

Elavhõbeda toksiliste toimetete seos Alzheimeri tõveks nimetatava haiguse süvenemisega

Boyd E. Haley, Ph.D.

Kentucky Ülikooli keemiaprofessor (USA)

Medical Veritas 4 (2007) 1510-1524

Lühikokkuvõte

Elavhõbe(II) ehk Hg^{2+} on neurotoksiline. Toimides normaalse ajukoe homogenaadile, neuronikultuurile, on Hg^{2+} võimeline põhjustama paljusid samasuguseid biokeemilisi kõrvalekaldeid, nagu on leitud ajus Alzheimeri tõve (AT) puhul. Ka rottidel, kellele toimiti metallilise elavhõbeda ($Hg(0)$) auruga, täheldati ajukoes mõningaid samalaadseid kõrvalekaldeid. Nimelt toimub ajukoe tiolrühmi sisaldavate valkude (tubuliin) ja ensüümide (kreatiini kinaas ja glutamiini süntetaas) kiire inaktivatsioon pärast kokkupuudet:

- Hg^{2+} -ga väikestes mikromolaarsetes kontsentratsioonides,
- elavhõbedaurudega (Hg^0) või
- timersaaliga (naatriumetüüelavhõbetiosalitsülaad).

Ka AT puhul on ajus märkimisväärselt inhibeeritud need samad valgud ja ensüümid. On näidatud, et Hg^{2+} lisamisel nanomolaarses kontsentratsioonis neuronikultuurile täheldatakse AT kolme laialdaselt aktsepteeritud patoloogilis-diagnostilise tunnuse tekkimist. Nendeks on amüloidvalgu sisalduse suurenemine, valgu tau hüperfosforüülimine ja neurofibrillaarsete kämpude (NTF - *neurofibrillary tangles*) tekkimine.

Selles artiklis käsitletakse hüpoteesi, et puhas elavhõbe, orgaanilised elavhõbedaühendid ja teised hematoentsefaalbarjääri läbivad toksilised ained, millel on kõrge spetsiifilisus tiolrühmi sisaldavate valkude ja ensüümide suhtes, on AT etioloogiliseks teguriks. Sellesse ainete rühma kuuluvad teised raskmetallid, nagu plii ja kaadmium, mis toimivad sünergistlikult, suurendades mitmekordselt metallilise elavhõbeda ja orgaaniliste elavhõbe(II)ühendite, nagu timersaal, toksilisust. See hüpotees selgitab ka geneetilist soodumust AT tekkeks, mille näitajaks on apoE genotüüp. Täpsemalt, kahte tsüsteiinijääki sisaldava apoE genotüübi vähenemine nõrgendab ühte apoE kaasasündinud detoksifikatsioonivõimetest, nimelt võimet eemaldada kesknärvisüsteemist elavhõbedat ja teisi tiolrühmadega reageerivaid toksilisi aineid. See suurendab aga aju ekspositsiooni tiolrühmadega reageerivatele toksilistele ainetele ja suurendab AT tekkeriski. Suurenenud ekspositsioon elavhõbedale amalgaamplommidest erituvate elavhõbedaurude sissehingamisel võib omada kahjulikku mõju ka haistmisvõimele. See toime võib selgitada kõrget korrelatsiooni lõhnataju kadumise ja sellele järgneva AT arenemise vahel.

Võtmesõnad: Alzheimeri tõbi (AT), elavhõbe, elavhõbeda toksilisus, neurotoksiinid.

1. Hüpoteesi põhjendus

Praegu peetakse AT-d tundmata etioloogiaga haiguseks. Samas on laialdaselt tunnustatud, et enamuse AT juhtudest ei ole otseselt geneetiliselt päritud ning tegemist peab olema mingi välise teguriga, nagu kokkupuude toksiliste ainetega või nakkus, et haigus areneks niikaugelt, kus AT on kliiniliselt diagnoositav.

USA-s on haiguse esinemissagedus maa- ja linnapiirkondades väga sarnane, ning see sagedus on sarnane ka kõikides USA osariikides. Seega, kui tegemist on mingi toksilise ainega, siis peab see olema meie endiga lähedalt seotud, midagi niisugust, mida me sööme või miski, mis on sattunud meie organismi muudest allikatest, nagu hambaplommid, vaktsiinid vms.

Nakkustekitajad, nagu bakterid, viirused või pärmseened, kuigi see on võimalik, ei näi olevat otseseks põhjuslikuks teguriks. See seisukoht põhineb tohtul hulgal vahenditel, mida USA riiklikud terviseinstituudid ja muud organisatsioonid üle kogu maailma on kulutanud AT uuringutele, et kindlaks teha seda põhjustavad tegurid, välistades samal ajal aga elavhõbeda. Siiani on ebaõnnestunud püüded välja selgitada haiguse tekkepõhjusena mis tahes mikroobset tegurit. Kui oleks tegemist mõne nakkustekitajaga (nagu AIDS-i või poliomüeliidi puhul), siis oleks see tõenäoliselt praeguseks ajaks juba kindlaks tehtud. Arvesse võtta tuleb aga ka mikroobidest põhjustatud paikseid põletikke suuõõnes, sest need mikroobid produtseerivad teadaolevalt toksilisi aineid (nt vesiniksulfiidi, metüülmerkaptani, gliitoksiini), mis inhibeerivad tiolrühmi sisaldavaid valke ja ensüüme. Pealegi võivad need suus pesitsevate fakultatiivsete anaeroobide poolt produtseeritavad toksiinid reageerida suus oleva elavhõbedaga ning moodustada ühendeid, nagu metüütioelavhõbeda kation ($\text{CH}_3\text{-S-Hg}^+$) ja di(metüütio)elavhõbe(II) ($\text{CH}_3\text{-S-Hg-S-CH}_3$), mis on erakordselt mürgised.

Niisiis, iga toksiline aine või toksiliste ainete rühm, mis arvatakse olevat seotud AT etioloogiaga, peab olema väga erinevates kohtades elavatele inimestele peaaegu võrdselt kättesaadav. Väljapakutav toksiline aine peab selgitama ka AT geneetilise soodumuse aspekte. Lisaks peavad eeldatavad toksilised ained olema eksperimentaalsetes tingimustes võimelised tekitama või süvendama paljusid biokeemilisi kõrvalekaldeid, mida on täheldatud AT puhul ajus. Toetudes meie uuringutele ja kirjanduses avaldatud andmetele esindavad elavhõbe ja elavhõbedat sisaldavad orgaanilised ühendid (pärit amalgaamplommidest, vaktsiinidest, muudest ravimitest, samuti värvides, seemneteraviljades jne kasutatud konservantidest) nendele tingimustele vastavaid ühendeid.

Selle hüpoteesiga on kooskõlas fakt, et esimene Alzheimeri tõve juhtum tuvastati 1903. aastal, umbes 60–70 aastat pärast seda, kui Läänemaailmas hakati hambaplommide materjalina kasutama elavhõbet sisaldavaid amalgaame. Tundub ebaloogiline, et kõikidel patoloogidel, kes tegutsesid aastatel 1700–1900, oleks märkamata jäänud haigus, mida iseloomustavad aju mahu vähenemine ning silmnähtavad kõrvalekalded morfoloogilistes tunnustes, mida on täheldatud AT diagnoosiga inimeste surmajärgsel uuringul. Seega on AT tõenäoliselt hiljuti tekkinud haigus, mille on põhjustanud inimese poolt loodud elavhõbedatoksiinid, st iatrogenesest elavhõbedamürgistusest tingitud haigus.

Elavhõbe ja orgaanilised elavhõbedaühendid on neurotoksiinid. Peale selle tugevneb elavhõbeda võime inhibeerida valke ja ensüüme sünergistlikult teiste toksiliste ainete, nagu plii ja kaadmium (suitsetajatel), manulusel. Nagu allpool näidatud, võib elavhõbeda toksilisust suurendada isegi EDTA (etüleendiamiintetraäädikhape, tavaline toidulisand) või metalliga seonduvad antibiootikumid, nagu tetratsükliin. Samuti on teada, et ka piima tarbimine suurendab elavhõbeda peetust organismis [25, 36]. Seega ei ole elavhõbeda ekspositsiooni ohutu taseme hindamine puuris peetavaid rotte kasutades, kes tarbivad hoolikalt kontrollitud toitu ning vett, usaldusväärne „elavhõbeda ekspositsiooni ohutu taseme“ kindlaksmääramisel inimeste jaoks. Tänapäeva teadus ei tea, millised on paljude toksiliste ainete või toksilisust võimendavate ainete kombineeritud toksilised toimed kombinatsioonis elavhõbedaga, ning seetõttu ei suuda nad kindlaks teha selle ekspositsiooni ohutut taset.

Järelikult on põhjust arvata, et tiolrühmadega reageerivad toksilised ained, nagu elavhõbe, kaadmium, plii ja teatud orgaanilised ühendid, on AT-d süvendavad või isegi seda põhjustavad tegurid. Ometi on elavhõbe ainuke toksiline aine, mis on näidanud vastavates testimissüsteemides võimet põhjustada paljusid biokeemilisi kõrvalekaldeid ja patoloogiaid, mis on AT diagnostilisteks tunnusteks. Samuti puutub enamus inimestest pidevalt kokku elavhõbedaga, sest paljudel meist on seda suus lausa grammides (hambaplommide kujul, millest umbes 50% moodustab elavhõbe) ja mis vabastab pidevalt elavhõbedauru vaid mõne tolli kaugusel meie ajust. Seega on alust arvata, et ekspositsioon elavhõbedale on üheks peamiseks teguriks, mis on seotud AT varajase algusega.

Pealegi võib ekspositsioon teistele toksilistele ainetele või teguritele suurendada elavhõbeda toksilisust ning kiirendada AT tekkimist, eriti neil inimestel, kellel on selleks geneetiline soodumus.

Võttes arvesse sünergistlikku toksilisust ja geneetilist soodumust ei saa olla mingit lihtsat korrelatsiooni elavhõbeda ekspositsiooni, kudedes sisalduse ja elavhõbedast põhjustatud haiguste tekkimise vahel.

2. Ülevaade uuringutest ja tulemused

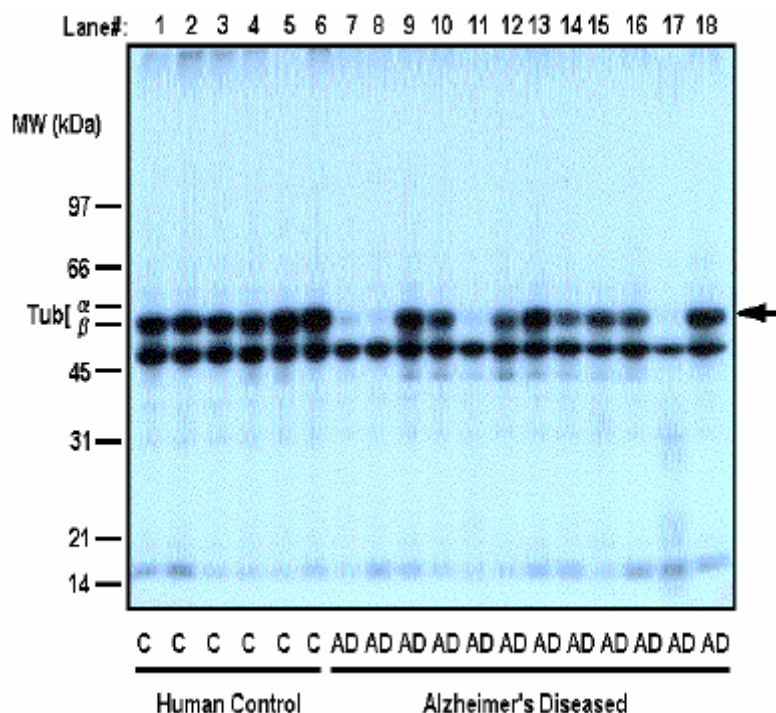
2.1. Ensüümide inhibeerimise ja valkude jaotumise tulemused

1980ndate lõpus meie laboris AT kohta tehtud uuringud olid seotud sellega, et leida erinevusi nukleotiididega seonduvates valkudes AT-ga patsientide *post-mortem* ajukoes ja samaealiste mittedementsete kontrollisikute ajukoeproovides. Meie varasemaid uurimistulemusi iseloomustas põhiliselt järgmine leid: AT-ga patsientide ajukoes täheldati võrreldes samaealiste kontrollisikute ajukoeproovidega kahe, ajus väga olulise nukleotiididega seonduva valgu, tubuliini ja kreatiini kinaasi (CK) aktiivsuse ning nukleotiididega seonduvise võime olulist vähenemist [1–3]. Tubuliin ja CK on valgud, mis seonduvad vastavalt nukleotiididega GTP (guanosiin-5'-trifosfaat) ja ATP (adenosiin-5'-trifosfaat).

Eluvõimelise CK ja tubuliini olemasolu jälgimiseks kasutasime me radioaktiivse märgistamise meetodit, et määrata nende nukleotiididega seonduvise kohtade biokättesaadavust enne ja pärast elavhõbeda või teiste toksiliste ainete lisamist.

Põhimõtte seisneb selles, et nende valkude ja ensüümide seonduvise radioaktiivse märgisega näitab nende ensüümide olemasolu ja normaalset aktiivsust, mitteseonduvise aga viitab sellele, et valgud ja ensüümid on inhibeeritud. Nende jaoks, kes on huvitatud keemiast, kirjeldatakse seda tehnoloogiat põhjalikult mujal [4]. Seda meetodit kasutades näidati meie laboris, et võrrelduna samaealiste kontrollisikutega on AT-ga patsientide ajus nii tubuliini kui ka CK bioloogiline aktiivsus vähenenud ja need on ebanormaalset jaotunud lahustumatusse (pelleti) fraktsiooni.

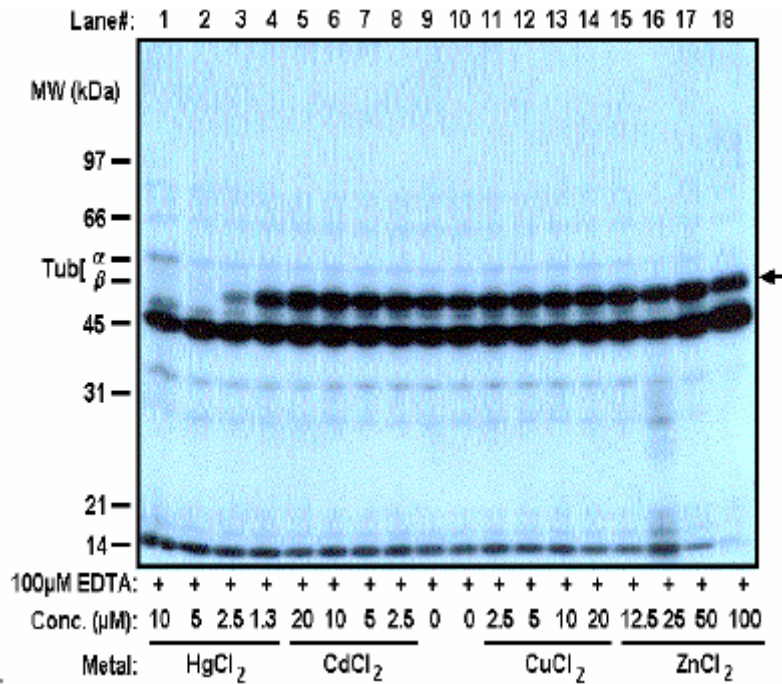
Joonis 1. Autoradiogramm, mis näitab biokättesaadavat tubuliini kontrollgrupi isikute ja kliiniliselt diagnoositud AT-ga isikute ajukoe homogenaadis



Joonisel 1 on näidatud autoradiogramm, mis on saadud SDS-PAG-est (naatriumdodetsüülpolüakrüülamiidgeel), millel ajuvalgud eraldatakse elektroforeesiga pärast radioaktiivset märgistamist (^{32}P)8- N_3GTP -ga, mis seondub ainult eluvõimelise tubuliiniga. (^{32}P)8- N_3GTP on loodusliku ühendi GTP keemiline analoog ja mõlemad on võimelised seonduma tubuliiniga ning põhjustama selle polümeriseerumist mikrotoubuliteks. Joonisel 1 on toodud võrdlus tubuliini biokättesaadavuse kohta kontrollgrupi ja AT-ga patsientide ajukoe homogeneaadis. Tubuliin oli peamine radioaktiivse märgisega valk kontrollgrupi ajukoe homogeneaadis, AT-ga patsientide ajukoe homogeneaadis oli eluvõimelise tubuliini sisaldus aga vähenenud umbes 80%. Nendel AT gruppi arvatud patsientidel, kellel oli tubuliini tase kõrgem (rajad 9, 13 ja 18), näitas hilisem patoloogiline uuring, et neil ei olnud AT-d, vaid muu dementsuse vorm (nt dementsus Lewy kehadega). Need katsed tehti vähemalt 2 mM Mg^{2+} ja 0,5 mM EDTA (kelaatija, mida kasutatakse raskmetalli toime elimineerimiseks) manulusel.

