

Ocena narażenia na wybrane ksenobiotyki dzieci z syndromem autyzmu i chorych na stwardnienie rozsiane z regionu Górnego Śląska

Krystyna Tyrpień-Golder

Katedra i Zakład Chemii, Wydział Lekarski
z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

SPOSOBY OCENY NARAŻENIA NA CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE

◆ ankietyzacja

◆ pomiar markerów ekspozycji

◆ **pomiar specyficznych biomarkerów ekspozycji –**

egzogenne substancje lub ich metabolity, a także produkty interakcji między czynnikiem chemicznym i docelowymi cząsteczkami lub komórkami. Preferowane są biomarkery, które łączą się z mechanizmami toksycznymi i określają ilościowo zależność dawka - odpowiedź.

◆ **pomiar biomarkerów efektu(skutku)** - mierzalne biochemiczne, fizjologiczne, behawioralne i inne zmiany zachodzące wewnątrz organizmu.

◆ **pomiar biomarkerów wrażliwości** - wskaźniki wrodzonej lub nabytej zdolności organizmu do odpowiedzi wywołanej ekspozycją na specyficzny ksenobiotyk.

Cel badań

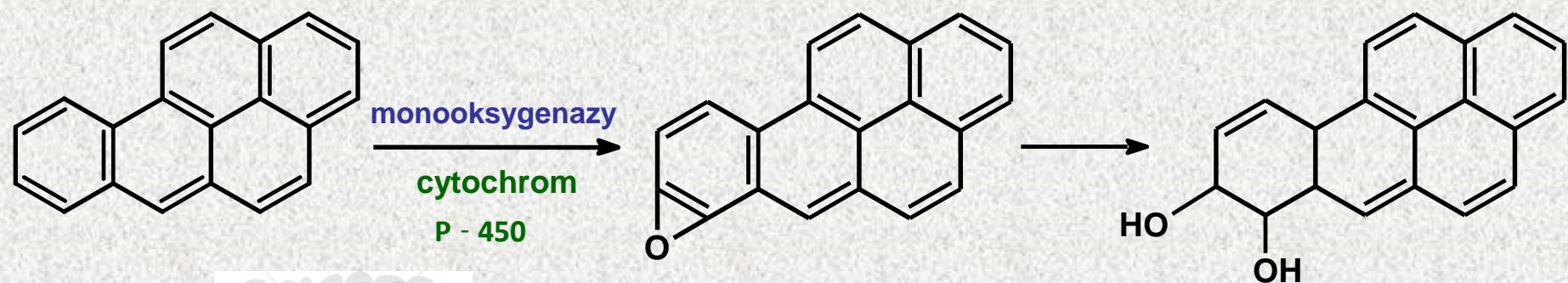
Celem badań była wstępna ocena narażenia na rtęć i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) dzieci z syndromem autyzmu (ASD) oraz chorych na stwardnienie rozsiane (SM) z rejonu Śląska.

Czynniki , które mają wpływ na procesy biotransformacji :

- **wiek**
- **płeć**
- **uwarunkowania genetyczne**
- **skład diety**

a także: stan zdrowia (choroby wątroby, jelit), rodzaj pracy (stres: temperatura, hałas, zmęczenie), ciąża, inne

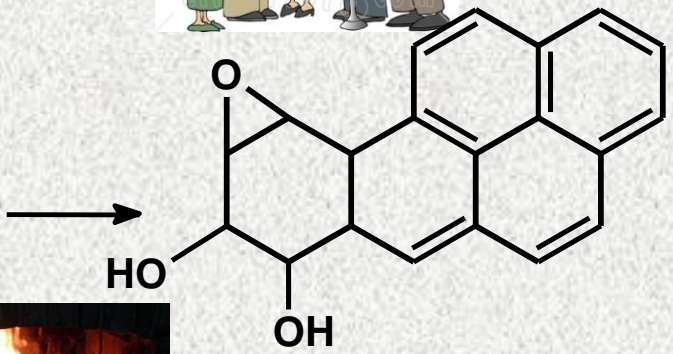
PRZYKŁAD AKTYWACJI METABOLICZNEJ BENZO(A)PIRENU W ORGANIZMACH ŻYWYCH



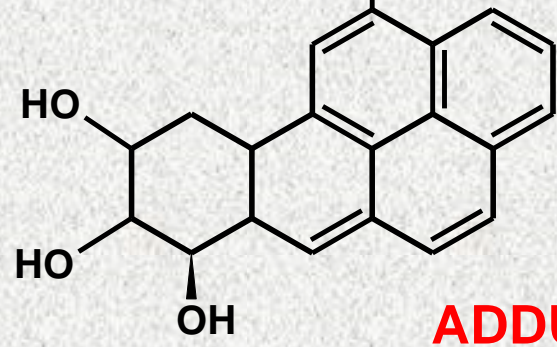
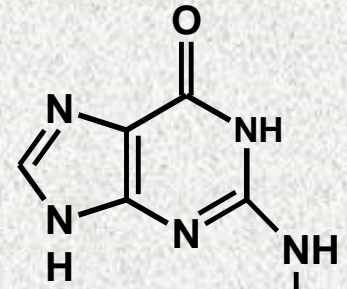
BaP

7,8-epoksy BaP

7,8-dihydro-diol BaP



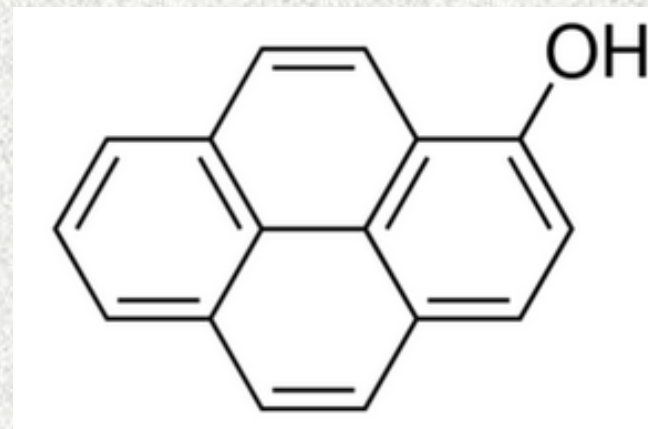
**7,8-dihydro-diol
9,10-epoksy BaP**



ADDUKT



1-hydroksypiren



W roku 2005 została ustanowiona przez Komisję HBM wartość referencyjna wydalania hydroksypirenu dla ogółu społeczeństwa (Komisja Human Biomonitoring 2005, 2009). Dla dzieci niepalących aktywnie (w wieku 3 - 14 lat) i dla dorosłych niepalących aktywnie (wiek 18 - 69 lat) wartość referencyjna wynosi 0,5 mikrograma hydroksypirenu na litr moczu.

1-hydroksypiren jako biomarker zanieczyszczeń powietrza

Manuela Ciarrocca et al. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* **24**, 17-26 (January/February 2014) | doi:10.1038/jes.2012.111

Oznaczenia 1-hydroksypirenu

Próbka moczu (10 mL)



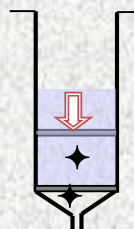
hydroliza enzymatyczna
(β -lukuronidaza/arylosulfataza)
helix pomatia)

INKUBACJA (16 h, temp. 37°C)

pH= 5,5



EKSTRAKCYJA SPE C18



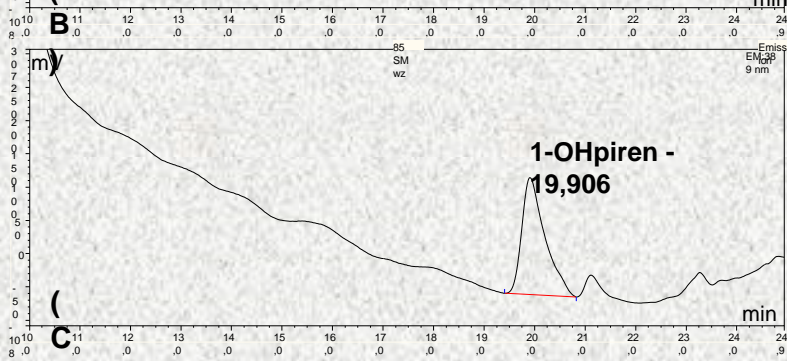
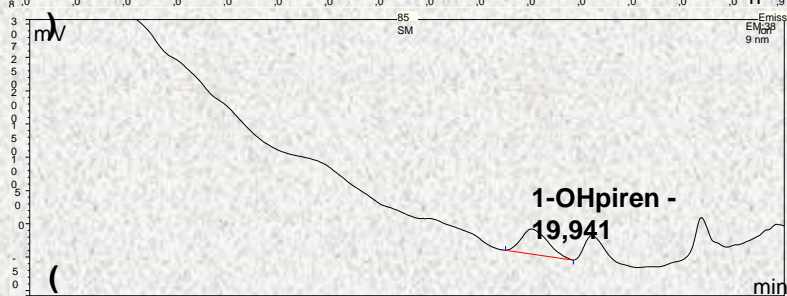
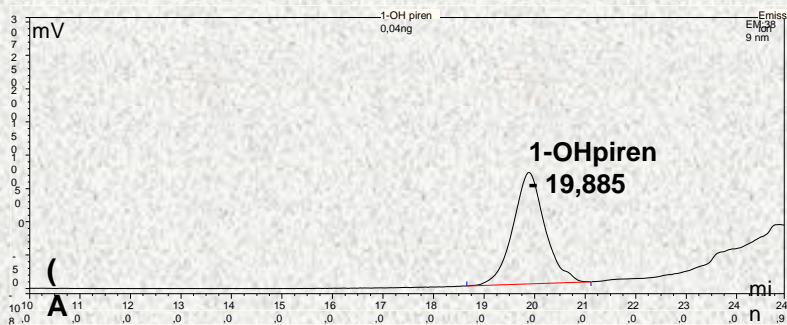
Kondycjonowanie,
elucja 5 mL metanol: aceton (1:1)

