

**Joanna Kreczko*, Elżbieta Kamysz*, Zbigniew Maćkiewicz*,
Leon Kośmider****

**OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WYBRANYCH METALI CIĘŻKICH
W ŚLINIE LUDZKIEJ – NOWA METODA OKREŚLANIA EKSPOZYCJI
RÓŻNYCH POPULACJI LUDZI NA ZANIECZYSZCZENIE METALAMI**

**ASSESSING HUMAN SALIVARY HEAVY METAL CONCENTRATIONS
– A NEW METHOD OF DETERMINING EXPOSITION TO METAL
POLLUTION**

Słowa kluczowe: ślina, metale ciężkie, monitoring.

Key words: saliva, heavy metals, monitoring.

The aim of our study was to investigate presence and determine concentration of heavy metals such as Co, Ni, Zn, Pb, Cd, Cu, Fe and Mn in saliva of different populations of people. Two populations were subjected to the testing:

- *secondary school, university and PhD students living in Gdańsk and Gdańsk environs;*
- *university and PhD students living in Śląsk region.*

Saliva was collected non-invasive, by spitting to polypropylene laboratory tubes. Than it was freeze-dried and mineralized. Analyses were performed with using of atomic absorption spectrometry (AAS) technique.

The preliminary results have shown presence of small quantity of Pb in the saliva from people living in Gdańsk. Cd, Cu and Zn were not detected. We also determined quantities of Pb, Ni, Co and Mn, and significant amount of Fe.

* *Mgr Joanna Kreczko, dr Elżbieta Kamysz, prof. dr hab. Zbigniew Maćkiewicz – Zakład Chemii Polipeptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, ul. Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdańsk; tel.: 58 523 53 01; e-mail: joanna.m.kreczko@gmail.com*

** *Leon Kośmider – student IV roku w Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec; tel.: 32 364 13 00*

Our results have shown that there is little relationship between considered individual conditionings such as: age, place of residence, smoking, wearing braces etc; and salivary heavy metal concentrations.

Human saliva has a potential to become alternative material for monitoring environmental exposition to heavy metals. However the method shall be optimized, and the correlation between saliva and other body fluids heavy metal concentrations should be determined. That would be the subject of later studies.

1. WPROWADZENIE

Ślina jest złożonym płynem produkowanym i uwalnianym do jamy ustnej przez zespół wyspecjalizowanych gruczołów charakterystycznych wyłącznie dla ssaków [Kmieć 2007]. Jest ona roztworem wielu organicznych i nieorganicznych związków, które mimo że stanowią jedynie niewielki procent jej składu, stanowią o jej unikalnych właściwościach [Schipper 2007, Streckfus 2002]. Ze śliną częściowo wydalane są z organizmu liczne substancje organiczne i nieorganiczne (użytki, leki, metale ciężkie), a wyniki badań różnych wydzielanych składników (jak białka, peptydy, hormony itp.) nabierają coraz większego znaczenia w diagnostyce [Polkowska i in. 2003, Tabak 2001].

Pobieranie próbek śliny jako materiału do pomiarów stężenia metali ciężkich w szeroko zakrojonym szacowaniu zagrożeń środowiskowych ma wiele zalet. Po pierwsze, ślina wydzielana przez gruczoły ślinowe zawiera także składniki pozakomórkowych płynów ciała. Co ciekawe, kluczowe jony metali nie dyfundują wprost z gruczołów, lecz są transportowane do śliny za pośrednictwem transportu aktywnego. Tak więc w teorii chemia śliny różni się od surowicy, co daje dodatkowe możliwości biochemicznego oszacowania ekspozycji ludzi na toksyczne substancje [Wang i in. 2008]. Po drugie, próbka do badań może być uzyskana szybko i w prosty sposób. Pobór materiału do badań jest nieinwazyjny i może być przeprowadzony w dowolnym miejscu, nawet w miejscu pracy. Ponadto do poboru próbek nie jest konieczna obecność wykwalifikowanego personelu (jak przy pobieraniu krwi) – wystarczy proste przeszkolenie. Próbki śliny są wygodne w przechowywaniu i transporcie, stanowią stosunkowo stabilny materiał do analizy zawartości jonów metali [Olmez i in. 1988, Streckfus i Bigler 2002].

