

STĘŻENIA KADMU W SUROWICY U MATEK DZIECI Z ROZSZCZEPAMI WARGI I/LUB PODNIEBIENIA

SERUM CADMIUM CONCENTRATIONS IN MOTHERS OF CHILDREN WITH CLEFT LIP AND/OR CLEFT PALATE

Kamil Hozyasz, Anna Ruszczyńska², Ewa Bulska², Zbigniew Surowiec¹

Klinika Pediatrii i ¹Klinika Chirurgii Dzieci i Młodzieży Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie
²Wydział Chemii UW

Streszczenie: Podczas badań doświadczalnych na zwierzętach stwierdzono, że ekspozycja na kadm w okresie ciąży zaburza rozwój czaszki twarzowej. W rejonach zwiększonego skażenia środowiska kadmem obserwowano częstsze rodzenie się dzieci z rozległymi rozszczepami wargi oraz wargi i podniebienia.

Celem pracy było zbadanie stężenia kadmu w surowicy u matek dzieci z niezespolowymi rozszczepami czaszki twarzowej i kobiet, które urodziły zdrowe dzieci. Badaniami objęto 167 zdrowych niepalących kobiet: 62 matki dzieci z rozszczepem wargi i podniebienia (RWP), 29 matek dzieci z rozszczepem wargi (RW), 31 matek dzieci z rozszczepem podniebienia (RP) oraz 45 matek dzieci bez wad wrodzonych. Stężenia kadmu w surowicy oznaczono metodą spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-MS).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi stężeniami kadmu u niepalących tytoniu matek dzieci z rozszczepami czaszki twarzowej (RWP- $0,15 \pm 0,15 \mu\text{g/l}$, RW- $0,20 \pm 0,18 \mu\text{g/l}$, RP- $0,15 \pm 0,14 \mu\text{g/l}$) oraz u kobiet z grupy porównawczej ($0,19 \pm 0,18 \mu\text{g/l}$).

Wniosek: Wyniki naszej pracy sugerują, że w praktyce klinicznej badanie stężenia kadmu w surowicy nie może służyć jako metoda identyfikacji niepalących kobiet z grupy zwiększonego ryzyka urodzenia dziecka z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Słowa kluczowe: kadm, surowica, rozszczep wargi, rozszczep podniebienia, etiologia

Abstract: Changes in orofacial development have been reported in offspring of animals treated with cadmium during pregnancy. In humans correlation between increases in environmental cadmium levels and incidence of orofacial clefts was observed.

The aim of our study was to determine whether serum levels of cadmium are higher in mothers of children with non-syndromic orofacial clefts than in women who gave birth to healthy children.

167 healthy non-smoking women participated in the study: 62 mothers of children with cleft lip and palate (CLP), 29 mothers of children with cleft lip (CL), 31 mothers of children with cleft palate (CP) and 45 control mothers of healthy children. Serum cadmium concentrations were determined by use of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).

There were no significant differences in mean cadmium levels between non-smoking mothers of children with clefts (CLP- $0.15 \pm 0.15 \mu\text{g/l}$, CL- $0.20 \pm 0.18 \mu\text{g/l}$, CP- $0.15 \pm 0.14 \mu\text{g/l}$) and controls ($0.19 \pm 0.18 \mu\text{g/l}$).

Conclusion: Determination of serum cadmium concentration is not recommended for identification of non-smoking women at increased risk of giving birth to children with orofacial clefts.

Key words: cadmium, serum, cleft lip, cleft palate, etiology

Wstęp

Wady wrodzone są stwierdzane u 3% żywo urodzonych noworodków. Rozszczepy wargi i/lub podniebienia są jed-

nymi z najczęstszych wad wrodzonych. W różnych populacjach występują one z częstością 0,4-2/1000 urodzeń. Wady te stanowią poważny problem w wymiarze społecznym, jak i ekonomicznym. Pacjenci z rozszczepem czaszki twarzo-

wej często wymagają wieloetapowego rekonstrukcyjnego leczenia chirurgicznego oraz wieloletniej opieki ortodontycznej, laryngologicznej, pediatrycznej, logopedycznej i psychologicznej (1,2). U podłoża rozszczepów leżą zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe, które są słabo poznane (1, 3). Badania epidemiologiczne wykazały zależność pomiędzy paleniem papierosów, spożyciem alkoholu, cukrzycą, przyjmowaniem niektórych leków i ekspozycją na niektóre chemikalia oraz przebyciem przez matkę infekcji wirusowych z gorączką w pierwszym trymestrze ciąży a zwiększonym ryzykiem urodzenia dziecka z rozszczepem czaszki twarzowej (3, 4).

