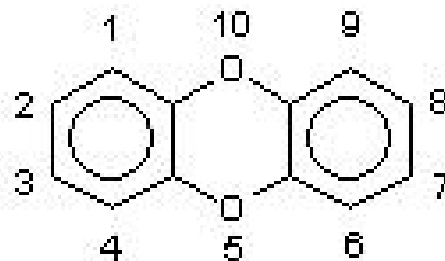


Jaké jsou následky profesionální intoxikace 2,3,7,8-TCDD po 50 letech?

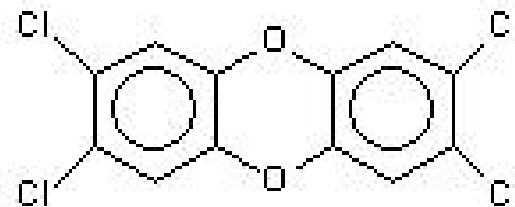
**Daniela Pelclová a kol.
Klinika pracovního lékařství
1. LF UK a VFN**

Chlorované dibenzo-*p*-dioxiny

- 75 chemických sloučenin
- Nejsou vyráběny záměrně
- Ubikvitérní v půdě, sedimentech, ovzduší
- Potravní řetězec
- Tvorba přírodními procesy
- Při lidské činnosti včetně výroby herbicidů
- Při spalování látek obsahujících chlór

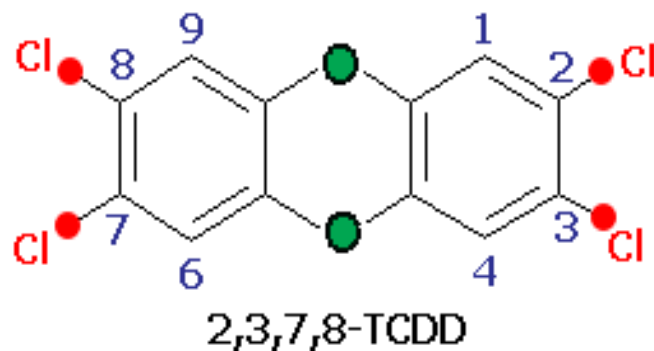


Dibenzo-*p*-dioxin



2,3,7,8-TCDD

2,3,7,8-tetrachlórdibenzo-*p*-dioxin



IARC karcinogen Group 1

morče

LD₅₀ p.o.

1 µg/kg

zvířata hynou po 2-3 týdnech - „wasting syndrom“

Akumulace v tuku

Eliminační poločas 7-12 - více let (?)

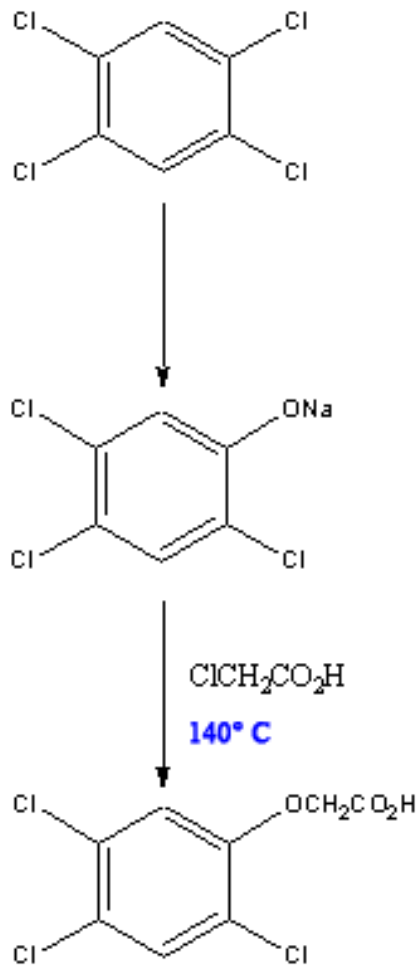
Američtí vojáci ve Vietnamu

- Vietnam 1962-1971
- Agent Orange =
- směs herbicidů 2,4-D a 2,4,5-T
- US Air Force Operace Ranch Hand

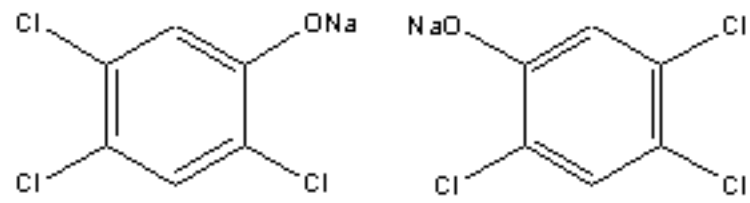
- **57 mil kg Agent Orange**
- **170 kg dioxinu v herbicidech**

Vznik TCDD

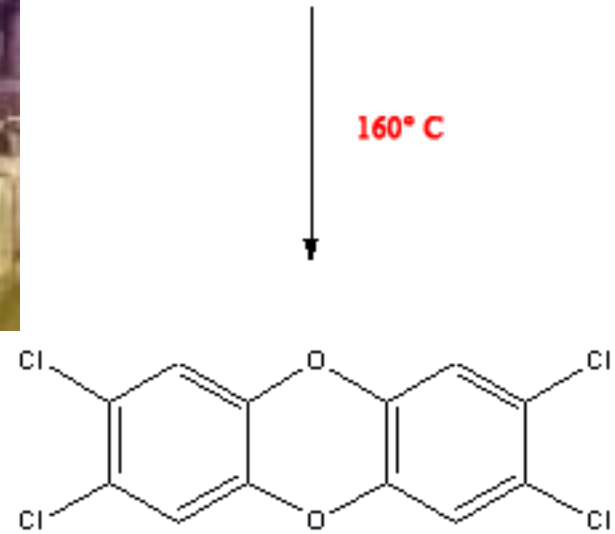
při výrobě 2,4,5-trichlórfenoxyoctové kyseliny (2,4,5-T)



2,4,5-T



160° C

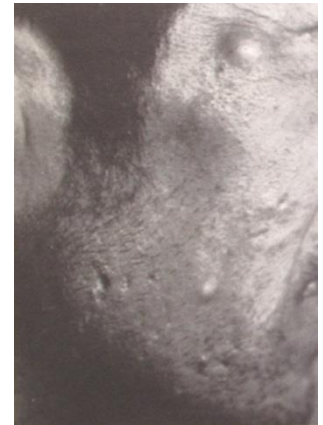


Dioxin

1965-1968

80 osob onemocnělo, 55 osob sledováno

- 100 % acne chlorina
- 50 % hyperlipidémie
- 38 % osob polyneuropatie
- 20 % symptomat. jaterní porfyrie
- 97 % neurast. sy, organ.psychosyndrom



PAZDEROVÁ-VEJLUPKOVÁ J, LUKÁŠ E, NĚMCOVÁ M, et al.: The development and prognosis of chronic intoxication by TCDD in men. *Arch Environ Health* 1981, vol. 36, 5-11

JIRÁSEK L, KALENSKÁ J, KUBEC K et al.: Porphyria cutanea tarda und andere Intoxikationen durch Herbizide. *Hautarzt* 1976, vol. 27, 328-333

