

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Charles University in Prague, Faculty of Science

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie (P1519)
Ph.D. study program: Molecular and Cell Biology, Genetics and Virology (P1519)

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**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**

Mgr. Yana Bagryantseva

Školitel/Supervisor: RNDr. Božena Novotná, CSc., Ph.D

Praha, 2015

OBSAH / CONTENTS

Abstrakt	3
<i>Abstract</i>	4
1. Úvod	5
2. Cíle studie	7
3. Materiál & metody	9
4. Výsledky & diskuse	11
5. Závěry	16
6. Použitá literatura/ <i>References</i>	18
1. <i>Introduction</i>	21
2. <i>Aims of the study</i>	23
3. <i>Materials & methods</i>	25
4. <i>Results & Discussion</i>	27
5. <i>Conclusions</i>	32
Životopis/ <i>Curriculum vitae</i>	34
Seznam publikací/ <i>Author's publications</i>	36

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 věněčkovými 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.

ÚVOD

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. 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 (Dušinská a Collins, 2008).

Při detekci apoptotického štěpení DNA vyvolaného radiací v linii lidských lymfoblastoidních buněk TK6 se jevil kometový test citlivější než klasické barvení apoptotických buněk Hoechstem 33342 (Olive et al, 1993b). V buňkách CHOK 1 odhalil kometový test apoptózu vyvolanou stauroporinem později než annexin V, ale dříve než TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling). 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).

V současné době je kometový test hojně využíván v genotoxikologii, především při testování nových léků, kosmetických přípravků a dalších chemikálií s potenciálně karcinogenním účinkem. Další oblastí jeho využití je biomonitoring 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. Alternativním přístupem může být testování škodlivých účinků látek znečišťujících určité prostředí na vhodných buněčných liniích v podmínkách *in vitro*. (Møller et al, 2000).

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 (Collins et al, 2014). 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). S postupující komercializací nanotechnologických produktů dramaticky narůstá i expozice lidské populace nanočásticím. S tím vyvstává i akutní potřeba hodnocení jejich toxického a genotoxického potenciálu. Srovnávací studie potvrdila, že kometový test je – při dodržení standardního protokolu – vhodnou metodou i k měření genotoxicity nanočástic (Karlsson et al, 2015).

Zvýšené hladiny poškození DNA a neefektivní opravné mechanismy hrají důležitou roli v patogenezi celé řady život ohrožujících onemocnění jako jsou nádory a degenerativní choroby. Velkou výhodou kometového testu při klinických aplikacích jsou nejen nízké nároky na množství analyzovaného materiálu, ale také možnost využít celou škálu buněčných typů. Kometový test byl již využit ke stanovení proporce hypoxických buněk v nádoru ve snaze určit optimální terapeutické dávky záření (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. Sledováno bylo poškození DNA v lymfocytech pacientů s nádorovým onemocněním a jejich zdravých příbuzných (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 (např. Herrero et al, 2015), 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). Velký ohlas z hlediska klinických aplikací získal kometový test také v oblasti reprodukční medicíny při hodnocení integrity DNA ve spermích (Gunasekara et al, 2015).

CÍLE STUDIE

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

(A) V hematologické problematice byla pozornost věnována myelodysplastickým syndromům (MDS), 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 refrakterní anémií (RA) a refrakterní anémií s věnečkovými sideroblasty (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 kontaminantám 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 superparamagnetickými nanočásticemi oxidů železa (SPIONy), což

umožňuje sledování těchto buněk v organismu pomocí magnetické resonance (MRI). Pozornost je také věnována syntéze nových typů SPIONů a analýze jejich povrchových a morfologických charakteristik, neboť je nezbytné zajistit nejen optimální účinnost značení pro MRI, ale i bezpečnost nanočástic pro biomedicínské aplikace. 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

MATERIÁL & METODY

Odběr vzorků.

Zdrojem buněk pro analýzu poškození DNA u pacientů s MDS a pro studium biologických účinků magnetických nanočástic byly aspiráty kostní dřeně (k.d.). 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 heparinizované 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 těžkým 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 restrikčních 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