2. CEL, MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Celem badań prezentowanych w niniejszym opracowaniu było porównanie stężeń kobaltu (Co), niklu (Ni), cynku (Zn), ołowiu (Pb), kadmu (Cd), miedzi (Cu), żelaza (Fe) i manganu (Mn) w ślinie mieszkańców Województwa Pomorskiego (Gdańsk i okolice) oraz regionu Górnego Śląska (Sosnowiec i okolice) oraz określenie czynników mających wpływ na stężenia wspomnianych metali w ślinie badanych osób, a niezwiązanych z miejscem zamieszkania, będących możliwymi powodami ekspozycji na wspomniane metale ciężkie (takie jak: wypełnienia dentystryczne, aparaty ortodontyczne czy palenie papierosów).

Przedmiotem badań była ślina pobrana od osób w przedziale wiekowym 18–30 lat zamieszkałych w Województwie Pomorskim oraz w regionie Górnego Śląska. Łącznie przebadano 50 osób – 18 z woj. Pomorskiego i 32 z woj. Śląskiego.

Próbki pobierano w sposób nieinwazyjny, przez spluwanie do polipropylenowych, zakręcanych probówek. Objętość próbek wynosiła od 5 do 10 ml.

W celu przygotowania próbek do analiz na obecność jonów metali, poddawano je liofilizacji. Następnie otrzymany liofilizat ważono, po czym dodawano do niego 5 lub 10 ml (w zależności od objętości próbki liofilizowanej) stężonego kwasu azotowego (V) i ogrzewano w temperaturze wrzenia ok. 40 min. Po tym czasie dodawano 5 lub 10 ml (j.w.) perhydroflu, aby zapewnić pełną mineralizację, i ponownie ogrzewano ok. 20 min. Tak przygotowane próbki rozcieńczano wodą dejonizowaną do objętości odpowiednio 25 lub 50 ml.

Analizy wykonano techniką absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA), na spektrometrze Carl Zeiss Jena, w Zespole Pracowni Fizykochemicznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Granice oznaczalności badanych metali podano w tabeli 1. Wyniki analiz z uwzględnieniem poziomu tła przedstawiono na wykresach (rys. od 1 do 5).

Tabela 1. Oznaczane metale i ich granice wykrywalności

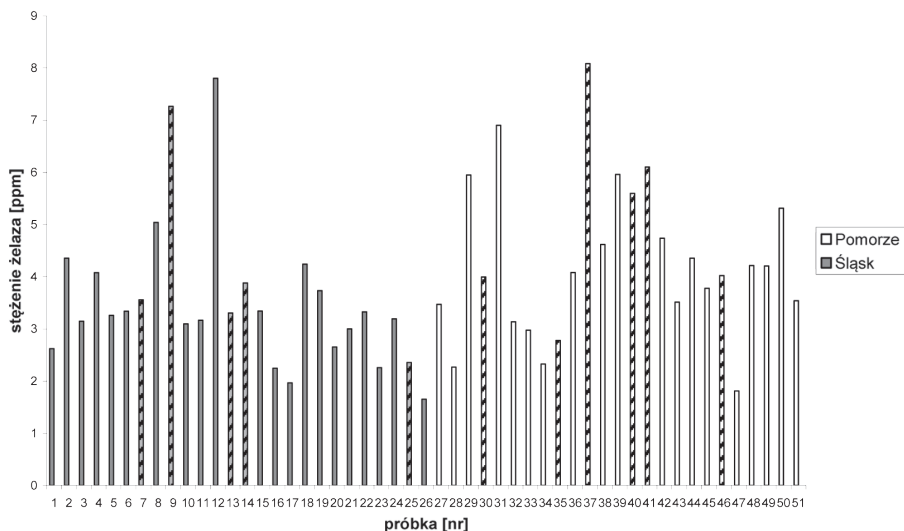
Table 1. Investigated metals and their limits of detection

