
Akademie věd České republiky

Teze doktorské disertační práce
k získání vědeckého titulu „doktor věd“
ve skupině molekulárně-biologických a lékařských
věd

**Hepatocyty potkana jako relevantní model
v genetické toxikologii**

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru
biomedicína

Ing. Jan Topinka, CSc.
Ústav experimentální medicíny AVČR

V Praze dne

OBSAH

SUMMARY (in English)	3
SOUHRN	5
1. ÚVOD	7
2. ZÁKLADNÍ METODICKÉ PŘÍSTUPY	8
2.1. <i>Izolace hepatocytů potkana</i>	8
2.2. <i>Stanovení DNA aduktů</i>	8
2.3. <i>Stanovení genových mutací in vivo</i>	9
3. NEJVÝZNAMNĚJŠÍ VÝSLEDKY DISERTACE	9
3.1. <i>Využití hepatocytů potkana při studiu genotoxicity chemických látek. Příklad: cyproteron acetát</i>	9
3.2. <i>Hepatocyty jako metabolicky relevantní model v genetické ekotoxikologii</i>	19
3.3. <i>Hepatocyty jako model při profesionální expozici i mutagenům a karcinogenům</i>	22
4. ZÁVĚR	23
5. VYUŽITÍ VÝSLEDKŮ DISERTACE V DALŠÍM VÝZKUMU A PRAXI	24
6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	26
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ JSOU PŘEDMĚTEM DISERTACE	33
8. PŘEHLED DALŠÍCH PUBLIKACÍ DISERTANTA SOUVISEJÍCÍCH S TEMATIKOU DISERTACE	35

SUMMARY

The question of the relevant model system reflecting human exposure to mutagens and carcinogens represents one of the basic problem in genetic toxicology. I have demonstrated on several experimental studies that rat hepatocytes, as metabolically competent cells equipped with many enzymes activating and deactivating xenobiotics, may be used in various areas of genetic toxicology as an appropriate model. Incubation of primary hepatocyte cultures *in vitro* or treatment of rats *in vivo* by genotoxic compounds or their mixtures may induce DNA adducts detectable by ultrasensitive method of ³²P-postlabelling. Formation of DNA adducts is known to be the first step in the multistage process of chemical carcinogenesis. Some of the DNA adducts could be fixed as mutations detectable, similar to DNA adducts, in any tissue of transgenic rats.

I have exemplified the mechanistic study in rat hepatocytes on the synthetic gestagen and antiandrogen cyproterone acetate (CPA), an active component of several drugs widely used in human therapy for many years as oral contraceptives (Diane-35^R) or drugs for the treatment of the hypersexual behaviour in men and several other indications (Androcur^R). CPA was originally regarded as a typical tumor promoter causing in high doses liver tumors in rats. In the basic battery of tests of genotoxicity, CPA exhibited no indication of any mutagenic potential. However, by using the rat hepatocytes we demonstrated that CPA, as a first synthetic steroid, induced the formation of high levels of DNA adducts [Topinka et al., Carcinogenesis 14 (1993) 423-427]. These DNA adduct levels were much higher than those induced by the structural analogues of CPA [Topinka et al., Carcinogenesis 16 (1995) 1483-1487]. The CPA induced DNA adducts were persistent and accumulating [Werner, Topinka et al., Carcinogenesis 16 (1995) 2369-2372]. We have also shown that CPA is an integral part of DNA adducts detected in hepatocytes treated with CPA [Topinka et al., Carcinogenesis 17 (1996) 167-169] and the activation pathway of CPA to DNA reactive metabolites via the action of ketoreductases and hydroxysteroid sulfotransferases has been demonstrated [Schwarz, Werner, Topinka et al., Biological Reactive Intermediates V (1996) 243-251; Wolff, Topinka, et al., Biological Reactive Intermediates VI (2001) 687-696]. Hepatic CPA-DNA adducts are fixed in the liver as point mutations [Topinka et al., Mutation Res. 550 (2004) 89-99] We have shown that DNA adduct formation is not the only prerequisite of mutagenic effect of CPA [Topinka et al., Mutation Res. 550 (2004) 101-108]. Second crucial prerequisite of the mutagenic effect of CPA is its mitogenic effect induced at higher doses than DNA adducts and exhibiting the threshold. Non-linearity at low doses of the dose response curve of the mutagenic effect *in vivo* in target tissue of carcinogenesis and the existence of no-effect level of CPA proved in agreement with epidemiologic studies that contraceptive dose of CPA does not represent any significant risk. The analysis of DNA adducts and mutations were recommended by the panel of

experts (International Commission on Harmonisation, ICH) as additional tests in the case of equivocal results in standard battery of tests. Particularly, some tumor promoters are good candidates for the re-evaluation of genotoxic effects by our approach.

Second example of the use of rat hepatocyte cultures in genetic toxicology was the study on genotoxicity of complex environmental mixtures in two regions of the Czech Republic with different levels of the air pollution [Topinka et al., Mutation Res. 469 (2000) 83-93]. Extractable organic matter (EOM) from ambient air particles (PM₁₀) was fractionated by acid-base partitioning and silica gel column chromatography. Crude extracts and various fractions were incubated with primary rat hepatocytes and DNA adducts were analyzed by ³²P-postlabelling. We have proved that polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their nitroderivatives are the main contributors to the genotoxicity of EOM derived from both regions. We have demonstrated that analysis of DNA adducts in hepatocytes offers a suitable method for monitoring the genotoxicity of complex mixtures of the environmental chemicals. To our knowledge, it was the first attempt to use rat hepatocytes in this context.

Finally, rat hepatocytes were used to assess genotoxic potential of complex mixtures in coke oven emissions [Topinka et al., Mutation Res. 419 (1998) 91-105]. We have used again acid-base partitioning and silica gel column chromatography of the extract of particles collected on the top of the coke oven battery with subsequent DNA adduct analysis in rat hepatocytes treated with the crude extract and its various fractions. The originality of the approach is based on the combined use of hepatocytes with other mammalian cell lines exhibiting more specialised enzymatic activities to bioactivate xenobiotics. By comparison of the total genotoxic potential of mixtures in hepatocytes with specific genotoxicity in metabolically specialised cell lines we demonstrated crucial role of PAH and nitro-PAH for the genotoxicity of the coke oven emissions. We proved that rat hepatocytes are suitable model for the analysis of mixtures due to the broad spectrum of xenobiotic metabolizing enzymes. This approach, based on the DNA reactivity of mixture components represents substantial improvement compared to the circumstantial chemical analysis of many various components. The usefulness of rat hepatocytes in the area of the occupational exposures to mutagens and carcinogens was clearly demonstrated.

We proved that rat hepatocytes exhibiting a wide spectrum of xenobiotic metabolizing enzymes are appropriate model to study genotoxicity of various compounds and their mixtures under different types of exposures, including the possibility to study the mechanisms of the action. Original results summarized in this dissertation indicate new possibilities of use of rat hepatocytes in various areas of genetic toxicology.

SOUHRN

Otázka vhodného modelového systému odrážejícího expozici člověka mutagenům a karcinogenům představuje jeden ze základních problémů genetické toxikologie. V této disertační práci prokazují na příkladu několika zcela prioritních experimentálních studií, že hepatocyty potkana, jako metabolicky kompetentní buňky vybavené mnoha aktivačními a deaktivujícími enzymy, jsou vhodným modelem v různých oblastech genetické toxikologie. Inkubace primárních hepatocytů *in vitro* nebo expozice zvířat genotoxickým látkám či jejich směsím *in vivo* může indukovat tvorbu DNA aduktů detekovatelných vysoce citlivou metodou ³²P-postlabelling. Tvorba DNA aduktů představuje první krok ve vícestupňovém procesu chemické kancerogeneze. Některé DNA adukty se mohou fixovat jako mutace detekovatelné, podobně jako DNA adukty, v libovolné tkáni transgenních potkanů.

Jako příklad využití hepatocytů potkana při hledání mechanismu genotoxicity byla provedena studie se syntetickým gestagenem a antiandrogenem cyproteron acetátem (CPA), který je aktivní složkou několika preparátů používaných řadu let v humánní terapii zejména jako velmi rozšířené orální kontraceptivum (Diane-35^R) nebo preparátů pro léčbu hypersexuálního chování u mužů a v dalších indikacích Androcur^R). CPA byl původně považován za typický nádorový promotor vyvolávající ve vysokých dávkách jaterní nádory u potkana. V základní baterii testů genotoxicity CPA nevykazoval žádné mutagenní účinky. Naproti tomu, s využitím hepatocytů potkana jsme jasně prokázali, že CPA, jako první syntetický steroid indukuje tvorbu vysokých hladin DNA aduktů [Topinka et al., Carcinogenesis 14 (1993) 423-427]. Tyto hladiny DNA aduktů byly výrazně vyšší než hladiny indukované strukturními analogy CPA [Topinka et al., Carcinogenesis 16 (1995) 1483-1487]. DNA adukty indukované CPA se akumulovaly a byly vysoce persistentní [Werner, Topinka et al., Carcinogenesis 16 (1995) 2369-2372]. Dále jsme prokázali, že část molekuly CPA je součástí DNA aduktů nalezených v hepatocytech po inkubaci s touto látkou [Topinka et al., Carcinogenesis 17 (1996) 167-169] a byl prokázán způsob aktivace CPA na DNA reaktivní metabolity působením ketoreduktázy a hydroxysteroid sulfotransferázy [[Schwarz, Werner, Topinka et al., in: Biological Reactive Intermediates V (1996) 243-251; Wolff, Topinka, et al., in: Biological Reactive Intermediates VI (2001) 687-696]. CPA-DNA adukty jsou v játrech fixovány jako bodové mutace [Topinka et al., Mutation Res. 550 (2004) 89-99]. V další části studie jsme prokázali, že tvorba DNA aduktů není jedinou podmínkou mutagenního působení CPA [Topinka et al., Mutation Res. 550 (2004) 101-108]. Námi prokázaná nelinearita dávkové závislosti mutagenních účinků CPA v oblasti nízkých dávek v cílové tkáni kancerogeneze *in vivo* a existence prahové dávky ukázala ve shodě s epidemiologickými studiemi, že dávka CPA odpovídající antikoncepční aplikaci nepředstavuje významně zvýšené riziko vzniku jaterního nádorového onemocnění.

Námi použitý přístup analýzy DNA aduktů a mutací v cílové tkáni kancerogeneze byl doporučen mezinárodním panelem expertů (international Commission on Harmonisation, ICH) k použití v případech rozporuplných výsledků standardních testů genotoxicity. Jde zejména o některé nádorové promotory, které jsou ve standardní baterii testů genotoxicity negativní.

