

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA”
BUCUREȘTI**



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

ROLUL STRESULUI OXIDATIV ȘI TERAPIA ANTIOXIDANTĂ ÎN INTOXICAȚIA CU PLUMB

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

PROF. UNIV. DR. RADU ALEXANDRU MACOVEI

DOCTORAND

ȚINCU RADU CIPRIAN

București

2017

CUPRINS

INTRODUCERE	4
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	6
I.1. Istoricul intoxicației cu plumb	6
I.2. Sursele intoxicației cu plumb	11
I.2.1. Plumbul folosit în industrie.....	12
I.2.2. Plumbul din alimente	13
I.2.3. Fumatul și expunerea la plumb.....	13
I.2.4. Plumbul din apa de consum	14
I.2.5. Plumbul din sol.....	15
I.2.6. Plumbul și remediile naturale	15
I.2.7. Surse autohtone.....	16
I.3. Farmacocinetica	18
I.3.1. Compuși anorganici de plumb	18
I.3.2. Compuși organici de plumb.....	24
I.4. Fiziopatologia intoxicației cu plumb	26
I.4.1. Afectarea sistemului eritropoetic.....	26
I.4.2. Afectarea sistemului nervos central	28
I.4.3. Afectarea renală.....	30
I.4.4. Afectarea cardiovasculară	31
I.4.5. Carcinogenitatea plumbului.....	32
I.4.6. Genotoxicitatea umană	34
I.4.7. Influența asupra mitogenezei	35
I.5. Intoxicația cu plumb și stresul oxidativ	37
I.5.1. Considerații generale	37
I.5.2. Peroxidarea lipidelor.....	39
I.5.3. Apoptoza și stresul oxidativ.....	47
I.5.4. Rolul enzimelor antioxidante	51
I.6. Manifestări clinice în intoxicația cu plumb	53
I.6.1. Semne și simptome legate de toxicitatea hematologică.	57
I.6.2. Semne și simptome legate de toxicitatea neurologică.	58
I.6.3. Semne și simptome legate de toxicitatea renală.....	59
I.6.4. Semne și simptome asociate aparatului reproducător.	59

I.6.5. Semne și simptome în raport cu nivelul plumbemiei	60
I.7. Diagnosticul în intoxicația cu plumb.	61
I.7.1. Evaluare anamnestică.....	61
I.7.2. Evaluarea fizică.....	61
I.7.3. Evaluare de laborator	62
I.8. Tratamentul intoxicației cu plumb	64
I.8.1. Principii de tratament	64
I.8.2. Terapia antioxidantă	66
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	70
II.1. Motivația studiului	70
II.2. Obiective	72
II.3. Material de lucru	73
II.3.1. Populația	73
II.4. Metode de cercetare	74
II.4.1. Protocolul de studiu	74
II.4.2. Ancheta socio-demografică.....	74
II.4.3. Evaluare antropometrică.....	75
II.4.4. Evaluare clinică	75
II.4.5. Determinări toxicologice.....	75
II.4.6. Evaluare hematologică	80
II.4.7. Evaluare biochimică	80
II.4.8. Determinarea capacității anti-oxidante	80
II.5. Analiza statistică	81
II.6. Considerații etice	82
II.7. Rezultate	82
II.7.1. Caracteristicile generale ale lotului studiat.....	82
II.7.2. Evaluare antropometrică.....	90
II.7.3. Evaluare clinică	93
II.7.4. Determinări toxicologice.....	102
II.7.5. Evaluare hematologică	108
II.7.6. Evaluare biochimică	111
II.7.7. Determinarea capacității antioxidante.....	116
II.8. Discuții	125
II.8.1. Caracteristicile generale ale lotului	125

II.8.2. Evaluare antropometrică.....	127
II.8.3. Evaluare clinică	128
II.8.4. Determinări toxicologice.....	130
II.8.5. Evaluare hematologică	132
II.8.6. Evaluare biochimică	133
II.8.7. Determinarea capacității anti-oxidante	134
II.9. Aplicații practice. Perspective	138
Listă de abrevieri	139
CONCLUZII FINALE.....	140
BIBLIOGRAFIE	142

INTRODUCERE

Plumbul este un metal toxic a cărui prezență este răspândită la nivelul scoarței terestre, având utilitate intensivă și extensivă în industrie și în activitatea umană, producând contaminarea mediului înconjurător și expunerea omului și a animalelor. Trebuie întreprinse eforturi pentru a cunoaște sursele non-profesionale de expunere, cunoscând faptul că acestea pot avea un impact asupra stării de sănătate a populației generale. În arealul geografic al României, există o preocupare pentru distilarea alcoolului în dispozitive fabricate artizanal, din elemente tehnice care pot conține plumb, urmată de comercializarea și consumul alcoolului contaminat cu plumb astfel rezultat.

Plumbul are un efect toxic cumulativ, pluriorganic, afectând populația indiferent de vârstă. Copiii sunt în mod particular vulnerabili la efectele toxice ale plumbului, care poate determina afectare permanentă neurologică și cognitivă. În cazul adulților, expunerea la plumb indică afecțiuni cronice, cardio-vasculare sau renale. Expunerea în cazul femeilor gravide interferează cu dezvoltarea normală a sarcinii. În anul 2013, Organizația Mondială a Sănătății atrage atenția asupra numărului important de decese (853000) cauzate de efectele pe termen lung ale expunerii la plumb, având cea mai mare incidență în țările în curs de dezvoltare. În același raport a fost identificat faptul că 9.3% din totalul dizabilităților intelectuale idiopatice, 4% dintre accidentele coronariene acute și 6.6% din accidentele vasculare cerebrale au în origine aceeași cauză toxică.

Chiar și în prezent, încă există dileme științifice cu privire la nivelul maxim de plumb acceptat ca expunere. Acest fapt este determinat de reducerea progresivă a normelor, ce are la bază dovezi științifice care atestă faptul că expunerea la plumb chiar și la valori ale plumbemiei de sub 10 $\mu\text{g/dL}$, interferează cu procesele fiziologice. De altfel, existența plumbului în sânge nu poate fi considerată sigură la nici un nivel, în lumina datelor care atestă apariția manifestărilor subclinice la nivele foarte scăzute ale plumbemiei. În acest context, multe dintre studiile experimentale actuale sunt îndreptate asupra identificării mecanismelor biomoleculare ale toxicității plumbului. Acestea au fost mai ales atribuite inducerii stresului oxidativ prin creșterea speciilor reactive de oxigen (anion superoxid, hidrogenul peroxid, radicalii hidroxil) sau prin diminuarea capacității de apărare antioxidantă (prin blocarea enzimelor antioxidante, prin depleția de antioxidanți endogeni). Stresul oxidativ indus de plumb generează peroxidarea lipidică cu efecte severe asupra membranei celulare, componentelor intracelulare (mitocondrii) și asupra materialului genetic, producând instabilitate genomică.

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

I.1. Istoricul intoxicației cu plumb

Plumbul este un metal greu de culoare cenușie sau albastră, a cărui prezență este regăsită la scară largă în mediul înconjurător, fiind utilizat în evoluția umanității din cele mai vechi timpuri datorită proprietăților sale fizice și chimice. Extragerea plumbului a început în urmă cu peste 6000 de ani, iar primele raportări despre intoxicația cu plumb sunt citate încă de acum 2000 de ani. Printre primele civilizații care au extras plumbul au fost fenicienii și egiptenii (1).

I.2. Sursele intoxicației cu plumb

Cercetările științifice actuale conturează problematica efectelor expunerii la plumbul din mediul înconjurător, știind faptul că plumbul este o particulă transportabilă atmosferic, ceea ce face ca și zonele considerate rezervații naturale să poată fi contaminate. Mineritul a generat materia primă pentru industrie, iar de aici plumbul și-a găsit o multitudine de întrebuințări cum ar fi: în industria bateriilor, în producția de vopseluri, în industria bijuteriilor, în industria ceramicii și în multe alte aplicații. Există și surse de plumb care sunt independente de activitatea omului precum: activitatea vulcanică, emisiile marine, remobilizarea surselor istorice de plumb (plumbul din sol sau apă). Plumbul este un element persistent din momentul în care a contaminat mediul înconjurător.

I.3. Farmacocinetica

I.3.1. Compuși anorganici de plumb

I.3.1.1. Absorbția

Proprietățile fizico-chimice ale plumbului îi condiționează disponibilitatea de a fi absorbit în organism, dar și farmacocinetica. Plumbul anorganic poate fi absorbit prin inhalarea particulelor fine sau prin ingestie, și mult mai rar transdermic. Plumbul anorganic este dispersat prin particule fine. Orice particulă sub 30 μm ca diametru poate fi absorbită în regiunea nazofaringiană, iar particulele sub 5 μm pot ajunge în regiunea bronhoalveolară.

I.3.1.2. Distribuția

Transferul plumbului din oase se realizează prin mai multe mecanisme printre care: transferul rapid dintre plasmă și os, ce apare la nivelul suprafeței de contact dintre os și capilarele osoase; eliberarea plumbului în timpul resorbției osoase, sub formă de difuzie lentă continuă (2).

I.3.1.3. Metabolizarea

La nivelul organismului, plumbul anorganic nu este metabolizat și nici nu este supus unor procese de biotransformare, formând însă o multitudine de complexe cu structuri proteice și non-proteice (3).

1.3.1.4. Excreția

Excreția plumbului nu depinde de ruta de expunere, iar raportul de excreție între calea urinară și cea fecală este variabil (3). Plumbul ce se elimină prin fecale este rezultat prin adunarea plumbului ingerat la care se adaugă plumbul excretat prin secreția biliară.

1.3.2. Compuși organici de plumb

1.3.2.1.1. Absorbția

Expunerea inhalatorie: vaporii de tetraetil de plumb și tetrametil de plumb sunt inhalați în tractul respirator, având un caracteristici diferite de depozitare și absorbție, comparativ cu compuși anorganici inhalați. Diferențele se referă la fracția absorbită, care este mult mai ridicată, rezultând o absorbție pulmonară de 60-80% din tetraetilul sau tetrametilul de plumb depozitat traheobronșic (4).

Expunerea dermică: tetraetilul de plumb este o substanță lipofilică care are capacitatea de a penetra pielea intactă, determinând chiar intoxicație letală transdermică. Cantitatea absorbită este proporțională cu aria suprafeței expuse, dar și cu concentrația. Tetraetilul de plumb, fiind mai lipofil decât tetrametilul de plumb, este absorbit cu o mai mare rapiditate (5).

1.3.2.1.2. Distribuția

Inhalarea de tetraetil de plumb determină concentrații mai ridicate de plumb la nivelul sistemului nervos central comparativ cu plumbul anorganic.