Kuna AT ei ole otseselt geneetiliselt päritav haigus, otsisime me võimalikke toksilisi aineid, mis võiksid jäljendada spetsiifilisi toimeid, mida on täheldatud seoses tubuliiniga ajus AT puhul. Enamus raskmetalle mõjutavad tubuliini eluvõimelisust seni, kuni nad ei ole seotud või kelaaditud ajus looduslike orgaaniliste hapetega (nt tsitraat). Joonisel 2 on toodud autoradiogramm, mis sarnaneb joonisel 1 olevaga ja kujutab näidet ühest meie skriinimistestidest, milles uuriti erinevate raskmetallide toimet tubuliini eluvõimelisusele.

Joonis 2. Autoradiogramm ühest skriinimistestist, milles uuriti erinevate raskmetallide toimet tubuliini eluvõimelisusele

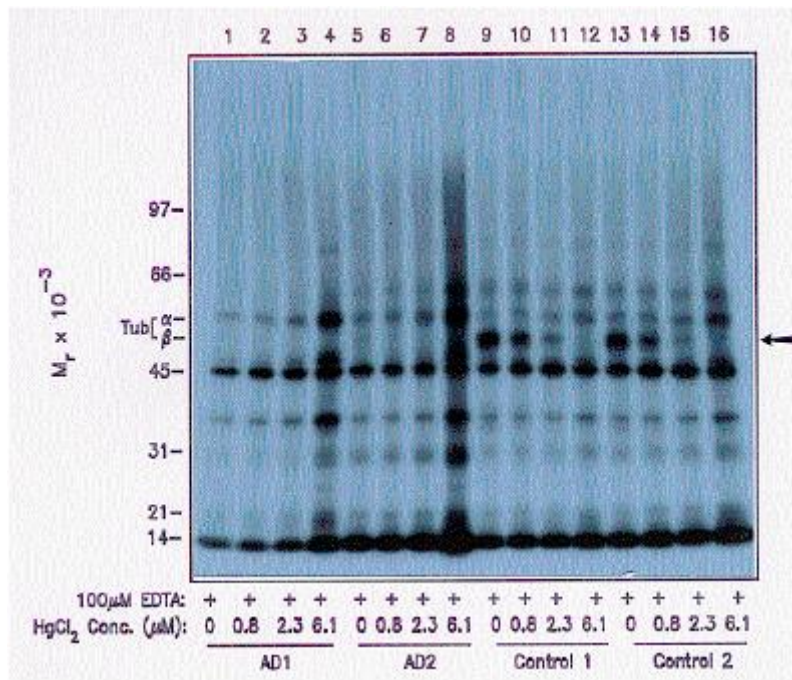


Pärast mitmete raskmetallide testimist märkasime, et EDTA või teistest looduslikest orgaanilistest hapetest kelaatijate manusel jäljendas ainult Hg²⁺ biokeemilisi kõrvalkaldeid, mida on täheldatud tubuliini puhul AT-ga patsientide ajukoe homogenaatides.

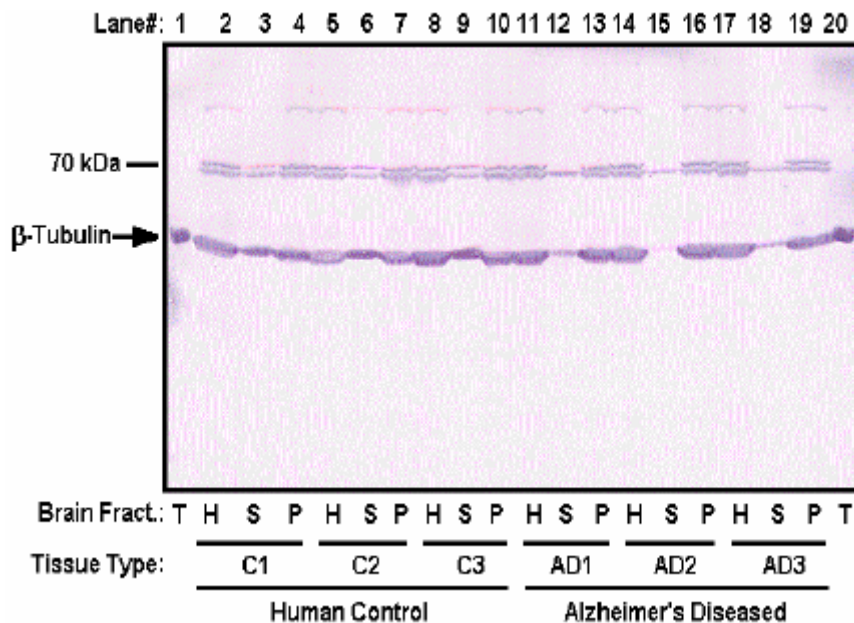
Seda tehti kõigepealt Hg²⁺ ja teiste toksiliste raskmetallide väikeste koguste lisamisega normaalse ajukoe homogenaadile erinevate kelaatijate manusel [3, 5, 6]. Leiti, et Hg²⁺ võib väga väikestes mikromolaarsetes kogustes (1 mikromolaarses) inhibeerida kiiresti ja selektiivselt GTP või (³²P)8-N₃GTP tubuliiniga (M_r = 55 000 daltonit) seondumise võimet, omamata märkimisväärset toimet teistele GTP-ga seonduvatele valkudele molekulmassiga umbes 42 000 daltonit, mida leidis nii kontrollgrupi kui ka AT-ga patsientide ajus võrdsel määral. Niisiis, mis puutub raskmetallidest toksilistesse ainetesse, siis mis tahes uuritud orgaanilisest hapest kelaatija manusel piisas vaid Hg lisamisest väikeses mikromolaarses kontsentratsioonis kontrollgrupi ajukoe homogenaadile, et saada samasugune (³²P)8-N₃GTP-ga seondumise profiil kui AT-ga isikute ajukoe proovides. Peale selle, Hg²⁺ kelaatimine EDTA-ga ei kõrvaldanud, vaid pigem tugevdas seda seondumist inhibeerivat toimet.

Joonisel 3 on näidatud tubuliini-GTP interaktsioonid (³²P)8-N₃GTP-ga pärast Hg²⁺ lisamist väikestes kontsentratsioonides normaalsetele ja AT-ga patsientide ajukoe homogenaatidele. Nendes AT-ga patsientide ajukoe homogenaatides märgistatud tubuliini ei leitud. Kuigi tubuliin on kõige raskem märgistatav valk kahes normaalse ajukoe homogenaadis, kaob see märgis kiiresti Hg²⁺ lisamisel väikeses mikromolaarses kontsentratsioonis. Samasugust toimet on täheldatud ka AT-ga patsientide ajukoe homogenaatides. Meie laboris läbiviidud uuringud näitavad, et tubuliini eluvõimelisuse inhibeerimine sõltus suuresti ajast ja et Hg²⁺ väiksemad kontsentratsioonid kui näidatud joonisel 3, põhjustasid tubuliini eluvõimelisuse kadumist, kui kontrollisikute Hg²⁺-ga töödeldud proove inkubeeriti pikema aja vältel.

Joonis 3. Autoradiogramm, mis näitab tubuliini-GTP interaktsioone (³²P)8-N₃GTP-ga pärast Hg²⁺ lisamist väikestes kontsentratsioonides normaalsetele ja AT-ga patsientide ajukoe homogenaatidele.



Joonis 4. Beeta-tubuliini üleminek lahustuvast fraktsioonist lahustumatusse fraktsiooni AT-ga patsientide ajukoe homogenaatides võrrelduna normaalsete isikute ajukoe homogenaatidega (võrrelda radasid 3, 6, ja 9 radadega 12, 15 ja 18)



Lühendid: T = puhastatud ajukoe tubuliin, H = kogu homogenaat, S = supernatant, P = pellet

Ajukoe tubuliin ja CK on homogenaadis temperatuuril 0 °C tavaliselt lahustuvad valgud. Lisaks võime kadumisele seonduda radioaktiivset määrgist omava nukleotiidiga, oli nii tubuliin kui ka CK pärast lihtsat tsentrifugeerimist jaotunud AT-ga patsientide ajukoe proovides ebanormaalselt, st lahustuva fraktsiooni asemel lahustumatusse fraktsiooni [2, 5, 6]. Nii normaalsete kui ka AT-ga patsientide ajuvalkude uurimisel redutseeriva SDS-PAGE-ga näivad mõlemad valgud olevat siiski normaalse suurusega ja modifitseerimata. Seda on näidatud tubuliini puhul ka joonisel 4, kus kasutati beeta-tubuliini vastaseid antikehi,

näitamaks, et AT-ga patsientidel läheb beeta-tubuliin ajukoe homogenaadi lahustuvast fraktsioonist lahustumatusse fraktsiooni ja normaalsetel isikutel jääb lahustuvasse fraktsiooni (võrrelda radasid 3, 6, 9 radadega 12,15 ja 18).

Peale selle on läbiviidud uuring kooskõlas sellega, et märgistatud tubuliini vähenemine vastab tubuliini sisalduse vähenemisele lahustuvast fraktsioonis.

Mis tahes homogenaadi testimisel tuleb arvesse võtta, et elusa looma organismis see nii olla ei saa. Seetõttu viidi läbi katsed, milles uuriti, kas elavhõbedaaurul, peamiselt amalgaamplommidest erituval kujul, võiks olla samasugune toime rottidele, kellele toimiti sellise auruga erinevate ajavahemike jooksul [7]. Rotid erinevad inimestest selle poolest, et nad suudavad sünteesida C-vitamiini, inimesed aga peavad seda saama toiduga. Arvatakse, et C-vitamiin kaitseb mõningal määral raskmetallide toksilisuse ja muud liiki oksüdatiivse stressi eest, sest ta suurendab taandatud glutatiooni (GSH) taset, mis seob Hg^{2+} ning aitab seda organismist välja viia. Siiski oleme täheldanud, et elavhõbedaauru toimel kaotab roti ajukoe tubuliin 41–75% oma [^{32}P]8- N_3 GTP-ga seondumise võimest, mis on sarnane AT puhul ajus esinevate kõrvalekalletega ja kinnitab ajukoe homogenaatidega saadud tulemusi [7]. Peale selle, uuringud teo neuronikultuuris näitasid, et elavhõbe, ja ainult elavhõbe, võib väikestes, nanomolaarsetes kontsentratsioonides lõhustada aksonites tubuliini ja jätta järele paljad neurofibrillid, mis kujutavad endast neurofibrillaarsete kämpude (NFT) (AT patoloogia tähtsaim diagnostiline tunnus) esialgset staadiumi. Seda demonstreerivat tähelepanuväärset videot võib näha aadressil <http://movies.commonscalgary.ca/mercury> [8].

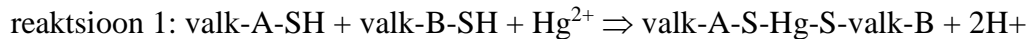
Täiendavad tulemused on näidanud, et Hg^{2+} lisamine kontrollisikute ajukoe homogenaadile ei põhjusta mitte ainult nukleotiidiga seondumise vähenemist, vaid soodustab ka tubuliini ebanormaalset jaotumist lahustumatusse fraktsiooni, nagu on näidatud joonisel 4. See oli eriti efektiivne teiste kahevalentsete metallide, nagu tsink, vask, plii ja alumiinium, manulusel. Mõningate nende metallide sisaldus teatakse olevat AT puhul ajus suurenenud [9, 10].

On tähtis aru saada, et nii tubuliin kui ka CK on normaalse ajukoe homogenaadis eeskätt lahustuvast fraktsioonis, kuid AT puhul läheb ta ebanormaalselt lahustumatusse fraktsiooni, kusjuures mõlema võime seonduda normaalsete nukleotiididega on suuresti vähenenud. On hästi teada, et CK omab väga reaktiivset tsüsteiinijääki oma ATP-ga seondumise kohtades ja AT puhul on see ajus üle 95% inhibeeritud [2]. Veel on täheldatud, et AT puhul jaotusid nii tubuliin kui ka CK SDS-PAGE-l normaalsete valkude M_r väärtustega. Seega ei esine nendes valkudes muutusi, mis võiks mõjutada molekulmassi. On tõenäoline, et ebanormaalse jaotumise põhjustajaks on miski, mis võib mõjutada valke **solubilisatsiooni** protseduuris, mida kasutatakse valkude ettevalmistamiseks SDS-PAGE jaoks.

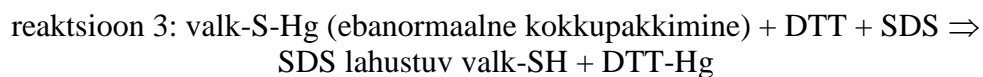
On andmeid raskmetallide ebanormaalse sisalduse kohta AT-ga patsientide ajukoes ja mõningatel andmetel on elavhõbeda sisaldus suurenenud [9, 10]. Tubuliini ja CK ühiseks omaduseks on see, et neil mõlemal on nukleotiidiga seondumise kohtade lähedal elavhõbeda suhtes väga reaktiivne tiolrühm, mis modifitseerituna inhibeerib nende bioloogilist aktiivsust, inhibeerib interaktsioone GTP ja ATP radioaktiivselt märgistatud analoogidega ning võib põhjustada tsentrifuugimisel ebanormaalset jaotumist lahustumatusse fraktsiooni [2, 11, 12]. Sobivaks seletuseks oleks siin valkude Hg^{2+} -vahendatud ristseondumine tsüsteiinijääkide kaudu, mille tulemusena suureneksid hüdrofoobsed interaktsioonid alaühikute vahel Hg^{2+} toimel tekkinud konformatsiooniliste muutuste tõttu valkude tertsaarstruktuuris. Nii Hg^{2+} -vahendatud ristseondumine kui ka ebanormaalne kokkupakkimine on kergesti lõhustatav ditiotreitoliga (DTT) redutseerimise ja SDS-ga

(naatriumdodetsüülsulfaat) solubiliseerimisega, mida kasutatakse SDS-PAGE korral ja mis võimaldab tubuliinil ja kreatiini kinaasil omada normaalseid M_r väärtusi.

Elavhõbedal on väga suur afiinsus tiolrühmade suhtes ja on tõestatud, et ta on nende mõlema valgu bioloogilise aktiivsuse väga tugev inhibiitor. Elavhõbe on kahevalentne ja võib moodustada ristsidemeid lahustuvate valkude, nagu tubuliin ja CK vahel, ning see põhjustab valgu agregatsiooni. Üldistatud üheetapiline reaktsioon oleks selline, nagu reaktsioon 1.



