

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY



**Ocena ryzyka zdrowotnego dla wybranych substancji
o potencjalnym wpływie na gospodarkę hormonalną,
w oparciu o wyniki badań monitoringu biologicznego**

Anna Justyna Klimowska

PRACA DOKTORSKA WYKONANA W

Gdańskim Uniwersytecie Medycznym

KATEDRA

Katedra i Zakład Toksykologii

KIEROWNIK KATEDRY I ZAKŁADU:

Dr hab. n. farm. Bartosz Wielgomas

PROMOTOR PRACY:

Dr hab. n. farm. Bartosz Wielgomas

GDAŃSK 2020

STRESZCZENIE

Współczesny postęp technologiczny i naukowy przyczyniły się do stworzenia wielu nowych substancji chemicznych. Substancje chemiczne przed wprowadzeniem na rynek poddawane są badaniom toksyczności, najczęściej z udziałem zwierząt. Jednak przeprowadzone badania na zwierzętach nie wykluczają możliwości wystąpienia negatywnego efektu zdrowotnego u ludzi już w trakcie użytkowania tych substancji. Badania obserwacyjne z udziałem ludzi, wykorzystujące metodę monitoringu biologicznego, są obecnie jednym z podstawowych narzędzi oceny ryzyka zdrowotnego wynikającego z przewlekłego narażenia na substancje chemiczne obecne w środowisku. Badania te polegają na pomiarze stężenia biomarkera ekspozycji w materiale biologicznym narażonych osób. Oznaczone stężenie biomarkera reprezentuje całkowitą wchłoniętą do organizmu dawkę substancji, która przy użyciu odpowiednich narzędzi może posłużyć do scharakteryzowania ryzyka wystąpienia szkodliwego wpływu na zdrowie narażonej populacji.

Celem pracy doktorskiej było przeprowadzenie oceny ryzyka zdrowotnego dla grupy substancji o potencjalnym wpływie na gospodarkę hormonalną: syntetyczne pyretroidy, parabeny, bisfenol A, oksybenzon oraz triklosan. Oceny dokonano na podstawie stężeń biomarkerów ekspozycji oznaczonych w 24-godzinnych próbkach moczu. Dodatkowo, pozyskany od uczestników badania materiał biologiczny pozwolił obserwować zmiany wielkości ekspozycji przez okres 12 miesięcy.

Pierwszym etapem pracy było opracowanie czułych metod analitycznych, które mogą zostać wykorzystane do oznaczenia całkowitego stężenia badanych substancji lub ich metabolitów w próbkach moczu. W przypadku metabolitów syntetycznych pyretroidów o strukturze kwasów opracowano metodę mikroekstrakcji do upakowanego sorbentu (ang. *microextraction by packed sorbent*, MEPS) połączoną z chromatografią gazową i spektrometrią mas. Natomiast metoda oznaczania związków o strukturze fenoli uwzględniała ekstrakcję typu ciecz–ciecz (ang. *liquid–liquid extraction*, LLE) oraz chromatografię gazową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas. Opracowane metody poddano procesowi walidacji, a ich użyteczność i wysoką jakość potwierdzono dzięki uczestnictwu w międzylaboratoryjnych badaniach kontroli jakości.

W ramach prowadzonych badań analizie poddano 295 dobowych próbek moczu dostarczonych przez 14 ochotników. Każdy uczestnik przez okres 12 kolejnych miesięcy dostarczył 1–2 próbki miesięcznie. W ponad 50% analizowanych próbkach oznaczono

9 spośród 14 badanych biomarkerów ekspozycji, które w dalszym postępowaniu wykorzystano do oceny ryzyka zdrowotnego. W wyniku przeprowadzonej analizy statystycznej wykazano istnienie korelacji pomiędzy dobowym wydalaniem biomarkerów w grupie niespecyficznych metabolitów syntetycznych pyretroidów, a także w grupie parabenów. Dodatkowo, stwierdzono istnienie różnic w dobowym wydalaniu bisfenolu A oraz oksybenzonu pomiędzy porami roku. Obserwacja zmian wielkości ekspozycji przez okres trwania badania wykazała, że narażenie na przedstawione w pracy ksenobiotyki środowiskowe ma charakter pseudostacjonarny, co wynikać może z występowania częstych epizodów ekspozycji oraz krótkiego biologicznego okresu półtrwania badanych ksenobiotyków.