1.3.2.1.3. Metabolizarea

Compușii de alchil plumb sunt metabolizați activ la nivel hepatic prin dealchilare oxidativă catalizată de citocromul P-450 (3). În literatura de specialitate există totuși puține studii la om care să urmărească etapele de metabolizare ale compușilor alchil plumb.

1.3.2.1.4. Excreția

Tetraetilul de plumb este excretat în urină sub formă de dietil de plumb și plumb anorganic (6). După expunerea inhalatorie, eliminarea expiratorie de tetraetil de plumb este calea majoră de excreție.

I.4. Fiziopatologia intoxicației cu plumb

Plumbul este un toxic care în mod teoretic poate afecta orice sistem și organ din corpul uman. Efectele toxice cele mai cunoscute, dar și severe apar la nivelul eritropoiezei, funcției renale și la nivelul sistemului nervos central (7).

I.5. Intoxicația cu plumb și stresul oxidativ

Stresul oxidativ este definit ca aceea stare în care oxidarea depășește sistemele de apărare antioxidantă ale organismului, secundar unui dezechilibru între componentele oxidante și cele antioxidante. Stresul oxidativ produce peroxidarea lipidelor și lezarea ADN-ului, dar afectează și transmiterea, și reglarea intracelulară.

Peroxidarea lipidelor este un fenomen ce se desfășoară sub forma unor reacții chimice succesive prin care acizii grași nesaturați din membrana celulară sunt oxidați. Peroxidarea lipidelor este considerată mecanismul principal implicat în distrucția oxidativă, care poate conduce la moartea celulară. Calea de peroxidare presupune formarea și propagarea radicalilor lipidici, preluarea de oxigen și rearanjarea legăturilor duble la nivelul lipidelor nesaturate cu distrucția lipidelor membranare și apariția unor produși secundari cum ar fi: alcooli, cetone, aldehydă și eteri (8). În condiții patologice, atunci când speciile reactive de oxigen sunt generate în cantități mult mai mari, peroxidarea lipidelor apare ca o consecință a deficienței de α -tocoferol.

Superoxid dismutazele sunt acele enzime care catalizează metabolizarea anionului superoxid la peroxid de hidrogen. Acționează în majoritatea celulelor care sunt expuse oxigenului. Irwin Fridovich și Joe McCord au descoperit activitatea enzimei superoxid dismutază. Inițial au fost încadrate în grupul de enzime numite metaloproteine (9).

Se cunosc astăzi numeroase forme de SOD, care sunt proteine cofactor cu anumite elemente: cupru, zinc, mangan, fier, nichel. Plecând de la aceste elemente sunt descrise trei familii mari de SOD: Cu/Zn, care leagă atât cupru, cât și zinc, Fe/Mn, care realizează legături cu fier și mangan și enzima care leagă nichel. Enzimele cu zinc și cupru se găsesc în special la toate eucariotele (Cu-Zn-SOD). Enzimele cu fier și mangan sunt utilizate de prokariote. De exemplu, E. Coli la fel ca și alte bacterii posedă enzime cu fier (Fe-SOD), iar altele funcționează cu enzime Mn-SOD, dar există și bacterii care posedă ambele forme.

La nivel uman există trei forme de superoxid dismutază. SOD 1 care se află localizată în citoplasmă, SOD 2 cu localizare mitocondrială și SOD 3 care se găsește extracelular. SOD 1 este un dimer format din două unități, iar celelalte două sunt tetramere. SOD 1 și SOD 3 conțin cupru și zinc, iar SOD 2 mitocondrial prezintă un centru reactiv care conține mangan.

I.6. Manifestări clinice în intoxicația cu plumb

Semnele și simptomele intoxicației cu plumb depind de o serie de parametri printre care: nivelul expunerii/intoxicației, durata de timp, patologii asociate, statusul hormonal (menopauză), vârsta. Semnele și simptomele pot apărea la nivelul oricărui sistem sau

organ. Aceste manifestări sunt expresia unor modificări biochimice induse de toxicitatea plumbului în organism. Lipsa semnelor și simptomelor nu elimină posibilitatea expunerii la plumb. În ultimii ani, s-a observat faptul că nivele din ce în ce mai reduse ale expunerii la plumb au efecte asupra organismului (10).

I.8. Tratamentul intoxicației cu plumb

Terapia chelatoare poate fi împărțită astăzi în **produse chelatoare clasice**, incluzând (D-penicilamina, 2,3-dimercaptopropanol și acidul etilendiamintetracetic - EDTA) și **produse chelatoare noi** precum acidul dimercaptosuccinic (DMSA) și dimercaptopropan sulfonat (DMPS). Entitățile științifice implicate în acest domeniu au definit drept substanță antioxidantă ca fiind o orice substanță din dietă, orice substanță capabilă să contrabalanseze efectele negative pe care le provoacă speciile reactive de oxigen (11). La rândul lor, speciile reactive de oxigen sunt supranumite radicali liberi, având efecte negative asupra structurilor biologice cu care vin în contact. Chiar dacă au timp de acțiune extreme de limitat, radicalii liberi induc stresul oxidativ, care stă la baza tuturor modificărilor patologice ce apar atât în intoxicația cu plumb, dar și alte patologii cronice, printre care: boli cardio-vasculare, psihiatrice, neurologice, cancer, diabet (12). Antioxidanții fac parte din arsenalul de apărare al organismului uman în fața acestor specii reactive de oxigen.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

II.1. Motivația studiului

Pe lângă efectele toxice cunoscute asociate intoxicației cu plumb, studiile recente pun un accent deosebit pe expunerile cronice la plumb chiar cu nivele extrem de scăzute, care produc o serie de dereglări ale proceselor fiziologice din organism, printr-o dezechilibrare a balanței oxidante/ antioxidante și a aparatul enzimatic implicat. Se cunoaște astăzi faptul că plumbul este un element toxic generator de stres oxidativ, de aceea, o parte a evaluării pacienților expuși la plumb, trebuie să cuprindă evaluarea statusului oxidant și a capacității antioxidante. În plus, se creează noi premise de tratament atât pentru pacienții intoxicați cu plumb, cât și pentru pacienți cu expunere la plumb. Medicamentele antioxidante pot ameliora capacitatea de apărare a organismului în fața speciilor reactive de oxigen. Mai mult, în cazul expunerilor cu nivele foarte scăzute de plumb se poate ridica problema unor terapii cu nutrienți antioxidanți, nutriție capabilă să antagonizeze efectele toxice induse de plumb. Acest tip de nutriție antioxidantă poate fi utilă în cazul acestor expuneri cu nivele extreme de reduse de plumb sau pentru populația pediatrică.

II.2. Obiective

Cercetarea de față și-a propus evaluarea mecanismelor stresului oxidativ implicate în cadrul subiecților expuși sau intoxicați cu plumb.

Obiectivele specifice constau în:

Obiectiv principal:

(a) Evidențierea corelației între nivelul expunerii la plumb și capacitatea antioxidantă a organismului.

Obiective secundare:

(b) Evidențierea particularităților socio-demografice ale pacienților cu expunere la plumb.

(c) Identificarea unor surse speciale de plumb din arealul geografic al României.

(d) Evaluarea corelației dintre fumatul de marijuana și expunerea la plumb asociată acestor practici.

(e) Corelația dintre consumul de alcool ilicit, sideremie și expunerea la plumb.

(f) Corelația dintre statusul nutrițional, elemente antioxidante și severitatea expunerii la plumb.

II.3. Material de lucru

II.3.1. Populația

Cercetarea a fost realizată utilizând o anchetă descriptivă, bazată pe metode calitative și cantitative, într-o populație de pacienți expuși/ intoxicați cu plumb, în

comparație cu un lot martor. Subiecții au fost selectați din rândul pacienților prezentați în cadrul Spitalului Clinic de Urgență București. Recrutarea s-a realizat în perioada decembrie 2012-decembrie 2015. Am decis includerea în studiu a tuturor pacienților prezentați pentru semne, simptome și anamneză sugestivă expunerii la plumb, iar împărțirea în grupele de lucru s-a efectuat conform nivelelor detectate pentru plumbemie. Am considerat lotul martor Grupul de pacienți la care valorile plumbemiei au fost mai mici de 10 µg/dl.

II.4. Metode de cercetare

II.4.1. Protocolul de studiu

Studiul a urmat un protocol prospectiv observațional, bazat pe înrolarea subiecților la prezentarea în Clinica ATI-Toxicologie pentru semne și simptome sugestive pentru expunere/intoxicația cu plumb. Inițial, s-a realizat ancheta socio-demografică complexă a participanților, prin metoda interviului față în față. Ulterior, s-au notat caracteristicile clinice ale subiecților și au fost supuși investigațiilor serologice complexe prin determinarea parametrilor biochimici și hematologici. Dozarea plumbemiei și a plumburiei a permis încadrarea subiecților în funcție de nivelul de expunere.

II.5. Analiza statistică

Datele au fost prelucrate statistic în cadrul programului Excell Microsoft și cu ajutorul SPSS versiunea 22. Au fost utilizate media aritmetică, mediana, abaterea standard, valoarea minimă și valoarea maximă pentru variabilele cantitative (numerice). Variabilele de tip calitativ au fost exprimate în frecvențe absolute și relative (exprimate în procente). Am folosit testul t-Student pentru compararea datelor numerice pe eșantionul selectat aleatoriu, având dispersia în populație necunoscută; testul Chi pătrat sau Fischer, în funcție de mărimea grupelor analizate (13). La finalul analizei, valoarea pentru p mai mică de 0.05 a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic. Am utilizat testul one way ANOVA pentru a realiza comparație între diferite variabile, urmat de analiza Bonferroni post-hoc pentru grupurile selectate, pentru a compara grupul martor cu celelalte grupe evaluate. Rezultatele numerice sunt prezentate sub formă de medie ± deviația standard.

II.6. Considerații etice

S-a obținut acordul informat pentru fiecare dintre subiecții care au participat la studiu, înainte de înrolarea acestora. Protocolul de studiu a fost aprobat anterior expunerii în practică la nivelul Comisiei de Etică a Spitalului Clinic de Urgență București. Datele personale au fost ascunse în totalitate pentru a evita eventual identificare a subiecților.

II.7. Rezultate și discuții

II.7.1. Caracteristicile generale ale lotului studiat

Lotul final de studiu a fost reprezentat de un număr de 115 pacienți. În Grupa 1 (lotul martor) am încadrat 19 pacienți, comparativ cu 96 de subiecți în Grupele expuse/intoxicate cu plumb. Repartiția generală în funcție de sex a indicat prezența a 20 de persoane de sex feminin și 95 de sex masculin. Un număr de 69 de pacienți din mediul rural au răspuns pozitiv la întrebarea legată de producția proprie de alcool în gospodărie în timp ce nici un pacient din mediul urban nu a declarat o astfel de procedură efectuată la domiciliu ($p < 0.005$). Am analizat repartiția pacienților producători de alcool la domiciliu în funcție de nivelul educațional al acestora, și am identificat valori semnificative statistic, în sensul în care pacienții cu un nivel educațional scăzut au fost cei care s-au declarat producători de alcool prin metode autohtone, la domiciliu. Dintre pacienții care au declarat producția proprie de alcool în gospodărie, 48.7% aparțin mediilor sociale cu venituri considerate medii, 2.61% au fost încadrați ca având nivel social și economic ridicat și 8.7% au fost considerați cu nivel scăzut de trai. Repartiția cazurilor este redată în Figura 10.