Selline keemiline reaktsioon võimaldaks agregaatide moodustumist, mis ilmuksid ebanormaalselt lahustumatus fraktsioonis. Oma struktuuri tõttu on DTT väga hea elavhõbeda kelaatija, omades võimet redutseerida disulfiidsidemeid. Redutseerivates geelides kasutatavad DTT väga suured kogused kelaadiks ja eemaldaks elavhõbeda valkudest, muutes need uuesti lahustuvateks ja migreeruvateks, nagu modifitseerimata valgud SDS-PAGE elektroforeesil, mis on näidatud reaktsioonidega 2 ja 3:



Niisiis on nii tubuliini kui ka CK ebanormaalne jaotumine ajukoe homogenaatides lahustumatusse fraktsiooni ilma molekulmassi vähenemiseta selgitatav Hg^{2+} reageerimisega nende valkudega.

2.2 Eksitotoksilisuse hüpotees ja elavhõbeda toksilisus

AT põhjuseks peetakse veel ka “eksitotoksilise” aminohappe hüpoteesi, milles eksitotoksiline aminohape glutamaat kuhjub ajukoosse, põhjustades neuronite surma. See on usutav hüpotees ja sobib kokku hüpoteesiga elavhõbeda toimete kohta tiolrühmi sisaldavatesse ensüümidesse/valkudesse. AT-ga patsientide ajus määrati Hg^{2+} -tundliku glutamiini süntetaasi (GS) aktiivsus ja tserebrospinaalvedelikus määrati GS kogus ning võrreldi kontrollgrupi patsientidel saadud väärtustega. Leiti, et GS on AT-ga patsientide ajus inhibeeritud ja GS koopia arv on nende tserebrospinaalvedelikus suurenenud [13, 14]. Kaks teist sõltumatut gruppi on kinnitanud, et GS-i suurenemist AT-ga patsientide tserebrospinaalvedelikus on võimalik kasutada AT diagnoosimiseks [15, 16]. Hiljuti näitasid teised andmed GS-i aktiivsuse märkimisväärset vähenemist AT-ga patsientide ajukoos [17]. GS on ensüüm, mis vajab aktivatsiooniks kahevalentset metalli. Seetõttu testisime me, kas ajus olevat GS-i võiks inhibeerida Hg^{2+} -ga ja leidsime, et see oli erakordselt tundlik. Selline inhibeerimine, kui seda põhjustab amalgaamist vabanenud elavhõbedaaorus olev Hg^{2+} , suurendaks glutamaadil põhinevat eksitotoksilisust ja põhjustaks neuronite surma. Peale selle transporditakse vakuoolides paiknev glutamaat molekulaarsete transporterite abil mikrotoobulitesse, mis samuti hävivad Hg^{2+} toimel [6]. Seega kahjustaks kokkupuude elavhõbedaaurudega kohe nii glutamaadi metabolismi kui ka transporti. GS-i leidumine tserebrospinaalvedelikus võib olla tingitud aju püüdest kompenseerida elavhõbeda pool inhibeeritud GS-i, mis põhjustab glutamaadi ja GS-i tasemete täheldatud suurenemist ning glutamaadi eksitotoksilisust.

2.3 Elavhõbeda ja AT põhjustatud metaboolsete radade inhibeerimine ning oksüdatiivne stress

Haigus, mis alandab meie metaboolse energia taset, alandab ka meie võimet sünteesida redutseerivaid ühendeid, mis seovad organismis liigse elavhõbeda ja viivad selle organismist välja. Teatakse, et Hg^{2+} inhibeerib metaboolseid protsesse mitokondrites, mis produtseerivad ATP-d ja NADH-d, inhibeerides ensüüme sidrunhappe tsükli ja elektronide transpordi süsteemi. Need nukleotiidid on vajalikud nii redutseeritud glutatiooni (GSH) sünteesimiseks kui ka glutatiooni redutseerimiseks pärast selle oksüdeerimist. GSH on tähtsaim biomolekul, mis osaleb elavhõbeda väljaviimisel organismist loomulikul teel. Niisiis, kuna elavhõbe kuhjub aeglaselt organismis, nõrgendab see organismi loomulikke kaitsemehhanisme iseenda ja kõigi teiste raskmetallide mürgistuse suhtes ning suurendab üldist oksüdatiivset stressi, mis väljendub reaktiivsete hapnikuosakeste moodustumises.

On hästi teada, et AT-ga patsientide ajukoes kannatavad kõik rakukomponendid tugeva oksüdatiivse stressi all, kontrollisikute samasugustes kudedes seda aga täheldatud ei ole. Selle tekitajaks võib olla elavhõbe, kuna on hästi dokumenteeritud, et elavhõbe suurendab bioloogilistes kudedes oksüdatiivset stressi. Peale selle on hästi teada, et Hg^{2+} inhibeerib paljusid teisi valke ja ensüüme, mis on tähtsad neuronite funktsioneerimiseks, sealhulgas porfüriini rada, mis vastutab heemi sünteesi eest [18–20]. On erakordne, et ainult Hg^{2+} mürgistus põhjustab spetsiifilist porfüriinide profiili, mis on tingitud konkreetse ensüümi inhibeerimisest. On kirjeldatud, et 85%-l testitud hambaarstidest ja hambatehnikutest esinesid elavhõbedamürgistuse tunnused nii käitumuslikes kui ka füsioloogilistes näitajates ning 15%-l esinesid elavhõbeda põhjustatud neuroloogilised häired koos CPOX4 geeni polümorfismiga [20].

Hg^{2+} põhjustatud heemi sünteesi katkemine mõjutab hapnikutransporti hemoglobiini sünteesi takistamise näol, vähendab ATP produktsiooni mitokondrites, kuna tsütokroom C vajab heemi ja inhibeerib palju heemi vajavate P450 ensüümide toimet, mis on organismis peamisteks detoksikatsioonensüümideks. Seetõttu võiks paljusid AT-ga patsientide ajus täheldatud kõrvalekaldeid hõlmata hüpoteesiga, mis pakub välja selle haiguse tekke peamise soodustajana ekspositsiooni Hg^{2+} -le. Samuti teatakse, et heemi sisaldus AT-ga patsientide ajus on ebanormaalselt madal ja et see kõrvalekalle on tõenäoliselt põhjustatud amüloid- β valgust [21]. Samuti on mõeldav, et Hg^{2+} muudab heemi sünteesi ajus, põhjustades võimetust amüloid- β valku väljutada.

2.4 Ekspositsioon elavhõbedale ja toksilise elavhõbeda amalgaamplommidest vabanemise määramine

Fakt, et elavhõbe inhibeerib tubuliini, CK-d ja GS-i ning et need valgud on ebanormaalselt inhibeeritud AT puhul ei tõesta veel, et ekspositsioon elavhõbedale põhjustab AT teket. Siiski on kindlalt tõestatud, et pidev igapäevane ekspositsioon elavhõbedale süvendab lõpuks AT kliinilist seisundit. Kas selline ekspositsioon elavhõbedale on võimalik? Vastus on jah, vaatamata FDA järjekindlale keeldumisele hinnata otseselt amalgaamplommidest vabanenud elavhõbedaaure või sundida ADA-t ning selle aine tootjaid esitama sellist informatsiooni. Elavhõbeda dokumenteeritud suurel hulgal vabanemine amalgaamplommidest ja elavhõbeda võime põhjustada biokeemilisi ja patoloogilisi kõrvalekaldeid, mis on kooskõlas leidudega AT-ga patsientide ajus, teeb elavhõbeda seotuse AT-ga põhjuslikult usutavaks.

Esimene küsimus, mis sellest tuleneb, oleks, kas amalgaamplommides on piisavalt elavhõbedat organismi aastatepikkuseks pidevaks mürgitamiseks väikeste kogustega? Vastus on jah. Näiteks ühest suurest amalgaamplommist, mis sisaldab 1 gramm elavhõbedat (1

miljon mikrogrammi) ja vabastab mürgist ainet 10 µg päevas, piisaks elavhõbeda ekspositsiooniks 100 000 päevaks või umbes 274 aastaks. Ühest kümnendikust grammist elavhõbedaplommist jätkub 27 aastaks. Seega on amalgaamplommides piisavalt elavhõbedat, et mürgitada organismi senikaua, kuni nad suus on.

Teiseks, kas elavhõbe eraldub amalgaamplommidest kiirusega, mille üle peaks muret tundma? Vastus on jah. Amalgaamplommid või “hõbeplommid”, nagu hambaarstid neid nimetavad, sisaldavad umbes 50% (massi järgi) elavhõbedat ja on üsna kerge näidata, et nendest plommidest eraldub elavhõbe aurudena. Täpset amalgaamist eritunud kogust saab aga määrata vaid suletud süsteemis oleva amalgaami puhul, kasutades usaldusväärseid, aja jooksul tõestatud keemilisi meetodeid ja kaasaegset aparatuuri. Suus olevatest amalgaamplommidest vabanenud elavhõbeda täpset kogust ei ole kerge määrata, sest mõningane kogus sellest vabaneb lõualuusse, mõningal määral imendub see sülge ja suukudedesse, mõningal määral vabanevad väikesed mittelenduvad osakesed, mis vabastavad elavhõbedat maos ja seedetraktis ning mõningal määral seda inhaleeritakse ja see imendub kopsudes.

Chew jt testisid hoolikalt kavandatud uuringus suletud anumast “elavhõbeda pikaajalist lahustumist elavhõbedat mitte vabastavast amalgaamist (kaubanimi Compositil)” [22]. Nende tulemused näitasid “et elavhõbedat vabanes 24 tunni jooksul keskmiselt $43,5 \pm 3,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ja vabanenud elavhõbeda kogus jäi katse käigus (2 aastat) üsna konstantseks.” Oma laboratooriumis oleme me korranud sarnaseid katseid samasuguste tulemustega.

International Academy of Oral Medicine and Toxicology (IAOMT) toetas uuringut, milles hinnati elavhõbeda vabanemist erinevatest amalgaamplommidest. Üheksale IAOMT-i hambaarstile saadeti ühesugused pleksiklaasist vormid 10 süvendiga, kusjuures igaühte mahtus 1 doos (e. 1 *spill* = 400 mg) amalgaami. Kõigile kümnele hambaarstile saadeti ka erinevate tootjate poolt valmistatud amalgaammaterjal. Nad panid 10 doosi amalgaami vormi kümnesse süvendisse ja saatsid need dr Haley laborisse Kentucky Ülikoolis elavhõbeda vabanemise testimiseks Nipponi otsese elavhõbeda analüsaatoriga. Esialgu lasti amalgaamid vananeda, kuni elavhõbeda emissioon ühtlustus, ja siis määrati vabanenud elavhõbeda kogus 25-l järjestikusel päeval. Mõned tulemused on toodud tabelis 1.

Need andmed näitavad, et 1 cm² amalgaami vabastas elavhõbedat ühte doosi (1 *spill*) sisaldavast plommist (iga plomm oli veidi alla 1 cm²) vahemikus 4–22 µg päevas. See tulemus saadi nii, et amalgaamid lasti seista destilleeritud vees toatemperatuuril, vett segati ettevaatlikult ilma amalgaami häirimata ja sealt võeti analüüsiks 1 ml. Me tegime mõned katsed. Näiteks hoides amalgaami vee all ja harjates seda 15 korda tavalise keskmise tihedusega hambaharjaga, suurenes elavhõbeda vabanemine 5–10 korda.

Niisiis, elavhõbeda vabanemise kohta varem teatatud andmeid $43,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ päevas [22] ja IAOMT-i amalgaamide uuringus leitud väärtusi ei saa lugeda elavhõbeda ebaolulise kogusega kokkupuutumiseks, arvestades, et täna veel elav 70-aastane isik on nende aastate jooksul oma amalgaamplommide tõttu pidevalt eksponeeritud elavhõbedale. Peale selle on selline vabanemine ilma galvanismita, üleliigsest kuumusest või närimisest tuleneva rõhuta, mis kõik suurendavad elavhõbeda vabanemist amalgaamplommidest [23].

Mõned võivad eelnevate elavhõbeda vabanemise väärtustega mitte nõustuda. Tõepoolest, erinevate tootjate amalgaamid võivad vabastada elavhõbedat rohkem või vähem. Isegi erinevate hambaarstide poolt valmistatud amalgaamplommid võivad vabastada elavhõbedat

erinevates kogustes, nagu on näidanud meie tulemused. Kuid isegi meie poolt teatatud madalaimad väärtused kujutavad toksilist ekspositsiooni elavhõbedale. Peale selle ei ole proamalgamidena varustajad publitseerinud ühtegi hoolikalt kontrollitud uuringut, mis sarnaneks ülaltooduga ja lükkaks ümber nende uuringute tulemused, isegi kui neil on olnud nii aega kui ka selleks vajaminevat laboritöö kogemust. Tõepoolest, amalgamidena varustajad kasutavad vabanemise “hindamist”, mis põhineb elavhõbeda sisaldusel uriinis ja veres, kuigi kõigile on teada, et see varieerub aja jooksul suuresti ega ole usaldusväärne. Esiteks on hästi teada, et umbes 85–95% elavhõbedast eritub väljaheite ja mitte uriiniga, miks siis hinnatakse elavhõbeda taset selle sisalduse järgi uriinis? Pealegi on kirjandus täis selliseid analüüse, milles on kasutatud täiesti ebakorrektsed ja ebaõigeid viise kogu elavhõbeda eritumise või sellele eksponeerituse määramiseks. Põhinedes elavhõbedale ohutu ekspositsiooni hindamisel selle sisalduse järgi veres, uriinis, juustes või väljaheites, ei arvestata üldse elavhõbeda peetust kehakudedes.

Tabel 1. Elavhõbeda vabanemine amalgamidest, määratuna 25 järjestikusel päeval 9 erineva hambaarsti poolt (kaubanimi: a – Valiant, b – Dispersalloy, c – Tytin)

Hambaarst/ Kaubanimi	Päev							
	1	4	8	11	15	18	22	25
1/a	9,92	9,68	9,58	9,46	8,70	8,87	9,39	9,31
	9,75	9,26	8,886	8,20	8,07	8,01	9,56	10,32
	8,08	7,29	7,054	7,29	7,56	7,31	7,32	6,96
2/b	9,97	9,62	10,85	10,59	11,26	9,07	9,28	9,01
	7,32	7,92	9,913	9,28	8,64	6,81	7,54	8,67
	9,21	8,69	8,599	8,48	7,78	8,27	7,94	9,00
3/a	5,96	5,83	4,408	4,53	4,27	4,47	5,14	4,47
	5,28	4,76	4,492	4,28	4,80	4,51	4,30	4,86
	4,60	4,70	4,929	4,87	6,15	5,80	5,94	5,47
4/a	6,84	6,90	6,788	5,78	8,16	7,74	7,89	8,03
	12,46	11,88	11,77	12,40	12,15	10,69	10,48	10,22
	13,91	13,42	12,62	11,18	11,67	13,44	13,21	13,09
5/b	11,36	11,24	11,89	12,09	15,34	14,71	14,47	15,86
	17,80	17,48	16,77	19,58	19,32	20,72	20,70	20,00
	15,35	14,60	14,09	18,63	17,76	12,39	16,29	15,85
6/c	14,21	13,18	12,24	11,84	11,64	11,57	14,15	13,24
	21,06	20,48	19,77	20,15	22,51	20,91	18,80	16,58
	9,41	8,28	8,69	9,73	9,56	11,78	9,80	9,22
7/c	9,02	8,66	8,27	7,52	8,04	11,22	9,52	8,67
	10,76	10,34	9,71	6,38	7,03	7,54	7,43	6,78
	7,54	7,108	6,66	6,51	6,90	6,51	6,96	8,20
8/b	11,42	10,90	12,08	10,39	10,74	10,98	12,09	11,54
	8,24	7,68	8,12	7,43	7,50	8,87	8,79	8,46
	10,53	10,43	10,55	11,15	10,46	10,16	10,56	10,23
9/c	9,10	8,06	7,80	7,37	7,99	7,30	9,80	9,31
	10,95	10,22	10,77	10,43	12,25	11,32	12,48	11,20
	15,93	15,53	14,99	12,23	12,80	14,67	14,04	13,65

Näiteks isikutel, kes on halvad elavhõbeda väljutajad, on uriinis elavhõbedat vähem kui isikutel, kes on head elavhõbeda väljutajad. Peale selle kinnitab proamalgamite tarnijate poolt kasutatud hindamismeetod, et halvad väljutajad on just vähem eksponeeritud elavhõbedale [24]. Uuringutes, milles määrati elavhõbeda sisaldust autistlike vastsündinute juustes ja võrreldi seda normaalsete lastega, on uurijad leidnud, et autistlikel lastel ei olnud sisalduse suurenemine juustes sõltuvuses nende emade amalgaamplommide arvuga, kuid normaalsetel lastel oli [25]. Jälgimisuuringud näitasid, et autistlikel lastel on elavhõbeda sisaldus organismis suurenenud [26].