Symptomatická jaterní porfyrie

- Halogenované aromatické uhlovodíky patří k látkám, které nejčastěji vyvolávají získaný deficit **uroporphyrinogen dekarboxylázy**
- Symptomy obdobné **porphyria cutanea tarda, symptomatické jaterní porfyrii**
- fragilita kůže, tmavá pigmentace, hypertrichóza, hepatomegalie
- zvýšená koncentrace uroporphyrinů, koproporphyrinů a urobilinogenu v moči, **načervenalá barva moče**
- **během let normalizace porfyriurie**

Zjištění koncentrace TCDD

1996 – poprvé - za 30 let



Analýza HRGC/HRMS prof. Rappe, Umeå, Švédsko
v rámci European Project EV5V-CT92-0204 *Assessment of
Early Signs of Biological Action Following Human Exposure
to Dibenzo-p-Dioxins*

2,3,7,8-TCDD převažujícím kongenerem

Expozice	roky	Maximální zpětné koncentrace v plazmě (pg/g tuku) s poločasem 7 let
USA, váleční veteráni	1962-1971	50
Vietnam –obyvatelstvo	1962-1971	260 až 460
Seveso	1976	390 zóna A 78 zóna B
BASF Ludwigshaven SRN	1953	400
USA, 12 chem. koncernů	50-70 léta	2 000
Linec, Rakousko	1974	4 500
Československo	1965-68	5 000
v populaci	přelom tisíciletí	2-3

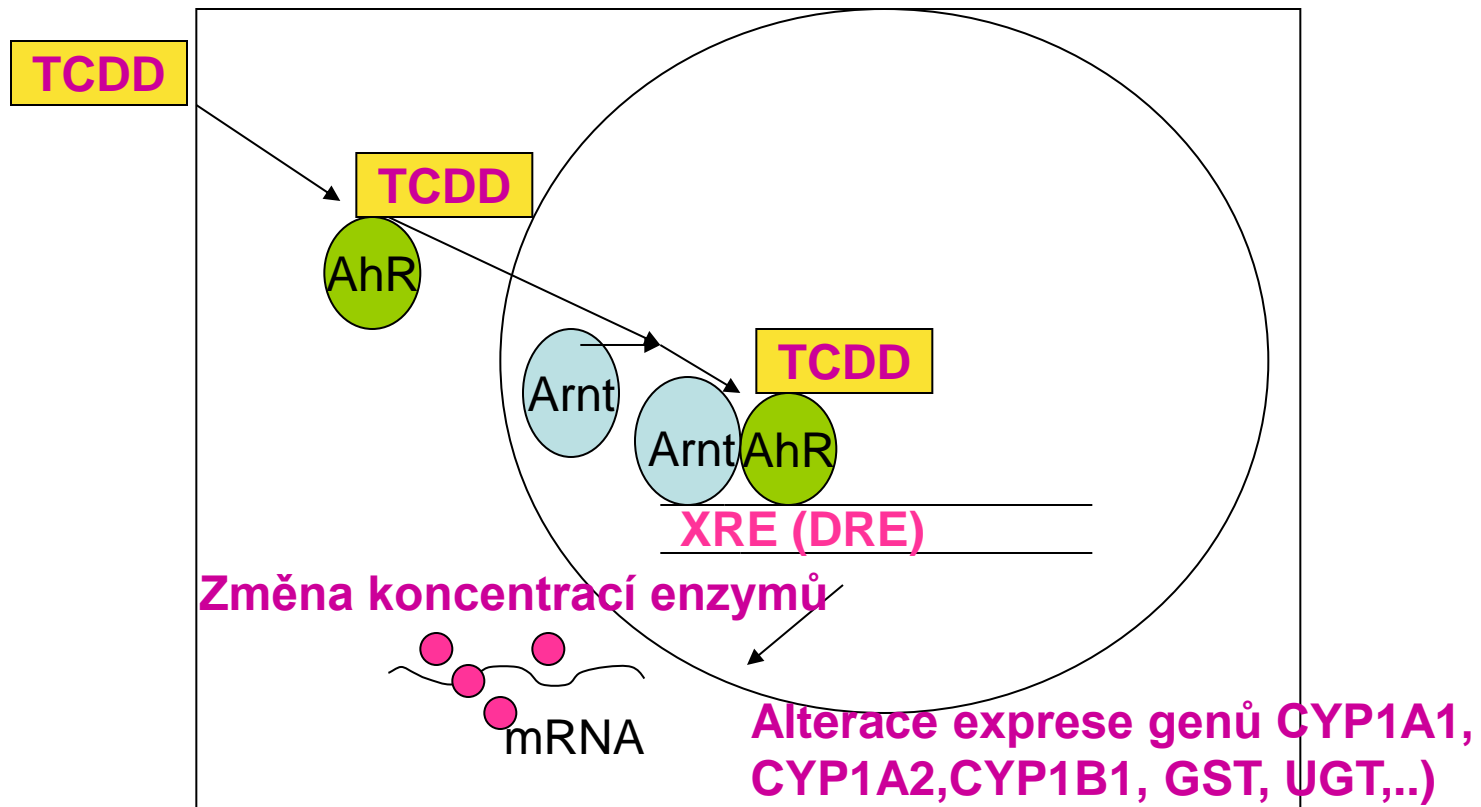
Mechanismus účinku TCDD

AhR- arylhydrokarbonový receptor

Arnt- arylhydrocarb. jaderný transportní protein

XRE- xenobiotika responsivní elementy

INDUKCE ENZYMŮ 1. i 2. FÁZE BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK



Experimentální studie - 1

- TCDD tlumí aktivitu **lipoproteinové lipázy**, snížení funkce peroxisome proliferator-activated receptoru (PPAR)-alfa – vztah k hyperlipidémii a diabetu 2. typu
- SHABAN Z, et al.: Down regulation of hepatic PPARalpha function by AhR ligand. *J Vet Med Sci* 2004, vol. 66, 1377-1386
- TCDD stimuluje transformaci makrofágů do **pěnovitých buněk**, schopných vytvářet plaky
- VOGEL CFA, et al.: Activation of inflammatory mediators and potential role of AhR in foam cell formation. *Cardiovascul Toxicol* 2004, vol. 4, 363-373

Experimentální studie - 2

- TCDD zvýšil:
- koncentraci triglyceridů, cholesterolu
- tvorbu aterosklerotických plátů
- exkreci vasoaktivních eicosanoidů (TXA₂) do moče, zvýšil krevní tlak ($p < 0,01$)

- DALTON PT, et al.: Dioxin exposure is an environmental risk factor for ischemic heart disease. *Cardiovascul Toxicol* 2001, vol 1, 285-298

