НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ОБЩЕСТВЕНО ЗДРАВЕ И АНАЛИЗИ

БИОМАРКЕРИ ЗА ИНДИВИДУАЛНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ ПРИ ПРОФЕСИОНАЛНА ЕКСПОЗИЦИЯ НА ОЛОВО

Христиан Костадинов Димбарев

ДИСЕРТАЦИЯ

За присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР“

Професионално направление 7.1. Медицина

Научна специалност „Токсикология“

Научен ръководител: проф. Цвета Петрова Георгиева, дм

Научен консултант: проф. д-р Таня Пенева Кунева, дм

София, 2023 г.

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

	Стр.
I ВЪВЕДЕНИЕ	**8**
II ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	**10**
1. Общи данни	10
1.1 Предистория и епидемиология на отравянето с олово	18
1.2 Олово и ALAD	20
2. Полиморфизмът ALAD-1/2 като модификатор на ефектите на оловото	21
3. Взаимодействия	22
3.1 Взаимодействия ген – заобикаляща среда	23
3.2 Взаимодействия ген – ген	24
4. Олово, епигенетични фактори и чревен микробиом	34
5. Избор на полиморфизми и методи за откриване	36
III ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	**41**
1. Цел	41
2. Задачи	41
IV МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	**42**
1. Обект на изследването	42
2. Методи	42
2.1 Клинико и биохимични изследвания	42
2.2 Молекулярно-генетични методи	44
2.3 Метод на анкетното проучване	49
2.4 Статистически методи за анализ	49
V РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	**51**
1. Дизайн на проучването	51
2. Подбор на популация експонирани на олово работещи в акумулаторното производство у нас и получаване на информирано съгласие за участие	51

3. Определяне на концентрацията и на олово в кръвта и екскрецията на 5-АЛК в урина 52
4. Определяне на разпределението на изследваната популация по генотип ALAD-2 и зависимост между нива на Pb в кръвта и хемоглобин (HGB), разпределени по генотип 54
5. Определяне на зависимост между нива на 5-АЛК в урина и брой левкоцити и еритроцити, разпределени по генотип и проследяване на зависимости между генотипа и индивидуалната чувствителност към олово 56
6. Определяне алелната честота и разпределението на отделните хаплотипове сред българска професионално експонирана на олово популация на базата на ALAD генен полиморфизъм (rs1800435C/G) и възможност за използване като прогнозен биомаркер за превенция на оловна интоксикация 58
7. Връзка между молекулярно-генетичния профил и начина на живот с цел разграничаване на силно чувствителна група работници от акумулаторната и рециклиращата индустрия в България, професионално изложени на олово 64
8. Обобщен анализ на ключови съпоставими данни, по отношение важни биомаркери касаещи оловната чувствителност 71
9. Предложение за здравно-промоционална стратегия за превенция на здравето на работното място 75
10. Предложение за допълнителни мерки за превенция на отравянията 79

VI ОБОБЩЕНИЕ 82

VII ИЗВОДИ 84

VIII ПРИНОСИ 86

IX ЛИТЕРАТУРА 87

X ПРИЛОЖЕНИЯ 107

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на проф. Цвета Георгиева и проф. Таня Кунева, както и на отдел „Приложна геномика и ГМО“ към НЦОЗА за неоценимата помощ при разработването на дисертацията. Благодаря на доц. Росица Георгиева за експертният прочит и конструктивните препоръки.

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

БАМИ	Българска асоциация на металургичната индустрия
СЗО	Световна здравна организация
ЕС	Европейски съюз
РКР	Реактивни кислородни радикали
CDC	Център за контрол на заболяванията
EPA	Американска агенция за опазване н околната среда
CNV	Вариация на броя на копията на ДНК
SNPs	Единични нуклеотидни полиморфизми
GSH	Глутатион в редуцирана форма
GSSG	Глутатион в окислена форма
ALAD	Дехидратаза на δ-амино-левулинова киселина
MT	Металотионеин
GST	Глутатион-S-трансфераза
VDR	Витамин-D рецептор
TF	Трансферин
ASAT	Аспартат аминотрансфераза
ALAT	Аланин аминотрансфераза
GGT	Гама-глутамил трансфераза
DMT	Транспортер на двувалентен метал
ALAS	Синтетаза на δ-аминолевулиновата киселина
miRNA	Микро РНК
3'UTR	Некодираща нуклеотидна последователност в зрялата иРНК
ATP7B	Мембранно-свързана мед-транспортираща АТФ-аза
RNA	Рибонуклеинова киселина
DMSA	Димеркаптосукцинова киселина
HFE	Хемохроматозен клас I протеин
IARC	Международна агенция за проучване на рака
AGT	Ангиотензин
HLA	Човешка левкоцитна антигенна система

GWAS	Изследване за асоцииране в целия геном
EWAS	Изследване за асоцииране в целия епигеном
RFLP	Рестриктазно смилане на геномна ДНК
ATSDR	Агенция за токсични субстанции и свързани с тях заболявания
ILA	Международна асоциация за оловото
ECHA	Европейска агенция по химикали
RAC	Комитет за оценка на риска
ACSH	Консултативен комитет по безопасност и здраве при работа
EUROBAT	Европейска асоциация на производителите на батерии
DALA	Делтааминолевулинова киселина
ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
РНК	Рибонуклеинова киселина
иРНК	Информационна РНК
ALA	Аминолевулинова киселина
CBC	Пълна кръвна картина
RBC	Брой на еритроцитите
WBC	Брой на белите кръвни клетки.
HCT	Хематокрит
Hb	Хемоглобин;robat
MCV	Големината на червените кръвни клетки
MCH	Средно количество хемоглобин в един еритроцит
MCHC	Концентрацията на хемоглобин в обем от еритроцити
RDW	Девиация на еритроцитите
PLT	Брой на тромбоцитите
MPV	Среден размер на тромбоцитите
PDW	Девиация на тромбоцитите
ПКК	Пълна кръвна картина
ДКК	Диференциална кръвна картина
Neu	Неутрофили
Ba	Базофили
Eo	Еозинофили

Mo	Моноцити
Ly	Лимфоцити
CHOL	Холестерол
TG	Триглицериди
ASAT	Аспартат аминотрансфераза
ALAT	Аланин аминотрансфера
GGT	Гамаглутамил трансфераза
PBS	Фосфатен буфер
КМБ	Кръвно-мозъчната бариера
СТМ	Служба по трудова медицина
КПЗ	Клиника по професионални болести
ТЕЛК	Трудово експертна лекарска комисия
НЕЛК	Национална експертна лекарска комисия

I ВЪВЕДЕНИЕ

Оловото е познато като токсичен елемент от хиляди години и остава постоянна заплаха за околната среда. Експозицията на олово може да доведе до значителни неблагоприятни последици за различни системи и органи. Широко проучени са токсичните ефекти на оловото върху нервната система, хемопоезата, бъбреците и репродуктивната система. След като оловото бе премахнато като бензинова добавка (тетраетил олово) през 1970 г., както и от приложението му в съдове за храни (например глеч за керамика, буркани и консервни кутии), интоксикациите с олово са намалели значително. Съществуват обаче други източници на олово и неговият неизвестен праг на субклинична токсичност продължават да бъдат проблем за общественото здраве. Оловото и неговите съединения имат много широка употреба в най-различни отрасли на производството и индустрията. Открива се в лакове, бои, батерии, пигменти, инсектициди, различни пластмасови и керамични изделия, медицинска апаратура, муниции, горива, специфични сплави използвани при заваряване. Дори днес съществуват много рискови фактори за отравяне с олово, най-често при професионална експозиция свързана с производство и преработка на акумулатори, метални тръби, кабели, сачми, бои, полимери, стабилизатори, оловно стъкло, оловни сплави, запояване, оловни покрития, производство и употреба на оловни оксиди и соли. Основните начини за попадането в организма на неорганично олово са инхалиране и поглъщане. При възрастни експозицията е обикновено инхалаторна в професионалната среда. При деца може да се наблюдава поглъщане на оловни бои в стари къщи. Също така, интоксикация може да се наблюдава при нелегална дестилация на алкохол, ако съдовете са калайдисвани (и съдържат олово).

По данни на Българската асоциация на металургичната индустрия (БАМИ) за периода 2015 - 2019 г., касаещи производството на първично и вторично олово, включително производство на акумулатори и батерии става ясно, че в България то се увеличава и запазва високо през годините (табл.1).

Таблица 1. Производството на първично и вторично олово, включително производство на акумулатори и батерии по данни на БАМИ

Производство на олово, тона

Продукт	2015	2016	2017	2018	2019	Разлика 2019/2018	
						+/-	%
Олово,блок-първично	**70 252**	**69 256**	**71 653**	**71 697**	**71 595**	**-102**	**99.9**
„КЦМ" АД	70 252	69 256	71 653	71 697	71 595	-102	99.9
Олово, вторично	**26 637**	**31 561**	**31 452**	**31 111**	**30 878**	**-233**	**99.3**
„Монбат Рисайкл." ЕАД	16 231	16 581	16 502	16 211	15 878	-333	97.9
„ЕЛБАТ"АД	10 406	14 980	14 950	14 900	15 000	100	100.7
Олово - общо	**96 889**	**100 817**	**103 105**	**102 808**	**102 473**	**-335**	**99.7**

Източник: Фирмени данни.

Редица изследвания на СЗО (64), установяват, че хронична експозиция на олово, например във въздуха, дори под гранични стойности за работното място, причинява отравяне с олово с по-висока честота, отколкото се очаква. Това предполага преразглеждане на данните и провеждане на нови проучвания с цел оценка на здравните ефекти при хронична експозиция на ниски нива.

През 2022 г. СЗО определи оловото като един от 10-те химичини вещества, предизвикващи голямо безпокойство за общественото здраве, които се нуждаят от действия от страна на държавите-членки за защита на здравето на работниците, децата и жените в репродуктивна възраст.

II ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.Общи данни

Тежките метали представляват повсеместни елементи в заобикалящата ни среда. Тяхното директно и индиректно влияние би могло да бъде причина за различни неразположения и увреждания в човешкото тяло (53). Загубата на костна плътност, увреждането на бъбреците, различни съдови нарушения, аномалии в развитието и индукция на ракови заболявания са някои от най – често срещаните здравословни проблеми, предизвикани от влиянието на тежки метали (6, 14, 23, 37, 140).

Оловото представлява силно токсичен метал, чието широко разпространение е причина за значителни замърсявания на околната среда и здравословни проблеми в световен мащаб. Оловото е светъл сребрист метал, леко синкав в суха атмосфера. Той започва да се окислява при контакт с въздуха като по този начин образува сложна смес от съединения в зависимост от дадените условия. Човешките дейности като минно дело, производство и изгаряне на изкопаеми горива са довели до натрупването на олово и неговите съединения в околната среда, включително въздуха, водата и почвата (1, 2, 3). Оловото се използва за производство на батерии, козметика, метални изделия като боеприпаси, тръби и др. (66, 110, 112, 113). То е силно токсично и следователно неговата употреба в различни продукти като бои, бензин и др. не е безопасна за човешкото здраве. Основните източници на експозиция на олово са бои на основата на олово, бензин, козметика, играчки, домашен прах, замърсени почви, промишлени емисии (89, 98, 99, 104, 105). Оловото се абсорбира в тялото както от респираторния, така и през гастроинтестиналния тракт (25, 27). Абсорбцията е правопропорционална на размера на частиците, това прави инхалирането на оловен прах най-сериозният проблем (72-75). Възможно е трансплацентарно преминаване и конгенитална експозиция с тежки последствия – спонтанен аборт, преждевременно раждане или ниско тегло при раждане. Това определя жените в детеродна възраст и бременните жени като популация в риск и налага специални мерки за недопускане на професионална експозиция на олово при тези групи жени.

Оловото е изключително токсичен тежък метал, който води до нарушаване на различни физиологични процеси в растенията и за разлика от други метали като цинк, мед и манган, не притежава никакви биологични функции. Растения с висока концентрация на олово ускоряват производството на реактивни кислородни радикали (РКР), причиняващи увреждане на липидната мембрана, което в крайна сметка води до деструктивни изменения в хлорофила и фотосинтетичните процеси и подтискане цялостния растеж на растението (110). Някои изследвания установяват, че оловото е в състояние да възпрепятства растежа на чаеното растение чрез намаляване на биомасата и понижаване на качеството на чая, като по този начин се променя и качеството на неговите компоненти (115). Дори при ниски концентрации на оловно третиране е установено, че се причинява огромна нестабилност в поглъщането на йони от растенията, което от своя страна води до значителни метаболитни промени във фотосинтетичния капацитет и в крайна сметка в силно инхибиране на растежа на растенията (115).

Риск от професионално отравяне с олово има при работници ангажирани в производство и преработка на акумулатори, тръби и кабели, сачми, бои, пластмаси, стабилизатори, оловно стъкло, в металургията при получаване на оловни сплави, запояване, гледжосване и декорация на керамични продукти с оловни съединения, оловни покрития, производство и употреба на оловни оксиди, соли и горива съдържащи тетраетилолово (4, 5, 43, 51, 62, 96).

При експозиция на олово неблагоприятните ефекти, свързани с биосинтезата на хемоглобина са предпоставка за намаляване преживяемостта на еритроцитите и развитие на анемия. Токсичното действие на метала се изразява в инхибиране на редица ензими, отговорни за биосинтеза на хема, респ. на хемоглобина. Количественото определяне на различни междинни метаболити в биологични среди се прилага за доказване проявата на ранни токсични ефекти при оловна експозиция, свързани със синтез на хема. Известно е, че оловото повишава активността на ензима синтетаза на δ-аминолевулиновата киселина (ALAS), в резултат на което се увеличава концентрацията на δ-аминолевулиновата киселина (DALA) в еритроцитите и в урината. Оловото инхибира дехидратазата на δ-аминолевулиновата киселина (ALAD) – ензимът катализиращ кондензационната реакция на две молекули δ-

аминолевулинова киселина до порфобилиноген. Оловото нарушава формирането на хеминовата молекула като инхибира ферохелатаза, чиято физиологична роля се изразява в инкорпориране на атом желязо в протопорфириновия пръстен на хема. Инхибирането на ферохелатазата води до натрупване на протопорфирини, поради което при оловна експозиция се установява намаляване на хемоглобина в кръвта (23, 63) и увеличение на копропорфирин в урина (EPA, 1986).

Оловният йон води до висока токсичност в живите клетки, обусловена от йонния механизъм и този на оксидативния стрес. Много изследователи докладват, че оксидативният стрес в живите клетки е причинен от дисбаланса между производството на свободни радикали и генерирането на антиоксиданти за детоксикация на реактивните междинни продукти или за поправяне на произтичащите от това щети. Антиоксидантите, като напр. глутатионът, присъстващ в клетката, я предпазва от свободни радикали като водороден пероксид H_2O_2. Под влиянието на оловото, обаче, се увеличава нивото на РКР, като поради тази причина нивото на антиоксиданти намалява. Тъй като глутатионът съществува както в редуцирано (GSH), така и в окислено (GSSG) състояние, редуцираната му форма дава редукционните си еквиваленти (H + + e-) от своите тиолови групи на цистеин в РКР, за да ги направи стабилни. В присъствието на ензима глутатион пероксидаза редуцираният глутатион лесно се свързва с друга молекула глутатион след отдаване на електрон и образуване на глутатион дисулфид (GSSG). Редуцираната форма (GSH) на глутатиона представлява 90% от неговото общо съдържание, а окислената форма (GSSG) е едва 10% при нормални условия. При условие на оксидативен стрес, концентрацията на GSSG надвишава концентрацията на GSH (154, 156, 158).

Друг биомаркер за оксидативния стрес е липидната пероксидация, тъй като свободните радикали събират електрони от липидните молекули, присъстващи вътре в клетъчната мембрана, което в крайна сметка причинява липидна пероксидация.

Йонният механизъм на токсичност на оловото се дължи главно на способността на оловните метални йони да заменят други двувалентни катиони като Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+} и едновалентни катиони като Na^{+}, което в крайна сметка нарушава биологичния метаболизъм на клетката. Йонният механизъм на токсичността на оловото причинява значителни промени в различни биологични процеси като клетъчна адхезия,

вътрешно- и междуклетъчно сигнализиране, нагъване на протеини, съзряване, апоптоза, йонен транспорт, ензимна регулация и освобождаване на невротрансмитери. Оловото може да замести калция дори в пикомоларна концентрация, засягаща протеин киназа С, която регулира нервната възбуда и паметта (115).

Отравянето с олово известно като сатурнизъм, се счита за класическо заболяване и признаците наблюдавани при деца и възрастни, са свързани главно с централната нервна система и стомашно-чревния тракт. Ранни симптоми на отравяне с олово са апатия или раздразнителност, физическа астения, анорексия, гадене, констипация, периодична абдоминална болка, миалгия. Характерна е изразена анемия с ретикулоцитоза и базофилен пунктат при натривка от периферна кръв, които са едни от хематологичните усложнения на сатурнизма. Могат също така да се наблюдават и специфични промени по венците, както и оловни депозити на дългите кости при деца, които могат да се наблюдават на рентгенография. В случай на остра интоксикация, настъпват тежки патологии на гастроинтестиналния тракт и невротоксичност – атаксия, мускулна слабост, конвулсии, ступор и кома. Повишената уринна екскреция на олово е признак за голяма и сериозна експозиция, независимо от клиничната картина на пациента.

Отравяне с олово може да се получи и от неочаквани източници, като питейната вода (31, 32). Ако водопроводните тръби са направени от олово и неговите съединения, това може да доведе до замърсяване на самата вода. Според Агенцията за опазване на околната среда (EPA) на САЩ, оловото се счита за вероятен канцерогенен елемент, съгласно класификацията на IARC, оказващ силно влияние върху отделните части на човешкото тяло. Разпределението на оловото в организма първоначално зависи от притока на кръв в тъканите и почти 95% от този тежък метал се отлага под формата на неразтворим фосфат в скелетните кости (95, 138).

Експозцията на олово, може да бъде остра или хронична. Острата експозиция може да причини загуба на апетит, главоболие, хипертония, коремна болка, бъбречна дисфункция, умора, безсъние, артрит, халюцинации и световъртеж (158). Острата експозиция се среща главно на работното място и в някои производствени отрасли, които използват олово. Хроничното излагане на олово може да доведе до умствена изостаналост, вродени дефекти, психози, аутизъм, алергии, дислексия, загуба на тегло,

хиперактивност, парализа, мускулна слабост, увреждане на мозъка, увреждане на бъбреците и дори смърт (115, 164).

През 2017 год. Европейският съюз (ЕС) заема трето място в световното производство на олово с дял от 16 % и прираст от 2.7% спрямо предходната година. Най-голям производител в ЕС традиционно е Германия с относителен дял 19.6 % и в сравнение с 2016 год. производството нараства с 4.4%. Великобритания заема втора позиция със 17.6 %, Италия има дял от 10.4 % . Произведеното в България общо олово през 2017 год. представлява 0.91 % от световното и 5.72 % от това на ЕС при 0.905 % и 5.75 % за 2016 год. По обем на произведеното олово България е на седмо място от страните-производители в ЕС (на 6-то през 2018 г.) (115).

Оловото оказва вредно въздействие върху почти всички системи на човешкото тяло. Въпреки че молекулярните механизми на токсичността на оловото все още се изследват, основният деструктивен ефект върху човешкото здраве се оказва оксидативния стрес. Според Центъра за контрол на заболяванията (CDC) в САЩ, нивото на оловото в кръвта 5 μg/dl показва висок риск за възрастни. Неотдавна Световната здравна организация предложи да няма безопасно ниво на олово. Податливостта на индивида към вредните ефекти на оловото зависи и от генетичните вариации, характеризиращи се с генетични полиморфизми. В допълнение, епигенетичната регулация също представлява интерес за научни изследвания в областта на изучаване токсичността на олово (114).

Генетичните вариации биха могли да бъдат разглеждани като ендогенни фактори, влияещи върху предразположеността и/или устойчивостта на индивидите към токсичността, свързана с експозицията на тежки метали (119-122). Точният механизъм на влияние на такива фактори по отношение на реакцията на организма към токсиканти, както и техните потенциални вредни въздействия, трябва да се разглеждат като действителни фактори на чувствителност, които е необходимо да бъдат проучени по-добре. Досега в някои експерименти са изследвани вариации в различни гени, които директно или индиректно участват в метаболизма на тежки метали, в това число кадмий и олово (60, 93, 103, 118, 129).

Напоследък генетичните фактори се считат за нови и важни участници в задържането и метаболизма на тежки метали в организма (86). Доказано е, че тези

вътрешни фактори играят пряка/непряка роля в метаболизма, екскрецията, адсорбцията и разпространението на тежки метали. Следователно те могат да окажат влияние върху основните реакции на организма към тежки метали (128). Това може да се докаже от някои експерименти, при които се установява, че генетична вариация 5A/G на металотионеин 2A гена е свързана освен с нивата на желязо в тялото, също така и с тези на кадмий и олово (11, 52). Подобна асоциация се наблюдава и при други експерименти върху близнаци, където е идентифицирана силна връзка между генетичните елементи и измерените концентрации на кадмий в организма (115).

Единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) в различни гени са свързани с риска от оловно отравяне. Тези гени включват дехидратаза на δ-амино-левулинова киселa (ALAD), металотионеин (MT), глутатион-S-трансфераза (GST), витамин-D рецептор (VDR), трансферин (TF), транспортер на двувалентен метал (DMT) и др. (8, 12, 13)

Скорошно корейско проучване съобщава за отрицателна връзка между костната минерална плътност и нивата на олово в кръвта сред пушачите. Техните изследвания показват вероятната взаимовръзка между вътреклетъчните пътища на ангиогенезата и сигнализирането на ядрен хормон и излагането на олово и генетичните вариации, особено при индивиди с намалена костна минерална плътност (15, 51, 144).

Епигенетичните изследвания в областта на токсичността на олово са по-нови области на изследване. Епигенетичните промени, които се характеризират с изменения в метилирането, хистонната модификация или miRNA регулацията са потенциално свързани с механизмите, отговорни за отравяне с олово. Сред тези епигенетични модификации, най-изучено е метилиране на ДНК. Въпреки че малко in vitro проучвания са установили потенциалната роля на хистонната модификация за модулиране на токсичността на олово, нито едно изследване при хора не е успяло да оцени същото. По този начин анализа на хистоновите модификации поставя нова област в изследванията на токсичността на олово. MiRNA сигнатурите са придобили значение като възможен диагностичен или терапевтичен биомаркер при различни заболявания. Част от докладите предполагат възможна промяна на профила на miRNA при индивиди, които са изложени на професионален контакт с олово, на базата на сравнение със здрави индивиди, които не са изложени на подобна експозиция.

Проучване, проведено сред китайски професионално експонирани работници, предлага miR-520c-3p, miR-211, miR-148a и miR-572 да бъдат потенциални биомаркери за чувствителност към олово (85).

Последните проучвания са изследвали потенциалната връзка на полиморфен вариант в miRNA таргетните области на различни гени, които могат да повлияят miRNA свързването, като по този начин нарушават регулацията на генния процес и допринасят за чувствителността към олово. Тези проучвания предлагат холистичен подход към дешифрирането на епигенетичния механизъм, имащи за цел изясняване на генетичните асоциации, които са били установени. Изследване в китайско население оценява асоциацията на полиморфизми, разположени в 3'-нетранслирани области (3'-UTR) на ALAD гена с риск от токсичност на олово и по-нататъшния им потенциал да променят експресията на ALAD чрез дисрегулация на miRNA. Резултатите от тяхното проучване показват, че rs818708 (T>C) вариант, разположен в 3'-UTR на ALAD гена, е свързан с риск от отравяне с олово сред професионално експонирани лица (7, 15, 60, 92, 162).