Druhým příkladem použití hepatocytů v genetické toxikologii je studie genotoxicity komplexních environmentálních směsí ve dvou regionech České republiky s různými hladinami znečištění ovzduší [Topinka et al., Mutation Res. 469 (2000) 83-93]. Extrahovatelná organická hmota (EOM) z částic v ovzduší (PM₁₀) byla frakcionována dle acidity a polarity. Hrubý extrakt a jeho jednotlivé frakce byly inkubovány s primárními kulturami hepatocytů. DNA adukty v hepatocytech byly stanoveny metodou ³²P-postlabelling. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a jejich nitroderiváty byly identifikovány jako hlavní příčina genotoxicity extraktu z obou studovaných oblastí. Bylo ukázáno, že analýza DNA aduktů v hepatocytech je vhodnou metodou monitorování genotoxicity komplexních směsí látek v životním prostředí. Jedná se o první příklad využití hepatocytů potkana k charakterizaci genotoxického potenciálu a identifikaci skupin látek s biologickou aktivitou.

Hepatocyty potkana byly též využity ke stanovení genotoxického potenciálu komplexních směsí látek v emisích na koksovárnách [Topinka et al., Mutation Res. 419 (1998) 91-105]. Částice zachycené na filtrech odběrového zařízení v horní části koksovací baterie byly opět extrahovány, frakcionovány dle acidity a polarity, inkubovány s primárními kulturami hepatocytů, v nichž byly stanoveny DNA adukty. Byla prokázána dominantní úloha PAU a jejich nitroderivátů v celkové genotoxicitě emisí na koksovně. Prokázali jsme, že hepatocyty potkana jsou vzhledem k širokému spektru enzymových aktivit nutných k bioaktivaci mnoha xenobiotik vhodným modelem pro analýzu látek na základě jejich biologické aktivity, což z hlediska hodnocení genotoxicity představuje výrazný krok vpřed ve srovnání s technicky velmi náročnou chemickou analýzou. V kombinaci s vybranými savčími buněčnými liniemi vybavenými užším spektrem schopnosti metabolické aktivace je možné hepatocyty použít ke skupinové identifikaci komponent s nejvyšším genotoxickým potenciálem. Ve studii jsme prokázali vhodnost použití hepatocytů potkana v oblasti profesionální expozice mutagenům a karcinogenům. Prokázali jsme, že hepatocyty potkana jsou vzhledem k širokému spektru enzymových aktivit nutných k bioaktivaci mnoha xenobiotik vhodným modelem pro analýzu genotoxicity chemických látek a jejich směsí za různých expozičních podmínek, včetně studia mechanismu působení těchto látek. Prioritní výsledky studií shrnutých v této disertaci ukazují nové možnosti využití hepatocytů potkana v různých oblastech genetické toxikologie.

1. OBSAH DISERTACE

Předkládaná doktorská disertační práce představuje ucelený soubor publikací, shrnující mnohaleté zkušenosti disertanta s využitím hepatocytů potkana v různých oblastech genetické toxikologie. Práce je rozdělena do 3 základních částí jejichž společným jmenovatelem je vedle využití hepatocytů jako modelového systému, též analýza DNA aduktů jako markeru vnitřní expozice genotoxickým látkám:

V první části je na příkladu syntetického steroidu cyproteron acetátu (CPA) ukázáno jak lze s použitím primárních kultur hepatocytů *in vitro* a jaterních buněk potkana *in vivo* v kombinaci s využitím současných metod genetické toxikologie postupně objasnit mechanismus aktivace, genotoxicity, mutageneze a karcinogeneze látky, která byla řadu let považována za nádorový promotor působící výhradně epigenetickým mechanismem. Cyproteron acetát je farmakologicky velmi významná látka používaná v humánní terapii zejména jako aktivní složka jednoho z nejrozšířenějších antikoncepčních prostředků Diane-35^R (Schering AG, Berlin). Ve vyšších dávkách se jeho antiandrogenních vlastností používá v léčbě hypersexuálního chování u mužů (Androcur^R, Schering AG, Berlin).

Ve druhé části byly primární kultury hepatocytů poprvé využity při studiu genotoxických účinků komplexních směsí extrahovatelných organických látek vázaných na prachové částice v ovzduší. V kombinaci s chemickou analýzou a frakcionací byly identifikovány skupiny látek vykazující nejvýraznější genotoxické účinky.

Ve třetí části je ukázána možnost jak i bez nutnosti velmi pracné chemické analýzy mohou být s výhodou využity hepatocyty potkana pro charakterizaci genotoxického potenciálu emisí na koksovárnách, tedy při hodnocení profesionální expozice směsím potenciálně karcinogenních organických látek jako jsou směsi polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich derivátů.

Veškeré získané výsledky publikované ve vysoce impaktovaných mezinárodních časopisech jsou zcela prioritní a ukazují nové možnosti využití hepatocytů potkana v genetické toxikologii.

2. ZÁKLADNÍ METODICKÉ PŘÍSTUPY

Detailní postupy všech použitých metodik jsou popsány v publikacích, které jsou součástí této disertační práce. Zde jsou zmíněny a citovány odkazy pouze na základní metodické postupy použité v pracích tvořících podklad disertace.

2.1. *Izolace hepatocytů potkana*

Hepatocyty byly izolovány perfuzí jater potkana kolagenázou, která je detailně popsána Schwarzem et al. (1992). Viabilita buněk byla stanovena trypanovou modří a preparace hepatocytů byla použita jen tehdy, když životnost buněk byla vyšší než 80 procent.

2.2.1. *Stanovení DNA aduktů*

DNA z primárních kultur hepatocytů nebo z homogenátu jaterní tkáně byla izolována fenolovou extrakcí popsanou Guptou (1984). DNA adukty, jako kovalentní sloučeniny mezi genotoxickou látkou a bázi nukleotidu DNA byly analyzovány metodou ³²P-postlabelling, na jejíž standardisaci a validaci se disertant podílel (Phillips et al., 1999). Byla použita modifikace podle Gupta et al. (1985) využívající extrakci do butanolu nebo modifikace podle Reddy et al. (1986) s použitím nukleázy P1 k obohacení DNA hydrolyzátu adukty ke zvýšení citlivosti stanovení.

2.3. *Stanovení genových mutací in vivo.*

Ke stanovení genových mutací *in vivo* v játrech potkana bylo použito transgenních potkanů Big Blue™ (Stratagene, La Jolla, USA) umožňujících analýzu bodových mutací v DNA z libovolné tkáně. Metoda je založena na detekci mutací v cílovém transgenu *lac I*, který je v mnoha kopiích zabudován do genomu každé buňky potkana. Metoda je detailně popsána v Dyaico et al., 1994.

3. NEJVÝZNAMNĚJŠÍ VÝSLEDKY DISERTACE

3.1. Využití hepatocytů potkana při studiu genotoxicity chemických látek.

Příklad: cyproteron acetát.

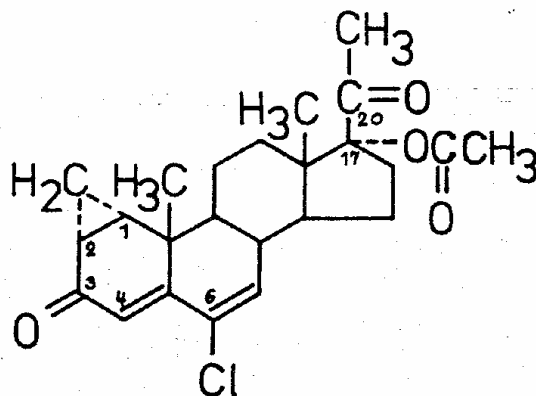
Součástí výzkumu možných toxických účinků nově vyvíjených léků a dalších látek je testování jejich genotoxicity. Problémem jsou látky, které vykazují ve standardní baterii testů genotoxicity negativní nebo rozporuplné výsledky a v dlouhodobých testech karcinogenity jsou pozitivní. V některých případech může jít o nádorové promotory, které neinteragují s DNA, ale v řadě případů se později ukáže, že standardní baterii testů nemohla být genotoxicita prokázána. Příkladem takové sloučeniny je cyproteron acetát.

Syntetický analog testosteronu s antiandrogenními a gestagenními účinky – cyproteron acetát (CPA; 6-chlor-17 α -acetoxy-1,2 α -metylenpregnan-4,6-dien-3,20-dion; Obr. 1) je látkou dlouhodobě používanou jako aktivní složka řady léků včetně velmi rozšířeného kontrceptiva Diane 35 (Schering AG, Berlin). Látka byla vyvinuta již v roce 1961 a od roku 1973 je využívána v humánní terapii.

3.1.1. Výchozí stav problematiky

Testování genotoxických a karcinogenních účinků prokázalo, že CPA po opakovaném podávání vysokých dávek vyvolává benigní nádory v játrech potkana (Schuppler et al., 1979). Tento výsledek byl interpretován působením CPA jako nádorového promotoru, neboť mutagenní a iniciační potenciál CPA nebyl v předcházejících testech genotoxicity potvrzen (Lang et al., 1979; Schuppler et al., 1983). Naproti tomu bylo prokázáno, že podobně jako řada dalších nádorových promotorů, CPA indukuje jaterní cytochrom P450 dependentní aktivity (Schulte-Hermann et al., 1980a; Nims et al., 1987) a stimuluje DNA syntézu a růst jaterní tkáně (Schulte-Hermann et al., 1980b). Kromě toho bylo prokázáno, že CPA indukuje zvýšenou proliferační aktivitu v preneoplastických γ -glutamyltranspeptidáza-pozitivních hepatocytech ve srovnání s nezměněnou okolní tkání (Schulte-Hermann et al., 1981; Neumann

et al., 1992;). Všechny výsledky potvrzovaly epigenetický mechanismus karcinogenních účinků DNA. Prvním náznakem



Obr. 1: Strukturální vzorec syntetického steroidu cyproteronacetátu

genotoxicity CPA bylo zjištění, že CPA indukuje DNA reparační syntézu v kultuře hepatocytů potkana (Neumann et al., 1992). Poznatek, že CPA indukuje reparační syntézu vyvolal otázky, které vedly ke studiím jejichž cílem bylo zhodnotit bezpečnost CPA jako léku a zejména najít mechanismus případného genotoxického působení CPA. Na těchto studiích se disertant rozhodující měrou podílel.

