

INSTYTUT MEDYCYNY PRACY  
im. prof. dra med. Jerzego Nofera

**Janusz A. Indulski**  
**Waldemar Lutz**  
**Piotr Lutz**

# BIOCHEMICZNE MARKERY NEUROTOKSYCZNOŚCI

Łódź 1999



Wydanie publikacji dofinansowane przez Komitet Badań Naukowych



Skład i redakcja techniczna: *Alina Frymus*  
Projekt okładki: *Andrzej Graczykowski*

36.733 / 1

© 1999, Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera

ISBN 83-86052-99-6

---

**WYDAWCA:**

**Oficina Wydawnicza**

Instytutu Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera

90-950 Łódź, ul. Św. Teresy 8

Rozpowszechnianie książek: fax (0-42) 631 48 50, tel. (0-42) 631 47 19

e-mail: ow@imp.pl, internet: <http://www.imp.lodz.pl>

---



|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| WSTĘP                                                                     | 5  |
| ZMIANY W UKŁADZIE NERWOWYM WYWOŁANE PRZEZ NEUROTOKSYNY                    | 9  |
| Neurony – podstawowe jednostki strukturalno-czynnościowe układu nerwowego | 12 |
| Podatność neuronów na toksyny chemiczne                                   | 17 |
| Mechanizmy toksycznej martwicy neuronów                                   | 25 |
| BIOMARKERY NEUROTOKSYCZNOŚCI                                              | 31 |
| Biomarkery ekspozycji                                                     | 33 |
| Biomarkery skutków                                                        | 38 |
| Biomarkery wrażliwości osobniczej                                         | 42 |
| ŚRODOWISKOWE I ZAWODOWE SUBSTANCJE CHEMICZNE O WŁAŚCIWOŚCIACH NEUROTOKSYN | 52 |
| Pestycydy                                                                 | 57 |
| Związki fosforoorganiczne                                                 | 58 |
| Karbaminiany                                                              | 66 |
| Organochlorowane pestycydy                                                | 69 |
| Rozpuszczalniki                                                           | 71 |
| Przykłady rozpuszczalników o właściwościach neurotoksycznych              | 72 |
| Styren                                                                    | 72 |
| Akrylamid                                                                 | 75 |
| n-heksan                                                                  | 76 |
| Dwusiarczek węgla                                                         | 78 |
| Trimetylobenzen                                                           | 79 |
| Metale                                                                    | 81 |
| Piśmiennictwo                                                             | 83 |
| Streszczenie                                                              | 89 |







W ostatnich latach obserwuje się narastające zainteresowanie toksykologią układu nerwowego **neurotoksykologią**. Wynika to zarówno z faktu zwiększonego zaniepo-

## WSTĘP

kojenia społeczeństwa oddziaływaniami, jakie chemiczne substancje toksyczne, obecne w środowisku pracy i bytowania człowieka, mogą wywierać na stan jego zdrowia, a także z faktu uzyskania potwierdzenia w badaniach naukowych, że układ nerwowy jest szczególnie podatny na urazy chemiczne.

Zaburzenia funkcjonowania układu nerwowego człowieka mogą być skutkiem jego narażenia na szereg związków chemicznych i czynników fizycznych, obecnych w środowisku, a także tych spożywanych przez niego na co dzień lub okazjnie, np. etanol, leki czy narkotyki. W grupie związków skażających środowisko należy wymienić te, które są obecne w spożywanym pokarmie, wodzie pitnej czy powietrzu, np. związków przeznaczonych dla zwalczania owadów, grzybów i chwastów oraz te, z którymi człowiek ma kontakt w miejscu pracy (toksyny przemysłowe).

Pod pojęciem **neurotoksyczność** rozumie się każdą zmianę, strukturalną lub czynnościową w układzie nerwowym, spowodowaną narażeniem na czynniki chemiczne, fizyczne lub biologiczne. Szkodliwą zmianę powodowaną narażeniem określa się mianem **skutku toksycznego**. Skutek toksyczny może się ujawnić prawie natychmiast po wniknięciu substancji chemicznej do organizmu lub ujawnić się po upływie pewnego czasu. Wczesne skutki przewlekłego lub ostrego kontaktu z neurotoksynami mogą mieć formę zwykłych, pojawiających się okresowo, dolegliwości w postaci bólów głowy, uczucia zmęczenia lub rozdrażnienia. Mogą również przybierać formę subtelnych zaburzeń funkcjonalnych ze strony układu nerwowego, często niezauważalnych przez osobę narażoną. Zaburzenia takie daje się wykryć dopiero po zastosowaniu odpowiednich testów psychologicznych, neurologicznych czy biochemicznych. W wielu przypadkach klinicznie jawne objawy chorobowe ze strony układu nerwowego mogą pojawić się po wielu latach trwającego narażenia na neurotoksyny. Objawy te są bardzo blisko związane z tymi, jakie towarzyszą normalnie przebiegającemu procesowi starzenia. Mogą one przypominać objawy towarzyszące rozwojowi zespołu Alzheimera, czy zespołu Parkinsona. To powoduje, że wyka-



zanie powiązania tych objawów z samym narażeniem na neurotoksyny jest bardzo trudne, a w wielu wypadkach wręcz niemożliwe.

Liczba substancji chemicznych, którym można przypisać właściwości neurotoksyczne lub potencjalnie neurotoksyczne jest bardzo duża. Co roku są wprowadzane do handlu dziesiątki, jeśli nie setki nowych substancji chemicznych o niepoznanych właściwościach neurotoksycznych. Powoduje to, że w wielu przypadkach trudno jest ustalić właściwą przyczynę wystąpienia toksycznych objawów ze strony układu nerwowego u pojedynczego człowieka, czy w grupie osób. Poważnym problemem jest również i to, że zmiany toksyczne w układzie nerwowym w znaczącej swej części są wykrywane raczej dość przypadkowo i zwykle już po tym, jak przyjmą one obraz klinicznie jawnych zmian chorobowych. Należy tu zauważyć, że dla szeregu substancji uzyskano dane o ich właściwościach neurotoksycznych na długo przed wykryciem takich właściwości u ludzi w warunkach klinicznych. Znane były np. wcześniej z badań na zwierzętach neurotoksyczne właściwości aluminium. Dopiero po ponad 100 latach fakt ten został potwierdzony w odniesieniu do człowieka. Ustalono, że za zwiększoną liczbę przypadków encefalopatii u pacjentów leczonych hemodializami odpowiedzialne jest aluminium, zawarte w żelu aluminiumowym, stosowanym przy tego rodzaju zabiegach leczniczych.

Zagrożenie człowieka przez substancje neurotoksyczne jest funkcją specyficznych właściwości danej substancji, wynikającej z jej budowy chemicznej, a także całego zespołu warunków, w jakich wystąpiło lub występuje narażenie (ostre lub przewlekłe, droga penetracji neurotoksyny do organizmu, współistniejące lub przebyte narażenia, itp.).

Obecnie nie ulega wątpliwości, że substancje chemiczne, które występują lub mogą się pojawić w środowisku pracy lub bytowania człowieka, stanowią rzeczywiste lub potencjalne zagrożenie integralności strukturalnej i funkcjonalnej układu nerwowego. Zmiany lub zaburzenia funkcji tego układu rzutują nie tylko na jakość życia, ale mogą doprowadzić również do poważnych stanów chorobowych w całym organizmie. W wielu przypadkach objawy występowania zmian w układzie nerwowym są bagatelizowane, jeśli nie dają one wyraźnych objawów choroby. Co wynika nie tylko z subiektywnych odczuć osób z takimi zmianami, ale również z braku możliwości diagnostycznych ze strony służb nadzorujących stan zdrowotny.

Złożoność anatomiczna i funkcjonalna układu nerwowego powoduje, że dla celów diagnostycznych, oceniających skutki narażenia na czynniki neurotoksyczne, konieczne jest podejście interdyscyplinarne, obejmujące wykonanie badań behawioralnych, fizjologicznych, morfologicznych i biochemicznych.

Stosowanie badań behawioralnych w neurotoksykologii oparte jest na założeniu, że zachowanie jest końcowym skutkiem procesów zachodzących w układzie nerwowym. Zmiana w zachowaniu w trakcie narażenia lub po narażeniu może być zatem traktowana jako świadectwo wpływu tego narażenia na stan czynnościowy układu nerwowego. Zaletą badań neurobehawioralnych jest to, że mogą być wykonywane wielokrotnie, w różnych odstępach czasu, co umożliwia śledzenie dynamiki zmian wywołanych przez neurotoksyny. Natomiast wadą tych badań jest ich mała selektywność. Wysoka czułość badań neurobehawioralnych wynika z faktu, że nawet najprostsza forma zachowania wymaga współdziałania szeregu procesów zachodzących w układzie nerwowym. Dlatego też nawet przybliżone określenie charakteru upośledzenia wywołanego narażeniem na neurotoksyny wymaga poddania badanej osoby wielu testom. To z kolei wymaga znajomości specyficznych cech zachowania charakterystycznych dla człowieka, a także wiedzy o tym, co dany test behawioralny mierzy.

Bardzo często stosowanymi badaniami dla oceny skutków narażenia na neurotoksyny są badania neurofizjologiczne. Pod tym pojęciem występują badania polegające na mierzeniu zjawisk elektrycznych w układzie nerwowym. Zjawiska te stanowią nieodłączny składnik czynności bioelektrycznej komórek nerwowych, a tym samym wskaźnik stanu czynnościowego układu nerwowego. W neurotoksykologii badania neurofizjologiczne wykorzystywane są najczęściej do oceny stanu czynnościowego nerwów obwodowych (pomiar szybkości przewodzenia), do wykrywania zaburzeń czucia i lokalizowania miejsc uszkodzenia w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym (technika potencjałów wywołanych) oraz do globalnej oceny stanu czynnościowego układu nerwowego (elektroencefalografia).

Badania morfologiczne tkanki nerwowej ze względu na swój wysocy inwazyjny charakter nie mają praktycznie zastosowania do badania osób i populacji narażonych na czynniki neurotoksyczne. Ich zastosowanie ogranicza się do badań na materiale sekcyjnym (lub na zwierzętach) w celu ujawnienia zmian strukturalnych na poziomie

komórkowym i subkomórkowym, które mogły być podłożem stwierdzonych wcześniej zaburzeń funkcjonalnych.

Aktualnie stają się coraz bardziej dostępne dla neurotoksykologów nieinwazyjne badania stanu morfologicznego i funkcjonalnego ośrodkowego układu nerwowego. Wymienić tu można skomputeryzowaną tomografię osiową (CAT, computed axial tomography), obrazy rezonansu magnetycznego (MRI, magnetic resonance imaging), spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (MRS, nuclear magnetic resonance spectroscopy) oraz pozytronową tomografię emisyjną (PET, positron-emission tomography). Te postępowania, jakkolwiek są uważane za nieinwazyjne, to niektóre z nich wymagają ekspozycji na promieniowanie jonizujące.

W ostatnich latach podjęto intensywne badania nad poszukiwaniem i weryfikacją przydatności już stosowanych biochemicznych wskaźników zmian w układzie nerwowym (biomarkerów), które mają istotne znaczenie w wykrywaniu przedklinicznych zmian neurotoksycznych w układzie nerwowym. Aktualnie wykorzystuje się te biomarkery, które występują w łatwo dostępnych tkankach obwodowych i mogą być reprezentatywne dla takich samych parametrów obecnych w tkance nerwowej. Ustalono, że w elementach morfotycznych krwi obwodowej (płytkach, leukocytach, erytrocytach) obecne są markery biochemiczne, mogące być mierzalnymi, zastępczymi wskaźnikami uszkodzeń, dysfunkcji i interakcji powodowanych przez neurotoksyny środowiskowe w układzie nerwowym. Badania biomarkerów powinny jednak być wykonywane równolegle z innymi, wymienionymi wcześniej badaniami. Równolegle prowadzone badania, dotyczące różnych poziomów organizacji układu nerwowego, mogą przyczynić się do zwiększenia wartości uzyskiwanych rezultatów diagnostycznych.



W koordynacji czynności organizmu ludzkiego zaangażowane są dwa układy – nerwowy i hormonalny. Pierwszy ma znacznie większą szybkość i selektywność działania od drugiego. Najważniejszą funkcją układu nerwowego jest

odbieranie bodźców pochodzących z zewnątrz organizmu, jak również z poszczególnych jego części, przekształcanie ich na impulsy nerwowe i przekazanie do odpowiednich ośrodków, gdzie wywołują one określone odpowiedzi. Układ nerwowy stanowi też morfologiczną i biochemiczną podstawę wyższych czynności nerwowych.

Podstawowym elementem komórkowym układu nerwowego są **neurony i komórki gleju**. Pozostają one w łączności z komórkami naczyń krwionośnych i wyspecjalizowanymi komórkami tkanki łącznej i nabłonkowej.

Neurony różnią się w zasadniczy sposób od innych komórek układu nerwowego. Ta odmienność wynika nie tylko z pełnionej przez nie funkcji, związanej z generowaniem, odbieraniem, przewodzeniem i przekształcaniem impulsów nerwowych, ale również z samej budowy tych komórek. Odmienność strukturalna polega głównie na istnieniu długich wypustek komórkowych. Z ciała neuronu wychodzą dwa rodzaje wypustek: **aksony i dendryty**. Akson (zwany też włóknem osiowym, neurylem) zaczyna się w obszarze neuronu zwanym odcinkiem początkowym aksonu. Dendryty występują w neuronie w znacznej niekiedy liczbie i są zwykle krótsze od aksonu, a ponadto charakteryzują się licznymi drzewiastymi rozgałęzieniami. Ze względu na czynność neuronu, ważnym elementem strukturalnym są osłonki aksonu. W ich tworzeniu uczestniczą komórki gleju. W zależności od rodzaju osłonek pokrywających akson wyróżnia się włókna nerwowe z osłonką mielinową, czyli włókna rdzenne oraz włókna bez osłonki – bezrdzenne. We włóknach rdzennych akson otoczony jest osłonką mielinową i neurolemmą. Osłonka mielinowa nie ma charakteru ciągłego. Przerywa się w regularnych odstępach tworząc cieśni węzła.

W zespole komórek glejowych ośrodkowego układu nerwowego wyróżnia się **astrocyty, oligodendrocyty oraz mikroglej**.

Astrocyty dzielą się na astrocyty plazmatyczne i astrocyty włókniste. Astrocytom obu typów przypisuje się cztery zasadnicze fun-

## ZMIANY W UKŁADZIE NERWOWYM WYWOŁANE PRZEZ NEUROTOKSYNY



kcje. Dzięki wzajemnym połączeniom z jednej strony z komórkami nerwowymi, a z drugiej strony z siecią naczyń krwionośnych spełniają funkcje podporowe tkanki nerwowej. Ponieważ astrocyty (tak jak inne komórki glejowe) zachowują zdolność podziałową przez cały okres życia człowieka, wydaje się, że mogą uczestniczyć w likwidowaniu ubytków w tkance nerwowej, spowodowanych procesami chorobowymi lub oddziaływaniem neurotoksyn. Zdolność astrocytów i innych komórek glejowych do podziału stanowi podłoże dla tworzenia guzów nowotworowych (glejaków), indukowanych przez kancerogeny chemiczne, penetrujące do układu nerwowego. Astrocyty biorą także udział w procesie fagocytozy obumarłych komórek nerwowych. Stanowią one izolację dla komórek nerwowych, dzięki czemu te ostatnie są chronione przed przypadkowym przyjęciem impulsu z innego neuronu. Astrocytom przypisuje się również funkcje odżywcze komórek nerwowych.

Oligodendrocyty biorą udział w zaopatrywaniu komórek nerwowych, w substancje odżywcze, jak również uczestniczą w fagocytozie komórek nerwowych zniszczonych w wyniku procesów chorobowych lub toksycznych oddziaływań substancji chemicznych. Są odpowiedzialne za wytwarzanie krótkich odcinków mieliny wokół aksonów centralnego układu nerwowego.

Komórki mikrogleju spełniają bliżej nieokreśloną rolę w metabolizmie tkanki nerwowej. Po uszkodzeniu tkanki nerwowej ilość komórek mikrogleju wyraźnie wzrasta, część z nich pełni funkcję fagocytarną. Sugeruje się, że komórki mikrogleju mogą spełniać dwie funkcje w usuwaniu skutków uszkodzeń układu nerwowego – to jest eliminowanie zniszczonych komórek oraz wypełnianie ubytków w tkance nerwowej. Poza obrębem ośrodkowego układu nerwowego wzdłuż włókien nerwowych występują neurolemocyty (dawna nazwa komórki Schwanna). Spełniają one funkcje odżywcze w stosunku do włókna oraz wytwarzają otoczkę mielinową. Wydaje się również, że odgrywają rolę w procesach wzrostu włókien osiowych, tj. aksonów. W przypadku uszkodzenia aksonu, bez jednoczesnego zniszczenia neurolemocyty, akson odrasta szybciej niż w przypadku, kiedy jednoczesnemu uszkodzeniu uległ neurolemocyt.

Układ nerwowy zabezpieczony jest przed niepożądanymi działaniami substancji egzogennych o charakterze neurotoksycznym przez naturalne bariery chemiczne i fizyczne. Te bariery nie gwarantują jednak pełnej ochrony. I tak bariera krew - mózg osłania układ nerwowy przed

zmianami składu chemicznego. Zasadniczą częścią strukturalną bariery krew - mózg są wyspecjalizowane komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, wyróżniające się tym, że połączone są strefami zamykania mającymi charakter taśmowaty. Opasują one całe komórki, czyniąc przestrzeń międzykomórkową nieprzepuszczalną dla znacznej części substancji, znajdujących się w środowisku krwi. Mogą one przekraczać barierę krew - mózg tylko drogą transportu przez komórki. Pewne substancje, zwłaszcza rozpuszczalne w tłuszczach (w tym również i te posiadające właściwości neurotoksyczne, np. pestycydy), mogą ją jednak przekraczać. Inną drogą penetracji substancji chemicznych do układu nerwowego jest ich wchłanianie przez zakończenia nerwów obwodowych. Z tych zakończeń przenoszone są do ośrodkowego układu nerwowego aksonalnym transportem wstecznym (np. toksyny tężca i niektóre wirusy).

Częścią układu nerwowego człowieka, najbardziej narażoną na działanie egzogennych substancji neurotoksycznych, jest obwodowy układ nerwowy. Neurony autonomicznego układu nerwowego oraz zwoje czuciowe nie są chronione barierą krew - mózg, podobnie jak niektóre struktury przykomorowe oraz w ograniczonym stopniu siatkówka. W niektórych przypadkach narażenia na toksyny chemiczne i szkodliwe czynniki fizyczne może dojść do uszkodzenia bariery krew - mózg. Umożliwia to проникnięcie do mózgu i zaburzenia jego funkcji substancjom chemicznym, które normalnie nie przechodzą przez tę barierę.

Układ nerwowy człowieka zalicza się do tzw. układów nadmiarowych. Oznacza to, że liczba komórek nerwowych w ośrodkach nerwowych znacznie przewyższa tę, jaka jest niezbędna do normalnego funkcjonowania tych ośrodków. Dodatkową cechą układu nerwowego człowieka (a także zwierząt) jest jego zdolność do tworzenia nowych połączeń synaptycznych między komórkami nerwowymi oraz zmiany ilości połączeń już istniejących (zmiany gęstości receptorów synaptycznych). Te cechy układu nerwowego człowieka określają wielkość tzw. rezerwy funkcjonalnej. Istnienie tej rezerwy powoduje, że niewielkie uszkodzenia w układzie nerwowym, np. te powodowane przez neurotoksyny, nie wywołują zauważalnych skutków, ponieważ funkcje neuronów obumierających zostają przejęte przez inne neurony. W przypadku, kiedy neurotoksyna upośledza przewodnictwo synaptyczne, np. inhibitor cholinesteraz, równowaga czynnościowa zostaje przywrócona





przez kompensacyjną zmianę gęstości receptorów. Powoduje to, że nawet w przypadku dość rozległych uszkodzeń układu nerwowego przez neurotoksyny skutki mają dość często charakter przejściowy. Podobnie brak widocznych, natychmiastowych skutków nie musi oznaczać, że dana osoba nie była narażona na czynniki neurotoksyczne. Zawsze należy się liczyć z możliwością, że działanie neurotoksyczne ma miejsce, lecz dzięki rezerwie funkcjonalnej skutki tego działania są kompensowane i nie ujawniają się w okresie narażenia lub bezpośrednio po narażeniu. Rezerwa funkcjonalna maleje jednak z wiekiem w wyniku naturalnego ubywania neuronów. Każdorazowe, dodatkowe wykorzystanie tej rezerwy, np. w sytuacjach, gdy kompensowane są skutki narażenia, przybliża moment wyczerpania jej zasobów. Wynika z tego, że widoczne skutki narażenia na czynniki neurotoksyczne mogą się ujawnić dopiero po latach w postaci wcześniejszego, niż wynikałoby to z wieku kalendarzowego, wystąpienia związanych z wiekiem upośledzeń funkcjonalnych układu nerwowego.

## **Neurony - podstawowe jednostki strukturalno-czynnościowe układu nerwowego**

Mimo zróżnicowania funkcji neuronów oraz bardzo złożonych stosunków zachodzących między tymi komórkami, budowa wszystkich neuronów jest zasadniczo podobna. Ich specjalizacja czynnościowa przejawia się znaczącym zróżnicowaniem wielkości, kształtu oraz ilości i sposobie rozgałęzień.

Ze względu na funkcje, jakie neurony spełniają w układzie nerwowym, zalicza się je do grupy komórek pobudliwych, tzn. mających zdolność do reagowania na bodźce zmianą w potencjale elektrycznym. Zjawiska elektryczne, zachodzące w neuronie uwarunkowane są przede wszystkim strukturą i czynnością błony komórkowej – neurolemmy oraz występowaniem w niej specyficznych struktur białkowych, jakimi są kanały jonowe. Obecność tych ostatnich łączy się ściśle z możliwością przedostawania się jonów z komórki i do komórki, bądź to na zasadzie swobodnego przepływu (transport bierny) bądź z wykorzystaniem energii metabolicznej, niezbędnej do funkcjonowania enzymów transportujących (transport aktywny).

Transport bierny zapewnia możliwość migracji jonów i innych substancji ze środowiska zewnątrzkomórkowego do wnętrza komórki





i oparty jest na zjawisku dyfuzji prostej lub złożonej oraz może zachodzić z udziałem nośników. Transport przez te ostatnie nie wymaga wydatku energetycznego. Należy tu zaznaczyć, że tą drogą, obok jonów i innych substancji drobnocząsteczkowych, zużywanych na potrzeby neuronu, mogą wnikać do jego wnętrza substancje mające charakter neurotoksyn. Warunkiem ich przedostania się do wnętrza neuronu jest to, aby wielkość ich cząsteczki była mniejsza od wielkości otworu kanału jonowego.

Drugi rodzaj transportu neuronalnego, transport aktywny, zużywa prawie połowę energii jaka powstaje w neuronie. W transport aktywny zaangażowane są enzymy transportujące, które wymagają dla swojego funkcjonowania dostarczenia energii chemicznej w postaci ATP. Głównym enzymem jest tu ATP-aza zależna od jonów magnezu. Enzym ten jest odpowiedzialny za transport jonów sodowych na zewnątrz neuronu i jonów potasowych do jego wnętrza. Utrzymanie właściwego gradientu obu tych jonów między wnętrzem komórki, a środowiskiem zewnętrznym jest koniecznym warunkiem prawidłowego funkcjonowania neuronów, a tym samym całego układu nerwowego. Neurotoksyny, które oddziałują hamująco na procesy związane z wytworzeniem energii magazynowanej w ATP lub hamują wykorzystanie tej energii przez ATP-azę w transporcie jonów sodowych i potasowych, powodują wystąpienie zakłóceń, a nawet zniesienie przewodzenia impulsów nerwowych. System transportowy ATP-azy obok specyficznych miejsc uchwytu dla jonów sodu i potasu, znajdujących się po zewnętrznej stronie błony komórkowej, ma również niespecyficzne miejsca wiążące dla jonów innych metali. Skutkiem tego drogą transportu aktywnego do wnętrza neuronu, obok jonów potasu, mogą się również dostać jony litu, talu, rubidu czy cezu, obecne w płynie pozakomórkowym. Duża koncentracja tych jonów wewnątrz neuronów może doprowadzić do wystąpienia w nich poważnych zaburzeń funkcjonalnych.

Transport jonów i innych substancji poprzez kanały jonowe oraz z udziałem enzymów transportujących zapewnia utrzymanie neuronów w dwóch podstawowych stanach czynnościowych: spoczynku i pobudzenia. Stan spoczynku odnosi się do stanu, kiedy do neuronu nie docierają informacje z sąsiednich komórek nerwowych i brak jest pobudzenia ze strony struktur recepcyjnych. Stan pobudzenia neuronu powstaje w momencie zadziałania określonego impulsu progowego,



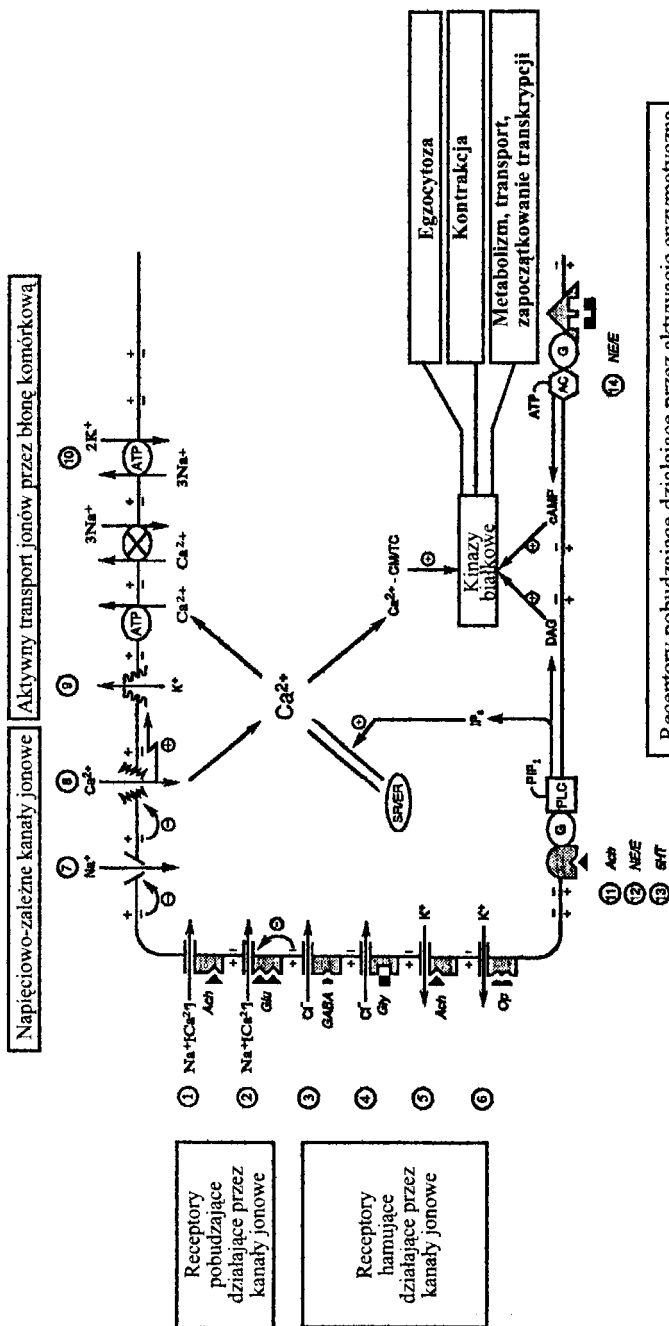
który uruchamia szereg zmian w obrębie błony komórkowej oraz w metabolizmie komórkowym. Skutkiem tych zmian jest wytworzenie określonego potencjału czynnościowego i nabycie przez neuron zdolności odbioru i przewodzenia oraz przekazywania impulsu nerwowego na sąsiednie komórki nerwowe oraz zakończenia efektorowe.

