

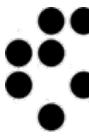


# Pregled tekočih EU projektov v povezavi z okoljskim zdravjem

Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju, Ljubljana  
Univerza v Ljubljani, Univerzitetni klinični center Ljubljana (KIKKB, Pediatrična klinika)

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo  
Univerza v Udinah, Italija

*Child's Health Institute*, Atene, Grčija  
Zelena infrastruktura (*prej Oikon*) Zagreb, Hrvaška  
Univerzitetni klinični center Reka, Hrvaška  
Univerza v Solunu, Grčija



# Nedavni in tekoči EU projekti

- PHIME - Vpliv dolgoročne izpostavljenosti nizkim koncentracijam elementov v hrani pri občutljivi populaciji



- CROME-Life+ - Okoljsko zdravstvena mreža na Mediteranu



- HEALS - Povezava med okoljem in zdravjem pri velikih populacijskih preiskavah

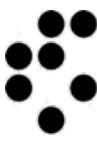




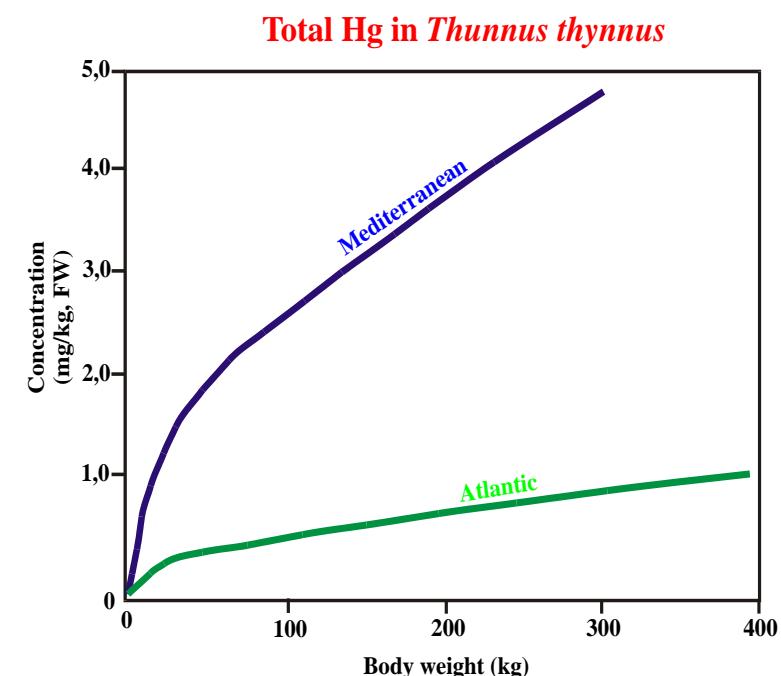
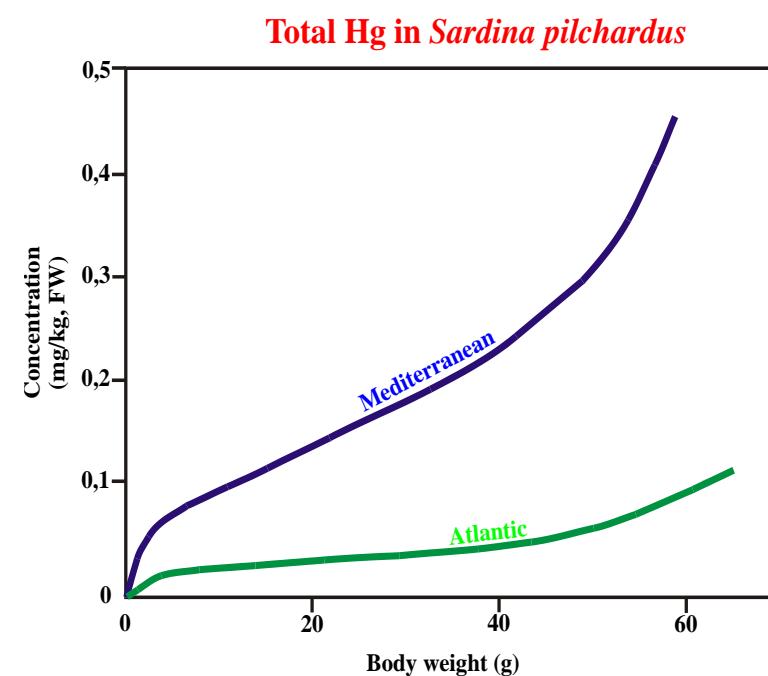
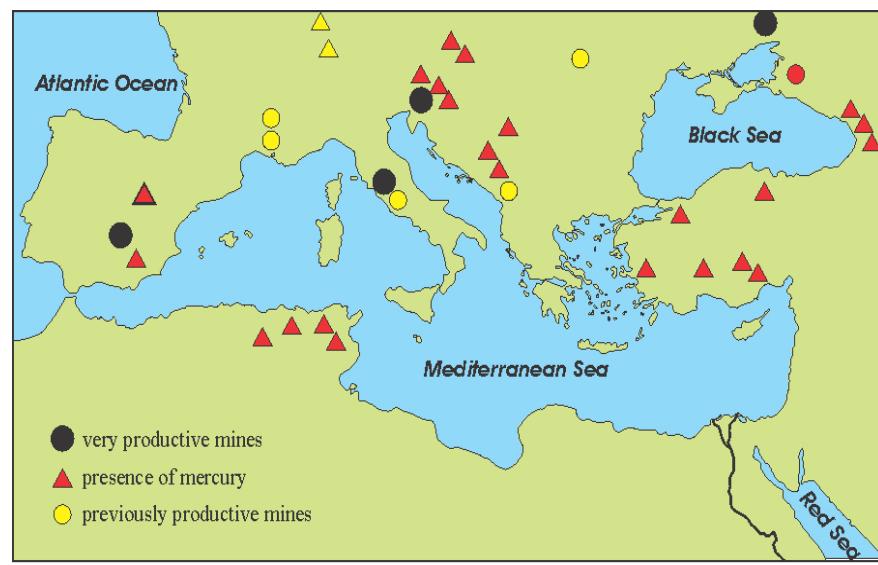
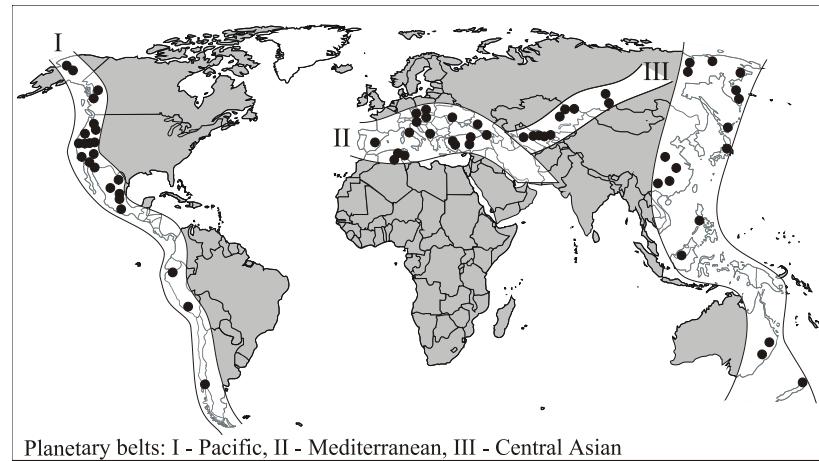
# PHIME in CROME