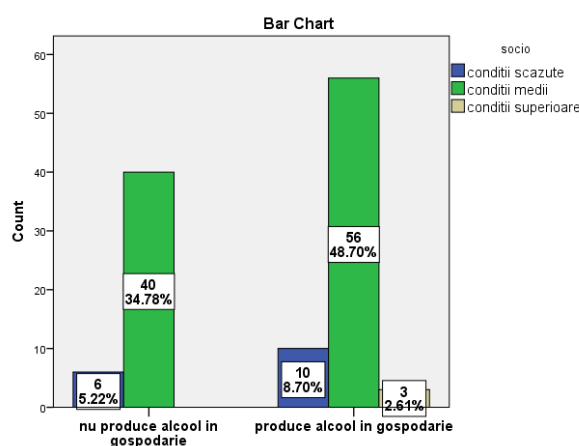


Figura 10. Repartiția în funcție de nivelul economic al subiecților care produc/ nu produc alcool în gospodărie

Vârsta medie a subiecților incluși în studiu a fost 48.97 ± 12.06 ani, extremele fiind reprezentate de indivizi cu vârsta de 24 și respectiv 78 de ani.

Un procent de 62% dintre participanți au declarat meserii efectuate în domeniul agriculturii, serviciilor publice, activități de producție a bunurilor de larg consum; 12% dintre participanți nu au declarat activități susținute sau un loc stabil de muncă. Dintre acești 44% au declarat venituri care îi situează în clasa medie de încadrare socială, conform declarației de venit, și 56% au declarat venituri reduse fiind încadrați în zona veniturilor

scăzute din punct de vedere economic. Rata de angajare a fost de 88%; dintre cei angajați, un procent de 65% au declarat un număr de ore de lucru pe săptămână maimare de 40.

Proporția preponderent masculină a pacienților expuși/ intoxicați poate fi explicată prin prin producția și consumul de alcool ilicit în special de către persoanele de sex masculin; de asemenea, alte activități artisanale care pot implica mecanismul de expunere la plumb sunt mai frecvent efectuate de către bărbați. Având în vedere faptul că și persoanele de sex feminin sunt reprezentate în grupul de pacienți expuși și în grupul de subiecți producători de alcool distilat în gospodărie, indică participarea acestora într-o oarecare măsură la activitățile de producție intra-familială. De asemenea, persoanele de sex masculin sunt mai frecvent implicați în mecanismele de expunere printr-un consum mai ridicat de alcool provenit din distilerie manufacturieră. Analizând un studiu din Alabama care a cuprins 8 subiecți cu expunere la plumb în urma consumului de alcool distilat ilicit observăm inversarea raportului privitor la gen, astfel încât persoanele expuse au fost cu precădere femei, ceea ce poate fi explicat prin faptul că obiceiurile locale au un impact important asupra modului de expunere. În plus, pacienții din acest studiu proveneau din mediul urban, comparativ cu pacienții incluși în studiul de față care aparțin mediului rural românesc. Este interesant și faptul că pacienții din Alabama provin din mediul urban, dar se declară producători de alcool distilat în mod ilicit în aparate de distilare confecționate artisanal. Mai mult, aceste caracteristici se regăsesc la pacienții ce aparțin unei țări cu un nivel economic ridicat, chiar dacă observația s-a realizat încă din anul 1992, ceea ce poate explica prezența fenomenului (14).

Majoritatea pacienților incluși în studiu provin din mediul rural, atât în Grupul martor cât și în Grupul expunere/ intoxicație (11.3% vs. 5.22% și 64.35% vs.19.13%). Numărul mare de pacienți proveniți din mediul rural este explicat prin: obiceiurile tradiționale specifice mediului rural prin producția de alcool distilat în cazane realizate din aliaje cu plumb, cu toate că legislația în vigoare interzice utilizarea acestor dispozitive, precum și distilarea artisanală de alcool (15). Deși există spre comercializare, cazane artisanale realizate din componente non-toxice, toți pacienții au confirmat la interviul față-în-față faptul că utilizează dispozitive fabricate artisanal.

Majoritatea pacienților incluși în studiu au provenit din categoriile educaționale scăzute și medii, ceea ce se corelează cu sursa principală a expunerii la plumb identificată în studiu, dar și cu studiile populaționale autohtone care au indicat asocierea dintre nivelul educațional și consumul de alcool ilicit. Totuși, în mod particular, un număr de 11 subiecți (15.9%) din totalul producătorilor de alcool sunt indivizi având condiții superioare de educație, fapt explicabil prin tendința socială a ultimilor ani de a reactiva obiceiurile alimentare tradiționale străvechi, fără a ține cont de posibilele riscuri care derivă din aceste

activități. La interviul față-în-față pacienții cu studii superioare, producători/ consumatori de alcool ilicit, au afirmat faptul că alcoolul distilat în gospodărie reprezintă o formă pură și sănătoasă de alcool. În mod similar, nivelul socio-economic a influențat sursa intoxicației cu plumb, în sensul în care indivizii aparținând condițiilor socio-economice scăzute și medii au declarat că au ales această sursă de alcool datorită costurilor de producție mult mai reduse comparativ cu alcoolul comercializat. Un număr de 3 subiecți (4.9% din totalul grupei producătoare/ consumatoare de alcool) au declarat faptul că, deși nu produc alcool ilicit, expunerea s-a produs în urma consumului unor cantități însoțite de la prieteni/ cunoscuți.

Consumul de alcoolul afectează cu preponderență sexul masculin, fiind cauza a peste 6.2% din totalul deceselor în rândul reprezentanților acestui indivizi și 1.1% în cazul femeilor. Rata consumului de alcool este de 7.4% în rândul bărbaților și de 1.4% în cazul femeilor (16).

În concluzie, analiza factorilor socio-economici determinanți pentru statusul de expus/intoxicat cu plumb a indicat faptul că acesta nu variază în funcție de sex, mediul de proveniență, nivelul educațional și statutul economic declarat; în schimb, numărul de ani de fumat și numărul de țigarete consumate pe zi au fost semnificativ statistic mai mici pentru lotul martor comparativ cu lotul expus/ intoxicat; de asemenea, statutul de producător de alcool în gospodăria proprie a fost mai frecvent întâlnit pentru grupa subiecților expuși/ intoxicați.

Analizând literatura de specialitate, ne explicăm prezența în rândul pacienților expuși a consumatorilor de marijuana cunoscând faptul că distribuitorii de stupefiante modifică conținutul amestecurilor în vederea optimizării câștigului prin adăugarea unor substanțe care să crească greutatea produsului. În cazul marijuanaei, adăugarea de particule fine de plumb este o practică frecventă. În plus, acest adaos toxic survine peste o posibilă expunere a frunzelor de marijuana la medii toxice, cunoscând faptul că zonele de cultivare a acesteia se află în țări în care reglementările legislative cu privire la substanțele toxice nu sunt respectate.

II.7.2. Evaluare antropometrică

În lotul analizat, repartiția în funcție de indicele de masă corporală a indicat faptul că 8.7% dintre subiecți au fost încadrați fiind obezi și 48.7% au fost supraponderali.

Valoarea medie a IMC-ului pentru fiecare grupă este redată în Figura 13.

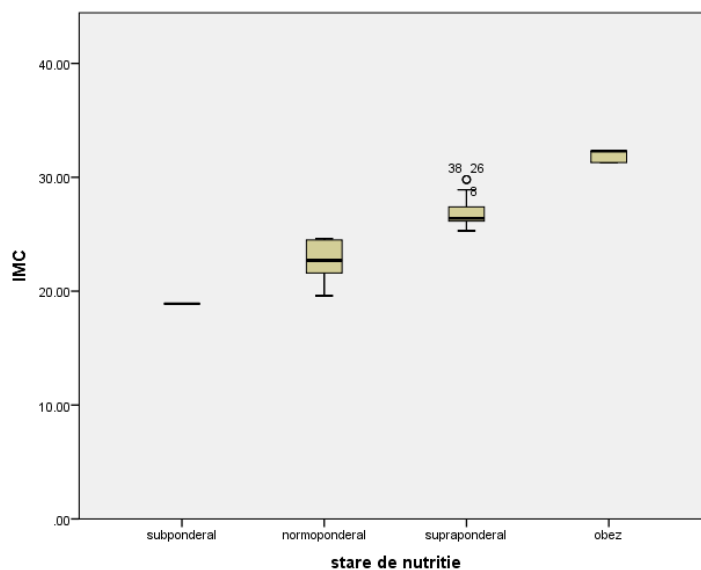


Figura 13. Valoriile medii pentru IMC

Repartiția valorilor constantelor hematologice în funcție de indicele de masă corporală este redată în Tabelul XII. Valoarea medie a hemoglobinei a fost de 9.5 g/dL, 12.87 g/dL, 12.17 g/dL, 11.98 g/dL pentru grupele subponderal, normoponderal, supraponderal, obez.

În ceea ce privește scăderea nivelului de seleniu la pacienții cu expunere la plumb, am putut identifica o corelație între subnutriție și nivelul de seleniu din organism, dar studii ulterioare ar putea determina corelații între aportul de seleniu din sol și nivelul sanguin. Este posibilă obținerea unor rezultate interesante având în vedere faptul că pacienții incluși în studiu provin din mediul rural, unde alimentația este preponderant obținută din surse proprii.

II.7.3. Evaluare clinică

Prevalența simptomelor este redată în Figurile 14-23, în mod comparativ pentru lotul martor și pentru grupul de pacienți expuși/intoxicați cu plumb.