Hyperlipidémie koreluje s TCDD v r. 1996

Archives of Environmental Health

Korelace celkového cholesterolu a TCDD v séru

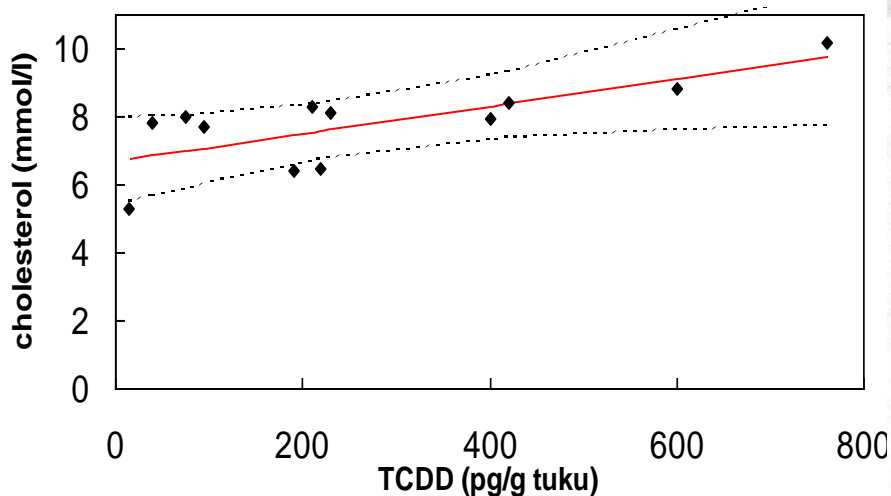


Table 3.—Plasma Lipids Correlated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin Level

Endpoint	Spearman's correlation	
	<i>r</i>	<i>p</i>
Cholesterol (1969–1970)	.653	.015
Cholesterol (1974–1976)	.726	.005
Cholesterol (1980–1981)	.735	.015
Cholesterol (1996)	.642	.018
Triglycerides (1969)	.774	.002
Plasma lipids (1974–1976)	.715	.006
Plasma lipids (1980–1981)	.902	.002
Plasma lipids (1987–1988)	.675	.016
Beta-lipoproteins (1996)	.700	.016

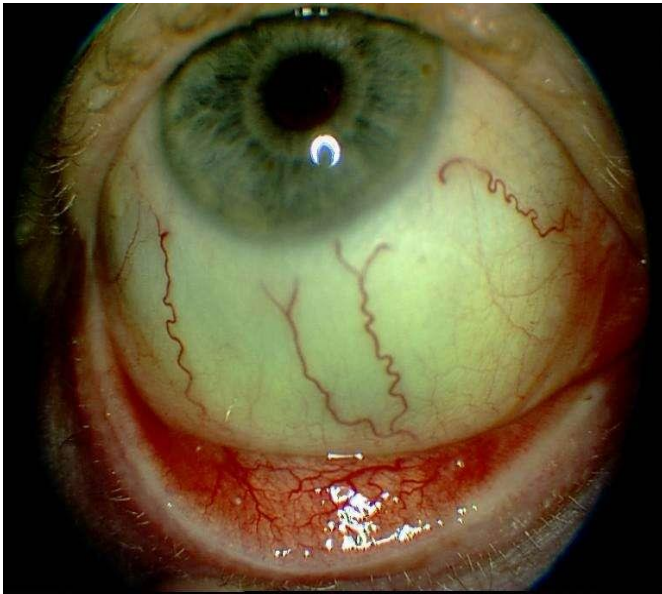
PELCLOVÁ D, FENCLOVÁ Z, URBAN P et al. Biochemical, neuropsychological, and neurological abnormalities following 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) exposure. *Arch Environ Health*, 2001, vol. 56, 493-500.

2004 - pozitivní nálezy u pacientů vs. kontrol

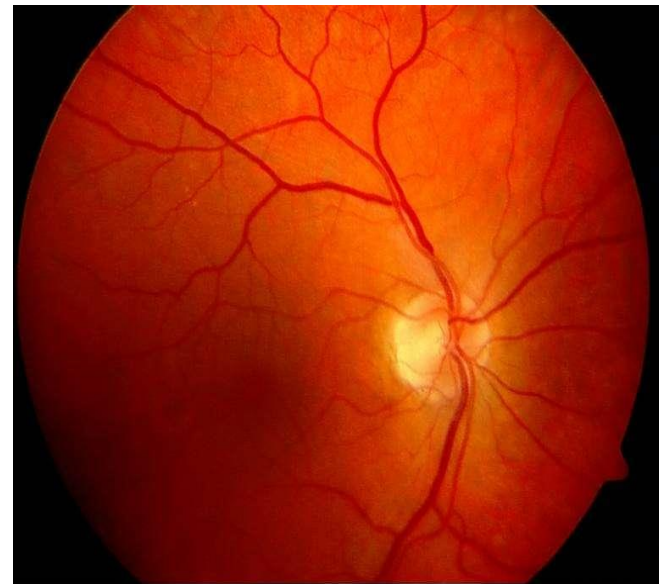
	Pacienti N=11	Kontroly N=14	P
VĚK	64,4 let	64,8 let	0,866
BMI	28,9	29,1	0,899
Cévy očního pozadí	100 %	50 %	0,006*
Pláty v karotidách	100 %	50 %	0,006*
Ischemická choroba srdeční	45 %	17 %	0,043*
Diabetes mellitus	55 %	19 %	0,016*
Hyperlipidémie	82 %	58 %	0,076
Hypertenze	73 %	41 %	0,066

Oční nálezy (100% pacientů)

