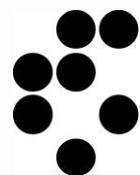


Humani biomonitoring: Netarčna analiza za določanje biomarkerjev izpostavljenosti

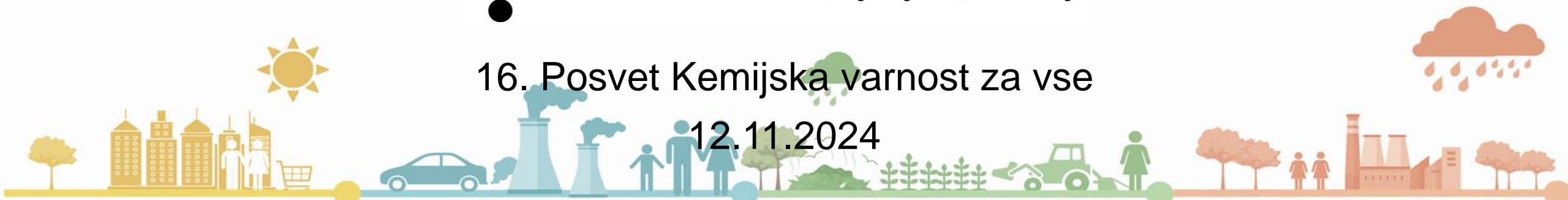
Helena Plešnik, Žan Rekar, Tina Kosjek, Darja Mazej, Janja Snoj
Tratnik, Milena Horvat



Institut "Jožef Stefan", Ljubljana, Slovenija

16. Posvet Kemijska varnost za vse

12.11.2024



Vsebina

1 Organska onesnažila in izpostavljenost

2 Humani biomonitoring (HBM)

3 Biomarkerji

4 Nacionalni HBM program

5 Mednarodni HBM program

6 Tarčne in netarčne analize

7 Tarčne HBM analize na IJS

8 Netarčna analiza v HBM

- Postopek
- Vzorci in priprava
- Instrumentalna analiza
- Obdelava podatkov
- Omejitve
- Netarčne analize na IJS

9 Primer študije: Rak jajčnikov

10 Kako naprej?



1 Organska onesnažila in izpostavljenost

- **Viri:** Hrana in voda (pesticidi, herbicidi), gospodinjski pripomočki, izdelki za osebno nego, oblačila in tekstil, zrak...
- **Poti izpostavljenosti pri ljudeh:**
 - Vdihovanje, zaužitje, stik s kožo
 - Bioakumulacija preko prehranjevalnih verig (ribe, mlečni izdelki)
- **Vpliv na zdravje:**
 - Motnje endokrinega sistema, rakava obolenja, nevrološke motnje
- **Vpliv na okolje:**
 - Onesnaževanje tal in vode, zraka
 - Vpliv na ekosisteme, zmanjšanje biodiverzitete



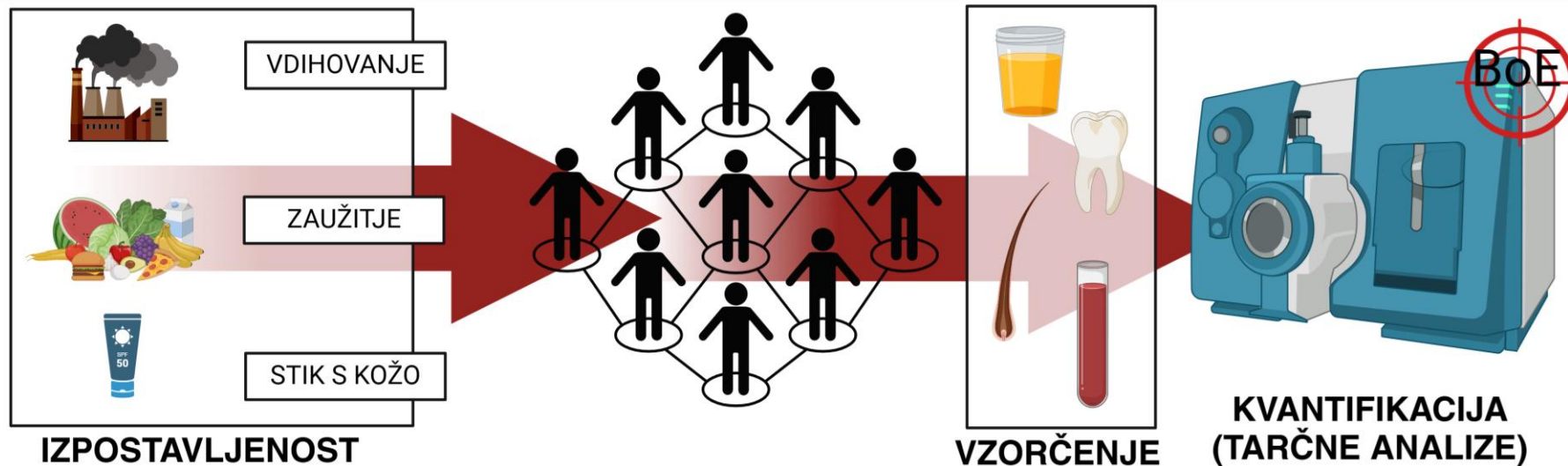
2 Humani biomonitoring (HBM)

Biomonitoring v praksi: Zbiranje in analiza bioloških vzorcev za oceno izpostavljenosti kontaminantom

VZORCI: urin, kri, lasje,...(izbor glede na vrsto kontaminanta)

ANALIZA: LC-MS in GC-MS (organski kontaminanti)

INTERPRETACIJA: Povezovanje rezultatov s potencialnimi učinki na zdravje in ocena tveganj



Uporaba rezultatov biomonitoringa:

Kratkoročno: Ugotovljene ravni izpostavljenosti prebivalstva (osnovne vrednosti in razlike glede na geografsko lego)

Dolgoročno: Časovni trendi, ocene tveganja za zdravje ljudi, ukrepi za zmanjšanje tveganja

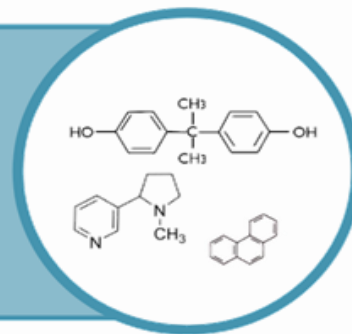


3 Biomarkerji (Biološki označevalci)

Kaj so? Kazalniki, ki razkrivajo biološke odzive telesa na izpostavljenost določenim snovem.

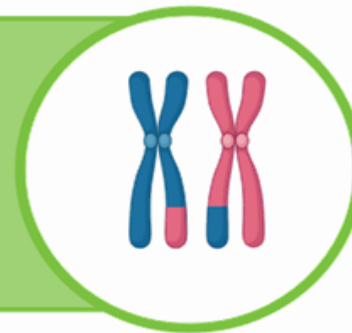
BIOMARKERJI IZPOSTAVLJENOSTI (biomarkers of exposure):

Eksogene kemikalije oz. njihovi presnovki v telesu (npr. kovine, pesticidi)



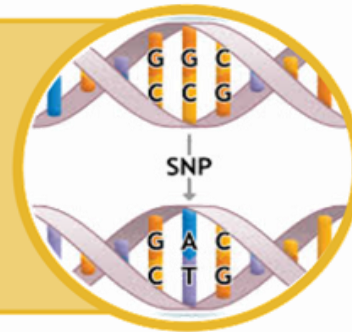
BIOMARKERJI UČINKA (biomarkers of effect):

Biokemične, fiziološke ali druge spremembe, do katerih pride zaradi biomarkerjev izpostavljenosti in ki lahko vplivajo na zdravje (npr. spremembe v DNK)

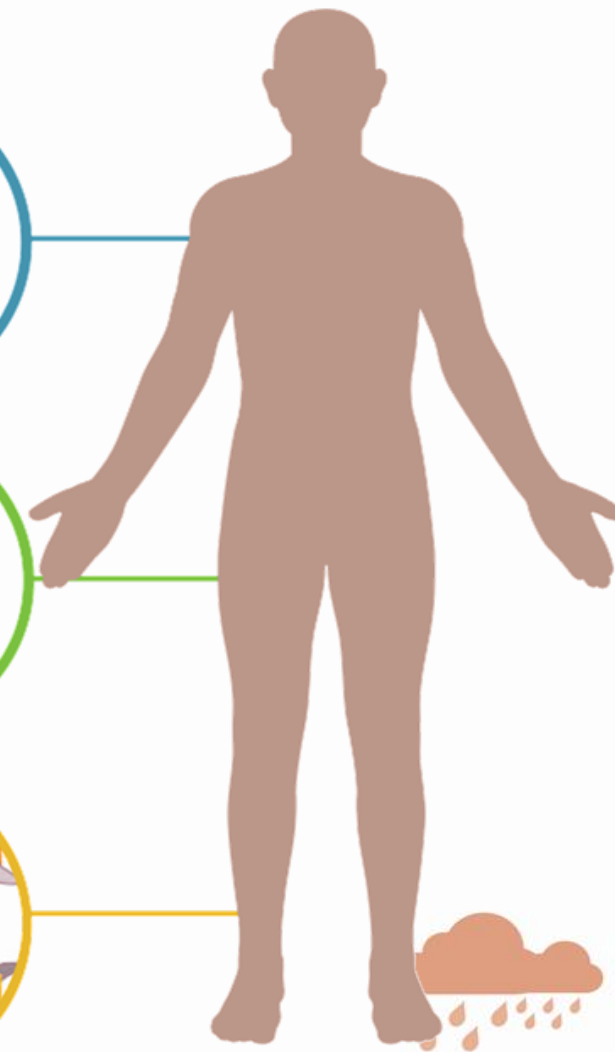


BIOMARKERJI DOVZETNOSTI (biomarkers of susceptibility):

