

20. 5. 2019 | Drážďany

EU projekt OdCom - závěrečná vědecká konference



Europäische Union. Europäischer
Fonds für regionale Entwicklung.
Evropská unie. Evropský fond pro
regionální rozvoj.



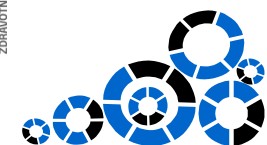
Ahoj sousede. Hallo Nachbar.
Interreg V A / 2014 – 2020

Porovnání cytotoxicity organických sloučenin navázaných na vzduchové částice

**Táňa Závodná¹, Alena Milcová¹, Zuzana Nováková¹,
Ivan Beneš², Jan Leníček², Jan Topinka¹**

¹Ústav experimentální medicíny AV ČR (Praha)

²Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem





Zdravotní důsledky znečištění ovzduší PM_{10}



- Epidemiologická data spojují znečištění ovzduší s řadou onemocnění
- Prokázán **podíl částic (PM_{10}) na negativních zdravotních účincích** znečištěného ovzduší
- PM_{10} fungují jako **nosiče** látek adsorbovaných na jejich povrch (až tisíce různých chemických látek)
- Z hlediska toxikologie jsou významné zejm. **organické látky** (**PAHs** a **jejich deriváty**; **fenoly**, **aldehydy**, **chinony**, **chlorované aromáty**, ...)

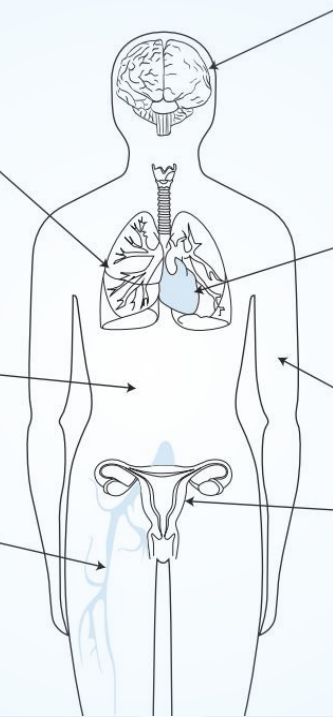
Účinky na respirační systém

Mortalita na onemocnění dýchacích cest
Snížení plicních funkcí
Astma
Chronická obstrukční plicní nemoc
Akutní respirační symptomy
Rakovina plic
Pneumonie
Záněty dýchacích cest

Inzulínová rezistence
Metabolismus kostí

Účinky na cévní systém

Mortalita na cévní onemocnění
Cévní funkce
Krevní tlak
Dysfunkce endotelu
Zvýšená koagulace krve
Hluboká žilní trombóza



Účinky na nervový systém

Vývoj nervové soustavy
Neurodegenerativní onemocnění
Ovlivnění autonomního nervového systému

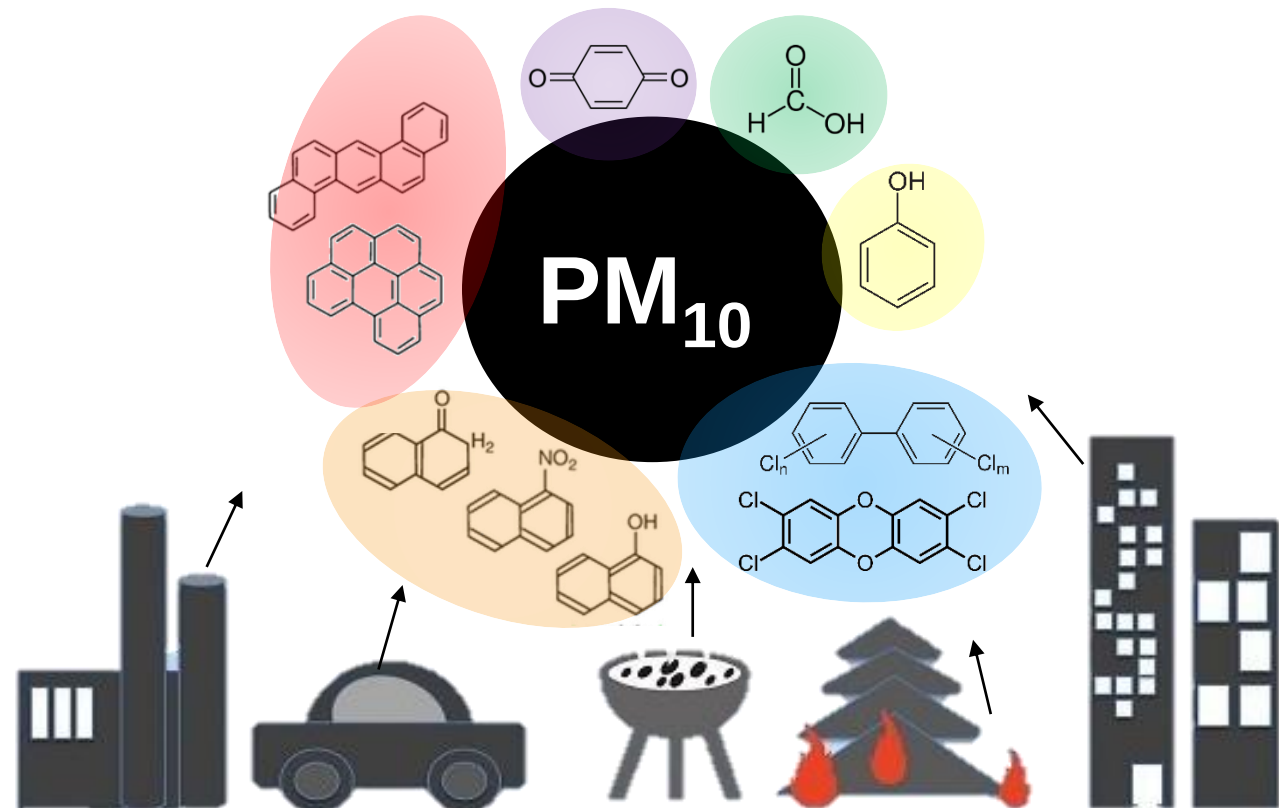
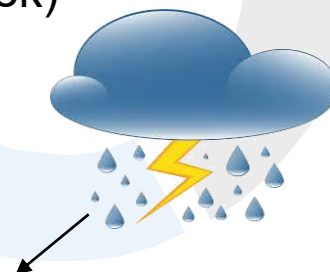
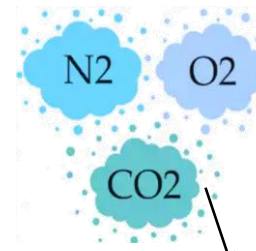
Účinky na srdce

Mortalita na onemocnění srdce
Hodnoty EKG
Změny ve variabilitě srdeční frekvence

Stárnutí kůže

Účinky na rozmnožovací systém

Snížení porodní váhy
Fetální růst
Vrozené vady
Předčasné porody
Kvalita spermatu
Preeklampsie



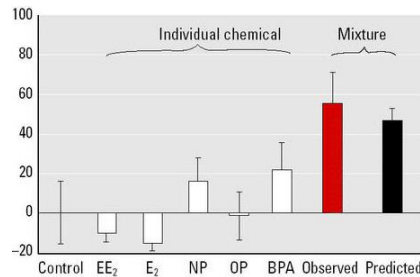
Jak zhodnotit toxicitu komplexních směsí látek vázaných na částice v ovzduší?