Metal	Granica wykrywalności w ppm
Cu	0,04
Fe	0,055
Zn	0,012
Ni	0,055
Pb	0,15
Cd	0,015
Mn	0,02
Co	0,06

3. WYNIKI

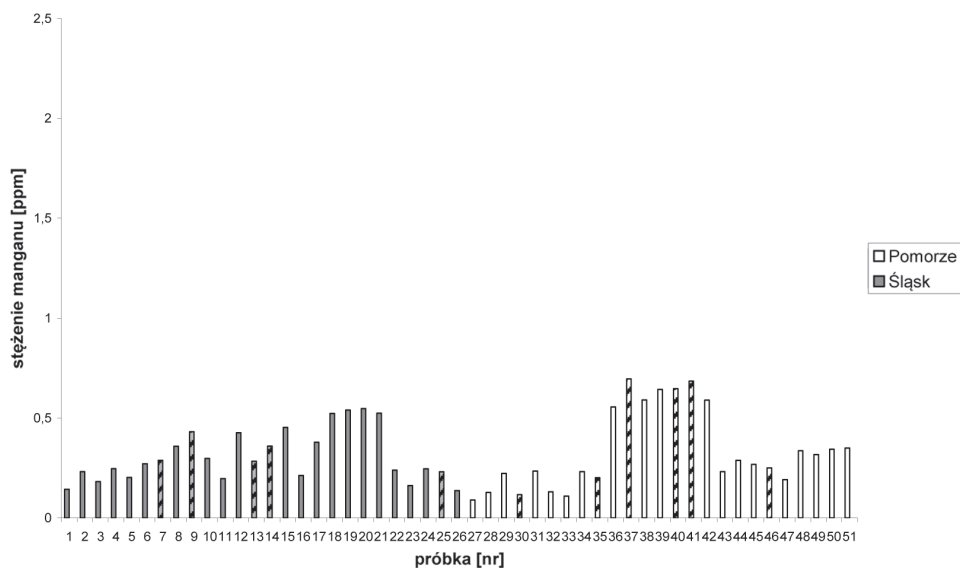
Przeprowadzone badania wykazały znaczną obecność jonów żelaza we wszystkich badanych próbkach (rys. 1). Według nielicznych danych literaturowych na temat stężenia jonów metali w ślinie można stwierdzić, że zawartość żelaza w 10 ml śliny zdrowej osoby wynosi od ok. 2 do 7,7 ppm [Eliades i in. 2003, Olmez i in. 1988, Chicharro i in. 1999]. Otrzymane wyniki generalnie mieszczą się w podanym zakresie. Brak jest wyraźnej zależności pomiędzy miejscem zamieszkania badanych osób, a zawartością żelaza w ich ślinie.

Wyniki pomiaru stężenia manganu (Mn) w pobranych próbkach przedstawiono na wykresie 2. Brak jest jednoznacznych danych literaturowych na temat stężenia tego pierwiastka w ślinie. Tak jak w odniesieniu do żelaza, brak wyraźnej zależności stężenia manganu w ślinie od badanych czynników, takich jak miejsce zamieszkania czy palenie papierosów.



Rys. 1. Zawartość żelaza w 10 ml badanej próbki śliny (pole kreskowane reprezentuje osobę palącą papierosy)

Fig. 1. Content of iron in 10 ml of the investigated saliva sample (marked areas represent people smoking cigarettes)



Rys. 2. Zawartość manganu w 10 ml badanej próbki śliny (pole kreskowane reprezentuje osobę palącą papierosy)