See leid võib selgitada Alzheimeri puhul leitud amüloid- β prekursorvalgu suurenenud sisaldust lastel, kellel on tugevad autistlikud sümptomid [27]. See näitab selgelt, et elavhõbeda peetus organismis ei näita selle sisaldus juustes ega ka veres või uriinis, sest elavhõbe peab enne jõudma verre ja alles siis saab ta erituda juuste, uriini või väljaheitega. See tähelepanek selgitab, miks kõrgelt hinnatud Šeišellide uuringus leiti, et lapsed, kelle juustes oli elavhõbeda sisaldus suur, sooritasid paremini mõningaid intellektuaalseid teste, ja miks Fääri saarte uuringus leiti, et lastel, kellel oli veres madalaim elavhõbeda sisaldus, esines rohkem kardiovaskulaarseid probleeme. Elavhõbeda kõrge sisaldus juustes näitab võimet väljutada elavhõbedat ja madal sisaldus veres näitab väljutamisvõime puudulikkust.

Teaduse hindamisel vaadatakse seda, mida ei ole avaldatud, aga mis peaks olema kindlasti avaldatud. Seetõttu on elavhõbedat sisaldava amalgaami kui ohutu materjali tarnijad püüdnud vältinud katsete läbiviimist, mis võiksid näidata elavhõbeda täpset kogust, mis vabaneb teadaoleva suuruse ja massiga amalgaamplommidest. On äärmiselt kerge näidata, et amalgaamid vabastavad mürgist ainet. Väljaspool suud võib seda näidata, valmistades ühe doosi (1 *spill*) amalgaami sisaldavat partiid, pannes need teatud ajaks destilleeritud vette ning analüüsides elavhõbeda sisaldust selles vees. Analüüsi võib läbi viia, kas määrates otse elavhõbeda sisaldust vees või viies vee alikvoodid bioloogilisse süsteemi, mida elavhõbe teatakse mõjutavat.

Me tegime seda nii aju tubuliini kui ka kreatiini kinaasiga, st valgu ja ensüümiga, mis on AT-ga patsientide ajus praktiliselt inhibeeritud. Kreatiini kinaasiga saadud tulemused olid väga dramaatilised, ensüümi inhibeerimine oli üle 95%, kui lisati mõni mikrolüüter vett 1 ml veest, milles oli vähem kui tund aega leotatud 1 doosi (1 *spill*) amalgaami. Tubuliini eluvõimelisuse hindamiseks leotasime amalgaame vees erinevate ajavahemike jooksul ja tulemused on toodud tabelis 2. 50 μ l lisamine igast alikvoodist, milles oli leotatud amalgaame, oli võimeline inhibeerima tubuliini eluvõimelisust üle 60% ja mõnikord isegi 80% või enam. Ei olnud suurt erinevust, kas ajukoe homogenaate töödeldi elavhõbeda väikeste kontsentratsioonidega või veega, milles oli leotatud amalgaame. See on kooskõlas andmetega, mis näitasid, et elavhõbeda toksilisus korreleerub selle vabanemisega hambaplokkidest [23].

Tabel 2. Tubuliini eluvõimelisus protsentides sõltuvalt tundidest, mille jooksul 1 doosi (1 *spill*) amalgaami leotati 1 ml vees

Aeg (tundides)	Tubuliini eluvõimelisus (%)
0	100
0–1	20
1–2	10
2–4	37
4–8	35

8–12	11
12–24	37
24–48	38
48–72	37

Sellised katsed näitavad, et amalgaamidest pärit elavhõbe on normaalses ajukoes võimeline esile kutsuma samasuguseid biokeemilisi kõrvalekaldeid, nagu on täheldatud AT-ga patsientide ajukoe proovides, ja juba see üksi peaks olema piisav põhjendus, miks amalgaamplommide kasutamist ei tohiks jätkata.

2.5 Kas amalgaamplommide esinemine mõjutab oluliselt elavhõbeda sisaldust organismis?

On avaldatud mitmeid artikleid elavhõbeda suurenenud sisalduse kohta inimese kudedes ja selle seosest amalgaamplommide arvuga [28-32]. Ka Maailma Tervishoiuorganisatsiooni teaduslik komisjon (*World Health Organization Scientific Panel*) leidis, et elavhõbeda ekspositsioon oli 3–70 µg päevas, millest suurem osa oli pärit amalgaamplommidest [33].

Andmed, mis puudutavad elavhõbeda ekspositsiooni amalgaamplommide kaudu, olid pärit hiljutisest NIH uuringust, milles osales 1127 sõjaväelast [34]. Selles uuringus osalenud sõduritel oli keskmiselt 20 amalgaamist pinda (vahemikus 0–66 pinda). Iga 10 pinda suurendas elavhõbeda sisaldust uriinis 1 µg/l. Varasemates uuringutes on näidanud, et väljaheite ja uriiniga eritunud elavhõbeda vahekord on 12 : 1, seega eritub uriiniga vähem kui 8% kogu elavhõbedast [29]. Niisiis suurendab iga 10 amalgaamist pinda kogu ekspositsiooni vähemalt 12 µg ja see ei hõlma isegi organismis peetunud elavhõbedat.

Samuti näitas NIH uuring, et keskmise amalgaamplommide arvuga isikutel oli elavhõbeda sisaldus uriinis umbes 4,5 korda suurem kui kontrollisikutel, kellel amalgaamplomme ei olnud [34]. Sõduritel, kellel oli üle 49 plommi, oli elavhõbeda sisaldus uriinis keskmiselt 8 korda suurem kui kontrollidel, kellel amalgaamplomme ei olnud. Ka korreleerus elavhõbeda sisaldus veres ja uriinis amalgaamplommide arvuga. Need tulemused on kooskõlas varasema uuringuga, milles elavhõbeda sisaldus uriinis langes 5 korda pärast mitme amalgaamplommi eemaldamist. Autorid järeldasid, et eksponeeritus elavhõbedale amalgaamplommide kaudu on suurem kui eksponeeritus toidu, õhu ja vedelike kaudu kokku [35]. Need sisaldused, eriti veres, rõhutavad vajadust eemaldada amalgaamplommid, sest viimaste andmete põhjal aktiveerib elavhõbe mikromolaarses kontsentratsioonis ensüümi fosfolipaas D, põhjustades arteriseina rakkudes biokeemilisi muutusi, mida on leitud kardiovaskulaarse haiguse korral [36].

Tuleb arvesse võtta kõiki andmeid, nii elavhõbeda sisaldust uriinis kui ka veres, sest umbes 80% sissehingatud elavhõbedaurust peetub organismis ja elavhõbeda sisaldus uriinis kujutab vaid väga väikest osa eritunud elavhõbedast ning ei ole kogu ekspositsiooni näitajaks. Elavhõbe kuulub organismis peetuvate mürkide hulka, sest suurem osa organismi sattuvast elavhõbedast läheb kudedesse. Kogus uriinis näitab eritunud elavhõbedat. Kuid peamine küsimus on selles, kui palju peetub elavhõbedat erinevates kehakudedes. Andmed, mis näitavad, et idiopaatilisse dilateeruvasse kardiomiopaatiasse (IDCM) surnud lastel on elavhõbeda sisaldus südamekoes 22 000 korda suurem kui mõnesse teise kardiovaskulaarsesse haigusse surnud isikutel [37], rõhutavad tähtsust silmas pidada organismis peetunud, mitte uriiniga eritunud elavhõbedat. Elavhõbeda sellise sisalduse kohta veres, uriinis või väljaheites ei ole andmeid, kuidas siis saaks elavhõbeda määramine nendes

proovides tõestada mis tahes tasemel ekspositsiooni ohutust? Kuigi need andmed IDCM kohta avaldati 1999. aastal, ei ole siiani keegi USA FDA-s, CDC-s, NIH-is või NIDCR-is teinud ettepanekut uurida seda leidu. See on haigus, millesse surevad kõige nooremad sportlased suure koormusega treenimisel ja mille tõttu vajavad paljud eakad isikud südamesiirdamist.

Üllatavalt, ja vastupidiselt teistele andmetele [30, 33], avaldati ajakirjas J. American Dental Association (JADA) uuring, milles määrati elavhõbeda sisaldus ajus ja teistes närvikudedes ning järeldati: “Meie tulemused ei toeta hüpoteesi, et amalgaamplommid on Hg sisalduse peamiseks suurendajaks ajus. Samuti ei näita need, et Hg on AT patogeneetiliseks teguriks.” [38]. Selle uuringu tulemustel puudub usaldusväärsus, sest ei ole võimalik selgitada, kuidas amalgaamplommid võivad suurendada elavhõbeda sisaldust neerudes, maksas, veres, juustes, uriinis ja väljaheites ning mitte suurendada elavhõbeda sisaldust ajus. Siiski näitavad nende uurijate poolt esitatud andmed Hg sisalduse mitteolulist suurenemist mitmes ajupiirkonnas kontroll- ja AT-ga isikutel, vaatamata nende amalgaamplommide arvule. Kuid nad esitasid andmed, mis näitavad, et umbes 8–15% isikutest on elavhõbeda sisaldus ajus äärmiselt suure mikromolaarses vahemikus [38]. Mõnedel oli AT ja mõned loeti “normaalseteks”, kuigi on raske selgitada, kuidas saab olla normaalne inimene, kelle ajus on elavhõbeda sisaldus nii kõrge (mikromoolides).

JADA artikkel sisaldas üllatavalt ka andmeid, mis näitavad, et Hg sisaldus kontrollisikute haistmispirkonna koes oli rohkem kui kaks korda suurem kui vastavate AT-ga isikute haistmispirkonna koes [38]. Sellel elavhõbeda sisalduse suurenemisel kontrollisikute haistmispirkonna koes võib olla mitu seletust. Üks seletus võiks olla selline, et selles uuringus ei hinnanud hambaarstid oma patsientidel täpselt hambaplommidest põhjustatud eksponeeritust elavhõbedale ja nende poolt valitud kontrollidel oli eksponeeritus elavhõbedale palju suurem kui valitud AT-ga isikutel. Haistmispirkond on väljaspool hematoentsefaalbarjääri ja peaks seega olema kindlaks sisemiseks standardiks, mille järgi hinnata elavhõbeda ekspositsiooni isiku poolt sissehingatava õhu kaudu.

Teine seletus oleks selline, et kontrollisikutel, isegi kui nende eksponeeritus elavhõbedale on kaks korda suurem kui AT-ga isikutel, mida näitas elavhõbeda sisaldus nende haistmispirkonna koes, on neil võime või mehhanism, mis kaitseb nende ajukude elavhõbeda sisalduse kahekordistumise eest. Kui see on õige, siis jagades elavhõbeda sisalduse ajukoes selle sisaldusega haistmispirkonna koes saame tulemused, mis näitavad selgelt kontrollisikute olulist võimet kaitsta oma ajukude elavhõbeda eest, see omadus AT-ga isikutel aga puudub. See võime võiks tuleneda kaitsva valgu apoE genotüübi (vt allpool) ja teiste veel tundmata eelsoodumuslike faktorite esinemisest [6, 39].

Arutelu jätkub sellega, et kas inimese eksponeeritus elavhõbedale põhjustab ajus ja teistes kudedes selliseid tasemeid, mida tuleb lugeda toksiliseks või kahjulikuks, või mitte. Siiski näitasid leitud sisaldused, mis küll hästi ei korreleeru AT-ga, kindlalt, et populatsiooni alarühma ajukoes võib elavhõbe esineda äärmiselt kõrges kontsentratsioonis [38].

Elavhõbeda toksilist taset, mis võiks põhjustada neuroloogilisi haigusi, on määratud loomadel, nagu rotid ja ahvid, rangelt kontrollitud laboratoorses tingimustes, kus toitumist jälgiti hoolikalt, et välistada teised toksilised ained. Peale selle kõrvaldati uuringust iga loom, kes haigestus või sai mikroobse nakkuse ning vajas antibiootikumravi.

Kuid inimesed ei ela sellistes kitsendatud tingimustes. Näiteks puutume me kokku paljude nakkustega, mis vajavad antibiootikumravi, mis loomadel on näidatud suurendavat

elavhõbeda peetust organismis [40]. Inimesed on eksponeeritud mitmesugustele teistele raskmetallidele. Suitsetajad on eksponeeritud liigsele kaadmiumile (Cd^{2+}) ja pliiürgistus (Pb^{2+}) on tavaline linnakeskonnas või nendel, kes on palju aastaid eksponeeritud pliidi sisaldavatele bensiiniaurudele. See tähendab, et inimeste puhul tuleb arvestada kombineeritud raskmetallide sünergistliku toksilisusega.

Samuti on küsitav, kas elavhõbeda sisaldus jääb AT-ga isikute ajus kõrgeks või mitte. Hock'i jt artiklis [41], mis on teravas vastuolus hambaarstide uuringuga [38], väideti, et AT varases staadiumis oli elavhõbeda sisaldus patsientide veres peaaegu kolm korda kõrgem kui kontrollgrupi isikutel ja et see suurenemine ei olnud seotud patsientide hammaste seisukorraga. Nad järeldasid, et elavhõbeda suurenenud sisaldus AT-ga patsientidel võib olla tingitud elavhõbeda vabanemist veel kindlaks tegemata keskkonnaallikatest või ajukoest seoses närvirakkude progresseeruva suremisega. AT-ga patsientide aju kaotab surma ajaks 25% oma massist, mis teeb viimase selgituse põhjendatuks. On hästi tuntud biokeemiline sündmus, et rakud ja koed vabastavad end denatureeritud kasutamata valgust. Hg suurem sisaldus kontrollisikute haistmispirkonna koes võrreldes AT-ga isikutega võib olla tingitud koe hävimise puudumisest kontrollisikutel.

Närvikoe inhibeerimist ja hävimist võib seletada ka teise AT puhul täheldatud leiuga. On dokumentaalselt tõestatud, et AT-ga patsientidel on haistmislävi suurenenud ja lõhnataju häirunud. Veel arvatakse, et kerge kognitiivse häirega patsientidel võivad haistmisprobleemid omada kliinilist tähtsust varase diagnostilise tunnusena AT diagnoosimisel [42–44]. Suuõõnes olev elavhõbe peab interakteeruma haistmissibulaga. Elavhõbeda neurotoksilise toime tõttu võib see halvendada haistmistundlikkust. Põhinedes elavhõbeda-AT hüpoteesil, peaks häirunud haistmistundlikkus esinema ja eelnema ajukahjustusele, nagu hilisemad uuringud on näidanud.