Měření koncentrací + srovnání s limity



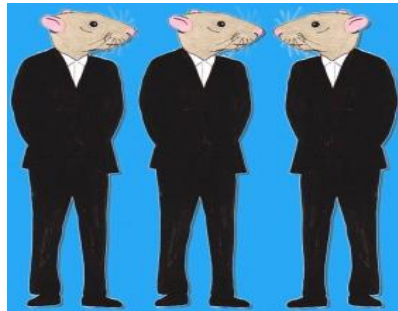
- Možná přítomnost vysoce toxických látek (toxických i při podlimitních koncentracích znečištění ovzduší PM)

Chemická analýza



- Efekt směsí (možné interakce složek směsi)
- Toxicita látek, které nebyly analyzovány a látek v koncentracích od detekčním limitem
- Účinky metabolitů

Toxikologické testy na zvířatech

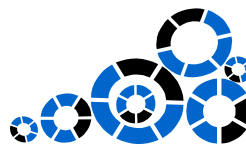
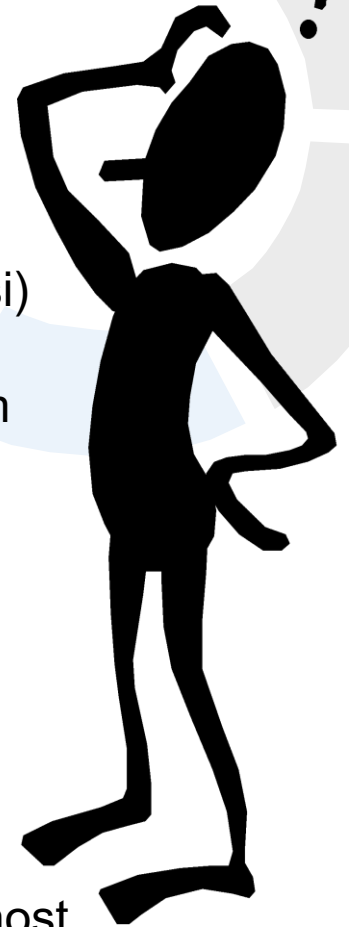


- Časová a finanční náročnost
- Etické otázky
- Mezidruhové rozdíly
- Nelze využít pro reálné vzorky ovzduší

Screeningové in vitro testy



- Jednoduchost, časová a finanční nenáročnost
- Možnost testovat reálné směsi odebrané z prostředí a zohlednit aktuální podmínky při odběru (lokalita, sezóna, aktuální zdroje znečištění ovzduší)
- Srovnání toxického potenciálu





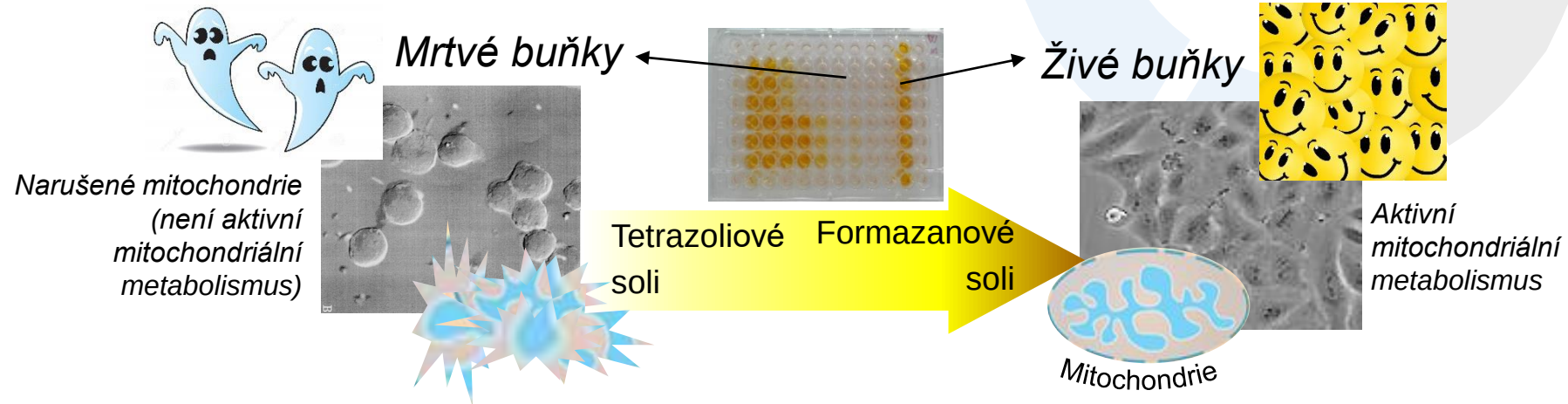
Hodnocení cytotoxicity



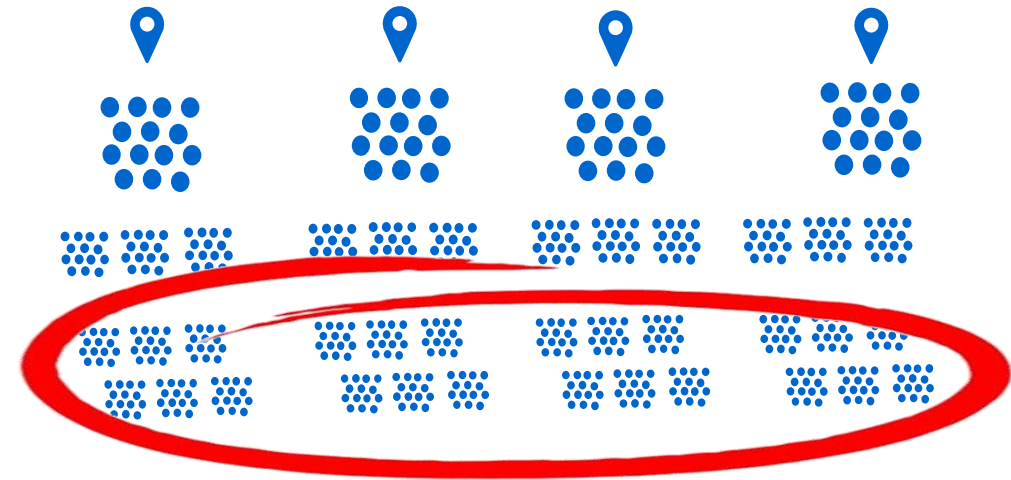
- Základní parametr v toxikologii
- Srovnání toxického potenciálu (prioritizace pro další testování)
- Určení koncentračního rozmezí pro další testování



- **WST-1 test**
hodnocení metabolické aktivity buněk, kolorimetrický test



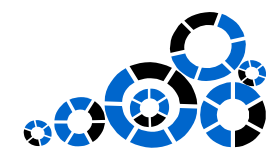
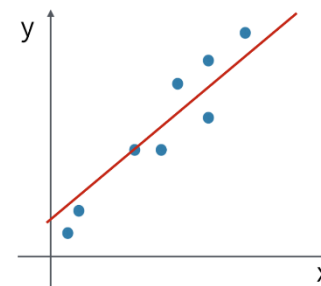
- 4 odběrová místa
- Cca 14 vzorků z každého odběrového místa
- 3 nezávislá opakování testu (A549 buňky, 24 h expozice)
- 2 odběrové kampaně (2017, 2018)





Cíle studie

- Srovnat toxické účinky organických extraktů PM_{10} ze 4 různých lokalit na lidských plicních buňkách za využití jednoduchého *in vitro* testu cytotoxicity
- Posoudit denní variabilitu mezi vzorky PM_{10} v průběhu odběrových kampaní (únor – březen)
- Porovnat výsledky testování mezi 2 odběrovými kampaněmi
- Posoudit, zda toxicita koreluje s koncentracemi PM v ovzduší





Postup a metody

Odběr a zpracování vzorků PM



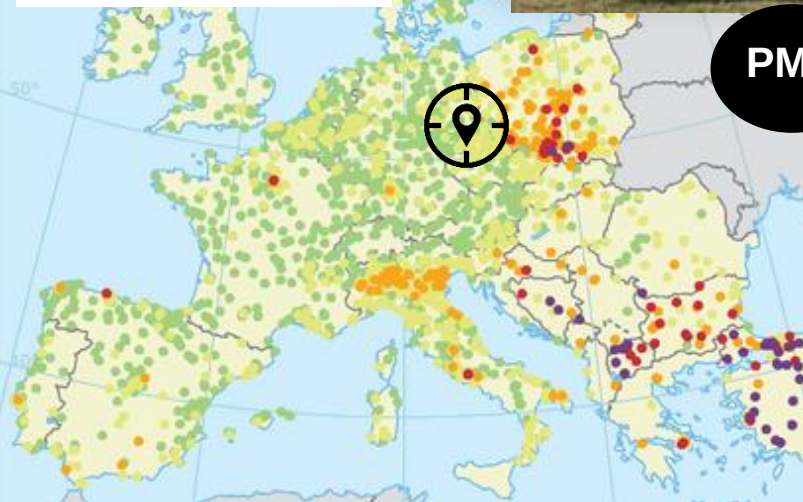
Odběr částic

Annual concentrations of
PM₁₀ in 2016

μg/m³

- ≤ 20
- 20-31
- 31-40
- 40-50
- > 50

0 500 1 000 Km



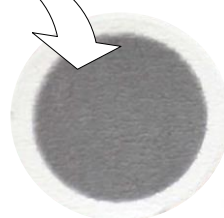
Odběr PM₁₀ (únor, březen 2017, 2018)
HiVol vzorkovačem na SiO₂ filtr (150 mm)