Kazalniki posebne dovzetnosti posameznega organizma za izpostavljenost ksenobiotiku (npr. mutacija/varianta določenega gena)



Končni cilj HBM: povezati informacije o izpostavljenosti, dovzetnosti in učinkih za izboljšanje ocene tveganja (NGRA):
Exposome pristop



4 Nacionalni HBM program

- Podlaga za izvajanje: **Zakon o kemikalijah** (Uradni list RS, 51.a člen (biomonitoring kemikalij))
 - Naročnik: Urad RS za kemikalije, Ministrstvo za zdravje
 - Izvajalec: Institut Jožef Stefan, Nacionalni Institut za javno zdravje
 - Podizvajalci: UKC Ljubljana, Regionalne bolnišnice in zdravstveni domovi, NLZOH
-
- **1. nacionalni HBM program: 2007-2014** (odrasli)
 - **2. nacionalni HBM program: 2018-2025** (otroci in mladostniki iz potencialno onesnaženih območij)
 - Različna območja po Sloveniji, 200 otrok/območje
 - Vzorci: urin, kri, lasje
 - Izbrane kemikalije (elementi v sledovih, ftalati, fenoli, pesticidi...) in markerji občutljivosti (genotipizacija)
 - Pilotna študija: 2018, Prekmurje: PFAS v serumu

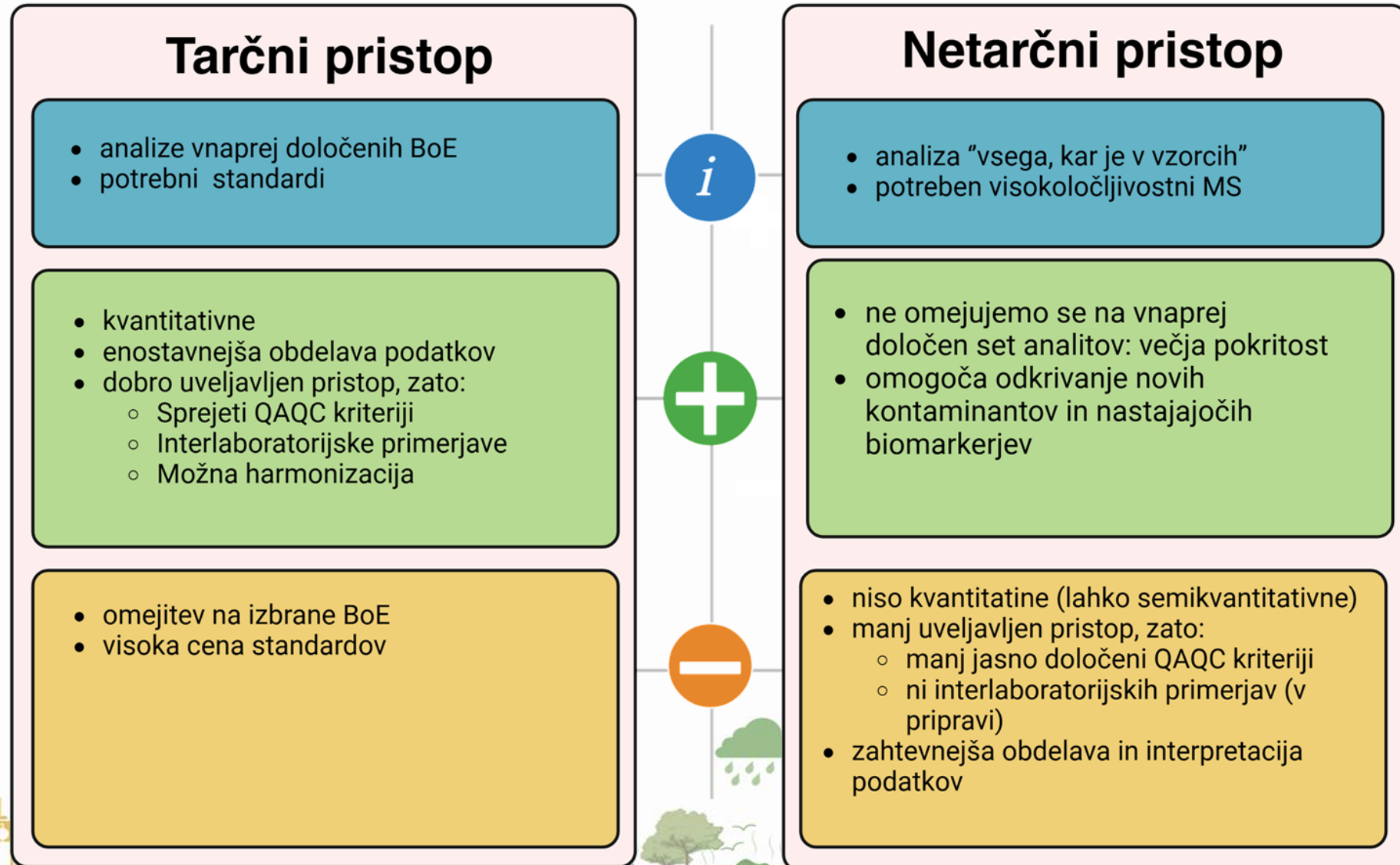


5 Mednarodni HBM programi (EU)

- COPHES (Consortium to Perform Human Biomonitoring on a European Scale)
- DEMOCOPHES (Demonstration of a Study to Coordinate and Perform Human Biomonitoring on a European Scale)
- **HBM4EU (Human Biomonitoring for Europe)**, 2017-2022; 26 držav
 - Prioritetne skupine kemikalij (per- in polifluoroalkilne (PFAS), ftalati in DINCH, fenoli, zaviralci gorenja, pesticidi, policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH), kovine, UV filtri, akrilamidi, zmesi kemikalij)
 - Inkorporacija netarčnih analiz (NTS)
- **PARC (European Partnership for the Assessment of Risk from Chemicals)**, 2022-2029
 - Gradi na dosežkih HBM4EU
 - Poenotenje metodologij med državami, kontrola, zagotavljanje kakovosti analiz
 - Razširitev NTS za bolj celovito oceno prisotnosti kemikalij in potencialnih tveganj za zdravje



6 LC-MS in GC-MS analize biomarkerjev izpostavljenosti: Tarčni in netarčni (NTS) pristop



7 Tarčne HBM analize na IJS

- Analize **bisfenolov, parabenov in triklosana** v urinu (GC-MS)
- Analize **ftalatov** v urinu (LC-MS)
 - Izpostavljenost otrok iz različnih lokacij po Sloveniji omenjenim endokrinim motilcem



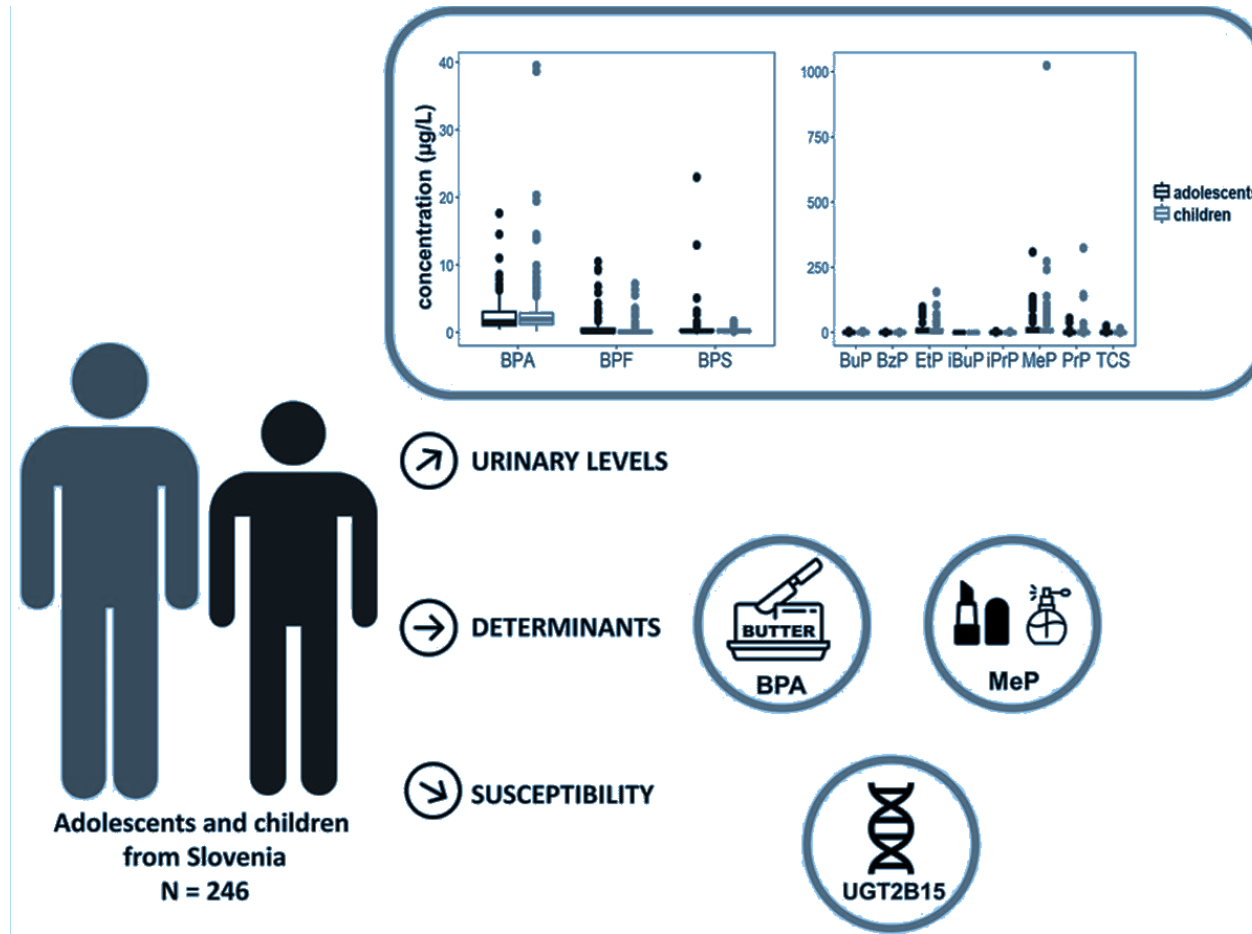
Exposure of Slovenian children and adolescents to bisphenols, parabens and triclosan: Urinary levels, exposure patterns, determinants of exposure and susceptibility

