

SEZÓNÍ VARIABILITA GENOTOXICITY PRACHOVÝCH ČÁSTIC V OVZDUŠÍ

Ing. Jan Topinka, DrSc.,
RNDr. Blanka Binková, CSc.
MUDr. Oksana Sevastyanova
Mgr. Zuzana Nováková
Mgr. Alena Milcová
Bc. Kateřina Hanzalová
MUDr. Radim Šrám, DrSc.

Oddělení genetické ekotoxikologie, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.
Zdravotní ústav Středočeského kraje, Praha

ÚVOD

Znečištěné ovzduší obsahuje velmi komplexní směs plynů a částic, na jejichž povrchu jsou zkoncentrovány organické látky. V současné době bylo ve vnějším ovzduší identifikováno více než 500 látek s mutagenním účinkem [1]. Vzhledem k tomu, že obecná populace je vždy současně exponována směsí látek, představuje predikce rizika velmi komplikovaný problém, protože genotoxické látky mohou ve směsi interagovat, což může ovlivnit jejich transport, metabolismus a vazebné vlastnosti [2, 3]. Lze tedy říci, že biologické účinky komplexních směsí, zejména genotoxicita představující jejich reaktivitu s DNA, je z hlediska možných zdravotních účinků významnější než komplikovaná chemická analýza [4-5].

Ukazuje se, že znečištění ovzduší prachovými částicemi je ve velmi důležité z hlediska zvýšeného rizika nádorových onemocnění a zvýšené nemocnosti a úmrtnosti na kardiovaskulární a plicní onemocnění [6-8]. Z těchto důvodů je posuzování kvality vnějšího ovzduší obvykle založeno na stanovení koncentrace prachových částic (PM_{10} a $PM_{2,5}$) a snížení koncentrací těchto částic je z hlediska kvality vnějšího ovzduší nejdůležitějším faktorem. Řada studií však prokazuje, že zdravotní účinek prachových částic závisí nejen na jeho koncentraci, ale i na aerodynamickém průměru částic [9-11], na jejich zdroji a chemickém složení [12, 13]. Mezi látkami vázanými na prachové částice mají nejvyšší význam z hlediska genotoxicity karcinogenní polycyklické aromatické uhlovodíky (k-PAU) [14, 15]. Bylo navrženo, že koncentrace k-PAU může být považována za index biologicky aktivních látek v prachu v ovzduší [16].

V této studii jsme porovnávali genotoxicitu ovzduší v centru Prahy s odstupem 5 let a zároveň jeho sezónní variabilitu. K dosažení tohoto cíle, jsme porovnali indukci vzniku sloučenin organických látek váza-

ných na částice (či jejich metabolitů) s nukleotidy DNA – tzv. DNA aduktů. Byly porovnány organické extrakty z částic PM_{10} odebrané v různých obdobích let 2000/2001 a 2005 v centru Prahy. Studie byla provedena s použitím lidské hepatální nádorové linie HepG2, která byla ověřena v předchozí studii [17].

MATERIÁL A METODY

Odběr vzorků ovzduší, extrakce EOM a chemická analýza PAU

Aerosolové částice PM_{10} (< 10 μm) byly odebírány v centru Prahy (Smíchov, monitorovací stanice Českého hydrometeorologického ústavu). Vzorky byly odebírány denně (24h) v létě 2000 (15.6. – 15.9. 2000), v zimě 2000/2001 (4.12. 2000 – 7.3. 2001) a v zimě 2005 (7.11. 2005 – 22.12. 2005) na filtry Pallflex 20x20 cm (T60A20) s použitím velkoobjemových čerpadel Anderson. Prachové částice <2,5 μm ($PM_{2,5}$) and <10 μm (PM_{10}) byly současně monitorovány s použitím vzorkovačů VAPS (versatile air pollution sampler) na stejném monitorovacím místě. Extrakci organické hmoty z filtrů dichlormethanem a chemickou analýzu PAU (polycyklických aromatických uhlovodíků) provedla akreditovaná firma ALS Czech Republic s.r.o., Praha (EN ISO CSN IEC 17025). Stanovení bylo provedeno s použitím standardních metod US EPA [18, 19]. V každém vzorku EOM byla analyzována koncentrace třinácti PAU – fenantrenu (PHE), antracenu (ANT), fluorantenu (FLU), pyrenu (PYR), koronenu (COR), benz[a]antracenu (B[a]A), chrysenu (CHRY), benzo[b]fluorantenu (B[b]F), benzo[k]fluorantenu (B[k]F), benzo[a]pyrenu (B[a]P), dibenzo[a,h]antracenu (DB[ah]A), benzo[ghi]perylenu (B[ghi]P) a indeno[1,2,3-cd]pyrenu (I[1,2,3-cd]P). Posledních osm vyjmenovaných PAU patří dle IARC [20] mezi tzv. karcinogenní PAU. Pro *in vitro* experimenty byly vzorky EOM po extrakci

