

GENOTOXICITA A ZMĚNY V GENOVÉ EXPRESI INDUKOVANÉ PŮSOBENÍM ORGANICKÝCH LÁTEK Z PRACHOVÝCH ČÁSTIC V OVZDUŠÍ

Kateřina Hanzalová

**Oddělení genetické ekotoxikologie
Ústav experimentální medicíny AV ČR v.v.i.**

k.hanzalova@biomed.cas.cz

ÚVOD

- Prachové částice v ovzduší (PM) – na povrchu nesou směs genotoxických látek, mj. **PAU** a jejich deriváty.
- Mechanismy působení těchto komplexních směsí látek v organismu nejsou přesně objasněny.

Cíl studie:

- Zhodnocení genotoxicity org.látek z PM v ovzduší.
- Studium změn v genové expresi v odpovědi na působení těchto látek u dvou různých linií plicních buněk.



ODBĚRY PRACHOVÝCH ČÁSTIC Z OVZDUŠÍ

- Částice $PM_{2,5}$ ($<2,5 \mu m$) odebrány v lokalitách: **Ostrava – Bartovice**, **Ostrava – Poruba**, **Karviná**, **Třeboň**
- V lokalitě **Praha – Libuš** odebrány z tech. důvodů PM_{10} ($<10 \mu m$)
- Odběry velkoobjemovými čerpadly probíhaly po **30 - 35 dnů** (po 24h výměna filtrů) v zimním období 2008/2009

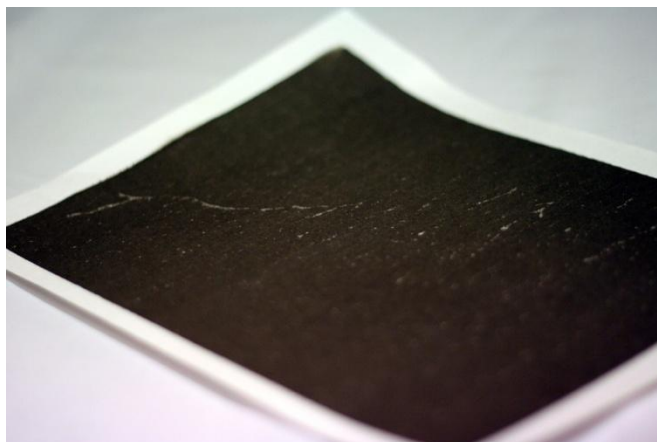


Odběrové zařízení

CHARAKTERISTIKY ODEBRANÝCH ČÁSTIC

Lokalita	Období odběru	Objem vzduchu [m ³]	PM _{2,5} [μg/m ³]	B[a]P [ng/m ³]	k-PAU [ng/m ³]
Ostrava-Bartovice	03/2009	29 900	36,7	13,6	81,6
Ostrava-Poruba	03/2009	35 200	25,8	4,28	27,2
Karviná	04/2009	47 400	n.a.	1,88	12,1
Třeboň	11-12/2008	44 700	11,4	1,11	7,92
Praha-Libuš	02/2009	47 900	27,2*	1,57	9,26

* Odebrány PM₁₀.



Filtr z Ostravy- Bartovic
z ledna 2010 po cca 3 h
expoziice



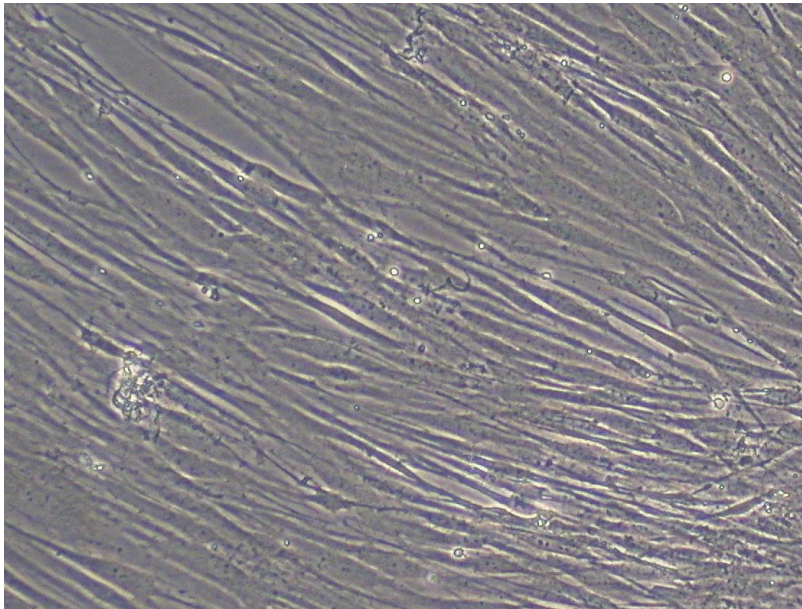
EXTRAKCE ORG. LÁTEK Z FILTRŮ

- Extrakci org. hmoty z filtrů dichlormetanem a chemickou analýzu PAU provedla firma ALS Czech Republic s.r.o.
- Dichlormetan byl odpařen pod dusíkem
- Odparky rozpuštěny v DMSO v koncentraci 50 mg/ml a následně přidány do kultivačního média k buňkám