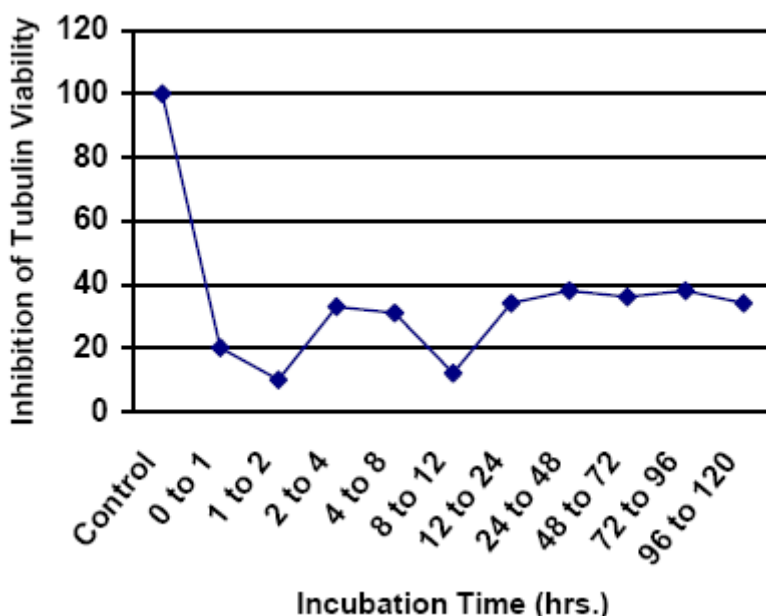
Meie laboratooriumis on näidatud, et lisades inimese ajukoe homogenaatidele erinevaid metalle kontsentratsioon, mis üksi ei mõjuta nukleotiidi seondumist tubuliiniga, suurendab nende metallide manulus aga sünergistlikult Hg^{2+} toksilisust. See tähendab, et Pb^{2+} , Zn^{2+} ja Cd^{2+} esinemine toimet mitteavaldavates kogustes vähendab Hg^{2+} kogust, mida on vaja tubuliini või kreatiini kinaasi eluvõimelisuse inhibeerimiseks 50%. Meenutagem elementide perioodilisuse tabelit, mis liigitab Zn, Cd ja Hg samasse IIB kategooriasse ja neil kõikidel on kõrge suhteline afiinsus tiolrühmade suhtes. Teiste sõnadega, elavhõbe on palju toksilisem koos teiste metallidega, mis konkureerivad elavhõbedaga seondumiskohtade suhtes kaitsvatel biomolekulidel (nt apoE2 ja -E3, glutatioon või GSH ja metallotioniin). Hiljuti täheldasime sama timerosaali toksilisuse puhul. Timerosaali võime surmata väikestes nanomolaarsetes kontsentratsioonides roti neuroneid primaarkultuuris suurenes tugevalt alumiiniumhüdrosiidi esinemisel mittetoksilistes kogustes, nagu need esinevad ka vaktsiinides [24].

Samuti on tähtis märkida, et elavhõbeda “katseklaasi tasemed” ei näita seda, mis võiks toimuda dünaamilises süsteemis, kus elavhõbeda püsiva taseme eest hoolitsevad amalgaamplommid. Katseklaasis, kuna elavhõbe eraldub lahusest, siis vaba Hg^{2+} kontsentratsioon lahuses langeb, mis muudab lahuse aja jooksul vähem toksiliseks. Kuna elavhõbe on organismis peetuv mürk, siis kogu süsteemist väljaviidud või koosse läinud elavhõbe asendatakse veelgi suurema elavhõbeda kogusega, mis vabaneb pidevalt amalgaamplommidest. Seetõttu on Hg^{2+} sisaldus uriinis ja veres püsivas tasakaalus elavhõbeda hulgaga organismis. Hiljutine uuring näitas, et elavhõbeda eemaldamine verest selle kelaatimisel DMPS-ga andis umbes 25% languse, mis kestis aga vaid 30 minutit, siis saavutas elavhõbeda sisaldus veres jällegi kelaatimiseelse taseme [45]. See võib juhtuda vaid

siis, kui elavhõbeda hulk organismis on piisavalt suur, et taastada kiiresti tasakaaluseisund ja asendada verest kelaatimisega eemaldatud elavhõbe. See näitab kindlalt, et elavhõbeda hulk organismis on palju suurem, kui veres määratud elavhõbeda kogus.

Elavhõbeda peetuse järgmiseks kinnituseks on elavhõbeda sisalduse alanemine uriinis lastel, kes osalesid uuringutes Children's Amalgam Trials (Amalgaamplommide uuringud lastel) [46]. Selles uuringus leiti, et esimese kahe aasta jooksul pärast amalgaamplommide panekut elavhõbeda sisaldus lastel peaaegu kahekordistus, siis langes see järgmise viie aasta jooksul tasemeni, mis amalgaamplommidega lastel ja komposiitplommidega lastel oluliselt ei erinenud. Seda täheldati isegi siis, kui lastele pandi viimase viie aasta jooksul täiendavaid amalgaamplomme! Seda nähtust võib kõige paremini selgitada elavhõbeda hästi tuntud võimega inhibeerida oma enda eritumist hästi tuntud nefrotoksiliste toimete kaudu. Autorite endi andmete põhjal peaks see elavhõbeda ilmne peetus organismi mitte lubama neil järeldada, et amalgaamplommid on lastele ohutud.

Joonis 5. Tubuliini eluvõimelisuse inhibeerimine aja jooksul (tunnid) lahusega, milles on leotatud amalgaami



2.6 Kas amalgaamid on võimelised andma toksilisi lahuseid?

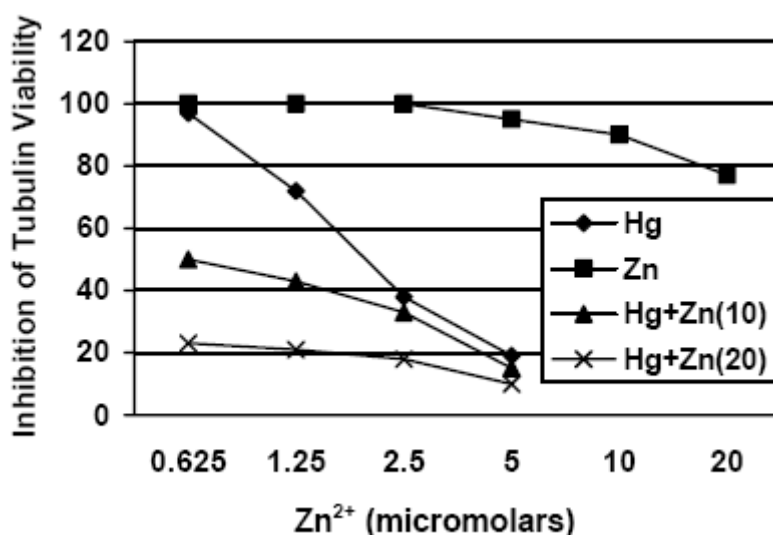
Et prognoosida amalgaamide kahjulikke toimeid suuõõnes, peab amalgaam olema võimeline avaldama toksilist toimet väljaspool suuõõnt. Joonisel 5 on näidatud tubuliini eluvõimelisuse inhibeerimine veega, milles leotati näidatud aja jooksul amalgaamplomme.

On selge, et amalgaamid muudavad vee aju tubuliinile toksiliseks viisil, mis on väga sarnane Hg^{2+} lisamisega, nagu seda tehti võrdluslahuste 3–6 puhul. Wataha jt teatasid, et amalgaammaterjali ekstrakt (kaubanimi Dispersalloy) “oli tugevalt tsütotoksiline, kui Zn vabanemine oli kõige suurem ning vähem toksiline 48–72 tunni vahel, mil Zn vabanemine vähenes.” [23]. Zn on lendumatu mikroelement amalgaamplommides ja Zn^{2+} on elusatele neuronitele vajalik mineraal. Seetõttu ei ole tõenäoline, et toksilisus oleks tingitud Zn vabanemisest amalgaamplommidest. Selle kontrollimiseks määrati ajukoe homogenaatides, nagu eespool on kirjeldatud, $0,6 \mu M Hg^{2+}$ toksilisus tubuliinile $0, 10$ ja $20 \mu M Zn^{2+}$

manulusel, nagu on näidatud joonisel 6 [3, 4]. Zn^{2+} suurendas nendes kontsentratsioonides 0,6 μM Hg^{2+} tubuliini eluvõimelisust inhibeerivat toimet vastavalt 4–50% ja 76%. See näitab, et tsingi seos suurenenud toksilisusega oli tingitud amalgaamist vabanenud elavhõbedast, mis suurendas toksilisust sünergistlikult, mitte aga Zn^{2+} toksilisusest üksi. Nagu näha tabelist 2, on uuringud meie laboratooriumis näidanud, et amalgaamide inkubeerimine destilleeritud vees vähem kui üks tund andis lahuse, mis samuti põhjustas aju tubuliini ja kreatiini kinaasi kiiret inhibeerimist sarnaselt sellele, mida täheldati Hg^{2+} lisamisel lahustele.

Seega näib, et nende lahuste toksilisus, milles on leotatud amalgaame, ei ole põhjustatud Zn^{2+} otsesest toksilisest toimest. Pigem on elavhõbeda suurenenud toksilisus tingitud Zn^{2+} või teistest amalgaamis sisalduvate raskmetallide manulusest, mis sünergistlikult suurendavad elavhõbeda toksilisust, nagu varem on teatatud plii ja kaadmiumi puhul [47]. Need metallid võivad konkureerida bioloogiliste kelaatijatega, tekitades suurtes kontsentratsioonides vaba Hg^{2+} , mis on võimeline inhibeerima nukleotiididega seonduvate valkude, nagu tubuliin ja CK, aktiivsust.

Joonis 6. Hg^{2+} toksilise toime tugevnemine aju tubuliinile Zn^{2+} kontsentratsiooni suurenedes



Täheldatud Hg^{2+} ja teiste raskmetallide sünergistlikku toksilisust on kinnitatud loomudelites. Kombineerides $1/20$ Pb^{2+} LD_1 -lahusest Hg^{2+} LD_1 -lahusega saadi lahus, mis süstimisel rottidele andis LD_2 asemel LD_{100} . Niisiis suureneb elavhõbeda toksilisus teiste raskmetallide manulusel. See on tähtis, sest amalgaamid sisaldavad Hg, Zn, Ag, Sn ja Cu ning nende teiste metallide galvanismist tingitud vabanemiskiirus ei ole teada. Seega on toksilisuse hindamine elavhõbeda sisalduse järgi organismis mõnevõrra triviaalne, kui ei hinnata ka teiste raskmetallide sisaldust organismis.

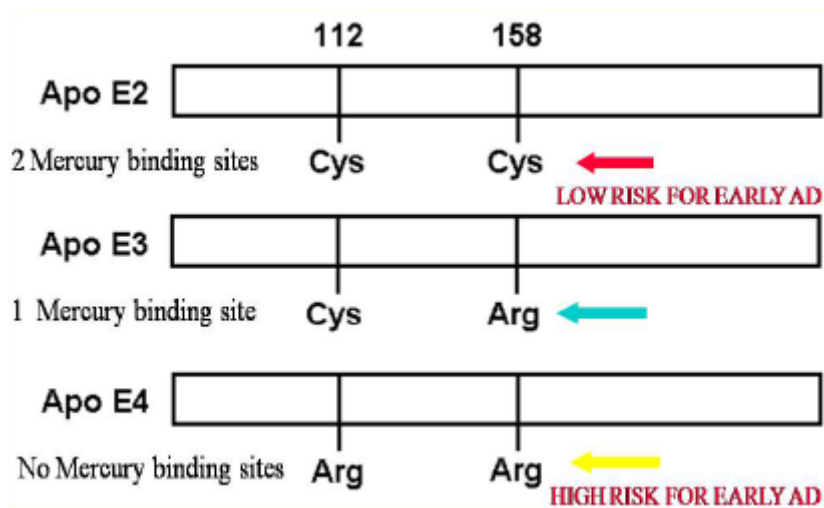
Seoses meie keskkonna komplitseerituse ja **närvisüsteemi puudutavate segadusseajavate faktorite tõttu ning** ilma valitsuseta, kes toetaks epidemioloogilisi ja teaduslikke uuringuid, sobivaid mitmetegurilisi toksilisuse uuringuid ohutuse tagamiseks, ei ole võimalik kindlalt väita, nagu paljud amalgaamide tarnijad seda teevad, et eksponeeritus sellel tasemel ei ole ohtlik inimese tervisele. Elavhõbedale eksponeeritusest põhjustatud “kahjustuse puudumise tõendit” kasutatakse õigustamatult kui “mis tahes materjali ohutuse kinnitamist”, sest

inimesed puutuvad iga päev tarbetult kokku paljude mikrogrammide elavhõbeda ja teiste metallidega.

3. Geneetilise soodumuse tähtsus

Igat AT etioloogia hüpoteesi tuleb vaadelda geneetilise soodumuse seisukohalt. AT tekke kõige tuntumaks geneetiliseks riskifaktoriks on korrelatsioon apoE genotüüpide ja vanuse vahel AT tekkimisel [39]. Inimesed võivad pärida mis tahes alleelide apoE2, -E3 või -E4 kombinatsiooni. Inimestel, kes on pärinud apoE2 geeni kaks koopiat või apoE2 ja -E3 kombinatsiooni, on tõenäosus AT varajaseks tekkeks palju väiksem, kui inimestel, kes on pärinud apoE4 geeni kaks koopiat. Samuti näib apoE2 kaitsvat AT varajase tekkimise eest palju paremini kui apoE3.

Joonis 7. Biokeemilised erinevused kolme kõige sagedasema apolipoproteiin E isovormi vahel näitavad elavhõbedaga seondumise võimet



Niisiis peab iga elavhõbeda toksilisusega seotud terviklik süsteem ajus selgitama seda seost elavhõbeda ja apoE genotüübist tingitud geneetilise soodumuse vahel. Põhilised struktuursed erinevused apoE kolme isovormi vahel selgitavad nende võimet kaitsta organismi elavhõbeda toksilisuse eest.

Lihtsalt öeldes “AT alguse” eest kaitsval apoE2-l on kaks tiolrühma (tsüsteiinid), mis võivad seonduda elavhõbedaga või teiste raskmetallidega, kuid apoE4-l need puuduvad, nagu näha jooniselt 7. Näiteks apoE3-l on üks apoE2 tsüsteiinidest asendatud arginiiniga ja apoE4-l on mõlemad apoE2 tsüsteiinid asendatud arginiinidega [48]. Niisiis arvati, et kaitse puudumine AT varajase alguse vastu on tingitud elavhõbedaga seonduvate tiolrühmade puudumisest apoE valkudes, nagu on näidatud tabelis 3 [6].

Tabel 3. Seos apoE SH-rühmade arvu ning vanuse vahel AT algamisel [punane – apoE genotüübi kombinatsioon, must – alarühmade arv (ligikaudne vanus AT algamisel)]

apoE ▶ ▼	2	3	4
2	4 (>90)	3 (>90)	2 (80-90)
3	3 (>90)	2 (80-90)	1 (70-80)

4	2 (80-90)	1 (70-80)	0 (<70)
---	-----------	-----------	---------

ApoE2 poolt pakutav kaitse on põhjendatud vaid siis, kui arvestatakse apoE valkude olemust ja biokeemilist ülesannet. ApoE valgud on seotud kolesterooli transpordiga ja kõik kolm alleeli teevad seda hästi. Kuid apoE liigitatakse “majapidaja valkude” hulka. See tähendab, et vastupidiselt tubuliinile, GS-le ja CK-le, mis jäävad rakkudesse, kus nad sünteesitakse, lahkub apoE ajurakkudest, transportides oksüdeerunud kolesterooli tserebrospinaalvedeliku (CSF) kaudu läbi hematoentsefaalbarjääri verre, kus see eemaldatakse maksa kaudu. See sobib hüpoteesiga, et kuna apoE2 või -E3 lahkuvad ajurakkudest ja liiguvad läbi CSF-i, siis seonduvad nad tõenäoliselt ja eemaldavad elavhõbeda, teised raskmetallid või teised tiolrühmadega reageerivad toksiinid, mis võivad olla kesknärvisüsteemi sattunud, kaitstes seeläbi aju neuroneid [6]. Tähelepanek, et 2 ja 4 ning 3 ja 3 kombinatsioonid annavad umbes sama vanuse AT algamisel näitab, et tiolrühmade sisaldus on sellega rohkem seotud kui apoE3 *versus* apoE2 või -E4 genotüüp.

