

## PODSUMOWANIE

### UZASADNIENIE PODJĘCIA BADAŃ

Rtęć (Hg) uznawana jest za jeden z najniebezpieczniejszych metali występujących w środowisku. Jako neurotoksyna o działaniu mutagennym, wpływa negatywnie na układ krążenia i centralny system nerwowy, powodując trwałe uszkodzenie komórek mózgowych (Splading i in., 2000; Rutkiewicz i in., 2011). Jest też zaliczana do substancji endokrynnie aktywnych, tj. zaburzających działanie układu hormonalnego (Zhu i in., 2000). Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) umieściła rtęć – obok m.in. dioksyn czy innych metali ciężkich – na liście dziesięciu substancji najbardziej zagrażających zdrowiu i życiu ludzi (WHO, 2010). Ze względu na globalny transport i depozycję w miejscach dalekich od źródeł emisji, Program Narodów Zjednoczonych ds. Środowiska (UNEP) uznał rtęć za substancję szkodliwą o znaczeniu światowym (UNEP, 2013). W związku z koniecznością podjęcia działań rozwiązujących problem skażenia środowiska rtęcią w 2013 roku przyjęto Konwencję Minamata. Jej celem jest ochrona zdrowia ludzkiego i środowiska przed antropogenicznymi emisjami rtęci oraz jej związków (Council Decision (EU) 2017/939).

Do środowiska morskiego rtęć dostaje się głównie w formie nieorganicznej  $Hg^{2+}$  lub jako  $Hg^0$  (Driscoll i in., 2013). Tam też przy udziale mikroorganizmów (Berman i Bartha 1986) i podczas chemicznej metylacji (Weber, 1993), ulega przemianie do metylortęci (MeHg) i w takiej postaci jest włączana w łańcuch troficzny (Evers i in., 2007; Scheuhammer i in., 2007). Metylortęć jest formą rtęci, która ulega największej biokumulacji w organizmach morskich. Ponadto, ze względu na swoją toksyczność, to właśnie ta forma stanowi dla nich największe zagrożenie (Eagle-Smith i in., 2018; Hsu-Kim i in., 2018). Ssaki morskie, zajmując wysoką pozycję w piramidzie troficznej, kumulują rtęć na poziomie często nawet tysiące razy przekraczającym stężenia występujące w otaczającym środowisku (Das i in., 2003; Das i in., 2008; Bossart, 2006; Scheuhammer et al., 2007). Pobierana z pokarmem metylortęć poprzez krew jest dystrybuowana do narządów wewnętrznych, głównie nerek i wątroby, gdzie może ulegać transformacji do mniej toksycznych form (National Research Council, 2000). Usuwanie rtęci z organizmu odbywa się codziennie poprzez wydalanie z kałem i moczem (Nigro i in., 2002). W przypadku fokowatych rtęć może być dodatkowo wbudowywana w pazury i sierść (Habran i in., 2013; Cossaboon i in., 2015; Grajewska i in., 2019). Wyjątkowo groźna dla ssaków jest zdolność przenikania metylortęci przez bariery biologiczne krew-

mózg i krew-łożysko (WHO, 2012). Stwarza to zagrożenie dla prawidłowego rozwoju już w okresie prenatalnym, co czyni układ nerwowy, będący docelowym miejscem działania toksyny, szczególnie wrażliwym na jej obecność.

W niniejszej pracy omówiono drogi wnikania rtęci do fok szarych (**Publikacja 1, Publikacja 2**). Oprócz – mającej największe znaczenie dla dorosłych osobników – drogi pokarmowej, szczególną uwagę poświęcono okresowi życia prenatalnego oraz pierwszym tygodniom życia zwierząt, podczas których rtęć przekazywana jest szczeniętom w dwojaki sposób: z krwią poprzez łożysko oraz z mlekiem w czasie karmienia (Habran i in., 2011; Habran i in., 2013). Na zasadność podjętych działań wskazuje również zaobserwowany w Bałtyku wzrost śmiertelności szczeniąt fok szarych (Harding i in., 2007). Potencjalnej przyczyny zjawiska upatruje się w zanieczyszczeniu morza, w tym metalami śladowymi. Biorąc pod uwagę, że osobniki młodociane są szczególnie wrażliwe na zmiany zachodzące w środowisku, a ich kondycja i stan zdrowia w pierwszym okresie życia będą miały zasadniczy wpływ na ich dalszy los, kluczowe jest poznanie transferu substancji toksycznych na drodze samica-szczenię w początkowej fazie życia.