3.1.2. *Cyproteron acetát indukuje v hepatocytech potkana vysoké hladiny DNA aduktů in vitro i in vivo.*

Publikováno v: **Topinka, J**, Andrae, U, Schwarz, LR, Wolff, T: Cyproterone acetate generates DNA adducts in rat liver and primary rat hepatocyte cultures, *Carcinogenesis* 14 (1993) 423-427.

V první fázi jsme se zaměřili na otázku zda CPA indukuje tvorbu DNA aduktů, jako markeru genotoxicity, v cílové tkáni kancerogeneze – játrech potkana. Inkubace primárních kultur hepatocytů izolovaných z potkanů obou pohlaví s CPA po dobu 6 hodin indukovaly několik typů DNA aduktů jejichž hladiny byly úměrné koncentraci CPA. Hepatocyty izolované ze samic potkana, vykazovaly cca 20-krát vyšší hladiny DNA aduktů než hepatocyty

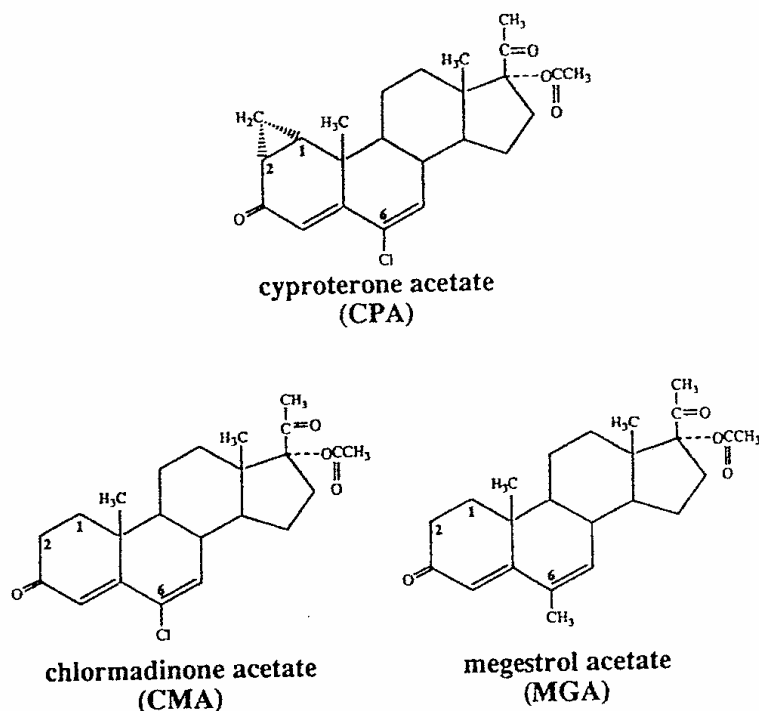
izolované ze samců potkana. Podobně, jednorázová dávka CPA vyvolávala v játrech samic potkana cca 100x vyšší hladiny DNA aduktů než u samců. Adukty nebyly detekovány v extrahepatálních tkáních ani při inkubacích nativní DNA s CPA, což ukázalo na nutnost metabolické aktivace jaterními enzymy, jejichž aktivita je závislá na pohlaví potkana (Kamataki et al., 1983; Waxman et al., 1985). Tato studie prokázala, že CPA, jako první ze skupiny syntetických steroidů, poškozuje DNA v hepatocytech jak *in vitro*, tak *in vivo* a setkala se s velmi výrazným ohlasem v odborné veřejnosti, o čemž svědčí dosavadních 50 citací této studie jinými autory. Vzhledem k velmi rozšířenému použití CPA tato studie iniciovala další intenzivní výzkum včetně několika epidemiologických studií. Výsledky naší studie se ne naší zásluhou dostaly prostřednictvím německého denního tisku i na laickou veřejnost, což vyvolalo okamžitý pokles ceny akcií firmy Schering AG o 7%. Bylo proto třeba co nejrychleji objasnit význam tvorby DNA aduktů v procesu hepatocelulární karcinogeneze a zejména objasnit, zda antikoncepční dávka CPA představuje zvýšené riziko

3.1.3. *Strukturní analogy cyproteronacetátu indukují výrazně nižší hladiny hepatálních DNA aduktů.*

Publikováno v : **Topinka, J**, Binková, B, Zhu, HK, Andrae, U, Neumann, I, Schwarz, LR, Werner, S, Wolff, T: DNA-damaging activity of the cyproterone acetate analogs chlormadinone acetate and megestrol acetate in rat liver, *Carcinogenesis* 16 (1995) 1483-1487.

Předmětem dalšího studia mechanismu genotoxického účinku CPA bylo zjistit, která část molekuly CPA je zodpovědná za poškození DNA. K identifikaci těchto strukturních elementů CPA byly testovány strukturní analogy CPA - chlormadinon acetát (CMA) a megestrol acetát (MGA) (Obr.2), z hlediska jejich schopnosti poškození DNA v kulturách hepatocytů *in vitro* (DNA adukty, reparační syntéza DNA) i v játrech potkana *in vivo* (DNA adukty). Bylo zjištěno, že hladiny DNA aduktů indukované CMA i MGA v hepatocytech samic potkana jsou zanedbatelně nízké ve srovnání s hladinou aduktů indukovanou CPA. Totéž platí pro srovnání hladin DNA aduktů v játrech potkanů *in vivo*. Dále bylo zjištěno, že na rozdíl od CPA, oba jeho analogy neindukují detekovatelnou

reparační syntézu DNA v hepatocytech potkana obou pohlaví. Najít jednoznačné vysvětlení proč CPA je mnohanásobně genotoxičtější než jeho strukturně velmi blízké analogy lišící se pouze přítomností 1,2 α -metylenové skupiny a v případě MGA navíc substitucí chloru metylovou skupinou v poloze 6 (Obr. 2) nebylo na základě této studie možné, avšak bylo možno s jistotou vyloučit roli substituentu v poloze 6. V literatuře nebyla dosud popsána aktivace 1,2 α -metylenové skupiny na DNA reaktivní metabolity a tak interpretace získaných dat měla v této fázi charakter možných hypotéz, z nichž ta nejpravděpodobnější souvisela s možnou sníženou rychlostí detoxifikace CPA a jeho analogů v důsledku přítomnosti 1,2 α -metylenové skupiny, zatímco CMA a MGA jsou účinně detoxifikovány (Cooke et al., 1965; Handy et al. 1974).



Obr.2: Porovnání strukturních vzorců cyproteron acetátu (CPA), Chlormadinon acetátu (CMA) a megestrol acetátu (MGA)

3.1.4. *DNA adukty indukované cyproteron acetátem jsou značně persistentní a dochází k jejich akumulaci.*

Publikováno v : Werner, S., **Topinka, J**, Wolff, T, Schwarz,LR: Accumulation and persistence of DNA-adducts of the synthetic steroid cyproterone acetate in rat liver, *Carcinogenesis* 16 (1995) 2369-2372.

Z hlediska významu DNA aduktů v procesu chemické karcinogeneze hraje významnou úlohu skutečnost, zda jsou indukované DNA adukty účinně reparovány nebo jsou naopak dostatečně persistentní a dochází k jejich akumulaci. V případě CPA, jako aktivní složky řady preparátů, které jsou podávány opakovaně v nízkých dávkách hraje akumulace a persistence DNA aduktů zvláště významnou roli. Po jednorázové aplikaci 10 mg CPA/kg samicím potkana byla zjištěna maximální hladina DNA aduktů po 1 týdnu ($340 \text{ aduktů} / 10^8 \text{ nukleotidů}$), která ještě po dalších 11 týdnech dosahovala cca 40% maximální hladiny. Akumulace DNA aduktů byla studována podáváním 50 μg CPA/kg samicím potkana po dobu 42 dní. Byl pozorován kontinuální vzestup hladiny DNA aduktů v rozmezí 1-38 aduktů / 10^8 nukleotidů. V souladu s předchozími výsledky, hladiny aduktů u samců byly řádově nižší. Závěrem této studie bylo, že DNA adukty indukované CPA jsou při jednorázovém podání CPA velmi persistentní s biologickým poločasem 6-7 týdnů a při dlouhodobém opakovaném podání dochází k jejich kontinuální akumulaci.

3.1.5. *Cyproteronacetát je integrální součástí hlavních DNA aduktů indukovaných tímto steroidem.*

Publikováno v : **Topinka, J**, Binková, B, Schwarz, LR, Wolff, T: Cyproterone acetate is an integral part of hepatic DNA adducts induced by this steroidal drug, *Carcinogenesis* 17 (1996) 167-169.

V další části studie mechanismu genotoxicity CPA jsem se zaměřil na otázku, zda DNA adukty indukované touto látkou v hepatocytech potkana obsahují molekulu CPA nebo jeho metabolit a nebo se jedná o nescifickou indukci endogenních DNA aduktů detekovaných např. po expozici křečka různými estrogeny (Liehr et

al., 1986). V této části studie jsem použil zcela originální přístup, při kterém vedle klasického provedení postlabellingu pro stanovení DNA aduktů, byly hepatocyty potkana inkubovány s CPA značeným tritiem ($^3\text{H-CPA}$) a vzniklé $^3\text{H-CPA-DNA}$ adukty byly fosforylovány s použitím neznačeného adenosin-trifosfátu (ATP). Distribuce ^3H -aktivity na chromatogramu a její porovnání s distribucí ^{32}P -aktivity prokázala, že indukované DNA adukty obsahují molekulu CPA nebo jeho metabolit. Tento přístup byl oceněn jako zvláště originální prof. D.H. Phillipsem (Cancer Research Institute, Sutton, UK) v publikaci komentující výhradně tuto studii disertanta (Phillips et al., 1996).