Odparowanie do sucha

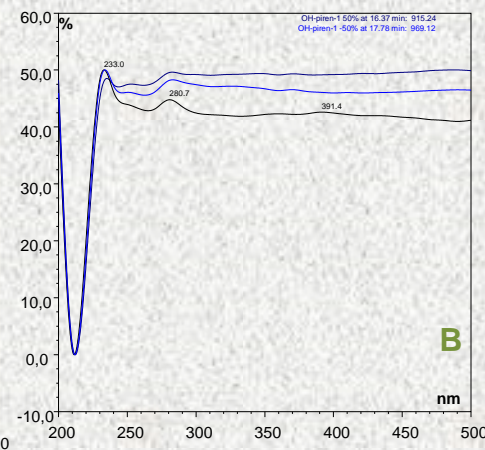
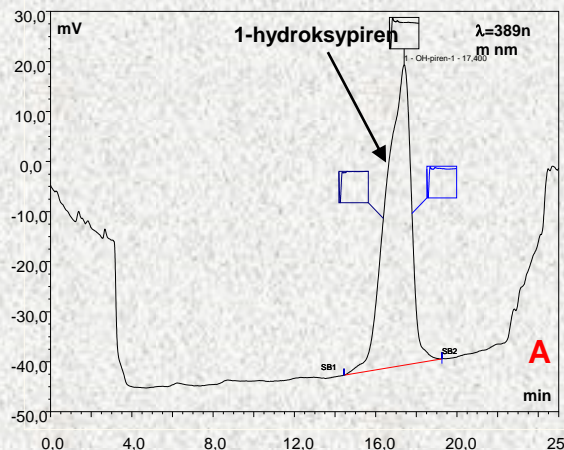
**Analiza HPLC z Detektorem
Fluorescencyjnym**

Kolumna Luna C18 (250 x 3 mm; 5 μ , 100A; Phenomenex), faza ruchoma - metanol (100%) oraz 40% roztwór metanolu w wodzie w elucji gradientowej przy długości fali wzbudzenia 242 nm oraz fali emisji 389 nm

Przykład analizy 1-hydroksypirenu wyizolowanego z moczu chorego na SM, oznaczanego techniką HPLC z detektorem fluorescencyjnym



Chromatogramy wzorca 1-hydroksypirenu (A) i ekstraktu próbki moczu chorego na SM (B) oraz próbki z dodatkiem wzorca (C)



Chromatogram 1-hydroksypirenu (A) oznaczanego techniką chromatografii cieczowej oraz widmo wzorca (B)





Rtęć w atmosferze

- Średnie stężenie rtęci w atmosferze ziemskiej mieści się w granicach od 1,2 ng/m³ do 4,0 ng/m³ nad najbardziej uprzemysłowionymi obszarami Europy.
- Najwięcej rtęci znajduje się w powietrzu w pobliżu elektrowni węglowych oraz składowisk niektórych odpadów przemysłowych i komunalnych.
- Z dymem tytoniowym 5-13 ng/papieros



Rtęć **Hg** występuje w postaci par lub związków nieorganicznych, łatwo tworzy związki metaloorganiczne.



- **sole metylortęci** CH_3HgX
- **metylo i dimetylortęć** CH_3Hg , $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$.

Rtęć wykazuje powinowactwo do grupy tiolowej –**SH(sulfhydrylowej)**.

Działanie toksyczne rtęci wiąże się z jej powinowactwem do:

- ❖ grup sulfhydrylowych
- ❖ grup karboksylowych
- ❖ grup aminowych
- ❖ aminokwasów



Losy rtęci w organizmie człowieka

- **Biologiczny okres półtrwania rtęci w mózgu wynosi kilka lat, w nerkach 64 dni, we krwi 2-4 dni.**
- **Dawka śmiertelna dla dorosłego wynosi około 1 do 4 gramów.**
- **Wspólny Komitet Ekspertów ds. Wyżywienia i Rolnictwa ONZ i WHO ograniczył maksymalną dopuszczalną dawkę rtęci organicznej do 1,6 μg na kilogram masy ciała w ciągu tygodnia. Komisja Europejska przyjęła tę wartość dla całkowitej zawartości rtęci (Komisja Europejska 2006).**

Losy rtęci w organizmie człowieka

- **Błona komórkowa jest pierwszym miejscem atakowanym przez rtęć i inne metale ciężkie.**
- **Nerki są narządem o największej kumulacji rtęci.**
- **Układem krytycznym w wyniku przewlekłego narażenia na pary rtęci jest OUN**
- **Rtęć i jej związki łatwo przenikają przez łożysko stanowiąc zagrożenie dla płodu (zawartość metylortęci w krwinkach płodu jest większa niż w krwinkach matki)**
- **Jedną z najwcześniejszych zmian biochemicznych przed wystąpieniem zmian fizjologicznych w zatruciu metylortęcią jest zaburzona synteza białka.**

Zawartość rtęci w organizmie można oznaczyć w próbkach:

- **Krwi,**
- **Moczu,**
- **Włosów**
- **Paznokci**
- **Mleka kobiet karmiących.**

Oznaczanie rtęci

Oznaczanie rtęci wykonywano za pomocą termicznej dekompozycji związków rtęci, amalgamacji i oznaczaniu rtęci w materiale biologicznym metodą spektrometrii atomowej przy długości fali 253,7 nm z zastosowaniem analizatora rtęci DMA-80 firmy Milestone w IMP im. Prof. J.Nofera w Łodzi. Identyfikator metody badawczej: ZBM–PB–35 (wyd.1 z dn.05.01.2015)

Inne metody:

- HPLC-ICP-MS, „łagodna” ekstrakcja r-rem L-cysteiny (2- merkaptoetanołem) /HCL/KCl(H₂O)**
- GC z detekcją optyczną i wzbudzeniem w plazmie mikrofalowej po mikroekstrakcji do fazy stałej w fazie nadpowierzchniowej HS PME-GC-MIP-OES**

Materiał badawczy

Ankiety oraz nieinwazyjnie pobierane próbki włosów i moczu od:

- osób chorych na stwardnienie rozsiane zamieszkujących rejon Górnego Śląska (35 ankiet oraz nieinwazyjnie pobierane próbki włosów i moczu 29), głównie skupionych w Śląskim Stowarzyszeniu Chorych na Stwardnienie Rozsiane SEZAM SM, z siedziba w Gliwicach-Bojkowie. Próbę kontrolną stanowiły zdrowe osoby (21) - rodzina i przyjaciele(GK) chorych na SM w wieku od dwudziestu do ponad pięćdziesiąt lat.

Materiał badawczy

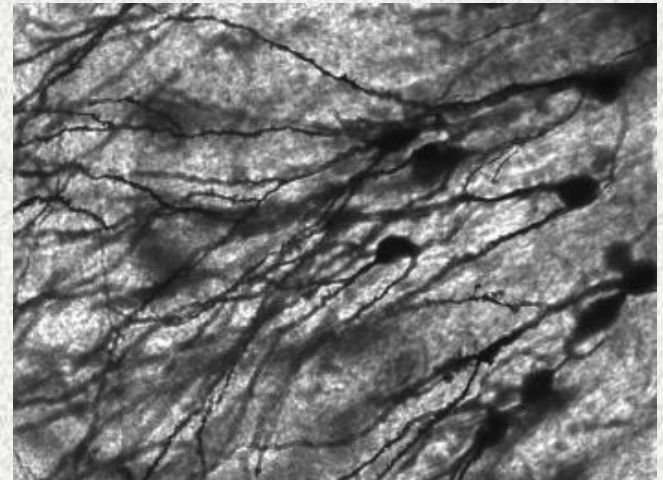
- dzieci, u których zdiagnozowano syndrom autyzmu(ASD) z rejonu Górnego Śląska (18 w tym 12 chłopców) i dzieci zdrowych(19 w tym 10 chłopców-GK) z tego samego rejonu w wieku od 2 do 14 lat.

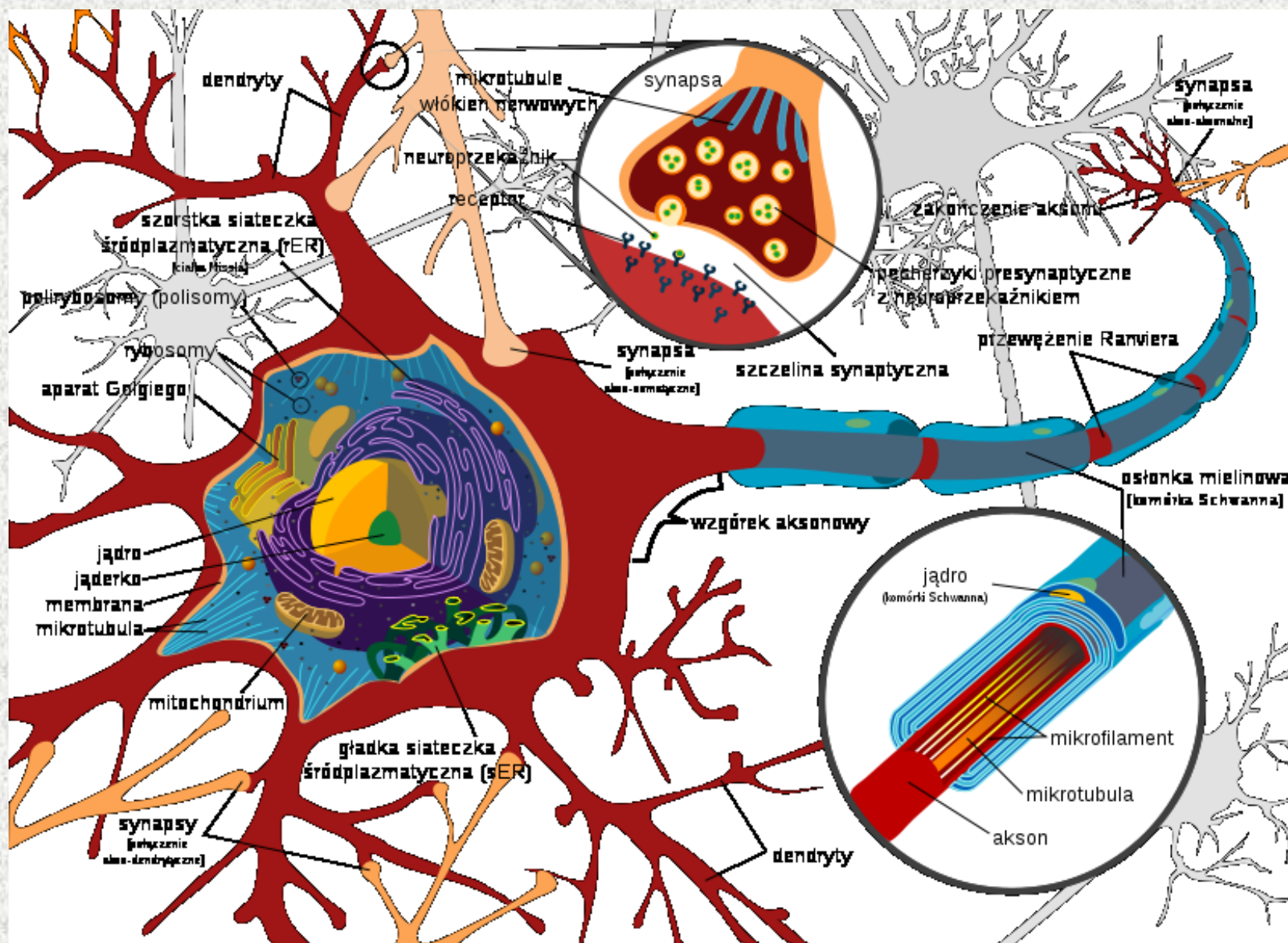
Na przeprowadzenie wymienionych badań uzyskano odpowiednie zgody Lokalnej Komisji Bioetycznej.