Przekazanie impulsu nerwowego z jednej komórki na drugą odbywa się w ściśle określonych miejscach, tworzących strukturę morfologiczną, zwaną synapsą. W wytworzeniu połączenia synaptycznego biorą udział fragmenty błony dwóch komórek: przekazującej impuls i komórki docelowej. Komórką przekazującą bodziec jest neuron, a przejmującą może być neuron lub inna komórka efektorowa, np. mięśniowa. Najczęściej w tworzeniu synapsy udział biorą aksony neuronu przekazującego impuls, a dokładniej ich końcowe rozgałęzienia i błona komórkowa różnych części komórki przyjmującej impuls, a zatem dendrytów, perykarionu i aksonu. W synapsie wyróżnia się część presynaptyczną i postsynaptyczną. Pierwsza jest częścią synapsy doprowadzającą impuls, druga - przyjmującą. Obie części oddzielone są szczeliną synaptyczną. W części presynaptycznej obecne są pęcherzyki, które są strukturami magazynującymi substancje przekazywające – neurotransmitery (np. acetylocholinę, adrenalinę, noradrenalinę, serotoninę). Neurotransmitery są odpowiedzialne za przenoszenie pobudzenia między dwoma komórkami i stanowią tzw. chemiczne ogniwo przewodzenia nerwowego. Cząsteczki neurotransmitera dyfundują przez szczelinę synaptyczną i reagują z właściwymi dla siebie receptorami w błonie postsynaptycznej. Reakcja neurotransmitera z receptorem powoduje wystąpienie przejściowej zmiany przepuszczalności błony postsynaptycznej. W wyniku tego następują przesunięcia jonowe. Jony sodu gromadzą się przy wewnętrznej stronie błony komórkowej części postsynaptycznej, natomiast jony potasowe na stronie zewnętrznej tej błony. Zachodzi więc odwrócenie potencjału błony, co jest podstawą powstawania impulsu. Zmiana potencjału elektrycznego w błonie postsynaptycznej powoduje, że jej część sąsiednia staje się bardziej przepuszczalna i powstaje w ten sposób fala depolaryzacyjna – czyli impuls nerwowy przenosi się wzdłuż włókna. Działanie cząsteczek neurotransmitera jest krótkotrwałe. Uwolniony przekazywacz szybko rozkładany jest w szczelinie synaptycznej przez enzymy, np. acetylocholina przez acetylocholinoesterazę, katecholaminy przez oksydazę monoaminową (MAO) lub metylotransferazę katecholową (COMT).



Mechanizmy wywoływania pobudzenia w komórkach przy udziale neurotransmiterów przedstawiono na ryc. 1. W wielu typach komórek, takich jak neurony, komórki mięśniowe czy komórki wydzielnicze występuje podobny mechanizm prowadzący do ich pobudzenia czynnościowego. Szybkie pobudzenie jest zapoczątkowane przez otwieranie się chemozależnych kanałów jonowych  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (oznaczenia 1, 2 na ryc. 1). Rezultatem tego jest napływ do wnętrza komórki ładunków dodatnich (tzn. powstanie stanu depolaryzacji). Konsekwencją tego jest otwarcie się napięciowozależnych kanałów dla jonów sodowych oraz wapniowych (oznaczenia 7, 8 na ryc. 1). Napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , spełniających funkcje drugiego przekaźnika, powoduje aktywację wewnątrzkomórkowych białek wiążących wapń, kalmoduliny (CM) i troponiny C (TC). Te z kolei aktywują proces fosforylacji białek odpowiedzialnych za określone zmiany w funkcjonowaniu komórki. Zakończenie stanu otwarcia kanałów jonowych oraz zahamowanie aktywności błonowych białek transportujących (oznaczenia 9, 10 na ryc. 1) ma miejsce w chwili wytworzenia się wewnątrz komórki ujemnego potencjału spoczynkowego (stanu repolaryzacji) i przywrócenia spoczynkowego poziomu jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Proces szybkiego pobudzenia może być hamowany przez otwarcie ligandoaktywowanych kanałów  $\text{Cl}^-$  lub  $\text{K}^+$  (oznaczenia 3–6 na ryc. 1), które powodują wzrost ładunków ujemnych wewnątrz komórki (tj. indukują hiperpolaryzację) i w ten sposób przeciwdziałają otwarciu się napięciowozależnych kanałów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  (7,8). Rola jonów  $\text{Ca}^{2+}$  jest szczególnie ważna z punktu widzenia ciągłości procesów metabolicznych, zachodzących we wszystkich komórkach pobudliwych, a zwłaszcza neuronach. Niedobór tego jonu może w znaczący sposób zakłócić proces przekazywania impulsów nerwowych w obrębie układu nerwowego. Podobną rolę jony  $\text{Ca}^{2+}$  odgrywają w komórkach mięśniowych (miocytach) oraz komórkach wydzielniczych (sekretocytach). Przekazywanie sygnałów z innych receptorów (oznaczenia 11–14 na ryc. 1) jest wolniejsze, ponieważ wymaga udziału enzymów w syntezie drugich przekaźników: 1,4,5-trifosforanu inozytolu (IP3) i diacyloglicerolu (DAG) przez fosfolipazę C (PLC) oraz cyklicznego AMP (cAMP) przez cyklazę adenilową. Te przekaźniki oddziałują na funkcje komórkowe przez bezpośrednią aktywację kinaz białkowych albo drogą pośrednią mobilizując jony  $\text{Ca}^{2+}$  z siateczki sarkoplazmatycznej lub endoplazmatycznej (SR lub ER).





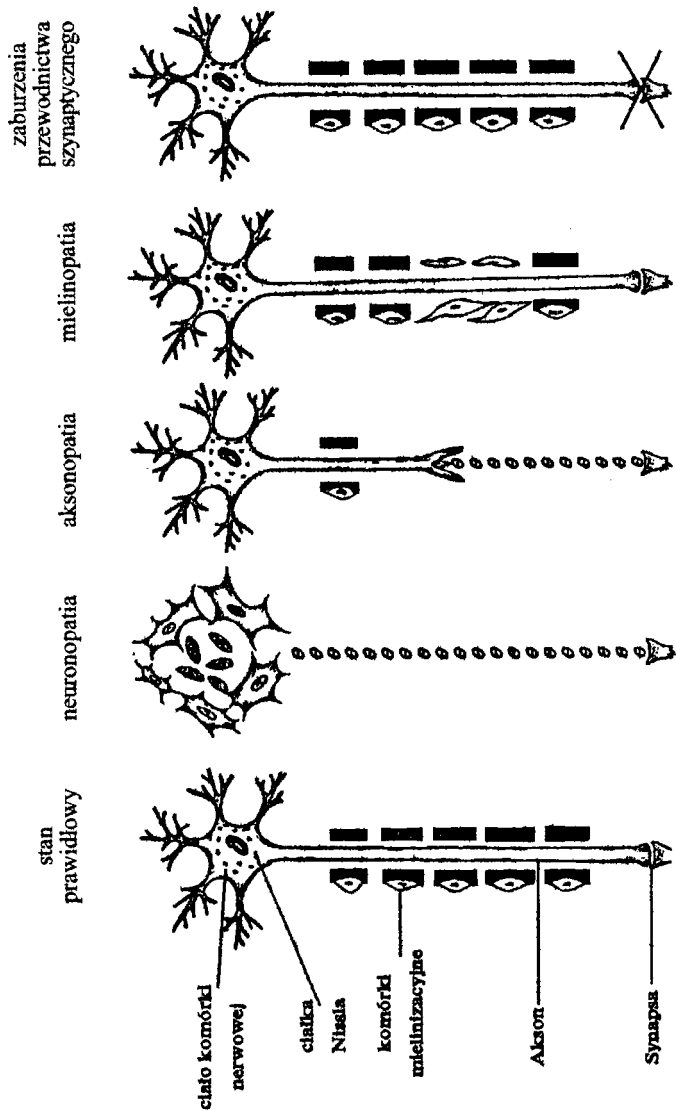
**Ryc. 1.** Mechanizmy wywoływania pobudzenia w komórkach przy udziale neurotransmiterów.

Ach - acetylcholina; Glu - glutamina; GABA - kwas  $\gamma$ -aminomasłowy; Gly - glicyna; Op - peptydy opioidowe; NE - norepinefryna; E - epinefryna; 5-HT - serotonina; G - białko G; PIP<sub>2</sub> - 4,5-difosforan-fosfatydyloinozytolu.

## Podatność neuronów na toksyny chemiczne

Neurony są wyjątkowo nietypowymi komórkami, ponieważ objętość ich wypustek cytoplazmatycznych jest często znacznie większa aniżeli objętość perykarionu (cytoplazma okołojądrowa neuronu). Na przykład, powierzchnia dendrytów może wynosić około 50%, aksonu około 45%, a ciała komórki tylko około 5% całej powierzchni neuronu. Taka budowa powoduje powstanie olbrzymiej powierzchni zwiększającej podatność neuronów na działanie czynników uszkodzających. Zwiększona podatność neuronu na uszkodzenia przez neurotoksyny wynika również i z tzw. niestosunku metabolicznego między perikarionem a wypustkami cytoplazmatycznymi. W perikarionie, mimo jego małych rozmiarów w porównaniu do wypustek cytoplazmatycznych, znajduje się prawie cały potencjał metaboliczny niezbędny dla utrzymania procesów życiowych neuronu. Niektóre perikariony, np. obwodowego neuronu ruchowego, muszą zaopatrzyć długi na około 1 m akson w substancje niezbędne do zachowania jego struktury i funkcji. Upośledzenie dowozu substancji koniecznych do podtrzymania czynności życiowych cytoplazmy na całej długości aksonu może być przyczyną uszkodzeń jego dystalnych odcinków w wielu przypadkach zatruc neurotoksycznych. Szereg neurotoksyn, np. deoksyrybicyna, wywołując zakłócenia w metabolizmie perikarionu, mogą doprowadzić do zwyrodnienia całego neuronu. Podobne zjawisko może zaistnieć w przypadku oddziaływania neurotoksyn na limfocyty (komórki mielinizujące) i ich wypustki cytoplazmatyczne, a także na osłonki mielinowe. Różne rodzaje uszkodzenia komórek nerwowych przez neurotoksyny przedstawiono na ryc. 2. Analizując uszkodzenia neuronów i komórek mielinizujących wywołane przez neurotoksyny stwierdzono, że rozdzielenie zmian wywołanych przez działanie samej neurotoksyny od tych związanych z reakcją komórki nerwowej na neurotoksynę jest często bardzo trudne. Dodatkowym utrudnieniem jest to, że rodzaj obserwowanych zmian zależy w znacznym stopniu od wielkości narażenia na neurotoksynę, a także pewnych uwarunkowań osobniczych. Te ostatnie mogą mieć charakter wrodzony (uwarunkowania genetyczne) lub mieć charakter nabyty, np. wynikający z wcześniejszych ekspozycji na czynniki neurotoksyczne lub przebyte choroby układu nerwowego.





Ryc. 2. Uszkodzenia komórek nerwowych powodowane przez neurotoksyny.

W komórkach nerwowych można generalnie wyróżnić dwa rodzaje pierwotnych zmian, powstających w wyniku działania neurotoksyn:

1) zwiększenie liczby (prolifracja), albo przemieszczenie elementów strukturalnych (np. filamentów, mikrotubuli) lub organelli komórkowych (np. mitochondriów, lizosomów) oraz/lub

2) częściowy lub całkowity rozpad komórek.

Po tym ostatnim stadium następuje zwykle proces odnowy (regeneracja), który może zachodzić również w obecności neurotoksyny. Zmiany mogą się pojawić w obrębie elementów komórkowych, w obrębie mózgowych naczyń krwionośnych, a także jako zmiany wtórne w obrębie innych układów i narządów, zwłaszcza mięśni poprzecznie prążkowanych.

Zakres reakcji komórek nerwowych na uszkadzające działanie neurotoksyn jest raczej ograniczony. To powoduje, że opierając się na znajomości biologii i funkcji tych komórek można przewidzieć, jakie będą konsekwencje ich narażenia na określone neurotoksyny. W układzie nerwowym, podobnie jak w innych układach naszego organizmu, występuje wzajemne powiązanie strukturalne i funkcjonalne tworzących ten układ komórek. Skutkiem tego powstanie zmiany lub zmian toksycznych w jednym typie komórek, bezpośrednio narażonych na neurotoksynę, prowadzi zazwyczaj do wystąpienia zmian w innych typach komórek, powiązanych funkcjonalnie z tymi pierwszymi. To z kolei może doprowadzić do wystąpienia zmian w kolejnych zespołach komórkowych. W efekcie mamy do czynienia z kaskadowo rozwijającą się reakcją na działanie czynnika neurotoksycznego w układzie nerwowym. Śledzenie skutków neurotoksycznych wywołanych taką reakcją utrudnia w wielu wypadkach zjawisko wystąpienia pierwotnych zmian toksycznych w kilku miejscach układu nerwowego. Rozmiar tego zjawiska może ulegać nasileniu wraz z przedłużającym się okresem działania czynnika neurotoksycznego oraz zwiększaniem się dawki tego czynnika.

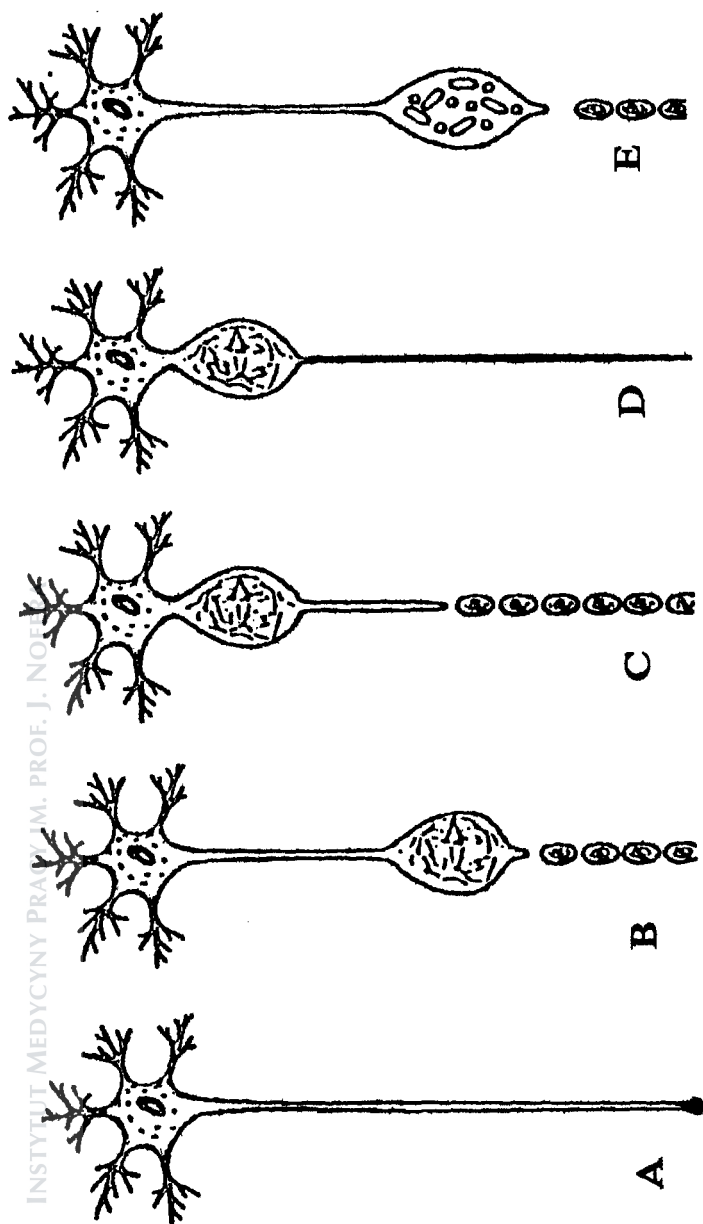
Zniszczenie perikarionu (nuropatia) jest zjawiskiem nieodwracalnym, obserwowanym w wielu rodzajach zatruc. Następstwa rozpadu perikarionu pojawiające się w obwodowym jak i w ośrodkowym układzie nerwowym są bardzo podobne. Wokół ginącej komórki gromadzą się makrofagi i komórki glejowe, zaś sam akson ulega zmianom zwyrodnieniowym. Rozpadowi ulega włókno na całej długości. Oślonka mielinowa ulega rozpuszczeniu i zostaje usunięta. Należy tu zauważyć,

że proces rozpadu i usuwania mieliny zachodzi wolniej w ośrodkowym układzie nerwowym niż obwodowym. Przestrzeń wytwarzająca się po zwyrodniałych włóknach wypełnia się astrocytami, które pojawiają się w zwiększonej ilości i, co jest charakterystyczne, mają większe wymiary niż normalnie. Proces zwyrodnienia aksonów doprowadza również do pojawienia się zmian o charakterze wtórnym w odnerwionych komórkach efektorów, np. mięśni (zanik neurogenny), lub w innych neuronach (zwyrodnienie transsynaptyczne i wsteczne zwyrodnienie transsynaptyczne). Przykłady aksonopatii powodowanych przez różne neurotoksyne przedstawiono na ryc. 3.

W niektórych rodzajach zatruc, zwłaszcza takich, które prowadzą do strukturalnych zmian wypustek komórkowych, neurony mogą przetrwać, a nawet po pewnym czasie może dojść do przywrócenia utraconych funkcji. Zmiany toksyczne o charakterze zwyrodnieniowym obserwowane w aksonach mogą mieć postać uogólnionego zaniku lub ogniskowych zmian obrzmieniowych. W ogniskach obrzmieniowych obserwuje się nadmierną liczbę elementów strukturalnych lub organelli komórkowych z towarzyszącymi temu zmianami wtórnymi w obrębie osłonek mieliniowych. Te ostatnie łączą się z wystąpieniem sfałdowań oraz przemieszczeń osłonek. Zjawisko to określa się jako wtórną demielinizację. Przerwanie ciągłości aksonu prowadzi do jego zaniku i/lub zwyrodnienia (aksonopatii). Występuje ono poniżej miejsca uszkodzenia i prowadzi do wystąpienia wtórnych zmian degeneracyjnych w unerwianych przez dany akson komórkach. Mogą nimi być komórki mięśni lub neurony. W tych warunkach oligodendrocyty i komórki Schwanna tracą zdolność do wytwarzania mieliny i zaczynają się dzielić. Pozostałości mieliny zostają usunięte przez komórki fagocytarne. Uszkodzeniu aksonów mogą czasem towarzyszyć zmiany zwyrodnieniowe w perikarionie. Rozpad komórki występuje jednak stosunkowo rzadko. Częściej dochodzi do przeorganizowania się składników komórkowych (chromatoliza), co doprowadza do zapoczątkowania procesu odnowy aksonu. Proces odnowy zaczyna się prawie natychmiast po uszkodzeniu przez neurotoksynę w miejscu jego przerwania. W układzie obwodowym wydłużające się w wyniku regeneracji wypustki łączą się z komórkami Schwanna, które wytwarzają osłonkę mielinową i kierują regenerujący akson do właściwego dla niego narządu docelowego, tj. do mięśnia lub narządu zmysłu.







Ryc. 3. Aksonopatie spowodowane przez różne neurotoksyny.

A - komórka z prawidłowym aksonem,  
 B - zmiany w aksonie spowodowane przez 2,5-heksandion,  
 C - zmiany w aksonie spowodowane przez 3,4-dimetylo-2,5-heksandion,  
 D - zmiany w aksonie spowodowane przez b, b' - imino-dipropiononitryl,  
 E - zmiany w aksonie spowodowane przez tionopirydynę.

W ośrodkowym układzie nerwowym reakcja astrocytów na działanie uszkodzające polega na zwiększeniu ich liczby oraz powiększeniu wypustek włóknistych. Wystąpienie takiego zjawiska zdaje się główną przyczyną hamowania regeneracji uszkodzonych aksonów w ośrodkowym układzie nerwowym.

Zaburzenia funkcjonalne neuronów wywołane przez substancje neurotoksyczne mogą być skutkiem: (1) zmian w stężeniu neurotransmiterów, (2) zmian w funkcji receptorów, (3) zmian w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu sygnału pobudzenia lub (4) zakłóceń w procesie terminacji sygnału pobudzenia.

**Zmiany stężenia neurotransmiterów.** Neurotoksyny chemiczne mogą zmieniać stężenie neurotransmiterów w synapsach neuronalnych poprzez zakłócanie procesu ich syntezy, przechowywanie, uwalnianie z synaps oraz eliminację z sąsiedztwa receptorów. Drgawki powodowane przez hydrazydy są wynikiem obniżenia syntezy kwasu gamma aminomasłowego (GABA). Wystąpienie niedoboru noradrenaliny, 5-hydroksytryptaminy i dopaminy spowodowane przez rezerpinę jest główną przyczyną występowania szkodliwych objawów ze strony układu nerwowego. Paraliż mięśni szkieletowych powodowany przez toksynę botulinową wynika z zahamowania uwalniania acetylocholino z neuronów motorycznych. Z kolei zahamowanie acetylocholinoestrazy przez insektycydy fosforoorganiczne i karbaminianowe, czy niektóre gazy bojowe, np. soman, zapobiega hydrolizie acetylocholino i prowadzi do masywnej stymulacji receptorów cholinergicznym oraz wystąpienia przesilenia cholinergicznego. Zahamowanie w neuronach zwrotnego pobierania noradrenaliny przez kokainę lub cykliczne antydepresanty jest odpowiedzialne za nadekspresję receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych obecnych w mięśniach gładkich naczyń, prowadząc do wystąpienia owrzodzenia śluzówki nosa oraz zawału serca u osób nałogowo nadużywających te leki. Z kolei nadstymulacja  $\beta_1$ -adrenergicznych receptorów sprzyja wystąpieniu zagrażających życiu arytmii. Podobne komplikacje ze strony serca mogą wystąpić po przedawkowaniu amfetaminy, ponieważ ta substancja zwiększa uwalnianie noradrenaliny z neuronów adrenergicznych i kompetytywnie hamuje neuronalne zwrotne pobieranie tego neurotransmitera. Kryzys nadciśnieniowy może się pojawić przy połączonym użyciu trójcyklicznych antydepresantów i inhibitorów monoaminooksydazy, leków blokujących różne mechanizmy związane z eliminacją noradrenaliny.



**Zmiany funkcjonalne receptorów.** Niektóre substancje chemiczne reagują bezpośrednio z receptorami neuronalnymi, wywierając działanie: (1) agonistyczne przez przyłączenie się do miejsca wiążącego w receptorze i naśladowania naturalnego ligandu, (2) antagonistyczne przez przyłączenie się do miejsca wiążącego ligand, ale nie powodując aktywacji receptora, (3) aktywujące lub (4) inhibitorowe przyłączając się do miejsca w receptorze, które nie uczestniczy w wiązaniu naturalnego ligandu. W nieobecności innych oddziaływań, działanie agonistyczne i aktywujące naśladuje fizjologiczną odpowiedź charakterystyczną dla endogennego liganda, podczas gdy antagonistyczne i inhibitorowe blokuje tę odpowiedź. Muscimol np. trująca grzybowa, jest agonistą dla inhibitorowego receptora GABA<sub>A</sub>. Z kolei barbiturany, benzodiazepiny i etanol są aktywatorami. Wszystkie te substancje powodują zahamowanie aktywności ośrodkowego systemu nerwowego, prowadząc do uspokojenia, ogólnego znieczulenia, śpiączki i blokowania ośrodka oddechowego, zależnie od wielkości przyjętej dawki.

**Zmiany w przekazywaniu sygnału pobudzenia.** Szereg substancji chemicznych zmienia aktywność neuronów przez oddziaływanie na zachodzące w nich procesy związane z wewnątrzkomórkowym przekazywaniem sygnału pobudzenia. Napięciozależne kanały sodowe, które przekazują i wzmacniają sygnały pobudzenia wytworzone przez ligandozależne kanały kationowe, są aktywowane przez substancje toksyczne pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, a także substancje pochodzenia syntetycznego, takie jak DDT. Skutkiem tej aktywacji jest wystąpienie zjawiska nadpobudzenia neuronów. W przeciwieństwie substancje chemiczne, które blokują napięciozależne kanały sodowe (takie jak tetrodotoksyna i saksitoksyna) powodują porażenie funkcji neuronów. Kanały sodowe odgrywają również ważną rolę w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału pobudzenia w neuronach czuciowych. Aktywatory dla tych kanałów wywołują wystąpienie sensacji i dodatkowych odruchów, podczas gdy inhibitory kanałów jonowych powodują wystąpienie objawów znieczulenia. To wyjaśnia wystąpienie objawów bradykardii po spożyciu tojadu, który zawiera akonitynę, będącą aktywatorem kanału sodowego oraz lokalnego znieczulenia po podaniu prokainy lub lidokainy, będących inhibitorami kanału sodowego.

**Zakłócenia procesu terminacji sygnału pobudzenia.** Pobudzenie generowane w neuronie przez napływ kationów zostaje zakończone przez usunięcie tych kationów z wnętrza neuronu z udziałem

blonowych kanałów jonowych lub nośników białkowych. Zahamowanie eksportu kationów z neuronu prowadzi do przedłużenia stanu jego pobudzenia. Zjawisko takie może wystąpić w zatruciu jonami baru, które powodują zahamowania aktywowanych przez jony  $\text{Ca}^{2+}$  kanałów potasowych. Towarzyszy temu wystąpienie potencjalnie letalnej nadpobudliwości i efektów spazmogennych. Glikozydy, np. z digitalis, hamują aktywność  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy. Skutkiem tego jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $\text{Na}^+$ , powodujący obniżenie eksportu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  na drodze wymiany  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ . Występuje wówczas wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i przedłużenie pobudzenia neuronów. Uważa się, że zahamowanie mózgowej  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy przez chlorodekon może być odpowiedzialne za występowanie objawów drgawkowych u osób pracujących w narażeniu na ten związek. Sole litu, jakkolwiek są stosowane w celach leczniczych, mogą nasilać wystąpienie objawów drgawkowych, powodować skurcze mięśniowe, biegunkę, arytmie serca. Podawanie soli litu powoduje również nasilenie objawów chorobowych, powodowanych zaburzeniami w nerwowej mediacji cholinergiczej. Możliwą przyczyną tych toksycznych oddziaływań litu jest występowanie w jego obecności niewystarczającej repolaryzacji neuronów (a także komórek mięśni). Jony  $\text{Li}^+$  jakkolwiek łatwo wnikają do tych komórek przez kanały sodowe, biorące udział w procesie repolaryzacji, to nie są jednak substratem dla pompy sodowo-potasowej. Ponadto, neurony tracą swoją zdolność do repolaryzacji, jeśli wewnątrzkomórkowe jony  $\text{Na}^+$  zostają zastąpione przez jony  $\text{Li}^+$ .

Uważa się, że zaburzenia w sprawnym funkcjonowaniu pompy sodowo-potasowej spowodowane zatruciem cyjankami, czy substancjami chemicznymi, które prowadzą do hipoglikemii i hipoksji, mogą doprowadzić do uszkodzenia neuronów. Należy w tym miejscu zauważyć, że nie mniej niż 70% ATP wytwarzanego przez neurony jest zużywane na podtrzymanie funkcjonowania pompy sodowo-potasowej. Z tego powodu zahamowanie lub przerwy w syntezie ATP, prowadzące do zubożenia puli komórkowego ATP, zakłócają lub znoszą proces repolaryzacji w neuronie. Indukowane przez depolaryzację uwalnianie neurotransmiterów, np. glutamianu, z neuronów mających niedobór ATP, może być odpowiedzialne za objawy neurologiczne, jakie towarzyszą hipoksji. Uszkodzenie neuronów i pogłębienie niedoboru ATP może się nasilać w wyniku neurotoksycznego oddziaływania nagromadzonego glutamianu.