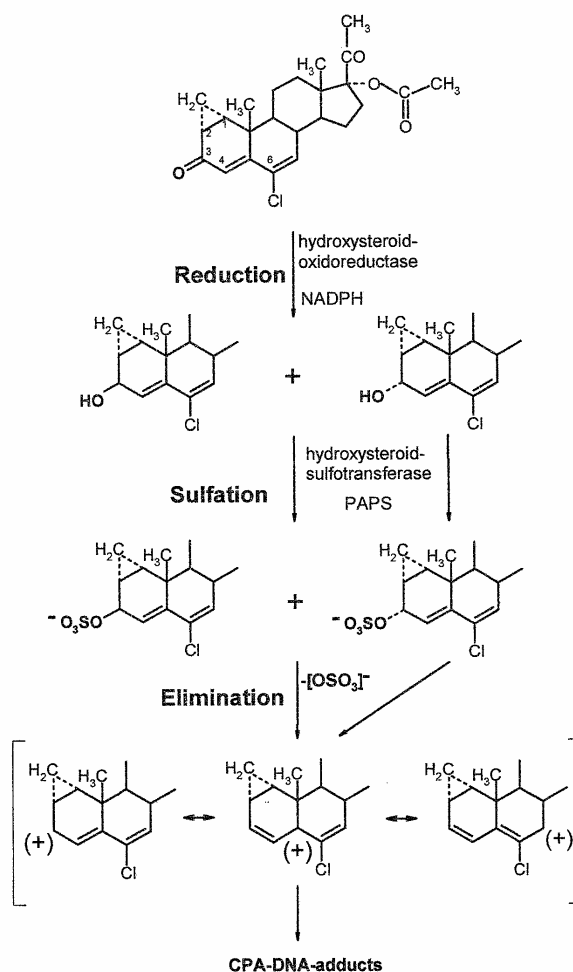
3.1.6. *Cyproteron acetát je aktivován ketoreduktázami a hydroxysteroid sulfotransferázami na DNA-reaktivní metabolity.*

Publikováno v : Schwarz, LR, Werner, S, **Topinka, J**, Andrae, U, Wolff, T: The liver as origin and target of reactive intermediates exemplified by the progesterone derivative, cyproterone acetate, in ***Biological Reactive Intermediates V: Basic mechanistic research in Toxicology and Human Risk Assessment***, Snyder R, et al., eds, Plenum Press, 1996, p. 243-251.

Wolff, T, **Topinka, J**, Deml, E, Oesterle, D, Schwarz, LR: Dose dependent induction of DNA adducts, gene mutations, and cell proliferation by the antiandrogenic drug cyproterone acetate in rat liver, , in ***Biological Reactive Intermediates VI: Chemical and Biological Mechanisms in Susceptibility and Prevention of Environmental diseases***, Dansette et al., eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001, p.687-696.

Důležitou nezodpovězenou otázkou zůstával způsob aktivace a struktura metabolitu CPA, který se váže na DNA a je zodpovědný za tvorbu DNA aduktů. S použitím hepatocytů potkana jsme testovali hypotézu o možné roli sulfokonjugace při aktivaci CPA. S použitím buněčného media bez sulfátu došlo k inhibici tvorby DNA aduktů na 5% původní hodnoty. Zároveň došlo ke kompletní inhibici tvorby CPA-DNA aduktů v přítomnosti dehydroepiandrosteronu, specifického substrátu hydroxysteroid-sulfotransferáz (HST). Dále jsme zjistili, že vedle HST hrají při aktivaci klíčovou roli ketoreduktázy. Kompletní bioaktivace CPA (Obr.3) pak probíhá přes redukci ketoskupiny v pozici C-3 následované sulfonací

hydroxysteroidu. Vzniklý sulfokonjugát je nestabilní a vytváří DNA reaktivní karboniový ion. Všechny tyto výsledky objasňují důvody proč genotoxicita CPA nemohla být nalezena dříve v klasických testech mutagenity: metabolická aktivace probíhá s pomocí cytosolických enzymů, které nejsou obsaženy v mikrosomální frakci používané pro aktivaci v *in vitro* testech.



Obr. 3: Kompletní mechanismus aktivace cyproteron acetátu na DNA reaktivní produkty

3.1.7. *Cyproteron acetát indukuje vysoké hladiny DNA aduktů v lidských hepatocytech.*

Publikováno v : Schwarz, LR, Werner, S, **Topinka, J**, Andrae, U, Wolff, T: The liver as origin and target of reactive intermediates exemplified by the progesterone derivative, cyproterone acetate, in ***Biological Reactive intermediates V: Basic mechanistic research in Toxicology and Human Risk Assessment***, Snyder R, et al., eds, Plenum Press, 1996, p. 243-251.

Werner, S, **Topinka, J**, Kunz, S, Beckurts, T, Heidecke, CD, Schwarz, LR, Wolff, T: Studies on the formation of hepatic DNA adducts by the antiandrogenic drug, cyproterone acetate, in ***Biological Reactive intermediates V: Basic mechanistic research in Toxicology and Human Risk Assessment***, Snyder R, et al., eds, Plenum Press, 1996, p. 253-257.

Vzhledem k tomu, že hydroxysteroid sulfotransferázy (HST) zodpovědné za aktivaci CPA jsou exprimovány v lidských játrech (Hobkirk et al., 1985; Aksoy et al., 1993), položili jsme si otázku zda DNA adukty indukované CPA v hepatocytech potkana mohou být též indukovány v lidských hepatocytech. V souladu se skutečností, že HST jsou exprimovány, na rozdíl od potkana, stejně v játrech obou pohlaví (Aksoy et al., 1993) jsme našli v hepatocytech izolovaných z jater mužů i žen přibližně stejné hladiny DNA aduktů. Zároveň byla ko-chromatografií potvrzena totožnost hlavních DNA aduktů u potkana a člověka.

3.1.8. *Cyproteronacetát indukuje po jednorázovém podání zvýšenou frekvenci bodových mutací v hepatocytech potkana závislou na době expozice a dávce.*

Publikováno v : **Topinka, J**, Reimann, R, Oesterle, D, Wolff, T: No-effect level in the mutagenic activity of the drug cyproterone acetate in rat liver: Part 1. single dose treatment, ***Mutation Res.*** 550 (2004) 89-99.

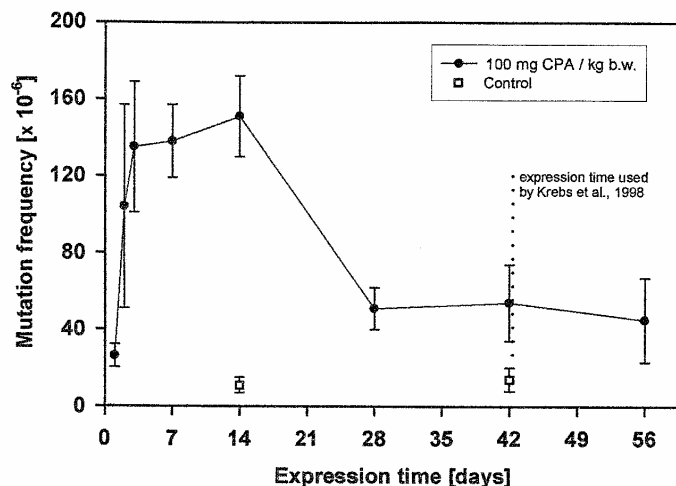
V další části studie jsme se zaměřili na otázku zda DNA adukty indukované CPA mohou být v játrech samic potkana fixovány jako genové mutace. Pilotní studie provedená Krebssem et al.

(1998) ukázala na mutagenní účinky CPA, avšak pouze po aplikaci vysokých dávek - 75 mg CPA/kg a více. Nedostatkem studie však bylo, že nebrala v úvahu optimální dobu pro expresi těchto mutací v játerní DNA. V naší další studii jsme se proto nejprve zaměřili na časovou závislost tvorby genových mutací *in vivo* v játrech samic transgenních potkanů Big Blue™ po aplikaci jednorázové dávky 100 mg CPA/kg. Zjistili jsme, že nejvyšší úroveň hladiny mutací a tím i nejvyšší citlivosti jejich měření po expozici CPA je dosaženo po 2 týdnech po podání (Obr.4), kdy CPA indukoval cca desetinásobek kontrolní úrovně mutací. Námi pozorovaný nelineární průběh časové závislosti mutačních frekvencí se stal podkladem obecnějších úvah o několika populacích hepatocytů, z nichž každá vykazuje rozdílnou kinetiku v procesu mutagenese (Heddle et al., 2003). S použitím doby exprese odpovídající maximální citlivosti detekce mutací jsme pak stanovili dávkovou závislost mutagenní aktivity CPA. Ukázali jsme, že k signifikatnímu zvýšení mutačních frekvencí (MF) dochází již při dávce 10 mg CPA/kg. Tím jsme prakticky prokázali obecný poznatek, že otázka doby expozice může být z hlediska výsledku testování mutagenity velmi významná a testování mutagenní aktivity neznámé látky by měla předcházet pilotní studie, která stanoví optimální dobu expozice z hlediska exprese mutací. V konkrétním případě CPA je však otázkou, zda pro stanovení rizika jsou podstatné tzv. „přechodné“ mutace detekované námi již při nižší dávce CPA, které jsou ale eliminovány asi po 4 týdnech po expozici a nebo tzv. „permanentní“ mutace detekované Krebsem et al. (1998) a persistující po řadu týdnů (Obr.4). V každém případě jsme prokázali existenci neúčinné dávky CPA z hlediska mutagenní aktivity (5 mg CPA/kg). Zároveň jsme prokázali, že tvorba mutací působením CPA je podmíněna nejen DNA adukty, ale i indukcí buněčné proliferace, ke které dochází až po dosažení určité prahové dávky.

3.1.9 *Cyproteron acetát indukuje po opakovaném podání zvýšenou frekvenci bodových mutací v hepatocytech potkana závislou na dávce.*

Publikováno v : **Topinka, J**, Reimann, R, Oesterle, D, Wolff, T: No-effect level in the mutagenic activity of the drug cyproterone acetate in rat liver: Part 2. multiple dose treatment, *Mutation Res.* 550 (2004) 101-108.

Z hlediska dávkového režimu CPA v humánní terapii představuje opakované podání nejvhodnější režim z hlediska dlouhodobých studií toxicity. Cílem této části studie bylo zjistit, zda i při opakovaném podání CPA lze nalézt neúčinnou dávku, která neindukuje genové mutace v hepatocytech potkana *in vivo*. CPA byl



Obr. 4: Časová závislost indukce mutací v játrech potkanů po jednorázové aplikaci dávky 100 mg CPA/kg

potkanům podáván denně po dobu 21 dní v dávkách 0,2; 1,0 a 5,0 mg CPA/kg, abychom se co nejvíce přiblížili k dávkovému režimu při použití CPA jako kontraceptiva. Zjistili jsme, že pouze opakovaná dávka 5 mg CPA/kg trojnásobně zvyšuje MF, zatímco dávky 0,2 a 1,0 jsou z hlediska indukce mutací neúčinné.

3.1.10. Hodnocení rizika mutagenních účinků CPA pro lidskou populaci

Publikováno v : **Topinka, J**, Reimann, R, Oesterle, D, Wolff, T: No-effect level in the mutagenic activity of the drug cyproterone acetate in rat liver: Part 2. multiple dose treatment, *Mutation Res.* 550 (2004) 101-108.