В друго китайско проучване се установява, че C алелът на rs7079 (AC), генетичен вариант, разположен в 3'-UTR на гена за ангиотензин (AGT), е пряко свързан с риска от оловно отравяне. Алел A на този полиморфизъм може да промени свързването на miR-31-5p и miR-584-5p към 3'-UTR на AGT, което води до повишена експресия на гена, като по този начин намалява риска от отравяне с олово (18, 132).

Тези проучвания, в които се съчетават генетичните вариации и регулацията на miRNA, проправят пътя за нови бъдещи изследвания в тази област. Основните забележки към тези проучвания са малкият размер на извадката и в някои случаи неправилния дизайн на изследването. Друг проблем е липсата на оценка на специфичното изменение на дозата. Бъдещите проучвания, планирани в по-големи групи от извадки и по-широки етноси, ще осигурят по-добра представа за основните механизми. Идентифицирането на генетичните варианти, свързани с промяната в епигенетичната регулация, може окончателно да допринесе за откриване на нови възможности за персонализирана диагностика и терапия (22, 24, 29).

Генът ALAD (хромозома 9q34) кодира ензима дехидратаза на δ - аминолевулиновата киселина (ALAD) (E.C. 4.2.1.24) (15, 151). Ензимът ALAD

(дехидратазата на δ-аминолевулиновата киселина) катализира втория етап на синтез на хема и е полиморфен. Полиморфизмът ALAD G177C има два алела, ALAD-1 и ALAD-2, и това е свързано с предразположеност към оловна токсичност (15, 50). Генотипните честоти се различават по географско разпределение и на популационно ниво. По-редкият алел ALAD-2 е свързан с високи нива на олово в кръвта и се смята, че повишава риска от оловна токсичност, като кодира протеин, който свързва повече олово от ALAD-1 протеина.

ALAD се експресира във всички тъкани, но най-високите нива на експресия се намират в еритроцитите и черния дроб (123, 146, 154).

Новите молекулярни технологии разширяват възможностите за скрининг, както на индивидуалния генетичен рисков фактор за чувствителност към вредностите на работната среда, така и на късно проявените наследствени болести. Откриването на лица с висока индивидуална чувствителност ще позволи те да бъдат предпазени от евентуални здравни проблеми, в резултат от експозиция на работното място. Полиморфизмите могат да бъдат маркер за чувствителност и голям брой гени и техни варианти са вече установени.

Много гени са с ключови функции и промяната на тези функции в резултат на полиморфизъм, може да повлияе върху чувствителността при развитие на дадено заболяване (100). Може би най-големия възможен принос на биомаркерите в аспекта на оценка и управление на рисковете ще бъде включването на биомаркери за индивидуална чувствителност.

1.1 Предистория и епидемиология на отравянето с олово

Пребиваването в сгради, построени преди 1950 г., се счита за рисков фактор поради наличието на многобройни елементи съдържащи олово. Старите тръби с оловна спойка могат да замърсят водоснабдяването. Широкото използване на оловните бои по онова време е все още известен източник на олово в тези сгради (111). Освен това за живеещите близо и до индустриални съоръжения, отделящи олово, това може да се окаже сериозен източник на кумулативна експозиция на олово чрез въздуха, водата и почвата.

Професионалното излагане на олово е най-често срещано при оловни топилни и съоръжения за производство на акумулаторни батерии, както и в проекти за обновяване на жилища, в които работниците вдишват и поемат замърсени с олово изпарения и прах от оловна боя. Децата са по-податливи на оловна интоксикация от възрастните поради поставяне на предмети в устата, повишената чревна абсорбция и по-учестеното дишане (89, 167). Боята на оловна основа остава основният източник на отравяне с висока доза олово при децата. Лошо хранене, особено недостиг на калций и желязо е вероятно важен рисков фактор за отравяне при децата (95).

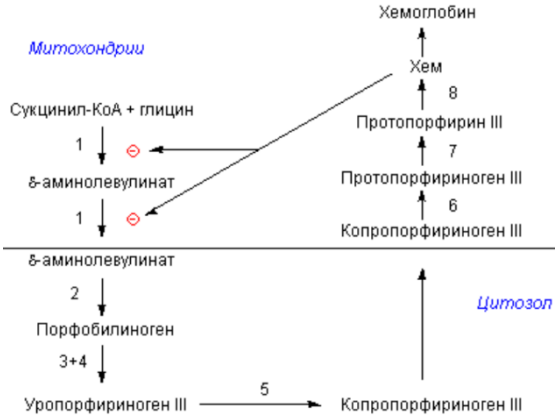
Нивото на оловото в кръвта (μg/dl) е биологичният маркер, най-често използван от здравните специалисти като показател за оловна експозиция (110). Две аналитични техники, анодна капеща волтаметрия и атомно-абсорбционна спектроскопия измерват нивото на олово в кръвта и имат граници на чувствителност по-малки от 1 μg/dl (114). В допълнение към нивото на оловото в кръвта, други биомаркери за експозиция за олово включват свободни порфирини в еритроцити и цинк протопорфирин; и двата са предшественици на хема, чиито нива се повишават при умерена до висока експозиция на олово. Въпреки това, свободният еритроцитен протопорфирин и цинковият протопорфирин не са нито достатъчно чувствителни, нито достатъчно специфични, за да бъдат използвани като първични индикатори за излагане на олово (103, 143). Нивата на олово в плазмата, урината, костите и зъбите (оловен дентин) се използват по-рядко за измервания на експозицията. Обикновено 90% от оловното съдържание се намира в скелета (143). Свързването на оловото с костта се дължи на подобната му валентност с калция. Измервания на олово в трабекуларна или спонгиозна кост (например патела),

в която оловото има сравнително кратък полуживот и олово в кортикална кост (например тибия), която представлява място за дългосрочно съхранение на олово се използва за оценка на разпределението на олово в костите и общо в организма (93, 143). Надеждни, неинвазивни техники като рентгенова флуоресценция са разработени за измерване на нивата на олово в костите. Това е важно, тъй като оловото в костите може да се излъчва във времето и това да се превърне в дългосрочен източник на олово преминаващо в кръвта (93). Хелатообразуващи агенти като димеркаптосукцинова киселина (DMSA) са използвани за терапевтично извличане на олово от тъканите (60). Доказано е, че хелатиращото олово корелира добре с оловото от трабекуларна кост (129).

Субклиничната оловна токсичност остава проблем и за двете групи - възрастни и деца (20-23). Концентрациите на олово в кръвта от 10μg/dl при деца са свързани с когнитивен дефицит, агресивно поведение и увреда на слуха (11, 12, 16, 52, 115). Обезпокоително, фактите показват, че няма доказан праг за неблагоприятните ефекти от експозицията на олово върху нервната система (86, 132).

1.2 Олово и ALAD

Един от водещите неблагоприятни ефекти на оловото е хемотоксичността и по-специално инхибиране на синтеза на хема. Оловото инхибира три ензима в пътя на биосинтезата на хема (фиг. 1) - ALAD, копропорфириноген оксидаза и ферохелатаза, но ефектите върху ALAD са най-изразени (77, 165). Оловото възпрепятства ALAD стехиометрично (39, 125) и степента на инхибиране на ALAD в еритроцитите се използва за клинично измерване степента на отравяне с олово. На молекулярно ниво оловото измества цинков йон на мястото за свързване на метала, без да засяга активния център (149), което води до инхибиране чрез промяна в четвъртичната структура на ензима. В резултат на инхибиране на ALAD става натрупване на аминолевулинова киселина, което може да се открие в плазмата и урината при нива на олово в кръвта дори под 10 μg/dl. Аминолевулиновата киселина наподобява γ-аминомаслена киселина и може да стимулира рецепторите на γ -аминомаслена киселина в нервната система; това се смята за един от основните механизми на индуцираната от олово невротоксичност (29, 109, 149).



Номер на ензима	Име на ензима	Локализация
Ензим 1	ALAS (АЛА синтаза)	митохондрии
Ензим 2	ALAD (АЛА дехидратаза)	цитоплазма
Ензим 3	уропорфириноген I синтаза (порфобилиноген дезаминаза)	цитоплазма
Ензим 4	уропорфириноген III косинтаза	цитоплазма
Ензим 5	уропорфириноген декарбоксилаза	цитоплазма
Ензим 6	копропорфириноген оксидаза	митохондрии
Ензим 7	протопорфириноген оксидаза	митохондрии
Ензим 8	ферохелатаза (хем синтаза)	митохондрии

Фигура 1. Биосинтеза на хем и ензими необходими за синтеза на хем

2. Полиморфизмът ALAD-1/2 като модификатор на ефектите на оловото

Първоначалните проучвания на полиморфизма на ALAD и отравянето с олово, се фокусират основно в разликите в нивата на олово в кръвта според генотипа, при популации с относително високи нива на експозиция на олово в домашна или работна среда. Ziemsen и съавтори (164) са първите, които описват различия в нивата на олово според генотипа. Те откриват, че изложени на олово работници (n =202) с ALAD-2 генотип имат по-високи нива на олово в кръвта, отколкото тези, които са ALAD-1 хомозиготи (44 µg/dl спрямо 38 µg/dl).

Хипотезите, генерирани в подкрепа на тези резултати, се основават на заряда на изоензима ALAD-2 (127, 134, 135, 153, 154, 155). Тъй като ALAD-2 кодира по-електронегативен ензим, се смята, че ALAD-2 протеинът е способен да свърже позитивно заредения оловен йон по-здраво, отколкото протеина ALAD-1. Така носителите на алела ALAD-2, които са експонирани на олово, могат да го запазят по-дълго в кръвта и тъканите, което увеличава вероятността от нежелан ефект, дължащ се на инхибиране на ензима ALAD и последващо натрупване на аминолевулинова киселина, а може би и поради самото олово, което директно предизвиква окислително увреждане и промяна в структурата на клетъчните компоненти (93, 152). От тези първоначални изследвания може да се заключи, че кинетиката на оловото в кръвта се модифицира от ALAD генотипа на индивида, въпреки че може би това е валидно само при относително високи нива на експозиция. Тези изследвания също така предполагат, че генотипът ALAD-2 е "рисков генотип" при високи нива на оловна експозиция.

3. Взаимодействия

В допълнение към ALAD генотипа, други фактори, които трябва да бъдат взети предвид при определяне на цялостната чувствителност към оловна интоксикация, включват вещества свързани с хранителния статус. Доказано е, че приема предимно на калций и желязо води до подтискане на ензима ALAD. Взаимодействието между тези вещества и ALAD генотипа може да е важно при отчитане на здравните ефекти от въздействие на оловото. Освен това гените, кодиращи витамин D рецептора (VDR) и хемохроматозния клас I протеин (HFE) от главния комплекс на тъканна съвместимост (HLA), са също полиморфни и напоследък се свързват с предразположеността към оловно отравяне. По този начин взаимодействието ген - заобикаляща среда и ген - ген може да доведе до по-изразени ефекти и заслужава допълнително проучване.

3.1 Взаимодействия ген – заобикаляща среда

Въпреки, че няма проучвания, които да изследват конкретно взаимодействията на ALAD с алкохол или активност на ALAD при тютюнопушене, съществуват данни, че ALAD ензимът се инхибира от алкохола и тютюнопушенето (45).

Установено е, че калциевият статус влияе върху абсорбцията и ефектите на оловото. Оловото се свързва с калциево-свързващите протеини и може да се конкурира директно за абсорбция в червата. Mahaffey и съавтори (94) доказват, че нивата на олово в кръвта са по-ниски при деца с по-висок прием на калций. Освен това, няколко проучвания върху експериментални животни ясно показаха, че приемът на калций намалява абсорбцията на олово и че абсорбцията на олово е по-висока при животните с недостиг на калций, отколкото при нормалните животни. Проучвания също така показват, че хората поемат повече олово, когато гладуват, отколкото когато не гладуват (25); следователно, приемането на храна като цяло също е важен фактор.

3.2 Взаимодействия ген - ген

Ефектите на калция върху приема и абсорбцията на олово се медиират чрез калций-свързващи протеини, които от своя страна се медиират чрез кръвната форма на витамин D, калцитриол. Калцитриолът се свързва с рецептора на витамин D и поради това генетичните вариации на витамин D рецептора също са важни за цялостния метаболитен път.

Подобно на калциевия статус, дефицитът на желязо също увеличава абсорбцията и токсичните ефекти на оловото (97). Тук причината е повишеното ниво на феритин, който представлява желязо транспортен протеин, директно свързващ оловото. Нивата на феритин се повишават при лица с желязо-дефицитна анемия, което ги прави с повишена чувствителност към оловна интоксикация.

В научната литература липсва достатъчно информация за това кои генетични фактори оказват влияние върху метаболизма и токсичните ефекти при професионална експозиция на тежки метали като олово. Настоящата работа има за цел да предостави информация за въздействието на гените и по-специално на различни полиморфни варианти по отношение на натрупването на олово и метаболизма му в организма и потенциалът им да предизвикат токсични ефекти.

Информацията относно взаимодействието между гените и околната среда е изключително важна, защото може да обясни разликите в чувствителността на индивидите и популациите към експозиция на тежки метали, заедно с други фактори, модифициращи ефекта, напр. пол, възраст, тютюнопушене и начин на хранене.

Взаимодействията между гените и околната среда по отношение на токсикокинетиката и токсикодинамиката на тежките метали могат да имат значение на различни нива. По този начин те могат да призовават за внимание от страна на системата на здравеопазване, за да се идентифицират субектите с особена уязвимост и да се предприемат превантивни и профилактични действия.

Изследването на генетичните вариации и техните взаимодействия с факторите на околната среда могат да предоставят допълнителна възможност за изясняване на индивидуалната чувствителност към олово. Днес е добре известно, че генетичните фактори представляват част от по-голям комплекс в дефинирането на чувствителни

към тежки метали индивиди. Такива междуиндивидуални генетични различия заедно с други фактори на околната среда могат да оформят уникален фенотип и следователно отличителен отговор на индивидите към срещащи се в заобикалящата ги среда токсини. Следователно, идентифициране на варианти в гени, свързани с механизма на токсичност към олово, както и техните взаимодействия с други фактори на околната среда ще осигурят важни данни не само за индивидуалните различия и идентификация на чувствителни групи индивиди, но също така и за разработване на нови превантивни или/и терапевтични подходи.

В настоящата дисертационна работа се обсъждат клинични и молекулярно – генетични подходи за отдиференциране на високочувствителни на експозиция на олово група от индивиди. Изследването на генетични варианти в различни гени, които са директно или индиректно свързани с метаболизма или токсичните ефекти от въздействието на олово би допринесло за подобряване на профилактиката при канцерогенна експозиция. Въпреки това, все още няма хармонизация между получените данни от проведените към настоящия етап проучвания, които изследват различни полиморфни варианти и техните асоциации с основните пътища на метаболизъм и токсичността към олово.

Основните ограничения на проведените експерименти са малкият размер на изследваните групи, в допълнение към игнорирането на алелните различия между популациите. Следователно, по-големият размер на изследваната извадка, обхваща индивиди с високи, средни и ниски нива на експозиция на проследявания тежък метал, позовавайки се на генетичните различия между отделните популации, а също така и отчитането на начин на живот и свързаните фактори като тютюнопушене, хранителни навици и т.н. ще допринесат за постигне на стабилен и надежден резултат в областта на токсикологията на тежките метали като олово. Като цяло, всички тези данни показват интерактивната роля както на екологичните, така и на генетичните фактори при определяне на нивата на чувствителност, а също така и определяне на групите с висок риск, индуциран от токсичност към тежки метали.

В литературата в последно време се съобщава за комбинираното въздействие на олово и кадмий, които имат синергичен адитивен ефект, при който в комбинация двата тежки метала имат кумулативна токсичност по-голяма от токсичността на всеки един

метал поотделно. Кадмият е металът на 20-ти век. Кадмият подобно на оловото има много приложения, напр. в батерии, пигменти, пластмаси и метални покрития и се използва широко в галваничното покритие (111). Кадмият и неговите съединения са класифицирани като канцерогени от Група 1 за хора от Международната агенция за изследване на рака (93).

Кадмият е седмият най-токсичен тежък метал според системата ATSDR. След като този метал се абсорбира от човешкия организъм, той се натрупва в тялото през целия живот. Този метал е използван за първи път през Първата световна война като заместител на калай и във багрилната индустрия като пигмент. Днес, той се използва и в акумулаторни батерии, за производство на специални сплави, като присъства също така и в цигарения дим. Кадмий се използва основно в алкалните батерии като електроден компонент, а 1/3 от общото му количество се включва в мазилки, пигменти, покрития и като пластмасов стабилизатор.

Хората могат да бъдат изложени на този метал предимно чрез вдишване и поглъщане, като впоследствие това води до остри и хронични интоксикации. Намиращият се в околната среда кадмий ще остане в почвите и утайките в продължение на няколко десетилетия. Растенията постепенно поемат този метал, който се натрупва в тях и се концентрира по протежение на хранителната верига, достигайки в крайна сметка човешкото тяло. В САЩ повече от 500 000 работници се излагат на токсичен кадмий всяка година според Агенцията за регистрация на токсични вещества и болести (103, 143).

Кадмият се открива предимно в плодовете и зеленчуците поради високата степен на усвояването му в почвата (60). Кадмият подобно на оловото е силно токсичен тежък метал, който е добре познат с неблагоприятното си влияние върху ензимните системи на клетките, оксидативния стрес и индуцирането на хранителен дефицит в растенията (129). Механизмът на токсичността на кадмий все още не е изяснен добре, но неговите ефекти върху клетките са добре известни (118).

Концентрацията на кадмий нараства 3000 пъти, когато се свързва с богат на цистеин протеин, като металотионеина. В черния дроб комплексът цистеин-металотионеин причинява хепатотоксичност и след това циркулира до бъбреците и се натрупва в бъбречната тъкан, причинявайки нефротоксичност. Кадмият има

способността да се свързва с цистеинови, глутаматни, хистидинови и аспартатни лиганди и може да доведе до дефицит на желязо (85). Кадмият и цинкът имат едни и същи окислени състояния и следователно кадмият може да замества цинка, присъстващ в металотионеин, като по този начин го възпрепятства да действа като акцептор на свободни радикали в клетката (85).

Кадмият е силно токсичен за бъбреците и се натрупва в проксималните тубулни клетки в по-високи концентрации. Металът може да причини минерализация на костите или чрез увреждане на костите, или чрез бъбречна дисфункция. Проучванията върху хора и животни показват, че остеопорозата (увреждане на скелета) е критичен ефект от експозицията на кадмий, както и нарушения в калциевия метаболизъм, образуване на бъбречни камъни и хиперкалциурия.

Вдишването на по-високи нива на кадмий може да причини тежки увреждания на белите дробове. Ако кадмият се погълне в по-големи количества, той може да доведе до дразнене на стомаха и да доведе до повръщане и диария. При продължителна експозиция на по-ниски концентрации от този метал, той може да се отдели в бъбреците и впоследствие да доведе до бъбречни заболявания, крехки кости и увреждане на белите дробове (103).

Кадмият и неговите съединения имат много по-добра водоразтворимост в сравнение с другите метали. Тяхната биодостъпност е много висока и следователно има тенденция да се биоакумулира. Продължителната експозиция на кадмий може да доведе до морфопатологични промени в бъбреците.

Идентифицирането, грижите и информирането на уязвимите хора, като работници в акумулаторни и батерийни производства, мини или жителите на замърсени райони, също могат да бъдат полезни за намаляване на поглъщането на тежки метали и съпътстващите ги клинични ефекти. Трябва да добавим, че тежките метали винаги са комбинирани макар и в различни концентрации и дори да преобладава един от тях, при експозиция винаги има макар и малки количества от някои тежки метали като желязо (Fe), цинк (Zn) и мед (Cu), които са от съществено значение за ензимните дейности и в комбинация с преобладаващите тежки метали като олово (Pb) или кадмий (Cd), повишават токсичността за хората (табл.2) (11). Причината за това е, че всички тези метали са способни да преминат през кръвно-

мозъчната бариера (КМБ), да предизвикат нарушения в централната нервна система, да повлияят различни йонни канали, да се конкурират с ензимните кофактори и накрая да предизвикат оксидативен стрес в тялото на човек (табл.3) (44, 46, 52, 106). Въпреки това се установява, че количествата на тежки метали в човешкия организъм са в пряка зависимост от пола, възрастта, диетата, начина на живот, заетостта и нивото на експозиция (115-117)

Табл. 2. Групи елементи според степента им на вредно въздействие

Група	**Елемент**
Първа група	Hg, Cd, Pb, As, Zn, Ti
Втора група	Co, Ni, Mo, Cu, Cr
Трета Група	Ba, V, Mn, Sr, Al

Табл. 3. Източници на замърсяване с олово и кадмий и влиянието им върху човешкия организъм

Тежък метал	Източници на замърсяване	Вредни въздействия върху човешкото тяло
Олово	козметика, пластмаси, батерии, бензин, инсектициди, грънчарски глазури, боя, калайдисани съдове, води, храни, въздух.	Коремни болки, надбъбречна недостатъчност, анемия, артрит, атеросклероза, гръбначни проблеми, слепота, рак, запек, конвулсии, глухота, депресия, диабет, дислексия, епилепсия, умора, подагра, нарушена гликогенна обмяна, халюцинации, импотентност, безплодие, възпаление, бъбречна дисфункция, намаляват либидото, мигренозно главоболие, множествена склероза, психоза и гниене на зъбите.
Кадмий	цигари, тютюн , марихуана, преработени и рафинирани храни, големи риби, ракообразни, течаща вода, ауспуси на автомобили, никелирани контейнери, поцинковани тръби, замърсяването на въздуха, каучук, моторни масла, пестициди, фунгициди, поливинил пластмаси.	хипертония, артрит, диабет, анемия, атеросклероза, нарушена костна система, рак, сърдечно-съдови заболявания, цироза, намалена плодовитост, хипогликемия, главоболие, остеопороза, бъбречни заболявания, шизофрения, инсулт и хроничната умора, загуба на коса, отоци, камъни в бъбреците и импотентност. Кадмий, който замества цинк в артериите, причинява възпаление и втвърдяване на артериите.

Проблемът с тежките метали е световен и все още нерешен. Показателно е, че още през 2012 г. Центърът за контрол и превенция на заболяванията (CDC), САЩ, снижи двойно граничната стойност за олово в кръв от 10 μg/dl на 5 μg/dl при експозиция от заобикалящата среда. От друга страна, през 2017 г. Международната

асоциация за оловото (ILA) и Европейската асоциация на производителите на батерии (EUROBAT) се обръщат към ГД „Здраве и безопасност на храните“ (SANTE) към Европейска агенция за безопасност и здраве при работа на Европейската комисия с искане ограниченията по отношение на граничната стойност на олово в работна среда да бъдат „преразгледани и изменени възможно най-скоро“. В резултат, през юни 2019 г. Европейската агенция по химикали (ECHA) стартира публични консултации на заинтересованите страни относно ревизия на граничната стойност за олово в работна среда. Ето защо всяко ново знание в тази област ще допринесе за изграждане на здравно-промоционални стратегии за превенция на здравето на работното място и подобряване на общественото и трудово здравеопазване.

През февруари 2022 г. Европейската комисия стартира инициатива за актуализация на Директивата на ЕС за опазване на здравето и безопасността на работниците от рискове, свързани с химични агенти на работното място (Директива 98/24/ЕО). Актуализацията има за цел да се подобрят здравето и безопасността на работниците чрез определяне или преразглеждане на задължителни гранични стойности за олово и диизоцианати.

