

**БИОМАРКЕРИ ЗА ИНДИВИДУАЛНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ ПРИ  
ПРОФЕСИОНАЛНА ЕКСПОЗИЦИЯ НА ОЛОВО**

**Христиан Костадинов Димбарев**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд 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.**

Дисертационният труд е представен на 113 стандартни страници и е онагледен с 20 фигури и 6 таблици. Библиографията включва 169 литературни източника – 5 на кирилица и 164 на латиница. Във връзка с дисертационния труд са публикувани 6 публикации.

Номерацията на таблиците и фигурите не отговаря на тези в дисертационния труд.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на 05.04.2023 г. на Колегиум на дирекция “Обществено здраве и здравен риск”, разширен с академичен състав от дирекция „Аналитични и лабораторни дейности“ в НЦОЗА.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 09.06.2023 г. в НЦОЗА, бул. „Акад. Иван Евстр. Гешов“ 15.

Материалите по защитата са на разположение в секретариата на Научния съвет към НЦОЗА, както и на сайта на НЦОЗА: <http://ncpha.government.bg>

## **С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е**

	<b>Стр.</b>
<b>I ВЪВЕДЕНИЕ</b>	<b>6</b>
<b>II ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b>	<b>7</b>
<b>III МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b>	<b>8</b>
<b>IV РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ</b>	<b>15</b>
1. Дизайн на проучването	15
2. Подбор на популация експонирани на олово работещи в акумулаторното производство у нас и получаване на информирано съгласие за участие	15
3. Определяне на концентрацията и на олово в кръвта и екскрецията на 5-АЛК в урина	16
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	18
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	20
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	22
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	27
8. Обобщен анализ на ключови съставими данни, по отношение важни биомаркери касаещи оловната чувствителност	34
9. Предложение за здравно-промоционална стратегия за превенция на здравето на работното място	37

10. Предложение за допълнителни мерки за превенция на отравянията	41
<b>V ИЗВОДИ</b>	<b>46</b>
<b>VI ПРИНОСИ</b>	<b>47</b>
<b>VII ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b>	<b>48</b>
<b>VIII ЛИТЕРАТУРА</b>	<b>49</b>

## СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
ЕС	Европейски съюз
КПЗ	Клиника по професионални болести
ПКК	Пълна кръвна картина
СЗО	Световна здравна организация
СТМ	Служба по трудова медицина
ACSH	Консултативен комитет по безопасност и здраве при работа
ALA	Аминолевулинова киселина
ALAD	Дехидратаза на $\delta$ -амино-левулинова киселина
DALA	Делтааминолевулинова киселина
ECHA	Европейска агенция по химикали
PBS	Фосфатен буфер
RAC	Комитет за оценка на риска
RBC	Брой на еритроцитите
SNPs	Единични нуклеотидни полиморфизми
WBC	Брой на белите кръвни клетки.

## **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. 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.

Редица изследвания на СЗО (1), 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 химични 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 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.

## **III 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:***

##### **Пълна кръвна картина**

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  $\mu\text{mol/L}$ ; за деца < 0.48)  $\mu\text{mol/L}$

*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;
- еритропоестични порфирии;
- (най-често) вторични копропорфирурии.

*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 (рН 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:

<i>Химичен компонент</i>	<i>Количество</i>
1. <i>NaCl</i>	8 g
2. <i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	0.2g
3. <i>KCl</i>	0.2g
4. <i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O</i>	2.9g

1. *Нужните количества от изредените компоненти се претеглят;*
2. ***KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** и **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** се разтварят отделно;*
3. *След разтваряне поотделно, разтворите се смесват;*
4. *Киселинно-алкалното състояние на получения разтвор се довежда максимално близо до рН - 7.4 като корекции се правят чрез добавяне на 2М 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  $\mu\text{L}$  PBS и с въртеливи движения се суспендират клетките за 30-60 секунди. Добавят се 400  $\mu\text{L}$  лизиращ агент и 200  $\mu\text{L}$  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 измивачи 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:  $X (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 (\mu\text{g/ml}) \times D$ , където: X - концентрацията на ДНК в  $\mu\text{g/ml}$ ;  $A_{260}$  - 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  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 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**

Всички PCR реакции са проведени в 7300 Teal Time PCR System (Applied Biosystems), съгласно инструкциите на производителя. Реакционният обем е 25  $\mu\text{l}$  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  $\chi^2$  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.

## **IV РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

### **1. Дизайн на проучването**

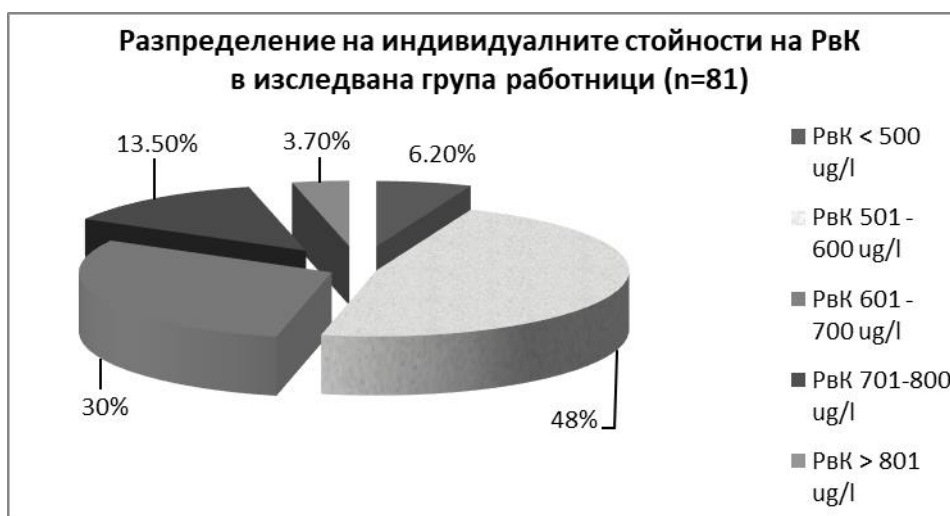
В настоящият дисертационен труд са обхванати общо 173 професионално експонирани на олово лица ( $n=173$ ) от цехове с висока експозиция на олово по данни от СТМ. Първоначално е определена концентрация на олово в кръвта и 5 – АЛК в урина при 81 работещи в акумулаторното производство лица ( $n=81$ ). От 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. 1 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. 1 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  $13,01 \pm 9,12$  mg/l (n=81). Индивидуалните резултати обхващат широк концентрационен интервал от 2,57 до 51,1 mg/l.