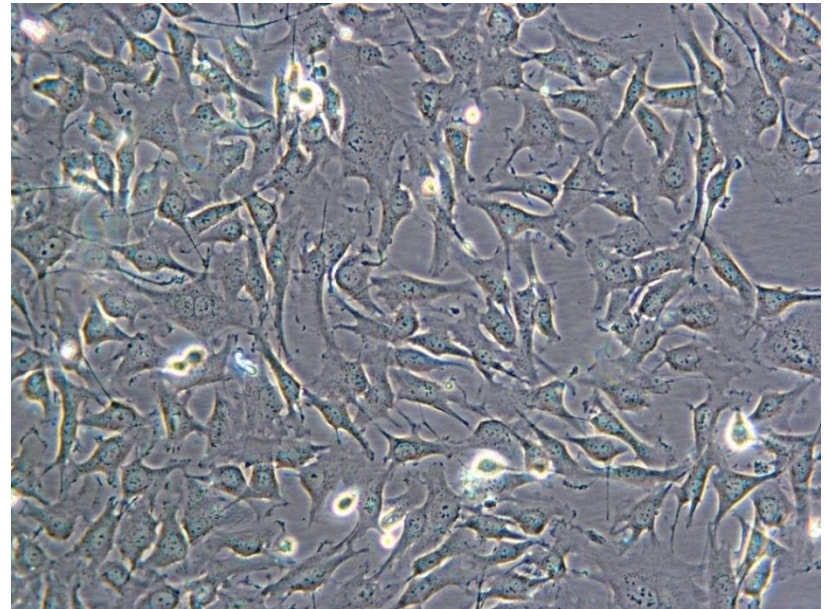


BUNĚČNÉ LINIE

Buňky HEL – lidské embryonální plicní fibroblasty



Buňky A549 – buňky lidského alveolárního adenokarcinomu



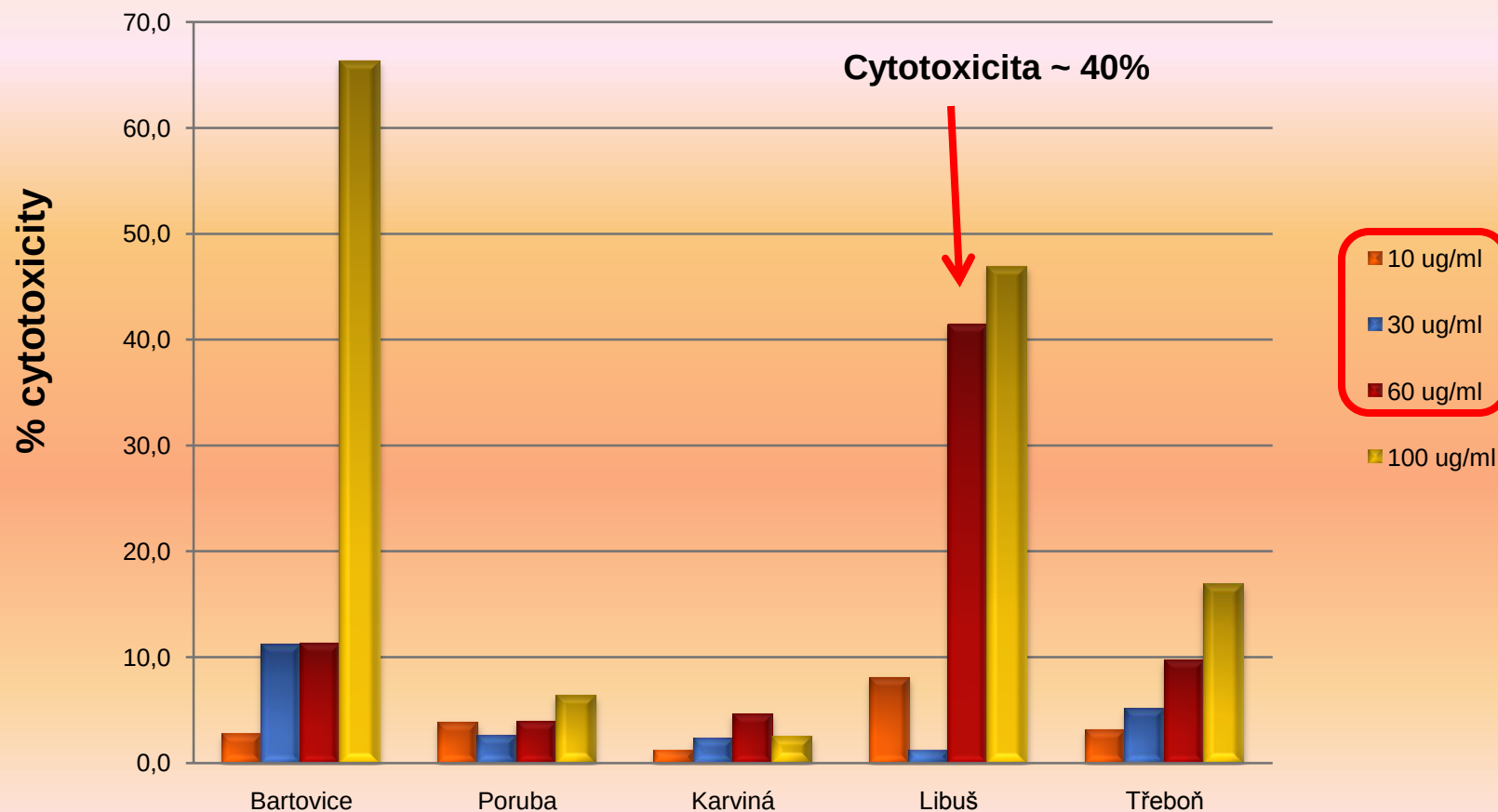
IN VITRO INKUBACE

- Obě buněčné linie inkubovány po **24 h** se všemi 5 extrakty org.látek (EOM) v koncentracích: **10, 30 a 60 µg/ml**
- Tyto koncentrace EOM = **sub-toxické** (až na Libuš – 60 ug/ml)