- Dolgoročna študija izpostavljenosti nizkim koncentracijam elementov v hrani pri občutljivi populaciji v Sredozemlju
- **Namen:** oceniti povezavo med prednatalno izpostavljenostjo nizkim odmerkom živega srebra (preko uživanja rib) ter nevrološkim razvojem
- Identificirati genske polimorfizme, ki lahko modulirajo učinek Hg (in drugih (pol)kovin) pri nizkih izpostavitvah



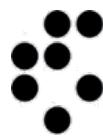


# Zakaj Sredozemlje?



Renzoni, A.; Zino, F.; Franchi E. Mercury levels along the food chain and risk for exposed populations. Environ. Res. **77**, 68–72 (1997).

# Elementi s potencialnim vplivom na osrednje živčevje



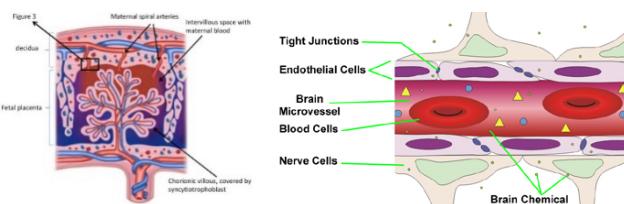
- > 1000 kemikalij nevrotoksičnih v laboratorijskih testih
- > 200 kemikalij nevrotoksičnih za človeka
- > 10 kemikalij nevrotoksičnih za osrednje živčevje v obdobju razvoja

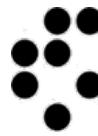
(Grandjean and Landigan, 2014, *The Lancet Neurology*)

- Nevrotoksične kovine/polkovine: **As** in spojine, **Pb**, **Hg**, **Mn**

- $\text{MeHg}^+$  zlahka prehaja **placento** in **krvno-možgansko bariero**

- Visoka afiniteta kationskih oblik Hg ( $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) za SH-skupine → spremembe na mitohondrijih, peroksidacija maščob, motena tvorba mikrotubulov, motena sinteza proteinov,...