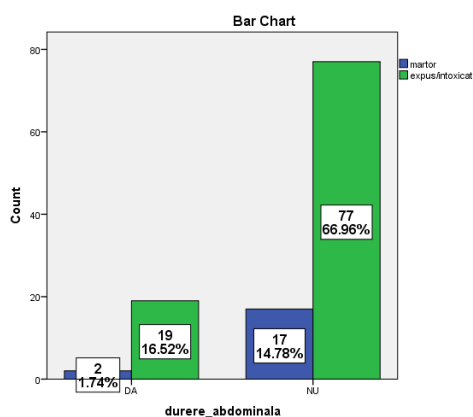


Figura 14. Simptomatologia în cele două grupuri

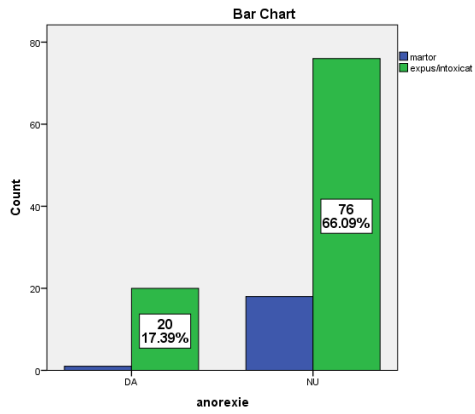


Figura 15. Simptomatologia în cele două grupuri

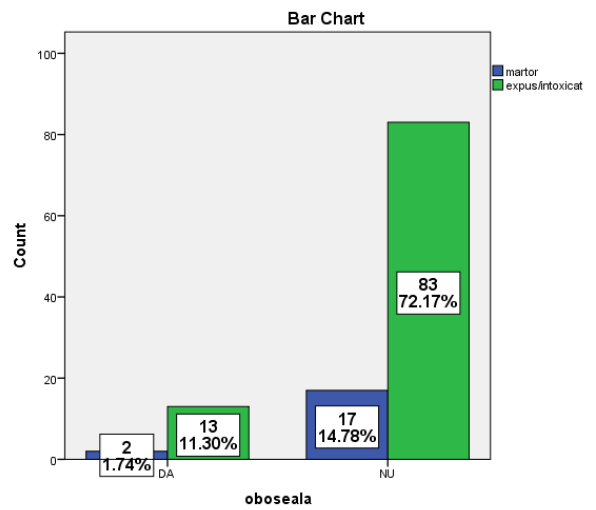


Figura 18. Simptomatologia în cele două grupuri

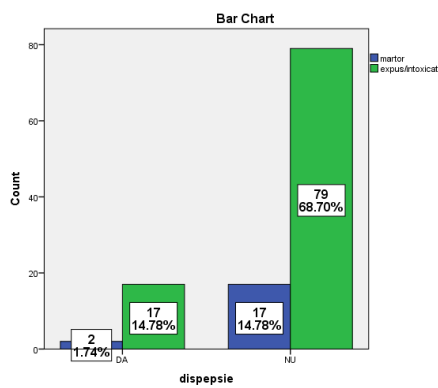


Figura 16. Simptomatologia în cele două grupuri

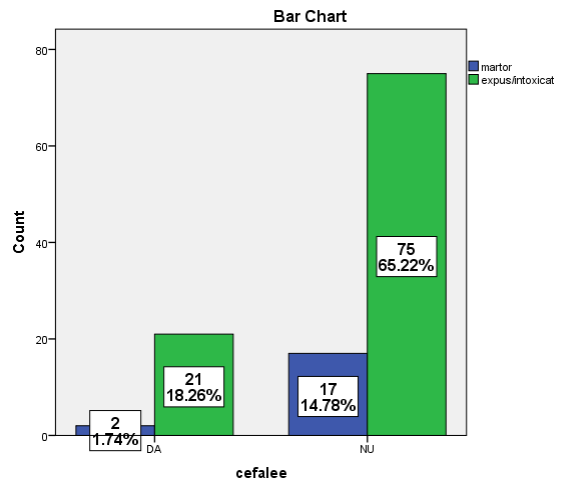


Figura 19. Simptomatologia în cele două grupuri

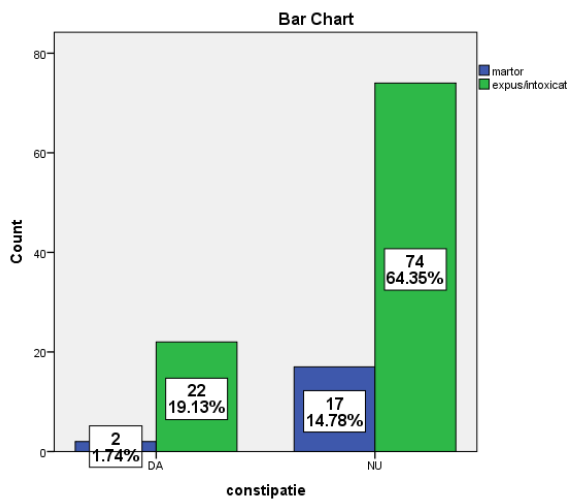


Figura 17. Simptomatologia în cele două grupuri

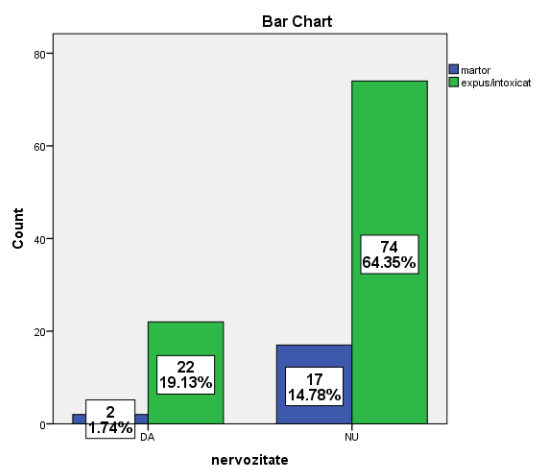


Figura 20. Simptomatologia în cele două grupuri

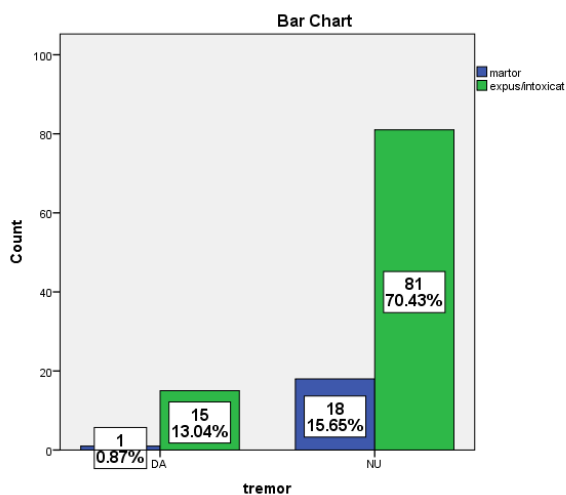


Figura 21. Simptomatologia în cele două grupuri

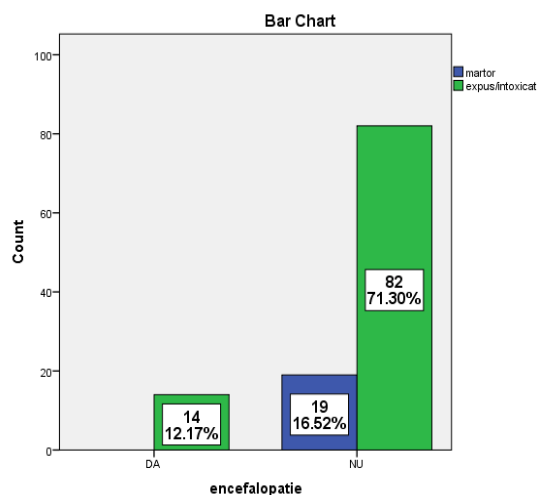


Figura 22. Simptomatologia în cele două grupuri

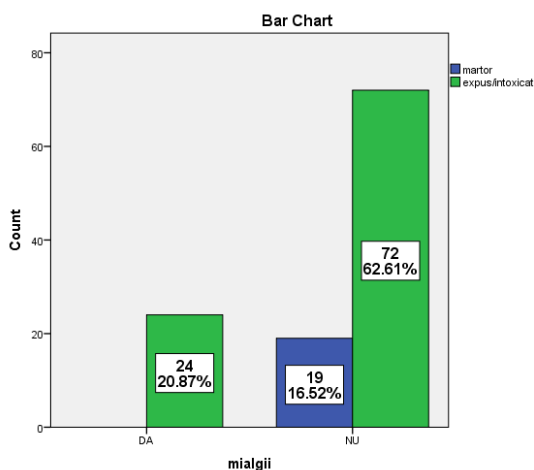


Figura 23. Simptomatologia în cele două grupuri

În general, nivelul de plumb a fost mai mare în cazul pacienților care au declarat prezența anumitor simptome. Diferența între nivelele plumbemiei a fost semnificativă statistic pentru cei care au indicat prezența simptomatologiei sugestive. Simptomele intoxicației cu plumb sunt recunoscute pentru o mare varietate de forme, care se corelează cu durata expunerii dar și cu anumite caracteristici individuale, severitatea acestora putând varia de la semne acute neurologice severe până la forme de boală fruste și intricate cu alte patologii colaterale (17). Semnele precoce de boală, atât în cazul populației pediatrică, cât și pentru populația adultă, îmbracă aspecte din sfera digestivă de tipul colică abdominală, greață, anorexie, constipație, sindrom dispeptic sau pierdere ponderală. Totuși, incidența simptomatologiei violente este redusă, acesta fiind un rezultat așteptat datorită unor valori medii ale plumbemiei nu foarte ridicate, cu excepția intoxicației acute severe. Spre exemplu,

într-un studiu care a analizat prevalența simptomatologiei la muncitorii expuși profesional la plumb, incidența liniei patognomonice Burton a fost prezentă doar la 2% dintre subiecți (18).

Am analizat în modele cu determinări multiple modificările valorilor medii ale tensiunii arteriale sistolice și diastolice, după excluderea pacienților care utilizau medicație antihipertensivă. Valorile au fost semnificative statistic, după analiza corelației între valoarea plumbemiei și valorile pentru tensiunile arteriale. Grupul pacienților având plumbemia cuprinsă între 0 și 10 $\mu\text{g/dL}$ a avut valori medii pentru TAs de $119.94 \pm 6.13 \text{ mmHg}$ și pentru TAd de $71.89 \pm 6.51 \text{ mmHg}$; pentru grupul 2, cu plumbemia cuprinsă între 10 și 40 $\mu\text{g/dL}$, valorile au fost de 128.74 ± 7.99 și respectiv 74.87 ± 5.41 .

Plumbul este recunoscut pentru efectul de a determina creșterea tensiunii arteriale (19). În evaluarea nivelului de plumbemie raportată la tensiunea arterială, se păstrează modelul clasic descris conform căruia există o corelație directă între nivelul plumbemiei și valorile tensionale; există dovezi care au indicat faptul că o creștere de 10 $\mu\text{g/dL}$ a plumbemiei se corelează cu o creștere tensională ușoară, 0.3-0.6 mmHg, dar semnificativă statistic. Multe cercetări publicate au corelat prezența valorilor ridicate pentru tensiunea arterială cu producția în exces de radicali liberi de oxigen și/ sau cu scăderea mecanismelor de apărare anti-oxidantă la nivelul organismului (20). Eliberarea de ROS determină creșteri ale tensiunii arteriale și modificări aterosclerotice la nivelul vasului de sânge, cu apariția hipertensiunii, a rezistenței vasculare periferice și a bolilor coronariene.

Rezultatele noastre sunt în concordanță cu meta-analizele efectuate, care au indicat corelații între valorile plumbemiei și cele ale tensiunii arteriale, atât în cadrul populației expuse cât și pentru grupa intoxicată profesional (21). În timp ce valori ale plumbemiei de până la 30 $\mu\text{g/dL}$ nu determină creșteri semnificative ale nivelelor de tensiunea arterială, expunerea peste aceste valori este asociată cu necesitatea instituirii tratamentului antihipertensiv. Expunerea profesională la plumb se asociază cu o creștere ușoară a valorilor pentru tensiunea arterială sistolică și diastolică. Elementele care pot determina diminuarea expunerii sunt legate de creșterea gradului de conștientizare la locul de muncă sau în gospodărie a riscurilor existente cu privire la modalitățile de expunere la plumb, de responsabilitatea factorilor de control pentru condițiile de muncă, de educarea și instruirea lucrătorilor. Rezultatele studiului prezent sunt susținute de datele publicate în anul 2008 care au concluzionat faptul că plumbul determină hipertensiune arterială, dar și că reprezintă un factor de risc pentru bolile cardiovasculare. Dacă inițial s-a considerat că hipertensiunea arterială indusă de plumb are ca mecanism de producere oxidarea oxidului nitric, datele actuale identifică mai multe mecanisme ce pot fi implicate: stresul oxidativ, reducerea nivelului de oxid nitric, creșterea activității adrenergice și de endotelină, dezechilibrarea sistemului renină angiotensină, creșterea nivelului de prostaglandine vasoconstrictoare și scăderea concomitentă a prostaglandinelor vasodilatatoare, inițierea inflamației endoteliale. Plumbul poate iniția injuria endotelială,

afectând capacitatea de reparare endotelială, inhibând angiogeneza, creșterea celulară și producția de proteoglicani (22).

II.7.4. Determinări toxicologice

Repartiția lotului în funcție de nivelele serice de plumb depistate la admisia pacienților a indicat faptul că cei mai mulți dintre aceștia, 44.35% (51 subiecți) au prezentat nivele serice pentru plumbemie între 40 și 80 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Am avut și un lot de subiecți cu intoxicație severă cu plumb, constituit din 14 pacienți (12.17%), pentru care s-au depistat valori ale plumbemiei de peste 80 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Repartiția cazurilor pe grupele de plumbemie este redată în Figura 26.

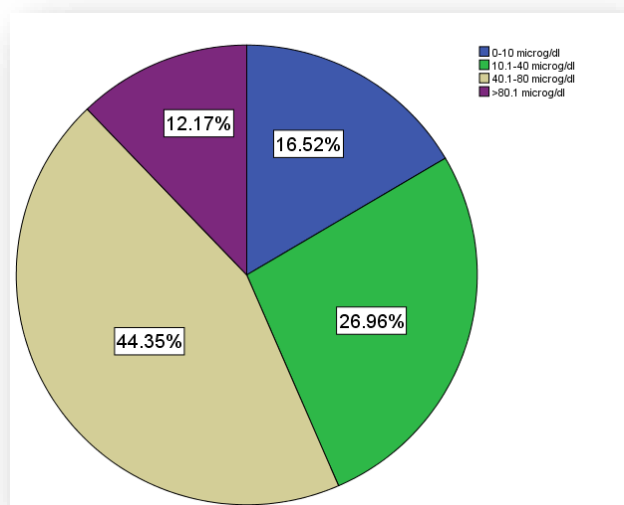


Figura 26. Repartiția cazurilor în funcție de valorile plumbemiei

Valorile serice pentru plumb au fost mai mari pentru sexul feminin, însă diferențele nu sunt semnificative statistic ($p > 0.05$). Având în vedere faptul că lotul pacienților investigați în clinică nu reprezintă un lot special din punct de vedere profesional (este cunoscut faptul că în cadrul meseriilor cu potențială expunere la plumb sunt mai frecvent implicați bărbații), constatarea poate reprezenta o realitate din societate, în care surse adiționale de plumb, oculte, trebuie identificate și sancționate. Valorile mai mari ale plumbemiei la persoanele de sex feminin post-menopauză este explicată prin procesele fiziologice de remodelare osoasă ce apar în această perioadă și care determină eliberarea din depozitul osos a unei cantități suplimentare de plumb; de fapt, în cazul acestor subiecți este foarte dificil de interpretat sursa și momentul de expunere, întrucât depozitele intra-osoase pot fi un semn al expunerii din perioada ante-menopauză sau chiar din copilărie. Tocmai de aceea, modelul statistic necesită factori de ajustare și o evaluare a depozitelor osoase prin metode imagistice ante-menopauză care să cuantifice gradul de expunere al acestor subiecți.

Pentru sexul feminin, valorile medii ale plumbemiei au fost de 52.68 ± 59.01 $\mu\text{g/dL}$, iar pentru sexul masculin, de 30.08 ± 27.72 $\mu\text{g/dL}$. Vârsta medie a subiecților de sex feminin expuse a fost de 45.59 ± 12.45 ani, iar vârsta medie a persoanelor de sex feminin intoxicate sever, din grupa 4, a fost de 49.25 ± 14.27 ani.

Am analizat valorile medii ale plumbemiei în funcție de mediul de proveniența al pacienților și am identificat rezultate semnificative statistic pentru pacienții care au provenit din mediul rural, comparativ cu mediul urban; nivelul seric pentru primii dintre aceștia a fost de 43.25 ± 37.02 $\mu\text{g/dL}$, iar pentru subiecții din mediul urban a fost de 32.23 ± 28.21 $\mu\text{g/dL}$, $p=0.1$.

Pacienții care au declarat producția ilicită, în gospodăria proprie de alcool distilat au avut nivele ale plumbemiei semnificativ statistic mai mari comparativ cu cei care au avut alte surse de expunere la plumb (51.82 ± 36.52 $\mu\text{g/dL}$ vs. 24.51 ± 26.44 $\mu\text{g/dL}$, $p=0.000$). Pentru valorile plumburiei, raportat la aceiași indicatori, corelațiile obținute au fost mai puțin semnificative statistic, însă au păstrat aceeași corelație.

Am evaluat evoluția plumbemiei pentru Grupa 1 și Grupa 2, la interval de 1 lună, și am analizat diferențele ajustate în funcție de tratamentul primit. Având în vedere că la acest nivel al plumbemiei se impune doar urmărirea valorilor acesteia în dinamică și îndepărtarea sursei cunoscute, pacienții randomizați să primească suplimente antioxidante descrise anterior, au avut valori ale plumbemiei semnificativ statistic mai mici față de subiecții care nu au primit tratament anti-oxidant. Rezultatul este redat în Tabelul XXI.

Tabel XXI. Evoluția valorilor medii ale plumbemiei în funcție de existența tratamentului anti-oxidant și de Grupa de expunere

	tratament	N	%	Media	DS	p
Grupa 1	fara tratament	8		3.17	1.07	0.000
	tratament antioxidant	11		1.08	.54	
Grupa 2	fara tratament	14		12.29	1.05	<0.5
	tratament antioxidant	13		11.86	.59	

Subiecții având nivele economice scăzute au avut valori ale plumbemiei mai mari comparativ cu pacienții având nivel economic ridicat. Cu cât nivelul socio-economic este mai scăzut cu atât gradul de improvizație al aparatelor de distilare și utilizarea de componente artisanale și reciclate este mai mare. În același sens, este cunoscut faptul că nivelul socio-economic este invers proporțional cu cantitatea de alcool consumată (în cazul pacienților consumatori) dar și direct proporțională cu calitatea alcoolului ingerat. La interviul față-în-față,

nici un pacient având condiții economice scăzute nu a fost interesat de tipul aparatului de distilat, iar cei care au cumpărat alcoolul produs ilicit nu au întrebat vânzătorul despre metoda de producție.

Pacienții care au declarat producția ilicită, în gospodăria proprie de alcool distilat au avut nivele ale plumbemiei semnificativ statistic mai mari comparativ cu cei care au avut alte surse de expunere la plumb ($51.82 \pm 36.52 \mu\text{g/dL}$ vs. $24.51 \pm 26.44 \mu\text{g/dL}$, $p=0.000$). Explicația fenomenului constă în faptul că obținerea ilicită de alcool se realizează în cazane artisanale ce sunt compuse din structuri (țevi și manșoane) care conțin plumb. Lotul nostru nu a inclus evaluarea grupurilor profesionale cunoscute pentru expunerea cronică la plumb. Un procent important, 36% dintre producătorii de alcool în gospodărie, au recunoscut utilizarea plumbului, având în vedere maleabilitatea foarte bună a metalului; existența unor efecte toxice posibile nu a fost cunoscută de către aceștia. Neidentificarea riscului de utilizare a plumbului în distilare poate reprezenta lipsa de informare medicală a populației, de aceea realizarea unor programe de informare de interes general ar putea reduce procentul acestui grup populațional.

Evaluând terapia antioxidantă în Grupa 1 și Grupa 2, am observat o diferență semnificativă între valorile medii ale plumbemiei în cazul pacienților tratați cu terapie antioxidantă, comparativ cu cei la care nu s-a instituit tratament. Acest rezultat reflectă faptul că moleculele antioxidante sunt implicate în contracararea efectelor toxice ale plumbului prin mai multe mecanisme: scăderea absorbției și reabsorbției intestinale a toxicului, refacerea depozitelor endogene de antioxidanți, participarea drept cofactori în cadrul enzimelor antioxidante, accelerând procesele de detoxifiere fiziologică la nivel hepatic. Se poate observa faptul că scăderea plumbemiei la pacienții care au primit tratament antioxidant a fost mai mare în Grupa 1 de expunere, acest fenomen putând fi explicat prin faptul că nivelul de plumb poate condiționa răspunsul terapeutic la această terapie. Literatura de specialitate susține această teorie considerând că expunerile moderate la plumb pot răspunde la terapia antioxidantă, comparativ cu expunerile severe; în cazul acestora din urmă, tratamentul antioxidant în monoterapie, nu și-a dovedit eficacitatea, însă, în asociere cu tratamentul chelator, a crescut eficiența acestuia. Într-un studiu din anul 2016, un grup de cercetători au analizat subiecții expuși profesional la plumb cărora le-au administrat 500 mg de vitamina C pe zi. Concluzia studiului a fost că vitamina C în monoterapie nu este suficientă pentru a scădea nivelul de plumb sanguin, dar are capacitatea de a reduce peroxidarea lipidică și nivelul de peroxinitrit. Prin acest mecanism vitamina C îmbunătățește statusul antioxidant. Prin reducerea nivelului de peroxidare al oxidului nitric vitamina poate fi benefică în reducerea hipertensiunii arteriale la pacienții expuși la plumb (23). Multiple studii cross section au evidențiat o asociere inversă între nivelul de vitamina C și nivelul plumbului sanguin. Într-un studiu ce a cuprins 747 de persoane, concluzia susține faptul că indivizii care primeau mai puțin de 109 mg/zi de vitamina C, prezentau un nivel mai ridicat al plumbemiei (24). Într-un alt studiu, de această dată mult

mai larg, care a cuprins 19.578 subiecți, dintre care 4214 copii cu vârsta cuprinsă între 6 și 16 ani, s-a observat o corelație directă între nivelul de vitamina C și nivelul de plumb. Astfel, indivizii care prezentau un nivel ridicat de vitamina C înregistrau un nivel scăzut al plumbemiei (25). Într-un alt studiu american, care a implicat 10.000 de adulți, nivelul de vitamina C este invers proporțional cu nivelul plumbemiei (26). Fumatul de țigarete, atât activ, cât și prin expunere pasivă, determină un status de expunere cronică de nivel redus la plumb. Într-o analiză desfășurată pe 75 de adulți fumători, suplimentarea cu 1000 mg pe zi de vitamina C a determinat o scădere semnificativă a plumbemiei, comparativ cu placebo (27).

Analizând datele obținute, se creionează ideea că o dietă bogată în nutrienți antioxidanți poate fi eficientă în cazul expunerii ușoare la plumb, iar suplimentarea cu terapie antioxidantă poate reprezenta un tratament adjuvant în cazul intoxicațiilor. Coroborând datele obținute și rezultatele din literatură putem afirma faptul că terapia anti-oxidantă, indiferent de nivelul de expunere, se poate regăsi în schema terapeutică complexă a acestor pacienți.

II.7.5. Evaluare hematologică

Am analizat variația valorilor hematologice pentru lotul studiat, în funcție de valorile medii ale plumbemiei, pentru fiecare Grup separat. În ceea ce privește valoarea medie a hemoglobinei aceasta a fost de 14.7 ± 0.76 g/dL pentru subiecții din lotul martor, în timp ce pentru subiecții cu plumbemie situată între 10 și 40 μ g/dL, valoarea hemoglobinei a fost de 11.3 ± 2.88 g/dL, diferența însă nu a fost semnificativă statistic.

Analiza post-hoc a identificat faptul că valorile leucocitelor nu au variat prin ajustarea modelului după media plumbemiei, în schimb pacienții din Grupul martor au avut valori semnificativ statistic mai mari pentru numărul total de hematii, comparativ cu subiecții încadrați în Grupurile 2 și 3 ($p=0.000$). De asemenea, valorile pentru hematocrit în Grupul martor au fost de $50 \pm 3.05\%$, comparativ cu 42.80 ± 6.44 , 38.01 ± 4.25 și respectiv 33.50 ± 2.13 , pentru Grupurile 2, 3 și 4 ($p=0.000$).

Unul dintre cele mai afectate sisteme în timpul expunerii la plumb este sistemul hematologic. Aceste modificări patologice se datorează perturbării căii de biosinteză a hemului. Studiile recente au indicat faptul că nivelul plasmatic de plumb are implicații asupra situsurilor de legare ale plumbului de eritrocite, ceea ce determină alterarea căilor de sinteză a hemului prin mecanismele enzimatic dependente (28). Unul dintre efectele toxice ale plumbului este reprezentat de inhibarea sintezei hem. Gradul de inhibiție al ALAD este utilizat în clinica curentă pentru a cuantifica severitatea intoxicației cu plumb. Acidul aminolevulinic mimează acidul γ aminobutiric, iar în acest mod poate stimula receptorii aminobutirici la nivelul sistemului nervos central (29). Valorile crescute ale plumbemiei au fost corelate în studiul de față cu apariția anemiei. Anemia a fost prezentă pentru 6, 40 și respectiv 14 pacienți pentru fiecare din Grupele 2, 3 și 4 de expunere/ intoxicație la plumb, diferențele fiind semnificative

față de Grupul pacienților non-expuși. Rezultate similare au fost indicate și în alte studii (30). În studiul de față, am identificat prezența eritrocitelor având granulațiilor bazofilice pentru 36.7% dintre subiecți.

Indicii eritrocitari studiați, MCH, MCHC, VEM, au fost corelați în același sens cu valoarea plumbemiei. Diagnosticul de anemie în cazul unor nivele serice de plumb mai mici de 80 $\mu\text{g/dL}$, trebuie atent supravegheat pentru identificarea unor cauze adiacente pentru anemie.

Nu am identificat diferențe semnificative pentru valorile medii ale hemoglobinei în funcție de grupa de intoxicație studiată. Modificările impuse de nivelul de plumb seric asupra hemoglobinei se realizează începând cu valori de 50 $\mu\text{g/dL}$, iar distribuția pacienților în funcție de loturile de plumbemie, poate explica rezultatul obținut. Hematocritul a fost semnificativ statistic mai mare pentru pacienții cu nivele serice ale plumbului mai mici de 10 $\mu\text{g/dL}$. Analiza efectuată în studiul de față a indicat un număr semnificativ statistic mai mic pentru valorile trombocitelor pentru Grupa 4 de intoxicație comparativ cu lotul martor, $p=0.000$. Plumbul stimulează legarea H-glutamatul în plachetele umane, crescând nivelul peroxidării lipidice și nivelul stresului oxidativ la nivelul trombocitelor (31).

II.7.6. Evaluare biochimică

Am analizat valorile medii pentru constantele biochimice incluse în studiu. Valorile medii pentru AST în funcție de grupa de intoxicație au fost de, respectiv, 23.14 ± 2.88 U/L, 32.98 ± 6.7 U/L, 41.00 ± 9.27 U/L, 81.8 ± 9.17 U/L. Ureea și creatinina au prezentat valori crescute în funcție de Grupa de intoxicație, și prin comparația cu lotul martor (19.1 ± 7.63 mg/dL, 20.48 ± 2.21 mg/dL, 24.62 ± 0.67 mg/dL, 29.87 ± 0.99 mg/dL, pentru uree și 0.86 ± 0.04 mg/dL, 0.95 ± 0.10 mg/dL, 1.17 ± 0.7 mg/dL, 1.29 ± 0.02 mg/dL pentru creatinină). Diferențele au fost semnificative statistic pentru fiecare dintre valori ($p=0.000$).

Subiecții care produc alcool în gospodărie au valori semnificativ statistic mai mari pentru AST și ALT, comparativ cu cei care nu au acest obicei, $p < 0.05$. Valorile medii au fost de 35.13 ± 2.42 U/L și de 39.96 ± 10.69 U/L pentru ALT.

II.7.7. Determinarea capacității antioxidante

Am analizat valorile medii ale superoxid dismutazei pentru fiecare din grupurile de plumbemie incluse în studiu. Pentru Grupa 1 valoarea medie a fost de 2056.73 U/g Hb, în timp ce pentru Grupele 2, 3 și 4 aceste valori au fost de 1559.54, 1075.19 și respectiv 843.92 U/g Hb.

Cele mai mici valori pentru acidul delta amino levulinic urinar au fost identificate în rândul pacienților cu nivel seric de plumb mai mic de 10 $\mu\text{g/dL}$, și anume 0.59 ± 0.43 mg/24 ore. În grupul pacienților expuși/intoxicați cu plumb valoarea medie pentru ALA_U a fost de

1.30 mg/24 ore, în timp ce pentru lotul martor aceasta a fost de 0.59 mg/ 24 ore ($p=0.000$). De asemenea, valorile au fost semnificative statistic și când am considerat grupul subiecților care produc alcool în gospodărie vs. grupul subiecților care nu produc alcool în gospodărie, în sensul în care valoarea medie pentru ALA_U în primul caz a fost de 1.37 mg/24 ore față de 0.91 mg/ 24 de ore, $p<0.05$. Valori medii pentru Seleniu în Grupul 1 a fost de $93.73\pm 6.74 \mu\text{g/l}$, iar pentru Grupurile 2, 3, 4 au fost de respectiv $78.61\pm 9.04 \mu\text{g/l}$, $62.98\pm 6.15 \mu\text{g/l}$ și respectiv $48.92\pm 2.52 \mu\text{g/l}$. Valorile serice ale SOD au fost corelate puternic și în sens negativ cu valorile plumbemiei și plumburiei; în același sens se păstrează corelația și pentru glutatation peroxidaza și seleniu.

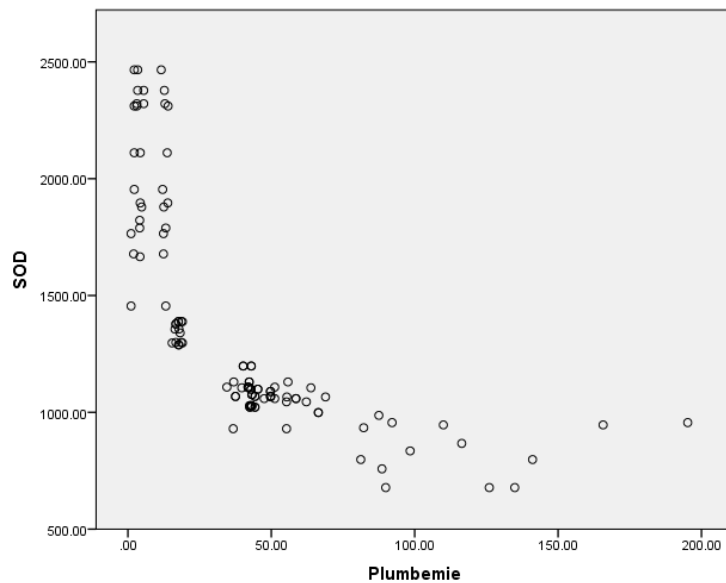


Figura 35. Corelația pozitivă între valorile SOD și ale plumbemiei

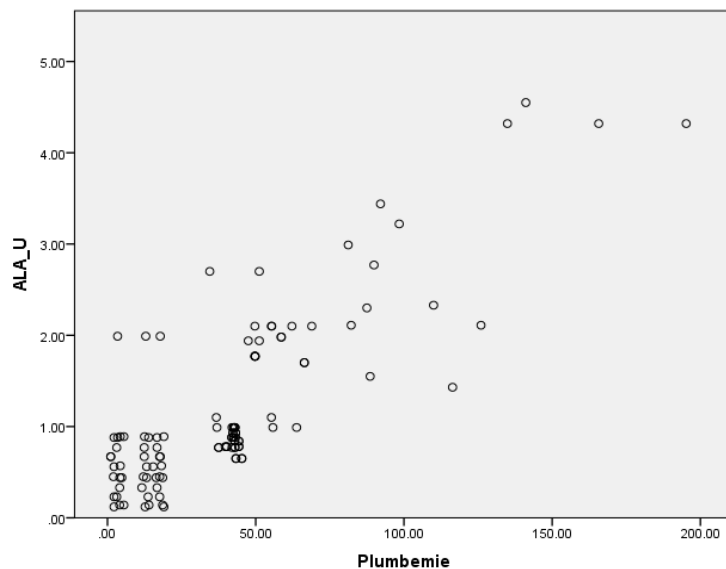


Figura 36. Corelația pozitivă între valorile ALA_U și ale plumbemiei

Am analizat variația determinărilor serice pentru Seleniu în funcție de valorile Glutation peroxidazei; valorile obținute s-au corelat în sens pozitiv, cu un coeficient Pearson de $r=0.78$, $p=0.000$.

Aplicarea utilizării biomarkerilor în supravegherea expunerii/ intoxicației la plumb a devenit o tehnică utilizată frecvent care oferă mecanismele metabolice impuse de expunere. În prezent, se utilizează nivelul seric de plumb pentru a identifica și monitoriza starea de sănătate a populației implicate. Totuși, utilizarea biomarkerilor specifici, sub forma de analiză surrogat pentru evaluarea nivelului de expunere, în special în ceea ce privește biosinteza hemului, este deopotrivă acceptată (32). În studiul de față am utilizat valorile acidului delta aminolevulinic; acesta se elimină în mod normal prin urină, și excreția sa crește în cazul expunerii la plumb. Creșterea aceasta poate fi definită ca o funcție direct dependentă de diminuarea activității plasmatice a ALAD, enzimă unic dependentă de toxicitatea plumbului. De asemenea, inhibarea ferochelatazei, ultima dintre enzimele care participă la calea de biosinteză a hemului, stimulează ALAS pentru a produce deltaALA; conversia acestuia la porfobilinogen nu se poate realiza în condițiile în care ALAD este inhibată de plumb, determinând creșteri ale nivelului plasmatic de deltaALA, și ulterior apariția sa în exces la nivel urinar (33). O corelație pozitivă puternică ($r=0.66$) între valorile urinare pentru acidul aminolevulinic și plumbemie au fost raportate până în prezent (34). De altfel, nivelul de ALA_U poate fi considerat un marker de monitorizare a gradului de intoxicație ocupațională pentru grupele expuse la plumb. În studiul nostru, valorile plumbemiei au fost intens și direct corelate cu valorile obținute pentru ALA_U ($r=0.88$). Valorile diferite statistic pentru ALA_U în funcție de statusul de expunere/ intoxicație indică posibilitatea ca statusul de expunere pe termen lung la nivele mici de plumb să fie responsabil de apariția ALA_U. Sunt implicați și alți factori, pe lângă cei ocupaționali, profesionali în modificările valorile ALA_U. Printre aceștia, în studiul de față, am identificat producția autohtonă de alcool prin metode ilicite în dispozitive construite din plumb sau aliaje ca fiind un factor ce determină valori crescute pentru ALA_U. Inițial, în anul 1997, Weyermann și Brenner au identificat valori crescute pentru ALA_U în rândul consumatorilor de bere, evidențiind și valori crescute ale plumbemiei; cu toate că legătura de cauzalitate s-a realizat mai ales cu dispozitivele de păstrare pentru băuturi sau cu obiectele din care acestea erau consumate, mai degrabă decât cu alcoolul în sine, consumul frecvent și prelungit determină expuneri patologice la nivele de plumb și creșteri ale ALA_U (35).

Valorile serice pentru SOD au fost semnificativ statistici mai mici pentru pacienții încadrați în Grupa 4 în comparație cu celelalte grupe de studiu. Unele date din literatură cu privire la influența plumbului asupra SOD sunt contradictorii (36). Rezultatele noastre sunt compatibile cu cele din studiul lui Gayathri Rao care a comunicat scădere valorilor plasmatice pentru SOD în raport cu activitatea plumbului, prin blocarea directă a grupărilor -SH de către plumb (37). Studiul a indicat de asemenea o corelație strânsă în sens negativ între plumbemie

și SOD. Efectele pro-oxidative ale plumbului pot fi atribuite mecanismelor de acțiune asupra SOD și asupra catalazei însă în literatura de specialitate este semnalată necesitatea unor studii ulterioare pentru a cuantifica mai exact dezechilibrul balanței pro/anti-oxidante.

Mecanismele de apărare anti-oxidantă intervin în organism pentru a anula efectele speciilor reactive de oxigen. Cel mai important anti-oxidant celular este reprezentat de glutatation, un tripeptid conținând grupări sulfhidril și care există sub ambele forme, oxidată și redusă. După donarea de electroni, forma redusă se combină cu altă moleculă de glutatation și formează glutatationul disulfid, în prezența glutatation peroxidazei; regenerarea glutatationului din forma disulfidică se realizează sub acțiunea glutatation reductazei. În condiții normale, 90% din glutatationul celular se află în forma sa redusă și 10 % se află în forma sa oxidată. În condițiile de stres oxidativ accentuat forma oxidată are o proporție mult mai mare (38). Glutatation peroxidaza acționează sinergic plasmatic pentru îndepărtarea speciilor libere de oxigen și a hidrogenului peroxid; activarea gradului de peroxidare lipidică membrană la nivelul eritrocitelor supuse plumbului determină scăderea nivelului de glutatation peroxidază la nivel eritrocitar (39).

Efectele antagoniste ale Seleniului și plumbului au fost raportate pe modelele de studiu la animale dar și la om. Rolul protector al Seleniului în intoxicația cu plumb este asigurat de capacitatea antioxidantă a acestuia. Un număr important de studii au atestat până în prezent eficiența administrării de seleniu în intoxicația cu plumb, pe modele animale, dovedindu-și eficiența prin acțiune multiorganică la nivel hematologic, renal, neurologic și cardiac (40). Sursa de Seleniu care intervine în mecanismele protectoare este reprezentată de conținutul dietei în acest microelement (41). Alterarea statusului prooxidant și diminuarea capacității de apărare anti-oxidantă este susținută de modificările biochimice întâlnite la populația expusă. În studiul nostru, valorile serice pentru Seleniu au fost mai mici pentru grupul de pacienți subnutriți. Terapia nutrițională poate avea un rol adjuvant în intoxicațiile cu plumb sau poate reprezenta un element critic în expunerile la valori cvasinormale de plumb. Nutriția antioxidantă deficitară reprezintă un factor agravant pentru dezechilibrul balanței oxidant-antioxidantă. Scăderea semnificativă a nivelului superoxid dismutază în Grupa 4 de studiu poate fi explicată prin faptul că expunerea severă, într-un context cronic, evidențiază caracterul cumulativ al expunerii la plumb care produce o diminuare progresivă a capacității antioxidante. Acest fenomen se poate datora fie faptului că superoxid dismutaza este inhibată de nivelele ridicate ale plumbemiei, dar și de faptul că o expunere cronică la plumb devine consumptivă pentru depozitele de substanțe antioxidante, în contextul unui aport alimentar normal, care însă nu mai poate asigura necesarul ridicat de antioxidanți. Mai mult, având în vedere caracteristica lotului de studiu, care evidențiază consumul de alcool distilat, cunoscându-se faptul că persoanele dependente de alcool prezintă diferite deficiențe

nutriționale se poate afirma faptul că în rândul acestor categorii de pacienți depleția de antioxidanți este și mai rapidă comparativ cu populația generală.

Existența corelației pozitive direct proporționale între nivelul de seleniu și nivelul de glutatation peroxidază evidențiază implicarea directă a micronutrienților în apărarea anti-oxidantă. Corelând indicele de masă corporală cu nivelul de seleniu, se poate obține inductiv ideea că un aport scăzut de seleniu va avea un impact negativ în apărarea anti-oxidantă în prezența plumbului.

II.9. Aplicații practice. Perspective.

La nivel populațional, este prezentă în continuare expunerea non-profesională la plumb. În timp ce pentru grupa expusă în mod clasic datorită activității zilnice, există o serie de măsuri preventive, mai mult sau mai puțin aplicabile, masa largă a populației este în continuare expusă. Activitățile cotidiene și private pot să constituie surse suplimentare de expunere la metale grele precum plumbul. Nivelele ridicate ale plumbemiei și nivelele scăzute ale acidului deltaaminolevulinic sprijină teoria unei contaminări populaționale extinse, dincolo de perimetrele cunoscute ale anumitor profesii. Aceasta se datorează lipsei unor măsuri de preventive și a factorilor de control autoritar care pot interveni. Este cunoscut faptul că instituirea măsurilor preventive în ceea ce privește expunerea la surse de plumb este cu mult mai eficientă și mai puțin costisitoare decât terapia în sine, mai ales dacă acest tip de intervenții au loc în etapa timpurie de expunere.

În acest sens se impune implementarea unor măsuri de control autoritar al metodelor artisanale de producție a alcoolului, identificat ca fiind o sursă reprezentativă de plumb în studiul nostru. Reglementările integrate cost-eficientă precum și monitorizarea gradului de expunere și a implementării active a acestor măsuri se constituie într-o strategie ce trebuie extinsă la nivel regional, în grupurile țintă de interes.

O dată identificate la nivel național, grupurile vulnerabile pot fi supravegheate prin măsurători non-invazive, de tipul determinării urinare de acidul deltaaminolevulinic.

În esență, prevenția unor probleme sociale și de sănătate se poate obține doar prin modificarea comportamentelor ancestrale, influențând comportamentul maselor populaționale în ciuda factorilor de rezistență, prin educație continuă și prin reorientarea resurselor comune, statale. În acest sens, este necesară implicarea competenței politice, pentru a crea premisele unor programe care să reorienteze comportamentul domestic în privința anumitor obiceiuri care s-au dovedit a fi nocive pentru sănătate și pentru care, suportarea costurilor de tratament poate fi o povară monetară chiar mai mare decât prevenția în sine.

Considerăm necesară implementarea unor programe naționale de informare cu privire la riscurile pe care le implică consumul de alcool distilat în mod ilicit în cazane de distilare artisanale. Realizarea unor măsuri legislative care să reglementeze producția de alcool distilat

în gospodărie, nu din perspectiva economică, dar mai ales care să vizeze măsuri de siguranță în procesul de producție. Este necesară demararea unor studii în rândul consumatorilor de marijuana, care să identifice nivelul de expunere la plumb în această grupă populațională, în urma cărora să putem emite materiale de informare asupra acestui risc.