## Mechanizmy toksycznej martwicy neuronów

Neurony należą do komórek wysoce zależnych od metabolizmu tlenowego. Energia wytwarzana w procesie przemian tlenowych substratów energetycznych w znacznej swej części jest zużywana na podtrzymanie odpowiedniego gradientu stężenia jonów między środowiskiem wewnętrznym i zewnętrznym. Depolaryzacja i repolaryzacja błony występuje z taką częstością, że wymaga ona dostarczenia bardzo dużych ilości wysokoenergetycznych fosforanów (ATP), w tym także w okresie spoczynkowym. Energia chemiczna potrzebna dla podtrzymania różnych funkcji neuronu jest uwalniana w czasie hydrolizy ATP do ADP lub AMP. ADP ulega refosforylacji z udziałem mitochondrialnej syntazy ATP. Złożony proces tworzenia wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych w czasie utleniania wodoru do wody, nazywany oksydacyjną fosforylacją, wymaga obok syntazy ATP, dostarczenia: (1) wodoru w postaci zredukowanych kofaktorów do kompleksu enzymatycznego transportującego elektrony (łańcuch transportu elektronów), dostarczenia (2) tlenu cząsteczkowego ( $O_2$ ) do końcowego fragmentu łańcucha transportującego elektrony, (3) ADP i fosforanu nieorganicznego dla syntazy ATP oraz (4) powrotu protonów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną do matriks mitochondrialnej, co przez zmianę gradientu elektrochemicznego uruchamia syntazę ATP. Znane jest wiele substancji chemicznych (neurotoksyn), które powodują zakłócenia w procesie mitochondrialnej syntezy ATP i upośledzają lub znoszą aktywność funkcjonalną neuronów, prowadząc do ich śmierci. Substancje te można podzielić na cztery grupy. Grupa pierwsza obejmuje neurotoksyny, które interferują w proces dostarczania wodoru do łańcucha transportu elektronów. Kwas fluorooctowy powoduje np. zahamowanie cyklu kwasu cytrynianowego i wytwarzania zredukowanych kofaktorów. W grupie drugiej można wyróżnić neurotoksyny, takie jak np. rotenon lub cyjanki, które hamują przeniesienie elektronów wzdłuż łańcucha transportującego elektrony na tlen. Trzecia grupa obejmuje te neurotoksyny, które zakłócają proces dostarczania  $O_2$  do terminalnej części łańcucha transportu elektronów, do oksydazy cytochromowej. W czwartej grupie są te neurotoksyny, które zmniejszają pulę komórkowego ATP na drodze hamowania aktywności syntazy ATP, kluczowego enzymu dla fosforylacji oksydacyjnej. Zahamowanie



aktywności syntazy może być spowodowane przez bezpośrednie inhibitory oddziaływanie na enzym, zakłócenia w dostarczaniu substratów ADP i fosforanów nieorganicznych, a także pozbawieniem syntazy siły napędowej, pochodzącej z kontrolowanego napływu protonów do matriks mitochondrialnej. Niezwykle ważną konsekwencją zaburzeń energetycznych w neuronach są zmiany w precyzyjnie kontrolowanym rozmieszczeniu wewnątrzkomórkowym jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . 10 000-krotne różnicowanie między stężeniem pozakomórkowym jonów  $\text{Ca}^{2+}$  a ich stężeniem w cytosolu neuronów jest utrzymywane dzięki nieprzepuszczalności błony plazmatycznej dla  $\text{Ca}^{2+}$  oraz dzięki obecności mechanizmów transportowych, usuwających jony wapniowe z cytoplazmy.  $\text{Ca}^{2+}$  jest aktywnie pompowany z cytosolu do przestrzeni pozakomórkowej oraz zatrzymywany w retikulum endoplazmatycznym oraz mitochondriach. Mitochondria dysponują nośnikiem białkowym o niskiej specyficzności w stosunku do jonów wapniowych i dlatego odgrywają one znaczącą rolę w zatrzymywaniu  $\text{Ca}^{2+}$  tylko wtedy kiedy ich stężenie w cytoplazmie wzrasta w skali mikromolarnej. W takich warunkach duże ilości  $\text{Ca}^{2+}$  gromadzą się w mitochondriach, odkładane jako fosforany wapnia. Neurotoksyny mogą indukować zwiększenie stężenia cytoplazmatycznego  $\text{Ca}^{2+}$  przez ułatwianie napływu do cytoplazmy lub hamowanie ich wypływu z tego przedziału komórkowego. Otwarcie ligandolub elektrozależnych kanałów wapniowych, a także uszkodzenia błony plazmatycznej, powodują obniżenie gradientu stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  między płynem pozakomórkowym i cytoplazmą. Neurotoksyny mogą również zwiększać stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  na drodze powodowania zwiększonej ucieczki tych jonów z mitochondriów. Mogą także zmniejszać wypływ  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplazmy, działając hamująco na enzymatyczne systemy transportowe (pompa wapniowa). Utrzymujące się zwiększone wewnątrzkomórkowe stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  jest szkodliwe dla neuronów, ponieważ prowadzi ono do pogłębienia deficytu rezerwy energetycznej, wystąpienia dysfunkcji mikrofilamentów oraz aktywacji enzymów hydrolitycznych. To w konsekwencji prowadzi do wystąpienia chaosu strukturalnego i metabolicznego w neuronie i jego śmierci. Wyróżnić można trzy mechanizmy, za pośrednictwem których zwiększenie stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w neuronach przez neurotoksyny może wywierać niekorzystny wpływ na ich równowagę energetyczną. Pierwszy z nich łączy się z tym, że wysokie stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie przyczynia się do zwiększonego pobierania tych jonów przez mitochondria za pośrednictwem systemu

transportującego, który podobnie jak ATP syntaza, wykorzystuje jako siłę napędową ujemny potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej. W efekcie tego napływ  $\text{Ca}^{2+}$  do mitochondriów i obniżenie ujemnego potencjału błony prowadzi do obniżenia w nich syntezy ATP. W niektórych przypadkach indukowana przez jony  $\text{Ca}^{2+}$  deenergizacja mitochondriów może mieć charakter cykliczny, z systematycznie powtarzającym się na przemian uwalnianiem i napływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do mitochondriów. Cykl taki zostaje zapoczątkowany przez zwiększony eksport jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z mitochondriów, co występuje w odpowiedzi na czynniki neurotoksyczne, mające właściwość utleniania mitochondrialnego NADH (np. alloksan, N-acetylo-p-benzochinonoimina, gliotoksyna, 1-metylo-4-fenylopirolidyna). Uruchomienie takiego cyklu może wystąpić również wtedy, kiedy neurotoksyna powoduje aktywację procesów transportujących związanych z wyprowadzeniem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z matriks mitochondrialnej.

Spowodowany działaniem neurotoksyn wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  może przyczynić się do wystąpienia niedoborów energetycznych w neuronach przez powodowanie oksydacyjnych uszkodzeń błony wewnętrznej mitochondriów, będących skutkiem aktywacji mitochondrialnych dehydrogenaz. Zwiększony napływ jonów wodorowych z cyklu cytrynianowego stymuluje przepływ elektronów przez łańcuch transportu elektronów i prowadzi do powstania rodników tlenowych, które uszkadzają błonę wewnętrzną mitochondrium i zakłócają proces oksydacyjnej fosforylacji.

Wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie prowadzi nie tylko do uszkodzenia procesów związanych z syntezą ATP, ale doprowadza również do zwiększonego zużycia tego wysoce energetycznego fosforanu przez  $\text{Ca}^{2+}$ -zależne ATPazy usuwające nadmiar tych jonów z cytoplazmy. Tak więc niedobór komórkowego ATP, który pierwotnie mógł być spowodowany hiperkalcemią wewnątrzkomórkową, może w wyniku dalszych oddziaływań czynnika neurotoksycznego na neurony doprowadzić do dalszego wzrostu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie tych komórek, ponieważ ich usuwanie jest ATP-zależne. Wystąpienie niedoboru ATP jak i wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie neuronów są ściśle ze sobą wzajemnie powiązane i prowadzą do powstania błędnego koła, które jeśli nie zostanie przerwane doprowadza do śmierci neuronu.

Drugi mechanizm, przez który niekontrolowany wzrost stężenia cytoplazmatycznego  $\text{Ca}^{2+}$  może doprowadzić do uszkodzenia i śmierci





neuronów jest związany z oddziaływaniem tych jonów na mikrofilamenty. Są to struktury białkowe, zorganizowane w formie cienkich nici cytoplazmatycznych (filamentów) i stanowią stosunkowo dynamiczny element składowy szkieletu wewnętrznego neuronu, łączący się z aktywno-podobnymi białkami błony plazmatycznej. Wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie neuronów powoduje dysocjację aktynowych filamentów od  $\alpha$ -aktyny i fodryny, białek ułatwiających zaczepienie się filamentów na błonie plazmatycznej. Wystąpienie tego zjawiska przyczynia się do powstania zmian strukturalnych w błonie plazmatycznej (pojawienie się pęcherzyków), które prowadzą do przerywania jej ciągłości.

Trzeci mechanizm za pośrednictwem którego wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie wywiera swoje szkodliwe oddziaływania na neurony jest związany z aktywacją enzymów hydrolitycznych, degradujących białka, fosfolipidy i kwasy nukleinowe. Białka, stanowiące integralną część błony plazmatycznej neuronów stają się miejscem docelowego działania  $\text{Ca}^{2+}$ -aktywowanych proteaz lub kalpain. Hydroлиза wiążących aktynę białek przez kalpains może również doprowadzić do powstania pęcherzy na błonie plazmatycznej neuronu, które mogą powodować jej rozerwani. Uważa się, że proteazy aktywowane jonami  $\text{Ca}^{2+}$  przekształcają dehydrogenazę ksantynową w oksydazę ksantynową. Ten enzym powoduje tworzenie w czasie reakcji utleniania produktów ubocznych, takich jak aktywne rodniki tlenowe i kwas mrówkowy. Substancje te przyczyniają się do uszkodzenia neuronu. Kalpains także aktywują na drodze proteolitycznej białkową kinazę C. Uogólniona aktywacja fosfolipaz przez jony  $\text{Ca}^{2+}$  doprowadza do rozpadu błon plazmatycznych neuronów zarówno przez bezpośrednie zmiany w strukturze tych błon, jak również przez powodowanie powstania substancji detergentowych, np. lizolecytyn. Aktywacja  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  – zależnej endonukleazy doprowadza do fragmentacji chromatyny i pojawienia się oligonukleosomów. Skutkiem tego zawarty w nukleosomach DNA (tzw. internukleosomalny DNA) staje się podatny na działanie enzymów nukleolitycznych. Topoizomeraza, która powoduje rozwinięcie hiperhelikalnej struktury DNA jest także pod wpływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Wzrost ich stężenia blokuje normalne funkcjonowanie tego enzymu.  $\text{Ca}^{2+}$  zależną fragmentację nukleosomów obserwowano w czasie kontrolowanej śmierci komórek (apoptozy) indukowanej przez TCDD.





Niezależnie od rodzaju czynnika neurotoksycznego mechanizm toksycznej śmierci neuronów jest podobny. Neurotoksyna doprowadza do wystąpienia wewnątrzkomórkowej hiperkalcemii oraz do zaburzenia szeregu procesów komórkowych, które są konieczne do utrzymania strukturalnej i funkcjonalnej integralności neuronów. Jeśli nie zostaną uruchomione mechanizmy kompensacyjne i nie zostanie przywrócona równowaga w wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu jonów wapnia dochodzi do martwicy neuronów.

Inną drogą eliminacji uszkodzonych przez neurotoksyny komórek nerwowych jest ich usuwanie za pośrednictwem procesu apoptozy. Apoptoza i martwica komórek nerwowych są dwiema postaciami śmierci komórkowej, które różnią się zasadniczo zarówno przebiegiem zmian o charakterze morfologicznym i funkcjonalnym, a także mechanizmami, które doprowadzają do ich śmierci. Należy ściśle rozgraniczyć pojęcie apoptozy, czyli śmierci fizjologicznej, która jest procesem aktywnym, związanym z indukcją genów i sekwencją pewnych wydarzeń biochemicznych od nekrozy, czyli martwicy, która zachodzi biernie pod wpływem różnorodnych czynników zewnętrznych (chemicznych, fizycznych, biologicznych), prowadzących do natychmiastowego uszkodzenia struktur komórki: błony komórkowej, organelli i jądra oraz zawartego w nim materiału genetycznego. Proces nekrozy trwa zwykle około kilku minut, a zawartość obumarłej komórki wydostaje się na zewnątrz, do tkanki, powodując rozwój reakcji zapalnej. Martwica obejmuje zwykle duże grupy komórek nerwowych – całe fragmenty tkanki nerwowej, tymczasem apoptoza często dotyczy pojedynczych komórek. W jej przebiegu na skutek dehydratacji (utrata 30–50% wody w ciągu kilku minut) dochodzi do znacznego zmniejszenia objętości komórki. Znikają te elementy komórkowe, za pośrednictwem których komórka nerwowa utrzymywała kontakt z innymi komórkami. Przez pewien czas pozostaje jednak zachowana ciągłość błony komórkowej, podobnie jak struktura organelli wewnątrzkomórkowych (głównie mitochondriów). Istotne zmiany zachodzą natomiast w obrębie jądra komórkowego. Chromatyna ulega kondensacji, a jąderka rozpadają się. Opisane procesy prowadzą do powstania błoniastych struktur zwanych ciałkami apoptotycznymi. Makrofagi oraz sąsiadujące komórki pochłaniają i trawią te błoniaste struktury bez uwalniania czynników proteolitycznych – stąd brak odczynu zapalnego tak charakterystycznego dla martwicy. Natychmiastowa fa-

gocytoza ciałek apoptotycznych związana jest z obecnością na ich powierzchni pewnych struktur cząsteczkowych rozpoznawanych przez komórki żerne (witronektyna, fosfatydyloseryna).

Na temat mechanizmu wyzwalającego proces apoptozy w komórkach nerwowych posiadamy stosunkowo mało informacji. Uważa się, że zasadniczą przyczyną wyzwalającą ten proces jest uszkodzenie przez czynnik toksyczny DNA. Uszkodzenie DNA, jeśli nie zostanie usunięte przez enzymy naprawcze, powoduje aktywację endonukleazy. Endonukleaza katalizuje hydrolizę cząsteczki DNA w internukleosomalnych regionach wiążących chromatyny jądrowej, prowadząc do powstania multimerów złożonych ze 180 par zasad. Rozpad chromatyny jądrowej i w dalszej kolejności struktur cytoplazmatycznych, jako skutek uaktywnienia enzymów nukleolitycznych i proteolitycznych, doprowadza do fragmentaryzacji komórki. Jednym ze zjawisk, które mogą uruchomić proces apoptozy na drodze aktywacji endonukleazy jest utrzymujący się wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{2+}$ .

W procesie programowanej śmierci komórek nerwowych wyróżnić można dwa punkty krytyczne, w których ważą się dalsze losy tych komórek. Pierwszy, kiedy pod wpływem działających bodźców pro- i antyapoptycznych komórka generuje sygnał wyzwalający mechanizmy prowadzące do śmierci lub też do ochrony przed nią. Ten etap jest kontrolowany przez białko p53 oraz białka należące do rodziny Bcl-2/Bax. Białko p53 – produkt genu p53 – jest nazywane „strażnikiem genomu” i jest jednym z najważniejszych czynników nadzorujących prawidłowy przebieg cyklu komórkowego. Odpowiedzią na uszkodzenie DNA komórek nerwowych, np. utworzenie adduktów, które nie zostaną usunięte przez procesy naprawcze, jest stymulacja syntezy białka p53 i uruchomienie przez to białko mechanizmów prowadzących do dezintegracji komórki. Białko Bcl-2 hamuje apoptozę, zatem blokuje rozpoczęty już proces samobójczej śmierci komórki.

Drugi punkt krytyczny, po przejściu którego apoptoza staje się już procesem nieodwracalnym, jest związany z działaniem proteaz cysteinowych (kaspaz) i serynowych (granzymy A i B). Uruchomienie kaskady proteolitycznej, w której, poza wymienionymi, uczestniczy wiele innych enzymów (kalpaina, endonukleazy) prowadzi do zmiany właściwości i struktury szeregu białek biologicznych w cytoplazmie, a przede wszystkim w jądrze, gdzie dochodzi do fragmentacji DNA.



Złożoność strukturalna i funkcjonalna systemu nerwowego sprawia, że monitoring biologiczny oddziaływań neu-

## BIOMARKERY NEUROTOKSYCZNOŚCI

rotoksycznych powodowanych przez chemikalia środowiskowe obejmuje bardzo szeroki zakres pomiarów od zmian na poziomie molekularnym, subkomórkowym i komórkowym do zmian neurofizjologicznych i neurobehawioralnych. Przez szereg lat w badaniach epidemiologicznych do oceny ekspozycji i skutków neurotoksycznych posługiwano się prawie wyłącznie testami neurofizjologicznymi i neurobehawioralnymi. Dopiero w ostatnich latach, dzięki istotnym postępom w doświadczalnej toksykologii biochemicznej, co łączyło się z wykryciem celów molekularnych dla neurotoksyn oraz wyjaśnieniem mechanizmów ich działania, stało się możliwe wprowadzenie do neuroepidemiologii testów biochemicznych – **biochemicznych markerów (biomarkerów) ekspozycji, skutków i wrażliwości**.

**Biomarkery ekspozycji** są wskaźnikami wchłoniętej dawki określając ilościowo wchłoniętą neurotoksynę (lub jej metabolity) względnie produkty interakcji z substancjami endogennymi, np. z DNA lub białkami enzymatycznymi.

**Biomakery skutków** dostarczają informacji o zmianach w układzie nerwowym, które dokonały się w wyniku określonej ekspozycji na czynnik neurotoksyczny, na różnych poziomach jego organizacji: narządowej, tkanowej, komórkowej, subkomórkowej oraz molekularnej.

**Biomarkery wrażliwości** informują o tym, czy w przypadku określonej osoby lub populacji należy oczekiwać wystąpienia skutków zdrowotnych w układzie nerwowym przy niższej bądź też wyższej ekspozycji na czynnik neurotoksyczny. Mogą one być przydatne dla określenia prawdopodobieństwa rozwinienia się choroby w układzie nerwowym w wyniku ekspozycji na neurotoksyny środowiskowe. Są mierzalnymi wskaźnikami tych czynników biologicznych układu nerwowego, które występują przed ekspozycją i mają swoje uwarunkowanie genetyczne albo mają charakter cech nabytych. Te ostatnie mogą być skutkiem przebytych wcześniej chorób układu nerwowego lub wcześniejszych ekspozycji na czynniki neurotoksyczne.



Jedną z najważniejszych przyczyn, która ograniczała i nadal ogranicza wprowadzenie monitoringu oddziaływań neurotoksycznych z użyciem biochemicznych biomarkerów, to niedostępność do bezpośrednich badań tkanki docelowej jaką jest tkanka nerwowa.

Powstała w związku z tym konieczność wykorzystania dla identyfikacji i charakterystyki zjawisk neurotoksycznych tych biomarkerów, które występują w łatwo dostępnych tkankach obwodowych i mogą być reprezentatywne dla takich samych parametrów obecnych w tkance nerwowej. Ustalono, że w elementach morfotycznych krwi obwodowej (płytkach, leukocytach, erytrocytach) obecne są markery biochemiczne mogące być mierzalnymi, zastępczymi wskaźnikami uszkodzeń, dysfunkcji i interakcji, powodowanych przez neurotoksyny środowiskowe w układzie nerwowym.

Oceniając przydatność biochemicznych biomarkerów w badaniach układu nerwowego, trzeba uwzględnić pewne właściwości, które ten układ cechują. Najważniejsze z nich to: (a) niemożność wykonania nieurazowego, bezpośredniego badania tego układu jako skutku izolacji od otoczenia przez powłoki skórne i kości; (b) nie występowanie w układzie nerwowym naczyń limfatycznych; (c) współistnienie w układzie nerwowym trzech różnych środowisk płynnych, a mianowicie krwi, płynu międzykomórkowego i płynu mózgowo-rdzeniowego jest odmienne od tego, jakie spotyka się w innych tkankach i narządach; (d) bariera krew - mózg utworzona przez zespół błon komórek nabłonka naczyniowego, łącznie z ich stykami międzykomórkowymi i błonami komórek gleju astrocytarnego, wybiórczo przepuszcza substancje z naczyń krwionośnych do tkanki nerwowej; (e) obecność w komórkach tkanki nerwowej dużej ilości lipidów.

Mimo znaczącego postępu w stosowaniu biochemicznych markerów w neurotoksykologii wydaje się, że postęp ten jest zdecydowanie wolniejszy niż w innych dziedzinach toksykologii, zajmujących się monitoringiem środowiskowym. Tym niemniej można już obecnie zaobserwować, że największe zainteresowanie neurotoksykologów środowiskowych wzbudzają te markery biochemiczne, które odzwierciedlają wczesne, subkliniczne stadia uszkodzeń układu nerwowego i wyprzedzają w czasie wystąpienie nieodwracalnego uszkodzenia komórek nerwowych.

Zjawiska prowadzące do ujawnienia się skutków neurotoksycznych i w dalszej kolejności do nieodwracalnych zmian w układzie



nerwowym można podzielić na kilka faz. Pierwsza z nich odpowiada penetracji neurotoksyny do organizmu i jej przemieszczania się do docelowych komórek nerwowych. W drugiej fazie występuje interakcja neurotoksyny z krytycznymi celami w komórkach nerwowych. W fazie trzeciej dochodzi do indukcji zmian biochemicznych w tych komórkach i uszkodzeń funkcjonalnych w systemie nerwowym. Uszkodzenia neurotoksyczne zaczynające się jedną lub większą liczbą pierwotnych zmian biochemicznych, przez początkowo jeszcze odwracalne, a następnie nieodwracalne już zmiany komórkowe doprowadzają w efekcie do wystąpienia trwałych uszkodzeń organicznych.

Obecnie dysponuje się już pewną liczbą biomarkerów, sprawdzonych pod kątem ich przydatności dla toksykologii środowiskowej. Umożliwiają one śledzenie oraz ocenę kolejnych faz związanych z neurotoksycznymi oddziaływaniami toksyn środowiskowych na układ nerwowy człowieka.

Znaczną ich część stanowią biomarkery umożliwiające dokonanie oceny ekspozycji na czynniki neurotoksyczne oraz te, które dostarczają danych o skutkach, jakie te czynniki powodują w układzie nerwowym osób eksponowanych. Niestety znana jest tylko niewielka liczba biomarkerów mogących znaleźć zastosowanie do wykrywania osobników o zwiększonej lub zmniejszonej wrażliwości na neurotoksyczne działania toksyn środowiskowych.

## **Biomarkery ekspozycji**

Biomarkery stosowane do oceny ekspozycji na czynniki neurotoksyczne opierają się głównie na pomiarze natywnej neurotoksyny lub jej metabolitów w płynach biologicznych (krwi i moczu). Pomiary te okazały się szczególnie przydatne w monitoringu biologicznym osób eksponowanych na **związki fosforoorganiczne**.

Znacząca ilość dialkilowych pochodnych kwasów fosforowego i fosfotiotowego, produktów hydrolizy insektycydów fosforoorganicznych, jest wydalana w moczu osób eksponowanych na te insektycydy już w czasie trwania samej ekspozycji, a także w okresie kilku dni po jej ustaniu. Ze względu na to, że zróżnicowanie chemiczne produktów hydrolizy insektycydów fosforoorganicznych nie jest duże istnieje możliwość stosowania jednego postępowania analitycznego dla celów monitoringu biologicznego w warunkach ekspozycji na różne



insektycydy. Wydalane w moczu alkilowe pochodne kwasów fosforowego i fosforotionowego są uważane za uniwersalne biomarkery ekspozycji na związki fosforoorganiczne.

W ocenie ekspozycji obok oznaczeń pochodnych alkilowych w moczu stosuje się również oznaczanie innego produktu hydrolizy insektycydów fosforoorganicznych, którym jest **niealkilowy podstawnik „X” w reszcie kwasu fosforowego lub fosforotionowego**. Ze względu na charakter chemiczny tych podstawników (najczęściej są to związki aromatyczne) mogą one być identyfikowane i oznaczone ilościowo z użyciem prostych metod kolorymetrycznych lub spektrofotometrycznych. Jakkolwiek testy te odznaczają się prostotą wykonania ich wykorzystanie jako biomarkerów ekspozycji jest w znaczący sposób ograniczone tym, że przy ich pomocy można oznaczyć tylko jeden rodzaj pestycydów. Ponadto poważnym problemem jest konieczność dokonywania czasochłonnego, wstępnego postępowania oczyszczającego, usuwającego interferujące metabolity pochodzenia endogennego.

Pomiar neurotoksyny lub jej metabolitu (metabolitów) dostarcza informacji o dawce, jaka wniknęła do organizmu, natomiast nie określa tej ilości neurotoksyny, która dotarła do tkanki docelowej, jaką jest tkanka nerwowa

Aby uzyskać tego typu informacje do oceny ekspozycji na neurotoksyny wprowadzono technikę pomiarów dozymetrycznych opartą na oznaczaniu **adduktów, jakie te toksyny mogą tworzyć z makrocząsteczkami komórkowymi**. Niestety tylko ograniczona liczba substancji chemicznych ujawnia swoje działanie neurotoksyczne na drodze tworzenia wiązań kowalencyjnych z DNA lub enzymami, a także białkami o właściwościach nieenzymatycznych. Niektóre z neurotoksyn mogą tworzyć addukty z hemoglobiną i szereg badań potwierdziło, że ich oznaczanie może być przydatnym biomarkerem ekspozycji, pozwalającym na przewidywanie wystąpienia neuropatii obwodowej w warunkach zawodowego narażenia na substancje chemiczne o właściwościach neurotoksycznych, np. narażenia na akrylamid lub n-heksan. Zaletą badania adduktów jakie neurotoksyny i/lub ich metabolity tworzą z hemoglobiną jest stosunkowo długi okres półtrwania hemoglobiny erytrocytarnej w krążeniu. Wynosi on u człowieka około 4 miesiące. Z tego powodu stosując oznaczanie adduktów neurotoksyny z hemo-

globiną możemy dokonywać oceny długotrwałej, skumulowanej ekspozycji na nieduże dawki. Pomiar taki może być również wykorzystany dla potwierdzenia wystąpienia ekspozycji na neurotoksynę w okresie minionych kilku miesięcy, poprzedzających wykonanie pomiaru.

Pomiary adduktów, jakie neurotoksyny tworzą z białkami, mogą być również prowadzone z zastosowaniem albumin. Albuminy mają krótszy półokres trwania w krążeniu niż hemoglobina. Wynosi on 20–25 dni. Z tego powodu addukty neurotoksyn z albuminą mogą być oznaczane w przypadkach ekspozycji, które wystąpiły na krótko przed wykonaniem badania. Zaletą oznaczeń adduktów jakie neurotoksyny mogą tworzyć z albuminami jest to, że potencjalnie aktywne metabolity neurotoksyn powstają w wątrobie, gdzie są syntetyzowane albuminy. Pominięty jest więc etap penetracji aktywnych metabolitów neurotoksyn przez błony komórkowe do krwi.

Oba białka, hemoglobina i albuminy, zawierają w swojej strukturze kilka ugrupowań nukleofilnych, które mogą tworzyć addukty z elektrofilnymi neurotoksynami lub metabolitami neurotoksyn o takich właściwościach. Należą do nich azoty na końcach aminowych łańcuchów polipeptydowych tych białek. W przypadku hemoglobiny N - końcowym aminokwasem jest walina. Większość ugrupowań nukleofilnych jest jednak zawarta w aminokwasach, znajdujących się wewnątrz łańcucha polipeptydowego. Do ugrupowań tych zaliczyć można azoty znajdujące się w grupie aminowej lizyny oraz w pierścieniu imidazolowym histydyny, siarkę w grupie tiolowej cysteiny i metioniny, a także tleny w grupach karboksylowych kwasów asparaginowego i glutaminowego oraz grupach hydroksylowych seryny i treoniny.

Postępowanie analityczne mierzące do identyfikacji i ilościowego oznaczenia adduktów jakie neurotoksyna tworzy z białkami zależy od rodzaju utworzonego adduktu oraz jego umiejscowienia w białku (czy jest on utworzony z aminokwasem końcowym, czy też aminokwasem znajdującym się wewnątrz łańcucha polipeptydowego białka). Addukty obecne wewnątrz łańcucha polipeptydowego mogą być oznaczone dopiero po całkowitej hydrolizie w środowisku kwaśnym lub z użyciem enzymów proteolitycznych.

W analizie adduktów tworzonych z waliną, znajdującą się na aminowym końcu cząsteczki hemoglobiny lub albuminy, stosuje się zmodyfikowaną metodę degradacji Edmana. W tym postępowaniu he-



moglobinę, wyodrębnioną z erytrocytów lub albuminę wyodrębnioną z surowicy krwi, poddaje się działaniu odczynnika Edmana, pięcio-fluorofenilo izotiocyjanianu. W wyniku reakcji zostaje uwolniona odpowiednia pochodna fenylotiohydantoinowa, zawierająca addukt przyłączony do N-końcowej waliny.

Metoda badania adduktów białek z zastosowaniem degradacji Edmanowskiej oraz analizą uzyskanej pochodnej fenylotiohydantoinowej z użyciem chromatografii gazowej w połączeniu ze spektrometrią masową umożliwia wykrycie 1 do 10 pmol adduktu neurotoksyny na gram hemoglobiny. Oznaczanie adduktów tworzonych z aminokwasami wewnątrz łańcucha polipeptydowego z zastosowaniem hydrolizy enzymatycznej białka oraz analizy ilościowej uwolnionego w czasie hydrolizy adduktu techniką połączonej chromatografii i spektrometrii masowej jest znacznie mniej czułe. Czułość tej metody jest 10 do 100 razy niższa niż ta uzyskiwana przy pomocy metody degradacji Edmanowskiej.

Na zakończenie rozważań o możliwościach zastosowania pomiarów adduktów neurotoksyn z niektórymi białkami jako biomarkera ekspozycji należy wspomnieć, że zarówno hemoglobina i albuminy nie są cząsteczkami docelowymi dla działania neurotoksyn. Dostarczają one tylko danych pośrednich o tym, czy dana neurotoksyna i w jakich ilościach może wiązać się z białkami (lub DNA) komórek układu nerwowego. Czynnikiem, które w istotny sposób wpływają na stosowanie pomiaru adduktów neurotoksyn z hemoglobiną i albuminami w monitoringu populacji narażonych na substancje neurotoksyczne, jest wspomniany wcześniej fakt stosunkowo wysokiej trwałości cząsteczek obu tych białek oraz niewystępowanie procesów naprawczych, usuwających addukty, z czym mamy do czynienia w przypadku DNA.

