



PROGRAM OSTRAVA VÝSLEDKY VÝZKUMU 2010

Radim J. Šrám



**Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha
KŽP AV ČR, Praha, 22. 11. 2010**

ZNEČIŠTĚNÍ OVZDUŠÍ 2009

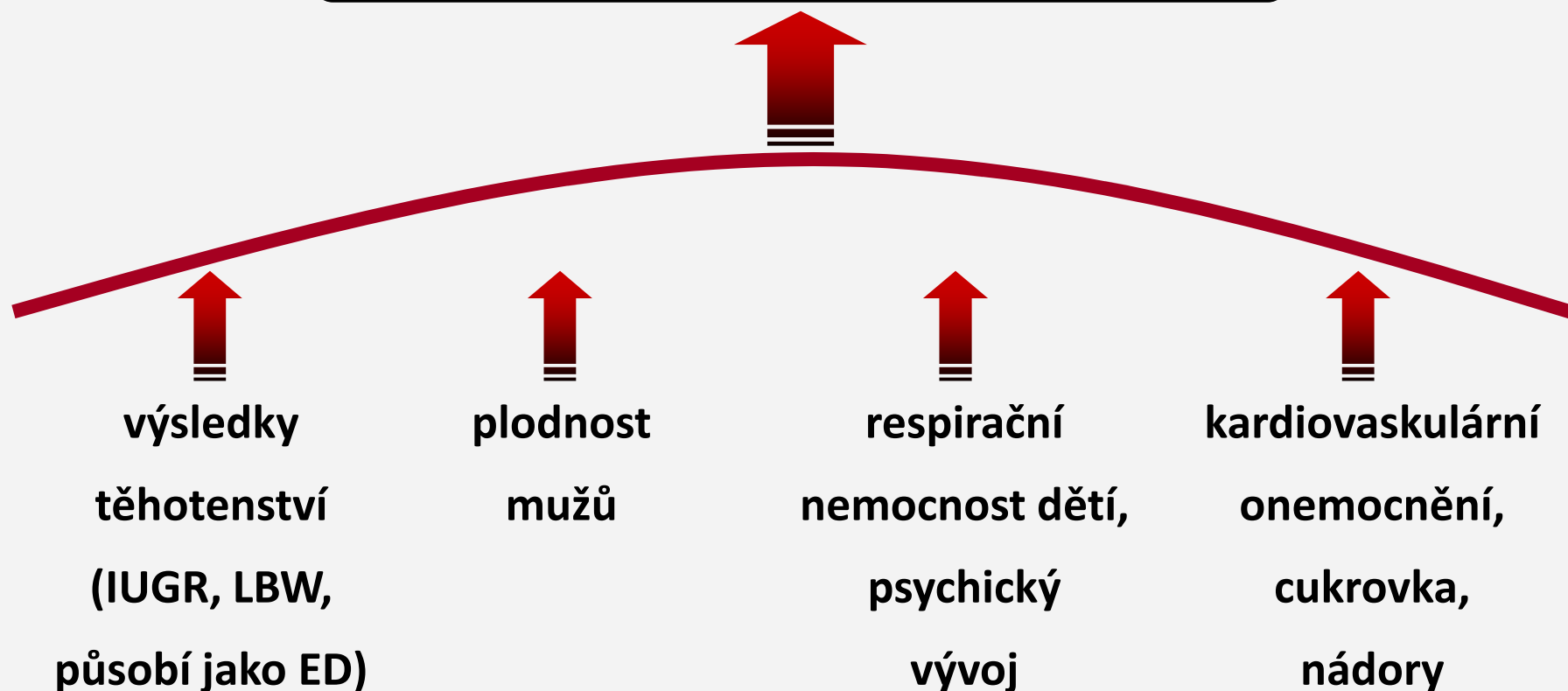
(ČHMÚ)

Lokalita	PM10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	PM2.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	B[a]P ng/m^3
Ostrava-Poruba	34.0 ± 28.1	27.6 ± 21.1	3.3 ± 1.0
Ostrava-Bartovice	47.6 ± 42.1	$35.1 \pm 29.$	9.2 ± 4.2
Karviná	44.7 ± 36.8	X	7.4 ± 2.0
Havířov	43.9 ± 35.9	X	X
Praha-Smíchov	30.5 ± 25.1	22.1 ± 18.4	0.9 ± 0.4
Praha-Libuš	25.4 ± 21.9	18.7 ± 15.9	0.8 ± 0.4
České Budějovice	23.0 ± 19.7	17.4 ± 14.5	1.4 ± 0.5
Prachatice	31.8 ± 17.2	28.1 ± 9.2	1.4 ± 2.1

x - neměřeno

VÝZNAM k-PAU VE ZNEČIŠTĚNÉM OVZDUŠÍ

RIZIKO PRO LIDSKÉ ZDRAVÍ



VÝSLEDKY MOLEKULÁRNĚ EPIDEMIOLOGICKÝCH STUDIÍ

(genomová frekvence translokací-FISH, mikrojadérka, fragmentace DNA ve
spermiích)

koncentrace
> 1 ng B[a]P/m³
v ovzduší

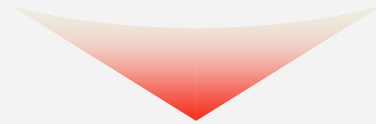


RIZIKO PRO LIDSKÉ ZDRAVÍ

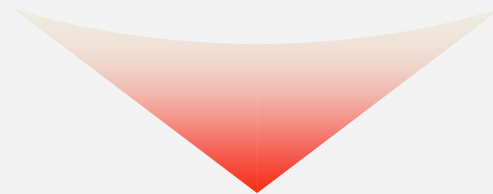


(WHO Bonn 6. 11. 2009)

POŠKOZENÍ GENOMU



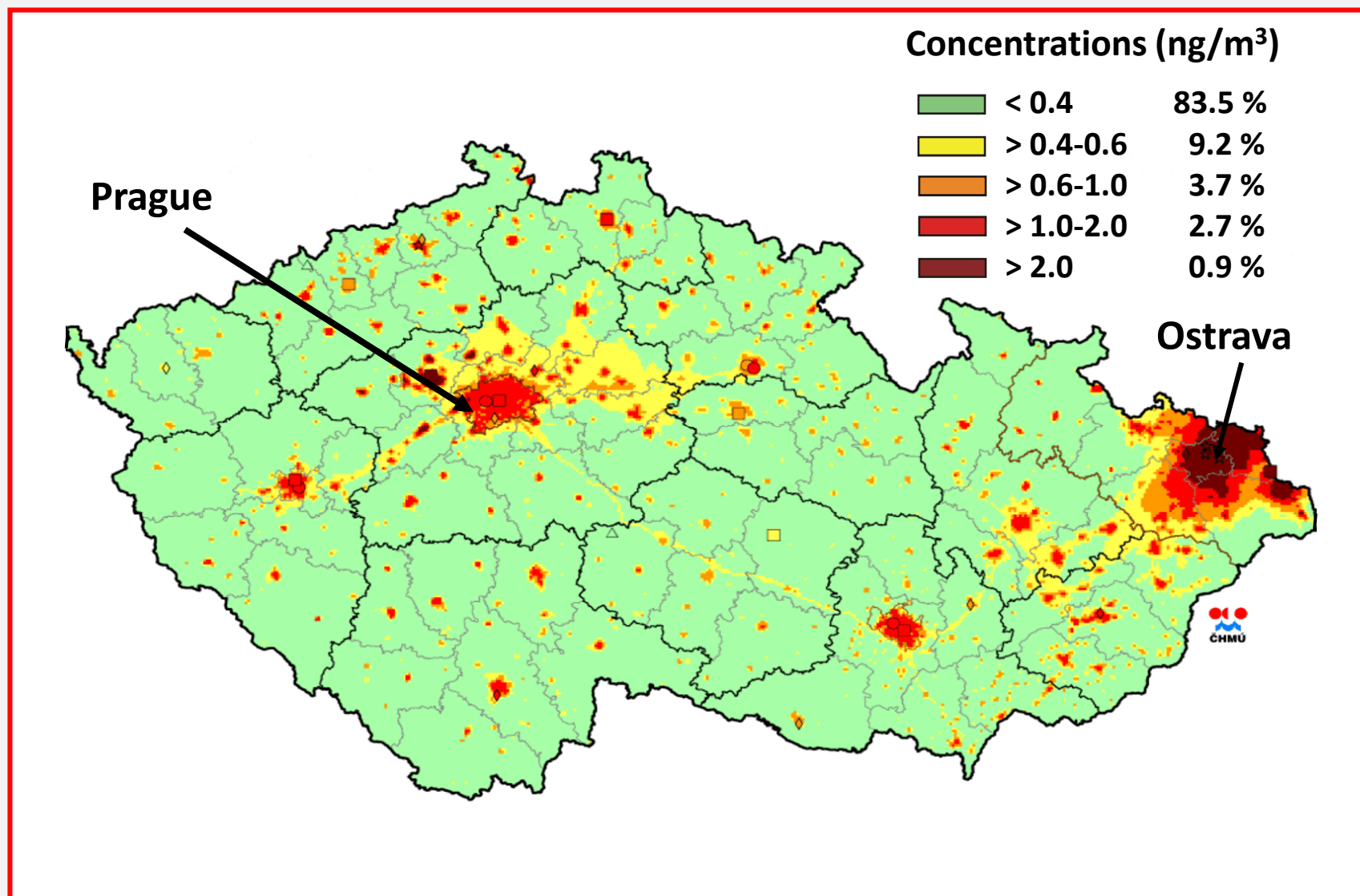
POČÁTEK NEMOCI



NUTNOST PREVENCE !



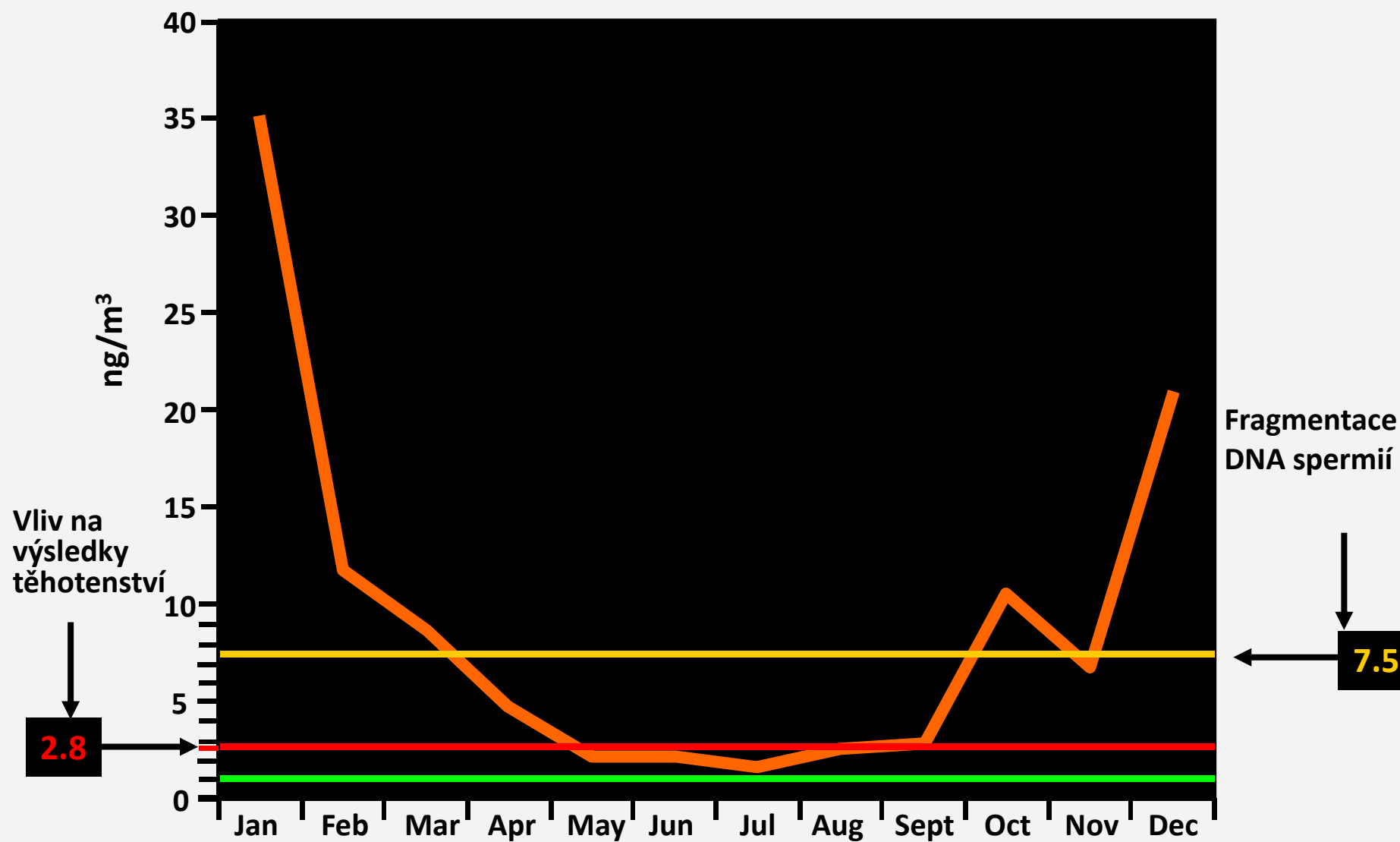
B[a]P 2008





Měsíční průměry koncentrace benzo[a]pyrenu

Bartovice (Ostrava) 2009



PROGRAM OSTRAVA



1.