W badaniach doświadczalnych na zwierzętach stwierdzono, że ekspozycja na kadm w okresie ciąży powoduje częstsze rodzenie potomstwa z rozszczepami wargi i podniebienia, jednakże molekularne podłoże teratogennego działania pierwiastka nie zostało poznane (5-7). Wiadomo obecnie, że kadm zmniejsza m.in. aktywność enzymów antyoksydacyjnych, jak manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD) czy miedziowo-cynkowa dysmutaza ponadtlenkowa (CuZnSOD), upośledza przechodzenie cynku od matki do płodu i wypiera cynk z połączeń z białkami, powoduje uszkodzenia DNA (8-13). Obserwacje dokonane przez Cesanego i wsp. sugerują, że dzieci z rozszczepem wargi częściej rodzą się w rejonach o dużej zawartości kadmu w środowisku (14). Nie wykonano jednakże oznaczeń tego pierwiastka u matek i ich potomstwa.

Podstawowymi źródłami kadmu jest dym papierosowy, zanieczyszczenia emitowane przez przemysł ciężki i wydobywczy rud cynku, ołowiu i innych metali kolorowych oraz niektóre produkty spożywcze, jak warzywa okopowe i zielone części roślin z upraw intensywnie nawożonych odpadowymi nawozami wapniowo-magnezowymi lub nawozami fosforanowymi, podroby i mięso pochodzące z uboju starych zwierząt, owoce morza i ryby morskie (15, 16). Okres półtrwania kadmu w organizmie człowieka sięga 30 lat (16, 17). Po dotarciu do tkanek pierwiastek stymuluje wytwarzanie wiążących go białek o niskim ciężarze molekularnym (metalotioneiny). Około 50% kadmu zawartego w organizmie jest zdeponowane w wątrobie i nerkach (15). Do osocza jest on stopniowo uwalniany w postaci kompleksów kadmowo-metalotioneinowych (17). U kobiet palących papierosy, stężenia kadmu we krwi są wyższe niż u niepalących (15, 18).

Celem pracy było zbadanie stężenia kadmu w surowicy u niepalących matek dzieci z trzema typami izolowanych wad wrodzonych czaszki twarzowej: rozszczepem wargi (RW), rozszczepem wargi i podniebienia (RWP), rozszczepem podniebienia (RP) oraz u matek dzieci zdrowych (grupa porównawcza).

Materiał i metody

W IMiD w latach 2001-2002 przeprowadzono badania homeostazy witamin rozpuszczalnych w tłuszczach u kobiet, które urodziły dzieci z izolowanymi (niezespołowymi) rozszczepami czaszki twarzowej. Badaniami objęto matki dzieci z wadą, pozostających pod opieką Poradni Chirurgicznej IMiD oraz matki dzieci bez wad wrodzonych (grupa porównawcza), pozostających pod opieką Poradni Gastroenterologicznej i Poradni Niemowlęcej IMiD (głównie z powodu chorób infekcyjnych). Od wszystkich kobiet uzyskano świadomą zgodę na uczestnictwo w projekcie badawczym, zaakceptowanym przez Komisję Bioetyczną przy IMiD. Uczestniczki były zdrowe i stosowały dietę zwykłą, nie nadużywały alkoholu.

Krew pobierano z żyły łokciowej do próbek bez antykoagulantu, 12 godzin po posiłku. Zamrożone surowice przechowywano w temperaturze - 35°C.

W 2003 r. w materiale resztkowym, pochodzącym od ko-

Tabela 1. Średnie stężenia kadmu u matek dzieci z rozszczepami w obrębie czaszki twarzowej.

Grupa kobiet	Stężenie kadmu w surowicy (mg/l)			
	n	Średnie stężenie ± SD	Zakres	Mediana
Matki dzieci z rozszczepem wargi i podniebienia	62	0,15±0,15	0,02-1,16	0,11
Matki dzieci z rozszczepem wargi	29	0,20±0,18	0,05-0,79	0,10
Matki dzieci z rozszczepem podniebienia	31	0,15±0,14	0,04-0,49	0,08
Matki zdrowych dzieci	45	0,19±0,18	0,04-1,05	0,15

biet niepalących tytoniu w okresie ciąży i po urodzeniu dziecka, oznaczono stężenia kadmu. Badania analityczne wykonano u 167 kobiet: 62 matek dzieci z RWP, 29 matek dzieci z RW, 31 matek dzieci z RP oraz 45 kobiet, które urodziły zdrowe dziecko. Średni wiek matek dzieci z RWP – 31,7 ± 7,6 lat, RW – 28,3 ± 4,4 lat, RP – 31,2 ± 5,7 lat oraz matek dzieci zdrowych – 32,1 ± 7,1 lat. Pobrania krwi były wykonane po upływie 3,8 ± 4,3 lat od porodu. Nie występowały istotne statystyczne różnice pomiędzy grupami badanymi i grupą porównawczą. W czasie badań ankietowych i pobierania krwi większość uczestniczek podawała jako miejsce zamieszkania tereny środkowej i wschodniej Polski, w tym połowa województwo mazowieckie. Autorzy nie dysponowali danymi dotyczącymi ewentualnych zmian miejsca zamieszkania w okresie prekonceptyjnym, w czasie ciąży oraz po urodzeniu dziecka.

Do oznaczenia kadmu w surowicy zastosowano technikę spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS). Ta nowoczesna technika, umożliwiająca oznaczenie niskich stężeń pierwiastków w próbkach materiałów klinicznych (mocz, krew), charakteryzuje się krótkim czasem analizy oraz wysoką czułością i swoistością. Wykonywane są proste pomiary wodnych roztworów wzorcowych, bezpośrednio po których poddaje się analizie rozcieńczone próbki kliniczne (19, 20).

Wszystkie roztwory stosowane do rozcieńczania próbek oraz przygotowania wzorców do krzywej kalibrowania były wysokiej czystości: 65% HNO₃ suprapure Merck (Niemcy), wielopierwiastkowy wzorec firmy Merck (Niemcy), woda Mili-Q (Milipore, USA). Wykorzystano spektrometr ICP MS Elan 6100 Perkin Elmer (Niemcy) wyposażony w rozpylacz typu Mainharda, kwarcową komorę mgielną Scota i niklowe stożki. Spektrometr kondycjonowano według standardowych procedur ustawiając przepływ gazu rozpylającego (Ar₂), położenie rozpylacza, stożków i soczewek skupiających. Próbkę surowicy rozcieńczano dziesięciokrotnie przed pomiarem. W pomiarach wykorzystano metodę krzywej kalibrowania. Granica wykrywalności (DL = 3δ) dla Cd¹¹⁴ wynosiła 0,0022 µg/l. Odchylenie standardowe pomiarów wykonywanych w trzech powtórzeniach dla każdej z próbek (SD_{pom}) nie przekraczało 0,03 µg/l.

W badanych grupach kobiet obliczono średnie arytmetyczne (x) oraz odchylenie standardowe (SD) dla stężeń kadmu. Różnice między średnimi oceniano testem t-Studenta. Za istotne statystycznie uznano różnice na poziomie ufności p<0,05.

Wyniki

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi stężeniami kadmu u matek dzieci z wadami rozszczepowymi czaszki twarzowej oraz u kobiet, które urodziły zdrowe dzieci (tab.1). Stężenie kadmu było niższe od średniego stężenia tego pierwiastka w grupie porównawczej u 65,5% matek dzieci z rozszczepem wargi, 77,4% matek dzieci z rozszczepem wargi i podniebienia, 83,9% matek dzieci z rozszczepem podniebienia.

Tabela 2. Stężenie kadmu u kobiet zamieszkałych w wybranych miastach.

Miejsce zamieszkania matek dzieci z rozszczepem	Zakres stężeń kadmu w surowicy (µg/l)
Warszawa (n=11)	0,07-0,53*
Białystok (n=2)	0,09-1,16
Elbląg (n=2)	0,11-0,20
Lublin (n=2)	0,05-0,08
Radom (n=2)	0,07-0,10
Repki (n=2)	0,15-0,20
Wyszków (n=2)	0,07-0,19
Miejsce zamieszkania matek zdrowych dzieci	
Warszawa (n=6)	0,05-0,51**
Mińsk Mazowiecki (n=2)	0,16-0,23

n – liczba kobiet; * mediana – 0,17 µg/l; **mediana – 20 µg/l

Stężenia kadmu u kobiet zamieszkałych w miejscowościach, z których pochodziła więcej niż jedna uczestniczka badania, przedstawiono w tabeli 2.

Dyskusja

U rodziców dzieci z izolowanym rozszczepem wargi i/lub podniebienia ryzyko wystąpienia wady u kolejnego potomstwa sięga kilkunastu procent (1). W świetle badań przeprowadzonych w Klinice Chirurgii Plastycznej w Łodzi co najmniej u 17% pacjentów występuje rodzinne obciążenie wadą (21). Identyfikacja czynników środowiskowych, powodujących znaczące zwiększenie ryzyka urodzenia dziecka z rozszczepem w obrębie czaszki twarzowej, umożliwiłaby stworzenie programów zapobiegawczych, np. dla rodzin z grupy wysokiego ryzyka.