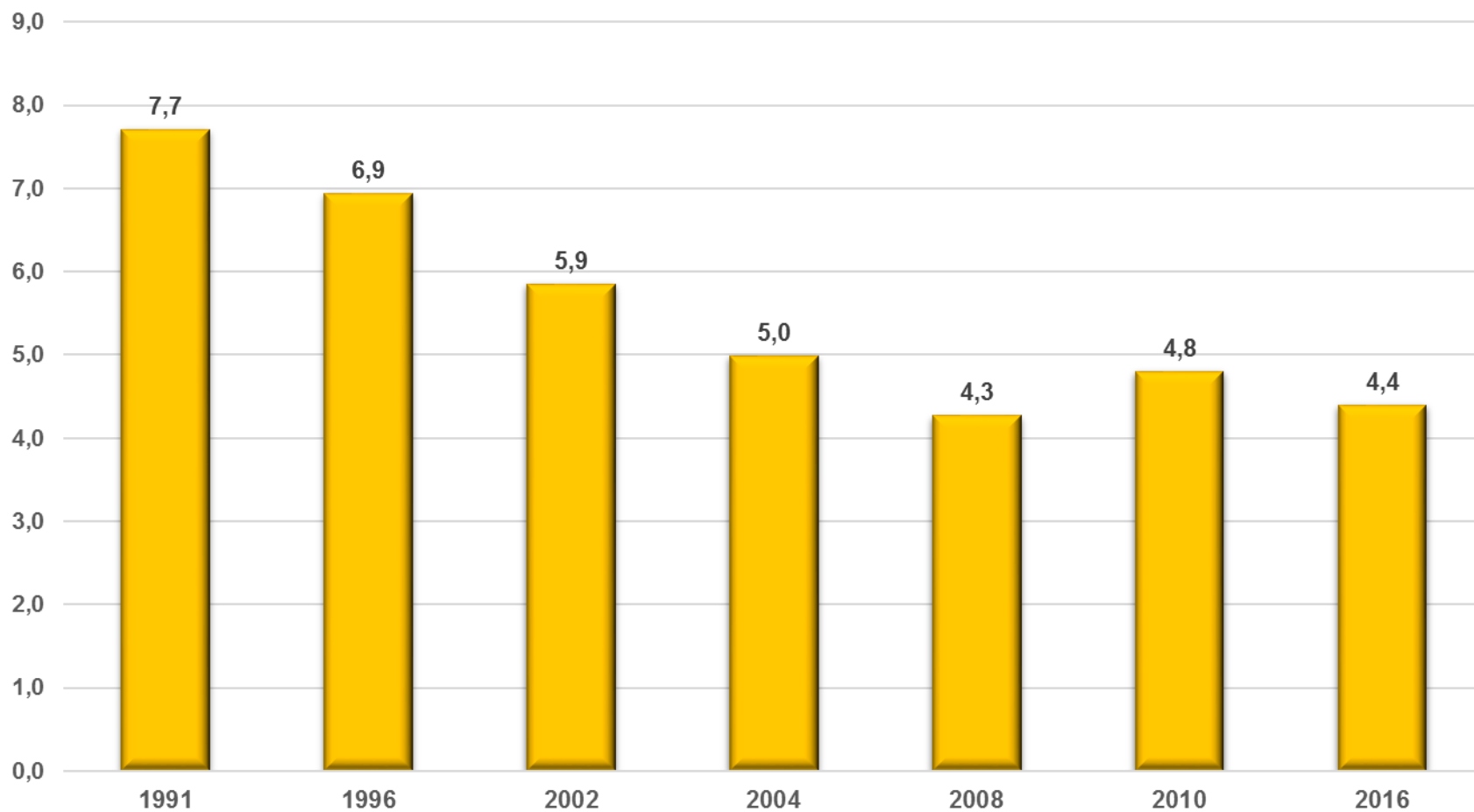
Chronická konjunktivitida



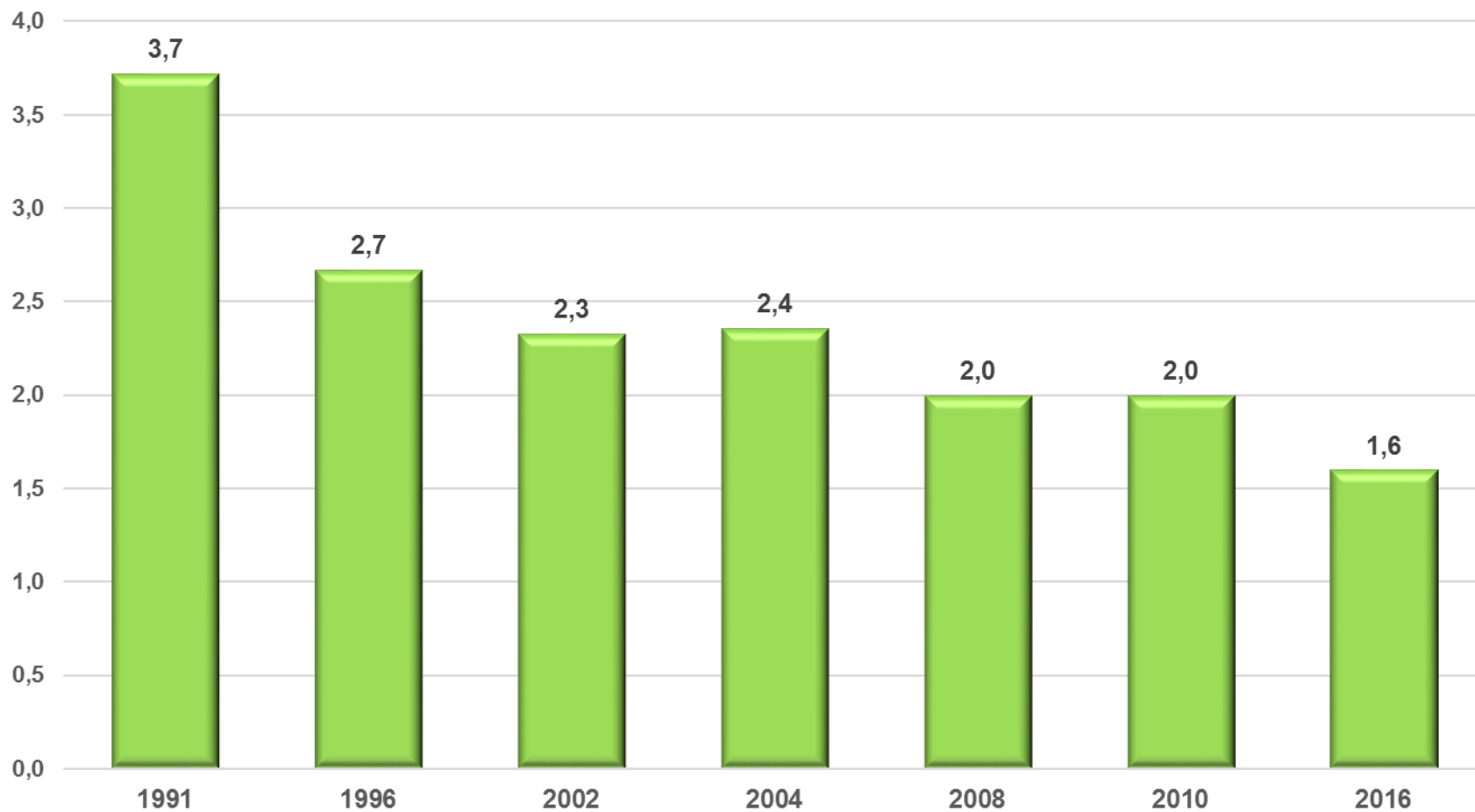
Angioskleróza tepen
očního pozadí



Snižování cholesterolu v séru



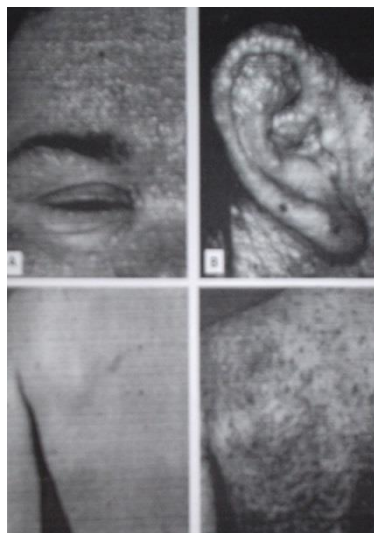
Snižování triacylglycerolů v séru



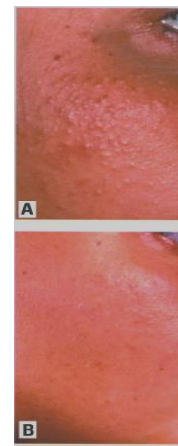
Rakousko 1998

Závažná otrava u dvou mladých žen

Patientka 1



Patientka 2



144 000 pg/g tuku = 25 µg/kg t. hm.

26 000 pg/g tuku = 6 µg/kg t. hm.