dichlormethanem odpařeny pod dusíkem a odparky rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) tak, aby každý vzorek EOM obsahoval 50 mg EOM v 1 ml DMSO.

Kultivace buněk a inkubace s k-PAU a extrakty

Linie lidských hepatocytů HepG2 pochází původně z biopsie lidských jater [21] a pro naše pokusy byla získána od Dr.A.Gábelové (Onkologický ústav SAV, Bratislava). Buňky (2-4x10⁶) byly inkubovány v plastických kultivačních lahvích (75 cm², Costar). Inkubace byly prováděny dle postupu popsaném Sevastyanovou a kol. [17]. Buněčné pelety byly třikrát promyty ve 13 ml fyziologického roztoku a následovně resuspendovány ve 3 ml fyziologického roztoku. Alikvóty (2ml) byly zamrazeny v tekutém dusíku do doby než byla provedena analýza DNA aduktů.

Izolace DNA z buněk

Pelety buněk byly homogenizovány v extrakčním pufru (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA a 1% SDS). Vzorky byly inkubovány se směsí RNAáz (10 mg/ml ribonukleáza A, 5000 U/ml ribonukleáza T1) a dále s proteinázou K. Následně byla použita fenol-chloroformová metoda extrakce (fenol/chloroform/isoamylalkohol) [22]. Vzorky pak byly uskladněny v mrazicím boxu při -80 °C.

Analýza DNA aduktů

Analýza DNA aduktů byla prováděna metodou ³²P-postlabeling [23, 24]. Celková hladina DNA aduktů byla vyjadřována jako počet aduktů/108 nukleotidů.

VÝSLEDKY

Odběr vzorků, extrakce a chemická analýza

Data z odběrů vzorků ovzduší velkoobjemovými čerpadly v Praze na

Tabulka 1: Velkoobjemové odběry PM₁₀ v Praze v různých obdobích – základní charakteristiky

Sezóna	Počet filtrů	Celk.obj [m ³]	PM ₁₀ [mg/m ³]	EOM [µg/m ³]	EOM [%]	B[a]P [ng/m ³]	k-PAU [ng/m ³]	k-PAU [ng/mg EOM]
Léto 2000	90	125064	36,9	5,0	13,4	0,3	2,3	0,5
Zima 2000/2001	94	147699	62,6	14,9	23,9	3,5	24,7	1,7
Zima 2005	41	65150	39,0	6,7	7,2	3,3	19,5	2,9

Tabulka 2: Průměrné koncentrace jednotlivých k-PAU v extraktech z PM₁₀ z jednotlivých odběrů

	Léto 2000		Zima 2000/2001		Zima 2005	
	(ng/m ³)	%	(ng/m ³)	%	(ng/m ³)	%
Benz[a]antracen	0,17	7,3	5,2	21,1	3,2	16,4
Chrysen	0,19	8,3	4,7	19,0	4,6	23,6
Benzo[b]fluoranten	0,37	16,0	4,6	18,6	2,0	10,3
Benzo[k]fluoranten	0,18	7,7	2,0	8,1	1,5	7,7
Benzo[a]pyren	0,25	10,8	3,5	14,2	3,3	16,9
Dibenz[a,h]antracen	0,05	2,0	0,29	1,2	0,27	1,4
Benzo[ghi]perylen	0,66	28,5	1,9	7,7	2,3	11,8
Indeno[1,2,3-cd]pyren	0,43	18,8	2,5	10,1	2,3	11,8

Tabulka 3: Celkové hladiny DNA aduktů indukované extrahovatelnou hmotou z PM₁₀ částic (EOM) odebraných v různých časových obdobích v centru Prahy