Projekt

AIRGEN

(MŽP ČR č. SP/1b3/8/08)



2.

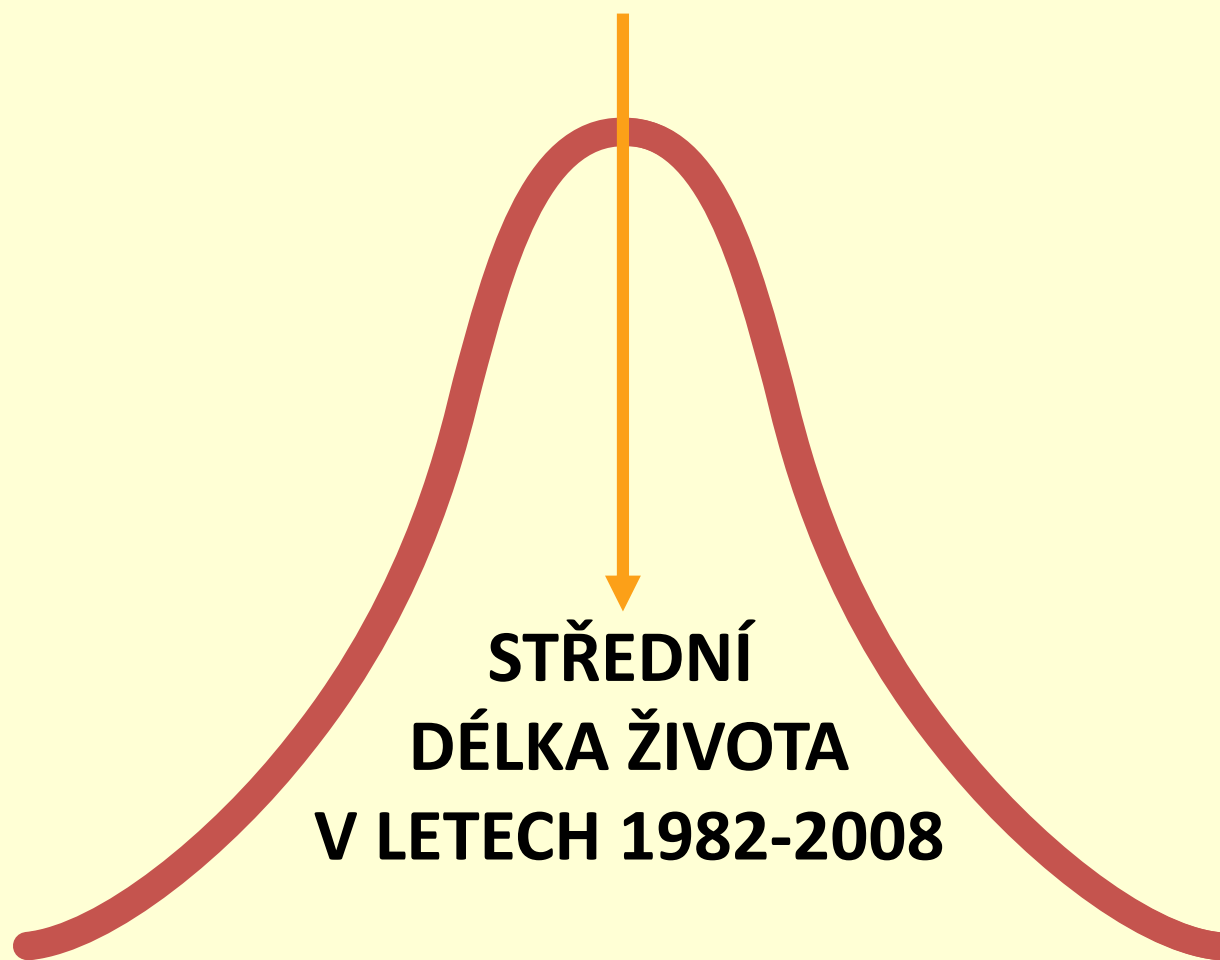
Projekt

AIRTOX

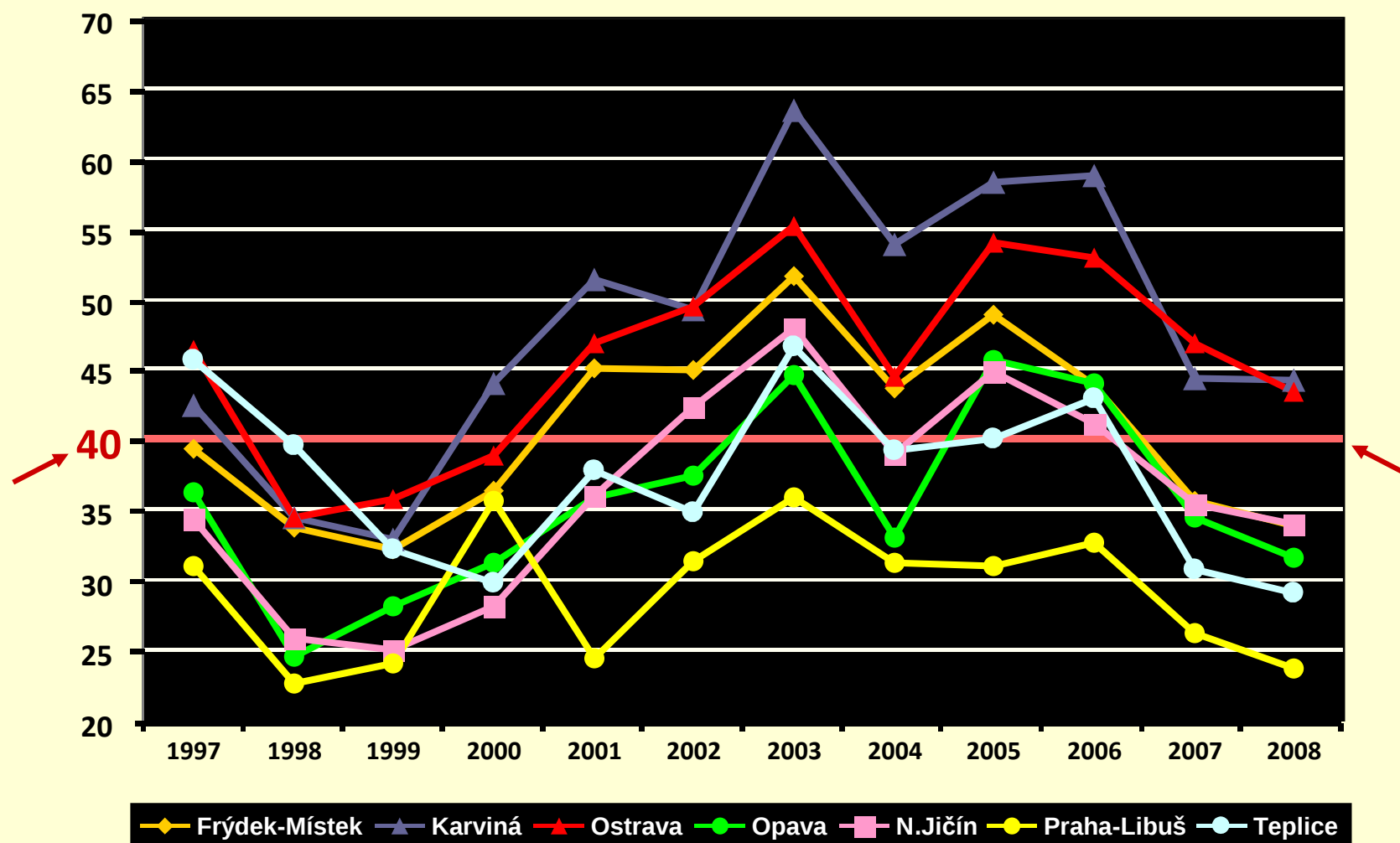
(MŠMT ČR č. 2B08005)

PROGRAM OSTRAVA

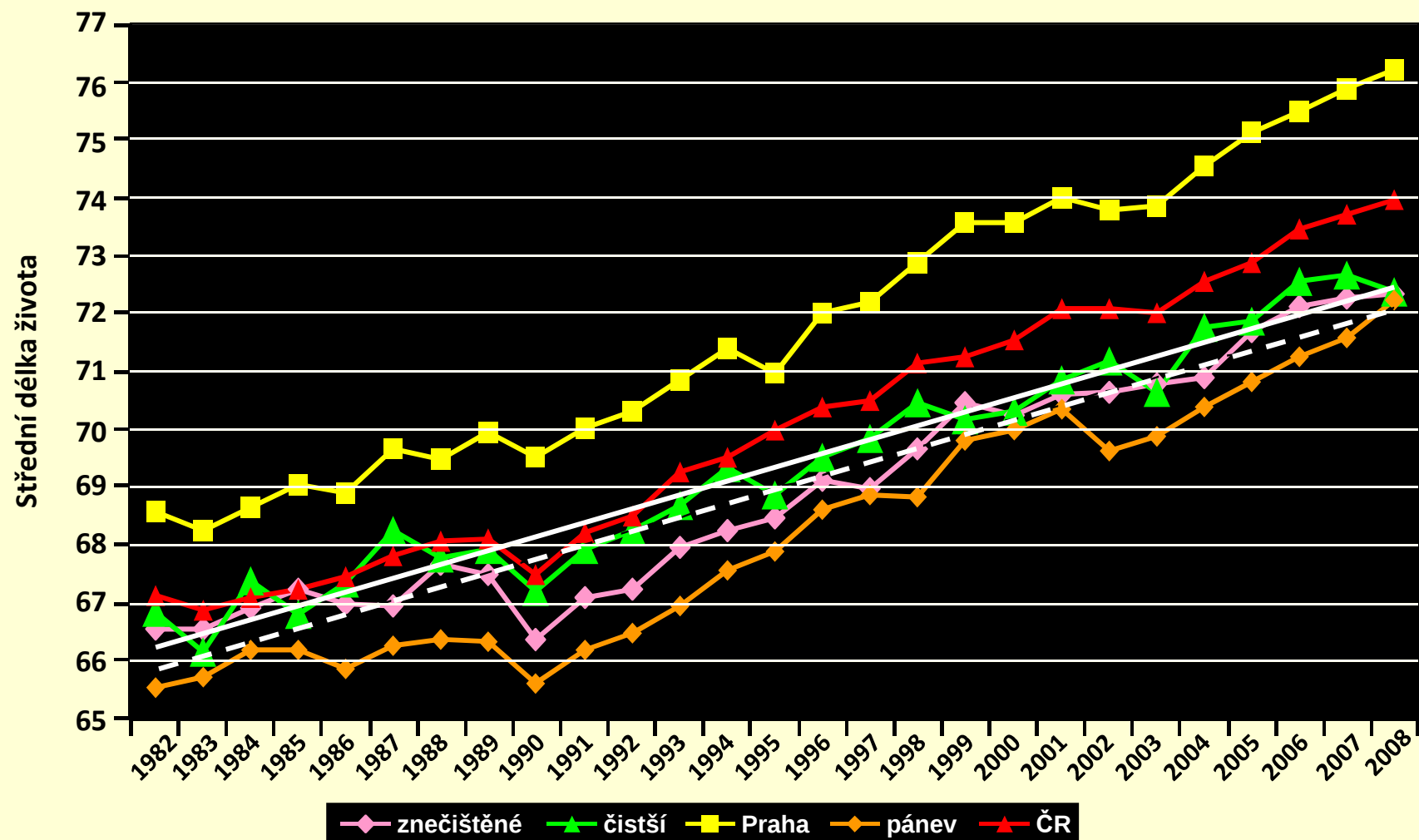
- 1) Zdravotní stav dětí**
- 2) Studium vlivu genetické výbavy na astma u dětí**
- 3) Molekulárně-epidemiologická studie:
vliv znečištěného ovzduší na lidský organismus**
- 4) Studie in vitro:
studium mechanismů toxického působení látek
vázaných na respirabilních prachových částicích**