Eliminační poločas za 3leté období

1,5 roku

2,9 roku

Maximální hodnotě (zpětně vypočítaná)

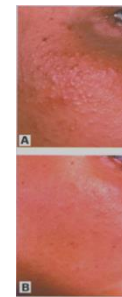
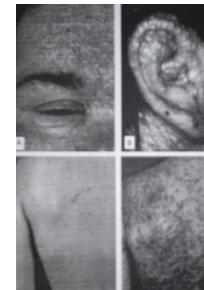
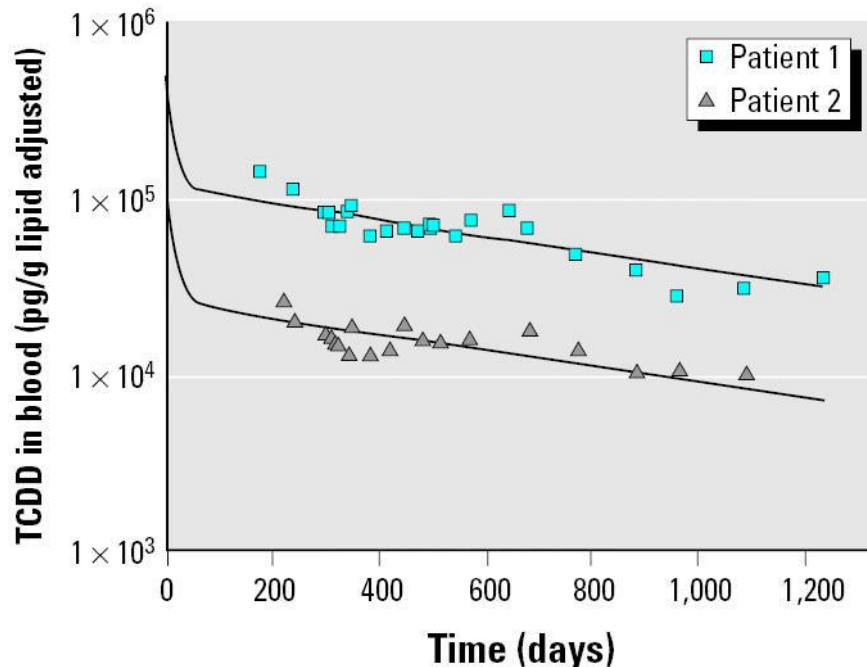
507 000 pg/g tuku

87 000 pg/g tuku

GEUSAU et al.: Severe 2,3,7,8-TCDD intoxication: kinetics and trials to enhance elimination in two patients. *Arch Toxicol* 2002

Počáteční eliminační poločas je kratší

- **Jeden dobrovolník** po 1 dávce 1.14 ng TCDD/kg per os byl sledován po 40 dní (Poiger H, Schlatter C: Pharmacokinetics of 2,3,7,8-TCDD in man. Chemosphere 1986)
- **Fyziologicky podložený model** počítá s indukcí eliminace TCDD při vysokých hladinách - nad 1 250 pg/g tuku (Emond et al. 2005 EHP) – vlivem **indukce P450 1A1, P450 1A/2, a P450 1B1 a zvýšené enzymatické aktivity** (Kopf, Walker 2010) při zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku v lidských buňkách



Ukrajina 2004

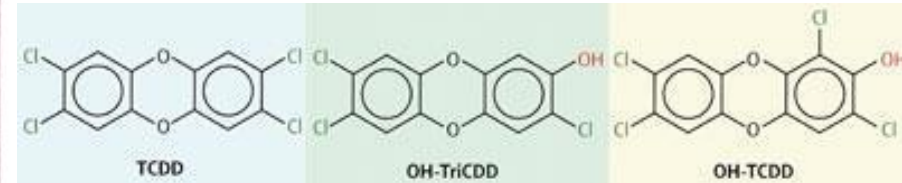
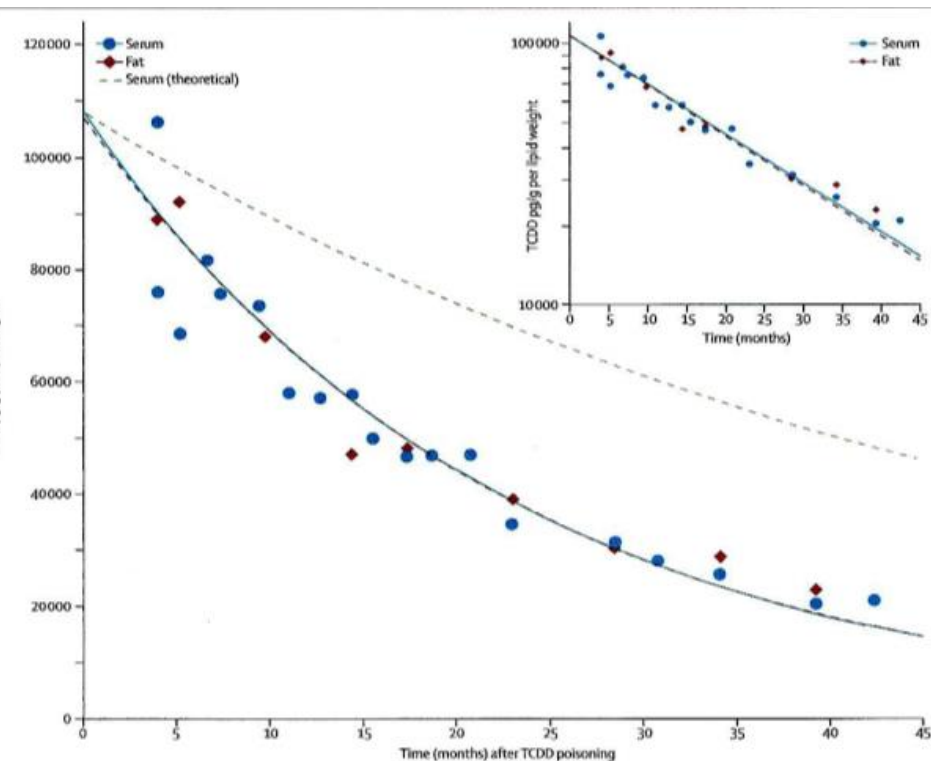
Kandidát na prezidenta V. J.
5. září 2004 večere v Kijevě
Diagnóza v prosinci 2004