**Фиг. 2** Ниво на екскреция на 5-АЛК в урина (5-АЛК mg/l)

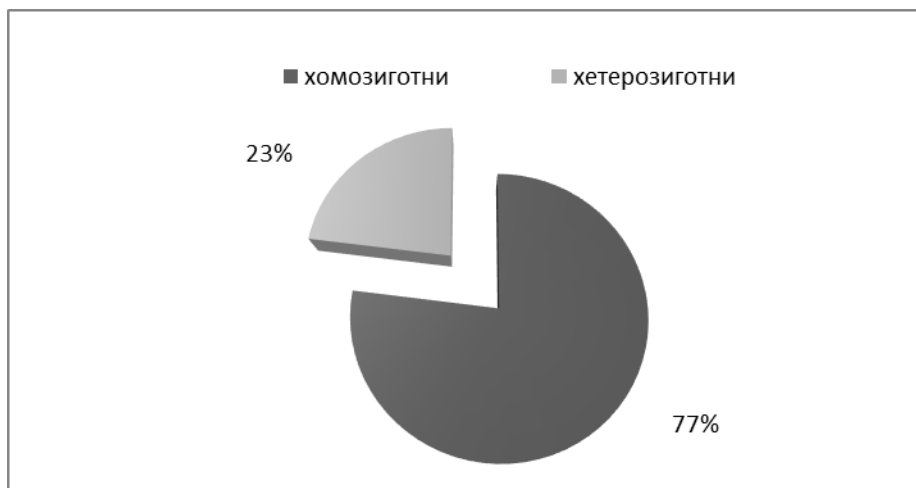
На Фиг. 2 е представено разпределението на индивидуалните стойности на 5-АЛК в урината на изследваната група. Само при 11,1% от работниците, 5-АЛК (mg/l) е в границите на нормалните стойности. Най-висок е относителният дял (61,2%) на лицата при които екскрецията на 5-АЛК е в интервала от 6,1 до 15 mg/l, 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

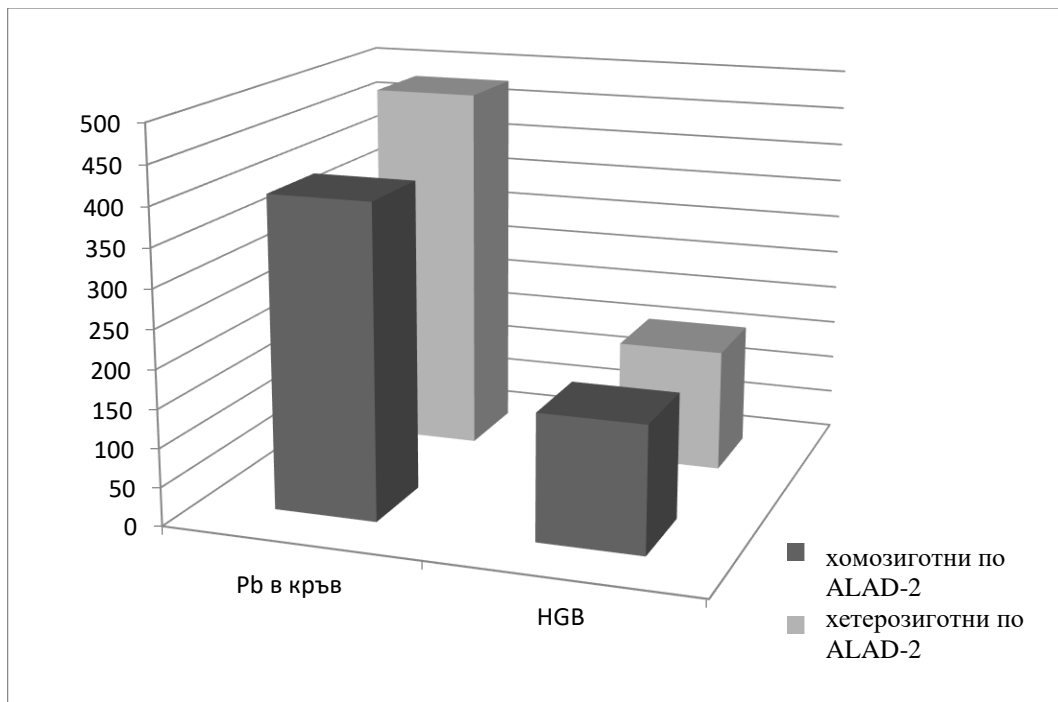
След анализ на резултатите е подбрана група експонирани лица ( $n = 32$ ) с високи стойности на олово в кръвта и 5- АЛК в урина. Като първоначален анализ е определено разпределението по генотип с цел отдиферинциране на група изследвани лица, хетерозиготни по *ALAD-2*. По литературни данни това е рисков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

Получените резултати от молекулярно-генетичните анализи (Фиг. 3) демонстрират, че 23 % от изследваната популация са хетерозиготни по *ALAD-2*.