Denní dávka CPA používaná v lidské terapii je 0,033 mg CPA/kg pro antikoncepci (Diane-35) a 0,166 mg CPA pro některé další indikace jako akné, hirsutismus (Androcur-10), což je 30x respektive 6x méně než neúčinná dávka z hlediska mutagenity pro samici potkana v případě opakovaného podání. Na základě našich výsledků a výsledků ostatních autorů, kteří našli 4-10-krát nižší hladiny CPA-DNA aduktů v lidských hepatocytech odvozených od obou pohlaví (Werner et al., 1996; Baumann et al., 1996) nebo v řezech jaterní tkáně, jsme konstatovali, že koncentrace DNA reaktivního metabolitu CPA- 3 α -sulfátu (Parzefall et al., 1991) jsou výrazně nižší v lidských hepatocytech než v hepatocytech potkana. Dalším kritickým parametrem pro mutagenní aktivitu CPA jsou jeho mitogenní účinky. CPA nemá mitogenní účinky v lidských hepatocytech, ale je výrazně mitogenní v hepatocytech potkana (Parzefall et al., 1996). Z těchto výsledků je zřejmé, že riziko vzniku mutací v lidských hepatocytech je při použití CPA jako kontraceptiva, tj. v nízké dávce 2 mg/denně velmi nízké, což potvrzují i závěry rozsáhlé epidemiologické studie (Heinemann et al. 1997), které neprokázaly zvýšené riziko hepatocelulárního karcinomu u žen užívajících orální kontraceptiva. Protože buňky nesoucí mutace mohou být prekursori iniciovaných buněk, pak nízké riziko vzniku mutací v lidské jaterní tkáni též znamená snížené riziko jaterních nádorů.

Naproti tomu riziko vyplývající z genotoxického působení vysokých dávek CPA potvrdila jiná epidemiologická studie (Watanabe et al., 1997) provedená v Japonsku na chlapcích s diagnózou předčasné puberty, která prokázala 5 případů hepatocelulárního karcinomu v souboru 1552 chlapců, kteří byli léčeni denní dávkou mezi 50 až 200 mg CPA po dobu cca 2,5 roku. Výsledky našich studií ve spojení s japonskou epidemiologickou studií byly podkladem k omezení využití CPA v indikaci předčasné puberty a v současné

době je vysokých dávek CPA (Androcur 100^R) používáno výhradně v indikaci neoperabilních nádorů prostaty, popřípadě sexuálních deviací u mužů (Androcur 50^R).

3.2. Hepatocyty jako metabolicky relevantní model v genetické toxikologii komplexních environmentálních směsí

Druhá část disertace demonstruje využití primárních kultur hepatocytů potkana při hodnocení genotoxického potenciálu komplexních směsí látek při environmentálních expozicích. Čerstvě izolované hepatocyty jsou vybaveny řadou enzymů pro metabolismus xenobiotik, včetně polycyklických aromatických uhlovodíků (Moldeus et al., 1983), které tvoří významnou část organických polutantů adsorbovaných na respirabilní částice v ovzduší.

3.2.1. Výchozí stav problematiky

Ve vnějším ovzduší bylo identifikováno několik tisíc chemických látek (Lewtas, 1990a). Už z tohoto faktu je zřejmé, že hodnocení genotoxicity ovzduší na základě chemické analýzy těchto látek a testování jejich případné individuální genotoxicity je nereálné, nehledě k tomu, že takový „chemicko-analytický“ přístup (Williams et al., 1986) nevystihuje možné interakce jednotlivých složek. V rámci rozsáhlého výzkumného programu zabývajícího se zdravotními důsledky znečištěného životního prostředí v Severních Čechách nazvaného Program Teplice (Šrám, 2001), bylo provedeno též hodnocení genotoxicity ovzduší ve dvou tehdejších okresech s různou úrovní znečištění ovzduší – Teplice jako průmyslová oblast s povrchovými uhelnými doly a tepelnými elektrárnami a Prachatice jako převážně zemědělská oblast bez těžkého průmyslu. Při hodnocení genotoxicity ovzduší bylo uplatněno několik metodických přístupů jako hodnocení personálního monitoringu ovzduší ve vztahu k indukci DNA aduktů v lymfocytech *in vivo* (Binková et al., 1995). Kromě toho byla provedena frakcionace extraktu z respirabilních prachových částic z ovzduší podle acidity a polarity (Lewtas, 1990b). Celkový extrakt a jeho frakce pak byly dále analyzovány v různých modelových systémech: byla provedena analýza DNA aduktů jednotlivých frakcí extraktu z obou studovaných lokalit s využitím

acelulárního systému *in vitro* pro studium DNA aduktů (Binková et al., 1996 a 1999) nebo kombinací metody ³²P-postlabelling a HPLC analýzy DNA aduktů (Binková et al., 1998). Bylo provedeno hodnocení mutagenity ovzduší bakteriálními testy (Černá et al., 2000). Námi získané výsledky potvrdily hypotézu, že hlavní genotoxickou složkou extraktu jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), práce Černé et al. (2000) navíc poukázala na významný příspěvek nitroderivátů PAU.

3.2.2. *Identifikace hlavních skupin genotoxických látek v extraktu respirabilních částic z ovzduší s využitím primárních kultur hepatocytů potkana*

Publikováno v : **Topinka, J**, Schwarz, LR, Wiebel, FJ, 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, *Mutation Res.* 469 (2000) 83-93.

Naše studie provedená na hepatocytech potkana se zaměřila na identifikaci skupin látek zodpovědných za genotoxicitu extraktu z ovzduší z obou lokalit (Teplice a Prachatice) v průběhu letního a zimního období. Vedle hepatocytů potkana, které svou schopností metabolizovat řadu xenobiotik představují jakousi integrální charakteristiku genotoxického potenciálu dané komplexní směsí látek, jsme využili geneticky modifikované linie plicních buněk čínské křečka V79NH, které chybí enzymy skupiny cytochromu P450, ale je schopna specifické aktivace nitrovaných PAU nitroreduktázami N-acetyltransferázami (Kiefer et al., 1989; Perchermeier et al., 1994). Kombinované použití hepatocytů a buněk V79NH v naší studii tedy představuje vhodný způsob jak odlišit příspěvek PAU a nitro-PAU k celkové genotoxicitě komplexní směsi. Oba typy buněk byly inkubovány s celkovými extrakty z obou studovaných lokalit i jejich jednotlivými frakcemi a ve všech těchto vzorcích byly stanoveny hladiny DNA aduktů metodou ³²P-postlabelling. S použitím hepatocytů jsme prokázali, že nejvyšší genotoxickou aktivitu vykazují látky obsažené v aromatické a slabě polární frakci, které obsahují zejména PAU a nitro-PAU. Tyto 2 frakce představovaly 75-90% celkově detekovaných DNA aduktů ve všech frakcích. Distribuce aduktů v jednotlivých frakcích nebyla závislá na lokalitě ani období sběru vzorků ovzduší.

Z kvantitativního hlediska však bylo množství DNA aduktů detekovaných v zimním období 3-4 vyšší. Jestliže se však vzala v úvahu koncentrace extrahovatelné organické hmoty na m³ (EOM/m³) pak byl tento rozdíl mezi zimním a letním obdobím až 10-ti násobný, přičemž v průmyslové oblasti Teplicka byly hladiny DNA aduktů cca 2x vyšší než na Prachaticku. Na rozdíl od hepatocytů bylo v buňkách V79NH nalezeno až 80% DNA aduktů ve slabě polární frakci obsahující nitro-PAU a sezónní variabilita zde byla podobně jako u hepatocytů vyšší než variabilita mezi oběma studovanými lokalitami. Tyto výsledky prokazují, že jak PAU tak nitro-PAU jsou hlavními zdroji genotoxicity ovzduší na Teplicku i Prachaticku. Zároveň bylo prokázáno, že analýza DNA aduktů v savcích buněčných kulturách jako jsou primární hepatocyty potkana při současném použití buněk s užším spektrem schopnosti metabolické aktivace xenobiotik představuje vhodný přístup při hodnocení genotoxického potenciálu komplexních směsí. Na rozdíl od výše zmíněného „chemicko-analytického“ přístupu, představuje náš „biologický“ přístup značný krok vpřed, neboť se soustředí na podstatně menší skupiny látek interagujících s DNA a identifikují skupiny látek zodpovědných za biologickou aktivitu.

3.3. Hepatocyty jako model při profesionální expozici mutagenům a karcinogenům

3.3.1. Výchozí stav problematiky

V řadě příkladů profesionálních expozic jsou pracovníci exponováni komplexním směsím chemických látek jejichž mutagenní či karcinogenní potenciál je nutno hodnotit komplexně, tedy i z hlediska možných interakcí látek ve směsi. Příkladem takové expozice jsou emise na koksárenských bateriích spojené zejména s expozicí PAU, z nichž některé jsou řazeny mezi karcinogeny (IARC, 1984). Poměrně málo je známo o příspěvku k celkové genotoxicitě extraktu dalších pravděpodobných komponent těchto emisí – nitro-PAU. Tyto látky se vyskytují ve výfukových plynech naftových motorů a v řadě emisí spojených s neúplným spalováním (Savela et al., 1995). Mohou být též vytvářeny v atmosféře reakcí oxidů dusíku s PAU (Imaida et al., 1991). Některé z nich jsou genotoxičtější než PAU a tak nehledě na řádově nižší koncentrace

nitro-PAU v ovzduší ve srovnání s PAU, může být příspěvek nitro-PAU pro posouzení genotoxicity některých komplexních směsí významný. Ke studiu poškození DNA, mutací a chromosomových aberací působením PAU a nitro-PAU nebo komplexních směsí byly použity různé savčí buněčné linie (Hasegava et al., 1988).

3.3.2. *Analýza genotoxicity koksárenských emisí s užitím hepatocytů potkana a dalších buněčných kultur*

Publikováno v : **Topinka, J, Schwarz, LR, Kiefer, F, Wiebel, FJ, Gajdoš, O, Vidová, P, Dobiáš, L, Fried, M, Šrám, RJ, Wolff, T:** DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract, *Mutation Res.* 419 (1998) 91-105.