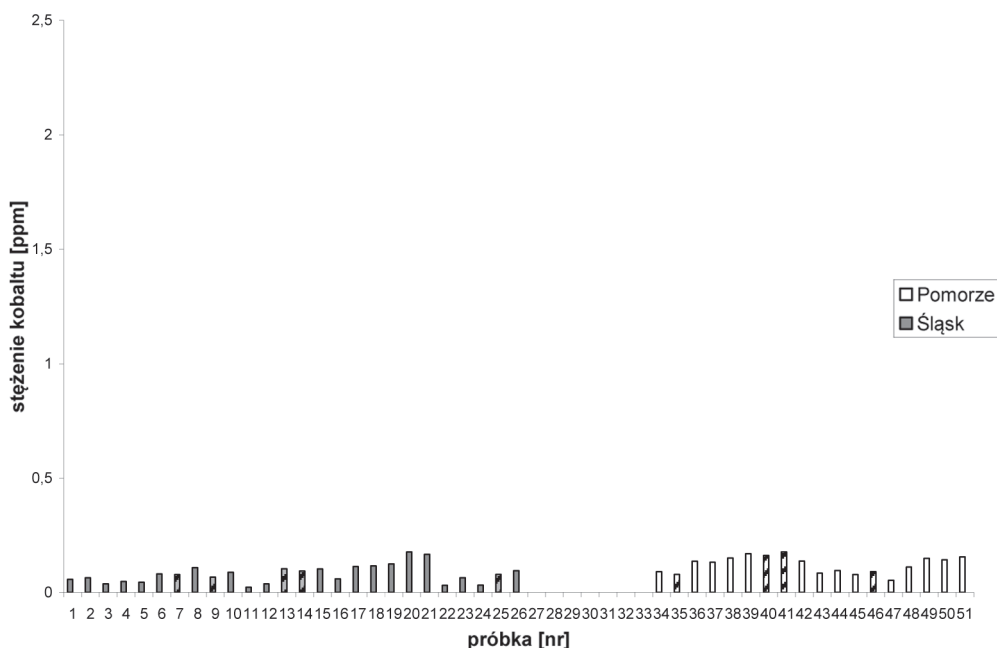
Fig. 2. Content of manganese in 10 ml of the investigated saliva sample (marked areas represent people smoking cigarettes)

W ślinie badanych osób wykryto także niewielkie ilości kobaltu (Co) – rysunek 3. Dane literaturowe sugerują, że zawartość kobaltu w 10 ml śliny zdrowej osoby wynosi ok. 0,02 ppm. Z przeprowadzonych badań wynika, że średnia zawartość kobaltu w 10 ml śliny osób badanych wynosi ok. 0,1 ppm.

Niewielkie ilości niklu (Ni) wykryto u większości badanych osób zamieszkałych w okolicach Gdańska – 12 osób spośród 19 osób badanych, a także u niektórych osób zamieszkałych w Sosnowcu i okolicach – 7 osób spośród 32 osób badanych (rys. 4). Ponadto u jednej z osób z Gdańska wykryto znaczne ilości tego pierwiastka (osoba niepaląca, nieposiadająca aparatu ortodontycznego, kolczyka w jamie ustnej bądź nietypowych uzupełnień dentystycznych).

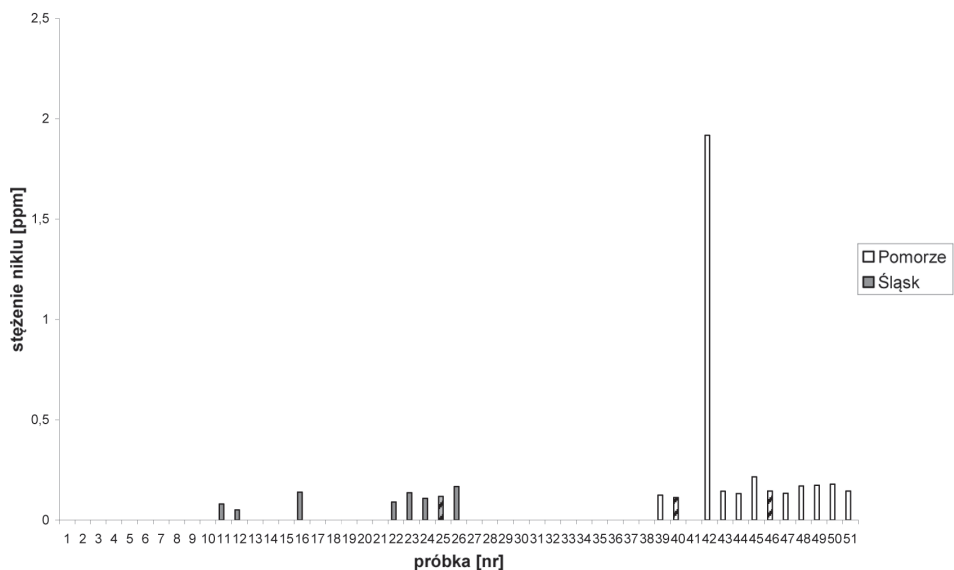
U dwóch osób pochodzących z grupy gdańskiej i czterech z grupy śląskiej wykryto minimalne ilości ołowiu (Pb). U pozostałych badanych zawartość ołowiu w ślinie nie przekroczyła granicy oznaczalności (0,15 ppm). Wyniki pomiarów, po uwzględnieniu poziomu tła, przedstawiono na rysunku 5.