Ocena statystyczna

Otrzymane wyniki przedstawiono stosując podstawowe parametry statystyki opisowej. Testem Shapiro-Wilka badano zgodność rozkładu zmiennych z rozkładem normalnym, a do porównań pomiędzy poszczególnymi grupami używano testów nieparametrycznych Kołmogorowa-Smirnowa i U. Manna-Whitney'a, do oceny korelacji wykorzystano test Spearmana. Za statystycznie znamienne przyjęto poziom istotności $p < 0,05$. Do obliczeń zastosowano program komputerowy Statistica 9.0 (StatSoft, Kraków, Polska) i Microsoft Office Excel 2010.

Stwardnienie rozsiane (łac. sclerosis multiplex, SM, ang. multiple sclerosis, MS) – przewlekła, zapalna, demielinizacyjna choroba centralnego układu nerwowego, w której dochodzi do wieloogniskowego uszkodzenia (demyelinizacji i rozpadu aksonów) tkanki nerwowej.



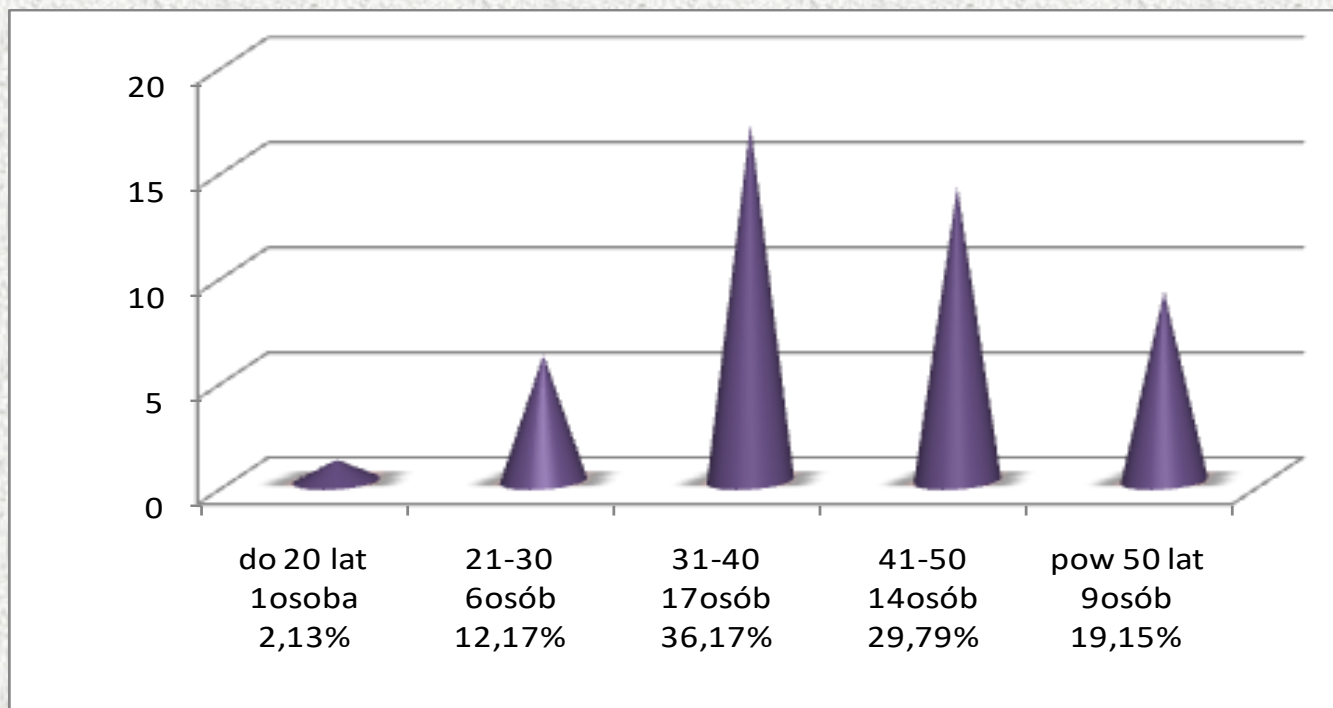


Wybrane czynniki związane z SM:

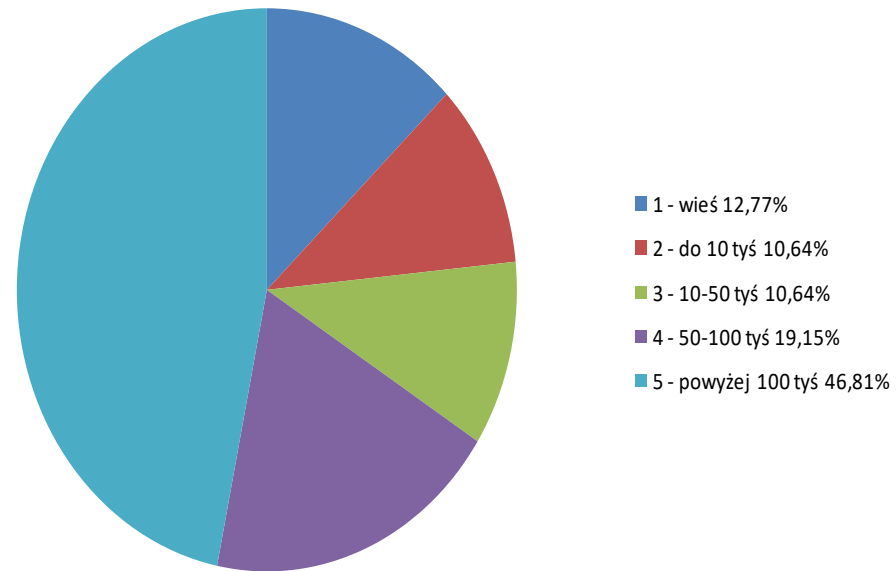
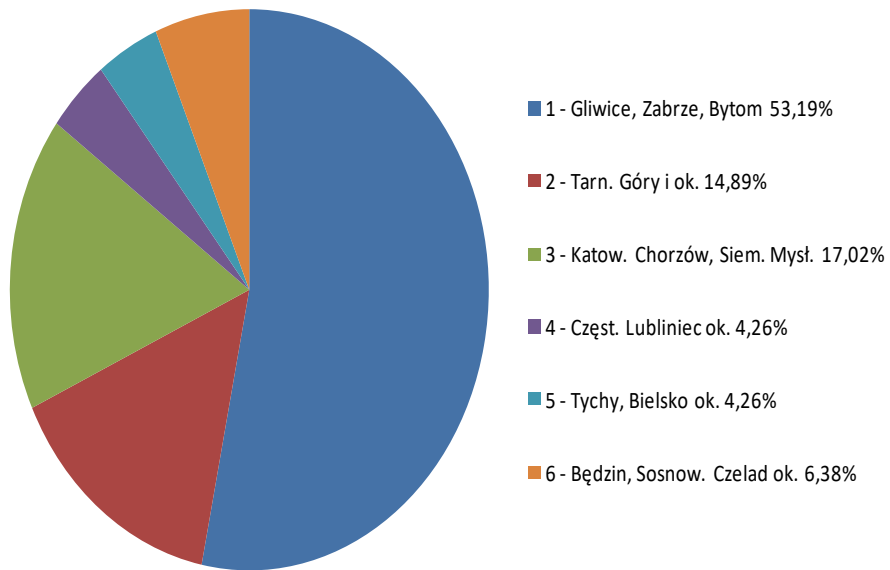
- **czynniki genetyczne,**
- **infekcje (wirusy, bakterie, grzyby),**
- **szerokość geograficzna,**
- **ekspozycja na światło,**
- **poziom witamin m.in D,**

Czynniki środowiskowe związane z SM:

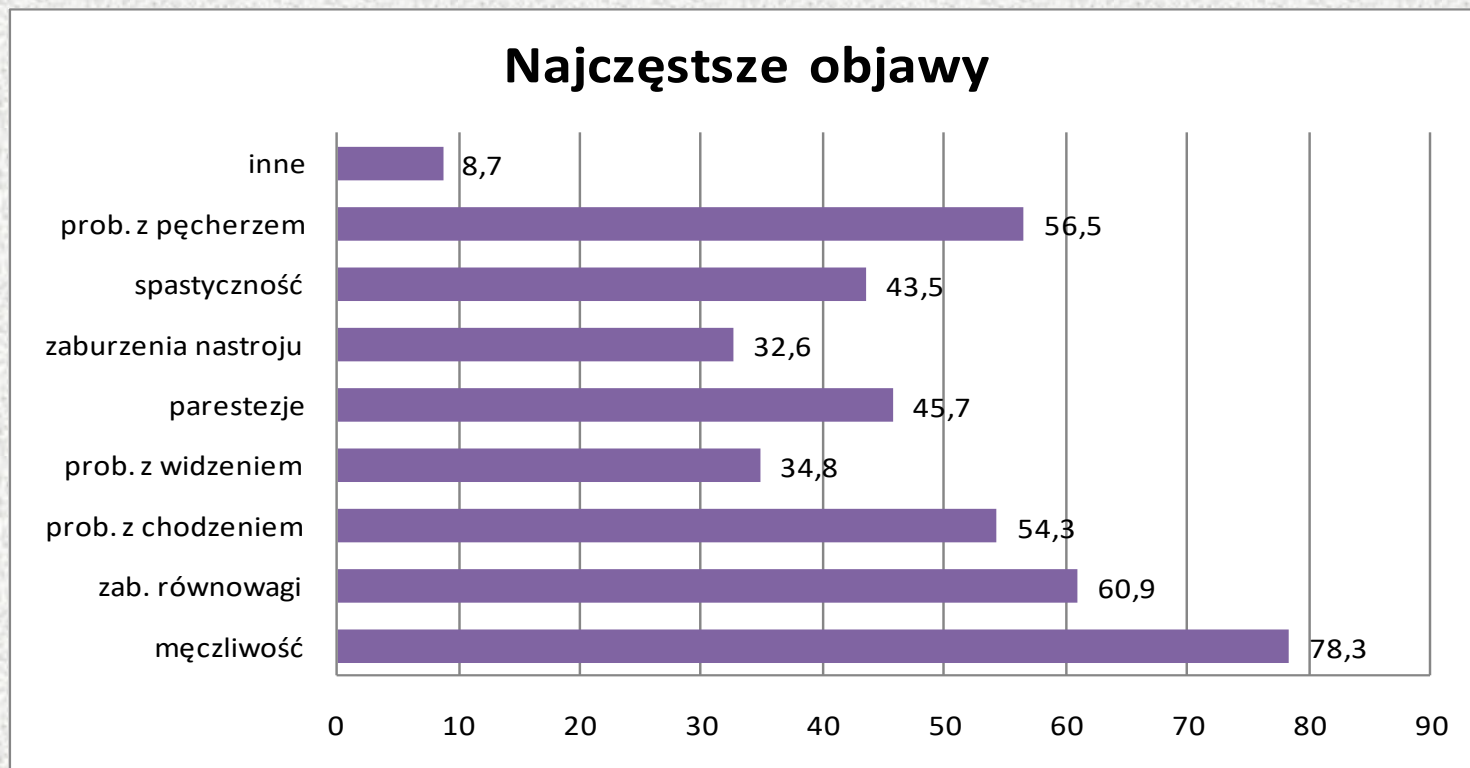
- ◆ leki zażywane w ciąży
- ◆ ekspozycja płodu na używki spożywane przez matkę
- ◆ działanie środków uzależniających
- ◆ zanieczyszczenie środowiska (działalność przemysłowa, palenie odpadów domowych, spalanie paliw, palenie tytoniu, zanieczyszczenia środowiska metalami)
- ◆ dieta, hormony



**Dystrybucja badanej grupy chorych na SM
w zależności od wieku**

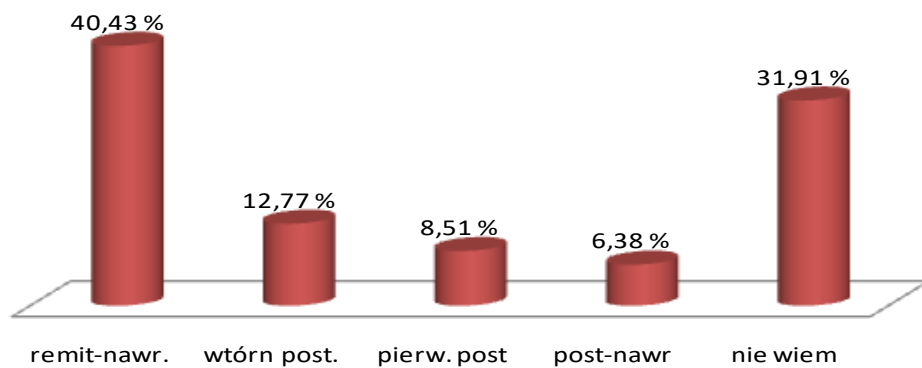


Dystrybucja badanej grupy chorych na SM w zależności od regionu (A), miejsca (B) zamieszkania

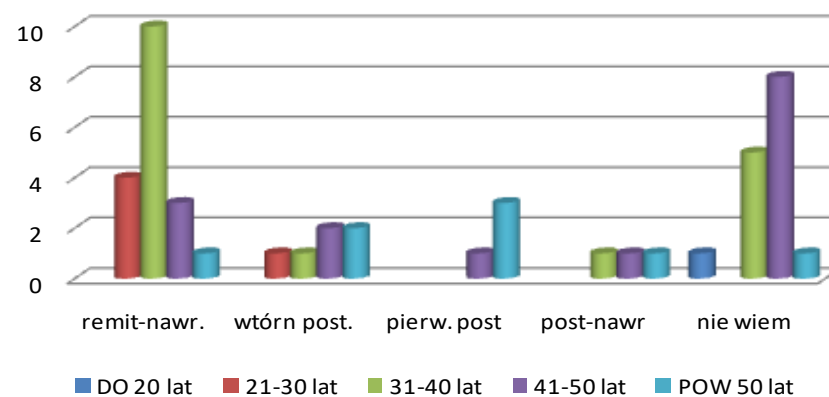


Najczęstsze objawy ankietowanych chorych na SM

Postać SM

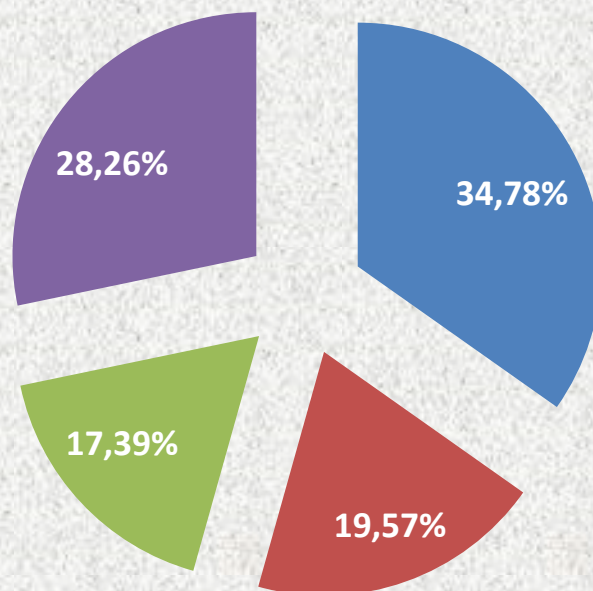


Postać SM w zależności od wieku

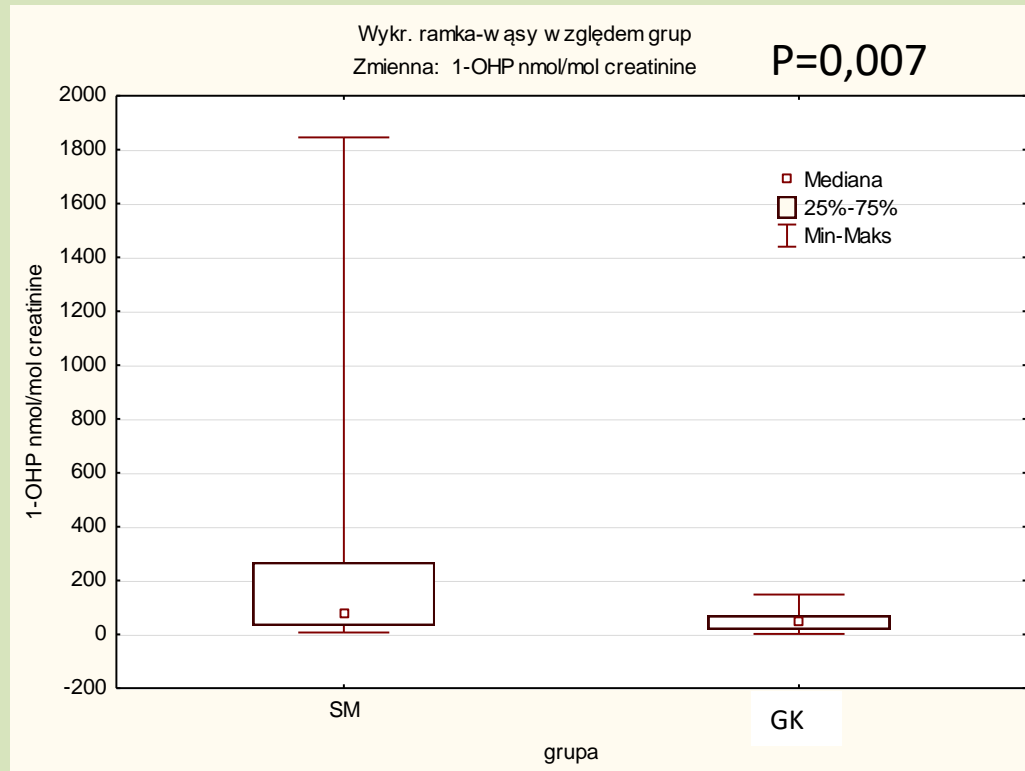


Postać SM

- brak narażenia
- elektrownie, ciepłownie
- zakłady przemysłowe
- natężony ruch samochodowy



