

БЪЛГАРСКО СПИСАНИЕ  
ЗА ОБЩЕСТВЕНО ЗДРАВЕ

■ ПСИХИЧНО ЗДРАВЕ

Психично-здравно обслужване в четири  
източноевропейски страни

■ ХРАНИ И ХРАНЕНЕ

Научнообосновани критерии за  
хранителни препоръки на популацията  
от стари хора

■ ДИСКУСИЯ

Нанотехнология - потенциален здравен  
риск

BULGARIAN JOURNAL  
OF PUBLIC HEALTH

■ MENTAL HEALTH

Mental health services in four European  
Countries

■ FOODS AND NUTRITION

Science-based criteria for dietary  
recommendations in elderly population

■ DISCUSSION

Nanotechnology - potential health risk

BULGARIAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH

4/2009

БЪЛГАРСКО СПИСАНИЕ ЗА ОБЩЕСТВЕНО ЗДРАВЕ

Том I, кн. 4

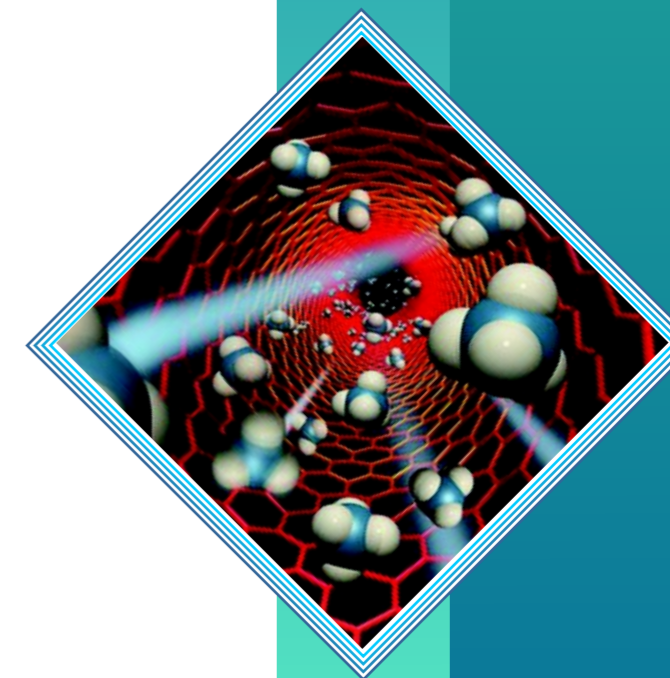
ISSN 1313-6461

Vol. I, №4

БЪЛГАРСКО  
СПИСАНИЕ  
ЗА ОБЩЕСТВЕНО  
ЗДРАВЕ

2009

BULGARIAN  
JOURNAL  
OF PUBLIC  
HEALTH



Том I, кн. 4 ■ Октомври-Декември ■ 2009

■ Vol. I, №4 ■ October - December

Издание на  
Националния център по опазване на  
общественото здраве



Published by  
the National Center of Public Health  
Protection

## БЪЛГАРСКО СПИСАНИЕ ЗА ОБЩЕСТВЕНО ЗДРАВЕ ОФИЦИАЛНО ИЗДАНИЕ НА НАЦИОНАЛНИЯ ЦЕНТЪР ПО ОПАЗВАНЕ НА ОБЩЕСТВЕНОТО ЗДРАВЕ

### ЦЕЛ И ОБХВАТ

“Българско списание за обществено здраве” е многопрофилно списание, което включва публикации в областта на здравната политика, управлението и финансирането на здравната система, епидемиологията, промоцията на здравето и профилактика на болестите, здравето на децата, състава и безопасността на храните, храненето и общественото здраве, околната среда и здравето, труда и здравето, психичното здраве. Списанието дава форум за дискусии по актуални проблеми на общественото здраве в България, Европа, САЩ и др. страни. В специални приложения се публикуват материали, посветени на актуални теми, проучвания, резюмета и доклади от международни и национални научни форуми и кръгли маси. Списанието има за цел да популяризира и насърчава изследвания, добри практики, политики, управление, образование и обучение в областта на общественото здраве. Излиза в 4 книжки годишно на български и английски език. Публикува се на английски език на интернет страницата на Националния център по опазване на общественото здраве [www.ncphp.government.bg](http://www.ncphp.government.bg)

**Главен редактор:** Ст.н.с. д-р Стефка Петрова, дм  
**Заместник главен редактор:** Доц. д-р Пламен Димитров, дм  
**Отговорен секретар:** Ст.н.с. Констанца Ангелова, дм  
**Секретари:** проф. д-р Тодор Попов, дмн, Татяна Каранешева

### РЕДАКЦИОННА КОЛЕГИЯ

Проф. д-р Стоянка Узунова, дмн (НЦООЗ)  
Доц. д-р Татяна Иванова, дм (НЦООЗ)  
Проф. д-р Любомир Иванов, дмн  
Проф. д-р Емилия Иванович, дмн  
Проф. д-р Цветана Попиванова, дмн  
Доц. д-р Никола Василевски, дм  
Акад. Богдан Петрунов, дмн (НЦЗПБ)  
Проф. д-р Цекомир Воденичаров, дмн (МУ, София)  
Проф. д-р Цветко Йолов, дмн (МУ, София)  
Проф. д-р Маргарита Колева, дмн (МУ, София)  
Доц. д-р Петко Салчев, дм (МУ, София)  
Доц. д-р Лидия Георгиева, дм (Marsh)  
Доц. д-р Красимир Гигов, дм  
Доц. д-р Желязко Христов, дм (МУ, Пловдив)  
Доц. д-р Невяна Фещиева, дм (МУ, Варна)  
Доц. д-р Радостина Георгиева, дм (НЦРРЗ)  
Доц. д-р Гена Гранчарова, дм (МУ, Плевен)

### МЕЖДУНАРОДЕН КОНСУЛТАТИВЕН СЪВЕТ

Проф. Питър Бойл (Международна агенция за изследвания на рака)  
Д-р Франческо Бранка (СЗО, Женева)  
Проф. д-р Зузана Браздова, дмн (Чехия)  
Ханниа Кампос, дм (САЩ)  
Проф. Кърт Дар д. пр., дмн (САЩ)  
Проф. д-р Джоук Денекенс (Белгия)  
Доц. д-р Херман Дитер (Германия)  
Проф. Дюла Дура, дм (Унгария)  
Проф. Игор Глазунов (Русия)  
Проф. д-р Вилиус Грабаускас (Литва)  
Проф. Андреас Хензел (Германия)  
Проф. Йованка Караджинска-Бислимовска (Македония)  
Проф. д-р Уилфрид Кармаус (САЩ)  
Проф. д-р Вилле Летинен, дм (Финландия)  
Агнета Ингве, дм (Швеция)

### СЪТРУДНИЦИМ

**Преводачи:** Боряна Барбукова, Калина Сиракова  
**Стилова редакция и корекция:** Татяна Каранешева  
**Дизайн:** Боряна Мекушина  
**Маркетинг и реклама:** Дора Овчарова  
**WEB администратор:** Рени Петкова

### АДРЕС НА РЕДАКЦИЯТА:

Ст.н.с. д-р Стефка Петрова, дм - Главен редактор  
Списание “Българско списание за обществено здраве”  
Национален център по опазване на общественото здраве  
Бул. “Акад. Иван Гешов” 15, София 1431, България  
E-mail: [s.petrova@ncphp.government.bg](mailto:s.petrova@ncphp.government.bg)

## BULGARIAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH OFFICIAL JOURNAL OF THE NATIONAL CENTER OF PUBLIC HEALTH PROTECTION

### AIMS AND SCOPE

The Bulgarian Journal of Public Health is a multidisciplinary journal in the field of health policy and practice, health management and economics, epidemiology of noncommunicable and communicable diseases, population/women's/children's health, health promotion and disease prevention, environmental and occupational health, food and nutrition, public health and disasters, mental health. The Journal provides a forum for discussion of current public health problems with a focus on Bulgaria, Europe, USA and other countries. It publishes supplements on topics of particular interest, including studies, abstracts and reports from international and national scientific events and roundtables. The aim of the Bulgarian Journal of Public Health is to promote studies, good practices, policy, management and education in relevance to public health. The Bulgarian Journal of Public Health is published quarterly in Bulgarian and English and will be available free on the Website of National Center of Public Health Protection, ([www.ncphp.government.bg](http://www.ncphp.government.bg)).

**Editor-in-Chief:** Assoc. Prof. Stefka Petrova, MD, PhD  
**Deputy Editor:** Assoc. Prof. Plamen Dimitrov, MD, PhD,  
**Secretary-in-Charge:** Assoc. Prof. Konstanza Angelova, MS, PhD  
**Secretaries:** Prof. Todor Popov, Dsc, Tatiana Karanesheva

### EDITORIAL BOARD

Prof. Stoyanka Uzunova, MD, DSc (NCPHP)  
Assoc. Prof. Tatiana Ivanova, MD, PhD (NCPHP)  
Prof. Dr. Lyubomir Ivanov, MD, PhD, DSc  
Prof. Emilia Ivanovich, MD, DSc  
Prof. Tzvetana Popivanova, MD, DSc  
Assoc. Prof. Nikola Vassilevski MD, PhD  
Acad. Bogdan Petrunov, MD, DSc (NCIPD)  
Prof. Tzekomir Vodenicharov, MD, DSc (MU, Sofia)  
Prof. Tzviatko Jolov, MD, DSc (MU, Sofia)  
Prof. Margarita Koleva, MD, DSc (MU, Sofia)  
Assoc. Prof. Petko Salchev, MD, PhD (MU, Sofia)  
Assoc. Prof. Lidia Georgieva, MD, PhD (Marsh)  
Assoc. Prof. Krassimir Gigov, MD, PhD  
Assoc. Prof. Jeli azko Hristov, MD, PhD (MU, Plovdiv)  
Assoc. Prof. Neviana Feschieva, MD, PhD (MU, Varna)  
Assoc. Prof. Radostina Georgieva, MD, PhD (NCRPP)  
Assoc. Prof. Gena Grancharova, MD, PhD (MU, Pleven)

### INTERNATIONAL ADVISORY BOARD

Prof. Peter Boyle (IARC)  
Dr. Francesco Branca (WHO, Geneva)  
Prof. Dr. Zuzana Brazdova, DSc. (Czech Republic)  
Hannia Campos, PhD (USA)  
Prof. Kurt Darr JD, DSc (USA)  
Prof. Dr. Joke Denekens (Belgium)  
PD Dr. Hermann H. Dieter (Germany)  
Prof. Gyula Dura, Dr. Biol. Med. PhD (Hungary)  
Prof. Igor Glazunov (Russia)  
Prof. Dr. Vilius Grabauskas (Lithuania)  
Prof. Andreas Hensel (Germany)  
Prof. Jovanka Karadzinska-Bislimovska (FYR Macedonia)  
Prof. Wilfried Karmaus, MD, MPH (USA)  
Prof. Ville Lehtinen, MD, PhD (Finland)  
Agneta Yngve, PhD (Sweden)

### EDITORIAL STAFF

**Translators:** Boryana Barbukova, Kalina Sirakova  
**Technical Editor:** Tatiana Karanesheva  
**Design:** Boryana Mekushina  
**Marketing:** Dora Ovcharova  
**Web administrator:** Reni Petkova

### ED ITORIAL OFFICE ADDRESS:

Assoc. Prof. Stefka Petrova, MD, PhD - Editor-in-Chief  
Bulgarian Journal of Public Health  
National Center of Public Health Protection  
15 Acad. Ivan Geshov Blvd, 1431 SOFIA, BULGARIA  
E-mail: [s.petrova@ncphp.government.bg](mailto:s.petrova@ncphp.government.bg)



### ТРЕТА НАЦИОНАЛНА КОНФЕРЕНЦИЯ НА БЪЛГАРСКИЯ ФОРУМ “ЗДРАВΟΣЛОВНИ И БЕЗОПАСНИ РАБОТНИ МЕСТА” / ВТОРА СРЕЩА ОКОЛО КРЪГЛАТА МАСА НА ЕМПЗРМ ПО ПРОМОЦИЯ НА ЗДРАВЕТО НА РАБОТНОТО МЯСТО В БЪЛГАРИЯ

Конференцията с мото “Здравословен труд здравословен начин на живот стабилен бизнес” се проведе на 9 юли 2009 г. в аудиторията на Националния център по опазване на общественото здраве (НЦООЗ) в София. Тя беше организирана в партньорство от Секретариата на Европейската мрежа за промоция на здравето на работното място (ЕМПЗРМ) и НЦООЗ Национален офис за контакти с ЕМПЗРМ (НОК). Обсегът на конференцията включваше три цели:

1. Обмяна на знания, методология и практика по промоция на здравето на работното място (ПЗРМ) между страните членки на ЕС Германия, Румъния и България.
  2. Представяне и социален маркетинг на резултатите от Седмата инициатива на ЕМПЗРМ кампанията “Европа в движение”.
  3. Публично обявяване на началото в България на Осмата инициатива на ЕМПЗРМ “Промоция на добрата практика по осигуряване на психично здраве на работното място” (MentalHealthWork) за периода 2008-2010 г.
- В работата на конференцията участваха 65 партньора от цялата страна: (а) управленци от МЗ и ИТСП на национално и регионално ниво (21,5%); (б) управленчески персонал на фирми по човешките ресурси и по безопасността и здравето при работа, представители на Служби по трудова медицина (35,4%) и (в) научни работници и преподаватели по професионално здраве (43,1%).

Участниците бяха приветствани с добре дошли от заместник директорката на НЦООЗ ст.н.с.у. ст., д-р Стоянка Узунова. Програмата на конференцията започна с въведение от представителката на МЗ д-р Маша Гавраилова, ръководител на отдела “Защита на общественото здраве”.

Втората среща около кръглата маса на ЕМПЗРМ по ПЗРМ беше открита с доклада на д-р Райнхолд Зохерт (ръководител на Секретариата на ЕМПЗРМ) на тема “Приносът на ПЗРМ за здравето и безопасността на работното място опит от Германия”. Докладът на д-р Теодор Харатау, изпълнителен директор на Фондация “Ромтенс”, на тема “ПЗРМ в румънските региони на развитие “Център” и “Запад”” беше публикуван на български език и използван от участниците в печатна версия. Третият доклад беше на ст.н.с.у. ст., д-р Запрян Запрян, НЦООЗ НОК България на тема “Резултати от кампанията “Европа в движение” в България. Впечатления от шестата Европейска конференция по промоция на здравето на работното място, Перуджа, Италия, 27-28 април 2009 г.” Състоя се оживена дискусия с модератори д-р Зохерт и д-р Запрян.

В хода на втората част на конференцията бяха представени двата национални модела на добра практика (МДП) от инж. Пандали Бозаджиев, завеждащ отдел “Човешки ресурси и безопасност и здраве при работа” на фирма “Оптикс” АД в град Панагюрище, “Български МДП Роля на иновативния стил за развитието на практиката по всеобхватна промоция на здравето на работното място” и от инж. Светлана Ъокова, отговорник по безопасност и здраве при работа на “Прогрес” АД в гр. Стара Загора, “Български МДП Успешна традиция за постигане на физическо, психично и организационно здраве чрез системата за управление на качеството, опитни секторни ръководители и участие на работещите”. Докладите породиха множество въпроси и отговори в силно позитивна атмосфера.

Началото на проекта MentalHealthWork в България беше обявено с презентацията на д-р Райнхолд Зохерт, ЕМПЗРМ, “Начало на осмата инициатива на ЕМПЗРМ в България Промоция на добрата практика по осигуряване на психично здраве на работното място за периода 2008-2010 г.”

39 участника (60% отговорили) попълниха акуратно анонимния “Въпросник за оценка на национално събитие”. По въпроса “Бихте ли препоръчали този вид събитие на вашите колеги/връстници? При ДА, с какви основания?” при 100% ДА водещи основания бяха “Форумът е извънредно полезен за всички фирми. Всички експерти трябва да познават в детайли ПЗРМ. Форумът повишава професионализма, оптимизма, разнообразието от подходи за постигане на здравословна и безопасна работна среда”, мотивацията и комуникацията. Водещи отговори на въпроса “В кои основни насоки трябва да се осигури подобрене от Ваша гледна точка?” бяха “Да се осигури системно образование и обучение по утвърдена програма за ПЗ.ПЗРМ. Да се предоставя повече информация, материали и МДП, особено чрез новия проект психично здраве при работа, управление на стреса чрез идентифициране, намаление или елиминиране на рисковите фактори”.

Повече подробности ще откриете на сайтовете <http://hp-whp.ncphp.government.bg> и <http://www.enwhp.org>

За контакти по Осмата инициатива на ЕМПЗРМ: Гл. експерт д-р З. Зарков, тел. (02) 9549769; факс (02) 9549719; е-поща:



### THIRD CONFERENCE OF THE BULGARIAN FORUM “HEALTHY AND SAFE WORKPLACES” / SECOND ENWHP ROUNDTABLE MEETING ON WORKPLACE HEALTH PROMOTION IN BULGARIA

The conference under the motto “Healthy work healthy lifestyle - healthy business” was held on July 9, 2009 in the auditorium of the National Centre of Public Health Protection (NCPHP) in Sofia. It was organised in partnership by the Secretariat of the European Network for Workplace Health Promotion (ENWHP) and NCPHP National contact office (NCO). The scope of the Conference covered three topics:

1. To share knowledge, methodology and practice in workplace health promotion (WHP) between countries of EU: Germany, Romania and Bulgaria.
2. To present and market the results of the Seventh ENWHP initiative “Move Europe” campaign.
3. To announce to the general public the start in Bulgaria of the Eighth ENWHP initiative “Promoting Good Practice in Mental Health Promotion at the Workplace” (MentalHealthWork) for the period 2008-2010.

At the Conference participated 65 partners from the whole country: (a) decision makers from MH and MLSP at national and regional levels (21,5%), (b) company managers on human resources and safety and health at work, representatives of occupational health services (35,4%) and (c) scientists and educators on occupational health (43,1%).

The participants were welcomed by the Deputy Director of NCPHP Prof. Dr. Stoyanka Uzunova. The conference programme started by the introduction of MH representative Dr. Masha Gavrilova, head of Department “Protection of Public Health”.

The Second ENWHP Roundtable Meeting on WHP started by presentation of Dr. Reinhold Sochert, ENWHP Secretariat, “The contribution of WHP to a healthy and safe working environment - experiences from Germany”. The presentation of Dr. Theodor Haratau, Executive Director of Romtens Foundation, NCO - Romania, “WHP within the Romanian development regions “Centre” and “West”” was published in Bulgarian and used by participants in printed version. The third presentation was of Dr. Zapryan Zapryanov, NCPHP, NCO - Bulgaria, “Results of the Move Europe Campaign in Bulgaria. Impressions from the 6-th European Conference on promoting Workplace Health, Perugia, Italy, 27-th and 28-th of April, 2009”. The roundtable discussion moderated by Dr. Sochert and Dr. Zapryanov was lively.

During the second part of the Conference were presented two national MOGP: by Dipl. Eng. Pandali Bosadjiev, HRM and OHS expert in “Optix” Co, Panagyurichte, “Bulgarian MOGP - Role of the innovative style in the development of comprehensive WHP practice” and by Dipl. Eng. Svetlana Gjokova, OHS expert, “Progress”JSC, Stara Zagora, “Bulgarian MOGP - A successful tradition to achieve physical, mental and organisational health through quality management system, experienced line managers and workers participation”. These presentations provoked a number of questions and answers in highly positive atmosphere.

The start of the MentalHealthWork project in Bulgaria was announced by the presentation of Dr. Reinhold Sochert, ENWHP, “The start of the Eighth ENWHP initiative in Bulgaria - Promoting Good Practice for Mental Health at the Workplace for a period 2008-2010”

39 participants (60% response ratio) filled in the anonymous “Evaluation questionnaire for national events”. The question “Will you recommend this type of event to your colleagues/peers? If yes on which reasons?” give rise to the considerations that this Forum is very useful for all companies, all the experts should know details of WHP; It increases the professionalism, the optimism and diversity of approaches to achieve healthy and safe working environment and the motivation and communication. The answers to the question “From your perspective what is the main issue that should be improved?” was: To offer a systematic education and training according to approved curriculum for WHP; To provide more information, materials and MOGP's, specially through the new project mental health at work, stress management by identifying, decreasing or eliminating the risk factors.

More information could be found at <http://hp-whp.ncphp.government.bg> and <http://www.enwhp.org>

For contacts on the Eighth ENWHP initiative in Bulgaria - Promoting Good Practice for Mental Health at the Workplace : Chief expert Dr. Z. Zarkov, phone (+359 2) 9549769; fax (+359 2) 9549719; e-mail: [z.zarkov@ncphp.government.bg](mailto:z.zarkov@ncphp.government.bg)

## СЪДЪРЖАНИЕ

### ПСИХИЧНО ЗДРАВЕ

Психично-здравно обслужване в четири  
източноевропейски страни

*Хр. Хинков, М. Длохи, Д. Косовеану П. Чизмарик,  
З. Зарков, М. Околийски, А. Броштилор*

2

### ХРАНИ И ХРАНЕНЕ

Научнообосновани критерии за формулиране на  
хранителни препоръки за популацията в напреднала и  
старческа възраст в България

*Ст. Петрова, К. Ангелова*

14

### ТРУДОВА МЕДИЦИНА

Промените в хематологичните показатели на работници,  
експонирани на серовъглерод (CS<sub>2</sub>)

*Н. Димитрова, Т. Попов, Т. Панев*

24

Оценка на ефекта на експозиция на пестициди  
върху имунния отговор

*Т. Вергиева, П. Теохаров, Хр. Зайков, М. Вуков*

32

### ПРОМОЦИЯ НА ЗДРАВЕ И ПРОФИЛАКТИКА НА БОЛЕСТИТЕ

Оценка на разпространението и влиянието на някои  
рискови фактори върху състоянието на костната система

*А. Манолова, М. Димов*

42

### ОКОЛНА СРЕДА И ЗДРАВЕ

Проучване на фактическото наличие на ултравиолетови (UV)  
филтри в български слънцезащитни козметични продукти

*С. Узунова, А. Тачев, Д. Чохаджиева, Н. Василева*

51

### ДИСКУСИЯ

Нанотехнология – потенциален здравен риск

*Ив. Хинков, К. Ангелова*

61

### НОВИ КНИГИ

68

### НОВИНИ

70

## CONTENTS

### MENTAL HEALTH

Mental health services in four European Countries

*H. Hinkov, M. Dlouhý, G. Cosoveanu, P. Čížmárik,  
Z. Zarkov, M. Okolyiski, A. Broshtilov*

### FOODS AND NUTRITION

Science-based criteria for formulating of dietary  
recommendations for elderly population in Bulgaria

*S. Petrova, K. Angelova*

### OCCUPATIONAL HEALTH

Changes in hematological parameters of workers  
exposed to carbon disulfide (CS<sub>2</sub>)

*N. Dimitrova, T. Popov, T. Panev*

Evaluation of the effect of exposure to pesticides  
on immune response

*T. Vergieva, P. Theoharov, C. Zaykov, M. Vukov*

### HEALTH PROMOTION AND DISEASE PREVENTION

Assessment of the prevalence and effect of some risk  
factors on the status of the bone system

*A. Manolova, M. Dimov*

### ENVIRONMENTAL HEALTH

Study on the presence of ultraviolet (UV) filters  
in Bulgarian sunscreen products

*S. Uzunova, A. Tachev, D. Chohadjieva, N. Vasileva*

### DISCUSSION

Nanotechnology – potential health risk

*I. Hinkov, K. Angelova*

### NEW BOOKS

### NEWS

## ПСИХИЧНО-ЗДРАВНО ОБСЛУЖВАНЕ В ЧЕТИРИ ИЗТОЧНОЕВРОПЕЙСКИ СТРАНИ

Христо Хинков<sup>1</sup>, Мартин Длохи<sup>2</sup>,  
Джеорджиана Косовеану<sup>3</sup> Павол Чизмарик<sup>4</sup>,  
Захари Зарков<sup>1</sup>, Михаил Околийски<sup>1</sup>, Ангел Брощилов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национален център по опазване на общественото здраве,  
София, България

<sup>2</sup>Факултет по информатика и статистика,  
Университет по икономика, Прага, Чехия

<sup>3</sup>Палата за здравно осигуряване на транспортното  
министерство, Букурещ, Румъния

<sup>4</sup> Университет "Матей Бел", Банска Бистрица, Словакия

### Резюме

*Целите на проучването са:*

а) да се опише и анализира настоящото състояние на психично-здравното обслужване в няколко избрани източно-европейски страни (Чехия, Словакия, Румъния и България) и

б) да се идентифицират общите тенденции, а така също и националната специфика при организиране на психично-здравното обслужване, като се открият възможностите за обмяна на познания и опит между страните.

**Методи:** Специфичната за дадена страна информация е получена от раздел във въпросник, посветен на организацията, собствеността и капацитета на местните служби за психично здраве в четирите страни. Въпросникът е подготвен от международен екип и включва както количествена, така и качествена информация за политиката за психично здраве, организацията на обслужване, разпределението на ресурси и други съответни тематика.

**Резултати:** Представено е сравнително проучване между четири страни в Централна и Източна Европа. Анализът е съсредоточен само върху два основни вида помощ: амбулаторни и стационарни служби за психично здраве. В Чехия и Словакия лечението на тежки психични разстройства може да се извършва в първичната помощ, докато в България и Румъния то се извършва само от психиатри. Този факт показва различни нива на интеграция на психично-здравното обслужване в първичната помощ.

**Изводи:** Всичките четири страни са стартирали основни промени в системите си за предоставяне на психично-здравно обслужване. Разнообразието, поради различния контекст, както и стартовите точки в реформите, могат да бъдат преодоляни. Идентифицираната празнота в наличната информация е предизвикателство за страните. Нужни са общи показатели, свързани с ефективното използване на услугите.

**Ключови думи:** психиатрия в общността, сравнителни проучвания, психосоциални услуги, Източна Европа.

## MENTAL HEALTH SERVICES IN FOUR EAST EUROPEAN COUNTRIES

Hristo Hinkov<sup>1</sup>, Martin Dlouhý<sup>2</sup>,  
Georgiana Cosoveanu<sup>3</sup>, Pavol Čizmarik<sup>4</sup>,  
Zahari Zarkov<sup>1</sup>, Michail Okolyiski<sup>1</sup>,  
Angel Broshtilov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Centre for Public Health Protection,  
Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup>School of Informatics and Statistics, The University  
of Economics, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Health Insurance House of Transport Ministry,  
Bucharest, Romania

<sup>4</sup>Matej Bel University, Banska Bystrica, Slovakia

### Abstract

**Aim:**

The objectives of this study are: (a) to describe and analyze the current status of mental health services in selected Eastern European countries (the Czech Republic, Slovakia, Romania, and Bulgaria) and (b) to identify common trends as well as national specifics in organizing the mental health services and to find opportunities for transfer of knowledge and experience among the countries.

**Methods:**

The country-specific information was obtained from the section in the questionnaire that is devoted to organization, ownership and capacity of the local mental health services in the four countries. The questionnaire was prepared by the international team and includes both quantitative as well as qualitative information about mental health policy, service organization, resource allocation and other relevant topics.

**Results:**

A comparative study between four countries in Central and East Europe is presented. The scope of the analysis is focused on two basic types of services only: outpatient and inpatient mental health services. In the Czech Republic and Slovakia treatment of severe mental disorders is available also in primary care while in Bulgaria and Romania it is strictly done by psychiatrists. This fact shows different levels of integration of the mental health care in the primary care.

**Conclusions:**

All the four countries have started mayor changes in their systems of delivering mental health care. The diversities due to different context as well starting points in the reforms could be overcome. The information gap identified is a challenge for the countries and common indicators related with the utilization of the services are needed.

**Key Words:** Community Psychiatry, Comparative Studies, Psychiatric Social Service, Eastern Europe

## Декларация за интересите:

Това проучване е извършено с подкрепата на проекта „Финансиране и психично-здравно обслужване в Чехия /Централна Европа“, спонсориран от Американските национални институти по здравеопазване, Международния център Джон Фогарти (5 D43 TW005810-07).

## 1. Въведение

Развитието на страните в Източна Европа, след основните политически промени през 1989 година, има своите подобия, но и различия, произхождащи от специфичната среда, в която започват реформите. В много аспекти е очевидно, а в психично-здравното обслужване е доста симптоматично, че нивото на подготовка и зрялост на обществото за глобални промени рефлектира в желанието за реформи: от политиката до редовите експерти. Традиционната психиатрия, която беше приета малко или повече в страните от пост-съветския блок, имаше своето въздействие в стила, начина на мислене и общата нагласа на повечето от професионалистите в тази област. Още повече, тя имаше последствия върху обкръжаващата ни среда, включително роднини, а даже и самите потребители. Идеята, че повечето сериозни психични разстройства могат да се третира без неизбежните в миналото усамотение и изолация, придружени от реакциите на маргинализиране и отхвърляне от страна на местната общност, беше приемана като нереална и чужда на здравия разум. Това широко разпространено вярване възпираше дълго време всяко усилие за реформиране на системата – доста по-дълго отколкото в общата здравна мрежа. Като резултат в този сектор можеше да се наблюдават примери на добри модерни практики в общността, съществуващи паралелно със старомодните, институционални и груби стереотипи, извършвани от много професионалисти, работещи във все още нереформираната система на службите за психично здраве. Това е основната причина за наблюдателя да добие впечатлението, че службите за психично здраве в тези страни имат смесени характеристики. Всъщност наблюдението и анализът на видовете, начините и пътищата за осигуряване на психично-здравното обслужване са най-надеждните показатели за добро внедряване на декларираната официална политика (1).