VÝSLEDKY & DISKUSE

(A) Pomocí kometového testu byla v buňkách kostní dřeně pacientů s RA a RARS prokázána významně zvýšená fragmentace DNA oproti kontrolám stejného věku. Pacienti s RA přitom vykazovali inverzní vztah mezi rozsahem fragmentace DNA v buňkách k.d. a počtem zralých buněk v periferní krvi. Postižena byla zejména erytroidní frakce k.d., což korespondovalo s publikovanými údaji o zvýšené apoptóze u těchto subtypů MDS. Literární údaje o typu buněk postižených apoptózou ale nebyly jednotné. Někteří autoři detekovali zvýšenou buněčnou smrt v progenitorových buňkách k.d. CD34+ (např. Parker et al, 2000). Naše výsledky v glykoforin A+ populaci podpořily zjištění autorů, kteří předčasnou apoptózu pozorovali i ve zralejších buňkách CD34- (např. Albitar et al, 2002). Překvapivě jsme nezjistili 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 tedy zřejmé, že poškození DNA u pacientů s RARS zahrnuje i zlomy v DNA 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. Oxidace pyrimidinových nukleotidů již byla detekována v progenitorových CD 34+ buňkách k.d. pacientů s MDS (Peddie et al, 1997). V naší studii pacienti s RA i RARS měli v obou frakcích k.d. (tj. i v diferencovanějších buněčných typech CD34-) výrazně vyšší hladiny oxidačního poškození DNA než kontroly. 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 těchto subtypů MDS korelaci mezi sérovými hladinami ferritinu a ROS v periferních leukocytech a trombocytech. U našich pacientů jsme však podobný vztah nezaznamenali. Dalším zdrojem ROS v organismu může být zánět. Podle našich výsledků, přidružené zánětlivé onemocnění evidentně nebylo hlavním faktorem ovlivňujícím rozsah oxidačního poškození DNA v buňkách k.d. pacientů s RA a RARS. Lze však uzavřít, že u těchto subtypů MDS oxidační poškození DNA nepochybně přispívá ke zvýšené nestabilitě genomu a progresi onemocnění.

(B) 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. 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, 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 v kohortě všech analyzovaných subjektů hladiny Fpg- a EndoIII-senzitivních míst v DNA lymfocytů zvyšovaly v závislosti na stoupající expozici benzénu. Benzén tedy nepochybně indukoval oxidační poškození DNA v lymfocytech, rozdíly mezi skupinami nebyly zachyceny zřejmě v důsledku efektivní opravy tohoto poškození. Zvýšený výskyt DNA-SB u řidičů autobusů a zaměstnanců garáží by potom mohl odrážet jak probíhající excisní opravu oxidovaných lézí, tak jedno- a dvouřetězcové SB vznikající z neopravených nebo chybně opravených lézí DNA.

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 jsme jako hlavní příčinu zvýšené oxidace proteinů a lipidů identifikovali 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.

V souladu s publikovanými údaji, 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. Vyšší příjem vitamínu C a nižší věk tak zřejmě byly hlavní příčinou nízkých hladin 15-2F_t-IsoP u zaměstnanců garáží, i když byli vystaveni vysokým koncentracím k-PAU.

Odpověď jedince na škodlivé účinky environmentálních kontaminantů může být výrazně modifikována i jeho genetickou konstitucí. V naší studii 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 mikrojader v populaci pracovníků exponovaných prachu z těžkých kovů (Mateuca et al, 2005). Naproti tomu jedinci s variantním genotypem *XPD 23* (*Gln/Gln*) se v našem souboru 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). Protože jsou DNA-SB nezbytným předpokladem poškození na chromozomální úrovni, naše zjištění naznačuje, že nosiči *XPD 23* (*Gln/Gln*) exponovaní respirabilním PM by mohli být více ohroženi vznikem nádorů než jedinci s divokou alelou.

Přítomnost tzv. *null* alely *GSTM* je spojována s nižší schopností odolávat oxidačnímu stresu indukovanému PAU (Autrup, 2000). Výsledky populačních studií však nejsou jednotné. Analýza kodaňských řidičů autobusů odhalila signifikantní vztah mezi absencí *GSTM1* a zvýšeným výskytem chromozomálních aberací (Knudsen et al, 1999), zatímco dopravní policisté s variantou *GSTM null* vykazovali v lymfocytech dokonce nižší výskyt mikrojader 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.

(C) Mezi všemi testovanými typy nanočástic vykazovaly nejnižší účinnost ve značení buněk komerční kontrastní nanočástice Endorem, zatímco nanočástice potažené poly-L-lysinem a D manózou pronikaly do buněk nejúčinněji. Účinnost buněčného značení byla primárně determinována velikostí nanočástic a chemickým složením jejich povrchu.

Nejen různé typy SPIONů vykazovaly různou efektivitu buněčného značení, dokonce i tentýž typ nanočástic značil s rozdílnou účinností stromální buňky k.d. pocházející od dvou různých dárců. Výsledky tak naznačily, že i genotyp konkrétního dárce by mohl ovlivňovat účinnost transportu nanočástic do buněk. Podobně i odpověď buněk na působení SPIONů závisela na dárci.

Buňky od dárce č.1 vykazovaly signifikantní, i když jen krátkodobý pokles viability pouze při kultivaci s nanočásticemi s nejvyšší účinností značení a žádný typ testovaných nanočástic nezvyšoval počet 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 od dárce č. 1 znamenaly, že v podstatě žádný z testovaných typů nanočástic nepředstavuje závažné biologické riziko. Analýza buněk od dárce č. 2 ukázala poněkud odlišný obrázek. Téměř všechny SPIONy snižovaly viabilitu buněk a tento efekt byl ještě markantnější po následné kultivaci značených buněk v médiu bez nanočástic. Rovněž počet mrtvých buněk byl vyšší a následná kultivace značených buněk v médiu bez nanočástic nevedla ke zmírnění cytotoxických účinků. U komerčních nanočástic Endorem byl dokonce zaznamenán vyšší počet mrtvých buněk oproti předchozímu intervalu.