W każdej z badanych grup matek dzieci z wadami rozszczepowymi czaszki twarzowej oraz u kobiet, które urodziły zdrowe dzieci występował szeroki zakres stężeń kadmu w surowicy. Wśród wszystkich 167 niepalących tytoniu probantek największe i najmniej jednokrotne stężenie tego pierwiastka stwierdzono u matek dzieci z RWP. Nie występowały istotne różnice w zakresie średniego stężenia kadmu, który należy do pierwiastków o bardzo długim okresie półtrwania w organizmie człowieka, pomiędzy matkami, u których pobrania krwi wykonano w pierwszych 12 miesiącach po porodzie oraz w późniejszym okresie.

U osób niepalących tytoniu ważnym źródłem kadmu jest dieta (15). Nie dysponowaliśmy szczegółowymi danymi dotyczącymi konsumpcji produktów spożywczych, często zawierających szczególnie dużo szkodliwego pierwiastka (np.

cynadry, owoce morza) lub pokarmów o przeciętnej zawartości kadmu a spożywanych w dużych ilościach, np. artykułów zbożowych (22). W przypadku analizy diety istotna jest również informacja o poziomie zanieczyszczenia środowiska w miejscu wytwarzania żywności (23).

Nie stwierdziliśmy istotnych różnic pomiędzy średnimi stężeniami kadmu u osób zamieszkujących na wsi i w miastach. Matki dzieci z wadą i kobiety z grupy porównawczej w większości pochodziły z województwa mazowieckiego oraz wschodniej Polski, gdzie nie doszło do zanieczyszczenia kadmem środowiska na skutek pozyskiwania kopaliny. Niestety podczas zbierania informacji o miejscu zamieszkania uczestniczek badania nie uwzględniono pytań dotyczących bliskiego sąsiedztwa spalarni i wysypisk śmieci oraz zakładów przemysłowych, których produkcja jest źródłem uciążliwych zanieczyszczeń. Kobiety mieszkające w pobliżu spalarni śmieci prawdopodobnie częściej rodzą dzieci z rozszczepami w obrębie czaszki twarzowej w porównaniu do ogólnej populacji (24). Interesujące są obserwacje Antoszewskiego i Kruk-Jeromin, którzy w latach 1988-1999 nie stwierdzili na terenie Łodzi zmniejszenia liczby urodzeń dzieci z rozszczepami wargi i/lub podniebienia, pomimo istotnego obniżenia emisji zanieczyszczeń przemysłowych w analizowanym okresie (25). Niezbędne są dalsze badania nad wpływem zanieczyszczeń przemysłowych na występowanie rozszczepów wargi i/lub podniebienia.

Analiza piśmiennictwa dotyczącego wpływu kadmu na rozwój zwierząt i ludzi wskazuje, że uzasadnione jest dalsze prowadzenie badań naukowych nad tym zagadnieniem. Kadm nie tylko bezpośrednio uszkadza komórki rozrodcze i rozwijający się płód, ale może być także przyczyną zaburzeń homeostazy hormonów płciowych u matki (7, 26).

W piśmiennictwie do oceny kumulacji kadmu w organizmie człowieka, obok pomiarów, w oparciu o metodę absorpcyjnej spektrometrii atomowej (GF-AAS) lub ICP-MS, w próbkach tkanek i krwi, są zalecane oznaczenia dobowego wydalania pierwiastka z moczem (15, 20).

Wniosek

Wyniki naszej pracy sugerują, że w praktyce klinicznej badanie stężenia kadmu w surowicy nie może służyć jako metoda identyfikacji niepalących kobiet z grupy zwiększonego ryzyka urodzenia dziecka z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

PIŚMIENNICTWO:

- Dudkiewicz Z. Rozszczep wargi i podniebienia w świetle współczesnych poglądów. *Med. Wieku Rozwoj.* 1997, 1 (4), 667-678.
- Kruk-Jeromin J. 25 lat doświadczeń w zespołowym leczeniu rozszczepów wargi i podniebienia. *Prz. Pediatr.* 2001, 31 (1), 93-95.
- Spritz R. A. The genetics and epigenetics of orofacial clefts. *Curr. Opin. Pediatr.* 2001, 13 (6), 556-560.
- Romitti P. A., Lidral A. C., Munger R. G., Daack-Hirsch S., Burns T. L., Murray J. C. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratol.* 1999, 59 (1), 39-50.
- Ferm V. H., Carpenter S. J. The relationship of cadmium and zinc in experimental mammalian teratogenesis. *Lab. Invest.* 1968, 18 (4), 429-432.
- Ferm V. H. The syneratogenic effect of lead and cadmium. *Experientia* 1969, 25 (1), 56-57.
- Domingo J. L. Metal-induced developmental toxicity in mammals: a review. *J. Toxicol. Environ. Health* 1994, 42 (2), 123-141.
- Casalino E., Calzeretti G., Sblano C., Landriscina C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 2002, 179 (1-2), 37-50.
- Buchko G., Hess N. J., Kennedy M. A. Cadmium mutagenicity and human nucleotide excision repair protein XPA: CD, EXAFS and ¹H/¹⁵N-NMR spectroscopic studies on the zinc(II)- and cadmium(II)-associated minimal DNA-binding domain (M98-F219). *Carcinogenesis* 2000, 21 (5), 1051-1057
- Jarup L., Berglund M., Elinder C. G., Nordberg G., Vahter M. Reproductive and developmental effects of zinc. *Scand. J. Work Environ. Health* 1998, 24 (suppl. 1), 37-41.
- Hartwig A. Current aspects in metal genotoxicity. *Biomaterials* 1995, 8 (1), 3-11
- Hossain Z., Huq F. Studies on the interaction between Cd(2+) ions and DNA. *J. Inorg. Biochem.* 2002, 90 (3-4), 85-96.

13. Palus J., Rydzyński K., Dziubałtowska E., Wyszyńska K., Natarajan A. T., Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat. Res.* 2003, 540 (1), 19-28.
14. Cesany P., Sevcikova M., Raska L. The influence of external factors on the development of primary palatal cleft. *Acta Chirurg. Plast.* 1991, 33 (4), 242-252.
15. Ryan J. A., Pahren H. R., Lucas J. B. Controlling cadmium in the human food chain: a review and rationale based on health effects. *Environ. Res.* 1982, 28 (2), 251-302.
16. Świątczak J., Cimander B. Kadm w środowisku. *Med. Prakt.* 1995, 5 (supl. 5), 39-56.
17. Nordberg G. Excursions of intake above ADI: case study on cadmium. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1999, 30, S57-S62.
18. Radisch B., Luck W., Nau H. Cadmium concentrations in milk and blood of smoking mothers. *Toxicol. Letters* 1987, 36 (2), 147-152.
19. Nixon D. E., Moyer T. P. Routine clinical determination of lead, arsenic, cadmium and thallium in urine and whole blood by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta. Part B.* 1996, 51 (1), 13-25.
20. Zhang Z. W., Shimbo S., Ochi N., Eguchi M., Watanabe T., Moon C. S., Ikeda M. Determination of lead and cadmium in food and blood by inductively coupled plasma mass spectrometry: a comparison with graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Sci. Total Environ.* 1997, 205 (2-3), 179-187.
21. Kot M., Kruk-Jeromin J. Dziedziczenie rozszczepów wargi i podniebienia. *Pol. Merk. Lek.* 2003, 15 (86), 158-160.
22. Jorhem L., Sundström B. Levels of lead, cadmium, zinc, copper, nickel, chromium, manganese and cobalt in foods on the Swedish market, 1983-1990. *J. Food Composit. Analysis* 1993, 6 (2), 223-241.
23. Krelowska-Kulas M., Kędzior W., Popek S. Content of some metals in goat's milk from southern Poland. *Nahrung* 1999, 43 (5), 317-319.
24. Tusscher G. W., Stam G. A., Koppe J. Open chemical combustions resulting in a local increased incidence of orofacial clefts. *The IPA Congress of Pediatrics, Amsterdam, 9-14.08.1998, Abstract book: 519*
25. Antoszewski B., Kruk-Jeromin. Analiza wpływu wybranych czynników środowiskowych na częstość występowania rozszczepów wargi i/lub podniebienia na terenie Łodzi w latach 1988-1999. *Ortopedia Szczękowa i Ortodontycja* 2003, 2 (1), 6-8
26. Satoh M., Koyama H., Kaji T., Kito H., Tohyama C. Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku J. Exp. Med.* 2002, 196 (1), 23-32.

Adres do korespondencji:

Dr med. Kamil Hozyasz
Klinika Pediatrii
Instytut Matki i Dziecka
ul. Kasprzaka 17a
01-211 Warszawa
tel./fax: (0-22) 6328009

