

OXIDAČNÍ ZMĚNY U ŘIDIČŮ AUTOBUSŮ – DŮSLEDKY PROFESIONÁLNÍ EXPOZICE

RNDr. Pavel Rössner Jr., Ph.D.

Ing. Vlasta Švecová

Mgr. Alena Milcová

Ing. Ivo Solanský

MUDr. Radim J. Šrám, DrSc.

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

Zdravotní ústav Středočeského kraje, Praha

ÚVOD

Expozice znečištěnému ovzduší má řadu negativních dopadů na lidské zdraví a je spojována se zvýšeným výskytem onemocnění dýchacího a kardiovaskulárního systému a nádorových onemocnění. Prachové částice (particulate matter – PM), které hrají významnou roli ve škodlivém působení znečištěného ovzduší na člověka, obsahují směs řady chemických látek. Mezi hlavní škodliviny vázané na PM se řadí karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky (k-PAU) a dále látky, které vyvolávají oxidační poškození DNA, lipidů a proteinů (chinony, toxické kovy). Oxidační poškození je též vyvoláváno procesy, jako jsou buněčný metabolismus a záněty. Oxidačnímu poškození bude věnován tento článek.

Oxidační poškození vzniká působením reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) na makromolekuly jako důsledek nerovnováhy mezi hladinami oxidantů a antioxidantů. Oxidanty – ROS – zahrnují látky radikálové i neradikálové povahy: hydroxylový radikál, superoxid, peroxinitrit, peroxid vodíku a další, zatímco mezi antioxidanty patří enzymy eliminující oxidanty (superoxid dismutáza, kataláza, glutathion reduktáza, glutathion peroxidáza) a některé vitamíny. Oxidační poškození je běžný jev, kterému jsou nevyhnutelně vystavovány všechny organismy využívající aerobní respiraci. Za normálních okolností se organismus dokáže díky reparačním mechanismům s oxidačním poškozením vyrovnat bez následků. Pokud však poškození je nadměrné, nebo kapacita reparačních systémů nedostatečná, dochází k negativnímu ovlivnění buněčných mechanismů. Faktory, při nichž vznikají ROS a které vyvolávají oxidační poškození, lze rozdělit na vnitřní a vnější. Vnitřní (endogenní) faktory zahrnují normální fyziologické procesy, jakými jsou oxidativní fosforylace, metabolismus zahrnující enzymy P450, a zánětlivé procesy. Mezi vnější (exo-

genní) vlivy řadíme především faktory životního prostředí a životního stylu, např. expozice znečištěnému ovzduší, kouření, nebo stravy. ROS jsou v organismu odbourávány působením enzymů (superoxid dismutáz a glutathion peroxidáz), pokud však odstraněny nejsou, způsobují přímé poškození DNA, oxidaci proteinů a lipidů, nebo poškození buněčných membrán. Proces oxidačního poškození je velmi komplexní a může vážně ohrozit činnost celé buňky. Děje probíhající v organismu jako důsledek vlivu ROS je možné sledovat měřením hladin molekul, které se specificky vytvářejí při působení ROS na makromolekuly. Těmto vybraným molekulám říkáme markery. Pro lepší pochopení mechanismů oxidačního stresu je vhodné provádět analýzy více markerů současně.

Působení ROS na DNA může vyvolat oxidaci bází, uvolňování bází z řetězce DNA, nebo i zlomy v DNA. Z hlediska frekvence vzniku a závažnosti důsledků pro osud buňky je pravděpodobně nejdůležitější 8-oxodeoxyguanosin (8-oxodG). Jedná se o modifikovanou bázi DNA, které je věnována drtivá většina prací zabývajících se vlivem ROS na genetický materiál. 8-oxodG je bázi, která, pokud není odstraněna reparačním systémem buňky, vyvolává vznik mutací: namísto párování s cytosinem se při replikaci páruje s adeninem a v dalším replikačním cyklu pak dojde k fixaci mutace (transverze) GC>TA. V optimálním případě je 8-oxodG odstraněn z DNA enzymem 8-oxoguanin DNA glykosylázou/AP lyázou a vylučován v moči. Hladina 8-oxodG v moči je považována za univerzální marker oxidačního poškození DNA, odráží ovšem též kapacitu reparačního systému buňky.

K peroxidaci lipidů dochází při působení ROS na nenasycené mastné kyseliny v buněčných membránách. Produktem této reakce jsou lipid peroxidy, které se rozkládají na látky zahrnující malondialdehyd, 4-hydroxynonenal, etan a pentan. Zejména malondialdehyd (MDA) patří k oblíbeným markerům peroxi-

dace lipidů, hlavně díky snadné detekci prováděné reakcí s kyselinou thiobarbiturovou. Nicméně, tato reakce je značně nespecifická, navíc MDA tvoří jen asi 1 % produktů vznikajících rozpadem lipid peroxidů. V posledních deseti letech jsou stále populárnější markery peroxidace lipidů látky ze skupiny F₂-isoprostanů, především pak nejvíce studovaný a charakterizovaný 15-F₂t-isoprostan (15-F₂t-IsoP). F₂-isoprostany vznikají z arachidonové kyseliny v buněčných membránách za přítomnosti ROS. Z membrán jsou odštěpovány působením fosfolipáz, cirkulují v plasmě a jsou vylučovány močí. Kromě moči lze F₂-isoprostany stanovit i v ostatních tělních tekutinách (v krevní plasmě, cerebrospinální tekutině) a v tkáních. Výhodou stanovení 15-F₂t-IsoP v moči je jeho stabilita a fakt, že se nevytváří *ex vivo*. Stanovení usnadňuje též existence komerčních kitů založených na použití metody ELISA.