Žiga Tkalec^{a,b}, Tina Kosjek^{a,b,*}, Janja Snoj Tratnik^{a,b}, Anja Stajnko^{a,b}, Agneta Annika Runkel^{a,b}, Marianthi Sykiotou^c, Darja Mazej^a, Milena Horvat^{a,b}

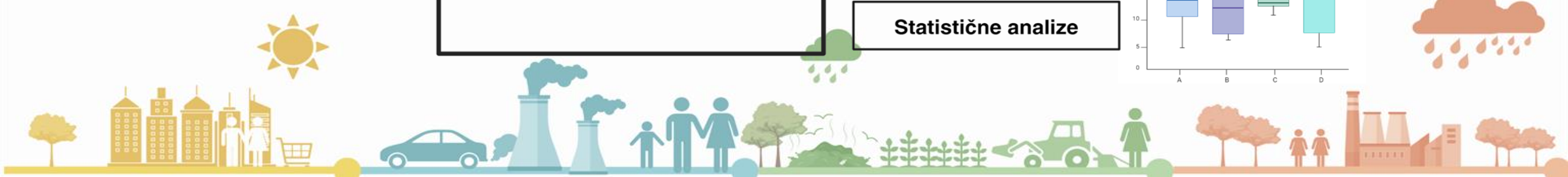
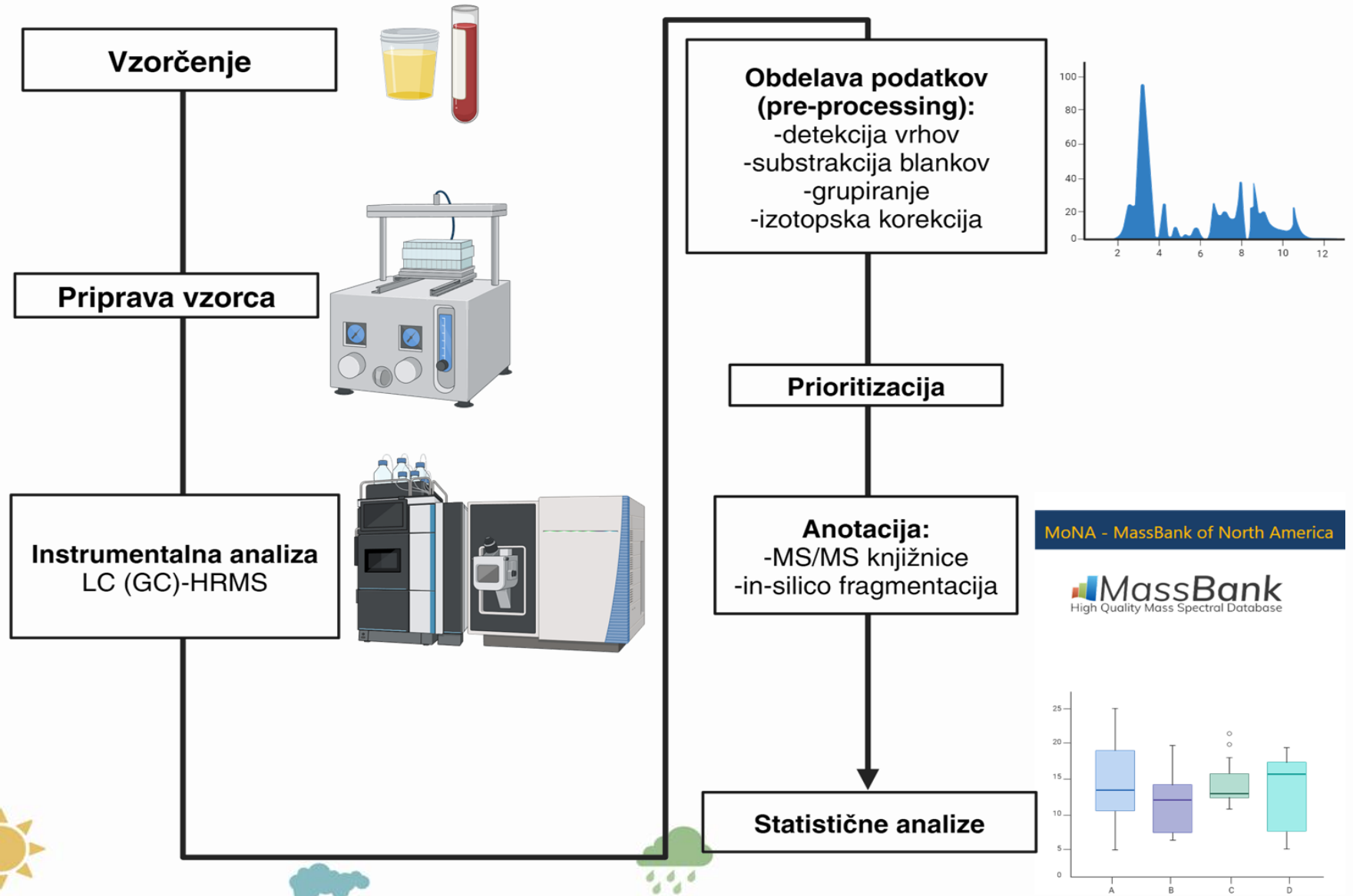
^a Jožef Stefan Institute, Department of Environmental Sciences, Jamova 39, Ljubljana, Slovenia

^b Jožef Stefan International Postgraduate School, Jamova 39, Ljubljana, Slovenia

^c Aristotle University of Thessaloniki, Department of Chemistry, Environmental Pollution Control Laboratory, University Campus GR – 54124, Thessaloniki, Greece