## 2. Аналитични процедури за данни

Направен е опит да се анализират и сравнят видовете предоставяне и начините за използване на психично-здравните услуги в четири страни от Източна Европа. Инструментът, използван за събиране на данни, е въпросник, подготвен в рамките на международен проект за изследване и оценка на предназначението на ресурсите по психично здраве. Въпросникът има отделни раздели, третиращи различни тематикати, като национална политика, финансови потоци, психично-здравното обслужване и т.н. Сравняването и анализът са направени на база на отговорите от четирите участващи страни в раздела „Психично-здравно обслужване“. Някои от данните на анализа са взети от доклада на СЗО „Политики и практики за психично здраве в Европа“, Регионален офис на СЗО за Европа (2008) (2).

## Declaration of Interest:

This research was supported from the project „Finance and Mental Health Services Training in Czech Republic/Central Europe“, sponsored by the U.S. National Institutes of Health, John E. Fogarty International Centre (5 D43 TW005810-07).

## 1. Introduction

The development of the countries in the Eastern Europe after the major political changes in 1989 has similarities as well as differences, stemming from the particular background, where the reforms in these countries started. In many aspects it is evident, and in mental health care it is quite symptomatic, that the level of preparedness and maturity of the society for global changes reflected in the willingness to reform: from the politics to the ordinary experts. Traditional psychiatry that was adopted more or less in the countries of the post-Soviet block has left its impact onto the style, way of thinking and general attitude of the most of professionals in the field. Moreover, it had implications on the surrounding society including relatives and even the users themselves. The idea that most of the severe mental disorders could be treated without unavoidable in the past seclusion and isolation, accompanied by reactions of marginalizing and rejection on behalf of the local community, was perceived as unrealistic and far away from the common sense. This widespread belief prevented for a long time any effort to reform the system - quite longer then in the general health care. As a result, in this sector one could observe examples of good, modern community practices existing in parallel with old-fashioned, institutional and rigid stereotypes performed by many professionals working in the still functioning, unreformed system of mental health care. This is the main reason for the observer to have an impression that mental health services in these countries have eclectic characteristics. In fact, observation and analysis of the types, modes and ways of providing mental health services is the most reliable indicator for a good implementation of a declared official policy (1).

## 2. Data Analytic Procedures

We attempt to analyze and compare the types of provision and ways of utilization of the mental health services in four countries from Eastern Europe. The instrument used to collect data is a questionnaire prepared within the frames of an international project for investigation and assessment of resource allocation in mental health. The questionnaire has several sections dealing with different topics like national policy, financial flows mental health services etc. The comparison and analysis is made on a base of answers from the four participating countries in the section „Mental health services“. Some of data for the analysis are taken from the WHO report „Policies and practices for mental health in Europe“ WHO Regional Office for Europe. (2008) (2).

За да имаме обща база за сравнение на следващите критерии за оценка, сме се съсредоточили върху два вида обслужване – амбулаторни и стационарни служби за психично здраве – и сравняваме показателите за капацитет и използваемост, както и типа на финансиране и организацията на услугите. Броят на психиатричните отделения в многопрофилните болници се разглежда като показател за интеграцията на психиатричната помощ в общото здравно обслужване (3).

### 3. Резултати и дискусия

Анализът е фокусиран върху два основни вида обслужване: амбулаторни и стационарни служби за психично здраве. Всеки от тези основни видове обслужване може да бъде разделен на подвидове, съгласно природата на подsigуряваната помощ или на доставчика: система на социална помощ, медицинско обслужване, религиозни институции и др. Сравняемостта е усложнена поради различните системи на обезпечаване на психичното здраве. В Чехия и Словакия лечението на тежките психични разстройства се осъществява още в първичната помощ, докато в България и Румъния третирането е само от психиатри. Този факт показва различните нива на интеграция на службите за психично здраве в първичната медицинска помощ. Други критерии, свързани с пола, възрастта или клиничния вид на психичния здравен проблем (умствено изоставане или психично разстройство), не се вземат предвид, въпреки че тяхната значимост е очевидна. Във всички случаи социалните последици могат да бъдат подобни, но видът на помощта и нуждите, които трябва да се посрещнат, са различни.

#### 3.1. Извънболнично обслужване

Заедно с реформата на общото здравно обслужване във всички източноевропейски страни, съществуващите извънболнични звена също претърпяват промени съгласно новоформулираните принципи за осигуряване на психиатрична помощ. Във всичките четири страни извънболничните служби се квалифицират като базирани в общността или ориентирани в тази посока. Службите са наследили предишните структури, например лабораториите за психично здраве са типични за Румъния, психиатричните диспансери – за България и така нататък. Някои служби за психично-здравно обслужване носят старото си име, но пък други предпочитат да носят ново име, в зависимост от нивото на трансформиране (4).

В Румъния са изградени 62 центъра за психично здраве чрез преобразуването на предишните лаборатории по психично здраве. Чрез тези центрове се очаква социалното приобщаване на хората с психични проблеми в обществото, в модерния смисъл на терапията. Тези служби подsigуряват повечето предписания за дългосрочна терапия, понякога терапия чрез общуване. Има само няколко заведения за дневно лечение. Повечето от тях са изградени с помощта на проекти на неправителствени организации или други международни инициативи като Инициативата за социална кохезия на СЗО и Пакта за стабилност за държавите от Югоизточна Европа. Съгласно Планът за действие за психично здраве, одобрен от Министерството на общественото здравеопазване

In order to have common basis for comparison the following criteria for assessment we have focused on two types of services – outpatient and inpatient mental health services – and compared the capacity and utilization indicators as well as ownership and organization of services. The number of psychiatric departments in general hospitals is considered as an indicator of integration of the psychiatric care into general health care (3).

### 3. Results and Discussion

The scope of the analysis will be focused on two basic types of services only: outpatient and inpatient mental health services. Each of these main types of services could be divided on subtypes according to the nature of care provided or the provider: system of social care, medical services, religious institutions etc. The comparability is complicated because of different systems of provision of mental health. In the Czech Republic and Slovakia treatment of severe mental disorders is available also in primary care while in Bulgaria and Romania it is strictly done by psychiatrists. This fact shows different levels of integration of the mental health care in the primary care. Other criteria related with sex, age or clinical type of the mental health problem (mental retardation or mental disorder) is not taken into consideration although its importance is obvious. In all the cases the social consequences could be similar but the type of care and needs that should be met are different.

#### 3.1 Outpatient services

Together with the general health care reform in all East European countries the existing outpatient facilities also underwent changes according to the newly formulated principles for mental health care provision. In all four countries the outpatient services are labeled as community based or community oriented. The services have inherited the previous structures, for example, mental health laboratories are typical for Romania, psychiatric dispensaries for Bulgaria etc. Some services kept the old name, but other services preferred to adopt new one, depending on the level of transformation (4).

In Romania, 62 community mental health centers have being established by transforming the previous mental health laboratories. Through these centers, the social insertion of the people with mental disabilities is expected, in the modern meaning of therapy within the society. These services provide mostly prescriptions for long-term therapy, occasionally talking therapy. There are only few day-treatment facilities. Most of them are established by NGO projects or other international initiatives as the Social Cohesion Initiative under WHO and the Stability Pact for SEE countries. According to the Action Plan in mental health approved by Ministry of Public Health (OMSP 426/2006) in period 2006-2009 will be set up 140 mental health centers for adults and 40 for children and adolescents. In ambulatory, the central structure in a catchment area is the Community Mental

(OMSP 426/2006), в периода 2006-2009 година ще бъдат изградени 140 центъра за психично здраве за възрастни и 40 – за деца и юноши. В амбулаторната мрежа, централна структура в обхванатата област е Центърът за психично здраве в общността, обгрижващ 100 000-150 000 души, за който работи мултидисциплинарен екип. Той предлага много услуги: психиатрични консултации, психологична и психотерапевтична оценка и интервенция, оценка на говорните смущения, терапия и съветване, интервенция при криза, услуги за обслужване по домовете, социално подпомагане, поддръжка, почасово обслужване за деня, клуб, почивка, дейности по трудова и работна терапия. Друга част на амбулаторната структура е общественият или частен психиатричен кабинет (5).

В Чехия (6) и Словакия (7) извънболничната помощ е подобна на тази в други държави. Психиатрите и психолозите в извънболничните служби са лица, повечето от които работят в своите частни практики. Болниците също имат амбулаторни психиатрични отделения. В този случай лекарите получават заплата от болницата. Едва наскоро бяха открити нови служби на база община, но все още достъпът до тях е ограничен или географски неравномерен. Някои служби по психично здраве са част от социалните служби и се финансират от други източници. Все още е трудно да се каже кои са здравните услуги и кое е социалното осигуряване.

В България идеята за извънболнична помощ трябваше да следва административното разпределение на 28 области. Всъщност само в 12 области психиатричните диспансери са изградени като поддържаща структура на болничната помощ. В областите, където такива структури не съществуват, тази роля е поета от съществуващата психиатрична болница или психиатричното отделение в многопрофилната болница. След големи реформи в общата здравна помощ новият подход към хората с психични разстройства беше възприет под различни форми като дневни центрове за обслужване, помощ по домовете, социално подпомагане, защитени жилища и т.н. (8).

**Таблица 1** показва събраните данни за четирите страни относно броя на психиатрите, друг персонал, броя на лекуваните пациенти и броя на консултациите. Заключение, което може да се направи е, че в Чехия и Словакия има повече ефективни извънболнични служби отколкото в Румъния и България, когато се сравнява броят на психиатрите и броят на лекуваните пациенти. Използването на службите също варира силно между държавите. В Словакия амбулаторно са лекувани повече пациенти отколкото в Румъния, която е с четири пъти по-голямо население.

Цифрите, представени в **Таблица 1**, трябва да се гледат в динамика, която показва, че между държавите има различия. В България се наблюдава намаление на броя пациенти, например 234 127 пациенти са лекувани в амбулаторните служби през 1997 г. (9). Означава ли това по-лош достъп до обслужването? Едно възможно обяснение е преминаването на извънболничното обслужване в частния сектор. От 2003

Health Centre (CMHC) staffed with a multidisciplinary team which covers 100 000-150 000 people. CMHCs offer a lot of services in the community: psychiatric consult, psychological and psychotherapeutic evaluation and intervention, assessment of speech disorders, therapy and counseling, crisis intervention, home care services, social assistance, advocacy, daytime care, club, leisure, occupational and work therapy activities. Another part of the ambulatory structure is the psychiatric office public or private (5).

In the Czech Republic (6) and Slovakia (7) the outpatient care is similar to other countries. Psychiatrist and psychologists in outpatient services are mostly private working in their private practices. Hospitals also have outpatient psychiatric departments; in this case physicians are salaried employers. Just recently the new community based services were opened but still the access to them is limited or geographically uneven. Some mental health services are part of social services and are paid from other sources. It is sometime hard to say what health services are and what is social service.

In Bulgaria, originally the idea for the outpatient care was to follow the administrative distribution of 28 regions in the country. In fact, only in 12 regions psychiatric dispensaries as supportive structure to the hospital care were established. In regions where such structures did not exist this role was taken by existing mental hospital or acute psychiatric ward in the general hospital. After the major reforms in the general health care the new approach to the mentally ill persons was adopted in many forms like day-care centers, home care, social assistance, protected homes etc. (8).

**Table 1** shows aggregated data for the four countries regarding the number of psychiatrists, other staff, the number of patients treated and the number of consultations. One conclusion that could be made is that the Czech Republic and Slovakia have more efficient outpatient services than Romania and Bulgaria when comparing number of mental health physicians and the number of patients treated. Utilization of services also varies greatly among countries. In Slovakia, more patients are treated by outpatient services than in Romania with four times larger population.

The numbers presented in **Table 1** must be seen in the dynamics that reveals that there are diversities between countries. In Bulgaria, we observe decreasing number of patients; for example 234 127 patients were treated in outpatient services in 1997 (9). Does this mean worse access to services? One possible explanation could be the privatization of the outpatient services. Since 2003 most of these consultations are not registered officially. Different situation is in the Czech Republic and Slovakia where the trend in the number of patients is steadily positive.

година повечето от консултациите не са регистрирани официално. Различна е ситуацията в Чехия и Словакия, където тенденцията в броя на пациентите е устойчиво позитивна.

**Таблица 1.** Капацитет и използване на амбулаторните служби за психично здраве

| Страна<br>Country                   | Население<br>Population | Брой на лекарите<br>(психиатри)<br>Number of physicians<br>(psychiatrists) | Брой лекувани<br>пациенти<br>Number of<br>patients treated | Брой консултации<br>Number of consultations |
|-------------------------------------|-------------------------|--|--|---|
| България, 2006<br>Bulgaria, 2006    | 7 679 290               | 428*   | 175 677  | не са налични<br>NA                         |
| Чехия, 2007<br>Czech Republic, 2007 | 10 322 689              | 697  | 464 836  | 2 662 032                                   |
| Румъния, 2005<br>Romania, 2005      | 21 623 848              | 1 398  | 222 000  | не са налични<br>NA                         |
| Словакия, 2006<br>Slovakia, 2006    | 5 391 184               | 304  | 258 650  | 1 615 105                                   |

\*Данни от 2007 г.

### 3.2 Inpatient care

The number of hospitals and hospital beds in the four countries differs. In some countries the number of beds

**Table 1.** Capacity and utilisation of outpatient mental health services

### 3.2. Болнично лечение

В четирите страни броят на болниците и болничните легла се различава. В някои страни броят на леглата и специално броят на психиатричните отделения в многопрофилните болници показва динамика. В България някои от съществуващите извънболнични структури имат легла (така наречените диспансери). Броят на болниците е най-висок в Румъния, страната с най-многобройно население. Средният престой в Румъния е най-ниският сравнен с другите две страни. Референтната година е 2005, тъй като оттогава са повечето данни за всички страни (Таблица 2).

**Таблица 2.** Болнично обслужване – психиатрични болници (2005)

| Страна<br>Country       | Брой на болниците<br>Number of hospitals | Брой легла (общо и<br>на 10000)<br>Number of beds total<br>and per 10000 | Брой на изписвания/<br>приеми<br>Number of discharges/<br>admissions | Среден престой<br>в дни<br>ALOS in days | Персонал<br>Personnel   |
|-------------------------|--|--|--|---|-------------------------|
| България<br>Bulgaria    | 24                                       | 4 922 (6.4)  | 25 521   | 38.98                                   | Няма в наличност<br>N/A |
| Чехия<br>Czech Republic | 20                                       | 9 858 (9.6)  | 41 719   | 79.4                                    | 5348.14                 |
| Румъния<br>Romania      | 38                                       | 17 224 (7.5)   | N/A  | 18.3                                    | Няма в наличност<br>N/A |
| Словакия*<br>Slovakia*  | 12                                       | N/A  | N/A  | N/A                                     | Няма в наличност<br>N/A |

\*За Словакия не са в наличност броят на леглата и другите данни за психиатричните болници и психиатрични отделения поотделно, затова те са включени в таблицата за многопрофилните болници с психиатрични отделения (Виж по-долу)

\* Data from 2007

and especially the number of psychiatric departments in general hospitals show some dynamics. In Bulgaria some of the existing outpatient structures have beds (so called dispensaries). The number of hospitals is highest in Romania, the country with the largest population. The average length of stay (ALOS) in Romania is lowest compared with other two countries. The reference year is 2005 as having most data for all the countries. (Table 2).

Table 3 shows the aggregated data for the four countries regarding the integrated with the general care mental health provisions.

**Table 2.** Inpatient care – psychiatric hospitals (2005)

**Таблица 3** показва събраните данни за четирите страни относно интегрирането на психично-здравното обслужване в многопрофилните болници.

В България броят на леглата в психиатричните болници бавно намалява, докато броят на психиатричните отделения в многопрофилните болници се увеличава, т.е. съществува процес на интеграция на психично-здравното обслужване в системата на общото здравеопазване. В същото време броят

In Bulgaria the number of beds in mental health hospitals slowly decreases while the number of psychiatric departments in general hospitals increases, i.e. there is a process of integration of the mental health care into the system of general health care. In the same time the number of hospitals remains stable. There is also a tendency of intensification of the care – the average length of stay (ALOS) decreases since 1995. One interesting trend is observed in 2007 when the number of beds increases

на болниците остава стабилен. Наблюдава се също тенденция на интензификация на грижата – средният престой намалява от 1995 г. Интересна тенденция е наблюдавана през 2007 г., когато броят на леглата се увеличава значително в сравнение с предишната година. Възможното обяснение е, че в много болници и диспансери с легла се отчитат така наречените дневни стационари с виртуални легла. През последните години финансирането на тези структури (основано на броя на леглата) стана зависимо от тези дневни стационари с виртуални легла.

**Таблица 3.** Болнично обслужване – психиатрични отделения в многопрофилните болници (2005)

| Страна<br>Country        | Брой на многопрофилните болници с психиатрични отделения<br>Number of general hospitals with psychiatric dpt. | Брой на леглата (общо и на 10000)<br>Number of beds (total and per 10 000) | Брой на изписвания/приеми<br>Number of discharges/admissions | Среден престой в дни<br>ALOS in days | Лекари на пълен работен ден<br>Physicians in FTE |
|--------------------------|---|--|--|--------------------------------------|--|
| България<br>Bulgaria     | 18  | 833 (1.15)   | 13 099   | 21.1                                 | Не са налични<br>N/A                             |
| Чехия<br>Czech Republic  | 32  | 1439 (1.4)   | 18 914   | 20.9                                 | 147.2  |
| Румъния<br>Romania       | 75  | 4540 (2.1)*  | 48 000   | N/A                                  | 900  |
| Словакия**<br>Slovakia** | 35 (оценени)<br>(est.)  | 4502 (8.4)   | 36376/38 730   | 32.7                                 | 286.98   |

\*Данните (2.1) са взети от докладана СЗО за политиките и практиките по психично здраве в Европа, 2008.

\*\*Натрупаните данни за психиатрични болници и психиатрични отделения в многопрофилните болници в Словакия 2005.

В Чехия също се наблюдава тенденция на намаляване на броя на леглата и подобряване на психиатричното обслужване. Броят на психиатричните отделения в многопрофилните болници също нараства от 1995 година насам.

Структурата на системата за предоставяне на психично-здравни услуги в Румъния продължава да бъде доминираща посредством психиатрични болници, подчинени на биологичния модел на обслужване:

- психиатрични отделения в многопрофилните болници;
- психиатрични болници за остри психози – среден престой при хоспитализиране – 17.5 дни;
- психиатрични болници за хронични психични разстройства – среден престой на хоспитализиране – 45 дни;
- дневна хоспитализация;
- център за рехабилитация и социална реинтеграция – месеци или години.

Не съществува редовна комуникация между институциите за дълъг престой и извънболничните отделения. Продължителността на помощта често е ограничена до времетраенето на даване на определени психотропни вещества. Териториалното разпределение на услугите е неравномерно. Около 7% от леглата са локализирани в дневните болници; 3.5% са в отделенията със затворен режим и около 1% са предназначени за лечение на наркозависимости. Някои легла също са

significantly compared with the previous year. Possible explanation is that in many hospitals and dispensaries with beds the so-called day-stationeries with virtual beds are reported. During the last years the financing of these structures (based on the number of beds) became dependent on these day-stationeries with virtual beds.

In the Czech Republic, there is also a tendency of decreasing the number of beds and intensification of the psychiatric services. The number of psychiatric departments in general hospitals is also increasing since 1995.

**Table 3.** Inpatient care – psychiatric departments in general hospitals (2005)

\*Data (2.1) is taken from WHO report on policies and practices for mental health in Europe, 2008

\*\*Aggregated data for psychiatric hospitals and psychiatric departments in general hospitals, Psychiatric Care in SR 2005.

The structure of the mental health delivery system in Romania continues to be dominated at the present by the psychiatric hospitals and subordinated to an excessively biological model.

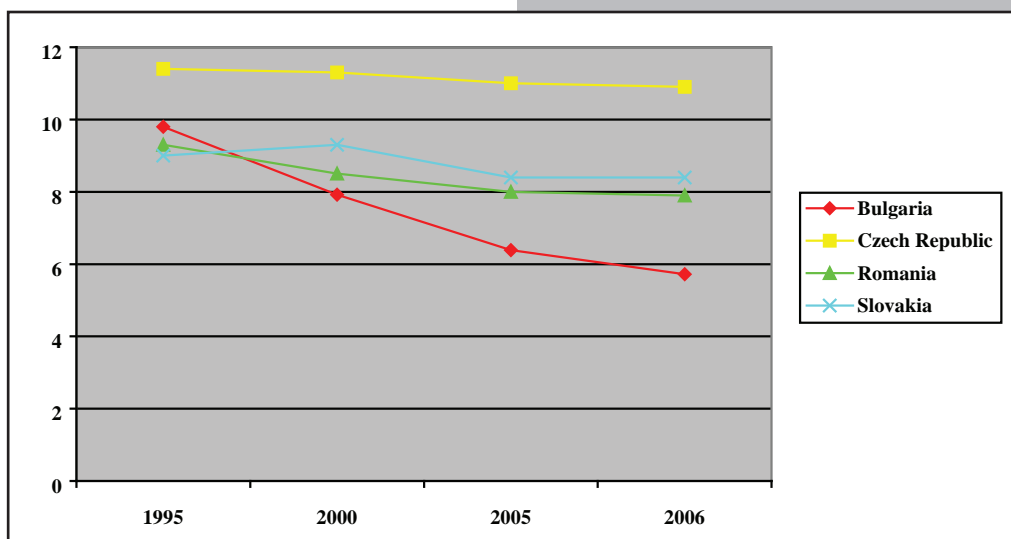
- Psychiatric wards within general hospital;
- Acute psychiatric hospital – the medium length of hospitalization – 17.5 days;
- Chronic psychiatric hospital – the medium length of hospitalization – 45 days;
- Daily hospitalization;
- Centre for rehabilitation and social re-integration – months or years.

There is no formal communication between the long-care institutions and the ambulatory ones, the continuity of care often being limited to the continuity of administrations of a certain psychotropic drug. The territorial distribution of services is uneven. About 7% of the beds are located in day hospitals, 3.5% in secure units and about 1% are allocated for treatment of drug abuse. Some beds are also earmarked for geriatric and child and adolescent services. There are no private psychiatry hospitals. There are about 260 child and adolescent psychiatrists in the country, which forms more than one-fourth of the psychiatry workforce. The Ministry recognized geriatric Psychiatry as a sub-specialty in 2001. Some psychiatrists work

предназначени за обслужване на възрастни, деца и юноши. Няма частни психиатрични болници. Около 260 са детските и юношески психиатри в страната, което оформя повече от една четвърт от психиатричните специалисти. Министерството признава гериатричната психиатрия като подспециалност през 2001 година. Някои психиатри работят в частни извънболнични клиники, оторизирани от Министерството на общественото здравеопазване. Департаментът по човешки ресурси на Министерството започна изпълнението на комплексна задача за класифициране и категоризация на медицинския персонал, зает в службите за психично здраве (10).

В Словакия броят на болниците, както и броят на психиатричните отделения в многопрофилните болници, е доста голям, предвид относително малкото население. Тези цифри могат да доведат до извода, че в тази страна стационарното обслужване преобладава над извънболничната помощ. Относно динамиката през годините, има относително устойчива ситуация спрямо интензитета на обслужването (7).

**Фигура 1.** Общ брой на психиатричните легла (в хиляди) в многопрофилните и психиатричните болници, 1995-2006



**Фигура 1** сравнява тенденциите на намаляване на броя легла в четирите страни.

По отношение на средния престой също има различия, които са показани на **Фигура 2**.

Сравнението между четирите страни показва различни нива на интензивност на обслужването – стартирайки от най-ниския престой в Румъния, до най-високия – в Чехия. В Словакия има бърза промяна около 2000 г., която може да бъде свързана с някои мерки, взети в този период (Sdheffler RM & Potucek M. (2008) (11). Едно обяснение за високия среден престой в Чехия може да бъде това, че натрупаните данни вероятно включват повече отделения или заведения за хронични състояния, отколкото в другите страни. **Фигура 3** подкрепя хипотезата, според която средният престой, само за психиатричните отделения в многопрофилните болници,

in private ambulatory clinics with authorization from the Ministry of Public Health. The Human Resources Department of the Ministry has begun the complex task of classification and categorization of medical staff employed in the mental health services (10).

In Slovakia, the number of hospitals as well the number of psychiatric wards in general hospitals is quite big having in mind the relatively small population. These figures could draw to the conclusion that in this country the stationery services prevail over the outpatient care. Regarding the dynamics over the years there is relatively stable situation concerning the intensity of care (7).

The next Figures show the dynamics during the years per country regarding several indicators – number of beds, average length of stay, number of psychiatric departments in general hospitals, number of discharges and personnel. Four years are taken as a reference: 1995, 2000, 2005 and 2006. The most obvious dynamics are evident for

**Figure1.** Total number of psychiatric bed (in thousands) in general and mental health hospitals, 1995-2006

Bulgaria, whereas the other countries show relatively stable trend with slow decreasing.

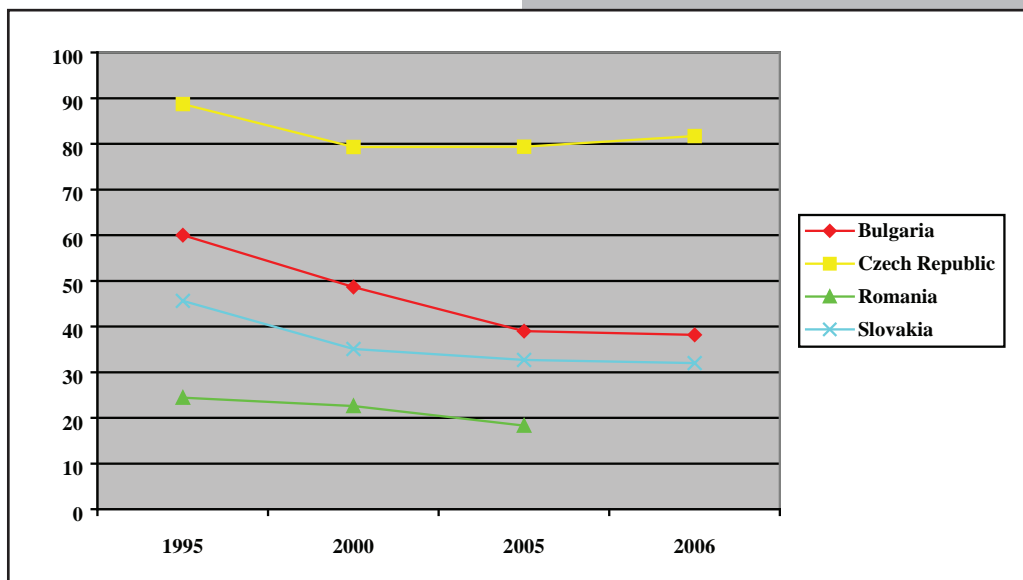
**Figure 1** compares the trends of decreasing the number of beds in the four countries.

Regarding the average length of stay (ALOS) there are also diversities shown on the **Figure 2**.

The comparison between the four countries shows different levels of intensity of care – starting from the lowest ALOS in Romania up to the highest in the Czech Republic. In Slovakia there is a rapid change around 2000, which could be connected with some measures taken in that period (Scheffler RM & Potůček M. 2008 (11). One explanation for the high ALOS in Czech Republic could be that the aggregated data probably include

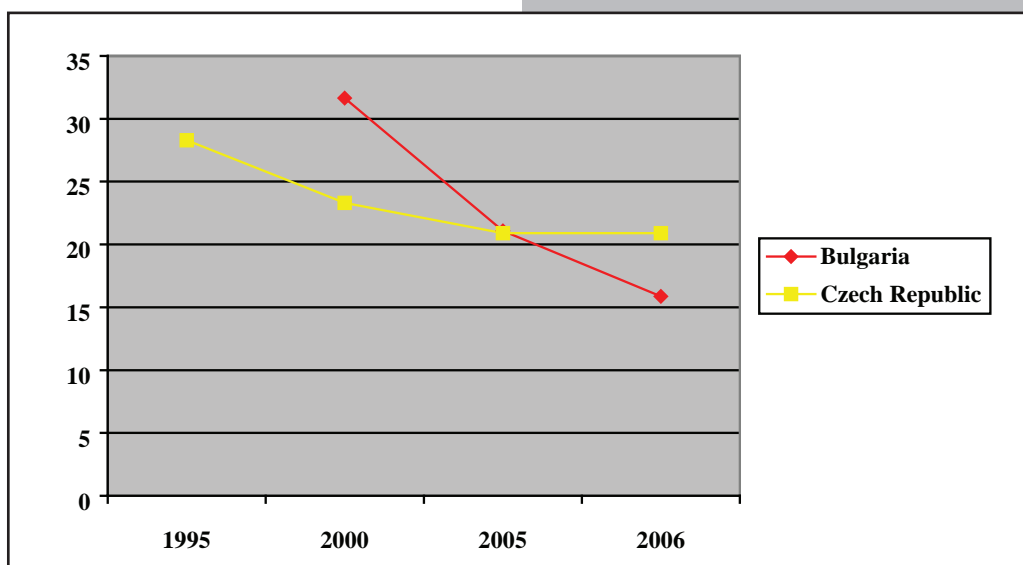
е сравнен в две страни – България и Чехия. Данните за Чехия се различават съществено от данните на **Фигура 2**.

**Фигура 2.** Среден престой в дни, психиатрични болници, 1995-2006



**Figure 2:** The average length of stay in days, mental health hospitals, 1995-2006

**Фигура 3.** Среден престой в психиатричните отделения на многопрофилните болници (в дни) 1995-2006



**Figure 3.** The average length of stay in psychiatric hospital departments (in days) 1995-2006

Показател за интеграция в общността и общото здравно обслужване е броят на психиатричните отделения за остри състояния в многопрофилните болници. **Фигура 4** показва динамиката за наблюдавания период в три от страните.

**Фигура 5** показва броя на изписванията в три от страните. Тази променлива се разглежда като друг важен показател за качеството и интензивността на обслужването. В същото време трябва да се подчертае, че тенденцията за скъсяване на престоя (което е свързано с броя на изписванията за определен период), обусловена от икономически причини, може да рефлектира отрицателно върху цялостното възстановяване на пациента. Във всички случаи то трябва да се подкрепя и от

ALOS only for the psychiatric department in general hospitals is compared in two countries – Bulgaria and Czech Republic. The data for the Czech Republic differ substantially from the data in the **Figure 2**.