# Živo srebro in vpliv na osrednje živčevje

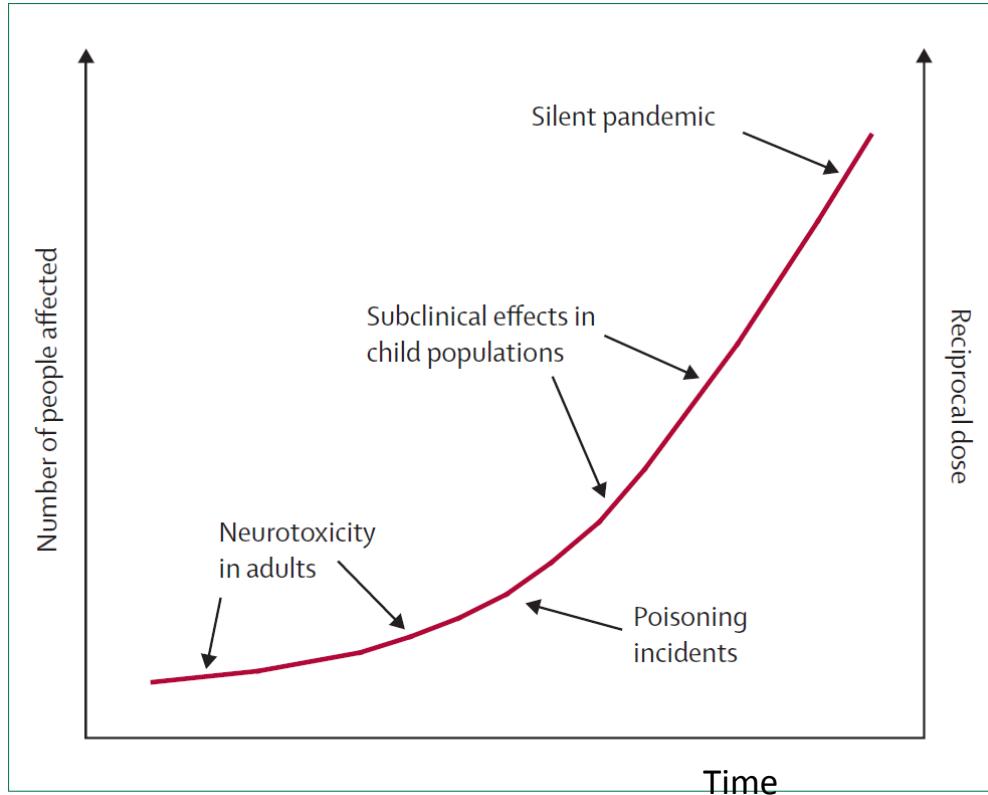


Figure 1: The effects of a neurotoxic chemical on a population over time

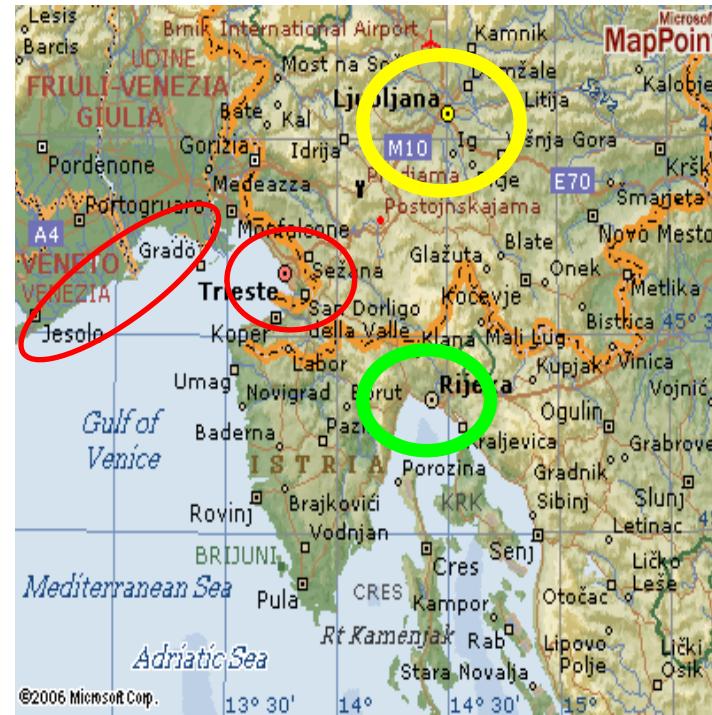
Ref: Grandjean and Landrigan, 2006, *Lancet*

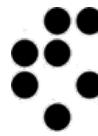


Epidemiološke študije izpostavljenosti Hg zaradi uživanja morske hrane v času nosečnosti:

- **Sejšeli** (ni asociacije)
- ✓ **Ferski otoki** (motnje spomina, pozornosti, govora, vizualne percepције)
- ✓ **Nova Zelandija** (znižan IQ)

# Dolgoročna epidemiološka študija izpostavljenosti nizkim koncentracijam živega srebra pri občutljivi populaciji





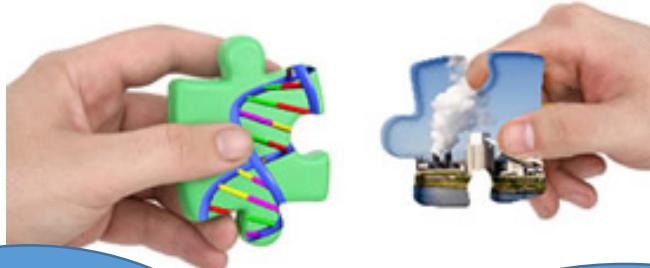
# Zasnova študije

## Ocena izpostavitve

Kovine  
Polkovine  
Organske spojine

Se, Zn,  
Cu,...

## Markerji občutljivosti



Geni vključeni v razvoj osrednjega živčevja  
PON1, BDNF, PGR, TF

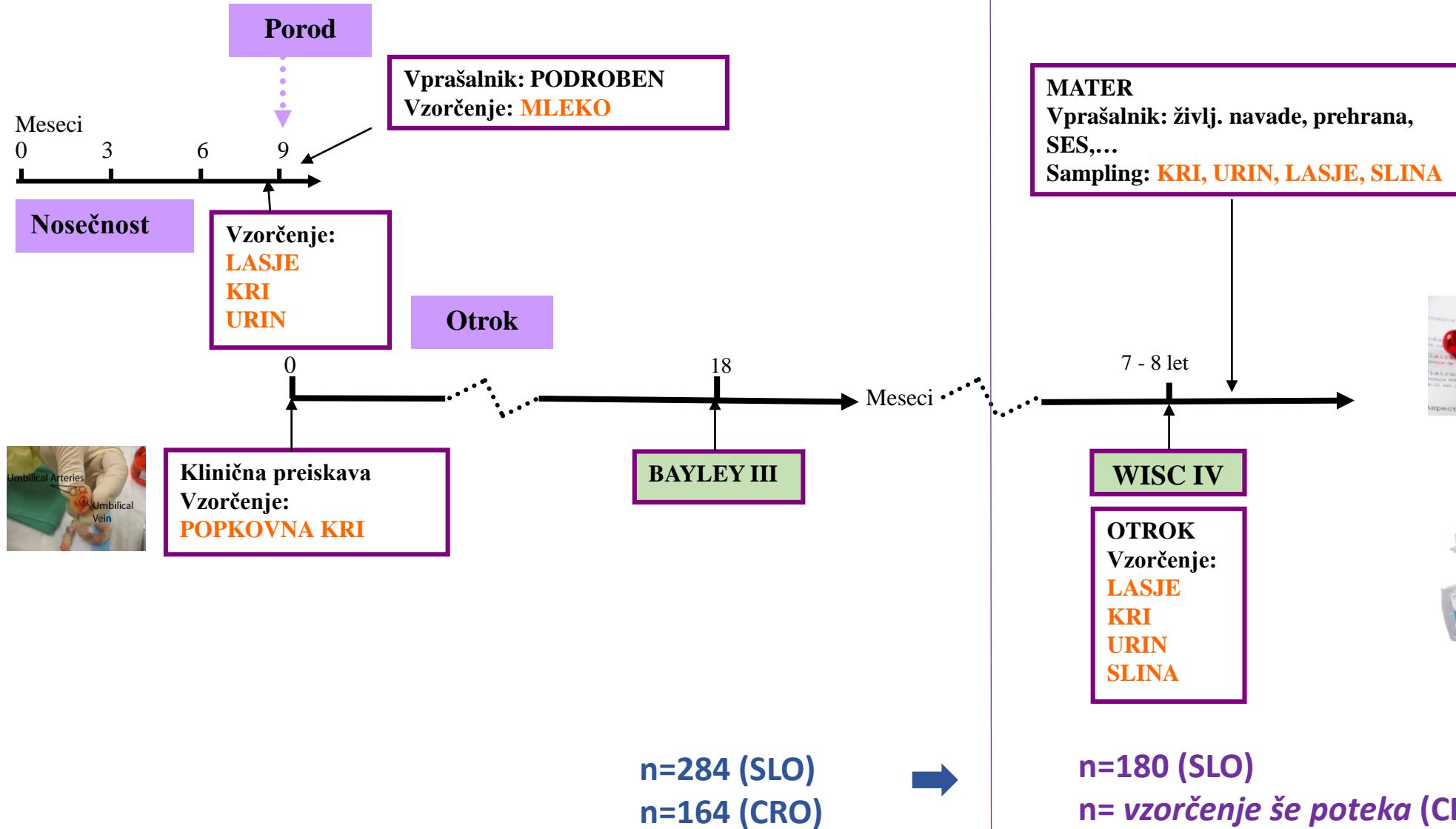
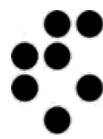
Geni vključeni v kinetiko živega srebra:  
GSH sistem,  
selenoproteini (SEPP1),  
metalotioneini (MT1,  
MT2a, MT3, MT4),  
arzen metiltransferaze,  
ABC transporterji

