapy-related“, t-MDS) onemocnění, která tvoří zhruba 10% případů. Sekundární MDS se zpravidla vyvíjejí jako následek předchozí cytotoxické terapie jako je radiační terapie, chemoterapie nebo jiná chemická expozice. U mladších pacientů a dětí postižených MDS jde vesměs o sekundární formu onemocnění a jejich prognóza je obecně horší v porovnání s *de novo* případy, neboť hůře odpovídají na léčbu a mají vysoké riziko transformace do akutní myeloidní leukémie (AML) (Foucar et al, 1979; Raza et al, 2014). Cytogenetické abnormality se vyskytují u 40% *de novo* případů, zatímco komplexní přestavby karyotypu a specifické změny jako např. monosomie chromozómu 5, trisomie chromozómu 8 nebo delece 5q a 7q byly detekovány až u 95% pacientů se sekundárním MDS (Raza et al, 2014).

Rozsáhlé studie neprokázaly příčinnou souvislost mezi MDS a profesionální expozicí pesticidům nebo faktorům životního stylu jako je obezita, kouření a konzumace alkoholu. Zato expozice benzénu prokazatelně zvyšuje riziko vzniku zejména pokročilejších forem MDS (RAEB) (Schnatter et al, 2012). Uvažuje se, že spouštěčem vzniku MDS by mohla být i chronická stimulace imunitního systému, neboť v anamnéze pacientů s MDS se vyskytovaly autoimunitní choroby (reumatoidní artritída, Sjögrenův syndrom, apod.) a infekce (zápal plic, meningitída, herpes zoster, apod.) častěji než v kontrolním souboru (Kristinsson et al, 2011). Spolu s průkazem zvýšených hladin biomarkerů oxidačního stresu v krevních buňkách a moči pacientů s MDS (Ghoti et al, 2007; Honda et al, 2000) toto zjištění podporuje představu, že důležitou úlohu při vzniku MDS může hrát oxidační stres (Farquhar a Bowen, 2003).

1.2.3. Mechanismus vzniku a patogeneze MDS

I když etiologie i patofyziologie myelodysplasie zatím nebyla zcela objasněna, je zřejmé, že mechanismus onemocnění zahrnuje poškození pluripotentní kmenové buňky a abnormality v proliferaci, diferenciaci, vyžívání a apoptóze buněk k.d., které vedou k neefektivní křetvorbě. Nadměrná apoptóza jako možná příčina periferní cytopenie byla identifikována již počátkem 90. let minulého století na základě morfologického hodnocení biopsií k.d. pacientů s MDS (Clark a Lampert, 1990) a záhy byla potvrzena specifitějšími metodami jako je značení externalizovaného fosfatidylserinu annexinem V (Merchant et al, 2001; Albitar et al, 2002) nebo metoda TUNEL (Raza et al, 1996a). Většina studií prokazovala v k.d. pacientů inverzní vztah mezi rozsahem apoptózy a klinickým stádiem onemocnění, tj. nejvyšší výskyt apoptotických buněk u raných forem MDS a jeho strmý pokles při progresi do leukemické transformace (Parker et al, 1998; Bouscary et al, 2000; Mundle, 2003; Span et al, 2005). Zvýšená apoptóza přitom nepostihuje všechny typy buněk, zaznamenána sice byla v myeloidní, erytroidní i megakaryotické řadě a B-lymfocytech, nikoliv však v T-lymfocytech (Amin et al, 2003). I když s postupným vývojem onemocnění může docházet k transformaci do AML, nelze MDS považovat za pouhý předstupeň této leukémie. Zatímco leukemické buňky MDS jsou schopny další diferenciace do zralých myeloidních buněk a monocytů, u AML se vývoj zastavuje na úrovni blastů. Pacienti s MDS navíc častěji umírají právě na následky selhání kostní dřeně než na přechod do AML (Albitar et al, 2002).

Předpokládá se, že MDS se vyvíjejí jako většina malignit na základě mnohočetných genetických aberací, které pak dávají vznik buněčným fenotypům detekovaným v hematopoetických liniích. Důležitou úlohu přitom zřejmě hraje dysregulace imunomodulačních cytokinů jako TNF- α (tumor necrosis factor α), který silně inhibuje krvetvorbu (Nagata a Golstein, 1995). Řada studií skutečně prokázala zvýšenou expresi TNF- α v hematopoetických buňkách a stromatu pacientů s MDS (např. Shetty et al, 1996; Deeg et al, 2000), ale i dalších cytokinů a signálních molekul příbuzných s cytokiny. Mezi ně patří např. TGF- β (transforming growth factor β), interferon- γ , interleukin 1 β , TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), aj. (Raza et al, 1996b; Plašilová et al, 2002; Sawanobori et al, 2003). Navíc byla pozorována korelace mezi zvýšenými hladinami TGF- β a TNF- α v k.d. pacientů s MDS, související se zvýšeným počtem blastů (Allampallam et al, 2002).

1.2.4. Genetické a epigenetické faktory v etiopatogenezi MDS

V posledních letech četné výsledky naznačují genetickou predispozici v etiologii a rozvoji MDS. V souboru pacientů s MDS byli v porovnání s kontrolní skupinou častěji zastoupeni jedinci s polymorfismy *TNF- α* a *TGF- β* , které jsou asociované se zvýšenou expresí těchto cytokinů (Powers et al, 2007). Polymorfismy v genech kódujících enzymy metabolické aktivace a detoxifikace a defektní „mismatch“ oprava DNA zřejmě mohou ovlivňovat riziko vzniku sekundárních MDS (Naoe et al, 2000; Olipitz et al, 2002). Polymorfismus v genu kódujícím receptor pro G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) může predisponovat jedince k rozvoji pokročilých forem MDS, neboť ovlivňuje signální dráhy pro proliferaci a diferenciaci myeloidních progenitorových buněk (Wölfler et al, 2005).

Na zajišťování genetické stability a integrity genomu se klíčovým způsobem podílí tumor-supresorový protein p53, jehož normální funkce brání maligní transformaci. Gen kódující tento protein je lokalizován v chromosomálním pruhu 17p13 a jeho mutační spektrum se u pacientů s MDS zásadně neliší od ostatních hematologických malignit a solidních nádorů. Pouze 10% pacientů s *de novo* MDS a AML vykazuje mutace v genu *p53* (hlavně substituce bází v párech G:C), které jsou často spojené se ztrátou chromosomálního úseku 17p13 v párovém chromozómu, mnohočetnými přestavbami karyotypu, resistencí k chemoterapii a krátkodobým přežíváním. Naproti tomu téměř 30% vyšetřených pacientů se sekundární formou MDS a AML mělo v *p53* nejčastěji substituční mutace v párech A:T a v důsledku zvýšené genetické nestability po předchozí terapii alkylačními agens byla ztráta

funkce p53 často spojena s delecí nebo ztrátou 5q nesoucí normální alelu *p53* (Christiansen et al, 2001). V rámci subtypu MDS del(5q) byla identifikována skupina pacientů s vysokou expresí p53 ve více jak 1% progenitorových buněk k.d. Tito pacienti se vyznačovali vyšším rizikem transformace do AML, sníženou cytogenetickou odpovědí na léčbu lenalidomidem a kratším přežitím. Následná sekvenční analýza buněk s vysokou expresí p53 potvrdila přítomnost mutantní alely *p53* (Saft et al, 2014). Zdá se tedy, že mutace *p53* představuje jednu z nezbytných podmínek leukemické transformace (Raza et al, 2014).

I když mutační a cytogenetická nestabilita je nepochybně důležitým mechanismem při inaktivaci tumor-supresorových genů (TSG), dominantní úlohu v procesu leukemizace MDS pravděpodobně hrají epigenetické modifikace, zejména aberantní metylace DNA. Obecně nejsou CpG ostrůvky v promotorových oblastech mnoha genů včetně TSG metylovány, zatímco repetitivní sekvence a introny jsou hypermetylovány. Naproti tomu genom nádorových buněk je charakterizován globální hypometylací a lokalizovanými hypermetylacemi (Galm et al, 2006; Jiang et al, 2009). Příkladem lokalizovaných hypermetylací u hematologických malignit jsou promotorové oblasti genů *CDKN2B (P15)* a *CDKN2A (P16)*, které kódují inhibitory cyklin-dependentních kináz důležité pro regulaci buněčného cyklu při přechodu z G1 do S fáze (Karlic et al, 2014). Gonçalves a kol. (2015) zjistili, že pacienti s MDS s vysokými hladinami intracelulárních peroxidů a superoxidového aniontu mají zvýšenou metylační frekvenci v promotorech genů *P15* a *P16*, což podporuje hypotézu o úloze oxidačního stresu při metylaci TSG (Franco et al, 2008).

U pacientů s méně pokročilými formami MDS může být jednou z příčin oxidačního stresu nadměrná akumulace Fe v důsledku četných transfúzí podávaných ke zmírnění těžké anémie (Ghoti et al, 2007). Potvrzují to klinické studie, kde podávání chelatačního agens deferasiroxu (DFS) skupině pacientů závislých na transfúzích výrazně snížilo hladiny markerů oxidačního stresu (Kikuchi et al, 2012). Více náchylní k oxidačnímu poškození DNA pak mohou být pacienti s méně efektivní excisní opravou oxidovaných bází (base excision repair, BER) (Jankowska et al, 2008).

U hematologických malignit se často vyskytují chromozomální přestavby v oblasti genu pro nucleoporin 98 (*NUP98*). Tento protein je součástí proteinového komplexu NPC (Nuclear Pore Complex) zajišťujícího transport mezi jádrem a cytoplasmou. V důsledku balancované translokace nebo inverse může docházet ke spojení *NUP98* s celou řadou dalších genů a

tyto modifikované geny pak kódují tzv. fúzované proteiny, ve kterých zůstává zachována terminální sekvence aminokyselin proteinu NUP98 s transkripčně aktivačním potenciálem. Protože přibližně polovina genů fúzujících s *NUP98* kóduje transkripční faktory a řada vzniklých fúzovaných proteinů inhibuje diferenciaci hematopoetických prekursorů a zvyšuje reprodukci krvetvorných kmenových buněk, uvažuje se, že tyto přestavby by mohly představovat klíčový mechanismus maligní transformace (Gough et al, 2011). U transgenních myší exprimujících v hematopoetickém kompartmentu fúzovaný gen *NHD13* (*NUP98-HOXD13*) se vyvíjí MDS charakterizovaný periferní pancytopenií, dysplázií k.d. a transformací do AML. Až třetina myší v leukemické transformaci vykazovala nadprodukcí ROS, zvýšený výskyt *de novo* mutací a částečnou blokádu G2/M fáze buněčného cyklu. Kromě toho byla exprese fúzovaného genu spojena se sníženou aktivitou tří různých genů kódujících peroxidázy (Chung et al, 2014). Protože byl fúzovaný gen *NHD13* identifikován i u lidských sekundárních a vývojově pokročilejších forem MDS (Gough et al, 2011), lze předpokládat, že chyby v opravě poškození DNA indukovaného nadprodukcí ROS mohou vést k postupnému vzniku mutací i v genech regulujících pro- a antioxidační dráhy, což dále prohlubuje oxidační stres a v interakci s expresí proteinu NHD13 vede k progresi MDS do AML (Chung et al, 2014).

Důležitou roli v krvetvorbě hrají mitochondrie, neboť se uplatňují jak při syntéze hemu, tak v apoptóze. Hromadění mutací v mitochondriální DNA (mtDNA) pozorované u pokročilých MDS tak musí nutně vést k těžkému energetickému deficitu a následně k poškození apoptotické dráhy zprostředkované mitochondriemi. Buňky k.d. se tak vymykají apoptotické kontrole a stávají se náchylné k leukemické transformaci (Linnartz et al, 2004). Zdrojem oxidačního poškození mtDNA u pacientů s RARS může být i Fe akumulované v mitochondriích sideroblastů. Vzhledem k perinukleární lokalizaci těchto mitochondrií a v závislosti na množství mutací vznikajících v mtDNA mohou vznikající ROS vyvolávat oxidační poškození i v onkogenech a TSG sousedního jaderného genomu. Tyto jaderné mutace pak řídí klonální expanzi do leukemie (Linnartz et al, 2004).

Tento zdaleka ne úplný výčet dokládá značnou genetickou a fenotypovou heterogenitu MDS. Dosavadní poznatky naznačují, že hlavní patogenetické události zodpovědné za vývoj a progresi MDS jsou epigenetické změny a somatické mutace detekované, na rozdíl od cytogenetických změn, téměř u všech pacientů. Využití genomiky v klinické praxi k upřesnění diagnostiky a uplatnění cílené individuální terapie však předpokládá (a) hlubší

pochopení sekvence molekulárních událostí v průběhu iniciace, klonální expanze a progresu onemocnění, (b) odhalení postižených signálních drah v souvislosti s klinickým fenotypem a (c) identifikaci prognostického významu mutací v dominantních a minoritních buněčných subklonech (Raza et al, 2014; Bejar 2014).

1.4. Znečištění ovzduší a poškození DNA

Znečištěné ovzduší škodí lidskému zdraví i životnímu prostředí. Značná část evropského obyvatelstva žije v oblastech a ve městech, kde jsou překračovány normy kvality ovzduší. Vysoké koncentrace škodlivých látek v ovzduší mohou být příčinou chronických patologických procesů v organismu, jako jsou nádorová a neurodegenerativní onemocnění, skupina poruch kardiovaskulárního systému, nemoci jater, ledvin, plic, kůže, zrakového aparátu a řady dalších chorob (Lewtas, 2007; Yang a Omaye, 2009).