- Po skončení inkubace buňky sklizeny a následně provedeny analýzy: stanovení genotoxicity (hladiny **aduktů DNA**) a analýza **genové exprese** na celogenomových čípech

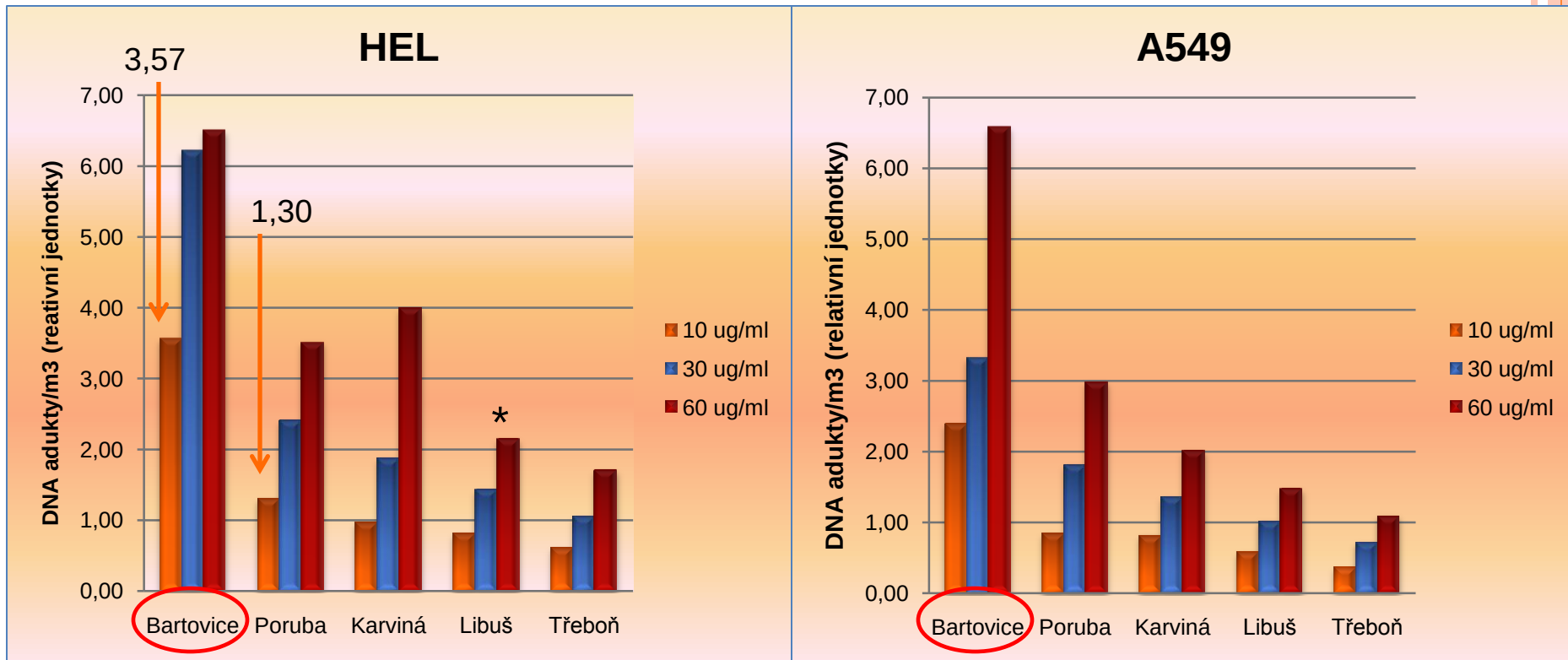


CYTOTOXICITA TESTOVANÝCH EOM

Cytotoxicita HEL



GENOTOXICITA - DNA ADUKTY



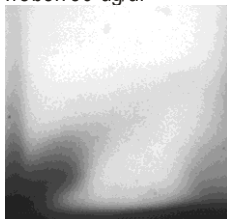
* Cytotoxicita ~ 40%

DNA adukty stanoveny metodou ³²P-postlabeling a vizualizovány autoradiograficky.