**Фиг. 3** Разпределение на изследваната популация по генотип *ALAD-2*

По литературни данни е налице повишен риск за хетерозиготни по *ALAD-2* изследвани лица (2). Резултатите от настоящето проучване демонстрират сходство с данни на други автори (3, 4). 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. 4)

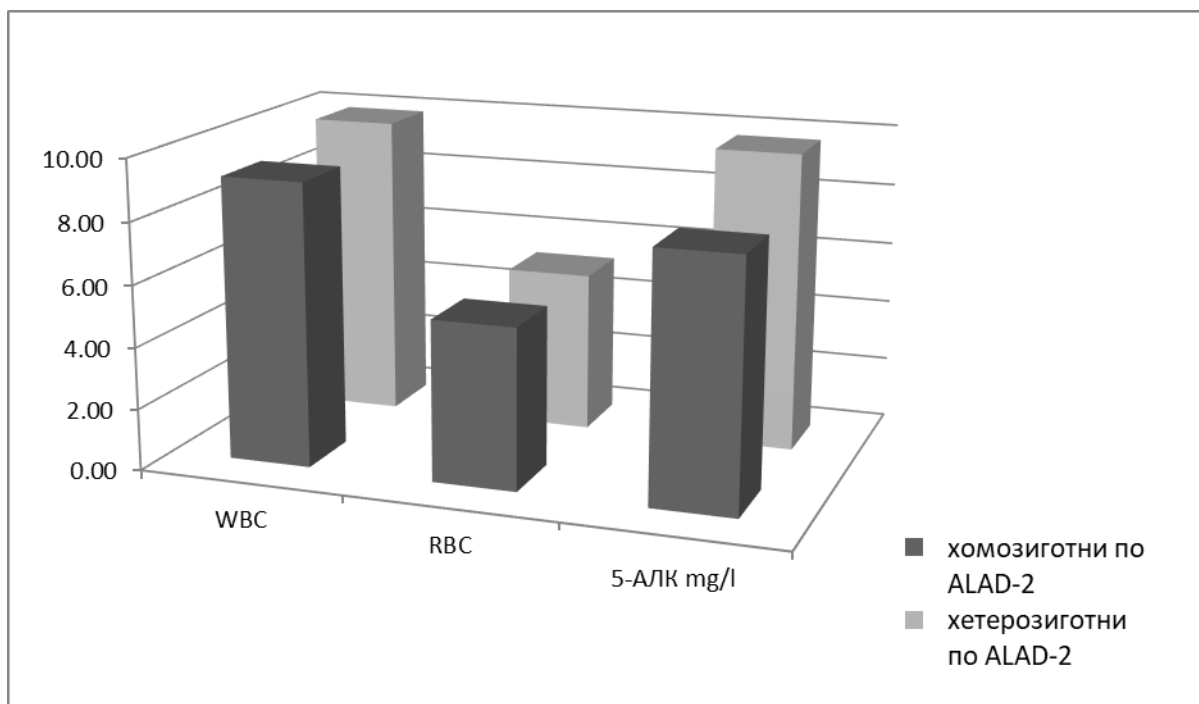


**Фиг. 4 Нива на Pb в кръв (ug/l) и хемоглобин (HGB), разпределени по генотип**

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.4).

**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. 5 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.5).

Тази хипотеза може да помогне да се обясни генотипната селекция, наблюдавана от Schwartz и съавтори (5), 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 аминокиселината в плазмата (6, 7).

Проучване на Bellinger и съавтори (8) 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 - аминокиселина) в урината.

Данните от генотипизирането (Табл. 1) показват категоричен превес на хомозиготен CC генотип с честота от 77,05% спрямо честота от едва 22,95 % хетерозиготен CG генотип сред изследваните.

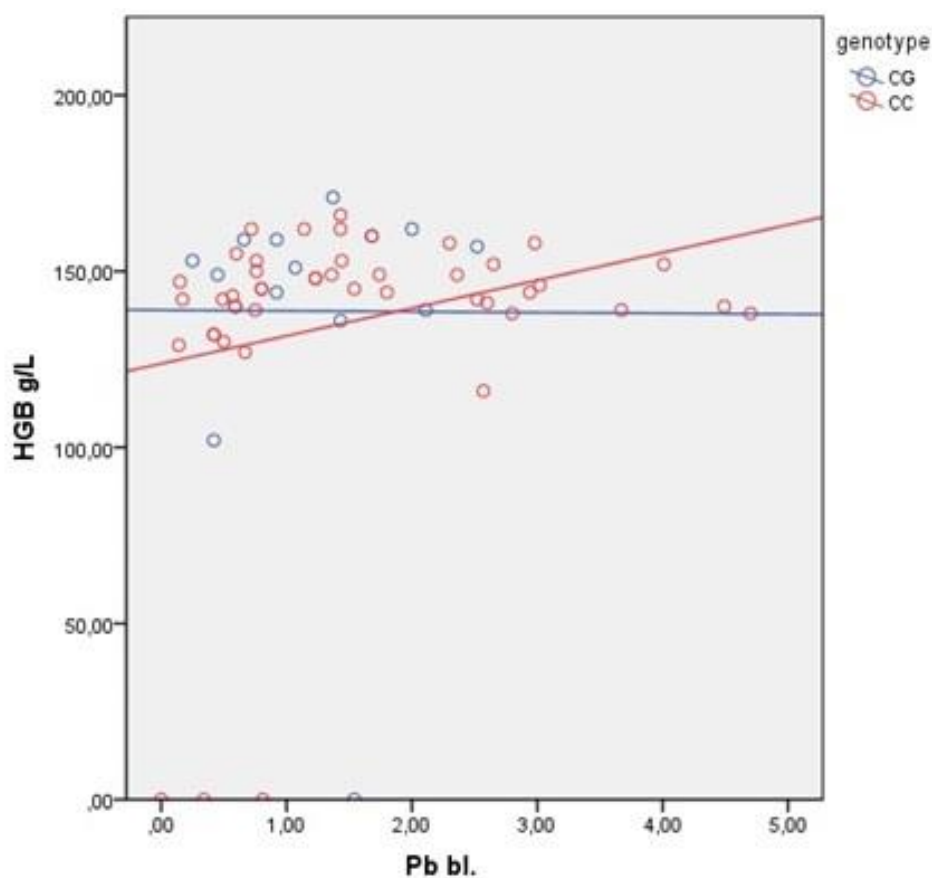
**Табл. 1 Алелна честота на изследваните работници от българската индустрия за рециклиране на батерии**

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

Последващият анализ на данните цели да установи съществува ли корелация между измерените стойности на олово в кръвта, 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.