Narażenie chorych na SM na wybrane zanieczyszczenia środowiskowe



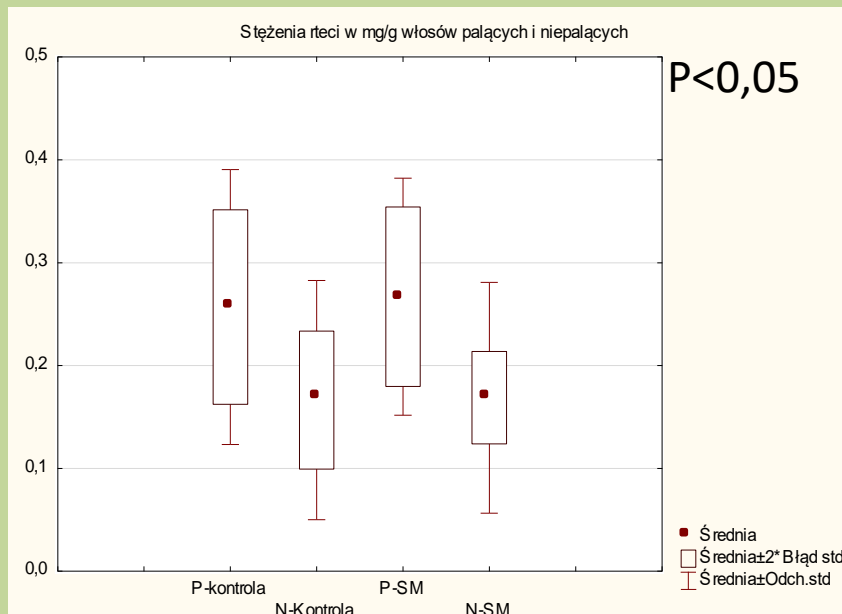
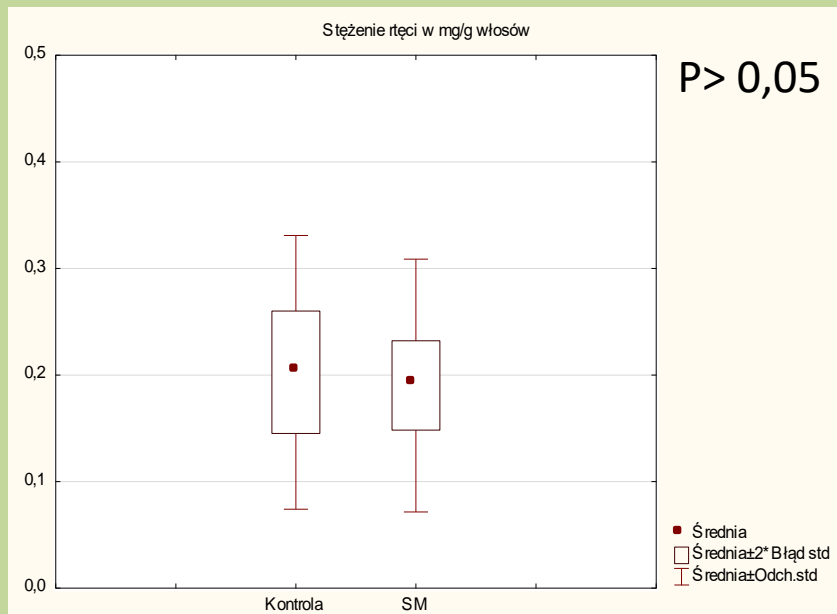
Porównanie stężeń 1-hydroksypirenu oznaczanego w moczu chorych na SM i w grupie kontrolnej

Zmienność genetyczna i indywidualne możliwości usuwania rtęci prawdopodobnie odgrywają ważną rolę w wieloczynnikowej etiologii SM.

Acta Neurol Scand.1993 Jun;87(6):461-4.

J Public Health Dent. 2007 Winter;67(1):64-6.

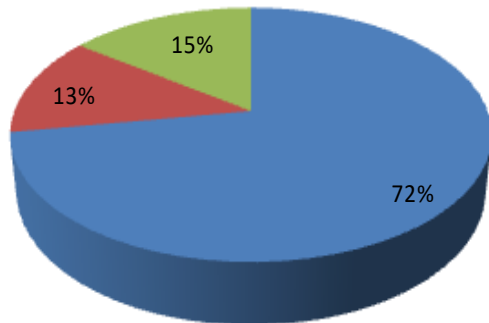
<https://articles.mercola.com/sites/articles/archive/2014/08/05/dental-amalgam-mercury-poisoning.aspx>



Wyniki oznaczania zawartości rtęci we włosach osób chorych na SM i grupy kontrolnej (A) oraz osób palących i niepalących (B)