CONCLUZII FINALE

1. Principala sursă de expunere la plumb a fost reprezentată de producția/ consumul de alcool ilicit distilat în sisteme artizanale.
2. Pacienții incluși în studiu provin mai ales din mediul rural, atât în Grupul martor cât și în Grupul expunere/ intoxicație. Pacienții aparținând mediului rural sunt și producători de alcool ilicit.
3. Categoriile educaționale au fost reprezentate în special de nivele scăzute și medii, ceea ce se corelează cu sursa principală a expunerii la plumb identificată în studiu, reprezentată de consumul de alcool produs ilicit.
4. Numărul de ani de fumat a fost mai mare în Grupul expus/ intoxicat, comparativ cu Grupul martor (25.73 ± 10.97 vs. 8.89 ± 4.28 , $p=0.000$).
5. Un procent de 17.3% din populația expusă/ intoxicată a fost consumatoare de marijuana.
6. Valorile plumbemiei au fost mai mari pentru fiecare dintre simptomele relatate de către pacient, spre deosebire de subiecți care nu au declarat prezența semnelor de boală.
7. Am identificat corelații pozitive între valorile plumbemiei și cele ale tensiunii arteriale.
8. Valorile serice pentru plumb au fost mai mari pentru sexul feminin însă diferențele nu sunt semnificative statistic ($p>0.05$). În mod adițional, acidul deltaaminolevulinic a fost mai mare pentru sexul feminin comparativ cu sexul masculin ($p<0.05$).
9. La subiecții din mediul rural, se înregistrează o valoare mai ridicată a plumbemiei comparativ cu mediul urban, $p<0.5$.
10. Subiecții având nivele economice scăzute au avut valori ale plumbemiei mai mari comparativ cu pacienții având nivel economic ridicat.
11. Pacienții care au declarat producția ilicită de alcool distilat au avut nivele ale plumbemiei semnificativ statistic mai mari comparativ cu cei care au avut alte surse de expunere la plumb, $p=0.000$.
12. Nu am identificat diferențe semnificative pentru valorile medii ale hemoglobinei în funcție de grupa de intoxicație studiată.
13. Hematocritul a fost semnificativ statistic mai mare pentru pacienții cu nivele serice ale plumbului mai mici de $10 \mu\text{d/dL}$.
14. Valoarea medie pentru sideremia subiecților care au consumat alcool distilat a fost mai mică comparativ cu valoarea medie în lotul subiecților care nu au produs/ consumat alcool distilat, $p=0.000$.
15. Datele prezentate au indicat valori semnificativ statistic mai mari pentru grupurile de pacienți expuse plumbului în comparație cu lotul martor, prin evaluarea transaminazelor hepatice.

16. Testele de funcționalitate renală, ureea și creatinina, au avut valori semnificativ statistic mai mari pentru populație expusă/ intoxicată față de lotul martor.
17. În studiul nostru, valorile plumbemiei au fost intens și direct corelate cu valorile obținute pentru acidul deltaaminolevulinic urinar ($r=0.88$).
18. Valorile serice pentru SOD au fost semnificativ statistici mai mici pentru pacienții încadrați în Grupa 4 în comparație cu celelalte grupe de studiu.
19. Valoarea medie a seleniului plasmatic a fost mai mică în Grupele 2, 3 și 4 comparativ cu lotul martor. Nivelul seric de seleniu a variat în funcție de indicele de masă corporală, pacienții subponderali având nivelele cele mai scăzute.
20. Existența corelației pozitive direct proporționale între nivelul de seleniu și nivelul de glutatation peroxidază evidențiază implicarea directă a micronutrienților în apărarea anti-oxidantă.

BIBLIOGRAFIE

1. Hernberg S. Lead Poisoning in a Historical Perspective. *American journal of industrial medicine*. 2000; 38: p. 244-254.
2. O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. IV. Kinetics of lead disposition in humans. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1993; 118: p. 16-29.
3. Toxicologic profile for lead. Atlanta: US Department of Health and Human Services. Public Health Service; 1992.
4. Heard MJ, Wells AC, Newton D, et al. Human uptake and metabolism of tetra ethyl and tetramethyl lead vapour labelled with ²⁰³Pb. In *International Conference on Management and Control of Heavy Metals in the Environment*. London,: CEP Consultants; 1979. p. 103-108.
5. Gething J. Tetramethyl lead absorption : A report of human exposure to a high level of tetramethyl lead. *Br. J. ind. Med*. 1975; 32: p. 329–333.
6. Vural, N., Duydu, Y. Biological monitoring of lead in workers exposed to tetraethyllead. *Sci. total Environ*. 1995; 171: p. 183–187.
7. WHO: Environmental health criteria 165 inorganic lead. Geneva: World Health Organization; 1995
8. Stefania Pizzimenti, Eric Ciamporcerro, Martina Daga, Piergiorgio Pettazzoni,1 Alessia Arcaro,2 Gianpaolo Cetrangolo, Rosalba Minelli, Chiara Dianzani et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol*. 2013; 4: p. 242.
9. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic. Biol. Med*. 1988; 5(5-6): p. 363-369.
10. Flora SJS FGSG. Flora SJS, Flora G, Saxena G. Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning. Amsterdam: Elsevier Publication; 2006.
11. Ames BN. Micronutrient deficiencies. A major cause of DNA damage. *Ann N Y AcadSci*. 1999; 889: p. 87-106.
12. Ames BN. The prevention of DNA damage: the role of nutrition. *Mutat Res*. 1997; 379(1): p. S172.
13. Niculescu-Aron IG, Mazurencu Marinescu M. Metode econometrice pentru afaceri Bucuresti: Editura ASE; 2007.
14. Toxicologic profile for lead. Atlanta: US Department of Health and Human Services. Public Health Service; 1992.
15. Parlamentul României. LEGEA 521 privind regimul de supraveghere și autorizare a producției, importului și circulației unor produse supuse accizelor. Bucuresti.; 2002.
16. WHO. Global status report on alcohol and health; 2011.

17. Hwan-Cheol Kim, Tae-Won Jang Email author, Hong-Jae Chae, Won-Jun Choi, Mi-Na Ha et al. Evaluation and management of lead exposure. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*. 2015; 27(30).
18. Awad el Karim MA, Hamed AS, Elhaimi YA, Osman Y. Effects of exposure to lead among lead-acid battery factory workers in Sudan. *Arch Environ Health*.. 1986; 41(4): p. 261-265
19. Goyer RA, Clarkson TW. Casarett & Doull's Toxicology. In Klaassen, editor. *Toxic Effects of Metals. The Basic Science of Poisons*. New York: The McGraw-Hill Companies; 2001. p. 827-834.
20. Martin D, Glass TA, Bandeen-Roche K, Todd AC, Weiping SK, Schwartz BS. Association of blood lead and tibia lead with blood pressure and hypertension in a community sample of older adults. *Am J Epidemiol*. 2006; 163: p. 467.
21. Nawrot TS, Thijs L, Den Hond EM, et al.. An epidemiological re-appraisal of the association between blood pressure and blood lead: a meta-analysis. 2002; 16:123. *J Hum Hypertens*. 2002; 16: p. 123.
22. ND V. Mechanisms of lead induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 295(2): p. H454-465.
23. Ganesh Ghanwat, Arun J Patil, Jyotsna Patil, Mandakini Kshirsagar, Ajit Sontakke, R.K. Ayachit. Effect of Vitamin C Supplementation on Blood Lead Level, Oxidative Stress and Antioxidant Status of Battery Manufacturing Workers of Western Maharashtra, India, Ganesh Ghanwat. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(4): p. BC08–BC11.
24. Cheng Y, Willett WC, Schwartz J, Sparrow D, Weiss S, Hu H. Relation of nutrition to bone lead and blood lead levels in middle-aged to elderly men. *The Normative Aging Study*. *Am J Epidemiol*. 1998; 147(12): p. 1162-1174.
25. Simon JA. Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA*. 1999; 281(24): p. 2289-2293.
26. Lee DH, Lim JS, Song K, Boo Y, Jacobs DR, Jr. Graded associations of blood lead and urinary cadmium concentrations with oxidative-stress-related markers in the U.S. population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey.. *Environ Health Perspect*. 2006; 14(3): p. 350-354.
27. Dawson EB, Evans DR, Harris WA, Teter MC, McGanity WJ. The effect of ascorbic acid supplementation on the blood lead levels of smokers.. *J Am Coll Nutr*. 1999; 18(2): p. 166-170.
28. Bergdahl IA, Grubb A, Schutz A, Desnick RJ, JG, Sassa S, Skerfving S. Lead binding to δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocyte. *Pharmacol. Toxicol*. 1997; 87: p. 153-158.

29. Warren MJ, Cooper JB, Wood SP, et al. Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. 1998;23:217–21. Trends Biochem Sci. 1998; 23: p. 217-221.
30. Baker EL, Landrigan PJ, Barbour AG, CoxDH, Folland DS, Ligo RN, et al. Occupational lead poisoning in the United States: clinical and biochemical findings related to blood lead levels. Br J Ind Med. 1979; 36(4): p. 314-322.
31. Borges V. C., Santos F. W., Rocha J. B. T., Nogueira C. W. Heavy Metals Modulate Glutamatergic System in Human Platelets. Neurochemical Research. 2007; 32(6): p. 953-958.
32. Sakai T. Biomarkers of Lead Exposure. Industrial Health. 2000; 38: p. 127-142.
33. Yokoyama K, Araki S, Sato H, Aono H. Circadian Rhythms of Seven Heavy Metals in Plasma, Erythrocytes and Urine in Men: observation in Metal Workers. Industrial Health. 2000; 38: p. 205-212.
34. Tomokuni K, Ichiba M, Fujishiro K. Interrelationship between urinary delta aminolevulinic acid (ALA), and blood lead in workers exposed to lead. Ind. Healt.1993; 31(2): p. 51-57.
35. Sherlock JC, Pickford CJ, White GF. Lead in alcoholic beverages. Food Addit Contam. 1986; 3: p. 347-354.
36. Adonaylo VN, Oteiza I. Lead intoxication: antioxidant defences and oxidative damage in rat brain. 1999; 135: p. 77-85.
37. Gayathri M Rao, Beena V Shetty, Sudha K. Evaluation of lead toxicity and antioxidants in battery workers. Biomedical Research. 2007; 19(1): p. 1-4.
38. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates. Interdiscip Toxicol. 2012; 5(2): p. 47-58.
39. Sugawara E, Nakamura K, Miyake T, Fukumura A, Seki Y. Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. Br J Ind Med; 48(4): p. 239-242.
40. Qixiao Zhai, Arjan Narbad, Wei Chen. Dietary Strategies for the Treatment of Cadmium and Lead Toxicity. Nutrients. 2015; 7(1): p. 552-571.
41. Yuan X, Tang C. The accumulation effect of lead on DNA damage in mice blood cells of three generations and the protection of selenium. J Environ Sci Health Part A: Tox Hazard Subst Environ Eng. 2001; 36: p. 501–508