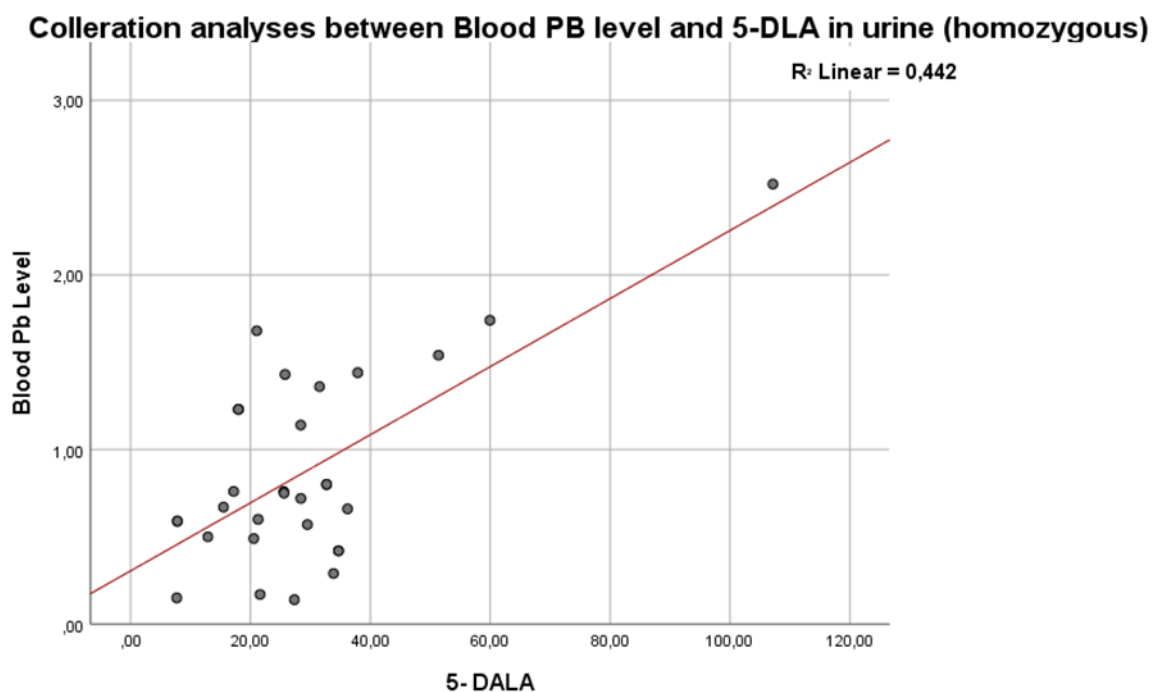
При анализа на данните по отношение наличието на корелация между нивата на олово в кръвта и количество на хемоглобин по генотип (Фиг. 6) се открива такава. Този резултат е в съответствия с данните получени и от други проучвания, както и с патогенезата на оловната интоксикация. При хетерозиготите средните 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. 6** Нива на олово в кръвта ( $\mu\text{mol/L}$ ) и количеството хемоглобин по генотип

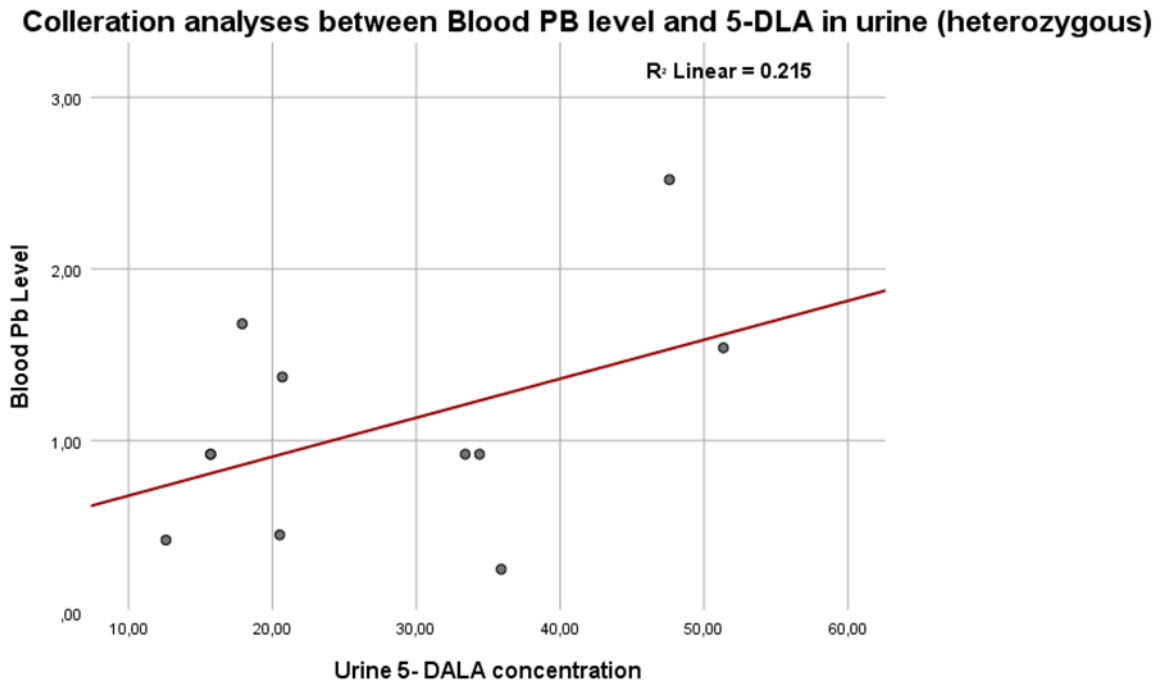
Интерес представлява и зависимостта между генотипа, нива на олово в кръвта и уринната екскреция на 5-АЛК, която се използва като биомаркер за определяне на тежестта на оловна интоксикация.