Хората са изложени на различни метали по много различни начини и генотипа на всеки човек допринася за индивидуалната чувствителност към метална токсичност. В допълнение, скорошни доказателства сочат ролята на генетиката на човешкия микробиом в усвояването и токсичността на метала. Вариациите на последователността на ДНК в гените, които регулират токсикокинетиката и токсикодинамиката на металите, влияят върху натрупването и задържането на метали в тялото, както и свързаните с тях токсични ефекти. Появяващата се картина показва, че е малко вероятно генетичната чувствителност да бъде предоставена от един ген, специфичен за всеки метал, а е по-скоро полигенна черта, съчетаваща гени с малък и голям ефект. Наличието на генетични варианти в човешката левкоцитна антигенна система (HLA) и рискът от белодробно заболяване, свързано с берилий, са един от първите примери за взаимодействие ген-среда. Гени, важни за чувствителността, са идентифицирани за арсен (AS3MT), олово (ALAD) и манган (SLC30A10). Нещо повече, появяващите се доказателства сочат ефектите на метали като арсен, кадмий и олово върху епигенетичния пейзаж, а епигенетичните фактори са идентифицирани

като мишени за метална токсичност. Наистина, епигенетичните ефекти могат да обяснят отбелязаната връзка между излагането на метали в началото на живота и по-късната проява на токсични ефекти, както и канцерогенността на металите (150).

Индивидите показват голяма вариация в своята чувствителност към излагане на метали. Изследвания на човешки близнаци, семейства и популации, както и проучвания върху животни са установили, че някои от тези вариации в чувствителността имат генетични причини. Въпреки това повечето проучвания в областта се фокусират върху данни за хора, тъй като генетичните вариации варират значително между видовете, а някои проучвания разкриват разлики в метаболизма на металите и токсичността на металите между хора и животински модели.

Взаимодействието, при което генетичен компонент променя връзката експозиция-болест, често се нарича взаимодействие ген-среда, а основните гени са гени на чувствителност. Тези гени променят усвояването и задържането (токсикокинетика) или токсичните ефекти на металите (токсикодинамика). Освен това, епигенетичните фактори са идентифицирани като фактори на чувствителност и цели на метална токсичност.

Изучаването на взаимодействието на металите с организма ни дава полезни модели за изучаване на взаимодействията ген-среда, тъй като техният метаболизъм често разчита само на няколко ензимни реакции, като по този начин улеснява идентифицирането на кандидат-гени за метална токсикокинетика (107). Например, генетичната вариация в AS3MT, кодираща основния ензим, метаболизиращ арсен (As), значително влияе върху ефективността на метаболизма на As (48). Освен това се знае много за токсикодинамиката на металите и основния механизъм на действие, включително специфичните гени, участващи в свързаните с металите болестни процеси. Например, вариант на човешки левкоцитен антиген (HLA) участва в представянето на берилий (Be) на имунната система и създава висок риск от свързано с Be белодробно заболяване.

Могат да бъдат идентифицирани някои общи принципи на гените, които влияят върху металната токсикокинетика и/или токсикодинамика. За токсикокинетиката са важни гените, кодиращи протеини, които регулират усвояването на метали, както се предполага за оловото и гена за хемохроматоза (HFE, кодиращ хомеостатичен

регулатор на желязото), както и гените, кодиращи протеини, участващи в транспорта, както е показано за манган (Mn) и Mn- специфичен ефлукс транспортен ген Solute Carrier Family 30 Member 10 (SLC30A10) и гени, участващи в метаболизма, както е илюстрирано за арсена, чрез генетични варианти в метилтрансфераза-кодиращия ген AS3MT. Гените, които модифицират токсичните ефекти на различни метали, могат да повлияят на свързването на металите с протеините, както за оловото и главния ген, свързан с биосинтезата на хема ALAD (делта-аминолевулинова киселина дехидратаза), или да участват в защита срещу оксидативен стрес и възстановяване на ДНК.

Гените за чувствителност към метали се различават от гените свързани с метаболизма на металите, които са идентифицирани за свързани с метали наследствени заболявания, например болести на Уилсън или Менкес, които се характеризират с нарушена медна хомеостаза и хиперманганемия с дистония 1, която включва нарушена манганова хомеостаза. Обикновено мутациите свързани с болестта са редки, с честоти под 1% в популацията. Например, мутацията, причиняваща болестта на Уилсън, варира от 0,3% до 0,7% в световен мащаб (59) и води до загуба на функцията ATPase Copper Transporting Beta (ATP7B) (33, 145). Такива мутации са силно доминантни, тъй като придават висок абсолютен риск, независимо от факторите на околната среда. Наследствената хемохроматоза е по-честа, с 5% честота сред кавказкото население (35, 54, 84). Наследствената хемохроматоза тип 1 се причинява от миссенс мутации в HFE гена, които водят до повишено усвояване на желязо (Fe) от стомашно-чревния тракт.

Генетичните варианти в гените за чувствителност обикновено имат ниска пенетрантност, но са по-чести. Генетичните варианти, които присъстват в над 1% от популацията, се наричат полиморфизми. Най-често срещаните полиморфизми са еднонуклеотидни полиморфизми (SNPs), с един SNP около всеки 500 базови двойки (bp). При вариацията на броя на копията (CNV) броят на копията на ДНК последователностите, по-дълги от 1 kb, варира между индивидите; например броят на копията на гените на глутатион S-трансферазата mu1 и theta 1 (GSTM1 и GSTT1) варира от 0 до 2, където 0 означава, че не се експресира протеин.

Повечето генетични варианти на чувствителност са свързани с дву- до трикратно увеличение на риска (47, 58, 64, 87, 88, 90, 91); Вариант на чувствителност може не само да увеличи индивидуалния риск за определено количество на експозиция, но също така присъствието на този вариант в популацията може да ни позволи да обясним значителна част от токсичните ефекти на металите с определен полиморфизъм (67-70).

4. Олово, епигенетични фактори и чревен микробиом

Епигенетичните фактори допринасят за чувствителността на индивида към метална токсичност. Тези наследствени промени в генната експресия и регулация не се кодират от ДНК последователността, а от различни модификации на ДНК (като ДНК метилиране) или на свързани с ДНК протеини като хистони. Влиянието на епигенетичните фактори върху предразположението на индивида към метална токсичност остава неясно, но все повече доказателства сочат, че металите са насочени към епигенетичните механизми, като по този начин модифицират наблюдаваната токсичност особено при едновременна експозиция на няколко метала.

Метилирането на ДНК, специфичното метилиране на цитозиновите остатъци директно преди гуанина, е от съществено значение за ембриогенезата и за поддържането на специфичната за клетъчната линия генна експресия през целия живот. Пре- и постнаталната среда са важни детерминанти на чувствителността към заболяване в по-късен етап на живота и се смята, че това влияние се медиира главно чрез промени в метилирането на ДНК, като всяка последваща дисрегулация на генната експресия променя епигенетичното програмиране на детето и води до дългосрочни отрицателни здравни резултати (14, 34, 61, 125, 150). Епигенетичната модификация от външни фактори е най-ясно демонстрирана при проучване за недохранване и тютюнопушене в ранна възраст (65, 76, 83). Все повече доказателства също показват, че излагането на метали в ранна възраст може да модулира епигенетичния пейзаж (139, 142), което може да повлияе на здравето както в детството, така и и по-късно в живота.

По време на канцерогенезата, общите нива на ДНК метилиране обикновено намаляват, докато специфични геномни региони, съдържащи туморни супресорни гени, често са хиперметилирани (42, 56, 124). Тъй като повечето метали не са силни мутагени, механизмите зад тяхната канцерогенност далеч не са ясни, но един механизъм вероятно са епигенетичните промени. Метали като арсен, олово и кадмий пречат на метилирането на ДНК, причинявайки ген-специфично ДНК хиперметилиране (например на гена, кодиращ ДНК-метилиращия ензим DNMT3A, 23) и глобално ДНК хипометилиране при хора (101). Нивата на транскрипция могат също да се регулират от микроРНК, които са малки, ендогенни, едноверижни некодиращи

РНК с дължина 20-22 нуклеотида. Те регулират генната експресия посттранскрипционно чрез хибридизиране с информационни РНК (mRNA), което води до транслационна супресия или разграждане на целевата РНК. Друг регулаторен механизъм на генната експресия включва хистонови модификации, които засягат хроматиновата структура, създавайки отворена хроматинова структура, позволяваща активна транскрипция, или затворена структура, която ограничава транскрипцията (160).

Чревният микробиом съвсем наскоро беше идентифициран като фактор опосредстващ генетичната чувствителност в отговор на металите. Чревният микробиом функционира като допълнителен орган на човешкото тяло, играещ съществена роля за здравето и заболявания като затлъстяване, диабет и метаболитен синдром (57, 102, 126), както и рак и възпалителни заболявания (49). Проучвания при мишки и рибки зебра показват, че арсенът пречи на микробиома на червата (38, 41) и активира имунитета (147). Съставът на чревния микробиом при мишки влияе върху усвояването на арсен от червата и толерантността към арсен, но все още малко се знае за хората. Прогнозирането на вероятността индивидите да натрупват метали и да развият заболяване, свързано с метали, ще изисква от нас да отчетем генетиката на микробиома и да разберем ролята му в защитата срещу токсични метали.

5. Избор на полиморфизми и методи за откриване

Много изследвания на взаимодействието ген-среда се основават на индивидуални генотипове и техните фенотипове (ефекти върху здравето). В по-глобалния и безпристрастен подход, известен като изследване на асоцииране в целия геном (GWAS), всички полиморфизми (SNPs и CNVs) се тестват за асоцииране с даден фенотип без предварителни предположения за причинно-следствените локуси. Епигенетичният пейзаж може по подобен начин да бъде изследван в проучвания за асоцииране в целия епигеном (EWAS). И двата типа изследвания имат огромен потенциал за идентифициране на маркери за генетичен риск; тяхното тълкуване обаче е възпрепятствано от големия брой многократни сравнения, които се провеждат, което може да доведе до фалшиви положителни резултати. Следователно проучванията за валидиране в други популации, животински модели или експериментални системи трябва да допълват GWAS и EWAS.

Разпределението на полиморфизмите варира по целия свят; наистина, взаимодействията ген-среда могат да се различават значително между различните етнически групи. Например, алел, свързан с по-ефективен метаболизъм на арсен, почти липсва в африканските популации, но присъства с честота от 70% в местните южноамерикански популации, което показва, че различни популации ще проявяват различна степен на токсичност. Следователно етническият произход трябва да се взема предвид, когато е възможно.

Повечето проучвания се фокусират върху генетичната основа за чувствителност към отделни метали, дори когато има излагане на няколко метала или когато техните съответни пътища се пресичат (78, 79, 157) . От зачеването до смъртта, хората са изложени на множество замърсители - метали, и други токсични вещества. За да се улови тази сложна и доживотна експозиция, терминът „експозома“ е въведен през 2005 г. от д-р Уайлд (2005). Експозомата може да обясни защо някои изследвания върху отделни елементи не могат да бъдат възпроизведени в други популации, поради тяхната различна история на експозома.

Оловото е токсичен елемент, който се среща в общата среда, както и в професионалните среди. Замърсяването с олово в околната среда е резултат от

промишлени емисии, изгаряне на въглища, автомобилни емисии, пигменти и водопроводни инсталации, което от своя страна води до замърсяване на водата и храната. Основните пътища за постъпване при човека са дихателен и чрез поглъщане. През последните години експозицията от околната среда е намаляла; въпреки това експозицията на олово е все още висока в някои развиващи се страни.

Първите доказателства за разлики в нивата на олово в кръвта като функция на вариациите на генотипа при ALAD (кодиращ дехидратаза на делта-аминолевулинова киселина) са докладвани преди почти 35 години (168). ALAD е основният протеин, който свързва оловото в червените кръвни клетки (19, 20). След тези първоначални публикации много проучвания са фокусирани върху основните взаимодействия между експозицията на олово, генотипа ALAD и токсичността.

Основният анализиран вариант на ALAD е заместването на Lys-59-Asn (rs18000435). Двата алела са традиционно означени ALAD-1 (Lys) и ALAD-2 (Asn), с получените генотипове CC (хомозиготен) и CG (хетерозиготен). Аминокиселинната позиция на Lys-59-Asn не е разположена близо до местата на свързване на цинка, към които Pb вероятно се свързва (71). Въпреки това, Asn е неутрална аминокиселина, докато Lys е положително зареден, така че това аминокиселинно заместване води до по-електроотрицателен ензим, повдигайки хипотезата, че ALAD-2 може да се свърже с положително заредения Pb йон по-здраво от ALAD-1, като по този начин осигурява защита чрез обездвижване на оловото във вътресъдовото пространство и вътре в клетки в по-малко биодостъпна форма (155).

Wetmur и съавт., 1991, са сред първите, които демонстрират, че индивидите, носещи алела ALAD-2, имат по-високи нива на Pb в кръвта, като резултат от проучване на 1000 деца от Ню Йорк (155). Метаанализ на 15 статии показва по-високи нива на Pb в кръвта при носители на ALAD-2 (166).

Генотипът rs1800435 ALAD-2 се свързва с професионална експозиция на Pb при индивиди, които са работили най-малко 6 години в предприятия от оловната промишленост(133). Разпределението на генотипа обаче може да бъде резултат от генотипна селекция, тъй като субектите ALAD-2 могат да бъдат защитени от ефектите на Pb и да толерират по-дълги експозиции на Pb в сравнение с индивидите ALAD-1 (169).

Основните генетични фактори очевидно играят критична роля в токсикокинетиката и токсикодинамиката на металите. Очертаващата се картина за повечето метали е, че това влияние най-вероятно е полигенно, като някои гени имат по-силен ефект от други.

Връзката между генотипа ALAD и експозицията на олово е най-добре проученото взаимодействие, с известни модификации на метаболизма на оловото чрез полиморфизми на ALAD, в допълнение към ефекта върху токсичността на оловото.

В токсикологията, широка популярност придобиха и повсеместно се използват биомаркери. През 2001 г. работна група на Американския здравен институт (NIH) стандартизира определението за биомаркер като „параметър, който може да бъде обективно измерен и е индикатор на биологичен процес".

Те представляват характеристика, която се измерва обективно и може да се счита за показател за нормален биологичен процес, процес на заболяване или типична реакция на организма към външни агенти. Биомаркерите се разделят на три групи:

1. *Биомаркери за експозиция* - екзогенни вещества, техните метаболити, продукти на взаимодействие между ксенобиотици и прицелни молекули или клетки, изследвани в някоя част на организма. Биоаркерите за експозиция проявяват тенденция да интегрират всички пътища на експозиция за определено химическо вещество. Приема се, че биомаркерът за експозиция е по-полезен, ако в биологичен материал се измерва съответното вещество, а не неговия метаболит. При оловна експозиция важен биомаркер за експозиция е измерване на концентрацията на олово в кръвта – при неекспонирани лица варира между 5 и 15микрограм/дл. При експонирани лица трябва да е под 40 микрограма/дл а при жени във фертилн възраст под 30 микрограма/дл. Биомаркер за експозиция на олово е и измерванене количеството на метаболитите копропорфирин и 5-АЛК в урината

2. *Биомаркери за ефект* - измеримо биохимично, физиологично или друго изменение в организма, което в зависимост от величината си се признава за установено или потенциално влошаване на здравето. Биоаркерите за ефект могат да бъдат полезни за оценка на експозицията, ако сигнализират за адаптиени, предклинични или предсимтомни стадии в развитието на заболяването, които са специфични за даденото

вещество. Например, неспецифичен биомаркер за експозиция на олово е инхибирането на хем метаболизма и развитието на хипохромна сидероахрестична анемия.

3. *Биомаркери за индивидуална чувствителност* – най-важната група биомаркери, оределяща разликата в индивидуалната чувствителност на всеки отделен индивид при една и съща експозиция на токсични агенти.

Откриването и систематизирането на важни биомаркери, имащи отношение към индивидуалната чувствителност на индивидите към олово, би довело до подобряване на превенцията и профилактиката на редица заболявания, дължащи се на професионална експозиция на тежки метали. Основната цел на настоящата работа е отдиференцирането на високо рисковите от ниско рискови индивиди. Това ще послужи за качествена оценка на риска при лица, работещи в заводи за преработка на тежки метали като олово.

Хипотеза:

Чрез генетично изследване на честотата на полиморфизма rs1800435 (разположен в Chr.9: 113391611 on GRCh38) на ALAD G177C при експонирани на олово работници в акумулаторното производство да се извърши оценка на хипотезата за връзката между индивидуалната чувствителност към оловна интоксикация и генотипа.

III ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Целта на настоящето изследване е да се проучи връзката между нивото на експозиция на олово, генотипната характеристика (rs1800435) и степента на вредно въздействие при работници, професионално експонирани на олово.

2. За постигането на поставената цел е необходимо решаването на следните основни задачи:

2.1 Подбор на популация експонирани на олово работещи в акумулаторното производство у нас.

2.2 Определяне на разпределението на изследваната популация по генотип ALAD-2 и зависимост между нива на Pb в кръвта и хемоглобин (HGB), разпределени по генотип.

2.3 Определяне на зависимост между нива на 5-АЛК в урина и брой левкоцити и еритроцити, разпределени по генотип и проследяване на зависимости между генотипа и индивидуалната чувствителност към олово.

2.4 Определяне връзката между молекулярно-генетичния профил и начина на живот с цел разграничаване на силно чувствителна група работници от акумулаторната и рециклиращата индустрия в България, професионално изложени на олово.

2.5 Предложения за здравно-промоционална стратегия за превенция на здравето на работното място и допълнителни мерки за превенция на отравянията.

IV МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Обект на изследването

Изследваната група обхваща 173 професионално експонирани на олово работници. След разрешение от ръководството на съответните заводи, в колаборация със съответните СТМ (Служби по трудова медицина), са селектирани цехове с очаквана висока оловна експозиция. На всички работници са подробно разяснени целите и ползите за тях, след което съгласните да участват са подписали декларации за информирано съгласие.

2. За постигане на поставената цел в настоящата научна работа са използвани следните подходи и методи:

2.1 Клинико и биохимични изследвания

Кръвни изследвания:

<u>Пълна кръвна картина</u>

Пълна кръвна картина /ПКК/ е кръвно изследване, което се използва за оценка на цялостното здравословно състояние. В аспекта на интоксикацията с тежки метали, служи за оценка развитието на анемия, която е характерна за отравяне с олово.

Повечето от показателите в ПКК са свързани и те винаги трябва да се интерпретират заедно. Например брой на червените кръвни клетки, хемоглобин и хематокрит са свързани и ако тези индекси показват намаление, то най-вероятно се касае за анемично състояние.

Метод: Автоматичен анализ на принципа на поточна флуоресцентна цитометрия.

Олово в кръвта

Използва се като биомаркер за оценка на оловната експозиция независимо от пътищата на постъпване на олово в организма. Съществува права връзка между количеството олово в работната среда, основно под формата на оловни аерозоли и количеството на олово в кръвта.

Референтни граници: < 1.21 μmol/L; за деца < 0.48) μmol/L

Метод: Атомно-абсорбционна спектрофотометрия - за изследване съдържанието на олово в кръвта чрез пробонабиране на венозна кръв, консервирана с подходящ антикоагулант (Li хепарин)

Изследване на урина:

5-АЛК (5- ALA)

Показания:

- Отравяне с олово или други тежки метали
- Порфирии

Принцип на изследването:

С помощта на йонообменни смоли се отделя 5-АЛК от порфобилиногена, след което количеството ѝ се определя фотометрично.

Референтни граници: до 6,0 mg/l

От 6,1 – 20 mg/l умерена оловна експозиция; над 20,1 mg/l значителна оловна експозиция

Интерпретация на резултатите:

Повишено отделяне на 5-АЛК има при:

- остри чернодробни порфирии;
- остри отравяния с олово или други тежки метали;
- наследствена тирозинемия.

Лекостепенно или липсващо увеличение на отделянето на 5-АЛК има при:

- хронични чернодробни порфирии;
- вторични копропорфирии.

Нормално отделяне на 5-АЛК с урината е налице при:

- здрави хора;
- еритропоетични порфирии;
- (най-често) вторични копропорфиринурии.

Метод: Използва се спектрофлуорометричен метод – за изследване съдържанието на делтааминолевулиновакиселина (5-АЛК) в урината в проби от урина на експонирани работещи

2.2 Молекулярно-генетични методи

2.2.1 Събиране на биологичен материал ДНК, съхранение и предварителна обработка на пробите

Проба от букална лигавица се събира от вътрешната страна на бузата посредством стерилен тампон (15.2 см., индивидуално опаковани Кат.№ 25-1506 1 PF 100, Progen ООД) и се поставя в 200 µl PBS буфер (pH 7.4) за по-нататъшно извличане на ДНК, като съхранението на така разтворената проба става в хладилни условия (1-4°C) за не повече от 2 дни. При невъзможност тампона с натривката от букална лигавица да бъде размит в PBS буфер веднага, той се съхранява в оригиналната

опаковка, за да се изсуши и да се избегне растежа на бактериална микрофлора, обитаваща нормално устната кухина.

Използваният за съхранение и транспорт PBS буфер е приготвен съгласно следната рецептура и посочените указания:

Химичен компонент	***Количество***
1. NaCl	*8 g*
2. KH_2PO_4	*0.2g*
3. KCl	*0.2g*
4. $Na_2HPO_4.12H_2O$	*2.9g*

1. *Нужните количества от изредените компоненти се претеглят;*
2. ***KH_2PO_4*** *и* ***Na_2HPO_4*** *се разтварят отделно;*
3. *След разтваряне поотделно, разтворите се смесват;*
4. *Киселинно-алкалното състояние на получения разтвор се довежда максимално близо до pH - 7.4 като корекции се правят чрез добавяне на 2M NaOH;*
5. *Получения PBS буфер се автоклавира 3 пъти на 100 градуса за по 30 минути на една атмосфера.*

2.2.2 Екстракция на ДНК от биологичен материал

Екстракцията на ДНК се извършва с помощта на Gene GET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No:K0721) от проби от букална лигавица, в съответствие с препоръките на производителя. Наборът за екстракция Gene GET Genomic DNA Purification Kit избягва използването на органични разтворители като фенол и хлороформ и е подходящ за широк набор от клинични материали.

За целта тампонът с натривка от букална лигавица внимателно се потапя в 200 µL PBS и с въртеливи движения се суспендират клетките за 30-60 секунди. Добавят се 400 µL лизиращ агент и 200 µL протеиназа К след което пробите бяха хомогенизирани за 10-15 s (vortex) и инкубирани на 56°C за 10 минути за получаване на клетъчни суспензии. След съответните обработки съгласно протокола на фирмата производител, ДНК-преципитатите внимателно бяха прехвърляни и пречиствани с помощта на колонки GeneGET Genomic Purification Columns и поредица от измиващи и елюиращи буфери до крайното елюиране на екстрахираната ДНК от филтрите на колоната.

2.2.3 Количествена и качествена оценка на екстрахираната ДНК

Качеството и количеството на екстрахираната нуклеинова киселина е оценена чрез спектрофотометричен анализ.

Концентрацията на ДНК е измервана спектрофотометрично (Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System, Agilent Technologies) при дължина на вълната 260 nm и 280 nm. Това позволява контролиране и на чистотата (примеси на РНК, белтък, фенол и др.) на получените разтвори. Количествени стойности за концентрация на получената ДНК бяха получавани автоматично или пресмятани по формулата: X (µg/ml)=A260 x 50 (µg/ml) x D, където: X - концентрацията на ДНК в µg/ml; A260 - екстинкцията на ДНК, при дължина на вълната 260 nm; D е фактор на разреждане.
Така получените препарати от ДНК бяха довеждани до работни концентрации от 0.5-2.0 µg/µl, разпределяни на аликвоти с цел предпазване от контаминации и съхранявани във фризер до по-нататъшното им анализиране.

Букалната тъкан се използва като материал за проба най-вече заради качеството на ДНК, която се добива, и поради неинвазивността на процедурата.