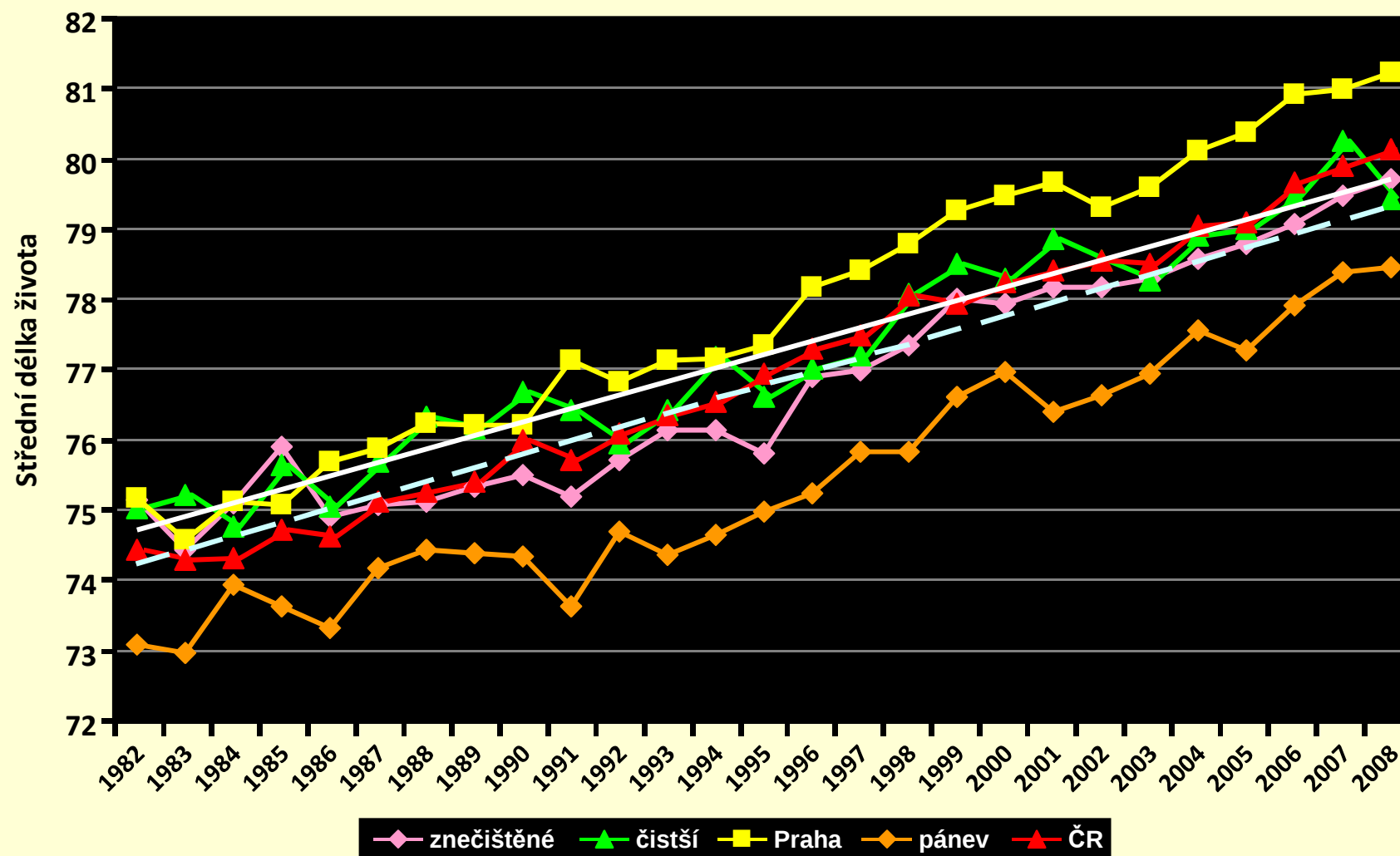
Průměrné roční koncentrace PM₁₀ [μg/m³] v okresech MS kraje, v Praze a v Teplicích



Střední délka života ve zneč. a čistší oblasti MSK, v Praze, v páni ÚK a ČR – muži



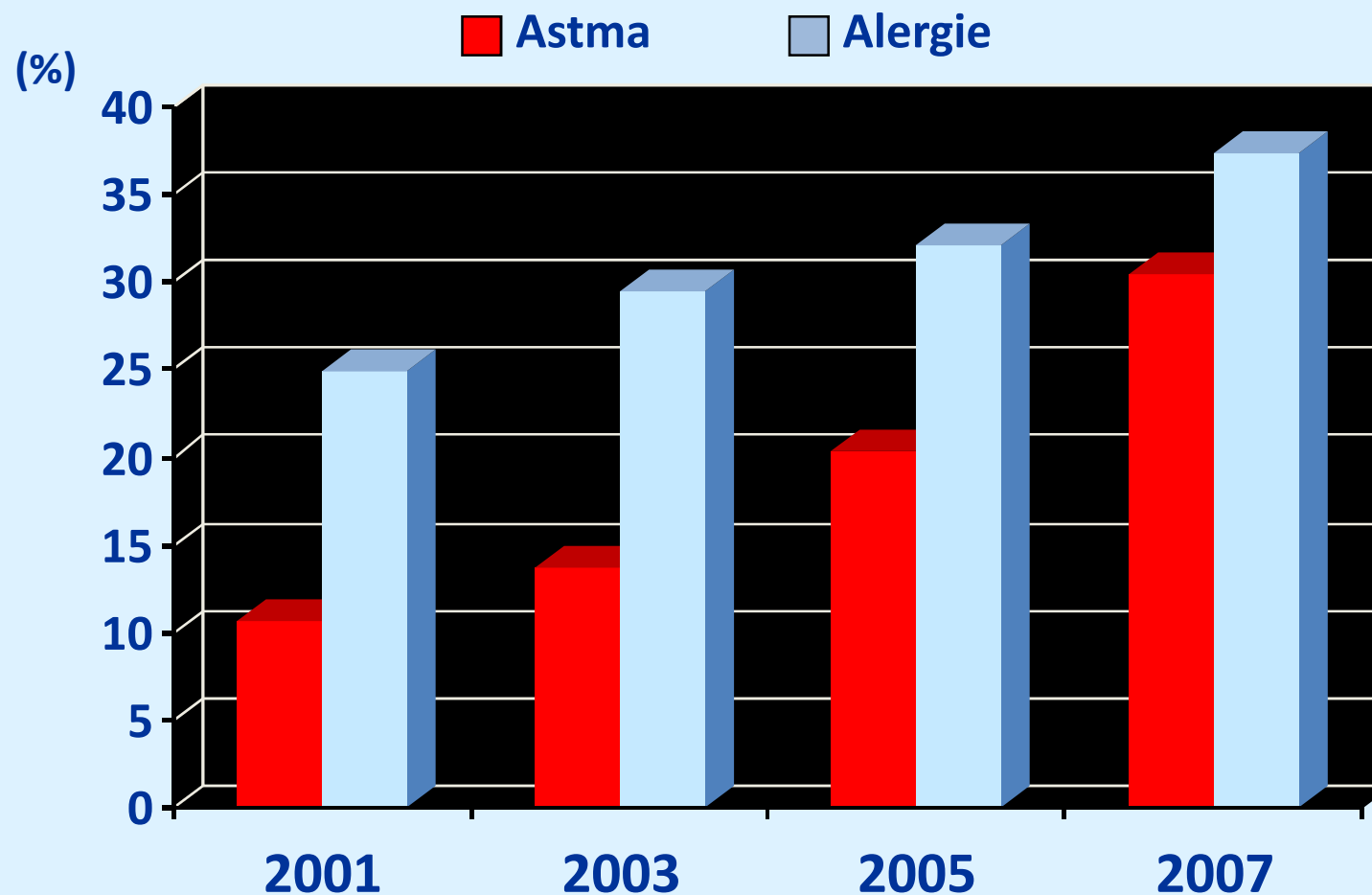
Střední délka života při narození ve zneč. a čistší oblasti MSK, v Praze, pánvi ÚK a ČR – ženy





ASTMATICKÉ A ALERGICKÉ DĚTI

OSTRAVA – BARTOVICE 2001 - 2007

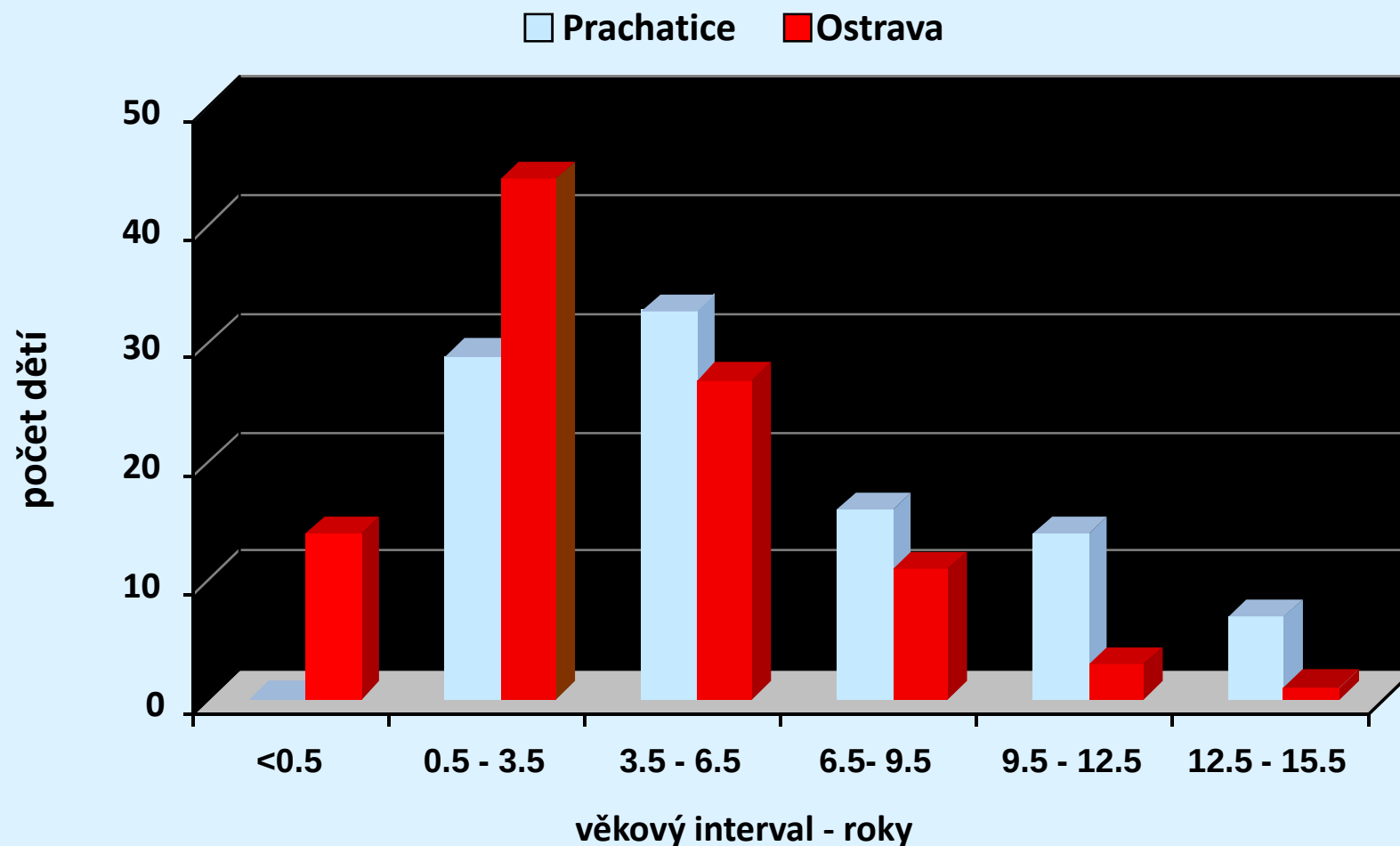


OSTRAVA PROGRAM

ASTHMA BRONCHIALE A BIOMARKERY

- ❑ Radvanice a Bartovice - 100 dětí s diagnostikovaným asthma bronchiale a 100 dětí bez alergie, věk 6-15 let
- ❑ Kontrolní děti z okresu Praachatice, stejný počet a věkové rozmezí
- ❑ **Genetické polymorfismy** (768 genů - metabolisme, DNA repair, imunitní systém, Illumina chips)
- ❑ **Genová exprese** (celý genom, Illumina chips)
- ❑ **Oxidativní poškození** (8-oxodG, 15-F2T-isoP, proteiny)
- ❑ **PAU-DNA adukty ze slin**
- ❑ **Vitamins A, E**
- ❑ **Kotinin**

PRVNÍ PŘÍZNAKY ASTHMA BRONCHIALE V ZÁVISLOSTI NA VĚKU



VZTAH GENOVÉ EXPRESE K ASTMATU

Průduškové astma je komplexní onemocnění.
Mezi hlavní faktory ovlivňující vznik a vývoj astmatu
patří **genetická predispozice a životní prostředí**
a jejich interakce



Cíl studie:

Porovnání exprese (aktivity) genů astmatických
a kontrolních dětí žijících ve znečištěné oblasti (**Ostrava**)
s expresí genů astmatických a kontrolních dětí žijících
v čisté oblasti (**Prachaticko**).