Indicator for integration within the community and the general health care is the number of acute psychiatric department in the general hospitals. **Figure 4** shows the dynamics for the observed period in three of the countries.

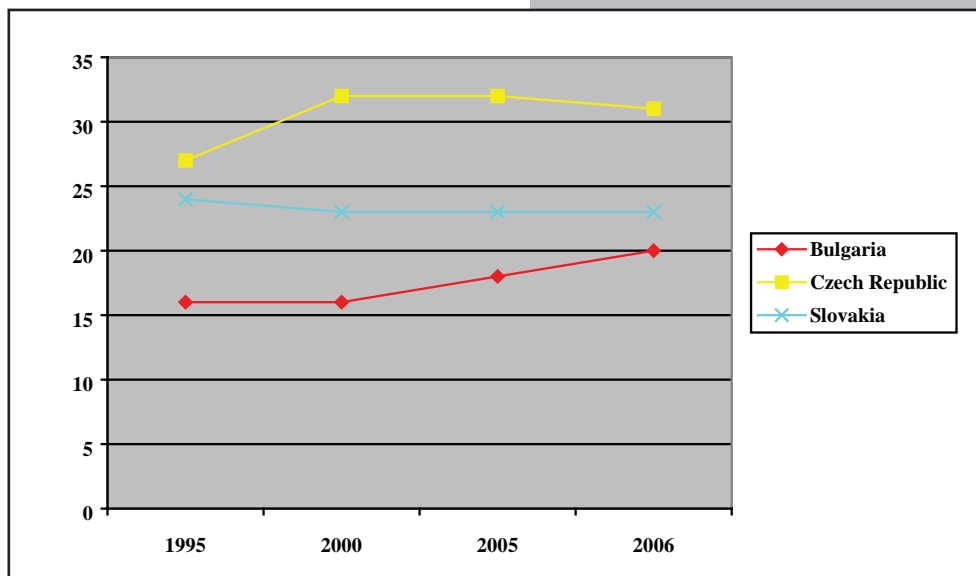
The **Figure 5** shows the number of discharges in three of the countries. This variable is considered as another important indicator for the quality and intensity of care.

развита мрежа за услуги за психосоциална рехабилитация в общността. За България данните показват по-слаба динамика сравнена с другите две страни. Едно обяснение би могло да е по-скоро количественият характер на реформите отколкото интензификацията на обслужването.

**Фигура 4.** Психиатрични отделения в многопрофилните болници

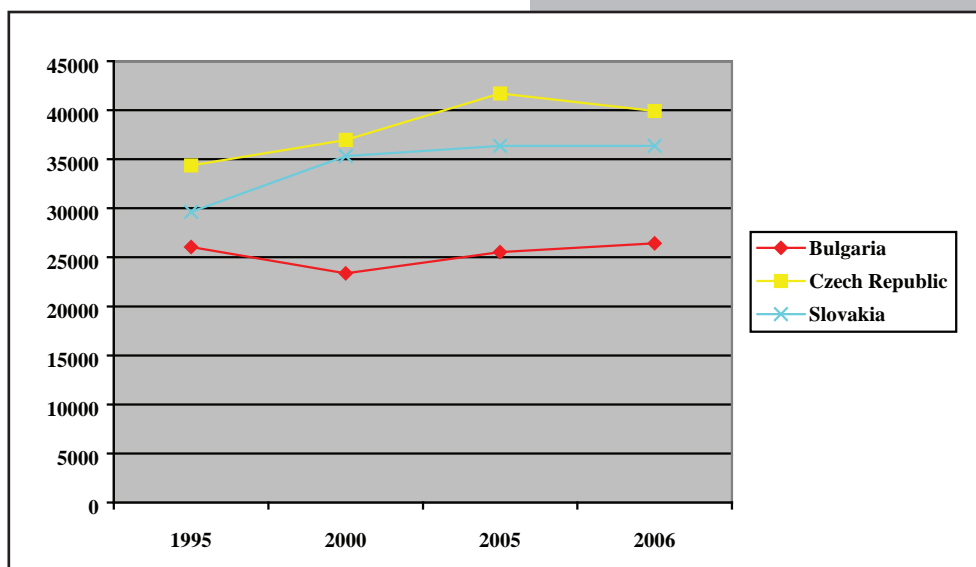
In the same time it must be pointed out that the tendency for shortening the length of stay (which is connected with the number of discharges for a certain period) especially when it is led by economic reasons could reflect negatively on the fully recovering of the patient. In

**Figure 4.** Psychiatric departments in general hospitals



**Фигура 5.** Брой на изписванията в психиатричните болници

**Figure 5.** Number of discharges in psychiatric hospitals



### 3.3. Доставчици: собственост и географско разпределение

В България психиатричните болници са 100% собственост на държавата. Съществуват също така извънболнични заведения, свързани с психосоциална рехабилитация, под ръководството на Министерството на труда и социалната политика – дневни центрове за обгрижване, защитени домове, хосписи и т.н. Някои от тези дейности се ръководят от неправителствени организации и имат обществено-частен характер. Това е направено чрез делегиране на функциите на дадена неправителствена организация от страна на общините или от частни структури, финансирани от дарители.

any case it must be supported with developed network of services for psychosocial rehabilitation in the community. For Bulgaria the data show less dynamics compared with other two countries. One explanation could be the possible quantitative character of the reforms rather than intensification of the care.

### 3.3. Providers: ownership and geographical distribution.

The mental health hospitals in Bulgaria are 100% State ownership. The outpatient mental health facilities are

Съществуват проблеми с достъпа до здравните служби, специално в отдалечените области на страната. Това е валидно и за психично-здравното обслужване, особено за центровете за психично здраве в общността и специализираната помощ. Ограниченият достъп е повече заради географски причини, отколкото поради липса на пари от страна на потребителите. Разпределението на заведенията за психично здраве – болници, психиатрични отделения и диспансери, е неравномерно за цялата страна. Този факт създава проблеми за приемането в тези заведения – понякога те се намират далече от местата за живеене. Няма стриктно определено териториално разпределение на заведенията за психично здраве откакто са започнали основните промени в системата на общественото здравеопазване. Последните намерения на правителството са този режим да се възстанови отново за хората с тежки психични разстройства, следвайки принципа на максимална близост до мястото, където живее потребителя.

Като цяло собствеността на доставчиците на здравно обслужване в Чехия е разделена на обществена (ръководена от Министерство на здравеопазването, областите и общините) и частна (частна с цел облагодетелстване, църквата). Повечето от многопрофилните болници са обществени, притежавани от областите, общините или от правителството. Психиатричните болници са обществени, ръководени от Министерство на здравеопазването. Лекарите са на заплата от работодателя, а повечето практикуващи лекари в извънболничната мрежа работят на частна практика. Мениджмънтът на техните ангажименти се различава в зависимост от тяхното локално местоположение, но повечето лекари от първичната медицинска помощ работят сами. Болниците имат амбулаторни психиатрични отделения с лекари на заплата (12).

Изобщо, географското разпределение не е напълно равномерно, но достъпът до традиционните услуги, като психиатър, болници и психиатрични болници, е добър. Проблемът с географската равнопоставеност е по-добър в новоразработените здравни/социални служби на база общност (консултиране, грижа по домовете, резидентни домове), които все още не се срещат във всички области.

Собствеността на доставчиците на здравно обслужване в Румъния е обществена, частна или обществено-частни партньорства (болници и частни медицински лаборатории). Обществените болници се оценяват и оторизират съгласно закона. Те сключват договори в рамките на системата за здравно осигуряване. Психиатричните болници са обществени, ръководени от Министерството на общественото здравеопазване. Лекарите са на заплата от работодателя. В последните години са открити някои частни болници. Не съществуват заведения за медицинска помощ за пациенти с психични проблеми в общността. Помощ в общността, включително защитените домове, е осигурена главно от неправителствените организации, фондации и религиозни организации. Съществуват някои центрове за дневна помощ и една част (около 10%) от посочените лаборатории за психично здраве осигуряват извънболнично обслужване. Забелязват се географски различия в обслужването в

private and municipal. There are also facilities concerned with psychosocial rehabilitation under the governance of the Ministry of Labor and Social Policy (MLSP) – day care centers, sheltered houses, hospices etc. Some of these services are run by NGO's and have public-private character. It is done through delegation of the functions to an NGO by municipalities or by private enterprise financed by donors.

There are problems with the access to the health care facilities especially in the remote areas in the country. It is valid as well for the mental health services especially community based mental health centers and specialized care. The restricted access is mostly because of geographical reasons than because of lack of money on behalf of the consumers. The distribution of the mental health facilities – hospitals, psychiatric wards and dispensaries is uneven across the country. This fact creates problems for admissions – sometimes away from the living area. There is no strictly defined catchment area for mental health services since the major changes in the general health care system. The last intentions of the government are to re-establish this regime again for the people with severe mental disorders following the principle of maximum closeness to the living area of the consumer.

Generally, ownership of health care providers in Czech Republic is divided into publicly owned (run by the health ministry, regions, and municipalities) and privately owned (private-for-profit, church). Majority of general hospitals is public, owned by regions or municipalities or by the national government. Psychiatric hospitals are public, run by the ministry of health. Physicians are salaried employees. Practitioners in outpatient services are mostly private. Their management arrangements differ depending on their local situation but most primary health care physicians work alone. Hospitals have outpatient psychiatric departments with salaried physicians (12).

In general, some geographical distribution is not totally equal, but access to traditional service as psychiatrist, hospitals and psychiatric hospitals is good. The problem with geographical equity is more in newly developed health/social community services (counseling, home care, residential homes) that are not available yet in all areas.

Ownership of health care providers in Romania can be public, private or public-private partnerships (hospitals and private medical laboratories). Public hospitals are evaluated and authorized according to the law. They conclude contracts in the framework of the social health insurance system. Psychiatric hospitals are public, run by the ministry of public health. Physicians are salaried employees. In the last years some private hospitals have been developed. There are no community care facilities for patients with mental disorders. Community based care including sheltered homes is mainly provided by

общността (някои области нямат извънболнични служби) и координацията между службите е ограничена. През 2003 г. стартира програма за осигуряване на помощ по домовете за възрастни хора с психични разстройства и деменция (13).

Най-общо казано, собствеността на доставчиците на здравно обслужване в Словакия е разделена на публична [ръководена от министрите (най-много от Министерство на здравеопазването, след това Министерство на отбраната, Министерство на вътрешните работи, Министерство на образованието), областите или общините] и частна (частни търговски дружества, църквата, неправителствените организации). Повечето от многопрофилните болници са обществени, притежание на областните или общински управители или на правителството (Министерство на здравеопазването, Министерство на образованието и Министерство на отбраната). Психиатричните болници са както обществени (управлявани от Министерство на здравеопазването), така и частни (неправителствени, частни търговски дружества). Лекарите са на заплата, давана от работодателя им. Повечето общопрактикуващи лекари в извънболничните служби работят частно. Мениджмънтът на техните ангажименти се различава в зависимост от тяхното местоположение, но повечето лекари в първичната здравна помощ работят сами. Болниците имат амбулаторни отделения; в този случай лекарите са на заплата от работодателя (14,15).

#### 4. Заключение

Психично-здравното обслужване в четирите разглеждани страни си прилича, но също така притежава и съществени разлики. Установените сходства са повече в исторически план, както и относително влиянието на модерните психиатрични модели, въведени в Европа. Във всички страни, макар и в различна степен, е приет новият подход за психично-здравно обслужване в общността, вместо стария институционален модел. Стартиран е процес на намаляване на болничните легла, по-добро използване на съществуващите служби и ресурси и интеграция на психиатричната болнична помощ в общата здравна мрежа. Съвместителството в собствеността, особено на извънболничната помощ, е друг важен знак за такова позитивно развитие.

Различията идват от различното ниво на икономическо, културно и политическо развитие като стартираща точка на реформата. Неравномерното разпределение на службите за предоставяне на психично-здравни услуги е малко изненадващо, имайки предвид стария модел "Семашко" за общата здравна мрежа, приет повече или по-малко от всичките четири страни, в който географският подход е водещ. Това разминаване може да произтича от основната философия на психично-здравното обслужване, приета по време на тоталитарното минало – централизирана, изолирана и институционална помощ, особено за тежките психични разстройства.

Важно заключение, което може да се направи, е, че няма подходяща информация за страните, на базата на която да се изготви валидна оценка. Данните, свързани с разпределение

the NGOs, foundations and religious organizations. Some day care centers are available and a proportion (around 10%) of designated mental health laboratories provides ambulatory services. Geographical disparities in community services are marked (some counties do not have any outpatient facilities) and coordination between services is limited. In 2003 a programme to provide domiciliary care to elderly with mental disorders and dementia was started (13).

The situation regarding the ownership of health care providers in Slovakia has no differences from the Czech Republic. It also divided into public (Ministry of Health – majority, then Ministry of Defense, Ministry of Interior, Ministry of Education, regions, or municipalities) and privately owned (private-for-profit, church, NGOs). Majority of general hospitals is public, owned by regions or municipalities or by the national government (Ministry of Health, Ministry of Education, and Ministry of Defense). Psychiatric hospitals are both public (run by the Ministry of Health) and private (NGOs, private-for-profit). Physicians are salaried employees. Practitioners in outpatient services are mostly private. Their management arrangements also differ depending on their local situation but most primary health care physicians work alone. Hospitals have outpatient departments; in this case physicians are salaried (14, 15).

#### 4. Conclusion

The mental health services in four countries have similarities as well substantial differentiations. Commonalities are identified mostly with the historic background as well as the influence of the modern psychiatric models established across Europe. All the countries have accepted, although with varying extent, the new approach toward community-based mental health services, instead of the old institutional model. All the four countries started a process of reduction of the hospital beds, better utilization of the existing facilities and resources and integration of the inpatient mental health care into the general health care. The pluralism in the ownership, especially in the outpatient care is another important sign for such a positive development.

The diversities come from the different level of economic, cultural and political development as a starting point for the reform. The uneven distribution of the mental health facilities is a bit surprising having in mind the old "Semashko" model for general health care adopted more or less by all the four countries, where the geographical approach is leading. The possible explanation for that unevenness could be rooted in the basic philosophy for mental health services adopted during the totalitarian past – centralized, isolating, and institutional care particularly for severe mental disorders.

One important conclusion that could be made is the availability of appropriate information for the countries, on the base of which valid assessment could be made. Data related with sex distribution, access to care, utilization of

по пол, достъп до здравна помощ, използване на услугите или различни видове извънболнични заведения, липсват за повечето страни. Тази празнота в информацията е сериозно предизвикателство за бъдещи изследвания. Необходими са както общи методи на достигане до нужната информация, така и индикатори за оценка на процеса.

the services or different types of outpatient facilities is missing for most of the countries. This information gap is a serious challenge for future investigations in this field. Common methods of acquiring information as well as indicators for assessment of the process are needed.

## Книгопис / References

1. Knapp M, McDavid D, Mossialos E and Thornicroft G (eds). *Mental health policy and practice across Europe: The future direction of mental health care*. Open University Press; 2006.
2. WHO Regional office for Europe. *Policies and practices for mental health in Europe*. WHO Regional office for Europe; 2008
3. Jacob KS, Sharan P, Mirza I, Garrido-Cumbrera M, Seedat S, Mari JJ, Sreenivas V, Saxena S. *Mental health system in countries: where are we now?* *Lancet* 2007; 370: 1061-1077.
4. Johnston T. *Supporting a healthy transition. Lessons from early World Bank experience in eastern Europe*. Washington DC, World Bank Operations Evaluation Department, 2002, [http://www.worldbank.org/oed/transitioneconomics/docs/eca\\_health\\_wp.pdf](http://www.worldbank.org/oed/transitioneconomics/docs/eca_health_wp.pdf)
5. Vlădescu C, Scintee G, Olsavszky V, Allin S and Mladovsky P. *Romania: Health system review. Health Systems in Transition*, 2008; 10(3): 1-172. <http://www.euro.who.int/Document/E91689.pdf>
6. Dlouhý M. *Mental health care system and mental health care expenditures in the Czech Republic. The Journal of Mental Health Policy and Economics* 2004; 7: 159-165.
7. National Health Information Center. *Psychiatric Care in the Slovak Republic 2007*. National Health Information Center: Bratislava; 2008.
8. Tomov T, Mladenova M., Lazarova I., Sotirov V., Okoliyski M. *Bulgaria mental health country profile. International Review of Psychiatry* 2004; 16: 93-106.
9. National Center of Health Information. *Health care, brief statistical manual*. National Center of Health Information: Sofia; 2008.
10. Romanian Ministry of Public Health. *Statistical data*. Bucharest, Ministry of Public Health Computing Centre of Health Statistics and Medical Documentation; 2006.
11. Scheffler RM & Potůček M. (eds). *Mental Health Care Reform in the Czech and Slovak Republics, 1989 to the Present*. Karolinum Press: Prague; 2008.
12. Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic. *Psychiatric Care 2007*. Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic: Prague; 2008.
13. Commission of the European Communities. *Commission staff working document 596: Romania May 2006 monitoring report*. Brussels, European Commission, 2006. [http://ec.europa.eu/enlargement/pdf/key\\_documents/2006/monitoring\\_report\\_ro\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/enlargement/pdf/key_documents/2006/monitoring_report_ro_en.pdf)
14. World Health Organization, *Mental Health in Europe. Country reports from the WHO European Network on Mental Health, 2001*. Geneva, World Health Organization, 2001. <http://www.euro.who.int/document/E76230.pdf>
15. World Health Organization. *ATLAS: country profiles, 2001*. Geneva, World Health Organization, Department of Mental Health and Substance Dependence, 2001. [http://www.who.int/mental\\_health](http://www.who.int/mental_health)

### Адрес за кореспонденция:

Д-р Христо Хинков  
 Национален център по опазване на общественото здраве  
 София, бул. "Акад. Иван Гешов" № 15  
 Тел.: 8056331  
 E-mail: mhproject@mbox.contact.bg

### Address for correspondence:

Hristo Hinkov, MD  
 National Center of Public Health Protection  
 15, Blvd „Akad. Ivan Evst. Geshov”, Sofia 1431  
 Tel: +359 2/ 8056 331  
 Email: mhproject@mbox.contact.bg

## НАУЧНООБОСНОВАНИ КРИТЕРИИ ЗА ФОРМУЛИРАНЕ НА ХРАНИТЕЛНИ ПРЕПОРЪКИ ЗА ПОПУЛАЦИЯТА В НАПРЕДНАЛА И СТАРЧЕСКА ВЪЗРАСТ В БЪЛГАРИЯ

Стефка Петрова, Констанца Ангелова

Национален център по опазване на общественото здраве

### Резюме

Атрибутивни фактори за глобалното покачване на средната възраст на популационно ниво се явяват демографските тенденции на експоненциално нарастване на относителния дял на старите хора в света и статистически значимото увеличение на продължителността на живота. Международният план за действие на ООН приема с приоритет политиката на промоция на здравето и превенция на заболяванията като ключов фактор за здравословно стареене с активен начин на живот. Аргументирани са научнообосновани критерии, включващи възрастово-свързаните промени в метаболитния, физиологичния и антропометричен статус, както и хранителните детерминанти в превенцията на хроничните заболявания. Формулиране на препоръките за здравословно хранене в рамката на биологичните процеси на постепенна загуба на костна минерална плътност, саркопения, редукция на основната метаболитна скорост, по-нисък аеробен капацитет и препоръки за редукция на риска при наличие на високо артериално налягане, дислипидемия, инсулинова резистентност, остеопороза – съставляват елементите на здравната стратегия за развитие на здравословен избор на храни и добро качество на живот. Представени са специфичният хранителен модел, преведен в нутриентен профил и антропометричният статус на популацията в напреднала и старческа възраст в България.

**Ключови думи:** стари хора, саркопения, преразпределение на мастна маса, антропометричен статус, хранителен модел, нутриентен профил, препоръки за здравословно хранене.

### Въведение

Атрибутивни фактори за глобалното покачване на средната възраст на популационно ниво се явяват демографските тенденции на експоненциално нарастване на относителния дял на старите хора в света и статистически значимото увеличение на продължителността на живота (1). Отделът "Популации" към ООН определя застаряването на популационно ниво като най-отчетливото и безпрецедентно демографско събитие от последните десетилетия, с отражение върху икономическата област, социалната сфера и здравния статус на обществото (2). Демографският профил на пирамидата на възрастовата структура на населението в света показва устойчива тенденция на промяна към непрекъснато

## SCIENCE-BASED CRITERIA FOR FORMULATING OF DIETARY RECOMMENDATIONS FOR ELDERLY POPULATION IN BULGARIA

Stefka Petrova, Konstanza Angelova

National Center of Public Health Protection

### Abstract

The global ageing of the population is attributed to demographic trends of exponentially increasing fraction of elderly in the world and the progression of life-expectancy. United Nations' International Plan of Action adopted with priority the policy of health promotion and disease prevention as a key factor of healthy and active ageing. Science-based criteria including age-related changes in metabolic, physiological and anthropometric status, as well as nutritional implications in the prevention of chronic diseases are considered. The formulation of food-based dietary guidelines in the frame of biological processes of gradual loss in bone density, sarcopenia, reduction of BMR, lower aerobic capacity and recommendations for risk reduction in case of high blood pressure, dyslipidemia, insulin resistance, osteoporosis - constitute the elements of public health strategy for developing healthy food choice and positive quality of life. The specific dietary pattern, translated in nutrient profiles and the anthropometric status of Bulgarian elderly population are presented.

**Key words:** Elderly, sarcopenia, fat mass redistribution, anthropometric status, dietary pattern, nutrient profile, FBDG.

### Introduction

The global ageing of the population is attributed to demographic trends of exponentially increasing fraction of elderly in the world and the progression of life-expectancy (1). United Nations Population Division (UN) determines the population ageing as the most distinctive unprecedented demographic event of the last decades, with implications in economic area, social sphere and health status of the society (2). The demographic profile of the world age-structure pyramid is steadily changing with continuing rising of the proportion of older populations (over 60 years) – 8% in 1950, 10% in 2000, 11% in 2009 and projecting to reach 22% in 2050 (2,3,4). In developed countries this process is more pronounced and currently in Europe elderly segment represent around 20% of the total population, in Bulgaria – 24.2%; median age for Europe is 40 years, for Bulgaria is 41.5 years, while for the world it is at the level of 28 years (3).

увеличение на общия относителен дял на популацията в напреднала и старческа възраст (над 60 и над 75 години) – 8% през 1950 г., 10% през 2000 г., 11% през 2009 г. и прогнозна стойност, достигаща 22% през 2050 г. (2,3,4). Този процес е по-ясно изразен в развитите страни и понастоящем в Европа сегментът на старите хора представлява около 20% от общата популация, за България – 24.2%. Медианата на възрастта за Европа е 40 години, за България е 41.5 години, докато за света медианата е на нивото 28 години (3).

Намалението на адаптационните възможности на организма – основна характеристика на стареенето, заедно с физиологичното и психично застаряване повлияват хранителния модел, който става по-нестабилен с предиспозиция към дефицитен или ексцесивен хранителен прием. Тези промени в храненето от своя страна повлияват процеса на стареене и здраве (1). Демографският преход към нарастване на възрастта в обществото и “епидемиологичният преход” към превалиране на т.нар. “болести на цивилизацията”, представляват водещи фактори за високата честота на хроничните неинфекциозни заболявания в напреднала възраст. Политиката на промоция на здравето и превенция на заболяванията, с поддържане на здравословно хранене и активен начин на живот, се явяват ключовите фактори за здравословно стареене.

На Втората световна асамблея на ООН по въпросите на стареенето, през 2002 година, бяха приети Политическа декларация и Международен план за действие в областта на процесите на стареене, с приоритет промоция на здравето в напреднала възраст и подчертаване на значението на научните изследвания като важен инструмент за разработването на политики на базата на надеждни и хармонизирани критерии (5).

## Дефиниции

Международната консултативна група по хранителна енергия (IDECG) счита, че стареенето представлява процес, а не болест (6). Експериментални изследвания при модели на прогерия (генетично детерминирано ускорено стареене) и модели на отлагане процеса на стареене чрез енергийна рестрикция, позволяват да се диференцира биологичната възраст от хронологичната възраст. Намалението на физиологичните функции във възрастта, когато честотата на хроничната заболяемост е увеличена, води до засилване на интериндивидуалната вариабилност сред тази възрастова група (6). Дефиницията на “стари хора” се явява проблематична – СЗО прилага възрастовата граница от 60 години, с цел класификация в областта на общественото здраве, докато ООН, САЩ, Великобритания и Австралия приемат 65 години за граница при категоризиране на старите хора, тъй като тази възраст се приема като традиционна за пенсиониране (1,2,6,7). В процеса на стареене, ООН диференцира още една популационна група в демографския профил на популацията от стари хора – тези над 80-годишна възраст, т.нар. “най-стари стари хора” (‘oldest-old’), (2). Лонгитудинални изследвания, които намират, че много физиологични параметри остават относително на постоянно

The basic postulates concerning aging and its nutritional implications comprise limited adaptation with convening physiological and psychological senescence, which induce less stable nutritional status with predisposition to deficiencies or excesses, determining per se the process of aging and health (1). Demographic transition of community to age progression and ‘epidemiological transition’ to predominance of diseases of affluence are leading factors to preponderance of chronic diseases in advanced age. The policy of health promotion and disease prevention for maintaining healthy eating and active lifestyle is the key factor of healthy ageing.

At the 2<sup>nd</sup> World Assembly of UN on ageing 2002, a Political Declaration and an International Plan of Action on Ageing were adopted with priority of health promotion into old age, emphasizing also the importance of research as an important instrument for developing policies, based on reliable and harmonized criteria (5).

## Definitions

The International Dietary Energy Consultative Group (IDECG) considers that ageing or senescence is a process, but not a disease (6). Experimental studies like models of progeria or models of delaying the ageing process by energy restriction, dissociate biological ageing from chronological ageing. Diminution of physiological functions in a stage when incidence of chronic diseases is increased, results in widening the interindividual variability among age-cohort (6). Definitions of ‘old age’ or ‘elderly’ is problematic – WHO applies cut-off limit of 60 years for public health classification while United Nations, US, UK and Australia, established 65 years for classification of older people as traditional age of retirement (1,2,6,7). In progression of the ageing process UN differentiate another population group in demographic profile of older population – 80 years and older – the ‘oldest-old’ (2). Longitudinal studies, finding that many physiological parameters remain relatively constant and show a decline at around 70-75 years, induce other suggestions for approximate classification of elderly as ‘young elderly’ – 65-75 years and ‘old elderly’ >75 years (8).

## Metabolic and physiological considerations

IDECG emphasizes that 60-65 years could not be identified as an age-range at which energy and protein metabolism could influence human requirements (6). IDECG considerations on energy requirements of the elderly are based on studies performed on healthy elderly in developed countries – emphasizing the necessity of distinguish between the normal process of ageing from the process of ageing with co-existing disease (9). Statements for elderly include maintenance of energy balance, PAL

ниво и започват да намаляват при възрастта около 70-75 години, водят до предложения за приемане на приблизителна класификация при тази популация на “напреднала възраст” (‘young elderly’) – 65-75 години и “старческа възраст” (‘old elderly’) – над 75 години (8).

### Метаболитни и физиологични критерии

Международната консултативна група по хранителна енергия (IDECG) подчертава, че интервалът 60-65 години не би могъл да бъде приет като възрастов интервал, при който енергийният и белтъчен метаболизъм повлияват съответните потребности за прием (6). Съображенията на IDECG за енергийни потребности при стари хора се базират на изследвания, проведени върху здрави хора в напреднала и старческа възраст от развитите страни, при което се подчертава необходимостта от диференциране на нормалния процес на стареене от процеса на стареене със съпътстващо заболяване (9). Научните становища за енергийния метаболизъм при стари хора включват поддържане на енергиен баланс, диференциране на системата за оценка на нивото на физическата активност (PAL) във възрастовите интервали 65-75, 76-85 и >85 години, препоръки за граници на вариабилност на PAL при здрави стари хора 1.5-1.8, със средно ниво 1.65, а при съпътстваща болестност – вариращ тотален енергоразход (TEE) от 1.1 до PAL 1.6 (9). Измерванията на основната метаболитна скорост (BMR) при трансверзални проучвания водят до надценяване на степента на редуция на BMR, докато лонгитудиналните наблюдения показват, че спадането на основната обмяна, свързано с напредване на възрастта, представлява само 1-2% на декада във възрастовия интервал от 20 до 70 години (8). Необходимо е да се има предвид, че хроничните заболявания могат да повлияят енергийния метаболизъм и при някои условия BMR може да бъде повишена (напр. възпаление) (10). Тъй като физическата активност представлява най-силно вариабилният компонент на енергоразхода и оттам – важна детерминанта на енергийните потребности, по-възрастните индивиди с хронични заболявания показват значително по-ниски енергийни потребности, поради по-ниските нива на физическа активност (11). Научни изследвания показват, че стареенето е свързано с нарушаване на процеса на регулация на хранителния прием, което води до увеличаване на риска от развитие на негативен енергиен баланс, недохранване, загуба на телесно тегло и увеличен риск от микронутриентни дефицити със спадане на физическата активност (12).