ApoE4 ei saa efektiivselt seonduda elavhõbedaga nendes tsüsteiinijäägi 112. ja 158. asukohas ja seetõttu ei ole tal kaitsvaid Hg²⁺-d puhverdavaid omadusi, mis on apoE2 ja -E3-l. On huvitav märkida, et apoE valgu suurim sisaldus organismis esineb veel CSF-is (tserebrospinaalvedelikus), mis kaitseb aju. Selle “metalliga seondumise” rolli kinnituseks on hiljutine uuring, milles näidati, et apoE4 normaalset geneetilist vormi leidub üleliia patsientidel, kes oma amalgaamplommide tõttu näivad kannatavat elavhõbedamürgistusest tingitud neuroloogiliste häirete all [49]. Nendel patsientidel leiti apoE2 sisaldus olevat väiksem, kui üldpopulatsiooni puhul võis oletada, ja umbes 70%-l nendest patsientidest paranes tervis pärast amalgaamplommide eemaldamist.

Eelnev töö kinnitas varasemat uuringut, milles hinnati samasuguse grupi tervislikku seisundit pärast amalgaamplommide eemaldamist [50]. Selles uuringus oli umbes 70%-l isikutest, kelle tervis kõige enam paranes, enne amalgaamplommide eemaldamist elavhõbeda sisaldus veres suurim ja kolm aastat hiljem väiksem. Väiksemal grupil aga, kelle tervis kolmeaastase perioodi jooksul pidevalt halvenes, oli elavhõbeda sisaldus veres enne amalgaamplommide eemaldamist väiksem ja nendel langes elavhõbeda sisaldus veres pärast amalgaamplommide eemaldamist kõige vähem.

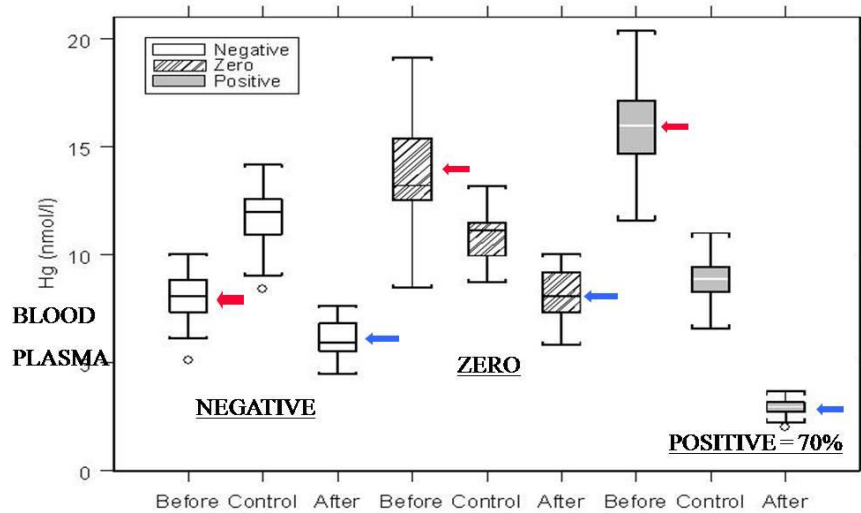
Joonisel 8 on toodud skeem, mis on koostatud “amalgaamplommide eemaldamise” uuringust saadud tulemuste põhjal [50]. Punased nooled näitavad elavhõbeda sisaldust veres uuringu alguses ja sinised nooled näitavad sisalduse vähenemist. Need andmed on kooskõlas elavhõbeda mürgistusega isikute grupi andmetega, kellel esines paranemine, sest nad olid võimelised elavhõbedat organismist välja viima, mida näitas nende kõrge Hg sisaldus veres. Need andmed on kooskõlas ka isikute grupi andmetega, kellel esines pidev halvenemine, sest nad ei väljutanud elavhõbedat efektiivselt organismist, mida näitab nende palju madalam Hg sisaldus veres. Pärast amalgaamplommide eemaldamist paranes suure Hg sisaldusega grupis tervis ja väikese Hg sisaldusega grupis ei paranenud.

4. Supertoksiinid suus, mis tekivad reageerimisel hambaplokkide elavhõbedaga

Paljud viimasel ajal kirjanduses ja populaarses pressis avaldatud teated väidavad, et periodontaalhaiguse esinemine suurendab mitme muidu näiliselt sellega mitteseotud haiguse riski (insult, madala sünnikaaluga vastsündinud ja kardiovaskulaarne haigus) või võimendab neid. Periodontaalhaiguse puhul toodavad anaeroobsed bakterid tsüsteiini- ja metioniini-

vastavalt divesiniksulfiidi (H_2S) ning metüülioli (CH_3SH). See tekitab periodontaalhaiguse puhul paljudel inimestel esinevat „halba hingeõhku”.

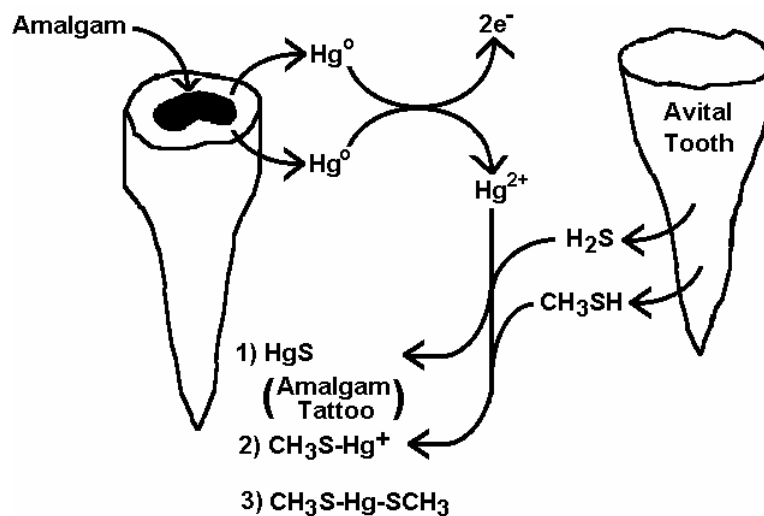
Joonis 8. Vereplasma Hg sisalduse enne ja pärast amalgaamplommide eemaldamist ning kliiniliste sümptomite korrelatsioon



Ulf Lindh et al. Neuroendocrinology Letters Nos5/6 V23, 450-482, 2002

Kuid suus, kus tekib H_2S , CH_3SH (periodontaalhaiguse anaeroobsete bakterite tegevuse tulemusena) ja Hg^0 (amalgaamplommidest), toimub tõenäoliselt ka nende reaktsiooniproduktide HgS (elavhõbesulfiid), $CH_3S-Hg-Cl$ (metüüliolavhõbekloriid) ning $CH_3S-Hg-S-CH_3$ (di(metüüliol)elavhõbe[II]) produktsioon. See on lihtne ja selge keemia, mille esinemist kinnitavad kergesti märgatavad „amalgaami tätoveeringud”. Need tätoveeringud kujutavad endast violetset igemekude, mis ümbritseb teatud hambaid igeme ja hamba piiril ning mis on põhjustatud peamiselt rakkudest väljasadenevast HgS -st, nagu näitab sellise koe elementanalüüs. Seda protsessi on kujutatud joonisel 9.

Joonis 9. „Amalgaami tätoveeringute” tekkeprotsess



HgS on üks kõige stabiilsemaid elavhõbedaühendite vorme ja see on mineraalne vorm, mida leidub kinaveriks nimetatavas maagis, millena elavhõbedat maapõuest kaevandatakse. Kõiki neid suus tekkivaid ühendeid peetakse äärmiselt toksilisteks ja viimane ühend di(metüülio)elavhõbe on väga hüdrofoobne, sarnanedes lahustuvuse poolest dimetüülelavhõbedale ($\text{CH}_3\text{-Hg-CH}_3$). Dimetüülelavhõbe oli ühend, mis sai pressis tuntuks selle kaudu, kui vaid väike kogus sattus Dartmouthi Ülikooli keemiaprofessori latekskindale, põhjustades tõsiseid neuroloogilisi probleeme ja lõpuks surma 10 kuud hiljem [52]. $\text{CH}_3\text{-Hg-CH}_3$ surmav toksilisus elavhõbeda muude vormidega võrreldes on tingitud ilmselt selle võimest koguneda organismi hüdrofoobsetesse piirkondadesse, näiteks kesknärvisüsteemi, enne kui see lagundatakse reaktiivseteks osakesteks. $\text{CH}_3\text{-Hg-CH}_3$ on oma hüdrofoobsete omaduste poolest sarnane $\text{CH}_3\text{-S-Hg-S-CH}_3$ -le ja on viimasega võrreldav oma suure toksilisuse poolest, mis ületab Hg^{2+} toksilisuse.

Loogika ütleb, et igaüks, kellel on periodontaalhaigus, anaeroobsete bakteritega nakatunud hambad ja elavhõbedat sisaldavad hambaplommid, puutub iga päev kokku nende väga toksiliste ühenditega. Oma laboratooriumis sünteesisime me kaks metüülioelavhõbe(II) ühendit ja testisime neid. Need on ülimalt tsütotoksilised juba 1 mikromolaarses kontsentratsioonis või alla selle ja imetajate paljude oluliste ensüümide ja valkude, sealhulgas tubuliini ning CK tugevad pöördumatud inhibiitorid.

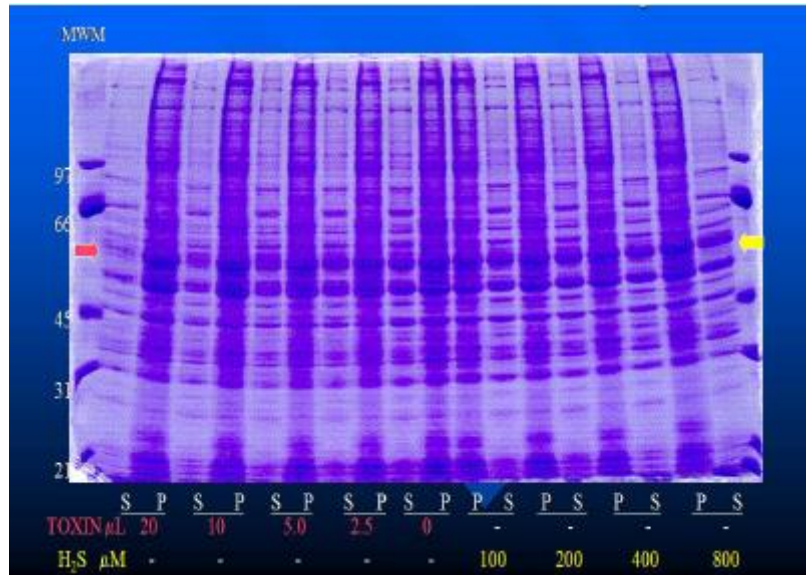
Idiopaatilisse dilateerivasse kardiomiopaatiasse (IDCM) surnud isikute südamekoes oli elavhõbeda sisaldus erakordselt suur – 178 400 ng/g koe kohta või 22 000 korda suurem kui kontrollgrupi isikutel, kes surid muudesse südamehaigustesse [37]. IDCM on haigus, millesse surevad noored sportlased suure kehalise koormuse ajal. Näib võimatu, et kude suudab siduda valkudega nii palju elavhõbedat ilma kahjustuse varaste sümptomite, nagu valu ning südamealitud häirumine, tekkimiseta. Kuid kui see elavhõbe peaks ühinema paikse anaeroobse nakkuse poolt produtseeritud H_2S -ga, võib see elavhõbe sadestuda südamekoesse kui HgS, nagu see toimub „amalgami tätoveeringute” puhul, ja kuhjuda seal ilma vaba Hg^{2+} vahetu toksilise toimeta. Kuid tuleb küsida, kust see liigne elavhõbe pärineb. Sageli esineb see isikutel, kes ei söö palju mereande. Minu arvates on see elavhõbe pärit amalgamplokkidest. Peale selle, kui südamekoes tekib HgS, võib seal tekkida ka väga tsütotoksilisi ühendeid $\text{CH}_3\text{-S-HgCl}$ ja $\text{CH}_3\text{-S-Hg-S-CH}_3$ ning nende toksilised toimed võivad selle haiguse puhul olulist rolli mängida.

Oma laboratooriumis testisime me rutiinselt väljatõmmatud surnud hambaid nende võime suhtes inhibeerida imetajate ATP-d siduvate ensüümide seondumist radioaktiivselt märgistatud [^{32}P]asido-ATP-ga. Enamik uuritud hammastest olid koos juurekanaliga. Kasutades samu ekstrakte, mis inhibeerisid ATP-d siduvate ensüümide eluvõimelisust, testisime nende toimeid inimese ajukoe tubuliinile, lisades nende ekstraktide alikvoote kontrollisikute ajukoe homogenaatidele ning määrates tubuliini eluvõimelisust ja jaotumist. Tulemused näitasid, et kuigi kõik ekstraktid inhibeerisid mõningal määral tubuliini liitumist radioaktiivse märgisega, inhibeeris ainult umbes 40% neist tubuliini eluvõimelisust ja põhjustas sellist jaotumist, nagu täheldatakse ajus AT puhul. Ühe sellise hambaga saadud tulemused on toodud joonistel 12 ja 13.

Joonisel 10 on kujutatud värvitud SDS-PAG (naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeel), millel ajuvalgud on eraldatud lihtsa tsentrifuugimisega pärast jaotumist lahustuvasse ja lahustumatusse fraktsiooni. Pange tähele, et radadel 1, 3, 5 ja 7 väheneb värvunud tubuliini kogus, samal ajal kui toksilise hambaekstrakti kogus suureneb, mis näitab tubuliini jaotumist

viisil, nagu seda täheldatakse ajus AT puhul. Seda ei juhtunud aga divesiniksulfiidi suurenenud koguse puhul, mis näitab, et sellega seotud toksiin ei ole H₂S.

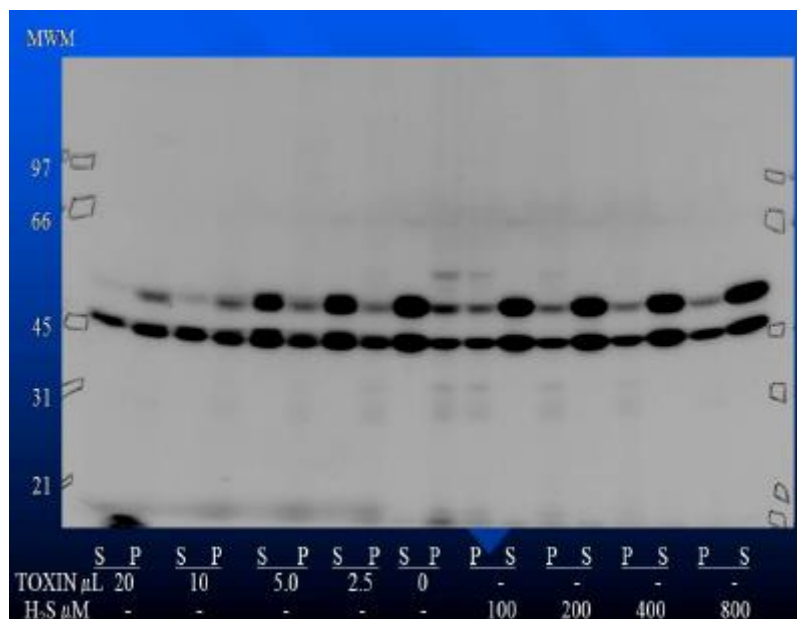
Joonis 10. SDS-PAG, millel on eraldatud ajuvalgud pärast nende eksponeerimist hambajuurekanali toksiinile või H₂S-le



Joonisel 11 on näidatud autoradiogramm, mis on tehtud samast SDS-PAG-est, mis on näidatud joonisel 10. See näitab toksilise hambaekstrakti poolt mõjutatud jaotumist, mis lisatud toksiooni koguse suurenedes inhibeerib dramaatiliselt tubuliini ja GTP interaktsioone. Toksiini kõrgeimate tasemete profiilid ei erine praktiliselt sellest, mida on täheldatud ajus AT puhul. Me võime näha sama tulemust, töödeldes normaalse ajukoe homogeneaate laboratooriumis valmistatud CH₃-S-HgCl-ga. See on kooskõlas Hg²⁺ ja teiste elavhõbedaühenditega, mis põhjustavad tubuliini ebanormaalset agregatsiooni vees lahustumatu materjalina ja need blokeerivad beeta-tubuliini interaktsiooni [³²P]8-N₃GTP-ga, GTP radioaktiivse analoogiga.