TCDD v krvi o 4,5 měsíců později -108 000 pg/g tuku

Iniciální poločas 1 ¼ roku



V. Juščenko

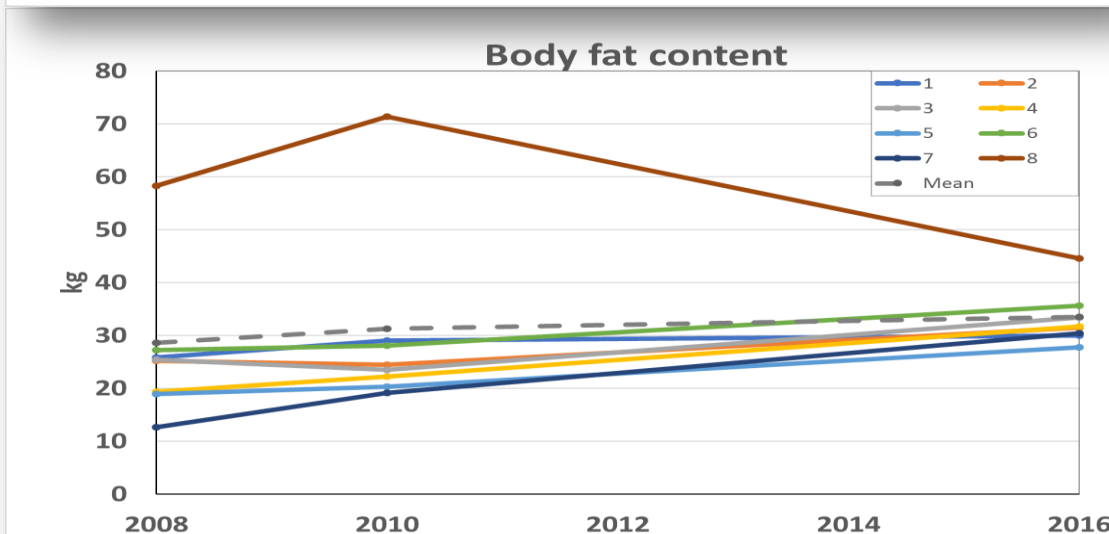
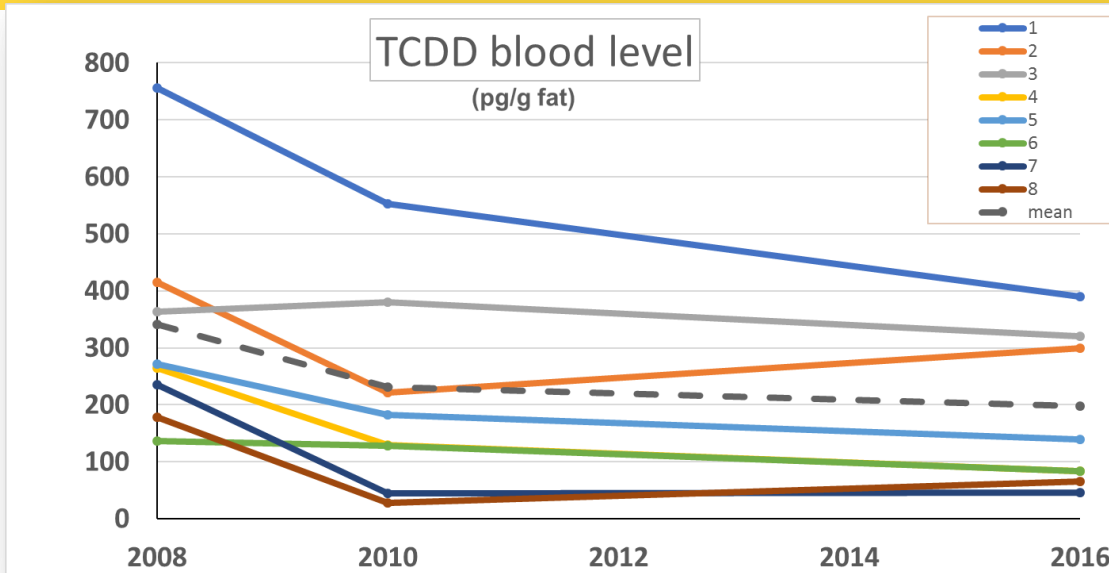


2 metabolism OH-TriCDD, OH-TCDD
– 38 % TCDD se takto eliminuje
Stolicí a močí

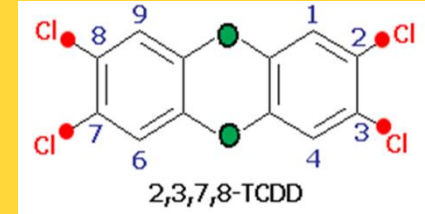
(Sorg et al. 2009 2,3,7,8,-TCDD poisoning
in V.Y.: identification and measurement
of TCDD metabolites)

Místo, stát	roky	Iniciální hladina 2,3,7,8-TCDD (pg/g plasma tuku) zpětným výpočtem <i>pomocí fyziologického modelu (Emond a kol. 2005)</i>
USA, Ranch Hand Veteráni	1962-1971	5 000
Seveso, Itálie	1976	1 770 - 56 000 zóna A
Spolana, ČSSR	1965-68	5 000 - 211 000
Populace	nyní	2-25

TCDD pacienti byli vyšetřováni v letech 1996, 2001, 2004, 2010, 2016



Vyšetření v r. 2016



- **Posledních 8 pacientů TCDD** (z 80 v r. 1965)
- věk $72,1 \pm 1,5$ roků
- Denzitometrie tělesného tuku (% , kg)
- **Neurologické vyšetření**
- Zrakové evokované potenciály (VEP)
- Elektromyografie (EMG)
- **Single photon emission computer tomography (SPECT) mozku**
- CDT – *karbohydrát-deficientní transferin (konzumace alkoholu v posledních 2 týdnech)*
- EG – *etylglukuronid v moči (konzumace 1-2 dny zpět)*