Проблемна област по отношение на белтъчния прием при стари хора се явява саркопенията и загубата на белтъци (13), но проучванията не предоставят убедителни доказателства за наличие на различни белтъчни потребности при стари хора, в сравнение с тези в зряла възраст (14). Заключениеята на базата на изследване на азотен баланс и мета-анализи показват съществуване на граница на безопасен прием, не по-нисък от 0.75 g протеин на kg телесна маса дневно за стари хора (14). Фактори като инфекция (при инволюция на тимус и нарушена регулация на имунната система) и травма (загуба на костна маса), които усилват белтъчния катаболизъм и проявяват тенденция към редуциране на хранителния прием, увеличават риска от белтъчен дефицит (14, 15). Саркопенията допринася

system differentiation at age ranges 65-75, 76-85 and >85 years, PAL range in healthy elderly 1.5-1.8 with mean level at 1.65, and in coexisting diseases – variable total energy expenditure (TEE) from restricted 1.1 to PAL 1.6 (9). Basal metabolic rate (BMR) measurements in cross-sectional studies give overestimated values for process of declining, while longitudinal studies show that the reduction in BMR attributable to age is only 1-2% per decade over the age range from 20 to 70 years (8). It should be known that chronic diseases may affect energy metabolism and in some conditions BMR is elevated (eg inflammatory conditions), (10). As physical activity is the most variable component of energy expenditure and hence important determinant of energy requirements, older adults with chronic diseases have significantly lower energy requirements than healthy older persons due to lower physical activity levels (11). Investigations show that ageing is associated with impairment in the regulation of food intake, leading to increased risk of negative energy balance, undernutrition, weight loss with increased risk of micronutrient deficiencies and decline in physical function (12).

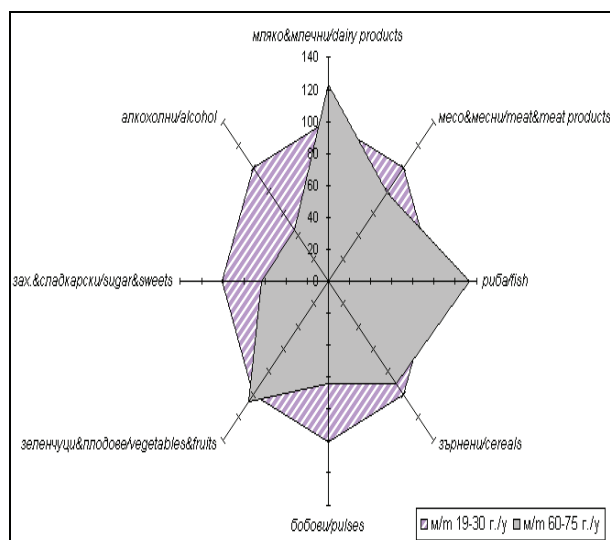
The area of concern in relation to protein nutrition in elderly people is sarcopenia and protein loss (13), but studies do not provide convincing evidence of differing elderly protein requirements from the protein needs of younger adults (14). Conclusions on the base of nitrogen balance studies and meta-analyses show a safe intake limit not lower than 0.75 g protein per kg per day for elderly (14). Factors as infection (with involution of thymus, dysregulation of immune system) and trauma (loss of bone mass) that increase protein catabolism and tend to reduce food intake increase the risk of protein deficiency (14, 15). Sarcopenia contributes to reduced physical activity and lower functional capacity. Age-related reduction of oxidative processes of the metabolically-active tissue appears as probable determinant of reduced fat oxidation and causal link to increased adiposity (16). In addition, intra-abdominal fat distribution or fat redistribution, loss of lean body mass (fat-free mass) and reduced physical activity are the attributive factors for incidence of declining of glucose tolerance with age (17). It is suggested that the trend of developing of insulin resistance is caused by accumulation of intra-abdominal fat rather than by ageing per se (18).

The specific dietary patterns in Bulgarian elderly population for males and females (Fig. 1), compared to the pattern in young population, show a trend to increase the consumption of fish in males, pulses and cereals in females, milk and dairy products in both groups and corresponding decrease of meat, meat products, sugary products and alcoholic beverages consumption. The

за редуциране на физическата активност и за по-нисък функционален капацитет. Възрастово-свързаното понижаване на оксидативните процеси в метаболитно-активните тъкани се явява като вероятна детерминанта за редуцираната мастна оксидация и причинна връзка за увеличен адипозитет (16). В допълнение, интра-абдоминалното мастно натрупване или мастното преразпределение, загубата на безмастна маса и намалената физическа активност се явяват атрибутивни фактори за понижаването на глюкозния толеранс с възрастта (17). Предполага се, че тенденцията за развитие на инсулинова резистентност се причинява по-скоро от акумулацията на интра-абдоминална мастна маса, отколкото от самия процес на стареене (18).

Хранителният модел на популацията стари хора в България, диференциран за мъже и жени (Фиг. 1), в сравнение с този при млади хора, показва тенденция на покачване консумацията на риба при мъжете, варива и зърнени храни при жените, мляко и млечни продукти при двата пола, със съответно намаление на приема на месо и месни продукти, захарни изделия и консумация на алкохолни напитки. Превръщането на хранителния модел в нутриентен профил разкрива тенденция за микронутриентен дефицитен прием – на тиамин и фолат по отношение на В-витамините и на калций за минералите (Фиг. 2), независимо че националното проучване на хранителния статус в България се явява по дизайн трансверзално изследване (19,20).

**A**



**Фиг. 1.** Сравнителен хранителен модел на населението в зряла възраст, 19-30 г., (100%) и в напреднала възраст, 60-75 г., Национално проучване на храненето, 2004 г. **A.** мъжки пол; **B.** женски пол.

**Антропометричен статус**

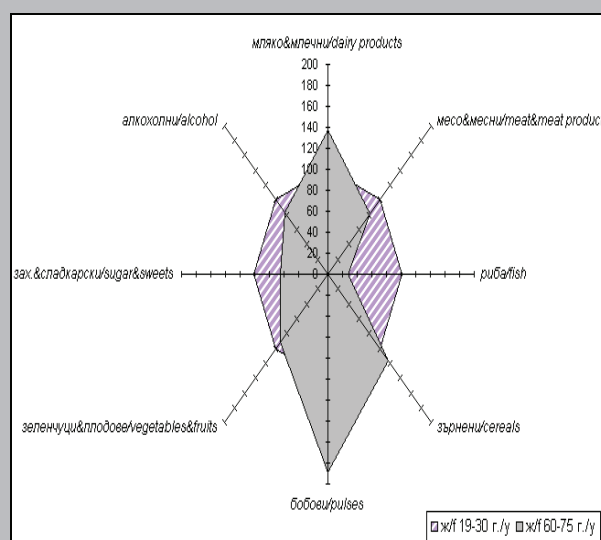
Оценката на промените в телесния състав, свързани с възрастта, представлява фундаментален проблем при изследване на биологичните процеси на стареенето (21). Важни аспекти при научните проучвания на стареенето се явяват количественото определяне на масата на енергийните депа, метаболитно-активните компартименти, безмастната

translation of dietary pattern into nutrient profiles reveals a trend to micronutrient deficient intakes – thiamin and antimetabolite folate for B-vitamins and calcium for minerals (Fig. 2), nevertheless that the National Dietary and Nutritional Status survey in Bulgaria is a cross-sectional study (19,20).

**Anthropometric status**

Evaluating the age-related changes in body composition is fundamental to the study of biology of ageing (21). Important aspects of ageing research are quantifying the mass of energy stores, metabolically active compartments, fat-free body mass, fat mass redistribution etc. Ageing is associated with alterations in body fat with important implications in health – through middle age body fat levels increase with impact on morbidity, while over the age of 65-70 years body fat decreases even in healthy persons (12). Sophisticated methods such as neutron activation analysis, magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT), dual-energy X-ray absorptiometry (DXA), represent reference methods for quantifying intra-abdominal (visceral) adipose tissue, bone mineral density, skeletal muscle mass, fat-free body mass (FFM) and hence total body fat (Body weight – FFM). These methods constitute the formative basis in body

**B**

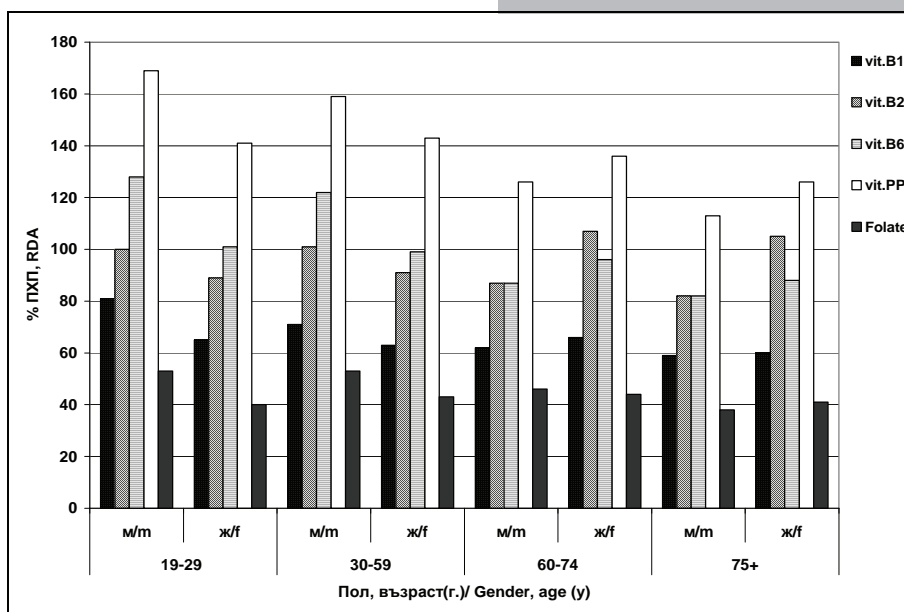


**Fig. 1.** Comparative dietary pattern of adults 19-30 y, (100%) and elderly 60-75 y, National nutrition surveys, 2004. **A.** Males; **B.** Females.

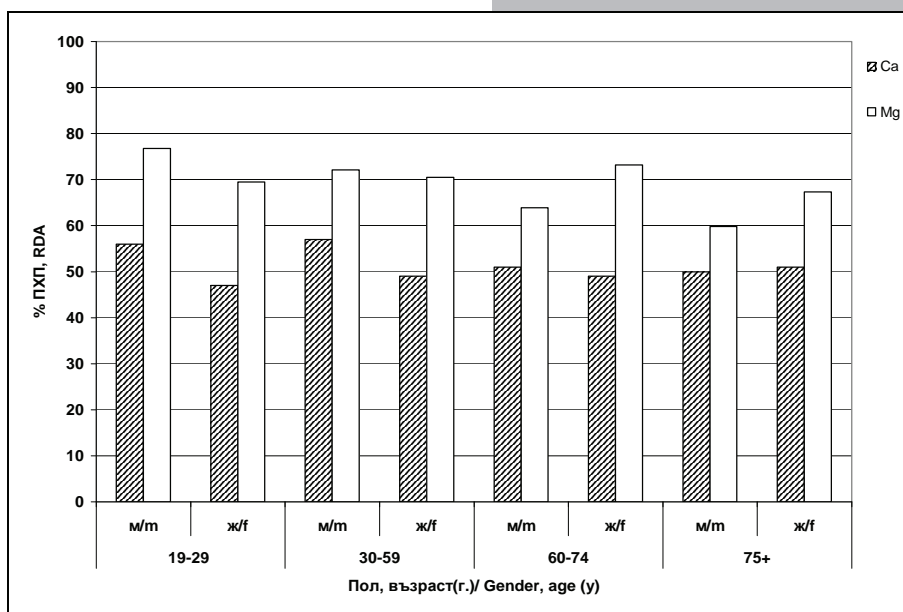
composition prediction models, which are developed by using multiple regression analysis (21).

Anthropometric descriptive methods, based on prediction models of body composition, apply somatic measurements for evaluation of body fat and assessment of health risk.

A



B



Фиг. 2. А. Прием на витамини от група В (тиамин, рибофлавин, витамин В6, ниацин и фолат), (% препоръчителен хранителен прием, ПХП) за възрастното население в България, Национално проучване на храненето, 2004 г. В. Прием на калций и магнезий (% препоръчителен хранителен прием, ПХП) за възрастното население в България, Национално проучване на храненето, 2004 г.

Fig. 2. A. Intake of B-vitamins (thiamine, riboflavin, vitamin B6, niacin, folate), (% RDA) in Bulgarian population, National nutrition surveys, 2004. B. Intake of calcium and magnesium (% RDA) in Bulgarian population, National nutrition surveys, 2004.

телесна маса, преразпределението на мастната маса и т.н. Стареенето се свързва с промени в телесната мастна маса с отражение върху здравния статус – с настъпване на средната възраст нивата на мастната маса нарастват с повлияване на заболяемостта, докато след възрастта 65-70 години мастната маса намалява, дори и при здрави индивиди (12). Високотехнологични методи като неутронен активационен анализ, ядрен магнитен резонанс (MRI), компютърна томография, двойно-енергийно-лъчева абсорбциометрия (DXA), представляват референтните методи за количествено определяне на интра-абдоминалната (висцерална) мастна

Body composition changes with senescence, physical activity or nutritional status, and stable body weight for short period represents ‘steady state’ of body composition and compartment relationship. Hydration, estimated as total body water (TBW) of fat-free body mass is established as stable ratio:  $TBW / FFM = \sim 0.73$ , but FFM hydration is function of age and declines with senescence (9). Body weight is not an adequate measure of adiposity so the calculation of Body Mass Index (BMI) presents a crude approximation of adiposity and

тъкан, костната минерална плътност, скелетната мускулна маса, безмастната телесна маса и оттам, съответно тоталната мастна маса (телесно тегло минус безмастната телесна маса = тотална мастна маса). Тези методи са в основата на прогностичните модели на състава на човешкото тяло, разработени на базата на множествения регресионен анализ (21).

Описателните антропометрични методи, основани от своя страна на прогностичните модели, прилагат измервания за оценка на телесната мастна маса и оценка на здравния риск. Телесният състав се променя при стареене, при промяна на физическата активност или при изменение на хранителния статус. Стабилно телесно тегло за кратък период от време представлява "стационарно състояние" на телесния състав и съотношението на телесните компартименти. Степента на хидратация, оценена като тотална телесна вода (TBW) на безмастната телесна маса (FFM), се установява като стабилно отношение:  $TBW / FFM = \sim 0.73$ , но хидратацията на безмастната телесна маса представлява функция на възрастта и намалява в процеса на стареене (9). Телесното тегло не е адекватен показател на адипозитета, така че изчисляването на индекса на телесна маса (ИТМ) представлява приблизителен биомаркер за адипозитета, но се използва при епидемиологични проучвания за оценка степента на здравния риск (22). Трансверзални епидемиологични изследвания показват, че разпространението на затлъстяването, оценено чрез ИТМ ( $>30 \text{ kg.m}^2$ ), намалява след възрастта 65 години. Вероятното обяснение се търси в селективната преживяемост, кохортния ефект или реалната загуба на тегло (23). Интра-абдоминалното преразпределение на мастната маса предполага, че ексцесивни мастни депа не са редки при стари хора и съответно ИТМ не представлява адекватен индикатор за телесен състав при популацията в напреднала и старческа възраст. Освен това, U-видната крива на зависимостта между ИТМ и общата смъртност става по-слабо изразена в напреднала възраст. В противоположния край на скалата на тази зависимост, ниският ИТМ и загубата на тегло, така както и колебанията на телесната маса при стари хора, представляват силни прогнозни фактори на последваща смъртност (23). За разлика от млада възраст, загубата на тегло при стари хора отразява преди всичко редукция на безмастна маса (напр. саркопения) и стабилността на телесната маса е от важно значение за здравния статус на старите хора. Ето защо, препоръки за намаляване на теглото при популацията на старите хора могат да създадат риск за здравето (23). Спонтанната загуба на тегло е индикативна за скрита болестност и се свързва с увеличена заболяемост и смъртност (24,25).

Препоръчителният интервал на ИТМ за стари хора е повишен в сравнение с оптималния интервал на ИТМ за популацията в зряла възраст (23). От друга страна, ИТМ естествено се покачва с напредване на възрастта, което се свързва с намаляване на ръста (26). При лонгитудинално 25-годишно проучване при популация на възраст от 70 до 95 години се наблюдава средно намаление на ръста от 4 и 4.9 cm, съответно за мъжки и женски пол (27). Някои автори намират, че ИТМ е в обратна зависимост и е предиктор на общата смъртност

WHO recommends cut-off points associated with risk gradient related to obesity (22). Epidemiological cross-sectional studies show after the age 65 years, a decreased prevalence of high body mass and obesity assessed by BMI ( $>30 \text{ kg.m}^2$ ). The suggested probable explanations are selective survival, cohort-effect, or loss of weight (23). The intra-abdominal fat redistribution implies that excess fat storage is not uncommon in elderly and so BMI is not an adequate indicator of body composition in senescence. In addition, U-shaped relationship between BMI and all-cause mortality becomes less pronounced and attenuates in advanced age. At the opposite end of the scale low BMI and weight loss, as well as weight fluctuations in the elderly represent strong predictors of subsequent mortality (23). In contrast to the young people, weight loss in elderly reflect predominantly reduction of lean body mass (eg sarcopenia), so weight stability is of great importance and it is hazardous to recommend intentional weight loss in elderly population (23). Unintentional weight loss is indicative of underlying disease and is associated with increased morbidity and mortality (24,25).

Acceptable range of BMI for elderly is elevated in comparison with the optimal range of BMI for adult population (23). On the other hand BMI naturally increases with advanced age associated with the reduced height (26). A 25-year longitudinal study of a population aged 70 to 95 years observed 4 and 4.9 cm mean height decreases in males and females respectively (27). Some authors find that BMI inversely predicted overall and cancer mortality only in men (28). Other investigators in a 15 years longitudinal population study of 2628 subjects 70 years old, estimate that relative risk (RR) for 15 years mortality is highest in the lowest BMI quintile of males and females and so low BMI and weight loss are risk factors for mortality. BMI ranges with lowest mortality are  $27\text{-}29 \text{ kg.m}^2$  for males and  $25\text{-}27 \text{ kg.m}^2$  for females (29). So, the role of BMI as a factor influencing longevity of the elderly population is still under discussion.

In Bulgaria, National Dietary and Nutritional Status survey reveals a high prevalence of overweight and obesity, assessed by BMI, among elderly (Fig. 3), (19,20), nevertheless that BMI gives approximation of adiposity and it is not useful indicator in elderly (30).

### Nutritional implications in the prevention of diet-related chronic diseases

The importance of diet and nutrition as determinants of chronic non-communicable diseases and their role in preventive policy are well established (22,31). WHO emphasizes that chronic diseases - cardiovascular diseases, cancer, obesity, diabetes type 2, osteoporosis and dental diseases dominate as causal factors for morbidity (31).

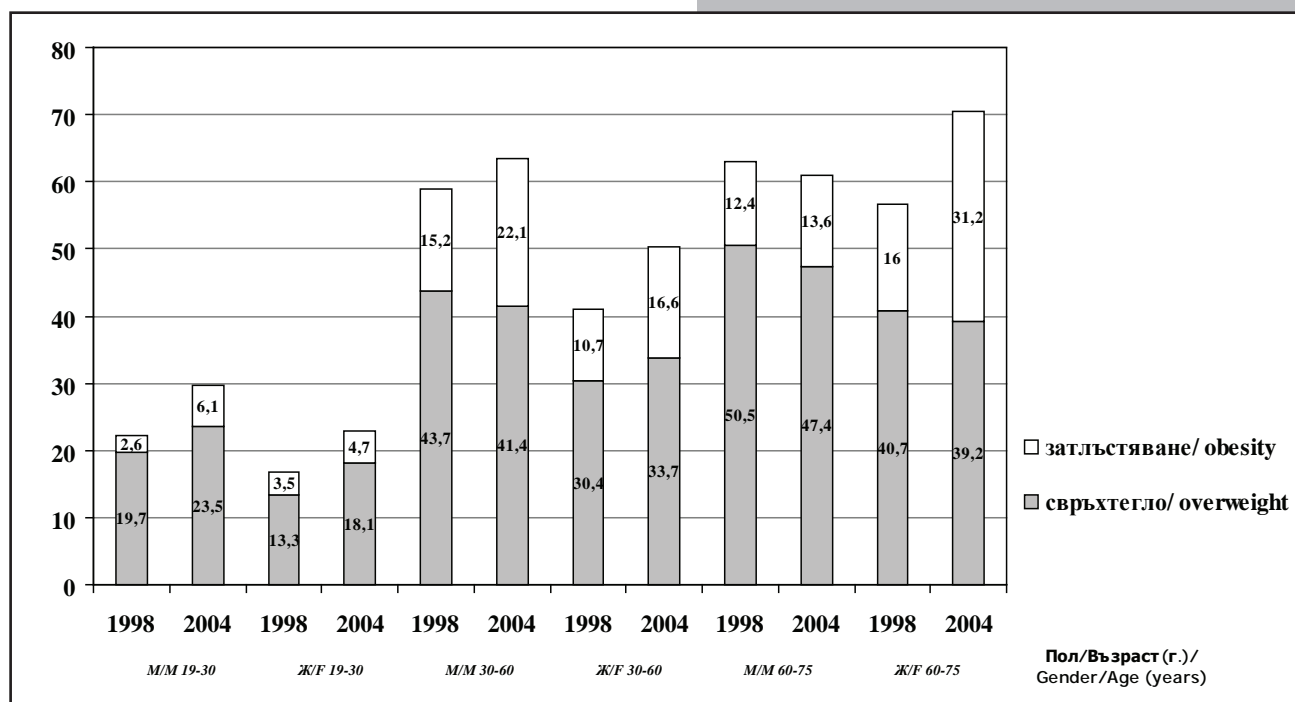
и на смъртността, свързана с раково заболяване, но само при мъжки пол (28). Други изследователи, при 15-годишно лонгитудинално популационно проучване върху 2628 индивиди на 70-годишна възраст, оценявайки относителния риск, свързан с 15-годишен леталитет, намират, че смъртността е най-висока при най-ниския квинтил на ИТМ за двата пола и съответно, ниският ИТМ и загубата на тегло представляват рисков фактори за смъртността. Интервалите на ИТМ, свързани с най-ниска смъртност, се оценяват 27-29 kg.m<sup>-2</sup> за мъжете и 25-27 kg.m<sup>-2</sup> за жените (29). Засега, ролята на ИТМ като фактор със значение за дълголетието при популацията от стари хора, все още подлежи на обсъждане.

В България, националното изследване на хранителния статус разкрива висока честота на свръхтегло и затлъстяване, оценени по ИТМ, при популацията на старите хора (Fig. 3), (19,20), независимо че ИТМ представлява приблизителен индикатор на адипозитета при стари хора и не се препоръчва при тази популация (30).

**Фиг. 3.** Разпространение на свръхтегло и затлъстяване сред популацията в зряла и напреднала възраст - Национално проучване на храненето, 1998 г. и 2004 г.

Coronary heart disease, stroke, certain types of cancer and atherosclerosis are among the leading causes of mortality (31,32). In Bulgaria, prevalence of diet-related chronic diseases expresses analogous tendency like in other developed countries (19,20). Aetiological factors are broadly classified into genetic and environmental (33), and while age, gender and genetic susceptibility in genetically heterogeneous population are non-modifiable risk factors, behavioral risk factors as non-prudent diet and physical inactivity as well as biological factors (dyslipidemia, hypertension, overweight, hyperinsulinaemia) – are modifiable (22). These considerations have implication in the policy of promotion healthy and active ageing (34,35). For the elderly population, an integrated approach of preventive policy towards nutritional deficiencies and chronic diseases should be applied (33).

**Fig.3.** Overweight and obesity prevalence among adults and elderly in Bulgaria - National nutrition surveys, 1998 and 2004.



### Хранене и превенция на хронични заболявания

Значението на хранителния модел и хранителния статус като детерминанти на хроничните неинфекциозни заболявания и ролята им в превантивната политика са добре установени (22,31). СЗО подчертава, че хроничните болести – сърдечносъдови заболявания, рак, затлъстяване, диабет тип 2, остеопороза и зъбен кариес, доминират в общата болестност (31). Ишемичната болест на сърцето, мозъчният инсулт, някои видове рак и атеросклерозата са сред водещите причинни фактори за смъртността (31,32). В България, болестността от хроничните заболявания, свързани с храненето, отбелязва аналогична тенденция с тази в другите развити страни

Some doubts have been existed about primary prevention and benefits of changing dietary and behavioral habits for risk reduction in elderly people, but the acceleration in functional decline caused by external factors is believed to be reversible (22). WHO emphasizes that secondary prevention through diet and physical activity should be a complementary strategy in retarding the progression of existing chronic diseases and decreasing mortality (22). A study of primary prevention in randomized double-blind placebo-controlled prospective trial, on cohort of 39 876

(19,20). Етиологичните фактори се класифицират най-общо като генетични и фактори на околната среда (33). Докато възрастта, полът и генетичната предиспозиция в генетично-хетерогенната популация са немодифицируеми рискови фактори, поведенческите рискови фактори – като нездравословната диета и физическата неактивност, така както и биологичните фактори (дислипидемия, хипертония, свръхтегло, хиперинсулинемия) – са модифицируеми (22). Тези съображения имат значение за политиката на промоция на здравословен и активен начин на живот в процеса на стареене (34,35). При популацията на стари хора е необходимо да се прилага интегриран подход на превенция спрямо хранителните дефицити и хроничните заболявания (33).

Съществуват известни съмнения относно първичната профилактика и благоприятното повлияване при промяна на хранителните и поведенческите навици за намаляване на риска при стари хора, но все пак функционалният спад, причинен от екзогенни фактори, се счита за обратим (22). СЗО подчертава, че вторичната профилактика чрез хранене и физическа активност трябва да бъде допълваща стратегия, с цел забавяне на прогресията на съществуващите хронични болести и намаляване на смъртността (22). Определяне ефекта на първичната профилактика при рандомизирано, двойно-сляпо, плацебо-контролирано, проспективно проучване върху кохорта от 39 876 жени на възраст 45-75+ години, показва обратна връзка между приема на плодове и зеленчуци и сърдечносъдовия риск – нарастването на квинтилите на прием съответства на относителен риск от 0.92 до 0.51 (за екстремните квинтили), с 95% доверителен интервал и статистическа достоверност  $P < 0.01$  (36).

Препоръките за намаляване на риска трябва да се базират на научни доказателства, установени чрез множество рандомизирани контролирани изследвания върху репрезентативни популационни групи, независимо, че този тип доказателства, особено за стари хора, са оскъдни. Целта е да се подобри здравият статус чрез редуция на рисковите фактори, свързани с хроничните болести и да се забави във времето настъпването на тези процеси (32). Световният фонд за научни изследвания на рака (WCRF) и СЗО прилагат критерии, основани на категоризация на риска на базата на силата на научните доказателства за наличие на зависимост между рискови или протективни фактори и настъпващите промени в резултат на съответната експозиция. Концепцията за формулиране на препоръки изисква съществуването на убедителни доказателства и силна степен на взаимовръзка при наличие на правдоподобен биологичен механизъм (22). Хранителните фактори, свързани с риска от хронични заболявания, се явяват на клъстери. Хранителен модел с прием на енергийно-плътни храни, с високо съдържание на мазнини и наситени мастни киселини (мазнини от животински произход), холестерол и добавена захар увеличава здравния риск, докато прием на храни, с висока хранителна плътност, като плодове и зеленчуци, пълнозърнести храни, богати на витамини, минерали и растителни влакнини, намалява здравния риск. Физическата активност също е обект на препоръките за хранене, тъй като енергоразходът, свързан

women, 45-75+ years old, shows inverse association of fruit and vegetable intake with cardiovascular disease risk – increasing quintiles of intake corresponded to relative risk (RR) from 0.92 to 0.51 (for the extreme quintiles) with 95% CI and  $P$  for trend 0.01 (36).

Recommendations for risk reduction should be based on scientific evidence established by multiple randomized controlled trials on representative population groups, nevertheless that this type of evidence and especially on elderly people are scarce. The goal is to improve health, to reduce risk factors related with chronic diseases and to delay the morbidity and mortality associated with such diseases (32). World Cancer Research Fund (WCRF) and WHO apply criteria based on categorizing risk and strength of evidence for established relationship between risk factor / protective factor and outcome of exposure. Convincing evidences for strong association with biological plausibility should be used as conceptual framework in formulating the recommendations (22). Nutritional factors related to chronic disease risk appear in clusters: energy-dense food, high fat and saturated fatty acids (animal fat), cholesterol and added sugar intakes versus nutrient-rich foods, high fruit and vegetables, wholesome cereals, rich in vitamins, minerals and fiber, plant oils – the first dietary pattern increases while the second - decreases health risk. Physical activity, through energy expenditure as an element of energy balance, is also included in recommendations, since the maintenance of body weight is important factor for risk reduction in elderly.

### Public health strategy – formulation of food-based dietary guidelines

Establishing food-based dietary guidelines (FBDG), scientifically formulated upon diet and disease relationship, represents an important step in the development of health policy and promotion of healthy and active lifestyle for elderly. FAO and WHO promoted the notion of providing nutritional advice to the public relevant for different age groups, but a few countries created separate dietary guidelines for different age groups (4,19,37). Dietary guidelines for older Australians apply to healthy people over 65 years old and able to live independently (38). Other authors considering the vulnerability of elderly population group propose a modified food guide pyramid for people over 70 years of age who are relatively healthy and active, living independently and are intended to maintain this status (39). FBDG should be formulated taking into consideration the biological basis of process of ageing per se and the changes caused by extrinsic factors such as dietary pattern, physical activity and lifestyle (40). The specific biological changes of ageing that should be taken into consideration are the gradual loss in bone

с нея е елемент на енергийния баланс и поддържането на телесното тегло, което е важен фактор за намаляване на здравния риск при стари хора.