## Ocena vpliva

Kognitivni, govorni in gibalni razvoj:  
Nevropsihološki testi

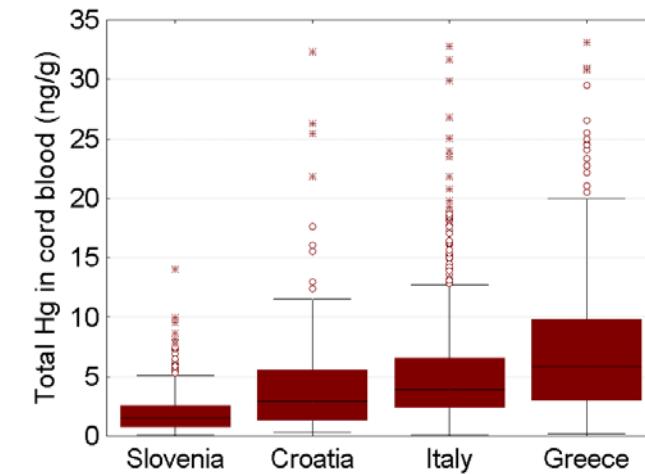
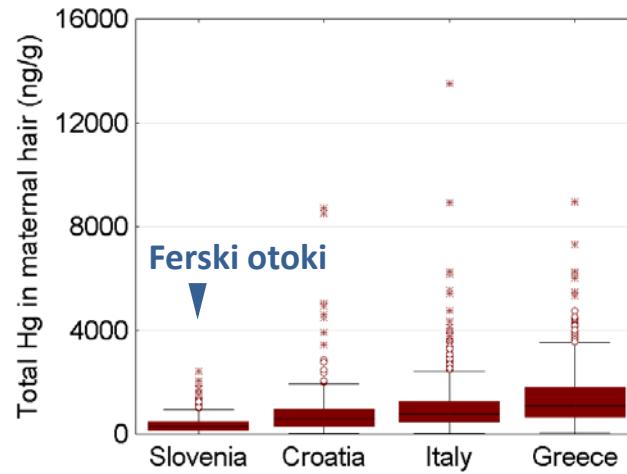
# Zasnova študije

PHIME

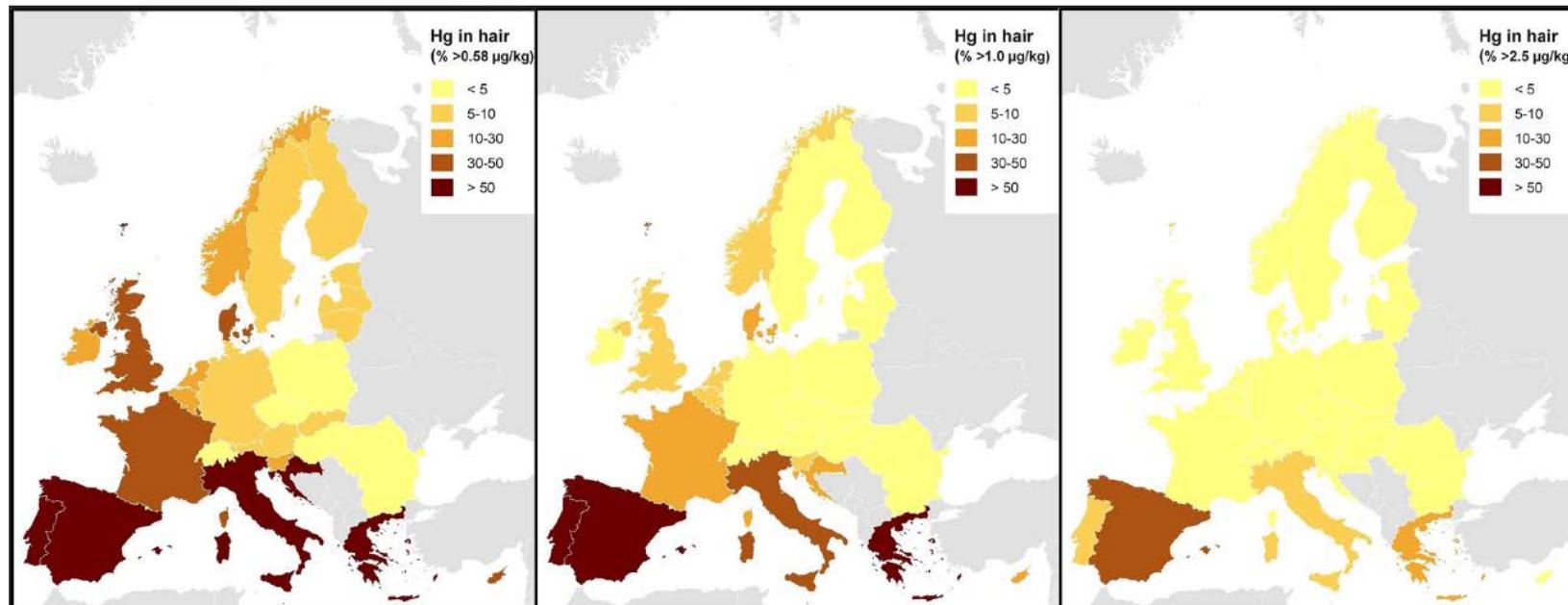




# Hg v materinih laseh in popkovni krvi



Delež populacije, ki presega 0.58 µg/g, 1.0 µg/g in 2.5 µg/g THg v laseh.