Potwierdzeniem przydatności pomiaru adduktów jako biomarkera ekspozycji na substancje neurotoksyczne mogą być obserwacje przeprowadzone u pracowników narażonych na akrylamid. Wykazały one, że tzw. indeks neurotoksyczności (wyznaczony na podstawie objawów neurologicznych oraz ilościowych wskaźników dysfunkcji nerwów obwodowych) był znamienne skorelowany z poziomem adduktów, jakie ta neurotoksyna tworzyła z hemoglobiną. Indeks ten korelował również z ilością kwasów merkapturowych, wydalanych z moczem, a także czasem pracy w narażeniu na akrylamid. Brak było natomiast korelacji między wartością indeksu neurotoksyczności a wielkością ek-



spożycji ocenianej na podstawie pomiarów stężenia akrylamidu w powietrzu oraz pomiarów stężenia tego związku we krwi narażonych pracowników. **Te obserwacje zdają się potwierdzać, że oznaczanie poziomu adduktów, jakie neurotoksyny tworzą z hemoglobina, może być cennym biomarkerem ekspozycji, mającym zastosowanie w monitorowaniu narażenia na niektóre substancje neurotoksyczne.**

W ocenie ekspozycji na substancje neurotoksyczne stosuje się pomiary zawartości (stężenia) różnych związków pochodzenia endogennego, które jakkolwiek zmieniają swoją zawartość w komórkach czy płynach ustrojowych dostępnych do badania, to nie zawsze są one bezpośrednio powiązane ze skutkami neurotoksycznymi. W zatruciu ołowiem np. wykonuje się oznaczenia aktywności dehydratazy  $\delta$ -aminolewulinianowej (ALAD) w erytrocytach, która ulega zahamowaniu przez ten metal. Pomiar ten może służyć do monitorowania współzależności między intensywnością zaburzeń neurobehawioralnych a rozmiarem ekspozycji na ołów. Bardzo duże jednak zróżnicowanie osobnicze aktywności ALAD w erytrocytach w istotny sposób zakłóca interpretację uzyskanych wyników badań. Podejmowano próby wykorzystania oceny ekspozycji na neurotoksyczne metale (ołów, rtęć) przez pomiar porfiryn wydalanych z moczem. Ponieważ różne metale hamują biosyntezę hemu na różnych etapach tego szlaku, na podstawie wzoru wydalanych z moczem porfiryn można dokonać oceny, jaki metal spowodował wystąpienie skutków neurotoksycznych.

Badania doświadczalne, a także obserwacje kliniczne i epidemiologiczne, potwierdziły wiarygodność i przydatność oznaczeń **acetylocholinoesterazy** obecnej w krwinkach czerwonych oraz **cholinoesterazy osoczowej (pseudocholinoesterazy)** w monitoringu biologicznym osób ekspozowanych na pestycydy (związki fosforoorganiczne, karbaminiany).

|                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cholinoesteraza osoczowa może być stosowana jako biomarker ekspozycji podczas gdy acetylocholinoesteraza krwinkowa znalazła zastosowanie zarówno jako biomarker ekspozycji a także jako marker skutków zdrowotnych. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Możliwość stosowania oznaczeń cholinoesterazy osoczowej tylko jako biomarkera ekspozycji wynika z tego, że stopień zahamowania jej aktywności przez pestycydy fosforoorganiczne nie wyka-

zuje bezpośredniej zależności z rozmiarami skutków neurotoksycznych, jakie te pestycydy powodują w układzie nerwowym. Występowanie znacznego zróżnicowania w stopniu zahamowania aktywności cholinioesterazy osoczowej i acetylocholinoesterazy krwinkowej przez pestycydy fosforoorganiczne o odmiennej strukturze chemicznej powoduje, że w zależności od tego, jakiego pestycydu dotyczy ekspozycja (jaki jest charakter chemiczny pestycydu) można oznaczać jeden lub drugi enzym.

Czynnikiem, który w istotny sposób ogranicza przydatność oznaczeń obu enzymów jako biomarkerów ekspozycji jest występowanie stosunkowo dużego zróżnicowania w aktywności cholinioesteraz u poszczególnych osób, a także w całej populacji

Z tego powodu zaleca się wielokrotne wykonywanie oznaczania aktywności u tej samej osoby lub w badanej populacji, np. przed i po ekspozycji. Przyjmuje się, że obniżenie aktywności cholinioesterazy osoczowej lub acetylocholinoesterazy krwinkowej o 20–25% w stosunku do wartości przed ekspozycją ma znaczenie diagnostyczne, ale nie stwarza jeszcze zagrożenia dla zdrowia. Przekroczenie wartości 30–50% zahamowania aktywności powinno być uważane za wskazanie do wyłączenia badanej osoby z dalszej ekspozycji na pestycydy fosforoorganiczne. Osoba taka może przystąpić do pracy dopiero po powrocie aktywności enzymatycznej do wartości prawidłowej.

## Biomarkery skutków

Z przedstawionych dotychczas rozważań o biomarkerach oceniających ekspozycję na neurotoksyny wynika, że niektóre z nich jak, np. acetylocholinoesteraza krwinkowa są stosowane zamiennie lub równocześnie jako biomarkery ekspozycji lub skutków. Typowym biomarkerem skutków powodowanych przez neurotoksyny środowiskowe jest **docelowa esteraza neuropatyczna**. Enzym ten może być stosowany do monitorowania zagrożeń zdrowotnych, jakie występują u osób ekspozowanych na niektóre pestycydy fosforoorganiczne, powodujące wystąpienie u nich opóźnionej neuropatii związanej z postępującą degeneracją długich aksonów rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych. Etapem inicjującym wystąpienie opóźnionej neuropatii

jest fosforylacja przez związek fosforoorganiczny białka docelowego (esterazy neuropatycznej), obecnego w komórkach nerwowych.

Konsekwencje interakcji związku fosforoorganicznego z docelową esterazą neuropatyczną różnią się od tych, jakie występują w przypadku zahamowania acetylocholinoesterazy.

Zahamowanie aktywności acetylocholinoesterazy prowadzi do nadmiernego nagromadzenia się fizjologicznego substratu tego enzymu (acetylocholino) na zakończeniach włókien nerwowych i przerwania transmisji nerwowej. W przypadku opóźnionej neuropatii, spowodowanej ekspozycją na aksonopatyczne pestycydy fosforoorganiczne, dochodzi do utworzenia i gromadzenia się pewnej ilości „zmodyfikowanych” esteraz neuropatycznych w komórkach nerwowych. Zmodyfikowane esterazy neuropatyczne nie tracą przy tym swoich właściwości katalitycznych. Pozwala to przypuszczać, że w etiologii opóźnionej neuropatii może odgrywać pewną rolę gromadzenie się w komórkach nerwowych nietypowych produktów hydrolizy bliżej nie znanego substratu komórkowego. Aktualnie jest wiadome, że modyfikacja cząsteczek docelowej esterazy neuropatycznej zależy od struktury chemicznej pestycydu, wiążącego się z centrum katalitycznym i łączy się z procesem tzw. starzenia się enzymu. Nie jest natomiast wiadome ile zmodyfikowanych cząsteczek esterazy neuropatycznej musi nagromadzić się w komórkach nerwowych, aby ujawniła się neuropatia.

Badania doświadczalne wykazały, że w przypadku podania związków fosforoorganicznych o właściwościach aksonopatycznych dochodzi do zahamowania aktywności docelowej esterazy neuropatycznej w tkance nerwowej ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, które koreluje z zahamowaniem tej esterazy obecnej w limfocytach oraz w płytkach krwi obwodowej. Tym samym powstała możliwość wykonywania badań dla monitorowania ryzyka rozwinienia się opóźnionej neuropatii u ludzi w warunkach środowiskowej ekspozycji na pestycydy fosforoorganiczne.

Innym przykładem biomarkera mogącego mieć zastosowanie w ocenie skutków zdrowotnych powodowanych przez toksyny środowiskowe w układzie nerwowym jest **monoaminooksydaza B**. Enzym ten katalizuje metabolizm oksydacyjny dopaminy i innych amin aktywnych biologicznie. **Monoaminooksydaza jest obecna w komórkach nerwo-**

wych, ale także występuje w elementach morfotycznych krwi, w tym w płytkach krwi. Na możliwość wykorzystania monoaminooksydazy B jako biomarkera skutków zdrowotnych powodowanych przez ekspozycję na neurotoksyny środowiskowe zwrócono uwagę wówczas, gdy okazało się, że ekspozycja szczurów na neurotoksyczny rozpuszczalnik styren łączy się z obniżeniem aktywności tego enzymu w tkance mózgowej. Dalsze badania wykazały, że podobne zmiany w aktywności monoaminooksydazy B wywołane przez styren miały miejsce w płytkach krwi. Opierając się na tych obserwacjach przeprowadzono badania aktywności monoaminooksydazy B płytkowej u osób zawodowo ekspozowanych na styren. Badania te wykazały, że najniższe aktywności tego enzymu w płytkach stwierdzono u osób z najwyższymi wartościami stężenia styrenu we krwi.

Mechanizm, przez który ekspozycja na styren prowadzi do obniżenia aktywności monoaminooksydazy B w komórkach ośrodkowego układu nerwowego i płytkach krwi nie jest wyjaśniony. Przypuszcza się, że może to być spowodowane obniżeniem przez styren poziomu dopaminy w komórkach nerwowych, jak również w płytkach krwi. Obniżenie aktywności monoaminooksydazy B jest prawdopodobnie odpowiedzią adaptacyjną komórek na to zjawisko. Nie jest wykluczone, że styren lub jego metabolity mogą wywierać bezpośredni inhibitorowy wpływ na aktywność enzymatyczną. Badania porównawcze wpływu różnych substancji chemicznych (rozpuszczalników) w tym styrenu i perchloroetyleny wykazały, że nie wszystkie rozpuszczalniki o właściwościach neurotoksycznych mają właściwość obniżania aktywności monoaminooksydazy B w płytkach.

Zmiany aktywności monoaminooksydazy B w płytkach wykazują pewną specyficzność w stosunku do niektórych grup rozpuszczalników neurotoksycznych. Szczególnie wrażliwy wydaje się ten enzym na rozpuszczalniki zawierające pochodne aromatyczne.

Pewne nadzieje na uzyskanie czułych biomarkerów skutków neurotoksycznych wiąże się z oznaczaniem we krwi białek specyficznych dla komórek nerwowych lub oznaczaniem przeciwciał, które pojawiają się w krążeniu jako reakcja układu immunologicznego na uszkodzenie przez toksyny komórek nerwowych. Badania doświadczalne wykazały, że zjawisku uszkodzenia komórek układu nerwowego

przez neurotoksyny towarzyszy uwalnianie do krwi **astrocytospicyficznego glejowego kwaśnego białka fibrylarnego (GFAP – glial fibrillary acidic protein)**. Dotychczas brak jest danych o zastosowaniu oznaczeń tego białka we krwi u ludzi eksponowanych na neurotoksyny. Ukazało się natomiast bardzo interesujące doniesienie, że u osób zawodowo eksponowanych na ołów we krwi pojawiają się zwiększone ilości przeciwciał przeciwko GFAP. Nie udało się wyjaśnić, czy występowanie GFAP we krwi jest biomarkerem uszkodzenia bariery mózg – krew, czy też uszkodzenia samych komórek nerwowych.

Rozważana jest możliwość stosowania jako biomarkera skutków neurotoksycznych w układzie nerwowym oznaczeń aktywności izoenzymu kinazy kreatynowej – CK-MB, specyficznego dla komórek mózgowych. Wzrost aktywności tego izoenzymu wykryto w surowicy krwi bokserów i osób z urazami głowy. Ponieważ u osób zdrowych, bez urazów głowy, aktywność CK-MB w surowicy krwi jest bardzo niska, zwiększenie jej aktywności może wskazywać na uszkodzenie bariery mózg - krew.

Płyn mózgowo-rdzeniowy jest innym płynem ustrojowym, który może być dostępny do badań, jakkolwiek w bardzo ograniczony sposób. Badania doświadczalne na szczurach wykazały, że pojawiające się w płynie mózgowo-rdzeniowym **mielinowe białko zasadowe** może być biomarkerem procesów demielinizacji zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym jako skutek działania neurotoksyn.

W poszukiwaniu biomarkerów skutków powodowanych przez neurotoksyny środowiskowe w układzie nerwowym szczególna uwaga skupia się na tych biomarkerach, które umożliwiają dokonywanie oceny interakcji neurotoksyn z systemami receptorowymi komórek nerwowych, ich oddziaływaniem na szlaki przenoszenia sygnału transdukcji, a także na inne systemy związane z procesami regulującymi stany czynnościowe komórek nerwowych. Badania tych biomarkerów reprezentują sobą jednak bardzo wczesne stadium i nie można jeszcze określić ich przydatności dla biomonitoringu w populacjach eksponowanych na neurotoksyny środowiskowe. Nadal występuje potrzeba ustalenia, czy zmiany wywołane w określonych systemach przez neurotoksyny w komórkach nie stanowiących składowych elementów tkanki nerwowej, np. komórkach krwi, odpowiadają takim zmianom w komórkach nerwowych. Obecnie sądzi się, że największe szanse na wykorzystanie jako biomarkery skutków neurotoksycznych mają takie elementy struktur

komórkowych, jak receptory cholinergiczne muskarynowe oraz beta-adrenergiczne w limfocytach, receptory alfa-2-adrenergiczne i  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza w płytkach krwi, a także system związany z transportem serotoniny w płytkach.

## **Biomarkery wrażliwości osobniczej**

Biomarkery ekspozycji oraz skutków wywołanych przez neurotoksyny środowiskowe w układzie nerwowym nie wyczerpują zagadnienia monitoringu biologicznego osób ekspozowanych na te neurotoksyny. Wynika to z tego, że **mierzone parametry biochemiczne, odpowiadające biomarkerom ekspozycji lub skutków, mogą ulegać modyfikacjom u poszczególnych osób, wynikających z indywidualnego zróżnicowania we wrażliwości na oddziaływania neurotoksyczne chemikaliów środowiskowych.**

Stąd do pełnego monitoringu biologicznego niezbędne jest wprowadzenie trzeciej klasy biomarkerów – biomarkerów wrażliwości. Szereg danych dotyczących tej klasy biomarkerów pochodzi z dynamicznie rozwijającej się w ostatnich latach dziedziny wiedzy określanej jako ekogenetyka. Właśnie ekogenetyka zajmuje się poszukiwaniem krytycznych determinant, uwarunkowanych genetycznie, określających wrażliwość (podatność) na szkodliwe oddziaływania toksyn środowiskowych.

W organizmie ludzkim jest syntetyzowana ogromna liczba enzymów i białek nieenzymatycznych. Ze względu na to, że każda pierwotna sekwencja aminokwasowa łańcucha polipeptydowego jest zakodowana w określonym genie, liczba tych genów musi być odpowiednio bardzo duża. Ocenia się, że w genomie komórek ludzkich znajduje się około 100 000 genów. Szereg z tych genów zawiera mutacje, które powodują syntezę białek o zmienionej sekwencji aminokwasowej, odmiennej od tej dla białek normalnych. Mutacje genowe i wynikające z nich zmiany właściwości białek syntetyzowanych pod kontrolą zmutowanych genów powodują znaczne zróżnicowanie populacji ludzkiej. Stopień tego zróżnicowania w odniesieniu do określonego białka zależy od częstości, z jaką różne mutacje występują w genie odpowiedzialnym za syntezę tego białka. Zjawisko występowania danego białka w dwóch lub większej liczbie odmian określa się mianem polimorfizmu. Polimorfizm danego białka ma miejsce wówczas, gdy

występuje ono w kilku odmianach syntetyzowanych pod kontrolą genów allelicznych, przy czym co najmniej dwa allele wykazują częstość przewyższającą 1% (0,01). Z faktu występowania dużego zróżnicowania białek organizmu ludzkiego można wnioskować, że każdy człowiek jest heterozygotą w znaczącym odsetku swoich loci genowych. Przyjmuje się, że przeciętny człowiek jest heterozygotą w 16% wszystkich swoich loci genowych, co przy założeniu, że liczba tych loci wynosi 100 tys., daje wartość 16 tys. To wyjaśnia wysokie zróżnicowanie biochemiczne populacji ludzkiej. Z kolei to zróżnicowanie stanowi o występowaniu nie tylko odrębności w cechach fizycznych i reakcjach fizjologicznych, ale może być także punktem wyjścia dla zrozumienia odmienności warunkujących wystąpienie reakcji patologicznych na działanie czynników szkodliwych dla organizmu, w tym czynników uszkadzających układ nerwowy.

**Znaczenie czynników genetycznych w neurotoksyczności powodowanej przez chemikalia środowiskowe, jakkolwiek nie jest kwestionowane, to brak jest jednak zakrojonych na szeroką skalę badań naukowych, zwłaszcza potwierdzających to zjawisko o charakterze epidemiologicznym.**

Większość badań dotyczących genetycznych uwarunkowań neurotoksyczności była prowadzona w warunkach doświadczalnych u pojedynczych ras myszy i szczurów. Z nich tylko nieliczne wykazywały wyraźne zróżnicowanie we wrażliwości na określone neurotoksyny. I tak badania przeprowadzone na myszach różniących się skutkami neurotoksycznymi, jakie powodowała ekspozycja na 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydro-pirydynę wykazały, że obserwowane zróżnicowanie w tych skutkach jest konsekwencją genetycznie uwarunkowanych różnic w zdolności do wiązania melanimy oraz aktywności monoaminooksydazy.

Czynniki genetyczne odgrywają istotną rolę w występowaniu znacznego zróżnicowania w skutkach neurotoksycznych, powodowanych przez alkohol etylowy u ludzi i zwierząt. Przyczyną występowania tego zróżnicowania jest **polimorfizm systemu enzymatycznego dehydrogenaz, alkoholowej i aldehydowej**, biorących udział w metabolizmie alkoholu etylowego.

Dehydrogenaza alkoholowa (ADH) jest cynkoenzymem, który katalizuje utlenianie etanolu do aldehydu octowego. ADH obecna jest w największych ilościach w wątrobie. Poza nią występuje również



w nerkach, płucu i śluzówce żołądka. Ludzka ADH jest dimerycznym białkiem, zawierającym dwie podjednostki o masie cząsteczkowej 40 kDa. Podjednostki ADH, oznaczone  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\pi$  i  $\chi$ , są kodowane przez pięć różnych loci genowych ( $ADH_1$ ,  $ADH_2$ ,  $ADH_3$ ,  $ADH_4$  i  $ADH_5$ ). Ze względu na występowanie trzech wariantów allelicznych podjednostki beta ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$ ) oraz dwóch wariantów allelicznych podjednostki gamma ( $\gamma_1$  i  $\gamma_2$ ), cząsteczki ADH obecne w komórkach ludzkich mogą zawierać po dwie z ośmiu podjednostek. Tworzenie się dimerów (homo- i heterodimerów) odbywa się na zasadzie swobodnej rekombinacji podjednostek. Różne molekularne formy ADH zostały podzielone na trzy główne klasy. Do klasy I zaliczono  $ADH_1$ ,  $ADH_2$  i  $ADH_3$ .  $ADH_1$  zawiera albo dwie podjednostki alfa lub jedną alfa i jedną beta lub gamma.  $ADH_2$  zawiera albo dwie podjednostki beta (którą mogą być  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$ ) albo jedną podjednostkę beta i jedną podjednostkę gamma (którą może być  $\gamma_1$  lub  $\gamma_2$ ). Klasa II zawiera  $ADH_4$  utworzoną z dwóch podjednostek pi. Klasa III zawiera  $ADH_5$  zbudowaną z dwóch podjednostek chi.

Izoenzymy ADH klasy I katalizują utlenianie etanolu i innych małych, alifatycznych alkoholi. Ich aktywność jest silnie hamowana przez pirazol i jego 4-alkilowe pochodne (np. 4-metylopirazol). Izoenzymy ADH klasy II utleniają preferencyjnie wyższe alifatyczne i aromatyczne alkohole i mają mały udział w utlenianiu etanolu. Izoenzymy klasy II nie utleniają metanolu i nie są hamowane przez pirazol. Długocząłkowe alkohole (pentanol i wyższe) oraz alkohole aromatyczne (np. alkohol cinamylowy) są preferowanymi substratami dla izoenzymów ADH klasy III. Te izoenzymy nie są również hamowane przez pirazol.

Zmienność różnych genów i fenotypów ADH (odpowiednich izoenzymów ADH) jest znaczna w różnych populacjach. Jeszcze w latach sześćdziesiątych von Wartburg wykrył „atypową” ADH o zwiększonej aktywności enzymatycznej w porównaniu z „typową” ADH. Późniejsze badania ustaliły, że atypowa ADH jest zbudowana z podjednostek  $\beta_2\beta_2$  lub  $\beta_2\beta_1$  (izoenzymy należące do klasy I). Częstość występowania atypowej ADH wynosi wśród rasy kaukaskiej europejskiej 0,09–0,11, zaś w rasie orientальной wynosi 0,85–0,89. Występowanie atypowej ADH wiązano początkowo ze zróżnicowaną reakcją na neurotoksyczne oddziaływania alkoholu etylowego w rasach kaukaskiej i orientальной. Dalsze badania wykazały jednak, że większe znaczenie w powodowaniu skutków neurotoksycznych ma zróżnicowanie tych ras



pod względem aktywności dehydrogenazy aldehydowej (ALDH). Atypowa ALDH, o niskiej aktywności w stosunku do aldehydu octowego, częściej występuje w populacji orientalnej niż europejskiej.

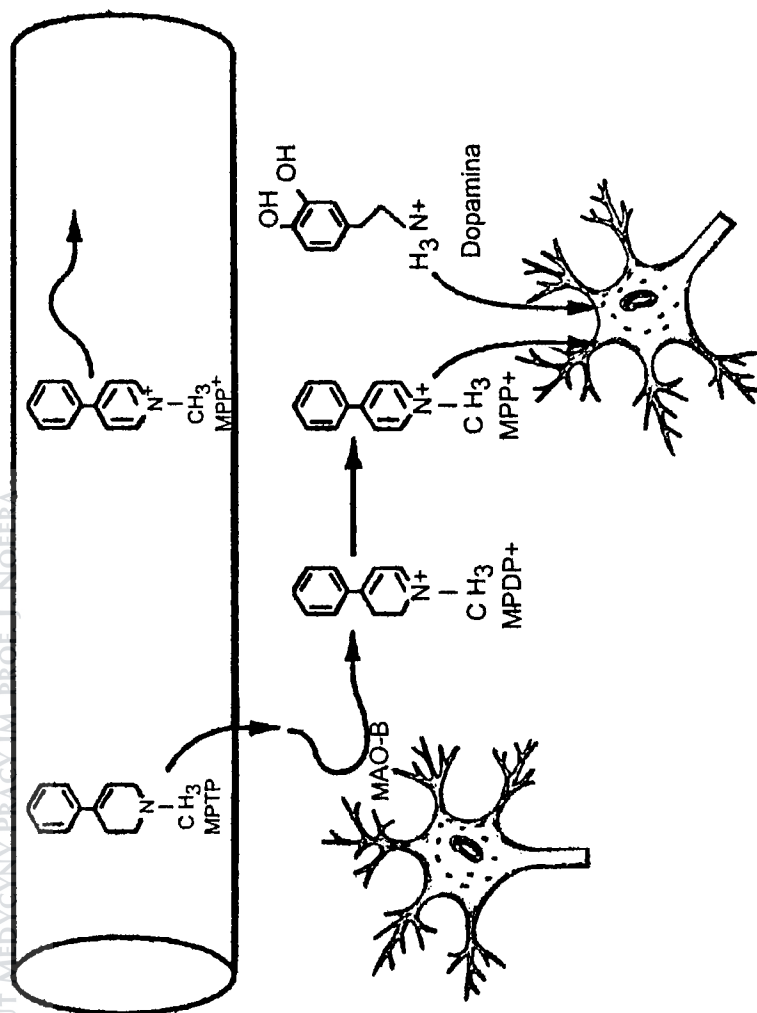
ALDH w komórkach organizmu ludzkiego występuje w trzech głównych izoformach: ALDH<sub>1</sub> o wysokiej wartości  $K_m$  występującej w cytosolu komórek, ALDH<sub>2</sub> o niskiej wartości  $K_m$  obecnej w mitochondriach oraz ALDH<sub>3</sub>. Izoforma ALDH<sub>2</sub> jest odpowiedzialna za utlenianie przeważającej ilości aldehydu octowego, powstającego w reakcjach utleniania alkoholu etylowego przez dehydrogenazę alkoholową (ADH). Polimorfizm szybkości utleniania alkoholu etylowego w populacji ludzkiej i wynikające z niego skutki neurotoksyczne, spowodowane gromadzeniem aldehydu octowego, łączone są z obecnością w komórkach normalnej i atypowej ALDH<sub>2</sub>. Atypowa ALDH<sub>2</sub> zawiera w jednej z podjednostek w pozycji 487 łańcucha polipeptydowego lizynę, gdy normalna ALDH<sub>2</sub> ma w tej pozycji kwas glutaminowy. Zamiana ta jest konsekwencją punktowej mutacji (zamiany zasady) w DNA genu kodującego ALDH<sub>2</sub>. Obecność atypowej ALDH<sub>2</sub> jest łączona z nasileniem skutków neurotoksycznych powodowanych nie tylko przez alkohol etylowy, ale również tych wynikających z ekspozycji zawodowej na toluen. Aldehyd octowy i inne aldehydy (w zależności od rodzaju ekspozycji), są gromadzone w zwiększonych ilościach przez komórki nerwowe u osób z niską aktywnością ALDH. W tych warunkach mogą one tworzyć z neuroprzekaźnikami tetrahydroizochinoliny i betakarboliny, załóżając funkcjonowanie systemu przewodzenia bodźców nerwowych.

ALDH bierze także udział w utlenianiu biogennych aldehydów powstających z biogennych amin w wyniku reakcji katalizowanej przez monoaminooksydazę. Niska aktywność ALDH w komórkach układu nerwowego powoduje wystąpienie toksycznych oddziaływań biogennych aldehydów na te komórki. Przypuszcza się, że ilość produktów kondensacji tworzonych przez biogenne aldehydy zależy od rodzaju i stężenia izoenzymów ALDH w komórkach tkanki nerwowej.

Szereg neurotoksyn ulega przemianom komórkowym (biotransformacji), które prowadzą albo do zwiększenia albo do zmniejszenia ich potencjału toksycznego. Enzymy biorące udział w procesach biotransformacji neurotoksyn wykazują polimorfizm, wynikający ze zmian w strukturze genów kodujących te enzymy. Polimorfizm dotyczy zarówno enzymów uczestniczących w procesie aktywacji jak i deaktywacji neurotoksyn. Można tu wymienić takie enzymy, jak cytochro-

my P-450, monoaminooksygenazy, transferazy S-glutationowe, N-acetylotransferazy, transferazy glukuronowe. Zróżnicowanie aktywności komórkowej tych enzymów może wywierać bardzo poważny wpływ na występowanie zjawiska neurotoksyczności w warunkach ekspozycji na toksyny pochodzenia egzogenne. Informacje na temat udziału enzymów uczestniczących w procesie biotransformacji neurotoksyn są więcej niż skąpe i dotyczą w zasadzie przemian zachodzących w wątrobie. Brak jest natomiast danych (poza pojedynczymi doniesieniami) o tym w jakim zakresie enzymy komórek nerwowych, uczestniczące w procesie biotransformacji, mogą wpływać na zjawisko neurotoksyczności.

Na szczególną uwagę w tym względzie zasługują badania próbujące wyjaśnić rolę genetycznie uwarunkowanego zróżnicowania w przemianach oksydacyjnych ksenobiotyków w etiologii choroby Parkinsona. Hipotezą roboczą dla podjęcia tych badań było to, że genetycznie uwarunkowane zróżnicowanie w przemianach oksydacyjnych może mieć wpływ na częstość występowania choroby Parkinsona jako skutku ekspozycji na dotychczas jeszcze nieokreślone chemiczne czynniki środowiskowe. Wcześniej zaobserwowano, że aby ekspozycja zwierząt doświadczalnych na 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydro-pirydynę (MPTP) doprowadziła do ujawnienia się skutków neurotoksycznych (ujawnienia się objawów Parkinsonopodobnych) związek ten musi wcześniej ulec oksydacyjnej biotransformacji z udziałem monoamino-oksydazy B (MAO B) (ryc. 4). MPTP w fizjologicznym pH występuje w postaci niezjonizowanej i stosunkowo łatwo przechodzi przez barierę krew – mózg dyfundując do wnętrza komórek obecnych w tkance nerwowej, w tym również do astrocytów. Obecna w astrocytach MAO B katalizuje dwu elektronową oksydację MPTP, prowadzącą do powstania jonu dihydropirydinowego (MPDP<sup>+</sup>). Kolejna dwuelektronowa oksydacja przekształca MPDP<sup>+</sup> w jon pirydinowy (MPP<sup>+</sup>). MPP<sup>+</sup> może penetrować do innych komórek tkanki nerwowej. Obecność jego wykryto w dopaminoergicznych neuronach substantia nigra, gdzie dostaje się przez system transportujący dopaminę. Nagromadzenie się MPP<sup>+</sup> w tych neuronach prowadzi do ich obumarcia. Należy w tym miejscu zauważyć, że podawanie zwierzętom doświadczalnym MPP<sup>+</sup> nie powoduje wystąpienia u nich objawów Parkinsonopodobnych. Spowodowane to jest tym, że MPP<sup>+</sup> nie może przechodzić przez barierę krew - mózg tak jak MPTP. Noradrenergiczne neurony obecne w *locus ceruleus* są również wrażliwe na powtarzane ekspozycje na MPTP, jakkolwiek skutki toksyczne wys-



**Ryc. 4.** Mechanizm neurotoksycznego działania 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP), MPP<sup>+</sup> - jon 1-metylo-4-fenylpyridynowy; MPDP<sup>+</sup> - jon 1-metylo-4-fenyl-2,3-dihydropirydonowy; MAO-B - monoaminooksydaza B.