Stężenia miedzi (Cu), cynku (Zn) i kadmu (Cd) w badanych próbkach znajdowały się poniżej granicy oznaczalności spektrometru.



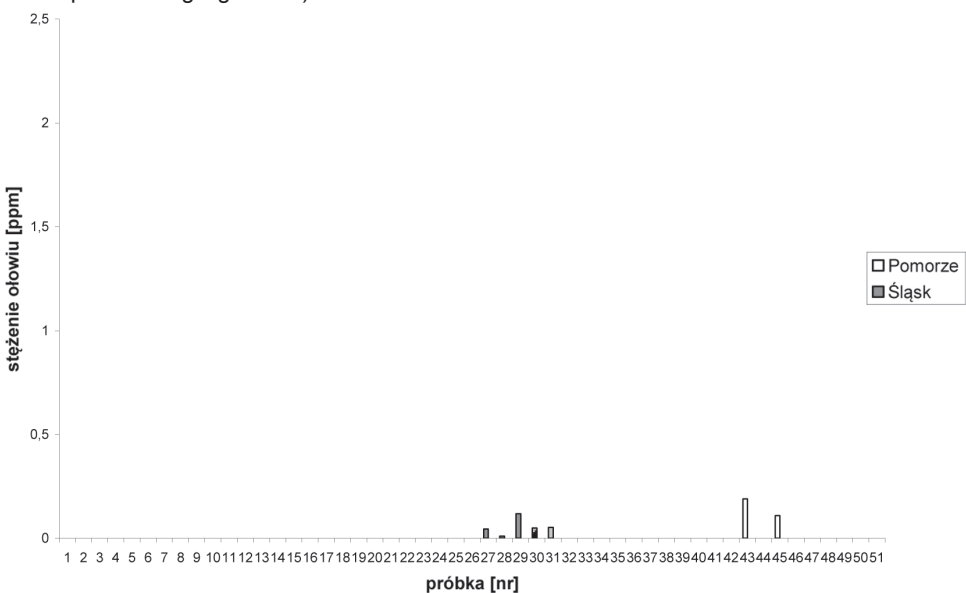
Rys. 3. Zawartość kobaltu w 10 ml badanej próbki śliny (pole kreskowane reprezentuje osobę palącą papierosy)

Fig. 3. Content of cobalt in 10 ml of the investigated saliva sample (marked areas represent people smoking cigarettes)



Rys. 4. Zawartość niklu w 10 ml badanej próbki śliny (pole kreskowane reprezentuje osobę palącą papierosy)

Fig. 4. Content of nickel in 10 ml of the investigated saliva sample (marked areas represent people smoking cigarettes)



Rys. 5. Zawartość ołowiu w 10 ml badanej próbki śliny (pole kreskowane reprezentuje osobę palącą papierosy)

Fig. 5. Content of lead in 10 ml of the investigated saliva sample (marked areas represent people smoking cigarettes)

4. PODSUMOWANIE

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że ślina ma szansę być alternatywnym materiałem do badań poziomu metali u ludzi, zarówno mikroelementów, takich jak żelazo, kobalt czy mangan, jak i pierwiastków naturalnie niepełniących żadnej roli w organizmie, takich jak ołów czy nikiel.