# Živo srebro in vpliv na osrednje živčevje

- Testi za ocenjevanje nevrotoksičnih učinkov pri ljudeh izpostavljenim kovinam so opredeljeni kot: opazovalni, vedenjski, nevro-fiziološki (prevodna hitrost živcev, izzvani potenciali, EEG), fiziološki (mišična moč, regulacija temperature, refleksi) in biokemijski
- Razvojne motnje vključujejo klinična in sub-klinična stanja: mentalna retardacija, motnje učenja, ADHD, spekter avtističnih motenj (ASD), motnje govora, disleksija,....
- **Subklinične spremembe** pri nevropsihološkem razvoju lahko vodijo v neurodegenerativne bolezni kasneje v življenskem obdobju!
- *Veliko študij na izpostavljenosti nizkim koncentracijam Hg iz okolja, izsledki študij nekonsistentni! (Schoeman et al, 2009. Ther Drug Monit. 2009 Dec;31(6):670-82)*

# Razvojno testiranje

## Bayley Scales of Infant and Toddler Development, Third Edition (Bayley-III)

- Kognitivni
- Govorni
- Gibalni razvoj
- Starost otrok: 18 mesecev



Bayley III ocena	Vsi	SLOVENIJA	HRVAŠKA	p-vrednost	št. otrok z zakasnelim razvojem
	Povp. ± SD	Povp. ± SD	Povp. ± SD		
Kognicija	111.7 ± 13.6 60-145	114.3 ± 13.6 70-145	106.7 ± 13.2 60-145	<0.001	6
Govor	106.0 ± 14.4 50-144	105.3 ± 13.4 56-141	107.5 ± 16.0 50-144	0.130	20
Motorika	107.4 ± 10.3 58-142	106.9 ± 9.5 61-136	108.0 ± 11.5 58-142	0.355	5



# Povezava med Hg, uživanjem rib in KOGNITIVNIM ter GOVORNIM razvojem

	Kognitivna domena	
	beta	p
Hg v laseh (ln)	0.0614	0.903
Ribe	0.5645	<b>0.070</b>
Model R <sup>2</sup> (N)	0.21 (N=689)	
Hg v popkovni krvi (ln)	-0.2524	0.647
Ribe	0.9312	<b>0.008</b>
Model R <sup>2</sup> (N)	0.23 (N=571)	

	Govorna domena	
	beta	p
Hg v laseh (ln)	1.1992	0.026
Ribe	0.7752	<b>0.019</b>
Model R <sup>2</sup> (N)	0.23 (N=689)	
Hg v popkovni krvi (ln)	0.3264	0.581
Ribe	1.0489	<b>0.006</b>
Model R <sup>2</sup> (N)	0.24 (N=571)	



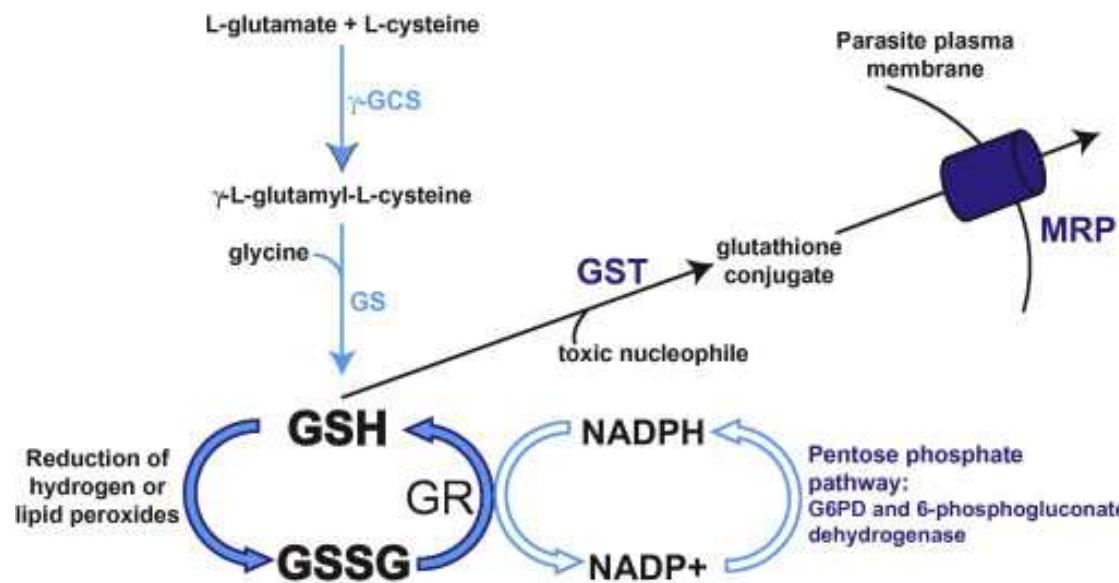
## Pozitivna povezava z uživanjem rib v nosečnosti

Pri obdelavi smo upoštevali naslednje spremenljivke: država, starost matere ob porodu, BMI pred porodom, porast teže med nosečnostjo, kajenje, uživanje alkohola, obiski pri zobozdravniku, zakonski status, stanovanjska površina, lastniški status, število otrok v družini, izobrazba staršev, spol otroka, porodna teža, obiskovanje vrtca pri 18 mesecih starosti, uživanje svežih in homogeniziranih rib pri 18 mesecih starosti, dojenje in trajanje le-tega

Podoben rezultat smo dobili, če smo namesto uživanja rib upoštevali uživanje rib in ostale morske hrane.

# Glutation S-transferaza (GST)

- Glutation (GSH): konjugacija elektrofilnih spojin ( $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ )
- GST: katalizira konjugacijo GSH z elektrofilnimi spojinami
- **GSTM1** in **GSTT1** delecija → zmanjšana encimska aktivnost



# Apolipoprotein E (APOE)

- APOE: glavni protein za transport maščob v možganih
- *Apoe* aleli: epsilon 2 ( $\epsilon 2$ ), epsilon 3 ( $\epsilon 3$ ) in epsilon 4 ( $\epsilon 4$ )
- ***Apoe ε4 alel*** povezan s slabšim obnavljanjem nevronov in je eden od faktorjev tveganja za Alzheimer-jevo bolezni
- Vloga APOE genskih različic nedavno spoznana tudi v razvoju osrednjega živčevja, saj je APOE vključen v presnovo holesterola, ta pa ima pomembno vlogo pri izraščanju aksonov in tvorbi sinaptičnih povezav
- Potencialna vloga APOE v metabolizmu **živega srebra**:
  - **$\epsilon 4$  izoforma** – ne vsebuje cisteina, ki sicer veže Hg in ga izloča iz vezavnih mest v celici