### **Формулиране на препоръки за здравословно хранене – елемент на здравната стратегия**

Разработването на препоръки за здравословно хранене, под формата на хранителен модел, изграден на базата на научно-доказани взаимна зависимост между хранене, здраве и хронични болести, представлява важен елемент на здравната политика, свързана с промоция на здраве и активен начин на живот при стари хора. ФАО и СЗО изтъкват значението на предоставяне на хранителни препоръки за различни възрастови групи, но твърде малко страни са разработили диференцирани по възраст принципи на здравословно хранене (4,19,37). Формулираните хранителни модели за австралийци в напреднала възраст са насочени към здрави индивиди над 65-годишна възраст (38). Други автори, които отчитат уязвимостта на старите хора, предлагат модифицирана хранителна пирамида за популационната група над 70 години, обхващаща относително здрави и активни индивиди, водещи независим начин на живот и поддържащи този статус (39). Принципите на хранене трябва да бъдат съобразени с биологичните механизми на процесите на стареене и промените, които настъпват под влиянието на екзогенни фактори, като хранителен модел, ниво на физическа активност и стил на живот (40). Специфичните биологични промени, настъпващи с напредване на възрастта, които трябва да бъдат съобразени при разработване на препоръки за хранене при стари хора, включват постепенна загуба на костна минерална плътност, саркопения, понижаване на основната обмяна, понисък аеробен капацитет, загуба на остротата на вкусовото възприемане, тенденция към атрофия на стомашната лигавица и оттам – намалена абсорбция на витамин В12. Необходимо е препоръчителният хранителен модел да цели намаляване на риска при наличие на високо артериално налягане, инсулинова резистентност, дислипидемия, остеопороза. Понижените енергийни потребности валидират модел с прием на храни с висока хранителна плътност, с цел превенция на малнутриция. Препоръките за хранене е необходимо да предоставят и обучителна рамка за създаване на възможност за здравословен хранителен избор и добро качество на живот.

density, sarcopenia, reduction in BMR, lower aerobic capacity, loss of taste acuity and smell acuity, a tendency to gastric atrophy and hence decreased absorption of vitamin B12. The recommended dietary pattern should consider the aim for reduction of risk in case of high blood pressure, insulin resistance, dyslipidemia, osteoporosis. Lower energy requirements imply recommendations for high nutrient-dense dietary pattern in order to prevent malnutrition. FBDG should provide also an educational framework for developing healthy food choice and positive quality of life.

**КНИГОПИС / REFERENCES**

1. Solomons NW. Demographic and nutritional trends among the elderly in developed and developing regions. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54 (Suppl.3): S2-S14.
2. UN. World Population Ageing: 1950-2050. UN publ.No E.02.XIII.3. United Nations DESA, Population Division, New York. 2002.
3. UN. World Population Ageing: 2009. ESA/P/WP/212. United Nations DESA, Population Division, New York. 2009.
4. WHO/Tufts University. Keep fit for life. Meeting the nutritional needs of older persons. Tufts University, School of Nutrition Science and Policy, WHO, Geneva, 2002.
5. UN. Report of the Second World Assembly on Aging. Madrid 8-12 April 2002. A/CONF.197/9. No E.02.IV.4. United Nations, New York 2002.
6. Henry CJK, Ritz P, Roth GS, Lane M, Solomons NW. Report of the IDECG Working Group on the biology of aging. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S157-S159.
7. IOM (Institute of Medicine). The Role of Nutrition in Maintaining Health in the Nation's Elderly. Evaluating Coverage of Nutrition Services for the Medicare Population. National Academy Press, Washington DC, 2000.
8. Henry CJK. Mechanisms of changes in basal metabolism during ageing. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S77-S91.
9. Beaufrre B, Castaneda C, de Groot L, Kurpad A, Roberts S, Tessari P. Report of the IDECG Working Group on energy and macronutrient metabolism and requirements of the elderly. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S162-S163.
10. Elia M, Ritz P, Stubbs RJ. Total energy expenditure in the elderly. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S92-S103.
11. Starling RD, Poehlman ET. Assessment of energy requirements in elderly populations. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S104-S111.
12. Roberts SB. Regulation of energy intake in relation to metabolic state and nutritional status. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S64-S69.
13. Roubenoff R. Sarcopenia and its implications for the elderly. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S40-S47.
14. WHO. Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. TRS 935. WHO, Geneva, 2007.
15. Ritz P. Physiology of aging with respect to gastrointestinal, circulatory and immune system changes and their significance for energy and protein metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S21-S25.
16. Toth MJ, Tchernof A. Lipid metabolism in the elderly. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S121-S125.
17. Elahi D, Muller DC. Carbohydrate metabolism in the elderly. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S112-S120.
18. Beaufrre B, Morio B. Fat and protein redistribution with aging: metabolic considerations. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S48-S53.
19. Petrova S, Angelova K. Food-Based Dietary Guidelines for Bulgarian adults – scientific background for development and formulation. *Advances in Bulgarian Sciences* 2006; 4: 19-33.
20. Министерство на здравеопазването, Национален център по опазване на общественото здраве. Национален план за действие "Храни и хранене 2005-2010". МЗ, НЦОЗ. / Ministry of Health, National Center of Public Health Protection. National Action Plan 'Food and Nutrition 2005-2010'. МН, NCPHP, 2005 (in Bulg.).
21. Heymsfield SB, Nucez C, Testolin C, Gallagher D. Anthropometry and methods of body composition measurement for research and field application in the elderly. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S26-S32.
22. WHO. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. TRS 916. WHO Geneva, 2003.
23. Seidell JC, Visscher TLS. Body weight and weight change and their health implications for the elderly. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S33-S39.
24. Huffman GB. Evaluating and treating unintentional weight loss in the elderly. *American Family Physician*, 2002; 65 (4): 640-650.
25. Miller SL, Wolfe RR. The danger of weight loss in the elderly. *The Journal of Nutrition, Health and Aging* 2008; 12 (7): 487-491.
26. Ritz P. Obesity in the elderly: should we be using new diagnostic criteria? *The Journal of Nutrition, Health and Aging* 2009; 13 (3): 168-169.
27. Dey DK, Rothenberg E, Sundh V, Bosaeus I, Steen B. Height and body weight in the elderly. I. A 25-year longitudinal study of a population aged 70 to 95 years. *European Journal of Clinical Nutrition* 1999; 53: 905-914.
28. Mazza A, Zamboni S, Tikhonoff V, Schiavon L, Pessina AC, Casiglia E. Body Mass Index and mortality in elderly men and women from general population. *Gerontology* 2007; 53 (1): 36-45.
29. Dey DK, Rothenberg E, Sundh V, Bosaeus I, Steen B. Body mass index, weight change and mortality in the elderly. A 15 y longitudinal population study of 70 y olds. *European Journal of Clinical Nutrition* 2001; 55: 482-492.
30. Caterson ID. Overweight and obesity. In: *Essentials of Human Nutrition*. 2<sup>nd</sup> ed. J Mann & AS Truswell (eds). Oxford University Press, 2002; 273-287.
31. WHO. The World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. WHO, Geneva 2002.
32. Wahlqvist ML, Savige GS. Intervention aimed at dietary and lifestyle changes to promote healthy aging. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S148-S156.
33. Woo J. Relationship among diet, physical activity and other lifestyle factors and debilitating diseases in the elderly. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S143-S147.
34. WHO. Active Ageing: A Policy Framework. WHO/NMH/NPH/02.8. WHO NCD & MHC, NCDP & HPD, Ageing and Life Course. Geneva, 2002.
35. WHO. International Plan of Action on Aging: Report on Implementation. WHO EB115/29. WHO, 2004.
36. Liu S, Manson JAE, Lee I-M, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, Buring JE. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 72 (4): 922-928.
37. Albert J. Global pattern and country experiences with the formulation and implementation of Food-Based Dietary Guidelines. *Annals of Nutrition & Metabolism* 2007; 51 (suppl): 2-7.
38. NHMRC. Dietary Guidelines for older Australians. Ed. C.Binns. NHM, 1999.
39. Russell RM, Rasmussen H, Lichtenstein AH. Modified food guide pyramid for people over seventy years of age. *Journal of Nutrition* 1999; 129: 751-753.
40. Roubenoff R, Scrimshaw N, Shetty P, Woo J. Report of the IDECG Working group on the role of lifestyle including nutrition for the health of the elderly. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000; 54(Suppl.3): S164-S165.

**Адрес за кореспонденция:**

Доц. д-р Стефка Петрова, дм  
 Национален център по опазване на общественото здраве  
 E-mail: s.petrova@ncphp.government.bg

**Address for correspondence:**

Assoc.Prof. S. Petrova MD, PhD  
 National Center of Public Health Protection  
 E-mail: s.petrova@ncphp.government.bg

## ПРОМЕНИ В ХЕМАТОЛОГИЧНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ НА РАБОТНИЦИ, ЕКСПОНИРАНИ НА СЕРОВЪГЛЕРОД (CS<sub>2</sub>)

Нелия Димитрова, Тодор Попов, Теодор Панев

Национален център по опазване на общественото здраве

### Резюме

Цел на проучването е да се оценят ефектите на серовъглерод (CS<sub>2</sub>) върху хематологичните показатели на работещи при различни нива на CS<sub>2</sub> във въздуха на работна среда. Изследвани са 76 работници, разпределени в професионални групи, с нива на експозиция: I група (20 ± 10,9mg/m<sup>3</sup>), II група (4 ± 4,0mg/m<sup>3</sup>), III група (2 ± 2,0mg/m<sup>3</sup>) и контролна група от 23 лица, без експозиция на химични вредности. Концентрацията на CS<sub>2</sub> във въздуха на работна среда е определена с газова хроматография, с мас-спектрометричен детектор. Хематологичните показатели са определени с автоматичен хематологичен анализатор. Диференциалната кръвна картина (ДКК) е определена с микроскопски метод. Клинико-лабораторно е установен относително нисък дял на анемичните синдроми (6 - 8 % при експонираните от I и II група), но са регистрирани тенденции за снижение на стойностите на хемоглобин, еритроцити, хематокрит, както и тенденции за повишение обема на еритроцитите и повишено съдържание на хемоглобин в тях, като промените наподобяват макроцитните анемии. По-високият тромбоцитен брой е с нисък относителен дял при всички нива на експозиция. В ДКК са установени тенденции към лимфоцитоза и по-нисък относителен дял на левкоцитите и техните пръчкоядрени форми. Проучването се взе предвид при установяване на гранична стойност на CS<sub>2</sub> във въздуха на работна среда в България. Тази стойност е близка до предлаганата към момента индикативна гранична стойност за нивото на CS<sub>2</sub> в Европейската общност.

**Ключови думи:** серовъглерод, гранична стойност за въздух на работна среда, хематология, диференциална кръвна картина

### Въведение

Съществува обширна литература за токсичните ефекти на серовъглерода при животни и хора и енциклопедични прегледи (1,2,3,4). Сред най-значимите токсични ефекти при продължителна експозиция са: хронични увреждания на централната и периферната нервна система, като полиневропатия, с редукция на скоростта на проводимост на моторните и сензорни нервни влакна, церебро-вакуларни ефекти, невро-поведенчески промени (5,6,7,8,9,10), кардио-вакуларни ефекти, асоциирани и с по-високи нива на серумните холестерол, триглицериди и липопротеини с ниска плътност, с проявления като хипертонична болест, исхемична болест на сърцето с много по-бързо развитие на атеросклероза и по-висока смъртност от инфаркт на миокарда (11,12,13,14,15,16,17,18,19); репродуктивна токсичност, с

## CHANGES IN HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF WORKERS EXPOSED TO CARBON DISULFIDE (CS<sub>2</sub>)

Nelia Dimitrova, Todor Popov, Teodor Panev

National Center of Public Health Protection

### Abstract

The aim of this study was to assess the effects of carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) on hematological parameters in workers exposed to different CS<sub>2</sub> levels in the workplace air. A total of 76 workers were examined, distributed within occupational groups exposed to CS<sub>2</sub> with different exposure levels: I group - (20 ± 10,9mg/m<sup>3</sup>), II group - (4 ± 4,0mg/m<sup>3</sup>), III group - (2 ± 2,0mg/m<sup>3</sup>) and a control group of 23 individuals non-exposed to chemical hazards. CS<sub>2</sub> concentrations in the workplace were determined by gas chromatography with mass spectrometric detector. Hematological parameters were determined by automated hematology analyzer. A microscopic method was used to determine the differential blood count. Clinical-laboratory tests showed a relatively low percentage of anemia syndrome (6 - 8 % in exposed individuals from the I and II group), moreover the trends registered a decrease in values of hemoglobin, erythrocytes, hematocrit as well as indicated an increase in amounts of erythrocytes and elevated content of hemoglobin as the changes in them resembled macrocytic anemia. The higher number of platelets was with lower rate at all exposure levels. In differential blood count trends to high lymphocyte count were registered as well as relatively lower rate of leucocytes and their stab forms. The study performed was taken into consideration in the establishment of limit values of CS<sub>2</sub> in the workplace air in Bulgaria. This value is close to the indicative ones recommended by the European Commission.

**Key words:** carbon disulfide, limit value for workplace air, hematology, complete blood count

### Introduction

There is extensive evidence on the toxic effects of carbon disulfide in humans and animals; including a number of comprehensive reviews (1, 2, 3, 4). Among the most serious toxic effects of long-term exposure to CS<sub>2</sub> are: chronic neurological damage to both the central (CNS) and peripheral nervous systems (PNS) as polyneuropathy with reduced velocity of stimuli transfer of both motor and sensory nerves; cerebrovascular effects; neurobehavioural changes (5, 6, 7, 8, 9, 10), cardiovascular effects associated with higher levels of serum cholesterol, triglycerides and low density lipoproteins (LDLP) with manifestations like hypertensive disease, ischemic heart disease with more rapid development of atherosclerosis and higher mortality rate after myocardial infarction (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

редукция на сперматозоидния брой при мъжки индивиди, менструални нарушения и нарастващ брой на абортите при жени, експонирани на серовъглерод (1, 20, 21, 22, 23, 24). Серовъглеродът ( $CS_2$ ) е известен с политропното си действие върху организма. Сред установените хематологични ефекти на  $CS_2$  са: анемии, еозинофилия (3, 25, 26), неутропения, снижена активност на неутрофилните ензими миелопероксидаза и алкална фосфатаза (27). Описани са промени в броя и функциите на тромбоцитите – повишен тромбоцитен брой, повишена тромбоцитна агрегация (28, 29) и хиперкоагулация на кръвта (25).

$CS_2$  е химичен агент, чиито гранични стойности във въздуха на работната среда се различават много съществено в отделните страни – до 5 и повече пъти.

### Цел на проучването

Целта на настоящото проучване е да се оценят промените в хематологичните показатели на експонирани на  $CS_2$  лица, в зависимост от степента на експозиция. То е част от проведеното мащабно проучване за ревизиране на граничната стойност за  $CS_2$  във въздуха на работна среда и във връзка с възникналите международни дискусии през последните години по този проблем. Към настоящия момент в Европейската общност се приема индикативна гранична стойност за нивото на серовъглерод и резултатите от това проучване са в подкрепа на тази стойност.

### Материали и методи

Проведено е трансверзално епидемиологично проучване, в което са изследвани 76 клинично здрави работници, експонирани на  $CS_2$  при производството на изкуствени влакна и контролна група от 23 лица, без експозиция на химически вредности. Основните характеристики на включените в изследването лица са резюмирани в Таблица 1. Работниците и контролната група са аналогично представени по отношение на възраст, специализиран трудов стаж, процент на настоящите пушачи. С изключение на III група, съставена изключително от мъже, останалите групи имат сходно разпределение по отношение на пола.

Таблица 1. Основни характеристики на изследваната популация

| Групи<br>Groups<br>n                       | Пол<br>Sex             | (%)      | Възраст<br>Age<br>( $\bar{X} \pm SD$ ) | Специализиран<br>трудова стаж (г.)<br>Length of employment (y)<br>( $\bar{X} \pm SD$ ) | Настоящи пушачи<br>Current smokers<br>(%) |
|--|------------------------|----------|--|--|---|
| Контролна група<br>Control group<br>(n=23) | мъже/men<br>жени/women | 52<br>48 | 44,6 $\pm$ 9,9                         | 0  | 39  |
| I група<br>I group<br>(n= 26)              | мъже/men<br>жени/women | 38<br>62 | 40,8 $\pm$ 6,2                         | 13,23 $\pm$ 8,7  | 27  |
| II група<br>II group<br>(n=25)             | мъже/men<br>жени/women | 48<br>52 | 46,1 $\pm$ 6,7                         | 18,8 $\pm$ 9,4   | 40  |
| III група<br>III group<br>(n=25)           | мъже/men               | 100      | 49,4 $\pm$ 9,4                         | 17,8 $\pm$ 11,4  | 40  |

18, 19); reproductive toxicity with reduced sperm count in males, menstrual disorders and higher abortion rates in women exposed to  $CS_2$  (1, 20, 21, 22, 23, 24). Carbon disulfide is known by its polytropic effect on human organism.

Among the established hematological effects of  $CS_2$  are: anemia, eosinophilia (3, 25; 26), neutropenia, reduced activity of neutrophil enzymes myeloperoxidase and alkaline phosphatase (27). Changes were described in the number and function of platelets – increased platelet count, increased platelet aggregation (28, 29) and hypercoagulation (25).

$CS_2$  is a chemical agent, for which limit values in the workplace air vary considerably in different countries.

### Aim of the study

The aim of this study was to assess the changes in hematological parameters of individuals exposed to  $CS_2$  depending on the exposure level. It was a part of a large-scale study conducted to revise the limit value for  $CS_2$  in workplace air in relation to the international discussion on this topic, which has arisen over the last few years. For the time being, an indicative limit value for  $CS_2$  is established at EU level and the results of this study support the value.

### Materials and methods

A transversal epidemiological study was carried out, in which a total of 76 clinically healthy workers exposed to  $CS_2$  in the production of synthetic fibers were examined as well as a control group of 23 individuals non-exposed to chemical hazards. The main characteristics of the persons included in the study were summarized in Table 1. The workers from the control group were matched by age, length of employment, percentage of the current smokers. With the exception of the III group, which consisted mainly of men, the other groups were similar according to distribution by sex.

Table 1. Selected characteristics of the study population

## Методи

Концентрациите на  $CS_2$  във въздуха на работна среда са определени с газова хроматография, с мас-спектрометричен детектор (Perkin Elmer, Q mass 910).

Изследвани са 9 хематологични показателя с автоматичен анализатор ("Serono 190+"): левкоцити (WBC) [3,5-10,5]\*; еритроцити (RBC) [m\*\* – 4,6-6,2; w – 4,2-5,4]; хемоглобин (HGB) [m – 140-180; w – 120-160]; хематокрит (HCT) [m – 0,40-0,54; w – 0,37-0,47]; среден обем на еритроцитите (MCV) [m – 85-89; w – 82-92]; средно съдържание на хемоглобин в еритроцити (MCH) [26,5-31,5]; средна концентрация на хемоглобин в еритроцити (MCHC) [m – 295-45; w – 320-360], тромбоцити (PLT) [140-440]; среден обем на тромбоцити (MPV) [7-9]. Направена е диференциална кръвна картина [St 3-6%; Sg 51-67%; Eo 2-4%; Ba 0,25-1%; Ly 22-40%; Mo 4-8%; Pl 0-0,5%].

За оценка на експозицията е проведено персонално осемчасово пробонабиране с нискодебитни помпи тип Gilian 113 PS I (USA), с дебит на пробовземане 50-70 ml/min в респираторната зона. Въз основа на данните от индивидуалната дозиметрия, професията и предварителната оценка на експозицията по производства, са оформени професионални групи по нива на експозиция, представени на **Табл.2**.

**Таблица 2.** Професионални групи в зависимост от нивата на експозиция на  $CS_2$

|  | I група<br>I group | II група<br>II group | III група<br>III group | Контр. група<br>Control group |
|--|--------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------|
| $CS_2$ ( $\bar{X} \pm SD$ )<br>mg/m <sup>3</sup> | 20 ± 10,9          | 4,0 ± 4,0            | 2,0 ± 2,0              | 0,15 ± 0,08                   |

## Резултати и обсъждане

Резултатите са обработени статистически. Средните стойности, стандартното отклонение, степента на достоверност за хематологичните показатели в "експозиция-ефект" зависимостта са представени в **Таблица 3**.

За групата с най-висока експозиция (група I) липсват статистически значими промени в средните стойности на показателите еритроцитен брой, хемоглобин и хематокрит (RBC, HGB, HCT). Средните стойности на показателите среден обем на еритроцитите (MCV) и средна концентрация на хемоглобин в еритроцитите (MCHC) при мъжете са над горна референтна граница, но без статистическа значимост спрямо контролните лица. При работниците от двата пола се установява по-високо средно съдържание на хемоглобин в еритроцитите (MCH), достоверно спрямо контролата. Установена е неблагоприятна тенденция за повишение на броя на тромбоцитите.

\*[ ] - Референтни стойности

\*\*m- мъже; w- жени

## Methods

$CS_2$  concentrations in workplace air were defined by gas chromatography with mass spectrometric detector (Perkin Elmer, Q mass 910).

Nine hematological parameters were examined by automated analyzer ("Serono 190+"): leucocytes (WBC) [3,5-10,5]\*; erythrocytes (RBC) [m\*\* – 4,6-6,2; w – 4,2-5,4] (\*[ ] – Referent values, \*\*m - men; w – women); hemoglobin (HGB) [m – 140-180; w – 120-160]; hematocrit (HCT) [m – 0,40-0,54; w – 0,37-0,47]; mean corpuscular volume (MCV) [m – 85-89; w – 82-92]; mean corpuscular hemoglobin (MCH) [26,5-31,5]; mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) [m – 295-345; w – 320-360], platelets (PLT) [140-440]; mean platelet volume (MPV) [7-9]. A differential blood count was made [St 3-6%; Sg 51-67%; Eo 2-4%; Ba 0,25-1%; Ly 22-40%; Mo 4-8%; Pl 0-0,5%].

For the assessment of exposure a personal 8-hour sampling was carried out using low flow pumps type Gilian 113 PS I (USA), with flow rate of 50-70 ml/min in the respiratory zone. Based on the data from individual dosimetry, occupation and preliminary assessment of exposure, professional groups were determined by their exposure levels, presented in **Table 2**.

**Table 2.** Professional groups depending on levels of exposure to  $CS_2$

## Results and discussion

The results were statistically processed. The mean values, standard deviation, statistical significance of hematological parameters in "exposure-effect" relationship are presented in **Table 3**. For the group with the highest exposure (group I) there were no statistically significant changes in the mean values of parameters – red blood cell count, hemoglobin and hematocrit (RBC, HGB, HCT). In men the mean values of parameters - mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration were above upper referent limits, no statistical significance versus control individuals was observed. In workers of both sexes significantly higher mean corpuscular hemoglobin (MCH) in erythrocytes was established versus the controls. Unfavorable trend for increase in the platelet count was observed.

**Таблица 3.** Промени в хематологичните показатели – “експозиция-ефект” зависимости при работници, експонирани на CS<sub>2</sub>**Table 3.** Changes in hematological parameters – “exposure-effect” relationships in workers exposed to CS<sub>2</sub>

| WBC  | RBC                           | HGB                             | HCT                            | MCV  | MCH  | MCHC                                   | PLT  |
|--|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--|--|--|--|
| <b>Контр. група</b><br><b>Controls</b><br>n=23<br>x=7.72<br>σ=1.54 | m<br>n=12<br>x=4.8<br>σ=0.3   | m<br>n=12<br>x=149.4<br>σ=9.7   | m<br>n=12<br>x=43.2<br>σ=3.12  | m<br>n=12<br><b>x=90.2</b><br>σ=6.2            | n=23<br>x=30.5<br>σ=2.03                             | m<br>n=12<br><b>x=346.2</b><br>σ=17.67 | n=23<br>x=296.3<br>σ=50.64                       |
|  | w<br>n=11<br>x=4.66<br>σ=0.31 | w<br>n=11<br>x=142<br>σ=13.99   | w<br>n=11<br>x=40.55<br>σ=3.81 | w<br>n=11<br>x=86.7<br>σ=5.6                   |  | w<br>n=11<br>x=350<br>σ=16.85          |  |
| <b>I група</b><br><b>I group</b><br>n=26<br>x=8.05<br>σ=2.09       | m<br>n=10<br>x=4.67<br>σ=0.54 | m<br>n=10<br>x=146.4<br>σ=12.59 | m<br>n=10<br>x=42.18<br>σ=4.14 | m<br>n=10<br><b>x=90.6</b><br>σ=3.31           | n=26<br><b>x=31.83</b><br>σ=2.21<br><b>p&lt;0.05</b> | m<br>n=10<br><b>x=348.1</b><br>σ=27.2  | n=26<br>x=336<br>σ=101.5                         |
|  | w<br>n=16<br>x=4.76<br>σ=0.37 | w<br>n=16<br>x=152<br>σ=12.43   | w<br>n=16<br>x=43<br>σ=3.32    | w<br>n=16<br>x=90.4<br>σ=2.94<br>Insignificant |  | w<br>n=16<br>x=353<br>σ=15.1           |  |
| <b>II група</b><br><b>II group</b><br>n=25<br>x=8.49<br>σ=2.04     | m<br>n=12<br>x=4.9<br>σ=0.37  | m<br>n=12<br>x=152<br>σ=16.2    | m<br>n=12<br>x=43.78<br>σ=4.14 | m<br>n=12<br>x=89.5<br>σ=4.62                  | n=25<br>x=30.76<br>σ=2.04                            | m<br>n=12<br><b>x=346.6</b><br>σ=19.6  | n=25<br>x=335.2<br>σ=64.4<br><b>p&lt;0.05</b>    |
|  | w<br>n=13<br>x=4.8<br>σ=0.45  | w<br>n=13<br>x=146<br>σ=13.86   | w<br>n=13<br>x=42.35<br>σ=4.04 | w<br>n=13<br>x=88.3<br>σ=5.54                  |  | w<br>n=13<br>x=345.2<br>σ=16.3         |  |
| <b>III група</b><br><b>III group</b><br>n=25<br>x=8.45<br>σ=2.55   | m<br>n=25<br>x=4.97<br>σ=0.49 | m<br>n=25<br>x=154.8<br>σ=12.47 | m<br>n=25<br>x=44.01<br>σ=4.18 | m<br>n=25<br>x=88.64<br>σ=4.41                 | m<br>n=25<br>x=31.28<br>σ=2.52                       | m<br>n=25<br><b>x=352</b><br>σ=24.06   | m<br>n=25<br>x=349<br>σ=98.4<br><b>p&lt;0.05</b> |

**Легенда:**

n – брой; x – средна аритметична; σ – стандартно отклонение

**Legend:**

n – number ; x – arithmetic means; σ – standard deviation

В **Таблица 4** са представени резултатите от “експозиция-отговор” зависимостта. При работниците от I група е установен висок относителен дял на показателите с промяна, сравнени с референтните стойности за метода/популацията. Отбелязан е “отговор” извън тези референтни стойности и за част от контролните лица. Поради това достоверност се регистрира за снижението на хематокрита при 40% от мъжете, за повишения обем на еритроцитите – при лицата от женски пол (18.5%) и за повишения брой на тромбоцитите – при 15.4% (общо мъже и жени).

При проведения полицев анализ лабораторна констелация на анемичен синдром е установена при 1 жена (6,25%).

Оценката на резултатите от “експозиция-ефект” зависимостта при лицата от II група показва достоверност за повишените средни стойности на показателите средно съдържание на хемоглобин в еритроцити при мъжете и на тромбоцитите (**Табл.3**). В “експозиция-отговор” зависимостта се регистрира достоверно снижение на хематокрита при 25% от мъжете в групата (**Табл.4**).

The results from “exposure-response” relationship are presented in **Table 4**. In workers of the I group a higher rate of change in parameters was established in comparison to the referent values for the method/population. A “response” was indicated out of these referent values also for a part of the controls. Due to this, statistical significance was registered for the decrease in hematocrit in 40% of men, for the increased erythrocyte volume in women (18.5%) and for the higher platelet count in 15.4% (a total of men and women).

In the person-by-person analysis conducted, a laboratory constellation of anemia syndrome was registered in one woman (6.25%).

The assessment of results from “exposure-effect” relationship in persons of the II group showed statistical significance for the increased mean values of parameters – mean erythrocyte hemoglobin content in men and of platelet content (**Table 3**). In “exposure- response” relationship a significant reduction in hematocrit was registered in 25% of men from the group (**Table 4**).