Extrakt	DNA adukty / 108 nukleotidů		
	Léto 2000 průměr (s.o.)	Zima 2000/2001 mean (s.o.)	Zima 2005 mean (s.o.)
Koncentrace (µg/ml)			
10	4,67 (0,7)	19,5 (3,17)	37,2 (6,05)
50	51,6 (28,5)	80,4 (3,50)	58,8 (14,7)
100	85,9 (11,8)	38,0 (2,16)	19,3 (2,73)

Smíchově v létě a v zimě 2000/2001 a v zimě 2005 jsou shrnuta v **tabulce I**. Celkový objem odebraného vzduchu a počet filtrů s odebranými PM₁₀ byl asi 2x vyšší v zimě a v létě 2000/2001 než v zimě 2005 jak odpovídá delšímu odběrovému období v letech 2000/2001. Koncentrace PM₁₀ a obsah extrahovatelné organické hmoty na m³ vzduchu byl cca 2–3krát vyšší v zimě 2000/2001 než v létě 2000. Pokud však porovnáme stejné parametry pro zimu 2005 a léto 2000, nebyly pozorovány žádné změny. Naopak koncentrace B[a]P a k-PAU v EOM v zimě 2005 byly výrazně vyšší než v zimě 2000/2001. Koncentrace B[a]P a k-PAU na m³ vzduchu byly v obou zimních obdobích srovnatelné a přibližně 10-krát vyšší než koncentrace v létě 2000. Průměrný podíl PM_{2,5} v celkovém množství PM₁₀ pro všechna odběrová období byl vypočten na základě dat z odběrových zařízení VAPS (**obr. 1**). Nejvyšší podíl PM_{2,5} (87,6% PM₁₀) byl nalezen ve vzorku ze zimy 2005, dále ze zimy 2000/2001 (74,4%) a nejnižší podíl PM_{2,5} byl ve vzorku z léta 2000 (51,5%).

Porovnání letního vzorku se vzorky zimními ukazuje různé relativní zastoupení individuálních PAU (**tabulka 2**). PAU s nižší rela-

tivní molekulovou hmotností (B[a]A a Chry) byly více zastoupeny v zimních vzorcích, zatímco těžší PAU (B[ghi]P a I[cd]P) byly významněji zastoupeny v letním vzorku. Koncentrace B[a]A a B[b]F byly v zimě 2005 nižší o 40, respektive 60%.

Genotoxicita extrahovatelné organické hmoty

Celkové hladiny DNA aduktů indukovaných po 24-hodinové expozici buněk HepG2 různými koncentracemi extraktů z různých odběrů jsou shrnuty v **tabulce 3**. Při nejnižší koncentraci extraktu (10 mg/ml) byl pozorován nejsilnější genotoxický účinek (nejvyšší hladina DNA aduktů) u vzorku odebraného v zimě 2005. Dále následoval vzorek ze zimy 2000/2001 a nejnižší genotoxicitu vykazoval vzorek z léta 2000. Oba extrakty ze zimního období indukovaly nejvyšší hladinu DNA aduktů v koncentraci 50 mg/ml, přičemž extrakt ze zimy 2000/2001 vykazoval o 30 % vyšší genotoxicitu než zimní vzorek z roku 2005. Toto zjištění ukazuje na možný vliv toxicity extraktu z roku 2005, který je pak zvláště patrný pro koncentraci extraktu 100 mg/ml, kdy byl pozorován pokles hladiny DNA aduktů pro oba zimní vzorky.

Aby mohl být porovnán genotoxický potenciál prachových částic ve vzduchu odebraných v různých obdobích, bylo vzato v úvahu množství extrahovatelné hmoty na m³ vzduchu. Naměřené hladiny DNA aduktů byly vynásobeny korekčním faktorem zohledňujícím rozdíly v obsahu EOM/m³ vzduchu (**obr. 2**). Za těchto podmínek představuje extrakt z letního odběru více než 10x nižší genotoxicitu (23,4 rel. jednotek) v porovnání s oběma zimními vzorky, jejichž genotoxický potenciál je obdobný (290,6 a 249,2 rel. jednotek).