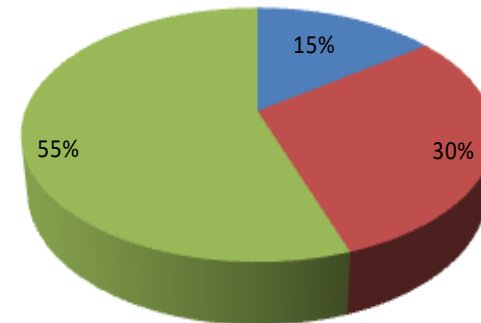
palący/niepalący

■ nie palę ■ paliłem przed diagnozą ■ pali nadal

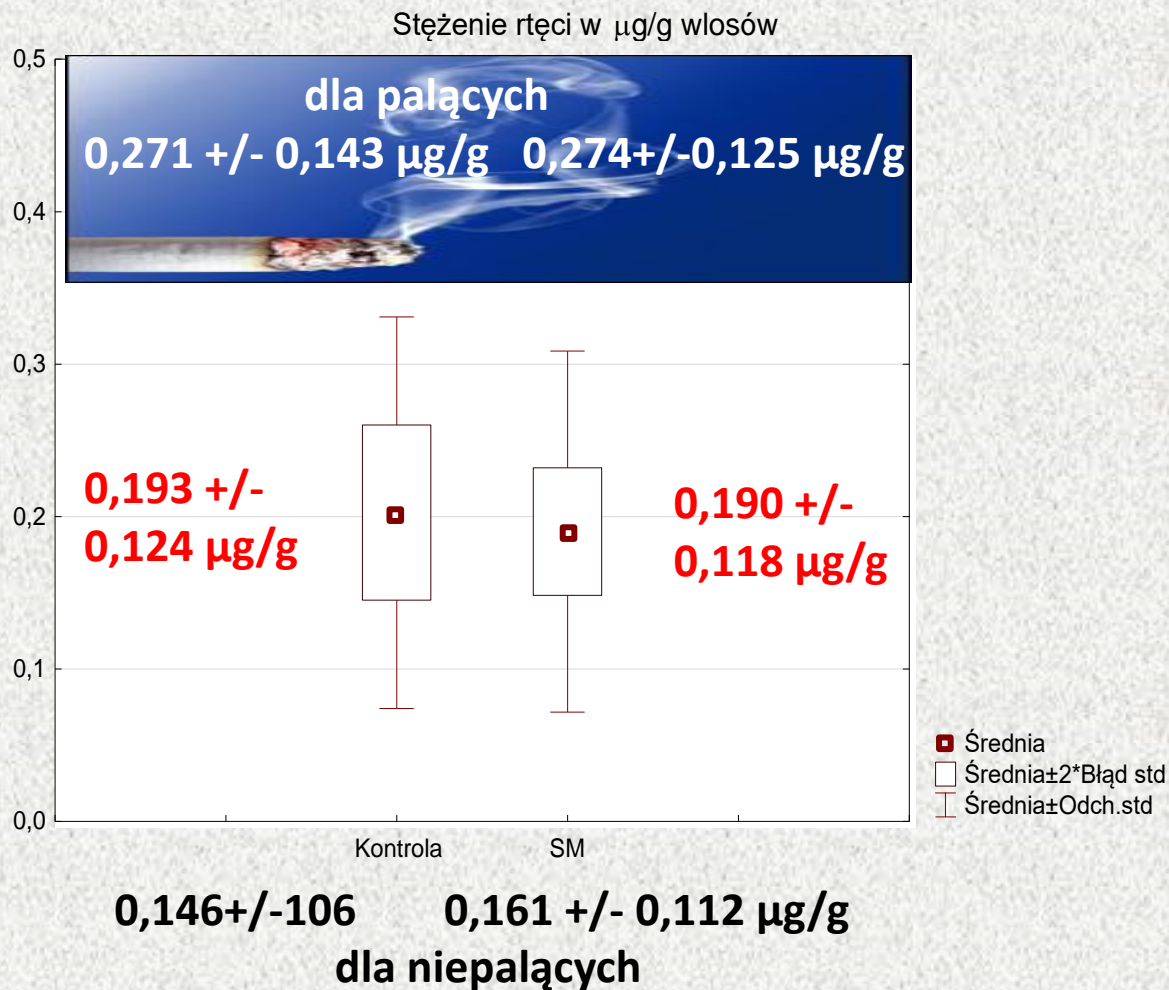


Narażenie na dym tytoniowy

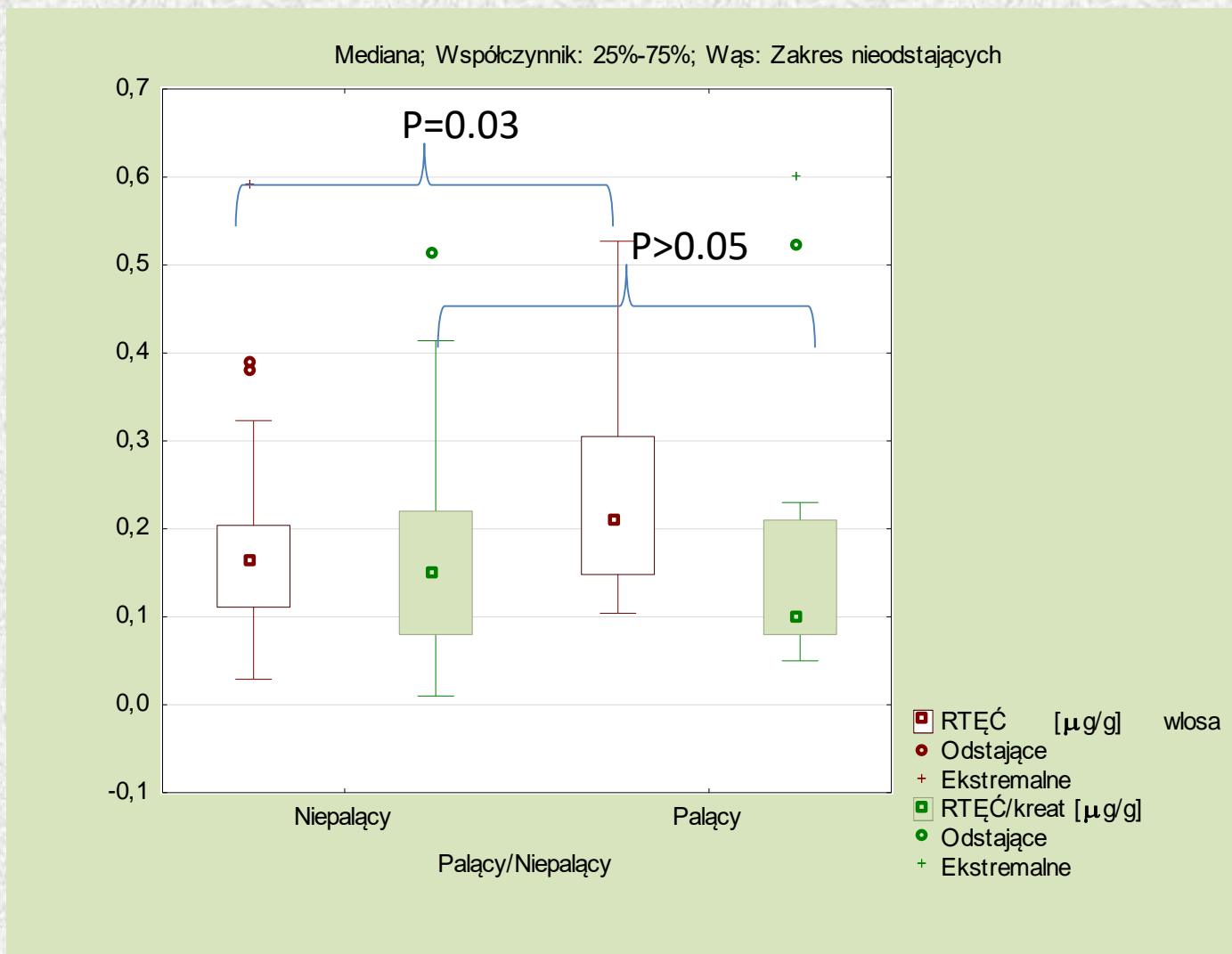
■ palący ■ narażeni na dym tytoniowy ■ niepalący i nienarażeni



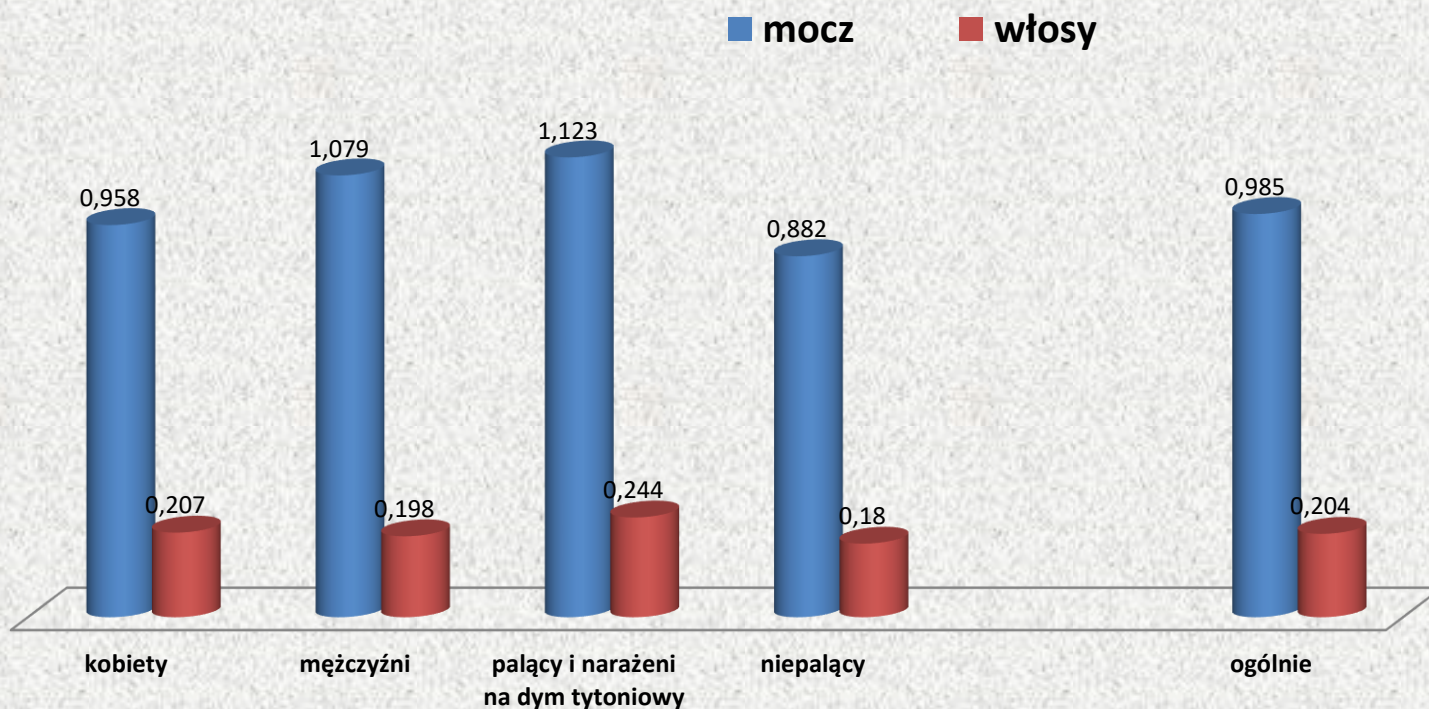
Narażenie chorych na SM na dym tytoniowy



Wyniki oznaczania zawartości rtęci we włosach osób chorych na SM (0,029-0,592 $\mu\text{g/g}$ włosów) i grupy kontrolnej (do 0,020 – 0,364 $\mu\text{g/g}$ włosów)



Wyniki oznaczeń rtęci w moczu ■ i we włosach ■ chorych na SM palących i niepalących



Zawartość rtęci w analizowanych próbkach włosów [$\mu\text{g/g}$] i w moczu [$\mu\text{g/g}$ kreatyniny] pobieranych od chorych na SM

SM a palenie tytoniu

2-krotnie większe prawdopodobieństwo zachorowania na SM u osób palących przed 15 rokiem życia -Riise, T. Smoking and Multiple Sclerosis, Neurology, 28, 2003; 61: pp 1122-1124

Badaniami przeprowadzonymi w Szwecji stwierdzono, że bierne palenie zwiększa ryzyko zachorowania na SM (OR 1.3, 95% CI 1.1-1.6)
Ther Adv Neurol Disord. 2012 January; 5(1): 13–22.

Dr Bianca Weinstock-Guttman (Professor of Neurology, State University of New York at Buffalo) **wraz ze swoimi współpracownikami przebadala 368 pacjentów chorych na MS w przeciętnym wieku 44 lat, u których chorobę zdiagnozowano 12 lat wcześniej. Z tej grupy ludzi 240 nigdy nie paliło, 96 było nałogowymi palaczami, a 32 paliło w przeszłości. Nałogowi palacze w porównaniu do niepalących mieli o 17 procent więcej uszkodzeń mózgowych.**

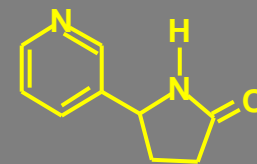
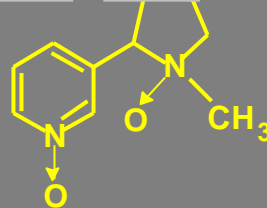
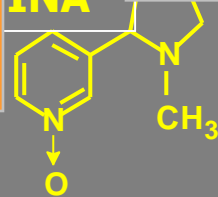
health.yahoo.com | medycyna24.pl/stwardnienie-rozsiane-a-palenie-papierosow