Další skupinou makromolekul, na něž ROS mohou působit, jsou proteiny. Důsledkem reakce ROS s proteiny může být jak fragmentace proteinů, tak modifikace jejich funkčních skupin za tvorby hydroperoxidů a karbonylových skupin. Hladiny karbonylových skupin jsou tradičně používaným markerem oxidace proteinů. Karbonylové skupiny jsou aldehydy a ketony vytvářející se na poststranních řetězcích aminokyselin i na proteinových kostrách v průběhu jejich oxidace. Důsledkem jejich tvorby může být fragmentace proteinů, jejich nežádoucí propojování a v konečném důsledku ztráta katalytické a strukturní funkce. Karbonylové skupiny se v organismu hromadí jak v souvislosti s procesem stárnutí, tak jako doprovodný jev některých onemocnění.

V naší studii jsme se zaměřili na analýzu hladin markerů oxidačního stresu ve skupině 50 řidičů autobusů pražské MHD; kontrolní skupinu tvořili většinou administrativní pracovníci pražského dopravního podniku. Uvedené populace byly sledovány ve třech obdobích: v listopadu-prosinci 2005 (v textu označené jako

zima 2005), květnu-červnu 2006 (léto 2006) a listopadu-prosinci 2006 (zima 2006). Mezi sledované parametry patřila jednak expozice znečištěnému ovzduší, dále pak biologické markery oxidačního poškození DNA, lipidů a proteinů (výše popsané markery: 8-oxodG, 15-F2t-IsoP, karbonylové skupiny). Analýzy se zaměřily nejprve na zjištění rozdílů mezi skupinami lišícími se expozicí znečištěnému ovzduší, dále pak na porovnání odběrových období mezi sebou. Vycházeli jsme ze dvou předpokladů: 1. řidiči autobusů se pohybují celý den v městském provozu, a měli by tedy být vystaveni vyššímu riziku oxidačního poškození makromolekul než administrativní pracovníci; 2. v zimním období bývá kvalita ovzduší, zejména kvůli inverzím, horší než v létě, proto by oxidační poškození stanovené u zimních vzorků z let 2005 a 2006 mělo být vyšší než u letního odběru 2006.

MATERIÁL A METODY

Osoby zahrnuté do studie a sběr vzorků

Do studie bylo zahrnuto 50 mužů, řidičů autobusů MHD Praha, u nichž se předpokládala vysoká expozice znečištěnému ovzduší (skupina BUS; BUS1-zima 2005, BUS2-léto 2006, BUS3-zima 2006). Kontroly tvořili muži trávící většinu pracovní doby v uzavřených prostorách (skupina CON; CON1-zima 2005, CON2-léto 2006, CON3-zima 2006). Všechny vybrané osoby byly nekuřáči. Každý účastník studie vyplnil dotazník o životním stylu a zdravotním stavu. Všechny osoby byly sledovány ve třech odběrových obdobích: v zimě 2005, v létě 2006 a zimě 2006.

Před zahájením studie byly osoby vybrané do studie seznámeny s jejími cíli a podepsaly informovaný souhlas. Do studie nebyly zahrnuty osoby, které podstoupily v posledních 3 měsících radiografické vyšetření, nebo byly v tomto období očkovány.

V rámci studie byly odebrány vzorky krve a moče. Krev byla odebírána do zkumavek obsahujících heparin. Vzorky byly okamžitě po odběru dopraveny do laboratoře, kde byly zpracovány a uchovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Stanovení expozice

Expozice k-PAU byla zjišťována pomocí personálních monitorů, které používali účastníci studie dva po

sobě následující dny (celkem 48 hodin). Personální monitory byly vybaveny filtry umožňujícími sběr částic o velikosti $2,5\text{ }\mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$). Kvantitativní chemická analýza k-PAU (benz[a]antracen, chrysen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[a]pyren, dibenzo[a,h]antracen, benzo[g,h,i]perylene and indeno-[1,2,3-cd]pyren) byla provedena pomocí HPLC s fluorescenční detekcí.

Kvalita ovzduší během odběrových období byla sledována pomocí stacionárních monitorů VAPS (Versatile Air Pollution Sampler) na dvou místech v Praze (Praha 5 – vyústění Strahovského tunelu, Praha 4 – Libuš). Stacionární monitory zaznamenávaly denní hladiny PM_{10} a $\text{PM}_{2,5}$ v ovzduší.