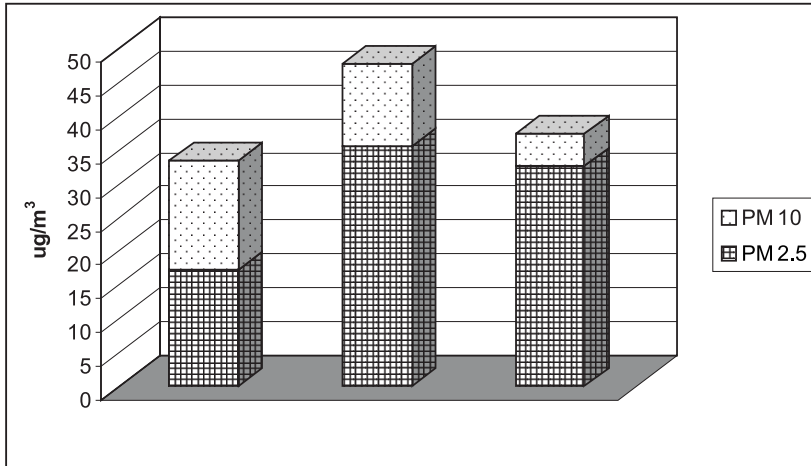
Mezi koncentracemi B[a]P a k-PAU v ovzduší a celkovými hladinami DNA aduktů indukovaných jednotlivými EOM v buňkách HepG2 byla nalezena statisticky významná pozitivní korelace (r₂ = 0,9; **obr. 3**). Rozdíly v obsahu EOM mezi jednotlivými odběry byly vzaty v úvahu, tzn., že hladiny DNA aduktů byly opět vynásobeny korekčním faktorem zohledňujícím rozdíly v obsahu EOM/m³ vzduchu.

DISKUSE

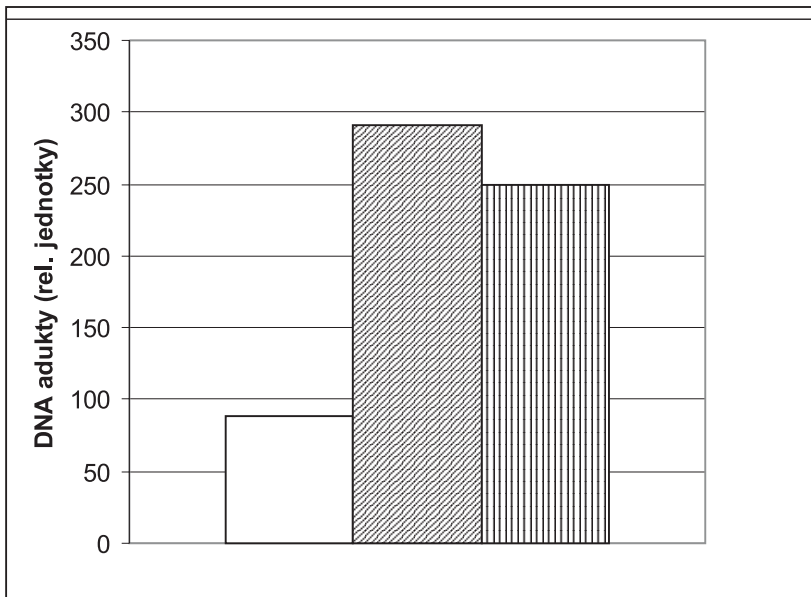
Nejvýznamnějším výsledkem této studie je zjištění, že genotoxický potenciál prachových částic v ovzduší není dán koncentrací PM₁₀ a PM_{2,5}, ale závisí převážně na množství k-PAU vázaných na tyto částice. Tento náleze je podložen dlouhodobým sledováním koncentrací PM₁₀, PM_{2,5} a k-PAU v centru Prahy a měřením genotoxicity organických extraktů z prachových částic s využitím analýzy DNA aduktů indukovaných v lidské nádorové buněčné linii HepG2. Tento závěr je dále podložen našimi předchozími výsledky o genotoxicitě ovzduší ve vybraných evropských městech [25].

Organické extrakty byly získány z prachových částic frakce PM₁₀ odebraných v letním a zimním období 2000/2001 [26] a v zimě 2005 velkoobjemovými odběrovými zařízeními. Koncentrace PM₁₀ a množství extrahovatelné hmoty bylo v zimě 2005 významně nižší než v zimě 2000/2001 (39,0 mg/m³, 6,7 mg/m³ vs. 62,6 mg/m³, 14,9 mg/m³). Na-