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. 7 и Фиг. 8), 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. 7** Зависимост между нива на олово в кръвта ( $\mu\text{mol/L}$ ) и екскрецията на 5-АЛК в урината ( $\text{mg/l}$ ) при хомозиготен СС генотип





**Фиг. 8** Зависимост между нива на олово в кръвта ( $\mu\text{mol/L}$ ) и екскрецията на 5-АЛК в урината ( $\text{mg/l}$ ) 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.

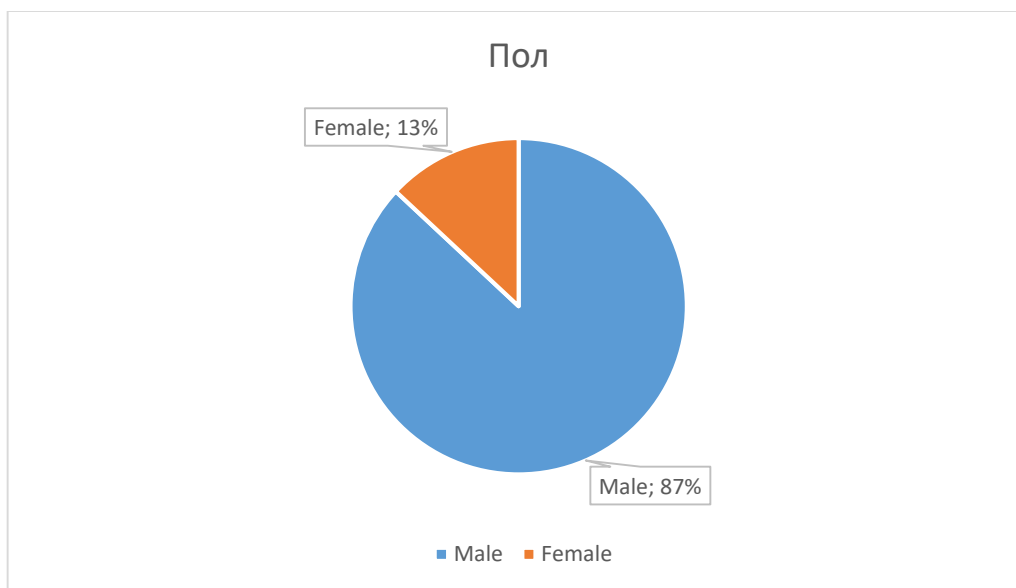
Трудно е да се реши кой генотип е „застрашен“ или т.нар. „генотип в риск“ тъй като резултатите показват, че всеки генотип е податлив на един или повече неблагоприятни фактори на средата. Това налага бъдеща работа в тази насока, включваща както по-голям брой експонирани лица, така и тестването за повече

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.

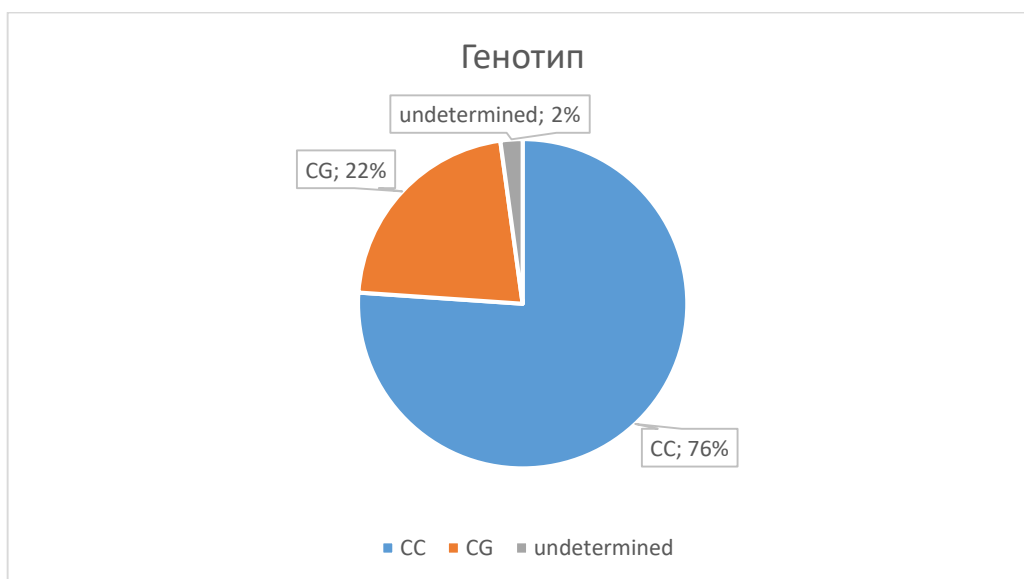
Обект на това изследване са 80 мъже и 12 жени (Възраст: 24-61) от българската индустрия за рециклиране на батерии. Измерени са следните биомаркери: съдържание на олово в кръвта, нива на DALA в урината и разпределение на полиморфизма на rs1800435C/G. Попълнен бе въпросник за начина на живот.

Анализът на данните показва, че 87% от участниците взели участие в проучването са мъже, а останалите 13% - жени (фиг. 9), 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. 9** Разпределение на участниците в изследването по пол

Спрямо генотипа: 76% са с хомозиготен СС генотип и 22% са с хетерозиготен СG генотип, само при 2% от изследваните не беше определен генотипът (фиг. 10). 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. 10** 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. 11). 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.