Podobný přístup jako v případě studia genotoxicity komplexních směsí extraktů z běžného ovzduší jsme použili pro analýzu směsí látek obsažených v koksárenských emisích. Hrubý extrakt organických látek extrahovaných z částic zachycených na filtrech pomocí velkoobjemových čerpadel umístěných na koksárenské baterii byl frakcionován dle acidity a polarity. Tento extrakt a jeho jednotlivé frakce byly inkubovány s kulturami hepatocytů potkana, buňkami V79NH (specifická detekce DNA aduktů indukovaných nitro-PAU) a lidskou plicní nádorovou linií NCI-H322 odvozenou od Clara buněk. Všechny 3 typy buněk byly nejprve testovány z hlediska citlivosti indukovat DNA adukty po inkubaci s vybranými PAU a nitro-PAU. Zároveň jsme na hepatocytech testovali syntetické směsi tří až osmi PAU a nitro-PAU pro posouzení vzájemné interakce těchto látek při indukci DNA aduktů. Na rozdíl od některých jiných studií, kde byl pozorován vzájemný inhibiční (Nesnow et al., 1998; Binková et al., 2004) nebo naopak synergický efekt (Lau a Baird, 1992) jednotlivých složek na tvorbu DNA aduktů byl námi prokázán spíše aditivní účinek jednotlivých komponent.

Hladiny DNA aduktů byly detekovány s užitím metody ³²P-postlabelling. DNA adukty byly po inkubaci s hrubým (nefrakcionovaným) extraktem detekovány ve všech třech typech použitých buněčných kultur, přičemž výrazně nejvyšší množství aduktů bylo detekováno v hepatocytech, jak odpovídá jejich metabolickému potenciálu. 80% z celkově detekovaného množství

DNA aduktů v hepatocytech připadlo na neutrální frakci obsahující PAU a jejich nitroderiváty. Další frakcionace neutrální frakce podle polariry a testování genotoxicity těchto frakcí ukázalo, že nejvyšší hladiny DNA aduktů indukuje aromatická frakce obsahující PAU. Analýza DNA aduktů s užitím buněčné linie V79NH prokázala přítomnost genotoxických nitro-PAU. Jejich příspěvek k celkové genotoxicitě byl však výrazně nižší než v případě PAU.

4. ZÁVĚR

Výsledky shrnuté v disertaci prokazují zcela nové možnosti využití hepatocytů potkana ve třech základních oblastech genetické toxikologie:

1. Studium mechanismu genotoxicity individuálních chemických látek: Výsledky studií, na kterých se disertant rozhodující měrou podílel, představují kompletní mechanistickou studii, která řeší všechny základní otázky spojené s aktivací CPA na DNA reaktivní metabolity, analýzu tvorby DNA aduktů, jejich charakterizaci, persistenci a akumulaci a především fixaci indukovaných CPA-DNA aduktů ve formě mutací v cílové tkáni kancerogeneze. Naše výsledky významnou měrou přispěly k přehodnocení představ o působení CPA jako nádorového promotoru a urychlily vývoj nového syntetického steroidu, který bude mít podobné spektrum farmakologických vlastností jako CPA, ale nebude vykazovat genotoxické účinky.

2. Studium genotoxicity komplexních environmentálních směsí: Vzhledem k expresi širokého spektra enzymů zodpovědných za metabolismus xenobiotik představují hepatocyty potkana vhodný model zejména pro studium genotoxických účinků látek vyžadujících bioaktivaci. Takto získané výsledky jsou nejen méně pracné než velmi komplikovaná chemická analýza, ale z hlediska genetické toxikologie mají vyšší výpovědní hodnotu, neboť měří přímou interakci potenciálně genotoxických látek v buněčném systému s relevantní metabolickou kapacitou.

3. Studium genotoxicity komplexních směsí při profesionální expozici: Na příkladu koksárenských emisí jsme prokázali, že při kombinovaném využití hepatocytů potkana, jako buněk se širokým spektrem enzymů pro metabolickou aktivaci xenobiotik, a některých speciálních buněčných linií specializovaných na bioaktivaci podstatně užšího spektra látek lze provést identifikaci skupin látek s rozhodujícím podílem na genotoxicitě komplexní směsi.

Veškeré výsledky výše uvedených studií byly publikovány v renomovaných zahraničních časopisech. Tyto publikace jsou podkladem předložené disertační práce.

5. VYUŽITÍ VÝSLEDKŮ DISERTACE V DALŠÍM VÝZKUMU A PRAXI

Disertace přinesla nové poznatky s využitím v následujících oblastech:

1. Promotor nebo iniciátor? Přehodnocení genotoxického působení některých látek, které ve standardní baterii testů genotoxicity vykazují, podobně jako CPA, negativní nebo kontraverzní výsledky a zároveň jsou pozitivní v dlouhodobých testech karcinogenity na savcích. Jde zejména o látky, které jsou dosud považovány za nádorové promotory a jsou velmi významné z hlediska rozsahu možné expozice v lidské populaci. U těchto látek může použití hepatocytů *in vitro* i *in vivo* v kombinaci s vysoce citlivou analýzou DNA aduktů metodou ³²P-postlabelling a mutací dát na rozdíl od standardních testů mutagenity definitivní odpověď na otázku zda daná látka působí jako nádorový promotor či iniciátor, popřípadě se jedná o kompletní karcinogen mající obojí účinky. Takový přístup, tj. použití analýzy DNA aduktů a mutací v tkáních transgenních zvířat, byl doporučen panelem expertů (International Commission on Harmonisation, ICH) a při sporných výsledcích standardních testů je i uplatňován v praxi příslušnými institucemi zodpovědnými za uvádění nových léků na trh. Naše výsledky s CPA k takovému přístupu výrazně přispěly.

2. Identifikace molekuly vázané na DNA. V rámci našich studií jsme zcela originálním způsobem s použitím CPA značeného tritiem

identifikovali, že adukty indukované CPA obsahují tuto molekulu nebo její část a nejde tedy o indukci tzv. endogenních aduktů. Tento přístup byl oceněn jako zvláště originální prof. D.H. Phillipsem (Cancer Research Institute, Sutton, UK) v publikaci komentující výhradně tuto studii disertanta (Phillips et al., 1996). Náš přístup je možno použít zejména tam, kde hladiny DNA aduktů jsou dostatečně vysoké.

3. Experimentální plán studií mutagenity na transgenních zvířatech. Prokázali jsme, že při plánování validních studií mutagenity *in vivo* na transgenních zvířatech je třeba nejprve provést analýzu mutačních frekvencí v závislosti na době expozice nebo-li exprese a poté stanovit dávkovou závislost pro dobu exprese odpovídající maximální citlivosti.

4. Analýza genotoxického potenciálu směsí chemických látek. Prokázali jsme, že hepatocyty potkana jsou vzhledem k širokému spektru enzymových aktivit nutných k bioaktivaci mnoha xenobiotik vhodným integrálním modelem pro analýzu látek na základě jejich biologické aktivity, což z hlediska hodnocení genotoxicity představuje výrazný krok vpřed ve srovnání s technicky velmi náročnou chemickou analýzou.

Prioritní výsledky studií shrnutých v této disertaci ukazují nové možnosti využití hepatocytů potkana v různých oblastech genetické toxikologie.

6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Aksoy, IA, Sochorová, V, Weinshilboum, R: Human liver dehydroepiandrosterone sulfotransferase: Nature and extent of individual variation, *Clin. Pharmacol. Ther.* 54 (1993) 498-506.

Baumann, A, Kerdar, RS, Cramer, P, Feser, W, Blode, H, Salomon, A, Kuhn, W: Use of rat and liver slices for the detection of steroid hormone-induced DNA adducts in vitro by means of the ³²P-postlabelling technique, *Pharmacol. Toxicol.* 78 (1996) 214-223.

Binková, B, Lewtas, J, Míšková, I, Leníček, J, Šrám RJ: DNA adducts and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic

aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population, *Carcinogenesis* 16 (1995) 1037-1046.

Binková, B, King, L, Lewtas, J: DNA adducts formed *in vitro* from fractionated extract of urban air particles, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* 10 (1996) 323-327.

Binková, B, Leníček, J, Beneš, I, Vidová, P, Gajdoš, O, Fried, M, Šrám, RJ: Genotoxicity of coke oven and urban air particulate matter in *in vitro* assays acellular assay coupled with ³²P-postlabelling and HPLC analysis of DNA adducts, *Mutation Res.* 414 (1998) 77-94.

Binková, B, Veselý, D, Veselá, D, Jelínek, R, Šrám, RJ: Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic, *Mutation Res.* 440 (1999) 45-58.

Binková, B, Šrám, RJ: The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid fibroblasts, *Mutation Res.* 547 (2004) 109-121.

Cooke, BA, Vallance, DK: Metabolism of megestrol acetate and related progesterone analogues by liver preparations *in vitro*, *Biochem. J.* 97 (1965) 672-677.

Černá, M, Pochmanová, D, Pastorková, A, Beneš, I, Leníček, J, Topinka, J, Binková, B: Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic: Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM10 particulates, *Mutation Res.* 469 (2000) 71-82.

Dycaico, MJ, Provost, GS, Kretz, PL, Ransom, SL, Moores, JC, Short, JM: The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats, *Mutation Res.* 307 (1994) 461-478.

Gupta, RC: Non-random binding of the carcinogen hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (1984) 6943-6947.

Gupta, RC: Enhanced sensitivity of ³²P-postlabelling analysis of aromatic carcinogen adducts, *Cancer Res.* 45 (1985) 5656-5662.

Handy, RW, Palmer, KH, Wall, ME, Piantadosi, C: The metabolism of antifertility steroids: the *in vitro* metabolism of chlormadinone acetate, *Drug Metab. Disp.* 2 (1974) 214-220.

Hasegava, NM, Nishi, I, Tsuda, H, Inui, N, Morimoto, K: Effect of diesel exhaust particles on chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and morphological transformation in cultured mammalian cells, *Cancer Lett.* 42 (1988) 61-66.

Heddle, JA, Martus, HJ, Douglas, GR: Treatment and sampling protocol for transgenic mutation assays, *Environ. Mol. Mutagen.* 41 (2003) 1-6.

Heinemann, LAJ, DoMinh, T, Guggenmoos-Holzmann, I, Thiel, C, Garbe, E : Oral contraceptives and livercancer. Results of multicentre international liver tumour study (MILTS), *Contraception* 56 (1997) 275-284.

IARC, Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, *IARC Monograph* 34 (1984) 101-131.

Hobkirk, R: Steroid sulfotransferases and steroid sulfate sulfatases: Characteristics and biological role, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 63 (1985) 1127-1144.