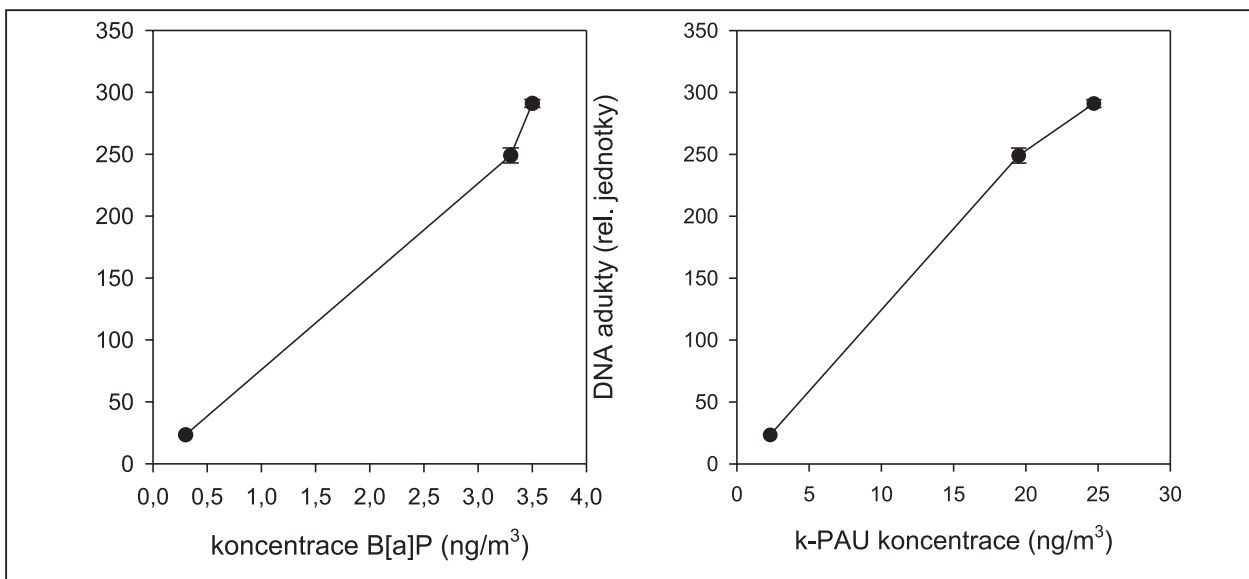
Obr. 1: Podíl PM_{2,5} v celkovém množství PM₁₀ v různých odběrových obdobích.



Obr. 2: Relativní srovnání schopnosti různých extraktů tvořit DNA adukty v buňkách HepG2. Rozdíly v koncentracích EOM mezi jednotlivými odběry jsou vzaty v úvahu. Hladiny DNA aduktů byly vynásobeny korekčním faktorem zohledňujícím rozdíly v koncentracích EOM/m³ vzduchu.



Obr. 3: Korelace mezi průměrnou koncentrací benzo[a]pyrenu (B[a]P) a k-PAU ve vzduchu v průběhu jednotlivých odběrových období a schopností jednotlivých extraktů indukovat DNA adukty v buňkách HepG2 (r²= 0,9). Buňky byly inkubovány v přítomnosti 10 mg jednotlivých EOM/ml media.



proti tomu, koncentrace B[a]P a k-PAU v ovzduší byly v obou zimních obdobích srovnatelné. Koncentrace PM₁₀ a obsah EOM v létě 2000 a v zimě 2005 se významně nelišily, ale B[a]P a k-PAU koncentrace na m³ vzduchu byly v zimě 2005 8-krát vyšší než v létě 2000. Zjištění, že úroveň PM₁₀ a k-PAU koncentrace v ovzduší spolu nekorelují může být částečně vysvětleno rozdílným podílem PM_{2,5} v PM₁₀ pro srovnávaná odběrová období. Nejvyšší podíl PM_{2,5} byl zjištěn v zimě 2005 (87,6%), zatímco v létě 2000 byl tento podíl nejnižší (51,5%). Srovnatelné koncentrace PM_{2,5} v obou zimních obdobích korelují se srovnatelnými k-PAU koncentracemi v těchto obdobích. Koncentrace PM_{2,5} v letním období však byla pouze 2-krát nižší než v zimním období, zatímco rozdíl v koncentraci k-PAU je více než 8-násobný. Toto srovnání naznačuje, že sezónní variabilita PM_{2,5} může těžko vysvětlit mnohem větší rozdíly v hladinách k-PAU. Tyto výsledky jsou konzistentní se studií Georgiadise a kol. [27], ve které též nebyla pozorována korelace mezi koncentracemi PM_{2,5} a k-PAU při srovnání dvou řeckých měst.

Různý relativní podíl PM_{2,5} a individuálních k-PAU naznačuje různé zdroje znečištění ovzduší v závislosti na ročním období a též vliv meteorologických podmínek, zejména inverzních situací, které udržuje polutanty v nižších vrstvách atmosféry. Vzhledem k tomu, že průměrné teploty v průběhu obou zimních odběrových období se vý-

razně nelišily (1,4 °C vs. 2,4 °C), lze vyloučit významný vliv meteorologických podmínek. Proto předpokládáme, že pozorované rozdíly mohou být způsobeny především rozdílností ve zdrojích znečištění ovzduší. Vyšší podíl benz[a]antracenu a chrysenu a nižší podíl benzo[ghi]perylenu a indeno[cd]pyrenu v zimních vzorcích byl též nalezen Binkovou a kol. v severních Čechách a Praze [16] a Georgiadisem a kol. v Aténách [27]. Nejpravděpodobnější vysvětlení těchto pozorování je v dominantním vlivu dopravy na znečištění ovzduší v letním období a lokálních zdrojů topení v zimním období [16, 28].

Vyšší koncentrace k-PAU a B[a]P v extraktu ze zimy 2005 ve srovnání se zimou 2000/2001 (k-PAU: 2,91 vs. 1,65 ng/mg and B[a]P 0,49 vs. 0,24 ng/mg EOM) koreluje s celkovou hladinou DNA aduktů ($37,2 \pm 6,1$ vs. $19,5 \pm 3,2$ aduktů / 108 nukleotidů) pro nejnižší testovanou koncentraci extraktu (10 µg EOM/ml). Tento výsledek ukazuje na klíčovou roli k-PAU a B[a]P pro genotoxický potenciál extraktu.

Koncentrace extraktů 50 mg extraktu/ml ze zimních odběrů indukovala hladiny DNA aduktů, které nekoreluje s koncentracemi k-PAU a B[a]P. Hladiny DNA aduktů v HepG2 buňkách inkubovaných se 100 mg EOM/ml (a částečně i s 50 mg EOM/ml) ukazují na vliv toxicity extraktů z obou zimních odběrů, zvláště pro EOM ze zimního odběru 2005. V důsledku těchto toxických účinků, byla pozorována lineární dávková závislost hladiny DNA aduktů pouze pro extrakt z letního odběru 2000. Tento nález je dále podpořen srovnáním schopnosti indukovat DNA adukty normované na množství EOM na m³ (**obr. 2**). Za těchto podmínek je extrakt z letního odběru roku 2000 desetkrát méně genotoxický, než odpovídající extrakt ze zimního období, zatímco oba zimní extrakty mají přibližně stejný genotoxický potenciál.

Přestože koncentrace PM₁₀ a obsah EOM ve vzorku ze zimy 2005 byly významně nižší než v zimě 2000/2001, genotoxicita obou extraktů byla přibližně stejná. Naopak, přibližně stejné koncentrace PM₁₀ a obsah EOM v zimním vzorku 2005 a v letním vzorku 2000/2001 představovaly značně odlišnou schopnost indukovat DNA adukty. Koncentrace PM_{2,5} odráží lépe genotoxický potenciál ovzduší,

ale přímá korelace mezi koncentrací PM_{2,5} a genotoxicitou zevního ovzduší nebyla pozorována. Lze tedy říci, že koncentrace PM₁₀ a dokonce ani PM_{2,5} v zevním ovzduší nekoreluje s jeho genotoxicitou a nemůže tedy odrážet reálné riziko.

Významná pozitivní korelace mezi koncentracemi B[a]P nebo k-PAU v ovzduší ($r^2 = 0,9$) a schopností extraktů z prachových částic tohoto ovzduší tvořit DNA adukty podporuje hypotézu, že koncentrace B[a]P a k-PAU ve vnějším ovzduší jsou nejdůležitějšími prediktory jejich genotoxicity.

Závěrem lze konstatovat, že genotoxický potenciál zevního ovzduší a predikce zdravotních rizik by měla být založena zejména na měření koncentrace k-PAU.