GŁÓWNE PRODUKTY PRZEMIAN NIKOTYNY

18h

7m 2m

trans-3-**INDOLININA**



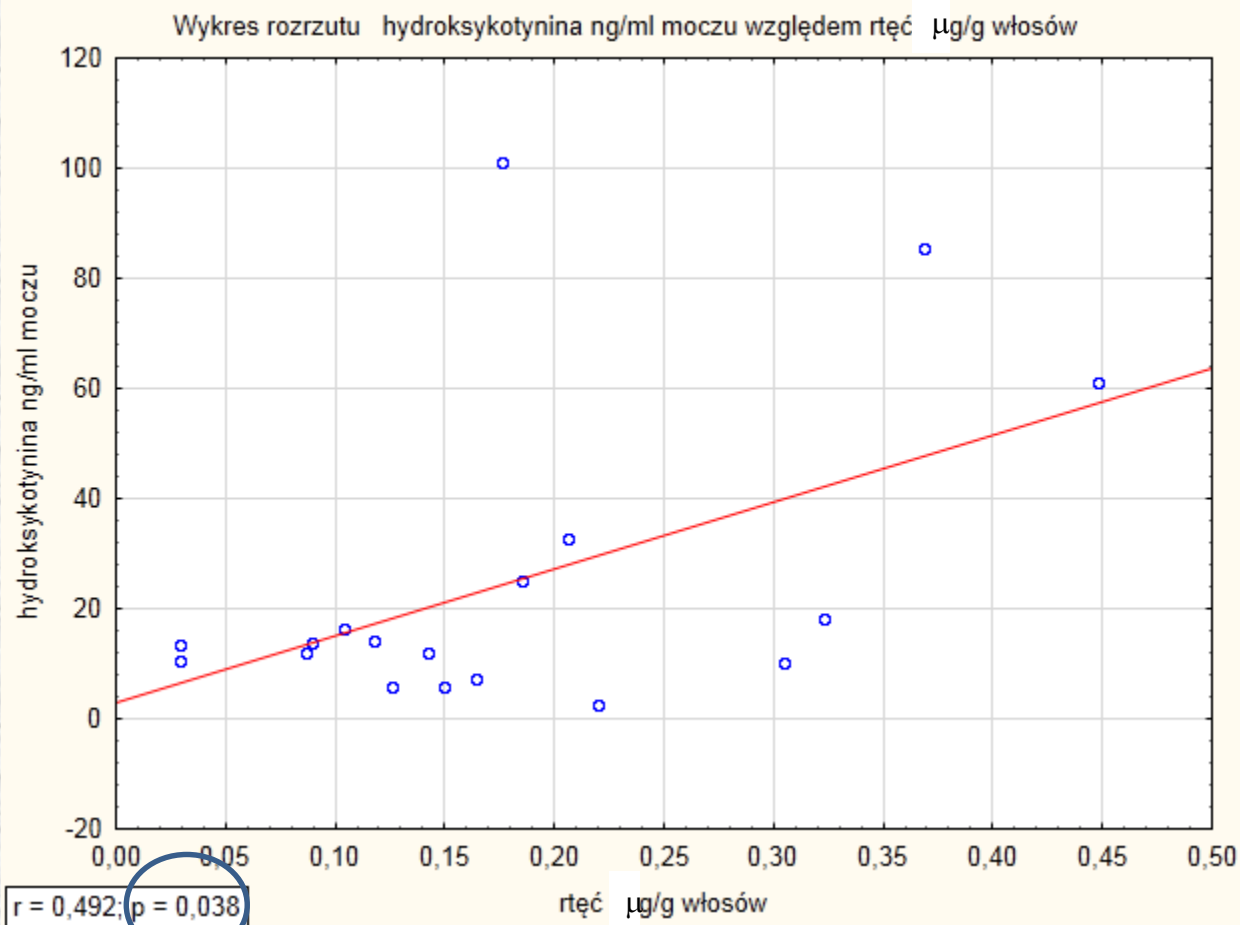
NORKOTYNINA

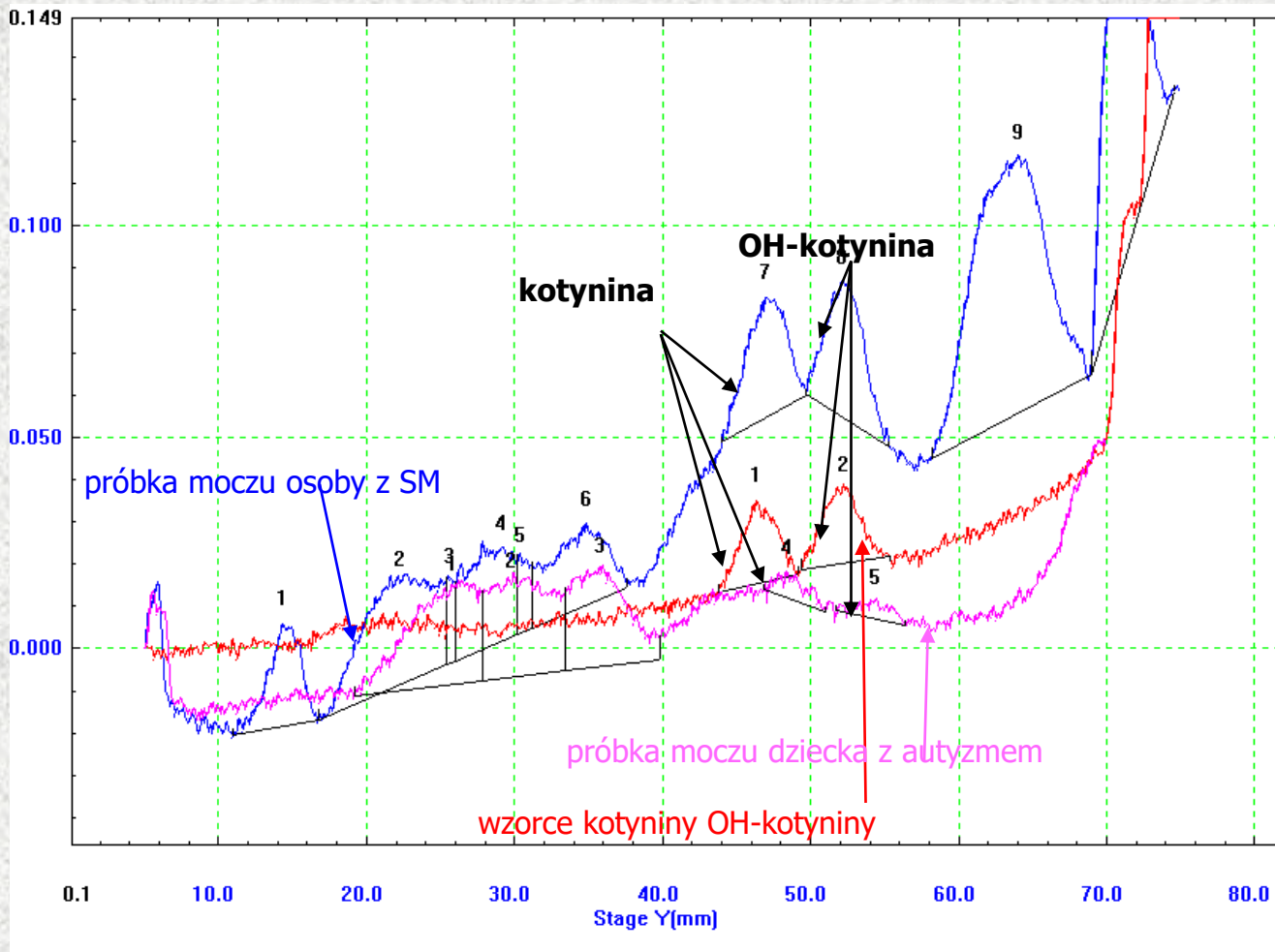


1-N- TLENEK NIKOTYNY


1,1'-N,N-DITLENEK NIKOTYNY

Zależność stężenia hydroksykotyniny w moczu vs rtęci we włosach chorych na SM





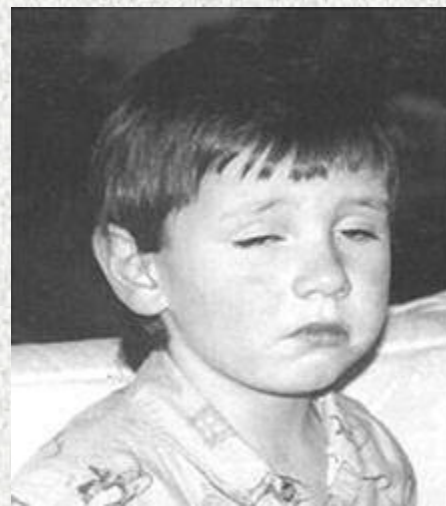
Densytogram mieszanki wzorców i ekstraktów próbki moczu osoby chorej na SM i dziecka autystycznego


przez EPA za
bezpieczną
(0,1 μ g
Hg/kg/dzień)
dla dorosłego
człowieka.

Chłopcy : dziewczynki 3-5 /1
współczynnik chorobowości
wynosi 30/10000



dziecko zatrute rtęcią.



dziecko autystyczne

Autyzm jest schorzeniem neurobiologicznym o nieustalonej etiologii

U ponad 90 % pacjentów z syndromem autyzmu (ASD) w badaniach neuropatologicznych mózgowia stwierdza się wielogniskowe zaburzenia neurogenezy, migracji neuronalnej i dojrzewania neuronów

Burbacher et al., (2005) Environ Health Perspect 113:1015-1021)., <http://www.bioautyzm.pl/2-2>

<https://adhdinfo.wordpress.com/2010/08/16/rtec/> **PIE - październik, Katowice 2017**

Porównanie zaburzeń psychicznych obserwowanych w autyzmie i w przypadkach zatrucia rtęcią według Safe Minds

Zatrucie rtęcią	Autyzm
Skrajna nieśmiałość, unikanie kontaktów, przewrażliwienie, introwersja	Trudności z kontaktami międzyludzkimi, zaniechanie kontaktów, nieśmiałość
Zmiany nastroju, twarz maska, niczym nie sprowokowany śmiech lub płacz, przypadki hysterii	Zmiany nastroju, nieruchomy wyraz twarzy, śmiech lub płacz bez widocznego powodu.
Niepokój, nerwowość, bojaźliwość, uczuciu niepokoju towarzyszą objawy cielesne	Niepokój, nerwowość
Tendencje schizoidalne, nerwice, natręctwa myślowe i czynności przymusowe, powtarzające się sny	Cechy schizofrenii, cechy typowe dla natręctw myślowych i czynności przymusowych, powtarzające się zachowania i myśli
Nie nawiązuje kontaktu wzrokowego, małomówny, niepewnie nawiązuje kontakty	Unika kontaktu wzrokowego, unika rozmowy
Depresja, brak zainteresowania życiem, zmęczenie, apatia, poczucie beznadziejności, smutek	Objawy kojarzone z depresją, brak inicjatywy, słabe reakcje emocjonalne
Z jednej strony mniej aktywny, niechętnie wychodzi i przebywa z innymi, z drugiej – jest bardziej niespokojny	Tendencja do unikania kontaktów, ucieka do swojego pokoju, woli być sam, hiperaktywność
Irracjonalne lęki	Irracjonalne lęki
Niecierpliwość, gniew i agresja, u dzieci może objawiać się pod postacią częstych i silnych napadów złości	Niecierpliwość i agresja, silne napady złości u dzieci
Przypadki psychozy, halucynacji, słyszenia głosów, paranoicznych myśli	Psychotyczne wypowiedzi, paranoiczne myśli
Trudności z rozpoznawaniem twarzy	Trudności z rozpoznawaniem twarzy

Czynniki wpływające na powstawanie i przebieg ASD

- ◆ **Ciąża/Poród**
- ◆ **Społeczne**
- ◆ **Środowiskowe:** Zatrucie metalami ciężkimi, infekcje / neuroinfekcje, antybiotykoterapia, szczepionki (?), inne

Podstawowe kryteria diagnostyczne autyzmu dziecięcego:

- ◆ jakościowe nieprawidłowości w kontaktach społecznych,
- ◆ jakościowe nieprawidłowości w porozumiewaniu się,
- ◆ ograniczone i powtarzane stereotypowe wzorce zachowań.

Do objawów psychopatologicznych najczęściej współistniejących z syndromem autyzmu należą :

- ◆ zaburzenia uwagi i aktywności,
- ◆ objawy obsesyjno-kompulsyjne,
- ◆ tiki,
- ◆ zaburzenia nastroju,
- ◆ lęk, zaburzenia snu
- ◆ zaburzenia zachowania.

