

Anna Skoczyńska¹
Leszek Gruszczyński²
Barbara Turczyn¹
Marek Ścieszka²
Anna Wojakowska¹
Tomasz Pawłowski¹
Edward Schmidt²

β-SYNTAZA CYSTATIONINY (CBS), γ-LIAZA CYSTATIONINY (CSE) I OKSYDAZA CYTOCHROMU C (COX) W SUROWICY GÓRNIKÓW KOPALNI MIEDZI POTENCJALNIE NARAŻONYCH NA EMISJE SIARKOWODORU

SERUM CYSTATHIONINE β-SYNTHASE (CBS), CYSTATHIONINE γ-LYASE (CSE) AND CYTOCHROME C OXIDASE (COX)
IN COPPER MINE MINERS POTENTIALLY EXPOSED TO HYDROGEN SULFIDE

¹ Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu / Wrocław Medical University, Wrocław, Poland
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego / Department of Internal
and Occupational Diseases and Hypertension

² Miedziowe Centrum Zdrowia / The Copper Health Centre, Lubin, Poland

STRESZCZENIE

Wstęp: Celem badań była ocena stężenia mitochondrialnego enzymu docelowego dla toksycznego działania siarkowodoru, tj. oksydazy cytochromu c (COX) oraz enzymów uczestniczących w syntezie endogennego H₂S (siarkowodoru) – syntazy β-cystationiny (CBS) i γ-liazy cystationiny (CSE) w surowicy górników kopalni miedzi. **Materiał i metody:** Badanie wstępne przeprowadzono u 237 górników, a zasadnicze u 88 górników zatrudnionych w 2 szybach: I – bez zarejestrowanych emisji H₂S w ciągu ostatnich 10 lat (grupa badana A); II – w którym występowały emisje H₂S (grupa badana B). U górników przeprowadzono badania lekarskie i bezpośrednio po wyjeździe z kopalni na powierzchnię pobrano od nich po 10 ml krwi żyłnej. **Wyniki:** Nie stwierdzono żadnych zmian klinicznych ani biochemicznych, typowych dla toksycznego działania siarkowodoru. Stężenie sulfhemoglobiny było nieoznaczalne, nie stwierdzono zmian w układzie oksydo-redukcyjnym. W grupie B wykazano natomiast zmiany regulacyjne, które mogą być wynikiem powtarzanych ekspozycji na H₂S. Do tych zmian należy wyższe stężenie CBS i CSE w surowicy, wzrost aktywności enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) w porównaniu z grupą A oraz liniowa zależność między ACE a CSE ($r = 0,6927$; $p < 0,001$). Wykazano, że palenie papierosów obniża stężenie COX ($p < 0,05$), jednak u górników zatrudnionych w szybie II obniżenie stężenia COX może wynikać, poza paleniem, także z obecności siarkowodoru w gazach kopalnianych. **Wnioski:** Stężenie COX może być czułym wskaźnikiem ekspozycji na siarkowodor. Pomiar stężenia siarkowodoru w krwi przeprowadzane na stanowiskach pracy powinny wyjaśnić przyczynę zmian w aktywności COX, CBS i CSE. Med. Pr. 2015;66(4):539–548

Słowa kluczowe: górnicy, siarkowodor, oksydaza cytochromu c, β-syntaza cystationiny, γ-liaza cystationiny, kopalnia miedzi

ABSTRACT

Background: The aim of the study was to evaluate serum levels of the target enzyme for H₂S toxicity – cytochrome c oxidase (COX) and enzymes involved in the synthesis of H₂S – cystathionine β-synthase (CBS) and cystathionine γ-lyase (CSE) in copper mine miners. **Material and Methods:** The initial and basic study was conducted respectively in 237 and 88 miners, working in 2 mining shafts: I – no H₂S emissions recorded in the last 10 years (study group A) and II – H₂S emissions occurred (study group B). A medical examination was performed and 10 ml of blood was collected from miners immediately after exiting the mine. **Results:** There were no clinical or biochemical changes typical for H₂S toxicity. Sulfhemoglobine was undetectable and there were no changes in the red-ox system. However, in group B, regulatory changes were found; a tendency to higher concentration of CBS and CSE, a higher activity of angiotensin converting enzyme (ACE) compared to group A ($p < 0.05$) and a linear relationship between ACE and CSE ($r = 0.6927$; $p < 0.001$). It has been shown that cigarette smoking decreases COX ($p < 0.05$), however, in miners working in shaft II, the decreased level of COX may result also from the presence of H₂S in the gaseous emissions. **Conclusions:** COX concentration can be a sensitive indicator of exposure to H₂S. The measurements of blood H₂S

concentrations carried out in workplaces should explain the cause of the changes observed in the COX, CBS and CSE activity. *Med Pr* 2015;66(4):539–548

Key words: miners, hydrogen sulfide, cytochrome c oxidase, cystathionine β -synthase, cystathionine γ -lyase, copper mine

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Anna Skoczyńska, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław, e-mail: anna.skoczynska@umed.wroc.pl
Nadesłano: 21 lutego 2015, zatwierdzono: 13 lipca 2015

WSTĘP

W ostatnich latach zarejestrowano w Polsce pojedyncze przypadki ostrego zatrucia siarkowodorem. Z kolei w USA w latach 1984–1994 odnotowano 80 zgonów z powodu zatrucia H_2S na stanowisku pracy [1], a w latach 1993–1999 – 52 zgony [2]. Wcześniej, w latach 1969–1973, w Kanadzie, w jednym tylko stanie Alberta zarejestrowano 172 przypadki hospitalizacji osób z rozpoznaniem zatrucia siarkowodorem (zmarło 13 chorych) [3].

Siarkowódor w stężeniu powyżej 1400 mg/m^3 powoduje nagły zgon w następstwie porażenia ośrodka oddechowego [4]. W mniejszych stężeniach działa toksycznie na układ nerwowy i oddechowy, mięsień sercowy oraz narząd wzroku [5,6]. Na poziomie subkomórkowym strukturą docelową dla toksycznego działania siarkowodoru są mitochondria i enzymy łańcucha wewnątrzkomórkowego oddychania – przede wszystkim oksydaza cytochromu c [7,8].

Endogennie wytwarzany siarkowódor pełni funkcję gazowej molekuly sygnalizacyjnej o działaniu podobnym do tlenu azotu czy tlenu węgla [9–12]. Głównym substratem syntezy endogenego siarkowodoru jest L-cysteina, a enzymy katalizujące reakcje syntezy to β -syntaza cystationiny (cystathionine β -synthase – CBS) oraz γ -liaza cystationiny (cystathionine γ -lyase – CSE), oba zależne od kofaktora – fosforanu pirydoksalu. Oba enzymy – CBS i CSE – są także odpowiedzialne za syntezę cysteiny, prekursora glutationu, głównego związku o działaniu antyoksydacyjnym [9,13].