Stanovení 8-oxodG

Hladina 8-oxodG v moči byla stanovena metodou kompetitivní ELISA podle publikované metodiky. Detekce je založena na použití primár-

ní protilátky specificky rozpoznávající 8-oxodG v biologickém materiálu (výrobce protilátky: JaICA, Japonsko). Vzorky moči byly analyzovány v triplicátech. Výsledky byly vztaženy na obsah kreatininu a vyjádřeny v nmol 8-oxodG/mmol kreatininu.

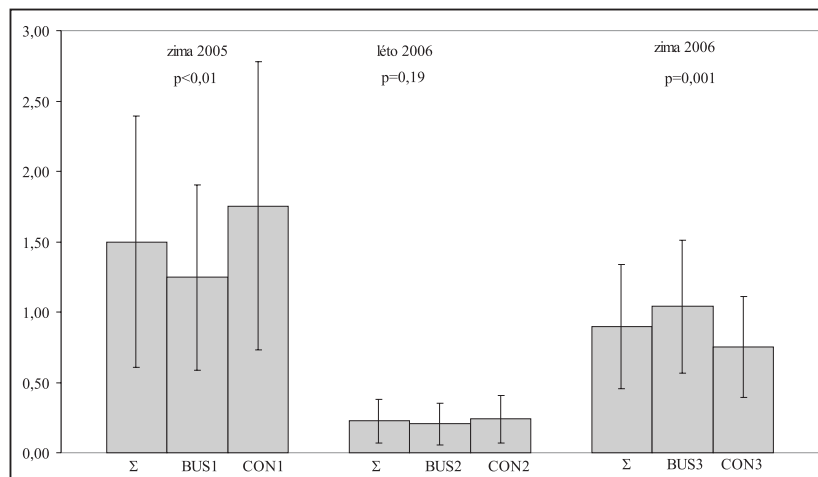
Stanovení 15-F2t-IsoP

Pro tuto analýzu byl použit komerční kit od firmy Oxford Biomedical Research (Oxford, MI, USA). Vzorky moči byly naředěny 7-krát pufrum dodaným s kitem a celý postup stanovení byl proveden podle doporučení výrobce. Každý vzorek byl analyzován v duplikátech. Koncentrace 15-F2t-IsoP byla vztažena na obsah kreatininu a vyjádřena v nmol 15-F2t-IsoP/mmol kreatininu.

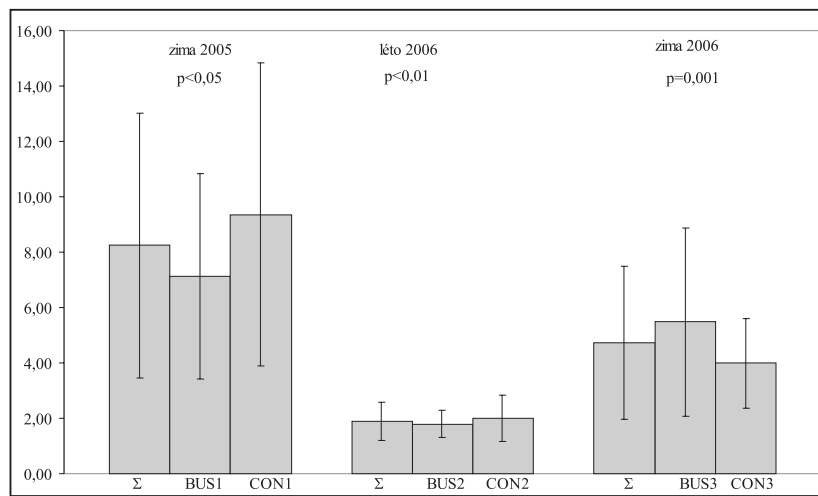
Stanovení karbonylových skupin v proteinech

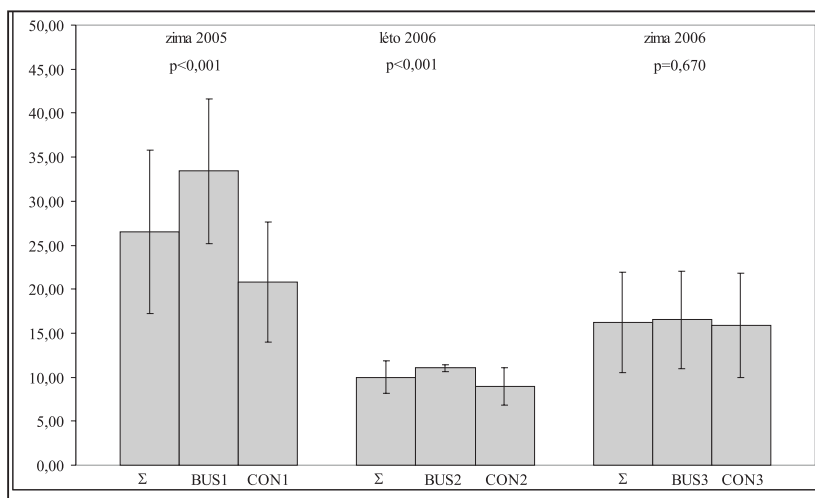
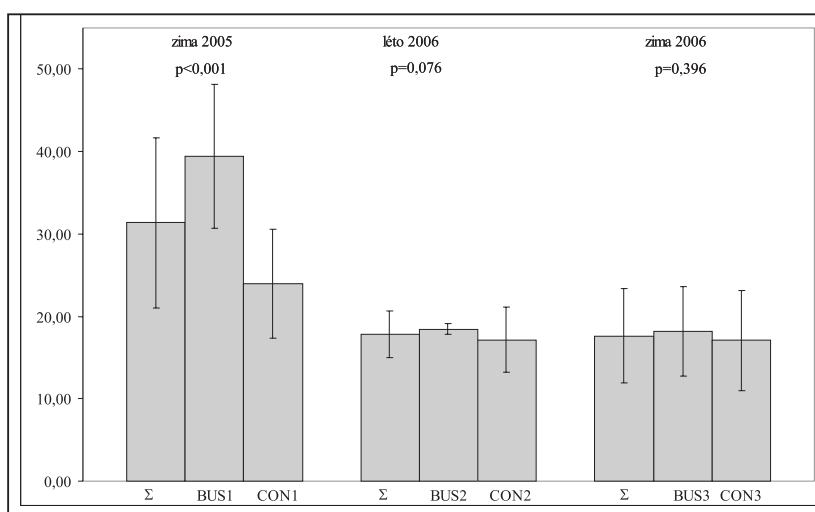
Hladiny karbonylových skupin v proteinech krevní plazmy byly stanoveny metodou nekompetitivní