Jeden z největších zdrojů znečištění ovzduší dnes představuje automobilová doprava, jejíž hustota se dramaticky zvýšila zejména v posledních desetiletích (Valavanidis et al, 2008). Z výfukových emisí se do ovzduší dostávají směsi škodlivých toxických látek, které na makromolekulární úrovni ovlivňují organismus. Především jsou to částice jemného polétavého prachu (particulate matter, PM), karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky (k-PAU) a látky označované zkratkou jako BTEX (těkavé organické látky jako benzen, toluen, etylbenzen, m,p-xylen a o-xylen) (Rössnerova et al, 2009; Kerchich a Kerbachi, 2012; Lan a Minh, 2013). Tyto částice se dělí podle velikosti na velké (PM10 s průměrem $<10\mu\text{m}$), jemné (PM 2,5 s průměrem $<2,5\mu\text{m}$) a ultrajemné (PM100 s průměrem $<100\mu\text{m}$) (de Kok et al, 2006; Cavanagh et al, 2009). Ze zdravotního hlediska jsou nebezpečnější PM2,5 a PM100, protože pronikají hlouběji do dýchacích cest než PM10 (Wegesser et al, 2009). Po inhalaci mohou PM vyvolávat přímo nebo nepřímo (aktivací zánětlivých procesů) vznik ROS s následným poškozením biologických makromolekul (Risom et al, 2005; Weichenthal et al, 2013). Ohroženou skupinou jsou zejména malé děti a kojenci, jejichž dýchací cesty nejsou ještě zcela vyvinuty a nadměrná expozice PM u nich může být příčinou vzniku astmatu, bronchitidy, apod. (Hertz-Picciotto et al, 2007; Iskandar et al, 2012; Ghosh et al, 2013). Kromě toho jemné prachové částice vyvolávají v plicích produkci volných radikálů a indukují oxidační stres (Risom et al, 2005; Weichenthal et al., 2013). Proto jsou dnes v řadě zemí ve zvláště ohrožených populacích (obyvatelé velkých městských aglomerací, řidiči autobusů a taxislužby, policisté řídící městskou dopravu apod.) sledovány biomarkery expozice, dávky a citlivosti ve vztahu k aktuálním expozičním dávkám a různým typům biologických účinků s cílem identifikovat příčiny a dráhy vedoucí ke zdravotním následkům.

PM představují heterogenní směs, jejíž složení se mění v čase a je závislé na různých zdrojích emisí, chemických procesech v ovzduší a klimatických podmínkách (Pitz et al, 2008). Na PM₁₀ jsou často vázány komplexní směsi obsahující karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky (k-PAU) a tato vazba může mít synergický efekt (Lauer et al, 2009). Vzhledem ke svým karcinogenním a genotoxickým účinkům (Lewtas, 2007) a schopnosti vyvolávat oxidační poškození prostřednictvím CYP1A1 a následnou produkci reaktivních chinonů (Xue a Warshawsky, 2005) přispívají k-PAU podstatným způsobem ke škodlivým zdravotním účinkům PM souvisejících s dopravou. Mezi k-PAU nejvíce ohrožuje lidské zdraví benzo[a]pyren (B[a]P) (Pedersen et al, 2005, Sevastyanova et al, 2008). Epidemiologická studie prokázala, že koncentrace vyšší než 1 ng B[a]P/m³ ovzduší významně zvyšují fragmentaci DNA (Sram et al, 2011).

Vysoké koncentrace těkavých organických sloučenin (volatile organic compounds, VOC) ve vzduchu také mohou působit četné zdravotní problémy – ovlivňují lidské smysly, vyvolávají narkotické účinky a některé z nich jsou toxické nebo karcinogenní (Zhou et al, 2009). Mezi těmito sloučeninami je pozornost věnována hlavně benzénu, protože jeho bioaktivace vede ke vzniku četných reaktivních metabolitů, které se vážou na biologické makromolekuly a indukují oxidační poškození prostřednictvím tvorby ROS (Snyder a Hedli, 1996; Barreto et al, 2009; Tung et al, 2012). Expozice toluenu zase ovlivňuje aktivitu metabolických genů kódujících cytochrom P450, např. CYP2E1 (Jiménez-Garza et al, 2012). Odpověď každého jedince na působení škodlivých látek v ovzduší může být významně modifikována genotypem, tj. zděděnou kapacitou metabolických drah a systémů opravujících poškozenou DNA, ale také celou řadou dalších faktorů jako je věk, pohlaví, životní styl, dieta, antioxidační status, apod. (Lewtas, 2007; Romieu et al, 2008). Všechny zmíněné faktory musí být uvažovány nejen při identifikaci jedinců citlivých z hlediska zdravotních dopadů, ale také při hledání účinných strategií ke zmírnění těchto škodlivých účinků.

Pro zimu v Praze jsou zpravidla charakteristické vyšší koncentrace škodlivin v ovzduší v porovnání s ostatními obdobími roku (Topinka et al, 2007; Rössnerova et al, 2009), pravděpodobně díky topení a častým atmosférickým inverzím. Biomonitoring pražských dopravních policistů v průběhu zimy 2004 odhalil v jejich leukocytech zvýšené oxidační poškození DNA související se zvýšenou expozicí k-PAU a jedinci s alespoň jednou mutantní alelou *CYP1A1*2C (Ile/Val)* byli citlivější k indukci oxidačního poškození v porovnání s kolegy

s divokým typem alely (Novotná et al, 2007). Následný výzkum naznačil, že i řidiči městské autobusové dopravy mohou být vystaveni vyššímu riziku oxidačního poškození, neboť v porovnání s kontrolami vykazovali vyšší oxidační poškození lipidů a proteinů a zvýšenou exkreci 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosinu (8-oxodG) (Rössner et al, 2008a,b).

1.4. Magnetické nanočástice v regenerativní medicíně

Regenerativní medicína v původním slova smyslu zahrnuje klasickou chirurgii, transplantace orgánů a k.d. a implantace např. umělých kloubů a sofistikovaných biomateriálů. Tyto klasické postupy jsou často spojeny s určitými problémy. Např. transplantace orgánů vyžaduje dlouhodobou imunosupresivní terapii, kovové klouby se časem opotřebují, biomateriály mohou vyvolávat zánět a pod. Proto je v současné době věnována značná pozornost kmenovým buňkám, které by v organismu mohly stimulovat přirozenou regeneraci tkání např. při selhání kardiovaskulárního systému, degeneraci chrupavky pohybového aparátu, poškození míchy a výhledově by mohly být využity i při léčbě takových onemocnění jako je inzulín-dependentní diabetes mellitus nebo Parkinsonova a Alzheimerova choroba (Mason a Dunnill, 2008).

V současné době bylo vyvinuto několik neinvazivních technik umožňujících sledovat osud transplantovaných buněk v organismu. Jednou z těchto metod je zobrazování buněk předem označených kontrastním agens pomocí magnetické resonance (magnetic resonance imaging, MRI) (Gupta et al, 2007; Kubinova a Sykova, 2010). Nejčastěji jsou k magnetickému značení využívány superparamagnetické nanočástice oxidů železa (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) jako magnetit (Fe_3O_4) nebo jeho stabilnější forma maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), neboť jejich hlavní složka – Fe – může být v buňkách recyklována prostřednictvím přirozených metabolických drah (Bulte et al, 1999; 2001; Bos et al, 2004; Sykova a Jendelova, 2007). Avšak samotné SPIONy jsou hydrofobní, mají velký povrch vzhledem k celkovému objemu a tendenci k agregaci (Lu et al, 2007). Vhodné potažení povrchu biokompatibilními polymery a specifickými agens nejenom zlepšuje biokompatibilitu SPIONů v suspenzi, ale také zvyšuje specifitu, účinnost a rychlost jejich internalizace v cílových buňkách (Allen et al, 2004; Zhang a Zhang 2005; Babic et al, 2008; Shubayev et al, 2009).

K chemické modifikaci povrchu SPIONů již bylo použito několik druhů potahových materiálů jako organické polymery (dextran, chitosan, polyetylénglykol) a surfaktanty (oleát sodný, dodecylamin), anorganické kovy (zlato) a oxidy (silika, oxid uhlíku) a bioaktivní molekuly a struktury (lipozómy, peptidy a ligandy/receptory) (Gupta a Gupta, 2005; Shubayev et al, 2009). Komerčně dostupné preparáty (např. Feridex, Endorem nebo Resovist) schválené FDA ke klinickým účelům jako kontrastní agens pro MRI jsou obvykle

tvořeny magnetickým jádrem potaženým biodegradabilními deriváty dextransu a uhlohydrátů s vysokou afinitou k oxidům železa. Na druhé straně polymerové potahy výrazně zvětšují velikost SPIONů, což může negativně ovlivňovat jejich schopnost penetrace a rychlost jejich metabolické likvidace v organismu. To by vysvětlovalo sníženou intracelulární absorpci nanočástic potažených dextransem (Gupta a Gupta, 2005; Wilhelm et al, 2003). Tato skutečnost spolu s nízkou konjugační kapacitou nanočástic s dextransovým povrchem stimulovala intenzivní vývoj alternativních modifikací povrchu s cílem vylepšit vlastnosti SPIONů pro aplikace *in vivo*.

Třebaže zpočátku převažoval optimismus ohledně bezpečnosti SPIONů, dnes se ukazuje, že specifické vlastnosti nanočástic, zejména velká reaktivní plocha povrchu a schopnost procházet buněčnými a tkáňovými bariérami znásobuje jejich cytotoxický potenciál ve srovnání s výchozími materiály stejného chemického složení (Nel et al, 2006; Shubayev et al, 2009). Pokusy *in vivo* prokázaly, že toxicita nanomateriálu může záviset na jeho složení, velikosti, přítomnosti funkčních skupin na povrchu a způsobu expozice (Harper et al, 2008). Za hlavní mechanismy způsobující toxicitu nanomateriálů jsou dnes obecně považovány indukce vzniku reaktivních radikálů kyslíku a buněčného oxidačního stresu, které následně vyvolávají oxidační poškození biologických makromolekul, dysfunkci buněk a buněčnou smrt (Karlsson et al, 2009; Donaldson et al, 2010). Snaha o zlepšení biologických vlastností nanočástic by tak současně mohla vést k nárůstu jejich nežádoucích účinků (Oberdörster et al, 2005; El-Ansary a Al-Daihan, 2009). To otevřelo diskusi o urgentní potřebě vyvinout vhodné testy na toxicitu, které by byly schopné identifikovat potenciální rizika nanočástic před jejich aplikací v biomedicíně (Dusinska et al, 2009; Kroll et al, 2009; Landsiedel et al, 2009; 2010). Dále viz Kapitola 1.1.4. *Nanotoxikologie a kometový test*.

2. Cíle studie

Práce je založena na využití kometového testu v hematologii, biomonitoringu a nanotoxikologii.

(A) V hematologické problematice byla pozornost věnována myelodysplastickým syndromům, neboť současné poznatky naznačují, že oxidační stres, získané léze DNA a účinnost opravy DNA hrají důležitou úlohu v patogenezi a klinickém průběhu těchto onemocnění. Zaměřili jsme se přitom na pacienty s RA a RARS, tj. subtypy s vysokou hladinou apoptózy v k.d., s následujícími cíli:

- ✓ **porovnat hladiny nespecifického (DNA-SB) a oxidačního poškození DNA v erytroidní (glykoforin A+) a myeloidní (glykoforin A-) frakci k.d. pacientů s RA, RARS a kontrolních jedinců**
- ✓ **detekovat případné rozdíly mezi oběma subtypy MDS**
- ✓ **ověřit, zda výsledky kometového testu korelují s klinickým stavem a laboratorními nálezy pacientů**

(B) V oblasti biomonitoringu byl kometový test použit při hodnocení poškození DNA v lymfocytech řidičů autobusů pražské hromadné dopravy, zaměstnanců garáží a kontrolní skupiny s cílem:

- ✓ **stanovit rozsah nespecifického (DNA-SB) a oxidačního poškození DNA v jednotlivých skupinách ve vztahu k personální expozici kontaminantům ovzduší**
- ✓ **porovnat výsledky kometového testu se stanovením hladin 8-oxodG v moči sledovaných osob a biomarkery oxidačního poškození lipidů a proteinů**
- ✓ **identifikovat vliv genetických a negenetických faktorů na hladiny poškození DNA**

(C) V Oddělení neurověd ÚEM AV ČR se dlouhodobě věnují výzkumu zaměřenému na vývoj terapeutických postupů usnadňujících zotavení centrálního nervového systému po traumatickém poranění, ischemii nebo degenerativních onemocněních. Přitom jsou využívány kmenové buňky k.d. značené magnetickými nanočásticemi. Ke zvýšení účinnosti značení je věnována pozornost také syntéze nových typů SPIONů a analýze jejich

povrchových a morfologických charakteristik. V rámci této problematiky byl kometový test použit s cílem:

- ✓ **stanovit hladiny nescifické fragmentace (DNA-SB) a oxidačního poškození DNA, proteinů a lipidů v lidských mesenchymálních kmenových buňkách k.d. značených SPIONy s různou povrchovou úpravou a porovnat s výsledky získanými v neznačených buňkách**
- ✓ **identifikovat nejperspektivnější typ SPIONů pro klinické aplikace**

3. Použité metody

Odběr vzorků.

Zdrojem buněk pro analýzu poškození DNA u pacientů s MDS a pro studium biologických účinků magnetických nanočástic byly aspiráty kostní dřeně. Vzorky rozmíchané v IMDM médiu (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma, Německo) byly udržovány při teplotě 4°C až do dalšího zpracování (maximálně 24 hodin).

Pro studii z oblasti humánního biomonitoringu byly odebírány vzorky moči a heparinované krve od řidičů autobusů pracujících v centru Prahy a zaměstnanců garáží, vždy po ukončení monitoringu personální expozice. Kontrolní skupinu tvořili administrativní pracovníci Dopravního podniku Praha. Po odběru byly vzorky kódovány a přepraveny při 4°C k dalšímu zpracování.

Zpracování vzorků

Izolace mononukleárních buněk

Z k.d. i plné krve byly mononukleární buňky (MNC) separovány centrifugací na hustotním gradientu Histopaque-1077 nebo Ficoll-Paque Plus podle pokynů výrobce (Sigma, Německo).

Separace erytroidní a myeloidní frakce k.d.

K separaci erytroidních a myeloidních buněk k.d. bylo použito značení magnetickými kuličkami s navázanou protilátkou proti glykoforinu A. Oddělení značené (erytroidní) a neznačené (myeloidní) frakce bylo provedeno pomocí separační kolony na separátoru MACS podle pokynů výrobce.

MNC získané z plné krve byly pro účely kometového testu naředěny v zamrazovacím médiu a skladovány při -80°C (Novotná et al, 2007).

Kometový test

Použita byla alkalická verze kometového testu s enzymy EndoIII a Fpg (Sigma, Německo) pro detekci oxidačního poškození DNA (Singh et al, 1988; Collins 2004, Novotná et al, 2007).