**Таблица 4.** Промени в хематологичните показатели – “експозиция-ефект” зависимости при работници, експонирани на CS<sub>2</sub>**Table 4.** Changes in hematological parameters - “exposure- response” relationships in workers exposed to CS<sub>2</sub>

| Група<br>Group  | RBC   | HGB                                  | HCT  | MCV  | MCH                                | MCHC  | PLT   |
|---|---|--------------------------------------|--|--|------------------------------------|---|---|
| <b>Контр. група</b><br><b>Controls</b><br>n=23<br>m -12<br>w - 11 | m<br>↓ 8.3%<br><br>w<br>0 %                         | m<br>↓ 8.3%<br><br>w<br>0 %          | m<br>0%<br><br>w<br>↓ 9.1%                         | m<br>↑ 25%<br><br>w<br>0 %   | общо<br>Total<br>↑ 21.7%           | m<br>↑ 25%<br><br>w<br>↑ 18.2%                      | общо<br>Total<br>0%   |
| <b>I група</b><br><b>I group</b><br>n=26<br>m -10<br>w -16        | m<br>↓ 40%<br>p>0.05<br><br>w<br>↓ 6.3%<br>p>0.05   | m<br>↓ 20%<br>p>0.05<br><br>w<br>0 % | m<br>↓ 40%<br>p<0.01<br><br>w<br>↓ 12.5%<br>p>0.05 | m<br>↑ 30%<br>p>0.05<br><br>w<br>↑ 18.5%<br>p<0.05                                       | Общо<br>Total<br>↑ 42.3%<br>p>0.05 | m<br>↑ 30%<br>p>0.05<br><br>w<br>↑ 25%<br>p>0.05    | <b>Общо</b><br><b>Total</b><br><b>↑ 15.4%</b><br><b>p&lt;0.01</b> |
| <b>II група</b><br><b>II group</b><br>n=25<br>m -12<br>w -13      | m<br>↓ 8.3%<br>p>0.05<br><br>w<br>↓ 15.4%<br>p>0.05 | m<br>↓ 25%<br>p>0.05<br><br>w<br>0 % | m<br>↓ 25%<br>p<0.02<br><br>w<br>↓ 7.7%<br>p<0.05  | m<br>↑ 25%<br>p>0.05<br>↓ 8.3%<br>p>0.05<br><br>w<br>↑ 23%<br>p>0.05<br>↓ 7.7%<br>p>0.05 | Общо<br>Total<br>↑ 24%<br>p>0.05   | m<br>↑ 41.7%<br>p>0.05<br><br>w<br>↑ 7.7%<br>p>0.05 | Общо<br>Total<br>↑ 4%<br>p>0.05                                   |
| <b>III група</b><br><b>III group</b><br>n=25 (m)                  | m<br>↓ 20%<br>p>0.05                                | m<br>↓ 8%<br>p>0.05                  | m<br>↓ 16%<br>p<0.05                               | m<br>↑ 32%<br>p>0.05<br>↓ 8%<br>p>0.05   | m<br>↑ 24%<br>p>0.05               | m<br>↑ 56%<br>p>0.05                                | m<br>↑ 12%<br>p<0.05  |

**Легенда:**

n – брой; x – средна аритметична; σ – стандартно отклонение

С полицев анализ при 1 жена (7,7%) е установена лабораторна констелация на анемичен синдром по типа на макроцитните. В групата с най-ниска експозиция на CS<sub>2</sub> (III група) се регистрират достоверно повишени стойности на средното съдържание на хемоглобин в еритроцити и на броя на тромбоцитите в “експозиция-ефект” зависимостта. “Отговор”, със снижение на хематокрита под долна референтна граница, е установен достоверно при 16% от изследваните. Със стойности на тромбоцитите над горна референтна граница са 12% от работниците, което също е статистически значимо. И при трите изследвани групи се оформят тенденции за снижение на стойностите на хемоглобин, еритроцити и хематокрит, като за последния се установява статистическа значимостта на промяната в “експозиция-отговор” зависимостта. Разкрити са и тенденции за повишение на обема на еритроцитите и за повишено съдържание на хемоглобин в тях. Типът на промените наподобява макроцитните анемии. В полицев анализ такава констелация се наблюдава при 25% от изследваните от I група, 8% от II група и 12% от III група. Диференциалната кръвна картина (Табл.5) разкрива общата тенденция при всички експонирани към по-нисък брой на пръчкоядрените левкоцитни форми (St), като средната стойност на показателя в “експозиция-ефект” зависимостта е под долната референтна граница (p<0.05) за популацията. За относителна дял на сегментоядрените левкоцити (Sg) не се установяват съществени различия в средните стойности

**Legend:**

n – number ; x – arithmetic means; σ – standard deviation

By using person-by-person analysis, one woman (7.7%) demonstrated laboratory constellation of anemia syndrome of macrocytic-type anemias. In the group with the lowest exposure to CS<sub>2</sub> (III group) significantly increased values of mean erythrocyte hemoglobin content and of platelet count were registered in “exposure-effect” relationship. “Response” with reduction of hematocrit below lower referent limit was established significantly in 16% of the examined individuals. 12% of the workers have platelet values above upper referent value, which is also statistically significant. In all three examined groups trends for reduction of the values of hemoglobin, erythrocytes and hematocrit were observed and for the latter statistical significance of the change of “exposure-response” relationship was established. Trends for the increase of erythrocyte volume and elevated hemoglobin content were revealed. The types of changes were similar to macrocytic anemia. In person-by-person analysis this constellation was observed in 25% of the studied persons of I group, 8% of II group and 12% of III group.

In all exposed individuals the differential blood count (Table 5) revealed the general trend of lower number of stab neutrophil leukocyte forms (St), as the mean value of parameter in “exposure-effect” relationship was below the

**Таблица 5.** Промени в диференциалната кръвна картина (ДКК) - "експозиция-ефект" зависимости при работници, експонирани на  $CS_2$

**Table 5.** Changes in differential blood count - "exposure-effect" relationships in workers exposed to  $CS_2$

| Група<br>Group                      | St(%)  | Sg(%)                            | Ly(%)                            | Mo(%)  | Eo(%)                           |
|-------------------------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|--|---------------------------------|
| I група<br>I group<br>n=26          | $\bar{x}=0.42$<br>$\sigma=0.7$<br><b><math>p&lt;0.01</math></b>  | $\bar{x}=55$<br>$\sigma=8.49$    | $\bar{x}=38.8$<br>$\sigma=7.64$  | $\bar{x}=4.15$<br>$\sigma=2.31$                                  | $\bar{x}=1.65$<br>$\sigma=1.23$ |
| II група<br>II group<br>n=25        | $\bar{x}=0.54$<br>$\sigma=0.78$<br><b><math>p&lt;0.05</math></b> | $\bar{x}=52.5$<br>$\sigma=10.1$  | $\bar{x}=37.7$<br>$\sigma=8.9$   | $\bar{x}=6.45$<br>$\sigma=2.87$<br><b><math>P&lt;0.01</math></b> | $\bar{x}=2.75$<br>$\sigma=2.31$ |
| III група<br>III group<br>n=25      | $\bar{x}=0.58$<br>$\sigma=0.78$<br><b><math>p&lt;0.05</math></b> | $\bar{x}=54.96$<br>$\sigma=7.53$ | $\bar{x}=34.96$<br>$\sigma=6.68$ | $\bar{x}=6.67$<br>$\sigma=2.75$<br><b><math>p&lt;0.01</math></b> | $\bar{x}=2.88$<br>$\sigma=2.09$ |
| Контр.<br>група<br>Controls<br>n=23 | $\bar{x}=1.17$<br>$\sigma=1.03$                                  | $\bar{x}=56.65$<br>$\sigma=8.54$ | $\bar{x}=34.87$<br>$\sigma=7.43$ | $\bar{x}=4.48$<br>$\sigma=1.7$                                   | $\bar{x}=2.39$<br>$\sigma=1.78$ |

**Легенда:**

$n$  – брой;  $\bar{x}$  – средна аритметична;  $\sigma$  – стандартно отклонение

за групите, но в "експозиция-отговор" зависимостта, при 20% от работниците от I група ( $p>0.05$ ), 31,8% ( $p<0.01$ ) от II група и 21,7% ( $p>0.05$ ) от III група се регистрира снижение в относителния им дял под долната референтна граница, сравнени с 8,7% от контролните лица (Фиг.1).

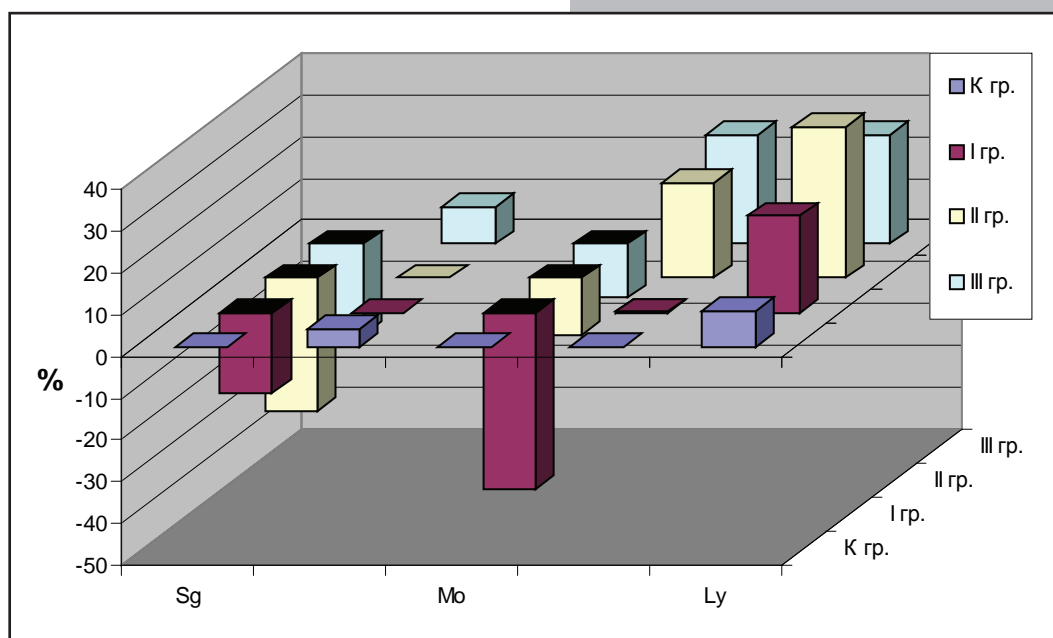
**Фигура 1.** Промени в диференциалната кръвна картина (ДКК) - "експозиция-отговор" зависимости при работници, експонирани на  $CS_2$

**Legend:**

$n$  – number ;  $\bar{x}$  – arithmetic means;  $\sigma$  – standard deviation

low referent limit ( $p<0.05$ ) for the population. For the rate of segmented leucocytes (Sg) no significant differences in mean values for the groups were established, but in "exposure-response" relationship, in 20% of workers of the I group ( $p>0.05$ ), 31.8% ( $p<0.01$ ) of the II group

**Fig 1.** Changes in differential blood count - "exposure- response" relationships in workers exposed to  $CS_2$



Относителният дял на моноцитите (Mo), като средногрупова стойност, е по-висок при работниците от II група (6.7%,  $p<0.01$ ). Стойности над референтната граница за относителния им дял ("експозиция-отговор" зависимост) се регистрират при 7,7% ( $p<0.01$ ) от изследваните лица от I група, 22,7% от II група ( $p<0.001$ ) и 26,1% от III група ( $p<0.001$ ). С по-нисък

and 21.7% ( $p>0.05$ ) of the III group, a reduction in their rate below the lower referent limit was registered in comparison to 8.7% of controls (Fig.1).

The rate of monocytes (Mo) as average-group value was higher in workers of the II group (6.7%,  $p<0.01$ ). Values above the referent limit for monocytes rate ("exposure-

от референтните стойности относителен дял на Мо са 42% ( $p < 0.001$ ) от работниците от I група и 13% ( $p < 0.01$ ) от тези от II и III група (**фиг.1**). Съществува тенденция за нарастване на относителния дял на лимфоцитите (Ly). Средните стойности на показателя са в референтната област за популацията (Табл.5), но относителна лимфоцитоза се регистрира при 23% ( $p < 0.05$ ) от изследваните лица от I група, 36% ( $p < 0.01$ ) от II група и 26% ( $p < 0.05$ ) от III група, сравнени с 8.7% отговор при контролните лица.

Резултатите от проведените хематологични изследвания установяват относително нисък дял на изявените анемичните синдроми, основно при лицата от женски пол – 6.25% за групата с експозиция средно  $20 \text{ mg/m}^3 \text{ CS}_2$  и 7.7% при средносменна експозиция от  $4 \text{ mg/m}^3$ .

Отбелязва се констелация, установявана и при предишни наши проучвания – тенденции за понижаване на стойностите на хемоглобина, еритроцитите, хематокрита, тенденции за повишаване на обема на еритроцитите и повишено съдържание на хемоглобин в тях, като промените наподобяват макроцитните анемии. В полицевия анализ подобна тенденция към анемично състояние, но без развита клиничко-лабораторно картина на анемия, се регистрира при една четвърт от работещите при нива  $20 \text{ mg/m}^3$  (I група). В тази група снижаване на броя на еритроцитите и на хематокрита се регистрира при 40% от изследваните.

Тези резултати дават основание да се тълкува като вреден ефектът при средни нива на експозиция от  $20 \text{ mg/m}^3$ . В групите със средносменна експозиция от  $4 \text{ mg/m}^3$  и  $2 \text{ mg/m}^3$  е регистрирано единствено значимо снижаване в стойностите на хематокрита. Изолирано, промените в този показател не могат да се приемат като вреден ефект от експозицията.

За относителна лимфоцитоза при макроцитните анемии се съобщава от Добрева и Мешков (30), което авторите тълкуват с нарушената матурация на костномозъчните клетки. Такава тенденция към лимфоцитоза, освен в настоящото проучване, сме регистрирали и в предишни наши проучвания при работници, хронично експонирани на  $\text{CS}_2$  (31). В синхрон с тази промяна е и установеното снижаване на броя на сегментоядрените левкоцити и на по-младите пръчкоядрени левкоцитни форми.

## Заклучение

Анемичните синдроми и тенденциите към анемични състояния, регистрирани при една четвърт от експонираните работници на средносменни концентрации от  $20 \text{ mg/m}^3 \text{ CS}_2$  във въздуха на работна среда, се приемат като вреден ефект, свързан с експозицията. При работници, изложени на въздействието на  $\text{CS}_2$  във въздуха на работна среда, под приетата за България гранична стойност от  $10 \text{ mg/m}^3$ , не се регистрират значими ефекти върху хематологичните показатели. Независимо от това е желателно да се проследяват хематологичните показатели и при по-ниските нива на експозиция. Повишаването на броя на тромбоцитите, установено в кръвната картина на 4 до 15% от работниците при всички нива на експозиция, не е статистически значим ефект, но в комбинация с другите ефекти на  $\text{CS}_2$  може да повиши риска от кардиоваскуларни и цереброваскуларни усложнения.

response” relationship) were registered in 7.7% ( $p < 0.01$ ) of the studied persons of the I group, 22.7% of the II group ( $p < 0.001$ ) and 26.1% of the III group ( $p < 0.001$ ). With Mo rate lower than the referent values were 42% ( $p < 0.001$ ) of workers of the I group and 13% ( $p < 0.01$ ) of those of the II and III group (**Fig.1**). A trend for increase in lymphocytes (Ly) rate was evidenced. The mean values of this parameter were in the referent range of population (Table 5), but relative lymphocytosis was registered in 23% ( $p < 0.05$ ) of persons studied of the I group, 36% ( $p < 0.01$ ) of the II group and 26% ( $p < 0.05$ ) of the III group, compared to 8.7% of response in the controls.

The results from the conducted hematological studies established comparatively low rate of the manifested anemia syndrome, mainly in females – in 6.25% of the group with average exposure of  $20 \text{ mg/m}^3 \text{ CS}_2$  and in 7.7% of the average-shift exposure of  $4 \text{ mg/m}^3$ .

Constellation was indicated, which was established in our previous studies – trends for reduction of the values of hemoglobin, erythrocytes, hematocrit, trends for increase in erythrocytes volume and hemoglobin content as the changes were similar to macrocytic anemia. In person-by-person analysis a similar tendency to anemic condition but without clinical and laboratory manifestation of anemia was registered in one quarter of the workers at levels of  $20 \text{ mg/m}^3$  (I group). In this group a reduction in erythrocytes count and in hematocrit was registered in 40% of the studied individuals. These results can be regarded as adverse effect at mean exposure levels of  $20 \text{ mg/m}^3$ . In the groups of average-shift exposure of  $4 \text{ mg/m}^3$  and  $2 \text{ mg/m}^3$  the only significant reduction was registered in hematocrit values. The changes in this parameter, themselves, cannot be considered as an adverse effect from the exposure.

Dobrova and Meshkov (30) reported relative lymphocytosis in macrocytic anemia, which was explained by the disturbed maturation of marrow cells. These trends to lymphocytosis, besides this study, have been registered by our previous studies in workers chronically exposed to  $\text{CS}_2$  (31). In line with this change was the established decrease in segmented leukocytic count and in younger stab neutrophilic leukocytic forms

## Conclusion

Anemia syndrome and trends to anemic conditions, registered in a quarter of the exposed workers at average-shift concentrations of  $20 \text{ mg/m}^3$  of  $\text{CS}_2$  in workplace air, were accepted as adverse effect related to the exposure. In workers exposed to the effect below the limit value of  $10 \text{ mg/m}^3$  for the workplace air in Bulgaria, significant effects on the hematological parameters were not registered. Nevertheless, it is recommendable to trace out the hematological parameters even in the lower exposure levels. The increase in platelet count established by differential blood count of 4 to 15% of workers at all exposure levels is not a statistically significant effect, but in combination with the other effects of  $\text{CS}_2$  it may elevate the cardiovascular risk.

Проведените хематологични изследвания са взети под внимание при приемането на гранична стойност за  $CS_2$  във въздуха на работна среда от  $10 \text{ mg/m}^3$ . Тази стойност е близка до предлаганата в момента в Европейската общност индикативна гранична стойност от  $15 \text{ mg/m}^3$  за 8-часова експозиция.

## Книгопис/References

1. BUA (GDCh- Advisory Committee on Existing Chemicals). Carbon disulphide: BUA Report 83, S Hirzel, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, August 1991.
2. DECOS. Carbon disulphide. Health-based recommended occupational exposure limit, Health Council: Dutch Expert Committee on Occupational Standards (DECOS). The Hague: Health Council publication No1994/08E. 1994: 140.
3. WHO. Concise International Chemical Assessment Document 46, Carbon disulphide, 2002.
4. DFG. Schwefelkohlenstoff, Toxicologisch-arbeitsmedizinische Begründungen für MAK-Werte, 36. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
5. Ruijten M, Salle HJA, Verbrak MM, Muijter H. Special nerve functions and colour discrimination in workers with long-term low-level exposure to carbon disulphide. *Br. J. Ind. Med.*, 1990; 47: 589-595.
6. Ruijten M, Salle HJA, Verbrak MM. Verification of effects on the nervous system of low level occupational exposure to  $CS_2$ . *Br. J. Ind. Med.*, 1993; 50: 301-307.
7. Cassitto MG, Camerino D, Imbriani M, Contardi T, Masera I, Gilioli R. Carbon disulphide and the central nervous system: a 15-year neurobehavioural surveillance of an exposed population. *Environ. Res.*, 1993; 63: 252-263.
8. Chu C-C, Huan C-C, Chen R-S, Shih T-S. Polyneuropathy induced by carbon disulphide in viscose rayon workers. *Occup. Environ. Med.*, 1995; 52: 404-407.
9. Takebayashi T, Omae K, Ishizuka C, Nomiyama T, Sakurai H. Cross sectional observation of the effects of carbon disulphide on the nervous system, endocrine system and subjective symptoms in rayon manufacturing workers. *Occup. Environ. Med.*, 1998; 55: 473-479.
10. Nishiwaki Y, Takebayashi T, O'Uchi T, Nomiyama T, Uemura T, Sakurai H, Omae K. Six year observational cohort study of the effect of carbon disulphide on brain MRI in rayon manufacturing workers. *Occup. Environ. Med.*, 2004; 61: 225-232.
11. Egeland GM, Burhart GA, Schnorr TM, Hornung RW, Fajen JM, Lee ST. Effects of exposure to carbon disulphide on low-density lipoprotein in cholesterol concentrations and diastolic blood pressure. *Br. J. Ind. Med.*, 1992; 49: 287-293.
12. Vanhoorne M, De Bacquer D, De Backer G. Epidemiological study of the cardiovascular effects of carbon disulphide. *Int. J. Epidemiol.*, 1992; 21: 745-752.
13. Stanosz S, Kuligowski D, Zuk E, Rzechula D, Kosciuszkiwicz B, Chlubek D. The pattern of some lipid fractions in the serum of women chronically exposed to carbon disulphide. *Ind. Health*, 1994; 32: 183-186.
14. Stanosz S, Kuligowska E, Kuligowski D. Coefficient of linear correlation between levels of fibrinogen, antithrombin III, thrombin-antithrombin complex and lipid fractions in women exposed chronically to carbon disulphide. *Med Pra.*, 1998; 49: 51-57.
15. Swaen GMH, Braun C, Slangen JJM. Mortality of Dutch workers exposed to carbon disulphide. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 1994; 66: 103-110.
16. Drexler H, Hubmann M, Hardt R, Goen T, Mondorf W, Lang E, Angerer J, Lehner G. Carbon disulphide III. Risk factors for coronary heart diseases in workers in the viscose industry. *Arch. Occup. Environ. Health*, 1995; 67: 243-252.
17. Kotseva K, Popov T. Study of the cardiovascular effects of occupational exposure to organic solvents. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 1998; 71: 87-91.
18. Sulsky SI, Hooven FH, Burch MT, Mundt KA. Critical review of the epidemiological literature on the potential cardiovascular effects of occupational carbon disulphide exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2002; 75: 365-380.
19. Takebayashi T, Nishiwaki Y, Uemura T, Nakashima H, Nomiyama T, Sakurai H, Omae K. A six year follow up study of the subclinical effects of carbon disulphide exposure on the cardiovascular system. *Occup. Environ. Med.*, 2004; 61: 127-134.
20. Cai SX, Bao YS. Placental transfer, secretion into mother milk of carbon disulphide and effect on maternal function of female viscose rayon workers. *Ind. Health*, 1981; 19:15-29.
21. Zhou SY, Liang YX, Chen ZQ, Wang YL. Effects of occupational exposure to low-level carbon disulphide on menstruation and pregnancy. *Ind. Health*, 1988; 26: 203-214.
22. Vanhoorne M, Vermoeulen A, De Bacquer D. Epidemiological study of endocrinological effects of carbon disulphide. *Arch. Environ. Health*, 1993; 48: 370-375.
23. Vanhoorne M, Comhare F, De Bacquer D. Epidemiological study of the effects of carbon disulphide on male sexuality and reproduction. *Arch. Environ. Health*, 1994; 49:237-278.
24. DFG. Schwefelkohlenstoff, Toxicologisch-arbeitsmedizinische Begründungen für MAK-Werte, Sammelkapitel MAK-Werte und Schwangerschaft, 21. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim, 1995.
25. WHO. EHC 10 Carbon disulfide. 1979: 48, 62, 63.
26. Toxicological Profile for Carbon disulfide. 1995: 23.
27. Lisiewicz J. Immunotoxic and hematotoxic effects of occupational exposures. *Folia Med. Cracov*, 1993; 34(1-4): 29-47.
28. Stanosz S, Jastrebska M, Chlubek D, Chukwu P. Effect of carbon disulphide on platelet aggregation in women. *Med Pr.*, 1992; 43(6): 493-497.
29. Stanosz S, Kuligowski D, Pielaszek A. Evaluation of relationship between concentration of serotonin in plasma and blood platelets and hypertension in women chronically exposed to carbon disulphide. *Med Pr.*, 1995; 46(2): 137-40.
30. Добрева AM, Мешков ТС. Атлас по хематология: Анемии, 1984: 62. [Dobrev A M, Meshkov T C. Atlas of Hematology: Anemias, 1984: 62 (in Bulgarian)].
31. Димитрова НД. Оценка на имунотоксични ефекти при работници от химическата промишленост: 5.3 Имунотоксични ефекти при работници експонирани на  $CS_2$ . Оценка на хематологичните показатели. Дисертационен труд, 2004: 79-82. [Dimitrova ND. Assessment of the immunotoxic effects on workers in chemical industry: 5.3 Immunotoxic effects on workers exposed to  $CS_2$ . Assessment of the hematological parameters. Dissertation, 2004: 79-82 (in Bulgarian)].

## Адрес за кореспонденция:

Н.с.І ст. д-р Нелия Димитрова, дм  
Национален център по опазване на общественото здраве  
Секция "Токсикология"  
Бул. "Акад. И.Е.Гешов" №15, София 1432  
Тел. 02/ 80 56 366  
e-mail: n.dimitrova@ncphp.government.bg

## Address for correspondence:

Nelia Dimitrova, MD, PhD  
National Center of Public Health Protection  
Dept "Toxicology"  
15, Blvd "Ivan Geshov", Sofia 1431  
Tel. +359 2/ 80 56 366  
e-mail: n.dimitrova@ncphp.government.bg

## ОЦЕНКА НА ЕФЕКТА НА ЕКСПОЗИЦИЯ НА ПЕСТИЦИДИ ВЪРХУ ИМУННИЯ ОТГОВОР

Татяна Вергиева<sup>1</sup>, Павел Теохаров<sup>2</sup>,  
Христо Зайков, Мирчо Вуков<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Национален център по опазване на общественото здраве

<sup>2</sup>Национален център по заразни и паразитни болести

<sup>3</sup>Национален център по здравна информация

### Резюме

Цел на това проучване е проверка, чрез един от най-чувствителните функционални тестове, на хипотезата, че професионалната експозиция на пестициди може да увреди имунната система. Този тест се състои в измерване на отговора на имунизация срещу хепатит В в ранен стадий на индуциране на антитела, когато стойностите на титрите на анти- HBs са все още на ниско ниво, при нашето изследване - 45 дни след първата инжекция с ваксина Engerix B.

Проучването е проведено с две групи експонирани лица и съответно две групи контролни лица, работници в производство на етиленбисдифенилокарбаматни фунгициди (EBDCs) и оранжерийни работници, с експозиция на различни пестициди и торове, висока влажност и температура.

Тези изследвания са проведени в България по проекта на Европейския съюз "Токсикологична оценка на имунната функция на работници с професионална експозиция на пестициди, европейско проучване": EUROPIT (QLRT-2001-00211).

Резултатите от изследването на работници в производство на EBDCs не установяват статистически достоверна разлика в имунния отговор при ваксиниране срещу хепатит В на работниците и контролните лица, когато сравненията са на база процент индивиди с негативен отговор (съответно 72.5 и 73.5%), както и на процентното разпределение на дискриминативните стойности на нивото на отговора. Не е установена и статистически достоверна разлика ( $p=0.633$ ), когато Т-тест е използван за сравнение на логаритмите на стойностите на анти HBs титрите при експонирани и контроли, съответно  $3.53 \pm 1.84$  и  $3.14 \pm 1.56$ . Достоверна разлика е установена и при статистическия анализ, проведен с цел разкриване на зависимост експозиция-ефект чрез сравнение на имунния отговор на работници с по-висока експозиция спрямо работници с по-ниска експозиция. Нивото на експозиция е определено чрез биологичен мониторинг.

Резултатите от изследването на оранжерийни работници не установяват статистически значима разлика и в отговора на имунизация срещу хепатит В между групата оранжерийни работници и групата на съответните контролни лица. Това се отнася както за процента лица с негативен отговор (44.82 спрямо 31.25), така и за процентното разпределение на стойностите на антителата. Отсъства статистически значима разлика ( $p=0.961$ ) и когато е използван Т-тест за сравнение логаритмите на средните стойности на анти HBs антителата: съответно  $2.66 \pm 1.86$  и  $2.68 \pm 1.57$ .

## FUNCTIONAL TEST FOR DETECTION OF AN EFFECT OF PESTICIDES TO IMMUNE RESPONSE

Tatjana Vergieva<sup>1</sup>, Pavel Theoharov<sup>2</sup>,  
Christo Zaykov, Mircho Vukov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> National Centre of Public Health Protection,

<sup>2</sup> National Centre of Parasitic and Infectious Diseases,  
Lab Virusology

<sup>3</sup> National Centre for Health Information, Sofia,

### Abstract

The objective of this study was to test the hypothesis that an occupational exposure to pesticides might affect the immune system and this to be detected with one of the presumably most sensitive functional tests. This test is measurement of the response to immunization against hepatitis B infection at an early stage of antibodies production when the titers of anti- HBs are still of low levels, in our case at 45 days after the 1<sup>st</sup> injection with the yeast derived vaccine Engerix B.

Two groups of exposed workers and the respective control subjects were enrolled, factory workers in production of EBDCs fungicides and greenhouse workers with exposure to different pesticides and fertilizers, high humidity and temperature.

This studies have been carried out in Bulgaria as a part of an EC project "Toxicological evaluation of the immune function of pesticide workers a European wide assessment" acronym: EUROPIT (QLRT-2001-00211)

Results from the study on the factory workers:

There was no statistically significant difference in response between the factory workers exposed to EBDCs and the control subjects when comparisons were made both for the percentage of individuals with negative response (72.5 and 73.5 % respectively) and for the distribution of the levels of response.

There was also no statistically significant difference ( $p=0.633$ ) when T-test was used to compare the log values for the anti HBs in exposed and controls,  $3.53 \pm 1.84$  and  $3.14 \pm 1.56$  respectively. No significant difference in the response was found also in the statistical analysis made for revealing exposure-effect relationship comparing workers with higher vs lower exposure as determined by biological monitoring

Study on greenhouse workers:

No statistically significant difference in the response to HBV immunization was found between the greenhouse workers. It was the case with both the percentage of subjects with negative response (44.82 vs. 31.25) and the distribution of the levels of response. There was also no statistically significant difference ( $p=0.961$ ) when T-test was used to compare the log values for the anti HBs levels of response in exposed and controls, respectively  $2.66 \pm 1.86$  and  $2.68 \pm 1.57$ .

*По-ниският процент на негативните отговори на оранжерийните работници и техните контроли, в сравнение с работниците в производството и техните контроли, може да се обясни с разликата в периода на пробовзимане, съответно 20 -25-ти ден след втората имунизация при първите и 15-ти ден - при вторите.*

**Ключови думи:** епидемиологично проучване, пестициди, етиленбисдитиокарбамати, ваксинация срещу хепатит Б, антитела срещу хепатит Б, имунен отговор

## Въведение

Пестицидите като потенциални замърсители на околната среда и храните са изследвани за възможни токсични ефекти върху различни органи и системи, включително и върху имунната система при експериментални животни, но по-рядко в епидемиологични проучвания при хора (1).

За имуноотоксичност на пестициди от различни химически групи се съобщава в редица изследвания *ин витро*. В тест на миши тимоцити с линдан, малатион и перметрин се съобщава както за изразена имуноотоксичност, предизвикана от отделните пестициди, така и за потенциране на ефекта при комбинираното им приложение (2). Значителна супресия на функционалната активност на фагоцити и лимфоцити от периферна кръв на овце се установява за агразин, бентазон, хлоридазон, дихлофлуанид, ендосулфан, МЦПА, симазин, триалат (3). За дитиокарбамати (ДТС) данните за имуноотоксичност са разнопосочни - от имunosупресия, до имуностимулация или отсъствие на ефект. Третирването на човешки клетки с ДТС води до супресия на хематопоеичния клоногенен отговор и функцията на Т-лимфоцитите (4). Други автори демонстрират *in vitro* на активирането на първични човешки CD4+ Т лимфоцити (5).

При работници с професионална експозиция се съобщава за имуномодулиращ ефект на Манкозеп (фунгицид от групата на етиленбисдитиокарбаматите, EBDCs) (6). Този ефект се демонстрира чрез повишение на функционалния отговор на Т-клетките. Умерен имуномодулиращ ефект на Манкозеп се установява и при професионална експозиция на земеделски работници (7). Повишени са нивата на IgG, IgE, b2-макроглобулина и на пролиферативния отговор на Т-клетки към митогени.