PM₁₀

Gravimetrie

Výpočet
koncentrace
EOM na
základě vážení
filtrů před a po
extrakci



Výpočet
koncentrace
PM10 na
základě
vážení filtrů
před a po
expozici



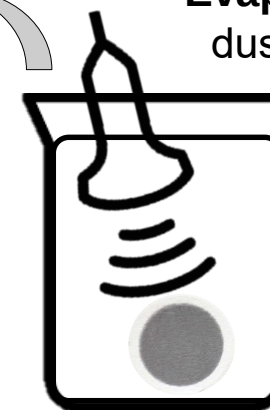
Extrakce EOM



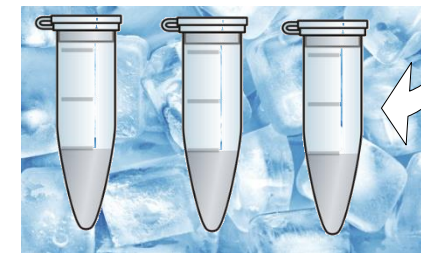
Evaporace
dusíkem



Rozpouštění
v DMSO



Ultrasonikace
filtrů (dichlor-
methan/methanol)



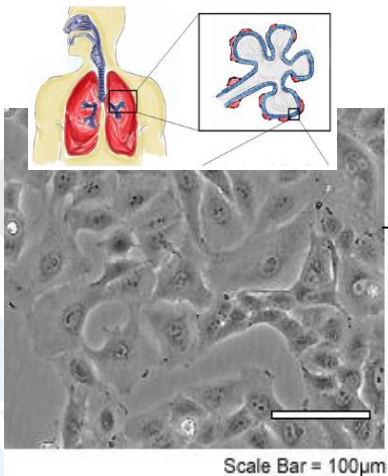
EOM uchovávány
při -80 °C



Postup a metody Cytotoxicita

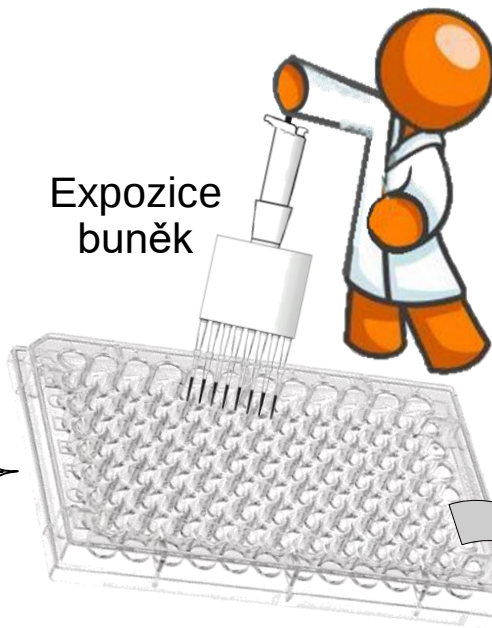


Lidské plicní
buňky A549



EOM naředěn
v buněčném
kultivačním médiu

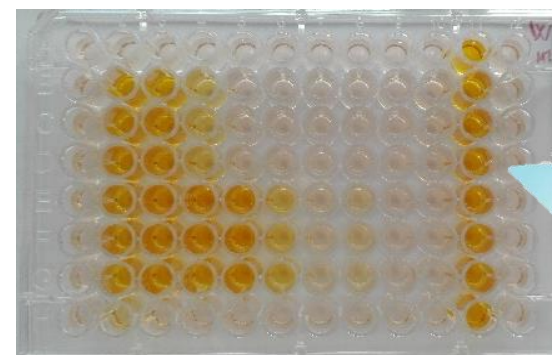
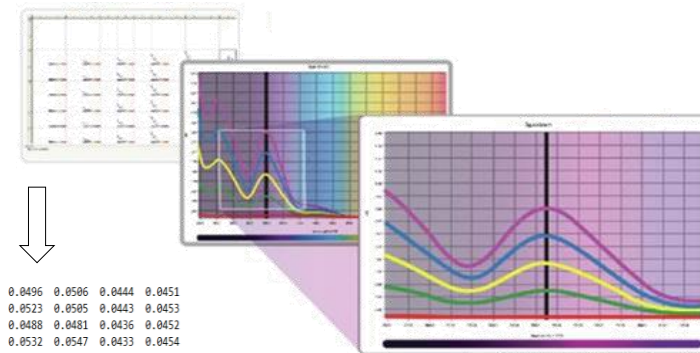
Expozice
buněk



Inkubace
24 h



0.0465	0.0453	0.0456	0.0454	0.047	0.0467	0.0472	0.0472	0.0496	0.0506	0.0444	0.0451
0.0441	0.0459	0.0462	0.0447	0.0462	0.0476	0.0471	0.0491	0.0523	0.0505	0.0443	0.0453
0.0446	0.0452	0.0444	0.0445	0.0457	0.0469	0.0478	0.0465	0.0488	0.0481	0.0436	0.0452
0.0442	0.0449	0.0446	0.0481	0.0492	0.0537	0.0501	0.0487	0.0532	0.0547	0.0433	0.0454
0.0442	0.0447	0.0623	0.0454	0.048	0.0482	0.0517	0.0474	0.0496	0.0575	0.0454	0.0465
0.0442	0.044	0.0447	0.0453	0.0484	0.05	0.0521	0.0507	0.056	0.0572	0.0452	0.0513
0.0444	0.0446	0.0459	0.0451	0.0493	0.0495	0.051	0.0495	0.0542	0.0546	0.0435	0.045
0.0445	0.0444	0.0437	0.0436	0.0432	0.0456	0.0442	0.0435	0.043	0.0437	0.0491	0.0449



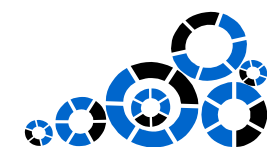
Měření
absorbance



Tetrazoliové
soli

Formazanové
soli

WST-1 test
(inkubace 1 h)