2.2.4 Генотипиране за откриване и определяне на SNP rs1800435C/G чрез полимеразно-верижна реакция

PCR в реално време е описан за първи път в началото на 90-те години на миналия век и използва флуоресцентни багрила за наблюдение на натрупването на PCR продукта в реално време. Техниката понастоящем се счита за "златен стандарт"

за количествена PCR методология - главно поради нейната чувствителност (могат да се открият единични величини на копирания брой копия), специфичност, рентабилност, простота (не се изисква допълнителна обработка). Тези характеристики на техниката често водят до преференциално прилагане спрямо други количествени анализи като Northern blot, in situ хибридизация и RNase протеинови анализи.

Полимеразната верижна реакция в реално време (Real-Time PCR) е лабораторна техника на молекулярната биология и молекулярната диагностика, основана на полимеразна верижна реакция (PCR). Той следи амплификацията на целевата ДНК молекула по време на PCR (т.е. в реално време), а не в нейния край, както в конвенционалния PCR. PCR in real time може да се използва количествено (количествен PCR в реално време) и качествено (наличие или отсъствие на търсената ДНК секвенция).

Генотипирането на подбраните полиморфни маркери е извършено посредством прилагане на полимерзна верижна реакция в реално време (Real-time PCR) с използване на флуоресцентно белязани праймери и сонди и последващ анализ със специализиран софтуер за отчитане на генотипите. Методът е подходящ за генотипиране на полиморфни варианти и се прилага за откриване на точкови мутации.

В настоящето изследване са използвани TaqMan проби за качествено определяне на нуклеотидни последователности. Наличието на две сонди във всяка реакция, позволява генотипирането на двата варианта на еднонуклеотидните полиморфни замени в изследваната секвенция. Всеки TaqMan експеримент се състои от два основни компонента:

1. Два специфични праймера, заграждащи интересуващия ни фрагмент ДНК, съдържащ варианта, който ще бъде изследван;

2. Две алел-специфични TaqMan® MGB сонди, за детекция на алелите на полиморфния вариант.

Алел специфичната TaqMan® MGB сонда включва:

1. Маркерна боя (флуорохром) в 5’края си – обикновено VIC® багрило е свързано към 5’края на сондата за алел 1, а FAM™ багрилото е свързано към 5’ края на сондата за алел 2. Алел 1 VIC® флуоресцентно белязаната сонда отговаря на единия алел на полиморфизма, а Алел 2 FAM™ флуоресцентно белязаната сонда – на другия.

Когато бъде възбудена под действие на енергията на лазерен лъч, всяко от тези багрила излъчва светлина с определена дължина на вълната;

2. MGB (Minor groove binder), който повишава температурата на топене (Tm) за конкретната дължина на сондата, позволява дизайн на по-къси сонди. По-късите сонди повишават ефикасността на генотипиране;

3. Нефлуоресцентен гасител (NFQ) в 3'края, който позволява отчитането на маркерния флуоресцентен сигнал.

Всяка TaqMan® MGB сонда се свързва специфично за комплементарната й секвенция между правия и обратния праймер. Когато сондата е интактна, близостта на гасителя до репортера действа, така че потиска флуоресценцията на репортера.

По време на реакцията, залепената сонда разделя репортера и гасителя. Натрупването на PCR продукти се открива директно, като се следи увеличаването на флуоресценцията на репортера и се отчита с лазер, като обработката на резултатите се извършват чрез компютър. Поради наличието на праймер, Taq полимеразата започва изграждането на комплементарната верига, като спазва 5'->3' полимеразната и екзонуклеазната активност По този начин Taq полимеразата започва да добавя нуклеотиди по растящата верига и премахва Taqman® нуклеотидите от прицелната ДНК. Този процес отделя репортера от гасителя като по този начин репортера се активира. На база дължината на вълната на флуоресцентния сигнал, отделен от всяка проба, се определя кои алели присъстват в нея.

Първичната обработка на данните от проведената полимеразна верижна реакция в реално време е направена с програмния продукт на фирмата Applied Biosystems – SDSv2.2.2.

Всички PCR реакции са проведени в 7300 Teal Time PCR System (Applied Biosystems), съгласно инструкциите на производителя. Реакционният обем е 25 µl и сместа съдържа 12.5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix, 1.25µl 20X TaqMan SNP Genotyping Assay - съдържащ двойка праймери и флуоресцентно белязана сонда (ThermoFisherScientific, кат. № 4351379), 6.25 µl RNase/DNase Free Water (Fermentas) и 5 µl разредена ДНК проба. Всички реакции са проведени в присъствието на две отрицателни контроли: 1. RNase/DNase Free Water (Non-template control, NTC); 2.

Бактериална ДНК. За положителни контрола са използвани проби с ДНК, от доброволци с вече доказани и познати генотипове.

PCR амплифициране е проведено с протокол, съгласно следното описание:

Стъпка	**Условия**
1	60°C за 120 секунди
2	95°C за 600 секунди
3	95°C за 15 секунди
4	60°C за 60 секунди
5	Отчитане на флуоресценция (plate read)
6	Стъпка No. 3, 4 и 5 се повтарят още 44 пъти (общо 45 цикъла за целия протокол)
8	Охлаждане и задържане на 4°C (край)

2.3 Метод на анкетното проучване

Анкетна карта за събиране на данни относно възраст и пол, период на професионална експозиция – трудов стаж, вредни навици – тютюнопушене и употреба на алкохол, местоживеене.

2.4 Статистически методи за анализ

Резултатите са обработени с Microsoft®Office Excel 2010 (Microsoft Office Professional Edition 2010). Създадените електронни таблици са проверени за коректен запис на информацията.

Анализът на резултатите е направен с помощта на статистически пакет за обработка на данни SPSS v20.0.

Използвани са дескриптивна статистика за описание на данните: вариационен (за количествени променливи) и честотен анализ (за качествени променливи), графично представяне; за сравняване на пропорциите са използвани Тест χ^2 и Тест на Fisher; при сравняване на свързани извадки е използван Тест на Wilcoxon. Нормалното

разпределение на данните е статистически изследвано с тестове на Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk. За сравняване на две средни стойности при нормално разпределение е използван Т-Тест. За сравняване на повече от две средни стойности е използван тест ANOVA. Тест на Mann-Whitney за сравняване на средни стойности е използван при ненормално разпределение на количествени променливи.
Използвани са също и регресионен и корелационен анализ, приложен е непараметричен тест на Spearman.

**Статистическата обработка на данните е извършена със съдействието на гл. експ. Даниела Божилова, Дирекция „Промоция на Здраве и Превенция на Болестите", отдел „Рискови Поведенчески Фактори и Превенция на ХНБ", Национален Център по Обществено Здраве и Анализи, София.*

V РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Дизайн на проучването

В настоящият дисертационен труд са обхванати общо 173 професионално експонирани на олово лица (n=173) от цехове с висока експозиция на олово по данни от СТМ. Първоначално е определена концентрация на олово в кръвта и 5 – АЛК в урина при 81 работещи в акумулаторното производство лица (n=81). От тях е подбрана група с високи стойности на олово в кръвта и 5 - АЛК в урина (n=32) за определяне на генотипа с цел отдиферинциране на група изследвани лица хетерозиготни по ALAD – 2. За потвърждаване на данните получени при предходните изследвания са включени още 92 лица професионално експонирани на олово (n=92), като за тях са определени концентрация на олово в кръвта, 5 – АЛК в урина и генотипа.

2. Подбор на популация експонирани на олово, работещи в акумулаторното производство у нас

Въпреки сериозните ограничения, свързани с глобалната пандемия от КОВИД 19 и рестрикциите за достъп до заводи и лаборатории, затрудненията с доставката на материали и консумативи, е осъществена реализацията на голяма част от планираната работа както на терен, така и в лаборатории (клиничната лаборатория на УМБАЛ „Св.Иван Рилски“ – София и генетичната лаборатория към НЦОЗА – София) при което са обхванати общо 173 професионално експонирани на олово работещи лица (n=173) от цехове с висока експозиция на олово по данни от СТМ.

3. Определяне на концентрацията на олово в кръвта и екскрецията на 5-АЛК в урина

Нивото на олово в кръвта се движи в границите - 221 до 800 ug/l. На Фиг. 2 е представено нивото на олово в кръвта на изследваните работници. Резултатите демонстрират, че при 13,5% са регистрирани концентрации на олово в кръв от 701-800 ug/l. При 3,7% определените стойности надвишават 801 ug/l.



Фиг. 2 Определени концентрации на олово в кръвта

Екскрецията на 5-АЛК в урина се прилага като неинвазивен биологичен маркер за оценка на ефекта с биологична чувствителност при нива на РвК над 400 ug/l. В изследваната група работници средната стойност на 5-АЛК (mg/l) варира в интервала 13,01 ± 9,12 mg/l (n=81). Индивидуалните резултати обхващат широк концентрационен интервал от 2,57 до 51,1 mg/l.



Фиг. 3 Ниво на екскреция на 5-АЛК в урина (5-АЛК mg/l)

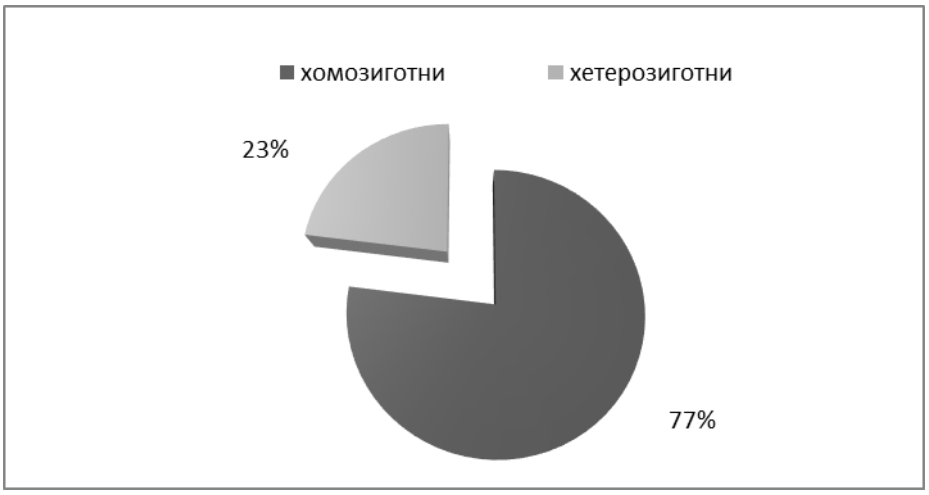
На Фиг. 3 е представено разпределението на индивидуалните стойности на 5-ALK в урината на изследваната група. Само при 11,1% от работниците, 5-АЛК (mg/l) е в границите на нормалните стойности. Най-висок е относителният дял (61,2%) на лицата при които екскрецията на 5-АЛК е в интервала от 6,1 до 15 mg/l, отразяващ умерена оловна експозиция. При 8% от работниците индивидуалните резултати достигат до стойности от 15,1 до 20 mg/l за които се приема, че нарастването на 5-АЛК кореспондира със значителна по сила вътрешна експозиция. С ясно изразен биологичен отговор са 18,5% от работниците, при които екскрецията на метаболита надвишава 20,1 mg/l.

Установена е "доза-отговор" зависимост между нивото на РвК и 5-АЛК. Относителният дял на лицата с повишение на 5-АЛК от 6-15 mg/l и над 15 mg/l нараства закономерно с увеличаване нивото на вътрешната експозиция. Биологичният отговор е резултат от инхибирането на дехидратазата на делта-аминолевулиновата киселина пропорционален на постъпването на олово в еритроцитите. Натрупващият се във високи концентрации междинен метаболит 5-АЛК преминава от еритроците в плазмата и от там се излъчва в урината.

4. Определяне на разпределението на изследваната популация по генотип *ALAD-2 и* зависимост между нива на Pb в кръвта и хемоглобин (HGB), разпределени по генотип

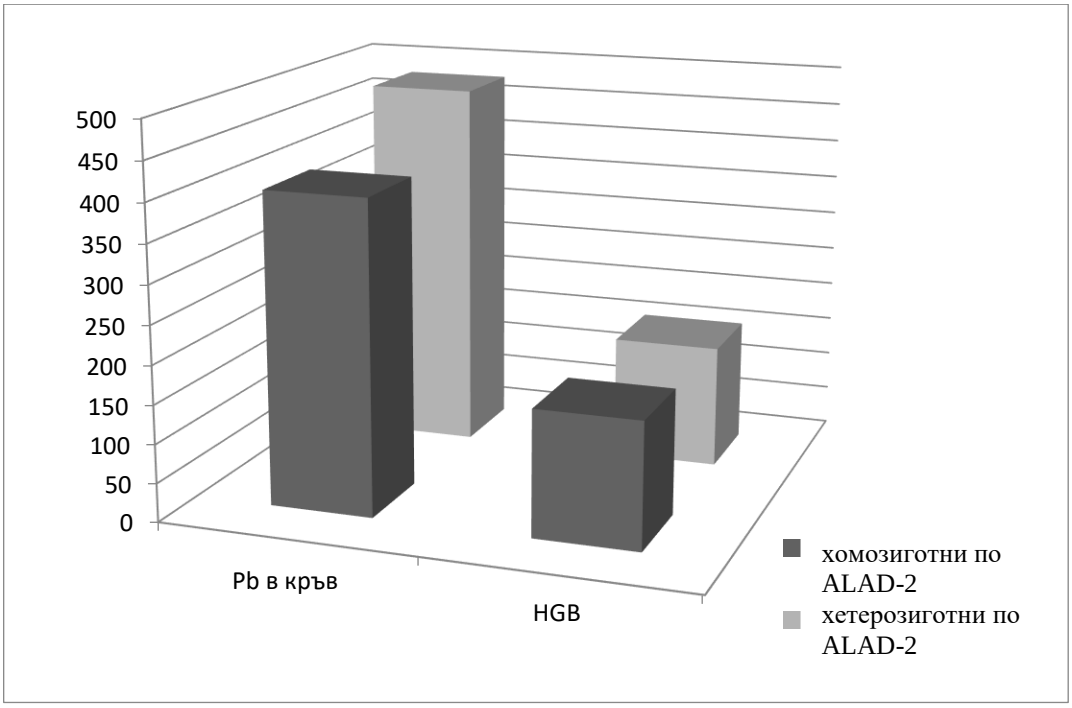
След анализ на резултатите е подбрана група експонирани лица (n = 32) с високи стойности на олово в кръвта и 5- АЛК в урина. Като първоначален анализ е определено разпределението по генотип с цел отдиференциране на група изследвани лица, хетерозиготни по *ALAD-2.* По литературни данни това е рисков генетичен профил и лица с такава характеристика са по-предразположени към оловна интоксикация.

Получените резултати от молекулярно-генетичните анализи (Фиг. 4) демонстрират, че 23 % от изследваната популация са хетерозиготни по *ALAD-2.*



Фиг. 4 Разпределение на изследваната популация по генотип *ALAD-2*

По литературни данни е налице повишен риск за хетерозиготни по *ALAD-2* изследвани лица (111). Резултатите от настоящето проучване демонстрират сходство с данни на други автори (23, 154). Наблюдават се тенденции на по-високи концентрации на олово в кръвта и занижени нива на хемоглобин при изследваните лица, които са хетерозиготни по *ALAD-2* (фиг. 5)

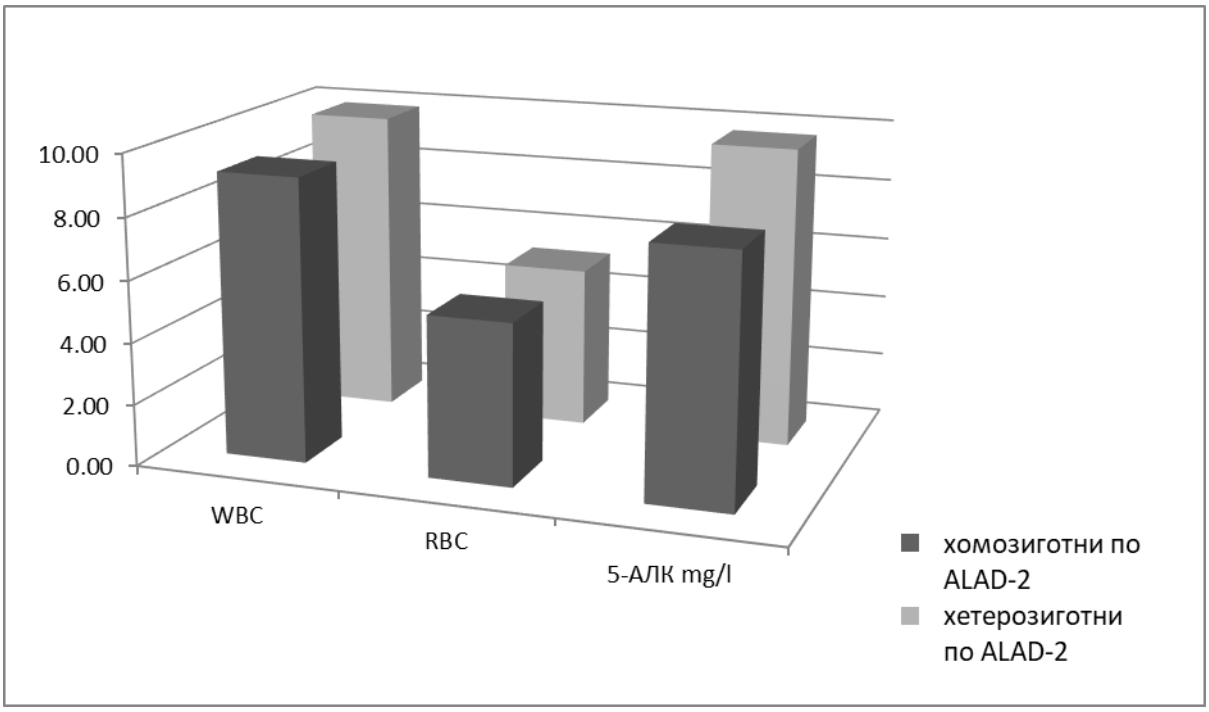


Фиг. 5 Нива на Pb в кръв (ug/l) и хемоглобин (HGB), разпределени по генотип

Тенденции на зависимост с генотипа се наблюдават и при сравняване на данните за концентрациите АЛК и брой на еритроцити и левкоцити, разпределени по генотипни характеристики на изследваната в проучването група работници.

Прави впечатление статистически значимо по-високата средна стойност на олово в кръв при хетерозиготите по ALAD-2 гена, което кореспондира с повишена чувствителност към оловна интоксикация при индивидите с този генотип (фиг.5).

5. Определяне на зависимост между нива на 5-АЛК в урина и брой левкоцити и еритроцити, разпределени по генотип и проследяване на зависимости между генотипа и индивидуалната чувствителност към олово



Фиг. 6 Нива на 5-АЛК (mg/l) в урина и брой левкоцити (WBC) и еритроцити (RBC), разпределени по генотип

Необходимо е да се анализира зависимостта между концентрациите на олово и нивата на биомаркерите в кръв и урина на фона на оценка на генотипното разпределение (фиг.6).

Тази хипотеза може да помогне да се обясни генотипната селекция, наблюдавана от Schwartz и съавтори (130), при която хората с ALAD-2 сякаш понасят по-продължителни експозиции на олово в работната среда. Данните също така показват, че хомозиготите по ALAD-1 могат да бъдат с по-голям риск от развитие на невротоксичност в сравнение с индивидите с ALAD-2. Причината е, че хомозиготите по ALAD-1 имат по-високи нива на аминолевулиновата киселина в плазмата (131,

141). Проучване на Bellinger и съавтори (17) предоставя предварителни доказателства, че хората с генотип ALAD-2 може да имат по-добро невропсихологично представяне в сравнение с ALAD-1 хомозиготи при подобна анамнеза за експозиция на олово.

6. Определяне алелната честота и разпределението на отделните хаплотипове сред българска професионално експонирана на олово популация на базата на ALAD генен полиморфизъм (rs1800435C/G) и възможност за използване като прогнозен биомаркер за превенция на оловна интоксикация.

Обект на това изследване са 61 мъже от българската индустрия за рециклиране на батерии. Измерени са следните биомаркери: разпределение на полиморфизма rs1800435C/G чрез RT-PCR метод; съдържание на олово в кръвта; хематологични и биохимични параметри; нива на 5-АЛК (делта - амино левулинова киселина) в урината.

Данните от генотипизирането (Табл. 4) показват категоричен превес на хомозиготен CC генотип с честота от 77,05% спрямо честота от едва 22,95 % хетерозиготен CG генотип сред изследваните.

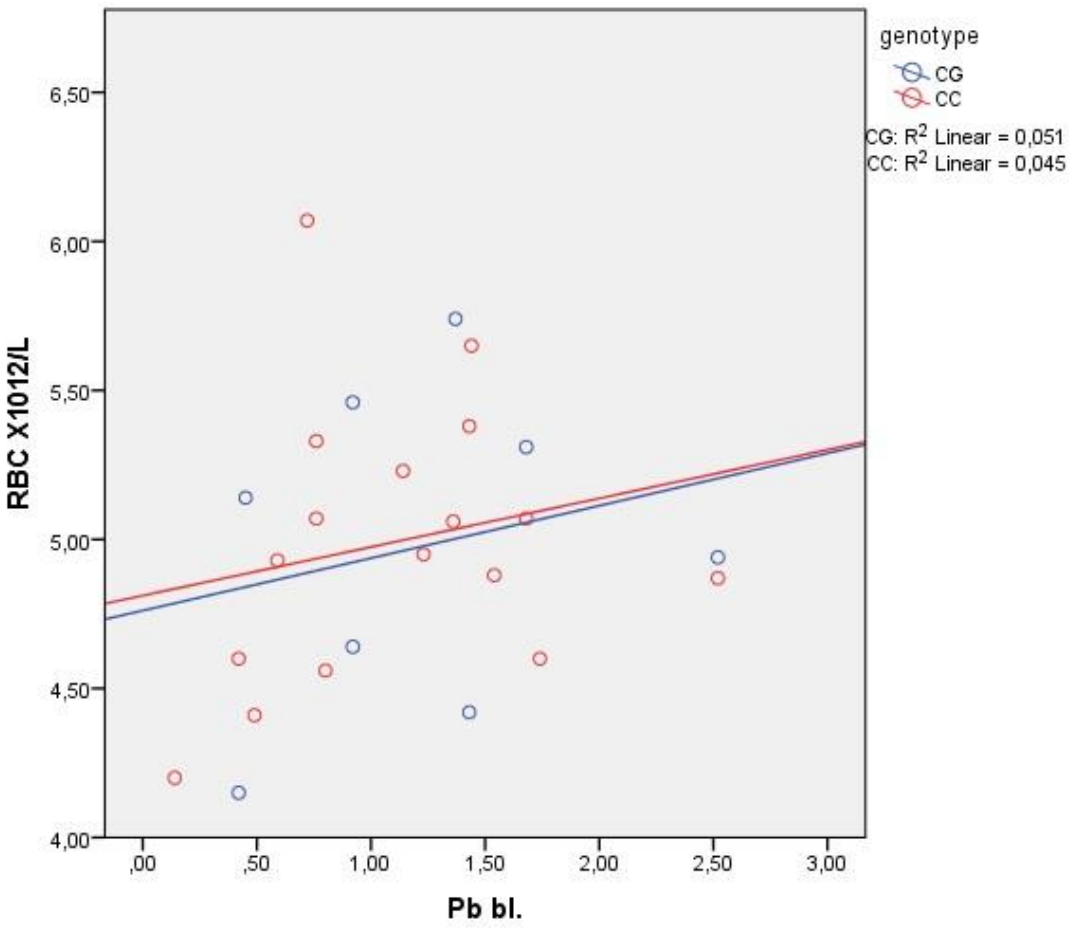
Табл. 4 Алелна честота на изследваните работници от българската индустрия за рециклиране на батерии

Gynotype	Count	%	Allelic frequency	Count	%
CC	47	77,05	C	108	88,52
CG	14	22,95	G	14	11,48
Total	61			122	

Последващият анализ на данните цели да установи съществува ли корелация между измерените стойности на олово в кръвта, броят на червените кръвни клетки, съдържаните на хемоглобин в кръвта и генотипа.