Ostatnim etapem pracy była ocena ryzyka zdrowotnego. W tym celu wykorzystano dwa podejścia: (1) w oparciu o dostępne dane toksykokinetyczne oraz zmierzone stężenie biomarkerów oszacowano dzienne pobranie (ang. *daily intake*, DI) ksenobiotyku, które następnie porównano z wartościami referencyjnymi – akceptowanym dziennym pobraniem (ADI) lub tolerowanym dziennym pobraniem (TDI) oraz (2) zmierzone stężenia biomarkerów w 24-godzinnych próbkach moczu porównano z wartościami równoważników biomonitoringu (ang. *biomonitoring equivalent*, BE) wyznaczonymi w oparciu o wartości NOAEL (ang. *no observed adverse effect level*). W wyniku przeprowadzonych porównań wyznaczono wartości ilorazów zagrożenia (ang. *hazard quotient*, HQ), które wykorzystywane są jako parametr przesiewowy. Jedynie w przypadku parabenu propylowego wartość HQ była większa od 1, co potencjalnie może wiązać się z wystąpieniem szkodliwego efektu zdrowotnego. Narażenie na pozostałe oznaczane ksenobiotyki środowiskowe wydaje się nie stanowić zagrożenia dla zdrowia ludzi.

ABSTRACT

In modern world humans are exposed to numerous man-made chemicals. Considering a chemical safety in regard to human health, new substances are usually tested in animal toxicity studies before entering the market. Chemicals are ubiquitously applied in daily life and may also adversely affect human health during the usage. Biomonitoring studies are one of the primary tools used for human health risk assessment nowadays, which is essential due to prevalent exposure to environmental pollutants. Biomonitoring relies on measurement of concentration of biomarkers of exposure in biological matrix. Measured concentration of biomarker, the parent chemical or its metabolite, represents a total internal dose as a result of exposure. The back-calculated intake may be thereafter used for evaluation of health risk for exposed population.

The aim of the study was to perform health risk assessment of selected endocrine disrupting compounds (EDCs): synthetic pyrethroids, parabens, bisphenol A, oxybenzone, and triclosan. Concentration of biomarkers of exposure were measured in 24-hour urine samples collected by study participants over 12 consecutive months.

In the first stage of the study, two sensitive analytical methods were developed. Both methods are intended for quantitation of total concentration of selected EDCs or their metabolites in urine samples. Microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography and mass spectrometry (MEPS-GC-MS) was developed for metabolites of synthetic pyrethroids, whereas liquid-liquid extraction coupled with gas chromatography and tandem mass spectrometry (LLE-GC-MS/MS) for determination of phenolic compounds. The methods were validated; moreover, their reliability was proved by successful participation in external quality assurance programs.

Fourteen volunteers collected 24-hour urine samples once or twice per month over 12 consecutive months. In total, 295 urine samples were collected and analyzed. Nine out of 14 studied biomarkers were quantified in more than 50% of samples and these biomarkers were used for risk assessment. The non-parametric analyses showed statistical significant correlations between daily excretion of urinary biomarkers in a group of nonspecific metabolites of synthetic pyrethroids and in a group of parabens. Moreover, statistical significant differences in daily excretion between seasons were observed for bisphenol A and oxybenzone. Evaluation of variability in long-term exposure demonstrated the pseudo-steady state of exposure to studied xenobiotics, which likely resulted from high frequency of exposure events and short half-life of xenobiotics.

The last stage of the study was to perform health risk assessment. For that purpose, two approaches were used: (1) daily intakes (DI) were calculated based on human toxicokinetic data and measured concentrations, and then DIs were compared with health based guidance values (acceptable or tolerable daily intake); (2) measured urinary biomarker concentrations were compared with biomonitoring equivalents, which were evaluated based on no observed adverse effect levels (NOAEL) derived from animal toxicity studies. As a result, hazard quotients (HQs) were calculated. For the majority of studied xenobiotics the exposure seems to be non-hazardous for human health. HQ calculated for 95 percentile was higher than 1 only for propyl paraben, thus further human risk assessment should be performed.