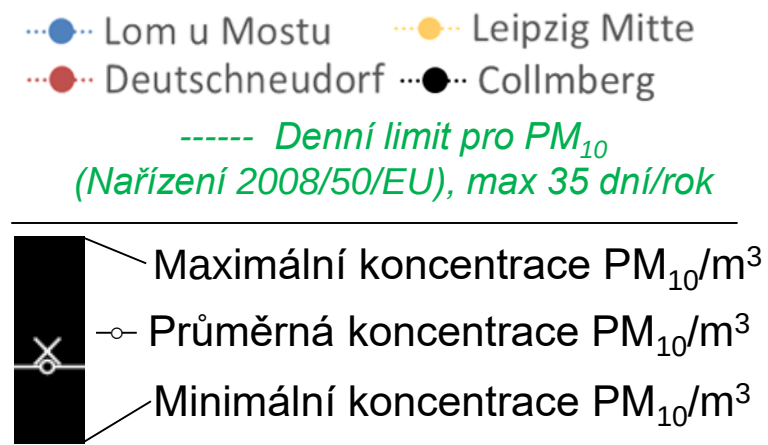
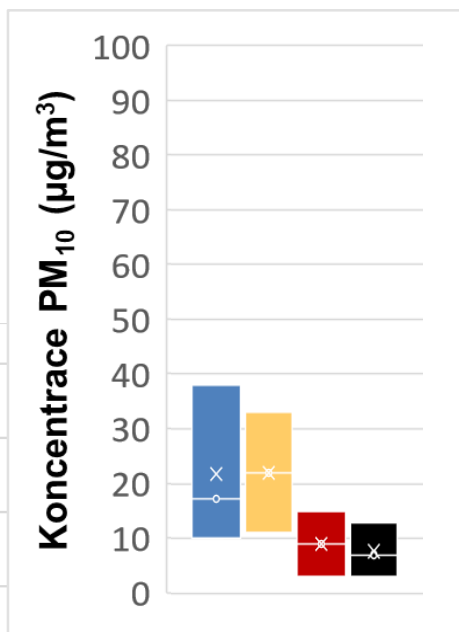
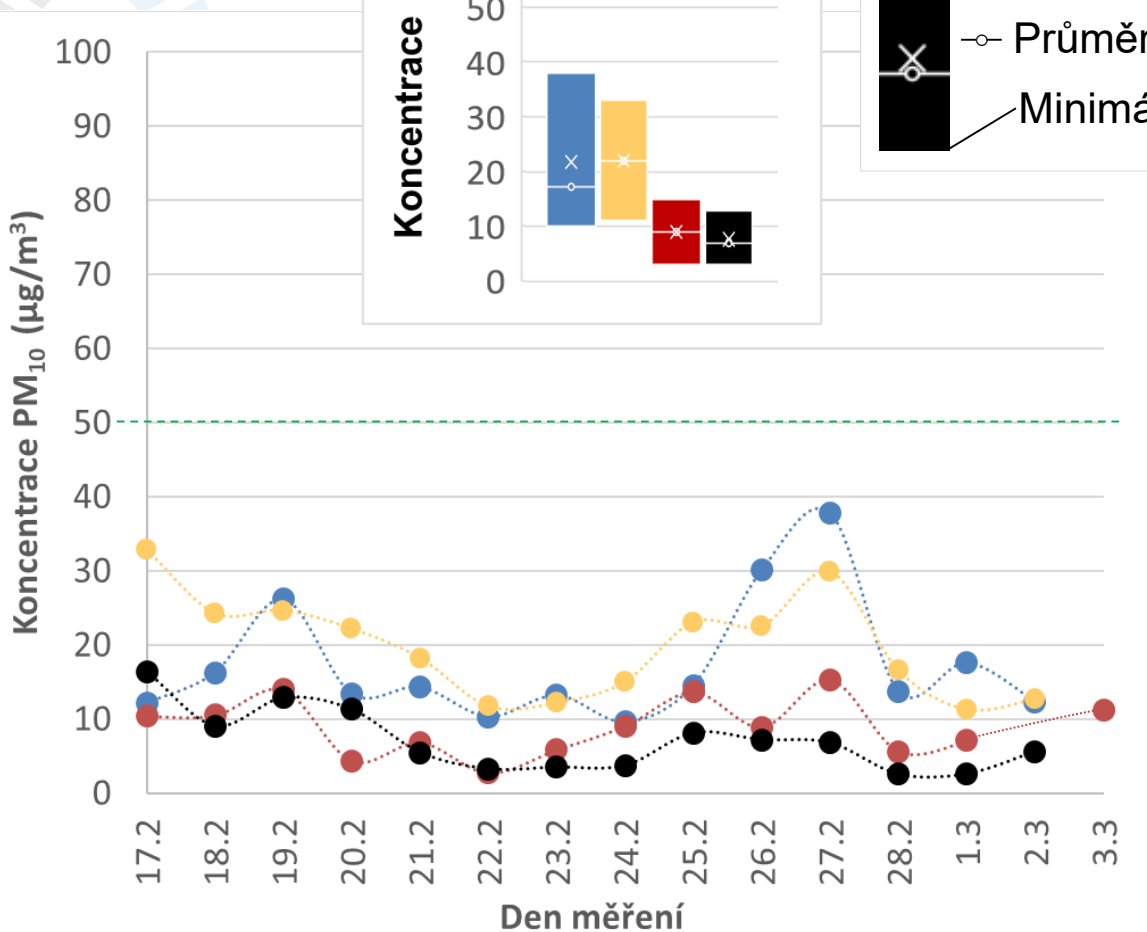




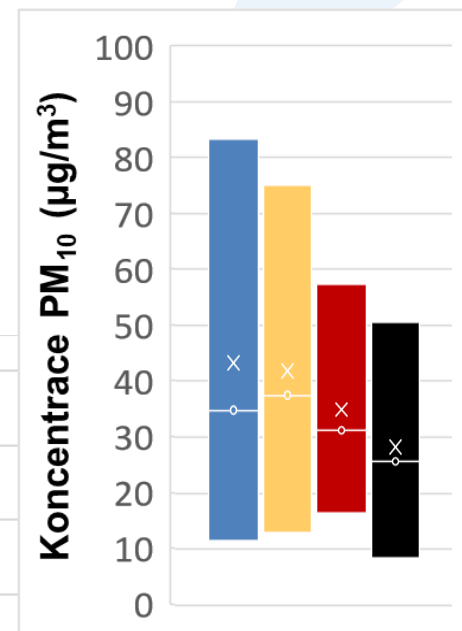
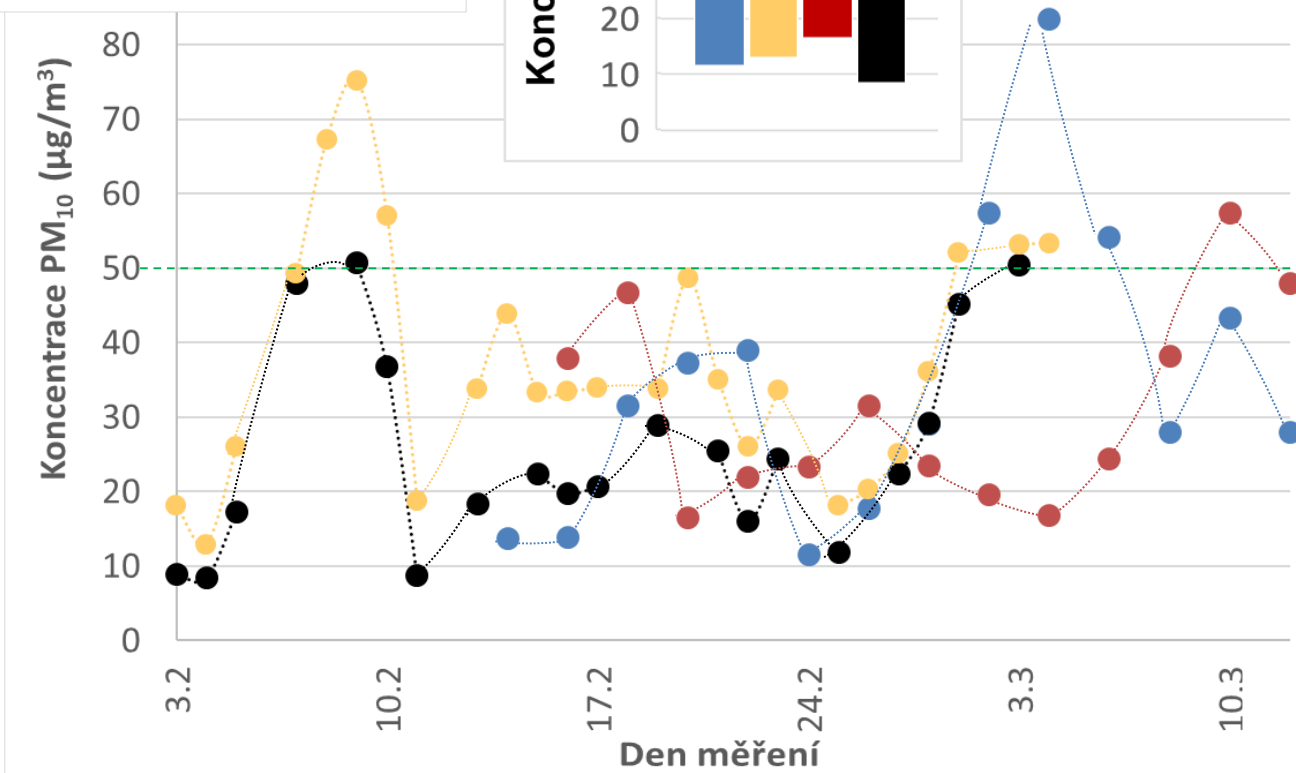
Výsledky měření koncentrací PM_{10}