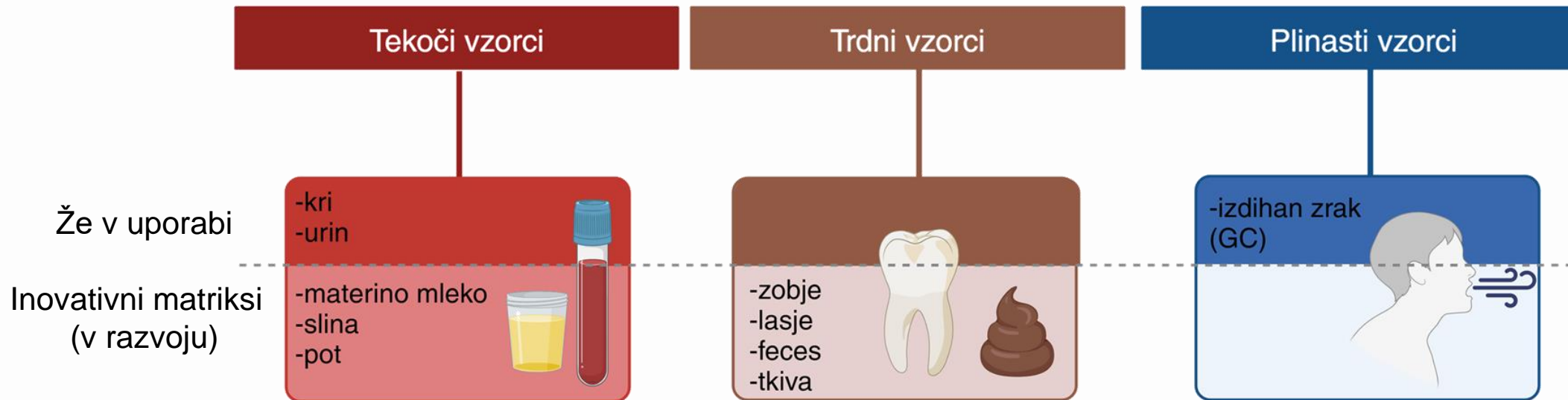


8 Netarčna analiza v HBM: postopek



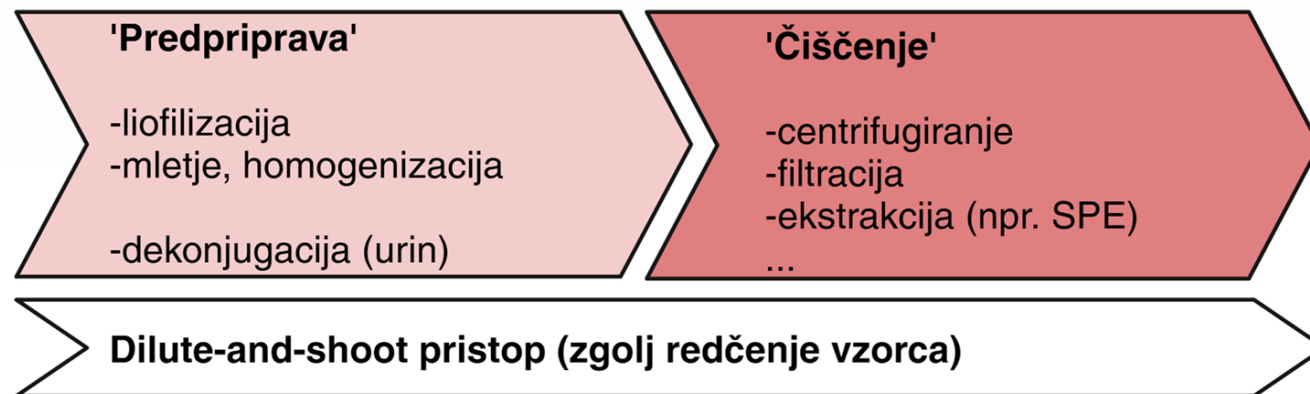
8 Netarčna analiza v HBM: Vzorci in priprava

- Tipi humanih vzorcev:



- Priprava vzorcev:

- **Vzorci dovolj očiščeni (interference), a hkrati čim bolj nespecifična (čim manj izgub): KOMPROMIS!**



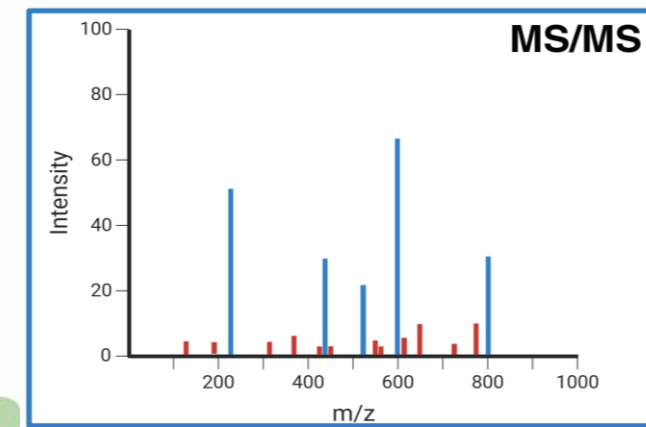
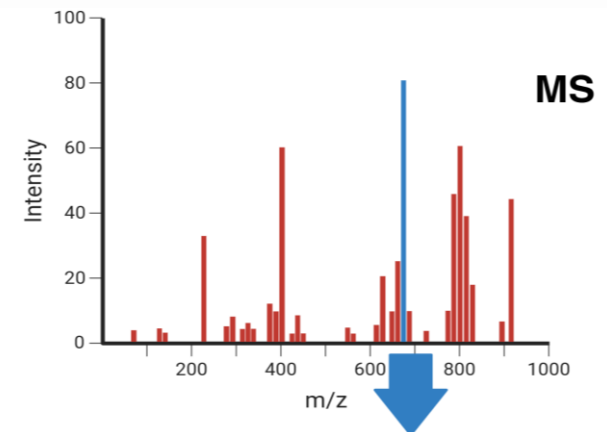
8 Netarčna analiza v HBM: Instrumentalna analiza (GC oz. LC-HRMS)

- **Kromatografija:** ločevanje

- Praksa so RP (C18) kolone (primerne za organske kontaminante; pokrivajo relativno širok spekter polarnosti)
 - Implementacija HILIC (oz. druge ANP) za določanje zelo polarnih BoE s slabo retencijo na RP kolonah

- **Masna spektrometrija:** identifikacija

- Za identifikacijo potrebni **točna masa** in **fragmenti oz. MS2 masni spekter**
- Nujna visoka resolucija (HRMS) za določitev točnih mas
- MS2 spektri pridobljeni s fragmentacijo starševskih ionov na način:
 - DDA (data-dependent acquisition): fragmentacija majhnega števila najmočnejših ionov v posameznem scanu
 - DIA (data-independent acquisition): fragmentacija vseh ionov znotraj m/z okna



8 Netarčna analiza v HBM: Obdelava podatkov

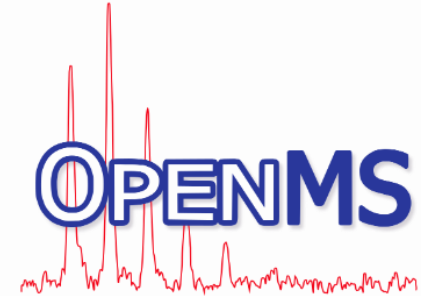
- **Predpriprava podatkov (preprocessing):**

- Identifikacija in poravnava vrhov
- Izločanje šuma in normalizacija

mzmine



MS-DIAL



- **Prioritizacija:**

- Pridobljen seznam spojin je zelo obsežen, kar zahteva sistematično selekcijo
- **Suspect list/seznam ciljnih spojin** (pri suspect screening)
- Izberemo spojine, ki najbolj izstopajo med skupinami (npr. primerjava zdravih in bolnih).



8 Netarčna analiza v HBM: Obdelava podatkov

- **Anotacije:**

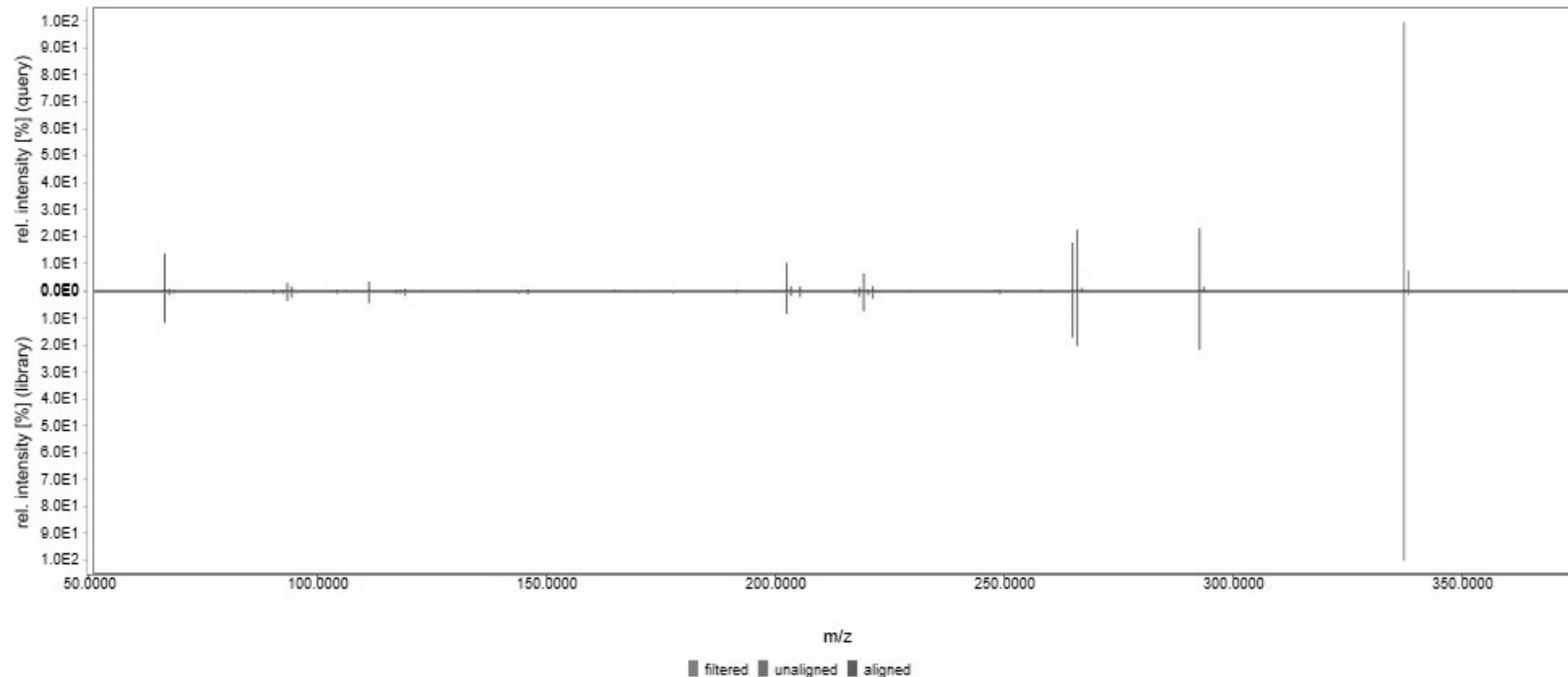
- **Spektralne knjižnice: lastne in spletne** (prosto dostopne: MoNA, MassBank...)