Odlišná odpověď kultur by mohla souviset s různým věkem dárců (téměř 40 let rozdíl), i když určitá variabilita v délce buněčného cyklu v závislosti na dárci 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 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 buňky od obou dárců 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) několiknásobně 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.

Naše výsledky tak 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 kmenových buněk v hostiteli. Je zřejmé, že intracelulární koncentrace SPIONů jsou stále příliš vysoké. K zajištění bezpečnosti nanočástic pro biomedicínské aplikace je proto třeba 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*.

ZÁVĚRY

Hlavní závěry práce, které zároveň naplňují stanovené cíle, jsou následující:

(A)

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. U pacientů s RA kometový test zachycoval zejména apoptotické štěpení DNA, zatímco u pacientů s RARS detekované poškození DNA zahrnovalo i zlomy neapoptotického původu.

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 DNA tak nepochybně přispívá ke zvýšené nestabilitě genomu a progresi onemocnění.

(B)

Jak řidiči městské autobusové dopravy, tak zaměstnanci garáží byli vystaveni vyšším koncentracím k-PAU a benzénu v ovzduší než kontrolní skupina. V porovnání s kontrolami měly obě exponované skupiny zvýšené oxidační poškození DNA a proteinů, pouze řidiči autobusů však současně vykazovali i známky zvýšené peroxidace lipidů. Výskyt oxidovaných lézí v DNA periferních lymfocytů narůstal se stoupající expozicí benzénu a zvýšené hladiny triglyceridů v plazmě zvyšovaly riziko toho poškození.

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 zvýšeným koncentracím k-PAU.

Rozsah poškození DNA ovlivňovaly i polymorfismy v genech kódujících enzymy opravných mechanismů DNA. Přítomnost alespoň jedné mutantní alely *hOGG1* (*Cys*) v genotypu zvyšovala riziko oxidačního poškození DNA, zatímco homozygotní konstituce *XPD23* (*Gln/Gln*) zvyšovala riziko vzniku DNA-SB.

Varianta *GSTM1 null* spojená s deficiencí metabolického enzymu II. fáze glutathion-S-transferázy vykazovala protektivní účinky na integritu DNA.

(C)

Mezi všemi testovanými typy magnetických nanočástic vykazovaly nejnižší účinnost ve značení mesenchymálních kmenových buněk lidské kostní dřene komerční kontrastní nanočástice Endorem. Naopak nejefektivněji pronikaly do buněk SPIONy potažené poly-L-lysinem a D manózou.

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.

Naše výsledky jednoznačně prokázaly schopnost všech typů testovaných 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.

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.

POUŽITÁ LITERATURA

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

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

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.

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.

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

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

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.

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.

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

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.

- Karlsson HL, Di Bucchianico S, Collins AR, Dusinska M: Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? *Environ Mol Mutagen* 2015, 56: doi: 10.1002/em.21933.
- 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 Biomarkers Prev* 1999, 8: 303-310.
- Langone JJ, Van VH: Radioimmunoassay of nicotine, cotinine, and gamma-(3-pyridyl)-gamma-oxo-N-methylbutyramide. *Methods Enzymol* 1982, 84: 628-640.
- Leopardi P, Zijno A, Marcon F, et al: Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of tradic wardens: effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. *Environ Mol Mutagen* 2003, 41: 126-130.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96: 1-2.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Rössner P Jr, Svecova V, Milcova A, et al: Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers. *Mutat Res* 2007, 617: 23-32.
- 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.
- 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.
- Sram RJ, Rössner P, Rubes J, et al: Possible genetic damage in the Czech nuclear power plant workers. *Mutat Res* 2006, 593: 50-63.
- Tanishima K, Kita M: High-performance liquid chromatographic determination of plasma ascorbic acid in relationship to health care. *J Chromatogr* 1993, 613: 275-280.
- 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.
- 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.
- 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.

INTRODUCTION

Single cell gel electrophoresis (SCGE) or comet assay is a method for detection and quantitation of DNA breaks at the level of individual cells. These breaks may result from direct interaction between the genotoxic agents and DNA or during the repair of induced lesions. Failed or defective repair usually triggers an apoptotic process which is also characterized by specific fragmentation of DNA. The action of genotoxic compounds is associated not only with the induction of DNA breaks but also with the base alterations. To increase its sensitivity and specificity, the comet assay is combined with lesion-specific repair enzymes. Their application on cells after lysis leads to formation of breaks in sites of damaged bases (Dušinská and Collins, 2008).

Compared to standard staining with Hoechst 333 42, the comet assay appeared to be more sensitive for detection of radiation-induced apoptosis in the human lymphoblastoid cell line TK6 (Olive et al, 1993b). In the CHOK 1 cells the comet assay revealed staurosporine-induced apoptosis later than annexin V, but earlier than TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling). In contrast to TUNEL, the comet assay failed to detect late apoptotic cells characterized by simultaneous labeling with annexin V and propidium iodide (Goddard et al, 1999).