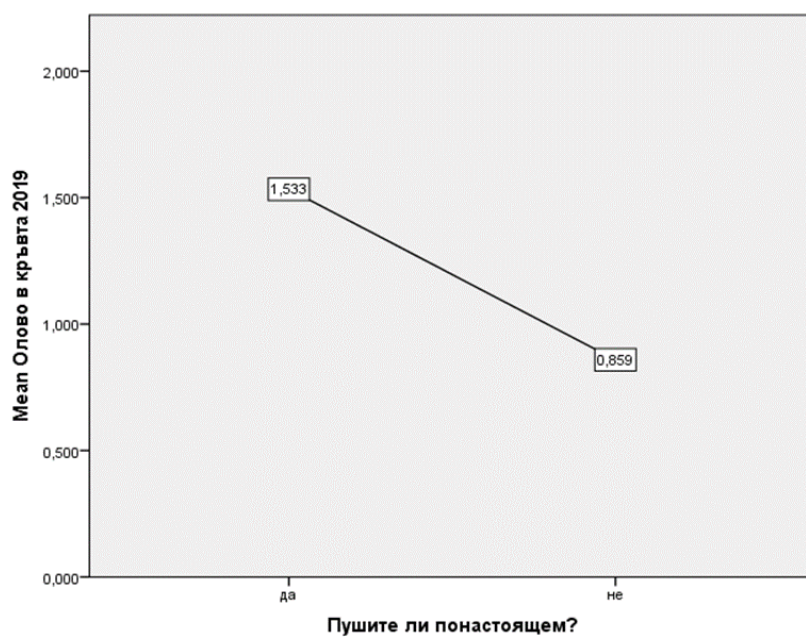


**Фиг. 11** Разпределение на участниците в изследването според трудовият им стаж

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. 12), 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.

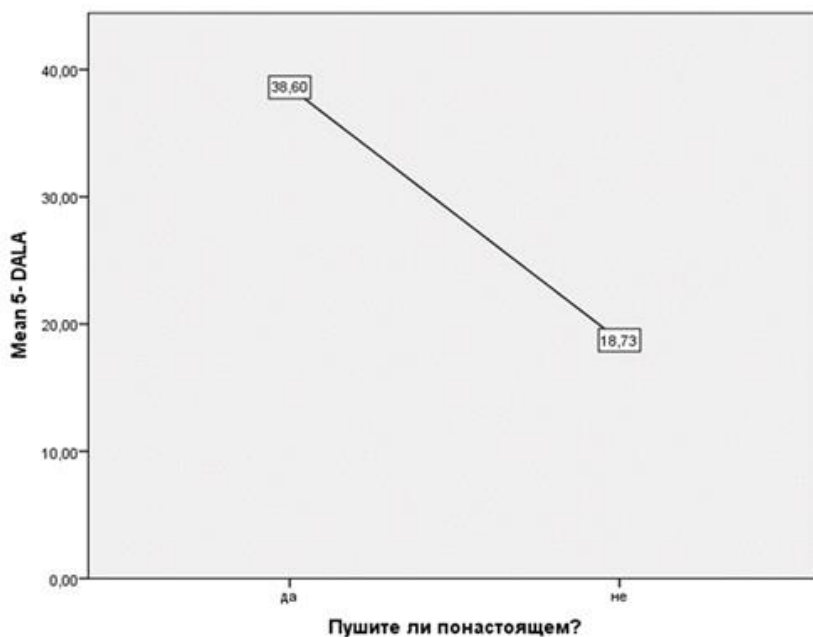


**Фиг. 12** Разпределение на участниците в изследването спрямо пушачи и непушачи



**Фиг. 13** Съдържание на олово в кръвта ( $\mu\text{mol/L}$ ) при двете изследвани групи пушачи/непушачи

Съществува статистически значима разлика между съдържанието на олово в кръвта при двете изследвани групи пушачи/непушачи (фиг. 13), като при пушачите се доказва по-високо съдържание 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.

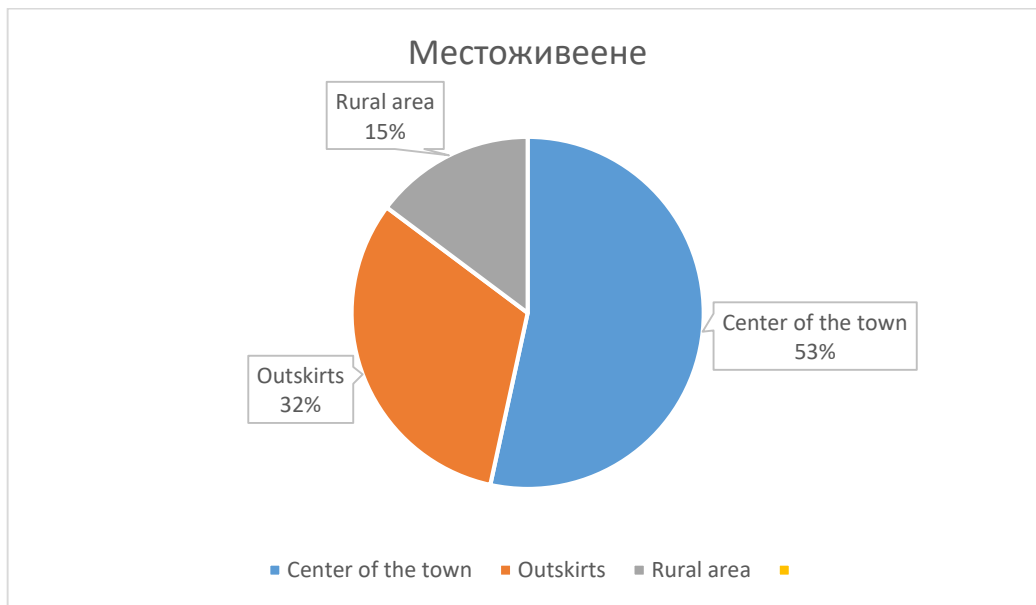


**Фиг. 14** Екскреция на 5-АЛК (mg/l) при двете групи изследвани лица - пушачи/непушачи.

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. 14). Тук отново по-високи са нивата при пушачите (Сиг. = 0,001 (<0,05), което затвърждава ролята на тютюнопушенето