Niisiis, sõltuvalt periodontaalhaiguse puhul ja surnud hammastes esinevast anaeroobse mikroobse infektsiooni tüübist võib tekkida toksiline aine, mis süvendab AT-ks nimetatud haigust, eriti kui inimesel esinevad ka amalgaamplommid. Samuti on võimalik, et paljud nendest suust väljatõmmatud hammastest sisaldavad amalgaamplomme ja toksiinid nendes hammastes võivad samuti koosneda osaliselt orgaanilistest elavhõbedaühenditest, nagu on kirjeldatud eespool, mis ründab spetsiifiliselt mikrotuubulite süsteemi.

Joonis 11. Autoradiogramm, millel võrreldakse väljatõmmatud hambas sisalduva toksiooni või divesiniksulfiidi (H₂S) toimet tubuliinile



On tähtis märkida, et mikrotuubulite moodustumise katkemine mõjutab ka immuunsüsteemi. Rakkude jagunemisega seotud mitoosikälv koosneb mikrotuubulitest ja selle põhistruktuuri lõhkumine seiskab immuunvastuse tekkimiseks vajalike rakkude jagunemise.

Peale selle on täheldatud, et elavhõbe ja orgaanilised elavhõbedaühendid inhibeerivad nanomolaarsetes kontsentratsioonides tugevalt fagotsütoosi [51]. Fagotsütoos on esimeseks etapiks nii loomulikus kui ka omandatud immuunvastuses. On tõenäoline, et orgaanilised elavhõbedaühendid, mis tekivad suus amalgaamplommide ja periodontaalhaiguse/nakatunud hammaste tõttu, võivad nõrgestada immuunsüsteemi, võimaldades süsteemsel infektsioonil kergemini tekkida. Lisaks pärsib timerosaali (etüülelavhõbedat vabastav ühend) süstimine väikelastele ühel ajal elusviirust sisaldavate vaktsiinidega immuunsüsteemi ja võimaldab nõrgestatud viiruste proliferatsiooni.

5. Neuronikultuuride ja AT diagnostiliste markeritega seotud uuringud

Järgmine hiljutine publikatsioon kinnitab meie arvamust, et amalgaamplommidest vabanenud elavhõbe võib põhjustada AT süvenemist. Olivieri jt näitasid, et neuroblastoomirakkude töötlemine Hg^{2+} subletaalsete annustega (36×10^{-9} molaarne) põhjustab GSH taseme kiiret langust, suurendab amüloid- β valgu sekretsiooni ja suurendab mikrotuubulite valgu tau fosforüülimist [53]. Kahte viimast biokeemilist muutust on täheldatud ajukoos vaid AT puhul ja neid peetakse haiguse patoloogilis-diagnostilisteks tunnusteks. Amüoid- β valk moodustab amüloidnaaste, mis oli AT patoloogia puhul üheks esimeseks täheldatud diagnostiliseks tunnuseks ajus. Suur osa AT uurijatest arvab, et amüloidvalk on AT tekkimise põhjuseks. Seega sunnib elavhõbeda esinemine nanomolaarsetes kontsentratsioonides neuroblastoomirakke produtseerima valku, mis arvatakse olevat seotud otseselt AT-ga. See viis autorid teise järelduseni, et elavhõbedat võiks pidada AT tekkimise põhjuslikuks teguriks [53].

Neuronid moodustavad kultuuris juba varajases staadiumis kiiresti neurofillaarseid kämpusid, mis tekivad mikrotuubulite struktuuri hävimise tõttu, kui nad puutuvad kokku elavhõbeda äärmiselt väikeste kontsentratsioonidega [8]. Kõikidest testitud metallidest põhjustas ainult elavhõbe seda nähtust tasemel, mis oli alla ppm-i (osa miljoni kohta). See

tulemus on kooskõlas varasemate andmetega, mis on toodud joonistel 2, 3 ja 4 aju tubuliini inhibeerimise ja jaotumise kohta homogenaatides, mida on töödeldud Hg^{2+} -ga [3, 57]. See leid toetab kindlalt hüpoteesi, et elavhõbe, ja ainult elavhõbe, on võimeline põhjustama AT kolme laialt aktsepteeritud tähtsa patoloogilise tunnuse tekkimist neuronikultuuris [8, 53].

Selle publikatsiooniga kaasas olev ja aadressil <http://movies.commonscalgary.ca/mercury> kättesaadav video näitab, et $2 \mu\text{l } 10^{-7} \text{ M}$ elavhõbeda lisamine 2 milliliitrile neuronilahusele põhjustab tubuliini kiiret lõhustumist neurofibrillides. Selle tulemusena neurofibrillid agregeeruvad, moodustades neurofibrillaarseid kämpe (NFT-d), mis sarnanevad AT puhul ajus leitud ajus leitud. Elavhõbeda lõplik kontsentratsioon nendes katsetes 10^{-10} M on orienteeruvalt 100–1000 korda väiksem, kui tavaliselt amalgaamplomme omavate inimeste ajus leitud sisaldus 10^{-7} M . Enamus ajus olevast elavhõbedast on seotud tõenäoliselt kaitsvate ühenditega, nagu GSH või seleen ega ole vaba, et põhjustada neuronaalset kahjustust. Kuid võib arvata, et mingi osa sellest elavhõbedast esineb mõnel ajamomendil vaba Hg^{2+} -na, eriti siis, kui GSH tase on kas haiguse tõttu või geneetiliselt või mürgistuse tõttu madal. Mitmed tõendid näitavad, et GSH tase ja GSH sünteesimisvõime on teatud neuroloogiliste haiguste korral pärssitud [54–57]. Samuti on hästi teada, et vanuse suurenedes väheneb GSH sisaldus rakus oluliselt.

Mis puutub teise elavhõbedaga seotud fakti, siis teatakse, et porfüriini profiilid uriinis on elavhõbedamürgistuse korral täiesti muutunud. Peale selle näib nendel, kes on elavhõbedaga kokku puutunud, olevat porfüriini ebanormaalsete profiilidega seotud ka geneetiline komponent. Hiljutine uuring on näidanud, et heem lahustab amüloid- β valgu ja et amüloid- β valgu sisalduse suurenemise ajus korreleerub heemi ebanormaalselt madala tasemega ajus [21]. Selles uuringus töötati välja amüloid- β poolt indutseeritud heemi vaeguse mudel, mida pakuti välja neurodegeneratsiooni hindamiseks AT korral. Heemi vaegus on porfüriini raja elavhõbeda poolt inhibeerimise lõpptulemuseks ja porfüriini profiil uriinis on tõestatud meetod spetsiifilise elavhõbedamürgistuse hindamiseks. Seetõttu näib olevat põhjendatud ka vastupidine oletus, et elavhõbeda poolt inhibeeritud heemi süntees ajus võib suurendada amüloid- β valgu produktsiooni. Seda oletust elavhõbeda toime kohta heemi sünteesile ajus tuleb veel uurida. Kas elavhõbedaga kokkupuude põhjustab heemi profiili häirumist ajus AT korral?

Peale selle on porfüriini profiili puhul uriinis näidatud, et erinevad toksilised metallid ja teised toksilised ühendid pärssivad porfüriini rada erinevates kohtades, põhjustades erinevat porfüriini profiili uriinis. Elavhõbedamürgistus annab unikaalse profiili, mida tänapäeval ei ole leitud ühegi teise mürgi puhul. Hiljutine uuring hambaarstidel ja hambatehnikutel näitas, et 85%-l nendest isikutest on a) porfüriini profiil oluliselt erinev normaalsetel täiskasvanutel leitud profiilist ja (b) esineb madalatasemelise elavhõbedamürgistuse sümptomaatika [58–60]. Peale selle on 15%-l sellest 85%-st dramaatiliselt ebanormaalne profiil, mis vastab polümorfismile CPOX4 geenis [61]. Need andmed näitavad selgelt nii amalgaamist vabaneva elavhõbedaauru üldist toksilisust kui ka populatsiooni geneetilise alarühma suurenenud tundlikkust. Kuna teised on näidanud, et AT puhul on ajus üks heemi vorm oluliselt vähenenud ja teine samal ajal suurenenud [21], on tähtsaks küsimuseks, kuidas mõjutab elavhõbeda ekspositsioon inimese aju porfüriinide profiili? Hg tekitatud muutused aju porfüriinide profiilis võivad põhjustada teisi AT-le iseloomulikke biokeemilisi kõrvalekaldeid, mida see toksiline metall jälgendab. Jällegi võib see seostada AT-d ja autismi sama põhjusliku teguriga, kusjuures erinevus on ainult vanuses ekspositsiooni ajal. On teatatud, et autistlikel lastel on porfüriinide profiil uriinis selline, mis näitab elavhõbedamürgistust [61]. On tõepoolest vaja uuringuid, mis teeksid kindlaks, kas

AT-ga patsientidel ja autistidel on ühesugune porfüriinide profiil ning kas nende aju ensüümid on ühtemoodi kahjustatud.

6. Järeldused

Kaasaegne meditsiin ei ole olnud võimeline kindlaks tegema kõige tähtsamate neuroloogiliste haiguste, nagu AT (Alzheimeri tõbi), autism, ALS (amüotroofiline lateraalskleroos), SM (*sclerosis multiplex* ehk hulgiskleroos) ja Parkinsoni tõbi, etioloogiat. See võib olla tingitud soovimatusest tunnistada, et nende haiguste kõige tähtsamaks põhjustajaks võib olla iatrogenne elavhõbedamürgistus. Paljud publikatsioonid kinnitavad esialgset arvamust, et inimaju kokkupuutel elavhõbedaga pärsitakse kiiresti tiolrühmi sisaldavad ensüümid ja valgud, nagu tubuliin, kreatiini kinaas ja glutamiini süntetaas ning see mõjutab dramaatiliselt metabolismi ja aksonite struktuuri. Tubuliini lõhustamine põhjustab NFT-de moodustumist ja valgu tau hüperfosforüülimist. Sellele järgneb amüloid- β valgu suurenenud produktsioon ja see valk võib agregeerudes moodustada seniilnaaste. Need on AT puhul kolm kõige enam aktsepteeritud diagnostilist tunnust. See on kooskõlas AT kohta käiva elavhõbeda toksilise hüpoteesiga, et täheldatud NFT-d, hüperfosforüülitud valk tau, amüloidnaastud ja suurenenud oksüdatiivne stress on elavhõbeda neuronalse toksilisuse tagajärjedeks.

Kuid need tunnused ei ole AT tekkimise põhjuseks, vaid pigem toksikandi toimete tulemus aju biokeemilistele protsessidele. Kuigi võib olla ka teisi, on elavhõbe elemendina ja organiliste vormidena kõige enam kõikjal levinud keskkonnamürk, mis kahjustab aju ensüüme ja valke, mis sisaldavad väga reaktiivseid tiolrühmi, põhjustades kliinilisi sümptomeid ja tunnuseid, mis on iseloomulikud AT-le.

Peale selle on andmed elavhõbeda kõrvaltoimetest nukleotiidide seondumisomadustele ja kahe väga tähtsa aju nukleotiididega seonduva valgu ebanormaalse jaotumise kohta näidanud, et see on ebanormaalne ajus ka AT puhul, mis kinnitab esiteks seda, et elavhõbedat tuleb lugeda AT-ks nimetatavat haigust süvendavaks teguriks. Seda on kindlalt toetanud ka viimase aja leiud, kus elavhõbe indutseerib nanomolaarses kontsentratsioonis neuroblastoomirakke produtseerima amüloid- β valku ja suurendab mikrotuubulitega seotud valgu tau fosforüülimist, kusjuures mõlemad need biokeemilised protsessid on seotud AT-ga. Ka neuronikultuuris, mida on töödeldud Hg^{2+} -ga kontsentratsioonis 10^{-7} – 10^{-10} M, on täheldatud ebanormaalset tubuliini agregatsiooni, mille tulemuseks on selle jaotumine viisil, mida on täheldatud AT-ga patsientide ajus. Ka tubuliini eraldumine neurofibrillidest põhjustab NFT-de moodustumist, mis ei erine ajus AT puhul esinevatest ja mida kasutatakse selle haiguse diagnostilise tunnuseks [8]. Juba need faktid üksi näitavad, et elavhõbe on kindlalt AT-d süvendav, kui mitte põhjuslik tegur.

Elavhõbeda pidamine AT tekkimise põhjuslikuks või haigust süvendavaks teguriks on eriti põhjendatud siis, kui elavhõbe esineb koos teiste raskmetallidega, nagu tsink (Zn), kaadmium (Cd) ja plii (Pb). Sünergistlik toksilisus ei ole erand, vaid seda vaadeldakse kui üldist elavhõbeda kohta käivat reeglit [47]. See kummutab väite, et elavhõbeda sisaldus peaks olema AT puhul ajus oluliselt suurenenud, et seda võiks lugeda seda haigust põhjustavaks teguriks. Peale selle suurendab amalgaamplommidest pärit elavhõbeda reaktsioon periodontaalhaiguse ajal bakterite poolt produtseeritud toksiliste tiolidega üsnagi tõenäoliselt vabanenud elavhõbeda toksilisust. Inimesed on tõenäoliselt ainsad imetajad, kellel esinevad amalgaamplommid ja periodontaalhaigus.

Lühidalt, elavhõbeda organismile ohutu taseme määramine inimestel, kasutades loomkatsetest saadud andmeid, milles loomi ei eksponeeritud teiste raskmetallidele, ei ole teaduslikult õigustatud. Elavhõbe on inimesele palju toksilisem koosinemisel teiste raskmetallidega. Minu arvamus on selline, et üheks tähtsamaks vastamata küsimuseks elavhõbeda toksiliste toimete kohta on “kas elavhõbe kombinatsioonis teiste raskmetallidega põhjustab mürgistuse erinevaid kliinilisi sümptomeid?”

Peale selle jälgendab elavhõbe mitmeid biokeemilisi toimeid, mida on täheldatud ajukoes AT puhul, sealhulgas haiguse laialdaselt aktsepteeritud diagnostiliste tunnuste tekkimist. Samuti on ilmselge elavhõbeda sünergistlik toksilisus teiste raskmetallide, mikroobide poolt suuõõnes produtseeritud toksiinide ja teatud metallide kelaatijatega. Ka on teaduslikult tõestatud, et amalgaamid suurendavad üldist elavhõbeda hulka organismis ja on võimelised andma tsütotoksilisi lahuseid, mille omadused sarnanevad elavhõbedalahustele.