At present, the comet assay is frequently used in genotoxicology for testing of new drugs, cosmetics and other compounds with potentially carcinogenic effects. Biomonitoring of subjects occupationally or environmentally exposed to harmful compounds represents another field for comet assay application. In this case, the biological samples collected from residents of polluted areas or subjects exposed during working hours are examined by comet assay and the results are compared with the levels of DNA damage in control subjects with the aim to identify and minimize the risk factors. Testing the harmful effects of environmental contaminants on suitable cell lines *in vitro* represents an alternative approach (Møller et al, 2000).

Comet assay is also used for studies aimed to the impact of particular diseases on DNA quality, investigation of individual variability in capacity of repair mechanisms or monitoring the changes induced by diet intervention, such as antioxidant intake (Collins et al, 2014). In ecogenotoxicology, the comet assay is applied to follow the influence of environmental factors on genetic material

of wild animals or to monitor the changes in the levels of DNA damage in relation to changes of ecological conditions (Møller, 2005). Advance in commercialization of nanotechnology products dramatically increases the risk of human exposure to nanoparticles. This is associated with urgent need to assess the toxic and genotoxic potential of engineered nanomaterials. Recent comparative study has confirmed the suitability of comet assay for measurement of nanoparticle genotoxicity (Karlsson et al, 2015).

Increased levels of DNA damage as well as ineffective repair mechanisms play an important role in pathogenesis of many life threatening diseases, such as malignant and degenerative diseases. Not only the low requirements on the amount of examined material, but also the possibility to analyze a wide scale of cell types represent a great advantage predetermining comet assay for clinical applications. The method has been already used for assessment of hypoxic cell proportion in the tumors with the aim to ascertain an optimal therapeutic dose of irradiation (Olive et al, 1996). Another approach involves monitoring of DNA damage in oncological patients during the treatment in order to judge the efficiency of therapy or recommend the change of individual therapeutic regime according to actual patient condition. To search for persons predisposed to carcinogenesis, the DNA damage in lymphocytes of patients with cancer and their healthy relatives was analyzed using comet assay (Rajeswari et al, 2000). Alternatively, the efficiency of repair mechanism was studied in oncological patients (Herrero et al, 2015) or the susceptible subjects were identified on the basis of association between the genetic polymorphisms in genes coding for repair enzymes and the repair efficiency of radiation and oxidative DNA damage (Vodička et al, 2007). With respect to clinical applications, the method has been widely accepted especially in reproductive medicine for the measurement of DNA integrity in sperms (Gunasekarana et al, 2015).

AIMS OF THE STUDY

The work is based upon the use of comet assay in hematology, biomonitoring and nanotoxicology.

(A) Within hematological research, the attention was paid to myelodysplastic syndromes (MDS) because the current knowledge suggests that the oxidative stress, acquired DNA lesions and the efficiency of DNA repair play an important role in pathogenesis and clinical course of these diseases. We focused on patients with refractory anemia (RA) and refractory anemia with ring sideroblasts (RARS), i.e. the subtypes with high levels of apoptosis in bone marrow cells, with the aim to:

- ✓ compare the levels of non-specific (DNA-SB) and oxidative damage to DNA in erythroid (glycophorin A+) and myeloid (glycophorin A-) bone marrow fractions from patients with RA, RARS and control subjects
- ✓ detect any differences between the two subtypes of MDS
- ✓ verify whether the results of comet assay correlate with the patient clinical status and laboratory findings

(B) In the field of biomonitoring, DNA damage in the lymphocytes of city bus drivers, garagemen and control subjects was evaluated using comet assay in order to:

- ✓ determine the extent of non-specific (DNA-SB) and oxidative DNA damage in the particular groups in relation to personal exposure to air pollutants
- ✓ compare the results of the comet assay with the levels of 8-oxodG in urine of monitored people and biomarkers of oxidative damage to lipids and proteins
- ✓ identify the impact of genetic and non-genetic factors on the levels of DNA damage

(C) The Department of Neuroscience at the Institute of Experimental Medicine AS CR has long been engaged in developing the therapeutic procedures facilitating the recovery of central nervous system after the traumatic injury, ischemia or degenerative disease. For these purposes, bone marrow stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are

used which allows the tracking of transplanted cells within organism by magnetic resonance imaging (MRI). To warrant the optimal labeling efficiency for MRI as well as the safety of nanoparticles for biomedical applications, the attention is paid also to design of new types of SPIONs and analysis of their surface and morphological characteristics. Within this issue, the comet assay was used in order to:

- ✓ determine the levels of DNA-SB and oxidative damage to DNA, proteins and lipids in human bone marrow mesenchymal stem cells labeled with SPIONs varying in their surface and compare them with the results obtained in unlabeled cells
- ✓ identify the most promising type of SPION for clinical applications

MATERIALS & METHODS

Subjects and collection of samples

Source of cells for analysis of DNA damage in MDS patients and study the biological effects of magnetic nanoparticles were bone marrow aspirates. Samples were maintained in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma, Germany) at 4 °C until further processing (maximum 24 hours).