ępują tu mniej wyraźnie niż to się obserwuje w neuronach dopaminergicznych.

Dalsze badania zostały podjęte celem wyjaśnienia, czy **polimorfizm MAO B** (związany z niską i wysoką aktywnością enzymu) może mieć wpływ na zjawisko wywoływania przez MPTP objawów choroby Parkinsona. Kurth i wsp. wykazali, że polimorfizm w aktywności MAO B (niska aktywność enzymu) ma swoje uwarunkowanie w zmianie konformacyjnej łańcucha DNA obecnej w 13 intronie genu kodującego ten enzym. Autorzy ci stwierdzili, że obecność zmienionego genu dla MAO B występuje znamienne częściej w komórkach osób z rozpoznaną chorobą Parkinsona niż w populacji generalnej. Badań tych nie potwierdzili jednak inni badacze.

Znaczenie przemian oksydacyjnych ksenobiotyków środowiskowych (innych niż przemiany katalizowane przez MAO B) w powstawaniu choroby Parkinsona zostało częściowo wyjaśnione przez badania **genotypu i fenotypu cytochromu P-450 – CYP2D6**. Wykazano, że u nosicieli genu zmutowanej formy CYP 2D6, odpowiedzialnej za syntezę enzymu o niskiej aktywności oksydacyjnej, choroba Parkinsona występuje częściej niż u nosicieli normalnego genu (kontrolującego syntezę CYP 2D6 o wysokiej aktywności). Dotychczas nie udało się jednak wykryć jaka neurotoksyna (bądź neurotoksyny), biorąca udział w uszkodzeniu komórek nerwowych, jest inaktywowana przez oksydację z udziałem CYP 2D6. Potwierdzeniem znaczenia wyższego potencjału oksydacyjnego komórek (w tym komórek nerwowych) w zapobieganiu powstaniu choroby Parkinsona w warunkach ekspozycji na neurotoksyny środowiskowe były badania doświadczalne z tetraizochinoliną – związkiem chemicznym, który podawany zwierzętom wywołuje u nich objawy chorobowe, podobne do tych obserwowanych w chorobie Parkinsona. Tetraizochinolina podana szczurom rasy Dark Agouti, znanej z niskiej aktywności CYP 2D6, znamienne częściej indukowała u nich wystąpienie objawów chorobowych odpowiadających chorobie Parkinsona niż w grupie kontrolnej szczurów z prawidłową aktywnością tego enzymu. Zaobserwowano również, że nikotyna, uważana za czynnik ochronny w rozwoju choroby Parkinsona, selektywnie zwiększa zawartość cytochromu P-450 w mózgu zwierząt doświadczalnych. Nie ma natomiast wpływu na jego zawartość w wątrobie. Może to potwierdzać sugestie, że wyższe możliwości oksydacyjne komórek mózgowych

zachodzące z udziałem cytochromu P-450 chronią je przed powstaniem zmian indukujących wystąpienie objawów Parkinsonopodobnych.

Pierwszym enzymem, którego genetycznie uwarunkowane odmiany zostały scharakteryzowane za pomocą testów czynnościowych, była **cholinoesteraza osoczowa**. Enzym, znany także jako pseudochoolinoesteraza, hydrolizuje estry choline z różnymi kwasami alifatycznymi i aromatycznymi. Wobec acetylocholiny wykazuje znacznie mniejszą aktywność niż acetylocholinoesteraza. Aktywność cholinoesterazy osoczowej, podobnie jak acetylocholinoesterazy krwinkowej, jest hamowana przez związki fosforoorganiczne i karbaminiany. Rozmiar zahamowania aktywności obu cholinoesteraz został wykorzystany jako badanie dostarczające pośrednich informacji o zahamowaniu aktywności acetylocholinoesterazy w obecnej w komórkach układu nerwowego (w zakończeniach synaptycznych).

Polimorfizm cholinoesterazy osoczowej został scharakteryzowany początkowo na podstawie różnej wrażliwości na hamowanie dibukainą, co pozwoliło na wykrycie allela  $E_1^A$ , odpowiedzialnego za syntezę tzw. **atypowej cholinoesterazy**. Następnie na podstawie hamowania przez fluorki wykryto tzw. odmianę fluorkooporną, za której syntezę odpowiada allel  $E_1^f$ . Te obie odmiany cholinoesterazy, w porównaniu z odmianą syntetyzowaną pod kontrolą allela prawidłowego  $E_1^U$  cechują się obniżoną aktywnością katalityczną. Kolejne badania umożliwiły wykrycie dwóch dalszych alleli: jednego odpowiedzialnego za syntezę enzymu o zmniejszonej wrażliwości na działanie alkoholu n-butyłowego oraz drugiego, tzw. allela niemego  $E_1^S$ , warunkującego u homozygot całkowity brak cholinoesterazy osoczowej. Atypowa cholinoesteraza występuje w formie homozygotycznej (dwa allele  $E_1^A$ ) u osób rasy kaukaskiej z częstością jeden przypadek na 3500 osób. Nietypowa cholinoesteraza różni się tym od normalnej, że w pozycji 70 łańcucha polipeptydowego zawiera glicynę zamiast kwasu asparaginowego.

Omówione allele warunkują syntezę enzymu w jednym locus genowym, który został określony jako  $E_1$ . Synteza cholinoesterazy znajduje się pod kontrolą dwóch loci genowych. Drugi locus, określony symbolem  $E_2$ , jest polimorficzny. Można więc wyróżnić dwa fenotypy:  $E_2^+$  i  $E_2^-$ . Występują one w proporcji 9:1. Osoby należące do subpopulacji  $E_2^+$  cechują się aktywnością cholinoesterazy większą o 25% od subpopulacji  $E_2^-$ .



Nadal brak jest ustaleń w jakim stopniu genetycznie uwarunkowane zróżnicowanie w aktywności cholinoestrazy osoczowej może wpływać na toksyczność związków fosforoorganicznych i karbaminianów w układzie nerwowym. Zależności takie są szczególnie interesujące, ze względu na fakt wykrycia w niektórych strukturach mózgowych obecności enzymu odpowiadającego swoimi właściwościami cholinoesterazy osoczowej.

Dotychczas najwięcej informacji zebrano na temat roli, jaką we wrażliwości osobniczej na neurotoksyczne oddziaływania pestycydów fosforoorganicznych odgrywa polimorfizm genetyczny **paraoksonazy**. Paraoksonaza jest enzymem występującym w osoczu krwi człowieka oraz zwierząt i jest syntetyzowana w wątrobie. Enzym ten katalizuje hydrolizę niektórych związków fosforoorganicznych, m.in paraoksonu, wnikaających do organizmu ze środowiska zewnętrznego. W populacji ludzkiej obserwuje się znaczne zróżnicowanie w aktywności paraoksonazy osoczowej. Stwierdzono występowanie kilku form tego enzymu, które różnią się szybkością z jaką hydrolizują paraokson. W zależności od szybkości hydrolizy paraoksonu przez paraoksonazę populację ludzką można podzielić na trzy grupy: szybko-, pośrednio- i wolnohydrolizujących ten związek fosforoorganiczny. Aktywność enzymu jest pod kontrolą genetyczną. Osobnicy homozygotyczni, o wysokiej aktywności paraoksonazy, mają w swoim genomie dwa allele odpowiadające niezmutowanej formie genu kodującego ten enzym (9% populacji). Z kolei osobnicy homozgotyczni o niskiej aktywności paraoksonazy mają dwa allele odpowiadające zmutowanej formie genu (48%). U heterozygot w genomie komórkowym obecny jest zarówno allel odpowiadający zmutowanej jak i dzikiej formie (43%). Należy zwrócić uwagę na występowanie dużego zróżnicowania (kilkunastokrotnego) w aktywności paraoksonazy osoczowej w obrębie grup homo- i heterozygotycznych.

Badania ostatnich lat umożliwiły wykazanie, że polimorfizm aktywności paraoksonazy może być łączony z występowaniem dwóch izoform tego enzymu, różniących się aminokwasem w pozycji 192 łańcucha polipeptydowego. Jedna z izoform, szybko hydrolizująca paraokson, charakteryzuje się obecnością w tej pozycji argininy (paraoksonaza Arg<sub>192</sub>), gdy druga izoforma, wolnohydrolizująca paraokson, ma w tej pozycji glutaminę (paraoksonanaza Gln<sub>192</sub>).



Informacje o powiązaniach między aktywnością paraoksonazy w osoczu krwi a wrażliwością na neurotoksyczne oddziaływania paraoksonu i niektórych jego pochodnych pochodzą z badań doświadczalnych. Króliki, u których aktywność paraoksonazy w osoczu krwi jest 7-krotnie wyższa niż u szczurów, są 4-krotnie mniej wrażliwe na neurotoksyczne działania paraoksonu. Wykazano również, że dożylne podanie oczyszczonej paraoksonazy szczurom powodowało zwiększenie ich odporności na neurotoksyczne oddziaływania paraoksonu. Brak natomiast danych o powiązaniach między aktywnością paraoksonazy osoczowej a wrażliwością na neurotoksyczne oddziaływania paraoksonu u ludzi.



# ŚRODOWISKOWE I ZAWODOWE SUBSTANCJE CHEMICZNE O WŁAŚCIWOŚCIACH NEUROTOKSYN

Aktualnie trudno jest ustalić, jaki udział w obserwowanych chorobach układu nerwowego populacji ludzkiej ma ekspozycja na neurotoksyny środowiskowe obecne w miejscu pracy i bytowania człowieka. Należy tu zauważyć,

że większym problemem, bardziej społecznie odczuwalnym, są schorzenia neurologiczne, powstające jako skutek ekspozycji na takie „rekreacyjne” substancje chemiczne jak alkohol etylowy, marihuana, czy leki psychoaktywne. Skutki zdrowotne tych ekspozycji w istotny sposób zaciemniają problemy związane ze skutkami wynikającymi z ekspozycji na toksyny chemiczne, skażające środowisko. Zwykle problem chemicznych skażeń środowiska i skutków zdrowotnych pojawia się, kiedy toksyczne objawy neurologiczne występują na masową skalę, np. w wyniku spożycia mąki skażonej przez insektycydy. Tym niemniej należy zdawać sobie sprawę z tego, że wiele schorzeń neurologicznych o nieznannej etiologii może być konsekwencją wcześniej przebytych lub aktualnych ekspozycji na neurotoksyny środowiskowe. Na znaczenie wpływu skażeń chemicznych środowiska na układ nerwowy człowieka mogą wskazywać badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych w 1987 roku. Z 25 substancji chemicznych, emitowanych w największych ilościach w powietrze przez zakłady przemysłu chemicznego, stalowego i farmaceutycznego, aż 17 miało udokumentowane właściwości neurotoksyczne. Liczba substancji chemicznych, którym można przypisać właściwości neurotoksyczne dla człowieka przekroczyła już 850 i obejmuje głównie takie grupy jak pestycydy, rozpuszczalniki, metale, halogenowe pochodne węglowodorów. Przykłady substancji chemicznych, którym można przypisać działania uszkodzające komórki nerwowe, aksony i mielinę przedstawiono w tabelach 1, 2 i 3.

**Tabela 1.** Substancje chemiczne powodujące uszkodzenia neuronów (neuronopatie)

| Związek neurotoksyczny | Zaburzenia neurologiczne                                                  | Zmiany patologiczne w obrębie układu nerwowego                                                              |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aluminium              | demencja, encefalopatia, zaburzenia procesów uczenia się i zapamiętywania | zmiany gąbczaste i zmiany zwyrodnieniowe kory mózgowej, tworzenie trwałych połączeń pomiędzy neurofibrilami |



|                       |                                                                                                        |                                                                                                                                                                |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6 – Aminonikotynoamid | brak danych o działaniu tego związku na ludzi, porażenie kończyn tylnych (badania na zwierzętach)      | zmiany gąbczaste (silna wakuolizacja) w obrębie komórek rdzenia kręgowego oraz pnia mózgu, degeneracja aksonów komórek układu obwodowego                       |
| Arsen                 | encefalopatia (narażenie ostre), neuropatia nerwów obwodowych (narażenie chroniczne).                  | obrzęk mózgu (narażenie ostre), degeneracja aksonów komórek tworzących układ obwodowy                                                                          |
| Azydek                | brak dokładnych danych o działaniu na organizm człowieka; drgawki, ataksja – naczelnne                 | zmniejszenie ilości komórek w mózdzku oraz korze mózgowej                                                                                                      |
| Bizmut                | zaburzenia stanów emocjonalnych, encefalopatia, mioklonia                                              | zmniejszenie ilości komórek w zwojach podstawy mózgu oraz zmniejszenie ilości komórek Purkiniego w mózdzku                                                     |
| Tlenek węgla          | encefalopatia, postępujący parkinsonizm, dystonia                                                      | zmniejszenie ilości komórek kory mózgowej, przyspieszenie pojawiania się stanów nekrotycznych w obrębie gałki bladej, pojawianie się ognisk demielinizacyjnych |
| Tetrachlorek węgla    | encefalopatia (prawdopodobnie jako następstwo wystąpienia wcześniej niewydolności wątroby)             | zwiększenie wymiarów astrocytów w prążkowie oraz gałce bladej                                                                                                  |
| Chloramfenikol        | zapalenie nerwów wzrokowych, neuropatia komórek nerwów obwodowych                                      | zmniejszenie ilości komórek odpowiedzialnych za syntezę retiny, degeneracja aksonów komórek nerwów obwodowych                                                  |
| Cyjanidynoina         | śpiączka, drgawki, nagła śmierć, postępujący parkinsonizm, dystonia                                    | degeneracja komórek mózdzku oraz gałki bladej, pojawienie się skupisk demielinizacyjnych                                                                       |
| Difenylohydantoina    | oczopląs, ataksja, zawroty głowy                                                                       | degeneracja komórek Purkiniego (mózdzek)                                                                                                                       |
| Kwas domoinowy        | zaburzenia pamięci, dezorientacja, napady padaczkowe                                                   | zmniejszenie ilości komórek w hipokampie, ciele migdałowatym oraz 5 i 6 warstwie nowej kory                                                                    |
| Doksyrubicyna         | brak dokładnych danych o działaniu na organizm człowieka; postępująca ataksja – badania na zwierzętach | degeneracja zwojów korzeni grzbietowych, degeneracja aksonów komórek układu obwodowego                                                                         |

Tabela 1 – cd.

| Związek neurotoksyczny                             | Zaburzenia neurologiczne                                                                                             | Zmiany patologiczne w obrębie układu nerwowego                                                                             |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kwas kainowy                                       | brak dokładnych danych o działaniu na organizm człowieka; pojawiające się napady padaczkowe – badania na zwierzętach | degeneracja neuronów hipokampa, kory węchowej, ciała migdałowego oraz wzgórza                                              |
| Ołów                                               | encefalopatia, zaburzenia pamięci, neuropatia                                                                        | obrzęk mózgu (narażenie ostre), zanik aksonów komórek układu obwodowego                                                    |
| Mangan                                             | zaburzenia stanów emocjonalnych, parkinsonizm, dystonia                                                              | degeneracja komórek w przątkowiu oraz gałce błędej                                                                         |
| Rtęć                                               | zaburzenia emocjonalne, drżenie mięśniowe, uczucie zmęczenia                                                         | brak dokładnych danych o działaniu na organizm człowieka (prawdopodobne zmiany w obrębie szlaków rdzeniowych oraz mózdzku) |
| Octan metyloazoksymetanolu                         | mikrocefalia (badania na szczurach)                                                                                  | zaburzenia rozwojowe mózgu (badania na szczurach)                                                                          |
| Bromek metylu                                      | uszkodzenia narządów wzroku oraz mowy, neuropatia komórek nerwów obwodowych                                          | brak dokładnych danych o działaniu na organizm człowieka                                                                   |
| Metylortęć                                         | parastezje, ataksja, spowolnienie psychomotoryczne (w przypadku narażenia płodów)                                    | degeneracja komórek kory wzrokowej, mózdzku oraz neuronów zwojowych, zmiany gąbczaste kory i mózdzku                       |
| 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna (MPTP) | parkinsonizm                                                                                                         | obumieranie komórek szlaku nigrostriatalnego                                                                               |
| Streptomycyna                                      | utrata słuchu                                                                                                        | zmiany w obrębie ucha wewnętrznego (narząd Cortiego)                                                                       |
| Tal                                                | zaburzenia emocjonalne, ataksja, neuropatia komórek układu ośrodkowego i obwodowego                                  | obrzęk mózgu (narażenie ostre), zanik aksonów komórek układu obwodowego                                                    |
| Trimetylocyna                                      | drżenie mięśniowe, podniecenie (dane z badań na zwierzętach)                                                         | obumieranie komórek hipokampa, ciała migdałowego i kory gruszkowatej.                                                      |

**Tabela 2.** Substancje chemiczne powodujące wystąpienie uszkodzeń aksonów (aksonopatie)

| Neurotoksyna                 | Skutki neurologiczne                                         | Objawy neurotoksyczne na poziomie komórkowym                                               |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Akrylamid                    | neuropatia obwodowa (często czuciowa)                        | degeneracja aksonów. We wczesnych stadiach występuje na końcach aksonów                    |
| p-Bromofenylo-acetylomocznik | neuropatia obwodowa                                          | degeneracja aksonów w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym                             |
| Dwusiarczek węgla            | ostra psychoza, przewlekła neuropatia obwodowa               | degeneracja aksonów. We wczesnych stadiach występuje zanik neurofilamentów                 |
| Chlorodekon                  | drżenia, brak koordynacji ruchowej                           | niewystarczające dane u ludzi. U zwierząt degeneracja i zanik aksonów                      |
| Chlorochina                  | neuropatia obwodowa                                          | degeneracja aksonów, zmiany o charakterze inkluzji w komórkach zwojów korzeni grzbietowych |
| Kolchicyna                   | neuropatia obwodowa                                          | degeneracja aksonów, agregacja neurofilamentów w ciele komórki nerwowej                    |
| Dapson                       | neuropatia obwodowa, najczęściej motoryczna                  | degeneracja aksonów                                                                        |
| Dichlorofenoksyoctan         | opóźniona neuropatia obwodowa                                | brak danych                                                                                |
| Dimetyloaminopropionitryl    | neuropatia obwodowa, zatrzymanie moczu                       | degeneracja aksonów (zarówno zmielinizowanych jak i niezmielinizowanych)                   |
| Disulfiram                   | neuropatia obwodowa, najczęściej czuciowa                    | degeneracja aksonów, zanik dystalnych części aksonów                                       |
| Tlenek etylenu               | neuropatia obwodowa                                          | degeneracja aksonów                                                                        |
| Glutimid                     | neuropatia obwodowa, najczęściej czuciowa                    | brak danych                                                                                |
| Złoto                        | neuropatia obwodowa (mogą się pojawić zaburzenia psychiczne) | degeneracja aksonów, może się pojawić segmentalna demielinizacja                           |
| Heksan                       | neuropatia obwodowa                                          | degeneracja aksonów, we wczesnych stadiach zanik neurofilamentów                           |
| Hydralazyna                  | neuropatia obwodowa                                          | brak danych                                                                                |

**Tabela 2 – cd.**

| Neurotoksyna               | Skutki neurologiczne                                                       | Objawy neurotoksyczne na poziomie komórkowym                                                                    |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3,3'-iminodipropiononitryl | brak danych odnośnie ludzi.<br>U zwierząt zaburzenia ruchowe               | zanik aksonów, degeneracja komórek nabłonkowych układu limbicznego, degeneracja komórek układu przed-sionkowego |
| Izoniazyd                  | neuropatia obwodowa                                                        | degeneracja aksonów. Dotyczy włókien zmielinizowanych i niezmielinizowanych                                     |
| Lit                        | śpiączka, drżenie, ataksja                                                 | brak danych                                                                                                     |
| Keton metylo-n-butyłowy    | neuropatia obwodowa                                                        | degeneracja aksonów, we wczesnym okresie zanik neurofilamentów                                                  |
| Metronidazol               | neuropatia obwodowa zakończeń czuciowych, ataksja                          | degeneracja aksonów, głównie dotycząca włókien zmielinizowanych, uszkodzenia komórek jąder podstawy mózgu       |
| Nitrofurantoina            | neuropatia obwodowa                                                        | degeneracja aksonów                                                                                             |
| Związki fosforoorganiczne  | bóle głowy, bóle brzucha, opóźniona neuropatia obwodowa (motoryczna)       | degeneracja aksonów                                                                                             |
| Polibromowane bifenylo     | kolorowe zjawy wzrokowe, zmęczenie                                         | brak danych                                                                                                     |
| Pyretroidy                 | zaburzenia ruchowe                                                         | degeneracja aksonów                                                                                             |
| Trichloroetylen            | neuropatia dotycząca nerwów czaszkowych, (najczęściej nerwu trójdzielnego) | dgeneracja aksonów, zmiany we włóknach nerwowych komórek rdzenia kręgowego                                      |

**Tabela 3.** Substancje chemiczne (neurotoksyny) powodujące uszkodzenia mieliny (mielinopatie)

| Związek neurotoksyczny                    | Zaburzenia neurologiczne                                                                                                     | Zaburzenia wywoływane przez te związki w układzie nerwowym                                                      |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Acetylotetylotetram etylotetralina (AETT) | brak dokładnych danych o działaniu tego związku na organizm człowieka; nadpobudliwość, drżenie mięśni (badania na szczurach) | powiększenie otoczek mielinowych w komórkach (obrzęk wewnątrzmielinowy), akumulacja barwników wewnątrz neuronów |

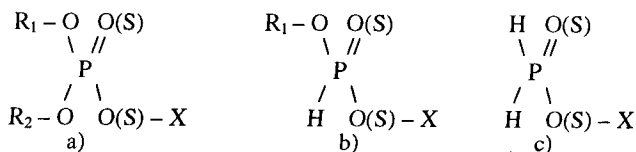
|                     |                                                                                                               |                                                                                                                  |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amiodaron           | obwodowa neuropatia                                                                                           | demielinizacja oraz degeneracja aksonów, znaczne nagromadzenie lipidów w obrębie lizosomów w komórkach Schwanna  |
| Kupryzon            | brak dokładnych danych o działaniu tego związku na organizm człowieka; encefalopatia (badania na zwierzętach) | stany gąbczaste w obrębie istoty białej, powiększenie otoczek mielinowych w komórkach (obrzęk wewnątrzmielinowy) |
| Cyjaniany           | obwodowa neuropatia                                                                                           | segmentalna demielinizacja, degeneracja aksonów                                                                  |
| Bromek etydyny      | brak szczegółowych badań o działaniu tego związku na organizm człowieka                                       | stany gąbczaste w obrębie istoty białej, powiększenie otoczek mielinowych w komórkach (obrzęk wewnątrzmielinowy) |
| Sześciochlorobenzen | rozdrażnienie, dezorientacja, możliwość wystąpienia napadów padaczkowych                                      | obrzęk mózgu, powiększenie otoczek mielinowych w komórkach układu ośrodkowego i obwodowego                       |
| Lizolecytyna        | objawy wyłącznie po podaniu związku do układu ośrodkowego lub obwodowego                                      | selektywna demielinizacja w miejscach bezpośredniego działania związku                                           |
| Perheksylen         | obwodowa neuropatia                                                                                           | demielinizacyjna neuropatia, zmiany w błonach komórek Schwanna                                                   |
| Tellur              | porażenie kończyn tylnych (badania na zwierzętach)                                                            | demielinizacyjna neuropatia, nacieki lipofuscyny (dane wyłącznie z badań przeprowadzonych na zwierzętach)        |
| Trietylocyna        | ból głowy, światłowstręt, wymioty, porażenie kończyn dolnych                                                  | obrzęk mózgu, powiększenie otoczek mielinowych w komórkach (obrzęk wewnątrzmielinowy)                            |

## Pestycydy

Nazwa pestycydy obejmuje grupę substancji chemicznych stosowanych do zwalczania owadów (insektycydy), grzybów (fungicydy), gryzoni (rodenticydy) i chwastów (herbicydy). Z punktu widzenia zagrożeń zdrowotnych dla populacji ludzkiej, wynikających z najbardziej masowego stosowania i najwyższego potencjału neurotoksycznego, szczególną uwagę zwracają związki fosforoorganiczne.

## Związki fosforoorganiczne

Związki fosforoorganiczne są pochodnymi trzech kwasów: fosforowego (a), fosfonowego (b) i fosfinowego (c) lub ich siarkowych analogów i mogą być przedstawione za pomocą ogólnych wzorów:



Podstawnikami  $R_1$  i  $R_2$  są najczęściej ugrupowania metylowe lub etylowe. Te ugrupowania decydują o trwałości związania się estru fosforoorganicznego z celem enzymatycznym. Ugrupowanie X, które determinuje toksyczność związków fosforoorganicznych, decyduje o powinowactwie tych związków do centrum aktywnego docelowego enzymu.

Chemiczna stabilność estrów fosforoorganicznych w znaczący sposób wpływa na ich użyteczność, trwałość środowiskową, a także na toksyczne skutki, jakie wywołują one w żywych organizmach. Jedną z ważniejszych reakcji związków fosforoorganicznych jest hydroliza przez wodę. W ogromnej większości przypadków reakcja hydrolizy wiązań estrowych prowadzi do znacznego osłabienia lub utraty ich działania toksycznego w stosunku do zwierząt i człowieka. Podatność na hydrolizę zależy od rodzaju ugrupowań estryfikujących kwasy fosforowe. Ze względu na to, że grupa  $P = O$  ma charakter bardziej elektrofilny niż grupa  $P = S$ , wymiana siarki na tlen zwiększa w znacznym stopniu podatność estru fosforoorganicznego na hydrolizę. Należy tu zauważyć, że hydrolizie przez wodę sprzyja alkaliczne pH. Stąd stosowanie silnie alkalicznych roztworów wodnych może być pomocne przy deaktywacji związków fosforoorganicznych.

Znaczna część związków fosforoorganicznych, stosowanych jako pestycydy, po wnikięciu do organizmu człowieka, jest szybko metabolizowana i wydalana. Pestycydy te mogą wnikać do organizmu różnymi drogami; drogą oddechową, drogą pokarmową, a także przez skórę. Względna ważność tych dróg w wywoływaniu skutków toksycznych zmienia się w zależności od właściwości związku fosforoorganicznego, samych warunków ekspozycji, a także sposobu przygo-

MECHANIZMY INHIBICJI

towania preparatu, który zostaje użyty, np. do spryskiwania czy też w formie pylistej. Zwraca się uwagę na fakt, że biooddziaływanie pestycydów fosforoorganicznych jest różne po ich absorpcji z przewodu pokarmowego do tego, jakie występuje po ich wchłonięciu przez drogi oddechowe, czy przez skórę. Wynika to ze znanego zjawiska udziału wątroby w procesie biotransformacji tych pestycydów. Wątroba pełniąc rolę swego rodzaju „bramy” do innych narządów i tkanek, wychwytuje znaczną część pestycydów z krwi przepływającej przez system żyły wrotnej. Po ich biotransformacji w wątrobie zostają one dopiero skierowane do krążenia ogólnego.

Wchłonięte z otoczenia związki fosforoorganiczne, a także ich metabolity, są szybko rozprzodczane z krwią i umiejscawiają się w różnych tkankach i narządach. Najwyższe stężenie znajduje się zwykle w wątrobie oraz w nerkach. Te związki fosforoorganiczne, które wykazują wysoki stopień lipofilności mogą osiągać wysokie stężenia w tkance nerwowej i innych bogatych w lipidy tkankach. Biologiczny półokres związków fosforoorganicznych jest bardzo zróżnicowany i waha się od kilku minut do wielu godzin. Uzależnione to jest do struktury chemicznej związku i procesów biotransformacji, jakim ulega on w organizmie, a także od drogi wchłaniania. Należy zauważyć, że zależność między enzymatyczną biotransformacją a toksycznością pestycydów fosforoorganicznych jest bardzo złożona. Skutek toksyczny zależy w znacznym stopniu od tego, jaki jest rozmiar dostępności aktywnego związku do specyficznych celów enzymatycznych w krytycznych miejscach tkanki nerwowej. To z kolei zależy od dynamiki procesów aktywacji i deaktywacji pestycydów, od wzajemnego zrównoważenia tych procesów.

Procesy aktywacji związków fosforoorganicznych łączą się najczęściej z procesami utleniania. Wszystkie tionowe pestycydy fosforoorganiczne zawierające ugrupowanie  $P = S$  (fosfortionowe) nie są aktywnymi inhibitorami acetylocholinoesterazy, ale wymagają aktywacji przez utlenianie ugrupowania fosfortionowego do fosfortlenowego. Prowadzi to do powstania odpowiednich analogów tlenowych.