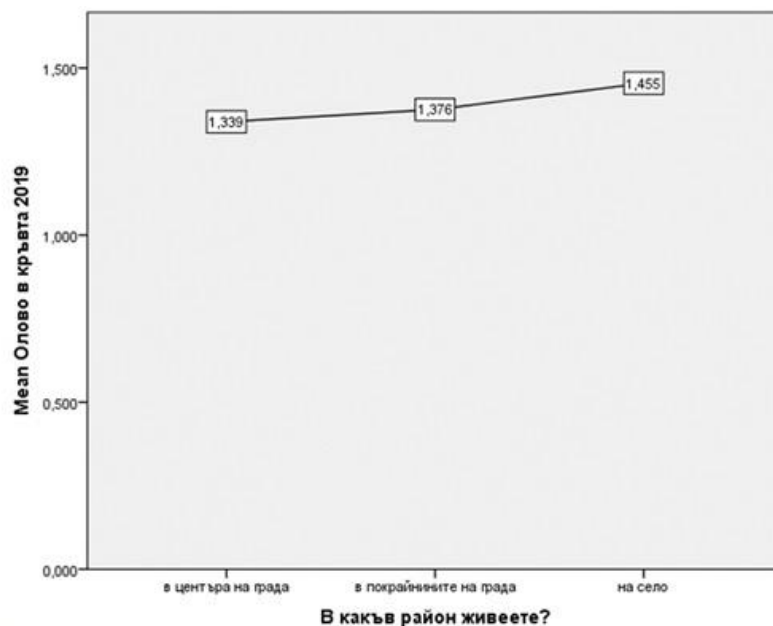
като кумулативен рисков фактор, който усилва ефекта на въздействието на оловото върху организма.

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. 15). 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 отделиани от изгаряне на въглища за отопление, характерни предимно за селските райони през зимата.



**Фиг. 15** Разпределение на участниците в изследването спрямо местоживеене



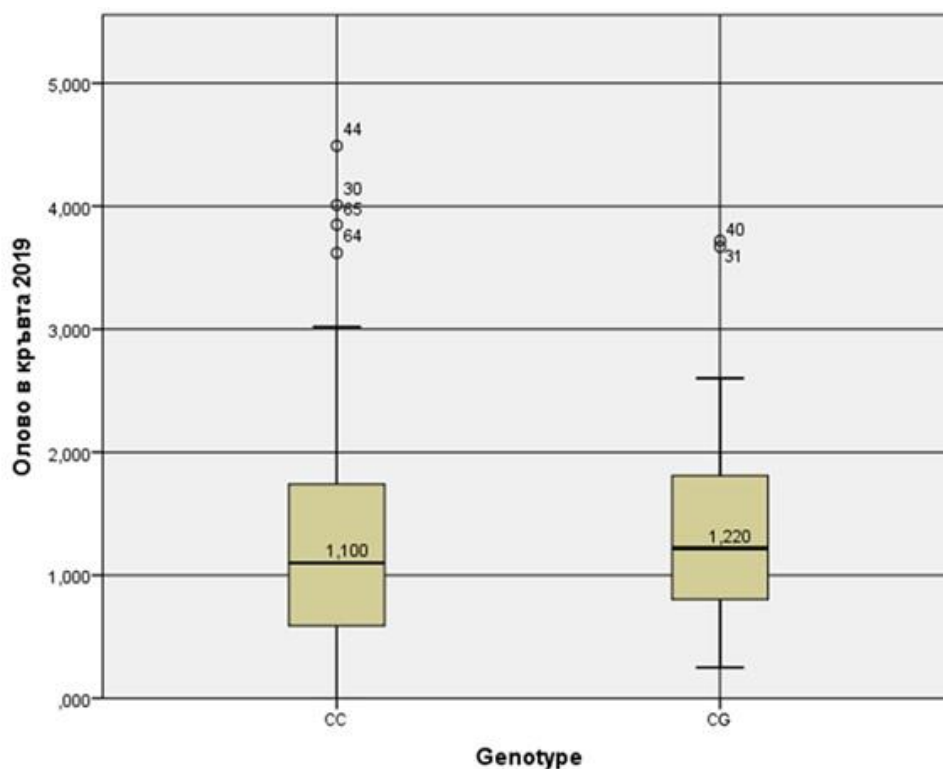


**Фиг. 16 Съдържание на олово в кръвта ( $\mu\text{mol/L}$ ) при трите групи хора по местоживеене (център на града, покрайнини и селски район)**

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, касаещи оловната чувствителност

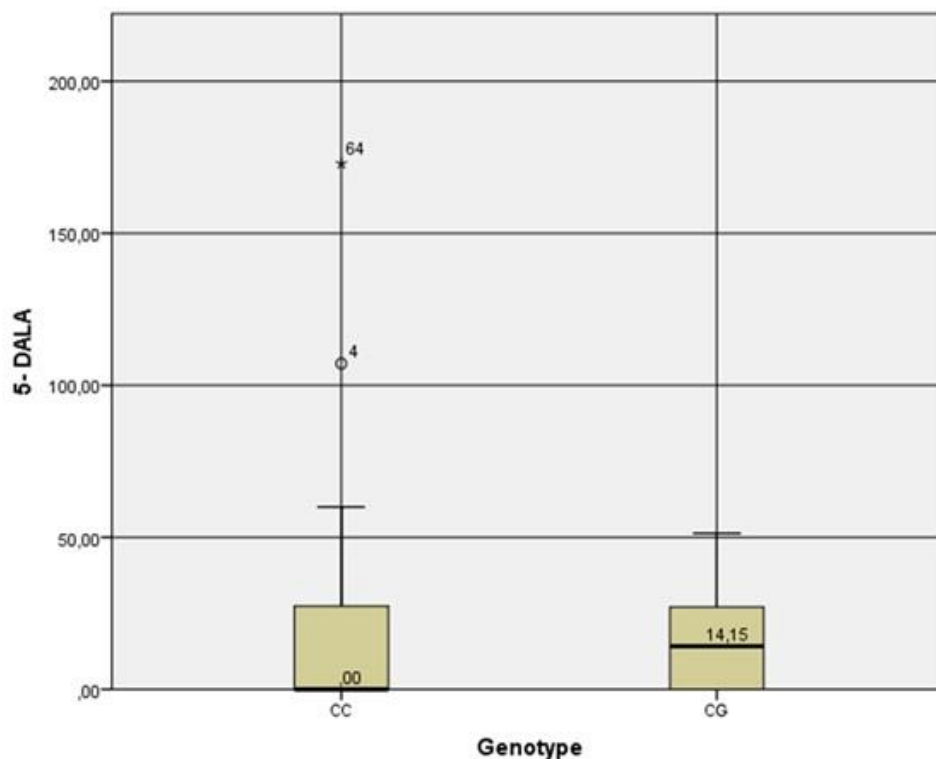
Интерес представлява обобщеният анализ на съпоставими данни, обхващащи всички изследвани до момента лица, като по този начин се постига по-голяма представителност на извадката, което дава възможност да се направят обобщаващи изводи. Получените обобщени данни са в съответствие както с предишно проучване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