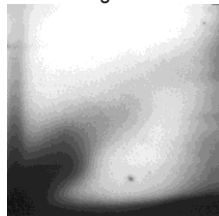
AUTORADIOGRAMY

HEL buňky

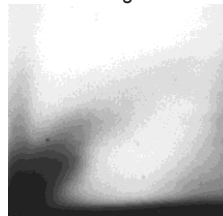
Trebon 30 ug/ul



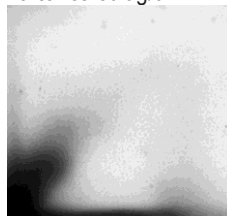
Libuš 30 ug/ul



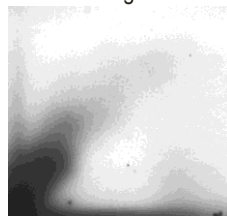
Karvina 30 ug/ul



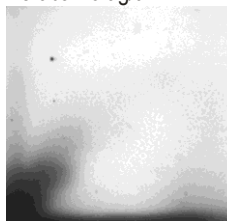
Bartovice 30 ug/ul



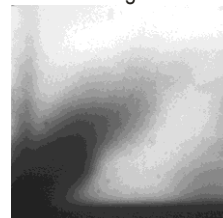
Poruba 30 ug/ul



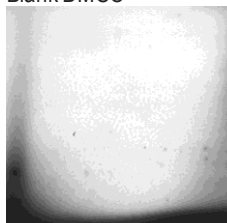
Poruba 10 ug/ul



Poruba 60 ug/ul

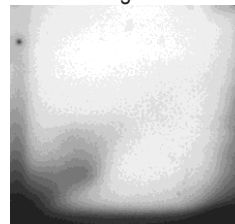


Blank DMSO

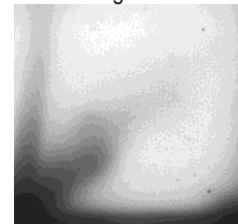


A549 buňky

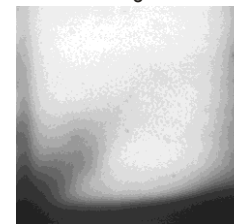
Trebon 30 ug/ul



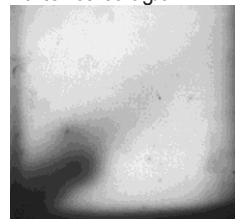
Libuš 30 ug/ul



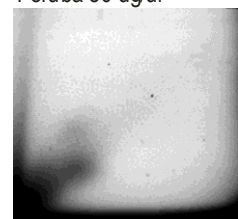
Karvina 30 ug/ul



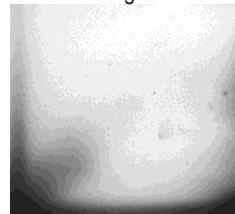
Bartovice 30 ug/ul



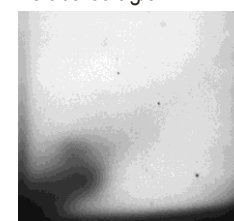
Poruba 30 ug/ul



Poruba 10 ug/ul



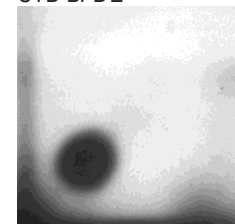
Poruba 60 ug/ul



Blank DMSO



STD BPDE



GENOVÁ EXPRESE

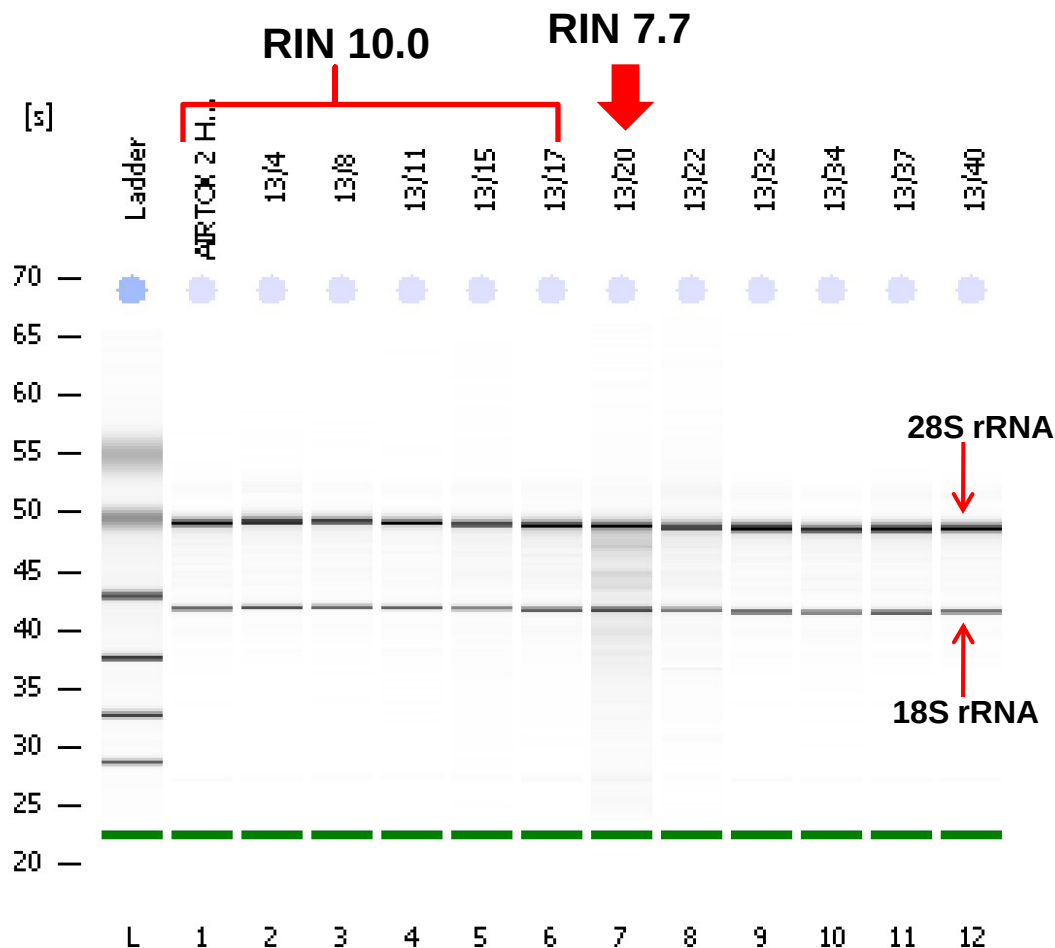
Izolace RNA

- Z buněk vyizolována **celková RNA** pomocí kolonek