For human biomonitoring, urine and heparinized blood were collected from bus drivers working in the center of Prague and garagemen, always at the end of personal monitoring. The control group consisted of administrative workers of Transportation Authority of the City of Prague. After collection, the samples were coded and transported at 4 °C for further processing.

Sample processing

Isolation of mononuclear cells

Mononuclear cells (MNCs) were isolated from bone marrow or blood by density gradient centrifugation over Histopaque-1077 or Ficoll-Paque PLUS according to the manufacturer's instructions (Sigma, Germany).

Separation of erythroid and myeloid fractions of bone marrow

Bone marrow mononuclear cells were labeled using magnetic beads with antibody against glycophorin A and erythroid and myeloid fraction were separated using a miniMACS magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec, Germany). MNCs from blood were diluted with freezing medium and stored at -80°C (Novotná et al, 2007).

Comet assay

Alkaline version of the comet assay was combined with enzymes EndoIII and Fpg (Sigma, Německo) for detection of oxidative damage to DNA (Singh et al, 1988; Collins 2004, Novotná et al, 2007).

Other methods

Cultivation and labeling of human mesenchymal bone marrow stem cells with magnetic nanoparticles (Turnovcova et al, 2009)

Efficiency of cell labeling with SPIONs – counting the number of Prussian blue-stained and unstained nanoparticle-labeled cells

Cell viability – WST-1 colorimetric assay based on the cleavage of the tetrazolium salt 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (Roche Diagnostics, Germany).

Cell death – Annexin V/propidium iodide labeling was performed according to the manufacturer's protocol.

Individual exposure to c-PAHs – personal samplers equipped with filters collecting PM 2.5 were carried by the study participants for 48 h (Binkova et al, 2007), quantitative chemical analysis of c-PAHs was performed according to the EPA method (EPA Report 1999) in the certified laboratory ALS Czech Republic, Prague.

Individual exposure to traffic-related volatile compounds was measured using Radiello® radial diffusive samplers (Supelco, PA, USA) carried by the study participants for 24 h, the analysis was performed by capillary gas chromatography with flame ionization detector technique detection in the certified laboratory ALS Czech Republic, Prague.

Assessment of urinary 8-oxodG – competitive ELISA (Yin et al, 1995;. Rössner et al, 2007)

Assessment of lipid peroxidation – F_{2t}-IsoP immunoassay kit (Oxford, MI, USA) according to manufacturer's instructions

Assessment of protein oxidation – protein carbonyl assay, noncompetitive ELISA (Buss et al, 1997; Marangon et al, 1999; Rössner et al, 2007)

Genotyping – PCR (polymerase chain reaction) and RFLP (restriction fragment length polymorphisms) (Binková et al, 2007;. Sram et al, 2006).

Determination of other analyzed variables – the levels of vitamins A, C and E were analyzed by HPLC with UV detection (Driskell et al, 1982; Tanishima a Kita, 1993), the plasma levels of LDL and HDL cholesterol and triglycerides were determined spectrophotometrically using Sigma diagnostic kits and appropriate standards, urinary levels of cotinine were analyzed by radioimmunoassay according to Langone a Van (1982) and the creatinine levels were measured in urine by reaction with picric acid (Jaffe method)

Statistical analysis – software GraphPad Prism 2.01, Statistica 7.0 a SAS 9.1

RESULTS & DISCUSSION

(A) The results of comet assay demonstrated significantly increased DNA fragmentation in bone marrow cells of patients with RA and RARS when compared to controls of the same age. The patients with RA exhibited an inverse relationship between the extent of DNA breakage in b.m. cells and the number of mature cells in the blood. Especially the erythroid fraction of b.m. was affected which corresponded with the generally accepted concept about an increased apoptosis in these MDS subtypes. Nevertheless, the published data about the cell type preferentially subjected to apoptosis are contradictory. Some authors detected an increased cell death in progenitor CD34+ b.m. cells (e.g. Parker et al, 2000). Our results in glycophorin A+ population supported the finding of researchers that observed premature apoptosis also in more advanced CD34- cell types (e.g. Albitar et al, 2002). Surprisingly, we did not find any relationship between the results of comet assay and cytopenia in patients with RARS, although their levels of DNA fragmentation in b.m. cells markedly exceeded not only the control values, but also the values detected in patients with RA. Apparently, the DNA damage in RARS involves also DNA breaks of non apoptotic origin.

The presence of ring sideroblasts with iron deposits in mitochondria represents the key feature discerning RARS and RA. High content of iron could contribute to oxidative stress and, subsequently, to induction of oxidative damage to DNA of b.m. cells. Oxidation of pyrimidine nucleotides in progenitor CD34+ b.m. cells of patients with MDS has already been reported (Peddie et al, 1997). In our study, both RA and RARS patients exhibited in both b.m. fractions (i.e. including the CD34- cells) considerably higher levels of oxidative DNA damage than the controls. In consequence of ineffective hematopoiesis, many RA and RARS patients depends on blood transfusions which may lead to iron overload and, subsequently to ROS production and damage to biological macromolecules. In agreement with this assumption, Ghoti et al. (2007) observed in these MDS subtypes correlation between the serum levels of ferritin and ROS in peripheral lymphocytes and thrombocytes. In our patients we did not find any similar relationship. Inflammation represents another possible source of ROS in organism. According to our results, associated inflammation apparently was not responsible for the extent of DNA oxidative damage in b.m. cells of RA and RARS patients. In any

case, oxidative damage to DNA undoubtedly contributes to increased genome instability and disease progression.