При индивидите с хетерозиготен CG генотип като цяло се наблюдават по-високи нива на олово в кръвта спрямо индивидите с хомозиготен CC генотип при еднаква или сходна експозиция на олово в работната среда.

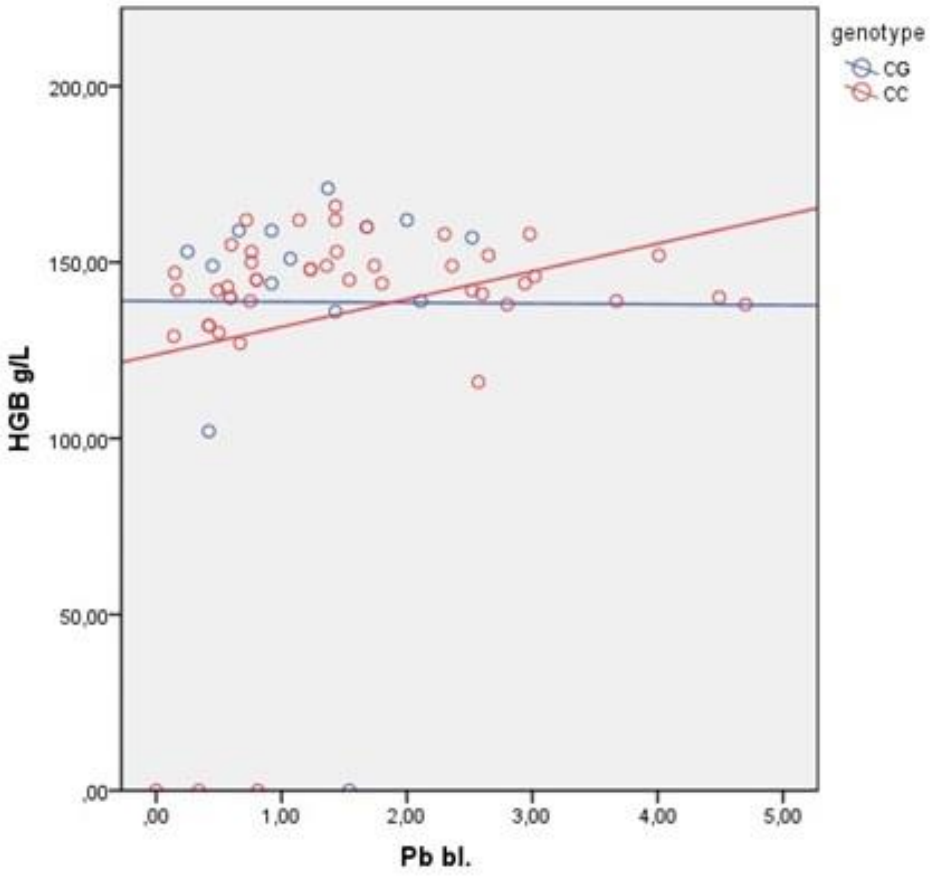
Анализирането на данните за евентуална връзка между нивата на олово в кръвта и броят на червените кръвни клетки (Фиг. 7) по генотип не открива корелация. Това означава, че както генотипа, така и оловната токсичност не могат да бъдат пряко свързани с процесите на образуване и/или разрушаване на еритроцитите.



Фиг. 7 Нива на олово в кръвта (µmol/L) и брой на червените кръвни клетки по генотип

При анализа на данните по отношение наличието на корелация между нивата на олово в кръвта и количество на хемоглобин по генотип (Фиг. 8) се открива такава. Този резултат е в съответствия с данните получени и от други проучвания, както и с патогенезата на оловната интоксикация. При хетерозиготите средните нива на олово в

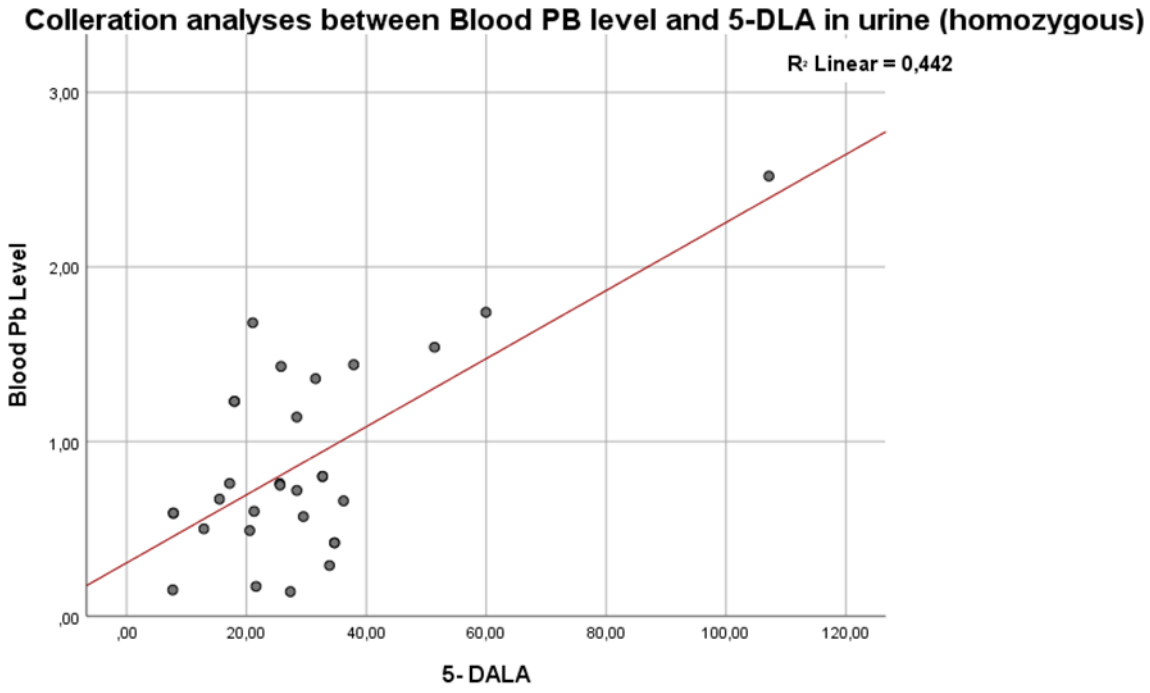
кръвта са статистически значително по-високи в сравнение с хомозиготите, което ги определя като популация в риск, заради по-високата им индивидуална чувствителност към оловна интоксикация. Респективно по-високите нива на олово в кръвта определят нарушената синтеза на хема при хетерозиготите и съответно намаленото количество на хемоглобин в еритроцитите.



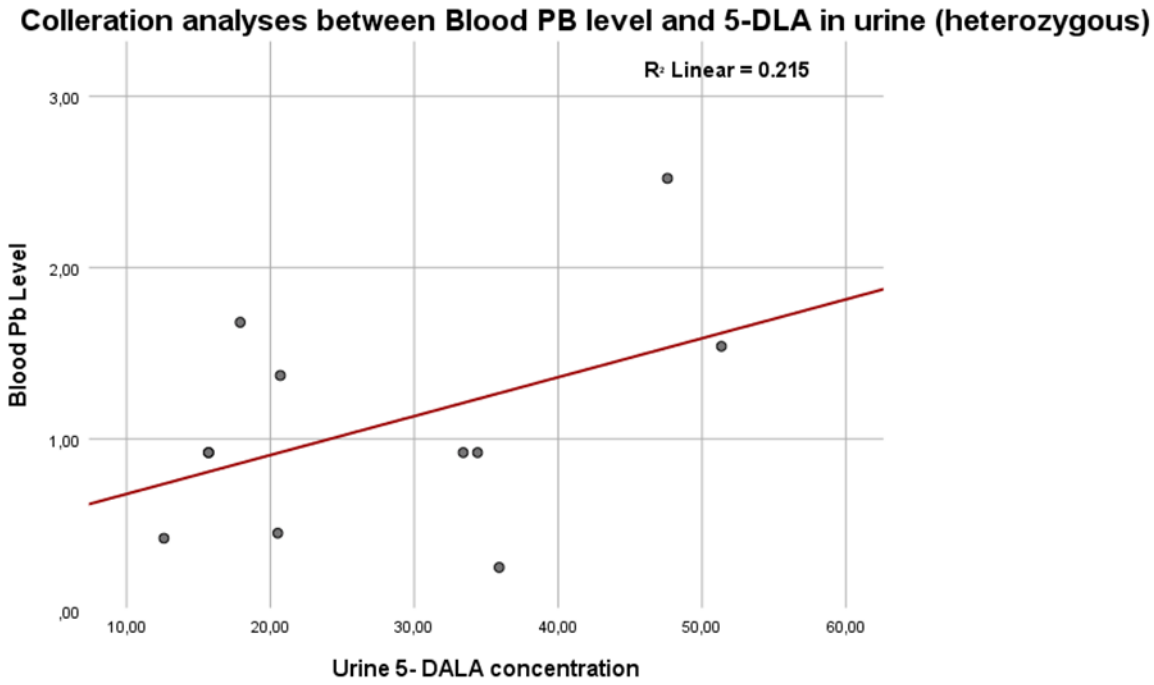
Фиг. 8 Нива на олово в кръвта (µmol/L) и количеството хемоглобин по генотип

Интерес представлява и зависимостта между генотипа, нива на олово в кръвта и уринната екскреция на 5-АЛК, която се използва като биомаркер за определяне на тежестта на оловна интоксикация.

При настоящето изследване са установени тенденции на зависимост между генотипа и екскрецията на 5-АЛК в урината в посока повишена уринна екскреция на 5-АЛК при хетерозиготите (Фиг. 9 и Фиг. 10), но предвид малката извадка не може категорично да се определи дали лицата с хомозиготен или хетерозиготен генотип са с повишена чувствителност към интоксикация с олово.



Фиг. 9 Зависимост между нива на олово в кръвта (µmol/L) и екскрецията на 5-АЛК в урината (mg/l) при хомозиготен CC генотип



Фиг. 10 Зависимост между нива на олово в кръвта (µmol/L) и екскрецията на 5-АЛК в урината (mg/l) при хетерозиготен CG генотип

При индивидите с хетерозиготен CG генотип като цяло се наблюдават по-високи нива на олово в кръвта спрямо индивидите с хомозиготен CC генотип при еднаква или сходна експозиция на олово в работната среда.

При анализ на резултатите са наблюдавани корелации между нивата на олово в кръвта и съдържанието на хемоглобин по генотип, но не е открита корелация в нивата на олово в кръвта и броят на червените кръвни клетки по генотип.

Установени са тенденции на зависимост между екскрецията на олово и генотипното разпределение, които налагат по-задълбочени проучвания за потвърждаване или отхвърляне на тази хипотеза.

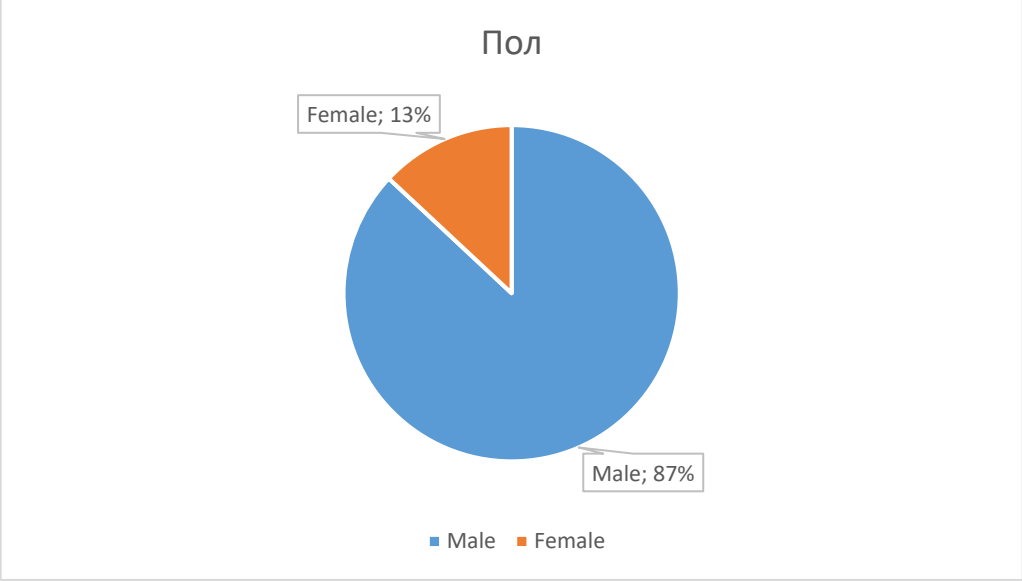
Трудно е да се реши кой генотип е „застрашен“ или т.нар. „генотип в риск“ тъй като резултатите показват, че всеки генотип е податлив на един или повече неблагоприятни фактори на средата. Това налага бъдеща работа в тази насока, включваща както по-голям брой експонирани лица, така и тестването за повече

генетични фактори, което ще позволи диференцирането на индивиди с повишена индивидуална чувствителност към интоксикация с олово и предприемането на навременни здравно-профилактични мерки с цел недопускане на оловна интоксикация и всичките свързани с нея неблагоприятни здравни ефекти при т.нар. „ранима популация“, представляваща индивиди с повишена индивидуална генетично обусловена чувствителност.

7. Връзка между молекулярно-генетичния профил и начина на живот с цел разграничаване на силно чувствителна група работници от акумулаторната и рециклиращата индустрия в България, професионално изложени на олово.

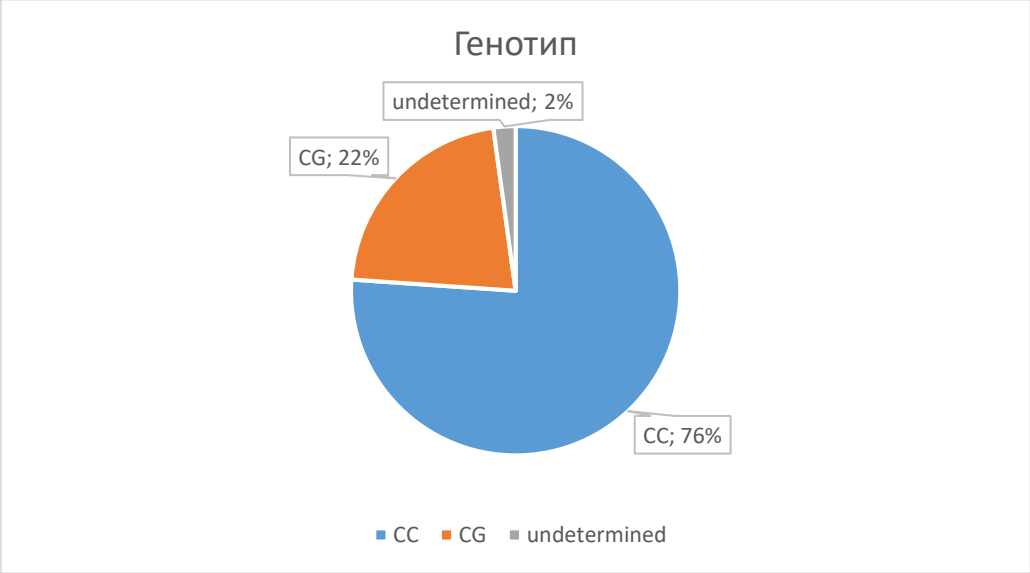
Обект на това изследване са 80 мъже и 12 жени (Възраст: 24-61) от българската индустрия за рециклиране на батерии. Измерени са следните биомаркери: съдържание на олово в кръвта, нива на DALA в урината и разпределение на полиморфизма на rs1800435C/G. Попълнен бе въпросник за начина на живот.

Анализът на данните показва, че 87% от участниците взели участие в проучването са мъже, а останалите 13% - жени (фиг. 11), което съответства на средното разпределение по пол на работещите в тежките производства, където основно работят мъже, а за жените, особено в детеродна възраст, има наложени редица законови ограничения.



Фиг. 11 Разпределение на участниците в изследването по пол

Спрямо генотипа: 76% са с хомозиготен CC генотип и 22% са с хетерозиготен CG генотип, само при 2% от изследваните не беше определен генотипът (фиг. 12). Като цяло хомозиготният генотип е по-широко разпространен по нашите географски ширини, което се потвърждава и от настоящото проучване. Все пак е необходимо по-всеобхватно генетично изследване на населението извън акумулаторното производство, за да може със сигурност да се определи генетичното разпределение при българска популация, тъй като винаги стои въпросът за естествената генетична селекция при работещите в дадено рисково производство. Логично е при започване на работа в акумулаторното производство на хора с повишена чувствителност, те да изпитват по-тежко неблагоприятните въздействия на токсичният метал и съответно по-често да напускат и по-малко да се задържат на работа.



Фиг. 12 Разпределение на участниците в изследването по генотип

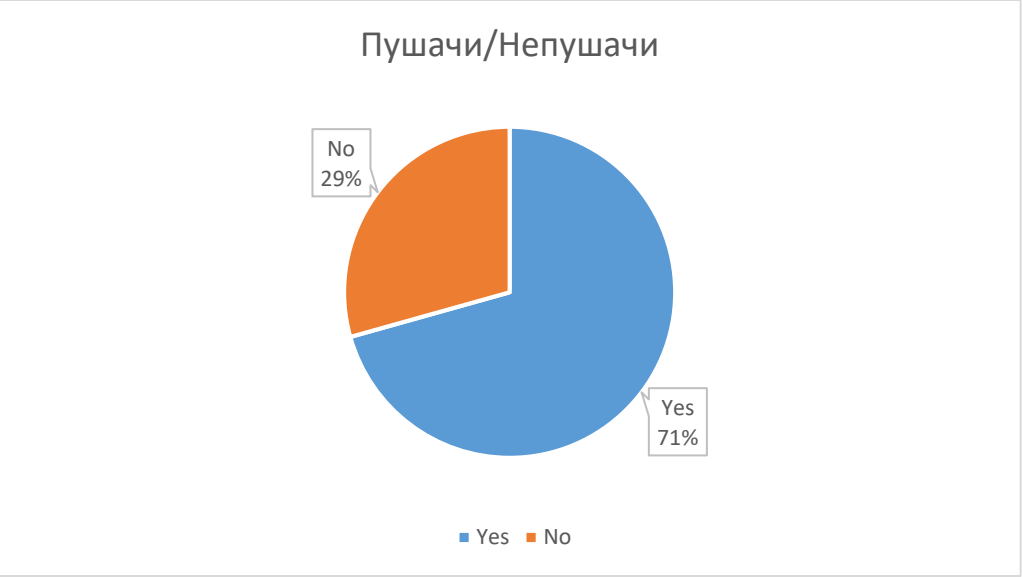
По отношение разпределение на участниците в изследването според трудовият им стаж, данните показват, че 50% от анкетираните работят от 0 до 5 години на посоченото работно място, 17% - от 5-10 години, сходен процент - 16% - до 15 години, а повече от 15 години на работното място са 17% от анкетираните (фиг. 13). Тези данни съответстват на данните от тежките производства съчетани с вредни фактори на

средата, където обикновено на работа постъпват млади здрави работници, предимно мъже и честотата на задържане в производството не е особено голяма.

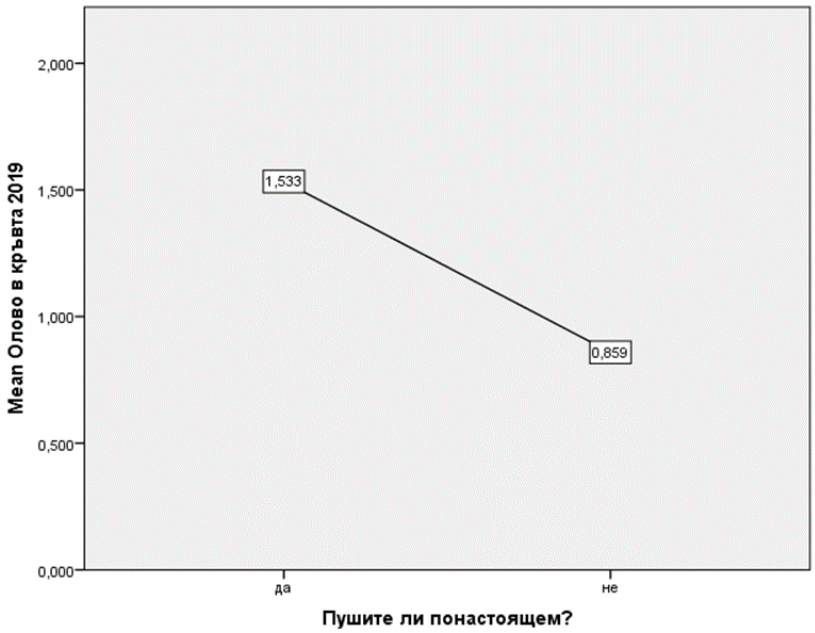


Фиг. 13 Разпределение на участниците в изследването според трудовият им стаж

Интерес представлява и разпределението на участниците в изследването спрямо това дали са активни пушачи или не. Става ясно, че 71% от участниците в анкетата са пушачи, 29% - непушачи (фиг. 14), което съответства на традиционно високата честота на разпространение на тютюнопушенето у нас. Това поставя въпроса за комбинираното въздействие на токсични агенти от работната среда и цигарения дим и потенциалното синергично или адитивно действие на токсичните агенти, налагащо по-задълбочени изследвания. От друга страна, добре е да се помисли за програми за здравна промоция сред работещите и включване на желаещите в програми за отказ от тютюнопушене.

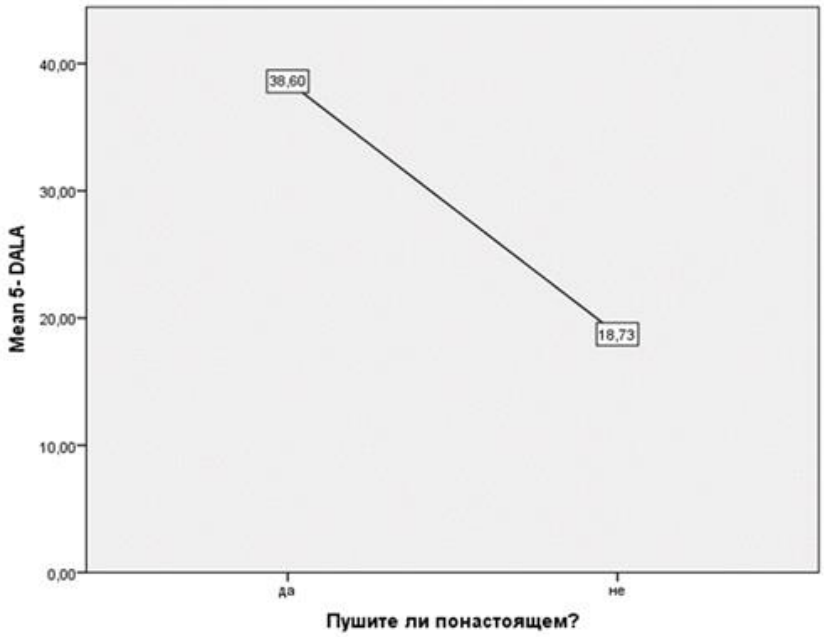


Фиг. 14 Разпределение на участниците в изследването спрямо пушачи и непушачи



Фиг. 15 Съдържание на олово в кръвта (µmol/L) при двете изследвани групи пушачи/непушачи

Съществува статистически значима разлика между съдържанието на олово в кръвта при двете изследвани групи пушачи/непушачи (фиг. 15), като при пушачите се доказва по-високо съсдържание на олово в кръвта (Сиг. = 0,001 (<0,05), което е в съответствие с данни от други проучвания в различни региони на света. Всичко това потвърждава неблагоприятният ефект на тютюнопушенето, особено при работещи в среда с повишена оловна експозиция и още веднъж акцентира върху важността на здравната промоция и въвеждането на програми за отказ от тютюнопушене сред работещите в акумулаторните производства.