Beta-syntaza cystationiny znajduje się głównie w komórkach centralnego układu nerwowego, zwłaszcza w neuronach hipokampa i komórkach Purkiniego oraz w nerkach, wątrobie, komórkach jelit, wysp trzustkowych, łożysku i macicy [13,14]. Gamma-liaza cystationiny obecna jest przede wszystkim w komórkach mięśni gładkich ściany naczyń krwionośnych i mięśni sercowym, a także w wątrobie, nerkach, jelicie, macicy, mózgu, trzustce i łożysku. Synteza siarkowodoru z L-cysteiny zwykle następuje w obecności jednego enzymu – CBS lub CSE. W przypadku braku L-cysteiny

siarkowódor może powstawać z homocysteiny, jednak wymaga to obecności zarówno CBS, jak i CSE [15].

Częstość występowania w Polsce ostrego zatrucia siarkowodorem może być niedoszacowana [16]. Z kolei w krajach takich jak USA czy Kanada wskaźniki śmiertelności z powodu ostrego zatrucia siarkowodorem były w ubiegłym wieku prawdopodobnie zawyżone [17]. Brakuje danych na temat przewlekłego działania siarkowodoru u ludzi, poza wskazującymi na upośledzenie węchu [18]. Dotąd nie są znane czułe markery ekspozycji na ten gaz.

Celem niniejszego badania była ocena stężenia mitochondrialnego enzymu, docelowego dla toksycznego działania siarkowodoru, tj. oksydazy cytochromu c oraz enzymów uczestniczących w metabolizmie endogenego H_2S – syntazy β -cystationiny i γ -liazy cystationiny – w surowicy górników kopalni miedzi, nienarażonych i narażonych na emisję siarkowodoru w pracy pod ziemią. Kolejnym celem było odniesienie ewentualnych zmian enzymatycznych do stanu zdrowia badanych górników.

MATERIAŁ I METODY

Badanie wstępne przeprowadzono u 237 górników kopalni miedzi, zatrudnionych w 2 szybach:

- I (128 górników) – nie zarejestrowano w nim emisji H_2S w ciągu ostatnich 10 lat – grupa badana (A) małego ryzyka,
- II (109 pracowników) – występowały w nim emisje siarkowodoru – grupa badana (B) zwiększonego ryzyka.

Kryteriami doboru górników do badania wstępnego (etap I) były ich zgoda na przeprowadzenie badania i okres zatrudnienia w kopalni pod ziemią nie krótszy niż 10 lat. Badanie wstępne polegało na badaniu podmiotowym i pobraniu, bezpośrednio po wyjeździe górników z kopalni, krwi żyłnej do oznaczeń enzymatycznych.

Badanie zasadnicze (II etap) przeprowadzono u 88 ochotników. Kryterium doboru górników do grup A i B było ryzyko ekspozycji na siarkowódor na stanowisku

pracy – małe (w grupie A liczącej 54 górników) lub zwiększone (w grupie B liczącej 34 górników). W badaniu zasadniczym zebrano informacje dotyczące wieku, wzrostu, masy ciała (obliczano wskaźnik masy ciała (body mass index – BMI)), palenia papierosów, spożywania alkoholu, chorób przewlekłych i długotrwałego stosowania leków. Przeprowadzono badanie przedmiotowe z pomiarem ciśnienia tętniczego oraz badanie laryngologiczne. Pobrano krew do oznaczeń morfologii krwi, odczynu Biernackiego (OB), wskaźników funkcji wątroby i nerek oraz wskaźników toksykologicznych i enzymatycznych.

Badania przeprowadzono zgodnie z zasadami etyki, zawartymi w Deklaracji Helsińskiej z 1975 r., z poprawkami z 1983 r. [19].

Parametry morfologiczne krwi (hematokryt, hemoglobinę, eryocyty, leukocyty, płytki krwi), OB, wskaźniki biochemiczne (kreatyninę, bilirubinę, transaminazę glutaminowo-pirogronową (glutamine-pyruvate transaminase – GPT), aminotransferazę asparagianową (glutamic oxaloacetic transaminase – GOT, γ -glutamylotransferazę (gamma glutamyltranspeptidase – GGTP) oznaczano metodami rutynowymi. Stężenie methemoglobiny (MetHb), karboksyhemoglobiny (carboxyhemoglobin – COHb) oraz sulfhemoglobiny (sulfhemoglobin – SHb) mierzono przy użyciu aparatu AVL 912 Co-Oxylite Analyzer (AVL Corp., Austria). Stężenia β -syntazy cystationiny (CBS), γ -liazy cystationiny (CSE), oksydazy cytochromu c (cytochrome c oxidase – COX), 8-epi-prostaglandyny F_{2a} (8-epi-PG) oraz aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I (angiotensyn I converting enzyme – ACE) oznaczano przy użyciu testów immunoenzymatycznych (metodą Elisa) firmy EIAab[®] Wuhan Eiaab Science CO., LTD (Chiny).

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (superoxide dismutase – SOD) oraz peroksydazy glutationu (glutathione peroxidase – GPX) oznaczono metodą kolorymetryczną, standaryzowanymi testami firmy BioAssay Systems (USA), przy wykorzystaniu czytnika mikroplątek Elisa. Aktywność S-transferazy glutationu (glutathione S-transferase – GST) oznaczano testami firmy Cayman Chemical Company (USA), a stężenie endoteliny-1 (endothelin 1 – ET-1) metodą Elisa, przy użyciu testów firmy R&D Systems Europe, Ltd. (UK).

Obliczenia statystyczne

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 10.0 Stat Polska. Rozkład każdej zmiennej o charakterze ciągłym określano przy zasto-

sowaniu testu Chi², zależnie od uzyskanego rozkładu stosowano parametryczne (w przypadku rozkładu normalnego) lub nieparametryczne metody analizy. Istotność różnic zmiennych o rozkładzie normalnym oceniano przy pomocy testu najmniejszych istotnych różnic (NIR) oraz testu rozsądnej istotnej różnicy (RIR) Tukeya. W obliczeniach nieparametrycznych stosowano testy Manna-Whitneya lub Kołmogorowa-Smirnowa. Dla zmiennych nominalnych w próbach niezależnych istotność różnic częstości występowania poszczególnych wartości w grupach analizowano przy użyciu testu Kruskala-Wallisa oraz testu mediany. Wykorzystano także jedno- i wieloczynnikową analizę regresji logistycznej. Korelacje liniowe oceniano na podstawie analizy porządku rang Spearmana. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

WYNIKI

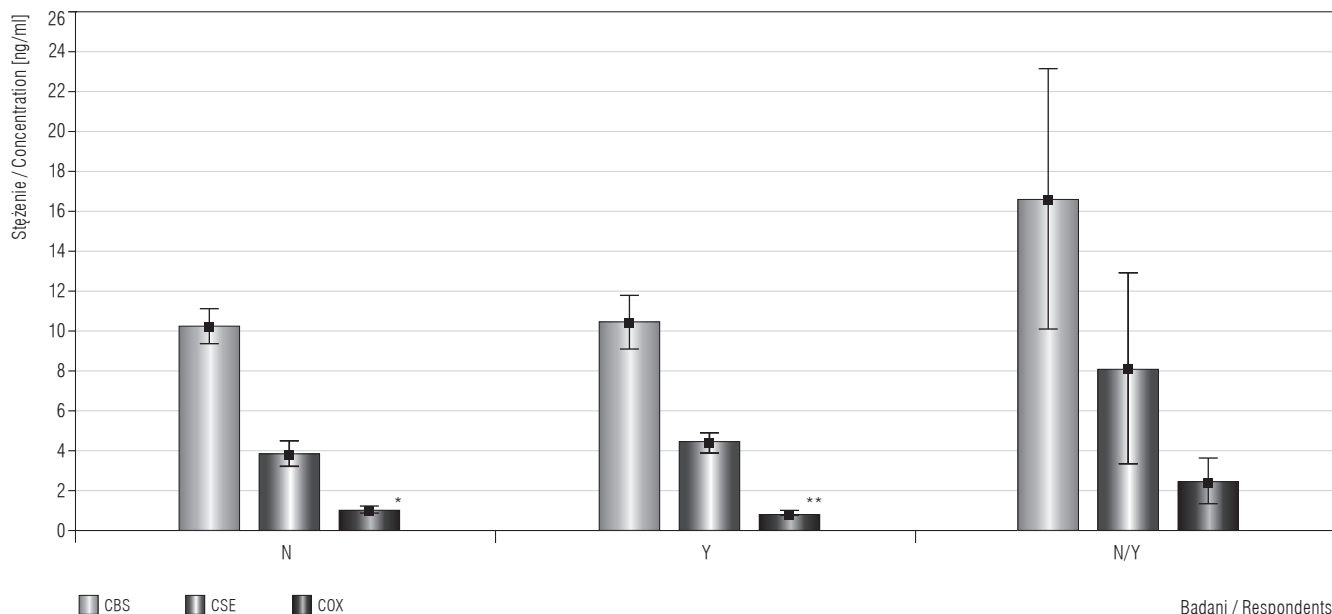
W badaniu wstępnym przeprowadzonym w grupie 237 górników kopalni miedzi wykazano ujemną zależność między wiekiem badanych a stężeniem β -syntazy cystationiny ($r = -0,1637$; $p < 0,01$) oraz tendencję do zmniejszania się stężenia oksydazy cytochromu c wraz z wiekiem ($p = 0,0519$). Nie stwierdzono takiej zależności dla γ -liazy cystationiny. Nieparametryczny test Manna-Whitneya wykazał istotny wpływ miejsca zatrudnienia górników (w szybie I lub II) na stężenie β -syntazy cystationiny (liczebność grup: 128 osób i 109 osób, odpowiednio dla grupy górników zatrudnionych w szybie o małym i zwiększonym ryzyku narażenia na siarkowodór, $p = 0,0337$).

Analiza stężenia oznaczanych enzymów zależnie od palenia papierosów (nie otrzymano danych dotyczących palenia od 33 górników) wykazała:

- stężenie oksydazy cytochromu c niższe o ok. 20% u 111 palaczy niż u 81 osób niepalących ($0,81 \pm 0,98$ ng/ml vs $1,03 \pm 1,67$ ng/ml),
- wyższe stężenie wszystkich oznaczanych enzymów u 12 osób, które przestały palić, niż u palących papierosy i niepalących.

W przypadku oksydazy cytochromu c różnice te były statystycznie istotne (odpowiednio: $p < 0,01$ i $p < 0,05$) (ryc. 1).

W badaniu zasadniczym, którym objęto 2 grupy górników – 54 osoby z grupy A o małym ryzyku emisji siarkowodoru i 34 osoby z grupy B o zwiększonym ryzyku – na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego nie stwierdzono istotnych zmian układowych lub narządowych, poza zwiększonym BMI



Wyniki przedstawiono jako średnie (słupki) \pm odchylenie standardowe (wąsy) / The results are presented as means (bars) \pm standard deviation (mustaches).
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ w odniesieniu do grupy N/Y / compared to N/Y group.

Ryc. 1. β -syntaza cystationiny (CBS), γ -liaza cystationiny (CSE) i oksydaza cytochromu c (COX) w surowicy górników niepalących papierosów (N), palących papierosy (Y) i osób, które przestały palić (N/Y)

Fig. 1. Serum cystathionine β -synthase (CBS), cystathionine γ -lyase (CSE) and cytochrome c oxidase (COX) in the group of non-smokers (N), smokers (Y) and people who stop smoking (N/Y)

i zmianami w układzie oddechowym (tab. 1). Badani twierdzili, że nie nadużywają alkoholu, nie chorują przewlekle ani długoterminowo nie stosują leków.

W badaniu laryngologicznym u 30% górników (16 mężczyzn) z grupy A i 24% górników z grupy B (8 mężczyzn) stwierdzono występowanie przewlekłych zmian zapalnych w górnych drogach oddechowych. Kolejno, pod względem częstości występowania, były to: złożony stan zapalny błony śluzowej nosa, za-

tok i gardła, przewlekły nieżyt błony śluzowej gardła, nieżyt nosa oraz przewlekłe zapalenie zatok obocznych nosa. Rozkład częstości występowania infekcji górnych dróg oddechowych u górników palących papierosy i niepalących był podobny w obu grupach. Ponadto w obu grupach stwierdzono podwyższone średnie BMI w stopniu odpowiadającym nadwadze. Średnie wartości ciśnienia tętniczego mieściły się w zakresie wartości dopuszczalnych (do 140/80 mm Hg). Wartości ciśnienia

Tabela 1. Charakterystyka grup badanych – o małym (grupa A) i zwiększonym (grupa B) ryzyku narażenia na siarkowodor
Table 1. Characteristics of the studied groups – a lower (group A) and a greater (group B) risk of exposure to hydrogen sulfide

Zmienna Variable	Grupa A Group A (N = 54)	Grupa B Group B (N = 34)
Wiek [w latach] / Age [years]	35,90 \pm 8,40	37,10 \pm 7,80
Wskaźnik masy ciała / Body mass index [kg/m ²] (M \pm SD)	27,90 \pm 3,87	29,00 \pm 4,00
Palący papierosy / Smokers [n (%)]	32 (60)	12 (36)
Przewlekłe zmiany zapalne w górnych drogach oddechowych / Chronic inflammatory diseases in the upper respiratory system [n (%)]	16 (30)	8 (24)
niepalący papierosów / non-smokers	4 (18)	4 (18)
palący papierosy / smokers	12 (38)	4 (18)
Skurczowe ciśnienie krwi / Systolic blood pressure [mm Hg] (M \pm SD)	136,00 \pm 14,50	134,00 \pm 7,50
Rozkurczowe ciśnienie krwi / Diastolic blood pressure [mm Hg] (M \pm SD)	84,00 \pm 10,90	82,00 \pm 6,40

M – średnia / mean, SD – standard deviation / odchylenie standardowe.

skurczowego w obu grupach były wyższe od wartości optymalnej, wynoszącej 120 mm Hg ($p < 0,001$), podczas gdy wartości ciśnienia rozkurczowego były zbliżone do poziomu optymalnego (80 mm Hg) (tab. 1).

W badaniach laboratoryjnych (morfologii krwi, OB, stężenia mocznika i kreatyniny, aktywności GOT, GPT i GGTP) nie wykazano istotnych nieprawidłowości, poza nieco podwyższoną średnią aktywnością GGTP w grupie małego ryzyka (grupie A). Wynikało to z podwyższonej aktywności GGTP u 6 (11%) górników. Osoby te w badaniu ankietowym zgłosiły częste/codziennie spożywanie piwa.

Wykazano niewielkie różnice między grupą A a grupą B w średnich stężeniach β -syntazy i γ -liazy cysta-

tioniny oraz oksydazy cytochromu c. W porównaniu z osobami z grupy A stężenie CBS i CSE w grupie B było wyższe, natomiast oksydazy cytochromu c – niższe (tab. 2). W testach Kołmogorowa-Smirnowa oraz Manna-Whitneya wykazano istotny wpływ miejsca zatrudnienia (szyb I lub II) na stężenie β -syntazy cystationiny ($p < 0,005$). Analiza regresji wykazała zależność między stężeniem oksydazy cytochromu c a γ -liazy cystationiny ($F = 12, 2104; p = 0,0007$). Ponadto stwierdzono występowanie statystycznie istotnej różnicy w stężeniu oksydazy cytochromu c między grupą osób palących papierosy a niepalących. W grupie palaczy było ono niższe ($p < 0,05$) niż u niepalących (tab. 3).

Tabela 2. Enzymy mitochondrialne i pozostałe wskaźniki oznaczone u górników o mniejszym (grupa A) i większym (grupa B) ryzyku narażenia na siarkowodór

Table 2. The mitochondrial enzymes and other parameters measured in the miners with the reduced (group A) and increased (group B) risk of exposure to hydrogen sulfide

Czynnik biologiczny Biological agent	Grupa A Group A (N = 54) (M±SD)	Grupa B Group B (N = 34) (M±SD)
β -syntaza cystationiny / Cystathionine β -synthase (CBS) [ng/ml]	13,59±14,09	14,09±19,53**
γ -liaza cystationiny / Cystathionine γ -lyase (CSE) [ng/ml]	6,09±6,93	7,54±8,26
Oksydaza cytochromu c / Cytochrome c oxydase (COX) [ng/ml]	0,74±1,49	0,69±1,19
8-epi prostaglandyna F _{2a} / 8-epi prostaglandin F _{2a} (8-epi-PG) [pg/ml]	73,11±11,92	73,27±6,33
Peroksydaza glutationu / Glutathione peroxidase (GPX) [U/l]	56,62±7,87	57,03±6,39
Transferaza glutationu / Glutathione transferase (GST) [nmol/min/ml]	35,18±15,59	40,23±19,62
Dysmutaza ponadtlenkowa / Superoxide dismutase (SOD) [U/ml]	0,82±0,49	0,78±0,48
Endotelina-1 / Endothelin-1 (ET-1) [pg/ml]	3,42±2,44	2,94±2,87
Enzym konwertujący angiotensynę I / Angiotensin I converting enzyme (ACE) [ng/ml]	2,13±2,79	3,14±2,87*
Sulfhemoglobina / Sulfhemoglobin (SHb) [%]	0,00±0,00	0,00±0,00
Karboksyhemoglobina / Carboxyhemoglobin (COHb) [%]	4,17±1,84	4,81±1,70
Methemoglobina / Methemoglobin (MetHb) [%]	0,254±0,386	0,082±0,086***

M – średnia / mean, SD – standard deviation / odchylenie standardowe.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – test Kołmogorowa-Smirnowa i/lub Manna-Whitneya / Kołmogorov-Smirnov and/or Mann-Whitney U tests.

Tabela 3. Enzymy mitochondrialne i patologiczne hemoglobiny oznaczone u górników palących i niepalących papierosy

Table 3. The mitochondrial enzymes and pathological hemoglobins measured in smokers and non-smokers

Zmienna Variable	Aktywność Activity [ng/ml] (M±SD)				Stężenie Concentration [%] (M±SD)	
	CBS	CSE	COX	COHb	MetHb	SulfHb
Niepalący papierosów / Non-smokers (N = 33)	13,58±13,90	8,13±9,38	1,04±1,87	3,90±1,22	0,19±0,44	0,00±0,00
Palący papierosy / Smokers (N = 43)	12,88±15,33	5,13±5,67	0,43±0,37*	5,33±2,06***	0,16±0,16	0,00±0,00

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ – poziom istotności różnic między wartościami średnimi / the level of significance of differences between mean values.

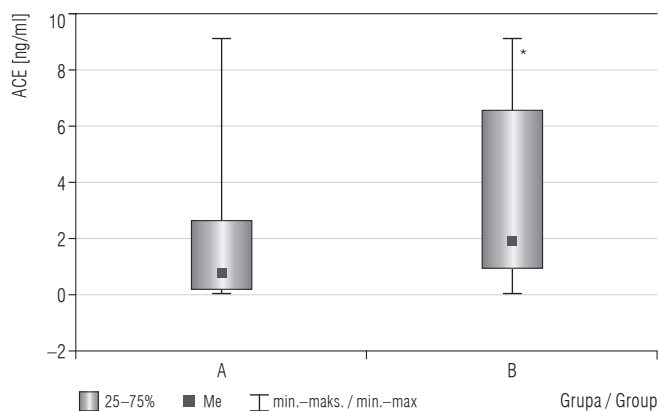
Skróty jak w tabeli 2 / Abbreviations as in Table 2.

Stężenie sulfhemoglobiny u wszystkich górników było nieoznaczalne – wynosiło 0% hemoglobiny całkowitej we wszystkich próbkach krwi pobranych od 88 górników. U górników narażonych na siarkowodor (grupa B) stwierdzono nieco wyższe stężenie karboksyhemoglobiny ($4,81 \pm 1,7\%$) niż u górników nienarażonych (grupa A) ($4,17 \pm 1,84\%$). Z kolei stężenie methemoglobiny w grupie B było niższe ($p < 0,03$) niż w grupie A (tab. 2). Stężenia COHb były wyższe u palaczy papierosów, w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie niepalących ($p < 0,001$) (tab. 3).

Oznaczane jednocześnie stężenie 8-epi-prostaglandyny F_{2a} oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych we krwi – peroksydazy glutationu, transferazy glutationu i dysmutazy ponadtlenu – były podobne w obu grupach (A i B). Średnie stężenie endoteliny-1 w surowicy krwi górników w obu badanych grupach było wyższe niż górna granica zakresu referencyjnego (2 pg/ml), a test średnich względem stałej wartości odniesienia wykazał różnicę na poziomie $p = 0,000026$ (średnia: 3,239; odchylenie standardowe: 2,615; liczba ważnych oznaczeń: 88; błąd standardowy: 0,278; $t = 4,445$; $df = 87$).

W obu badanych grupach podwyższonym stężeniem endoteliny-1 towarzyszyła prawidłowa aktywność enzymu konwertującego angiotensynę. Test Manna-Whitneya wykazał jednak istotną różnicę ($p < 0,05$) w aktywności ACE między górnikiem zatrudnionym w szybie I

a zatrudnionym w szybie II. Aktywność ACE u górników narażonych na siarkowodor była wyższa niż u górników z grupy małego ryzyka (ryc. 2). Analiza regresji liniowej według porządku rang Spearmana wykazała dodatnią zależność między aktywnością ACE a stężeniem CSE ($r = 0,6927$; $p < 0,001$) (ryc. 3).



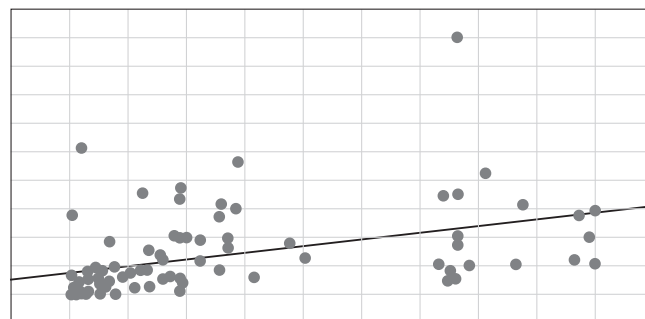
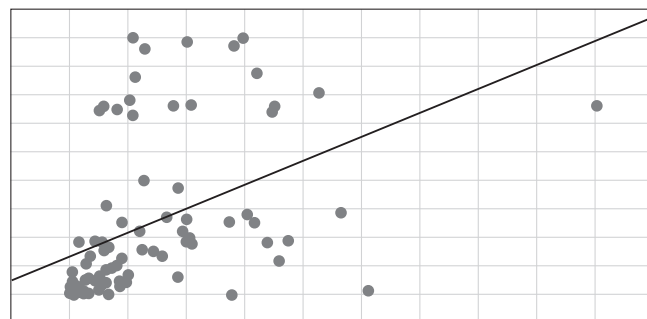
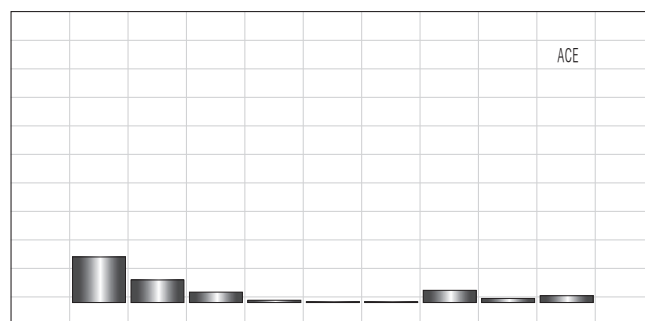
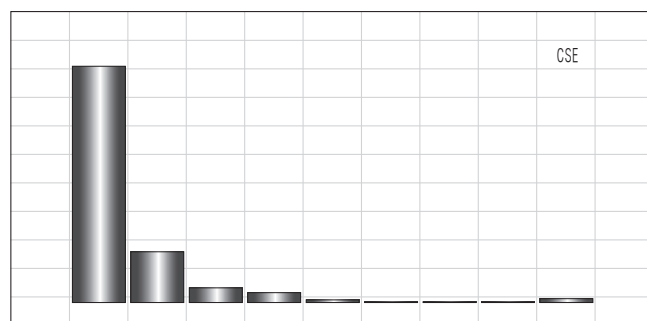
A – małe ryzyko narażenia na siarkowodor / increased risk of exposure to hydrogen sulfide, B – zwiększone ryzyko narażenia na siarkowodor / reduced risk of exposure to hydrogen sulfide.

ME – mediana / median, min. – wartość minimalna / minimal value, maks. – wartość maksymalna / max – maximal value.

* $p < 0,05$.

Ryc. 2. Aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I (ACE) w testach nieparametrycznych w obu badanych grupach

Fig. 2. Comparison of groups A and B according to angiotensin I converting enzyme (ACE) activity in both studied groups



Ryc. 3. Macierz rozrzutu γ -liazy cystationiny (CSE) i enzymu konwertującego angiotensynę (ACE)

Fig. 3. Matrix scatter graph of cystathionine γ -lyase (CSE) and angiotensin converting enzyme (ACE)

OMÓWIENIE

Zbadani górnicy to mężczyźni młodzi lub w średnim wieku, oceniający stan swojego zdrowia jako dobry, niezgłaszający dolegliwości i z reguły wykonujący ciężką pracę fizyczną. W badaniu przedmiotowym rozpoznano u nich nadwagę lub otyłość I stopnia i przewlekłe zmiany zapalne w górnych drogach oddechowych. Najczęściej były to nieżyt nosa i/lub gardła, i/lub przewlekłe zapalenie zatok. Częstość występowania tych zmian była podobna u górników z obu grup badanych – zatrudnionych w szybie II o zwiększonym ryzyku narażenia na siarkowodor (grupa B) i w szybie I bez zarejestrowanych emisji H_2S w ciągu ostatnich 10 lat (grupa A). W grupie A częstość występowania zmian była około 2-krotnie większa u palaczy papierosów (38%) niż u niepalących (18%).

Zmiany laryngologiczne mogą być następstwem ekspozycji na gazy kopalniane zawierające siarkowodor i inne gazy [20]. Obecnie wiadomo, że siarkowodor uszkadza komórki nabłonka oddechowego w jamach nosowych, a wcześniej – nawet w małych stężeniach – uszkadza komórki nabłonka węchowego (w stężeniach powyżej 225 mg/m^3 poraża percepcję węchową). Upośledzenie rozróżniania zapachów należy więc do charakterystycznych następstw ekspozycji na siarkowodor [17,18]. Ośrodki, w których zatrudnieni są autorzy niniejszej publikacji, kontynuują badania narządu zmysłu powonienia u górników.

W niniejszym badaniu u górników nie stwierdzono zmian narządu wzroku, typowych dla powtarzających się incydentów ekspozycji na siarkowodor. W stężeniach wyższych od 15 mg/m^3 siarkowodor drażni spojówkę, a w stężeniach powyżej 70 mg/m^3 powoduje zapalenie spojówek i rogówki, kurcz powiek, łzawienie i światłowstręt [5]. U górników nie wykazano także obniżenia ciśnienia tętniczego, związanego z naczyniorozszerzającym działaniem siarkowodoru na poziomie naczyń oporowych. Działanie to wynika z aktywacji przez H_2S kanałów potasowych, regulowanych przez adenosynotriphosforan (adenosine triphosphate – ATP) w komórkach mięśni gładkich ściany naczyń [21,22]. W obu badanych grupach wartości ciśnienia skurczowego były bliskie wartościom granicznym dla rozpoznania nadciśnienia tętniczego.

W innych badaniach oddziaływania siarkowodoru (w stężeniu 5 lub 10 ppm) na układ krążenia u ochotników nie zaobserwowano obniżenia wartości ciśnienia [17]. W niniejszym badaniu w obu badanych grupach górników stężenie endoteliny-1 było jednak podwyższo-

ne. Ze względu na silne naczyniokurczące działanie tego mediatora może on odpowiadać za wyższe wartości ciśnienia tętniczego, jednak autorzy niniejszej publikacji nie wykazali istotnej zależności między stężeniem ET-1 a ciśnieniem skurczowym ani rozkurczowym.

Nie jest znany wpływ siarkowodoru na stężenie ET-1. W badaniach *in vitro* wykazano natomiast hamujący wpływ H_2S na aktywność enzymu konwertującego angiotensynę [23]. W niniejszym badaniu w grupie górników narażonych na H_2S wykazano wyższą aktywność ACE w surowicy niż w grupie górników z grupy małego ryzyka. Ponadto wykazano statystycznie istotną zależność ($p < 0,001$) między aktywnością ACE a stężeniem γ -liazy cystationiny. Oba białka enzymatyczne są obecne w stosunkowo dużych ilościach w ścianie naczyń. Rola ACE w regulacji ciśnienia tętniczego jest dobrze znana, natomiast o roli CSE wiadomo, że jego brak lub inhibitory tego enzymu podnoszą ciśnienie tętnicze [9,24].

Związek między ACE a CSE w regulacji ciśnienia tętniczego jest bardzo prawdopodobny. Są to 2 enzymy o działaniach potencjalnie przeciwstawnych do napięcia ściany naczyń: ACE przez konwersję angiotensyny I do II powoduje skurcz mięśniówki gładkiej, natomiast CSE przez syntezę siarkowodoru – jej rozkurcz. W badaniach doświadczalnych potwierdzono, że CSE, obecna w ścianie naczyń, może wytwarzać z egzogennej L-cysteiny siarkowodor w ilości wystarczającej do działania wazodilatacyjnego [21]. Zależność między ACE a CSE może więc wynikać z mechanizmów homeostazy naczyniowej. W niniejszym badaniu znacznie większa aktywność ACE i większe o 23% stężenie CSE u górników z grupy B (w porównaniu z grupą A) może świadczyć o zmianie poziomu regulacji ciśnienia. Należy zaznaczyć, że endogenne siarkowodor, obok tlenu azotu, jest zaliczany do gazowych molekuł sygnalizacyjnych w ścianie naczyń o działaniu naczyniowo- i kardioprotekcyjnym [25].

Podsumowując, na podstawie badań podmiotowych, przedmiotowych i dodatkowych przeprowadzonych u górników z szybu II nie wykazano zmian, które jednoznacznie można odnieść do następstw toksycznego działania siarkowodoru. Nie stwierdzono zwiększonej częstości występowania zmian w zakresie układu oddechowego, narządu wzroku ani niskich wartości ciśnienia tętniczego. Nie wykazano także zmian w układzie oksydo-redukcyjnym – w stężeniu 8-epi-prostaglandyny $F_{2\alpha}$ ani aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Podwyższona aktywność transaminaz u 11% (6 mężczyzn) najprawdopodobniej wiązała się z częstym spożywaniem piwa.

Na poziomie komórkowym głównym mechanizmem toksycznego działania H_2S jest zaburzenie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym w mitochondriach, ograniczające procesy utleniania i wytwarzania energii. Jest to efekt hamowania przez siarkowodor *oksydazy cytochromu c* (kompleksu IV łańcucha oddechowego w mitochondriach) we wszystkich komórkach, dlatego H_2S zalicza się do trucizn protoplazmatycznych [7,17].

Niższe stężenie *oksydazy cytochromu c* w surowicy górników zatrudnionych w szybie II (w porównaniu z górnikami pracującymi w szybie I) może być wynikiem przebywania w atmosferze o wyższym stężeniu siarkowodoru – mimo że w stężeniach COX nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy. Świadczy o tym przeprowadzona analiza stężeń COX, uwzględniająca wiek górników i palenie papierosów.

Stężenie *oksydazy cytochromu c*, a w jeszcze większym stopniu stężenie syntazy β -cystationiny, jest zależne od wieku badanych, co potwierdziło badanie wstępne. Zmniejszenie aktywności enzymów biorących udział w metabolizmie H_2S w procesie starzenia komórki wykazali także inni autorzy [26]. W niniejszym badaniu, w badaniu zasadniczym średni wiek górników zatrudnionych w szybach I i II był zbliżony – wynosił odpowiednio: $35,9 \pm 8,4$ roku i $37,1 \pm 7,8$ roku.

Aktywność *oksydazy cytochromu c* zależy także od palenia papierosów – u palaczy jest niższa niż u niepalących [27]. Niniejsze badanie – zarówno wstępne, jak i zasadnicze – potwierdziło hamujące działanie palenia papierosów na stężenie COX. Zmniejszenie aktywności COX u palaczy w dużym stopniu jest następstwem hamującego działania tlenku węgla zawartego w dymie papierosowym na COX, a także oddziaływania innych składników obecnych w dymie [28]. W niniejszym badaniu potwierdzono, że u górników palących papierosy obniżonemu stężeniu COX towarzyszy zwiększone stężenie karboksyhemoglobiny. Ponadto wykazano, że palenie papierosów obniża stężenie nie tylko COX, ale także (choć w mniejszym stopniu) enzymów uczestniczących w syntezie siarkowodoru, tj. γ -liazy cystationiny i β -syntazy cystationiny.

Za istotnym wpływem palenia tytoniu na stężenie COX, CBS i CSE przemawia też to, że u osób, które przestały palić, stężenie wszystkich tych enzymów było wyższe niż u osób palących i niepalących, typowo dla „efektu z odbicia” (ryc. 1). Stężenie karboksyhemoglobiny w grupie górników zatrudnionych w szybie II było o 15% wyższe od stężenia COHb w grupie górników zatrudnionych w szybie I. Przyczyną tych różnic

może być zarówno palenie tytoniu, jak i ekspozycja zawodowa na tlenek węgla (tym bardziej, że odsetek osób palących papierosy był w tej grupie prawie 2-krotnie mniejszy niż u górników z szybu I). Podsumowując, przyczyna niższego stężenia COX u górników z szybu II w porównaniu z górnikami z szybu I jest złożona oraz obejmuje wpływ gazów kopalnianych i palenia papierosów.

Z innej strony, w badaniu zasadniczym stężenie sulfhemoglobiny u wszystkich górników wynosiło 0%. W warunkach fizjologicznych, w środowisku o pH zbliżonym do 7,4, około 30% siarkowodoru występuje w postaci niezdysonowanej. W tej postaci H_2S łatwo przenika przez błony komórkowe, wiąże się z hemoglobiną, tworząc sulfhemoglobinę, i krąży rozpuszczony w osoczu. Stężenie H_2S w osoczu i większości tkanek wynosi około $50 \mu M$, ale okres półtrwania siarkowodoru *in vivo* to kilka minut. Oznaczanie stężenia sulfhemoglobiny, kompleksu bardziej trwałego, służy za wskaźnik toksycznego działania H_2S [29].

W jednym z ostatnio opublikowanych badań, przeprowadzonym w grupie 110 pracowników przewlekle narażonych na siarkowodor w małych stężeniach, stwierdzono stężenie sulfhemoglobiny podwyższone do 0,04%. Były to więc wartości także niskie, na granicy progu oznaczalności. Jednocześnie w badanej grupie wykazano podwyższone stężenie methemoglobiny w badanej grupie, które miało wynikać z ochronnej roli methemoglobiny przed stresem oksydacyjnym, nasilanym w wyniku hamowania *oksydazy cytochromu c* przez H_2S [29]. W niniejszym badaniu przy podobnym stężeniu hemoglobiny całkowitej i erytrocytów w obu grupach górników aktywność układu oksydo-redukcyjnego w grupie B była podobna do uzyskanego w grupie A, natomiast stężenie methemoglobiny było znacznie niższe. Może to wynikać z obecności związków methemoglobino-twórczych (należą do nich np. tlenki azotu) w szybie I i przemawiać – zgodnie z przedstawioną powyżej hipotezą – przeciw występowaniu skutków ekspozycji na H_2S w układzie oksydo-redukcyjnym u górników z szybu II.

Uzyskane wyniki badań wykazały istotny wpływ miejsca zatrudnienia (szyb I vs II) na stężenie β -syntazy cystationiny. Aktywność CBS jest regulowana na poziomie transkrypcyjnym przez różne czynniki jądrowe, czynniki wzrostu i cykliczny adenozynomonofosforan oraz na poziomie posttranskrypcyjnym przez np. metioninę [13]. Z kolei siarkowodor hamuje aktywność enzymów odpowiedzialnych za jego syntezę (CBS i CSE) w mechanizmie ujemnego sprzężenia zwrot-

nego [9]. Można więc przypuszczać, że wzrost stężenia CBS u górników z grupy B jest w większym stopniu następstwem zmian regulacyjnych na poziomie syntezy endogennego siarkowodoru niż toksycznego działania egzogennego H_2S .

Podobnie wyraźnie większe stężenie CBS, CSE i COX u osób, które przestały palić, w porównaniu z wynikami osób palących lub nigdy niepalących, wskazują na regulacyjne zmiany aktywności enzymów ujawniające się po zaprzestaniu ekspozycji na dym tytoniowy, a nie na prosty efekt związany z ustąpieniem toksycznego działania dymu. Zmiany regulacyjne przebiegające ze wzrostem stężenia CBS i CSE towarzyszą zwiększonej syntezie endogennego H_2S [13]. Wyjaśnienia wymaga, czy zmiany te mogą towarzyszyć powtarzanej ekspozycji na H_2S , a jeśli tak, czy są związane z obecnością siarkowodoru, czy z przerwą w ekspozycji na H_2S .

Podsumowując, w niniejszym badaniu nie stwierdzono skutków toksycznego działania siarkowodoru w grupie B, czyli górników zatrudnionych w szybie II kopalni miedzi o zwiększonym ryzyku emisji tego gazu. Stwierdzono natomiast zmiany regulacyjne, które mogą wynikać z powtarzanych ekspozycji na H_2S . Do zmian tych należy zwiększenie stężenia β -syntazy cystationiny i γ -liazy cystationiny w surowicy – w porównaniu z wynikami grupy górników zatrudnionych w szybie I bez narażenia na siarkowodor – oraz wzrost aktywności enzymu konwertującego angiotensynę i zależność tej aktywności od stężenia γ -liazy cystationiny.

Wykazano, że palenie papierosów obniża stężenie oksydazy cytochromu c – enzymu docelowego dla toksycznego działania siarkowodoru. U górników zatrudnionych w szybie o zwiększonym ryzyku emisji gazów kopalnianych przyczyną obniżenia stężenia COX, poza paleniem, może być także obecność siarkowodoru w gazach kopalnianych. Jeśli tak jest, stężenie COX może być bardzo czułym wskaźnikiem ekspozycji na siarkowodor. Ekspozycji tej nie towarzyszyły bowiem zmiany kliniczne ani inne biochemiczne, typowe dla toksycznego działania siarkowodoru – nawet tak czułe jak zmiany w układzie oksydo-redukcyjnym. Pomiar stężeń siarkowodoru we krwi przeprowadzane na stanowiskach pracy powinny wyjaśnić przyczynę zmian w aktywności oznaczanych enzymów.