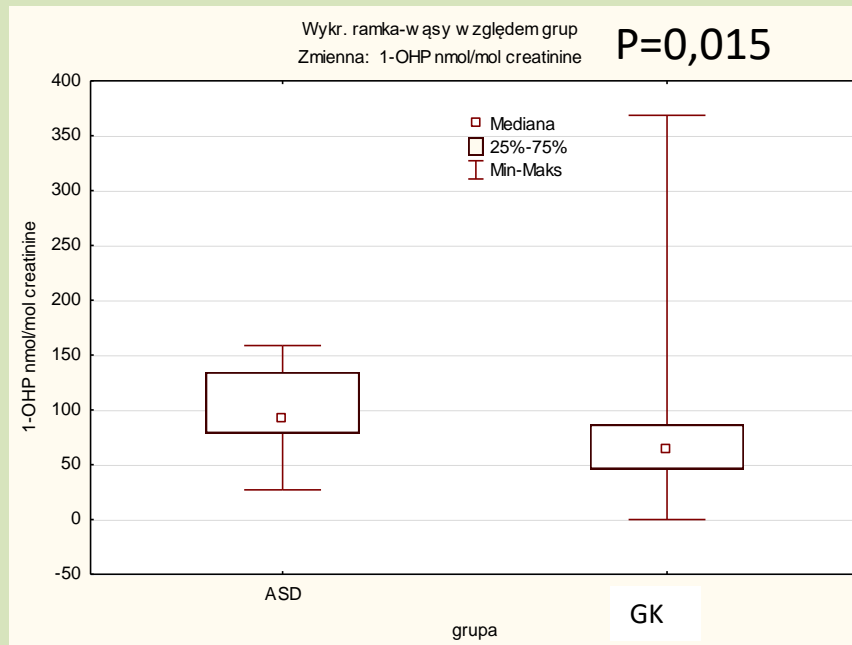


Badania wykazały bowiem, że dzieci z autyzmem miały 210% więcej rtęci aniżeli dzieci zdrowe. [JAMA z 11 lipca 2007r].

do 7 miesiąca życia dziecko otrzymuje, zgodnie z kalendarzem szczepień, do 175 μg czystego pierwiastka rtęci

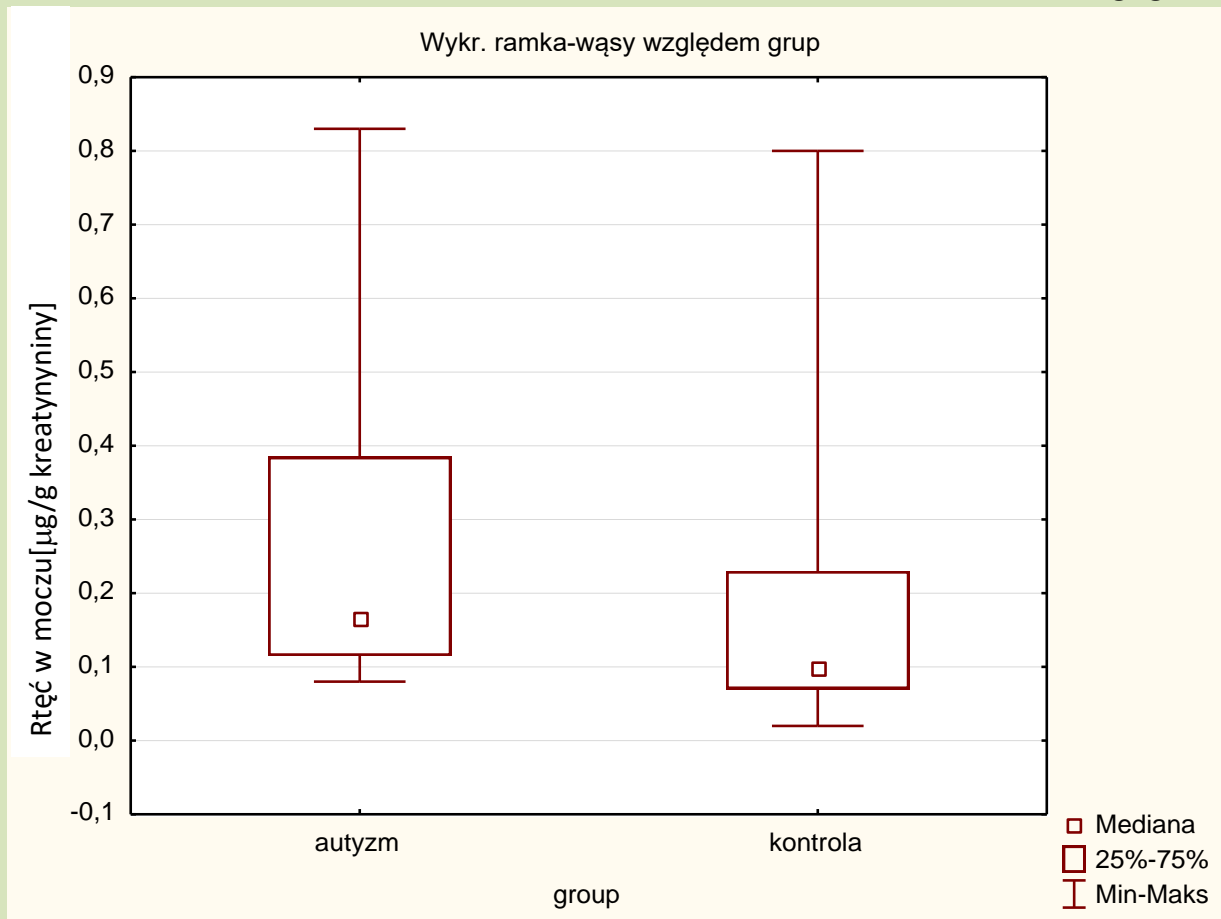


Ekspozycja na metale ciężkie może zablokować wchłanianie i szlaki metaboliczne metali odżywczych, takich jak żelazo



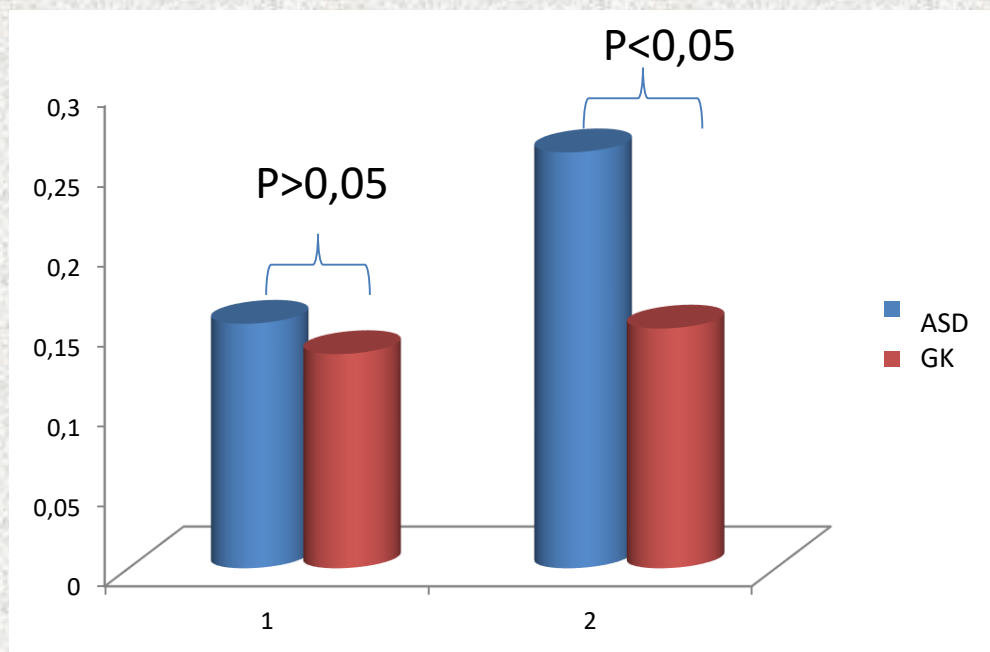
Porównanie stężeń 1-hydroksypirenu oznaczanego w moczu dzieci z syndromem autyzmu i w grupie kontrolnej

P=0.02



Wyniki oznaczania zawartości rtęci w moczu dzieci z syndromem autyzmu i w grupie kontrolnej

PIE - październik, Katowice 2017



1 –włosy Hg $\mu\text{g/g}$
 2 –mocz Hg $\mu\text{g/g}$
 kreatyniny

Wyniki oznaczania stężeń rtęci [$\mu\text{g/g}$] we włosach oraz w moczu [$\mu\text{g/g}$ kreatyniny] dzieci z syndromem autyzmu (ASD) i z grupy kontrolnej (GC)

Chorzy na SM i dzieci z syndromem autyzmu powinni unikać miejsc o dużym natężeniu ruchu i przebywać jak najczęściej poza skupiskiem zakładów i osiedli emitujących WWA jak i w pobliżu wysypisk śmieci.

Dodatknie, choć niezbyt silne korelacje między stężeniami rtęci we włosach a stężeniami metabolitów nikotyny w moczu może potwierdzać fakt narażenia na metale ciężkie m.in. rtęć, pochodzące z dymu tytoniowego. Nieznaczne stężenie metabolitów nikotyny oznaczane w moczu dzieci z syndromem autyzmu świadczy o dojrzałości i odpowiedzialności rodziców oraz otoczenia badanej grupy dzieci autystycznych.

Chorzy na SM powinni zrezygnować z palenia papierosów ze względów zdrowotnych, a w świetle powyższych badań (ponad połowa z ankietowanych miała lub ma kontakt ze składnikami dymu tytoniowego) także ze względu na to, aby nie pogarszać swojej choroby przez narażenie na metale ciężkie (w tym rtęć).



Podziękowania:

- ◆ **Mgr inż. Cezaremu Doboszowi** za udział w badaniach i opracowanie części wykresów
- ◆ **Dr n. med. Aleksandrze Damasiewicz-Bodzek** za udział w statystycznym opracowaniu wyników
- ◆ **Pani Bogusi i Basi** za pomoc techniczną przy przygotowaniu próbek do analizy



Dziękuję za uwagę!