Obr. 1a. Expozice B[a]P pro jednotlivá odběrová období (hodnoty uvedeny v ng/m^3).



Obr. 1b. Expozice k-PAU pro jednotlivá odběrová období (hodnoty uvedeny v ng/m^3).



Obr. 2a. Hladiny PM_{2,5} v jednotlivých odběrových obdobích (hodnoty uvedeny v µg/m³)**Obr. 2b. Hladiny PM₁₀ v jednotlivých odběrových obdobích (hodnoty uvedeny v µg/m³)**

ELISA podle publikovaného postupu, s drobnými modifikacemi. Principem metody je tzv. derivatizace analyzovaných vzorků – jejich inkubace s dinitrofenylhydrazinem, který se specificky váže na oxidovaná místa v proteinech, přičemž se mění na dinitrofenylhydrazon. Ten je pak stanoven pomocí specifické primární protilátky namířené proti DNP (výrobce Molecular Probes, OR, USA). Vzorky plazmy byly analyzovány v triplicátech, množství karbonylových skupin bylo vyjádřeno v nmol/ml plazmy.

Měření hladin kotininu

Hladiny kotininu v moči, které sloužily jako marker expozice tabákovému kouři, byly stanoveny radioimunochemicky.

Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byl použit software SPSS. Data, která neměla

normální rozložení, byla analyzována neparametrickými testy – Mann-Whitney testem pro porovnání dvou skupin vzájemně a Spearmanovým korelačním testem pro zjištění vzájemných vztahů mezi biomarkery. Data s normální distribucí byla analyzována T-testem a Pearsonovým korelačním testem.

VÝSLEDKY

Charakteristika studované populace

Obě studované skupiny byly věkově srovnatelné (průměrný věk ± směrodatná odchylka; skupina BUS: 49,8±9,5, skupina CON: 50,5±10,5), věkový rozdíl nebyl statisticky signifikantní (p=0,37). Hladiny kotininu v moči potvrdily, že všechny osoby vybrané do studie byly nekuřáci (průměrná hladina kotininu/mg kreatininu ± směrodatná odchylka; skupina BUS: 23,9±51,5, skupina

CON: 53,2±158,4; p=0,19).

Expozice znečištěnému ovzduší

Na obrázcích 1a a 1b jsou znázorněny hodnoty personální expozice B[a]P a k-PAU u řidičů autobusů a kontrol; obrázky 2a a 2b ukazují hladiny PM_{2,5} a PM₁₀ měřené stacionárními monitory v jednotlivých odběrových obdobích. Hladiny B[a]P a k-PAU byly stanoveny pomocí personálních monitorů a ukazují skutečnou expozici jednotlivých osob uvedeným látkám. Kvůli velmi malému množství prachových částic odebraných personálními monitory nebylo možné stanovit personální expozici PM_{2,5}. Pro zjištění celkové kvality ovzduší v jednotlivých odběrových obdobích byly použity hladiny prachových částic pomocí stacionárních monitorů VAPS. Výpočet expozice PM_{2,5} a PM₁₀ pro jednotlivá období byl proveden tak, že pro každý odběrový den byla vypočítána průměrná hodnota koncentrací prachových částic z obou pražských lokalit a tato hodnota byla přiřazena všem subjektům, kterým byly v daný den odebrány biologické vzorky. V letním období, kdy byly hodnoty ze stacionárního monitoringu zaznamenávány každý třetí den, byly použity koncentrace nejbližšího dne, kdy byly biologické vzorky odebrány.

Oproti očekávání byly expozice B[a]P vyšší u skupiny CON v období zima 2005, v létě 2006 byly expozice vyrovnány a v zimě 2006 byly vyšší u skupiny BUS. Hladiny PM_{2,5} v ovzduší byly signifikantně vyšší při monitorování skupiny BUS1 a BUS2 ve srovnání s kontrolními skupinami, u skupiny BUS3 byly hladiny vyrovnané se skupinou CON3. Podobný trend byl zaznamenán u částic PM₁₀ s tím rozdílem, že u skupiny BUS2 nebyl již rozdíl statisticky signifikantní.

Při porovnání jednotlivých období mezi sebou byly nejvyšší hladiny B[a]P, k-PAU, PM_{2,5} i PM₁₀ naměřeny v zimě 2005, následovala zima 2006 a nejnižší expozice byly zaznamenány v létě 2006.

Markery oxidačního poškození

Tabulky 1–3 ukazují hladiny markerů oxidačního stresu u řidičů autobusů, kontrol a všech subjektů pro jednotlivá odběrová období. Hladiny 8-oxodG, markeru oxidačního poškození DNA [5], byly signi-

Tabulka 1. Porovnání hladin 8-oxodG u skupiny BUS a CON pro jednotlivá odběrová období a u všech subjektů mezi obdobími (hodnoty v nmol 8-oxodG/mmol kreatininu)

	Median	Minimum	Maximum	Průměr	Směrodatná odchylka
Zima 2005 všechny subjekty	7,08	0,70	12,34	6,94	2,50
BUS1	7,79	2,64	12,34	7,59	2,25
CON1	6,12	0,70	11,38	6,29	2,59
Srovnání BUS1-CON1; p	<0,01				
Léto 2006 všechny subjekty	5,79	1,30	12,32	6,12	2,49
BUS2	6,91	1,30	10,68	6,73	2,48
CON2	5,11	2,34	12,32	5,51	2,36
Srovnání BUS2-CON2; p	<0,05				
Zima 2006 všechny subjekty	4,37	0,45	11,89	4,74	2,33
BUS2	5,73	1,54	11,89	5,67	2,50
CON2	3,94	0,45	7,65	3,82	1,73
Srovnání BUS3-CON3; p	<0,001				
zima 2005 vs. léto 2006; p=0,029 zima 2005 vs. zima 2006; p<0,001 zima 2006 vs. léto 2006; p<0,001					

Tabulka 2. Porovnání hladin 15-F2t-IsoP u skupiny BUS a CON pro jednotlivá odběrová období a u všech subjektů mezi obdobími (hodnoty v nmol 15-F2t-IsoP/mmol kreatininu)

	Median	Minimum	Maximum	Průměr	Směrodatná odchylka
Zima 2005 všechny subjekty	0,75	0,38	1,79	0,79	0,30
BUS1	0,81	0,38	1,55	0,84	0,26
CON1	0,68	0,39	1,79	0,73	0,33
Srovnání BUS1-CON1; p	<0,01				
Léto 2006 všechny subjekty	0,61	0,24	3,40	0,67	0,40
BUS2	0,62	0,24	1,14	0,63	0,21
CON2	0,60	0,28	3,40	0,72	0,52
Srovnání BUS2-CON2; p	=0,89				
Zima 2006 všechny subjekty	0,66	0,25	2,22	0,72	0,34
BUS2	0,76	0,31	2,22	0,85	0,35
CON2	0,51	0,25	1,56	0,60	0,28
Srovnání BUS3-CON3; p	<0,001				
zima 2005 vs. léto 2006; p<0,001 zima 2005 vs. zima 2006; p=0,055 zima 2006 vs. léto 2006; p=0,113					

fikantně zvýšeny u skupiny BUS ve všech sledovaných obdobích. Při srovnání jednotlivých období mezi sebou byly též zjištěny statisticky významné rozdíly; hladiny 8-oxodG u všech subjektů (skupina BUS+CON) byly nejvyšší v zimě 2005, následované létem 2006 a zimou 2006.

15-F2t-IsoP, marker peroxidace lipidů [6], byl signifikantně zvýšen u skupiny BUS v zimním období 2005 a 2006, zatímco v létě 2006 mezi sledovanými skupinami nebyl žádný rozdíl. Srovnání období mezi sebou ukázalo nejvyšší hladiny 15-F2t-IsoP v zimě 2005, přičemž tato hodnota se signifikantně lišila pou-

ze od hladin naměřených v létě 2006.

Trend zjištěný pro hladiny 15-F2t-IsoP byl pozorován též pro marker oxidace proteinů – karbonylové skupiny [10,11]. Signifikantní rozdíl mezi skupinami BUS a CON byl pozorován pouze v zimních obdobích, zatímco v létě 2006 byly hladiny u obou skupin vyrovnané. Zajímavý výsledek přineslo porovnání odběrových období mezi sebou: nejvyšší hladiny karbonylových skupin byly zaznamenány u vzorků odebíraných v letním období 2006, zatímco hladiny v zimních obdobích 2005 a 2006 byly signifikantně nižší a vzájemně se od sebe nelišily.