- **Kvalita RNA ověřena:**
 - spektrofotometricky – míra čistoty RNA dána poměry vlnových délek **260/280** a **260/230**
 - Stanovením **RIN** (RNA integrity number) na Agilent 2100 Bioanalyzeru. RIN nabývá hodnot **0-10**.



INTEGRITA RNA

Mikrofluidní elektroforéza



Vzorky RNA

- RINy v rozmezí 7.3 - 10.0
- Naprostá většina v rozmezí 9.0 - 10.0



RNA čip

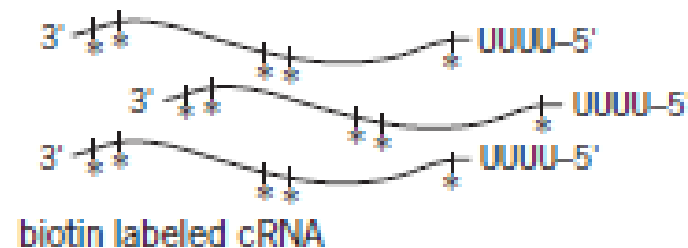
IN VITRO TRANSKRIPCE (IVT)

1. Reverzní transkripce

- Přepis mRNA do cDNA (Ambion kit)
 - syntéza 1. vlákna – oligo(d)T primery + reverzní transkriptáza
 - syntéza 2. vlákna – DNA polymeráza, RNáza H

2. IVT

- Přepis cDNA do cRNA + zabudování biotinem značených UTP



HYBRIDIZACE NA ČIPY

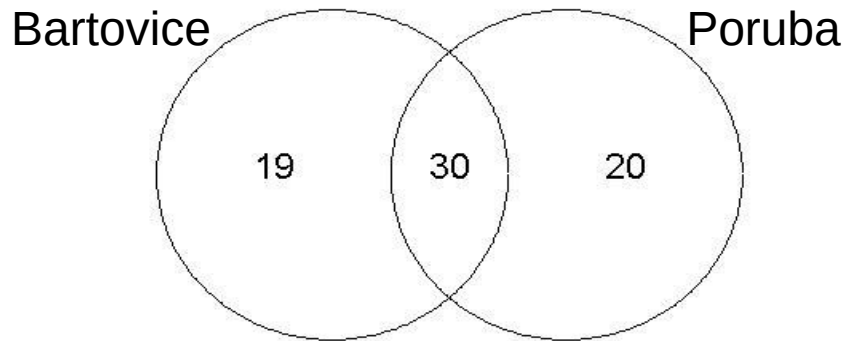
- Hybridizace cRNA vzorků na čipy – Human – HT – 12 v3 Expression Bead Chips – 12 vzorků na čip – **celogenomová** expresní analýza: přes 25 000 dobře anotovaných genů – 48 804 prób (NCBI & UniGene databáze)
- Fluorescenční značení – **streptavidin-Cy3**
- Skenování – Illumina Bead Array Reader
- Analýza dat