(B) The results of personal monitoring demonstrated that the bus drivers and garagemen were exposed to higher concentrations of c-PAH than the controls. This was probably the main cause of increased DNA breaks in lymphocytes of both exposed groups. On the other hand, the levels of Fpg- a EndoIII-sensitive sites did not differ between the groups, although the levels of urinary 8-oxodG in exposed subjects significantly exceeded control values. The difference between the two methods used for demonstration of oxidative damage could be responsible for this discrepancy. While the amount of urinary 8-oxodG involves the repair products of oxidized guanine in DNA and cell pool from the whole organism, the results of comet assay combined with enzymes of excision repair reflect a broad spectrum of oxidized purines and pyrimidines, but only in lymphocyte DNA (Møller et al, 2000). In our cohort of all analyzed subjects, the levels of Fpg- and EndoIII sensitive sites in lymphocyte DNA increased with increasing exposure to benzene. Hence, the benzene undoubtedly induced oxidative DNA damage and the difference between the groups was not detected probably due to effective repair of this damage. Increased levels of DNA-SB in bus drivers and garagemen could than reflect an ongoing excision repair of oxidized lesions as well as the single- and double-SB arising from unrepaired or incorrectly repaired DNA lesions.

Long-term exposure to air pollutants may also damage to the other biological macromolecules. In our study, both bus drivers and garagemen showed higher levels of oxidized proteins in plasma than the controls. However, only the bus drivers simultaneously exhibited also the marks of increased lipid peroxidation because increased levels of 15-2F_{2t}-IsoP were detected in their urine. In this case, the c-PAH were identified as a main cause of increased oxidation of proteins and lipids. In contrast to DNA, these macromolecules lack the fast repair mechanisms. As a result, the induced lesions accumulate so that even the effect of relatively low concentrations of c-PAH may manifest.

In agreement with published data, advanced age and increased LDL cholesterol levels belonged in our study to factors contributing to higher risk of lipid oxidative damage, while the high levels of vitamin C had an opposite effect. Higher intake of vitamin C and younger age were probably the main

cause of low levels of 15-2_{Ft}-IsoP in garagemen despite that they were exposed to high concentrations of c-PAH.

Also the genetic constitution may significantly modify the response of individual to harmful effects of environmental pollutants. In our study, the carriers of at least one mutant allele *hOGG1* (*Ser/Cys* or *Cys/Cys*) exhibited higher levels of oxidative damage than the subjects with wild genotype (*Ser/Ser*). Similar results were obtained in study aimed to the incidence of micronuclei in workers exposed to dust from heavy metals (Mateuca et al, 2005). In contrast, the individuals with variant genotype *XPB 23* (*Gln/Gln*) in our cohort appeared to be more susceptible to the induction of DNA-SB than heterozygotes (*Lys/Gln*) and homozygotes with wild allele (*Lys/Lys*). Similarly, Matullo et al. (2001) observed in population of healthy nonsmokers an association between the variant allele *XPB 23* and increased incidence of DNA adducts. As the DNA-SB represent necessary prerequisite of damage at chromosomal level, our finding suggests, that the carriers of *XPB 23* (*Gln/Gln*) exposed to respirable particulate matter could be more susceptible to carcinogenesis than the subjects with wild allele.

The presence of *null GSTM* allele has been associated with lower resistance to PAH-induced oxidative stress (Astrup, 2000). The population studies, however, gave contradictory results. Analysis of bus drivers in Copenhagen revealed significant relationship between the *GSTM1* absence and increased incidence of chromosomal aberrations (Knudsen et al, 1999), while the traffic policemen with *GSTM null* variant exhibited even a lower incidence of micronuclei in lymphocytes than their counterparts with active enzyme (Leopardi et al, 2003). Similarly, our previous study suggested relationship between the *GSTM* deficiency and mild protective effect on the levels of DNA-SB in lymphocytes of city policemen (Novotná et al, 2007). The same relationship was observed in the present study.

(C) Among all tested SPIONs, the commercial Endorem exhibited the lowest efficiency of cell labeling while SPIONs coated with poly-L-lysine or D mannose internalized most effectively. Nanoparticle size and chemical composition of their surface were the main factors influencing the efficiency of cell labeling.

Not only the various types of SPIONs exhibited the different efficiency of cell labeling, but also the same type of SPION labeled with different efficiency the stromal b.m. cells obtained from different donors. These results suggested

that also the genotype of particular donor could influence the efficiency of nanoparticle transport into the cell.