Badania wykazały, że istnieje niewielka zależność pomiędzy stężeniem badanych metali w ślinie a takimi czynnikami jak miejsce zamieszkania, palenie papierosów i uzupełnienia dentystyczne. Czynnikiem, wpływającym w sposób decydujący na zawartość niklu i ołowiu w ślinie badanych osób była prawdopodobnie indywidualna ekspozycja badanej osoby na dany metal. Uwagę jednak zwraca fakt, że spośród 51 przebadanych osób obecność większych ilości ołowiu stwierdzono u dwóch osób zamieszkałych w Gdańsku, u tej grupy także stwierdzono większe ilości niklu.

Wyniki pomiarów wskazują również, że w przypadku ołowiu, kadmu, niklu i manganu brak jest związku pomiędzy stężeniem tych pierwiastków i paleniem papierosów.

Otrzymane wyniki sugerują obecność innych niż badane czynniki, wpływających na poziom metali w ślinie. Do takich mogą należeć: dieta (rodzaj pożywienia, napoje w tym ujęcie wody pitnej), miejsce pracy i wiele innych.

W celu stwierdzenia lub/i określenia zawartości miedzi, cynku i kadmu, a także potwierdzenia otrzymanych wyników planowane jest powtórne przeprowadzenie podobnych badań z użyciem innej techniki badań. Pożądane jest również określenie korelacji pomiędzy stężeniem wybranych metali w ślinie a stężeniem w organizmie (włosy, paznokcie, krew itp.). Stanowiąc to będzie przedmiot dalszych badań w tym zakresie.

Badania sfinansowano ze środków Uniwersytetu Gdańskiego DS 8362-4-0135-9 i BW 8000-5-0254-9.

PIŚMIENNICTWO

- CHICHARRO J.L., SERRANO V., UREÑA R., GUTIERREZ A.M., CARVAJAL A., FERNÁNDEZ-HERNANDO P., LUCÍA A. 1999. Trace elements and electrolytes in human resting mixed saliva after exercise. *British Journal of Sports Medicine* 33: 204–207.
- ELIADES T., TRAPALIS C., ELIADES G., KATSAVRIAS E. 2003. Salivary metal levels of orthodontic patients: methodological and analytical approach. *European Journal of Orthodontics* 25: 103–106.
- GARHAMMER P., HILLER K.A., REITINGER T., SCHMALZ G. 2004. Metal content of saliva of patients with and without metal restorations. *Clinical Oral Investigations* 8: 238–242.
- KAUFMAN E., LAMSTER I.B. 2002. The diagnostic applications of saliva – a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 13 (2): 197–212.

- KMIEĆ Z. 2007. *Histologia i cytofizjologia zęba i jamy ustnej*. Elsevier Urban & Partner. Wrocław.
- NIEUWAMERONGEN A.V., VEERMAN E.C.I. 2002. Salivary glands and saliva: (numer 2) Saliva – the defender of oral cavity. *Oral Diseases*: 12–22.
- OLMEZ I., GULOVALI M.C., GORDON G.E., HENKIN R.I. 1988. Trace elements in human saliva. *Biological Trace Elements Research* 17: 259–270.
- POLKOWSKA Ż., KOZŁOWSKA K., NAMIEŚNIK J. 2003. Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. Płyny biologiczne jako źródło informacji o narażeniu człowieka na środowiskowe czynniki chemiczne. CCEAM, Gdańsk.
- SCHIPPER R.G., SILLETTI E., VINGERHOEDS M.H. 2007. Saliva as research material: Biochemical, physiochemical and practical aspects. *Archives of oral biology* 52: 1114–1135.
- SLAVKIN H.C. 1998. Towards molecularly based diagnostics for the oral cavity. *Journal of American Dental Association* 129: 1138–1143.
- STRECKFUS C.F., BIGLER L.R. 2002. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral diseases* 8: 69–76.
- TABAK L.A. 2001. A revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnostics. *Journal of Dental Education* 65 (12): 1335–1339.
- WANG D., DU X., ZHENG W. 2008. Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. *Toxicology letters* 176: 40–47.