TCDD V PLAZMĚ 180 ± 110 pg/g tuku

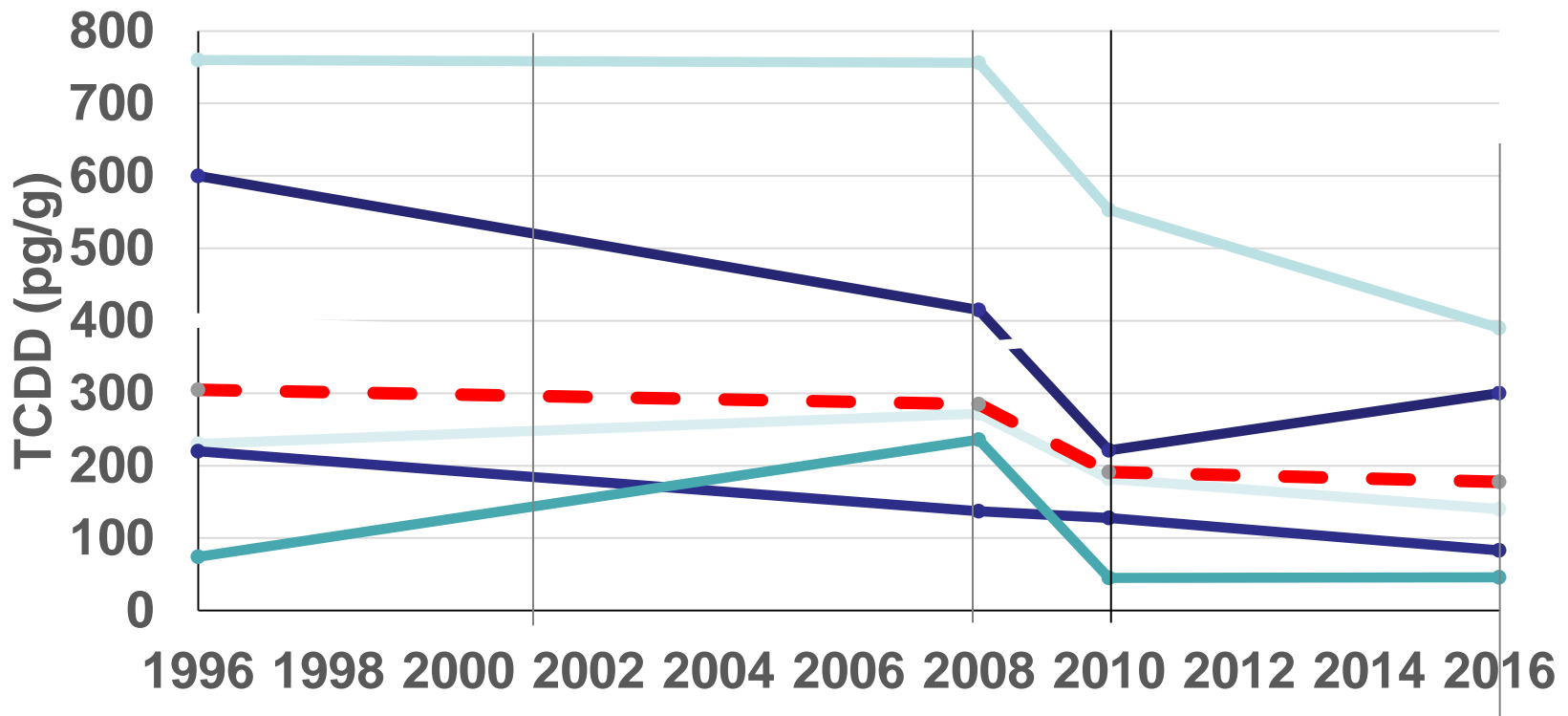
KONTROLY: 12 pg/g tuku



1996-2001: 8,0 let

POLOČAS

2010-2016: 13,6 let



**V r. 2016 měli všichni pacienti rezidua „chloracne“ –
MADISH - Metabolising Aquired Dioxin Induced Skin
Hamartomas (cysty, zánik tukových žlázek, Saurat et al. 2012)**



Pelclová D, et al. Adverse health effects in humans exposed to 2,3,7,8- TCDD.
Rev Environ Health. 2006





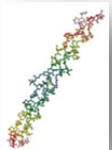
Markery v kondenzátu vydechovaného vzduchu (EBC) LC-ESI-MS/MS analýza

- **malondialdehyd (MDA)**
- **4-hydroxy-trans-hexenal (HHE)** **oxidace lipidů**
- **4-hydroxy-trans-nonenal (HNE)**
- **8-isoProstaglandin F_{2α} (8-isoprostane)**

- **8-hydroxy-2-deoxyguanosin (8-OHdG)**
- **8-hydroxyguanosin (8-OHG)** **oxidace nukleových kys.**
- **5-hydroxymethyl uracil (5-OHMeU)**

- **o-tyrosin (o-Tyr)**
- **3-chloro-tyrosin (3-Cl-Tyr)** **oxidace proteinů**
- **nitrotyrosin (NO-Tyr)**

- **Leukotrieny LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄** **markery zánětu**

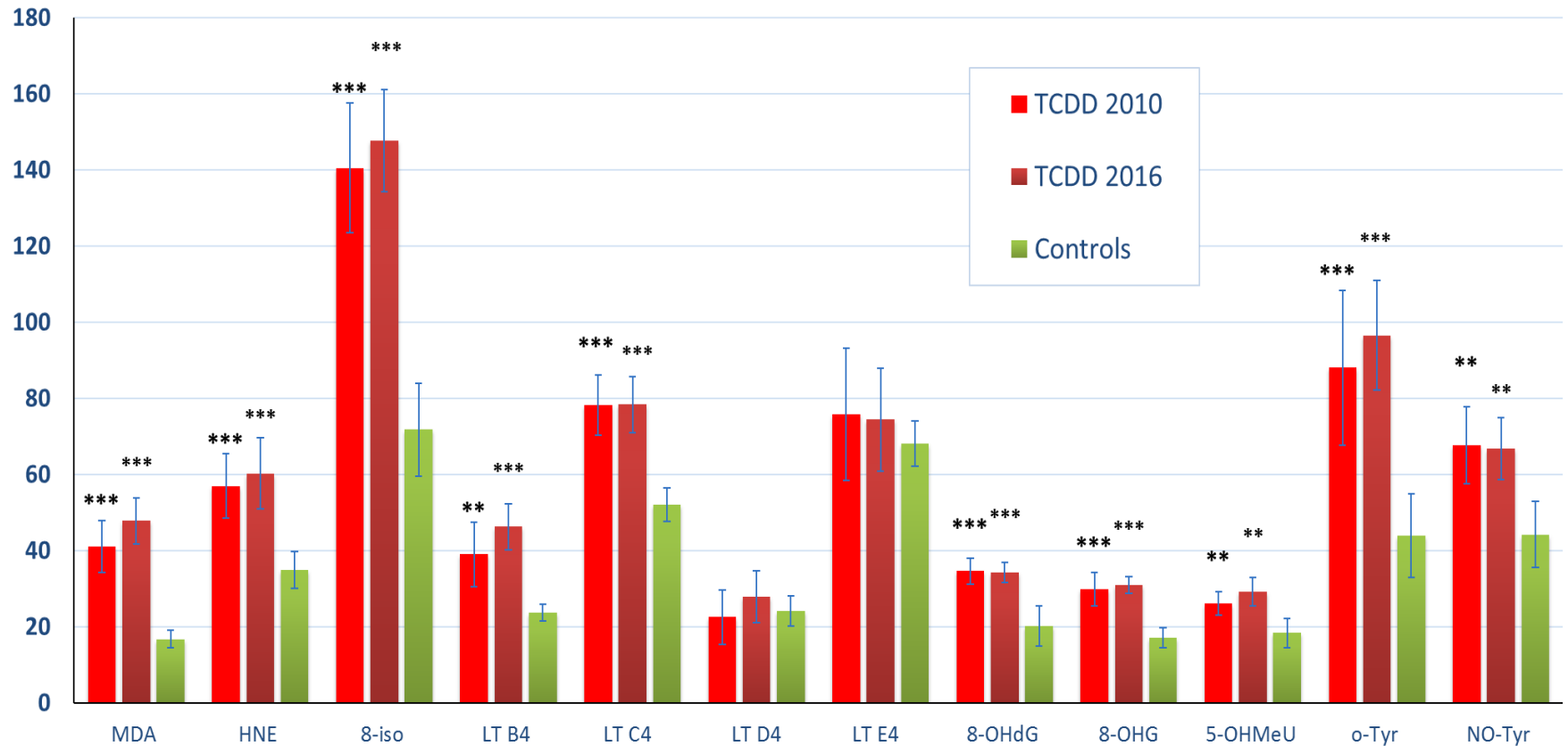


Oxidační stres a markery zánětu (leukotrieny) u pacientů s intoxikací TCDD a kontrolních osob v kondenzátu vydechovaného vzduchu

(**p<0.01, ***p<0.001)

MDA a HNE ng/ml,

ostatní markery pg/ml



Pelcova D, et al. Increased oxidative/nitrosative stress markers measured non-invasively in patients with high 2,3,7,8-TCDD plasma level. Neuro Endocrinol Lett. 2011.