# Povezava med razvojem (ocena Bayley III) in koncentracijo Hg v popkovni krvi glede na genotip otroka

		Koeficient (CI 95%), p-vrednost, Bayley III vs. Hg v popkovni krvi (ln)				
Populacija	n	Kognicija	Govor	Motorika	Fina motorika	Groba motorika
Vsi	283	-1.41 (-3.47, 0.66), 0.181	-1.03 (-3.46, 1.40), 0.406	-1.16 (-2.76, 0.44), 0.153	<b>-0.33 (-0.66, -0.01), 0.043</b>	-0.10 (-0.41, 0.22), 0.553
$\epsilon 2, \epsilon 3$ nosilci	232	-0.49 (-2.76, 1.78), 0.949	-0.59 (-3.42, 2.45), 0.682	-0.84 (-2.68, 1.00), 0.369	-0.29 (-0.66, 0.08), 0.122	-0.06 (-0.41, 0.29), 0.742
$\epsilon 4$ nosilci	51	<b>-5.44 (-10.7, 0.19), 0.043</b>	-2.61 (-7.41, 2.20), 0.276	-2.54 (-5.94, 0.86), 0.139	-0.51 (-1.16, 0.13), 0.117	-0.26 (-1.09, 0.57), 0.528
Interakcija p* Apoe x Hg	283	0.052	0.181	0.275	0.353	0.418

Pri statistični obdelavi smo upoštevali naslednje spremenljivke: država, izobrazba staršev, spol otroka, starost matere ob porodu, kajenje matere med nosečnostjo, BMI matere, ter koncentracije selenja (Se) in svinca (Pb) v popkovni krvi

Ostale povezave:

- Negativna povezava: **Pb** v popkovni krvi in **gibalni razvoj** pri  $\epsilon 2$  in  $\epsilon 3$  nosilcih: -3.2 (CI 95%: -6.1, -0.23), p=0.035
- Pozitivna povezava: **Se** v serumu popkovne krvi in **govorni razvoj** pri celotni populaciji: 7.6 (CI 95%: -1.3, 16.6), p=0.094
- Več točk za govorni razvoj pri deklicah (celotna populacija): 7.6 (CI 95%: 3.45, 10.6), p<0.001

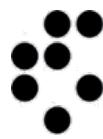


# Ugotovitve in smernice za nadaljne študije...

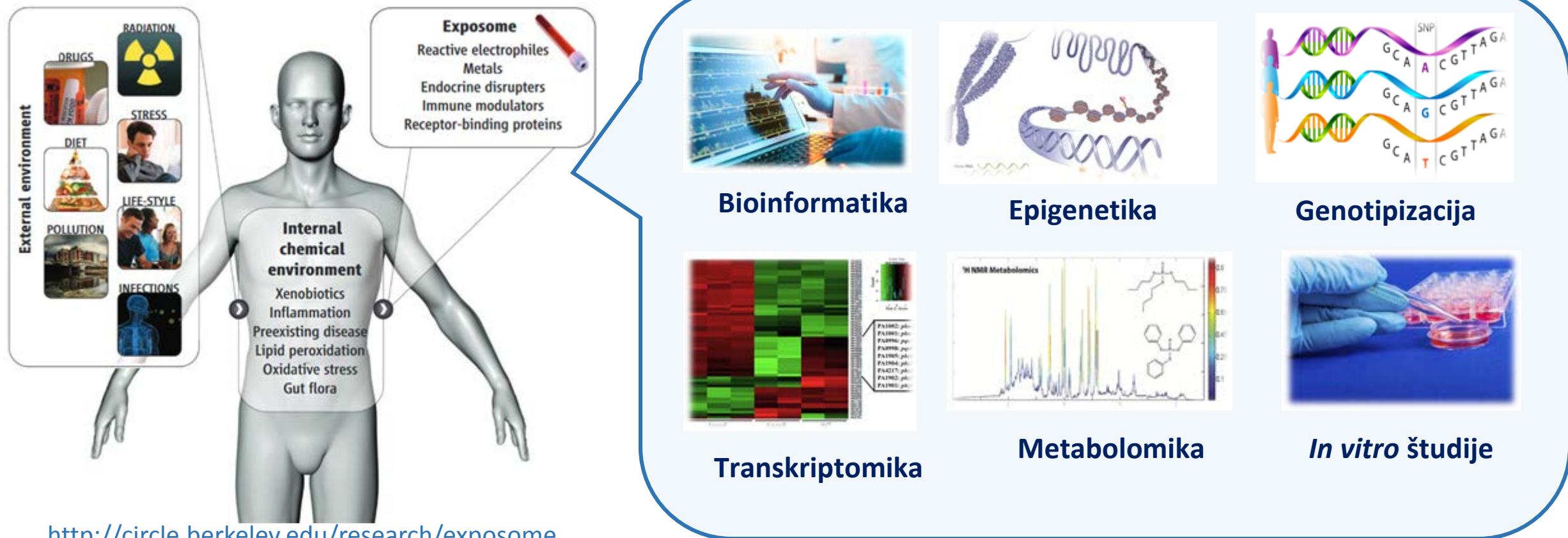
- Zmerno pozitiven, a statistično pomemben vpliv uživanja rib v nosečnosti na KOGNITIVNI in GOVORNI razvoj otrok!
- Za realnejšo oceno tveganja izpostavitve živemu srebru zelo pomembna identifikacija **občutljivih skupin populacije!**
- Negativno povezavo med prednatalno izpostavljenostjo Hg in kognicijo odkrili le pri nosilcih alela *Apoe ε4*
- V nadaljnih študijah (7. FP projekt HEALS) iščemo **nove gene**, ki bi lahko vplivali na povezavo med izpostavitvijo živemu srebru in razvojem, prav tako upoštevamo **razlike v presnovi** med posamezniki in preskrbljenost z **esencialnimi elementi, sočasno izpostavljenost drugim nevrotoksičnim spojinam ter epigenetske spremembe** na identificiranih genih

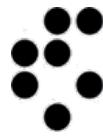
# HEALS: Health and Environment-wide Associations based on Large population Surveys

[Povezava med okoljem in zdravjem pri velikih populacijskih preiskavah]