Seetõttu näib olevat vägagi põhjendatud hüpotees, et elavhõbe on AT varase alguse peamiseks soodustajaks.

Seda arvamust ei toeta kuidagi suured uuringuprogrammid USA-s ja Euroopas isegi pärast seda, kui 2004. aastal avaldati kriitiline analüüs amalgaamplommide kui toksilisuse allika kohta AT puhul [62]. Näiteks käsitleti ajakirjas Journal of Alzheimer's Disease 2006. aastal kahte probleemi, mis olid suunatud kahevalentsete metallide võimalikule seotusele AT-ga, kuid ei olnud ühtegi artiklit, mille pealkirjas või kokkuvõttes oleks mainitud elavhõbedat [63]. Elavhõbedat, mis on kõige raskemini ohjatatav, mille neurotoksilisus on kõikidest metallidest suurim ning mis asus vaid mõne tolli kaugusel ajast, ignoreeriti täielikult alumiiniumi kasuks, mis on tavaline kolmevalentne metall (Al^{3+}), samuti teiste kahevalentsete eluks vajalike metallide kasuks.

Viited

- [1] Khatoon S, Campbell SR, Haley BE, Slevin JT. Aberrant GTP β -tubulin interaction in Alzheimer's Disease. *Annals of Neurology* 1989;26:210-5.
- [2] David S, Shoemaker M, Haley B. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's Disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Molecular Brain Research* 1998;54:276-87.
- [3] Duhr EF, Pendergrass JC, Slevin JT, Haley B. HgEDTA complex inhibits GTP interactions with the E-Site of brain β -tubulin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1993 Oct.;122(2):273-88.
- [4] Haley BE. Development and utilization of 8-azidopurine nucleotide photoaffinity Probes. *Federation Proceedings* 1983;42:2831-6.
- [5] Pendergrass JC, Haley BE. Mercury-EDTA complex specifically blocks brain β -tubulin-GTP interactions: similarity to observations in Alzheimer's Disease. In: *Status Quo and Perspective of Amalgam and Other Dental Materials (International Symposium Proceedings)*. Friberg LT, Schrauzer GN. Georg Thieme Verlag, eds. Stuttgart-New York 1995:98-105.
- [6] Pendergrass JC, Haley BE. Inhibition of brain tubulin-guanosine 5'-triphosphate interactions by mercury: similarity to observations in Alzheimer's Diseased brain. In: *Metal Ions in Biological Systems V34. Mercury and Its Effects on Environment and Biology*, Chapter 16. Edited by H. Sigel and A. Sigel. Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Ave., N.Y., N.Y. 10016, 1996:461-78.
- [7] Pendergrass JC, Haley BE, Vimy MJ, Winfield SA, Lorscheider FL. Mercury vapor inhalation inhibits binding of GTP to tubulin in rat brain: similarity to a molecular lesion in Alzheimer's Disease brain. *Neurotoxicology* 1997;18(2):315-24.
- [8] Leong CCW, Syed NI, Lorscheider FL. Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity and formation of neurofibrillary tangles at nerve growth cones following *in-vitro* exposure to mercury. *NeuroRe-ports*2001;12(4):733-7.
- [9] Thompson CM, Markesbery WR, Ehmann WD, Mao YX, Vance DE. Regional brain trace-element studies in Alzheimer's disease. *NeuroToxicology* 1988 Spring;9(1):1-7.
- [10] Deibel MA, Ehmann WD, Markesbery WR. Copper, iron and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J. Neurol. Sci.* 1996;143:137-42.
- [11] Jayaram B, Haley B. Identification of peptides within the base binding domains of the GTP and ATP specific binding sites of tubulin. *J. Biol. Chem.* 1994;269(5):3233-42.
- [12] Olcott M, Haley B. Identification of two peptides from the ATP-binding domain of creatine kinase. *Biochemistry* 1994;33:11935-41.

- [13] Gunnerson DJ, Haley B. Detection of glutamine synthetase in the cerebro-spinal fluid of Alzheimer's diseased patients: a potential diagnostic biochemical marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992 Dec. 15;89(24):, 11949-53.
- [14] Butterfield DA, Hensley K, Cole P, Subramaniam R, Aksenov M, Ak-senova M, Bummer PM, Haley BE, Carney JM. Oxidatively-induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin labeled incorporation kinetics: relevance to Alzheimer's disease, *J. Neuro-chem.* 1997 Jun.;68(6):2451-7.
- [15] Tumani H, Shen GQ, Peter J, Bruck W. Glutamine synthetase in cerebro-spinal fluid, serum and brain: a diagnostic marker for Alzheimer Disease? *Arch. Neurol.* 1999;56:1241-6.
- [16] Takahashi M, Stanton E, Moreno JI, Jackowski G. Immunoassay for serum glutamine synthetase in serum: development, reference values, and preliminary study in dementias. *Clinical Chemistry* 2002;48(2):375-8.
- [17] Robinson S/R. Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicate a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. *Neurochemistry International* 2000;36:471-82.
- [18] Woods J, Martin MD, Naleway CA, Echeverria D. Urinary porphyrin profiles as a biomarker of mercury exposure: studies on dentists with occupational exposure to mercury vapor. *J. Toxicol. Environ. Health* 1993; 40:235-46.
- [19] Echeverria D, Woods JS, Heyer NJ, Rohlman DS, Farin FM, Bittner AC, Li T, Garabedian C. Chronic low-level mercury exposure, BDNF (brain derived neurotrophic factor) polymorphism, and associations with cognitive and motor function. *Neurotoxicol. Teratol.* 2005 Nov.-Dec.; 27(6):781-96.
- [20] Echeverria D, Woods JS, Heyer NJ, Rohlman D, Farin FM, Li T, Garabedian CE. The association between a genetic polymorphism of coproporphyrinogen oxidase, dental mercury exposure and neurobehavioral response in humans. *Neurotoxicol. Teratol.* 2006 Jan.-Feb.; 28(1):39-48.
- [21] Atamna H, Frey WH. A Role for heme in Alzheimer's disease: Heme binds amyloid β and has altered metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004;101(30):11153-8.
- [22] Chew CL, Soh G, Lee AS, Yeoh TS. Long-term dissolution of mercury from a non-mercury-releasing amalgam. *Clinical Preventive Dentistry* 1991 May-Jun.;13(3):5-7.
- [23] Wataha JC, Nakajima H, Hanks CT, Okabe T. Correlation of Cytotoxicity with Element Release from Mercury and Gallium-based Dental Alloys in vitro. *Dental Materials* 1994 Sept.;10(5):298-303.
- [24] Haley BE. Mercury toxicity: genetic susceptibility and synergistic effects. *Medical Veritas* 2005 Nov.;2(2):535-42.
- [25] Holmes AS, Blaxill MF, Haley B. Reduced levels of mercury in first baby haircuts of autistic children. *International J. of Toxicology*, 2003;22:1-9.

- [26] Bradstreet J, Geier DA, Kartzinell JJ, Adams JB, Geier MR. A case-control study of mercury burden in children with autistic spectrum disorders. *J. Am. Phys. Surg.* 2003;8(3):76-9.
- [27] Sokol DK, Chem D, Farlow MR, Dunn DW, Maloney B, Zimmer JA, Lahiri DK. High levels of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP) in children with severely autistic behavior and aggression. 2006; 21(6):444-9.
- [28] Guzzi G, Grandi M, Cattaneo C, Calza S, Minoia C, Ronchi A, Gatti A, Severi G. Dental amalgam and mercury levels in autopsy tissues: food for thought. *Am J Forensic Med Pathol* 2006 Mar.;27(1):42-5.
- [29] Engqvist SI. Amalgam Restorations-an important source of human exposure of mercury and silver. *Lakartidningen* 1992;15:1299-1301.
- [30] Drasch G, Aigner S, Roider G, Staiger F, Lipowsky G. Mercury in human colostrum and early breast milk. Its dependence on dental amalgam and other factors. *J. Trace Elements Med. Biol.* 1998;12(1); 23-7.
- [31] Luglie PF, Campus G, Chessa G, Spano G, Capobianco G, Fadda GM, Dessole S. Effect of amalgam fillings on the mercury concentration in human amniotic fluid. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2005;271(2): 138-4.
- [32] Lorscheider FL, Vimy MJ, Summers AO. Mercury exposure from silver tooth fillings: emerging evidence questions a traditional dental paradigm. *FASEB J.* 1995;9:504-8.
- [33] World Health Organization (WHO) report on Environmental Health Criteria 118, Inorganic Mercury, WHO, Geneva, 1991.
- [34] Kingman A, Albertini T, Brown LJ. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a U.S. military population. *J. of Dental Research* 1998;77(3):461-71.
- [35] Begerow J, Zander D, Freier I, Dunemann L. Long-term mercury excretion in urine after removal of amalgam fillings. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1994;66(3):209-12.
- [36] Hagele J, Mazerik JN, Gregory A, Kaufman B, Magalang U, Kuppusamy ML, Marsh CB, Kuppusamy P, Parinandi L. Mercury activates vascular endothelial cell phospholipase D through thiols and oxidative stress. *International J. Toxicology* 2007;26:57-69.
- [37] Frustaci A, Magnavita N, Chimenti C, Caldarulo M, Sabbioni E, Pietra R, Cellini C, Possati GF, Maseri A. Marked elevation of myocardial trace elements in idiopathic dilated cardiomyopathy compared with secondary dysfunction. *J. American College of Cardiology* 1999;33(6): 1578-83.
- [38] Saxe SR, Wekstein MW, Kryscio RJ, Henry RG, Connett CR, Snowdon, DA, Grant FT, Schmitt FA, Donegan SJ, Wekstein DR, Ehmann WD, Markesbery WR. Alzheimers' disease, dental amalgam and mercury. *JADA* 1999;130:191-9.

- [39] (a)Roses AD. Scientific American. Science and Medicine, 1995:16-15. (b)Roses AD. Apolipoprotein-E and Alzheimer's disease. The tip of the susceptibility iceberg. Annals of the N.Y. Academy of Science 1998; 855:738-43.
- [40] Rowland I, Davies M, Evans J. Tissue content of mercury in rats given methylmercury chloride orally: Influence of intestinal flora. Arch Environ Health 1980;35:155-60.
- [41] Hock C, Drasch G, Golombowski S, Muller-Spahn F, Willershausen-Zonnchen B, Schwarz P, Hock U, Growdon JH, Nitsch RM. Increased blood mercury levels in patients with Alzheimer's disease. J. Neural Transm 1998;105(1):59-68.
- [42] Devanand DP, Michaels-Marston KS, Liu X, Pelton GH, Padilla M, Marder K, Bell K, Stern Y, Mayeux R. Olfactory deficits in patients with mild cognitive impairment predict Alzheimer's disease at follow-up. Am. J. Psychiatry 2000;157(9):1399-1405.
- [43] Kovacs T, Cairns NJ, Lantos PL. Olfactory centres in Alzheimer's disease: olfactory bulb is involved in early Braak's stages. Neuroreport 2001; 12(2):285-8.
- [44] Gray AJ, Staples V, Murren K, Dahariwal A, Bentham P. Olfactory identification is impaired in clinic-based patients with vascular dementia and senile dementia of Alzheimer's type. Int. J. Geriatr. 2001 ;Psychiatry 16(5):513-7.
- [45] Vamnes *et al.* Blood mercury following DMPS administration to subjects with and without dental amalgam. Sci. Total Envir. 2004;308:63-71.
- [46] DeRouen TA, Martin MD, Leroux BG, Townes BD, Woods JS, Leitao J *et al.* Neurobehavioral effects of dental amalgam in children: a randomized clinical trial. JAMA 2006 Apr. 19;295(15): 1784-92.
- [47] Schubert J, Riley EJ, Tyler SA. Combined effects in toxicology - a rapid systemic testing procedure: cadmium, mercury and lead. J. of Toxicology and Environmental Health 1978;4:763-76.
- [48] Brouwer DA. Clinical chemistry of common Apoprotein-E isoforms. J. Chromatography, Biomed. Applications 1996;678(1):23-41.
- [49] Wojcik D, Godfrey M, Christie D, Haley B. Mercury toxicity presenting as chronic fatigue, memory impairment and depression: diagnosis, treatment, susceptibility, and outcomes in a New Zealand general practice setting (1994-2006). Neuroendocrinology Letters 2006;27(4):416-23.
- [50] Ulf Lindh *et al.* Neuroendocrinology Letters 2002;23(5/6):450-82.
- [51] Rampersad GC, Suck G, Sakac D, Fahim S, Foo A, Denomme GA, Langler RF, Branch DR. Chemical compounds that target thiol-disulfide groups on mononuclear phagocytes inhibit immune mediated phagocytosis of red blood cells. Transfusion 2005;45:384-93.

- [52] Nierenberg DW, Nordgren RE, Chang MB, Siegler W, Blayney MG, Hochberg F, Toribara TY, Cernichiari E, Clarkson T. Delayed cerebellar disease and death after accidental exposure to dimethyl mercury. *N. Engl. J. Med* 1998;338; 1672-5.
- [53] Olivieri G, Brack C, Muller-Spahn F, Stahelin HB, Herrmann M, Renard P, Brockhaus M, Hock C. Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases β -amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurochemistry* 2000 Jan.;74(1):231-6.
- [54] Westphal GA, Schnuch A, Schulz TG, Reich K, Aberer W, Brasch J, Koch P, Wessbecher R, Szliska C, Bauer A, Hallier E. Homozygous gene deletions of the glutathione S-transferases M1 and T1 are associated with thimerosal sensitization. *Int Arch Occup Environ Health* 2000;73:384-8.
- [55] James SJ, Slikker W 3rd, Melnyk S, New E, Pogribna M, Jernigan S. Thimerosal neurotoxicity is associated with glutathione depletion: protection with glutathione precursors. *Neurotoxicology* 2005;26:1-8.
- [56] James SJ, Cutler P, Melnyk S *et al.* Metabolic Biomarkers of Increased Oxidative Stress and Impaired Methylation capacity in children with au-tims. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;80:1611-17.
- [57] Waly M, Olteanu H, Banerjee R, Choi SW, Mason JB, Parker BS, Suku-mar S, Shim S, Sharma A, Benzecry JM, Power-Charnitsky VA, Deth RC. Activation of methionine synthase by insulin-like growth factor-1 and do-pamine: a target for neurodevelopmental toxins and thimerosal. *Mol Psychiatry* 2004;9:358-70.
- [58] Woods J, Martin MD, Naleway CA, Echeverria D. Urinary porphyrin profiles as a biomarker of mercury exposure: studies on dentists with occupational exposure to mercury vapor. *J. Toxicol. Environ. Health* 1993;40:235-46.
- [59] Echeverria D, Woods JS, Heyer NJ, Rohlman DS, Farin FM, Bittner AC, Li T, Garabedian C. Chronic low-level mercury exposure, BDNF (brain derived neurotrophic factor) polymorphism, and associations with cognitive and motor function. *Neurotoxicol. Teratol*, 2005 Nov.-Dec.;27(6):781-96.
- [60] Echeverria, D. Woods, JS, Heyer NJ, Rohlman D, Farin FM, Li T, Garabedian CE. The association between a genetic polymorphism of coproporphyrinogen oxidase, dental mercury exposure and neurobehavioral response in humans. *Neurotoxicol. Teratol.* 2006 Jan.-Feb.;28(1):39-48.
- [61] Nataf R, Skorupka C, Amet L, Lam A, Springbett A, Lathe R. Porphyrinuria in childhood autistic disorder: implications for environmental toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006 Jul. 15;214(2):99-108.
- [62] Mutter J, Naumann J, Sadaghiani C, Walach H, Drasch G. Amalgam studies: disregarding basic principles of mercury toxicity. *Int J Hyg Environ Health* 2004;207:391-7.
- [63] Adlard PA, Bush AI. Metals in Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 2006 Nov.; 10(2-3): 145-63.