Фиг. 17 Съдържание на олово в кръвта ( $\mu\text{mol/L}$ ) спрямо генотипа

Обобщеният анализ потвърждава, че при хетерозиготите се наблюдават по-високи нива на олово в кръвта при еднаква експозиция на работната среда (фиг. 17).

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



**Фиг. 18** 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.

Сред световната научна общност все още няма единно мнение по отношение на 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 брой 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 brutният 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 (ЕСНА) 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 (ЕСНА) 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 (РАС) 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 работния 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.

## 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 аминокиселините 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 (9, 10). 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 (11, 12).

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 (13). 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 (14-17). Освен това, повечето проучвания са използвали хора с професионална експозиция на олово с относително високи нива на експозицията (18-19). 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.

## V 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.
- Установена 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.

## VI 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.

## VII ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Dimbarev, H.**, D. Dimbareva, Tzv. Georgieva, R. Georgieva, V. Boyadzhieva, T. Kuneva. Polymorphism of ALAD gene in Bulgarian population exposed to lead. Occupational Medicine and Work Ability, Issue 3 – 2018, p. 254-263, ISSN 2534-9481
2. **Димбарев, Х.**, Д. Димбарева, Ц. Георгиева. Биомаркери за индивидуална чувствителност при професионална експозиция на олово. Здраве и безопасност при работа, Том 4, 2018, p. 25-33, ISSN 2367-7171
3. **Dimbarev, H.**, D. Dimbareva, T. Georgieva, R. Georgieva, T. Panev, T. Kuneva Health risk associated with delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) gene polymorphism (rs1800435C/G) in Bulgarian workers from battery recycling industry. Abstracts / Toxicology Letters 314S1 (2019) S1–S309 S229, ISSN: 0378-4274
4. **Димбарев, Х.**, Д. Димбарева, Ц. Георгиева. Здравно-промоционална стратегия за превенция на здравето на работното място и предложение за допълнителни мерки за превенция на отравянията с олово. Здраве и безопасност при работа, Том 7, 2021, p. 31-37, ISSN 2367-7171
5. **Димбарев, Х.**, Д. Димбарева, Цв. Георгиева. Биомаркери за чувствителност при професионална експозиция на кадмий, Българско списание за обществено здраве, 2022, 14 (2), 61-68, ISSN 1313-860X.
6. **Dimbarev, H.**, D. Dimbareva, V. Boyadzhieva, T.P. Georgieva, T.I. Panev. Correlation between health risks associated with genetic profile and lifestyle in occupationally exposed lead workers. Toxicology Letters Volume 368S1, 1 September 2022, 368S1 S1–S335, ISSN 0378-4274



## VIII ЛІТЕРАТУРА

1. 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.
2. National Research Council, National Academy of Sciences. *Measuring lead exposure in infants, children, and other sensitive populations*. Washington, DC: National Academy Press, 1990.
3. Bernard, B.P., Becker, C.E.: *Environmental lead exposure and kidney*. *Clin Chem Toxicol* 26, 1-34 1988.
4. Wetmur JG. Influence of the common human  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden. *Environ Health Perspect* 1994;102(SUPPL. 3):215-219.
5. Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, et al. Associations of  $\delta$ -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.
6. Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, et al.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase genotype modifies four hour urinary lead excretion after oral administration of dimercaptosuccinic acid. *Occup Environ Med* 1997;54:241-6.
7. 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.
8. 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.
9. Fujita H, Sato K, Sano S. Increase in the amount of erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase in workers with moderate lead exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1982;50:287-97.
10. Boudene C, Despau-Pages N, Comoy E, et al. Immunological and enzymatic studies of erythrocytic  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase: comparison of results obtained in normal and lead-exposed subjects. *Int Arch Occup Environ Health* 1984;55:57-96.

11. Bergdahl IA, Skerfving S, Lead, *Handbook on the Toxicology of Metals*, 10.1016/B978-0-12-822946-0.00036-2, 2022, (427-493).
12. 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.
13. 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.
14. Scinicariello, Franco et al. "Lead and  $\delta$ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Polymorphism: Where Does It Lead? A Meta-Analysis." *Environmental Health Perspectives* 115 (2006): 35 - 41.
15. Shaik, Apsar and Kaiser Jamil. "A study on the ALAD gene polymorphisms associated with lead exposure." *Toxicology and Industrial Health* 24 (2008): 501 - 506.
16. 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.
17. 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.
18. 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
19. Kim HS et all., *The Protective Effect of  $\delta$ -Aminolevulinic Acid Dehydratase 1-2 and 2-2 Isozymes against Blood Lead with Higher Hematologic Parameters*, 2008