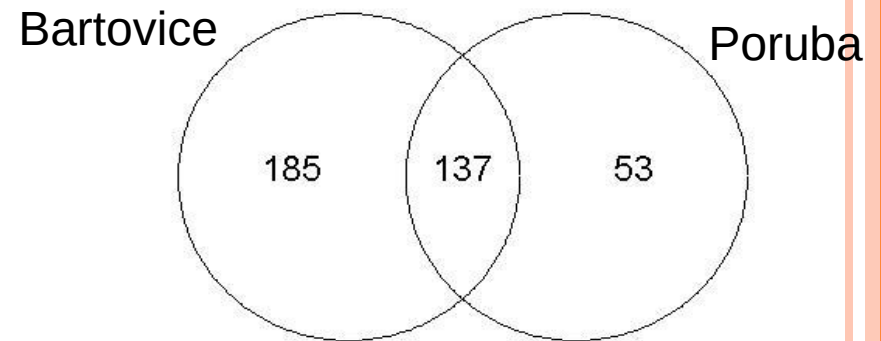
POČTY DEREГУLOVANÝCH GENŮ BARTOVICE VS. PORUBA

HEL buňky

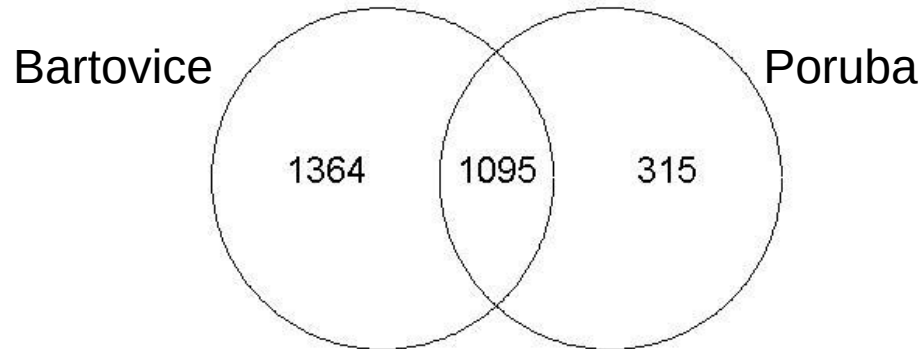
10 µg/ml



30 µg/ml



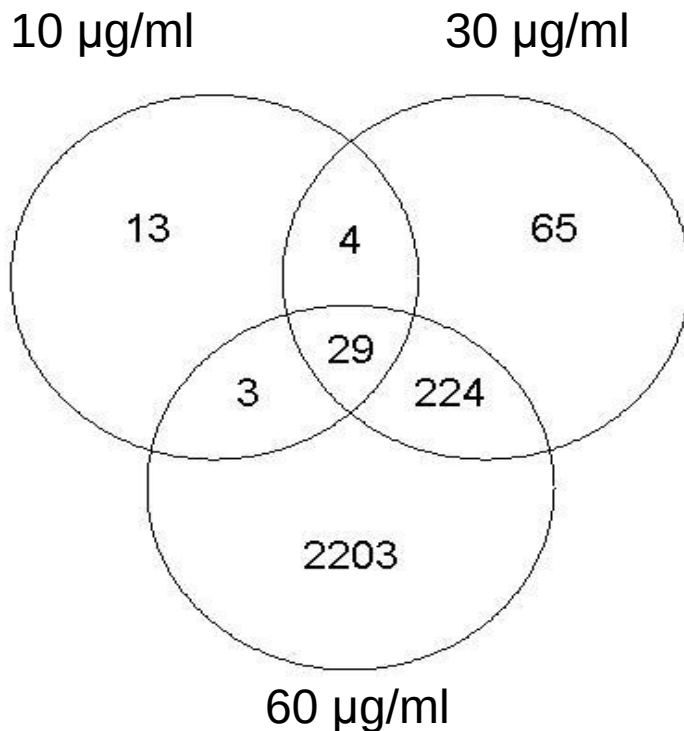
60 µg/ml



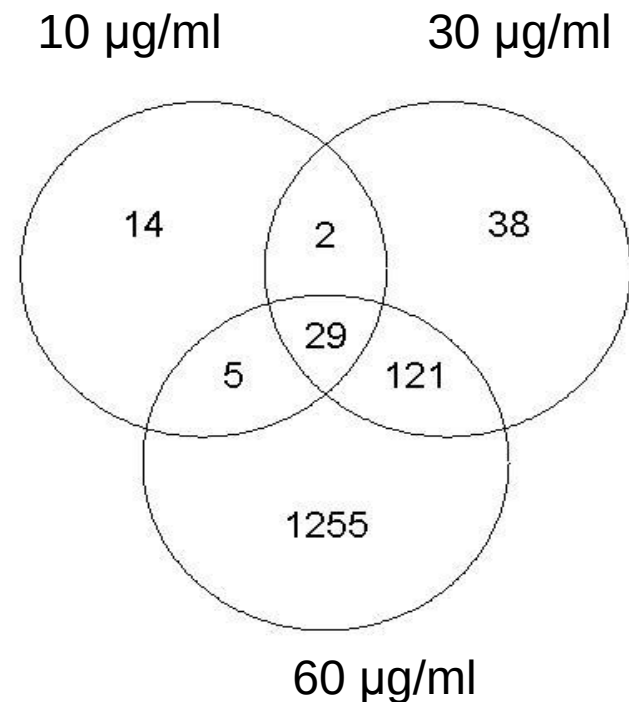