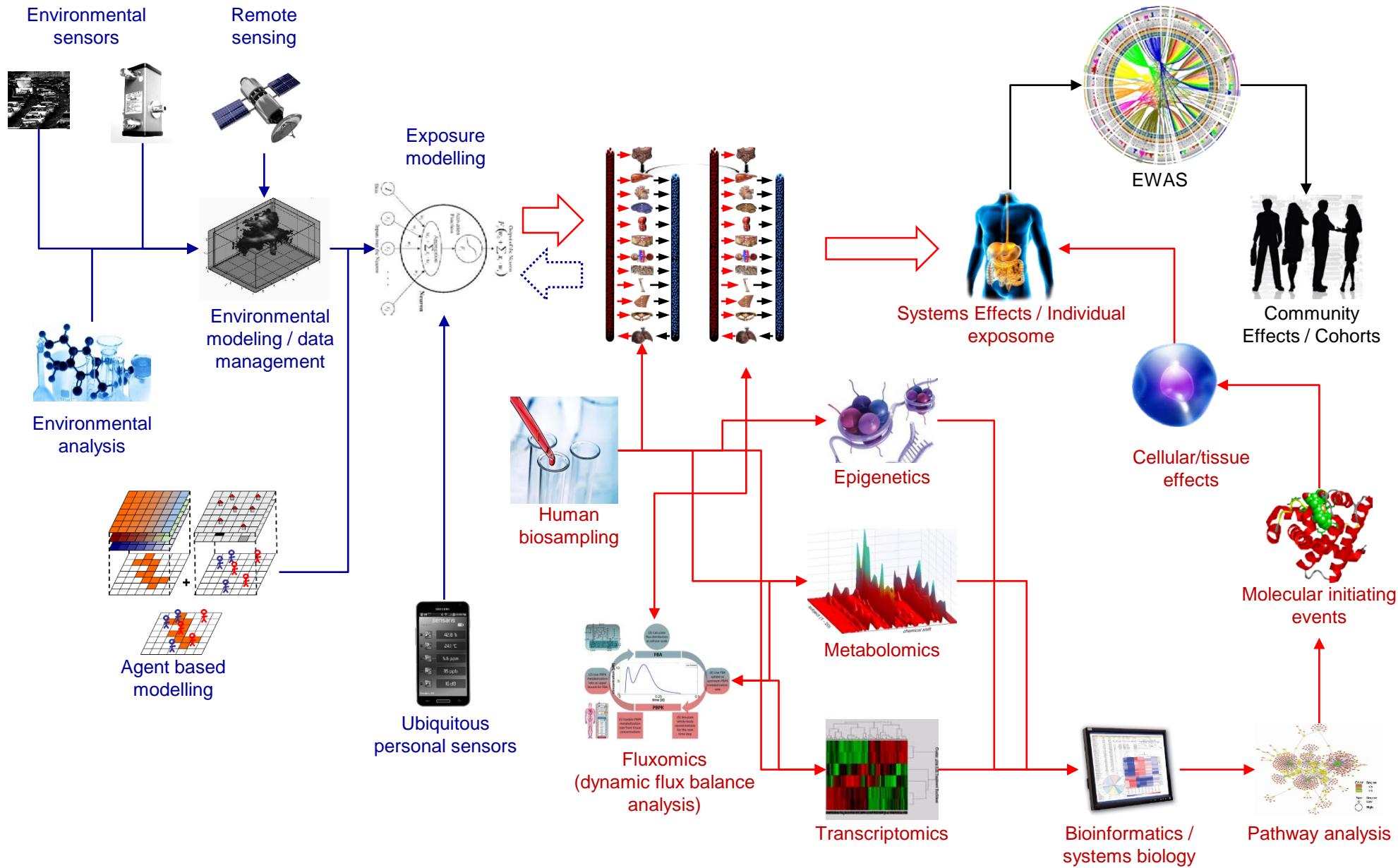


„Exposome“ pristop

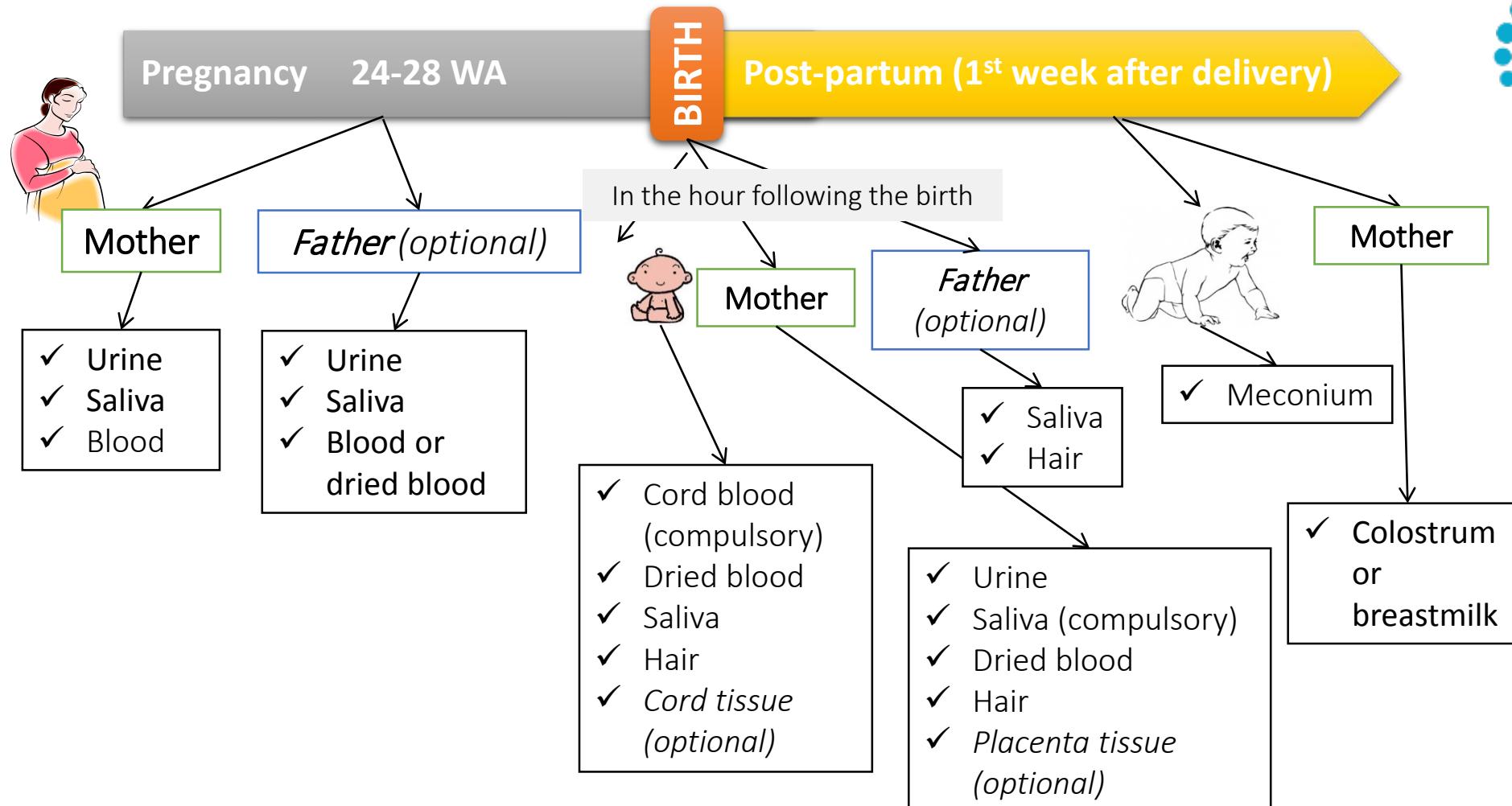




# HEALS metodološki pristop



# Nabor novih porodnic – sodelovanje z Ginekološko klinikjo (prof. Geršak) EXHES: Exposure and Health Examination Survey Protocol



## Planiranih

150 dvojčkov

150 enojčkov, ki se po datumu rojstva in spolu ujemajo z dvojčki

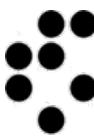
300 dodatnih enojčkov



# Vprašanja?

Finančna podpora: 6. okvirni EU program PHIME in ARRS raziskovalni program P-0143; LIFE+ projekt CROME in 7. okvirni EU program HEALS





- Snoj Tratnik J, Falnoga I., Trdin A., Mazej D., Fajon V., Miklavčič A, Kobal A.B., Horvat M., et al., 2017. Prenatal mercury exposure, neurodevelopment and apolipoprotein E genetic polymorphism. *Environmental research* 152, 375-385.
- Trdin, A., 2015. Connection between mutations in the gene for apolipoprotein E with concentrations of mercury in the mothers and newborns. Master's thesis.
- MIKLAVČIČ, Ana, KOCMAN, David, HORVAT, Milena. Human mercury exposure and effects in Europe : Ana Miklavčič, Višnjevec, David Kocman, Milena Horvat. *Environmental toxicology and chemistry*, ISSN 0730-7268, 2014, vol. 33, issue 6, str. 1259-1270
- LLOP, Sabrine, SNOJ TRATNIK, Janja, MAZEJ, Darja, HORVAT, Milena, et al. Polymorphisms in ABC transporter genes and concentrations of mercury in newborns - evidence from two Mediterranean birth cohorts. *PloS one*, ISSN 1932-6203, 2014, vol. 9, issue 5, str. e97172-1-e97172-9.  
<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0097172&representation=PDF>,
- BELLANGER, Martine, MIKLAVČIČ, Ana, SNOJ TRATNIK, Janja, HORVAT, Milena, et al. Economic benefits of methylmercury exposure control in Europe: : Monetary value of neurotoxicity prevention. *Environmental health*, ISSN 1476-069X. [Online ed.], 2013, no. 3, vol. 12, 20 str.
- MIKLAVČIČ, Ana, CASETTA, Anica, SNOJ TRATNIK, Janja, MAZEJ, Darja, KRSNIK, Mladen, MARIUZ, Marika, SOFIANOU, Katia, ŠPIRIĆ, Zdravko, BARBONE, Fabio, HORVAT, Milena. Mercury, arsenic and selenium exposure levels in relation to fish consumption in the Mediterranean area. *Environmental research*, ISSN 0013-9351, 2013, vol. 120, str. 7-17