Когато се екстраполира от опити на животни относно потенциала за имуноотоксичност или имуномодулация, трябва да се има предвид, че при ниски нива на експозиция, какъвто е случая с експозицията на общото население или при някои професии, вредният ефект може да отсъства, да бъде незначителен или различен, като имуностимулация вместо супресия (5).

Установяването на промени във функциите на имунната система при хората е значително по-трудно поради ограничения брой не-инвазивни методи, неточности по

*The lower percentage of negative responses of both exposed and control population in the study on greenhouse workers is to be explained by blood sampling after a longer period(20 to 25 days) following the second vaccination than in the study on factory workers (10 to 15 days).*

**Key words:** Epidemiological study, pesticides, EBDCs, hepatitis B vaccination, anti HBs

## Introduction

Pesticides as environmental and food contaminants have been extensively studied for different toxic effects including such on immune system in experimental animals (EHC 180) (1) but less often in epidemiological studies on human.

When extrapolating from animal studies the potential for immune toxicity or immune modulation of chemicals it should be taken into consideration that at low level of exposure (as it is the case with the exposure of general population and exposure in certain occupation) the deleterious effects might not be present, be subtle or be different, for example immune system stimulation but not suppression.

Immunotoxicity of pesticides of different chemical classes has been demonstrated also in a number of *in vitro* studies. Olgun et al. 2004(2) reported that lindane, malathion, and permethrin are potent immunotoxicants to murine thymocytes and in addition when in a mixture there was a potentiation of their cytotoxicity. Significant suppression in functional activity of sheep peripheral blood phagocytes and lymphocytes has been demonstrated with atrazine, bentazone, chloridazone, dichlofluanid, endosulfan, MCPA, simazine, triallate by Pistl et al 2003 (3). DTC (dithiocarbamates) have been reported to inhibit, enhance or have no effect on immune system. Treatment of human cells with DTC resulted in suppression of hematopoietic clonogenic response and T-lymphocytes function(Irons et al 2001) (4). Pyatt et al 1998 (5) demonstrated that Dimethyldithiocarbamate inhibits *in vitro* activation of primary human CD4+ T lymphocytes.

It is considerably more complex to establish immune changes in humans than in animals, since non-invasive tests are limited, the levels of exposure to an agent are difficult to establish and the responses in the population are extremely heterogeneous. With respect to the latter, the variation in immune responses (genetic or environmental) can exceed a coefficient of variation greater than 20-30%. (EHC 180) (1).

Colosio et al 1996 (6) has shown an immunomodulatory effect of Mancozeb of an increased in workers with occupational exposure. This effect was demonstrated by an increase in T-cells functional response. Mancozeb is a fungicide from the group of ethylenebisdithiocarbamates. A mild immunomodulatory effect of Mancozeb has also

установяване нивото на експозиция на съответния химичен агент и изключителната хетерогенност на имунния отговор на човешката популация. Вариабилността на имунния отговор на човека, в зависимост от генетични фактори и такива от околната среда, може да доведе до коефициент на вариация над 20-30 % (1).

В по-голямата си част наличните тестове са разработени с цел разкриване на състояния на имунна недостатъчност и не винаги са подходящи за установяване на слаби промени, предизвикани от експозиция на химични агенти от околната среда при епидемиологични проучвания от типа трансверзални (1). Промените в имунната система при тези проучвания освен незначителни могат да бъдат и спорадични или преходни, което изисква и чувствителни тестове за разкриването им. Според цитирания по-горе документ, съществува убедителен консенсус между специалистите в тази област, че количествената оценка на първичния имунен отговор след ваксинация е не само подходящ, но и много чувствителен тест. Приема се, че състояние на потисната функция на имунната система се разкрива при ваксинация с антиген, при който не е имало предварителна експозиция (8). В частност, отговорът на ваксинация срещу хепатит В е използван успешно при изучаване ефектите на стреса. Тютюнопушенето също въздейства на имунния отговор при ваксинация. Данните показват, че този параметър може да бъде по-чувствителен от много други показатели при изучаване на минимални стресори от околната среда (9). Според Shapira et al (8) при пациенти с имunosупресия след лъчетерапия, хемотерапия или диализа, имуногенността на хепатит В ваксината е силно редуцирана.

Цел на настоящото епидемиологично проучване е да се провери хипотезата, че професионалната експозиция на пестициди би могла да предизвика неблагоприятни ефекти върху имунната система и те да бъдат установени чрез един от най-чувствителните тестове, а именно отговор на имунизация на ранен стадий от продукцията на защитни антитела /анти-НВс/, когато титърът им е все още на ниско ниво. В нашия проект избрахме 45-ия ден след първата инжекция с ваксина Engerix B.

Това проучване е проведено в България като част от спонсорирания от ЕС мултицентрален научен проект "Токсикологична оценка на функцията на имунната система при работници с професионална експозиция на пестициди, европейско изследване: EUROPIT (QLRT-2001-00211)". Освен в България, такива проучвания са проведени в Холандия, Италия и Финландия.

## Материали и методи

България участва в проекта с две епидемиологични проучвания. Първото е проведено с 50 работници от предприятие за производство на етиленбисдитиокарбаматни (EBDCs) фунгициди и 50 контролни лица. Във второто проучване са обхванати 50 работници от зеленчукова

been reported on occupationally exposed agricultural workers by Corsini et al 2006 (7). An increase in IgG, IgE, b2-macroglobulin, and T-cell proliferative response to mitogens have been detected.

As most of the available tests have been developed to detect an immuno- deficiency disease and are not always adequate to detect subtle alterations induced by environmental chemicals in a cross-sectional study (EHC 180) (1). However the immune changes might be sporadic or subtle (or transient) – there is a need of sensitive tests. According to the above cited document there is a strong consensus that quantification of a primary immune response after immunization is not only a very relevant test but also very sensitive. It is accepted that for suppression of immune function, the immune system is best assessed by vaccination with an antigen to which no prior exposure has occurred (8). In particular, hepatitis B vaccination responses have been successfully used to study the effects of stress; also smoking shows an influence on the vaccination immune response, showing that this parameter can be more sensitive to subtle environmental stressors than more others immune assays (9). According to Shapira et al (8) in immunosuppressed individuals such as patients receiving radiation, chemotherapy or dialysis, the immunogenicity of HB vaccines is significantly reduced.

The objective of this study was to test the hypothesis that an occupational exposure to pesticides might affect the immune system and this to be detected with one of the presumably most sensitive functional tests, the response to immunization at an early stage of antibodies production when the titers of anti HBV are still of low levels, in our case at 45 days after 1<sup>st</sup> injection with the yeast derived vaccine Engerix B.

The studies described bellow have been carried out in Bulgaria as a part of an EC multicentre project. The title of this EC study is: Toxicological evaluation of the immune function of pesticide workers, a European wide assessment, acronym: EUROPIT (QLRT-2001-00211). Field studies within this project were conducted also in Netherlands, Italy and Finland.

## Material and methods

Two groups of workers and the respective control subjects (50 persons in each group) were enrolled, factory workers in production of EBDCs and greenhouse workers with exposure to different pesticides and fertilizers, high humidity and temperature.

Measurement on anti-HB antibodies has been carried out at T0 (Pre-exposure evaluation). The subjects which were negative for anti- HBs antibodies underwent the first administration of hepatitis B vaccination before the beginning of the exposure, 35 days after the first vaccination, a second vaccination has been performed,

оранжерия, експонирани на различни пестициди и торове, работещи в условия на висока влажност и температура, и контролна група от 50 лица.

Измерването на титъра на анти-HBs антителата е проведено след 30-дневна годишна отпуса (оценка преди началото на професионалната експозиция на пестициди). На индивидите от двете групи, експонирани и контроли, е поставена инжекция от ваксината срещу хепатит В, 35 дни след първата инжекция следва втората, а след още пет месеца – третата (бустер) ваксина (тя не е част от проекта, но е необходима за завършване на процедурата на ваксинация). Титърът на анти-HB антителата е измерен отново на 45-ия ден (T45) след инжектирането на първата ваксина.

За да се валидира методът на измерването на титъра на анти-HBs антителата, партньорът от Холандия (RIVM) разработи кит с референтни стойности, отговарящи на ниски, средни и високи стойности. Лабораториите от участващите в проекта страни получиха китове и проведеха тестовете с референтните серуми. **Таблица 1** демонстрира съответствие на резултатите, получени във всички участващи в проекта страни.

**Таблица 1.** Данни от измерванията на анти-HBs антитела с референтния кит в България, Холандия, Финландия, Италия

| Титър<br>Titre | България<br>Bulgaria | Холандия<br>Netherlands | Финландия<br>Finland | Италия<br>Italy |
|----------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-----------------|
| Нисък / low    | 3.0 ± 3              | 8.5 ± 2.6               | 7.0 ± 0.05           | 6.9 ± 3.6       |
| Среден/ middle | 58.9 ± 3.3           | 56.4 ± 5.0              | 50 ± 0.16            | 72.9 ± 15.4     |
| Висок / high   | 398 ± 46.4           | 404.0 ± 55.8            | 395 ± 6.5            | 485.2 ± 40.4    |

## Резултати

### Изследване на работници с професионална експозиция на EBDCs при производството им

Общо 51 работници (група на експонирани – E) от предприятие за синтез и формулация на фунгицида Цинеб, от групата на етиленбисдитиокарбаматите (EBDC s), са изследвани за наличие на антитела срещу хепатит В. Същото се отнася и за 49 лица от контролната група (C), съставена от 31 работници от същото предприятие, но без контакт с EBDCs (служители в администрацията, охрана, шофьори извън предприятието), както и 18 лица от техническия състав на научния институт, участващ в проекта. Средната възраст на експонирания и контролната група е съответно 40.73 и 39.11 години.

Отсъствие на антитела срещу хепатит В преди имунизацията (T0) се установи съответно при 40 експонирани и 34 контроли (78.4% и 69.38 %). От представените на **Табл. 2** нива /титри/ на анти-HBs в международни единици (IU/L) се вижда, че отсъстват значими разлики в разпределението им между двете популации.

followed, five months later, by a third booster vaccination (this is not part of the study, but it is necessary to complete the vaccination procedure). Anti-HBs-hepatitis antibodies have been measured at day 45 after the first vaccination.

To validate the method the partner of the project in Netherlands (RIVM) has developed a reference kit with a low, middle and high concentration of anti-HB. Every laboratory bought their own kit and has tested the reference sera.

**Table 1** shows the results. Data from RIVM, Finland, Italy and Bulgaria were in line with one and another

## Results

### Study on factory workers with EBDCs exposure

Altogether 51 workers (group exposed, E) from a factory for synthesis and formulation of the EBDC fungicide Zineb were examined for anti HBV antibodies. A control group (C) of 49 subjects was formed from 31 people working in the same factory, but without a contact with EBDCs : administration, security guards, drivers outside

**Table 1.** Data from anti-HB titers -RIVM, Finland, Italy and Bulgaria from the measurements with the reference kit

the factory and 18 technical staff of a scientific institute. The mean age of the E group was 40.73 and of the C group 39.11 years.

Negative for the presence of anti-HBs antibodies at T0 (before immunization) were 40 exposed and 34 controls persons (78.4 and 69.38 % respectively). There was no significant difference in the distribution of the subjects according the cut-offs of anti HBs (in IU/L) as presented on **Table 2**.

The distribution according the anti HBs cut-offs at T45 of the subjects from both groups 15 days after the second injection of Enderix B immunization (45 days after the first) was very similar indicating no difference in response. (**Table 3**)

To explore more precisely the hypothesis of an eventual difference in the response of exposed vs unexposed to EBDCs population a comparison was made of the % only of the immunized people with negative answer (zero IU/L) at 45<sup>th</sup> day (**Table 3A**). This was 72.5 in exposed and 73.5 in controls. There was also no difference in the cut-offs for the different levels of immunoprotection.

**Таблица 2.** Анти-HBs нива на T0 при работници, експонирани на EBDC и при контроли

| Anti-HBs (IU/l)<br>преди имунизацията<br><i>Before immunization</i> | Експонирани<br><i>Exposed</i> |       | Контроли<br><i>Controls</i> |       |
|---|-------------------------------|-------|-----------------------------|-------|
|   | n                             | %     | n                           | %     |
| ( - ) отр.  | 40                            | 78.4  | 34                          | 69.38 |
| (< =10) IU  | 1                             | 1.96  | 2                           | 4.08  |
| (> 10 =100)   | 6                             | 11.76 | 7                           | 14.28 |
| (>100 )   | 4                             | 9.80  | 6                           | 12.24 |
| <b>Общо (Total)</b>   | <b>51</b>                     |       | <b>49</b>                   |       |

Разпределението в проценти на нива /титри/ на анти-HBs (IU/L) при изследването, проведено 45 дни след първата, съответно 15 дни след втората имунизация с Engerix B (T45), е с близки стойности за експонирани и контроли (Таблица 3).

Изводът е за отсъствие на разлики в имунния отговор на двете групи.

**Таблица 3.** Анти-HBs нива на T 45 при работници, експонирани на EBDC и при контроли

| Anti-HBs (IU/l)<br>45 дни след 1-та имунизация<br><i>45 days After immunization</i> | Експонирани<br><i>Exposed</i> |      | Контроли<br><i>Controls</i> |       |
|---|-------------------------------|------|-----------------------------|-------|
|   | n                             | %    | n                           | %     |
| ( - ) отр. / <i>negative</i>  | 29                            | 56.9 | 25                          | 56.81 |
| (< =10) IU  | 3                             | 5.9  | 3                           | 6.81  |
| (> 10 =100)   | 7                             | 13.7 | 6                           | 13.63 |
| (>100 )   | 12                            | 23.5 | 12                          | 27.27 |
| <b>Общо (Total)</b>   | <b>51</b>                     |      | <b>49</b>                   |       |

С цел по-нататъшно прецизиране на отговора на хипотезата за възможна разлика в имунния отговор на експонирани и не експонирани на EBDCs лица, сравнихме данните само за индивиди, при които анти- HBs титрите са негативни (-) на T0 и са получили Engerix B на месец 0 и 1 (Таблица 3А). И при това сравнение не са установени значими разлики между двете групи в процентното разпределение на дискриминативните нива на титрите.

**Таблица 3А.** Анти- HBs нива на T 45 при работници, експонирани на EBDC и при контроли ( данни само за индивиди, при които Анти-HBs титрите са били негативни(-) на T0 и са получили Engerix B на месец 0 и 1)

| Анти /anti HBs(IU/l)<br>45 дни след 1-та имунизация<br><i>45 days After 1<sup>st</sup> immunization</i> | Експонирани<br><i>Exposed</i> |      | Контроли<br><i>Controls</i> |      |
|---|-------------------------------|------|-----------------------------|------|
|   | n                             | %    | n                           | %    |
| ( - ) отр. / <i>negative</i>  | 29                            | 72.5 | 25                          | 73.5 |
| (< =10) IU  | 3                             | 7.5  | 3                           | 8.8  |
| (> 10 =100)   | 5                             | 12.5 | 3                           | 8.8  |
| (>100 )   | 3                             | 7.5  | 2                           | 5.9  |
| <b>Общо (Total)</b>   | <b>40</b>                     |      | <b>33</b>                   |      |

Следваща стъпка в анализа на данните от проучването бе сравнение на средните стойности на анти- HBs титрите в IU/L за групата на експонирани лица и тази на контролите. Както сравнението на абсолютните стойности (Mann-Whitney test), така и на техните логаритми (T-test) не разкри статистически значими разлики (Таблица 4).

**Table 2.** Anti HBs levels at T0 of Factory workers exposed to EBDC and controls

Next step was a comparison of the mean values of anti HBs IU/l for the subjects from the two groups (E vs C). Both comparing the absolute values (Mann-Whitney test) and their logarithms (T-test) we did not find a statistically significant difference. (Table 4)

Another statistical analysis was performed with the aim to explore possible differences in the age and in the number

**Table 3.** Anti HBs levels at T 45 of Factory workers EBDC and controls

of years at this job between the exposed population which was with negative response and that with presence of anti HBs antibodies at day 45 after the first injection. There was no statistically significant difference in the mean age between the subjects with negative response and those with anti HBs antibodies: 41.83±9.46 and 37.90±8.31 years, p=0.249 respectively as well as in the mean

**Table 3A.** Factory workers exposed to EBDC and controls according to anti-HBs levels at T 45 (only data for the subjects which were negative for anti-HBs at T0 and have received Engerix B at month 0 and 1)

number of years at this job: 12.24± 7.33 and 10.80±8.79 years, p=0.613, respectively, when T-test was applied.

With the aim to reveal eventual level of exposure-response relationship within the exposed group next

**Таблица 4.** Средни стойности на анти-HBs титъра на Т45 при работници, експонирани на EBDC и при контроли

**Table 4.** Factory workers exposed to EBDC and controls mean anti-HBs titers at day 45 after 1st injection

| Група<br>Group                | n  | Средна ст.<br>Mean IU/L<br>anti-HBs | SD     | Медиана<br>Median<br>(min.-max.) | Средна ст.<br>Mean<br>Log IU/L<br>anti-HBs | SD   | Медиана<br>Median<br>(min.-max.) |
|-------------------------------|----|-------------------------------------|--------|----------------------------------|--|------|----------------------------------|
| Експонирани<br><i>Exposed</i> | 10 | 130.30                              | 204.06 | 30.50<br>(2-539)                 | 3.53                                       | 1.84 | 3.42<br>(0.69-6.29)              |
| Контроли<br><i>Controls</i>   | 8  | 64.75                               | 92.76  | 14.50<br>(4-258)                 | 3.14                                       | 1.56 | 2.64<br>(1.39-5.55)              |
| P                             |    | 0.515                               |        |                                  | 0.633                                      |      |                                  |

В допълнение е проведен статистически анализ на данните за експонираната група, целящ разкриване на достоверни разлики в средните стойности на възрастта и на продължителността на трудовия стаж в години, при лицата с негативен отговор и тези с наличие на антитела на 45-ия ден след първата имунизация. Не се установи значима разлика между средната възраст на лицата с негативен отговор на имунизацията и тези с наличие на анти-HB антитела, съответно:  $41.83 \pm 9.46$  и  $37.90 \pm 8.31$  години,  $p = 0.249$ . Същото се отнася и за средния брой години трудов стаж в това предприятие, съответно  $12.24 \pm 7.33$  г. и  $10.80 \pm 8.79$  години,  $p = 0.613$ .

С цел разкриване на евентуална зависимост на имунния отговор от нивото на експозиция на EBDCs, следващото сравнение е направено между група 1 експонирани и група 2 експонирани. Група 1 е съставена от работници с висока експозиция, с работни места в цех формулация. Група 2 – от работници с по-ниска експозиция, с работни места в цех синтез и в лаборатории на предприятието. Това разпределение е направено първоначално от специалист по хигиена на труда и в последствие верифицирано с данните от биологичния мониторинг (концентрация на етилен тиоурея, ETU, в урина). Поради отсъствие на нормално разпределение на данните за концентрация на ETU в урина, логаритъмът на абсолютните им стойности е използван за провеждането на статистическия анализ за различия между Група 1 и 2 и по-нататък в опита да се установи корелация с нивото на титрите на анти-HB антителата.

Разликата между Група 1 и 2 по отношение на логаритъма на нивото на ETU в урина бе статистически значима при  $p < 0.0001$  (Група 1 :  $\log$  ETU  $\mu\text{g/g}$  креатинин – средна стойност 3.86,  $SD = 1.32$  и Група 2 : средна стойност 2.25,  $SD = 0.90$ ).

От 17 работници от Група 1 (с висока експозиция) 10 (58.82%) бяха с негативен отговор на имунизацията на Т45, докато по-голям процент работници 18/25 (78%) от Група 2 (с по-ниска експозиция) демонстрират отсъствие на антитела.

Средните нива на анти HBs титрите са с близки стойности, 35.0 и 30.78 IU/L, съответно за Група 1 и Група 2. Също така изчислението на непараметричния корелационен коефициент на Spearman не доказва корелация между концентрацията на ETU в урината и отговора на имунизацията ( $r = 0.037$ ,  $p = 0.822$ )

comparisons were made between Gr 1 Exposed (workers with higher exposure, these at work places in formulation) and Gr 2 Exposed (workers with lower exposure, those at workplaces in synthesis and laboratories). This distribution was made by an occupational hygiene specialist and later verified by the data from biological monitoring (ETU concentration in urine). As ETU concentration data were without normal distribution their log values were used for statistical analysis of the difference between Gr 1 and 2 and for further studies aiming at revealing correlations with anti HBs titres. The difference between Gr 1 ( $\log$  ETU  $\mu\text{g/g}$  creatinine – mean 3.86,  $SD = 1.32$ ) and Gr 2 (mean 2.25,  $SD = 0.90$ ) was significant at  $p < 0.0001$  using the T-test.

From 17 workers from Gr 1 (higher exposure) 10 (58.82%) were with negative response to immunization whereas more workers from the lower exposure group (18/25, 78%) did not respond to immunization at the same term. The mean anti HBs titers of Gr 1 and Gr 2 were with similar values, 35.0 and 30.78 IU/L, respectively. The calculation of Spearman's nonparametric correlation coefficient ( $r = 0.037$ ,  $p = 0.822$ ) also did not reveal correlation between ETU concentration in urine and the response to immunization.

### Study on Greenhouse workers

Altogether 53 workers with work place in a greenhouse (exposed group, E) for growing of vegetables in the South-East part of the country were examined for a presence of antibodies against HBV. This was done just before the season of the work inside the greenhouse has started. A control group (E) of 51 subjects (14 from the greenhouse administration and 37 technical staff from a scientific institute) was enrolled into the study.

During this period the exposure of the greenhouse workers has been to Lanat (a carbamate insecticide), Actera and Lyrosect (biological insecticides), Rovral (a carboxamide fungicide), for all of them one application for the whole period well as to fertilizers once weekly spraying (Table 5).

### Изследване на оранжерийни работници

Общо 53 лица, с работно място в оранжерия за отглеждане на зеленчуци в югоизточната част на страната (експонирана група, E), са изследвани за наличие на антитела срещу хепатит В. Изследването е проведено непосредствено преди началото на сезона на работа вътре в оранжерията (T0). Паралелно е включена контролна група (C) от 51 лица: 14 от администрацията на оранжерията и 37 от техническия персонал на научен институт.

През последвалия период на експозиция, до T55, оранжерийните работници са били в контакт по време на пръскането на зеленчуковите култури с пестицидите Ланат (карбаматен инсектицид), Актера и Лиросект (биологични инсектициди), Роврал (карбоксамиден инсектицид). С всички изброени препарати пръскането е било еднократно за целия период, докато приложение на торове е имало веднъж седмично (Таблица 5).

Таблица 5. Анти- HBs титри при оранжерийни работници и контроли на T0

| Анти HBs IU/L<br>преди имунизация<br><i>Anti HBs IU/L</i><br><i>Before immunization</i> | Експонирани<br><i>Exposed</i> |       | Контроли<br><i>Controls</i> |       |
|---|-------------------------------|-------|-----------------------------|-------|
|   | n                             | %     | n                           | %     |
| ( - ) отр./ <i>negative</i>   | 32                            | 60.37 | 42                          | 82.35 |
| ( < =10 )   | 4                             | 7.55  | 0                           | 0     |
| ( > 10 =100 )   | 6                             | 11.3  | 4                           | 7.84  |
| ( >100 )  | 11                            | 20.75 | 6                           | 11.76 |
| Общо / <i>Total</i>   | 53                            |       | 51                          |       |

От оранжерийните работници 32-ма без антитела срещу хепатит В (-) и един с < 10 и 32 контроли с (-) на T0 са имунизирани и изследвани за наличие на антитела на 55-ия ден след първата от двете инжекции и 25 дни след втората инжекция с Enderix B.

Таблица 6. Анти- HBs титри 55 дни след първата имунизация

| Анти HBs in IU/L<br><i>Anti HBs IU/L</i> | Експонирани<br><i>Exposed</i> |       | Контроли<br><i>Controls</i> |       |
|--|-------------------------------|-------|-----------------------------|-------|
|  | n                             | %     | n                           | %     |
| ( - ) отр./ <i>negative</i>              | 13                            | 39.39 | 10                          | 31.25 |
| ( < =10 ) IU                             | 5                             | 15.15 | 4                           | 12.5  |
| ( > 10 =100 )                            | 7                             | 21.21 | 15                          | 46.87 |
| ( >100 )                                 | 8                             | 24.24 | 3                           | 9.37  |
| Общо / <i>Total</i>                      | 33                            |       | 32                          |       |

Не се установи статистически значима разлика както за процента на случаи с негативен отговор, така и за процентното разпределение на дискриминативните нива анти HBs в IU/L (Таблица 6) след анализ чрез X\*Y крос-табулация и оценка с X-квадрат коефициент за вероятност и Fisher's Exact тест, съответно  $p=0.158$  и  $p=0.803$ .

Както се вижда от Таблица 7 средните нива на анти HBs са с близки стойности за експонирани и контроли. Сравнението на средните стойности на анти HBs титрите на оранжерийните работници с тези на контролите, както и на стойностите на техните логаритми (Т-тест), не доказва статистически значими разлики, съответно  $p=0.872$  и  $0.961$ .

The 32 greenhouse workers without HBV antibodies and one with < 10 IU/l and 32 controls underwent an examination for a presence of HBV antibodies 55 days after the first of two injections with Enderix B.

There was no significant differences in both the percentage of the cases with negative response as well as in the distribution in the respective cut-offs (Table 6) as analyzed by X\*Y cross-tabulation and evaluated by X-square likelihood ratio ( $p=0.158$ ) and Fisher's Exact test ( $p=0.803$ ).

As it is seen on Table 7 the mean values antiHBs titers in both group are very close to each other. The comparison of both the mean values of the absolute antiHBs titers (Mann-Whitney test) of greenhouse workers with those of controls and their log values (T-test) did not reveal a statistically significant difference.

Table 5. Anti- HBs levels of Greenhouse workers and controls at T0

### Discussion

In a multi-centric study conducted in 1999-2000 in the five biggest cities in Bulgaria on total of 11595 healthy people seronegative for HBV markers were 72.54%.

Table 6. Anti- HBs distribution of the responses 55 days after first immunization

(Kojouharova et al 2002) (10). In our study the data were in the same range, at T0 absence of anti HBs was proved in 78.4% of the factory workers and 69.38% of the respective control group. In the greenhouse workers group only 60.37 % were negative for anti HBs and this was the case for 82.35% of the controls. The difference might be due to the different place where most of the controls were living ( only 14 persons from the small town and villages in the South-East of Bulgaria where the greenhouse was and the rest 37 in Sofia). According to Kojouharova et al 2002 the evidence for a previous infection with HBV varies from 17.7 in Sofia to 38.57 % in South part of Bulgaria.

**Таблица 7.** Средни стойности на абсолютните нива на анти-HBs и техните логаритми 55 дни (T55) след първата имунизация**Table 7.** Mean absolute values of anti-HBs titers and their logs 55 days after first immunization

| Група<br>Group         | n  | Средна<br>стойност<br>Mean IU/L<br>antiHBs | SD    | Медиана<br>Median<br>(min.-max.) | Средна<br>стойност<br>Mean<br>Log IU/L antiHBs | SD   | Медиана<br>Median<br>(min.-max.) |
|------------------------|----|--|-------|----------------------------------|--|------|----------------------------------|
| Експонирани<br>Exposed | 22 | 41.44                                      | 41.94 | 20.31<br>(0.47-100)              | 2.65   | 1.86 | 2.85-0.76 – 4.61                 |
| Контроли<br>Controls   | 27 | 33.26                                      | 34.95 | 17.93<br>(0.37-106)              | 2.68   | 1.57 | 2.88<br>(-0.9 - 4.66)            |
| p                      |    | 0.872                                      |       |                                  | 0.961  |      |                                  |

## Обсъждане

При национално проучване (10), проведено през 1999-2000 година в 5 големи града в България, на 11 595 здрави лица, серонегативни за HBV маркери са били 72.54 %. При настоящото изследване данните са с близки стойности на Т0. Отсъствие на анти-HBs антитела е доказано за 78.4% от работниците в производство на етиленбисдитиокарбамати и за 69.38% от съответната контролна група. При групата на оранжерийните работници само 60.37 % са с негативен резултат за анти-HBs антитела, а при контролите - 82.35%. Тази разлика може да се дължи на различното местожителство на експонираната и контролната група. Само 14 от контролните лица живеят в малко градче и околните села в Югоизточна България, където живеят работниците от оранжерията, докато останалите контроли живеят в София. Според проучвания на някои автори (10) данните за инфекции с хепатит В вариат от 17.7% в София, до 38.57 % в южната част на България.

Втората генерация рекомбинантни HB ваксини, получени на база дрожди, са въведени през 1986 година. Те съдържат не-гликозилиран антиген S HBV с малка повърхност – r HBs Ag. Демонстрирана е отлична имуногенност след три дози на 0, 1 и 6-ти месец при млади и имунокомпетентни хора (11). Дори след три инжекции обаче, някои лица остават без имуноен отговор. Процентът на лицата с отсъствие на ефект от имунизацията се увеличава с напредване на възрастта, с наличие на заплъстяване и при някои системни заболявания, като такива, засягащи бъбречната функция или случаи на имunosупресия (11). Същите автори съобщават, че четири седмици след първата инжекция, но преди втората, серопротекция (концентрация на анти-HBs титри > 10 IU/L) се получава при 12.5 % от реципиентите на ваксина Engerix B и че средните нива на анти-HBs титъра в IU/L са  $4.1 \pm 2.3$ .

Горните данни се потвърждават от резултатите, получени при нашите изследвания на ранен период от протокола на ваксинирането, когато се очакват сравнително ниски титри на антитела. Това предполага и възможност за чувствителност на този функционален тест към въздействия на химически фактори от околната среда.