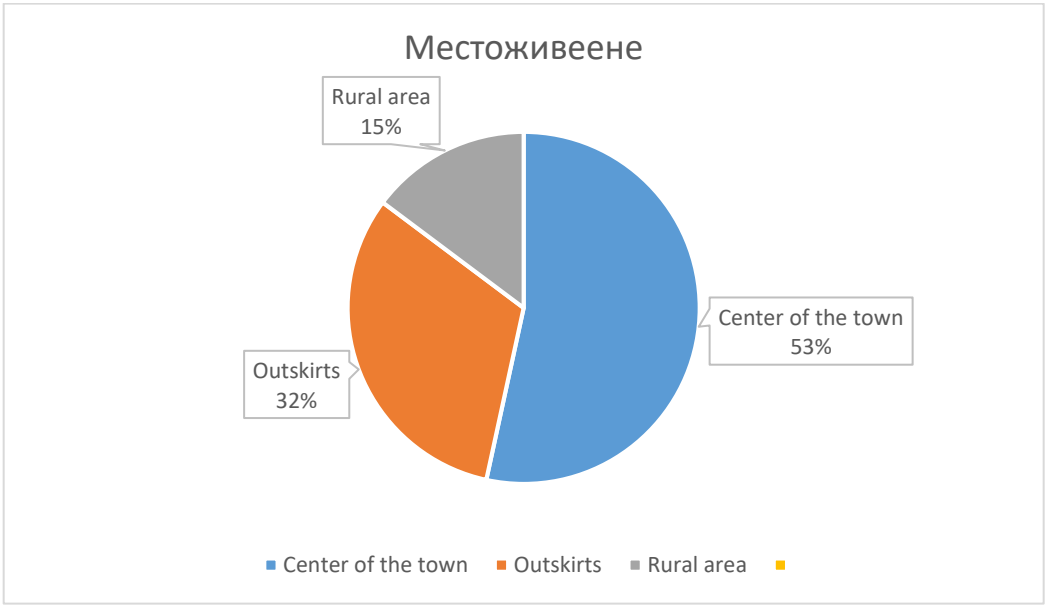


Фиг. 16 Екскреция на 5-АЛК (mg/l) при двете групи изследвани лица - пушачи/непушачи.

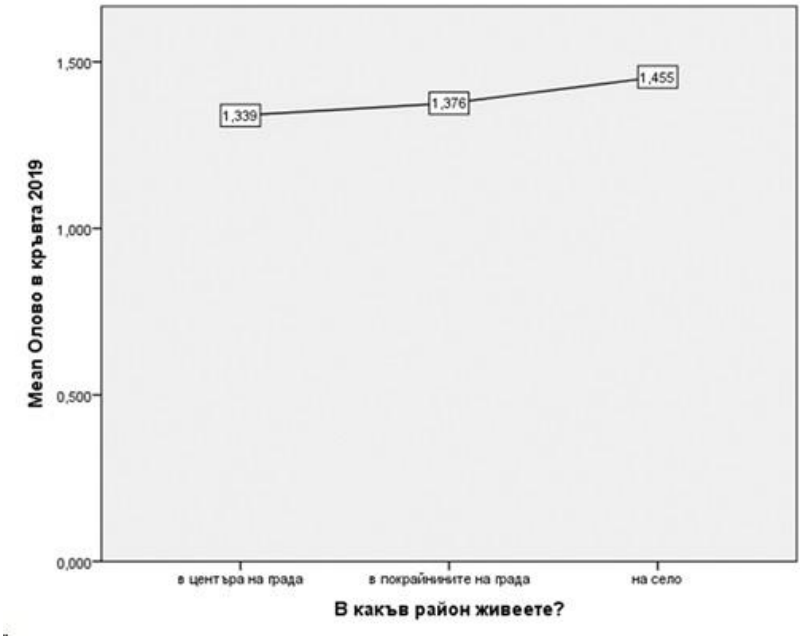
След изключване на субектите с нулеви стойности на 5-АЛК в урината съществува статистически значима разлика между екскрецията на 5-АЛК при двете групи изследвани лица - пушачи/непушачи (фиг. 16). Тук отново по-високи са нивата при пушачите (Сиг. = 0,001 (<0,05), което затвърждава ролята на тютюнопушенето

като кумулативен рисков фактор, който усилва ефекта на въздействието на оловото върху организма.

По отношение изясняване влиянието на средата на живот върху оловната експозиция и потенциална интоксикация, бе включен в анкетата и въпрос за местоживеенето на работещите. Анализът на данните показва, че 53% от участниците са посочили центъра на града като местоживеене, 32% - покрайнините на града, а 15% живеят на село (фиг. 17). Традиционно центърът на града се счита за местоживеене с повишена концентрация на вредни фактори във въздуха главно от изгорели газове от двигателите с вътрешно горене, но не бива да се пренебрегват и вредностите отделяни от изгаряне на въглища за отопление, характерни предимно за селските райони през зимата.



Фиг. 17 Разпределение на участниците в изследването спрямо местоживеене

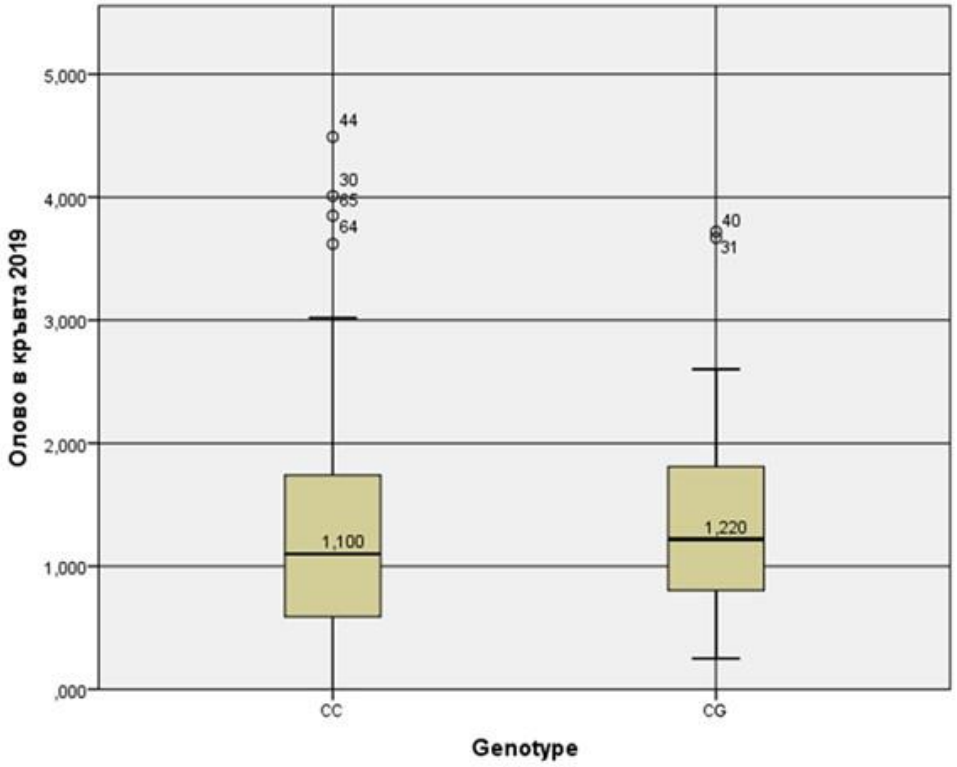


Фиг. 18 Съдържание на олово в кръвта (µmol/L) при трите групи хора по местоживеене (център на града, покрайнини и селски район)

Няма статистически значима разлика (p>0,05) в съдържанието на олово в кръвта при трите групи хора по местоживеене (център на града, покрайнини и селски район), което означава, че не може да се направи връзка по отношение риска от оловна интоксикация и местоживеенето.

8. Обобщен анализ на ключови съпоставими данни, по отношение важни биомаркери, касаеши оловната чувствителност

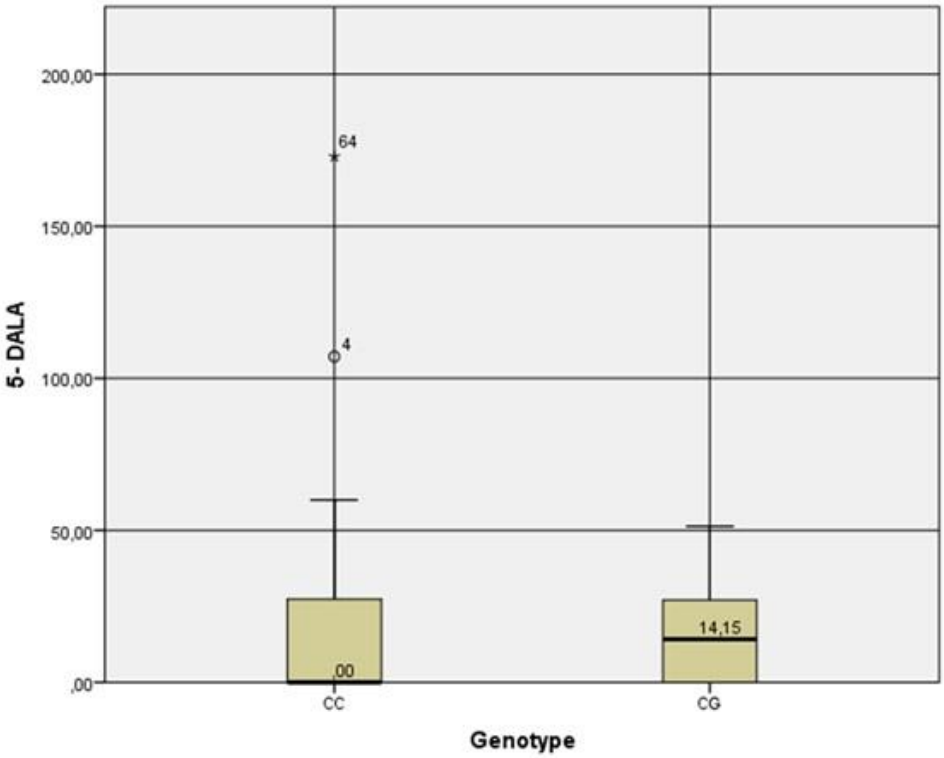
Интерес представлява обобщеният анализ на съпоставими данни, обхващащи всички изследвани до момента лица, като по този начин се постига по-голяма представителност на извадката, което дава възможност да се направят обобщаващи изводи. Получените обобщени данни са в съответствие както с предишно проучване по темата, така и с частичните анализи на данните от настоящето проучване.



Фиг. 19 Съдържание на олово в кръвта (µmol/L) спрямо генотипа

Обобщеният анализ потвърждава, че при хетерозиготите се наблюдават по-високи нива на олово в кръвта при еднаква експозиция на работната среда. Всичко

това съответства на литературните даннни и определя хетерозиготите като популация с повишен риск от оловна интоксикация при равни други условия.



Фиг. 20 Екскреция на 5-АЛК (mg/l) спрямо генотипа

Анализът на обобщените данни по отношение на уринната екскреция на 5-АЛК не показва статистически значима разлика между двата генотипа (p=0,643), което потвърждава необходимостта от по – задълбочени проучвания по темата.

Табл. 5 Статистика генотип CC

Statistics

		Pbblood2018 Олово в кръвта 2018	Pbbl2019 Олово в кръвта 2019	acid5DALA 5-DALA
N	Valid	12	70	70
	Missing	58	0	0
Mean		1,67583	1,32986	15,9361
Std. Error of Mean		,126661	,121853	3,22575
Median		1,77500	1,10000	0,0000
Std. Deviation		,438768	1,019499	26,98854
Minimum		,800	0,000	0,00
Maximum		2,320	4,490	172,91

Табл. 6 Статистика генотип CG

Statistics

		Pbblood2018 Олово в кръвта 2018	Pbbl2019 Олово в кръвта 2019	acid5DALA 5-DALA
N	Valid	5	20	20
	Missing	15	0	0
Mean		1,68800	1,46250	15,5400
Std. Error of Mean		,187894	,223744	3,86122
Median		1,62000	1,22000	14,1500
Std. Deviation		,420143	1,000615	17,26792
Minimum		1,200	,250	0,00
Maximum		2,220	3,720	51,35

Сред световната научна общност все още няма единно мнение по отношение данните, получени от текущи проучвания, изследващи различни полиморфни варианти и техните асоциации с основните метаболитни пътища и токсичността на оловото. Настоящото изследване е част от първото изследване за български работници, професионално изложени на олово. Установена е връзка между концентрацията на олово в кръв и генотипа.

Наблюдавани са корелации между нивата на 5-АЛК в урината и олово в кръв по генотип. Все още е трудно да се реши кой генотип е генотип „в риск“. Следва да се установи и вземе под внимание контролна група от здрави, неекспонирани лица. Работниците, които пушат, са изложени на по-голям риск от интоксикация с олово, отколкото непушачите. При настоящето изследване местоживеенето не оказва влияние върху концентрацията на олово в кръвта. 50% от работниците имат трудов стаж под 5 години, поради което е необходимо по-широко проучване. Изследването на генетични варианти в различни гени, които са пряко или косвено свързани с метаболизма или токсичните ефекти на оловото, би допринесло за подобряване на превенцията на канцерогенното излагане.

9. Предложение за здравно-промоционална стратегия за превенция на здравето на работното място

1. *Създаване на програма за ранна превенция на ранима популация с повишена чувствителност към оловна интоксикация от попадане в среда с риск от повишена експозиция като се определя генотипа преди постъпване на работа.*

Като се има предвид, че у нас в отрасли свързани с добив и преработка на олово в различните им деривати – рудодобив, цветна металургия, производство на бои, преработка на оловни отпадъци, преработка и производство на акумулатори са ангажирани огромен брои хора и то предимно в млада и трудоспособна възраст, а така също и жени в детеродна възраст, абсолютно наложително е да се изгради национална здравно – промоционална стратегия за превенция на здравето на участващите в оловните производства на всяко едно ниво. За България, това са водещи отрасли генериращи значим процент от брутният вътрешен продукт, а така също и свързани с експорта, така че не е възможно те да бъдат елиминирани или заместени с друго в кратък и средносрочен план. Единствено решение остава пряко ангажиране с проблема от страна на държавата и институциите, така че да се извърши адекватна оценка на всички рискове и предприемане на стратегия за избягване или поне минимизиране на рисковете, които не могат да бъдат отстранени. На първо място, необходимо е тясно сътрудничество между работодатели и работници с участието на съответните служби по трудова медицина (СТМ), така че работниците да имат пълна информация за проблема и свързаните с него рискове още преди постъпване на работа, така че тези от тях които преценят да се откажат още преди да са попаднали в среда с оловна експозиция. Необходимо е да се включи в предварителните медицински прегледи анализ на генотипа, така че да се дефинират хората с повишена чувствителност. Това ще осигури възможност те да не бъдат допускани на подобна работа или да бъдат подложени на по-чест и по-стриктен контрол, така че навреме да бъдат предприети мерки за отстраняване от вредната среда и/или адекватно лечение в клиника по професионални болести (КПЗ).

2. *Скрининг на всички работещи в среда с повишен риск от оловна интоксикация, определяне на генетичната им чувствителност и информирането им дали са с повишена чувствителност към олово с цел да направят информиран избор за професионалното си развитие или предприемане на мерки за по-стриктно наблюдение и превенция от интоксикация.*

За вече работещите в оловните производства е необходимо да бъде организиран повсеместен генетичен скрининг за работници с рисков генотип с помощта на службите по трудова медицина, възможно е да бъде включен в периодичните медицински прегледи. При дефиниране на индивиди с рисков генотип те да получават допълнителна информация за рисковете за тяхното здраве и да вземат информиран избор дали да останат на работа, дали могат да бъдат преместени на работно място с по-ниски нива на експозиция или ако това е невъзможно да бъдат подложени на по-чест контрол по отношение олово в кръвта, хематологични показатели и 5-АЛК в урина. При отклонения от нормата, показващи оловна интоксикация да бъдат своевременно лекувани в КПЗ.

3. *Участие на асоциациите на работодателите от оловния сектор и съответните служби по трудова медицина в активна колаборация с органите свързани с проблема, както на национално така и на европейско ниво*.

Повод за това предложение е неясната нормативна рамка, както на национално, така и на европейско ниво и липсата на колаборация и обективни данни от оловния сектор у нас. Освен това, България е сред водещите страни в Европейският съюз (ЕС) по обем на оловния сектор в националната и европейската индустрия. През 2019 година ЕС заема трето място в световното производство на олово с дял от 16 % и прираст от 2.7% спрямо предходната година. Най-голям производител в ЕС традиционно е Германия с относителен дял 19.6 %. и в сравнение с 2018 год. производството нараства с 4.4%. Великобритания заема втора позиция със 17.6 %, Италия има дял от 10.4 % . Произведеното в България общо олово през 2019 год. представлява 0.91 % от

световното и 5.72 % от това на ЕС при 0.905 % и 5.75 % за 2018 год. По обем на произведеното олово България е на седмо място от страните-производители в ЕС (на 6-то през 2018 г.). От друга страна, проблемът с оловната интоксикация при професионално експонирани се превръща в световен проблем. През месец април миналата година Европейската агенция по химикали (ECHA) направи призив относно преразглеждане на научните доказателства за нивата на олово при професионална експозиция на работното място. Целта е получаване на научно обоснована оценка относно нормативните стойности и прагове за минимална допустима експозиция на олово, което да не води до риск за здравето на работещите в преработвателната и рециклиращата промишленост. Този призив има за цел да събере информация за употребите, експозицията, влиянието върху здравето, токсикологията, епидемиологията и начините на действие на оловото и неговите съединения. Събраната информация ще бъде основата при изготвянето на обстоен научен доклад.

Повод за направения призив е, че Европейската комисия възлага на Европейската агенция по химикали (ECHA) през месец март миналата година съставяне на научната оценка на границата (ите) на професионална експозиция, биологичната гранична стойност (и), мерките за здравен надзор и/или подходящи обозначения за оловото и неговите съединения. Научните оценки на базираните на здравето пределни стойности на експозиция впоследствие ще се използват за подпомагане на регулаторните инициативи за граничните стойности на професионална експозиция за защита на работниците от химически рискове, които трябва да бъдат определени на равнището на Съюза в съответствие с Директивата за химичните агенти (Директива 98/24/ЕО). Заинтересовани страни по въпроса ще бъдат различни промишлени предприятия, научни академии, неправителствени организации, търговски асоциации и др.

Научният доклад за ограниченията на експозицията на олово, който ще бъде разработен въз основа на доказателствата, представени в обявения призив, впоследствие ще се оценява от Комитета за оценка на риска (RAC) на Европейската

агенция по химикали (ECHA) за разработване на тяхното становище. След като становището бъде прието в Комитета за оценка на риска (RAC), то ще бъде изпратено до Европейската комисия и ще се публикува на уебсайта на Европейската агенция по химикали (ECHA). Становището на Комитета за оценка на риска (RAC) ще се използва като подкрепа за Европейската комисия в регулаторния процес за установяване на граничните стойности на професионална експозиция за защита на работниците от химически рискове, които да бъдат определени на ниво Съюз съгласно Директивата за химичните агенти (Директива 98/24/ЕО). Становището на Комитета за оценка на риска (RAC) ще включва препоръка към Комисията, която да им даде възможност да информират Консултативния комитет по безопасност и здраве при работа (ACSH) с оглед изработване на законодателни инициативи валидни за целия ЕС. България, като водеща страна в ЕС в областта на добива, производството и преработката на олово може да заеме ключово място в този сложен процес.

10. Предложение за допълнителни мерки за превенция на отравянията

1. *Архитектурно – планировъчни*

В основата им стои интегрирането на най-новите архитектурни и инженерни постижения още при проектирането и строителството на сградите на съответните производства. Целта е да бъдат отделени чисто пространствено цеховете и помещенията с токсични производства, така че да се ограничи разпространението на токсични агенти на голяма площ и засягащо голям брой хора, включително работници непряко ангажирани в токсичното производство. Освен това още при избор на място за строителство на съответен завод, следва той да се построи в подветрената зона спрямо населеното място, така че посоката на вятъра да минава от населеното място през завода.

2. *Технологични*

Технологичните мерки са неизменна част от комплексните мерки за превенция и включват използването на най-новите съвременни технологии за производство, които се характеризират с много по-малко отделяне на токсични агенти в околния въздух, много по ефективни и по-малко енергоемки са. Те включват и преминаване от по-опасни към по-малко опасни за здравето технологии или замяна на опасното с безопасно или поне по-малко опасно. Инвестирането в нови технологии трябва да бъде неразделна част от плана за развитие на всяка компания.

3. *Технически*

Техническите мерки представляват непрекъсната техническа поддръжка и усъвършенстване на наличните технологии. Доказано е, че добре подържаните машини и апарати дават по-малко дефекти, работят в по-оптимален режим и отделят по-малко вредности. Техническите мерки включват също така и добавяне на нови

съоръжения като филтри от по-висок клас, въвеждане на мокрото бурене в мините, въвеждане на водни завеси, засмукваща вентилация и др.

4. Медицински

Медицинските мерки са едни от най – важните за опазване здравето и безопасността на работниците. Това са и мерките, които дават непрекъсната обратна връзка за ефективността на всички останали мерки и отчитат най – бързо и ефективно дали адаптирането и подобряването на останалите мерки дава желаният резултат. Към медицинските мерки спадат предварителните и периодични медицински прегледи – това са прегледи преди лицето да постъпи на работа и периодично в процеса на работа, при които могат да бъдат установени важни данни извеждане на лицето от вредното производство и евентуално лечение. Тук спадат и мерките за възстановяване на здравето и работоспособността на работещите чрез санаториално лечение, предпазно и професионално хранене, трудоустрояване или ранно пенсиониране чрез органите на ТЕЛК и НЕЛК.

5. Организационни

Организационните мерки са едни от най – важните мерки за опазване здравето и безопасността на работещите. Те водят до по-добра адаптация на организма към рисковите фактори на работната среда и дават възможност човек да упражнява професията си по-дълго време. Тук спадат организацията на работното време – продължителност на работният ден, режимите на труд и почивка, работата на смени, ротацията на работните места, създаване на помещения за отмора и/или лична хигиена особено важни за жените работещи в рискови производства.

6. *Индивидуални*

Докато всички останали мерки въздействат върху работните условия като цяло и засягат големи групи от хора, индивидуалните мерки са тези които въздействат конкретно и индивидуално върху съответният работник. Те трябва да се използват като добавка към всички останали мерки, а не да се разчита само на тях. Мерки за индивидуална защита, например са всички лични предпазни средства като очила, шлемове, респиратори, индивидуални защитни костюми и др.

VI ОБОБЩЕНИЕ

Данните за полиморфизма на ALAD G177C и оловното отравяне могат да бъдат обобщени по следния начин. При високи нива на експозиция и в сравнение с ALAD-1 индивиди, ALAD-2 индивиди имат повишени нива на олово в кръвта, по-ниски концентрации на аминолевулиновата киселина в плазмата, по-ниски цинк протопорфиринови нива, по-ниска концентрация на олово в кортикални кости, по-висока концентрация на олово в трабекуларен (спонгиозни) кости и по-ниски количества на подходящо за хелатиране с димеркаптосукцинова киселина (DMSA) олово. По този начин ALAD генотипът модифицира кинетиката на оловото, както в кръвта, така и в костите. Въпреки че хората с генотип ALAD-2 могат да достигнат по-високи нива на олово в кръвта при оловна експозиция, те могат да изпитат по-малко инхибиране на синтез на хема, отколкото хомозиготите по ALAD-1. Когато оловото се свързва и инхибира ензима ALAD, експресията на гена ALAD се увеличава в отговор на инхибицията (55, 26). Следователно, индивидите с генотип ALAD-2 може да са по-способни да компенсират отколкото ALAD-1 хомозиготите, тъй като повече олово се свързва с ALAD-2 ензима (21, 36).