Similarly, the response of cells to the action of SPIONs was donor-dependent. The cells from donor 1 exhibited significant decrease of cell viability only in culture most efficiently labeled with nanoparticles and none of tested SPIONs increased the number of dead cells above the control values.

For a long time, the absence of acute toxic effects has been considered as a confirmation of biocompatibility of tested nanoparticles. According to these criteria, our results obtained with cells from donor 1 should imply that none of the tested SPIONs represent serious biological risk. However, the analysis of cells from donor 2 showed a somewhat different picture. Almost all types of SPIONs decreased cell viability and this effect was even more pronounced after the subsequent growth of labeled cells in medium without nanoparticles. Also the cell death was higher and subsequent cultivation of cells in medium without SPIONs did not alleviate the cytotoxic effects. The cells labeled with commercial contrast agent Endorem exhibited even a higher incidence of dead cells in comparison with preceding interval.

The different responses of the cultures could be primarily linked to different ages of cell donors (almost 40 year difference), although the donor-related variability in the length of cell cycle might play some role as well. On the other hand, it is generally accepted that the nanoparticle protein „corona“, a dynamic layer of proteins and other biomolecules that adsorbs to nanoparticle surfaces immediately upon contact with living systems, mediates the interaction of nanoparticles with the cellular machinery rather than the nanomaterial itself (Lynch et al, 2007). Hence, differences in the composition of the intracellular environment due to disparate genotypes must be also taken into consideration when explaining the different responses of our cultures.

It has been stated that the induction of high ROS levels, although perhaps not toxic to cells as such, could have long term effects and should be considered as a hazard (Soenen et al, 2011). Indeed, in our experiments, the cells from both donors exhibited high levels of oxidative damage to lipids, proteins and DNA as a consequence of nanoparticle exposure and, in general, no improvement occurred during the subsequent growth of cells in medium without nanoparticles. The effect was most apparent in the lipids of the exposed cells. The levels of 15-F_{2t}-IsoP (a marker of lipid peroxidation)

exceeded the control values several-fold and markedly increased even further during the subsequent interval. This could be associated with the accumulation of induced lesions because lipids lack fast repair mechanisms.

In conclusion, our results unambiguously demonstrated capability of SPIONs to induce long-term oxidative stress inside the cells. Oxidative damage to lipids, proteins and DNA was detected even in absence of acute cell toxicity which could impair therapeutic functions of stem cells in the host. Apparently, the intracellular concentrations of SPIONs were too high. To warrant the safety of nanoparticles for biomedical applications, the concentrations of intracellular label should be decreased to minimum necessary for MRI. Attention should be simultaneously paid to the possible consequences of oxidative stress induced by SPIONs under *in vivo* conditions.

CONCLUSIONS

The main conclusions of the Ph.D. thesis are as follows:

(B)

In agreement with the concept of increased apoptosis in low-risk MDS subtypes, the results of comet assay demonstrated in b.m. cells of patients suffering from this disease considerably increased DNA instability in comparison with control subjects. While in patients with RA the comet assay detected mostly an apoptotic DNA fragmentation, in patients with RARS the observed DNA damage involved an additional breaks of non-apoptotic origin.

Patients with low-risk MDS exhibited in erythroid and myeloid fraction of b.m. significantly higher levels of oxidative DNA damage than the control subjects. In this respect, RA and RARS subtypes did not differed. Hence, oxidative damage to DNA undoubtedly contributes to increased genomic instability of the patients and disease progression.

(B)

Both city bus drivers and garagemen were exposed to higher concentrations of c-PAHs and benzene than the control group. Compared to controls, the exposed groups showed an increased oxidative damage to DNA and proteins, only bus drivers exhibited simultaneously the marks of increased lipid peroxidation. The incidence of oxidized lesions in lymphocyte DNA correlated with exposure to benzene and plasma triglycerides increased the risk of this damage.

Oxidative damage to lipids and proteins was associated with exposure to c-PAHs and the lipid peroxidation levels positively correlated with age and LDL cholesterol, and negatively with vitamin C. A higher intake of vitamin C and a younger age probably represented the main factors responsible for the low levels of urinary 15-2_{ft}-IsoP in the garagemen despite their increased exposure to c-PAHs.

Also the polymorphisms in genes coding for enzymes of DNA repair modified the extent of DNA damage. The presence of at least one *hOGG1* (*Cys*) allele in

genotype increased the risk of oxidative damage to DNA, while *XPD23 (Gln/Gln)* homozygotes were more susceptible to induction of DNA breaks. *GSTM1 null* variant seemed to protect DNA integrity.

(C)

Among all tested SPIONs, the commercial contrast agent Endorem exhibited the lowest efficiency in labeling of human mesenchymal bone marrow stem cells. In contrast, the SPIONs coated with poly-L-lysine and D-mannose entered the cells the most efficiently.

Labeling efficiency depended not only on the type of nanoparticle , but also on cell origin which suggests that the genotype of particular donor could influence the efficiency of nanoparticle transport into the cells.