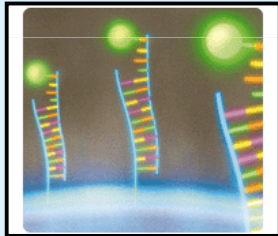
ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE

Princip čipové technologie



Human HT-12 v3 Expression BeadChip

- 12 pozic pro 12 různých vzorků; detekce transkriptů téměř celého lidského
- genomu současně (48 804 prób pro stejný počet transkriptů)



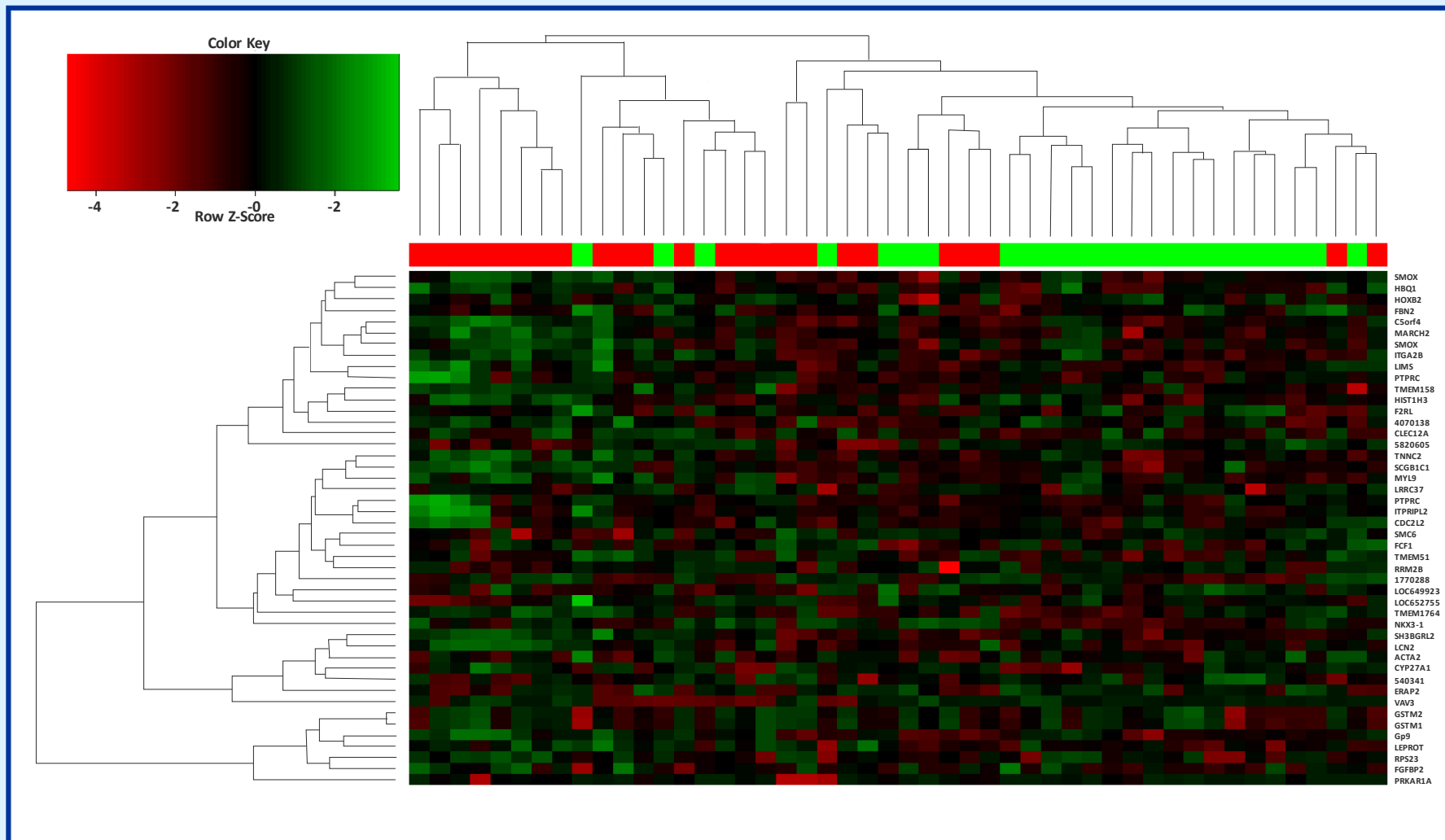
- próba = fragment DNA, představuje 1 gen
- transkripty – značení fluorescenční barvou + vazba na příslušné (komplementární) próby



Illumina Beadstation 500 GX

- detekce intenzity fluorescenčního signálu jednotlivých prób
- čím větší intenzita signálu → větší počet transkriptů
- → větší aktivita genu

HIEARARCHICAL CLUSTERING OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN ASTHMATIC (red) AND HEALTHY (green) CHILDREN SAMPLES



Analysis of transcriptomics data from children with asthma

2nd report

Dr. Hans Gmuender, Scientific Consultant
Genedata AG, Basel
July, 2010

Comparison of 'no asthma' or 'asthma' results from the two regions

There is a significant amount of differentially expressed genes comparing the 2 'no asthma' or the 2 'asthma' groups, respectively, indicating a strong region effect

The Venn diagrams below show the number of significant transcripts obtained with these two comparisons and with the disease-independent comparison 'control' vs. 'Ostrava'

P-value ≤ 0.01

no asthma control
vs. no asthma Ostrava

asthma control
vs. asthma Ostrava

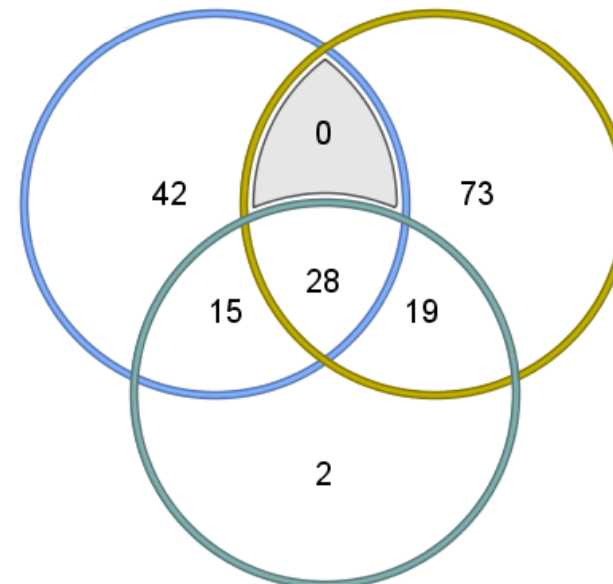


control vs. Ostrava

P-value ≤ 0.01
fold change ≥ 1.5

no asthma control
vs. no asthma Ostrava

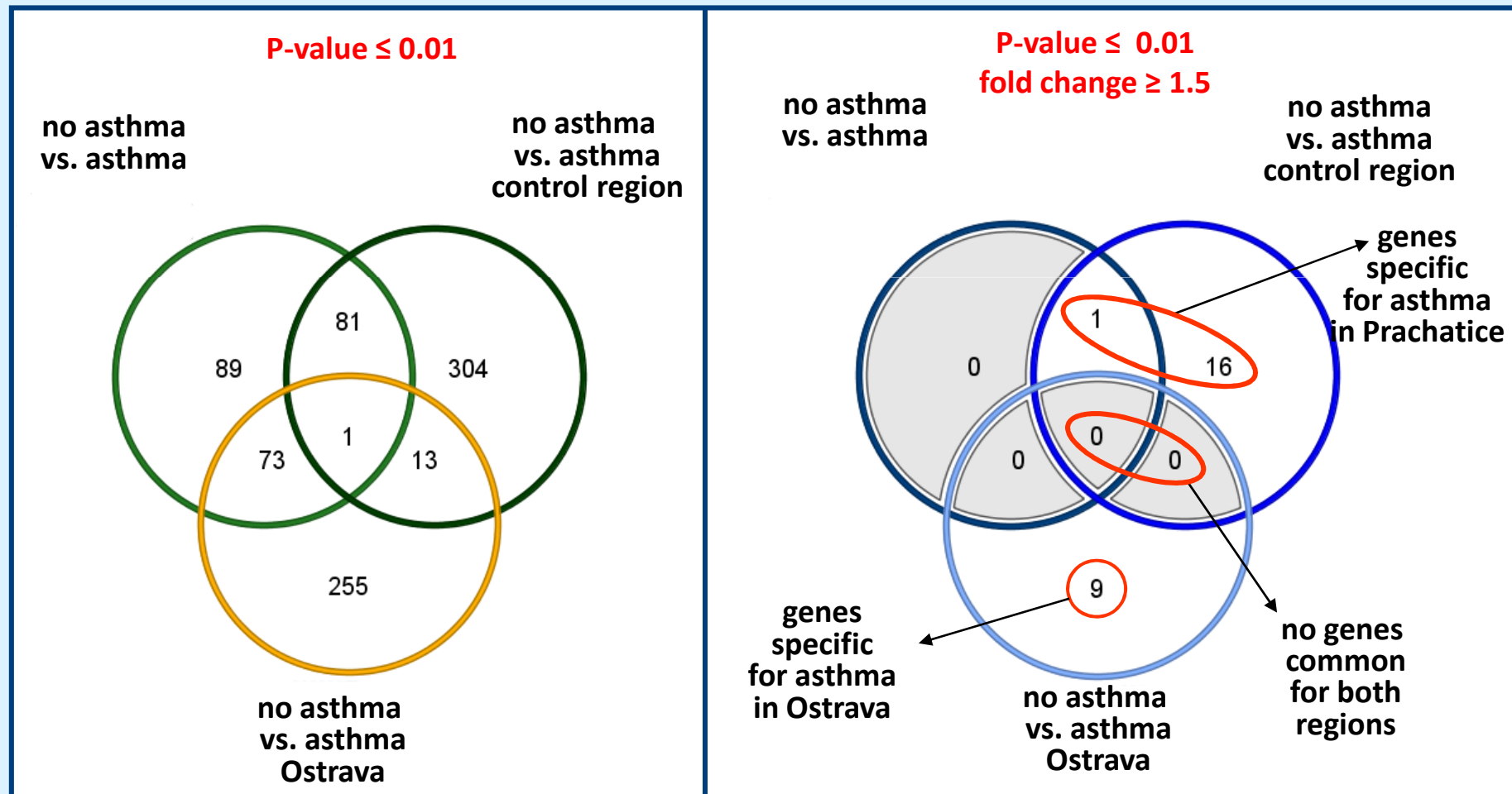
asthma control
vs. asthma Ostrava



control vs. Ostrava

Comparison of 'no asthma' vs. 'asthma' t-test results

In the Venn diagrams shown below, the t-test results obtained using all experiments either with a p-value cutoff of 0.01 or a p-value cutoff of 0.01 and at least a 1.5 fold change are compared



➤ Závěr ◀

- Výsledky prokazují deregulaci genů, která je specifická pro onemocnění, i pro sledovanou oblast
- Deregulace genů u astmatických dětí je rozdílná mezi znečištěnou a kontrolní oblastí.
- V každé oblasti byly pozorovány specifické deregulované geny při srovnání astmatických a kontrolních dětí: 17 transkriptů v kontrolní oblasti, 12 transkriptů v znečištěné oblasti.
- Při srovnání astmatických a kontrolních skupin byl pozorován významný vliv oblasti (92 a 57 transkriptů s > 1.5 násobnou změnou).

Souhrn

- **Asthma bronchiale na Prachaticku – alergický typ astmatu, odpověď na alergen.**
- **Asthma bronchiale v Ostravě - nealergický typ astmatu, vyvolán iritanty – znečištěné ovzduší, ETS, virové infekce.**



**MOLEKULÁRNĚ
EPIDEMIOLOGICKÁ
STUDIE**

PROGRAM OSTRAVA

MOLEKULÁRNĚ EPIDEMIOLOGICKÁ STUDIE

skupiny:

1.

**Městští strážníci
v Praze
(kontroly,
N = 65)**

2.

**Úředníci
v Ostravě
(indoor,
N = 70)**

3.

**Městští strážníci
v Karviné
(N = 23)**

4.

**Městští strážníci
v Havířově
(N = 20)**

5.