SOUHRN

Hlavním cílem studie bylo porovnat genotoxický potenciál organických extraktů z prachových částic zevního ovzduší odebraných v různých obdobích v centru Prahy (Smíchov). K dosažení tohoto cíle, byla analyzována schopnost extrahovatelné hmoty z částic PM₁₀ indukovat tvorbu DNA aduktů v lidské nádorové línii HepG2. Hladiny DNA aduktů byly analyzovány metodou ³²P-postlabelling. Zjištěné koncentrace PM₁₀ byly 36,9 mg/m³ v létě 2000, 62,6 mg/m³ v zimě 2000/2001 a 39,0 mg/m³ v zimě 2005. Odpovídající koncentrace extrahovatelné organické hmoty (EOM) byly 5,0 mg/m³ (13,9% of PM₁₀), 14,9 mg/m³ (23,8%) a 6,7 mg/m³ (17,2%). Celkové hladiny DNA aduktů indukované 10 mg EOM/ml byly 17,7 v létě 2000; 19,5 v zimě 2000/2001 a 37,2 aduktů/108 nukleotidů v zimě 2005. Jestliže je vzat v úvahu rozdíl v obsahu EOM/m³ vzduchu mezi jednotlivými odběrovými obdobími, potom extrakt z letního odběru 2000 představuje 10-krát nižší genotoxicitu než odpovídající zimní vzorek, zatímco rozdíl mezi zimními vzorky je velmi nízký: 23,4 DNA aduktů (v rel. jednotkách) v létě 2000, 291 v zimě 2000/2001 and 249 v zimě 2005. Ačkoli koncentrace PM₁₀ ve vzduchu a obsah EOM v prachových částicích byly v zimě 2005 výrazně nižší než v zimě 2000/2001, genotoxický potenciál obou extraktů byl téměř stejný. Byla nalezena významná pozitivní korelace mezi koncentracemi B[a]P nebo k-PAU v ovzduší ($r^2 =$

0,9) a schopností extraktů z prachových částic tohoto ovzduší indukovat tvorbu DNA aduktů. Tento výsledek podporuje hypotézu, že obsah B[a]P a k-PAU v EOM jsou nejdůležitější faktory pro genotoxický potenciál prachu v ovzduší. Celkově naše výsledky ukázaly, že genotoxicita ovzduší a poredikce zdravotních rizik musí být především založena na měření koncentrací k-PAU v ovzduší a měření biologické aktivity extraktů, zatímco koncentrace částic a obsah EOM v těchto částicích se nezdá pro určení genotoxicity ovzduší rozhodujícím faktorem.

Poděkování

Studie byla provedena s finanční podporou Ministerstva životního prostředí České republiky (grant VaV-SL/5/160/05) a Akademie věd ČR (grant 1QS500390506).

LITERATURA

- [1] Claxton, L.D., Matthews, P.P., Warren, S.H.: The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat. Res.* 567, 2004, s. 347-400.
- [2] White, P.A.: The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat. Res.* 515, 2002, s. 85-98.
- [3] Donnelly, K.C., Brown, K.W., Anderson, C.S., Barbee, G.C., Safe, S.H.: Metabolism and bacterial mutagenicity of binary mixtures of benzo(a)pyrene and polychlorinated aromatic hydrocarbons. *Environ. Mol. Mutagen.* 16, 1990, s. 238-245.
- [4] Topinka, J., Schwarz, L.R., Kiefer, F., Wiebel, F.J., Gajdos, O., Vidova, P., Dobias, L., Fried, M., Sram, R.J., Wolff, T.: DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract. *Mutat. Res.* 419, 1998, s. 91-105.
- [5] Topinka, J., Schwarz, L.R., Wiebel, F.J., Černá, M., Wolff, T.: Genotoxicity of urban air pollution in the Czech Republic. Part II: DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutat. Res.* 469, 2000, s. 83-93.
- [6] Laden, F., Neas, L.M., Dockery, D.W., Schwartz, J.: Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities. *Environ. Health Perspect.* 108, 2000, s. 941-947.