Our results unambiguously demonstrated capability of all tested SPIONs to induce long-term oxidative stress in cells. This was evident even in the case when the standard tests on cell viability and cell death did not indicate any harmful effects. Hence, the absence of acute toxicity cannot be considered as an evidence of SPION biocompatibility.

Lowering intracellular label concentrations and authenticating oxidative stress levels using in vivo experiments are required to ensure the safety of SPIONs for biomedical applications.

ŽIVOTOPIS/CURRICULUM VITAE

Mgr. Yana Bagryantseva

červenec, 2015

Kontakty

Adresa pracoviště: Ústav experimentální medicíny AV ČR
Oddělení genetické ekotoxikologie
Václavská 1083, 142 20 Praha 4

Telefon: +420 241 062 209

E-mail: yanvalbag@gmail.com

Vzdělání:

1998-2003 Státní univerzita Dálného Východu, Vladivostok, Ruská federace
Fakulta ekologie, mořské biologie a biotechnologie
Katedra ekologie

2006 – současnost: Přírodovědecká fakulta UK v Praze, doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Vědecká práce:

2001 - 2003 Diplomová práce: Chemical and Ecological assessment of Mercury content in Environmental components of Sea of Japan (Pacifický vědecko- výzkumnický rybářský ústav, Vladivostok, Ruská federace)

2003 - 2005 Studium vlivů škodlivých látek na mořské organismy a monitorování jejich stavu pomocí kometového testu
Pacifický oceánologický ústav, Vladivostok, Ruská federace
Oddělení geochemie a ekologie oceánu
Laboratoř mořské ekotoxikologie

2006 – současnost Dizertační práce: Využití kometového testu při měření integrity DNA v klinice a aplikovaném výzkumu

Spoluúčast na řešení projektů:

IGA MZd ČR – grant č. NR8265-3/2005; MŽP ČR – grant č. SP/1b3/08/08; GA ČR grant č. P304/12/1370 a institucionální grant AV0Z50390512

Konference

Y. Bagryantseva, B. Novotná, M. Šišková, R. Neuwirtová: Oxidační poškození DNA v buňkách kostní dřeně pacientů s myelodysplastickým syndromem.

32. pracovní dny České a Slovenské společnosti pro mutagenезi zevním prostředím Čsl. biol. spol., Brno, ČR, 5.-7.5.2009. *Přednáška*

Y. Bagryantseva, B. Novotná, I. Solanský, R.J. Šrám: Impact of air pollution on DNA damage of bus drivers in Prague. The 3rd Central and Eastern Europe Conference on Health and the Environment, Cluj – Napoca, Romania, 19.-22. 10 2008. *Poster*

B. Novotná, M. Kapcalová, P. Rössner Jr., K. Turnovcová, Y. Bagryantseva, P. Jendelová, E. Syková: Oxidační poškození mezenchymálních kmenových buněk lidské kostní dřenež značených *in vitro* různými typy nanočástic oxidu železa. 31. pracovní dny České a Slovenské společnosti pro mutagenезi zevním prostředím Čsl. biol. spol., Brno, 12.-14.5.2008.

Y. Bagryantseva, B. Novotná, M. Šišková, R. Neuwirtová: Zvýšené oxidační poškození DNA v buňkách kostní dřenež pacientů s myelodysplastickým syndromem typu refrakterní anémie. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky a 40. výroční cytogenetická konference, Praha. ČR 19.-21. září 2007, *Poster*

Absolvované kurzy a přednášky

Kurz „Základy vědecké práce“, 2007, Praha, Česká republika.

Kurz „Pokroky v molekulární biologii a genetice“, 2007, Praha, Česká republika.

Základy molekulární biologie, 2008, Praha, Česká republika.

Buněčné cykly a signály, 2008, Praha, Česká republika.

Molekulární biologie, 2009, Praha, Česká republika.

SEZNAM PUBLIKACÍ/AUTHOR'S PUBLICATIONS

Publikace s IF, které jsou součástí dizertační práce:

- Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles.
Novotna B, Jendelova P, Kapcalova M, Rossner P Jr, Turnovcova K, Bagryantseva Y, Babic M, Horak D, Sykova E.
Toxicol Lett. 2012 Apr 5;210(1):53-63.
IF 3.145
- Oxidative damage to biological macromolecules in Prague bus drivers and garagemen: impact of air pollution and genetic polymorphisms.
Bagryantseva Y, Novotna B, Rossner P Jr, Chvatalova I, Milcova A, Svecova V, Lnenickova Z, Solansky I, Sram RJ.
Toxicol Lett. 2010 Nov 10;199(1):60-68.
IF 3.581
- Oxidative DNA damage in bone marrow cells of patients with low-risk myelodysplastic syndrome.
Novotna B, Bagryantseva Y, Siskova M, Neuwirtova R.
Leuk Res. 2009 Feb;33(2):340-343.
IF 2.358
- DNA instability in low-risk myelodysplastic syndromes: refractory anemia with or without ring sideroblasts.
Novotna B, Neuwirtova R, Siskova M, Bagryantseva Y.
Hum Mol Genet. 2008 Jul 15;17(14):2144-2149.
IF 7.249