**Dobrovolníci
v Ostravě-Radvanicích
(N=28)**

HUMAN STUDIES AND BIOMARKERS OF EXPOSURE, EFFECT AND SUSCEPTIBILITY

⇒ PM2.5 Stationary monitoring

⇒ c-PAHs Personal monitoring
Stationary monitoring

⇒ VOC Personal monitoring
Stationary monitoring

⇒ Cotinine

⇒ Triglycerids, Total, HDL and LDL
cholesterol

⇒ Vitamins A, C, E

⇒ DNA adducts by ^{32}P -postlabeling

⇒ Chromosomal aberrations
FISH,
micronuclei

⇒ Oxidative damage
8-oxodG, 15-F2T-isoP,
proteins, SCGE

⇒ Genetic polymorphisms

⇒ Gene expression

PERSONÁLNÍ ODBĚRY OSTRAVSKO

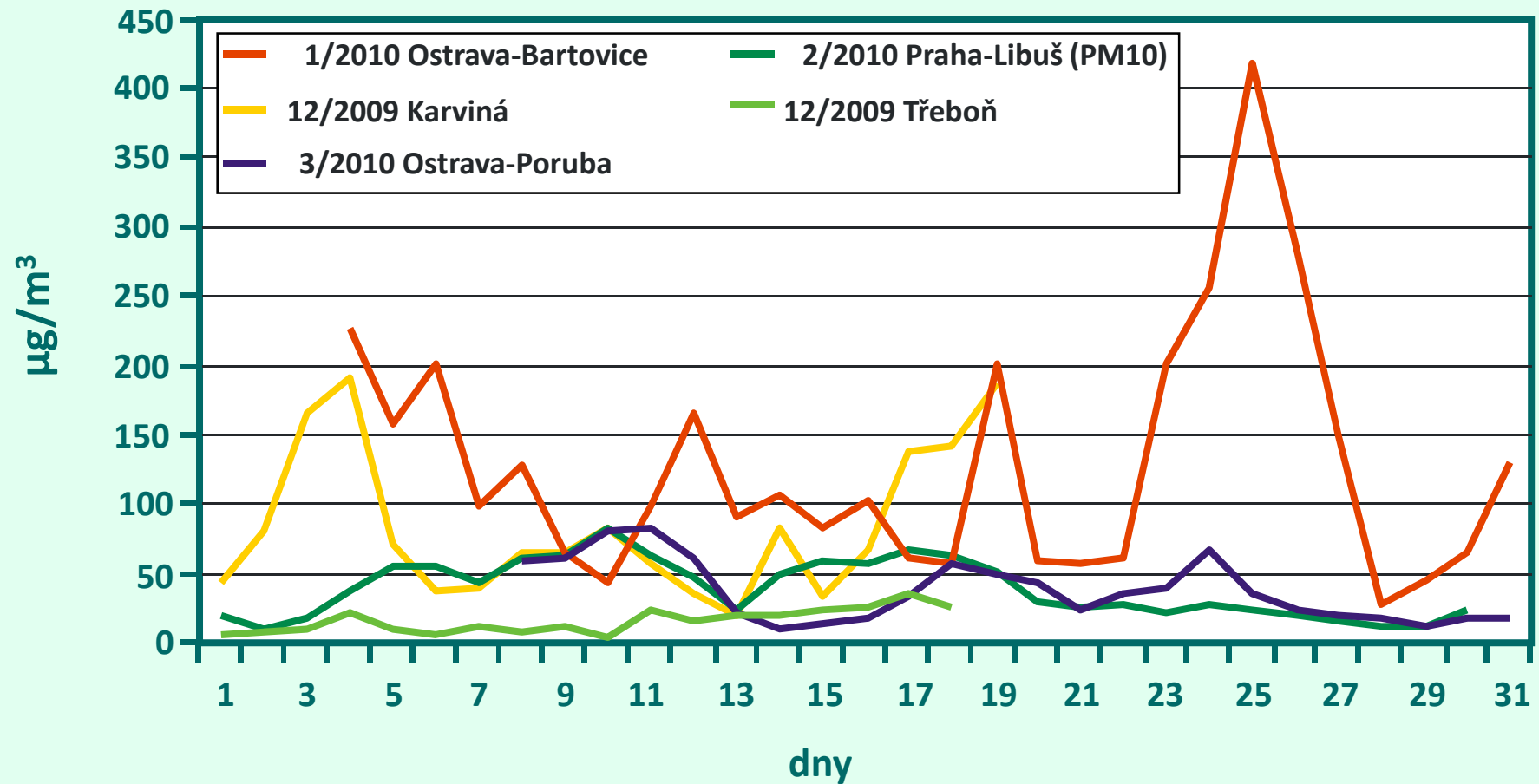
11. – 28. 1. 2010



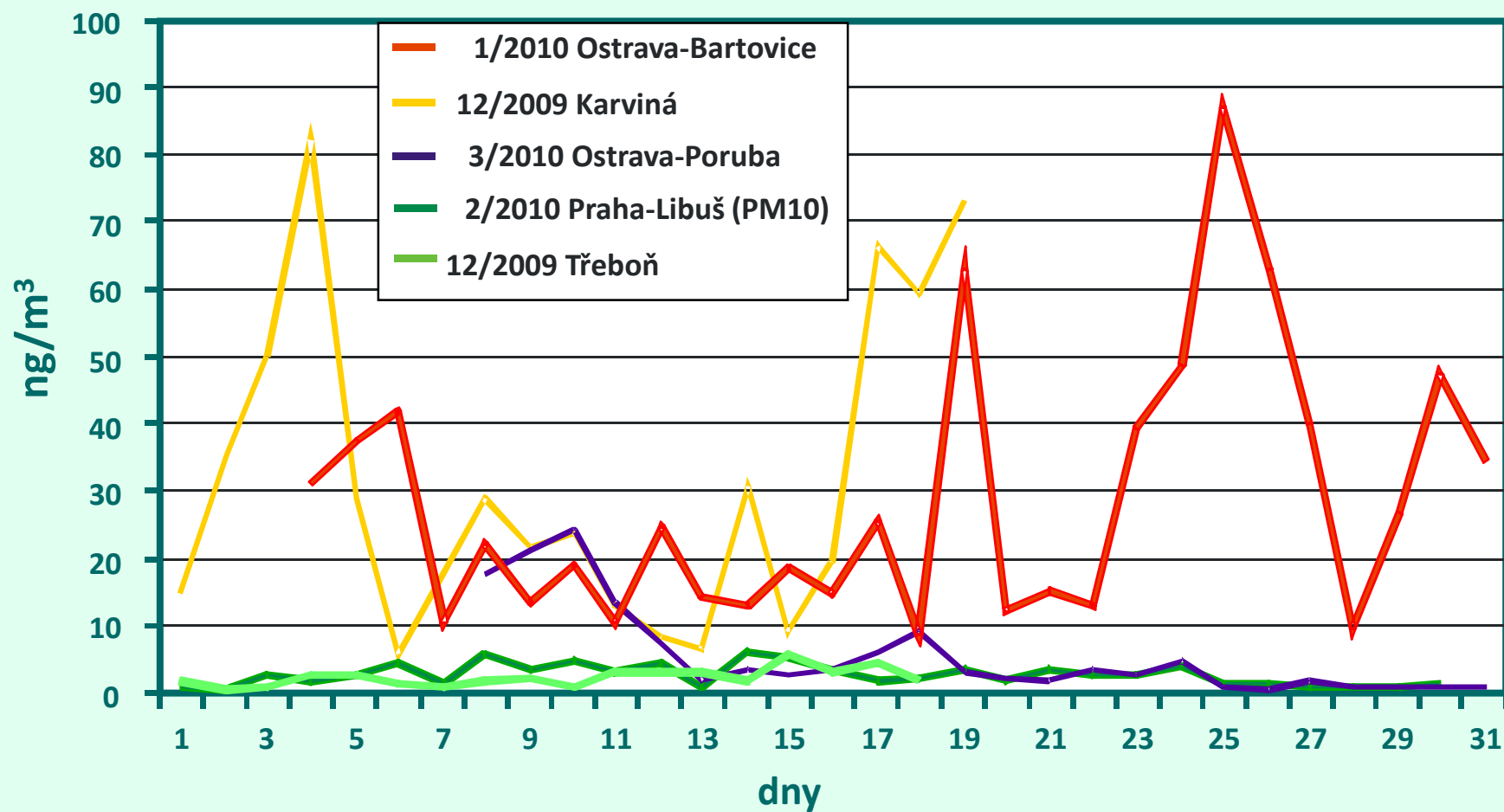
B[a]P ⇒ 14.6 ng/m³



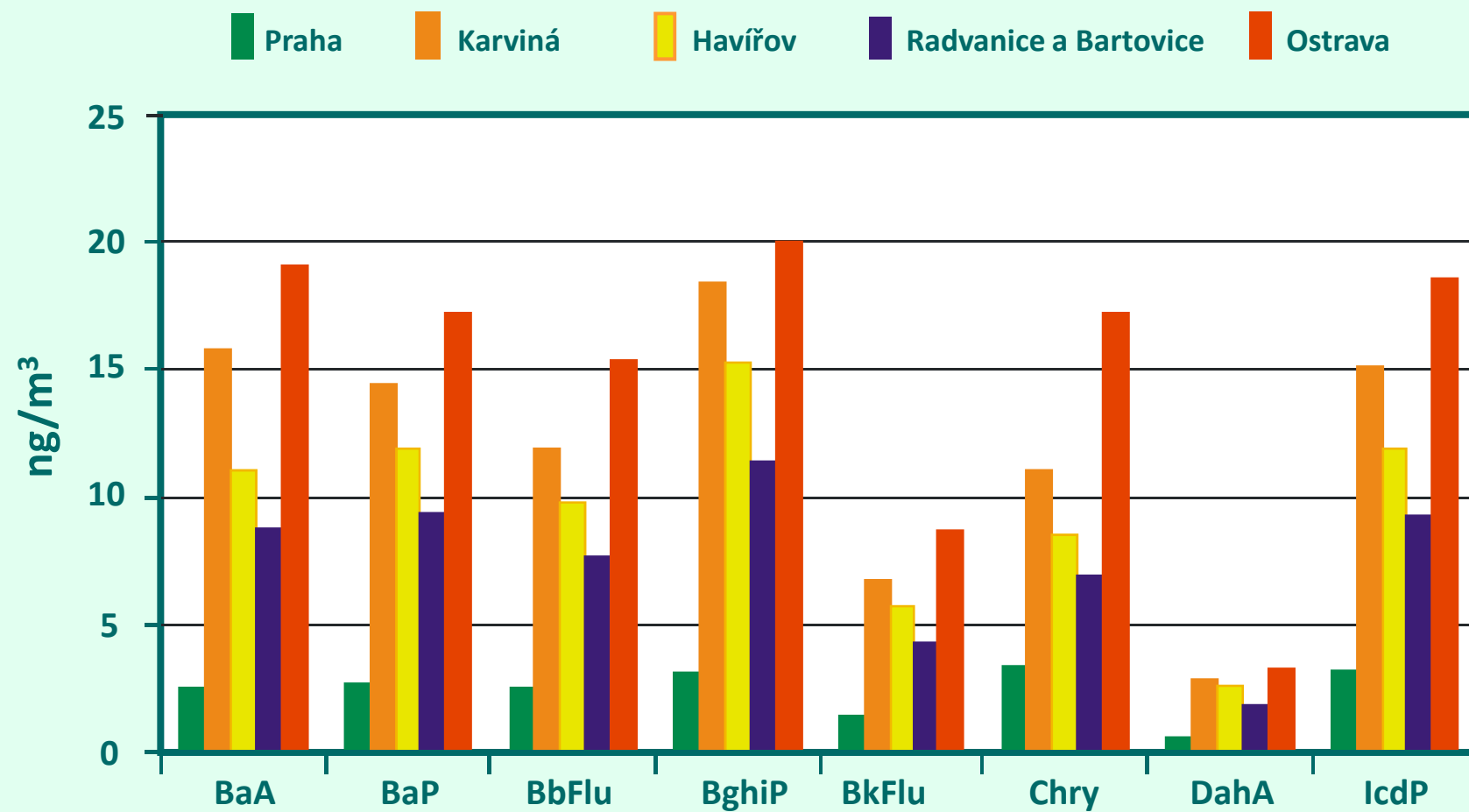
Koncentrace PM2.5 ze stacionárního měření HiVol v Ostravě, Karvině, Praze a Třeboni



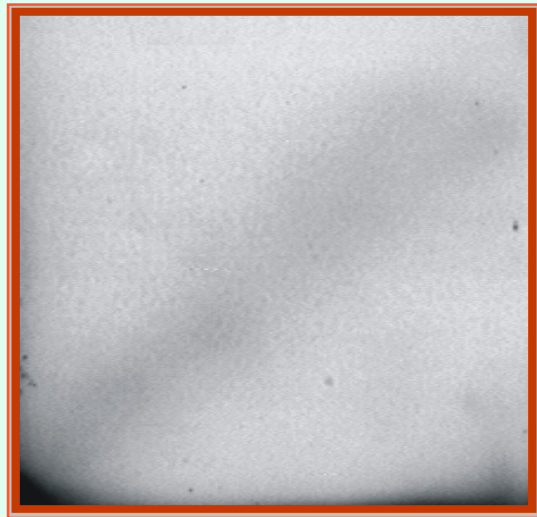
Koncentrace B[a]P ze stacionárního měření HiVol v Ostravě, Karviné, Praze a Třeboni