Korelace markerů oxidačního stresu s faktory, které mohou mít na jejich hladiny vliv

Z faktorů případně ovlivňujících hladiny markerů oxidačního stresu jsou dále uvedeny výsledky pro parametry znečištění ovzduší: B[a]P, k-PAU, PM_{2,5} a PM₁₀. Výsledky korelační analýzy ukazuje tabulka IV; pro statistickou analýzu byly zkombinovány dohromady výsledky získané pro obě studované skupiny (BUS i CON) a všechna období (zima 2005, léto 2006, zima 2006). Oxidační poškození DNA bylo signifikantně pozitivně ovlivněno expozicí prachovým částicím PM_{2,5} i PM₁₀. Peroxidace lipidů byla navíc pozitivně ovlivněna hladinami expozice B[a]P a k-PAU. Obdobný výsledek byl získán pro oxidace proteinů s tím rozdílem, že korelace byla negativní. Společným faktorem ovlivňujícím (pozitivně či negativně) hladiny všech markerů oxidačního stresu byla expozice prachovým částicím PM_{2,5}.

DISKUSE

Cílem prezentované studie bylo ověřit důsledky profesionální expozice řidičů autobusů na hladiny zvolených markerů oxidačního poškození DNA, lipidů a proteinů a pokusit se stanovit míru podílu expozice prachovým částicím a karcinogenním polycyklickým aromatickým uhlovodíkům na změny v těchto vybraných markerech.

Výchozím předpokladem pro výběr exponované skupiny byla hypotéza, že řidiči autobusů jsou po většinu pracovní doby vystaveni ovzduší výrazně znečištěnému vý-

Tabulka 3. Porovnání hladin karbonylových skupin u skupiny BUS a CON pro jednotlivá odběrová období a u všech subjektů mezi obdobími (hodnoty v nmol karbonylových skupin/ml plazmy)

	Median	Minimum	Maximum	Průměr	Směrodatná odchylka
Zima 2005 všechny subjekty	13,65	9,84	18,99	13,66	1,78
BUS1	14,08	11,80	18,99	14,36	1,69
CON1	12,92	9,84	16,63	13,03	1,63
Srovnání BUS1-CON1; p	=0,001				
Léto 2006 všechny subjekty	17,20	12,02	23,59	17,50	2,54
BUS2	17,52	12,02	23,23	17,78	2,59
CON2	16,62	13,03	23,59	17,22	2,50
Srovnání BUS2-CON2; p	=0,28				
Zima 2006 všechny subjekty	12,44	9,39	31,06	13,18	3,25
BUS2	13,54	9,79	19,41	14,20	2,99
CON2	11,73	9,39	31,06	12,16	3,20
Srovnání BUS3-CON3; p	<0,001				
zima 2005 vs. léto 2006; p<0,001					
zima 2005 vs. zima 2006; p=0,231					
zima 2006 vs. léto 2006; p<0,001					

Tabulka 4. Korelace mezi markery oxidačního stresu a parametry znečištěného ovzduší

		8-oxodG	15-F2t-IsoP	karbonylové skupiny	B[a]P	k-PAU	PM _{2,5}	PM ₁₀
8-oxodG	R	–	0,212	0,057	0,009	0,009	0,212	0,307
	p	–	<0,001	0,338	0,874	0,874	<0,001	<0,001
15-F2t-IsoP	R	0,212	–	0,083	0,172	0,180	0,168	0,116
	p	<0,001	–	0,165	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,05
Karbonylové skupiny	R	0,057	0,083	–	–0,371	–0,379	–0,404	–0,030
	p	0,338	0,165	–	<0,001	<0,001	<0,001	0,613

fukovými plyny a dalšími škodlivinami, což by se mohlo negativně odrážet na jejich zdravotním stavu. Tento předpoklad nebyl ve všech případech potvrzen: v zimním období 2005 byla personální expozice B[a]P a k-PAU signifikantně vyšší u kontrolní skupiny; v létě 2006 byl tentýž výsledek pozorován pro expozici k-PAU. Avšak pro letní odběr je třeba zdůraznit, že hladiny expozice k-PAU i B[a]P jsou velmi nízké, v mnoha případech pod detekčním limitem použitých analytických metod. Nelze tedy vyloučit možnost, že v tomto případě se jedná o chybu měření. Pro výsledky získané v zimním období 2005 lze najít vysvětlení: řidiči autobusů tráví sice pracovní dobu v městském provozu, ale jsou v uzavřené kabině, kde mohou být expozice B[a]P a k-PAU paradoxně relativně nízké. Narozdíl od personálního monitoringu byly hladiny prachových částic PM_{2,5}

i PM₁₀ vždy buď vyšší v době odběru exponované skupiny, nebo alespoň srovnatelné. Protože jsme použili údaje ze stacionárního monitoringu, naměřené hladiny prachových částic nekorespondují přímo s expozicí sledovaných subjektů těmto částicím, ale ilustrují celkovou kvalitu ovzduší v době provádění odběrů.

Markery oxidačního poškození sledují odlišný trend: společně pro všechny tři markery lze uzavřít, že jejich hladiny jsou v zimním období vždy vyšší u řidičů autobusů než u kontrol. Pro 8-oxodG byl navíc nalezen též rozdíl i v letním období 2006.