Трудно е да се вземе решение кой генотип е генотипът "в риск", тъй като различните изследвания показват, че всеки генотип е по-податлив на един или повече неблагоприятни фактори в сравнение с другия. Допълнително затруднение е и използването на различни методи в проучванията (80). Налице е необходимост поради множество фактори, различни от експозицията на олово, те да бъдат оценени с подходящи статистически методи. Всъщност отговорът на въпроса, кои методи са най-подходящи за оценка на тежестта на оловна интоксикация и рискът за здравето на организма предстои да бъде намерен и затова заслужава обширна дискусия. В частност, липсата на сигурни данни за ефекта на този полиморфизъм по отношение крайни точки в проучванията, като когнитивни дефицити и/или невропсихологичните ефекти е обезпокоителна (136, 137, 148, 156). Освен това, повечето проучвания са използвали хора с професионална експозиция на олово с относително високи нива на експозицията (40, 81, 108). Преднамереност при избора на субектите на изследване е

често срещана в тези проучвания. Много малко проучвания са използвали проби от общата популация, за които нивата на експозиция обикновено са много по-ниски, отколкото в професионалните среди. И в проучванията в обща популация, и в проучванията в работна среда с олово, процентът на пробите включващи жени не е известен. По този начин е трудно да се направят изводи за общата популация. Резултатите от текущи изследователски проекти, които преодоляват тези проблеми, като използват проби от обща популация, могат да помогнат за разрешаването на тези въпроси.

VII ИЗВОДИ

- Разработена и валидирана е надеждна методология за откриване и анализ на алелна дискриминация на базата на ALAD генен полиморфизъм rs1800435 и определяне на съответния генотип, високо специфична за анализирания C/G SNP.
- За първи път е определена алелната честота и индивидуалните генотипове сред българска популация по отношение на rs1800435 полиморфизъм в гена ALAD.
- Уставновена е зависимост на по-високи концентрации на олово в кръвта, занижени нива на хемоглобин и повишена уринна екскреция на ДАЛК при АЛАД–2 хетерозиготите, доказващо връзката между генотипа и индивидуалната чувствителност към олово. Анализът на резултатите позволява разработването на здравно-промоционална стратегия за превенция на здравето на работното място.
- В комбинация с тютюнопушенето, изследвания генетичен терен (rs1800435) може да бъде сериозна предпоставка за повишен риск от оловна интоксикация.
- Анализът на резултатите позволява разработването на здравно-промоционална стратегия за превенция на здравето на работното място.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящето проучване е първо за българската популация. Установяват се тенденции на зависимост между нивата на олово в кръвта и геноптипното разпределение. Необходимо е да се разшири бройката на изследваните лица, с цел проучване на зависимостта и оценка на статистическата достоверност. Необходимо е да се изследва и контролна, неекспонирана на олово група. Трудно е да се вземе решение, кой генотип е в действителност генотипът "в риск", тъй като резултатите показват, че всеки генотип е по-податлив на един или повече неблагоприятни ефекти в сравнение с другите. Влиянието на гените върху оловната интоксикация все още се определя. Най-известният ген в това отношение е ALAD ген, който е добре проучен в човешките популации и животинските модели. Генетичният полиморфизъм изглежда има силно влияние върху абсорбцията и биоакумулирането на оловото, но неговата роля в засягането на невротоксичността на олово е все още неясно. Необходими са бъдещи изследвания и в тази насока.

VIII ПРИНОСИ

ПРИНОСИ С ПРИЛОЖНО - МЕТОДОЛОГИЧЕН ХАРАКТЕР

- ✓ Разработена и въведена е бърза, точна и надеждна молекулярно-генетична методология за алелна дискриминация на базата на ALAD генен полиморфизъм *rs1800435C/G* и определяне на съответния генотип.
- ✓ Използвайки предложената методология, веднъж открит и определен SNP *rs1800435C/G* представлява възможност за използване като прогнозен биомаркер за превенция на оловна интоксикация.
- ✓ Разработено и публикувано е предложение за здравно-промоционална стратегия за превенция на здравето на работното място и предложение за допълнителни мерки за превенция на отравянията.

ПРИНОСИ С НАУЧНО - ТЕОРЕТИЧЕН ХАРАКТЕР

- ✓ За първи път е определена и охарактеризирана алелната честота и честотата на генотиповете по отношение на rs1800435C/G полиморфизъм в гена ALAD сред българската популация.
- ✓ Получените резултати от молекулярно-генетичните анализи демонстрират, че 23 % от изследваната популация са хетерозиготни по ALAD-2. По резултатите от настоящото проучване и по литературни данни е налице повишен риск за хетерозиготни по ALAD-2 изследвани лица.
- ✓ При индивидите с хетерозиготен CG генотип като цяло се наблюдават по-високи нива на олово в кръвта спрямо индивидите с хомозиготен CC генотип при еднаква или сходна експозиция на олово в работната среда.

IX ЛИТЕРАТУРА

1. *Балабанов Ц, Гаврилова М, Георгиева Е, Мечкуева Л, Георгиева Р. Хигиенно проучване на степента на замърсяване на почвата с олово в детски заведения на територията на гр. София. Проблеми на хигиената, 25 (1) – (2004)*
2. *Балабанов Ц, Георгиева Р, Гавраилова М, Мечкуева Л. Замърсяване на почвата с олово и оценка на здравния риск за децата - Проблеми на хигиената, 22 (2), 20–24 (2001). – 2001*
3. *Георгиева Р, Караджова И, Караджов М. Съдържание на токсични елементи (As, Cd, Pb) във водите и рибите на язовир в Северозападна България. Науката за хранене между дискусиите и доказателствата, ред. Б. Попов, Българско дружество по хранене и диететика, Везни-4, София, 44-47 (2012).*
4. *Кунева Т, Иванова Ир, Тодорова Е, Бояджиева В, Йосифчева Кр. Здравно състояние на работещи в акумулаторно производство. Годишник на СУ „Св. Кл. Охридски“, МФ, 2015, Том 1, 198-208*
5. *Станкова Д, Паунова Г, Георгиева Р. Съдържание на олово, кадмий, живак и хром в изделия от полимерни материали. Сборник доклади от Годишна университетска научна конференция 2018 на Национален военен университет „Васил Левски“ - гр. Велико Търново, 14 15 юни 2018 г. 410-417, E-ISBN-13: 978-619-7246-20-9*
6. *“Contribution de la pollution atmosphérique extérieure en pathologie respiratoire” [The contribution of outdoor atmospheric pollution in respiratory pathology]. Revue des maladies respiratoires vol. 14 Suppl 6 (1997): S1-63.*
7. *A. Moreira, et all Genotyping an ALAD Polymorphism with Real-Time PCR in Two Populations from the Iberian Peninsula, Biochem Genet DOI 10.1007/s10528-012-9500-x, Springer Science+Business Media, LLC, 2012*
8. *Alexander, B H et al. “Interaction of blood lead and delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead*

smelter workers." Environmental health perspectives vol. 106,4 (1998): 213-6. doi:10.1289/ehp.98106213

9. *Amaya, Maria A et al. "Blood lead in the 21st Century: The sub-microgram challenge." Journal of blood medicine vol. 1 (2010): 71-8. doi:10.2147/JBM.S7765*
10. *Astrin KH, Bishop DF, Wetmur JG, et al. δ-Aminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. Ann N Y Acad Sci 1987;514:23–9.*
11. *Baghurst PA, McMichael AJ, Wigg NR. Environmental exposure to lead and children's intelligence at the age of seven years: The Port Pirie Cohort Study. N Engl J Med 1992;327: 1279–84.*
12. *Banks EC, Ferretti LE, Shucard DW. Effects of low level lead exposure on cognitive function in children: a review of behavioral, neuropsychological and behavioral evidence. Neurotoxicology 1997;18:237–81.*
13. *Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ (2005) A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. Environ Health Perspect 113(12):1669–1674*
14. *Barker DJP. Fetal growth and adult disease. BJOG Int J Obstet Gynaecol 1992;99(4):275-276.*
15. *Battistuzzi G, Petrucci R, Silvagni L, et al. δ-Aminolevulinatedehydrase: a new genetic polymorphism in man. Ann HumGenet 1981;45:223–9.*
16. *Bellinger D, Dietrich KN. Low-level lead exposure and cognitive function in children. Pediatr Ann 1994;23:600–5.*
17. *Bellinger D, Hu H, Titlebaum L, et al. Attentional correlates of dentin and bone lead levels in adolescents. Arch Environ Health 1994;49:98–105.*
18. *Ben-Ezzer J, Oelsner H, Szeinberg A. Genetic polymorphism of delta-aminolevulinate dehydrase in several population groups in Israel. Human heredity. 1987;37(4):229-32.*

19. *Bergdahl IA, Grubb A, Schütz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Sassa S, et al. Lead binding to δ-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. Pharmacol Toxicol 1997;81(4):153-158.*
20. *Bergdahl IA, Sheveleva M, Schutz A, Artamonova VG, Skerfving S. Plasma and blood lead in humans: Capacity-limited binding to δ- aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components. Toxicol Sci 1998;46(2):247-253.*
21. *Bergdahl IA, Skerfving S, Lead, Handbook on the Toxicology of Metals, 10.1016/B978-0-12-822946-0.00036-2, 2022, (427-493).*
22. *Bergdahl, Ingvar A. et al. "Delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: influence on lead levels and kidney function in humans." Archives of environmental health 52 2 (1997): 91-6 .*
23. *Bernard, B.P., Becker, C.E.: Environmental lead exposure and kidney. Clin Chem Toxicol 26, 1-34 1988.*
24. *Bibi K, Shah MH. Study of Essential and Toxic Metal Imbalances in the Scalp Hair of Thyroid Cancer Patients in Comparison with Healthy Donors. Biol Trace Elem Res. 2021 Feb;199(2):500-512. doi: 10.1007/s12011-020-02186-9. Epub 2020 May 14. PMID: 32405688.*
25. *Blake KC, Mann M. Effect of calcium and phosphorus on the gastrointestinal absorption of 203 Pb in man. Environ Res 1983; 30:188–94.*
26. *Boudene C, Despaux-Pages N, Comoy E, et al. Immunological and enzymatic studies of erythrocytic δ-aminolevulinate dehydratase: comparison of results obtained in normal and lead-exposed subjects. Int Arch Occup Environ Health 1984;55:57–96.*
27. *Boudène, C. "L'apport alimentaire en plomb; son importance dans l'évaluation de l'exposition de l'homme à ce toxique" [Oral lead intake; its importance in the evaluation of man's exposure to this toxic agent]. Bulletin de l'Academie nationale de medecine vol. 166,9 (1982): 1323-31.*

28. *Bozack AK, Cardenas A, Geldhof J, Quamruzzaman Q, Rahman M, Mostofa G, et al. Cord blood DNA methylation of DNMT3A mediates the association between in utero arsenic exposure and birth outcomes: Results from a prospective birth cohort in Bangladesh. Environ Res 2020;183.*
29. *Brennan MJ, Cantrill RC. δ-Aminolaevulinic acid is a potent agonist for GABA autoreceptors. Nature 1979;280:514–15.*
30. *Brodie, M J et al. "The treatment of acute intermittent porphyria with laevulose." Clinical science and molecular medicine vol. 53,4 (1977): 365-71. doi:10.1042/cs0530365*
31. *Brown, Mary Jean, and Stephen Margolis. "Lead in drinking water and human blood lead levels in the United States." MMWR supplements vol. 61,4 (2012): 1-9.*
32. *Brunekreef, Bert. "Health effects of air pollution observed in cohort studies in Europe." Journal of exposure science & environmental epidemiology vol. 17 Suppl 2 (2007): S61-5. doi:10.1038/sj.jes.7500628*
33. *Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the menkes gene. Nat Genet 1993;5(4):327-337.*
34. *Campagna, Dave et al. "Environmental lead exposure and activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in maternal and cord blood." Toxicology 134 2-3 (1999): 143-52*
35. *Cartwright GE, Edwards CQ, Kravitz K, Skolnick M, Amos DB, Johnson A, et al. Hereditary Hemochromatosis: Phenotypic Expression of the Disease. New Engl J Med 1979;301(4):175-179.*
36. *Çetin T, Samadi A, Reçber T, Dinçer AK, Eser B, Yalcinkaya A, Nemutlu E, Öztaş Y, Lay I, Sabuncuoğlu S. Possible Effect of Chelation Treatment on Metabolomic and Lipidomic Analysis in Lead Exposure. J Occup Environ Med. 2022 May*

1;64(5):e284-e290. doi: 10.1097/JOM.0000000000002503. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35121693.

37. *Chavatte, Laurent et al. "Elemental and molecular imaging of human full thickness skin after exposure to heavy metals." Metallomics : integrated biometal science vol. 12,10 (2020): 1555-1562. doi:10.1039/d0mt00121j*
38. *Chi L, Xue J, Tu P, Lai Y, Ru H, Lu K. Gut microbiome disruption altered the biotransformation and liver toxicity of arsenic in mice. Arch Toxicol 2019;93(1):25-35.*
39. *Chisolm JJ Jr, Thomas DJ, Hamill TG. Erythrocyte porphobilinogen synthase activity as an indicator of lead exposure in children. Clin Chem 1985;31:601–5.*
40. *da Cunha Martins A et all. Effects of Lead Exposure and Genetic Polymorphisms on ALAD and GPx Activities in Brazilian Battery Workers, J Toxicol Environ Health A. 2015;78(16):1073-8*
41. *de Moraes Meine, Bernardo et al. "Chemical hypermethioninemia in young mice: oxidative damage and reduction of antioxidant enzyme activity in brain, kidney, and liver." Metabolic brain disease, 10.1007/s11011-022-01107-0. 29 Oct. 2022, doi:10.1007/s11011-022-01107-0*
42. *Deng G, Nguyen A, Tanaka H, Matsuzaki K, Bell I, Mehta KR, et al. Regional hypermethylation and global hypomethylation are associated with altered chromatin conformation and histone acetylation in colorectal cancer. Int J Cancer 2006;118(12):2999-3005.*
43. *Diawara, Moussa M et al. "Smelting Remains a Public Health Risk Nearly a Century Later: A Case Study in Pueblo, Colorado, USA." International journal of environmental research and public health vol. 15,5 932. 7 May. 2018, doi:10.3390/ijerph15050932*
44. *Dosa, Melodj et al. "Natural Zeolite Clinoptilolite Application in Wastewater Treatment: Methylene Blue, Zinc and Cadmium Abatement Tests and Kinetic*

Studies." Materials (Basel, Switzerland) vol. 15,22 8191. 18 Nov. 2022, doi:10.3390/ma15228191

45. *Doss M, Laubenthal F, Stoeppler M. Lead poisoning in inherited δ-aminolevulinic acid dehydratase deficiency. Int Arch Occup Environ Health 1984;54:55–63.*
46. *El-Far, Ali H et al. "Hepatoprotective efficacy of Nigella sativa seeds dietary supplementation against lead acetate-induced oxidative damage in rabbit - Purification and characterization of glutathione peroxidase." Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie vol. 89 (2017): 711-718. doi:10.1016/j.biopha.2017.02.044*
47. *Engel LS, Taioli E, Pfeiffer R, Garcia-Closas M, Marcus PM, Lan Q, et al. Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: A HuGE review. Am J Epidemiol 2002;156(2):95-109.*
48. *Engström K, Vahter M, Mlakar SJ, Concha G, Nermell B, Raqib R, et al. Polymorphisms in arsenic(+III oxidation state) methyltransferase (AS3MT) predict gene expression of AS3MT as well as arsenic metabolism. Environ Health Perspect 2011;119(2):182-188.*
49. *Feng Q, Chen W-, Wang Y-. Gut microbiota: An integral moderator in health and disease. Front Microbiol 2018;9(FEB).*
50. *Fleming, David E. B. et al. "Effect of the delta-aminolevulinate dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers." Environmental research 77 1 (1998): 49-61 .*
51. *Fouad, A.A., Foda, N.T., Diab, I.H. et al. Evaluation of possible molecular toxicity induced by occupational exposure to lead and concomitant effect of smoking. Environ Sci Pollut Res 27, 411–423 (2020). https://doi.org/10.1007/s11356-019-06879-0*
52. *Friscancho AR, Ryan AS. Decreased stature associated with moderate blood lead concentrations in Mexican-American children. Am J Clin Nutr 1991;54:516–19.*

53. *Fu, Zhushan, and Shuhua Xi. "The effects of heavy metals on human metabolism." Toxicology mechanisms and methods vol. 30,3 (2020): 167-176. doi:10.1080/15376516.2019.1701594*

54. *Fujihara J, Agusa T, Yasuda T, Soejima M, Kato H, Panduro A, Koda Y, Kimura-Kataoka K, Takeshita H. Ethnic variation in genotype frequencies of δ-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD). Toxicology letters. 2009 Dec 15;191(2-3):236-9.*

55. *Fujita H, Sato K, Sano S. Increase in the amount of erythrocyte δ-aminolevulinate dehydratase in workers with moderate lead exposure. Int Arch Occup Environ Health 1982;50:287–97.*

56. *Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. Science 2003;300(5618):489-492.*

57. *Gérard P. Gut microbiota and obesity. Cell Mol Life Sci 2016;73(1):147-162.*

58. *Gerhardsson, L., et al., Blood lead concentration after a shotgun accident. Environ Health Perspect, 2002. 110(1): p. 115-7.*

59. *Gollan JL. Wilson disease in 1998: Genetic, diagnostic and therapeutic aspects. J Hepatol Suppl 1998;28(1):28-36.*

60. *Goyer RA. Toxic effects of metals. In: Klaassen CD, ed. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 5th ed. New York, NY: McGraw-Hill Book Company, 1996: 691–736.*

61. *Haar, G T, and R Aronow. "New information on lead in dirt and dust as related to the childhood lead problem." Environmental health perspectives vol. 7 (1974): 83-9. doi:10.1289/ehp.74783*

62. *Haider, Muhammad Jamal, and Naeemullah Qureshi. "Studies on battery repair and recycling workers occupationally exposed to lead in Karachi." Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny vol. 64,1 (2013): 37-42.*

63. *Han, Zhixuan et al. "Blood lead levels of children in urban and suburban areas in China (1997-2015): Temporal and spatial variations and influencing factors." The Science of the total environment vol. 625 (2018): 1659-1666. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.315*

64. *Hashibe M, Brennan P, Strange RC, Bhisey R, Cascorbi I, Lazarus P, et al. Meta- and Pooled Analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 Genotypes and Risk of Head and Neck Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003;12(12):1509-1517.*

65. *Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105(44):17046-17049.*

66. *Hicks, R M. "Air-borne lead as an environmental toxin. A review." Chemico-biological interactions vol. 5,6 (1972): 361-90. doi:10.1016/0009-2797(72)90075-0*

67. *Horiuchi, K, and S Horiguchi. "An attempt to assume absorption and excretion of lead in the healthy Japanese population." Osaka city medical journal vol. 17,1 (1971): 19-23.*

68. *Hu, H. et al. "The delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and bone and blood lead levels in community-exposed men: the Normative Aging Study." Environmental Health Perspectives 109 (2001): 827 - 832.*

69. *IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, volume 98 (2010)*

70. *Ilyas A, Shah MH. Disparities of Selected Metal Levels in the Blood and Scalp Hair of Ischemia Heart Disease Patients and Healthy Subjects. Biol Trace Elem Res. 2017*

Dec;180(2):191-205. doi: 10.1007/s12011-017-1021-3. Epub 2017 Apr 20. PMID: 28424967.

71. *Jaffe EK, Bagla S, Michini PA. Reevaluation of a sensitive indicator of early lead exposure: measurement of porphobilinogen synthase in blood. Biol Trace Element Res 1991;28: 223–31.*
72. *Jahandari, Ashkan. "Pollution status and human health risk assessments of selected heavy metals in urban dust of 16 cities in Iran." Environmental science and pollution research international vol. 27,18 (2020): 23094-23107. doi:10.1007/s11356-020-08585-8*
73. *Jaishankar, M., et al., Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. Interdiscip Toxicol, 2014. 7(2): p. 60-72.*
74. *Järup, Lars. "Hazards of heavy metal contamination." British medical bulletin vol. 68 (2003): 167-82. doi:10.1093/bmb/ldg032*
75. *Jordan, P M. "Highlights in haem biosynthesis." Current opinion in structural biology vol. 4,6 (1994): 902-11. doi:10.1016/0959-440x(94)90273-9*
76. *Joubert BR, Håberg SE, Nilsen RM, Wang X, Vollset SE, Murphy SK, et al. 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. Environ Health Perspect 2012;120(10):1425-1431.*
77. *Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, et al. The porphyrias. In:Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, eds. The metabolic and molecular basis of inherited disease. 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill Book Company, 1995:2103–59.*
78. *Kayaalti Z, Akyüzlü DK, Söylemezoğlu T. Evaluation of the effect of divalent metal transporter 1 gene polymorphism on blood iron, lead and cadmium levels. Environ Res 2015;137:8-13.*

79. *Kayaalti Z, Kaya-Akyüzlü D, Söylemez E, Söylemezoğlu T. Maternal hemochromatosis gene H63D single-nucleotide polymorphism and lead levels of placental tissue, maternal and umbilical cord blood. Environ Res 2015;140:456-461.*

80. *Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ. Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. Am J Epidemiol. 2001 Jul 1;154(1):1-13.*

81. *Kim HS et all., The Protective Effect of δ-Aminolevulinic Acid Dehydratase 1-2 and 2-2 Isozymes against Blood Lead with Higher Hematologic Parameters , 2008*

82. *Kisser, W. "Biochemische Methoden zum Nachweis der Bleivergiftung" [Biochemical methods for the detection of lead poisoning (author's transl)]. Archives of toxicology vol. 37,3 (1977): 173-93. doi:10.1007/BF00355487*

83. *Kuykendall, Jim R et al. "Chemicals present in automobile traffic tunnels and the possible community health hazards: a review of the literature." Inhalation toxicology vol. 21,9 (2009): 747-92. doi:10.1080/08958370802524357*

84. *Lalouel JM, Le Mignon L, Simon M, Fauchet R, Bourel M, Rao DC, et al. Genetic analysis of idiopathic hemochromatosis using both qualitative (disease status) and quantitative (serum iron) information. Am J Hum Genet 1985;37(4):700-718.*

85. *Lanphear BP, Byrd RS, Auinger P, et al. Community characteristics associated with children's blood lead levels. Pediatrics 1998;101:264–71.*

86. *Lanphear BP, Dietrich KN, Auinger P, et al. Subclinical lead toxicity in U.S. children and adolescents. (Abstract). Pediatr Res 2000;47(suppl):152A.*

87. *Leroyer, Ariane et al. "Influence Of Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Gene Polymorphism on Selected Lead Exposure Biomarkers in a Cohort of Ex-Smelter Workers." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 76 (2013): 895 - 906.*

88. *Leung, F. Y. et al. "Reference intervals for blood lead and evaluation of zinc protoporphyrin as a screening test for lead toxicity." Clinical biochemistry 26 6 (1993): 491-6 .*

89. *Lin-Fu JS. Vulnerability of children to lead exposure and toxicity: part one. N Engl J Med 1973;289:1229–33.*

90. *Lipfert, Frederick W et al. "Air pollution and survival within the Washington University-EPRI veterans cohort: risks based on modeled estimates of ambient levels of hazardous and criteria air pollutants." Journal of the Air & Waste Management Association (1995) vol. 59,4 (2009): 473-89.*

91. *Louis, Elan D. et al. "Interaction between blood lead concentration and δ-amino-levulinic acid dehydratase gene polymorphisms increases the odds of essential tremor." Movement Disorders 20 (2005): n. pag.*