Imaida, K, Hirose, M, Tay, L, Lee, MS, Wang, CY, King, CM: Comparative carcinogenicities of 1-, 2-, and 4-nitropyrene and structurally related compounds in the female CD rat, *Cancer Res.* 51 (1991) 2902-2907.

Kamataki, T, Maeda, K, Yamazoe, T, Nagai, T, Kato, R: Sex differences of cytochrome P-450 in the rat: purification, characterisation and quantification of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats, *Arch. Biochem. Biophys.* 225 (1986) 758-770.

Kiefer, F, Wiebel, FJ: V79 Chinese hamster cells express cytochrome P-450 activity after simultaneous exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and aminophylline, *Toxicol. Lett.* 48 (1989) 265-273.

Krebs, O, Schäfer, B, Wolff, T, Oesterle, D, Deml, E, Sund, M, Favor, J, The DNA damaging drug cyproterone acetate causes gene mutations and induces glutathione-S-transferase P in the liver of female Big Blue™ transgenic rats, *Carcinogenesis* 19 (1998) 241-245.

Lang, R, Redmann, U: Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames' *Salmonella* microsome mutagenicity test, *Mutation Res.* (1979) 361-365.

Lau, HH, Baird, WM: The co-carcinogen benzo(e)pyrene increases the binding of a low dose of the carcinogen benzo(a)pyrene to DNA in Sencar mouse epidermis, *Cancer Lett.* 63 (1992) 229-236.

Lewtas, J: Experimental evidence for the carcinogenicity of air pollutants, *Air Pollution and Human Cancer*, Springer-Verlag, Berlin, 1990a, 49-61.

Lewtas, J: Bioassay-directed fractionation of the organic extract of SRM 1649 urban air particulate matter, *Intern. J. Anal. Chem.* 39 (1990b) 245-256.

Liehr, JG, Avitts, TA, Randerath, E, Randerath, A: Estrogen-induced endogenous DNA adduction: possible mechanisms of hormonal cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1986) 5301-5305.

Moldeus, P, Jernström, P, Dawson, JR: The use of freshly isolated or cultured rat hepatocytes in studies of the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons and other carcinogens, in: Hodgson, E, Bend, E, Philpot, RM (Eds.) *Reviews in Biochemical Toxicology* vol.5 Elsevier, Amsterdam, 1983, 239-266.

Neumann, I, Thierau, D, Andrae, U, Greim, H, Schwarz, LR: Cyproterone acetate induces DNA damage in cultured rat hepatocytes preferentially stimulates DNA synthesis in

g.glutamyltranspeptidase-positive cells, *Carcinogenesis* 13 (1992) 373-378.

Nesnow, S, Davis, C, Nelson, G, Ross, JA, Galati, AJ, Lambert, GR, Gennings, C, Carter, WH, Stoner, GD: Lung tumorigenic interactions in strain A/J mice of five environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environ. Health Perspect.* 106 (1998) 1337-1346.

Nims, RW, Devor, DE, Henneman, JR, Lubet, RA: Induction of alkoxyresorufin O-dealkylases, epoxide hydrolase, and liver weight gain correlation with liver tumor-promoting potential in a series of barbiturates, *Carcinogenesis* 8 (1987) 67-71.

Parzefall, W, Erber, E, Sedivy, R, Schulte-Hermann, R: Testing for induction of DNA synthesis in human hepatocyte primary cultures by rat liver tumor promoters, *Cancer Res.* 51 (1991) 1143-1147.

Perchermeier, MM, Kiefer, F, Wiebel, FJ: Toxicity of monocyclic and polycyclic nitroaromatic compounds in a panel of mammalian test cell lines, *Toxicol, Lett.* 72 (1994) 53-57.

Phillips, DH: 100% proof - Cyproterone acetate is an integral part of hepatic DNA adducts induced by this steroidal drug - Comment, *Hum. Exp.Toxicol.* 15 (1996) 600.

Phillips, DH, Castegnaro, M on behalf of trial participants: Standardisation and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols, *Mutagenesis* 14 (1999) 301-315.

Reddy, MV, Randerath, K: Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts, *Carcinogenesis* 7 (1986) 1543-1551.

Savela, K, King, L, Gallager, J, Lewtas, J: ³²P-postlabelling and HPLC separation of DNA adducts formed by diesel exhaust extracts in vitro and in mouse skin and lung after topical treatment, *Carcinogenesis* 16 (1995) 2083-2089.

Schulte-Hermann, R, Parzefall, W: Adaptive response of rat liver to the gestagen and anti-androgen cyproterone acetate and other inducers. I. Induction of drug metabolizing enzymes, *Chem. Biol. Interactions*, 31 (1980a) 279-286.

Schulte-Hermann, R, Hoffmann, V, Parzefall, W, Kallenbach, D, Gerhardt, A, Schuppler, J: Adaptive response of rat liver to gestagen and anti-androgencyproterone acetate and other inducers. II. Induction of liver growth, *Chem. Biol. Interactions* 31 (1980b) 287-300.

Schulte-Hermann, R, Ohde, G, Schuppler, J, Timmermann-Trosiener, I: Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat following treatment with the tumor promotersphenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds, and nafenopin, *Cancer Res.* 41 (1981) 2556-2562.

Schulte-Hermann, R, Ochs, H, Bursch, W, Parzefall, W: Quantitative structure-activity studies on effects of sixteen different sterouids on growth and monooxygenases of rat liver , *Cancer Res.* 48 (1988) 2462-2468.

Schuppler, J, Guenzel, P: Liver tumors and steroid hormones in rats and mice, *Arch. Toxicol.* 2 (1979) 181-195.

Schuppler, J, Damme, J, Schulte-Hermann, R: Assay of endogenous and synthetic sex steroids for tumor initiating activity in rat using the Solt-Farber system, *Carcinogenesis* 4 (1983) 239-241.

Schwarz, LR, Watkins, JB: Uptake of taurocholate, a vecuronium like organic cation, ORG 9426, and ouabain into carcinogen-induced diploid and polyploid hepatocytes obtained by centrifugal elutriation, *Biochem. Pharmacol.* 43 (1992) 1195-1201.

Šrám, RJ: Teplice Program, *Impact of Air Pollution on Human Health*, Academia, Prague, 2001.

Watanabe, S, Cui, Y, Tanae, T, Fujimoto, M, Matsuo, Y, Tachibana, K, Yamasaki, S: Follow-up study of children with precocious

puberty treated with cyproterone acetate. Ad hoc Committee for CPA, *J. Epidemiol.* 7 (1997) 173-178.

Waxman, DJ, Dannan, GA, Guengerich, FP: Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex specific isozymes, *Biochemistry* 24 (1985) 4409-4417.

Werner, S, Kunz, S, Wolff, T, Schwarz, LR: The steroidal drug cyproterone acetate is activated to DNA binding metabolites by sulfonation, *Cancer Res.* 56 (1996) 4391-4397.

Williams, R, Sparacino, C, Petersen, B, Bumgarner, J, Jungers, RH, Lewtas, J: Comparative characterisation of organic emissions from diesel particles, coke oven mains, roofing tar vapors and cigarette smoke condensate, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 26 (1986) 27-49.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ JSOU PŘEDMĚTEM DISERTACE

1. **Topinka, J**, Andrae, U, Schwarz, LR, Wolff, T: Cyproterone acetate generates DNA adducts in rat liver and primary rat hepatocyte cultures, *Carcinogenesis* 14 (1993) 423-427.
2. **Topinka, J**, Binková, B, Zhu, HK, Andrae, U, Neumann, I, Schwarz, LR, Werner, S, Wolff, T: DNA-damaging activity of the cyproterone acetate analogues chlormadinone acetate and megestrol acetate in rat liver, *Carcinogenesis* 16 (1995) 1483-1487.
3. Werner, S, **Topinka, J**, Wolff, T, Schwarz, LR: Accumulation and persistence of DNA-adducts of the synthetic steroid cyproterone acetate in rat liver, *Carcinogenesis* 16 (1995) 2369-2372.
4. **Topinka, J**, Binková, B, Schwarz, LR, Wolff, T: Cyproterone acetate is an integral part of hepatic DNA adducts induced by this steroidal drug, *Carcinogenesis* 17 (1996) 167-169.
5. Schwarz, LR, Werner, S, **Topinka, J**, Andrae, U, Wolff, T: The liver as origin and target of reactive intermediates exemplified by the progesterone derivative, cyproterone acetate, in *Biological Reactive intermediates V: Basic mechanistic research in Toxicology and Human Risk Assessment*, Snyder R, et al., eds, Plenum Press, New York, 1996, p.243-251.
6. Werner, S, **Topinka, J**, Kunz, S, Beckurts, T, Heidecke, CD, Schwarz, LR, Wolff, T: Studies on the formation of hepatic DNA adducts by the antiandrogenic drug, cyproterone acetate, in *Biological Reactive intermediates V: Basic mechanistic research in Toxicology and Human Risk Assessment*, Snyder R, et al., eds, Plenum Press, New York, 1996, p.253-257.
7. Wolff, T, **Topinka, J**, Deml, E, Oesterle, D, Schwarz, LR: Dose dependent induction of DNA adducts, gene mutations, and cell proliferation by the antiandrogenic drug cyproterone acetate in

rat liver, , in *Biological Reactive intermediates VI: Chemical and Biological Mechanisms in Susceptibility and Prevention of Environmental diseases*, Dansette et al., eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001, p.687-696.

8. **Topinka, J**, Reimann, R, Oesterle, D, Wolff, T: No-effect level in the mutagenic activity of the drug cyproterone acetate in rat liver: Part 1. single dose treatment, *Mutation Res.* 550 (2004) 89-99.
9. **Topinka, J**, Reimann, R, Oesterle, D, Wolff, T: No-effect level in the mutagenic activity of the drug cyproterone acetate in rat liver: Part 2. multiple dose treatment, *Mutation Res.* 550 (2004) 101-108.
10. **Topinka, J**, Schwarz, LR, Wiebel, FJ, 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, *Mutation Res.* 469 (2000) 83-93.
11. **Topinka, J**, Schwarz, LR, Kiefer, F, Wiebel, FJ, Gajdoš, O, Vidová, P, Dobiáš, L, Fried, M, Šrám, RJ, Wolff, T: DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract, *Mutation Res.* 419 (1998) 91-105.