Vzájemné porovnání jednotlivých odběrových období z hlediska hladin znečištění ovzduší, kdy hodnoty získané pro skupinu BUS i CON pro každé dané období byly spojeny a vzájemně porovnány, ukazuje, že v zimě 2005 bylo znečiš-

tění nejvyšší, následovala zima 2006 a podle očekávání nejkvalitnější ovzduší bylo v létě 2006.

Vzájemné srovnání jednotlivých období z hlediska hladin markerů oxidačního stresu ukazuje, že pro 8-oxodG a 15-F2t-IsoP byly nejvyšší hodnoty naměřeny v zimě 2005, což koresponduje s hladinami znečištěného ovzduší v tomto období. Zajímavý výsledek byl získán pro hladiny karbonylových skupin: jejich hladiny byly v létě 2006 signifikantně vyšší než v zimě 2005 i v zimě 2006. Lze předpokládat, že jejich hladiny jsou ovlivněny jiným faktorem než k-PAU, nebo prachovými částicemi. Vzhledem k tomu, že měření jiných škodlivin nebylo v rámci této studie prováděno ve všech obdobích, lze pouze spekulovat, že hladiny látek, které jsou v letním období výrazně zvýšené ve srovnání se zimním obdobím, mohou mít na svědomí tento neočekávaný výsledek. Příkladem takové látky je přízemní ozon, jehož hladiny byly v létě 2006 výrazně vyšší. Možná jsou však i jiná vysvětlení. Stabilita jednotlivých markerů oxidace makromolekul se liší: v případě 8-oxodG a 15-F2t-IsoP je spíše v řádu dnů, zatímco u karbonylových skupin se jedná o delší intervaly v řádu týdnů. Je možné, že naměřené hodnoty karbonylových skupin ve skutečnosti odrážejí expozice, kterým byly subjekty vystaveny před několika týdny, a proto nemůžeme jejich hladiny korelovat s aktuálními expozicemi k-PAU a prachových částic. Získané výsledky je tedy třeba hodnotit kriticky.

8-oxodG je často používaným markerem oxidačního poškození a byl studován již v několika studiích zabývajících se vlivem znečištěného ovzduší na řidiče autobusů, řidiče taxi a osoby žijících v centru města. V poslední zmíněné studii bylo sledováno 50 studentů žijících v Kodani po dobu jednoho roku a byly sledovány hladiny personální expozice PM_{2,5} a markery poškození DNA. Současně byly měřeny hladiny PM_{2,5} stacionárním monitoringem. Výsledkem studie bylo, že pouze personální expozice PM_{2,5} byla prediktorem hladin 8-oxodG v lymfocytární DNA. Nebyl zjištěn žádný vliv na hladiny 8-oxodG v moči, ani žádné ovlivnění hladinami PM_{2,5} naměřenými stacionárním monitoringem. Autoři uzavírají, že měření personální expozice PM_{2,5} je z hlediska indukce oxidačního poškození DNA relevantnější

než hladiny $PM_{2,5}$ naměřené stacionárním monitoringem. V naší studii nebyl prováděn z technických důvodů personální monitoring $PM_{2,5}$. Množství odebraných prachových částic za dobu personálního monitoringu je příliš malé na to, aby bylo možné provést přesnou analýzu expozice $PM_{2,5}$. Avšak naše výsledky ukazují, narozdíl od výše zmíněné studie, že hladiny $PM_{2,5}$ i PM_{10} měřené stacionárním monitoringem signifikantně korelují s hladinami 8-oxodG v moči. Důvodů pro odlišné výsledky může být celá řada, patří mezi ně zejména fakt, že kvalita ovzduší v Kodani je lepší než Praze (nižší expozice $PM_{2,5}$ – 9,2 vs. 22,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ – průměrná hodnota naměřená v lokalitě Praha-Strahov v roce 2006; odlišné chemické složení PM).

Hladiny 8-oxodG nekorelovaly, na rozdíl od PM, s expozicí B[a]P a k-PAU. Jakkoliv se může tento výsledek zdát překvapivý, je nutné si uvědomit, že 8-oxodG v moči odráží nejen oxidační poškození, ale též aktivitu systémů reparace DNA, které získané výsledky též ovlivňují. Navíc, k-PAU nemusí být těmi složkami PM, které oxidační poškození vyvolávají.

Studie analyzující vliv prachových částic na oxidaci proteinů a lipidů jsou velmi vzácné. Jako příklad mohou sloužit studie a, avšak ani v jedné z nich nebyly analyzovány hladiny karbonylových skupin a 15-F2t-IsoP ve vztahu ke znečištěnému ovzduší charakterizovanému hladinami expozice k-PAU a PM.

Závěrem lze shrnout, že u řidičů autobusů pražské MHD je pozorováno zvýšené oxidační poškození DNA, lipidů i proteinů ve srovnání s kontrolou. Toto zvýšení je pozorováno zejména v zimním období, pravděpodobně jako důsledek většího znečištění ovzduší. Znečištěné ovzduší se proto zdá být faktorem ovlivňujícím oxidační poškození. Expozice $PM_{2,5}$ je konsistentně signifikantně korelována s indukci oxidačního poškození, zatímco přítomnost k-PAU hraje pravděpodobně jen minoritní roli. Pro detekci oxidačního poškození znečištěným ovzduším se zdají být vhodnější markery 8-oxodG a 15-F2t-IsoP než hladiny karbonylových skupin. Naše výsledky jednoznačně ukazují, že profesionální expozice znečištěnému ovzduší u řidičů autobusů může ovlivnit jejich zdravotní stav. Z definice oxidačního poškození vyplývá, že tyto změny mohou urychlit pro-

ces stárnutí a výskyt kardiovaskulárních chorob. Je tedy zjevné, že zdravotnímu stavu této rizikové skupiny by měla být věnována soustavná pozornost.

Poděkování

Studie byla provedena s finanční podporou Ministerstva životního prostředí ČR (grant VaV-SL/5/160/05) a Akademie věd ČR (grant IQS500390506).

LITERATURA

- [1] Brunekreef, B., Holgate, S. T.: Air pollution and health. *Lancet* 360, 2002, s. 1233-1242.
- [2] Pope, C. A., III, Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G. D.: Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama* 287, 2002, s. 1132-1141.
- [3] Ricciardolo, F. L., Di, S. A., Sabatini, F., Folkerts, G.: Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur.J Pharmacol.* 533, 2006, s. 240-252.
- [4] Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M.: The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 44, 2004, s. 239-267.
- [5] Sorensen, M., Autrup, H., Moller, P., Hertel, O., Jensen, S. S., Vinzents, P., Knudsen, L. E., Loft, S.: Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat.Res* 544, 2003, s. 255-271.
- [6] Cracowski, J. L., Durand, T., Bessard, G.: Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical applications. *Trends Pharmacol.Sci* 23, 2002, s. 360-366.
- [7] Morrow, C. S., Chiu, J., Cowan, K. H.: Posttranscriptional control of glutathione S-transferase pi gene expression in human breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* 267, 1992, s. 10544-10550.
- [8] Montuschi, P., Barnes, P. J., Roberts, L. J.: Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *Faseb J.* 18, 2004, s. 1791-1800.
- [9] Pratico, D., Barry, O. P., Lawson, J. A., Adiyaman, M., Hwang, S. W., Khanapure, S. P., Iuliano, L., Rokach, J., FitzGerald, G. A.: IPF2alpha-I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1998, s. 3449-3454.
- [10] Shacter, E.: Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* 32, 2000, s. 307-326.
- [11] Beal, M. F.: Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic.Biol.Med.* 32, 2002, s. 797-803.
- [12] Yin, B., Whyatt, R. M., Perera, F. P., Randall, M. C., Jedrychowski, W., Cooper, Y., Santella, R. M.: Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by immunoaffinity chromatography-immunoassay. *Free Radical Biol.Med.* 18, 1995, s. 1023-1032.
- [13] Rossner, P., Jr., Svecova, V., Milcova, A., Lnenickova, Z., Solansky, I., Santella, R. M., Sram, R. J.: Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers. *Mutat.Res* 617, 2007, s. 23-32.
- [14] Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Dorn, H., Winterbourn, C. C.: Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radical Biol.Med.* 23, 1997, s. 361-366.
- [15] Langone, J. J., Van, V. H.: Radioimmunoassay of nicotine, cotinine, and gamma-(3-pyridyl)-gamma-oxo-N-methylbutyramide. *Methods Enzymol.* 84, 1982, s. 628-640.
- [16] Loft, S., Poulsen, H. E., Vistisen, K., Knudsen, L. E.: Increased urinary excretion of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative DNA damage, in urban bus drivers. *Mutat.Res* 441, 1999, s. 11-19.
- [17] Chuang, C. Y., Lee, C. C., Chang, Y. K., Sung, F. C.: Oxidative DNA damage estimated by urinary 8-hydroxydeoxyguanosine: influence of taxi driving, smoking and areca chewing. *Chemosphere* 52, 2003, s. 1163-1171.
- [18] Sorensen, M., Autrup, H., Hertel, O., Wallin, H., Knudsen, L. E., Loft, S.: Personal exposure to PM2.5 and biomarkers of DNA damage. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 12, 2003, s. 191-196.
- [19] Cooke, M. S., Evans, M. D., Dove, R., Rozalski, R., Gackowski, D., Siomek, A., Lunec, J., Olinski, R.: DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat.Res.* 574, 2005, s. 58-66.
- [20] Sorensen, M., Daneshvar, B., Hansen, M., Dragsted, L. O., Hertel, O., Knudsen, L., Loft, S.: Personal PM2.5 exposure and markers of oxidative stress in blood. *Environ Health Perspect* 111, 2003, s. 161-166.
- [21] Autrup, H., Daneshvar, B., Dragsted, L. O., Gamborg, M., Hansen, M., Loft, S., Okkels, H., Nielsen, F., Nielsen, P. S., Raffn, E., Wallin, H., Knudsen, L. E.: Biomarkers for exposure to ambient air pollution--comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ Health Perspect* 107, 1999, s. 233-238.