- Primerjava pridobljenih MS2 spektrov (točne mase, intenzitete fragmentov) in retencijskih časov (lastne knjižnice)

#26565 m/z 338.1501 (4.92 min)

Zolpidem Carboxylic Acid

Matched signals: 26 / 35
Expl. intensity: 0.973 **0.946**



Compound information

Name: Zolpidem Carboxylic Acid
Formula: C₁₉H₁₉N₃O₃
Exact mass: 0.0
Ion type: M+H
Precursor m/z: 338.1502
Polarity: Positive

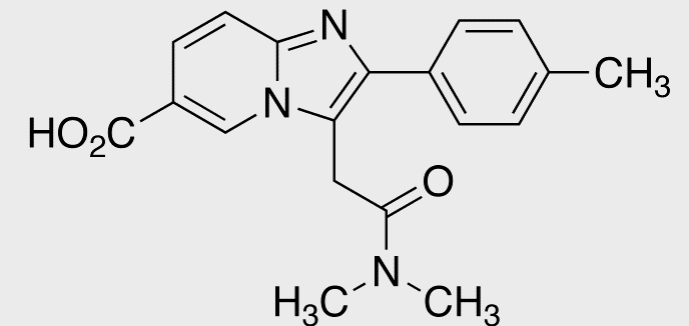
Instrument information

Instrument type: Orbitrap
Ms level: MS2

Other information

Database links

Spectral library: null



8 Netarčna analiza v HBM: Obdelava podatkov

- Anotacije:
 - In-silico fragmentacija

The screenshot displays the HBM (High-Resolution Mass Spectrometry) software interface. At the top, there are tabs for 'LC-MS', 'Formulas', 'Spectra', 'Trees', 'Predicted Fingerprint', 'Structures', 'Substructure Annotation', and 'Compound Classes'. Below these, a list of search results is shown, with the first result highlighted in green. The results table includes columns for peak number, molecular formula, ZODIAC score, and CSI score.

Peak	Formula	ZODIAC	CSI
1	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃ + H ⁺	0,000%	-47,391
2	C ₁₅ H ₂₂ N ₄ O ₃ P + H ⁺	0,000%	
3	C ₁₇ H ₂₄ N ₄ O ₄ P + H ⁺	0,000%	
4	C ₁₃ H ₂₀ N ₇ O ₂ P + H ⁺	0,000%	
5	C ₁₅ H ₂₆ N ₄ O ₄ P + Na ⁺	0,000%	
6	C ₁₇ H ₁₇ N ₆ O ₂ + H ⁺	0,000%	

Below the table, there are sliders for 'XLogP' (1,00 to 5,00) and 'Similarity' (0 to 100). A 'SMARTS Filter' input field and a 'Filter' dropdown are also present. A list of databases is shown with checkboxes: additional, Bio Database, Biocyc, CHEBI, COCONUT, EcoCyc Mine, GNPS, HMDB, HSDB, KEGG, KEGG Mine, KNAPsACK, Lipid, Maconda, MeSH, Natural Products, NORMAN, Plantcyc, PubChem, PubMed, Training Set, YMDB, YMDB Mine, ZINC bio.

The first result, 'Zolpidem Carboxylic Acid', is shown with its chemical structure, a 'Substructures' bar (96.28% match), and 'Sources/Tags' (COCONUT, MeSH, PubChem, PubMed, Training Set, additional). The CSI:FingerID score is -47,391 and the XLogP is 2,924.

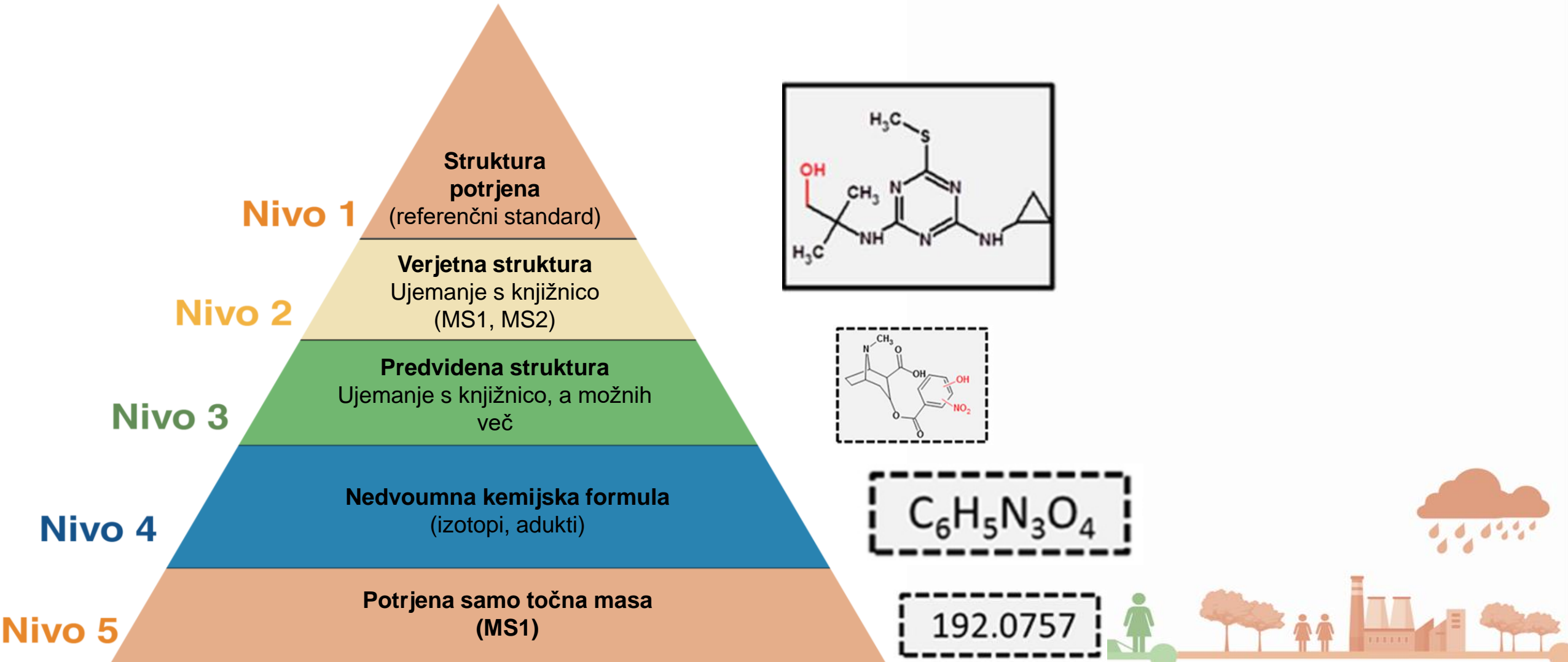
The second result, 'Zolpidem 6-Carboxylic Acid', is shown with its chemical structure, a 'Substructures' bar (90.85% match), and 'Sources/Tags' (PubChem). The CSI:FingerID score is -73,119 and the XLogP is 2,924.

The third result, 'Zolpidem 6-Carboxylic Acid', is shown with its chemical structure, a 'Substructures' bar (90.85% match), and 'Sources/Tags' (PubChem). The CSI:FingerID score is -73,119 and the XLogP is 2,924.

8 Netarčna analiza v HBM: Obdelava podatkov

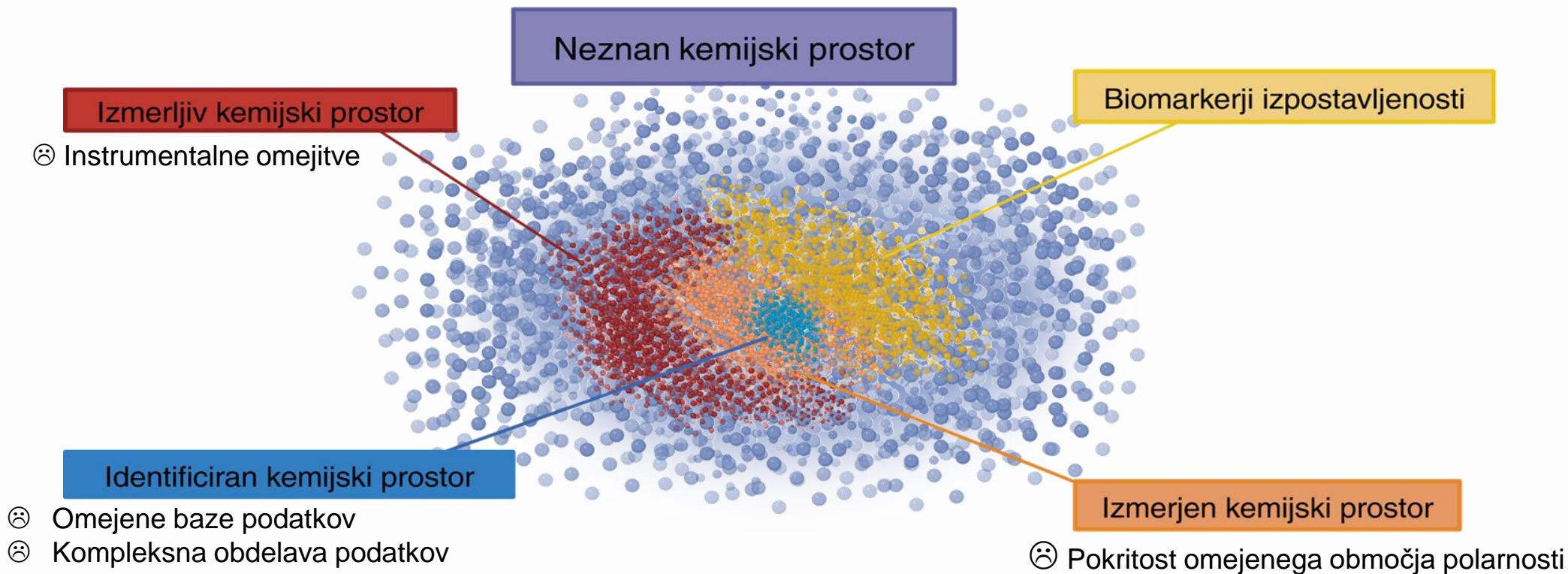
- **Anotacije:**

- **Nivoji identifikacije (gotovost pravilne anotacije):** Skala po Schymanski et al.