2017

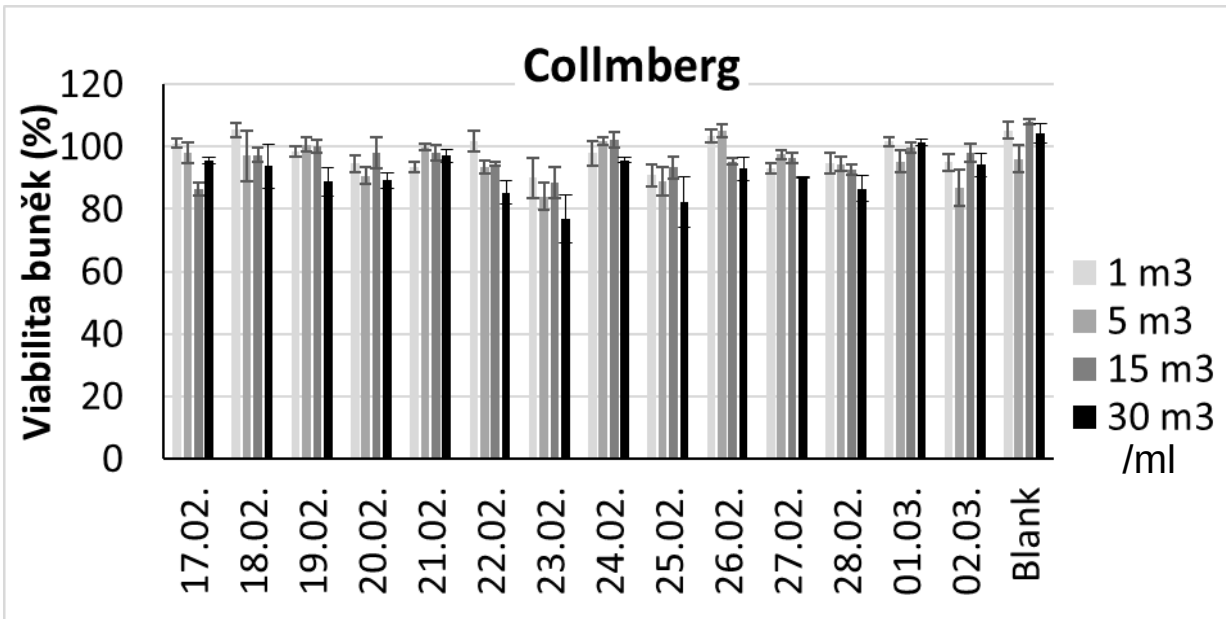
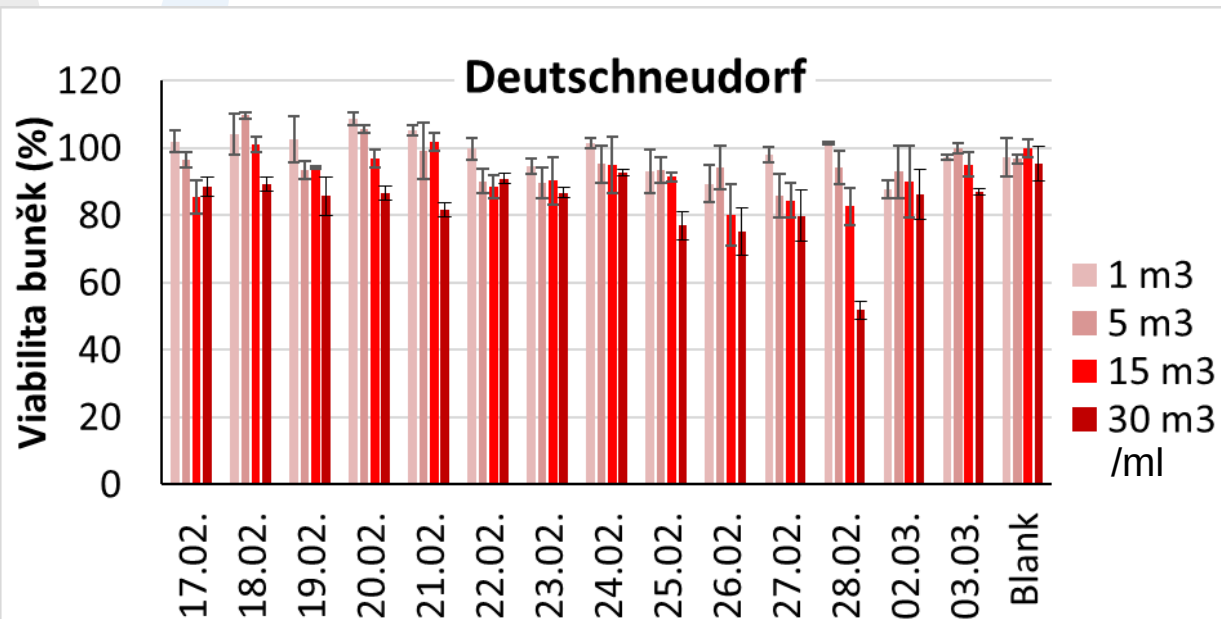
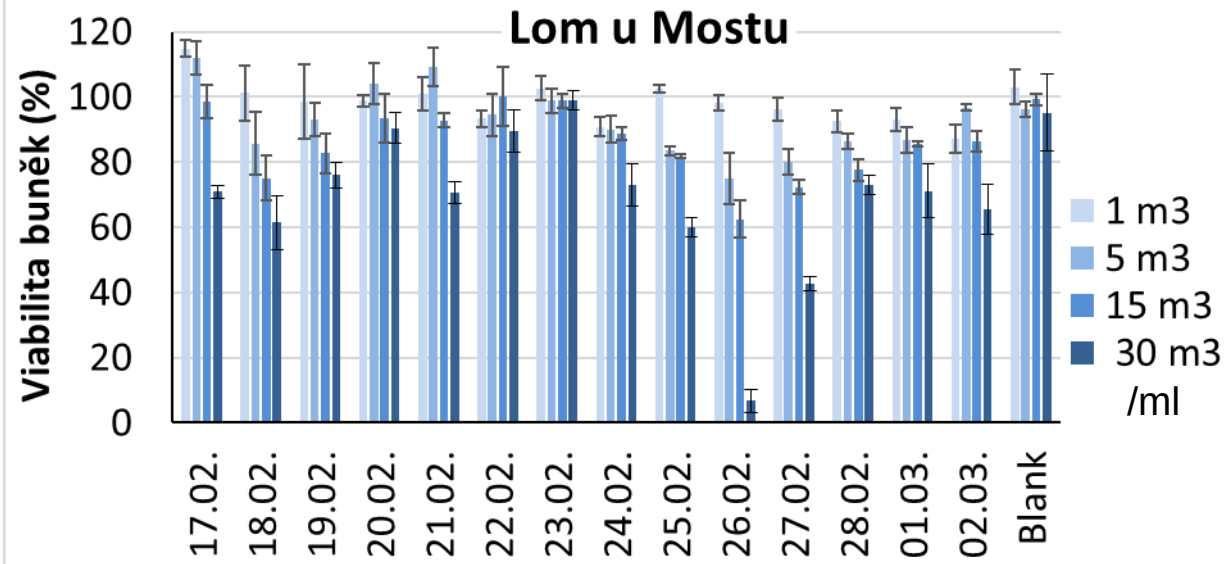
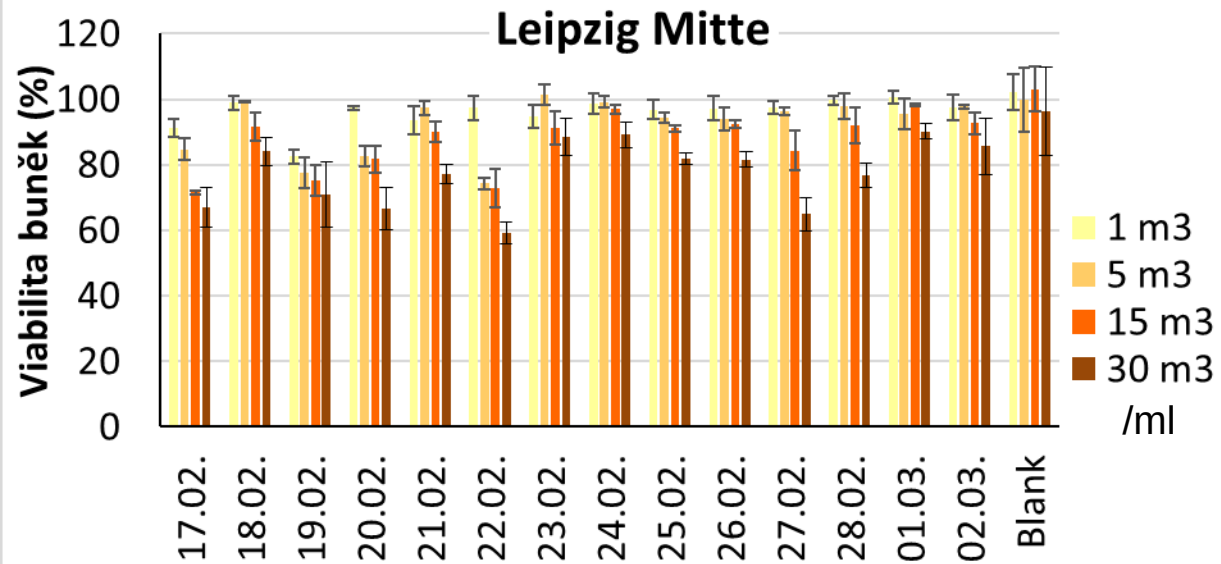