Další metodiky

Kultivace a značení buněk lidských mesenchymálních kmenových buněk k.d magnetickými nanočásticemi (Turnovcova et al, 2009)

Účinnost značení buněk magnetickými nanočásticemi – stanovení procenta buněk s modře obarvenou cytoplasmou (Pruská modř) jako průkaz přítomnosti Fe

Viabilita buněk – WST-1 colorimetric assay založený na schopnosti mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk štěpit tetrazoliovou sůl 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát na ve vodě rozpustné formazanové barvivo

Buněčná smrt – značení buněk Annexin V/propidium jodidem podle pokynů výrobce

Stanovení individuálních expozic k-PAU – personální samplery vybavené filtry k zachycení PM 2,5 (Binkova et al, 2007), expozice měřena 48 hod, kvantitativní chemická analýza k-PAU provedena podle metody EPA (EPA Report 1999) v certifikované laboratoři ALS, Praha, ČR

Stanovení individuálních expozic volatilním látkám – personální samplery Radiello®(Supelco, PA, USA), expozice měřena 24 hod, analýza provedena kapilární plynovou chromatografií v certifikované laboratoři ALS, Praha, ČR

Stanovení 8-oxodG v moči – kompetitivní ELISA (Yin et al, 1995;. Rössner et al, 2007)

Stanovení peroxidace lipidů – F_{2t}-IsoP immunoassay kit, podle pokynů výrobce

Stanovení oxidace proteinů – protein carbonyl assay, nekompetitivní ELISA (Buss et al, 1997; Marangon et al, 1999; Rössner et al, 2007)

Genotypizace polymorfismů – PCR (polymerázová řetězová reakce) a RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů) (Binková et al, 2007;. Sram et al, 2006).

Stanovení dalších analyzovaných proměnných – hladiny vitaminů A, C, a E v plasmě analyzovány HPLC s UV detekcí (Driskell et al, 1982; Tanishima a Kita, 1993), hladiny LDL a HDL cholesterolu a triglyceridů v plasmě stanoveny

s použitím diagnostických kitů Sigma, hladiny kotininu v moči (marker expozice tabákovému kouři) analyzovány radioimunoassai podle Langone a Van (1982) a hladiny kreatininu měřeny v moči reakcí s kyselinou pikrovou (Jaffeho metoda)

Statistické analýzy – programy GraphPad Prism 2.01, Statistica 7.0 a SAS 9.1

4. Výsledky (viz. Kapitola 8, přílohy 1-4)

4.1. Hematologie

Příloha 1:

Novotna B, Neuwirtova R, Siskova M, Bagryantseva Y: DNA instability in low-risk myelodysplastic syndromes: refractory anemia with or without ring sideroblasts. Hum Mol Genet 2008, 17:2144-2149.

Příloha 2:

Novotna B, Bagryantseva Y, Siskova M, Neuwirtova R: Oxidative DNA damage in bone marrow cells of patients with low-risk myelodysplastic syndrome. Leukemia Research 2009, 33: 340-343.

4.2. Biomonitoring

Příloha 3:

Bagryantseva Y, Novotna B, Rössner P Jr, Chvatalova I, Milcova A, Svecova V, Lnenickova Z, Solansky I, Sram RJ: Oxidative damage to biological macromolecules in Prague bus drivers and garagemen: Impact of air pollution and genetic polymorphisms. Toxicol Lett 2010, 199: 60-68.

4.3. Nanotoxikologie

Příloha 4:

Novotna B, Jendelova P, Kapcalova M, Rössner P Jr, Turnovcova K, Bagryantseva Y, Babic M, Horak D, Sykova E: Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles. Toxicol Lett, 2012, 210: 53-63.

5. Diskuse souboru prací

5.1. Hematologie

5.1.1. *Instabilita DNA u pacientů s RA a RARS*

Pomocí kometového testu byla v buňkách kostní dřeně pacientů s RA a RARS prokázána významně zvýšená fragmentace DNA oproti kontrolám stejného věku. Postižena byla zejména erytroidní frakce k.d., což korespondovalo s publikovanými údaji o zvýšené apoptóze u těchto subtypů MDS. Lze proto předpokládat, že naše výsledky odrážejí především apoptotické štěpení DNA a zdálo se, že tento závěr podporuje i korelační analýza mezi výsledky kometového testu a cytopenií. Pacienti s RA totiž vykazovali inverzní vztah mezi rozsahem fragmentace DNA v erytroidních buňkách k.d. a počtem erytrocytů v periferní krvi.

Při studiu méně pokročilých forem MDS byla některými autory zvýšená buněčná smrt detekována v progenitorových buňkách k.d. CD34+ (Rajapaksa et al, 1996; Parker et al, 1998; Parker et al, 2000). V našich pokusech byly tyto buňky obsaženy v glykoforin A-frakci a nebyly tak analyzovány odděleně. Nicméně, naše výsledky v glykoforin A+ populaci podporují zjištění ostatních autorů, tj. že předčasná apoptóza postihuje i zralejší buněčná stádia (Shetty et al, 2000; van de Loosdrecht et al, 2001; Albitar et al, 2002)

Překvapivě jsme nepozorovali žádný vztah mezi výsledky kometového testu a cytopenií u pacientů s RARS, třebaže jejich hladiny fragmentace DNA signifikantně převyšovaly nejen kontrolní hodnoty, ale i hodnoty zjištěné u pacientů s RA. Je zřejmé, že poškození DNA u pacientů s RARS zahrnuje i zlomy neapoptotického původu. Základním morfologickým rysem odlišujícím RARS od RA je přítomnost věnečkových sideroblastů s deposity železa v mitochondriích. Vysoký obsah Fe by mohl přispívat k oxidačnímu stresu a tím k následné indukci oxidačního poškození v buňkách k.d. Nelze tedy vyloučit, že za nárůstem migrace DNA v kometové testu stojí u tohoto subtypu MDS i extensivní oprava oxidovaných bází.

Oxidace pyrimidinových nukleotidů již byla detekována v progenitorových CD 34+ buňkách k.d. pacientů s MDS (Peddie et al, 1997). Kapacita opravných mechanismů DNA nepochybně ovlivňuje schopnost poškozených buněk přežít, protože pouze neopravené nebo chybně opravené léze nasměrují buňku na dráhu smrti. Pokud oxidační poškození hraje důležitou úlohu v patogenezi RARS, potom jeho účinná oprava by mohla přispívat k obecně lepší prognóze tohoto subtypu MDS oproti pacientům s RA.

Závěrem lze shrnout, že naše výsledky podpořily užitečnost kometového testu ve výzkumu MDS. Jedná se o poměrně jednoduchou metodu, vyžadující minimální množství analyzovaného materiálu, což je zejména u hematologických pacientů dost podstatné. Další modifikace této metody umožňují i identifikaci dalších specifických lézí v DNA a analýzu účinnosti opravy DNA, což by mohlo přispět k odhalení primárních rozdílů mezi RA a RARS a poskytnout nové náhledy na patogenezi těchto subtypů MDS.

5.1.2. Oxidační poškození DNA v buňkách k.d. pacientů s RA a RARS

Kometový test kombinovaný s enzymy Endo III a Fpg neodhalil mezi pacienty s RA a RARS významné rozdíly v hladinách oxidačního poškození, a to jak v erytroidní, tak neerytroidní frakci k.d. Proto byli tito pacienti při porovnávání s kontrolním jedinci sloučeni do jedné skupiny. Výsledky statistické analýzy jednoznačně prokázaly u pacientů s MDS vyšší oxidační poškození DNA v obou frakcích k.d. oproti kontrolní skupině, tj. Tail DNA 6,81% vs 2,40% v erytroidní a 9,22% vs 1,65% v neerytroidní populaci. Naproti tomu v rámci sledovaných skupin se glykoforin A pozitivní a glykoforin A negativní buněčná frakce mezi sebou nelišily.

V důsledku inefektivní krvetvorby je mnoho pacientů s RA a RARS závislých na transfúzích, což může vést k nadbytku Fe a následně k tvorbě ROS a poškození biologických makromolekul. V souladu s tímto předpokladem Ghoti a kol. (2007) zjistili u méně pokročilých subtypů MDS korelaci mezi sérovými hladinami ferritinu a ROS v periferních leukocytech a trombocytech. V naší studii dva pacienti s RA s vysokými hladinami ferritinu v séru rovněž vykazovali vysoké hladiny oxidačního poškození DNA, zejména v glykoforin A negativní buněčné populaci k.d. Ale někteří z dalších pacientů s MDS měli dokonce ještě vyšší oxidační poškození DNA i při mnohonásobně nižších hladinách sérového ferritinu.

Dalším zdrojem ROS v organismu může být zánět. Skutečně, v naší kontrolní skupině měl nejvyšší oxidační poškození jedinec trpící v době odběru k.d. aspergilózou. U dalšího kontrolního jedince byla v době odběru diagnostikována rheumatoidní artritida a také tento jedinec vykazoval v rámci kontrolní skupiny relativně vysoké hladiny oxidovaných bází. Avšak pacient s RA se stejnou komplikací, stejně jako jiný pacient s ulcerózní kolitidou měli hodnoty oxidačního poškození DNA více jak dvojnásobné. Zánět tedy nepochybně může přispívat k oxidačnímu poškození u pacientů s MDS, klíčovou roli ale hraje jiný faktor nebo faktory. Peddie a kol. (1997) formulovali hypotézu, že oxidační stres by mohl u

pacientů s MDS souviset s nadměrnou expresí proapoptotického cytokinu TNF- α , který podporuje buněčnou smrt, alespoň částečně, prostřednictvím indukce intracelulárních ROS. Bez ohledu na původ oxidovaných nukleotidů v DNA pacientů s MDS, jejich konečné množství závisí na vnitřních antioxidantech a reparační kapacitě DNA daného subjektu. To by vysvětlovalo, proč jsme neprokázali žádný vztah mezi stupněm oxidačního poškození DNA a hladinou ferritinu nebo periferní cytopenií.

Naše předchozí studie prokázala korelaci mezi nespecifickou fragmentací DNA v erytroidní frakci k.d. pacientů s RA a počtem erytrocytů v krvi, což naznačilo, že u tohoto subtypu MDS výsledky standardního kometového testu odrážejí především apoptotickou fragmentaci DNA. Použití kometového testu se specifickými enzymy prokázalo, že hladina oxidačního poškození sama o sobě není zodpovědná za rozsah apoptózy a následnou cytopenii. Ve skutečnosti vede od oxidačního poškození ke smrti buňky dlouhá cesta a ne každá buňka s poškozenou DNA umírá. Vysoký počet oxidovaných bází v DNA pravděpodobně může v buňce přímo spustit kaskádu apoptotických procesů. Mnoho lézí ale může být v průběhu času opraveno nebo převedeno na jednořetězcové zlomy v DNA nebo fixováno jako mutace. Kromě vlastní reparační kapacity (tj. genotypu), může buňku nasměrovat k přežití bez následků, na dráhu buněčné smrti nebo k maligní transformaci i místo léze v DNA (heterochromatin nebo euchromatin, exon nebo intron, apod.). V každém případě naše výsledky dokládají, že v porovnání s kontrolami mají pacienti s RA a RARS zvýšené hladiny oxidačního poškození DNA i v diferencovanější buněčné populaci k.d. CD34-. To se týká obou analyzovaných frakcí k.d., neboť nízký počet progenitorových buněk CD34+ přítomný v neerytroidní frakci by stěžil mohl ovlivnit výsledky. Zůstává otázkou, zda naše zjištění odráží spíše přetížení BER v důsledku zvýšeného oxidačního stresu nebo dysfunkci v samotném mechanismu BER.

Závěrem lze shrnout, že u méně pokročilých subtypů MDS oxidační poškození DNA nepochybně přispívá ke zvýšené nestabilitě genomu a progresi onemocnění. Kometový test přitom poskytuje vhodný nástroj k detailní analýze úlohy oxidačního poškození DNA u MDS.

5.2. Biomonitoring

5.2.1. Vliv znečištěného ovzduší a genetických polymorfismů na oxidační poškození biologických makromolekul

Výsledky personálního monitoringu ukázaly, že řidiči autobusů i zaměstnanci garáží byli vystaveni výrazně vyšším koncentracím k-PAU a benzénu než kontrolní jedinci. To bylo zřejmě hlavní příčinou zvýšeného výskytu DNA-SB v periferních lymfocytech obou exponovaných skupin, i když nemůže být zcela vyloučen vliv dalších neidentifikovaných expozičních faktorů. Na druhé straně, hladiny Fpg- a EndoIII-senzitivních míst v DNA se mezi skupinami nelišily, i když hladiny 8-oxodG v moči exponovaných jedinců signifikantně převyšovaly kontrolní hodnoty. Příčinou této diskrepance by mohly být rozdíly v obou metodách použitých k průkazu oxidačního poškození. Zatímco množství 8-oxodG v moči zahrnuje produkty opravy oxidovaného guaninu v DNA a buněčném poolu z celého organismu (Haghdoust et al, 2006; Cooke et al, 2009), výsledky kometového testu kombinovaného s enzymy excisní opravy odrážejí široké spektrum oxidovaných purinů a pyrimidinů, ale pouze v DNA lymfocytů (Møller et al, 2000). V naší studii se však v kohortě všech analyzovaných subjektů hladiny Fpg- a EndoIII-senzitivních míst zvyšovaly v závislosti na stoupající expozici benzénu. Podobnou korelaci mezi hladinami oxidačního poškození a expozicí benzénu publikoval Avogbe s kol. (2005). Experimenty na myších naznačily, že oxidační poškození DNA v periferních lymfocytech může být po expozici dlouhodobému oxidačnímu stresu maskováno zvýšenou aktivitou reparačních mechanismů (Risom et al, 2003; 2005). V naší studii benzen zjevně indukoval oxidační poškození DNA v lymfocytech, ale kapacita opravných mechanismů DNA pravděpodobně nebyla přetížena, takže rozdíly v hladinách Fpg- a EndoIII-senzitivních míst mezi exponovanou a kontrolní skupinou byly maskovány rychlým odstraňováním oxidovaných lézí z DNA. Zvýšený výskyt DNA-SB detekovaný u řidičů autobusů a zaměstnanců garáží by potom mohl odrážet jak zvýšený výskyt přechodných gapů DNA v průběhu excisní opravy, tak jedno- a dvouřetězcové SB vznikající z neopravených nebo chybně opravených lézí DNA.