Przy stałym dopływie rtęci wraz z pokarmem, efektywność i tempo eliminacji mogą mieć decydujący wpływ na utrzymanie stężenia rtęci na poziomie niezagrażającym życiu i zdrowiu fok. Równolegle w pracy podjęto więc dyskusję dotyczącą najważniejszych dróg eliminacji rtęci z organizmów fok (**Publikacja 3**), wśród których wyróżniono wydalanie rtęci wraz z odchodami oraz wbudowywanie jej w sierść podczas wymiany futra. Ponadto przedstawiono też inne spojrzenie na matczyne transfer, który będąc niebezpiecznym dla potomstwa, dla samicy jest mechanizmem oczyszczającym, dającym możliwość usunięcia z organizmu pewnego ładunku toksycznej substancji (**Publikacja 1, Publikacja 2**).

Forma, w jakiej występuje rtęć, warunkuje jej toksyczność (WHO, 2010). Zarówno w przypadku wnikania, jak i eliminacji, ustalenie, w jakim stopniu procesy zachodzą z udziałem najbardziej toksycznych form, może dostarczyć ważnych informacji na temat transformacji rtęci wewnątrz organizmu. Dlatego poszerzono zakres badań i oprócz rtęci całkowitej (THg) włączono do pomiarów rtęć organiczną ( $Hg_{ORG}$ ; **Publikacja 1**), którą w organizmach fok stanowi w przeważającej części metylortęć (MeHg). Zakup nowoczesnej aparatury i wdrożenie metody oznaczania metylortęci pozwoliły na późniejsze włączenie do badań również i tej formy metalu (**Publikacja 2, Publikacja 3**).

Odchody i sierść fok mogą być traktowane jako potencjalne, wtórne źródło rtęci w rejonach przybrzeżnych mórz i oceanów (Cossaboon i in., 2015). Dla ekosystemu największe znaczenie ma forma powracającej rtęci. Biodostępna rtęć (Hg(II) lub MeHg) może być szybciej ponownie włączona do łańcucha troficznego (Jędruch i in., 2018). Wydzielenie z całkowitej zawartości rtęci form labilnych i stabilnych (**Publikacja 3**) pozwoliło na ocenę wewnętrznego recyklingu tego pierwiastka.

Jako parametr dodatkowy do pracy włączono selen (**Publikacja 1, Publikacja 2**) – pierwiastek mogący obniżyć toksyczność rtęci poprzez formowanie kompleksów  $(\text{CH}_3\text{Hg})_2\text{Se}$  (Berry i Ralston, 2008; Correa i in., 2014; Das i in., 2016). W przypadku ssaków proces ten może być szczególnie istotny, gdyż środowisko morskie zapewnia dużą dostępność tego pierwiastka (Correa i in., 2014). Połączenie rtęci z selenem wpływa też znacząco na dystrybucję narządową oraz tempo usuwania rtęci z organizmu (Gailer, 2007; Khan i Wang, 2009).

## CELE PRACY

Ze względu na trudności związane z pozyskaniem materiału, badania ssaków morskich rzadko są możliwe do zrealizowania. Wciąż niewiele wiadomo o wpływie żywienia, kondycji czy stanu fizjologicznego na stężenia metali śladowych w ssakach morskich (Habran i in., 2011). Przedłożona praca miała za zadanie dostarczyć nowych informacji dotyczących procesów wnikania i eliminacji rtęci u przedstawicieli jednego z gatunków ssaków morskich – bałtyckiej foki szarej – oraz przyczynić się do weryfikacji następujących hipotez:

1. Intoksykacja rtęcią szczenięcia foki szarej na drodze matczyngo transferu zredukowana jest procesami ochronnymi już w okresie prenatalnym i pierwszych miesiącach życia, co sprawia, że zdrowie młodego organizmu nie jest zagrożone.
2. Odchody i sierść fok stanowią istotne ogniwo krążenia rtęci w środowisku ich bytowania.

Hipotezy zweryfikowano poprzez realizację następujących celów badawczych:

1. Ocena narażenia na rtęć drogą pokarmową (**Publikacja 2, Publikacja 3**).
2. Ocena wybranych procesów eliminacji rtęci z organizmu (**Publikacja 3**):
  - a) porównanie efektywności eliminacji rtęci z organizmu bałtyckiej foki szarej poprzez odchody i sierść
  - b) oszacowanie jaka część eliminowanej rtęci dostaje się do środowiska w formie biodostępnej.
3. Identyfikacja międzypokoleniowego transferu rtęci i selenu (**Publikacja 1, Publikacja 2**):
  - a) określenie roli łożyska w transporcie rtęci organicznej, nieorganicznej i selenu z krwią samicy do płodu
  - b) zbadanie transferu rtęci i selenu do kolejnego pokolenia z mlekiem matki w czasie laktacji
  - c) zbadanie zmian stężeń rtęci i selenu we krwi szczenięcia w pierwszych miesiącach życia, gdy przechodzi ono przez trzy następujące po sobie fazy – karmienie przez matkę, fizjologiczną głodówkę i dietę rybną.

## ZEBRANY MATERIAŁ I ANALIZY CHEMICZNE

Foka szara (*Halichoerus grypus grypus*; Fabricius, 1791) to najliczniejszy gatunek fokowatych, z trzech występujących w Morzu Bałtyckim. Obecnie jest to gatunek chroniony we wszystkich krajach nadbałtyckich (HELCOM, 2013), a liczebność populacji od 2014 roku utrzymuje się na poziomie ok. 30 000 osobników. Badania zrealizowano we współpracy ze Stacją Morską im. prof. Krzysztofa Skóry w Helu, jednostką terenową podlegającą Instytutowi Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego. Jednym z zadań Stacji Morskiej jest czynna ochrona bałtyckich fok i ich siedlisk. Obecnie najważniejszym działaniem podejmowanym w tym zakresie jest ograniczenie nadmiernej śmiertelności ssaków w Bałtyku. Funkcjonujące w ramach Stacji fokarium zajmuje się rehabilitacją i leczeniem chorych i osłabionych szczeniąt, znajdujących na bałtyckich plażach. W latach 2001-2018 w fokarium realizowano także program restytucji fok szarych na obszarze południowego Bałtyku, w ramach którego rozmnażano zamieszkujące jednostkę stado hodowlane. Ważne z punktu widzenia przedłożonej pracy doktorskiej jest to, że życie szczeniąt w fokarium przebiegało analogicznie do życia zwierząt dzikich. Najpierw zwierzęta przez okres około 21 dni po porodzie pozostawały pod opieką matek, w tym czasie traciły lanugo i zyskiwały nową sierść, następnie przechodziły dwutygodniowy okres głodówki, w czasie którego przystosowywały organizm do życia w wodzie. Po tym czasie uczone były polowania na ryby. Po zdobyciu umiejętności niezbędnych do przeżycia na wolności (samodzielne zdobywanie pokarmu) i osiągnięciu właściwej masy ciała, wypuszczane były do wód Morza Bałtyckiego.

Próbki do badań pozyskano od 6 fok tworzących stado hodowlane (4 samice i 2 samce) fokarium Stacji Morskiej oraz od urodzonych tam w okresie trwania badań 13 szczeniąt. Pobrany materiał stanowiło 30 łożysk (**Publikacja 1**), 153 próbki krwi i 53 próbki mleka (**Publikacja 2**) oraz 95 próbek odchodów i 36 próbek sierści (**Publikacja 3**). Dodatkowo pobrano 29 śledzi (*Clupea harengus membras*; Linneusz, 1761), które stanowią główny składnik pokarmu przebywających w fokarium osobników (**Publikacja 2**). Szczegółowy opis materiału zestawiono w Tabeli 1.

Pomiaru stężeń rtęci całkowitej (THg) dokonano, wykorzystując spektrometr absorpcji atomowej AMA 254 (Altec) (**Publikacja 1, Publikacja 2, Publikacja 3**). Analizę rtęci organicznej (Hg<sub>ORG</sub>) (**Publikacja 1**) przeprowadzono poprzez ekstrakcję tej formy ze zliofilizowanej próbki, a następnie przeniesienie jej na hydrofobowy nośnik (Carbonell i in., 2009; Kwaśniak i in., 2012). Pomiarów rtęci w otrzymanych ekstraktach dokonano przy

użyciu analizatora AMA- 254. Metylortęć (MeHg) (**Publikacja 2, Publikacja 3**) analizowano, w próbkach poddanych 12-godzinnej mineralizacji w 30-procentowym kwasie azotowym, w temperaturze nieprzekraczającej 60° C, z zastosowaniem metody atomowej spektroskopii fluorescencyjnej po uprzedniej separacji metodą chromatografii gazowej z użyciem aparatu MERX-M (Brooks Rand) zgodnie z metodyką U.S. EPA, 2002. Dodatkowo w wybranych próbkach (**Publikacja 3**) dokonano analizy udziału poszczególnych form rtęci metodą termodesorbpcji, zaproponowaną przez Jędruch i współpracowników (2018), wykorzystując analizator DMA-80 (Milestone). Użycie tej metody pozwoliło na wydzielenie pięciu grup zawierających związki rtęci o podobnych właściwościach, różniące się biodostępnością w środowisku. W ten sposób otrzymano trzy frakcje labilne: Hg<sub>Labilna 1a</sub> (rtęć związana głównie z halogenkami), Hg<sub>Labilna 1b</sub> (rtęć organiczna, w tym MeHg), Hg<sub>Labilna 2</sub> (siarczan i tlenek rtęci) oraz dwie stabilne: Hg<sub>S</sub> (siarczek rtęci), Hg<sub>Rezydualna</sub> (rtęć rezydualna). Selen oznaczono w próbkach poddanych mineralizacji, w warunkach podwyższonego ciśnienia i temperatury, techniką generacji wodorków (HGAAS), przy użyciu spektrometru absorpcji atomowej połączonego z FIAS 200 (**Publikacja 1**) i spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie wzbudzoną (ICP-MS) na aparacie Nexion 300X (Perkin Elmer) (**Publikacja 2**).

Tabela 1. Materiał badawczy.

Publikacja	Próbka	Okres pobierania	Liczba próbek	Wykonane analizy
Publikacja 1	łożysko	2007-2016	30	THg; Hg <sub>ORG</sub> ; Se;
	krew samic fok		76	
	krew szczeniąt		73	
Publikacja 2	krew pępowinowa	2014-2017	4	THg; MeHg; Se
	mleko		53	
	śledzie	2017	29	
	odchody fok dorosłych		71	
	odchody szczeniąt	2016-2017	24	
Publikacja 3	sierść fok dorosłych		14	THg; MeHg; frakcje Hg
	lanugo szczeniąt	2014-2017	13	
	sierść szczeniąt		9	

## WNIOSKI

Dorośla foka wraz z pożywieniem pobiera dziennie 140 µg rtęci (**Publikacja 2**; **Publikacja 3**). Poprzez odchody i sierść organizm foki jest w stanie usunąć prawie 50% rtęci przyjmowanej z pokarmem. Za prawie 90% tego ładunku odpowiedzialne są odchody. Eliminacja rtęci wraz z odchodami jest więc procesem daleko bardziej efektywnym dla organizmu niż wbudowywanie jej w nowo powstającą co roku sierść (**Publikacja 3**). Relatywnie niski udział metylortęci w odchodach (17%) w porównaniu do pokarmu, w którym metylortęć stanowi ponad 80% dowodzi jednak, że wydalana wraz z odchodami rtęć ulega wcześniej transformacji wewnątrz organizmu zwierzęcia. Zarówno w odchodach, jak i sierści więcej rtęci (>95% dla odchodów i >85% dla sierści) występuje w formie labilnej, która może szybko zostać ponownie włączona do obiegu. Może to mieć szczególne znaczenie w rejonach przybrzeżnych będących miejscami odpoczynku i rozrodu fok (**Publikacja 3**). Bazując na wynikach otrzymanych w helskim fokarium, obliczono, że populacja fok szarych, licząca w Bałtyku 30 000 osobników, może poprzez odchody i futro dostarczać do wód Morza Bałtyckiego 800 g rtęci w ciągu roku. W odniesieniu do ogólnego ładunku rtęci dostającego się do Bałtyku wartość ta ma małe znaczenie. Odchody i futro ssaków nie powinny być postrzegane jako dodatkowe źródło skażenia rtęcią morskiego łańcucha troficznego. Procesy życiowe kontrolują czas i formę, w jakiej rtęć powraca do środowiska, ale nie mają istotnego wpływu na całkowity ładunek rtęci krążący z udziałem fok w całym ekosystemie.

Łożysko odgrywa istotną rolę w transferze rtęci, pośrednicząc w wymianie substancji pomiędzy samicą a płodem. Wykazano, że jest ono miejscem kumulacji nieorganicznych form rtęci, nie stanowiąc jednak bariery dla najbardziej toksycznych organicznych form, w tym metylortęci (**Publikacja 1**). Systematyczny spadek stężenia rtęci całkowitej i metylortęci we krwi samicy przez cały okres trwania ciąży, prowadzący do obniżenia stężeń rtęci we krwi o około 40% tuż przed porodem, dowodził jej skutecznej detoksykacji. Równocześnie, najwyższy, prawie 100-procentowy, udział metylortęci w rtęci całkowitej we krwi pępowinowej, wskazywał na intoksykację szczenięcia (**Publikacja 2**). Nie stwierdzono jednoznacznie, czy łożysko stanowi barierę dla selenu. Niższe – względem stężenia we krwi samic – stężenie selenu we krwi pępowinowej świadczyło o mniejszej roli łożyska w międzypokoleniowym transferze selenu (**Publikacja 2**). Ze względu na wysokie stosunki

Se:Hg w tkance łożyska, nie można jednak wykluczyć, że obecny tam selen mógł ograniczać przedostawanie się toksycznej rtęci do płodu (**Publikacja 1**).