System enzymatyczny, który katalizuje tę reakcję należy do grupy NADPH zależnego systemu mikrosomalnych monooksygenaz i związany jest cytochromem P-450. Dotychczas nie ustalono, jaka izoforma tego cytochromu bierze udział w procesie zamiany ugrupowania tionowego na tlenowe. Jakkolwiek wątroba wykazuje największą zdolność do utleniania ugrupowania fosfortionowego w pestycydach, to



proces ten może również zachodzić w innych tkankach, włączając w to tkankę płucną czy mózgową. Aktywacja pestycydów fosforoorganicznych przez tkanki pozawątrobowe, także i w tych przypadkach kiedy zachodzi w niewielkim stopniu, może być ważna, jeśli tkanki te są krytycznymi docelowymi miejscami dla zahamowania aktywności acetylocholinoesterazy.

Proces deaktywacji pestycydów fosforoorganicznych w organizmie może przebiegać w dwojaki sposób, albo na drodze biochemicznych modyfikacji ich struktury, albo przez ich związanie z takimi składnikami komórkowymi, których połączenie ze związkiem fosforoorganicznym nie powoduje następstw toksycznych, np. rozpuszczenie się w fazie lipidowej utworzonej przez triglicerydy komórek tłuszczowych.

Zasadniczymi reakcjami biochemicznymi, które prowadzą do zniesienia bądź osłabienia skutków toksycznych pestycydów fosforoorganicznych są:

- 1) rozszczepienie wiązań P - X przez esterazy;
- 2) rozszczepienie wiązań estrowych w innych częściach cząsteczki przez karboksyesterazy;
- 3) utlenienie alkilowego łańcucha bocznego ( $R_1$  lub  $R_2$ ). Powoduje to, że wiązanie R - O - P staje się nietrwałe i łatwo ulega rozpadowi;
- 4) przeniesienie grupy alkilowej na glutation z udziałem S-transferazy glutationowej.

Pestycydy fosforoorganiczne wywołują swoje skutki biologiczne głównie jako inhibitory cholinoesteraz. U człowieka występują dwa podstawowe rodzaje cholinoesteraz: acetylocholinoesteraza (inne nazwy: acetylocholino acetylo hydrolaza E.C. 3.1.1.7, cholinoestaza specyficzna, cholinoesteraza specyficzna, cholinoesteraza erytrocytarna) oraz butyrylocholinoesteraza (inne nazwy: acetylocholinoacylohydrolaza EC 3.1.1.8, cholinoestaza niespecyficzna, pseudocholinoesteraza osoczowa lub surowicza). Oba rodzaje cholinoesteraz różnią się umiejscowieniem w tkankach, powinowactwem substartowym oraz funkcją fizjologiczną. Oznaczenia ilościowe aktywności acetylocholinoesterazy w krwinkach czerwonych i psudocholinoesterazy w osoczu oparte są na reakcji kolorymetrycznego pomiaru tiocholiny uwalnianej z acetylotiocholiny, opracowanej przez Elmana i wsp. w 1961 roku.

Na praktyczny użytek można stwierdzić, że skutki farmakologiczne indukowane przez pestycydy fosforoorganiczne w organizmach zwierząt i człowieka są spowodowane zahamowaniem aktywności acety-



locholinoesterazy. Aktywność butyrylocholinoesterazy jest również hamowana przez te pestycydy, ale jej zahamowanie nie powoduje zauważalnych zaburzeń funkcjonalnych.

Ze względu na to, że acetylocholinoesteraza katalizuje hydrolytyczne rozszczepienie acetylocholiney do choliny i kwasu octowego, w warunkach zahamowania aktywności tego enzymu dochodzi do gromadzenia się acetylocholiney. Ta ostatnia bierze udział w transmisji potencjału nerwowego. Proces ten wymaga najpierw uwolnienia acetylocholiney do przestrzeni wewnątrzsynaptycznej, związania się jej z postsynaptycznym receptorem i następnie bardzo szybkiej, trwającej milisekundy, degradacji acetylocholiney. Zahamowanie aktywności acetylocholinoesterazy powoduje, że postsynaptyczna transmisja cholinergiczna nie jest zakończona we właściwym czasie i objawia się przedłużoną nadstymulacją cholinergiczną. Nagromadzenie się dużych ilości acetylocholiney prowadzi do zniesienia reaktywności receptora cholinergicznego.

Wzrost stężenia acetylocholiney prowadzi również do zaburzenia równowagi między podstawowymi neuroprzekaźnikami w ośrodkowym układzie nerwowym. Obserwuje się zmiany w zawartości dopaminy, noradrenaliny, serotoniny i kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego. Pestycydy fosforoorganiczne powodują również szereg zaburzeń w metabolizmie komórek nerwowych. Stwierdzono zmiany w aktywności niektórych enzymów mitochondrialnych, zwłaszcza enzymów przemian oksydo-redukcyjnych. Ekspozycja na pestycydy może powodować zmiany w zawartości glikogenu w komórkach mózgowych, a także zwolnienie przemian energetycznych tych komórek.

Poznano już dość dobrze mechanizm, za pośrednictwem którego pestycydy fosforoorganiczne powodują zahamowanie aktywności acetylocholinoesterazy. W procesie inhibitorowego oddziaływania pestycydów na ten enzym wyróżnić można trzy zasadnicze etapy. Pierwszym jest tworzenie kompleksu między enzymem i inhibitorem. Szybkość tworzenia tego kompleksu, określana stałą powinowactwa, jest tu podobna jak dla naturalnego substratu, tj. acetylocholiney. Kolejne etapy wykazują znaczne zróżnicowanie. Reakcje acetylacji ugrupowania -OH seryny przez naturalny substart w centrum aktywnym acetylocholinoesterazy oraz deacetylacji enzymu przebiegają szybko i w bardzo krótkim czasie dochodzi do odtworzenia aktywnego enzymu. W przypadku pestycydu fosforoorganicznego fosforylacja ugrupowania -OH seryny

w centrum aktywnym acetylocholinoestrazy przebiega znacznie wolniej, zaś defosforylacja zachodzi bardzo powoli. Jeszcze wolniej przebiega odtworzenie aktywnego enzymu. Skutkiem tego jest gromadzenie się ufosforylowanej, nieaktywnej formy acetylocholino. Liczba cząsteczek hydrolizowanych w ciągu minuty przez jedną cząsteczkę acetylocholinoestrazy jest  $10^7$  do  $10^8$  razy mniejsza dla pestycydu fosforoorganicznego niż dla naturalnego substratu – acetylocholino. Tak więc enzym bardzo szybko hydrolizuje acetylocholinę, ale jest prawie nieodwracalnie zahamowany przez związki fosforoorganiczne.

Szybkość odtwarzania wolnej i aktywnej acetylocholinoestrazy w warunkach zatrucia pestycydami fosforoorganicznymi jest bardzo różnicowana. Większość ze znanych pestycydów fosforoorganicznych jest wolno odwracalnymi inhibitorami. Spontaniczne odwrócenie zahamowania enzymu występuje przez hydrolizę ufosforylowanego ugrupowania -OH seryny w centrum aktywnym acetylocholinoestrazy. Szybkość spontanicznej regeneracji ufosforylowanego enzymu zależy od rodzaju podstawników alkilowych grupy fosforanowej pestycydu. Pochodne dimetylowe ulegają np. spontanicznej hydrolizie znacznie wolniej niż pochodne dietylowe.

Niezwykle ważnym zjawiskiem w procesie regeneracji aktywnej formy acetylocholinoestrazy jest tzw. proces „starzenia” się ufosforylowanego enzymu. Zjawisko to łączy się z uwolnieniem jednej z grup alkilujących obecnych w grupie fosforanowej i utworzeniem wolnego ugrupowania kwasowego -OH. Proces ten ma duże znaczenie z punktu widzenia skuteczności postępowania leczniczego w stosunku do osób zatrutych pestycydami fosforoorganicznymi. Wynika to z tego, że zdolność pochodnych oksymowych, używanych w leczeniu osób zatrutych związkami fosforoorganicznymi do odblokowania zahamowanej acetlocholinoestrazy zależy od tego, czy reakcja „starzenia” miała miejsce przed podaniem tego leku. „Zestarzały”, ufosforylowany enzym nie poddaje się reaktywującemu działaniu oksymów. Skuteczność leczenia zatrucia pestycydami fosforoorganicznymi przez oksymy jest uzależniona od szybkiego ich podania, zanim wystąpi reakcja „starzenia” ufosforylowanego enzymu.

Szybkość procesu „starzenia” ufosforylowanej acetylocholino uzależniona jest od tego, jakie podstawniki alkilowe obecne są w blokującej enzym grupie fosforanowej. I tak półokres „starzenia” dietylofosforylowanej acetylocholinoestrazy wynosi 41 godzin, a półokres



„starzenia” diizopropylofosforylowanego enzymu tylko 4,6 godzin. Niektóre z ugrupowań alkilujących grupę fosforanową charakteryzują się tym, że proces „starzenia” ufosforylowanej acetylocholinoesterazy odbywa się wręcz z „piorunującą” szybkością. Półokres „starzenia” acetylocholinoesterazy np. ufosforylowanej przez soman (gaz bojowy o bardzo silnym działaniu neurotoksycznym) wynosi tylko 6 minut w temperaturze 25°C. Wymiana ugrupowania 1,2,2-trimetylopropylowego w somanie na cykloheksylowe powoduje wydłużenie półokresu starzenia do 66,6 godzin. To potwierdza, że szybkość „starzenia” ufosforylowanej acetylocholinoesterazy jest wyraźnie zależna od rodzaju podstawników alkilowych obecnych w grupie fosforanowej.

Od szeregu lat toksykolodzy próbują wyjaśnić zjawisko działania neurotoksycznego niektórych związków fosforoorganicznych, które pojawia się u osób mających kontakt z tymi związkami dopiero po pewnym czasie od chwili zaistnienia ekspozycji. To zjawisko, określane jako opóźniona neuropatia, łączy się z degeneracją długich aksonów w obwodowym układzie nerwowym i wybranych szlaków nerwowych ośrodkowego układu nerwowego. Objawy neuropatii występują po około 2 tygodniach (a często i po dłuższym okresie utajenia) od czasu kontaktu z związkiem fosforoorganicznym i **nie są związane z hamowaniem aktywności acetylocholinoesterazy**. Intensywne badania tego problemu doprowadziły do wyjaśnienia, że zjawisko opóźnionej neuropatii łączy się z fosforylacją przez związki fosforoorganiczne pewnych specyficznych enzymów esterazowych w komórkach tkanki nerwowej. Nazwano je **docelowymi esterazami neuropatycznymi**.

Reakcją zapoczątkowującą proces opóźnionej neuropatii jest fosforylacja docelowej esterazy neuropatycznej. Drugim etapem, koniecznym, aby neuropatia mogła w ogóle wystąpić, jest transformacja ufosforylowanego celu enzymatycznego, tj. enzymu esterazowego, w formę „zestarzałą”. W tej formie jedno z ugrupowań alkilujących resztę fosforanową zostaje odłączone i pojawia się ujemnie naładowane ugrupowanie kwasowe -O<sup>-</sup>. Obecność dodatkowego ujemnie naładowanego ugrupowania zmienia w sposób istotny właściwości docelowej esterazy neuropatycznej, a zwłaszcza oddziaływania tego enzymu z białkami komórkowymi biorącymi udział w przemianie energetycznej komórek nerwowych. Reakcja „starzenia” docelowej neuropatycznej esterazy może wystąpić w przypadkach zatrucia związkami fosforoorganicznymi, pochodnymi kwasu fosforowego, fosfonowego lub ami-

dofosforowego. Pochodne te zwykle określa się mianem pestycydów aksonopatycznych. Natomiast nie obserwuje się reakcji „starzenia” esterazy i opóźnionej neuropatii w przypadkach zatruc pochodnymi kwasu fosfinowego, podobnie jak w zatruciach karbaminianami. W przypadku ich związania z docelową esterazą neuropatyczną występuje jej zablokowanie. Podanie wówczas pestycydu fosforo-organicznego o właściwościach aksonopatycznych nie wywołuje już zjawiska opóźnionej neuropatii.

Docelowa esteraza neuropatyczna została zidentyfikowana i potwierdzono jej bezpośredni udział w powstawaniu opóźnionej neuropatii przez badania doświadczalne na zwierzętach. Stwierdzono, że znakowane pestycydy aksonopatyczne wiążą się selektywnie z białkiem o właściwościach esterazy, obecnym w komórkach nerwowych. Ze względu na obecność w komórkach nerwowych licznych enzymów esterazowych i braku absolutnej specyficzności substratowej (tak jak to ma miejsce w przypadku acetylocholinoesterazy), aktywność docelowej esterazy neuropatycznej może być oznaczona ilościowo po zahamowaniu aktywności innych enzymów esterazowych. Oznaczenie takie może być dokonane przez podanie np. paraoksonu, będącego silnym inhibitorem acetylocholinoesterazy oraz szeregu innych enzymów esterazowych. Sam paraokson nie powoduje wystąpienia opóźnionej neuropatii, ponieważ nie hamuje aktywności docelowej esterazy neuropatycznej. Jeśli poda się odpowiednią dawkę paraoksonu zwierzęciu doświadczalnemu wrażliwemu na wystąpienie opóźnionej neuropatii, np. kurze, dochodzi do silnego zahamowania acetylocholinoesterazy, a całkowita aktywność esterazowa tkanki nerwowej obniża się do wartości poniżej 50% stanu tej aktywności przed podaniem paraoksonu. W tych warunkach zwierzę pozostaje nadal wrażliwe na rozwinięcie się opóźnionej neuropatii, jeśli zostanie podany pestycyd aksonopatyczny, np. mipafox lub diizopropyl fluorofosforan (DFP). Po podaniu DFP pewna część aktywności esterazowej pozostaje nadal wykrywalna w tkance nerwowej. Wskazuje to, że obecne są tam również i takie enzymy esterazowe, których aktywność nie jest hamowana ani przez paraokson ani przez DFP.

Zwierzęcym modelem z wyboru dla badania zjawiska opóźnionej neuropatii były kury. Spowodowane to było dużym podobieństwem charakterystyki biochemicznej docelowej esterazy neuropatycznej tkanek kury i człowieka. Aby wywołać objawy opóźnionej neuropatii

u kur minimalne zahamowanie aktywności docelowej esterazy neuropatycznej wynosiło 70% (w warunkach *in vivo*) i osiągnięte zostało w okresie 24 godzin po podaniu pestycydu aksonopatycznego. Czy podobny próg inhibicji występuje również u człowieka i jaka jest jego wartość nie jest dotychczas poznane. Nie wiemy również jakie zdarzenia w neuronie są konsekwencją zahamowania aktywności neuropatycznej esterazy docelowej. Rozważana jest możliwość występowania zaburzeń w biosyntezie białka, zaburzeń w procesie aktywnego transportu, a także w procesie wytwarzania energii niezbędnej do przewodzenia impulsów nerwowych. Nie wiemy jaka jest rola docelowej esterazy neuropatycznej w neuronie.

U człowieka obecność docelowej esterazy neuropatycznej wykryto w tkance nerwowej, w wątrobie, w limfocytach, w płytkach krwi, a także w wielu innych tkankach.

Badania doświadczalne wykazały, że po podawaniu aksonopatycznych związków fosforoorganicznych zahamowanie aktywności docelowej esterazy neuropatycznej w limfocytach koreluje z zahamowaniem tej esterazy w komórkach obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego. Tym samym zostały stworzone możliwości podjęcia badań dla monitorowania ryzyka rozwinięcia się opóźnionej neuropatii u ludzi w warunkach ekspozycji (zawodowej lub przypadkowej) na aksonopatyczne związki fosforoorganiczne. Należy tu jednak zauważyć, że jakkolwiek uzyskano wysoką korelację między hamowaniem aktywności docelowej esterazy neuropatycznej w mózgu i limfocytach po pojedynczych dawkach neuropatycznych związków fosforoorganicznych, to nie wykazano takiej korelacji w czasie przewlekłego podawania tych związków. Przyczyny tych rozbieżności mogą wynikać z tego, że na wyniki pomiarów aktywności docelowej esterazy neuropatycznej w warunkach powtarzanej, wielokrotnej ekspozycji, w istotny sposób wpływa zmienność puli krążących limfocytów.

Badania, jakie przeprowadzono u ludzi w przypadkach śmiertelnego zatrucia neuropatycznymi związkami fosforoorganicznymi, m.in. zatruciu chlorpyrifosem (3,5,6-trichloro-2-pirydylo-trifosforanem) wykazały, że stopień zahamowania docelowej esterazy neuropatycznej w limfocytach był zbliżony do tego, jaki oznaczono w tkance nerwowej (pobranej pośmiertnie).

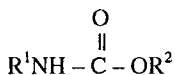
Jak dotąd, występowanie opóźnionej neuropatii u człowieka wykazano po zaistnieniu ekspozycji na mipafox, leptofos, trichlorfon,

trichlornat, trichlorfen, methamidofos, EPN (0-etylo-0-1-nitrofenylofenylotiofosfonian) i TOCP (trójortokrezylofosforan). Opóźniona neuropatia może wystąpić jako odległe następstwo po ekspozycji na wyżej wymienione związki fosforoorganiczne i objawia się kurczowymi bólami mięśniowymi oraz postępującym osłabieniem mięśni, zaczynającym się od nóg i postępującym stopniowo w górę, obejmując również ręce. Stwierdzono również u niektórych osób subiektywną utratę czucia. Do wyróżniających się objawów należy również osłabienie odruchów ścięgowych. W badaniach behawioralnych zaobserwowano osłabienie reakcji psychomotorycznej i przetwarzania informacji, niedobory pamięciowe i poddenerwowanie. Badania, jakie wykonano u robotników zatrudnionych przy produkcji aksonopatycznych związków fosforoorganicznych wykazały obniżenie szybkości przewodnictwa nerwowego oraz przemijających zmian w niektórych parametrach zapisu elektromiograficznego.

## Karbaminiany

Karbaminiany stanowią obok związków fosforoorganicznych jedną z najliczniej reprezentowanych grup pestycydów. Ich szczególne właściwości biologiczne uzależnione od struktury chemicznej sprawiły, że znajdują zastosowanie jako środki owadobójcze, chwastobójcze i grzybobójcze. Działanie toksyczne karbaminianów na organizm człowieka charakteryzuje ogromne zróżnicowanie, niespotykane wśród innych pestycydów. I tak jeden z insektycydów o nazwie aldikarb jest zaliczany do klasy najsilniejszych trucizn dla człowieka gdy z kolei fungicyd o nazwie benomyl nie wywołuje praktycznie zauważalnych objawów zatrucia.

Budowę chemiczną pestycydów karbaminianowych można przedstawić w następujący sposób:



gdzie  $\text{R}^1$  i  $\text{R}^2$  są grupami alkilowymi lub aryłowymi.

Pestycydy karbaminianowe w zależności od zastosowania dzieli się na trzy klasy. Pierwszą klasę stanowią estrowe pochodne karbaminianów stosowane jako insektycydy i nematocydy (środki niecie-

niobójcze). Podstawnikiem  $R^1$  jest grupa metylowa. Do drugiej klasy zalicza się te pestycydy karbaminianowe, które są wykorzystywane jako herbicydy i inhibitory kiełkowania. Podstawnikiem  $R^1$  jest reszta aromatyczna. Trzecia klasa to karbaminiany używane jako fungicydy i zawierające jako podstawnik  $R^1$  ugrupowanie benzimidazolowe.

Zagrożenie dla człowieka przez karbaminiany wynika głównie z nadmiernego narażenia zawodowego, kiedy to dochodzi do zatrucia i wystąpienia objawów ze strony układu nerwowego, jako skutku zahamowania aktywności acetylocholinoesterazy. Objawy zatrucia u ludzi występują po kilku minutach po narażeniu i mogą się utrzymywać przez kilka godzin. Po tym czasie następuje cofanie się objawów zatrucia ze strony układu nerwowego z towarzyszącym temu powrotem obniżonej aktywności cholinoesterazy surowiczej i acetylocholinoesterazy krwinkowej do wartości prawidłowych.

Pestycydy karbaminianowe ulegają w komórkach organizmu ludzkiego przekształceniom w pochodne o zwiększonej polarności i lepiej rozpuszczalne w wodzie. W pierwszym etapie przemian komórkowych karbaminiany zwykle ulegają utlenieniu z udziałem cytochromów P-450. W zależności od obecności różnych grup funkcjonalnych karbaminian może podlegać różnym reakcjom utleniania. Do typowych reakcji utleniania katalizowanych przez cytochromy P-450 można zaliczyć: (a) hydroksylację lub epoksydację pierścienia aromatycznego, (b) O-dealkilację, (c) N-metylohydroksylację, (d) hydroksylację, a następnie utlenienie alifatycznego łańcucha bocznego i (f) utlenienie tioeteru do sulfotlenków i sulfonów. Powstające w reakcji utleniania pochodne hydroksylowe karbaminianów mogą ulegać dalszemu przekształcaniu w polarne pochodne, o większej rozpuszczalności w wodzie, w wyniku reakcji sprzęgania. Prowadzą one do powstania pochodnych O- i N-glukuronidowych, siarczanowych oraz połączeń z kwasem merkapturowym, które są łatwo wydalane z moczem lub kałem.

Jedną z ważniejszych reakcji jakim ulegają karbaminiany po wchłonięciu do organizmu jest reakcja hydrolizy. Ma ona charakter spontaniczny lub następuje wskutek działania esteraz. W wyniku tej reakcji karbaminiany ulegają rozkładowi, dając w wyniku aminę, dwutlenek węgla, alkohol lub fenol. U człowieka w procesie hydrolizy karbaminianów dominującą rolę odgrywa hydroliza z udziałem esteraz. Szybkość tej hydrolizy zależy od budowy chemicznej i rodzaju estrazy.





W hydrolizie karbaminianów uczestniczy grupa enzymów zwana A-esterazami lub aryloesterazami.

Większość karbaminianów należy do silnych inhibitorów acetylocholinoesterazy, nie wymagających aktywacji metabolicznej do ujawnienia tego działania. Jednak niektóre karbaminiany, takie jak na przykład pochodne benzimidazolu, nie hamują aktywności cholinoesterazowej. Karbaminiany, podobnie jak związki fosforoorganiczne, mogą hamować aktywność acetylocholinoesterazy wiążąc się z ugrupowaniem -OH seryny obecnej w centrum aktywnym tego enzymu (proces karbamyłacji). Szybkość regeneracji aktywnego enzymu z nieaktywnej karbamyłowanej acetylocholinoesterazy jest jednak znacznie większa niż to ma miejsce w przypadku pochodnej fosforylowanej przez związki fosforoorganiczne. Z tego powodu narażenie człowieka na pestycydy karbaminianowe nie jest tak niebezpieczne, jak narażenie na pestycydy fosforoorganiczne. Wynika to również z faktu, że różnica między dawką śmiertelną a dawką wywołującą pierwsze, najsłabsze objawy zatrucia jest w przypadku karbaminianów na ogół znacznie większa niż przy związkach fosforoorganicznych. Istnieje znacznie większe prawdopodobieństwo powrotu do normalnego stanu zdrowia po przerwaniu narażenia i prawidłowym leczeniu po zatruciu karbaminianami niż związkami fosforoorganicznymi.

Niektóre N-arylowe karbaminiany mogą hamować aktywność neuropatycznej esterazy docelowej, ale budowa chemiczna tej klasy karbaminianów uniemożliwia wystąpienie procesu „starzenia się” enzymu. Te karbaminianowe inhibitory nie wywołują opóźnionej neuropatii i mogą utrudniać lub zapobiegać wystąpieniu tego działania po narażeniu na związki fosforoorganiczne, jeśli tkankowa neuropatyczna esteraza docelowa wcześniej uległa karbamyłowaniu.

Niebezpieczeństwo dla zdrowia człowieka, wynikające z narażenia na karbaminiany, pojawia się przede wszystkim jako rezultat zahamowania aktywności acetylocholinoesterazy w układzie nerwowym i nagromadzenia się acetylocholino w zakończeniach nerwowych. Objawy towarzyszące zatruciu karbaminianami można zaszeregować do trzech grup:

a) **objawy muskarynowe** (wzrost wydzielania śluzu w górnych drogach oddechowych, pocenie się, ślinotok, łzawienie, zwężenie źrenic, wymioty, biegunka, zwolnienie akcji serca),





b) **objawy nikotynowe** (skurcze włókienek mięśniowych, przypieszenie akcji serca),

c) **objawy z ośrodkowego układu nerwowego** (ból i zawroty głowy, niepokój, drgawki, śpiączka).

Objawy te mogą się pojawiać z różnym nasileniem, w różnych kombinacjach i w różnej kolejności, w zależności od związku chemicznego, dawki i drogi narażenia. W przypadku zatruc wynikających z narażenia na niewielkie dawki karbaminian zwykle obserwuje się jedynie objawy muskarynowe i nikotynowe. Cięższymi przypadkami zatrucia towarzyszą zawsze objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego.

Przy monitorowaniu narażenia na karbaminiany stosuje się jako biomarkery metody enzymatyczne, wykorzystujące pomiar aktywności acetylocholinoesterazy w krwinkach czerwonych lub cholinoesterazy osoczowej (surowiczej). W przypadku karbaminianów stwierdzenie zahamowania aktywności acetylocholinoesterazy lub cholinoesterazy może być utrudnione wskutek odwracalności reakcji zahamowania aktywności tych enzymów. Zasadniczą sprawą jest czas i temperatura przechowywania próbki krwi przed pomiarem aktywności enzymów. Wybrana metoda oznaczania aktywności musi zapewnić możliwie krótki czas hydrolizy substratu.

Monitorowanie narażenia człowieka na karbaminiany można również prowadzić, stosując jako biomarkery oznaczenia karbaminianów lub produkty ich metabolizmu w moczu. Z moczu ekstrahuje się karbaminiany lub ich metabolity, usuwa z ekstraktu substancje interferujące w dalszej analizie, a następnie dokonuje identyfikacji jakościowej oraz ilościowego oznaczenia z zastosowaniem chromatografii gazowej lub cieczowej. Oznaczanie 1-naftolu np. jako siarczanu lub glukuronianu, w moczu osób narażonych na karbaryl (metylokarbaminian 1-naftyłu) jest jedną z metod monitoringu biologicznego w przypadku narażenia na ten związek. Należy zwrócić uwagę na to, aby sposób pobierania moczu oraz jego przechowywanie przed wykonaniem analizy nie stały się źródłem dodatkowego zanieczyszczenia badanej próbki.

## Organochlorowane pestycydy

Pestycydy z tej grupy, takie jak 1,1-bis(p-chlorofenylo)-2,2,2-trichloroetan (DDT), sześćchlorocykloheksan (lindan), chlorodekon (kepon) czy toksofen, były w przeszłości masowo stosowane jako pod-

stawowe środki owadobójcze. Swoimi właściwościami biologicznymi różnią się od niskocząsteczkowych chlorowanych węglowodorów, mających zastosowanie jako rozpuszczalniki, jakkolwiek obie grupy związków mają silne właściwości lipofilne i gromadzą się w tkankach bogatych w lipidy, w tym również i w tkance nerwowej. Niska toksyczność organochlorowanych pestycydów spowodowała masowe ich stosowanie. Konsekwencją tego było to, że prawie wszystkie żywe organizmy, rośliny i zwierzęta, zostały skażone obecnością tych związków, a zwłaszcza DDT. Na masowe skażenie organizmów żywych przez DDT wpłynęła stosunkowo wysoka trwałość chemiczna tego związku. Może on pozostawać w środowisku przez lata w postaci niezmienionej.

Zjawiskiem, które spowodowało wystąpienie zagrożenia toksycznego dla człowieka, a także zwierząt, jest zjawisko bioakumulacji DDT, spowodowane istnieniem tzw. łańcucha pokarmowego. Związek ten z racji swojej niskiej toksyczności występuje w wielu organizmach tego łańcucha nie dając zauważalnych objawów szkodliwych. Organizmy znajdujące się w górnej części tego łańcucha, spożywając organizmy z niższych części, kumulują coraz wyższe stężenia DDT. Na końcu łańcucha pokarmowego jest człowiek. Stąd postępujące skażenie środowiska, flory i fauny, okazało się szczególnie groźne właśnie dla człowieka. Obok narażenia środowiskowego w populacji ludzkiej występują narażenia, wynikające z kontaktu zawodowego, pracy przy produkcji i konfekcjonowaniu organochlorowanych pestycydów. Narastające zagrożenie toksyczne ze strony organochlorowanych pestycydów spowodowało najpierw ograniczenie, a następnie zakaz ich stosowania w wielu krajach. W Stanach Zjednoczonych zakaz taki wprowadzono już w 1972 roku. Tym niemniej nadal istnieje poważne zagrożenie tymi pestycydami, ponieważ są one nadal produkowane na dużą skalę przez niektóre kraje i stosowane przez rolnictwo krajów rozwijających się.