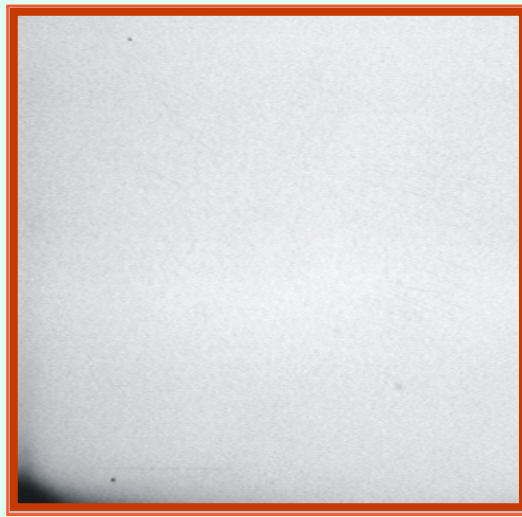
Průměrné hodnoty personální expozice karcinogenním PAU v zimě roku 2010 na jednotlivých lokalitách



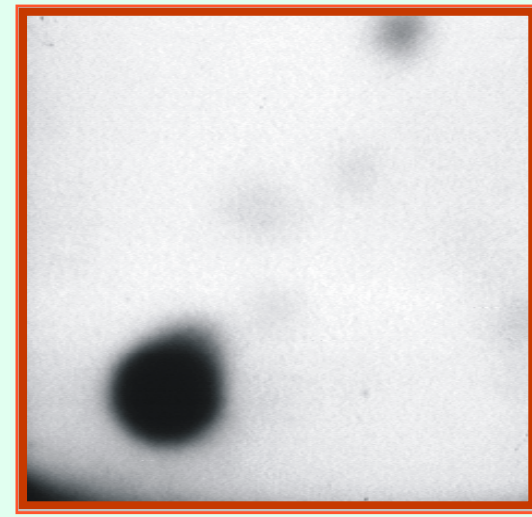
Autoradiographs of thin layer chromatograms with DNA adduct pattern of:



**DNA isolated from lymphocytes
of subject sampled
in January 2004
(1st sampling period)**



Water blank



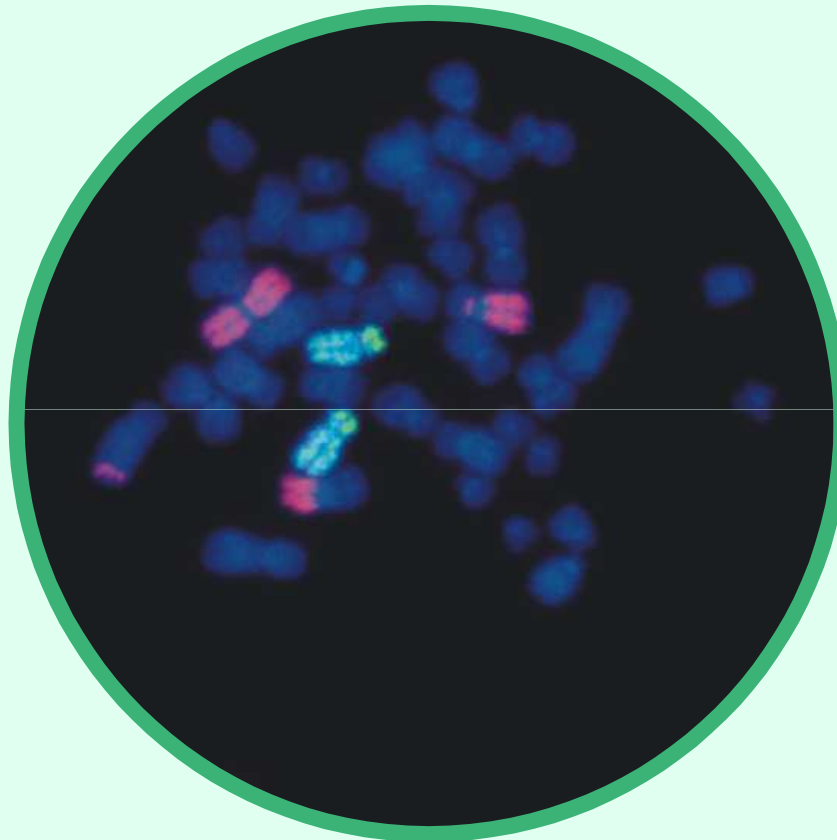
**Positive control
(DNA isolated from the lung of
rats intraperitoneally treated
with 100 mg B[a]P/kg b.w.)**

DNA adukty

	N	B[a]P ng/m ²		DNA adukty/10 ⁸ nukleotidů			
				B[a]P –“like“		Celkové	
		2009	2010	2009	2010	2009	2010
Praha	64	0.80 ± 0.55	2.86 ± 1.87	0.21 ± 0.06	0.25 ± 0.12	1.30 ± 0.41	1.37 ± 0.47
Ostravsko	98	2.73 ± 2.60*	14.8 ± 13.3*	0.28 ± 0.08*	0.16 ± 0.06*	1.37 ± 0.37	1.03 ± 0.33*
Kontrola	42	0.80 ± 0.62		0.10 ± 0.03		0.76 ± 0.20	

CYTOGENETIC ANALYSIS

FISH analysis



t(Ab);t(Ab);t(Ba)
Three translocations
between chromosome 1
and unpainted chromosomes

GENOMOVÁ FREKVENCE TRANSLOKACÍ FISH

	N	B[a]P ng/m ²		% AB.B.		F _G /100	
		2009	2010	2009	2010	2009	2010
Praha	60	0.80 ± 0.55	2.86 ± 1.87	0.27 ± 0.18	0.23 ± 0.15	1.43 ± 1.15	1.39 ± 1.03
Ostravsko	98	2.73 ± 2.60	14.8 ± 13.3*	0.26 ± 0.19	0.22 ± 0.18	1.44 ± 1.23	1.25 ± 1.18
Kontrola	42	0.80 ± 0.62		0.21 ± 0.16		1.13 ± 1.01	

Hladiny 15-F2t-IsoP v krevní plasmě v zimním období 2009 a 2010 v Praze a na Ostravsku.

	Lokalita			
	Praha (N=65)		Ostravsko (N=100)	
	Zima 2009	Zima 2010	Zima 2009	Zima 2010
Průměr	165.9	256.5	279.3	279.5
Směrodatná odchylka	41.7	104.7	303.6	124.5
Median	158.4	236.9	179.2	252.3
Minimum	108.7	119.6	101.3	90.6
Maximum	321.2	647.8	2410.3	814.6
Porovnání lokalit (Praha vs. Ostravsko) v rámci období (p)	<0.001			
Porovnání období (2009 vs. 2010) v rámci lokality (p)	<0.001			

VÝZNAM OXIDAČNÍHO POŠKOZENÍ U DOSPĚLÝCH

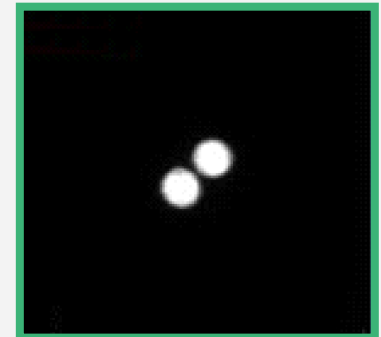
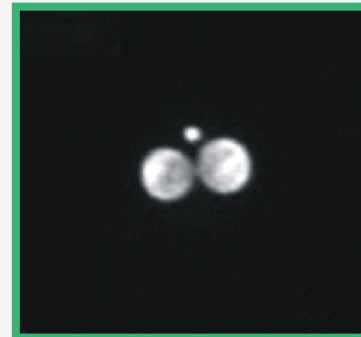
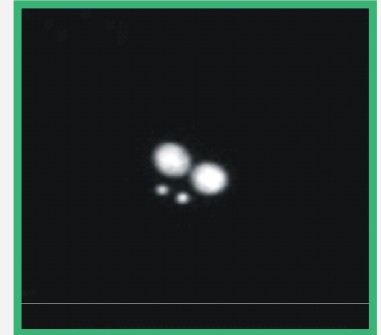
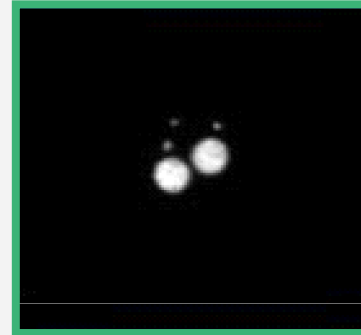
ZVYŠUJE VÝSKYT:

- ⇒ nádorových onemocnění
- ⇒ aterosklerosy
- ⇒ diabetes
- ⇒ Alzheimerovy demence



URYCHLUJE PROCES STÁRNUTÍ

MICRONUCLEI



FREKVENCE MIKROJADÉREK

(vliv 3-týdenního pobytu na Ostravsku, leden 2010)

Skupiny		N (6000 b./osobu)	% AB.B. S MN	MN/1000
kontrolní	I.odběr	4	0.81 ± 0.15	8.32 ± 1.63
	II.odběr	4	0.80 ± 0.14	8.47 ± 1.55
exponovaná	I.odběr	4	0.74 ± 0.43	7.96 ± 4.92
	II.odběr	4	1.14 ± 0.55	$12.91 \pm 6.49^*$

* $p < 0.05$

FREKVENCE GENOMOVÝCH TRANSLOKACÍ

(FISH)

(vliv 3-týdenního pobytu na Ostravsku, leden 2010)

Skupiny		N (5000 b./osobu)	% $F_G/100$	% AB.B.
kontrolní	I.odběr	4	1.51 ± 0.61	0.27 ± 0.05
	II.odběr	4	1.45 ± 0.52	0.28 ± 0.07
exponovaná	I.odběr	4	1.44 ± 0.66	0.25 ± 0.11
	II.odběr	4	2.44 ± 1.82	0.43 ± 0.30

* $p < 0,05$

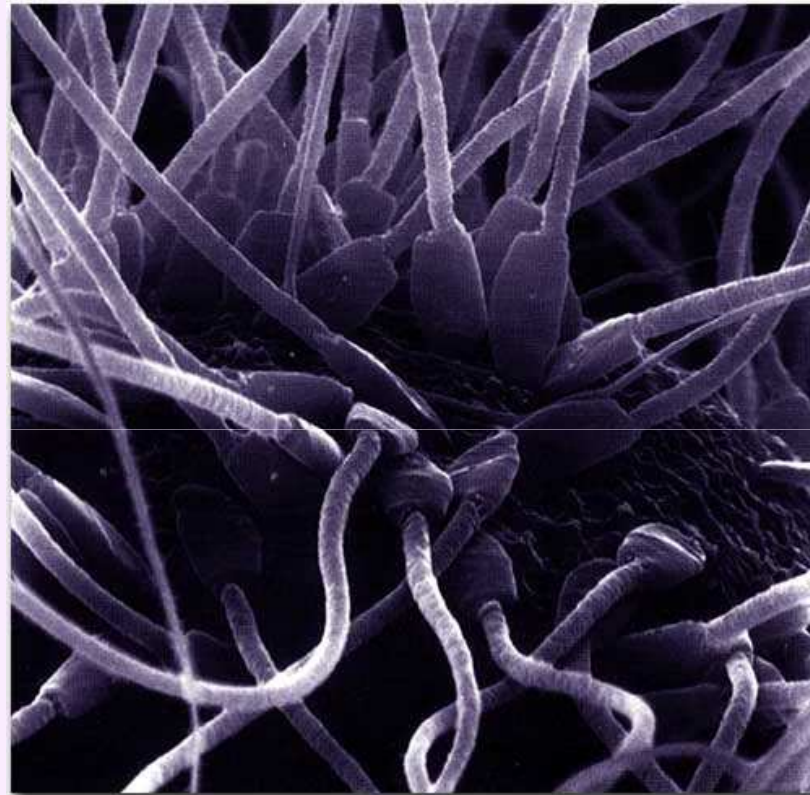
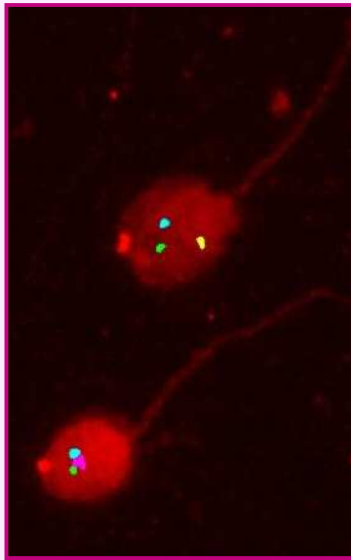