8. PŘEHLED DALŠÍCH PUBLIKACÍ DISERTANTA SOUVISEJÍCÍCH S TEMATIKOU DISERTACE

8. 1. *Studium genotoxicity vybraných chemických látek a vláknitých prachů*

Topinka, J, Šrám, RJ, Širinjan, G, Binková, B, Fojtiková, I, Mutagenicity studies on paracetamol in human volunteers. II. Unscheduled DNA synthesis and micronucleus test, *Mutation Res.* 227 (1989) 147-152.

Topinka, J, Binková, B, Šrám, RJ, Erin, AN: The influence of alpha-tocopherol and pyritinol on oxidative damage in lymphocytes, *Mutation Res.* 225 (1989) 131-136

Šrám, RJ, Kočišová, J, Rössner, P, Binková, B, Topinka, J, Bavorová, H: Mutagenní aktivita paracetamolu – Studie na dobrovolnících, *Čas.lék.čes.*, 128 (1989) 1230-1234.

Šrám, RJ, **Topinka, J,** Binková, B, Kočišová, J, Kubíček, J: Genetic damage in peripheral lymphocytes of chronic alcoholics, in: *Biochemistry of Chemical Carcinogenesis*, Garner, R.C., Hradec, J, eds., Plenum Press, New York 1990, p.219-226.

Binková, B, **Topinka, J,** Šrám, RJ: Influence of potential antioxidants on free radical damage of lymphocytes, in: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*, Kuroda, Y, Shankel, DM, Waters, MD, eds., Plenum press, New York, 1990, p.455-458.

Fojtiková, I, **Topinka, J,** Šrám, RJ, Bakeš, K: The effect of alpha-tocopherol in schizophrenic patients treated with neuroleptics, *Schizophrenia Res.* 3 (1990) 93.

Binková, B, **Topinka, J,** Šrám, RJ: The effect of paracetamol on oxidative damage in human peripheral lymphocytes, *Mutation Res.* 244 (1990) 227-231.

Šrám, RJ, Binková, B, **Topinka, J**, Fojtíková, I: Inhibition of DNA repair synthesis in the rat by in vivo exposure to psychotropic drugs and reversal of the effect by co-administration with alpha-tocopherol, *Mutation Res.* 244 (1990) 331-335.

Šrám, RJ, Kočíšová, J, Rössner, P, Binková, B, **Topinka, J**, Bavorová, H: Mutagenic activity of paracetamol. A study conducted on volunteers, *Czechoslovak Med.* 13 (1990) 114-123.

Topinka, J, Binková, B, Šrám: DNA repair capacity and lipid peroxidation in chronic alcoholics, *Mutation Res.* 263 (1991) 133-136.

Topinka, J, Zhu, KH, Binková, B, Wolff, T, Andrae, U, Neumann, I, Schwarz, LR: Genotoxicity of the synthetic steroids cyproterone acetate (CPA) megestrol acetate (MGA) and chlormadinone acetate (CMA) in rat liver cells, *Mutation Res.* 291 (1993) 279.

Šrám, RJ, Binková, B, Stejskalová, J., **Topinka, J**: Effect of Egb-761 on lipid peroxidation, DNA repair and antioxidant activity, in: *Advances in Ginkgo Biloba Extract Research.*, Vol. 2, Ferradini, C, Droy-Lefaix, MT, Christen, Y, eds., Elsevier, Paris 1993, p.27-38.

Topinka, J, Zhu, HK, Binková, B, Neumann, I, Werner, S, Andrae, U, Schwarz, LR, Wolff, T: Studies on the genotoxicity of structural analogues of the synthetic progestin, cyproterone acetate in rat liver, *Archives of Pharmacology*, 349 (1994) 493.

Topinka, J, Loli, P., Georgiadis, P et al.: Mutagenicity of amosite and its interaction with benzo(a)pyrene, *Arch.Pharmacol.* 365, Suppl.1 (2002) 559

Topinka, J, Loli, P, Georgiadis, P, Dušinská, M, Hurbánková, M, Kováčiková, Z, Volkovová, K, Tatrai, E, Wolff, T, Oesterle, D, Kyrtopoulos, SA: Benzo[a]pyrene enhanced mutagenesis by asbestos in the lung of lambda-lacI transgenic rats, *Mutation Res.* (2004) in press.

Topinka, J, Loli, P, Georgiadis, P, Dušinská, M, Hurbánková, M, Kováčiková, Z, Volkovová, K, Kažimírová, A, Barančoková, M,

Tatrai, E, Wolff, T, Oesterle, D, Kyrtopoulos, SA: Mutagenesis by asbestos in the lung of lambda-lacI transgenic rats, *Mutation Res.* (2004) in press.

8. 2. Studium genotoxicity komplexních směsí environmentálních polutantů

Topinka, J, Binková, B, Dejmek, J, Šrám, RJ: DNA adducts induced by environmental pollution in human placenta. *Epidemiology* 6 (1995) 84.

Topinka, J, Binková, B, Mračková, G, Stávková, Z, Peterka, V, Beneš, I, Dejmek, J, Leníček, J, Pilčík, T, Šrám, RJ: Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on placental DNA adducts in an environmentally exposed population, *Environ. Mol. Mutagen.*, 30 (1997) 184-195.

Topinka, J, Binková, B, Mračková, G, Stávková, Z, Beneš, I, Dejmek, J, Leníček, J, Šrám, RJ: DNA adducts in human placenta as related to air pollution and to GSTM1 genotype, *Mutation Res.*, 390 (1997) 59-68.

Farooq, S, Bailey, E, Farmer, PB, Jukes, R, Lamb, JH, Hernandez, H, Šrám, RJ, **Topinka, J**: Determination of cis-thymine glycol in DNA by gas chromatography/mass spectrometry with selected ion recording (SIR) and multiple reaction monitoring (MRM) *J.Chromatography B* 702 (1997) 49-60.

Topinka, J, Wolff, T, Schwarz, L, Leníček, R.J. Šrám DNA adducts induced by fractionated extract of urban air particles in primary rat hepatocytes, *Mutation Res.* 379, Suppl. 1 (1997) 99.

Farmer, PB, Leuratti, C, Šrám, R, **Topinka, J**, Farooq, S, Singh, R, Shuker, DEG Carcinogen adducts in humans resulting from endogenous and exogenous exposures, *Mutation Res.* 379, Suppl.1 (1997) 153.

Šrám, RJ, Binková, B, Rössner, P, Rubes, J, **Topinka, J**, Dejmek, J: Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens, *Mutation Res.* 428 (1999) 203-215.

Binková, B, Dejmek, J, Mračková, G, **Topinka, J**, Šrám, RJ: DNA adducts in placenta and environmental exposure, *Epidemiology*, Supplement, 10 (1999) 208.

Šrám, R, **Topinka, J**, Binková, B, Solanský, I, Mračková, G, Dejmek, J: DNA adducts in placentas and environmental exposure, *Pharmacology and Toxicology*. Supplement, 85 (1999) 33.

Černá, M, Pochmanová, D, Pastorková, A, Beneš, I, Leníček, J, **Topinka, J**, Binková, B: Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic: Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM10 particulates, *Mutation Res.* 469 (2000) 71-82.

Georgiadis, P, **Topinka, J**, Stoikidou, M, Kaila, S, Gioka, M, Katsouyanni, K, Šrám, RJ, Autrup, H, Kyrtopoulos, SA: Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters. *Carcinogenesis* 22 (2001) 1447-1457.

Georgiadis, P, **Topinka, J**, Stoikidou, M et al.: Personal exposures to PM2.5 and polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke at two locations in Greece, *J. Expo. Anal. Env. Epid.* 11 (3) (2001) 169-183.

Kyrtopoulos, SA, Georgiadis, P, Autrup, H, Demopoulos, NA, Farmer, P, Haugen, A, Katsouyanni, K, Lambert, B, Ovrebo, S, Sram, R, Stephanou, G, **Topinka, J**: Biomarkers of genotoxicity of urban air pollution – Overview and descriptive data from a molecular epidemiology study on populations exposed to moderate-to-low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons: the AULIS project, *Mutation Res.* 496 (2002) 207-228.

P. Georgiadis, P, Demopoulos, NA, **Topinka, J**, Stephanou, G, Stoikidou, M, Bekyrou, M, Katsouyianni, K, Šrám, R, Autrup, H, Kyrtopoulos, SA: Impact of phase I or phase II enzyme

polymorphisms on lymphocyte DNA adducts in subjects exposed to urban air pollution and environmental tobacco smoke, *Toxicology Letters*, 149 (2004) 269-280.

8.3. Studium genotoxicity komplexních směsí při profesionální expozici

Šrám, RJ, Binková, B, Dobiáš, L, Rössner, P, **Topinka, J**, Veselá, D, Veselý, D, Stejskalová, J, Bavorová, H, Řeřicha Monitoring of genotoxic exposure in uranium miners, *Environmental Health Perspectives*, 99 (1993) 303-305.

Binková, B, **Topinka, J**, Mračková, G, Gajdošová, D, Vidová, P, Stávková, Z, Peterka, V, Pilčík, T, Rimár, V, Dobiáš, L: Coke oven workers study: the effect of exposure and GSTM1 and NAT2 genotypes on DNA adduct levels in white blood cells and lymphocytes as determined by ³²P-postlabelling, *Mutation Res.* 416 (1998) 67-84.

Dobiáš, L, Kůsová, J, Gajdoš, O, Vidová, P, Gajdošová, D, Havránková, J, Fried, M, Binková, B, **Topinka, J**: Bioassay-directed chemical analysis and detection of mutagenicity in ambient air of the coke oven, *Mutation Res.* 445 (1999) 285-293.

8.4. Další práce disertanta

Šrám, RJ, Binková, B, **Topinka, J**, Kotěšovec, F: Neplánovaná syntéza DNA a peroxidace lipidů u stárnoucí populace, *Čas. lék. čes.* 127 (1988) 1365-1369.

Binková, B, Erin, AN, Šrám, RJ, **Topinka, J**: Lipid peroxidation – induced changes in physical properties of annular lipids in rat brain synaptosomal membrane, *Gen. Physiol. Biophys.* 9 (1990) 311-318.

Topinka, J, Šrám, RJ: Metody studia poškození a reparace DNA, *Chemické listy* 85 (1991) 377-397.

Šrám, RJ, Binková, B, **Topinka, J** et al.: Effect of Antioxidant Supplementation in Elderly Population, in: Bronzetti, G, Hayatsu, H, de Flora, S, Waters, MD, Shankel, DM, eds: *Antimutagenesis and*

Anticarcinogenesis Mechanisms. Vol.3, Plenum Press, New York, 1993, p. 459-477.