Kliniczne objawy zatrucia powodowane przez neurotoksyny z grupy organochlorowanych pestycydów są odmienne od tych, powodowanych przez związki fosforoorganiczne i karbaminy. Długotrwałe obserwacje osób ekspozowanych przewlekłe na organochlorowane pestycydy nie wskazywały na występowanie u nich zaburzeń ze strony układu nerwowego, które można by powiązać przyczynowo z tą ekspozycją. Lekarze zajmujący się tymi osobami określali występujące u nich zaburzenia neurologiczne jako nerwice lub problemy psychiczne. Na-

tomiast ostra ekspozycja na organochlorowane pestycydy ma przebieg bardzo dramatyczny. Po spożyciu toksycznej dawki, np. toxofenu lub lindanu, po około 20 minutach występują napady padaczkowe, powtarzające się przez kilka godzin. Napady padaczkowe mogą występować jeszcze po kilku tygodniach od wystąpienia intoksykacji. Z tego powodu, że bardzo często ostre zatrucia organochlorowanymi pestycydami zdarzają się u dzieci, lekarze w wielu przypadkach mylnie orzekają przyczynę napadów padaczkowych, przypisując je innym, bardziej powszechnym przyczynom. Chorzy z objawami padaczkowymi spowodowanymi zatruciem organochlorowanymi pestycydami bardzo słabo reagują na podawanie antykonwulsantów. Dotychczas nie zostało ustalone, jaki udział może mieć przewlekła ekspozycja na organochlorowe pestycydy indukowaniu padaczki w populacji zamieszkującej tereny skażone przez organochlorowane pestycydy lub spożywającej pokarm, zawierający te pestycydy. Ustalono natomiast pewne powiązania między przewlekłą ekspozycją środowiskową na chlorodekon a występowaniem objawów drgawkowych. Drgawki nie występują w czasie odpoczynku i snu. Pojawiają się one podczas próby osiągnięcia jakiegoś przedmiotu lub próbie utrzymania rąk na określonym poziomie. Objawy utrzymują się przez około 6 tygodni po zaprzestaniu ekspozycji na chlorodekon. Stwierdzono również występowanie oczopląsu. W leczeniu zatruc organochlorowymi pestycydami bardzo skuteczne okazało się doustne podanie cholestyraminy. Podanie jej powodowało znaczne skrócenie półokresu zanikania chlorodekonu z krwi. Cholestyramina, żywica jonowymienna, która wiąże kwasy żółciowe, wiąże także chlorodekon. W postaci związanej z cholestyraminą jest on wydalany z kałem, nie wracając do krążenia. Podanie np. 16 gramów cholestyraminy zwiększa zawartość chlorodekonu w kale prawie siedmiokrotnie. Półokres tego pestycydu we krwi skraca się w tych warunkach ze 165 dni do 80 dni.

Biomarkerem, oceniającym wystąpienie i rozmiar ekspozycji na organochlorowe pestycydy jest pomiar ich stężenia we krwi. Pomiar ten ma jednak dość ograniczoną wartość diagnostyczną i prognostyczną, ponieważ nie jest znana zależność dawka – odpowiedź.

## Rozpuszczalniki

Lista cieczy i gazów, które są wykorzystywane jako rozpuszczalniki, jest bardzo długa. Najczęściej stosowanymi są n-heksan, kero-

sen, benzen, toluen, trimetylobenzeny, dwusiarczek węgla, bromek i chlorek metylu, trichloroetylen, trichloroetan, alkohol metylowy i propylowy, metylo-n-butylo keton, aceton, formaldehyd, fenole i krezole. Wszystkie one są związkami organicznymi i charakteryzują się niskim ciężarem cząsteczkowym. Nie ma w zasadzie przemysłu, w którym nie są stosowane rozpuszczalniki. To spowodowało, że stanowią one jeden z głównych elementów skażenia chemicznego środowiska pracy i bytowania człowieka. Z racji swej dużej lotności rozpuszczalniki skażają głównie środowisko, jako skutek niewłaściwego ich przechowywania, czy uwalniania się w czasie ich stosowania w różnych procesach produkcyjnych.

Szkodliwe skutki działania rozpuszczalników w organizmie są rezultatem interakcji z lipidowymi i białkowymi składnikami błon komórkowych. Rozpuszczalnik, penetrując lipidowy fragment błony, wpływa na zmianę jej płynności i przyczynia się do zmiany aktywności enzymów biorących udział w transporcie jonów ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ). Rozpuszczalniki mogą wpływać na zmianę stanu czynnościowego układów neurotransmisyjnych, w tym adrenergicznego, cholinergicznego i dopaminergicznego. Znane jest, że węglowodory aromatyczne wywierają inhibujący wpływ na aktywność acetylocholinoesterazy. Z kolei toluen i ksylen, w warunkach wysokiego narażenia na te substancje, zwiększają przemianę i uwalnianie amin katecholowych. Jednym ze skutków neurotoksycznego oddziaływania rozpuszczalników organicznych są zmiany w czynności receptorów GABA-ergicznych oraz hydroksytryptaminowych. Upośledzenie transportu aksonalnego może prowadzić do wystąpienia neuropatii, będącej skutkiem zwyrodnienia nerwów czuciowych i ruchowych.

### Przykłady rozpuszczalników o właściwościach neurotoksycznych

**Styren.** Substancja ta jest bardzo ważnym rozpuszczalnikiem stosowanym w czasie produkcji wielu polimerów i kopolimerów, włączając w to polistyren, gumy styrenoakrylonitrylowe i styrenobutadienowe. Podobnie jak dla większości rozpuszczalników, ostra ekspozycja na wysokie stężenia styrenu powoduje podrażnienie i stany zapalne w układzie oddechowym oraz skóry, a także depresję układu nerwowego. W warunkach przewlekłej ekspozycji może się ujawnić toksyczne

oddziaływanie na układ reprodukcyjny oraz właściwości kancerogenne. Badania *in vitro* wykazały, że tlenowe metabolity styrenu są odpowiedzialne za genotoksyczność oraz szkodliwe skutki występujące na różnych etapach rozwojowych zwierząt i człowieka. Ekspozycja na styren ujawnia również swoje skutki neurotoksyczne. Szereg badań, w których oceniano stan zdrowotny osób zawodowo ekspozowanych na styren, wykazało znamiona i objawy charakterystyczne dla toksycznego uszkodzenia centralnego układu nerwowego.

Szerokie rozpowszechnienie styrenu i produktów pochodnych powoduje ogromne zainteresowanie problemami rozwoju metod, umożliwiających monitoring biologiczny populacji mających kontakt z tymi substancjami. Styren jest metabolizowany do tlenku styrenu przez cytochrom P-450. Powstający toksyczny metabolit epoksydowy może ulec detoksykacji z udziałem transferazy S-glutationowej i/lub hydrolazy epoksydowej. U człowieka detoksykacja z udziałem hydrolazy epoksydowej ma istotniejsze znaczenie niż ta, zachodząca z udziałem transferazy S-glutationowej. W moczu osób narażonych na styren jako główne metabolity przemian ustrojowych tego węglowodoru wykrywa się kwas migdałowy i kwas fenyloglioksylowy. Oznaczenia tych metabolitów w moczu oraz oznaczenia styrenu we krwi i powietrzu wydychanym są stosowane jako biomarkery ekspozycji. W populacji generalnej stwierdza się bardzo znaczne różnicowanie osobnicze w wydalaniu z moczem metabolitów styrenu. Dotyczy ono różnicowanego wydalania optycznych enantiomerów kwasu migdałowego. Ma to być skutkiem występowania w komórkach ekspozowanych osób polimorficznych form cytochromu P-450 lub hydrolazy epoksydowej, które powodują powstawanie zmiennych ilości R- lub S – 7,8-tlenku styrenu. Należy zauważyć, że enantiomer R- 7,8-tlenku styrenu ma silniejsze właściwości genotoksyczne niż enantiomer S. 7,8-tlenek styrenu tworzy addukty z hemoglobina (z resztą N-waliny), a pomiar ilości tego adduktu jest wykorzystywany w monitorowaniu ekspozycji na styren. Niektórzy badacze uważają, że niska skuteczność tlenku styrenu w tworzeniu adduktów z hemoglobina nie daje podstaw do wykorzystania pomiaru tych adduktów jako biomarkera ekspozycji.

Pomiary stężenia styrenu we krwi oraz w powietrzu wydychanym, a także pomiary ilości wydalanych w moczu wymienionych wcześniej metabolitów, jakkolwiek są uznanymi biomarkerami ekspozycji, to żaden z tych biomarkerów nie wykazuje powiązań ze skutkami

neurotoksycznymi. Dotychczas nie znamy ani specyficznych miejsc docelowych w komórkach układu nerwowego dla styrenu i jego tlenowych metabolitów ani roli jaką odgrywają one w zjawisku neurotoksyczności. Na ten temat istnieją tylko cząstkowe informacje i pochodzą one z badań na zwierzętach. Badania doświadczalne na szczurach wykazały, że skutkiem ekspozycji na styren jest obniżenie zawartości glutationu w komórkach mózgowych, co jest w przeważającej swej części spowodowane reakcjami detoksykacji tlenu styrenu zachodzących z udziałem transferazy S-glutationowej. Zaobserwowano również, że jednym ze skutków ekspozycji zwierząt na styren jest wzrost zawartości specyficznego dla astrocytów kwaśnego glicynowego białka włóknkowego (GFAP – glial fibrillary acidic protein). Może to być odzwierciedleniem reaktywnej astrogliozы w odpowiedzi na podanie styrenu lub uszkodzenia neuronów przez tlenek styrenu. Badania *in vitro*, jakie przeprowadzono na komórkach PC12 wykazały, że tlenek styrenu powoduje wystąpienie niedoboru komórkowego glutationu i ATP. Skutkiem tego jest wzrost stężenia wapnia zjonizowanego w komórce oraz indukcja endonukleazy, co prowadzi do uszkodzenia DNA. Badania na zwierzętach wykazały również, że styren może wywierać wpływ na metabolizm dopaminy przez powodowanie wzrostu liczby receptorów D2. Wzrost liczby receptorów może być skutkiem reakcji kompensacyjnej na obniżony poziom dopaminy, wynikający z jej wiązania przez kwas fenylloglioksylowy, metabolit styrenu. Te dane znalazły swoje potwierdzenie w obserwacji, że u pracowników narażonych na styren stwierdza się zwiększony poziom prolaktyny we krwi. Uwalnianie prolaktyny z przedniego płata przysadki jest hamowane przez dopaminę.

Oddziaływania styrenu na metabolizm amin katecholowych znalazły również swoje potwierdzenie w badaniach doświadczalnych oraz obserwacjach, jakie przeprowadzono u osób eksponowanych na styren. I tak, u szczurów eksponowanych na styren wykazano obniżenie aktywności monoaminooksydazy B (MAO B) w mózgu. Natomiast u osób pracujących w narażeniu na styren wykryto obniżenie aktywności tego enzymu w płytkach krwi. Obniżenie aktywności MAO B było skorelowane z wielkością narażenia na styren. Obniżenie aktywności MAO B wydaje się charakterystyczne dla działania styrenu. Nie zaobserwowano bowiem, aby takie zmiany wystąpiły w płytkach krwi osób eksponowanych na inne rozpuszczalniki, w tym perchloroetylen i toluen. Z kolei wykryto obniżoną aktywność dopamino- $\beta$ -hydroksylazy (DBH) w suro-

wicy krwi osób zawodowo narażonych na styren lub toluen. Obniżona aktywność tego enzymu była spowodowana hamującym oddziaływaniem metabolitów, fenolu i krezolu. Natomiast nie wykazano, aby ekspozycja na trichloroetylen powodowała istotne zmiany w aktywności DBH. Udział MAO B i DBH w metabolizmie amin katecholowych pozwala na wysunięcie sugestii, że zmiany aktywności tych enzymów mogą mieć powiązania z toksycznym oddziaływaniem styrenu na układ nerwowy, a pomiar ich aktywności może być cennym wskaźnikiem biologicznym (biomarkerem) tych oddziaływań toksycznych.

**Akrylamid.** Rozpuszczalnik ten jest stosowany w syntezie poliakrylamidów, mających różnorodne zastosowania w wielu gałęziach przemysłu i gospodarki. Związkowi temu jakkolwiek przypisuje się toksyczne oddziaływania na układ reprodukcyjny oraz właściwości kancerogenne w oparciu o wyniki badań doświadczalnych na zwierzętach, to u ludzi toksyczne właściwości tego rozpuszczalnika ujawniają się najbardziej w układzie nerwowym. Neurotoksyczność akrylamidu wyraża się w sposób najbardziej zauważalny jako dystalna aksonopatia. Neurotoksyczne właściwości akrylamidu, prowadzące do wystąpienia neuropatii obwodowej, zostały potwierdzone zarówno w badaniach doświadczalnych na zwierzętach, jak również w badaniach osób zawodowo narażonych na tę substancję. Dotychczas nie udało się wyjaśnić, czy za występujące skutki neurotoksyczne odpowiedzialny jest sam akrylamid, czy skutki te są wynikiem połączonego działania akrylamidu i jego oksydacyjnego metabolitu, glicynamidu, powstającego w wyniku reakcji katalizowanej przez cytochrom P-450. Badania biochemiczne, behawioralne i morfologiczne wykazały, że jakkolwiek oba związki mają właściwości neurotoksyczne, to ujawniają się one silniej w przypadku akrylamidu. Potwierdzeniem wyższego potencjału neurotoksycznego akrylamidu było stwierdzenie, że związek ten tworzy trzykrotnie więcej adduktów z hemoglobina niż glicynamid, podawany w takich samych dawkach. Wczesne badania, dotyczące rozmieszczenia akrylamidu znakowanego węglem  $^{14}\text{C}$  u szczurów wykazały, że najwyższy poziom radioaktywności stwierdza się w erytrocytach. Kolejne badania wykryły, że akrylamid wiąże się nie tylko z hemoglobina, ale również z resztami cysteiny, obecnymi w białkach mózgowych. Dalsze badania wykazały, że dla oceny ekspozycji na akrylamid najkorzystniejsze jest oznaczanie adduktu, jakie akrylamid lub jego metabolit, glicynamid, tworzą z N-końcową walina.

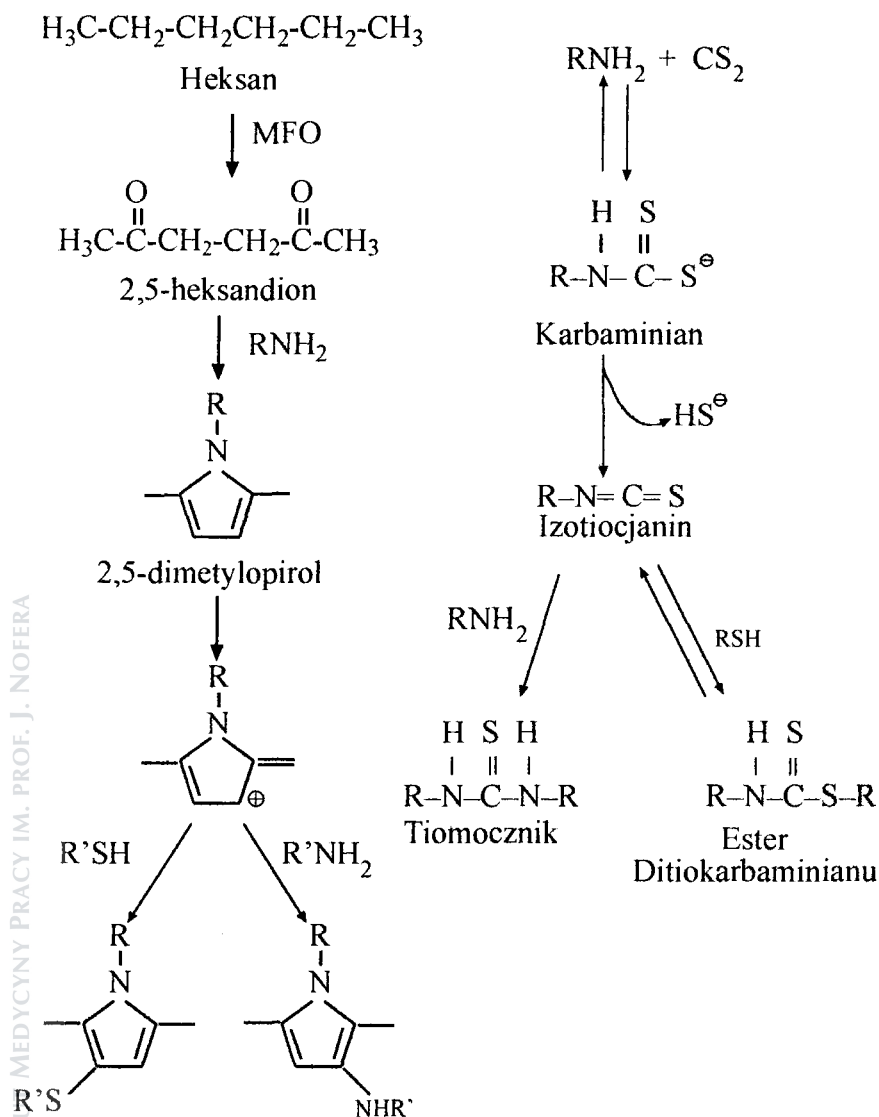


Mechanizm wywoływania neuropatii obwodowej przez akrylamid pozostaje nie wyjaśniony. Jakkolwiek przypuszcza się, że kowalencyjne związanie akrylamidu lub glicynamidu z białkami aksonalnymi może reprezentować sobą jeden z etapów w patogenezie tej neuropatii.

Badania, jakie przeprowadzono u pracowników ekspozowanych na akrylamid zdają się potwierdzać przydatność pomiaru adduktów, jakie tworzy on z hemoglobina, jako biomarkera ekspozycji. Wykazano, że tzw. indeks nurotoksyczności (wyznaczony na podstawie objawów neurologicznych oraz ilościowych wskaźników dysfunkcji nerwów obwodowych) był znamienne skorelowany z poziomem adduktów, jakie akrylamid tworzył z hemoglobina. Indeks ten korelował również z ilością kwasów merkapturowych wydalanych z moczem, a także czasem pracy w narażeniu na akrylamid. Brak było natomiast korelacji między wartością indeksu nurotoksyczności a wielkością ekspozycji ocenianej na podstawie pomiarów stężenia akrylamidu w powietrzu oraz pomiarów stężenia tego związku we krwi narażonych pracowników.

**n-heksan.** Neurotoksyczność tego rozpuszczalnika była najpierw wykryta u ludzi, a następnie potwierdzona w badaniach na zwierzętach. Objawy neurotoksyczności n-heksanu związane są z wystąpieniem drętwienia, a następnie osłabieniem mięśni rąk i stóp. Jeśli ekspozycja jest kontynuowana dochodzi do postępującej utraty czucia i funkcji ruchowych. Obserwacje u ludzi oraz badania na zwierzętach określiły tę neuropatię jako typ specyficznej aksonopatii dystalnej. Inny rozpuszczalnik, metylo-n-butyloketon, który podobnie jak n-heksan ulega przemianom komórkowym poprzez taki sam toksyczny metabolit, 2,5 heksandion, także powoduje powstanie neuropatii czuciowo-motorycznej. Patogeneza neuropatii powodowanej przez n-heksan została już częściowo wyjaśniona. Reakcja 2,5-heksadionu (i innych  $\gamma$ -diketonów, ale nie diketonów z ugrupowaniami ketonowymi w innych pozycjach) z grupą aminową lizyny obecnej w łańcuchu polipeptydowym białek prowadzi, poprzez serię stadiów pośrednich, do utworzenia adduktów określanych mianem piroli. Badania z diastereoizomerami 3,4-dimetylo-2,5-heksadionu wykazały, że utworzenie piroli jest krytycznym etapem w sekwencji zdarzeń, które prowadzą do aksonopatii. Kolejne badania wykryły, że jakkolwiek tworzenie piroli jest niezbędne dla ujawnienia neurotoksyczności, to nie jest ono wystarczające. Okazało się, że musi jeszcze dojść do utlenienia piroli i utworzenia, z udziałem utlenionego piroli, wiązań krzyżowych między neurofilamentami (ryc. 5).





Ryc. 5. Molekularny mechanizm tworzenia wiązań krzyżowych w białkach neurofilamentów przez 2,5-heksandion i dwusiarczekwęglą (CS<sub>2</sub>).

Oceny rozmiarów ekspozycji zawodowej na n-heksan dokonuje się stosując jako biomarker ekspozycji oznaczanie ilości wydalanego z moczem toksycznego metabolitu, 2,5-heksadionu. Pomiary takie umożliwiają dokonanie tylko niedawno przebytej ekspozycji, rzędu od kilku godzin do kilku dni. Ostatnio do oceny rozmiarów ekspozycji na n-heksan został wprowadzony nowy biomarker, oznaczanie adduktów pirolowych z makrocząsteczkami komórkowymi. Ten biomarker umożliwia dokonanie kumulatywnej, trwającej tygodnie i miesiące, oceny ekspozycji na n-heksan. Badania doświadczalne na szczurach eksponowanych na n-heksan wykazały, że ilość tworzonych adduktów pirolowych z hemoglobina erycytarną jest proporcjonalna zarówno do wielkości dawki n-heksanu jak i czasu trwania ekspozycji. Ponieważ wcześniej wykazano, że tworzenie adduktów pirolowych może być przyczynowo powiązane z powstawaniem neuropatii, hemoglobina może być użyta jako surrogat dla białek neurofilamentów komórek układu nerwowego w warunkach oceny ekspozycji na n-heksan *in vivo*. Uważa się, że ilościowy pomiar pirolowych adduktów hemoglobiny może być wykorzystany nie tylko jako biomarker ekspozycji, ale również jako biomarker skutków, jakie wywołuje ekspozycja na n-heksan w układzie nerwowym. To ostatnie zastosowanie pomiaru adduktów pirolowych wymaga jednak dalszych badań nad ustaleniem zależności dawka – odpowiedź w aspekcie ryzyka neurotoksycznego związanego z tworzeniem przez metabolity n-heksanu.

Tworzenie wiązań krzyżowych między neurofilamentami aksonów obwodowych jest krytycznym etapem w procesie neuropatii indukowanej przez n-heksan. Wykonanie ilościowego pomiaru tych wiązań w dostępnym materiale tkankowym może być wykorzystane jako biomarker ekspozycji na ten rozpuszczalnik i/lub biomarker skutków zdrowotnych. Dotychczas prowadzone badania zdają się wskazywać, że takim biomarkerem może być spektryna, obecna w erytrocytach. Podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  tego białka obecne są po wewnętrznej (cytoplazmatycznej) stronie błony erycyty. Tworzone w obecności ketonowego metabolitu n-heksanu (2,5-heksadionu) wiązania krzyżowe między heterodimerami  $\alpha$  i  $\beta$  mogą być wykryte za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem dodecylosiarczanu sodu. Diketony, które nie wykazują właściwości neurotoksycznych nie tworzą wiązań krzyżowych między podjednostkami spektryny.

**Dwusiarczek węgla.** Ekspozycja na dwusiarczek węgla ( $CS_2$ ), obok szeregu różnych oddziaływań na tkanki i narządy osób narażonych,

powoduje również wystąpienie objawów neurotoksycznych. Najczęstszym skutkiem neurotoksycznym powstającym w wyniku ekspozycji na CS<sub>2</sub> jest neuropatia czuciowo-motoryczna określana jako aksonopatia neurowłókienna. Pomimo znacznego zróżnicowania w strukturze chemicznej CS<sub>2</sub> i n-heksanu, obie substancje powodują występowanie identycznych neuropatii. W odróżnieniu jednak od n-heksanu, przewlekła ekspozycja na CS<sub>2</sub> także prowadzi do rozwinięcia się encefalopatii, której mechanizm powstawania nie został dotychczas wyjaśniony. Indukowane przez CS<sub>2</sub> powstawanie wiązań krzyżowych między neurofilamentami jest spowodowane reakcją tego rozpuszczalnika z ugrupowaniami nukleofilowymi (-SH oraz -NH<sub>2</sub>) reszt aminokwasowych białek tworzących te struktury (ryc. 5). Powstające ditiokarbaminiany przekształcają się w addukty izotiocyanowe, które w wyniku nukleofilowej addycji z ugrupowaniem sulfhydrylowym lub aminowym tworzą kowalencyjne wiązania estrowe ditiokarbaminianowe i tiomocznikowe. Powstanie wiązań tiomocznikowych ma charakter nieodwracalny. Poznanie mechanizmu tworzenia wiązań krzyżowych w białkach neurofilamentów przez CS<sub>2</sub> nasunęło możliwość wykorzystania tego zjawiska w poszukiwaniu odpowiednich biomarkerów dla oceny neurotoksyczności w obwodowym układzie nerwowym. Wykryto, że spektryna erytrocytarna ulega dimeryzacji pod wpływem CS<sub>2</sub>, a ilość gromadzonych w erytrocytach dimerów spektryny jest proporcjonalna do czasu ekspozycji i wielkości dawki CS<sub>2</sub>. Bardzo ważną była obserwacja, że dimery spektryny mogą być wykryte zanim pojawią się kliniczne lub morfologiczne cechy neurotoksyczności. Zaobserwowano również, że siarczek karbonylu, powstający w wyniku oksydacyjnego metabolizmu CS<sub>2</sub> z udziałem nieznannej jeszcze izoformy cytochromu P-450, może także powodować powstanie wiązań krzyżowych w neurofilamentach. Udział siarczku karbonylu w zjawisku neurotoksyczności powodowanej przez CS<sub>2</sub> w obwodowym układzie nerwowym nie jest znany. Biorąc jednak pod uwagę występowanie polimorfizmu cytochromów P-450, w tym przypuszczalnie i tej formy utleniającej CS<sub>2</sub>, należy się spodziewać istotnego zróżnicowania osobniczego w reakcjach neurotoksycznych powodowanych przez oba te związki siarkowe.

**Trimetylobenzen.** Trimetylobenzen występuje w trzech formach izomerycznych: 1,2,3-trimetylobenzen (hemimeliten), 1,3,5-trimetylobenzen (mezytylen) oraz 1,2,4-trimetylobenzen (pseudokumen). Stosowany jest jako składnik mieszanin rozpuszczalników przy pro-

dukcji farb i lakierów. Ponadto używany jest przy produkcji tworzyw sztucznych, różnego rodzaju polimerów (polietylenowych, polipropylenowych, poliamidowych), gum, żywic, wosków, parafin, środków odłuszczających i czyszczących, a także przy produkcji niektórych pestycydów. Wchodzi także w skład niektórych paliw samochodowych. Badania epidemiologiczne wykazały, że przewlekłe, zawodowe narażenie na trimetylobenzen (pseudokumen zawarty w rozcieńczalniku) wywołuje bóle głowy, nadmierną drażliwość. Można to przypisać zaburzeniom czynnościowym układu nerwowego. Potwierdzeniem tego mogą być badania neurobehawioralne, przeprowadzone na zwierzętach narażonych na trimetylobenzen (psudokumen i hemimeliten). Wykazały one, że długotrwałe narażenie szczurów na trimetylobenzen prowadzi do zaburzeń czynnościowych w ośrodkowym układzie nerwowym, objawiających się jako upośledzenie zdolności hamowania reakcji ruchowej w sytuacji zagrożenia. Niektórzy badacze uważają, że powtarzane narażenie na trimetylobenzen może prowadzić do wystąpienia zjawiska uwrażliwienia. Pod tym pojęciem rozumie się postępujący stopniowo i długotrwały wzrost reaktywności behawioralnej oraz poziomu neurotransmiterów i gęstości receptorów (przypuszczalnie głównie w układzie dopaergicznym). Zjawisko uwrażliwienia może być odpowiedzialne za występowanie zespołu nadwrażliwości na substancje chemiczne (multiple chemical sensitivities – MCS), stanu chorobowego charakteryzującego się występowaniem różnorodnych zaburzeń psychicznych i dolegliwości somatycznych po narażeniu na substancje chemiczne w stężeniach, które nie powinny wywoływać żadnych skutków biologicznych. Wśród substancji wskazywanych przez pacjentów z MCS, jako czynniki sprawcze ich dolegliwości, rozpuszczalniki organiczne, obok pestycydów, zajmują czołowe miejsce. Ponadto istnieje pewne podobieństwo w symptomatologii MCS i łagodnej formy neurologicznego zespołu rozpuszczalnikowego. Zarówno w przypadku rozpuszczalników, jak też pestycydów fosforoorganicznych, narażenie na te substancje może wywołać długotrwałe skutki neurobehawioralne. Wykazano występowanie wyraźnego podobieństwa w wynikach badań psychologicznych w grupach osób zawodowo narażonych na rozpuszczalniki organiczne oraz grupach osób z MCS.

Zalecanym biomarkerem ekspozycji na trimetylobenzen (w tym jego izomery) jest oznaczanie stężenia tego związku w krwi kapilarnej



z zastosowaniem chromatografii gazowej lub oznaczanie ilości wydalonego z moczem kwasu dimetylohipurowego.

## Metale

Metale stanowią specyficzną grupę neurotoksyn. W odróżnieniu od większości innych neurotoksyn nie ulegają metabolizmowi. Nie ulegają one aktywacji ani deaktywacji z udziałem systemów enzymatycznych biorących udział w przemianach ksenobiotyków. W grupie metali, którym można przypisać właściwości neurotoksyczne, szczególną pozycję zajmuje **ołów**. Obecność tego pierwiastka w organizmie człowieka w zwiększonych stężeniach prowadzi do rozwinięcia się encefalopatii. Objawy encefalopatii mogą wystąpić u dzieci przy stężeniach ołowiu we krwi przekraczających 80  $\mu\text{g/dl}$ , a dorosłych powyżej 100  $\mu\text{g/dl}$ . Objawy encefalopatii ołowiczej zaczynają się sennością i zawrotami głowy. Dalej dochodzi do postępującej utraty świadomości, śpiączki i zgonu.