Podobně jako oxidační poškození DNA v lymfocytech, ani exkrece 8-oxodG v moči nekorelovala s personální expozicí benzénu. Např. Lagorio a kol. (1994) zaznamenali signifikantní korelaci mezi expozicí benzénu a 8-OHdG (alternativní tautomerická forma 8-oxodG) v moči u obsluhy benzínové stanice v Římě. Ale v tomto případě koncentrace

benzénu (stanovené ze sedmi opakovaných personálních měření v průběhu roku) byly více jak 50x vyšší (kolem 0.45 mg/m^3) v porovnání s našimi údaji. Toxicita benzénu u člověka je primárně charakterizovaná škálou hematologických účinků, které jsou přičítány sekundárním metabolitům vznikajícím v k.d. po předchozí biotransformaci původní látky v játrech (Snyder a Hedli, 1996). Vysoký oxidační potenciál těchto sekundárních metabolitů přednostně postihujících krevní buňky a relativně nízké expoziční dávky benzénu by mohly být hlavní příčinou, proč se v naší studii oxidační poškození asociované s benzénem nemanifestovalo zvýšenou exkrecí 8-oxod-G, zvláště když tato léze představuje pouze jeden typ (třebaže nejčastější) z celého spektra modifikovaných nukleotidů.

Rozsah oxidačního poškození DNA v lymfocytech našich sledovaných subjektů by mohl být determinován kromě benzénu i hladinami triglyceridů v plasmě, neboť triglyceridy přispívají k oxidačnímu stresu (Katsuki et al, 2004). Na druhé straně jsme nezaznamenali žádný vliv vitamínů nebo věku na hladiny Fpg a EndoIII senzitivních míst v DNA.

Ve skupině pražských dopravních policistů exponovaných znečištěnému ovzduší v průběhu zimy 2004 jsme prokázali výrazný nárůst oxidačního poškození DNA nad kontrolní hladiny a rozsah toho poškození koreloval s personální expozicí k-PAU asociovaných s PM 2,5 (Novotná et al, 2007). Předchozí studie pražských řidičů autobusů identifikovala koncentrace PM 2,5 a PM 10 naměřené stacionárními monitory během tří dnů před odběrem vzorků moči jako jediné faktory signifikantně ovlivňující hladiny 8-oxodG v moči, zatímco koncentrace k-PAU žádný vliv neměly (Rössner et al, 2008a). Rovněž naše studie využívající vzorky sbírané během zimy 2006 neprokázala efekt k-PAU ani na hladiny 8-oxodG v moči, ani na výskyt oxidovaných lézí v DNA lymfocytů. Ale personální expozice řidičů autobusů a pracovníků v garážích k-PAU byly v průběhu zimy 2006 zhruba poloviční v porovnání s hladinami detekovanými u policistů o dva roky dříve. Dokonce kontrolní jedinci ve studii zaměřené na policisty byli vystaveni vyšším dávkám k-PAU než exponovaní jedinci v této studii. Karcinogenní PAU evidentně nemohly podstatným způsobem přispět ke zvýšeným hladinám 8-oxodG v moči řidičů autobusů a zaměstnanců garáží, neboť jejich koncentrace v ovzduší v průběhu zimy 2006 nebyly dostatečně vysoké. Spíše je pravděpodobné, že za zvýšenou exkrecí 8-oxodG stojí u těchto jedinců produkce ROS související se zánětlivou reakcí na respirabilní PM nebo s přítomností kovů navázaných na PM (Singh et al, 2007). V případě řidičů autobusů lze rovněž uvažovat o úloze psychického

stresu vzhledem k husté městské dopravě a jejich zodpovědnosti za bezpečnost pasažérů neboť některá publikovaná data potvrzují vztah mezi psychickým a oxidačním stresem (Møller et al, 1996; Sivonova et al, 2004).

Dlouhodobá expozice znečištěnému ovzduší může poškozovat i další biologické makromolekuly. V naší studii jak řidiči autobusů, tak pracovníci v garážích měli vyšší hladiny oxidovaných proteinů v plasmě než kontroly. Pouze řidiči autobusů však současně vykazovali i známky zvýšené peroxidace lipidů, neboť v jejich moči byly detekovány zvýšené hladiny 15-2F_{2t}-IsoP. V tomto případě byly jako hlavní příčina zvýšené oxidace proteinů a lipidů identifikovány k-PAU. Na rozdíl od DNA postrádají tyto makromolekuly rychlé opravné mechanismy. Výsledkem je akumulace indukovaných lézí, takže se může projevit i efekt relativně nízkých koncentrací k-PAU.

Údaje o účincích k-PAU na oxidační poškození lipidů zatím nejsou jednoznačné. Zatímco jedna studie na základě měření malondialdehydu (MDA) u dětí prokázala korelaci mezi peroxidací lipidů a expozicí PAU (Singh et al, 2008), jiná studie sledující hladiny 15-2F_{2t}-IsoP v moči asfaltérů podobný vztah nenašla (Toraason et al, 2001). V každém případě naše výsledky potvrzují předchozí zjištění u pražských řidičů autobusů sledovaných v průběhu různých ročních období (Rössner et al, 2008b).

Rovněž vyšší věk a zvýšené hladiny LDL cholesterolu patřily v naší studii k faktorům přispívajícím k vyššímu riziku oxidačního poškození lipidů, zatímco vysoké hladiny vitamínu C měly opačný efekt. Nedávné experimentální důkazy naznačují, že stárnutí je provázáno změnami v metabolismu lipidů a akumulací reaktivních volných radikálů v důsledku klesající aktivity enzymů podílejících se na jejich odstraňování jako je kataláza, glutathion peroxidáza a superoxid dismutáza (Hsu et al, 2008; Yan et al, 2009). Rovněž LDL cholesterol ve své oxidované formě může zvyšovat hladiny oxidačního stresu (Chen et al, 2006). Naproti tomu publikované údaje o účincích vitamínu E se poněkud různí (Dragsted, 2008; Catania et al, 2009). Např. suplementace diabetických potkanů vitamínem C vedla k poklesu zvýšených hladin peroxidace lipidů (Jain et al, 2009). Někteří autoři popsali u zdravých lidských dobrovolníků negativní korelaci mezi MDA a užíváním vitamínu C (Bloomer a Fisher-Wellman, 2008), zatímco jiní nepozorovali žádný efekt podávání askorbátu na hladiny isoprostanů v plasmě a moči (Kelly et al, 2008). Naše výsledky potvrzují předpoklad o protektivních účincích vitamínu C na oxidační poškození lipidů.

Vyšší příjem vitamínu C a nižší věk byly zřejmě hlavními faktory zodpovědné za nízké hladiny 15-2_{Fl}-IsoP u zaměstnanců garáží, i když byli vystaveni vyšším koncentracím k-PAU. Rovněž genetická konstituce může výrazně modifikovat odpověď jedince na škodlivé účinky environmentálních kontaminantů. Lidský gen *OGG1* kóduje 8-oxo-guanin-DNA glykosylázu/AP lyázu, která odstraňuje 8-oxo-7,8-dihydroguanin v průběhu excisní opravy (Boiteux a Radicella, 2000). Snížená schopnost odstraňovat tuto lézi může vést k akumulaci oxidačního poškození DNA (Goode et al, 2002). Často detekované polymorfismy vedoucí k záměně serinu za cystein v pozici 326 proteinu hOOG1 jsou skutečně spojené se zvýšenou genetickou nestabilitou a sníženou rychlostí opravy 8-oxodG *in vivo*, což naznačuje, že jedinci homozygotní pro variantu *hOOG1 (Cys/Cys)* by mohli v podmínkách oxidačního stresu více akumulovat mutace (Bravard et al, 2009). V naší studii již nositelé alespoň jedné mutantní alely *hOGG1 (Ser/Cys nebo Cys/Cys)* vykazovali vyšší hladiny oxidačního poškození než jedinci s divokým genotypem (*Ser/Ser*). Obdobné výsledky byly získány i ve studii sledující výskyt mikrojadér v populaci pracovníků exponovaných prachu z těžkých kovů (Mateuca et al, 2005). I v tomto případě byly genotypy *hOGG1 (Ser/Cys)* a (*Cys/Cys*) spojeny s vyšším genotoxickým poškozením.

Gen *XPD* kóduje DNA helikázu, složku transkripčního faktoru IIH, který je zapojen do iniciace transkripce a excisní opravy nukleotidů (NER) různých velkých lézí DNA a thymidinových dimerů (Lehmann, 2001; Manuguerra et al, 2006). V naší studii jedinci s variantním genotypem *XPD 23 (Gln/Gln)* se jeví náchylnější k indukci DNA-SB než heterozygoti (*Lys/Gln*) a homozygoti s divokou alelou (*Lys/Lys*). Podobně byla v populaci zdravých nekuřáků zaznamenána souvislost mezi variantní alelou *XPD 23* a vyšším výskytem DNA aduktů (Matullo et al, 2001). Jinak jsou ale výsledky studií zaměřené na genotypy *XPD 23* a účinnost opravy DNA poněkud nejednoznačné (viz. Příloha 3), což naznačuje, že polymorfismy *XPD 23* by mohly mít rozdílné účinky v různých opravných drahách a že efekt dané alely by mohl záviset na expozici a interakci s dalšími geny, které se účastní na rozpoznání poškození DNA, jeho opravě a regulaci buněčného cyklu (Lunn et al, 2000). Protože jsou DNA-SB nezbytným předpokladem poškození na chromozomální úrovni (Obe et al, 2002), naše zjištění naznačuje, že nosiči *XPD 23 (Gln/Gln)* exponovaní respirabilním PM by mohli být více ohroženi vznikem nádorů než jedinci s divokou alelou. Některé alelické varianty *XPD* již skutečně byly dány do souvislosti se zvýšeným rizikem

plicních nádorů (např. Chen et al, 2002; Zienolddiny et al, 2006). Údaje u ostatních typů malignit zatím nejsou přesvědčující (viz Příloha 3).

GSTM je metabolický enzym II. fáze, který se účastní detoxifikace ROS, neboť katalyzuje jejich konjugaci s glutathionem (Hayes a Strange, 2000). Přítomnost tzv. *null* alely *GSTM* je obecně spojována s kompletním chyběním enzymu a redukovanou nebo nulovou konjugační aktivitou (Rebbeck, 1997). Na základě korelace mezi hladinou DNA-adtů v lidské plicní tkáni a genotypem *GSTM null* se předpokládá, že *GSTM* by mohla hrát zásadní roli v ochraně proti oxidačnímu stresu indukovanému PAU (Autrup, 2000). Analýza kodaňských řidičů autobusů odhalila signifikantní vztah mezi absencí *GSTM1* a zvýšeným výskytem chromozomálních aberací (Knudsen et al, 1999), zatímco předchozí studie stejných subjektů neprokázala vliv tohoto genotypu na hladiny DNA aduktů v periferních leukocytech (Nielsen et al, 1996). Naproti tomu, dopravní policisté s variantou *GSTM null* vykazovali v lymfocytech dokonce nižší výskyt mikrojadér než jejich kolegové s aktivním enzymem (Leopardi et al, 2003). I naše předchozí studie naznačila vztah mezi deficiencí *GSTM* a mírným protektivním účinkem na hladiny DNA-SB v lymfocytech městských policistů (Novotná et al, 2007). V souboru subjektů vyšetřovaných v této studii jsme pozorovali stejný vztah. Poléťavé prachové částice představují komplexní směs látek s variabilním složením, které závisí na ročním období, aktuálních povětrnostních podmínkách a lokalitě. I když je aktivita *GSTM* zpravidla spojována s detoxifikací xenobiotik, určité sloučeniny mohou být tímto enzymem konvertovány na vysoce reaktivní metabolity. Biomonitoringové studie však zatím nemají k dispozici vhodné experimentální modely, které by pomohly objasnit případné interakce v účincích toxických složek komplexních směsí přítomných v ovzduší na konkrétní metabolické dráhy. Na druhé straně nelze vyloučit, že tato poněkud neočekávaná zjištění mohou souviset s poměrně malým souborem vyšetřovaných jedinců.

Methionin syntáza (*MS*) je enzym participující v metabolismu folátů, který hraje klíčovou roli v udržení integrity genomu ovlivňováním poolu nukleotidů a metylace DNA. Genetické polymorfismy v genu kódujícím *MS* snižují aktivitu tohoto enzymu (Zijno et al, 2003). Protože přítomnost variantních alel byla spojena s poklesem chybné inkorporace uracilu do DNA, předpokládalo se, že tyto alely budou mít protektivní účinky na hladiny DNA-SB (Zijno et al, 2003). Naše výsledky však naznačují pravý opak. Jedinci s variantou *MS 2656 (Gly/Gly)* se zdáli být citlivější k indukci DNA-SB než jedinci s (*Asp/Gly*) nebo (*Asp/Asp*).

V naší předchozí studii tento polymorfismus zase koreloval s nárůstem oxidačního poškození DNA (Novotna et al, 2007). Nicméně, vzhledem k extrémně nízkému výskytu homozygotů *MS 2656 (Gly/Gly)* v našem souboru může být tento nález náhodný a je zapotřebí další výzkum, který by identifikoval úlohu polymorfismů folátového metabolismu v drahách zodpovědných za integritu genomu.

5.3. Nanotoxikologie

5.3.1. Oxidační poškození v buňkách značených různými typy magnetických nanočástic

Mezi všemi testovanými typy nanočástic vykazovaly nejnižší účinnost ve značení buněk komerční kontrastní nanočástice Endorem (kolem 40-60% značených buněk), zatímco nanočástice potažené poly-L-lysinem (PLL- γ -Fe₂O₃) a D manózou (mannose- γ -Fe₂O₃) pronikaly do buněk nejúčinněji (80-100% značených buněk). Účinnost buněčné internalizace nanočástic je primárně determinována jejich velikostí a chemickým složením povrchu. Nanočástice potažené manózou se dostávají do buněk mechanismem manózového transportu, který funguje ve většině savčích buněk. Nanočástice potažené PLL vstupují do buněk prostřednictvím rozdílných nábojů polylysinu a buněčného povrchu. Nanočástice potažené poly(N,N-dimethylakrylamidem) (PDMAAm- γ -Fe₂O₃) jsou, podobně jako Endorem, pohlcovány endocytózou. Lepší účinnost buněčného značení PDMAAm- γ -Fe₂O₃ oproti komerčním nanočásticím může souviset s jejich (1) kladným povrchovým nábojem vzhledem k negativně nabitě buněčné membráně a (2) menším rozměrem (Horak et al, 2009). Velikost pravděpodobně hraje roli i v relativně nízké účinnosti buněčného značení nanočásticemi Endorem potažených polylysinem (PLL-Endorem) oproti komplexu Endorem s transfekčním agens (Endorem+PLL). Zatímco samotné částice Endorem dosahují v průměru 130 nm, potažení polylysinem jejich velikost téměř zdvojnásobí (145-260 nm).