**ZNEČIŠTĚNÉ
OVZDUŠÍ**

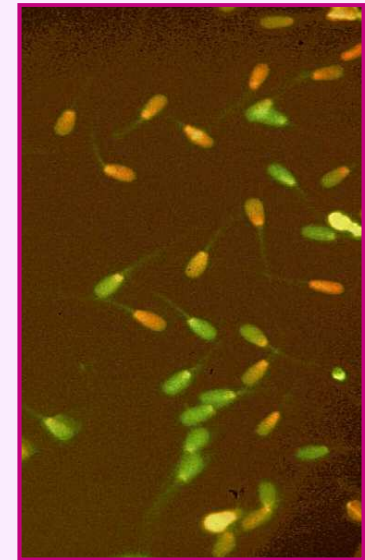
**VLIV
NA KVALITU
SPERMIÍ**

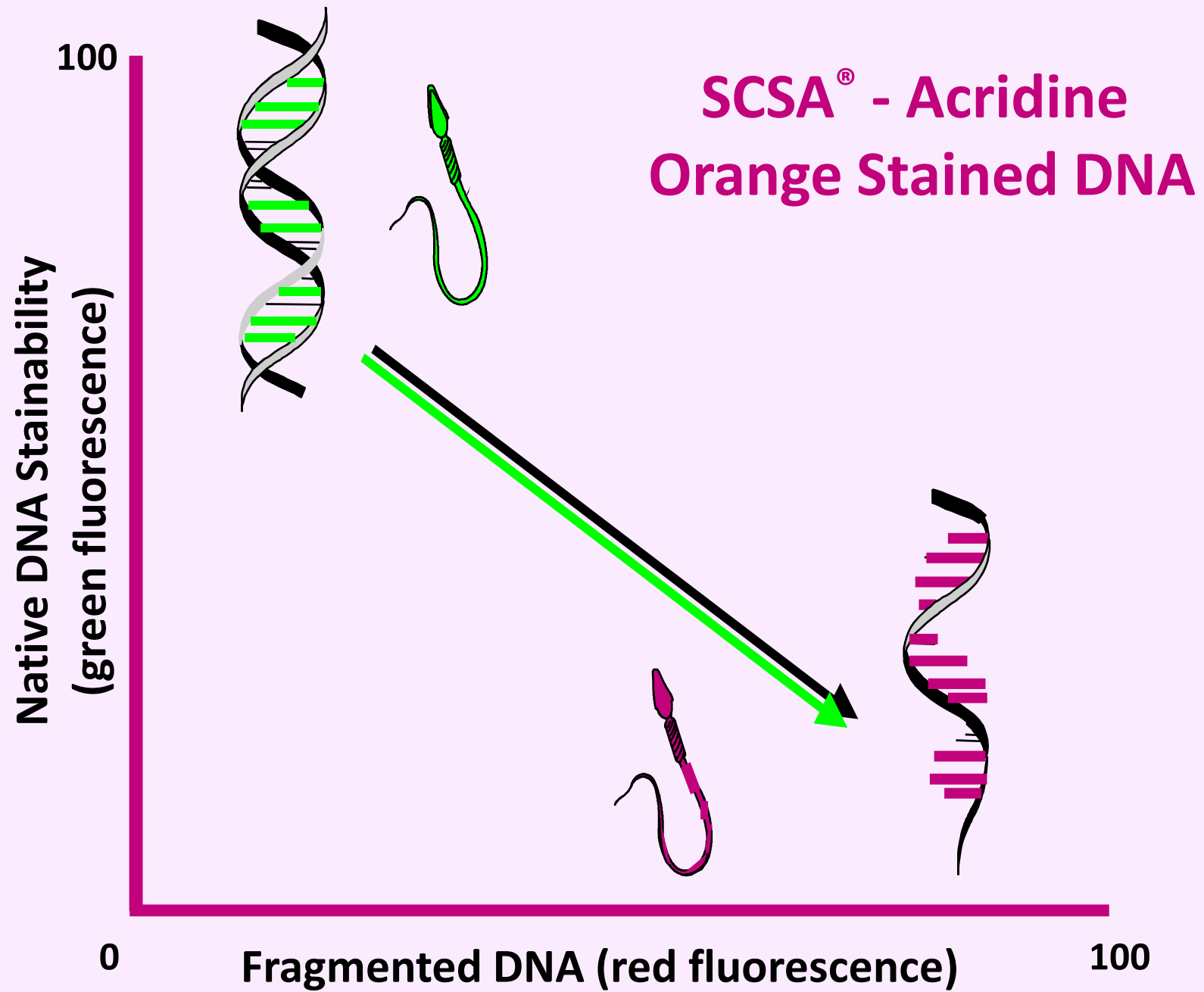
DNA adducts

chromosomes

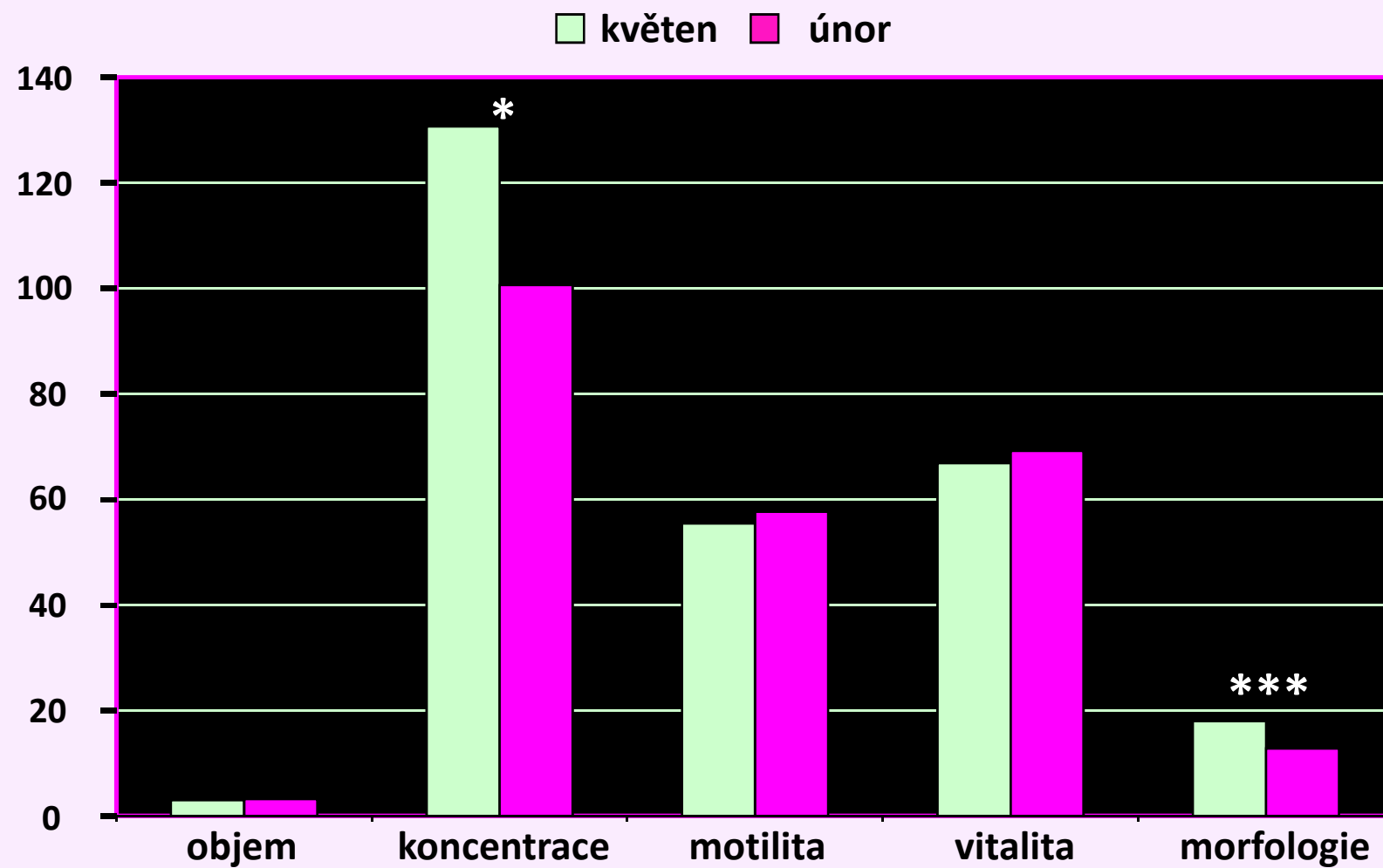


chromatine





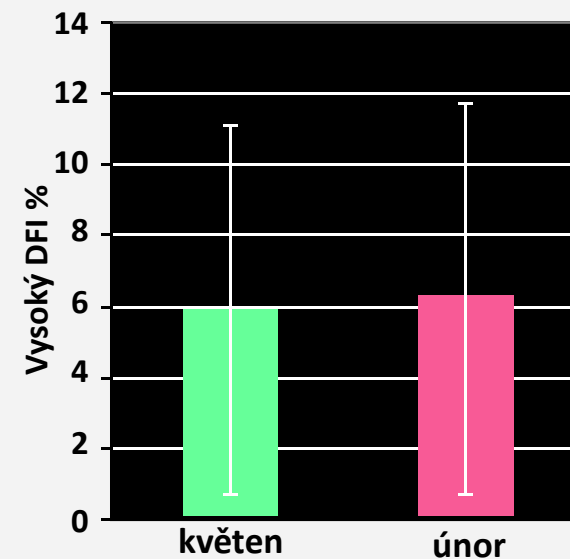
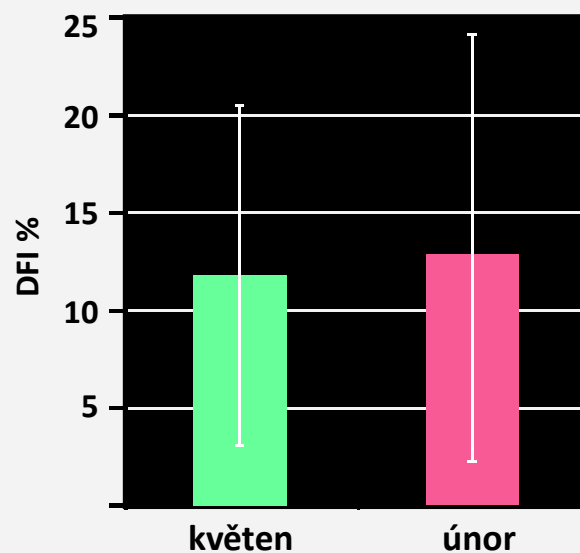
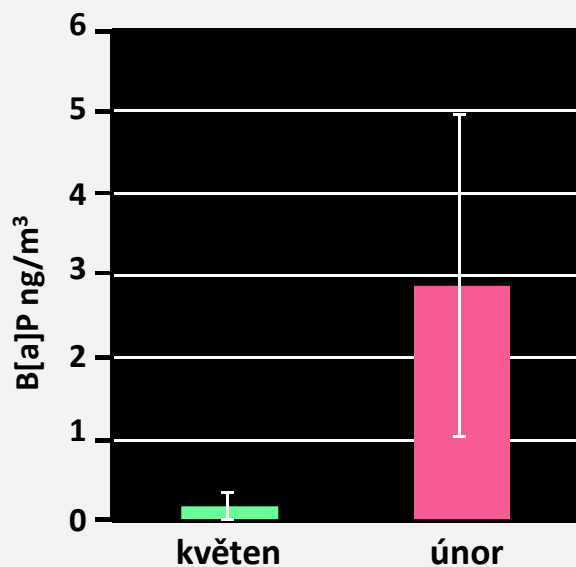
Kvalita semene



* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$

Vliv B[a]P na fragmentaci DNA ve spermiích (J. Rubeš 2010)



N = 49

dDFI	< 15%	květen 42	únor 34
dDFI	15 – 30%	květen 3	únor 12
dDFI	>30%	květen 4	únor 3
HDS	>15%	květen 12	únor 9

V poruží....



Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen

From Smog To Blue Skies - Remaining Challenges



**Air Quality Management in European Regions
– Challenges and success stories, Essen 2010**



Prof. Dr. Peter Bruckmann

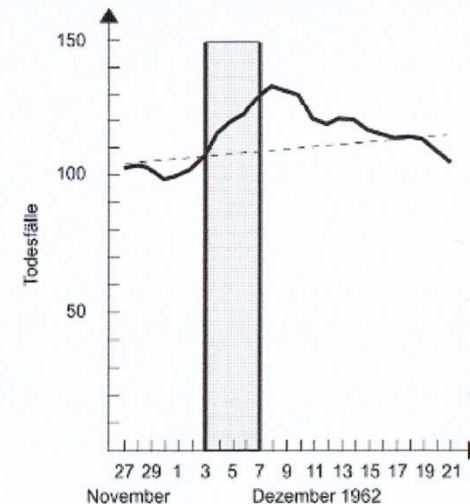
lanuvNRW.