92. *Luo, Tingyu et al. "Association between combined exposure to plasma heavy metals and dyslipidemia in a chinese population." Lipids in health and disease vol. 21,1 131. 6 Dec. 2022, doi:10.1186/s12944-022-01743-6*

93. *Mahaffey K, McKinney J, Reigart JR. Lead and compounds.In: Lippmann M, ed. Environmental toxicants, human exposures and their health effects. 2nd ed. New York, NY: John Wiley and Sons, Inc, 2000:481–521.*

94. *Mahaffey KR, Gartside PS, Glueck CJ. Blood lead levels and dietary calcium intake in 1–11-year-old children: the Second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976–1980. Pediatrics 1986;78:257–62.*

95. *Mahaffey KR. Nutrition and lead: strategies for public health.Environ Health Perspect 1995;103(suppl 6):191–6.*

96. *Mahaffey, K R. "Quantities of lead producing health effects in humans: sources and bioavailability." Environmental health perspectives vol. 19 (1977): 285-95. doi:10.1289/ehp.7719285*

97. *Mahaffey-Six K, Goyer RA. Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. J Lab Clin Med 1972; 76:933–42.*

98. *Mañay, Nelly et al. "Lead contamination in Uruguay: the "La Teja" neighborhood case." Reviews of environmental contamination and toxicology vol. 195 (2008): 93-115.*

99. *Mandić-Rajčević, Stefan et al. "Environmental and take-home lead exposure in children living in the vicinity of a lead battery smelter in Serbia." Environmental research vol. 167 (2018): 725-734. doi:10.1016/j.envres.2018.08.031*

100. *Mani, Monica Shirley et al. "Modifying effects of δ-Aminolevulinate dehydratase polymorphism on blood lead levels and ALAD activity." Toxicology letters vol. 295 (2018): 351-356. doi:10.1016/j.toxlet.2018.07.014*

101. *Martin EM, Fry RC. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure-Associated DNA Methylation in Human Populations. Annu Rev Public Health 2018;39:309-333.*

102. *Mazidi M, Kirwan R, Davies IG. Genetically determined blood lead is associated with reduced renal function amongst individuals with type 2 diabetes mellitus: insight from Mendelian Randomisation. J Mol Med (Berl). 2022 Jan;100(1):125-134. doi: 10.1007/s00109-021-02152-5. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34661687; PMCID: PMC8724171.*

103. *McElvaine MD, Orbach HG, Binder S, et al. Evaluation of erythrocyte protoporphyrin test as a screen for elevated blood lead levels, Chicago, Illinois, 1988–1989. J Pediatr 1991;119: 548–50.*

104. *Mielke, Howard W et al. "Lead in Air, Soil, and Blood: Pb Poisoning in a Changing World." International journal of environmental research and public health vol. 19,15 9500. 2 Aug. 2022, doi:10.3390/ijerph19159500*

105. *Mitchell, D G. "Lead contamination in milks fed to infants: 1972-1973. Paint is not the only problem." Pediatrics vol. 53,2 (1974): 142-3.*

106. *Mohamed, Omnia Ismail et al. "Ginger extract modulates Pb-induced hepatic oxidative stress and expression of antioxidant gene transcripts in rat liver." Pharmaceutical biology vol. 54,7 (2016): 1164-72. doi:10.3109/13880209.2015.1057651*

107. *Momcilović, B. "Metabolizam olova s posebnim osvrtom na problem izlozenosti stanovnistva" [Lead metabolism with special reference to the problem of population exposure]. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju vol. 24,2 (1973): 131-87.*

108. *Montenegro, Marcelo F et al. "A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio." Archives of toxicology vol. 80,7 (2006): 394-8. doi:10.1007/s00204-005-0056-y*

109. *Muller WE, Snyder SH. δ-Aminolevulinic acid: influences on synaptic GABA receptor binding may explain CNS symptoms of porphyria. Ann Neurol 1977;2:340–2.*

110. *National Institute for Occupational Safety and Health.Protecting workers exposed to lead-based paint hazards: a report to Congress. Cincinnati, OH: National Institute for Occupational Safety and Health, 1997.*

111. *National Research Council, National Academy of Sciences.Measuring lead exposure in infants, children, and other sensitive populations. Washington, DC: National Academy Press, 1990.*

112. *Olowoyo, Joshua O et al. "Concentrations of Pb and Other Associated Elements in Soil Dust 15 Years after the Introduction of Unleaded Fuel and the Human Health Implications in Pretoria, South Africa." International journal of environmental research and public health vol. 19,16 10238. 18 Aug. 2022, doi:10.3390/ijerph191610238*

113. *Olowoyo, Joshua Oluwole et al. "Health Risk Assessment of Trace Metals in Bottled Water Purchased from Various Retail Stores in Pretoria, South Africa." International journal of environmental research and public health vol. 19,22 15131. 16 Nov. 2022, doi:10.3390/ijerph192215131*

114. *Osterlow JF, Sharp DS, Hata B. Quality control data for low blood lead concentrations by three methods used in clinical studies. J Anal Toxicol 1990;14:8–11.*

115. *Otto DA, Fox DA. Auditory and visual dysfunction following lead exposure. Neurotoxicology 1993;14:191–207.*

116. *Pérez-Bravo, Francisco et al. "Association Between Aminolevulinate Dehydrase Genotypes and Blood Lead Levels in Children from a Lead-Contaminated Area in Antofagasta, Chile." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 47 (2004): 276-280.*

117. *Pidetcha, P et al. "Delta-aminolevulinic acid dehydratase and delta-amino levulinic acid as an index of asymptomatic industrial lead workers." Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet vol. 73,11 (1990): 624-8.*

118. *Pirkle JL, Kaufmann RB, Brody DJ, et al. Exposure of the U.S. population to lead, 1991–1994. Environ Health Perspect 1998; 11:745–50.*

119. *Qader, Abdul et al. "Genetic susceptibility of δ-ALAD associated with lead (Pb) intoxication: sources of exposure, preventive measures, and treatment interventions." Environmental science and pollution research international vol. 28,33 (2021): 44818-44832. doi:10.1007/s11356-021-15323-1*

120. *Rabstein, Sylvia et al. "Lack of Association of Delta-Aminolevulinate Dehydratase Polymorphisms with Blood Lead Levels and Hemoglobin in Romanian Women from a Lead-Contaminated Region." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 71 (2008): 716 - 724.*

121. *Rehman, Kanwal et al. "Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences." Journal of cellular biochemistry vol. 119,1 (2018): 157-184. doi:10.1002/jcb.26234*

122. *Renu, Kaviyarasi et al. "Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity - A review." Chemosphere vol. 271 (2021): 129735. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.129735*

123. *Richtová, Jitka et al. "Using Diatom and Apicomplexan Models to Study the Heme Pathway of Chromera velia." International journal of molecular sciences vol. 22,12 6495. 17 Jun. 2021, doi:10.3390/ijms22126495*

124. *Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: Past, present and future directions. Carcinogenesis 2000;21(3):461-467.*

125. *Rogan WJ, Reigart JR, Gladen BC. Association of aminolevulinate dehydratase levels and ferrochelatase inhibition in childhood lead exposure. J Pediatr 1986;109:60–4.*

126. *Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Cell Mol Life Sci 2019;76(8):1541-1558.*

127. *Sakai, Tadashi et al. "Relationship between delta-aminolevulinic acid dehydratase genotypes and heme precursors in lead workers." American journal of industrial medicine 38 3 (2000): 355-60 .*

128. *Sargent JD, Brown MJ, Freeman JL, et al. Childhood lead poisoning in Massachusetts communities: its association with sociodemographic and housing characteristics. Am J Public Health 1995;85:528–34.*

129. *Schutz AS, Skervfing J, Christoffersson JO. Chelatable level versus lead in human trabecular and compact bone. Sci Total Environ 1987;68:45–59.*

130. *Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, et al. Associations of δ-aminolevulinic acid dehydratase genotype with plant, exposure duration, and blood lead and zinc protoporphyrin levels in Korean lead workers. Am J Epidemiol 1995;142:738–45.*

131. *Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, et al. δ-Aminolevulinic acid dehydratase genotype modifies four hour urinary lead excretion after oral administration of dimercaptosuccinic acid. Occup Environ Med 1997;54:241–6.*

132. *Schwartz J. Low-level lead exposure and children's IQ: a meta-analysis and search for a threshold. Environ Res 1994; 65:42–55.*

133. *Schwartz KB, Cheng J, Reddy V, Fone M, Fisher H. Adv.X-ray Anal. 1995:38.*

134. *Schwartz, Brian S. et al. "Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid-chelatable lead, and tibia lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and [delta]-aminolevulinic acid dehydratase genes." Environmental Health Perspectives 108 (2000): 949 - 954.*

135. *Schwartz, Brian S. et al. "Associations of subtypes of hemoglobin with delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and dimercaptosuccinic acid-chelatable lead levels." Archives of environmental health 52 2 (1997): 97-103 .*

136. *Scinicariello, Franco et al. "Lead and δ-Aminolevulinic Acid Dehydratase Polymorphism: Where Does It Lead? A Meta-Analysis." Environmental Health Perspectives 115 (2006): 35 - 41.*

137. *Shaik, Apsar and Kaiser Jamil. "A study on the ALAD gene polymorphisms associated with lead exposure." Toxicology and Industrial Health 24 (2008): 501 - 506.*

138. *Shaw, J C. "Evidence for defective skeletal mineralization in low-birthweight infants: the absorption of calcium and fat." Pediatrics vol. 57,1 (1976): 16-25.*

139. *Shtenberg, A I, and G N Zaeva. "Rol' svintsa kak faktora, vozdeĭstvuiushchego cherez pishchu na vnutrenniuiu sredu organizma" [Role of lead*

as a factor affecting, via food, the internal medium of the body]. Vestnik Akademii meditsinskikh nauk SSSR ,3 (1978): 78-82.

140. Siha, Mona Sobhi et al. "Effects of delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Gene Polymorphism on Hematological Parameters and Kidney Function of Lead-exposed Workers." The international journal of occupational and environmental medicine vol. 10,2 (2019): 89-93. doi:10.15171/ijoem.2019.1629

141. Sithisarankul P, Schwartz BS, Lee BK, et al. Aminolevulinic acid dehydratase genotype mediates plasma levels of the neurotoxin, 5-aminolevulinic acid, in lead-exposed workers. Am J Ind Med 1997;32:15–20.

142. Smeester L, Fry RC. Long-Term Health Effects and Underlying Biological Mechanisms of Developmental Exposure to Arsenic. Curr Environ Health Rep 2018;5(1):134-144.

143. Smith CM, Wang X, Hu H, et al. A polymorphism in the δ-aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. Environ Health Perspect 1995;103:248–53.

144. Szymańska-Chabowska, Anna et al. "The relationship between selected VDR, HFE and ALAD gene polymorphisms and several basic toxicological parameters among persons occupationally exposed to lead." Toxicology vol. 334 (2015): 12-21. doi:10.1016/j.tox.2015.05.002

145. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the menkes disease gene. Nat Genet 1993;5(4):344-350.

146. Teschke, Rolf. "Aluminum, Arsenic, Beryllium, Cadmium, Chromium, Cobalt, Copper, Iron, Lead, Mercury, Molybdenum, Nickel, Platinum, Thallium, Titanium, Vanadium, and Zinc: Molecular Aspects in Experimental Liver Injury." International journal of molecular sciences vol. 23,20 12213. 13 Oct. 2022, doi:10.3390/ijms232012213

147. *Tikka C, Manthari RK, Ommati MM, Niu R, Sun Z, Zhang J, et al. Immune disruption occurs through altered gut microbiome and NOD2 in arsenic induced mice: Correlation with colon cancer markers. Chemosphere 2020;246.*

148. *Wananukul, Winai et al. "Polymorphism of Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase and Its Effect on Blood Lead Levels in Thai Workers." Archives of Environmental & Occupational Health 61 (2006): 67 - 72.*

149. *Warren MJ, Cooper JB, Wood SP, et al. Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. Trends Biochem Sci 1998;23:217–21.*

150. *Waterland RA, Michels KB. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. Annu Rev Nutr 2007;27:363-388.*

151. *Wetmur JG, Bishop DF, Cantelmo C, et al. Human δ-aminolevulinate dehydratase: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. Proc Natl AcadSci U S A 1986;83:7703–*

152. *Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ. Molecular characterization of the human δ-aminolevulinate dehydratase 2 (ALAD2) allele: Implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. Am J Hum Genet 1991;49(4):757-763.*

153. *Wetmur JG, Lehnert G, Desnick RJ. The δ-aminolevulinate dehydratase polymorphism: higher blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1-2 and 2-2 isozymes. Environ Res 1991;56:109–19.*

154. *Wetmur JG. Influence of the common human δ-aminolevulinate dehydratase polymorphism on lead body burden. Environ Health Perspect 1994;102(SUPPL. 3):215-219.*

155. *Wetmur, J G et al. "Molecular characterization of the human delta-aminolevulinate dehydratase 2 (ALAD2) allele: implications for molecular screening*

of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning." American journal of human genetics vol. 49,4 (1991): 757-63.

156. *Weuve, Jennifer et al. "Delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism and the relation between low level lead exposure and the Mini-Mental Status Examination in older men: the Normative Aging Study." Occupational and Environmental Medicine 63 (2006): 746 - 753.*

157. *Wong WP, Allen NB, Meyers MS, Link EO, Zhang X, MacRenaris KW, et al. Exploring the Association between Demographics, SLC30A8 Genotype, and Human Islet Content of Zinc, Cadmium, Copper, Iron, Manganese and Nickel. Sci Rep 2017;7(1).*

158. *Wu, Ming-Tsang et al. "A delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism may modify the relationship of low-level lead exposure to uricemia and renal function: the normative aging study." Environmental Health Perspectives 111 (2002): 335 - 341.*

159. *Wu, Shenghu et al. Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research vol. 33,2 (2004): 226-8, 232.*

160. *Yan C, Boyd DD. Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression. Mol Cell Biol 2006;26(17):6357-6371.*

161. *Yang, Hong et al. Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi = Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi = Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases vol. 33,6 (2015): 403-8.*

162. *Yang, Yuelin et al. "Effects of Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Polymorphisms on Susceptibility to Lead in Han Subjects from Southwestern China." International Journal of Environmental Research and Public Health 9 (2012): 2326 - 2338.*

163. *Yaqoob, Azka et al. "Biochemical profiling of metabolomics in heavy metal-intoxicated impaired metabolism and its amelioration using plant-based bioactive compound." Frontiers in molecular biosciences vol. 9 1029729. 18 Oct. 2022, doi:10.3389/fmolb.2022.1029729*

164. *Zaĭtseva, N V et al. "Vliianie na zdorov'e naseleniia vybrosov svintsa avtotransportom" [The effect on the health of the population of the lead exhaust from vehicular traffic]. Gigiena i sanitariia ,3 (1999): 3-4.*

165. *Zhang, Jiusong et al. "Relation between Polymorphism of δ-Aminolevulinic Acid Dehydratase and Some Parameters in Lead Workers." Journal of Occupational Health 40 (1998): n. pag.*

166. *Zhao Y, Wang L, Shen H-, Wang Z-, Wei Q-, Chen F. Association between δ-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and blood lead levels: A meta-regression analysis. J Toxicol Environ Health Part A Curr Iss 2007;70(23):1986-1994.*

167. *Zheng G, Tian L, Liang Y, Broberg K, Lei L, Guo W, et al. δ-Aminolevulinic acid dehydratase genotype predicts toxic effects of lead on workers' peripheral nervous system. Neurotoxicology 2011;32(4):374-382.*

168. *Ziegler EE, Edwards BB, Jensen RL, et al. Absorption and retention of lead by infants. Pediatr Res 1978;12:29–34.*

169. *Ziemsen B, Angerer J, Lehnert G, Benkmann H-, Goedde HW. Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in lead-exposed workers. Int Arch Occup Environ Heath 1986;58(3):245-247.*

X ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1

Анкетна карта

Моля, попълнете този въпросник като нанесете отговорите с знак ✔в ☐

Идентификационен номер:

В1 Име, презиме, фамилия

В2 Възраст :

В3 Пол 1 Мъж ☐ 2 Жена ☐

В4 Общ трудов стаж ☐☐ год ☐☐ мес

В5 Данни за настоящата професия
Наименование.....
От коя година работите на това работно място ☐☐☐☐ (година)
Описание на професията.....…….....…….....

ТЮТЮНОПУШЕНЕ
В6 Пушил ли сте някога в живота си?
1 ДА ☐ 2 НЕ ☐

В7 От каква възраст сте започнали да пушите?
Възраст ☐☐ год.

В8 Пушите ли в момента?
1 ДА ☐ 2 НЕ ☐
*Ако **НЕ** преминете на Въпрос 10*

Ако пушите в момента
В9 Колко цигари пушите на ден?
☐☐ (брой на ден)

В10 От каква възраст спряхте да пушите?
Възраст ☐☐ год.

В11 По колко цигари дневно пушехте ?
☐☐ (брой на ден)

КОНСУМАЦИЯ НА АЛКОХОЛ

В 12. Консумирате ли някои от посочените видове алкохол

	1. минимум един път дневно	2. минимум един път седмично	3. при случай	4. никога
Вино	☐	☐	☐	☐
Бира	☐	☐	☐	☐
Концентрат	☐	☐	☐	☐

В13 Консумирали ли сте алкохол в последните 24 часа?

1 ДА ☐ 2 НЕ ☐

В.14 Количество (мл).....

В14 В какъв район живеете?
Моля отбележете само един отговор

1 в града (център) ☐ 2 В покрайнините на града ☐ 3 на село ☐

В15. Имате ли осигурено изкъпване и смяна на бельото след работа?

1 ДА ☐ 2 НЕ ☐

Приложение №2

ФОРМУЛЯР ЗА ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ
ЗА УЧАСТИЕ В ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ

Заглавие на проекта:
БИОМАРКЕРИ ЗА ИНДИВИДУАЛНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ ПРИ ПРОФЕСИОНАЛНА ЕКСПОЗИЦИЯ НА ОЛОВО

Уважаеми Господине/Госпожо,

Бихме искали да Ви помолим да участвате в изследователски проект с горепосоченото заглавие. Решението за Вашето участие е изцяло доброволно.

Прочетете внимателно тази информация преди да решите дали ще се включите в проекта. Имате право да откажете своето участие или да се оттеглите от проучването. Ако се откажете от участие в проекта, Ви молим да уведомите изследователския екип.

Проектът ще се осъществява от екип на Национален център по обществено здраве и анализи (НЦОЗА), гр. София, в рамките на провеждан ежегоден профилактичен преглед. Изследователският проект е преминал през оценка на Етичната комисия за медицински изследвания към НЦОЗА (Протокол № 3 от 31.05.2019 г).

Целта на настоящия проект е да се получи повече информация относно молекулните механизми на биотрансформация на оловото в човешкия организъм. Ще бъде проучени единични полиморфни варианти в гени, имащи отношение към индивидуалната чувствителност при професионална експозиция на олово. Това ще даде информация и база за извършване на превантивни и профилактични дейности насочени към Вашето здраве и качество на живот. При необходимост ще бъдат направени допълнителен изследвания с цел потвърждаване или отхвърляне на получените в хода на анализа резултати.

Участието Ви в проекта ще включва:

1. Самостоятелно попълване на анкета за здравния Ви статус и начина Ви на живот.
2. Еднократно, чрез обтриване със стерилен тампон, ще Ви бъде взета проба от устната кухина (вътрешната част на бузата). Тестът е неинвазивен и безболезнен. Участието Ви не е свързано с никакви рискове за Вашето здраве.

Вашето участие в проучването ще отнеме не повече от 15 мин.
Ако решите да участвате, цялата информация за Вас ще остане поверителна.

Благодарим за Вашето участие:
За контакт – Проф. Цв. Георгиева, тел; 0884 642 433, e-mail: tzv.georgieva@ncpha.government.bg

Моля, подчертайте **Да** или **Не** за всички посочени по-долу твърдения (**подчертава се вярното твърдение**).

Прочетох информацията за проекта Да Не

Съгласен/а съм да участвам в проекта Да Не

Съгласен съм да предоставя демографски данни Да Не
и данни за здравословен и хранителен статус

Дата:……. Име, презиме, фамилия/ подпис на участника

……

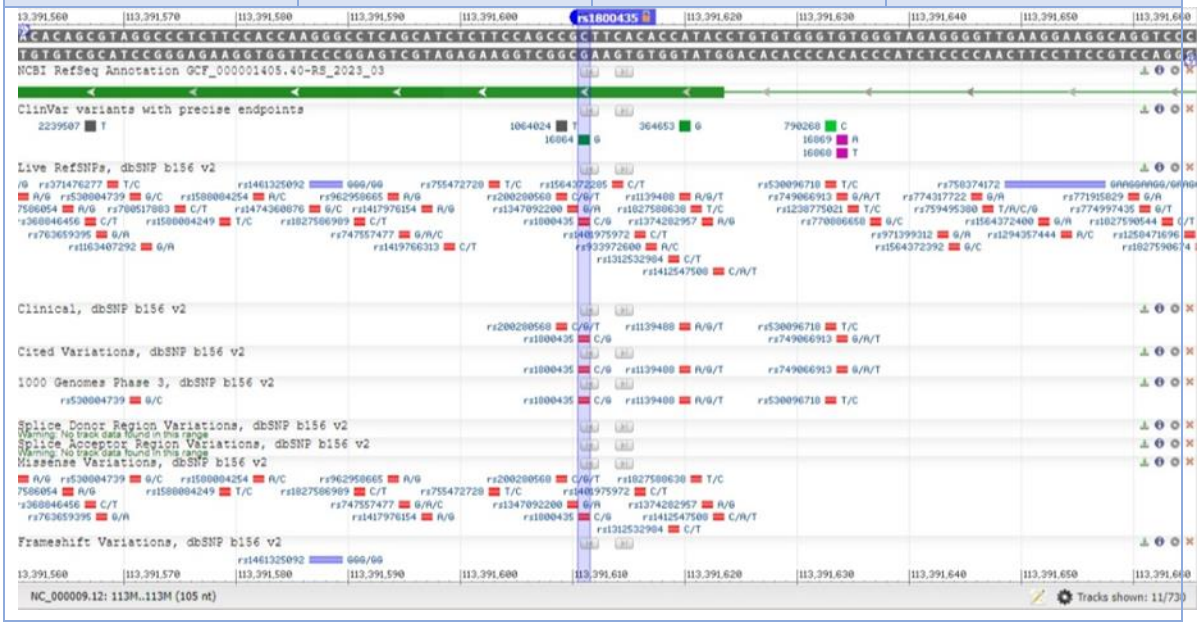
Обясних същността на изследването на пациента. Отговорих на всички въпроси:

Име:…… Дата:…….....
Подпис:……..……

Приложение №3

ГЕНОМЕН ИЗГЛЕД на rs1800435

ген	вариант	замяна	тип
ALAD	rs1800435	C/G	Трансверсия субституция



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1800435#seq_hash

Приложение №4

Списък с генетични полиморфизми, кандидати за генетични биомаркери за оценка на индивидуална предразположеност към интоксикацията с олово

ген	вариант	замяна	тип
AGT	rs699 (AGT M235T)	A/G	Транзиция субституция
ALAD	rs1805313	A/G	Транзиция субституция
XPO5 (POLR1C)	rs2257082	G/A	Транзиция субституция
UNC5D	rs10503970	G/A	Транзиция субституция
CYP1B1	rs1056836	G/C	Трансверсия субституция
ALAD	rs818708	G/A	Транзиция субституция
HOTAIR	rs7958904	C/A/G	Трансверсия субституция
TRPV5	rs4252424	G/A	Транзиция субституция
MALAT1	rs3200401	C/T	Транзиция субституция
AGT	rs7079	G/T	Трансверсия субституция