POČTY DEREGULOVANÝCH GENŮ BARTOVICE VS. PORUBA

HEL buňky

Bartovice



Poruba

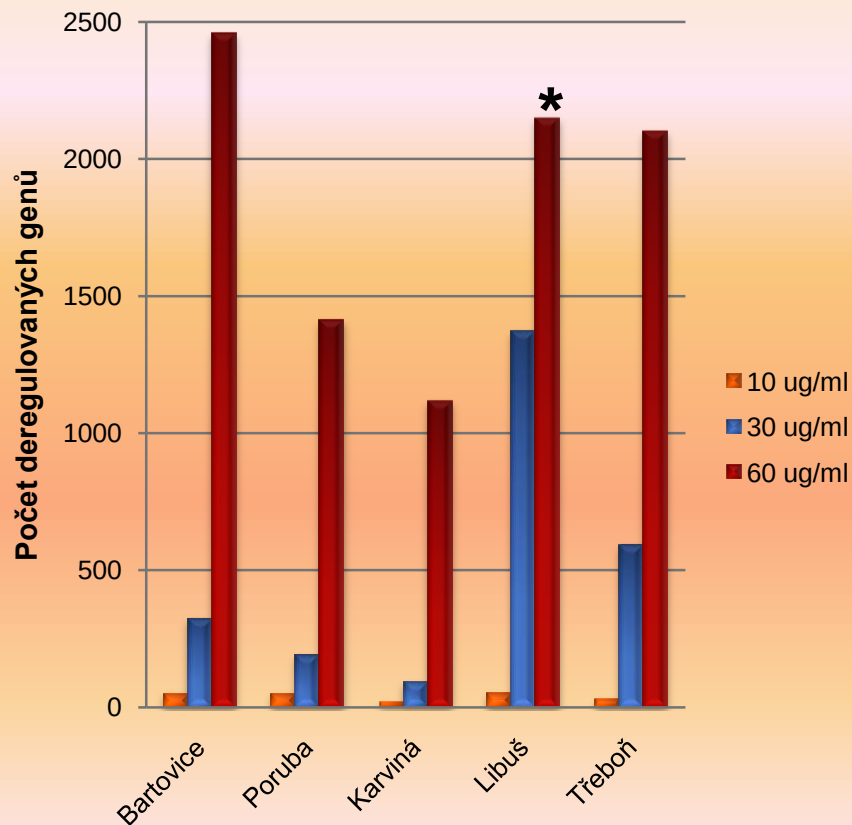


POČTY DEREGULOVANÝCH GENŮ

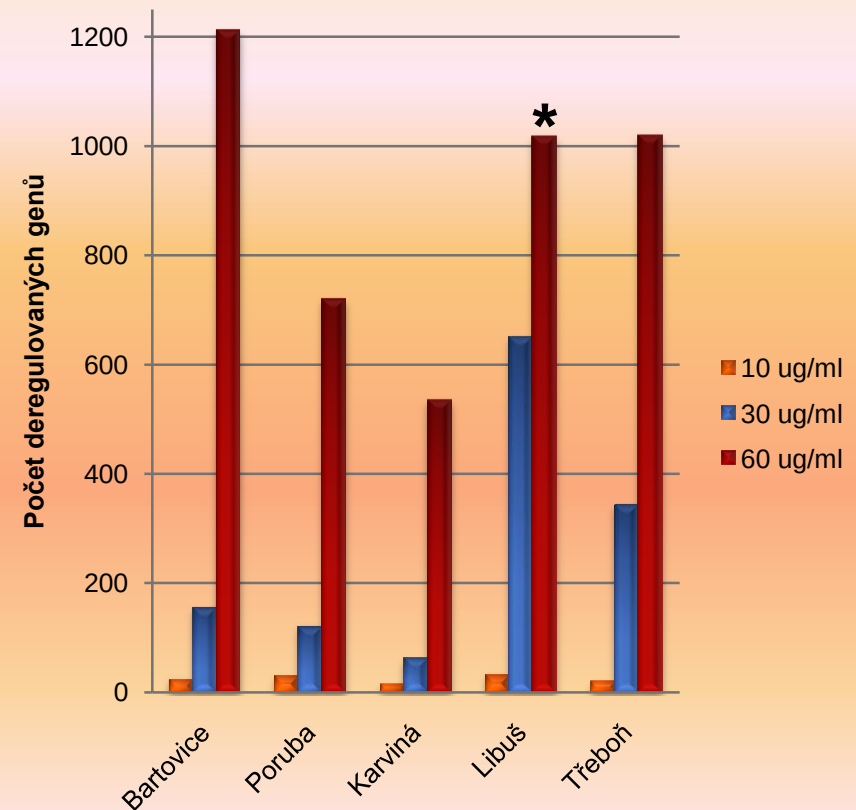
Před korekcí

Po korekci na dostatečnou
změnu hladin exprese (100%)