Ale nejen různé typy SPIONů vykazovaly různou efektivitu buněčného značení, dokonce i tentýž typ nanočástic značil s rozdílnou účinností stromální buňky k.d. (hBMSCs, human bone marrow stem cells) pocházející od dvou různých dárců (hBMSCs-1 a hBMSCs-2). Je dobře známo, že schopnost pohlcovat SPIONy se může značně lišit u různých buněčných typů (Soenen et al, 2010). Určité rozdíly byly pozorovány i u lidských a potkaních mesenchymálních kmenových buněk pocházejících z různých pasáží (Horak et al, 2009).

V naší studii jsme ale použili výhradně buňky ze 3. pasáže. Výsledky tak naznačují, že i genotyp konkrétního dárce by mohl ovlivňovat účinnost transportu nanočástic do buněk. Zřejmě i odpověď buněk na působení SPIONů může záviset na dárci. Montzka a kol. (2010) pozorovali odlišnou reakci hBMSCs od různých dárců na stimulaci lipopolysacharidem a tkáňovými homogenáty z normálních a patologických tkání. V naší studii jsme získali podobné výsledky. Buňky h-BMSCs-1 vykazovaly signifikantní, i když jen krátkodobý pokles viability pouze při kultivaci s nanočásticemi s nejvyšší účinností značení. V souladu s tím, v žádné z kultur hBMSCs-1 ovlivňovaných nanočásticemi nebyl pozorován nárůst počtu mrtvých buněk nad kontrolní hodnoty. Donedávna byla absence akutních toxických účinků považována za důkaz biokompatibility testovaných nanočástic. Podle těchto kritérií by výsledky získané na buňkách hBMSCs-1 znamenaly, že v podstatě žádný z testovaných typů nanočástic nepředstavuje závažné biologické riziko. Analýza hBMSCs-2 však ukázala poněkud odlišný obrázek. S výjimkou PLL-Endorem a PDMAAm- γ -Fe₂O₃, všechny SPIONy snižovaly viabilitu buněk a tento efekt byl ještě markantnější po následné kultivaci značených buněk v médiu bez nanočástic. V tomto intervalu všechny testované nanočástice indukovaly výrazný pokles buněčné viability, který se pohyboval v rozmezí 36% pro nepotažené maghemitové nanočástice až po 82% pro mannose- γ -Fe₂O₃. Rovněž počet mrtvých buněk byl vyšší u hBMSCs-2 oproti hBMSCs-1. Podobně jako u buněčné viability, následná kultivace značených hBMSCs-2 v médiu bez nanočástic nevedla ke zmírnění cytotoxických účinků. V některých případech (Endorem) byl dokonce zaznamenán vyšší počet mrtvých buněk oproti předchozímu intervalu. Z tohoto hlediska se zdály být bezpečné pouze částice Endorem potažené polylysinem. Absence cytotoxických účinků těchto částic by mohla být vysvětlena opožděným uvolňováním volného Fe do intracelulárního prostředí v důsledku pomalejší degradace dvojitého obalu. Hladiny buněčné smrti indukované nanočásticemi v hBMSC-2 zcela nekorespondovaly s poklesem buněčné viability. Například nejtoxičtější maghemitové částice bez potahu (γ -Fe₂O₃) indukovaly 50% pokles buněčné viability, ale zabíjely jen kolem 17% buněk. Je tedy zřejmé, že buněčná smrt sama o sobě není hlavní příčinou účinku SPIONů na buněčnou viabilitu. Lidské hBMSCs jsou charakterizovány relativně pomalým růstem („doubling time“ přibližně 35 hod.), jehož rychlost závisí i na dárci. Navíc je jejich proliferující frakce velmi malá – kolem 10% buněčné populace při kultivaci v α -MEM s 10% BFS (Turnovcova et al,

2009). Dlouhodobou supresi buněčné viability v kultuře hBMSCs-2 tak lze přičítat spíše silné inhibici proliferační aktivity než excesivnímu vymírání buněk.

Bylo publikováno, že profil genové exprese hBMSCs se s věkem výrazně mění. Zejména geny podílející se na udržování integrity genomu a regulaci transkripce jsou v závislosti na věku reprimovány, což může zhoršovat funkce a regenerační potenciál buněk (Wagner et al, 2009). Odlišná odpověď našich kultur by tak mohla souviset s různým věkem dárců (téměř 40 let rozdíl), i když určitá variabilita v délce buněčného cyklu v závislosti na dárci (Turnovcova et al, 2009) by také mohla hrát určitou roli. Na druhé straně je dnes obecně akceptováno, že interakce nanočástic s buněčným aparátem je zprostředkována spíše dynamickou vrstvou proteinů a dalších biomolekul, které se vážou na povrch nanočástic (tzv. „corona“) bezprostředně po kontaktu s živým systémem než nanomateriálem samotným (Lynch et al, 2007). Při vysvětlování rozdílných odpovědí našich hBMSC kultur tak je možné uvažovat i o rozdílech ve složení vnitrobuněčného prostředí v důsledku odlišných genotypů.

Bylo konstatováno, že indukce vysokých hladin ROS, i když pro buňku netoxických, může mít dlouhodobé následky (Soenen et al, 2011). V našich experimentech skutečně nejen hBMSCs-2, ale také hBMSCs-1 (resistentní k toxickým účinkům SPIONů) vykazovaly vysoké hladiny oxidačního poškození lipidů, proteinů a DNA jako následek expozice nanočásticím a k podstatnému zlepšení nedošlo ani po následné kultivaci značených buněk v médiu bez nanočástic. Efekt byl nejvýraznější u lipidů ovlivněných buněk, kde hladiny 15-F_{2t}-IsoP (marker peroxidace lipidů) několikanásobně převýšily kontrolní hodnoty a dále se zvyšovaly i během následné kultivace v médiu bez nanočástic. To by mohlo souviset s akumulací indukovaných lézí, protože lipidy postrádají rychlé opravné mechanismy.

Rovněž Radu a kol. (2010) pozorovali v buňkách plicních fibroblastů MRC-5 exponovaných nanočásticím α -Fe₂O₃ nárůst peroxidace lipidů, provázený poklesem koncentrací redukovaného glutathionu a zvýšenou aktivitou enzymů fungujících při odstraňování ROS. Peroxidace lipidů může narušit uspořádání buněčné membrány, což následně může vyvolat změny v propustnosti membrány, transportu iontů a inhibici metabolických procesů (Nigam a Schewe, 2000). Rozpad lipidových hydroperoxidů vede v biologických systémech k tvorbě vysoce reaktivních aldehydů, které mohou dále šířit a zvyšovat původní produkci volných radikálů (Catalá, 2009). Rovněž poškození mitochondrií vyvolané

peroxidací lipidů může vést k další tvorbě a šíření ROS (Catalá, 2009). Všechny tyto události amplifikují nejen poškození lipidů, ale i proteinů a DNA.

Akumulace oxidovaných proteinů jako výsledek nerovnováhy mezi rychlostí vzniku ROS, hladinami antioxidantů a kapacitou eliminovat oxidované proteiny proteolýzou může poškozovat morfologii i funkce buněk (Catalá, 2009). Vysoké hladiny proteinových karbonylových skupin byly např. popsány u řady neurodegenerativních onemocnění (Stadtman, 2001).

Hromadění genetických chyb jako následek opakovaného poškození DNA a/nebo poruchy funkcí metabolických a opravných enzymů může také vést k celé řadě chronických onemocnění, včetně nádorů (Azad et al, 2008). Produkty oxidace DNA zahrnují oxidované báze, abázická místa, intrařetězcové adukty DNA-DNA, DNA-SB a křížové vazby DNA-protein (Ferguson, 2010). Většina těchto lézí je detekovatelná kometovým testem (Møller et al, 2000; Møller 2005). S použitím této metody jsme prokázali genotoxický potenciál analyzovaných nanočástic bez ohledu na jejich povrchovou úpravu, i když rozsah odpovědi na jednotlivé typy SPIONů se lišil. Z tohoto hlediska se jevil nejslibněji komplex (Endorem+PLL). Ale vzhledem k vysokým hladinám oxidačního poškození lipidů a proteinů může být absence genotoxických účinků v buňkách exponovaných tomuto komplexu pouze dočasný. Částice PLL- γ -Fe₂O₃ v obou buněčných kulturách zase zvyšovaly pouze DNA-SB, nikoliv oxidační poškození DNA. Nelze vyloučit, že oxidované léze vznikající v buňkách ovlivněných těmito částicemi byly opravnými mechanismy tak účinně z DNA odstraňovány, že nebyly kometovým testem zachyceny (Risom et al, 2003; 2005). Zvýšené hladiny DNA-SB by pak mohly odrážet kromě jedno- a dvouřetězcových zlomů v DNA i zvýšenou aktivitu excisní opravy oxidovaných bází.

Nežádoucí účinky nanočástic na okolní tkáň bývají často přičítány, mezi jiným, tvorbě ROS zánětlivými buňkami (Donaldson et al, 2010). Potkani po i.v. aplikaci γ -Fe₂O₃ skutečně vykazovali za dva týdny po expozici známky zánětu v plicích, játrech a ledvinách (Hanini et al, 2011). Naproti tomu dlouhodobé sledování (až 18 týdnů) neodhalilo mezi zvířaty s transplantovanými buňkami značenými a neznačenými SPIONy žádný rozdíl v zánětlivé reakci (Guzman et al, 2007). Pokud jde o zánět, aplikace SPIONů ve formě intracelulární značky se tak zdá být méně riziková. Nicméně naše výsledky jednoznačně prokázaly schopnost SPIONů indukovat uvnitř buněk dlouhodobý oxidační stres. Oxidační poškození lipidů, proteinů a DNA bylo detekováno i při absenci buněčné toxicity, což by mohlo

ovlivnit terapeutické funkce hBMSCs v hostiteli. Dosud publikované výsledky z experimentů *in vivo* se zatím zdají být slibné, protože buňky značené SPIONy migrovaly v hostiteli k místu léze, vhodným způsobem se zde diferencovaly a vylepšovaly funkční zdatnost zraněných zvířat (Jendelova et al, 2003; Zhang et al, 2003; Urdzikova et al, 2006). Rovněž sekreční profil hBMSCs značených ferumoxidem, včetně produkce růstových faktorů a cytokinů zprostředkujících zotavení, se zdál být nepoškozen (van Buul et al, 2011). Na druhé straně, značení Feridexem blokovalo v mesenchymálních kmenových buňkách *in vitro* chondrogenní aktivitu, zatímco adipogeneze a osteogeneze probíhala normálně (Kostura et al, 2004). Spolu s našimi výsledky to naznačuje, že intracelulární koncentrace SPIONů jsou stále příliš vysoké. V našich experimentech dosahovaly koncentrace Fe 14,6 - 51,7 pg/buňku v závislosti na povrchovém obalu nanočástic, což je srovnatelné s pokusy Kostury (13 - 16 pg Fe/buňku). Přitom koncentrace až o jeden řád nižší jsou stále dostatečné pro účely MRI (Heyn et al, 2005). Na základě experimentů s buněčnou linií myších fibroblastů L-929 dospěli Hong a kol. (2011) k závěru, že dávky SPIONů nižší než 200 ppm mohou být považovány za bezpečné. Z tohoto hlediska by koncentrace komerčních SPIONů (Resovist nebo Endorem) používané v experimentech *in vivo* pro značení transplantovaných buněk spadaly do rozmezí biologicky bezpečných dávek, neboť se pohybovaly v rozmezí od 5,6 µg Fe/ml (Guo et al, 2011) po 140 µg Fe/ml (Park et al, 2011). Ale naše výsledky získané na buňkách s terapeutickým potenciálem naznačují, že dokonce dávky kolem 15 µg Fe/ml mohou znamenat zvýšené riziko oxidačního poškození biologických makromolekul, zejména lipidů.

K zajištění bezpečnosti nanočástic pro biomedicínské aplikace je proto nezbytné snížit koncentrace intracelulárního značení na minimum nezbytné pro MRI. Současně by měla být věnována pozornost i možným následkům oxidačního stresu vyvolaného SPIONy za podmínek *in vivo*. To by obnášelo paralelní monitorování oxidačního poškození DNA, proteinů a lipidů jak v poškozené tkáni regenerující po transplantaci značených nebo neznačených buněk, tak ve zdravé tkáni léčených zvířat. Tyto experimenty by rovněž měly potvrdit nebo vyloučit zánětlivou odpověď jako zdroj oxidačního poškození buněk.

6. Závěry

6.1. Hematologie

- 1) V souladu s koncepcí zvýšené apoptózy u subtypů MDS s nízkým rizikem leukemické transformace byla pomocí kometového testu prokázána v buňkách kostní dřeně pacientů s tímto onemocněním výrazně zvýšená instabilita DNA v porovnání se skupinou kontrolních jedinců.
- 2) U pacientů s RA byla postižena pouze erytroidní (glykoforin A+) frakce kostní dřeně a rozsah poškození DNA koreloval se stupněm anémie v periferní krvi. Podobný trend, i když méně výrazný, byl zaznamenán také v buňkách myeloidních (glykoforin A-). Znamená to, že u RA kometový test zachycuje zejména apoptotické štěpení DNA.
- 3) Pacienti s RARS vykazovali zvýšenou fragmentaci DNA oproti kontrolám jak v erytroidní, tak myeloidní frakci kostní dřeně a poškození v glykoforin A+ buňkách dokonce výrazně převyšovalo i hodnoty detekované u pacientů s RA. Na rozdíl od pacientů s RA nebyl prokázán žádný vztah mezi výsledky kometového testu a hematologickými nálezy. V případě RARS tak detekované poškození DNA nepochybně zahrnuje i zlomy neapoptického původu.
- 4) Pacienti s MDS měli v erytroidní i myeloidní frakci kostní dřeně výrazně vyšší hladiny oxidačního poškození DNA než kontrolní skupina. Subtypy RA a RARS se v tomto ohledu mezi sebou nelišily. Oxidační poškození u pacientů s MDS tak evidentně nepostihuje pouze progenitorové buňky CD34+, ale i vývojově pokročilejší stádia buněk kostní dřeně.
- 5) Zvýšený výskyt oxidovaných lézí v DNA u pacientů s MDS nekoreloval ani s hladinami sérového ferritinu, ani s periferní cytopénií či přidruženým zánětlivým onemocněním. Oxidační poškození DNA tedy není hlavní příčinou extensivní apoptózy buněk v kostní dřeni těchto pacientů, nepochybně však přispívá ke zvýšené nestabilitě genomu a progresi onemocnění.