WNIOSKI

Stężenie oksydazy cytochromu c może być bardzo czułym markerem ekspozycji na siarkowodor w kopalniach miedzi.

Zmiany stężeń syntazy β -cystationiny i γ -liazy cystationiny wskazują na zmiany regulacyjne w syntezie endogennego siarkowodoru u górników zatrudnionych w warunkach zwiększonego ryzyka emisji gazów kopalnianych.

PIŚMIENNICTWO

1. Fuller D.C., Suruda A.J.: Occupationally related hydrogen sulfide deaths in the United States from 1984 to 1994. *J. Occup. Environ. Med.* 2000;42:939–942, <http://dx.doi.org/10.1097/00043764-200009000-00019>
2. Hendrickson R.G., Chang A., Hamilton R.J.: Co-worker fatalities from hydrogen sulfide H_2S . *Am. J. Ind. Med.* 2004;45:346–350, <http://dx.doi.org/10.1002/ajim.10355>
3. Burnett W.W., King E.G., Grace M., Hall W.F.: Hydrogen sulfide poisoning: Review of 5 years' experience. *Can. Med. Assoc. J.* 1977;117:1277–1280
4. Van Aalst J.A., Isakov R., Polk J.D. van Antwerp A.D., Yang M., Fratianne R.B.: Hydrogen sulfide inhalation injury. *J. Burn Care Rehabil.* 2000;21:24–53
5. Savolainen H.: Nordic expert group for TLV evaluation. 40. Hydrogen sulfide. *Arbete Hals* 1982;31:1–27
6. Cush M.: Hydrogen Sulphide. Toxicological overview (Version 2). Health Protection Agency, London 2011
7. Dorman D.C., Moulin F.J.M., McManus B.E., Mahle K.C., James R.A., Struve M.F.: Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: Correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. *Toxicol. Sci.* 2002;65: 18–25, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/65.1.18>
8. Guidotti T.L.: Hydrogen sulfide advances in understanding human toxicity. *Int. J. Toxicol.* 2010;29:569–581, <http://dx.doi.org/10.1177/1091581810384882>
9. Bęłtowski J.: Siarkowodor jako biologicznie aktywny mediator w układzie krążenia. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2004;58:285–291
10. Li L., Hsu A., Moore P.K.: Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation – A tale of three gases! *Pharmacol. Ther.* 2009;123:386–400, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.05.005>
11. Bates M.N., Garrett N., Crane J., Balmes J.R.: Associations of ambient hydrogen sulfide exposure with self-reported asthma and asthma symptoms. *Environ Res.* 2013; 122:81–87, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2013.02.002>
12. Li L., Rose P., Moore P.K.: Hydrogen sulfide and cell signaling. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011;51:169–187, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100505>

13. Wang P., Isaak C.K., Siow Y.L., O K.: Downregulation of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase expression stimulates inflammation in kidney ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Rep.* 2014;24:2–12, <http://dx.doi.org/10.14814/phy2.12251>
14. Li L., Moore P.K.: Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: A breath of not so fresh air? *Trends Pharmacol. Sci.* 2008;29:84–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2007.11.003>
15. Sarna L.K., Siow Y.L., O K.: The CBS/CSE system: A potential therapeutic target in NAFLD? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2015;93:1–11, <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2014-0394>
16. Stetkiewicz J.: Siarkowodór. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. *Podst. Met. Oceny Środ. Pr.* 2011;4:97–117
17. Arnold I.M., Dufresne R.M., Alleyne B.C., Stuart P.J.: Health implication of occupational exposures to hydrogen sulfide. *J. Occup. Med.* 1985;27:373–376, <http://dx.doi.org/10.1097/00043764-198505000-00018>
18. Moulin F.J.M., Brenneman K.A., Kimbell J.S., Dorman D.C.: Predicted regional flux of hydrogen sulfide correlates with distribution of nasal olfactory lesions in rats. *Toxicol. Sci.* 2002;66:7–15, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/66.1.7>
19. Toellner R.: Experiences with committees dealing with the issues of ethics. *Forensic Sci. Int.* 1994;69(3):329–336
20. Dorman D.C., Struve M.F., Gross E.A., Brenneman K.A.: Respiratory tract toxicity of inhaled hydrogen sulfide in Fischer-344 rats, Sprague-Dawley rats, and B6C3F1 mice following subchronic (90-day) exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004;198:29–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2004.03.010>
21. Cheng Y., Ndisang J.F., Tang G., Cao K., Wang R.: Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004;287:H2316–2323, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00331.2004>
22. Tang G., Wu L., Liang W., Wang R.: Direct stimulation of K (ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 2005;68:1757–1764
23. Laggner H., Hermann M., Esterbauer H., Muellner M.K., Exner M., Gmeiner B.M. i wsp.: The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. *J. Hypertens.* 2007;25:2100–2104, <http://dx.doi.org/10.1097/HJH.0b013e32829b8fd0>
24. Yang G., Wu L., Jiang B., Yang W., Qi J., Cao K. i wsp.: H₂S as a physiologic Vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science* 2008;24: 587–590, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1162667>
25. Polhemus D.J., Lefer D.J.: Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2014;114:730–737, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300505>
26. Zhang Y., Tang Z.H., Ren Z., Qu S.L., Liu M.H., Jiang Z.: Hydrogen sulfide, the next potent preventive and therapeutic agent in aging and age-associated diseases. *Mol. Cell. Biol.* 2013;33:1104–1113, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01215-12>
27. Alonso J.R., Cardellach F., Lopez S., Casademont J., Miro O.: Carbon monoxide specifically inhibits cytochrome c oxidase of human mitochondrial respiratory chain. *Pharmacol. Toxicol.* 2003;93(3):142–146, <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.930306.x>
28. Miro O., Casademont J., Barrientos A., Urbano-Marquez A., Cardellach F.: Mitochondrial cytochrome c oxidase inhibition during acute carbon monoxide poisoning. *Pharmacol. Toxicol.* 1998;82:199–202, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0773.1998.tb01425.x>
29. Saeedi A., Najibi A., Mohammadi-Bardbori A.: Effects of long-term exposure to hydrogen sulfide on human red blood cells. *Int. J. Occup. Environ. Med.* 2015;6:20–25