Markery oxidačního stresu u intoxikovaných TCDD

- Zvýšení markerů podporuje hypotézu,
- Že TCDD indukuje kardiovaskulární a neurologické poškození cestou oxidačního stresu
- *Kopf and Walker 2009*: 2,3,7,8-TCDD increases ROS production in human endothelial cells via induction of cytochrome P4501A1
- *Wu et al. 2012*: Activation of Ah Receptor induces vascular inflammation and promotes atherosclerosis

Ultrasonografie karotid

- 100% pacientů má pláty v karotidách
- 2 patienti prodělali operaci – endarektomii - odstranění plátu
- (Pacient 1: 2001+2009, Pacient 4: 2007, 2016 další progrese)
- 62,5 % pacientů mělo zvýšení tloušťky **intima-media thickness (IMT)**

- Přímý toxický efekt TCDD
- Vliv chron. hyperlipidémie a endoteliální dysfunce

Pelclová D, et al. 2,3,7,8-TCDD exposure, endothelial dysfunction and impaired microvascular reactivity. Hum Exp Toxicol. 2007

Perfuzní SPECT mozku

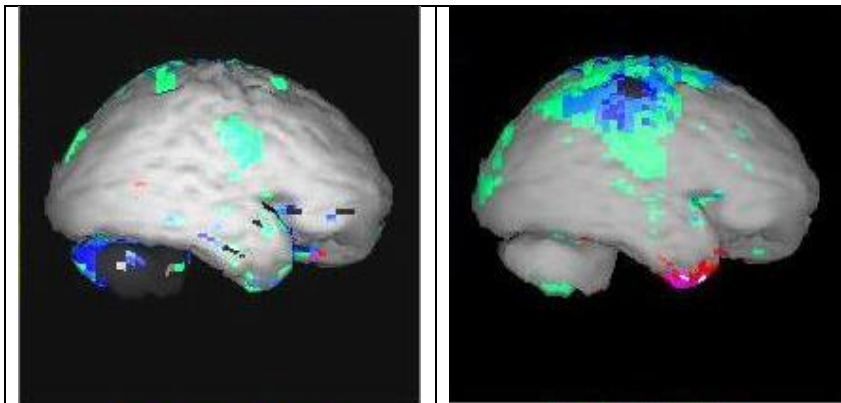
(Single-Photon Emission Computer Tomography)

DISTRIBUCE REGIONÁLNÍHO PRŮTOKU MOZKEM

- **SPECT lokální snížení průtoků v různých oblastech mozku u všech 8 (100 % pacientů)**
- **Navíc zhoršení od r. 2010 u 4 (50%) pacientů**
- Pacient č. 5 – vývoj snížení prokrvení v area parietalis superior pravé hemisféry od r. 2010
- *^{99m}Tc-HMPAO SPECT - Neurogam Segami*

2010

2016



HYPOPERFUZE – statistické
zhodnocení:

**SD -2.0 = zelená; SD -3.0 =
modrozelená; SD -4.0 = modrá;**

HYPERAKUMULACE (hyperperfuze”)
**SD+2.0=červená; SD+3.0=růžová;
SD+4.0=bílá.**

TCDD a poškození v r. 2016

A- abnormální, N – normální

Pacient č.	Věk	TCDD (pg/g tuku)	TCDD depo V těle (pg)	CNS známky	PNS známky	EMG	EEG	VEP	Lanthon y	SPECT	Počet poruch
1	71	390	11 715	A	A	A	N	A	A	A	6
2	72	320	7 114	A	N	A	N	A	A	A	5
3	73	300	7 712	A	A	A	N	A	A	A	6
4	72	140	3 154	A	A	A	N	N	A	A	5
5	71	84	2 131	A	A	A	N	A	A	A	6
6	72	83	2 317	A	A	A	N	A	<i>Vyřazeno</i>	A	5
7	71	66	4 603	A	A	N	N	N	A	A	4
8	76	46	821	A	A	N	N	N	A	A	4
r	-	0.381	0.313								
p*	-	0.352	0.450								
2016				100%	88%	75%	0%	63%	88%	100%	5,1
2004				50%	50%	38%	0%	50%	63%	100%	3,5

V čem jsou výsledky výjimečné

- **Pozdní následky po desetiletích od kontaktu -
Poprvé v klinické studii prokázány :**
- Zvýšení markerů oxidačního stresu
- Porucha endoteliální funkce, cév - karotidy, oční pozadí
- Porucha perfúze mozku (SPECT)
- Získaná porucha barevného vidění (Lanthony)
- **Dlouhodobě:**
- Korelace hypercholesterolémie s TCDD
- Korelace neuropsychol.oslabení s TCDD, cholesterolem



ZÁVĚR 2016

- **Proč míra poškození nekoreluje s hladinou TCDD??**
- **TCDD klesá jen zvolna, biologický poločas se prodlužuje**
- Chyba měření (30-40%) hraje významnou roli
- **Téměř všichni pacienti mají závažné nálezy**
- 88 % se léčí pro hyperlipidémii a hypertenzi
- 62,5 % pro diabetes II. typu a ICHS
- Uplatňuje se oxidační stres
- Není patrný vliv alkoholu

Závěr

- 50 let po intoxikaci je hladina TCDD ještě **100 násobně vyšší**, než v populaci.
- Výsledků jsme použili při stanovení výše bodového hodnocení pro odškodnění pro nemoc z povolání
- včetně nádorů (plíce, thyreoidea, 2x ledviny)
- Není známo antidotum k vyloučení TCDD z těla
- Proto je nezbytné monitorování krevních lipidů a trvalá hypolipidemická terapie

Letální otrava dioxinem ? (úmrtí 1970)

57-letý provozní chemik, 9 měsíců zaměstnán ve výrobě 2,4,5-T

Zemřel v průběhu 2 let: kachexie (164 cm/48 kg), demence, porfyrie, akne, hyperpigmentace, hypertrichóza, hypertenze, diabetes, neuropatie
Rodina dostala odškodnění v r. 1970 za jeho průmyslovou intoxikaci

Patologická anatomie:

Generalizovaná arterioskleróza (mozek, játra, ledviny, pankreas)

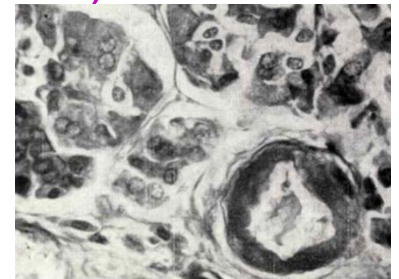
Hypertrofie srdce

Porfyrie (fluorescence v UV světle - játra, ledviny, kostní dřeň)

Polyneuropatie

Bezprostřední příčina smrti:

Bronchopneumonie



Atheroma

PAZDEROVÁ-VEJLUPKOVÁ J, LUKÁŠ E, NĚMCOVÁ M, et al.: *Arch Environ Health* 198

**Vzorky pacienta, který pravděpodobně zemřel
na otravu TCDD (1913-1970)
použijeme je k vysvětlení příčiny úmrtí v budoucnosti?**



Děkuji za pozornost.