8 Omejitve netarčnih analiz

- Omejena pokritost kemijskega prostora:



Tudi:


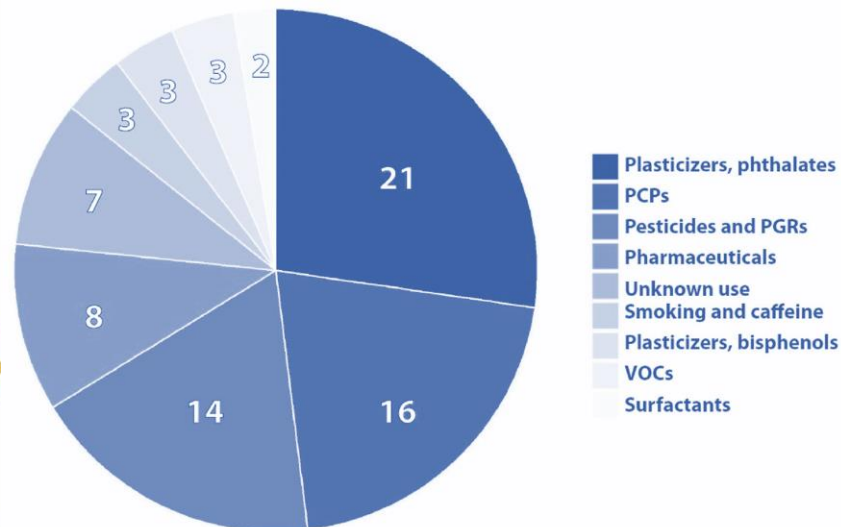
- Pomanjkanje harmoniziranih protokolov
- Pomanjkanje medlaboratorijskih primerjav
- Nezanosljiva kvantifikacija

8 Netarčne analize na IJS: HBM4EU




- Urin slovenskih otrok (6-9 let) iz urbanega in ruralnega območja
- Identifikacija 74 biomarkerjev izpostavljenosti
- Statistične razlike glede na geografsko območje in časovno obdobje (poletje/zima) -> vpliv sezonskih in okoljskih dejavnikov
- Najdeni **novi biomarkerji: bisfenol G, polietilenglikoli in njihovi etri** (še niso vključene v obstoječe sheme HBM)
- **Nekatere identificirane prvič;** neznan vir izpostavljenosti -> potreba po spremljanju!



Pomen netarčnega pristopa!




Environmental Pollution
Volume 313, 15 November 2022, 120091




Suspect and non-targeted screening-based human biomonitoring identified 74 biomarkers of exposure in urine of Slovenian children ☆

Žiga Tkalec ^{a b}, Garry Codling ^c, Janja Snoj Tratnik ^a, Darja Mazej ^a, Jana Klánová ^c, Milena Horvat ^{a b}, Tina Kosjek ^{a b}  

[Show more](#) 

[+ Add to Mendeley](#) [Share](#) [Cite](#)

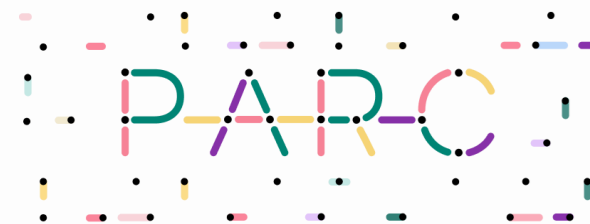
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120091> [Get rights and content](#)

Under a Creative Commons license  [open access](#)

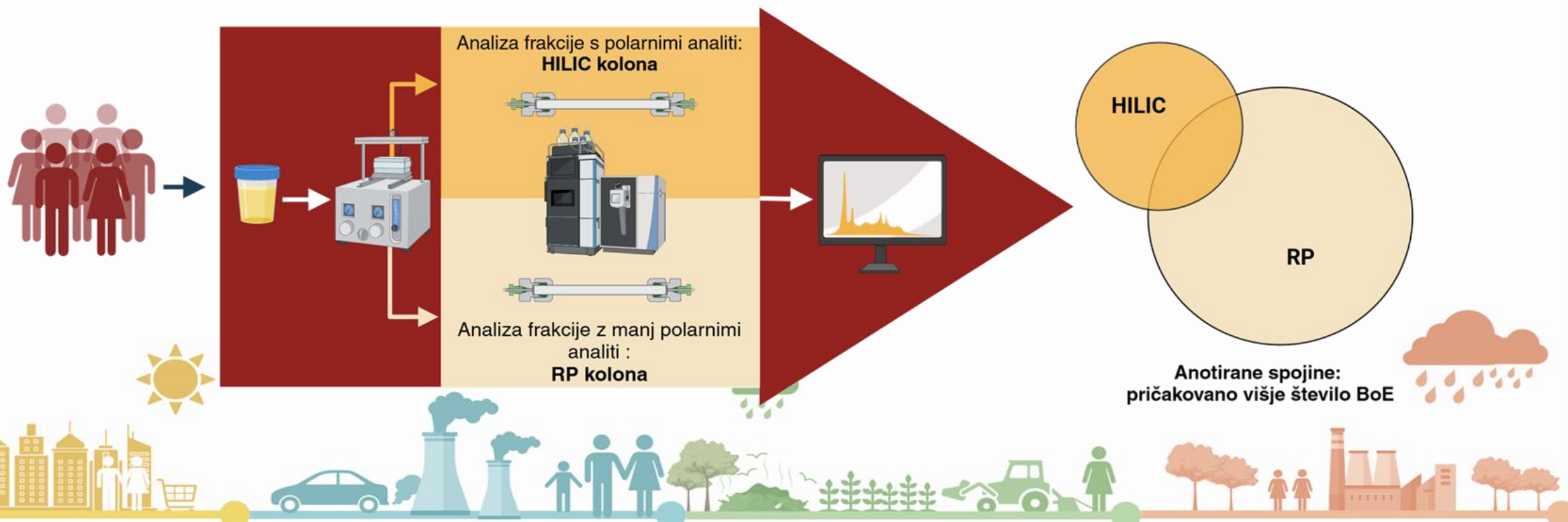
8 Netarčne analize na IJS: PARC

Širjenje pokritosti NTS metod:

Razvoj in optimizacija metode za SS/NTS urinskih vzorcev



- **Cilj:** Razvoj analizne metode za določitev širšega spektra polarnosti BoE
- **Kako?** Kombinacija dveh analiz: z RP in HILIC kolonama



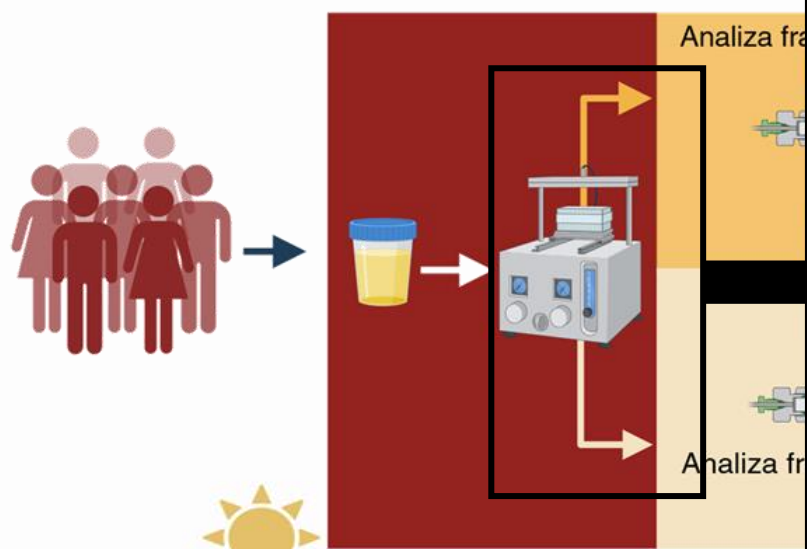
8 Netarčne analize na IJS: PARC



Širjenje pokritosti NTS metod:

Razvoj in optimizacija metode za SS/NTS urinskih vzorcev

- **Cilj:** Razvoj analizne metode za določitev širšega spektra polarnosti BoE
- **Kako?** Kombinacija dveh analiz: z RP