- VALENT, Francesca, HORVAT, Milena, MAZEJ, Darja, et al. Neurodevelopmental effects of low-level prenatal mercury exposure from maternal fish consumption in a Mediterranean cohort : study rationale and design. *Journal of epidemiology*, ISSN 0917-5040, 2013, vol. 23, no. 2, str. 146-152
- DEROMA, L., PARPINEL, Maria, TOGNIN, Veronika, CHANNOUFI, L., SNOJ TRATNIK, Janja, HORVAT, Milena, VALENT, Francesca, BARBONE, Fabio. Neuropsychological assessment at school-age and prenatal low-level exposure to mercury through fish consumption in an Italian birth cohort living near a contaminated site. *International journal of hygiene and environmental health*, ISSN 1438-4639, 2013, vol. 216, issue 4, str. 486-493
- MIKLAVČIČ, Ana, CUDERMAN, Petra, MAZEJ, Darja, SNOJ TRATNIK, Janja, KRSNIK, Mladen, PLANINŠEK, Petra, OSREDKAR, Joško, HORVAT, Milena. Biomarkers of low-level mercury exposure through fish consumption in pregnant and lactating Slovenian women. *Environmental research*, ISSN 0013-9351, 2011, vol. 111, no. 8, str. 1201-1207.  
<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00139351>,
- MIKLAVČIČ, Ana, STIBILJ, Vekoslava, HEATH, Ester, POLAK, Tomaž, SNOJ TRATNIK, Janja, KLAVŽ, Janez, MAZEJ, Darja, HORVAT, Milena. Mercury, selenium, PCBs and fatty acids in fresh and canned fish available on the Slovenian market. *Food chemistry*, ISSN 0308-8146. [Print ed.], 2011, vol. 124, issue 3, str. 711-720
- BILIĆ ČACE, I., MILARDOVIĆ, A., PRPIĆ, Igor, KRAJINA, R., PETROVIĆ, Oleg, VUKELIĆ, P., ŠPIRIĆ, Zdravko, HORVAT, Milena, MAZEJ, Darja, SNOJ TRATNIK, Janja. Relationship between the prenatal exposure to low-level of mercury and the size of a newborn's cerebellum. *Medical hypotheses*, ISSN 0306-9877, 2011, vol. 76, issue 4, str. 514-516
- VALENT, Francesca, PISA, Federica, MARIUZ, Marika, HORVAT, Milena, GIBIČAR, Darija, FAJON, Vesna, MAZEJ, Darja, DARIS, Fulvio, BARBONE, Fabio. Esposizione fetale e perinatale a mercurio e selenio : valutazione alla baseline di una coorte di bambini del Friuli Venezia Giulia = Fetal and perinatal exposure to mercury and selenium : baseline evaluation of a cohort of children in Friuli Venezia Giulia, Italy. *Epidemiologia e prevenzione*, ISSN 1120-9763, 2011, vol. 35, no. 1, str. 33-42.