6.2. Biomonitoring

- 1) Jak řidiči městské autobusové dopravy, tak zaměstnanci garáží byli vystaveni vyšším koncentracím B[a]P, k-PAU a benzénu v ovzduší než kontrolní skupina.

- 2) V porovnání s kontrolami vykazovaly obě exponované skupiny zvýšený výskyt DNA-SB v lymfocytech. Výskyt Fpg- a EndoIII-senzitivních míst v DNA lymfocytů se mezi skupinami nelišil, ale hladiny 8-oxodG v moči exponovaných jedinců signifikantně převyšovaly kontrolní hodnoty.
- 3) Jak u řidičů autobusů, tak u pracovníků v garážích bylo detekováno zvýšené oxidační poškození proteinů oproti kontrolám, pouze řidiči autobusů však současně vykazovali i známky zvýšené peroxidace lipidů.
- 4) Výskyt oxidovaných lézí v DNA periferních lymfocytů narůstal se stoupající expozicí benzénu a zvýšené hladiny triglyceridů v plazmě zvyšovaly riziko toho poškození.
- 5) Jako hlavní příčina zvýšené oxidace proteinů a lipidů byly identifikovány k-PAU. Vyšší věk a zvýšené hladiny LDL cholesterolu patřily k faktorům přispívajícím k vyššímu riziku oxidačního poškození lipidů, zatímco vysoké hladiny vitamínu C měly protektivní efekt. Vyšší příjem vitamínu C a nižší věk byly zřejmě hlavní faktory zodpovědné za nízké hladiny 15-2_{Ft}-IsoP u zaměstnanců garáží, i když byli vystaveni vyšším koncentracím k-PAU.
- 6) Pokud jde o polymorfismus v genech kódujících enzymy opravných mechanismů DNA, přítomnost alespoň jedné mutantní alely *hOGG1 (Cys)* v genotypu zvyšovala riziko oxidačního poškození DNA, zatímco homozygoti s *XPD23 (Gln/Gln)* byli v porovnání s nositeli standardní alely náchylnější k indukci DNA-SB. Varianta *GSTM1 null* spojená s deficiencí metabolického enzymu II. fáze glutathion-S-transferázy vykazovala, poněkud překvapivě, protektivní účinky na integritu DNA.

6.3. Nanotoxikologie

- 1) Mezi všemi testovanými typy magnetických nanočástic vykazovaly nejnižší účinnost ve značení mesenchymálních kmenových buněk lidské kostní dřeně komerční kontrastní nanočástice Endorem. Naopak nejefektivněji pronikaly do buněk SPIONy potažené poly-L-lysinem a D manózou.
- 2) Účinnosti značení závisela nejen na typu nanočástic, ale i na původu buněk, což naznačuje, že genotyp konkrétního dárce by mohl ovlivňovat účinnost transportu nanočástic do buněk.

- 3)** V buňkách od dárce č. 1 neprokázalo hodnocení viability a buněčné smrti akutní toxické účinky u žádného typu testovaných nanočástic. Naproti tomu v buňkách od dárce č. 2 všechny typy nanočástic s výjimkou PLL-Endorem a PDMAAm- γ -Fe₂O₃ výrazně inhibovaly buněčnou proliferaci a zvyšovaly počet mrtvých buněk a tento efekt byl ještě markantnější po následné kultivaci značených buněk v médiu bez nanočástic. Nejvýraznější cytotoxické účinky byly zaznamenány při použití nepotažených maghemitových nanočástic.
- 4)** Buňky od obou dárců vykazovaly vysoké hladiny oxidačního poškození lipidů, proteinů a DNA jako následek expozice nanočásticím. Efekt byl nejvýraznější u lipidů, neboť hladiny 15-F_{2t}-IsoP v ovlivněných buňkách několikanásobně převyšovaly kontrolní hodnoty a v průběhu času se dále zvyšovaly bez ohledu na typ nanočástic.
- 5)** Naše výsledky jednoznačně prokázaly schopnost SPIONů indukovat v buňkách dlouhodobý oxidační stres i v případech, kdy klasické testy na viabilitu a buněčnou smrt nenaznačují žádné škodlivé účinky. Absence akutních toxických účinků tak nemůže být považována za důkaz biokompatibility testovaných nanočástic.
- 6)** K zajištění bezpečnosti SPIONů pro biomedicínské aplikace je proto třeba ověřit oxidační poškození biologických makromolekul po snížení koncentrací intracelulárního značení na minimum nezbytné pro MRI.

7. Použitá literatura

Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordiere A et al: Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1999, 83: 83-90.

Alapetite C. The comet assay as a repair test for prenatal diagnosis of Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy. *J Invest Dermat* 1997; 108: 154–159.

Albitar M, Manshouri T, Shen Y, et al: Myelodysplastic syndrome is not merely “preleukemia”. *Blood* 2002, 100:791-798.

Ali D, Alarifi S, Kumar S, et al: Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. *Aquat Toxicol* 2012, 124-125: 83-90.

Allampallam K, Shetty V, Mundle S, et al: Biological significance of proliferation, apoptosis, cytokines, and monocyte/macrophage cells in bone marrow biopsies of 145 patients with myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 2002, 75: 289-297.

Allen MJ, MacRenaris KW, Venkatasubramanian PN, Meade TJ: Cellular delivery of MRI contrast agents. *Chem Biol*, 2004, 11: 301-307.

Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, et al: Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2002, 78: 319-329.

Amin HM, Jilani I., Estey EH, et al: Increased apoptosis in bone marrow B lymphocytes but not T lymphocytes in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2003, 102: 1866-1888.

Autrup H:. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000, 464: 65-76.

Avogbe PH, Ayi-Fanou L, Autrup H: Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 2005, 26: 613-620.

Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V: Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol. Environ Health B Crit Rev* 2008, 11: 1-15

Azqueta A, Collins AR: The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol* 2013, 87: 949-968.

Azqueta A, Gutzkow KB, Brunborg G, Collins AR: Towards to a more reliable comet assay: Optimizing agarose concentrations, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutat Res* 2011; 724: 41-45.

Azqueta A, Gutzkow KB, Priestley CC, et al: A comparative performance test of standard, medium- and high-throughput comet assays. *Toxicology in vitro* 2013, 27: 768-773.

Babic M, Horak D, Trchova M, et al: Poly(l-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem* 2008, 19: 740-745.

Bacsó Z, Everson RB, Eliason JF: The DNA of Annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res* 2000, 60: 4623-4628.

Barreto G, Madureira D, Capani F, et al: The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: an oxidative DNA damage pathway. *Environ. Mol. Mutagen* 2009, 50: 771-780.

Bejar R: Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2014, 99: 956-964.

Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C et al: Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007, 87: 93-100.

Bennett MJ, Catovsky D, Daniel TM, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982, 51: 189-199.

Biancini C, Vanzin S, Rodriguez DB, et al: Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1822: 226-232.

Biancini GB, Moura DJ, Manini PR, et al: DNA damage in Fabry patients: an investigation of oxidative damage and repair. *Mutat Res* 2015, 784-785: 31-36.

Binková B, Cerná M, Pastorková A, et al: Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000-2001. *Mutat Res* 2003, 525:43-59.

Binkova B, Chvatalova I, Lnenickova Z, et al: PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutat Res* 2007, 620: 49-61.

Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH: Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gend Med* 2008, 5: 218-228.

Boiteux S, Radicella JP: The Human OGG1 gene structure, functions and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2000, 377: 1-8.

Bos C, Delmas Y, Desmouliere A, et al: In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology* 2004, 233: 781-789.

Bouscary D, Chen YL, Dreyfus F, Fontenay-Roupie M: Activity of the caspase-3/CPP32 enzyme is increased in 'early stage' myelodysplastic syndromes with excessive apoptosis, but caspase inhibition does not enhance colony formation in vitro. *Exp Hematol* 2000, 28: 784-791.

Bravard A, Vacher M, Moritz E, et al: Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res* 2009, 15: 3642-3649.

Brink A, Schulz B, Kolras K et al: Time-dependent effects of sodium arsenite on DNA breakage and apoptosis observed in comet assay. *Mutat Res* 2006, 603: 121-128.

Bulte JW, Souhlas T, Witwer B, et al: Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol* 2001, 19: 1141-1147.

Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P: et al: Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 15256-15261.

Bungum M, Bungum L, Giwercman A: Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl* 2011, 13: 69-75.

Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* 1997, 23: 361-366.

Catala A: Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 2009, 157: 1-11.

Catania AS, de Barros CR, Ferreira SR: Vitamins and minerals with antioxidant properties and cardiometabolic risk: controversies and perspectives. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009, 53: 550-559.

Cavanagh JA, Trought K, Brown L, Duggan S: Exploratory investigation of the chemical characteristics and relative toxicity of ambient air particulates from two New Zealand cities. *Sci Total Environ* 2009, 407:5007-5018.

Chen JW, Chen YH, Lin SJ: Long-term exposure to oxidized low-density lipoprotein enhances tumor necrosis factor-alpha-stimulated endothelial adhesiveness of monocytes by activating superoxide generation and redox-sensitive pathways. *Free Radic Biol Med* 2006, 40: 817-826.

Chen S, Tang D, Xue K, et al: DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of lung cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2002, 23: 1321-1325.

Choucroun P, Gillet D, Dorange G, et al: Comet assay and early apoptosis. *Mutat Res* 2001: 478: 89-96.

Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J: Mutations with loss of heterozygosity of *p53* are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 2001, 19: 1405-1413.

Chung YJ, Robert C, Gough SM, et al: Oxidative stress leads to increased mutation frequency in a murine model of myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2014, 38: 1-16.

Clark DM, Lampert IA: Apoptosis is a common histopathological finding in myelodysplasia: the correlate of ineffective hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 1990, 2: 415-418.

Collins A, Anderson D, Coskun E, et al: Launch of the ComNet (comet network) project on the comet assay in human population studies during the International Comet Assay workshop meeting in Kusadasi, Turkey (September 13-16, 2011). *Mutagenesis* 2012, 27: 385-386.

Collins A, Koppen G, Valdiglesias V, et al: The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet Project. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2014, 759: 27-39.

Collins AR, Azqueta Oscoz A, Brunborg G et al: The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008, 23: 143-151.

Collins AR, Dušinská M, Horská A: Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol* 2001, 48: 611-614.

Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL: Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 1993, 14: 1733-1735.

Collins AR, Horvathova E: Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans* 2001, 29: 337-341.

Collins AR: Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res* 2009, 681: 24-32.

Collins AR: The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology* 2004, 26: 249-261.

Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN: Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008, 89: 823-831.

Cook PR, Brazell IA, Jost E: Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci* 1976, 22: 303-324.

Cooke MS, Henderson PT, Evans MD: Sources of extracellular, oxidatively modified DNA lesions: implications for their measurement in urine. *J Clin Biochem Nutr* 2009, 45: 255-270.

Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Fernández JL et al: New application of the comet assay: Chromosome-Comet assay. *J Histochem Cytochem* 59, 2011, 655-660.

Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992, 13: 795-808.

De Boeck M, Touil N, De Visscher G, Vande PA, Kirsch-Volders M: Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutat Res* 2000, 469: 181-197.

de Kok TM, Drieste HA, Hogervorst JG, Briedé JJ: Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutat Res* 2006, 613:103-122.

Deeg HJ, Beckham C, Loken MR, et al: Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 2000, 37: 405-414.

Djuzenova CS, Rothfuss A, Oppitz U et al: Response to X-irradiation of Fanconi anemia homozygous and heterozygous cells assessed by the single-cell gel electrophoresis (comet assay). *Lab Invest* 2001, 81: 185-192.

Donaldson K, Poland CA, Schins RP: Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology* 2010, 4: 414-4120.

Dragsted LO: Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *Eur J Nutr* 2008, 47 (Suppl. 2): 3-18.

Driskell WJ, Neese JW, Bryant CC, Basho, MM: Measurement of vitamin A and vitamin E in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1982, 231: 439-444.

Dušinská M, Collins AR: Detection of oxidized purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Altern Lab Anim* 1996, 24: 405-411.

Dušinská M, Collins AR: The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 2008, 23: 191-205.

Dusinska M, Fjellsbo L, Magdolenova Z, et al: Testing strategies for the safety of nanoparticles used in medical applications. *Nanomedicine* 2009, 4: 605-607.

Duthie SJ, McMillan P: Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis. *Carcinogenesis* 1997, 18: 1709-1714.

El-Ansary A, Al-Daihan S: On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview. *J Toxicol* 2009, 2009: 1-9.

EPA Report, 1999: Compendium of methods for toxic organic compounds in ambient air. Compendium method TO-13A, No. 625/R-96/010b, US EPA, OH.

Ersson C, Møller L: The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or alkaline treatments. *Mutagenesis* 2011, 26: 689-695.

Ersson C, Møller P, Forchhammer L, et al: An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter- and intra-laboratory variation of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells. *Mutagenesis* 2013, 28: 279-286.

ESCOOD (European Standards Committee on Oxidative DNA damage), Gedik CM, Collins A: Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J* 2005, 19: 82-84.

Espinosa-Reyes G, Torres-Dosal A, Ilizaliturri C, et al: Wild rodents (*Dipodomys merriami*) used as biomonitors in contaminated mining sites. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ* 2010, 45:82-89.

Etebari M, Jafarian-Dehkordi A, Kahookar A, Moradi S. Assessment of the deoxyribonucleic acid damage caused by occupational exposure to chemical compounds in Isfahan Polyacryl Company. *J Res Med Sci* 2014, 19: 542–548.

Evenson DP, Kaspersen K, Wixon RL: Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007, 65: 93-113.

Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B: Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil* 2014, 15: 2-14.

Fairbairn DW, O'Neill KL: The neutral comet assay is sufficient to identify an apoptotic "window" by visual inspection. *Apoptosis* 1996, 1: 91-94.

Farquhar MJ, Bowen DT: Oxidative stress and the myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 2003, 77: 342-350.

Ferguson LR: Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat Res* 2010, 690: 3-11.

Forchhammer L, Ersson C, Loft S, et al: Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol. *Mutagenesis* 2012, 27: 665-672.

Foucar K, McKenna RW, Bloomfield CD, et al: Therapy-related leukemia. A panmyelosis. *Cancer* 1979, 43: 1285-1296.

Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI: Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008, 266: 6-11.

Fubini B: Surface chemistry and quartz hazard. *Ann Occup Hyg* 1998, 42: 521-530.

Galm O, Herman JG, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic in hematopoietic malignancies. *Blood Rev* 2006, 20: 1-13.

García-Medina S, Razo-Estrada C, Galar-Martinez M, et al: Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2011, 153:113-118.

Ge J, Prasongtanakij S, Wood DK, et al: CometChip: a high-throughput 96-well platform for measuring DNA damage in microarrayed human cells. *JOVE* 2014, 92: e50607.

Germing U, Gatterman N, Strupp C, et al: Validation of the WHO proposal for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res* 2000, 24: 983-992.

Ghosh R, Topinka J, Joad JP, Dostal M, Sram RJ, Hertz-Picciotto I. Air pollutants, genes and early childhood acute bronchitis. *Mutat Res*. 2013 Sep;749(1-2):80-6.

Ghoti H, Amer J, Winder A, Rachmilewitz E, Fibach E: Oxidative stress in red blood cells, platelets and polymorphonuclear leukocytes from patients with myelodysplastic syndrome. *Eur J Haematol* 2007;79:463-467.

Goddard T, Deslandes E, Lebailly P, et al: Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet assay and annexin V assay. *Histochem Cell Biol* 1999, 112: 155-161.

Gonçalves AC, Cortesão E, Olivieros B, et al: Oxidative stress levels are correlated with *P15* and *P16* gene promoter methylation in myelodysplastic syndrome patients. *Clin Exp Med* 2015, DOI 10.1007/s10238-015-0357-2.

Gonzales L, Lison D, Kirsch-Volders M: Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology* 2008, 2: 252-273.

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD: Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, 11: 1330-1513.

Gough SM, Slape CH, Aplan PD: *NUP98* gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biological insights. *Blood* 2011, 118: 6247-6257.

Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, et al: Myelodysplastic syndromes. 2011, *J Natl Compr Canc Netw* 9: 30-56.

Guan H, Liu X, Peng W et al: Beta-carboline derivatives: novel photosensitizers that intercalate into DNA to cause direct DNA damage in photodynamic therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 342: 894-901.

Gunasekarana V, Raj GV, Chand P: A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *JCDR* 2015, 9: 1-5.

Guo J, Shen JK, Wang L, et al: In vivo evaluation of cerebral transplantation of resovist labeled bone marrow stromal cells in Parkinson's disease rats using magnetic resonance imaging. *Appl Biochem Biotechnol* 2011, 163: 636-648.

Gupta AK, Gupta M: Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 2005, 26, 3995-4021.

Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M: Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine* 2007, 2: 23-39.

Gutzkow KB, Langleite TM, Meier S, et al: High-throughput comet assay using 96 minigels. *Mutagenesis* 2013, 28: 333-340.

Guzman R, Uchida N, Blis, TM: Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104: 10211-10216.

Haghdoust S, Sjölander L, Czene S, Harms-Ringdahl M: The nucleotide pool is a significant target for oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006, 41: 620-626.

Hanini A, Schmitt A, Kacem K, et al: Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *Int J Nanomed* 2011, 6: 787-794.

Harper S, Usenko C, Hutchison JE, Maddux B.S, Tanguay RL: In vivo biodistribution and toxicity depends on nanomaterial composition, size, surface functionalisation and route of exposure. *J Exp Nanosci* 2008, 3: 195-206.

Hartmann A, Speit G: The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett* 1997, 90: 183-188.

Hayes JD, Strange RC: Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000, 61: 154-166.

Herrero AB, San Miguel J, Gutierrez NC: Deregulation of DNA double-strand break repair in multiple myeloma: implications for genome stability. *PLOS one* 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0121581.

Hertz-Picciotto I, Baker RJ, Yap PS et al: Early childhood lower respiratory illness and air pollution. *Environ Health Perspect* 2007, 115:1510-1518.

Heyn C, Bowen CV, Rutt BK, Foster PJ: Detection threshold of single SPIO-labeled cells with FIESTA. *Magn Reson Med* 2005, 53: 312-320.

Honda M, Yamada Y, Tomonaga M et al: Correlation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. *Leuk Res* 2000, 24: 461-468.

Hong SC, Lee JH, Lee J, et al: Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *Int J Nanomed* 2011, 6: 3219-3231.

Horak D, Babic M, Jendelova P, et al: Effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling. *J Magn Magn Mater* 2009, 321: 1539-1547.

Hsu CY, Chiu YC, Hsu WL, Chan YP: Age-related markers assayed at different developmental stages of the annual fish *Nothobranchius rachovii*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008, 63: 1267-1276.

Iskandar A, Andersen ZJ, Bønnelykke K, et al: Coarse and fine particles but not ultrafine particles in urban air trigger hospital admission for asthma in children. *Thorax* 2012, 67:252-257.

Jain N, Naseem I, Ahmad J: Evaluation of DNA damage and metabolic syndrome parameters in diabetic rabbits supplemented with antioxidants. *Fundam Clin Pharmacol* 2009, 23: 197-205.

Jankowska AM, Gondek LP, Szpurka H et al: Base excision repair dysfunction in a subgroup of patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2008, 22: 551-558.

Jendelova P, Herynek V, DeCroos J, et al: Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med* 2003, 50: 767-776.

Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, et al: Aberrant methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 2009, 113: 1315-1325.

Jiménez-Garza O, Márquez-Gamiño S, Albores A, et al: CYP2E1 phenotype in Mexican workers occupationally exposed to low levels of toluene. *Toxicol Lett* 2012, 210:254-263.

Jošt P, Svobodová H, Štětina R: Induction and repair of DNA cross-links induced by sulfur mustard in the A-549 cell line followed by a comet assay. *Chem Biol Interact* 2015, 237: 31-37.

Karlic H, Herrmann H, Varga F, et al: The role of epigenetics in the regulation of apoptosis in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014, 90: 1-16.

Karlsson HL, Di Bucchianico S, Collins AR, Dusinska M: Can the comet assay be use reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? *Environ Mol Mutagen* 2015, 56: doi: 10.1002/em.21933.

Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L: Size-dependent toxicity of metal oxide particles — a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett* 2009, 188: 112-118.

Katsuki A, Sumida Y, Urakawa H, et al: Increased oxidative stress is associated with serum levels of triglyceride, insulin resistance, and hyperinsulinemia in Japanese metabolically obese, normal-weight men. *Diabetes Care* 2004, 27: 631-632.

Kelly RP, Poo Yeo K, Isaac HB, et al: Lack of effect of acute oral ingestion of vitamin C on oxidative stress, arterial stiffness or blood pressure in healthy subjects. *Free Radic Res* 2008, 42: 514-522.

Kerchich Y, Kerbachi R: Measurement of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene) levels at urban and semirural areas of Algiers City using passive air samplers. *J Air Waste Manag Assoc* 2012, 62:1370-1379.

Kikuchi S, Kobune M, Iyama S, et al: Improvement of iron-mediated oxidative DNA damage in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndrome by treatment with deferasirox. *Free Radic Biol Med* 2012, 53:643-648.

Knudsen LE, Norppa H, Gamborg MO, et al: Chromosomal aberrations in humans induced by urban air pollution: influence of DNA repair and polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and N-acetyltransferase 2. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 1999, 8: 303-310.

Kobayashi H, Larson K, Sharma RK, et al: DNA damage in cancer patients before tretment as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2001, 75: 469-475.

Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, et al: Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed* 2004, 17: 513-517.

Kristinsson SY, Bjorkholm M, Hultcrantz M, et al: Chronic immune stimulation might act as a trigger for the development of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2011, 29: 2897-2903.

Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J: Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur. J. Pharm Biopharm* 2009, 72: 370-377.

Kubinova S, Sykova E: Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2010, 19: 144-156.

Lagorio S, Tagesson C, Forastiere F, et al: Exposure to benzene and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative damage to DNA. *Occup Environ Med* 1994, 51: 739-743.

Lan TT, Minh PA: BTEX pollution caused by motorcycles in the megacity of HoChiMinh. *J Environ Sci (China)* 2013, 25:348-356.

Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F: Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations — many questions, some answers. *Mutat Res* 2009, 681: 241-258.

Landsiedel R, Ma-Hock L, Kroll A, et al: Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Adv Mater* 2010, 22: 2601-2627.

Langone JJ, Van VH: Radioimmunoassay of nicotine, cotinine, and gamma-(3-pyridyl)-gamma-oxo-N-methylbutyramide. *Methods Enzymol* 1982, 84: 628-640.

Lauer FT, Mitchell LA, Bedrick E, et al: Temporal-spatial analysis of U.S.-Mexico border environmental fine and coarse PM air sample extract activity in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009, 238:1-10.

Lehmann AR: The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev* 2001, 15: 15-23.

Leopardi P, Zijno A, Marcon F, et al: Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. *Environ Mol Mutagen* 2003, 41: 126-130.

Lewis SEM, Agbaje M: Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis* 2008, 23: 163-170.

Lewtas J: Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res* 2007, 636:95-133.

Lima MI, Arruda VO, Alves EV, et al: Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime. *Arch Toxicol* 2010, 84:227-232.

Lin X, Wood CG, Shao L et al: Risk assessment of renal cell carcinoma using alkaline comet assay. *Cancer* 2007, 110: 282-288.

Linnartz B, Anglmayer R,, Zanssen S: Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA alterations in acute leukemia developing from myelodysplastic syndromes. *Cancer Res* 2004, 64: 1966-1971.

Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, Azqueta A: The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis* 2013, 28: 427-432.

Lou J, He J, Zheng W et al: Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. *Mutat Res* 2007, 617: 104-110.

Lovel DP, Omori T: Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* 2008, 23: 171-182.

Lu AH, Salabas EL, Schuth F: Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007, 46: 1222-1244.

Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, et al: XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 2000, 21: 551-555.

Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, et al: The nanoparticle–protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv Colloid Interface Sci* 2007, 134-135: 167-174.

Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, et al: Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 2014, 8: 233-278.

Magdolenova Z, Lorenzo Y, Collins A, Dusinska M: Can standard genotoxicity tests be applied to nanoparticles? *J Toxicol Environ Health A Part A* 2012, 75: 1-7.

Manuguerra M, Saletta F, Karagas MR, et al: XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGe review. *Am J Epidemiol* 2006, 164: 297-302.

Marangon K, Devaraj S, Jialal I: Measurement of protein carbonyls in plasma of smokers and in oxidized LDL by an ELISA. *Clin Chem* 1999, 45: 577-578.

Masson Ch, Dunnill P: A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 2008, 3: 1-5,

Mateuca R, Aka PV, De Boeck M, et al: Influence of hOOG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicol Lett* 2005, 156: 277-288.

Matullo G, Palli D, Peluso M, et al: XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 2001, 22: 1437-1445.

McCann MJ, Gill CI, O' Brien G, et al: Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food Chem Toxicol* 2007, 45:1224-1230.

McGlynn AP, Wasson G, O'Connor J et al: The bromodeoxyuridine comet assay: detection of maturation of recently replicated DNA in individual cells. *Cancer Res* 1999, 59: 5912-5916.

McKelvey-Martin VJ, Ho ETS, McKeown SR et al: Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent *in situ* hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis* 1998, 13: 1-8.

McKenna DJ, McKeown SR, McKelvey-Martin VJ: Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* 2008, 23: 183-190.

Merchant SH, Gonchoroff NJ, Hutchison RE: Apoptotic index by Annexin V flow cytometry: adjunct to morphologic and cytogenetic diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Cytometry* 2001: 46: 28-32.

Miyamae Y, Iwasaki K, Kinae N, et al: Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using SCGE (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat Res* 1997, 393: 107-113.

Møller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H: The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9: 1005-1015.

- Møller P, Loft S, Ersson C, et al: On the search of an intelligible comet assay descriptor. *Frontiers in Genetics* 2014, 5: 1-4
- Møller P, Möller L, Godschalk RW, Jones GD: Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group. *Mutagenesis* 2010, 25: 25: 109-111.
- Møller P, Wallin H, Knudsen LE: Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biol Interact* 1996, 102: 17-36.
- Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96: 1-2.
- Montzka K, Fuhrmann T, Muller-Ehmsen J, Woltje M, Brook GA: Growth factor and cytokine expression of human mesenchymal stromal cells is not altered in an in vitro model of tissue damage. *Cytotherapy* 2010, 12: 870-880.
- Muller MR, Buschfort C, Thomale J et al: DNA repair and cellular resistance to alkylating agents in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 1997, 3: 2055-2061.
- Mundle SD: Lingering biologic dilemmas about the status of the progenitor cells in myelodysplasia. *Arch Med Res* 2003, 34: 515-519.
- Nagata S, Golstein P: The Fas death factor. *Science* 1995, 76: 959-962.
- Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, et al: Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and *de novo* acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000, 6: 4091-4095.
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N: Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006, 311: 622-627.
- Neri M, Milazzo D, Ugolini D, et al: Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. *Mutagenesis* 2015, 30: 155-163.
- Nielsen PS, de Pater N, Okkels H, Autrup H: Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers: effect of GSTM1 and NAT2 genotype on adduct levels. *Carcinogenesis* 1996, 17: 1021-1027.
- Nigam S, Schewe T: Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1488: 167-181.
- Novotná B, Neuwirtová R, Blažková V, Šišková M: Kometový test: princip metody a klinické aplikace. *Čas Lék Čes* 2001, 140: 761-766.
- Novotna B, Topinka J, Solansky I, et al: Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen. *Toxicol Lett* 2007, 172: 37-47.
- Obe G, Pfeiffer P, Savage .R, et al: Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 2002, 504: 17-36.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J: 2. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005, 113: 823-839.
- Olipitz W, Hoplinger G, Aguilar RC, et al: Defective DNA-mismatch repair : a potential mediator of leukemogenic susceptibility in therapy-related myelodysplasia and leukemia. *Genes, Chromosomes, Cancer* 2002, 34: 243-248.
- Olive PL, Durand RE, Jackson SM, et al: The comet assay in clinical practice. *Acta Oncol* 38, 1999, 839-844.

Olive PL, Durand RE, Leriche J et al: Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancer cancer. *Cancer Res* 1993a, 53: 733-736.

Olive PL, Frayer G, Banáth JP: Radiation induced apoptosis in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res* 1993b, 136: 130-136.

Olive PL, Trotter T, Banath JP, et al: Heterogeneity in human tumour hypoxic fraction measured using the comet assay. *Br J Cancer* 1996, 74: 191-195.