Następujący po porodzie okres matczynej opieki i karmienia młodych nie był dla samic kontynuacją oczyszczania organizmu z toksycznej rtęci. Stopniowa utrata masy ciała wywołana głodówką samic oraz postępującą mobilizacją rezerw energetycznych powodowała, że w okresie karmienia obserwowano wzrost stężeń rtęci całkowitej i metylortęci w ich krwi (**Publikacja 2**). Mimo to, badania nie wykazały statystycznie istotnych różnic pomiędzy stężeniami rtęci we krwi samic przed i w czasie laktacji. Pozwala to stwierdzić, że transfer rtęci przez łożysko skutecznie obniżał poziom rtęci całkowitej i metylortęci we krwi samic, niwelując wpływ krótkotrwałego wzrostu stężeń wywołanego laktacją. Produkcja mleka doprowadzała jednak do obniżenia stężeń selenu we krwi karmiących samic. Najintensywniejszy transfer selenu z mlekiem odbywał się w pierwszych dniach laktacji (**Publikacja 2**). Podczas 21-dniowego cyklu szczenięcia otrzymywały wraz z mlekiem około 335 µg rtęci, w tym 15 µg metylortęci oraz 16 mg selenu. Mleko jest więc mało istotnym źródłem rtęci, ale bardzo istotnym źródłem selenu (**Publikacja 2**).

Obecność rtęci w lanugo, niemowlęcym futrze powstającym jeszcze w łonie matki, także świadczy o przepływie rtęci do płodu (**Publikacja 3**). Prawdopodobnie, wbudowywanie rtęci w futro jest najważniejszą z dróg eliminacji metylortęci u nienarodzonych szczeniąt. Na skutek nieustającej ekspozycji na rtęć w życiu prenatalnym, jej najwyższe stężenie we krwi zaobserwowano bezpośrednio po narodzinach (**Publikacja 2**). W żadnej późniejszej fazie rozwoju szczenięcia stężenie rtęci we krwi nie było tak wysokie. Następstwem wysokiej koncentracji toksyny w organizmie było jej – natychmiastowe po przyjściu na świat – usuwanie wraz z odchodami (**Publikacja 3**). Pierwsze odchody charakteryzowały się najniższym stężeniem rtęci całkowitej z najwyższym udziałem metylortęci. Skuteczna transformacja metylortęci do formy nietoksycznej ujawniała się w kolejnych dniach życia szczeniąt. W tym czasie, pomimo małych ilości rtęci dostarczanych z mlekiem, stężenie rtęci w odchodach zaczynało rosnąć, niejednokrotnie przewyższając stężenia w odchodach fok dorosłych. Eliminacja poprzez odchody oraz obserwowany podczas karmienia gwałtowny przyrost masy ciała (1.51 kg dziennie) prowadziły do obniżenia poziomu stężeń rtęci w szczenięcej krwi (**Publikacja 2**). Przeciwną tendencję wykazywał selen, którego stężenia rosły w kolejnych dniach karmienia, wskazując na istotną rolę mleka jako źródła tego pierwiastka (**Publikacja 2**).



Stosunkowo szybka, bo już po kilkunastu dniach od narodzenia, wymiana futra dawała szczeniętom możliwość pozbycia się z organizmu dodatkowego ładunku rtęci (**Publikacja 2, Publikacja 3**). Co więcej, stężenia rtęci w lanugo i nowopowstałym futrze utrzymywały się na podobnym poziomie (**Publikacja 3**), pomimo że lanugo, w przeciwieństwie do nowej sierści, wzrastało w okresie, kiedy organizm narażony był na dopływ metylortęci wraz z krwią przez łożysko. W rezultacie, szczenięta opuszczające fokarium po około trzech miesiącach życia, pomimo spożywania ryb, charakteryzowały się niższymi stężeniami rtęci całkowitej i metylortęci we krwi niż w dniu przyjścia na świat. Można więc wnioskować, że naturalny rozwój szczenięcia pozwala na efektywne eliminowanie rtęci przekazywanej szczenięciu na drodze matczyne transferu przez łożysko (**Publikacja 2**). Jednak w żaden sposób nie umniejsza to potencjalnego zagrożenia, jakie może stanowić przekazywana tą drogą metylortęć dla rozwijającego się w łonie matki płodu.