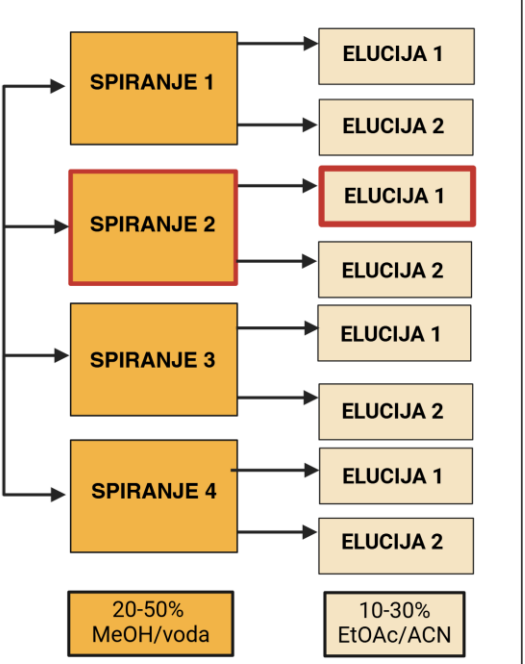
SPAJKANJE MATRIKSA

Reprezentativni nabor BoE (57 standardov z XLogP3 vrednostmi od -7.5 do 7.4)

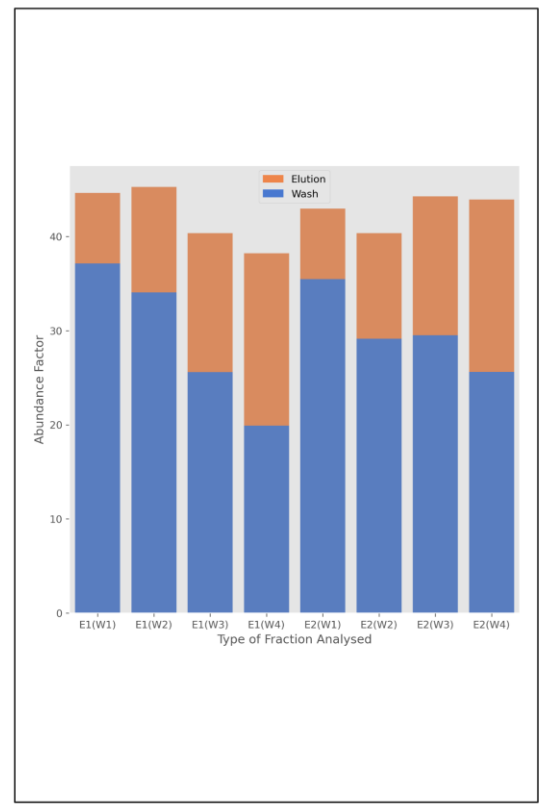


SPE

Fracija SPIRANJE: Fracija ELUCIJA:



EVALUACIJA RAZLIČNIH SPE PROTOKOLOV

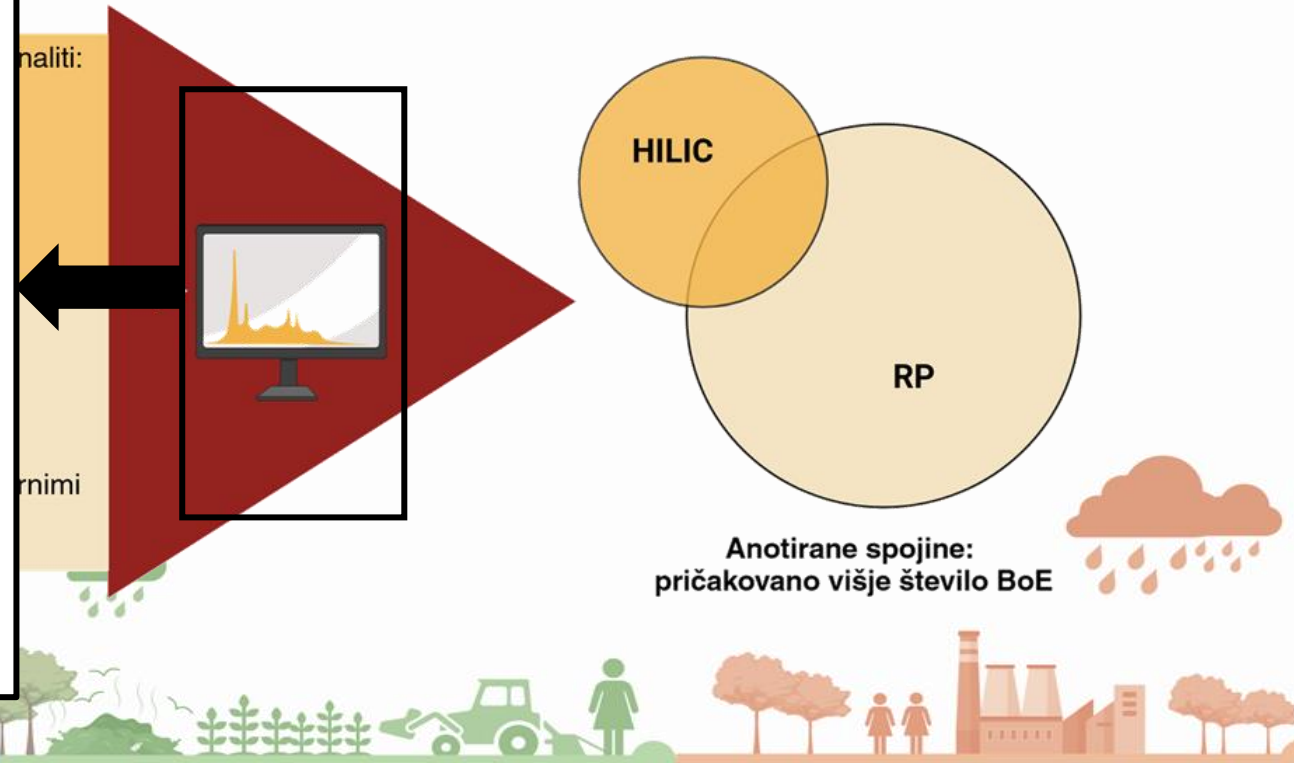
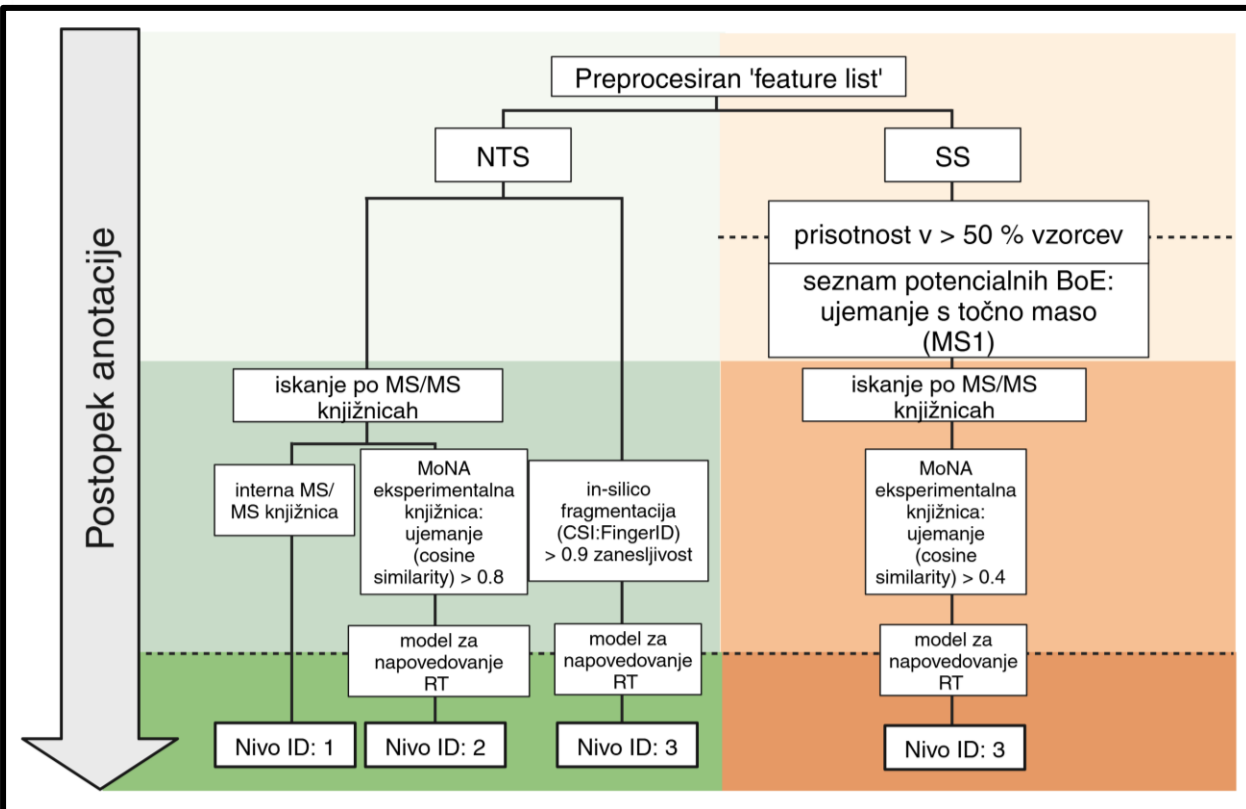


8 Netarčne analize na IJS: PARC

Širjenje pokritosti NTS metod:

Razvoj in optimizacija metode za SS/NTS urinskih vzorcev

- **Cilj:** Razvoj analizne metode za določitev širšega spektra polarnosti BoE
- **Kako?** Kombinacija dveh analiz: z RP in HILIC kolonama