Jednym z ważniejszych mechanizmów toksycznego działania ołowiu na układ nerwowy jest powodowanie przez ten metal zaburzeń w synaptycznym uwalnianiu neurotransmiterów. Uważa się, że ołów może zastępować wapń, a możliwie również cynk, w jonozależnych reakcjach chemicznych zachodzących na poziomie synapsy. Powoduje to wystąpienie zaburzeń w różnego rodzaju systemach przekąźnikowych, np. cholinergicznym, noradrenergicznym, GABAergicznym i dopaergicznym. Zaobserwowano, że mikromolarne stężenia ołowiu powodują aktywację kinazy C w komórkach wyściełających naczynia krwionośne. Ta  $\text{Ca}^{2+}$  zależna kinaza funkcjonuje w systemie przekąźnikowym, regulującym metabolizm komórkowy. Hamowanie aktywności  $\text{Ca}^{2+}$ -zależnej kinazy C przez ołów doprowadza do upośledzenia metabolizmu komórek tworzących barierę krew – mózg i w konsekwencji do zwiększenia przepuszczalności tej bariery.

Ołów może również zastępować wapń w reakcjach biochemicznych zależnych od obecności kalmoduliny (białka wiążącego wapń), co powoduje zwolnienie, a nawet zahamowanie. Przykładem może być hamowanie aktywności związanej z błoną komórkową  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy, a także zakłócenia w uwalnianiu wapnia z mitochondriów i związanych z tym zaburzeń energetycznych. Skutki te mają charakter zmian odwracalnych jeśli w odpowiednim czasie ołów zostanie usunięty ze

środowiska komórkowego. W zatruciach ołowiem obserwuje się segmentalną demielinizację oraz degenerację aksonalną. Towarzyszy temu postępująca dysfunkcja nerwów obwodowych co znajduje swój wyraz w zwolnieniu przewodnictwa nerwowego.

Najlepszym biomarkerem, umożliwiającym dokonanie oceny ekspozycji na ołów, jest oznaczanie stężenia tego pierwiastka we krwi. Natomiast nie dysponujemy wiarygodnymi biochemicznymi biomarkarami skutków, jakie ekspozycja na ołów powoduje w układzie nerwowym. Są doniesienia wskazujące, że genetycznie uwarunkowana niska aktywność dehydratazy kwasu delataaminolewulinowego może przyczynić się do zwiększenia osobniczej podatności na neurotoksyczne oddziaływania ołowiu.

Metalem, któremu można przypisać właściwości neurotoksyczne jest **rtęć**. Dotyczy to zarówno rtęci nieorganicznej jak i organicznej, **metylortęci**. Ekspozycja na pary rtęci powoduje wystąpienie utraty pamięci, zwiększoną pobudliwość, a także wystąpienie halucynacji. Znacznie szerszy zespół objawów neurotoksycznych występuje w warunkach ekspozycji na metylortęć. Klinicznie stwierdza się wystąpienie niedowładu dystalnych części kończyn, spowolnienie wymowy, osłabienie, niezdolność do koncentracji, utratę słuchu, omamy wzrokowe, drżenia i skórcze. W obrazie neuropatologicznym obserwuje się ogniskowe zmiany martwicze neuronów, występujące w obrębie kory mózgu i móżdżku. Zmianom tym towarzyszą liza komórek, nasilenie procesu fagocytozy oraz przerost komórek glejowych. Uważa się skutki neurotoksyczne obserwowane w neuronach mózgu wynikają z interakcji metylortęci z DNA i RNA oraz jej wiązania się grupami sulfhydrylowymi białek. Skutkiem tego są zmiany w strukturze drugorzędowej DNA oraz zakłócenia w syntezie RNA. Wykazano również uszkadzający wpływ metylortęci na mikrotubule neuronów.

Od szeregu lat obserwuje się coraz więcej przypadków wystąpienia objawów toksycznych ze strony układu nerwowego, powodowanych przez ekspozycję środowiskową i zawodową na **aluminium**. Wielu badaczy zwraca uwagę na możliwe powiązania występowania choroby Alzheimera z ekspozycją na aluminium.

W świetle dotychczasowych badań lista metali, którym można przypisać właściwości neurotoksyczne jest coraz dłuższa i poza wymienionymi wcześniej obejmuje metale takie jak **tal, mangan, arsen, lit, cyna, kadm**.

1. Aaserud O., Hommeren O.J., Tvedt B., Nakstad P., Mowe G., Efskind J., Russel D., Jorgensen J.B., Nyberg-Hanson R., Rootwelt K., Gjerstad I.: Carbon disulfide exposure and neurotoxic sequelae among viscose rayon workers. *Am J Ind Med* 18, 25, 1990.
2. Abdel Moneim I., Shamy M.Y., El-Gazzar R.M., El-Fawal H.A.N.: Autoantibodies to neurofilaments, glial fibrillary acidic protein and myelin basic protein in workers exposed to lead. *Toxicologist* 14, 291, 1994.
3. Abou-Donia M.B., Lapadula D.M.: Mechanisms of organophosphorous ester-induced delayed neurotoxicity: type I and Type II. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 30, 405, 1990.
4. Anandatheerthavarda H.K., Williams J.F., Wecker I.: The chronic administration of nicotine induces cytochrome P450 in rat brain. *J Neurochem* 60, 1941, 1993.
5. Anger W.K.: Worksite behavioral research: results, sensitive methods, test batteries and the transition from laboratory data to human health. *Neurotoxicology* 18, 629, 1990.
6. Anthony D.C., Montine T.J., Graham D.G.: Toxic responses of the nervous system. W: Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. C.D. Klaassen (red). Wyd. 5. McGraw-Hill, New York, St. Louis, San Francisco, 463, 1996.
7. Anthony D.C., Amaranch V., Simons G.R., St. Clair M.B.G., Moody M.A., Graham D.G.: Accumulation of pyrrole residues as the molecular basis of cumulative neurotoxic dose of 2,5-hexanedione. *J Neuropathol Exp Neurol* 47, 325, 1988.
8. Arfini G., Mutti A., Vescovi P., Ferroni C., Ferrati M., Giasoli C., Passeri M., Franchini I.: Impaired dopaminergic modulation of pituitary secretion in workers occupationally exposed to styrene: further evidence from PRL-response to TRH stimulation. *J Occup Med* 29, 826, 1987.
9. Armstrong M., Daly A.K., Chalerton S., Bateman D.N., Idle J.R.: Mutant debrisoquine hydroxylation genes in Parkinson's disease. *Lancet* 339, 1017, 1992.
10. Barrio J.P., Huang S.C., Phelps M.E.: In vivo assessment of neurotransmitter biochemistry in humans. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 28, 213, 1988.
11. Becking G. C., Boyes W. K., Damstra T., MacPhail R.: Assessing the neurotoxic potential of chemicals - a multidisciplinary approach. *Environ Res* 61, 164, 1993.
12. Bell I.R.: Clinically relevant EEG studies in psychophysiological findings: possible neural mechanisms for multiple chemical sensitivity. *Toxicology* 111, 101, 1996.
13. Bell I.R., Schwartz G.E., Baldwin C.M., Haradin E.E.: Individual differences in neural sensitization and the role of context in illness from low-level environmental chemical exposure. *Environ. Health Perspect.* 105, 457, 1997.
14. Bergmark E., Callemann C.J., He F., Costa L.G.: Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 120, 45, 1993.
15. Bergmark E., Callemann C.J., Costa L.G.: Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 111, 352, 1991.
16. Callemann C.J., Bergmark E., Costa L.G.: Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem Res Toxicol* 3, 406, 1990.
17. Callemann C.J., Wu Y., He F., Tian G., Bergmark E., Zhang S., Deng H., Wang Y., Crofton K.M., Fennel T., Costa L.G.: Relationships between biomarkers of exposure and neurological effects in a group of workers exposed to acrylamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 126, 361, 1994.
18. Castodli A.F., Coccini T., Rossi A., Nicotera P., Costa L.G., Tan X.X., Manzo L.: Biomarkers in environmental medicine: alterations of cell signaling as early indicators of neurotoxicity. *Funct Neurol* 9, 101, 1994.
19. Charonnet A., Lockridge O.: Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 260, 625, 1989.



20. Checkoway H., Costa L.G., Camp J., Coccini T., Daniell W.E., Dills R.L.: Peripheral markers of neurochemical function among workers exposed to styrene. *Br J Ind Med* 49, 560, 1992.
21. Checkoway H., Echeverria D., Moon J.D., Heyer N., Costa L.G.: Platelet monoamine oxidase B activity in workers exposed to styrene. *Int Arch Occup Environ Health* 66, 359, 1994.
22. Cherry N., Gautrin D.: Neurotoxic effects of styrene: further evidence. *Br J Ind Med* 47, 29, 1990.
23. Chorostowska-Wynimko J.: Ksenobiotyki jako regulatory apoptozy. W: Wpływ ksenobiotyków na organizm zwierząt i człowieka. A.K. Siwicki (red.), Wyd. IRS, Olsztyn, 65, 1999.
24. Christakopoulos A., Bergmark E., Zorcec V., Norppa H., Maki-Pankkanen J., Osterman-Golkar S.: Monitoring occupational exposure to styrene from hemoglobin adducts and metabolites in blood. *Scand J Work Environ Health* 19, 255, 1993.
25. Costa L.G.: Peripheral models for the study of neurotransmitter receptors: their potential application to occupational health. W: Occupational and Environmental Chemical Hazards. V. Foa, E.A. Emmett, M. Maroni, A. Colombi (red.). Ellis Harwood Ltd., Chichester, 1987.
26. Costa L.G.: Effect of neurotoxicants on brain neurochemistry. W: Neurotoxicology. H. Tilson, C. Mitchell (red.). Raven Press, New York, 1992.
27. Costa L.G.: Peripheral models for the study of neurotransmitter receptors: their potential application to occupational health. W: Occupational and Environmental Chemical Hazards. V. Foa, E.A. Emmerr, M. Maroni, A. Colombi (red.). Ellis Horwood, Chichester, 1987.
28. Costa L.G.: Biomarker research in Neurotoxicology: The role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *Environ Health Perspect (Suppl. 1)*, 104, 55, 1996.
29. Costa L.G., Deng H., Gregotti C., Manzo L., Faustman E.M., Bergmark E., Calleman C.J.: Comparative studies on the neuro- and reproductive toxicity of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Neurotoxicology* 13, 219, 1992.
30. Costa L.G., Deng H., Calleman C.J., Bergmark E.: Evaluation of the neurotoxicity of glycidamide, an epoxide metabolite of acrylamide: Behavioral, neurochemical and morphological studies. *Toxicology* 98, 151, 1995.
31. Costa L.G., Manzo L.: Biochemical markers of neurotoxicity: research strategies and epidemiological applications. *Toxicol Lett* 77, 137, 1995.
32. Costa L.G., Omiecinski C.J., Faustman E.M., Omenn G.S.: Ecogenetics: determining susceptibility to chemical-induced diseases. *Wash Public Health* 11, 8, 1993.
33. Costa P., Auger C.B., Traver D.J., Costa L.G.: Identification of m3, m4 and m5 subtypes of muscarinic receptor mRNA in human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 60, 45, 1995.
34. DeVoto E., Yokel R.A.: The biological speciation and toxicokinetics of aluminium. *Environ. Health Perspect* 102, 940, 1994.
35. Eadsforth C.V.: Determination of urinary dimethyl phosphate by gas-liquid chromatography. Manual of analytical methods. WHO, Cremona, 1985.
36. Ecobichon D.J.: Toxic effects of pesticides. W: Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. C.D. Klassen (red.). McGraw-Hill, New York, St. Louis, San Francisco, 1996.
37. Festing M.F.W.: Genetic factors in neurotoxicology and neuropharmacology: a critical evaluation of the use of genetics as a research tool. *Experientia* 47, 990, 1991.
38. Gallo M.A., Lawryk N.J.: Organic phosphorus pesticides. W: Handbook of Pesticide Toxicology. Tom 2. W.J. Hayes E.R. Laws (red.). Academic Press, San Diego, 1991.
39. Genter M.B., St Clair M.B.G., Amaranth V., Moody M.A., Anthony D.C., Anderson C.W., Graham D.G.: Pyrrole oxidation and protein cross-linking as necessary steps in the development of  $\gamma$ -diketone neuropathy. *Toxicol Appl Pharmacol* 87, 351, 1987.
40. Gobba F., Galassi C., Ghittori S., Imbriani M., Pugliese F., Cavalleri A.: Urinary styrene in the biological monitoring of styrene exposure. *Scand J Work Environ Health* 19, 175, 1993.



41. *Gonzales F.J., Gelboin H.V.*: Role of human cytochrome P-450s in risk assessment and susceptibility to environmentally based diseases. *J Toxicol Environ Health* 40, 289, 1993.
42. *Goyer R.A.*: Toxic effects of metals. W: Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons.. *C.D. Klaassen* (red.). Wyd. 5. McGraw-Hill, New York, St. Louis, San Francisco, 691, 1996.
43. *Graham D.G., Amarnath V., Valentine W.M., Pyle S.J., Anthony D.C.*: Pathogenetic studies of hexane and carbon disulfide neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 25, 91, 1995.
44. *Gralewicz S.*: Nadwrażliwość na czynniki chemiczne. Nowy rodzaj skutków toksycznych? *Med Pr* 49, 473, 1998.
45. *Gregus Z., Klassen C.D.*: Mechanisms of toxicity. W: Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, *C.D. Klaassen* (red.). Wyd. 5. McGraw-Hill, New York, St. Louis, San Francisco, 35, 1996.
46. *Hallier E., Goergens H.W., Katels H., Golka K.*: A note on individual differences in the urinary excretion of optical enantiomers of styrene metabolites and of styrene-derived mercapturic acids in humans. *Arch Toxicol* 69, 300, 1995.
47. *Hirvonen A.*: Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *J Occup Environ Med* 37, 37, 1995.
48. *Ho S.L., Kapadi A.L., Ramsden D.B., Williams A.C.*: An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 37, 403, 1995.
49. *Hodgson E.*: Production of pesticide metabolites by oxidation reactions. *J Toxicol Clin* 19, 609, 1987.
50. *Hsu Y.P.P., Powell J.F., Sims K.B., Breakefield X.O.*: Molecular genetics of monoamine oxidases. *J Neurochem* 53, 12, 1989.
51. *Humbert R., Adler D.A., Distech C.M., Hassett C., Omiecinski C.J., Furlong C.E.*: The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 3, 73, 1993.
52. *Husain R., Arivastava S.P., Mushtag M., Seth P.K.*: Effect of styrene on levels of serotonin, noradrenaline, dopamine and activity of acetylcholinesterase and monoamine oxidase in rat brain. *Toxicol Lett* 7, 47, 1980.
53. *Indulski J.A., Lutz W.*: Biomarkery neurotoksycznych oddziaływań chemikaliów środowiskowych. *Med Pr* 47, 383, 1996.
54. *Järnberg J., Johanson G., Lof A., Stahlbom B.*: Urinary excretion of dimethylhippuric acids in humans after exposure to trimethylbenzenes. *Int Arch Occup Environ Health* 69, 491, 1996.
55. *Johnson M.K.*: Mechanism of action and biomarkers for acute and delayed neuropathic effects of organophosphorous esters. W: Use of Biomarkers in Assessing Health and Environmental Impacts of Chemical Pollutants. *C.C. Travis* (red.). Plenum Press, New York 1993.
56. *Kallio J., Martilla R.J., Rinne U.K., Somninen V., Syyalathi E.*: Debrisoquine oxidation in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 83, 194, 1991.
57. *Kawai T., Yasugi T., Mizunuma K., Horiguchi S., Uchida Y., Iwassi O., Oguchi H., Ideka M.*: Dose-dependent increase in 2,5-hexanedione in the urine of workers exposed to n-hexane. *Int Arch Occup Environ Health* 65, 285, 1991.
58. *Kitamura S., Ferrari F., Vides G., Filho D.C.M.*: Biological monitoring of workers occupationally exposed to carbon disulfide in a rayon plant in Brazil; validity of 2-thiotiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) in urine samples taken at different times, during and after the real exposure period. *Int Arch Occup Environ Health* (Suppl), 65, S177, 1993.
59. *Kohn J., Minotti S., Durham H.*: Assessment of the neurotoxicity of styrene, styrene oxide and styrene glycol in primary cultures of motor and sensory neurons. *Toxicol Lett* 75, 29, 1995.
60. *Korn M., Gforer W., Filser J.G., Kessler W.*: Styrene-7,8-oxide in blood of workers exposed to styrene. *Arch Toxicol* 68, 524, 1994.
61. *Kostrzewski P., Wiaderna-Brycht A.*: Kinetics of elimination of mesitylene and 3,5-dimethylbenzoic acid after experimental human exposure. *Toxicol Lett* 77, 259, 1995.

62. Kurth J.H., Kurth M.C., Poduslo S.E., Schwankhaus J.D.: Association of a monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 33, 368, 1993
63. Li W.F., Costa L.G., Furlong C.E.: Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol Appl Pharmacol* 103, 66, 1993.
64. Li W.F., Furlong C.E., Costa L.G.: Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett* 76, 219, 1995.
65. Lockridge O.: Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther* 47, 35, 1990.
66. Lotti M.: The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. *Crit Rev Toxicol* 21, 465, 1991.
67. Lotti M.: Mechanism of toxicity and risk assessment. *Toxicol Lett* 77, 9, 1995.
68. Lotti M., Moretto A., Capodicasa E., Bertoluzi M., Peraica M., Scapellato M.L.: Interactions between neuropathy target esterase and its inhibitors and the development of polyneuropathy. *Toxicol Appl Pharmacol* 122, 165, 1993.
69. Lutz W., Sułkowski W.: Biochemiczne podstawy działania pestycydów fosforoorganicznych na człowieka. *Med Pr* 41, 181, 1990.
70. Lutz W.: Biomarkery zagrożeń środowiskowych. *Med Pr* 50 (Supl. 12), 33, 1999.
71. Magnotti R.A., Dowling K., Eherly J.P., Mc Connell R.S.: Field measurement of plasma and erythrocyte cholinesterase. *Clin Chim Acta* 315, 315, 1988.
72. Manzo L., Castoldi A.F., Coccini T., Rossi A.D., Nicotera P., Costa L.G.: Mechanisms of neurotoxicity: applications to human biomonitoring. *Toxicol Lett* 77, 63, 1995.
73. Miller M.S., Spencer P.S.: The mechanism of acrylamide axonopathy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25, 643, 1985.
74. Miller R.R., Newhook R., Poole A.: Styrene production, use and human exposure. *Crit Rev Toxicol* 24, 51, 1994.
75. Mutti A., Falzoi M., Romanelli A., Franchini I.: Regional alterations of brain catecholamines by styrene exposure in rabbits. *Arch Toxicol* 55, 173, 1984.
76. Murray W.J., Franklin C.A.: Monitoring for exposure to anticholinesterase-inhibiting organophosphorous and carbamate compounds by urine analysis. W: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. B. Ballantyne, T.C. Marrs (red.). Butterworth Heinemann, Oxford 1992.
77. Ohra S., Tachikawa O., Makino Y., Tasaki Y., Hirobe M.: Metabolism and brain accumulation of tetrahydroisoquinoline (TIQ), a possible parkinsonism inducing substance, in an animal model of a poor debrisoquine metabolizer. *Life Sci* 46, 599, 1990
78. Padilla S., Wilson V.Z., Bushnell P.J.: Studies on the correlation between blood cholinesterase inhibition and „target tissue” inhibition in pesticide-treated rats. *Toxicology* 92, 11, 1994.
79. Pahwa R., Karla J.: A critical review of the neurotoxicity of styrene in humans. *Vet Hum Toxicol* 35, 516, 1993.
80. Phillips M.: Detection of carbon disulfide in breath and air: a possible new risk factor for coronary artery disease. *Int Arch Occup Environ Health* 64, 119, 1992.
81. Rühimaki V., Kivisto H., Peltonen K., Helpio E., Aitio A.: Assessment of exposure to carbon disulfide in viscose production workers from urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid determinations. *Am J Ind Med* 22, 85, 1992.
82. Phillips D.H., Farmer P.B.: Evidence for DNA and protein binding by styrene and styrene oxide. *Crit Rev Toxicol* 24, 535, 1994.
83. Rebert C.S., Hall T.A.: The neuroepidemiology of styrene: a critical review of representative literature. *Crit Rev Toxicol* 24, 557, 1994.
84. Rosengren L.E., Haglid K.G.: Long term neurotoxicity of styrene. A quantitative study of glial fibrillary acidic protein (GFA) and S-100. *Br J Ind Med* 46, 316, 1989.

85. *Schulte P.A.*: Contribution of biological markers to occupational health. *Am J Ind Med* 20, 435, 1993.
86. *Severi M., Pauwels W., Van Hummelen P., Roosels D., Kirsh-Volders M., Veulemans H.*: Urinary mandelic acid and hemoglobin adducts in fiberglass reinforced plastics workers exposed to styrene. *Scand J Work Environ Health* 20, 451, 1994.
87. *Seppalainen A.M.H.*: Neurophysiological approaches to the detection of early neurotoxicity in humans. *CRC Crit Rev Toxicol* 18, 629, 1990.
88. *Silbergeld E.K.*: Mechanisms of lead neurotoxicity, looking beyond the lamppost. *FASEB J* 6, 3201, 1992.
89. *Silbergeld E.K.*: Neurochemical approaches to developing biochemical markers of neurotoxicity: review of current status and evaluation of future prospects. *Environ Res* 63, 247, 1993.
90. *Sińczuk-Walczak H.*: Przydatność elektroencefalografii klinicznej w rozpoznawaniu przewlekłego zatrucia dwusiarczkiem węgla (CS<sub>2</sub>). *Praca na stopień dra hab. Med Pr* 49 (Supl. 10), 7, 1998.
91. *Slikker W.*: Biomarkers of neurotoxicity: an overview. *Biomed Environ Sci* 4, 192, 1991.
92. *Smolen A., Eckerson H.W., Gan K.N., Hailat N., La Du B.N.*: Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 19, 107, 1991.
93. *Solomon J.J.*: DNA adducts of lactones, sultones, acylating agents and acrylic compounds. W: *DNA Adducts: Identification and Biological Significance*. *K. Hemminki, A. Dipple, D.E.G. Shuker, F.F. Kadlubar, D. Segerback, H. Bartsch* (red.). IARC Scientific Publications No 125, Lyon 1994.
94. *Sonsalla P.K., Heikkila R.E.*: Neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and methamphetamine in several strains of mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12, 345, 1988.
95. *Stahl S.M.*: Peripheral models of the study of neurotransmitter receptors in man. *Psychopharmacol Bull* 21, 663, 1985.
96. *St Omer V.E.V., Rottinghaus G.E.*: Biochemical determination of cholinesterase activity in biological fluids and tissues. W: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. *B. Ballantyne, T.C. Marrs* (red.). Butterworth Heinemann, Oxford 1992.
97. *Sultatos L.G.*: Role of glutathione in the mammalian detoxication of organophosphorous insecticides. W: *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*. *J.E. Chambers, Levi P.E.* (red.). Academic Press, San Diego, 1992.
98. *Taylor J. R.*: Disorders of the nervous system. W: *Principles and Practice of Environmental Medicine*. *A. B. Tarcher* (red). Plenum Medical Book Company, New York 1992.
99. *Thompson H.M., Walker C.H.*: Blood esterases as indicators of exposure to organophosphorous and carbamate insecticides. W: *Non-Destructive Biomarkers in Vertebrates*. *M.C. Fossi, C. Leonzio* (red). Elsevier, New York 1992.
100. *Tilson H.A.*: The neurotoxicity of acrylamide: an overview. *Neurobehav Toxicol Teratol* 3, 445, 1981.
101. *Vaalavirta L., Tähti H.*: Astrocyte membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup> as targets of organic solvent impact. *Life Sci* 57, 2223, 1995.
102. *Valentine W.M., Amarnath V., Graham D.G., Anthony D.C.*: Covalent cross-linking of proteins by carbon disulfide. *Chem Res Toxicol* 5, 254, 1992.
103. *Valentine W.M., Graham D.G., Anthony D.C.*: Covalent cross-linking of erythrocyte spectrin by carbon disulfide *in vivo*. *Toxicol Appl Pharmacol* 121, 71, 1993.
104. *Vasilic Z., Drevenkar V., Frobe Z., Stengl B., Tkacevic B.*: The metabolites of organophosphorous pesticides in urine as an indicator of occupational exposure. *Toxicol Environ Chem* 14, 111, 1987.



105. *Wald I.*: Czynniki genetyczne związane z działaniem etanolu. W: Działanie biologiczne alkoholu etylowego. *W. Kostowski, I. Wald* (red.). PWN, Warszawa, 1991.

106. *Wasilewska E., Stanosz S., Bargiel Z.*: Serum dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity in women occupationally exposed to carbon disulfide. *Ind Health* 27, 89, 1989.

107. *Wiaderna D.*: Neurotoksyczność trimetylobenzenów: pseudokumen (1,2,4-trimetylobenzen) i hemimeliten (1,2,3-trimetylobenzen). Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera, Łódź, 1999.

108. WHO: Environmental Health Criteria for Organophosphorous Pesticides. A General Introduction. Environmental Health Criteria No 63, Geneva 1986.

109. WHO: Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Environmental Health Criteria No 155, Geneva 1993.



## Streszczenie

Monitoring biologiczny oddziaływań neurotoksycznych powodowanych przez chemikalia środowiskowe obejmuje bardzo szeroki zakres pomiarów od zmian na poziomie molekularnym, subkomórkowym i komórkowym do zmian neurofizjologicznych i neurobehawioralnych. Przez szereg lat w badaniach epidemiologicznych dla oceny ekspozycji i skutków neurotoksycznych posługiwano się prawie wyłącznie testami neurofizjologicznymi i neurobehawioralnymi. Dopiero w ostatnich latach dzięki istotnym postępom w doświadczalnej toksykologii biochemicznej, co łączyło się z wykryciem celów molekularnych dla neurotoksyn oraz wyjaśnieniem mechanizmów ich działania, stało się możliwe wprowadzenie do neuroepidemiologii testów biochemicznych – biomarkerów ekspozycji, skutków zdrowotnych i wrażliwości.

Biomarkery ekspozycji są wskaźnikami wchłoniętej dawki, określając ilościowo wchłoniętą neurotoksynę (lub jej metabolity) względnie produkty interakcji z substancjami endogennymi, np. z DNA lub białkami enzymatycznymi.

Biomakery skutków zdrowotnych dostarczają informacji o zmianach w układzie nerwowym, które dokonały się w wyniku określonej ekspozycji na czynnik neurotoksyczny, na różnych poziomach jego organizacji: narządowej, tkankowej, komórkowej, subkomórkowej oraz molekularnej.

Biomarkery wrażliwości informują o tym, czy w przypadku określonej osoby lub populacji należy oczekiwać wystąpienia skutków zdrowotnych w układzie nerwowym przy niższej, bądź też wyższej ekspozycji na czynnik neurotoksyczny. Mogą one być przydatne dla określenia prawdopodobieństwa rozwinięcia się choroby w układzie nerwowym w wyniku ekspozycji na neurotoksyny środowiskowe. Są mierzalnymi wskaźnikami tych czynników biologicznych układu nerwowego, które występują przed ekspozycją i mają swoje uwarunkowanie genetyczne albo mają charakter cech nabytych. Te ostatnie mogą być skutkiem przebytych wcześniej chorób układu nerwowego lub wcześniejszych ekspozycji na czynniki neurotoksyczne.

Jedną z najważniejszych przyczyn, która ograniczała i nadal ogranicza wprowadzenie monitoringu oddziaływań neurotoksycznych z użyciem testów biochemicznych jest niedostępność do bezpośrednich badań tkanki docelowej, jaką jest tkanka nerwowa. Powstała w związku

z tym konieczność wykorzystania dla identyfikacji i charakterystyki zjawisk neurotoksycznych tych parametrów biochemicznych, które występują w łatwo dostępnych tkankach obwodowych i mogą być reprezentatywne dla takich samych parametrów obecnych w tkance nerwowej.



INSTYTUT MEDYCYNY PRACY  
im. prof. dra med. Jerzego Nofera w Łodzi

**Waldemar Lutz, Bożenna Krajewska,  
Ewa Nowakowska**

# **ONKOPROTEINY SUROWICY KRWI**

**Pozakomórkowe biomarkery ekspresji genów  
w chorobie nowotworowej**

INSTYTUT MEDYCYNY PRACY IM. PROF. J. NOFERA

Łódź, 1998



INSTYTUT MEDYCYNY PRACY  
im. prof. dra med. J. Nofera w Łodzi

**Waldemar Lutz, Jadwiga Mielczarska**

## **BIOMARKERY SKUTKÓW HEPATOTOKSYCZNYCH**

**Przydatność do skriningu**

INSTYTUT MEDYCYNY PRACY IM. PROF. J. NOFERA

Łódź 1998