2018



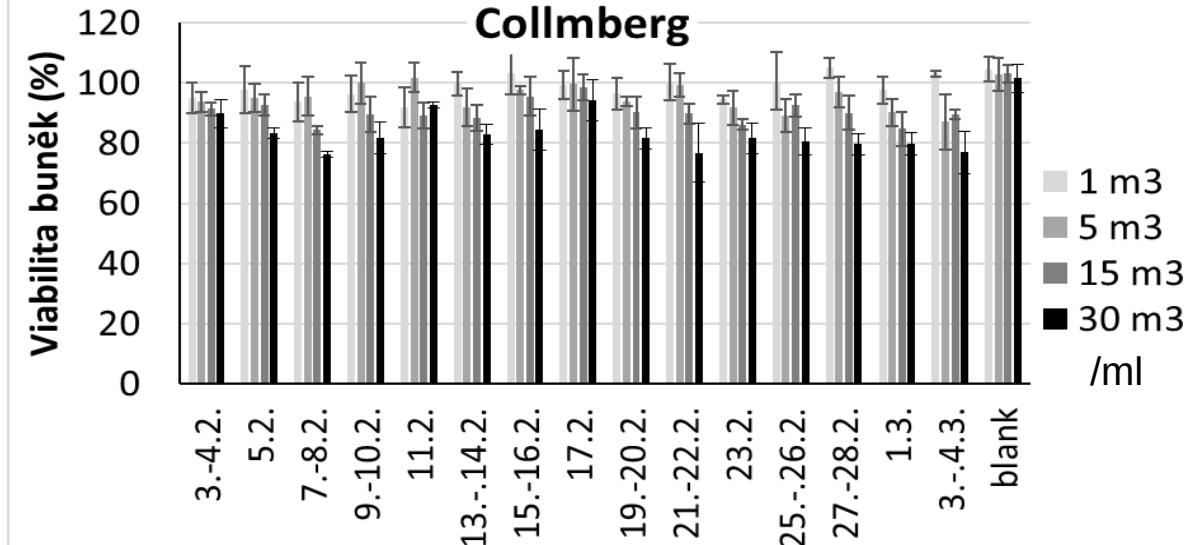
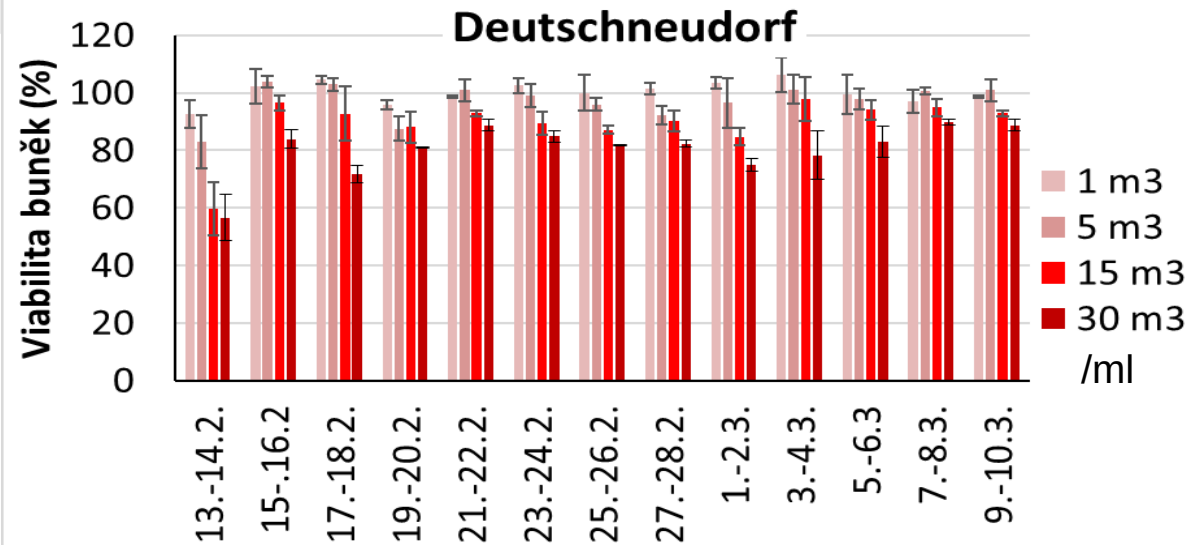
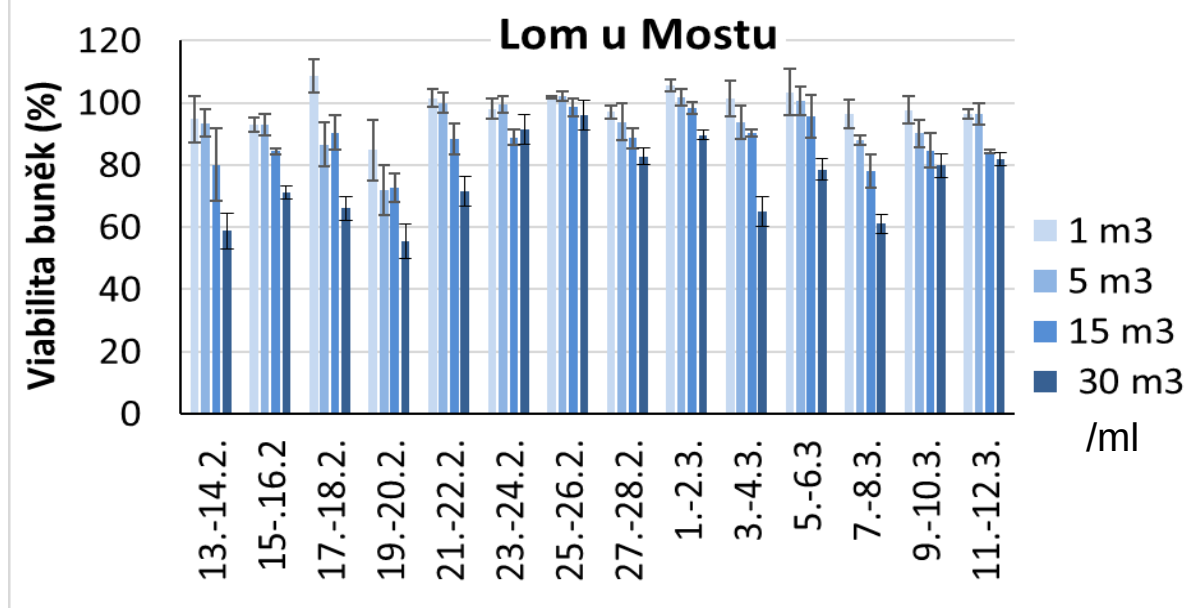
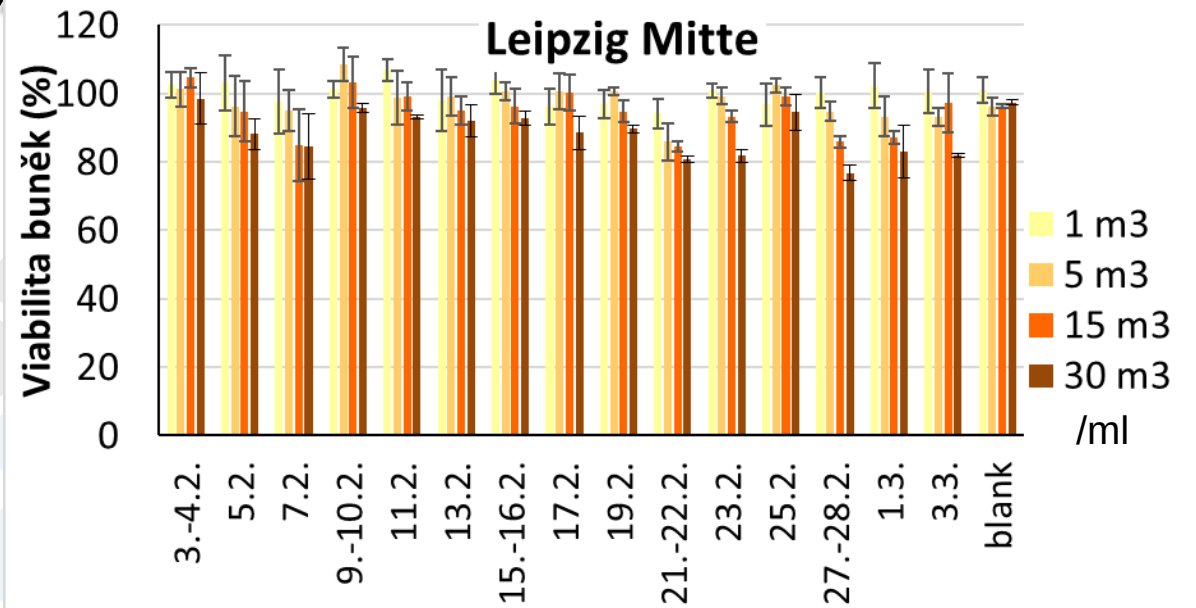


Výsledky testování cytotoxicity (odběr 2017)





Výsledky testování cytotoxicity (odběr 2018)

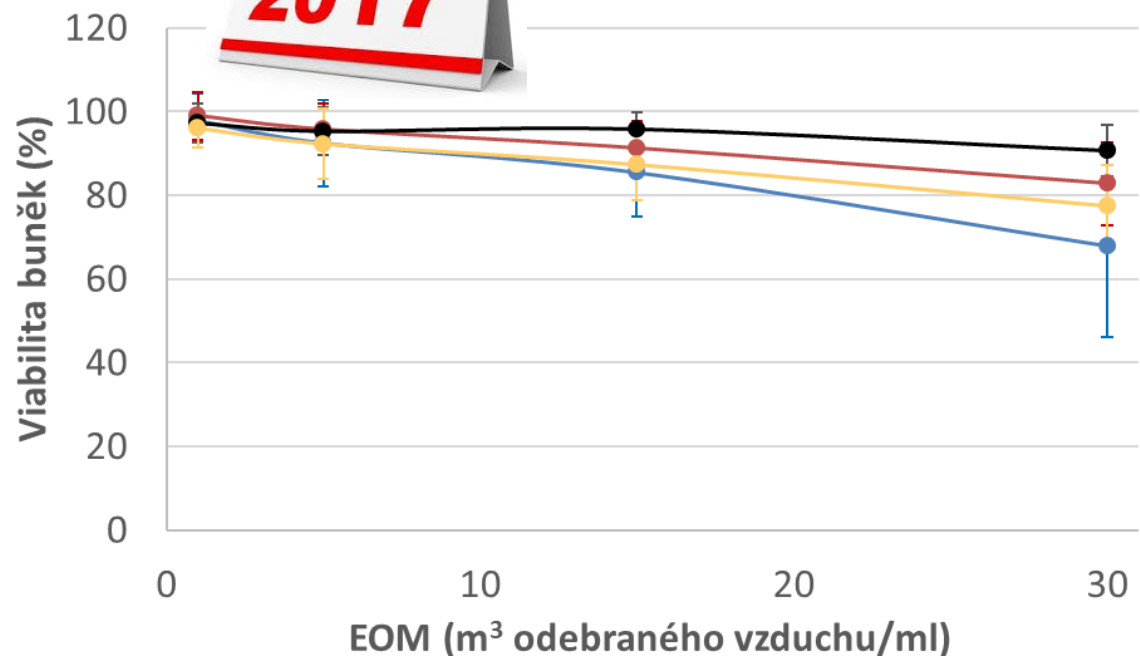




Výsledky testování cytotoxicity

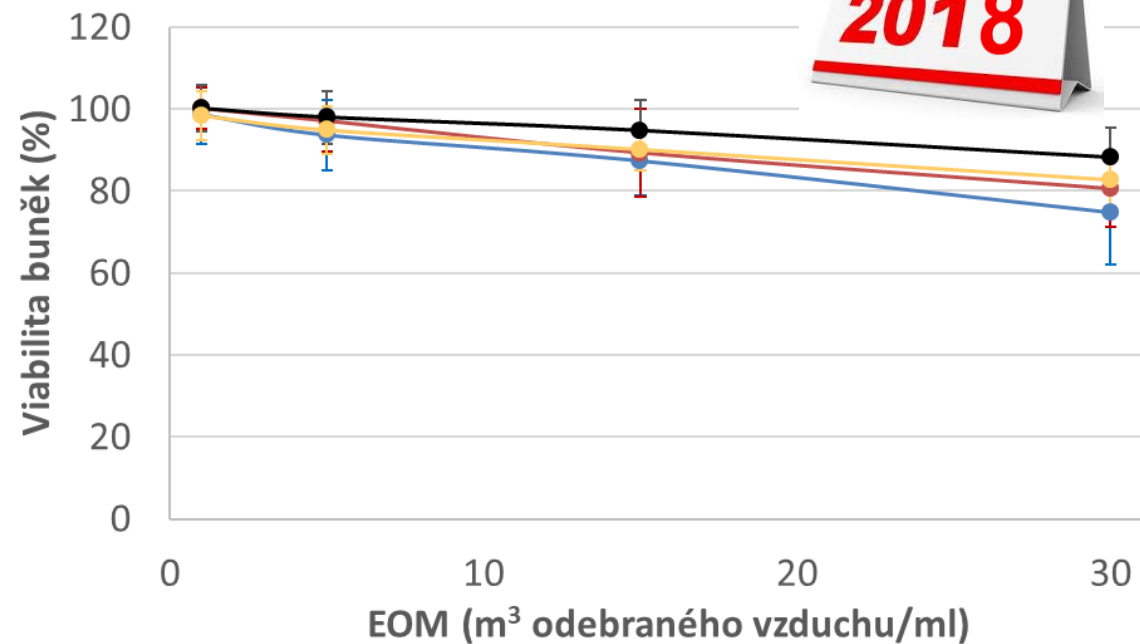


2017



— Lom u Mostu — Deutschneudorf — Collmberg — Leipzig Mitte

2018

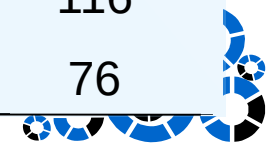


— Lom u Mostu — Deutschneudorf — Collmberg — Leipzig Mitte

- Závislost dávka – účinek
- Toxicita celkově nízká (viabilita > 65 %)
- Mírné rozdíly mezi lokalitami (Lom u Mostu nejcytotoxičtější, Collmberg nejméně cytotoxický)
- Vzorky z roku 2018 nejsou cytotoxičtější, přestože koncentrace PM₁₀ byly vyšší

LC₃₀ (m³/ml)

	Lom u Mostu	Leipzig Mitte	Deutschneudorf	Collmberg
2017	28	40	53	116
2018	36	53	45	76

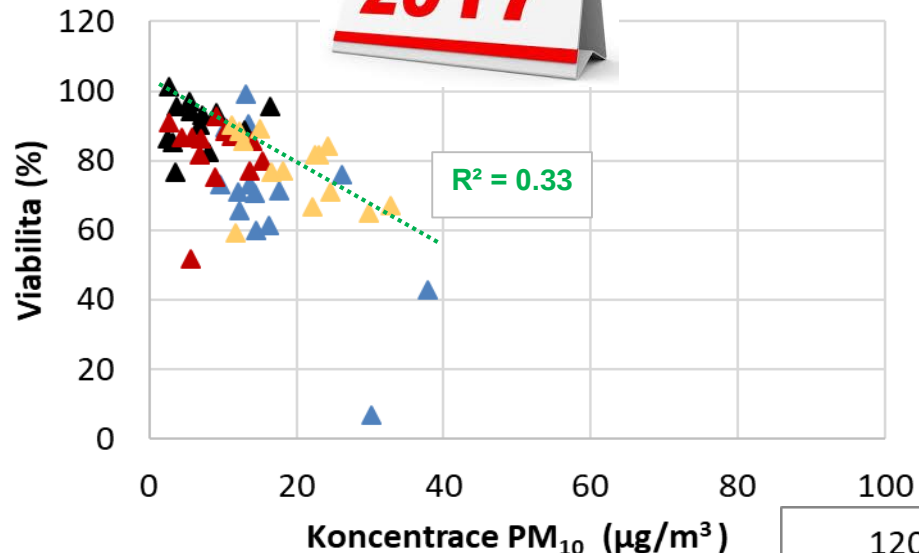




Korelace cytotoxicity a koncentrací PM_{10}

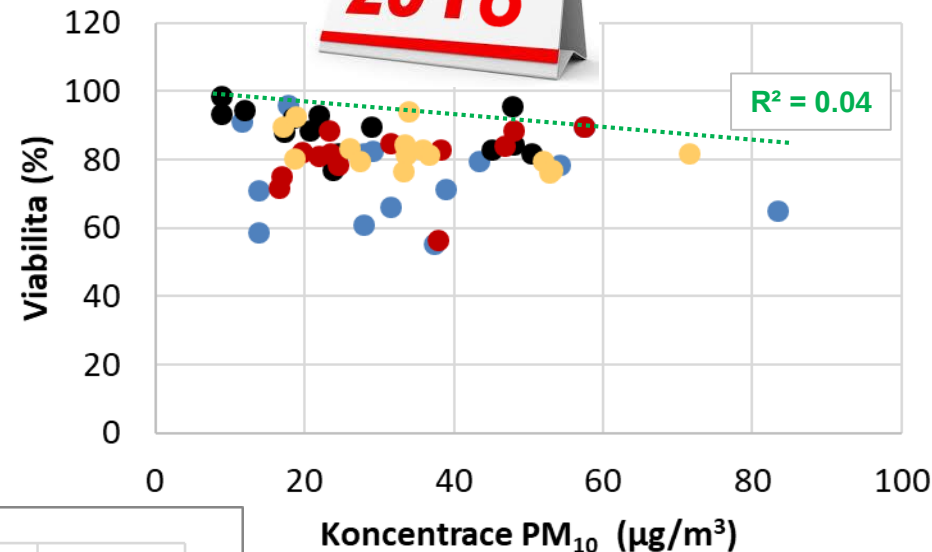


2017

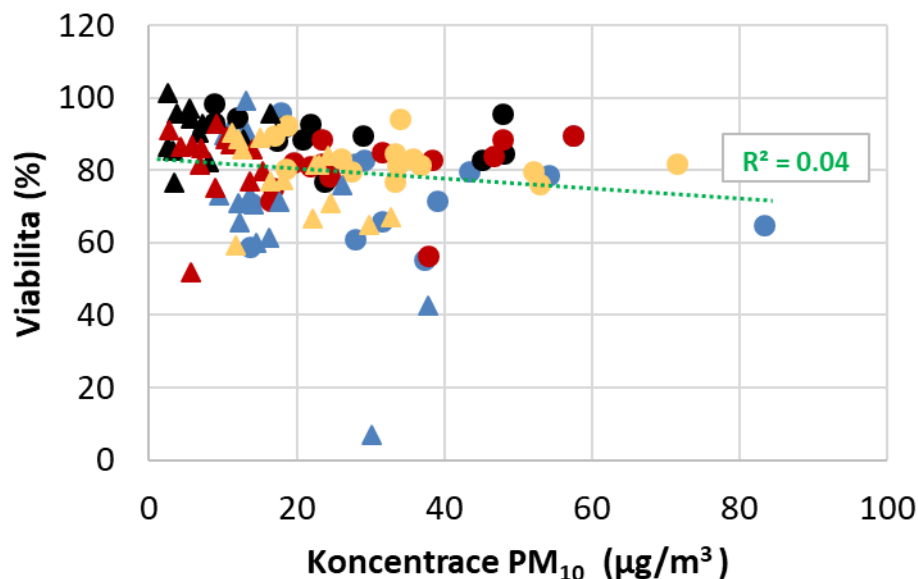


● Lom u Mostu
● Collmberg
● Leipzig Mitte
● Deutschneudorf

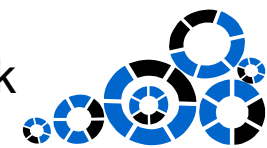
2018



- Není korelace mezi úrovní znečištění ($\mu\text{g } PM_{10}/\text{m}^3$ vzduchu) a cytotoxicitou



- Toxicitu mohou vyvolávat částice menší frakce (ultrajemné $PM_{0.1}$), které výrazně nepřispívají k hmotnostním koncentracím, ale vzhledem k velkému povrchu mohou vázat významný podíl organických látek



- **Cytotoxicita** organických extraktů PM₁₀ vůči buňkám A549 byla obecně **nízká** - cca 70-90 % přeživších buněk při nejvyšší testované koncentraci EOM (30 m³ odebraného vzduchu/ml), malé rozdíly mezi vzorky
- Mírný pokles viability buněk s rostoucí testovanou koncentrací EOM (**závislost dávka – účinek**)
- Cytotoxicita vzorků rostla v pořadí:
Collmberg < Leipzig Mitte (2017), Deutschneudorf (2018) < Lom u Mostu
- **Denní variabilita** mezi koncentracemi PM₁₀ byla **nízká** v roce **2017**, ale **vysoká** v roce **2018**
- V roce **2018** naměřeny **vyšší koncentrace PM₁₀** (na všech lokalitách **překročen denní limit** pro PM₁₀ 50 µg/m³). Vzorky z roku 2018 však **nevykazovaly vyšší cytotoxicitu**
- **Výsledky cytotoxicity** (vyjádřeny v m³ odebraného vzduchu/ml) **nekorelovaly s úrovní znečištění PM₁₀**
- Výsledky potvrzují, že toxicita nezávisí pouze na koncentraci PM₁₀ v ovzduší, roli hraje i **přítomnost látek**, které mohou být **toxické v nízké koncentraci** (tzn. je obtížné je detekovat při monitorování znečištění ovzduší) – pro posouzení toxicity PM₁₀ není dostatečné pouze měření jeho hmotnostních koncentrací
- Význam testování dalších toxických účinků (zejm. **genotoxicity**) a **chemické analýzy**



DĚKUJI

- **Projektu a finanční podporu**



Europäische Union. Europäischer
Fonds für regionale Entwicklung.
Evropská unie. Evropský fond pro
regionální rozvoj.



Ahoj sousede. Hallo Nachbar.
Interreg V A / 2014 – 2020

- **Kolegům za spolupráci**

Jan Topinka
Alena Milcová
Zuzana Nováková



Ústav
experimentální
medicíny AV ČR, v.v.i.
EU Centre of Excellence

Ivan Beneš
Jan Leníček



- **Vám za pozornost**

tana.brzicova@iem.cas.cz



jan.topinka@iem.cas.cz