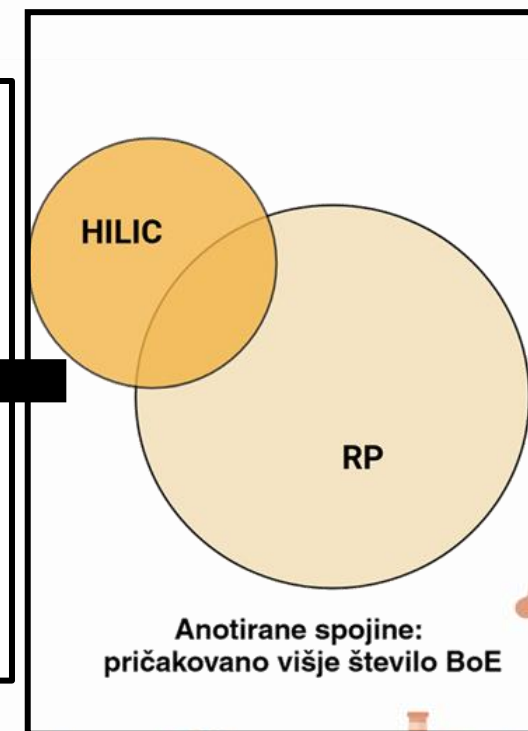
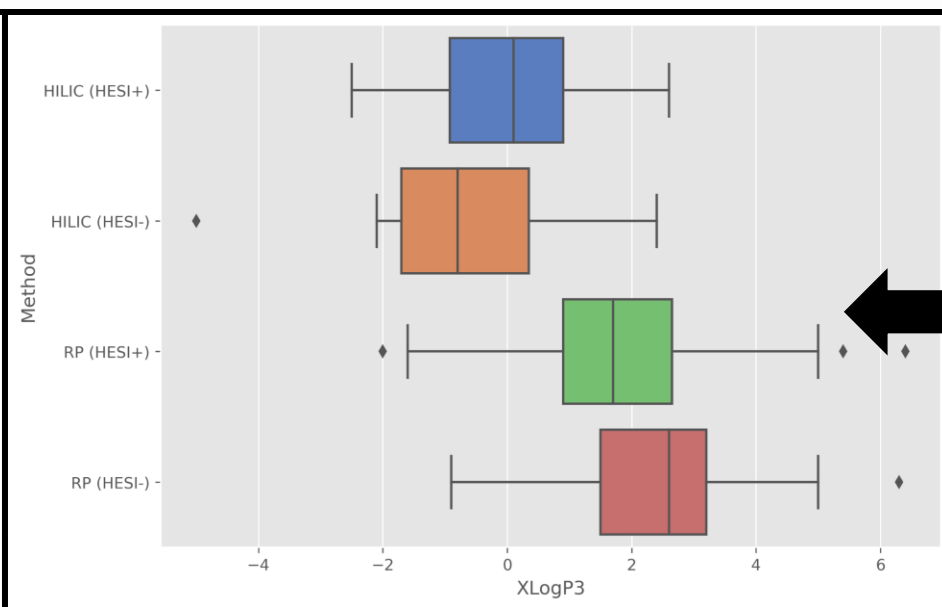
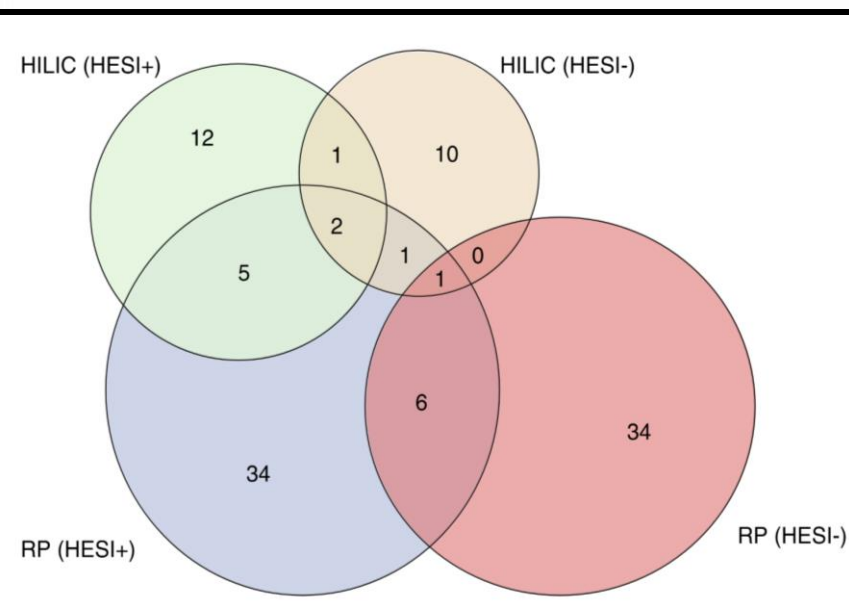


8 Netarčne analize na IJS: PARC

Širjenje pokritosti NTS metod:

Razvoj in optimizacija metode za SS/NTS urinskih vzorcev

- **Cilj:** Razvoj analizne metode za določitev širšega spektra polarnosti BoE
- **Kako?** Kombinacija dveh analiz: z RP in HILIC kolonama

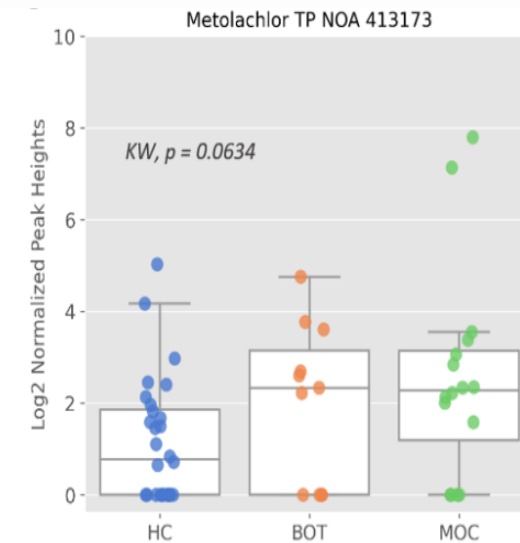
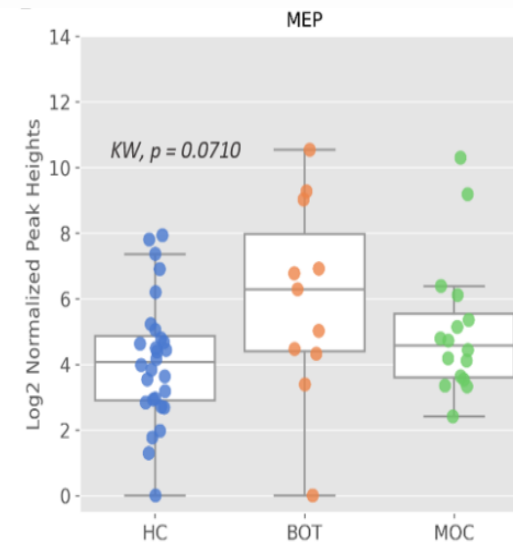
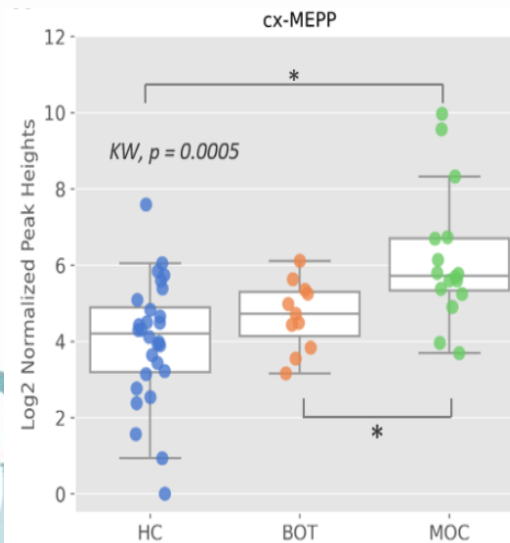
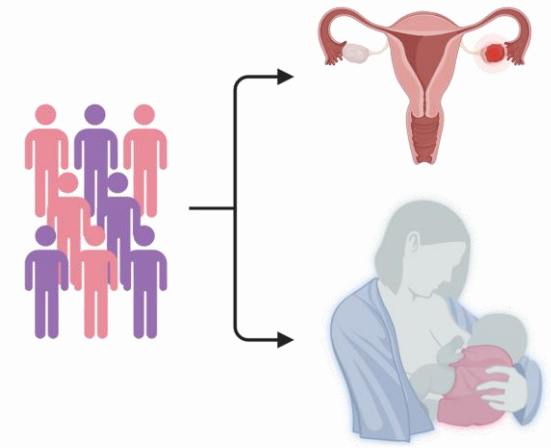


9 Primer študije: Biomarkerji pri raku jajčnikov (NTS urinskih vzorcev)

- Zdrave kontrole (HC, n=28)
- Pacientke z rakom jajčnika (n=28)
 - Mejno maligna oblika (BOT, n=16)
 - Maligna oblika (MOC, n=12)
- 106 anotiranih eksogenih spojin \Rightarrow odstranimo farmacevtike
- BoE s statistično značilnimi razlikami med skupinami:

- Pesticidi
- Ftalati
- UV filtri

Znani in domnevni
endokrini motilci



Hvala za pozornost!



Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia

