

Получена: 20 октомври 2014  
Редактирана: 8 ноември 2014  
Приета: 10 ноември 2014  
Излязла online: 20 ноември 2014

# Нива на манган в урина и нокти – информативна стойност и приложимост като биомаркери за експозиция

СТАТИЯ

Росица Б. Георгиева<sup>1,\*</sup>, Димитър Л. Цалев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национален център по общественото здраве и анализи, бул. „Акад. Ив. Евст. Гешов“ № 15, 1431 София, България

<sup>2</sup> Софийски университет “Св. Кл. Охридски”, Факултет по химия и фармация, бул. Дж. Баучер № 1, 1164 София, България

\* Corresponding author. E-mail: r.georgieva@ncpha.government.bg

Манганът е есенциален микроелемент, но при високи дози оказва невротоксично действие. Валидирани аналитични процедури за определяне на манган в урина (Mn-U) и нокти (Mn-N) са приложени за биологичен контрол на експозицията при 149 работници от стоманодобива и 179 деца от с. Яна, район МК Кремиковци. Установено е, че средните стойности на Mn-U се увеличават при технологичния персонал – стомановари ( $1.6 \pm 1.3 \mu\text{g/l}$ ) и разливачици ( $1.4 \pm 1.3 \mu\text{g/l}$ ). Концентрациите на Mn-N са най-високи при стомановарите на манганова стомана ( $3.8 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$ ), подложени на наднормена експозиция в работната среда. Стойностите на Mn-N при всички възрастови групи деца:  $11.0 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$  (3–6 г.),  $10.7 \pm 1.0 \mu\text{g/g}$  (7–9 г.);  $11.7 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$  (10–12 г.) и  $7.5 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$  (13–15 г.) са достоверно повишени спрямо контролната група ( $0.5 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ ), а индивидуалните стойности варират в широк интервал  $1.0$ – $43.8 \mu\text{g/g}$ . Mn-U и Mn-N показват възможност за приложение като биомаркери за експозиция: Mn-U за оценка на непосредствената експозиция на групово ниво, при високи концентрации на метала във въздуха на работната среда; Mn-N за нивото на индивидуалната и групова вътрешна експозиция преди 6–8 месеца, дори при умерено повишени концентрации във въздуха на работната среда – около и над  $0.1 \text{ mg/m}^3$ , както и при експозиция от замърсена околна среда.

**Ключови думи:** биомаркери; валидиране; електротермична атомноабсорбционна спектрометрия; манган; оценка на експозицията

## 1. Увод

Манганът се използва главно в металургията за получаване на фероманган, както и в широка гама други продукти като фойерверки, батерии, торове, бои, козметика. Органометални съединения на мангана се прилагат като пестициди (манеб, манкоцеб), добавка към бензини (в България не се използват), контрастно вещество при ядрено-магнитен резонанс [1-5].

Манганът е есенциален микроелемент и играе роля при минерализацията на костите, протеиновия и енергиен метаболизъм, активирането на някои ензими; участва в защитата на клетките от въздействието на свободни радикали. Той има съществено значение за нормалното пренатално и неонатално развитие [2-4,6].

### **Професионална и непрофесионална експозиция**

На професионална инхалаторна експозиция на ман-

ган са изложени миньори, работници от фероманганово производство и стоманодобив, заварчици. Най-високи концентрации се емитират при добив на манганова руда [7].

Като компонент на земната кора манганът се среща естествено в почти всички почви. Той се съдържа в повечето храни, като концентрациите му варират значително. Водите могат да бъдат замърсени с манган вследствие заустване на промишлени отпадни води или инфилтриране от почвата [1]. По-високи експозиции могат да се регистрират близо до заводи или депа за опасни отпадъци [1,3].

#### **Токсикокинетика**

При инхалаторна експозиция на манганови съединения се абсорбира респирабилната фракция, която достига до алвеоларния отдел на белите дробове. Отложените в горните дихателни пътища по-големи частици могат да бъдат придвижени чрез мукоцилиарен транспорт и след поглъщане да попаднат в чревния тракт. Много малки количества манган преминават през кожата след дермална експозиция на органични манганови съединения [4]. Абсорбцията на мангана зависи от възрастта, ретенцията при новородените е по-висока [1]. Манганът се транспортира от кръвта, свързан с протеини. Поглътният манган бързо се елиминира от кръвта и отначало се концентрира в черния дроб. Като цяло, органите и тъканите не натрупват големи количества манган. Транспортът през кръвно-мозъчната бариера е важен механизъм за обяснение на повишеното постъпване в мозъка при висока експозиция на манган [1]. Манганът прониква през плацентарната бариера [4], секретира се в млякото [8]. Черният дроб е основният орган за отлагане във всички възрасти. Ноктите и косата, особено тъмната (богата на меланин) кумулират Mn [6,9]. Поглътният метал почти напълно се екскретира чрез жлъчката. (около 92–98%) и само 0.1–1.3% чрез урината [1,3,4,6].

#### **Токсични ефекти**

Манганът представлява особен случай, защото е есенциален микроелемент, но при високи нива на постъпване причинява невротоксични ефекти. Те се проявяват главно при инхалаторна експозиция, въпреки че съществуват данни от епидемиологични изследвания, които предполагат връзка между установените невротоксични увреждания и експозицията от високи концентрации на манган в питейната вода [3,7,10]. Синдромът, известен като "манганизъм", е установен при работници, експонирани на концентрации около един милион пъти по-високи от нормалните нива на манган във въздуха [1,4]. Минни работници, изложени на високи концентрации на манганов прах, развиват "*locura manganica*" или манганова лудост [1,7]. Други неблагоприятни ефекти са повишена заболяемост и смъртност от пневмония [1,6], понижена абсорбция на желязото [11,12],

импотентност и загуба на либидо [1,4]. Наличните научни данни не показват карценогенност на неорганичния манган за човека [4].

Невротоксичността на мангана може да се прояви и при продължителна експозиция на по-ниски нива. Установени са промени в невроповеденчески тестове при население от околностите на бивш завод за феросплави [1]. Някои проучвания при деца показват, че приемане на вода с повишени концентрации на Mn може да доведе до нежелани неврологични ефекти [3,10,13].

#### **Биомаркери**

Манганът може да се определи с добра чувствителност в биологични течности и тъкани. Изследванията, включващи използването на нивата на манган в кръв, урина, изпражнения, нокти и коси като възможни биомаркери за експозиция, показват много противоречиви резултати:

Приложимостта на манган в кръв (Mn-B) и урина (Mn-U) като биомаркери за експозиция е под въпрос въз основа на констатациите от множество изследвания. Като цяло, не са установени или са установени слаби (и то само при високи нива) връзки между експозицията на манган и съдържанието на елемента в кръв и урина. Фактори, които ограничават ползата от определяне на манган в тези биологични течности, са сравнително бързият манганов клирънс, високата интериндивидуална вариабилност на резултатите и много ниската екскреция с урината [1,2,5,14,15]. Изследвания и на български автори показват, че определянето на манган в кръв не доказва качества на биомаркер за оценяване на индивидуалната експозиция [16,17].

Не е установена достоверна корелация между екскрецията на манган с фекалиите и професионалната експозиция на метала [1].

Редица проучвания показват, че манганът може да се натрупва в ноктите и косата и че това е по-изразено при групите с високи експозиции, отколкото при пониско експонирани. Ограничения относно валидността на анализа на коса като биомаркер за експозиция са риска от външно замърсяване и варирането на концентрацията на Mn съобразно пигментацията на косата, тъмната коса е по-богата на манган от сивата и светлата [3,6,18].

В проучване на заварчици е изследвана корелацията между експозицията на манган и концентрациите на елемента в нокти (Mn-N), кръв и урина преди и след края на работната смяна. Установена е статистически значима корелация на Mn-N с експозицията – през 7–9, 10–12 и 7–12 месеци преди датата на изрязване на ноктите, но не и с тази през 1–6 месеци. Експозицията на манган по време на работната смяна не корелира с промените на Mn-B и Mn-U. Счита се, че ноктите от крака могат да бъдат подходящ биомаркер за натрупване на манган от 7 до 12 месеца по-рано и че нито концентра-

цията на манган в кръв, нито в урината са подходящи показатели на експозиция. Тези резултати могат да бъдат приложими при изследване на население, където Mn-N може да отрази кумулативната експозиция от околната среда, за която се предполага, че е по-постоянна, отколкото в работната атмосфера [9,15].

Определянето на експозицията на манган от околната среда е предизвикателство, поради наличието на големи различия в условията, определящи фона, и между отделните индивиди [11]. Установена е доза-ефект зависимост между Mn-B и някои невроповеденчески тестове при население от околностите на бивш завод за феросплави [1]; при деца, експонирани на манган чрез замърсена вода, е установена обратнопропорционална зависимост между съдържанието на манган в коси (Mn-N) и невропсихологичните функции и поведението на децата в училищна възраст [10,13]. В обзора на Menezes-Filho et al [3], върху 12 изследвания на невропсихологични ефекти при деца, причинени от експозиция на манган, определянето на Mn-N като биомаркер за експозиция се използва в 10 от тях. При останалите две изследвания е определено съдържанието на манган в кръв и Mn в дентин. В 10 от проучванията е установена връзка между повишението на манган в биологичната среда и когнитивни затруднения, в останалите две с биомаркер манган в коса не са установени корелации [3].

Наличието на разнопосочни резултати от прилаганите биомаркери за експозиция на манган и фактът, че манганът е есенциален микроелемент, който присъства във всички човешки тъкани и течности, затрудняват интерпретацията по отношение наличието на предшестваща експозиция. Ето защо, по-нататъшните изследвания трябва да се съсредоточат върху валидирането на по-прецизни, достъпни и надеждни биомаркери за експозиция на манган, чрез които по-добре да се характеризира и оцени влиянието на мангана върху здравето на експонирани групи работници и население [2,11,14].

В статията са представени валидирани аналитични процедури за определяне на манган в урина и нокти, които са приложени при дългогодишни изследвания на експозицията при работници от стоманодобива и на деца от с. Яна, район МК Кремиковци, с цел проучване на информативната стойност на нивата на Mn в тези биологични среди като биомаркери за експозиция при оценка на въздействието от работна и околна среда.

## 2. Постановка, изследвани групи и биологични материали

### 2.1. Изследвани групи

#### Работници от металургични производства с експозиция на манган

Определено е съдържанието на Mn-U и Mn-N при

224 лица, от които 75 контролни (45 мъже и 30 жени, на възраст от 22 до 58 год.) и 149 работници (119 мъже и 30 жени, 22–58 год.) от производствата на специални стомани, манганова стомана и електростомана.

#### Деца, живеещи в район, антропогенно замърсен с манган

Изследвано е съдържанието на Mn-N на общо 205 деца, 26 деца контролна група (15 момчета и 11 момичета) и 179 от с. Яна, район МК „Кремиковци“ (87 момчета и 92 момичета), разпределени в 4 възрастови групи: 3–6 години (39 деца), 7–9 години (47 деца), 10–12 години (47 деца), 13–15 години (46 деца).

### 2.2. Биологични материали

Съдържанието на манган е определено в *урина и нокти*. Пробовземането е извършено целенасочено и представително, със спазване на правилата на преданалитичния качествен контрол за вземане и съхранение на биологични проби.

*Урина* – събирани са 4 или 6-часови порции от експонирани работници в хода на работната смяна (през всеки друг освен първия ден на работната седмица или първия след почивни дни при други сменни режими). Порции от 15 ml от всяка проба са прехвърлени в пластмасови епруветки и консервирани с 0.5 ml 1M HNO<sub>3</sub>.

*Нокти* – израснали за 1 месец, направен е предварителен инструктаж за спазване на определени условия и изисквания.

При пробонабирането и реализирането на дейностите са следвани “Етичните принципи за медицински изследвания с участието на хора”, съгласно Декларацията от Хелзинки на Световната медицинска асоциация [19]. **Сертифицирани референтни материали (СРМ) и лабораторни референтни материали (ЛРМ)**

Сертифицирани референтни материали за определяне на манган в урина („Urine Metals Control” Lot № 39201, BioRad® ECS Div., Anaheim, CA) и коса (CRM-5 „Human Hair”, предоставен от National Institute for Environmental Studies (NIES), Tsukuba, Japan), и ЛРМ (коса) са използвани за контрол на качеството на анализите при разработване, валидиране и приложение на методите за определяне на манган в биологични среди.

### 2.3. Апаратура

Определянето на концентрациите на манган в различните биологични среди е извършено с атомноабсорбционен спектрометър AAS Perkin-Elmer 3030 с автоматичен деутериев коректор; графитен атомизатор HGA-400 и автоматично пробоподаващо устройство (аутосамплер) AS-1. Концентрацията на Mn в някои хомогенати на нокти и коса (10% m/v) е определена също чрез пламъкова ААС чрез ръчно импулсно пулверизи-

ране с атомноабсорбционен спектрометър Pye Unicam SP9 [20].

### 3. Резултати и обсъждане

#### 3.1. Аналитични процедури за определяне на манган в биологични среди

Електротермичната атомно-абсорбционна спектрометрия с графитен атомизатор (ETAAS, GFAAS) е сред най-добрите и широко използвани аналитични методи за определяне на манган в биологични среди.

#### Подготовка на пробите

**Урина:** В деня на определяне на манган в урина с ETAAS пробите се разреждат директно в съотношение 1+1 (v/v) с 1M HNO<sub>3</sub>, която също играе ролята и на подходящ химичен модификатор. Поради много ниските нива на анализа е необходим стриктен контрол на празната проба. При изследване на урина от експонирани на манган работници се налагат по-големи разреждания, в зависимост от очакваните концентрации на елемента. Ако урината е съхранявана в замразено състояние, за по-добро хомогенизиране след размразяване, е подходящо третиране на епруветките с пробите в ултразвукова вана за около 15 min.

**Нокти:** Почистените механично изрезки от нокти се претеглят (около 0.05–0.1 g), промиват се с 0.1% v/v Три-тон X-100 и се изплакват неколккратно с бидестилирана вода. Пробите се солибилизируют с 0.5 ml 40% воден разтвор на тетраетиламониев хидроксид (TEAH) и се разреждат с бидестилирана вода за получаване на 10% m/v хомогенат. За определяне на Mn чрез FAAS аликуотни части от хомогенатите (100 µl) се инжектират (ръчно, с микропипета) в устройството за импулсно пулверизиране в пламък – чашка от политетрафлуоретилен (PTFE), свързана с пулверизатора посредством къса PTFE капилляра. За ETAAS определяне 20 µl от допълнително разредените хомогенати (1% m/v) на пробите се инжектират в графитната пещ [20].

#### Инструментални параметри

Количественото определяне на манган в подготовените биологични проби се извършва при дължина на вълната  $\lambda=279.5$  nm; процеп на монохроматора 0.2 nm за определяне на Mn-U и по-широк (2 nm) при определяне на Mn-N, при което се фотометрират и останалите две линии на триплета на мангана 279.8 и 280.1 nm за по-добро съотношение сигнал/шум; ток на лампата HCL 20 mA; обем на внесената проба 20 µl. При определяне на Mn-N се използват обикновени графитни тръбички; графитните тръбички с пиролитно покритие притежават по-висока термична устойчивост и осигуряват по-добра чувствителност при определяне на Mn-U. Корекция за неселективно поглъщане е необходима за избягване на

грешки близо до границата на откриване, както и за елиминиране на ефекти, причинени от съизпарила се матрица.

#### Температурни програми

Температурните програми са представени в Таблица 1.

С въвеждане на допълнителна стъпка на опепеляване при 350 °C се постига по-пълно и плавно отстраняване на белтъчната матрица. Чувствителността се повишава, а влиянието на преченията от матрицата се намалява при измерване на площ на пиковите (интегрална абсорбция,  $A_{int}$ ).

**Таблица 1.** Температурни програми за ETAAS определяне на Mn-U<sup>a</sup> и Mn-N<sup>b</sup>

Стъпка №	Температура [°C]	Време за достигане [s]	Време за задържане [s]	Поток на аргона [ml/min]	Отчитане
1	130	10 <sup>a</sup> ; 20 <sup>b</sup>	30	250	–
2	350 <sup>a</sup> ; 550 <sup>b</sup>	15	10	250	–
3	1100 <sup>a</sup> ; 1050 <sup>b</sup>	15	20 <sup>a</sup> ; 40 <sup>b</sup>	250	–
4	2400	0	3	0	Да
5	2600	1	2	250	–

#### Калибриране

При определяне на Mn-U се калибрира по метода на стандартната добавка (МСД). При наши изследвания е установено, че разреждане на урината 1+3 е подходящо за определяне на повишени нива на манган; получените прави по МСД и калибрационната крива (кк) са почти успоредни, което дава възможност да се увеличи производителността на анализа при голям брой проби от експонирани лица като се калибрира по кк. При определяне на Mn-N чрез FAAS калибрирането се извършва по МСД; за ETAAS определяне на манган в 1% m/v хомогенат от нокти, поради липса на матричен ефект, може да се калибрира и по метода на калибрационната крива.

Направено е сравнение между резултатите за Mn в нокти, получени чрез FAAS и ETAAS. Анализирани са 33 проби нокти за Mn. Получените средни концентрации за елемента по двата начина на определяне (ETAAS 1.1 µg/g; FAAS 1.0 µg/g) не се различават статистически достоверно помежду си ( $P > 0.05$ ), коефициентът на корелация между индивидуалните стойности ( $r$ ) е 0.87.

#### Валидиране

Методите са валидирани чрез анализи на СРМ за определяне на манган в урина и коса (Таблица 2). Получените средни концентрации на манган в СРМ показват добро съгласие със сертифицираните стойности.

#### Аналитични характеристики

Аналитичните характеристики на разработените методи за определяне на манган в урина и нокти са представени в Таблица 3.

**Таблица 2.** Установени концентрации на манган в СРМ урина<sup>а</sup> и коса<sup>б</sup>

Показател	Сертифицирано	Получено ± SD, <sup>а</sup>	RSD, <sup>а</sup> [%]	Изместване [%]
Mn-U [µg/l]	15.8 (11.3–20.3)	16.5±1.70 (14.3–18.6)	10.1	4.7
Mn-H [µg/g]	5.2±0.3	4.9±0.14 (GFAAS) 5.4±0.33 (FAAS)	1.7 4	-4.0 6.9

<sup>а</sup> Bio Rad Urine Metals Control<sup>®</sup>; <sup>б</sup> CRM-5 „Human Hair“; <sup>а</sup> Стандартно отклонение в условия на

**Таблица 3.** Аналитични характеристики при определяне на Mn-U и Mn-N

Параметър	Mn-U	Mn-N	
		GFAAS	FAAS
Граница на откриване (LOD)	0.15 µg/l или 0.30 µg Mn/l урина	0.20 µg/g	0.13 µg/g
Граница на определяне (LOQ)	0.30 µg/l или 0.60 µg Mn/l урина	0.40 µg/g	0.26 µg/g
RSD <sub>r</sub>	2–8%	1.70%	4.00%
Изместване	4.7% <sup>а</sup>	-4.0 % <sup>б</sup>	6.9 % <sup>б</sup>

<sup>а</sup> CPM BioRad<sup>®</sup> Urine Metals Control Lot № 39201, Mn 15.8 (11.3–20.3) µg/l.

<sup>б</sup> CRM-5 „Human Hair“, Mn 5.2±0.3.

Определянето на манган в урина чрез ETAAS и на манган в нокти (и коса) чрез FAAS с импулсно пулверизиране и ETAAS след солибилизиране с TEAH са напълно достъпни и несложни процедури. При оптимизираните инструментални параметри и температурни програми е постигнато селективно определяне на манган: много добро съотношение сигнал/шум, намаляване на преченята, ефективна корекция на неселективното поглъщане и разделяне на пиковете на мангана A<sub>ат</sub> и неселективната абсорбция A<sub>бг</sub>. Методите са директни, времето за подготовка на пробите и възможностите за замърсяване или загуби на елемента са сведени до минимум, което значително подобрява тяхната надеждност.

### 3.2. Проучвания върху информативната стойност на нивата на манган в урина и нокти и приложението им като биомаркери за експозиция

В България контролът на експозицията се осъществява чрез определяне на концентрацията на Mn във въздуха на работното място. Граничната стойност (ГС) за „манган-оксид и неорганични съединения (като манган)“ е 0.3 mg/m<sup>3</sup> [21]. Липсата на биомаркери за персонална оценка на експозицията ограничава провеждането на биологичен контрол.

Разработените аналитични процедури за определяне на Mn в урина и нокти са приложени при деца, експонирани работници и контролни лица. Получените резултати

са оценени от гледна точка на тяхната информативност и възможност за приложение като биомаркери за експозиция.

### Параметри на външната експозиция

Най-висока експозиция е установена в производството на манганова стомана. Тя е относително постоянна, концентрациите на манган във въздуха (Mn-A) са повишени над 0.3 mg/m<sup>3</sup>. В производството на специални стомани Mn-A не надвишава ГС и е в интервала 0.0007–0.1040 mg/m<sup>3</sup>. В производството на електростомана средните концентрации при пещта и машината за леене са малко над ГС – съответно 0.43 и 0.38 mg/m<sup>3</sup>, а на останалите работни места са по-ниски от 0.3 mg/m<sup>3</sup>.

Металургичният комбинат (МК) Кремиковци е дългогодишен основен източник на замърсяване на въздуха, водата и почвата в Софийската котловина с Pb, Mn и Cd [22]. Замърсяването с Mn е предимно чрез атмосферно отлагане на прах и аерозолни емисии от Комбината. При проведени проучвания е установено повишено съдържание на метала във въздух, води, почви и растения. Най-високи концентрации във въздуха са измервани в с. Яна, пак там са установени значителни нива на Mn в повърхностни води и е открито най-високо съдържание на Mn в почви и растителни храни [22,23–27]. Токсичните метали притежават изключителна устойчивост и практическа неизменчивост след постъпване в почвата. Ерозията частично намалява количеството им, но улеснява пренасянето и акумулирането им, което способства за разпространяване на замърсяването върху все по-големи площи [24].

### Манган в урина и нокти при работници, експонирани на манган

#### Манган в урина

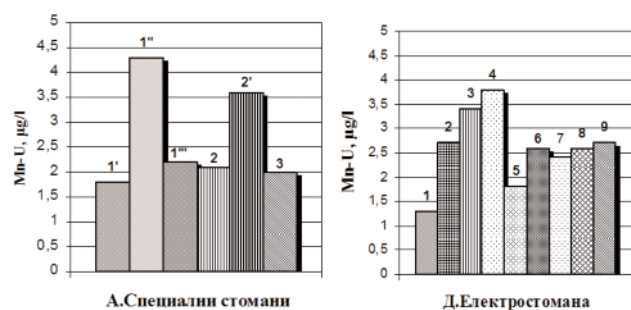
Mn-U при изследваните групи работници от производство на специални стомани не се увеличава достоверно (P > 0.05) спрямо контролната група A1 (x<sub>g</sub> 2.7 µg/l, SEM 0.8 µg/l, n = 26) при съществуващото ниво на експозиция. Най-висока е установената средна стойност на подгрупа A1“ (4.3 µg/l), което обаче не е в съответствие с измерените нива на Mn във въздуха на работната среда. Mn-U се увеличава достоверно при изследваните групи работници от производството на електростомана с изключение на механошлосерите от пещен участък (група D5) (Табл. 4, Фиг. 1). Установените средни стойности на Mn-U на професионалните групи в пещен и разливочен участък са в сравнително добро съответствие с Mn-A. Те са най-високи при “кранистите” (група D4), следвани от “стомановари” (група D3), “разливчици” (група D6) и “други професии” (група D9).

Получените резултати показват, че Mn-U може да се използва като биомаркер за оценка на вътрешната експозиция на групово ниво при високи концентрации на елемента във въздуха на работната среда. Проявява ясно и възможността от установяване на фалшиво

**Таблица 4.** Нива на манган в урина и нокти на изследваните групи работници от производствата на специална, манганова и електростомана

Производство	Група (Код)	Описание	Mn-U, µg/l x <sub>g</sub> (n) SEM min-max	Mn-N, µg/g x <sub>g</sub> (n) SEM min-max
А. Специални стомани	A1'	Конструктори + рентгенова лаборатория	1.8 (14) 0.4 0.3-5.5	
	A1''	РМЦ	4.3 (6) 1.8 0.3-13.0	1.1 (18) 1.2 0.2-2.7
	A1'''	Административен персонал	2.2 (6) 0.5 0.5-4.0	
	A2	Стомановари	2.1 (13) 0.5 0.6-7.9	2.3 (13) 1.1 0.9-3.6
	A2'	Стомановари, експонирани в деня на пробоземане на	3.6 (8) 1.2 0.7-8.5	
	A3	Спомагателен персонал	2.0 (21) 1.2 0.4-5.1	2.0 (12) 1.2 0.8-3.8
Г. Манганова стомана	Г1	Контрола		0.8 (9) 1.3 0.3-2.7
	Г2	Контрола		0.6 (17) 1.2 0.2-1.9
	Г3	Стомановари		3.8 (7) 1.3 1.0-11.0
Д. Електростомана	Д1	Контрола	1.3 (23) 1.2 0.5-4.0	0.5 (21) 1.2 0.3-2.7
	Д2	Газорезачи – шихтов участък	2.7 (11) 1.1 1.2-5.6	
	Д3	Стомановари	3.4 (14) 1.3 1.0-22.8	1.6 (13) 1.3 1.0-3.7
	Д4	Кранисти	3.8 (18) 1.2 0.8-15.5	1.2 (12) 1.2 0.5-2.3
	Д5	Механошлосери – пещен участък	1.8 (10) 1.3 0.3-4.2	
	Д6	Разливчици	2.6 (15) 1.2 1.2-8.0	1.4 (9) 1.3 0.4-3.9
	Д7	Оператори – разливочен участък	2.4 (14) 1.2 0.6-6.2	0.7 (10) 1.1 0.5-1.2
	Д8	Други професии в пещен и разливочен участък	2.6 (10) 1.3 1.0-10.2	1.4 (5) 1.3 0.8-3.0
	Д9	Други професии	2.7 (8) 1.4 0.6-7.2	1.4 (4) 1.3 1.1-2.1

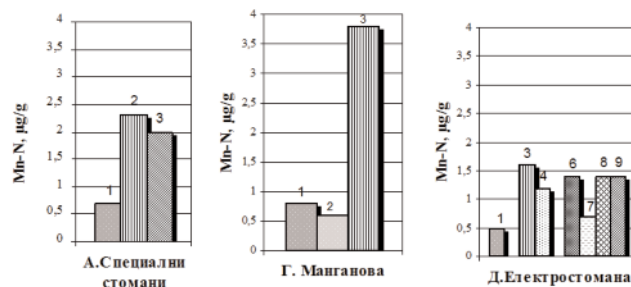
LOD: Mn-N 0.2µg/g, Mn-U 0.3 µg/l

**Фигура 1.** Нива на манган в урина на изследваните групи работници Производства – групи: А. Специални стомани – А1, контрола; А1' - конструктори и персонал на рентгеновата лаборатория, А1'' - работници от ремонтно-механичен цех (РМЦ) и А1''' - технолози, снабдители, административен персонал); А2, стомановари; А2' стомановари, експонирани в деня; А3, спомагателен персонал. Д. Електростомана – Д1, контрола; Д2, газорезачи – шихтов участък; Д3, стомановари; Д4, кранисти; Д5, механошлосери-пещен участък; Д6, разливчици; Д7, оператори-разливочен участък; Д8, други професии в пещен и разливочен участък; Д9, други професии.

позитивни резултати при неекспонирани лица (както е при работниците от РМЦ от производството на специални стомани) поради повишено постъпване на мангана по други пътища (напр. с храна и напитки). Изследвания на други автори също показват, че Mn-U може да се използва за мониторинг на експозицията на манган само на групова база: нивата на манган в урината на експонирани работници (заварчици на стомана, работници от линия за производство на елементи за батерии) са статистически значимо по-високи спрямо тези на контролните групи, но корелацията на индивидуалните резултати с концентрацията на манган в работната среда е слабо изразена както и корелацията между Mn-A и нивото на заболяемост [28-31].

#### Манган в нокти

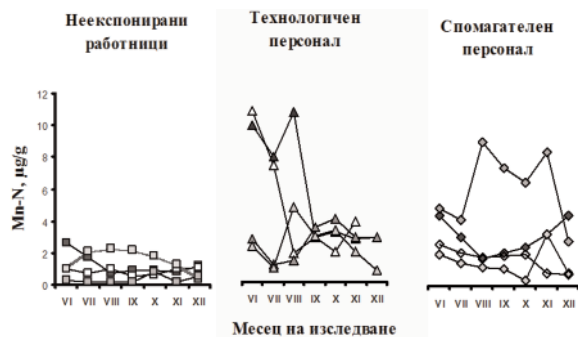
Средните стойности на Mn-N при експонирани групи от изследваните производства на стомана се увеличават статистически достоверно над стойностите при лицата без професионална експозиция на Mn (Табл. 4, Фиг. 2). Най-висока е средната стойност на стомановарите от манганова стомана (група Г3), следвани от групите на стомановарите и спомагателен персонал (А2 и А3) от специални стомани. От групите в електростоманодобива, предоставили нокти за изследване, средните стойности на Mn-N (без "оператори") се увеличават статистически достоверно над стойностите за контролната група.

**Фигура 2.** Нива на манган в нокти на изследваните групи работници Производства – групи: А. Специални стомани – А1, контрола; А2, стомановари; А3, спомагателен персонал. Г. Манганова стомана – Г1, контрола; Г2, контрола; Г3, стомановари. Д. Електростомана – Д1, контрола; Д2, газорезачи-шихтов участък; Д3, стомановари; Д4, кранисти; Д5, механошлосери-пещен участък; Д6, разливчици; Д7, оператори-разливочен участък; Д8, други професии в пещен и разливочен участък; Д9, други професии.

Проверена е статистически хипотезата за възможни полови различия (при неекспонирани лица) по отношение концентрациите на Mn-N: при мъжете е установено по-високо ниво ( $0.8 \pm 1.1$ ) µg/g, n = 26 в сравнение с това при жените ( $0.5 \pm 1.1$ ) µg/g, n = 23, P < 0.05).

В продължение на 7 месеца е проведен лонгитудинален биологичен контрол за проследяване нивото на

отлагане на манган в ноктите без наличието и в хода на професионална експозиция при изследваните групи от производството на специални стомани (Фиг. 3 и Фиг. 4).



**Фигура 3.** Типични хронологични индивидуални вариации на нивата на Mn-N при неекспонирани и експонирани на манган работници в производството на специални стомани

Фактът, че Mn-N може да се различава значително при един и същ човек в два последователни месеца подсказва необходимостта от лонгитудинален биологичен контрол и натрупването на резултати, показващи трайното наличие на повишени стойности (Фиг. 3). Средногруповите резултати също не показват ясна сезонна вариабилност, а наличие на трайно и достоверно повишение при експонирани на манган групи през целия изследван период. Различията от месец до месец свидетелстват главно за колебания в нивата на експозиция (особено ясно при нормализираните стойности – Фиг. 4).



**Фигура 4.** Проспективно лонгитудинално изследване на нивата на Mn-N при неекспонирани и експонирани на манган групи в производството на специални стомани

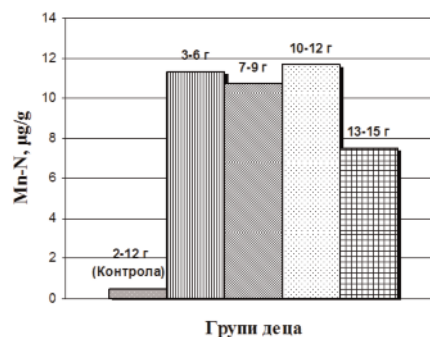
При корелационния анализ на двойките данни Mn-U:Mn-N се получава нисък и статистически недостоверен корелационен коефициент, който за производството на специални стомани е  $r = 0.13$ ,  $n = 39$ ,  $P > 0.05$ , а при работниците от електростоманодобива  $r = 0.18$ ,  $n = 48$ ,  $P > 0.05$ . Липсата на съгласуваност между нивата на Mn-N и

Mn-U може да се обясни с факта, че Mn-U отразява близката по време експозиция, а Mn-N – нивото на експозиция преди 6–8 месеца.

Оценката на вътрешната експозиция на Mn в изследваните производства на стомана чрез определяне на елемента в нокти доказва реално повишено постъпване на метала по дихателен път. Нивата на Mn-N са по-високи при технологичния персонал (стомановари, разливачници) и корелират с концентрациите на елемента във въздуха на работната среда, които са най-високи в производството на манганова стомана, а в електростоманодобива – при пещта и машината за леене.

#### **Манган в нокти при изследваните рискови групи население от района на МК Кремиковци**

Статистическата оценка на Mn-N на всички изследвани групи деца от с. Яна (Фиг. 5) показва достоверно увеличение спрямо контролната група ( $P < 0.001$ ). Средната стойност на Mn-N на групата на най-големите деца (13–15 г.) е статистически достоверно по-ниска от останалите три групи на по-малките ( $P < 0.05$ ).



**Фигура 5.** Нива на Mn-N на изследваните групи деца от с. Яна, район МК „Кремиковци“

Регресионният и корелационен анализи на зависимостта между Mn-N и възрастта на изследваните деца очертават тенденция към понижаване на Mn в ноктите с увеличаване на възрастта:

$Mn-N = -0.35 \text{ възраст в години} + 13.64$ ;  $r = -0.71$ ,  $n = 179$ ,  $P < 0.05$ .

Тази тенденция може да се обясни с утвърждаването на хигиенните навици у по-големите деца.

Установените разлики в нивата на Mn-N при мъже и жени се наблюдават и при децата. Проведената допълнителна статистическа обработка за откриване на полови различия по отношение концентрациите на Mn-N показва, че средната стойност при момчетата е по-висока от средната стойност на момичетата:

момчета ( $12.9 \pm 0.8$ )  $\mu\text{g/g}$ ,  $n = 87$  vs. момичета ( $8.2 \pm 0.6$ )  $\mu\text{g/g}$ ,  $n = 92$ , ( $P < 0.001$ ).

Тази констатация предполага при бъдещи изследвания групите да бъдат стандартизирани и по пол.

Установените високи средногрупови стойности на манган в ноктите на изследваните деца от с. Яна и по-широкият интервал на вариране на индивидуалните стойности (1.0–43.8 µg/g) показват относително по-висока абсорбция на метала при децата. При неврологичния преглед и при изследвания на хематологични и биохимични показатели, обаче, не са установени достоверни различия между изследваните деца от с. Яна и контролната група, които могат да се свържат с въздействие или интоксикация [32]. Неблагоприятните последици за здравето от експозиция на манган могат да се проявят по различни начини и са описани като "континуум от дисфункции". Част от тази вариабилност може да се дължи на различията в метаболизма на мангана – дадена доза може преференциално да се абсорбира или екскретира според различните нива на чувствителност на отделния индивид [33–35].

Проведените изследвания на експонирани работници и деца демонстрират качествата на Mn-N като перспективен биомаркер за оценка на предшестваща експозиция на групово ниво и аргументират неговото използване като нов специфичен биомаркер за експозиция в помощ на биологичния контрол, предоставящ информация за депониране на Mn в клетките и за индивидуалните различия в този процес. Показана е възможността за използване на Mn-U като индикатор за непосредствената експозиция при високи концентрации на Mn във въздуха на работната среда.

#### 4. Заключение

Проведените изследвания на работници и деца, експонирани на манган, дават основание да се приеме че резултатите от определянето на токсичния елемент в биологични среди (урина и нокти) чрез разработените аналитични процедури могат да се прилагат като биомаркери за експозиция за оценка на въздействието на Mn от околна и работна среда: Mn-U е селективен биомаркер, но не различава професионалната експозиция на метала, възможно е установяване на фалшиво позитивни резултати при неекспонирани лица, поради повишено постъпване на манган по други пътища (напр. с храни и напитки). Mn-U може да се използва за оценка на експозицията на групово ниво при високи концентрации на метала във въздуха на работната среда; Mn-N е селективен и чувствителен биомаркер, доказва повишено постъпване на елемента при експонирани групи, корелира с концентрациите на Mn-A. Mn-N предоставя информация за нивото на индивидуалната и групова вътрешна експозиция дори при умерено повишени концентрации на елемента в работна среда, а също и при постъпване от замърсена околна среда. Mn-U отразява непосредствената експозиция; Mn-N – нивото на експозиция преди 6–8 месеца.

#### References

- [1] M. Šarić, R. Lucchini. Manganese, In: *Handbook on the Toxicology of Metals*. 3rd edition, G. Nordberg, B. Fowler, M. Nordberg, L. Friberg (Eds.), Academic Press, Inc., New York, **2007**, Chapter 32, pp. 645–676.
- [2] A.B. Santamaria, *Indian J. Med. Res.* 128 (**2008**) 484–500.
- [3] J.A. Menezes-Filho, M. Bouchard, P.N. Sarcinelli, J.C. Moreira, *Rev. Panam. Salud Publica* 26 (**2009**) 541–548.
- [4] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), *Toxicological Profile for Manganese*, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, Georgia, pp. 556, **2012**.
- [5] B. Michalke, K. Fernsebner, *J. Trace Elements in Medicine and Biology* 28 (**2014**) 106–116, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.08.005>.
- [6] D.L. Tsalev, Z.K. Zaprianov. Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice, Vol. I: Analytical Aspects and Health Significance, CRC Press, Boca Raton, Florida, **1983**, ISBN 0-8493-5603-2.
- [7] B. Weiss, *Workshop Report of SAB/EPA Workshop on the Benefits of Reductions in Exposure to Hazardous Air* (**2002**), F-4-1–F-4-26, [http://yosemite.epa.gov/sab/5CSABPRODUCT.NSF/34355712ECO11A358525719A005BF6F6/\\$File/ecwksph02001%2Bappa-g.pdf](http://yosemite.epa.gov/sab/5CSABPRODUCT.NSF/34355712ECO11A358525719A005BF6F6/$File/ecwksph02001%2Bappa-g.pdf).
- [8] K.L. Björklund, M. Vahter, B. Palm, M. Grandér, S. Lignell, M. Berglund, *Environ. Health* 11 (**2012**), doi:10.1186/1476-069X-11-92.
- [9] J. Cavallari, *The Center for Construction Research and Training (CPWR) Technical Report*, pp. 19, **2010**.
- [10] M. Bouchard, F. Laforest, L. Vandeland, D. Bellinger, D. Mergler, *Environ. Health Perspect.* 115 (**2007**) 122–127.
- [11] S. Montes, H. Riojas-Rodriguez, E. Sabido-Pedraza, C. Rios, *Environ. Research* 106 (**2008**) 89–95.
- [12] E.A. Smith, P. Newland, K.G. Bestwick, N. Ahmed, *J. Trace Elements in Medicine and Biology* 27 (**2013**) 65–69.
- [13] R.O. Wright, C. Amarasiriwardena, A.D. Woolf, R. Jim, D.C. Bellinger, *NeuroToxicology* 27 (**2006**) 210–216.
- [14] P. Apostoli, R. Lucchini, L. Alessio, *Am. J. Ind. Med.* 37 (**2000**) 283–290.
- [15] W. Laohadomchok, X. Lin, R.F. Herrick, S.C. Fang, J.M. Cavallari, D.C. Christiani, M.G. Weisskopf, *J. Occup. Environ. Med.* 53 (**2011**) 506–510, DOI:10.1097/JOM.0b013e31821854da.
- [16] Ц. Водиченска, *Хигиена и здравеопазване* 35 (**1992**) 39–41.
- [17] В. Петкова, Й. Хаджиева, М. Матакиева, *Хигиена и здравеопазване* 35 (**1992**) 32–37.
- [18] F. Baruthio, O. Guillard, J. Arnaud, F. Pierre, R. Zawislak, *Clin. Chem.* 34 (**1988**) 227–234.
- [19] World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 1964, last amended **2008**.
- [20] D.L. Tsalev, E.I. Tserovski, A.I. Raitcheva, A.I. Barzev, R.B. Georgieva, Z.K. Zaprianov, *Spectrosc. Lett.* 26 (**1993**) 331–346.
- [21] Наредба № 13/2003 г. за защита на работещите от рискове, свързани с експозиция на химични агенти при работа, *Обн. ДВ. бр. 8/2004 г.*
- [22] *ОВОС на Общ Устройствен план на гр. София и Столична Община*. Доклад на колектив: В. Троева, Д. Денев (ръководители), ЕТ Троева Консулт – София, **2002**, 184 с.
- [23] В. Бояджиев (ръководител). *Замърсяване на околната среда с тежки метали (олово, манган, кадмий, живак и арсен) и влиянието им върху човешкия организъм*, Отчет по тема рег. № 10179009, НИХПЗ, МА, С., **1978**, 161 с.
- [24] И. Лъчовев (ръководител). Актуализиране и внедряване на проучванията и картиране на замърсяването на почвите с тежки метали в Софийски окръг, Отчет по тема, НИХПЗ-МА, Клуб за ТНТМ, С., **1982**, 58 с.