HEL

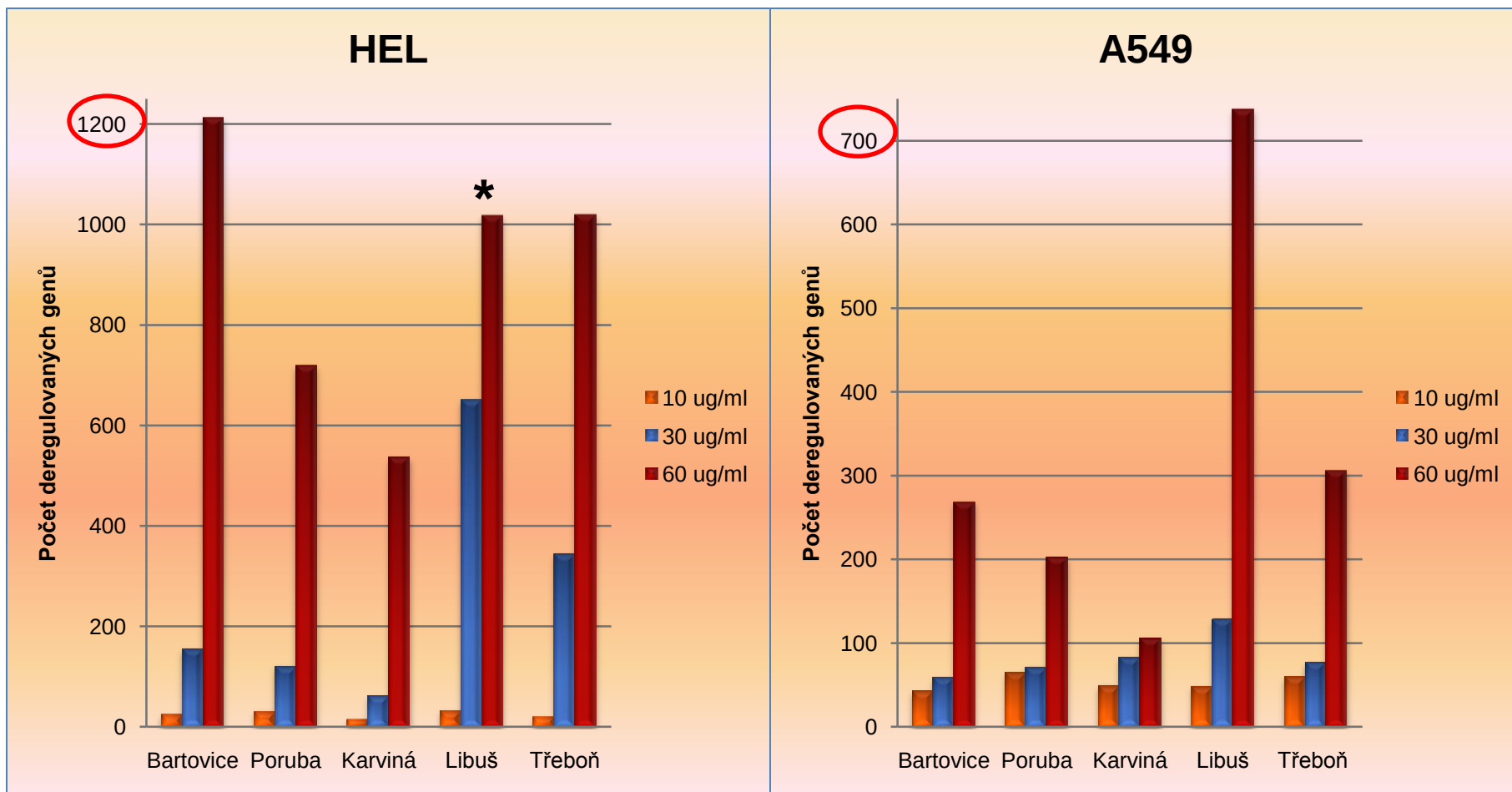


HEL



* Cytotoxicita ~ 40%

POČTY DEREGULOVANÝCH GENŮ PO KOREKCI NA $\pm 100\%$ ZMĚNU EXPRESE



* Cytotoxicita ~ 40%

ZÁVĚRY

- Testy genotoxicity ukázaly dávkovou závislost hladin DNA aduktů na koncentraci EOM u obou linií plicních buněk
- **EOM z Bartovic – několikanásobně vyšší genotox.potenciál než EOM z Poruby a ostatních lokalit – odpovídá několikanásobně vyššímu obsahu B[a]P a k-PAU v ovzduší Bartovic**
- Podobně předběžné výsledky analýzy genové exprese ukazují zvýšený počet deregulovaných genů se zvyšující se koncentrací EOM
- Další analýzy budou následovat: **identifikace deregulovaných biologických drah, ověření hladin vybraných deregulovaných genů pomocí qPCR, analýza oxidačního poškození lipidů a proteinů a především detailní porovnání lokalit – hl. Bartovic a Poruby**



PODĚKOVÁNÍ

H. Líbalová

E. Tulupova

A. Milcová

J. Schmuczerová

V. Stránecký

J. Topinka

R.J. Šrám

Projekt financován Granty MŠMT (2B08005) a AV ČR
(AVOZ 50390512)



DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST!