Olive PL: Detection of hypoxia by measurement of DNA damage in individual cells from spheroids and murine tumours exposed to bioreductive drugs, II. RSU 1069. *Br J Cancer* 71, 1995, 537-542.

Ong KJ, MacCormack TJ, Clark RJ, et al: Widespread nanoparticle-assay interference: Implications for nanotoxicity testing. *PLOS ONE* 2014, 9: e90650.

Östling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984, 123: 291-298.

Park KS, Lee HS, Kim YS, et al: Improved quantification of islet transplants by magnetic resonance imaging with Resovist. *Pancreas* 2011 40, 911-919.

Parker JE, Fishlock KL, Mijovic A, et al: 'Low-risk' myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro- versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *Br J Hematol* 1998, 103: 1075-1082.

Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, et al: The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* 2000, 96: 3932–3938.

Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, et al: Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *J Androl* 2001, 22: 316-322.

Peddie CM, Wolf R, McLellan L et al: Oxidative DNA damage in CD 34+ myelodysplastic cells is associated with intracellular redox changes and elevated plasma tumor necrosis factor- α concentration. *Br J Haematol* 1997, 99: 625-631.

Pedersen DU, Durant JL, Taghizadeh K, et al: Human cell mutagens in respirable airborne particles from the northeastern United States. 2. Quantification of mutagens and other organic compounds. *Environ Sci Technol* 2005, 39:9547-9560.

Pellegrini V, Gorbi G, Buschini A. Comet Assay on *Daphnia magna* in eco-genotoxicity testing. *Aquat Toxicol* 2014, 155:261-268.

Peluso G, Palmieri A, Cozza PP, et al: The study of spermatic DNA fragmentation and sperm motility in infertile subjects. *Arch Ital Urol Androl* 2013, 85: 8-13.

Pitz M, Schmid O, Heinrich J, et al: Seasonal and diurnal variation of PM2.5 apparent particle density in urban air in Augsburg, Germany. *Environ Sci Technol* 2008, 42:5087-5093.

Plasilová M, Zivny J, Jelinek J, et al: TRAIL (Apo21) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia* 2002, 16: 67-73.

Powers MP, Nishino H, Luo Y, et al: Polymorphisms in *TGF- β* and *TNF- α* are associated with the myelodysplastic syndrome phenotype. *Arch Pathol Lab Med* 2007, 131: 1789-1793.

Radu M, Munteanu MC, Petrache S, et al: Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells. *Biochim Pol* 2010, 57: 355-360.

Rajae-Bebahani N, Schmezer P, Risch A et al: Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2001, 95: 86-91.

Rajaguru P, Suba S, Palanivel N, Kalaiselvi K: Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ Mol Mutagen* 2003, 41: 85-91.

Rajapaksa R, Ginzton N, Rott LS, Greenberg PL: Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. *Blood* 1996, 88: 4275-42-87.

Rajeswari N, Ahuja YR, Malani U et al: Risk assessment in the first degree female relatives of breast cancer patients using alkaline Comet assay. *Carcinogenesis* 2000, 21: 557-561.

Rajeswari N: Biomonitoring individual risk in relatives of breast cancer patients by comet assay. *Ind J Hum Genet* 1995, 1: 33-41.

Rapp A, Bock C, Dittmar H, Greulich KO: Comet-fish used to detect UV-A sensitive regions in the whole human genome and on chromosome 8. *Neoplasma* 1999, 46: 99-101.

Raza A, Iverson N, Ali AM: Developments in the treatment of transfusion-dependent anemia in patients with myelodysplastic syndromes: epidemiology, etiology, genetics, and targeted therapies. *Adv Genom Genet* 2014, 4: 95-106.

Raza A, Mundle S, Shetty V, et al: A paradigm shift in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1996b, 10: 1648-1652.

Raza A, Mundle S, Shetty V, et al: Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *Int J Hematol* 1996a, 63: 265-278.

Rebbeck TR: Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotype GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 1997, 6: 733-743.

Reinecke SA, Reinecke AJ: The comet assay as a biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Arch Environ Contam Toxicol* 2004, 46: 208-215.

Risom L, Dybdahl M, Bomholdt J: Oxidative DNA damage and defence gene expression in the mouse lung after short-term exposure to diesel exhaust particles by inhalation. *Carcinogenesis* 2003, 24: 1847-1852.

Risom L, Møller P, Loft S: Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 2005, 592:119-137.

Rollison ED, Howlader N, Smith TM, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001–2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* 2008, 112: 45-52.

Romieu I, Castro-Giner F, Kunzli N, Sunyer J: Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *Eur Respir J* 2008, 31: 179-196.

Rössner P Jr, Svecova V, Milcova A, et al: Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers. *Mutat Res* 2007, 617: 23-32.

Rössner P Jr, Svecova V, Milcova A, et al: Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers. Part I. Oxidative damage to DNA. *Mutat Res* 2008a: 642: 14-20.

Rössner P Jr, Svecova V, Milcova A, et al: Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers. Part II. Oxidative damage to lipids and proteins. *Mutat Res* 2008b: 642: 21-27.

Rössnerova A, Spatova M, Rossner P, Solansky I, Sram RJ: The impact of air pollution on the levels of micronuclei measured by automated image analysis. *Mutat Res* 2009, 669: 42-47.

Rubes J, Selevan DP, Evenson D, et al: Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005, 20: 2776-2783.

- Rybar R, Kopecka V, Prinosilova P, Markova P, Rubes J: Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia* 2011, 43: 286-291.
- Rydberg B, Johanson KJ: Estimation of single strand breaks in single mammalian cells, in DNA repair mechanisms (Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF, editoři), Academic Press, New York 1978, 465-468.
- Saft L, Karimi M, Ghaderi M, et al: p53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q). *Haematologica* 2014, 99: 1041-1049.
- Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT: Fluorescence *in situ* hybridization with comets. *Exp Cell Res* 1997, 232: 407-411.
- Sawanobori M, Yamaguchi S, Hasegawa M, et al: Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2003, 27: 583-591.
- Schins RP, Knaapen AM: Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhal Toxicol* 2007, 19 (Suppl. 1): 189-198.
- Schnatter AR, Glass DC, Tang G, et al: Myelodysplastic syndrome and benzene exposure among petroleum workers: an international pooled analysis. *J Natl Cancer Inst* 2012, 104: 1724-1737.
- Senthilkumar S, Manju A, Muthuselvam P, et al: Characterization and genotoxicity evaluation of particulate matter collected from industrial atmosphere in Tamil Nadu state, India. *J Hazard Mater* 2014, 274:392-398.
- Sevastyanova O, Novakova Z, Hanzalova K, et al: Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutat Res* 2008, 649:179-186.
- Shetty V, Hussaini S, Broady-Robinson LM, et al: Intramedullary apoptosis of hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome patients can be massive: apoptotic cells recovered from high-density fraction of bone marrow aspirates. *Blood* 2000, 96: 1388-1392.
- Shetty V, Mundle S, Alvi S, et al: Measurement of apoptosis, proliferation and three cytokines in 46 patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1996, 20: 891-900.
- Shubayev VI, Pisanic TR 2nd, Jin S: Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv Drug Deliv Rev* 2009, 61: 467-477.
- Simon L, Liu L, Murphy K, et al: Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 2014, 29: 904-917.
- Singh A, Agarwal A: The role of sperm chromatin integrity and DNA damage on male infertility. *Open Reprod Sci J* 2011, 3: 65-71.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988, 175: 184-191.
- Singh NP, Muller CH, Berger RE: Effect of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003, 80: 1420-1430.
- Singh NP, Stephens RE, Singh H, Lai H: Visual quantification of DNA double-strand breaks in bacteria. *Mutat Res* 1999, 429: 328-337.
- Singh NP: Microgels for estimations of DNA strand breaks, DNA protein cross-links and apoptosis. *Mutat Res* 2000, 455: 111-127.

Singh R, Sram RJ, Binkova B, et al: The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat. Res.* 2007, 630: 83-92.

Singh VK, Patel DK, Singh J, et al: Blood levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in children and their association with oxidative stress indices. *An Indian perspective Clin Biochem* 2008, 41: 152-161.

Sivonova M, Zitnanova I, Hlincikova I, et al: Oxidative stress in university students during examinations. *Stress* 2004, 7: 183-188.

Smith CC, O'Donovan MR, Martin EA: hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDO III. *Mutagenesis* 2006, 21: 185-190.

Smith TR, Miller MS, Lohman KK et al: DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2003, 24: 883-889.

Snyder R, Hedli CC: An overview of benzene metabolism. *Environ Health Perspect* 1996, 104 (Suppl. 6): 1165-1171.

Soenen SJ, Himmelreich U, Nuytten N, De Cuyper M: Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials* 2011, 32: 195-205.

Soenen SJ, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M: High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small* 2010, 6: 832-842.

Span LF, Vierwinden G, Pennings AH, et al: Programmed cell death is an intrinsic feature of MDS progenitors, predominantly found in the cluster-forming cells. *Exp Hematol* 2005, 33: 435-442.

Spanswick V, Hartley J, Hartley J: Measurement of DNA inter-strand crosslinking in individual cells using the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. In: Fox Keith R (ed) *Drug-DNA interaction protocols*, *Meth Mol Biol* 613: 267-282, Humana Press, London, 2010.

Speit G, Schütz P, Bonzheim I et al: Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett* 2004, 15: 151-158.

Sram RJ, Binkova B, Beskid O: Biomarkers of exposure and effect-interpretation in human risk assessment. *Air Qual Atmos Health* 2011, 4:161-167.

Sram RJ, Rössner P, Rubes J, et al: Possible genetic damage in the Czech nuclear power plant workers. *Mutat Res* 2006, 593: 50-63.

Stadtman ER: Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci* 2001, 928: 22-38.

Sykova E, Jendelova P: In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2007, 161: 367-433.

Tanishima K, Kita M: High-performance liquid chromatographic determination of plasma ascorbic acid in relationship to health care. *J Chromatogr* 1993, 613: 275-280.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 206–21.

Tice RR, Strauss GH, Peters WP: High dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: Preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 1992, 271: 101-113.

Topinka J, Sevastyanova O, Binkova B, et al: Biomarkers of air pollution exposure – a study of policemen in Prague. *Mutat Res* 2007, 624: 9-17.

Toraason M, Hayden C, Marlow D, et al: DNA strand breaks, oxidative damage, and 1-OH pyrene in roofers with coal-tar pitch dust and/or asphalt fume exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 2001, 74: 396-404.

Tung EW, Philbrook NA, Macdonald KD, Winn LM: DNA double-strand breaks and DNA recombination in benzene metabolite-induced genotoxicity. *Toxicol Sci.* 2012, 126: 569-577.

Turnovcova K, Ruzickova K, Vanecek V, Sykova E, Jendelova P: Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated on different media. *Cytotherapy* 2009, 11: 874-885.

Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, et al: Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006, 23: 1379-1391.

Vaghef H, Nygren P, Edling C et al: Alkaline SCGE and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutat Res* 1997, 395: 127-138.

Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T.: Airborne particulate matter and Human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. 2008, *J Environ Sci Health, Part C* 26: 339–362.

Vallespi T, Imbert M, Mecucci C, et al: Diagnosis, classification and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 1998, 83:258-275.

van Buul GM, Kotek G, Wielopolski PA, et al: Clinically translatable cell tracking and quantification by MRI in cartilage repair using superparamagnetic iron oxides. *PLoS One* 2011, 6: e17001.

van de Loosdrecht AA, Brada SJ, Blom NR, et al: Mitochondrial disruption and limited apoptosis of erythroblasts are associated with high risk myelodysplasia. An ultrastructural analysis. *Leuk Res* 2001, 25: 385-393.

Vodicka P, Stetina R, Polakova V, et al: Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis* 2007, 28: 657-664.

Wagner W, Bork S, Horn P, et al: Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One* 2009, 4: e5846.

Wasson GR, McKelvey-Martin VJ, Downes CS: The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis* 2008, 23: 153-162.

Wegesser TC, Pinkerton KE, Last JA: California wildfires of 2008: coarse and fine particulate matter toxicity. *Environ Health Perspect* 2009, 117:893-897.

Weichenthal SA, Godri-Pollitt K, Villeneuve PJ: PM2.5, oxidant defence and cardiorespiratory health: a review. *Environ Health* 2013,12:40-48.

Wilhelm C, Billotey C, Roger J.: Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 2003, 24: 1001-1011.

Willie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activity. *Nature* 1980, 284: 555-556.

Wilson JT, Pascoe PL, Parry JM, Dixon DR: Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutat Res* 1998, 399: 87-95.

Wölfler A, Erkeland SJ, Bodner C, et al: A functional single-nucleotide polymorphism of the *G-CSF* receptor gene predisposes individuals to high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005, 105: 3731-3736.

- Xue W, Warshawsky D: Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. 2005, *Toxicol App. Pharmacol* 206: 73–93.
- Yan S, Wu B, Lin Z, et al.: Metabonomic characterization of aging and investigation on the antiaging effects of total flavones of *Epimedium*. *Mol Biosyst* 2009, 5: 1204-1213.
- Yang W, Omaye ST: Air pollutants, oxidative stress and human health. *Mutat Res* 2009, 674: 45–54.
- Yin B, Whyatt RM, Perera FP, et al.: Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *FreeRadic Biol Med* 1995, 18: 1023-1032.
- Zainol M, Stoute J, Almeida GM, et al: Introducing a true internal standard for the comet assay to minimize intra- and inter-experiment variability in measures of DNA damage and repair. *Nucleic Acid Res* 2009, 37: e150.
- Zhang Y, Zhang J: Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells. *J Colloid Interface Sci* 2005, 283: 352-357.
- Zhang ZG, Jiang Q, Zhang R, et al: Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann Neurol* 2003, 53: 259-263.
- Zhou Y, Levy JI: Between-airport heterogeneity in air toxics emissions associated with individual cancer risk thresholds and population risks. *Environ Health*, 2009, 8: 8-22.
- Zienolddiny S, Campa D, Lind H, et al: Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*, 2006, 27: 560-567
- Zijno A, Andreoli C, Leopardi P, et al: Folate status, metabolic genotype, and biomarkers of genotoxicity in healthy subjects. *Carcinogenesis* 2003, 24: 1097-1103.
- Zoli W, Ricotti L, Tesei A et al: Schedule-dependent cytotoxic interaction between epidoxorubicin and gemcitabine in human bladder cancer cells in vitro. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 1500-1507.