- [25] Ф. Калоянова, К. Басмаджиева, М. Попов (ред.). *Екология и здраве*. С., Медицина и физкултура, С., **1985**, с. 84–170.
- [26] К. Узунов, В. Захаријева, В. Коларова, В. Драгостинова, Й. Узунов, *Геохимия, минералогия и петрология*, БАН, 31 (**1996**) 103–123.
- [27] Н. Динев, Автореферат на дисертация за присъждане на научна степен "Доктор на науките", Институт по почвознание „Н. Пушкин", С., **2011**.
- [28] J. Järvisalo, M. Olkinuora, M. Kiilunen, H. Kivistö, P. Ristola, A. Tossavainen, A. Aitio, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 63 (**1992**) 495–501.
- [29] К. Мутафчиев, *Приложение на нови каталитични спектрофотометрични методи за определяне на манган в различни обекти, в клиничнолабораторни изследвания при някои гастроентерологични, хематологични, ендокринни заболявания и в условия на професионална експозиция*, Автореферат за присъждане на научна степен Доктор на науките, МУ, Плевен, **2005**, 101 с.
- [30] К. Мутафчиев, *Манганът в медицината и аналитичната химия*, ИЦ – „МУ-Плевен", **2006**, 293 с.
- [31] D. Ellingsen, E. Zibarev, Z. Kusraeva, B. Berlinger, M. Chashchin, R. Bast-Pettersen, V. Chashchin, Y. Thomassen, *Environ. Sci.: Processes Impacts* 15 (**2013**) 357–365
- [32] Д. Чаръкчиев (ръководител). *Оценка здравословното състояние на децата от района на община Кремиковци (с оглед на съществуващото замърсяване)*, рег. № 82283225 (ЦИНТИ), С., **1990**.
- [33] D. Mergler, M. Baldwin, S. Belanger, F. Larribe, A. Beuter, R. Bowler, M. Panisset, R. Edwards, A. de Geoffroy, M.P. Sassine, K. Hudnell, *Neurotoxicology* 20 (**1999**) 327–342.
- [34] C.J. Martin, *Neurotoxicology* 27 (**2006**) 347–349.
- [35] B.C. Henn, J. Kim, M. Wessling-Resnick, M.M. Téllez-Rojo, I. Jayawardene, A.S. Ettinger, M. Hernández-Avila, J. Schwartz, D.C. Christiani, H. Hu, R.O. Wright, *Environ. Health* 10 (**2011**), doi:10.1186/1476-069X-10-97.

*Bulg. J. Chem.* 3 (**2014**) 101-109

# Manganese levels in urine and nails as biomarkers of exposure – informational value and relevance

Rossitsa B. Georgieva<sup>1,\*</sup>, Dimiter L. Tsalev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Center of Public Health and Analyses, 15, Acad. Iv. Evst. Geshov, 1431 Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup> University of Sofia "St. Kl. Ohridski", Faculty of Chemistry and Pharmacy, 1, J. Bourchier Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria

\* Corresponding author. E-mail: r.georgieva@ncpha.government.bg

## Article history:

Received: 20 October 2014

Revised: 8 November 2014

Accepted: 10 November 2014

Available online: 20 November 2014

Manganese is an essential trace element, but in higher doses it exhibits a neurotoxic effect. Validated analytical procedures for determination of manganese in urine (Mn-U) and nails (Mn-N) were applied for biological control of the exposure of 149 workers from steel production and 179 children from village Yana, MK Kremikovtzi area. It was established that the mean Mn-U levels of technological staff – steel smelters ( $1.6 \pm 1.3 \mu\text{g/l}$ ) and steel founders ( $1.4 \pm 1.3 \mu\text{g/l}$ ) were increased; the highest mean Mn-N level was found in the steel smelters' group from the manganese steel production ( $3.8 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$ ), exposed to manganese concentrations in their work environment above the permitted levels. Mean Mn-N levels of all children's groups splitted by their age ranges:  $11.0 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$  (3–6 years old);  $10.7 \pm 1.0 \mu\text{g/g}$  (7–9 years);  $11.7 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$  (10–12 years); and  $7.5 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$  (13–15 years), were reliably increased versus the control group ( $0.5 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ ), and the individual values vary within a wide range ( $1.0$ – $43.8 \mu\text{g/g}$ ). Mn-U and Mn-N could be applied as biomarkers of exposure: Mn-U for assessment of the recent exposure on a group level, at high manganese concentrations in the working environment; Mn-N reflects individual and group levels of internal exposure 6–8 months ago, even at moderately elevated metal concentrations in the working environment – at about  $0.1 \text{ mg/m}^3$ , as well as from the exposure of polluted environment.

**Keywords:** biomarkers, electrothermal atomic absorption spectrometry, exposure assessment, manganese, validation