Air Quality in the Ruhr region deplorable

Climax: smog-episode 03.-07.12.1962

- SO_2 , 24 h: 5 mg/m^3
(Bochum, 06.12.)
- TSP, 24 h: $2,4 \text{ mg/m}^3$
(Bochum, 05.12.)
- Rise of mortality by 30 %;
- Further smog episodes
1/79; 1/82; 1/85, 1/87

Death toll in the Ruhr area from
27.11.-21.12.1962 (Brockhaus, 1966)
(running average over 7 days)



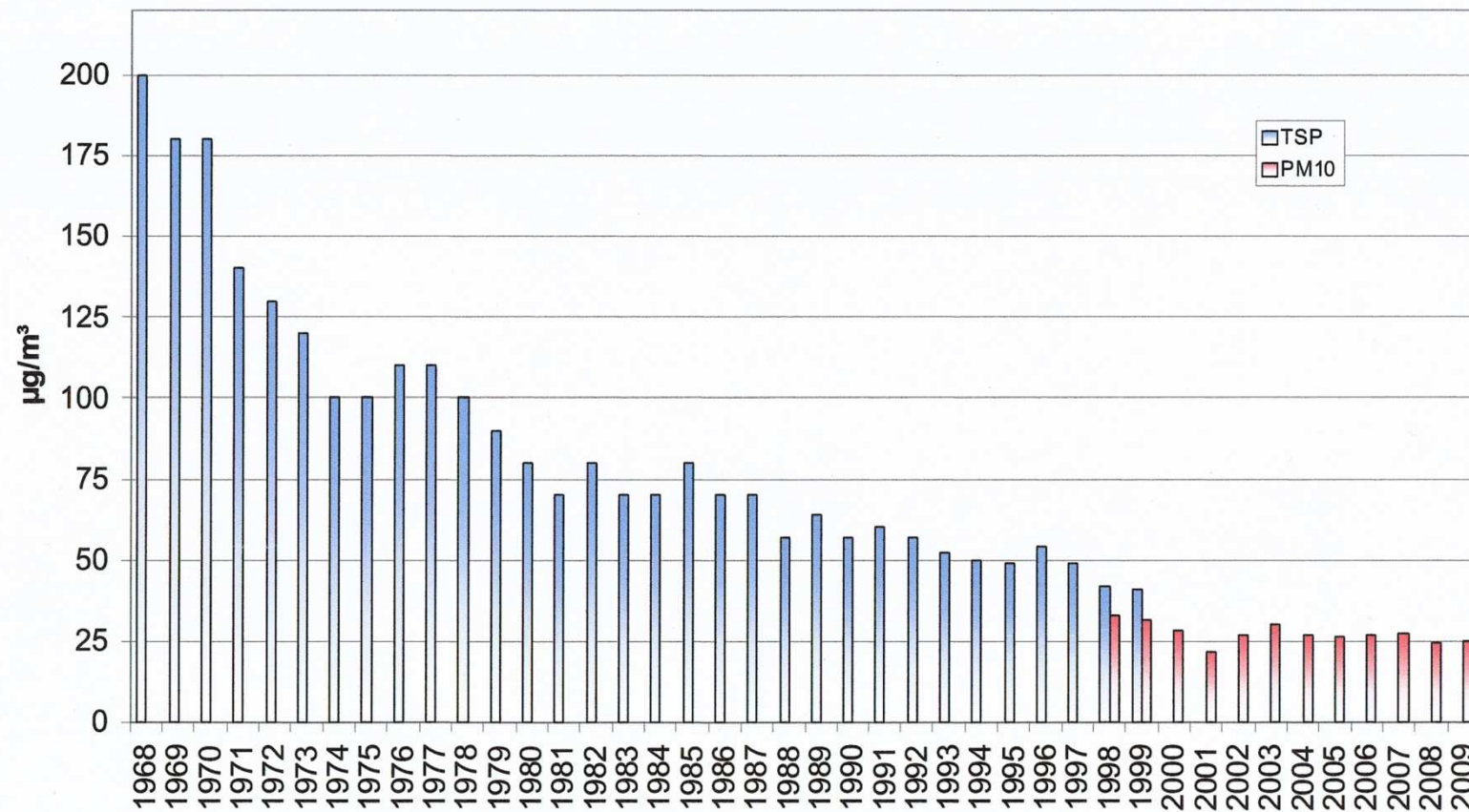
1961
election campaign

Willi Brandt:
Blue skies over the Ruhr district (vision)



Jahresmittelwerte Schwebstaub im Rhein-Ruhr-Gebiet

Annual Means TSP/PM10 - Rhine-Ruhr

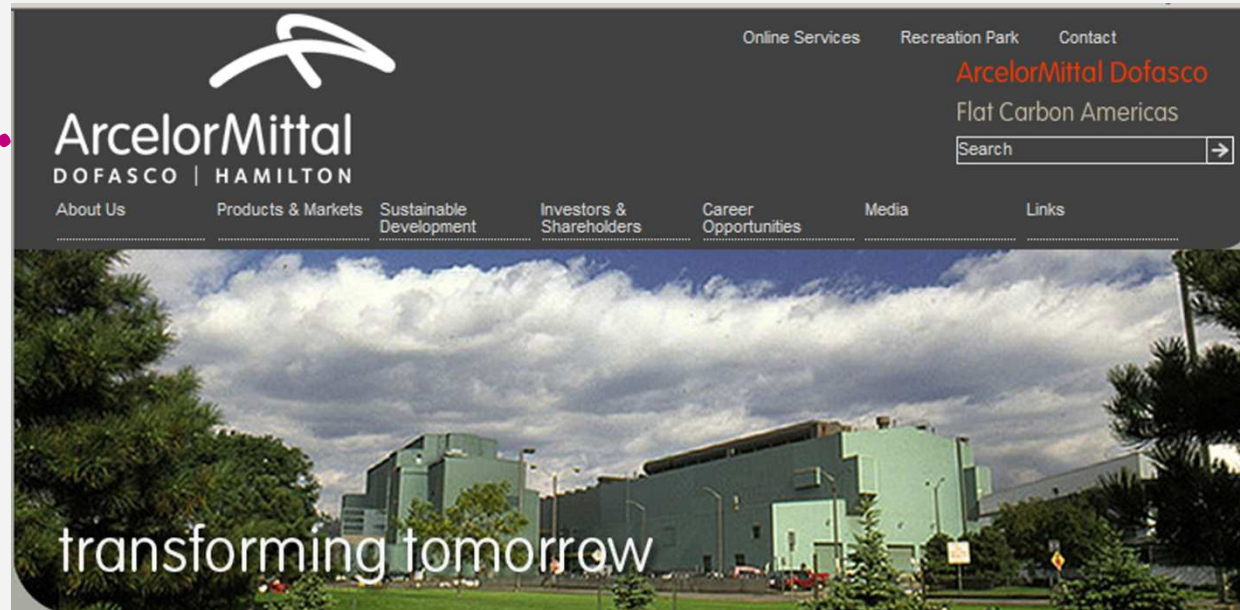


How was this success achieved?

- **National legislation:**
Setting strict emission limits and air quality standards:
 - *1st (1964) – 4th (2002) TA Luft*
 - *Fed. Im. Prot. Law (BImSchG), 1974*
 - *Ordinance on large combustion plants (1983)*
- **State level:**
 - *Protection, public awareness: smog ordinances (1963), 3 updates*
 - *Abatement actions covering selected industrial branches and domestic heating (1st stage)*
 - *Regional air quality plans (start: 1975)*



V Kanadě...



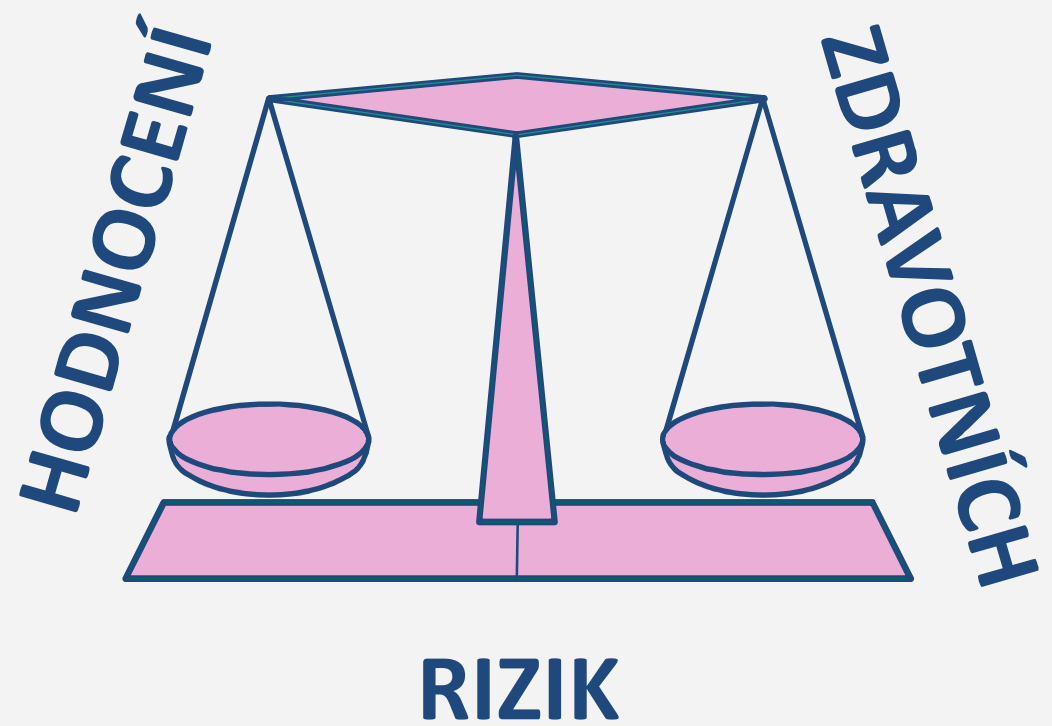
ArcelorMittal, Hamilton Canada

kPAU $\Rightarrow$ 1 – 16 ng/m³
(B[a]P $\Rightarrow$ 0.2 – 2 ng/m³)

V Ostravě...



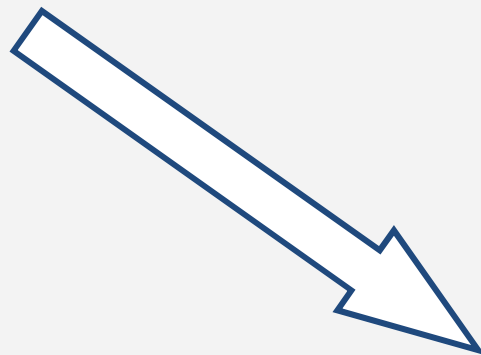
R. J. Sram 2010



OTÁZKY



MOŽNÁ ADAPTIVNÍ ODPOVĚĎ



VZTAH DÁVKY A ÚČINKU?

ZÁVĚR

Znečištěné ovzduší při koncentraci

> 1 ng B[a]P/m³

-  DNA adukty – 32-postlabelling
-  Genomovou frekvenci translokací
-  Frekvenci jadérek
-  Fragmentaci DNA ve spermiích

SOUČASNÁ SITUACE V MSK

- 1) Monitorování znečištění ovzduší
- 2) Popis zdrojů ?
- 3) Ovlivnění zdravotního stavu ?
- 4) Hodnocení zdravotních rizik z ovzduší ?

ŘEŠENÍ V MSK ?

- 1) Využít zkušeností z Programu Teplice a Porůří (SRN)
- 2) Analýza zdrojů znečištění ovzduší v MSK
- 3) Zhodnocení zdravotních rizik pro populaci
- 4) Návrh opatření k zajištění směrnice EU

NÁVRH OPATŘENÍ V MSK

- 1) Strategické řešení kvality ovzduší na základě účasti českých i polských zdrojů - společné řešení pro MSK a Katowické vojvodství**
- 2) Nutnost řešení sekundární prašnosti**
- 3) Program snížení emisí z průmyslových zdrojů, dopravy a lokálních topenišť**
- 4) Program kompenzačních opatření pro děti ze zatížených lokalit**

NÁVRH OPATŘENÍ V MSK



- 1) Připravit v gesci MŽP ČR Program Slezsko (Ostrava ?) na období 2011-2015
- 2) Studovat vliv navržených opatření ke snížení znečištění ovzduší na vybrané skupiny populace, zejména děti
- 3) Tyto skupiny opakovaně vyšetřit v r. 2012 a 2014, aby bylo možné ověřit účinnost prováděných opatření na ovlivnění zdravotního stavu

PODĚKOVÁNÍ

O. Beskid
E. Dejmková
M. Dostál
F. Kotěšovec
H. Líbalová
A. Milcová
B. Novotná
A. Pastorková
P. Rössner, Jr.
A. Rössnerová

J. Rubeš
E. Rychlíková
J. Schmuczerová
J. Skorkovský
I. Solanský
M. Špátová
O. Štveráková
V. Švecová
N. Tabashidze
J. Topinka
L. Tulupova

L. Holý
Z. Pokorná

E. Schallerová

KÚ Ostrava
MP Karviná
MP Havířov
MP Praha 1 a 5
Dobrovolníci
z Radvanic

PODĚKOVÁNÍ

Podpořeno granty

MŽP ČR

Projekt AIRGEN (čís. SP/1b3/8/08)

MŠMT ČR

Projekt AIRTOX (čís. 2B08005)