- [7] Schwela, D.: Air pollution and health in urban areas. *Rev. Environ. Health* 15, 2000, s. 3-42.
- [8] Alkinson, R.W., Bremner, S.A., Anderson, H.R., Trachan, D.P., Bland, J.M., de Leon, A.P.: Short-term associated between emergency hospital admission for respiratory and cardiovascular disease and outdoor air pollution in London. *Arch. Environ. Health* 54, 1999, s. 398-411.
- [9] Brunekreef, B., Forsberg, B.: Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *Eur. Respir. J.* 26, 2005, s. 187-188.
- [10] Diociaiuti, M., Balduzzi, M., De Berardis, B., Cattani, G., Stacchini, G., Ziemacki, G., Marconi, A., Paoletti, L.: The two PM(2.5) and PM(2.5-10) (coarse) fractions: Evidence of different biological activity. *Environ. Res.* 86, 2001, s. 254-262.
- [11] Huang, S.L., Hsu, M.K., Chan, C.C.: Effects of submicrometer particle compositions on cytokine production and lipid peroxidation of human bronchial epithelial cells. *Environ. Health Perspect.* 111, 2003, s. 478-482.
- [12] Castillejos, M., Borja Aburto, H., Dockery, D., Gold, D., Loomis, D.: Airborne coarse particulate mortality. *Inhal. Toxicol.* 12 (Suppl 1), 2000, s. 61-72.
- [13] Hogervorst, J.G., de Kok, T.M., Briede, J.J., Wesseling, G., Kleinjans, J.C., van Schayck, C.P.: Relationship between radical generation by urban ambient particulate matter and pulmonary function of school children. *J. Toxicol Environ. Health A69*, 2006, s. 245-262.
- [14] Binkova, B., Vesely, D., Vesela, D., Jelinek R., Sram, R.J.: Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic. *Mutat. Res.* 440, 1999, s. 45-58.
- [15] Binkova, B., Sram, R.J.: The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat. Res.* 547, 2004, s. 109-121.
- [16] Binkova, B., Cerna, M., Pastorkova, A., Jelinek, R., Benes, I., Novak, J., Sram, R.J.: Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000-2001. *Mutat. Res.* 525, 2003, s. 43-59.
- [17] Sevastyanova, O., Binkova, B., Topinka, J., Sram, R.J., Kalina, I., Popov, T., Novakova, Z., Farmer, P.B.: In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles. Part II: human cell lines, *Mutat. Res.* 620, 2007, s. 123-134.
- [18] EPA Report: Methods for Determination of Toxic Organic compounds in Ambient Air. No 600/4-84-041, US EPA, RTP, NC, 1984.
- [19] EPA Report: Compendium of Methods for Toxic Organic compounds in Ambient Air. Compendium method TO-13A, No. 625/R-96/010b, US EPA, OH, 1999.
- [20] International Agency for Research on Cancer (IARC): Polynuclear Aromatic Compounds. Part I. Chemical, Environmental and Experimental Data. WHO, Lyon, 1983.
- [21] Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B.: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 1979, s. 615-616.
- [22] Binkova, B., Giguere, Y., Rossner, P. Jr., Dostal, M., Sram, R.J.: The effect of dibenzo[a]pyrene on human diploid fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21WAF1 proteins and cell cycle distribution. *Mutat. Res.* 471, 2000, s. 57-70.
- [23] Reddy, M.V., Randerath, K.: Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabelling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7, 1986, s. 1543-1551.
- [24] Phillips, D.H., Castegnaro, M.: Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 14, 1999, s. 301-315.
- [25] Gábelová, A., Valovičová, Z., Bačová, G., Lábaj, J., Binková, B., Topinka, J., Sevastyanova, O., Šrám, R.J., Kalina, I., Habalová, V., Popov, T.A., Panev, A.S., Farmer, P.B.: Sensitivity of different endpoints for *in vitro* measurement of genotoxicity of extractable organic matter associated with ambient airborne particles (PM10). *Mutat. Res.* 620, 2007, s. 103-113.
- [26] Binkova, B., Topinka, J., Sram, R.J., Sevastyanova, O., Suchankova, Z., Kalina, I., Popov, T., Farmer, P.B.: In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles. Part I: acellular assay. *Mutat. Res.* 620, 2007, s. 114-122.
- [27] Georgiadis, A., Stoikidou, M., Topinka, J., Kaila, S., Gioka, M., Katsouyanni, K., Sram, R.J., Kyrtopoulos, S.: Personal exposures to PM2.5 and polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke at two locations in Greece. *J. Expos. Anal. and Environ. Epidemiol.* 11, 2001, s. 169-183.
- [28] Westerholm, R., Egeback, K.-E.: Exhaust emissions from light and heavy-duty vehicles: chemical composition, impact of exhaust after treatment, and fuel parameters. *Environ. Health Perspect.* 102, 1994, s. 13-23.