В нашето проучване върху работници от производство на EBDCs отчитането на индуцираната с Engerix B серопротек-

Second generation yeast derived recombinant HBV vaccines were introduced in 1986. They contain the non-glycosylated small S HBV surface antigen – r HBs Ag. They have an excellent record of immunogenicity after three doses given at 0, 1 and 6 months in young and immuno competent individuals (Kojouharova et al 2001) (11). Even with three doses, some healthy individuals remain non-responders. Vaccination failure rates increase with age, obesity, and systemic diseases such as kidney disease or other causes of immune suppression (Shapira et al 2001). The same authors report that following primary immunization at week 4 (before the second injection) seroprotection (anti-HBs level > 10 mIU/ml) was found in 12.5 % of the recipients of Engerix B vaccine and the mean levels of anti-HBs were  $4.1 \pm 2.3$  expressed in mIU/ml. We are citing these data only to demonstrate that there is a certain agreement with our data received at an early term of the vaccination protocol when relatively low titers of anti HBs are to be expected but presumably it makes this functional test more sensitive to an environmental chemical exposure.

In our study on factory workers the checking of the induced by Engerix B seroprotection was done 15 day after the second injection, it is on week 6-7 after the 1<sup>st</sup> one. At 45 days after the 1<sup>st</sup> vaccine seroprotection was found in 20% of the subjects exposed to EBDCs which were negative for anti HBs before immunization, (the total % of persons with anti HBs being 27.5) and the mean levels of anti-HBs in IU/l was  $130.30 \pm 204.06$ . The respective figures for the control group were 14.7% (and total % of persons with anti HBs being 23.5%) and  $64.75 \pm 92.76$  IU/l ( $p=0.515$ ).

There was also no statistically significant difference ( $p=0.633$ ) when T-test was used to compare the log values for the anti HBs in exposed and controls,  $3.53 \pm 1.84$  and  $3.14 \pm 1.56$  respectively.

The above cited results clearly demonstrated that an occupational exposure to EBDCs during their production does not suppress the formation of anti HBs.

ция е проведено на 15-ия ден след втората инжекция и на 6-та-7-ма седмица (45-ти ден) след първата. Серопротекция е установена при 20% от експонираните на EBDCs лица, които са били с негативен резултат за анти-HBs преди имунизацията. Процентът на лицата със серопротекция от всички имунизирани експонирани работници е 37.2 и средното ниво на анти- HBs в IU/l за всички експонирани е  $130.30 \pm 204.06$ . Съответните стойности за контролната група са 14.7% и 40.9% и средно ниво на анти- HBs в IU/L -  $64.75 \pm 92.76$  IU/L ( $p=0.515$ ).

Не се доказва и статистически значима разлика ( $p=0.633$ ), когато Т-тест е използван за сравнение на логаритъма на стойностите на анти-HBs в IU/l при експонирани и контроли, съответно  $3.53 \pm 1.84$  и  $3.14 \pm 1.56$ .

Резултатите от тези статистически анализи показват, че професионалната експозиция при производство на етиленбисдитиокарбамати не причинява супресия на имунния отговор, свързан с формиране на антитела вследствие на имунизация срещу хепатит Б.

С цел по-нататъшна проверка на хипотезата за потенциално въздействие на EBDC върху функциите на имунната система, се опитахме да разкрием потенциална експозиция-отговор зависимост чрез сравнение на резултатите между две групи работници с различна степен на експозиция, определена от данните на биологичен мониторинг (концентрация на ETU в урина). Статистическият анализ не разкри разлики в имунния отговор на двете групи.

Не бе установена статистически значима разлика и в отговора на имунизация срещу хепатит Б между групата оранжерийни работници (с многократна експозиция на биоинсектициди и минерални торове и еднократно пръскане с карбаматен инсектицид или карбоксамиден фунгицид) и групата на съответните контролни лица. Това се отнася както за процента лица с негативен отговор (44.82 спрямо 31.25), така и за процентното разпределение на титрите на антителата при лицата с имунен отговор. Отсъства статистически значима разлика ( $p=0.961$ ) и когато използвахме Т-тест, за сравняване на логаритмите на средните стойности на анти-HBs антителата.

По-ниският процент на негативните отговори на оранжерийните работници и техните контроли, в сравнение с работниците в производството и техните контроли, може да се обясни с разликата в периода на пробовзимане, съответно 20-25-и ден след 2-та имунизация при първите, 15-и ден - при вторите.

Нашите резултати с този функционален тест могат да бъдат интерпретирани като доказателство, че професионалната експозиция на работници при производството на EBDCs, както и на пестициди и торове – при оранжерийни работници, е без значим ефект върху този вид имунен отговор.

To explore further this hypothesis we have tried to find an eventual exposure-response relationship when the exposed workers have been divided into two groups depending on their level of exposure. The statistical analysis did not reveal a differences in response between the two groups.

No statistically significant difference in the response to HBV immunization was found between the greenhouse workers (exposure to bioinsecticides, fertilizers and single days spraying with a carbamate insecticide or a carboxamide fungicide) and the respective controls. It was the case with both the percentage of subjects with negative response (44.82 vs. 31.25) and the distribution of the cut-offs of levels of response. The lower percentage of negative responses of both exposed and control population in the study on greenhouse workers is to be explained by blood sampling after a longer period following the second vaccination (10 to 15 days) than in the study on factory workers. There was also no statistically significant difference ( $p=0.961$ ) when T-test was used to compare the log values of anti HBs.

The above cited results with this functional test should be interpreted as a prove that occupational exposure to a mixture of pesticides and fertilizers in greenhouse workers does not affect significantly this type of immune response.

**Книгопис / References**

1. *Environmental Health Criteria 180. Principles and Methods for Assessing Direct Immunotoxicity Associated with Exposure to Chemicals.* WHO, Geneva, 1996.
2. Olgun S, Gogal RM, Adeshina F et al. Pesticide MIXTURE Potentiate the Toxicity in Murine Thymocytes. *Toxicology* 2004; 196(3): 181-195.
3. Pistl J, Kovalkovicova N, Holovska N, et al, Determination of the Immunotoxic Potential of Pesticides on Functional Activity of Sheep leucocytes in vitro. *Toxicology* 2003; 188(1): 73-81.
4. Irons RD, Stillman WS, Pyatt DW, et al. Comparative Toxicity of Dithiocarbamates and Butadiene Metabolites in Human Lymphoid and Bone Marrow Cells. *Chem. Biol Interact* 2001.; 135-136: 615-625.
5. Pyatt DW, Gruntmeir J, Stillman WS, Irons RD, Dimethyldithiocarbamate Inhibit in Vitro Activation of Primary Human CD4+ T Lymphocytes. *Toxicology* 1998, 128(2), 83-90.
6. Colosio C., Barcellini W., Maroni M., Alcini D., Bersani M., Cavallo D., Galli A., Meroni P., Pastorelli R., Rizzardi G.P., Soleo L. and Foa V. Immunomodulatory effects of occupational exposure to Mancozeb. *Arch Environ. Health* 1996; 51: 445-451.
7. Corsini E, Birindelli S, Fustinioni S, De pschale G, Mammone T, Visentin S, Galli CL, Marinovich M, Colosio C. Immunomodulatory Effects of The Fungicide Mancozeb in Agricultural Workers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;208:178-185.
8. Shapira M., E.Zeira, R.Adler, D, Shouval, Rapid seroprotection against hepatitis B following the first dose of a Pre-S1/Pre-S2/S vaccine, *Journal of Hepatology* 2001; 34: 123-127.
9. Van Loveren H., Van Amsterdam JG, Vandebriel RJ, Rumke HG, Steerenberg PS, Vos JG. Vaccine-induced antibody responses as parameters of the influence of endogenous and environmental factors. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 757-764.
10. Kojouharova M., P.Teoharov, N.Vladimirova, S.Zlatev, I.Haydushka, M.Atanasova, M.Sredkova, V.Grigorova, P.Sotirova, H.Djeneva, B.Dimitrova, V.Rusev and I.Ivanova, Seroepidemiological study on hepatitis B infection prevalence in Bulgaria. *Clinical Microbiology and Infection* 2002; 8 (suppl.1): 305-306 (Abstract).
11. Kojouharova M., P.Teoharov, T.Bahtchevanova, I.Maeva, A.Eginlian, M.Deneva, Safety and Immunogenicity of a yeast-Derived recombinant Hepatitis B Vaccine in Bulgarian Newborns. *Infection* 2001; 29 (6):342-344.

**Адрес за кореспонденция:**

Таяна Вергиева  
 Национален център по опазване на общественото здраве  
 t.vergieva@ncphp.government.bg

**Address for correspondence:**

T. Vergieva  
 National Centre of Public Health Protection  
 t.vergieva@ncphp.government.bg

## ОЦЕНКА НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО И ВЛИЯНИЕТО НА НЯКОИ РИСКОВИ ФАКТОРИ ВЪРХУ СЪСТОЯНИЕТО НА КОСТНАТА СИСТЕМА

Антоанета Манолова<sup>1</sup>, Милен Димов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национален център по опазване на общественото здраве,  
<sup>2</sup>ДКЦ 14

### Резюме

Остеопорозата е един от значимите проблеми на общественото здравеопазване в световен мащаб.

**Целта** на настоящото проучване е да бъде анализирано разпространението на някои рискови фактори и индикатори за остеопороза сред българското население и оценено тяхното влияние върху костния статус на база ултразвукова остеометрия.

**Методи:** Общо 4542 души (4390 жени и 152 мъже) на средна възраст  $48,8 \pm 9,7$  г. са анкетирани с «Едноминутен тест за оценка на риска от остеопороза» на Международната фондация по остеопороза (български превод). Чрез ултразвукова остеометрия са изследвани 4524 от анкетираните лица (150 мъже и 4369 жени).

**Резултати:** Около половината от анкетираните съобщават за наличието на един или повече рискови фактори, съответно 57.9% мъже и 57.5% жени. Водещи при жените са хормоналните фактори, фамилната предиспозиция към остеопороза и основният индикатор за наличие на остеопороза – една или повече фрактури при минимална травма, докато при мъжете водещата триада включва тютюнопушене, положителна фамилна анамнеза, една или повече фрактури при минимална травма. Като цяло остеопороза се открива при 7.8%, остеопения при 26.0%, а нормална костна маса при 66.2% от извадката, със статистически значими междуполови разлики ( $P < 0.001$ ). Резултатите от логистичната регресия показват, че определящи за остеопорозния риск са: женският пол (OR 4,165; 95CI=2,588-6,702), възраст над 50 г. (OR 14,454; 95CI=8,008-26,088), броят на рисковите фактори (OR 1,854; 95CI=1,622-2,119),

**Заключение:** Ранното идентифициране на рисковата конституция в различните възрастови периоди при мъже и жени ще даде научнообоснована основа за насочени интервенционни подходи, които ще доведат до редуциране на индивидуалното и популационното равнище на риска за остеопороза и свързаните с нея фрактури.

**Ключови думи:** остеопороза, рискови фактори, ултразвукова остеометрия, T-скор

Остеопорозата е един от значимите медицински и социални проблеми на новото хилядолетие и представлява заболяване на скелета, характеризиращо се с намалена костна маса и нарушена структура на костната тъкан, водещи до повишена чупливост на костите и увеличен риск от фрактури (1,2,3). Най-чести и тежки са счупванията на шийката на бедрената

## ASSESSMENT OF THE PREVALENCE AND EFFECT OF SOME RISK FACTORS ON THE STATUS OF THE BONE SYSTEM

Antoaneta Manolova<sup>1</sup>, Milen Dimov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Center of Public Health Protection  
<sup>2</sup>Diagnostic-Consultative Center 14

### Abstract

Osteoporosis is one of the significant issues of global public health.

**The aim** of this study is to analyze the prevalence of some risk factors and indicators for osteoporosis among the Bulgarian population and to assess their impact on bone status through ultrasound osteodensitometry.

**Methods:** A total of 4542 individuals (4390 women and 152 men, mean age  $48,8 \pm 9,7$ ) were investigated using the Bulgarian version of the “One-minute osteoporosis risk test”. Ultrasound osteodensitometry was used to examine 4524 of the investigated individuals (150 men and 4369 women).

**Results:** About half of the investigated individuals reported the presence of one or more risk factors – 57.9% men and 57.5% women. For the women hormonal factors were leading, followed by family predisposition to osteoporosis and the main indicator for osteoporosis – one or more fractures at minimal injury, while for the men the leading triad included smoking, positive family history, one or more fractures at minimal trauma. In general osteoporosis was found in 7.8%, osteopenia in 26.0%, and normal bone mass – in 66.2% of the sample with statistically significant differences between the genders ( $P < 0.001$ ). The results from the logistic regression showed that the determinants of osteoporosis risk were: female gender (OR 4,165; 95CI=2,588-6,702), age above 50 (OR 14,454; 95CI=8,008-26,088), number of risk factors (OR 1,854; 95CI=1,622-2,119).

**Conclusion:** The early identification of the risk constellation in the various age periods of men and women will provide a scientific basis for targeted intervention approaches that will lead to reduction of individual and population level of risk for osteoporosis and related fractures.

**Key words:** osteoporosis, risk factors, quantitative ultrasound densitometry, T-score

Osteoporosis is one of the significant medical and social issues of the new millennium. It is a skeletal disease, characterized by low bone mass and abnormal structure of bone tissue, leading to increased bone fragility and an increased risk of fractures (1,2,3). Hip and vertebral fractures are most frequent and reduce life expectancy, leading to disability and impaired quality of life (3,4,5).

кост и прешлените, които намаляват продължителността на живота, водят до инвалидност и влошено качество на живот (3,4,5).

В страните на Европейската общност от остеопороза боледуват 40 милиона, което представлява 12% от населението (1). Остеопорозата поражда най-често жените (особено след менопаузата) и старите хора от двата пола, като се приема, че 1/2 от жените и 1/4 от мъжете над 60-годишна възраст ще претърпят поне една фрактура през остатъка от своя живот. В Европа, САЩ и Япония от остеопороза боледуват 75 милиона, от които 50 милиона са жени (5).

По данни от Доклада за остеопорозата в Европейския съюз, приблизително 1 от 9 европейски граждани над 50 години има фрактура на гръбначния стълб. В допълнение 1 от всеки 3 жени и 1 от 9 мъже над 80-годишна възраст фрактурира бедрената кост (1). Според единственото българско проучване, над 92 хиляди жени имат поне по една остеопорозна фрактура на прешлен. Над 4 хиляди жени годишно си чупят бедрената шийка и 800 от тях умират до 1 година от усложненията на фрактурата (6).

Нарастването на заболяемостта от остеопороза е предизвикателство към медицинската наука, както за изясняване на рисковите фактори, така и за тяхното повлияване с цел ранна профилактика и лечение. Като се има предвид ограниченият достъп до все още недостатъчната апаратура за измерване на костната плътност, недостигът на ресурси и ниските икономическите възможности у нас, през последните години се поставя въпросът за избор на скринингови методи за оценка на остеопорозния и фрактурния риск (7). Международната фондация по остеопороза и СЗО препоръчват това да става чрез скринингов подход на база оценка на индивидуалните рискови фактори (8).

ЦЕЛТА на настоящото проучване е да бъдат анализирани данните за разпространението на някои рискови фактори и индикатори за остеопороза сред българското население и оценено тяхното влияние върху костния статус на база ултразвукова остеометрия.

## Материал и методи

С "Едноминутен тест за оценка на риска от остеопороза" на Международната фондация по остеопороза (български превод), от асоциация "Жени без остеопороза", през 2004-2006 г., са анкетирани общо 4542 души (4390 жени и 152 мъже) от 22 града в България. Средната възраст на изследваната извадка е  $48,8 \pm 9,7$  г., като възрастта на мъжете е статистически значимо по-висока от тази на жените ( $P < 0.001$ ), съответно  $55,5 \pm 10,6$  г. и  $44,37 \pm 9,5$  г.

При анализа на данните от "Едноминутния тест за оценка на риска от остеопороза", всеки отговор "да" получава 1 точка, а всеки отговор "не" – 0 точки. Изчислен е остеопорозният рисков профил (брой рискови фактори), който е равен на сумата от всички положителни отговори.

Чрез ултразвукова остеометрия са изследвани общо 4524 от анкетираните лица (150 мъже и 4369 жени). Оценена е

Forty million individuals suffer from osteoporosis in EU countries, which is 12% of the population (1). Osteoporosis affects most women (especially after menopause) and aged population of both genders. It is assumed that a half of women and a quarter of men, aged above 60 years will suffer at least from one fracture during the rest of their life. The number of individuals with osteoporosis in Europe, USA and Japan is 75 millions, of which 50 million are women (5).

According to data from the EU Report on Osteoporosis approximately one in 9 European citizens, aged above 50 years, has a spine fracture. In addition, one in every 3 women and every 9 men, aged above 80, have a hip fracture (1). According to the unique Bulgarian study more than 92 thousands women aged above 92 years have at least one osteoporotic vertebral fracture. Every year above 4 thousands women will have a hip fracture and 800 of them will die within a year from fracture-related complications (6).

The increased prevalence of osteoporosis is a challenge to medical science, related to the necessity of elucidating the risk factors and reducing them for the early prevention and treatment of osteoporosis. The limited access to still inadequate apparatus for measuring bone density, scarce resources and insufficient funding in our country during the last years pose the question of the choice of screening methods for assessing the risk of osteoporosis and fracture (7). International Osteoporosis Foundation and WHO recommend a screening approach, based on the assessment of individual risk factors, to be used (8).

This study is aimed at analyzing the data on the prevalence of certain risk factors and indicators for osteoporosis among Bulgarian population and assessing their impact on bone status through ultrasonic osteodensitometry.

## Material and methods

A total of 4542 individuals (4390 women and 152 men) of 22 city in Bulgaria were investigated using the Bulgarian version of the "One-minute osteoporosis risk test" of International Osteoporosis Foundation in 2004-2006. The mean age of sample studied was  $48,8 \pm 9,7$ , the men's age being significantly higher than that of women ( $P < 0.001$ ), respectively  $55,5 \pm 10,6$  years and  $44,37 \pm 9,5$  years.

In order to analyse data from the "One-minute osteoporosis risk", each answer "yes" was quantified 1 point and each answer "no" – 0 points. The osteoporosis risk profile (the number of risk factors) was calculated as a sum of all positive answers.

4524 of the investigated individuals (150 men and 4369 women) were examined through quantitative ultrasound densitometry (QUS). The prevalence of osteoporosis, osteopenia and normal bone mass was defined by WHO diagnostic criteria for diagnosis of osteoporosis: (T-score up to -1 SD – normal, within -1 SD and -2,5 SD – osteopenia, less than -2,5 SD – osteoporosis).

честотата на остеопороза, остеопения и нормална костна маса чрез диагностичен критерии T-Скор в дефинираните от СЗО групи: (до -1 SD – норма; от -1 SD до -2,5 SD – остеопения; под -2,5 SD – остеопороза).

Получените данни са обработени със SPSS 10.0 за Windows. Извършен е честотен анализ на качествени променливи, който включва абсолютни и относителни честоти. Приложени са множествен линейен регресионен анализ стъпка назад и линейен логистичен регресионен анализ за оценка на връзката между дихотомизираната зависима променлива “костна маса” (нормална костна маса и остеопения/остеопороза) и множество количествени и качествени променливи. При всички анализи е използвано ниво на значимост  $P < 0.05$ . Данните са обработени и анализирани от авторите като задача от Националната програма за ограничаване на остеопорозата в Република България 2006-2010 г. (т. 8 от дейностите по Националната програма, възложени на НЦООЗ през 2006 г. – “Оценка на въздействието на рисковите фактори за разпространение на остеопорозата”)

## Резултати

### Резултати от анкетното проучване

Анализът на данните сочи, че рисковите фактори (РФ) се срещат почти в еднаква степен при мъже и жени ( $P > 0.05$ ) – около половината от анкетираните съобщават за наличието на един или повече рискови фактори/индикатори за остеопороза (съответно 57.9% мъже и 57.5% жени).

Преобладават лицата, съобщили за 1-3 РФ – 57.9% (30.3% мъже и 57.5% жени), следвани от тези с 2-3 РФ – 11.0% при мъжете и 15.0% при жените. С повече от 4 РФ са 7% от мъжете и 3% от жените.

Във възрастов план се отчита статистически значимо увеличение на броя на рисковите фактори при жените ( $P < 0.001$ ), докато при мъжете не се установява възрастов градиент на този показател ( $P > 0.05$ ) – **Таблица 1**.

**Таблица 1.** Рисков профил на изследваните лица от различните възрасти

|                             |              | Възрастови групи (години) |      |       |       |       |      |
|-----------------------------|--------------|---------------------------|------|-------|-------|-------|------|
|                             |              | <i>Age groups (years)</i> |      |       |       |       |      |
|                             |              |                           | <30  | 31-40 | 41-50 | 51-60 | >60  |
| <b>Мъже</b><br><i>Men</i>   | Без РФ       | n                         | 2    | 6     | 16    | 36    | 24   |
|                             | <i>NO RF</i> | %                         | 66.7 | 50.0  | 64.0  | 60.0  | 53.3 |
|                             | 1-3 РФ/RF    | n                         | 1    | 6     | 9     | 24    | 20   |
|                             |              | %                         | 33.3 | 50.0  | 36.0  | 40.0  | 44.4 |
|                             | > 4 РФ/RF    | n                         |      |       |       |       | 1    |
|                             |              | %                         |      |       |       |       | 2.2  |
| <b>Жени</b><br><i>Women</i> | Без РФ       | n                         | 128  | 483   | 926   | 822   | 108  |
|                             | <i>NO RF</i> | %                         | 76.2 | 70.4  | 60.1  | 52.5  | 32.7 |
|                             | 1-3 РФ/RF    | n                         | 40   | 203   | 607   | 724   | 208  |
|                             |              | %                         | 23.8 | 29.6  | 39.4  | 46.2  | 63.0 |
|                             | > 4 РФ/RF    | n                         |      |       | 7     | 21    | 14   |
|                             |              | %                         |      |       | 0.5   | 1.3   | 4.2  |

Data were processed with SPSS 10.0 for Windows. Frequency analysis by qualitative variables was performed. Backward multiple linear regression analysis and linear step logistic regression analysis were performed to assess the relationship between the dichotomous dependent variable “bone mass” (normal bone mass and osteopenia/ osteoporosis) and multiple quantitative and qualitative variables. The level of significance was  $P < 0.05$  in all analyses performed. Data were processed and analyzed as a task of the National Program for reducing osteoporosis in Bulgaria 2006-2010 (item 8 of the activities under the National Program, assigned to the NCPHP in 2006 “Assessment of the impact of risk factors on the prevalence of osteoporosis”).

## Results

### Results of the questionnaire survey

Data analysis showed that risk factors (RF) are almost equally distributed among men and women ( $P > 0.05$ ) – about half of the respondents reported one or more risk factors / indicators for osteoporosis (respectively, 57.9% men and 57.5% women).

Most individuals reported 1-3 RF – 57.9% (30.3% of men and 57.5% of women), followed by those with 2-3 RF – 11.0% of men and 15.0% of women. 7% of men and 3% of women reported more than 4 RF.

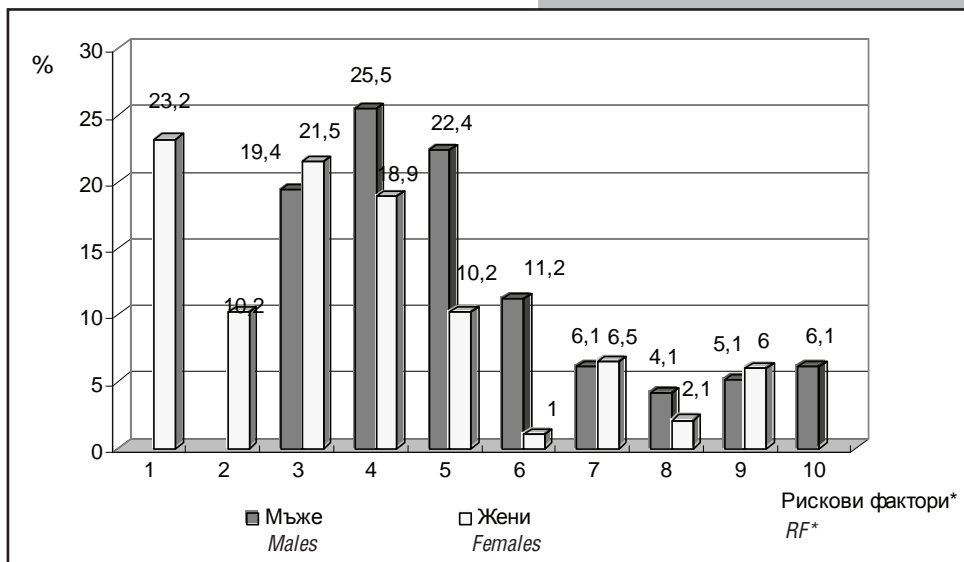
Referring to age, we found a significantly increased number of risk factors among women ( $P < 0.001$ ) and no age-related increase of this indicator among men ( $P > 0.05$ ) – **Table 1**.

The distribution of various RF (% of positive answers) among men and women, given in **Fig. 1**, shows that hormonal factors (early menopause) and familial predisposition to osteoporosis were leading among women, followed by the main indicator for osteoporosis –

**Table 1.** Risk profile of subjects from various age groups

Разпределението на различните РФ (% положителни отговори) при мъже и жени е представено на **Фиг. 1** и показва, че водещи при жените са хормоналните фактори (ранна менопауза) и фамилната предиспозиция към остеопороза, следвани от основния индикатор за наличие на остеопороза – една или повече фрактури при минимална травма. При мъжете водещата триада включва тютюнопушене, положителна фамилна анамнеза, както и една или повече фрактури при минимална травма.

**Фиг. 1.** Разпределение на рисковите фактори при мъже и жени

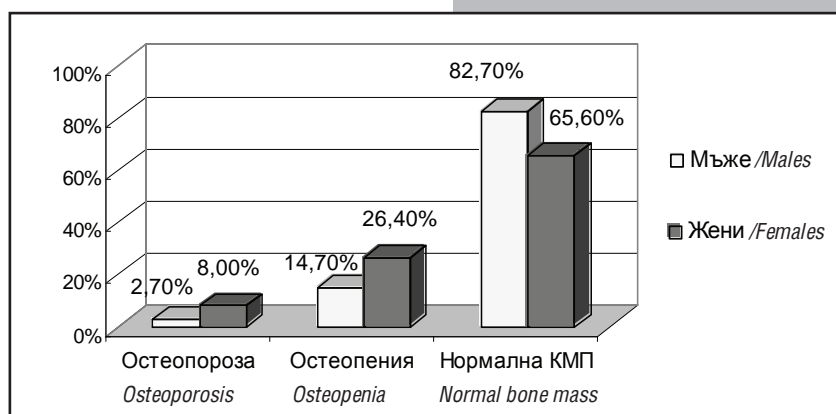


\*1 Ранна менопауза; 2 Аменорея за повече от 12 месеца; 3 Фамилна анамнеза за остеопороза (бедрена фрактура при родителите след слаб удар или падане); 4 Една или повече фрактури след слаб удар или падане; 5 Тютюнопушене (над 20 цигари дневно); 6 Прекомерна алкохолна консумация; 7 Лечение с кортикостероиди над 3 месеца; 8 Чести диарии, следствие на болестта на Крон; 9 Намален ръст с повече от 3 см; 10 Импотентност, липса на либидо или други симптоми, свързани с ниско ниво на тестостерон

### Резултати от ултразвуковата остеометрия

Като цяло остеопороза се открива при 7.8%, а остеопения при 26.0% от извадката. Останалите изследвани лица са с нормална костна маса – 66.2%. Установяват се статистически значими междуполови разлики в честотата на диагностицираните чрез остеометрия остеопороза, остеопения и нормална костна маса –  $P < 0.001$  (Фиг.2).

**Фиг. 2.** Резултати от ултразвуковата остеометрия при мъже и жени



one or more fractures at minimal injury. The first three RF among men were smoking, positive family history to osteoporosis and one or more fractures at minimal injury.

### Results of ultrasound osteodensitometry

In general osteoporosis was found in 7.8% of subjects, osteopenia in 26.0% and normal bone mass – in 66.2%. Statistically significant gender differences in

**Fig. 1** Distribution of risk factors among men and women

\*1 Early menopause; 2 amenorrhea for more than 12 months; 3 Familial predisposition (hip fracture among parents due to blow or fall); 4 One or more fractures due to blow or fall; 5 Smoking more than 20 cigarettes daily; 6 excessive alcohol consumption; 7 Corticosteroid treatment for more than 3 months; 8 Frequent diarrhea due to the Kron disease; 9 More than 3 cm height loss; 10 Impotence, low libido or other symptoms due to the low testosterone

the prevalence of osteoporosis, osteopenia and normal bone mass, diagnosed through osteodensitometry, were established –  $P < 0.001$  (Fig. 2).

Table 2 shows that statistically significant age differences in the prevalence of osteoporosis, osteopenia and normal bone mass were found only among women ( $P < 0.001$ ), but not among men ( $P > 0.05$ ).

**Fig. 2.** Results of QUS among men and women

Както се вижда от представените в Таблица 2 резултати статистически значими възрастови разлики в честотата на остеопороза, остеопения и нормална костна маса се доказват само при жените ( $P < 0.001$ ) и не се отчитат при мъжете ( $P > 0.05$ ).

Таблица 2. Разпространение на остеопороза и ниска костна маса в различните възрастови групи

|   |                                    | Възрастови групи ( години ) |       |       |       |      |      |
|---|------------------------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|------|------|
|   |                                    | Age groups (years)          |       |       |       |      |      |
|   |                                    | <30                         | 31-40 | 41-50 | 51-60 | >60  |      |
| Мъже<br><i>Men</i><br>( $P > 0.05$ )    | Остеопороза<br><i>Osteoporosis</i> | n                           | 1     | 1     | 1     | 1    |      |
|   |                                    | %                           | 9,1   | 3,7   | 1,7   | 2,0  |      |
|   | Остеопения<br><i>Osteopenia</i>    | n                           | 1     | 1     | 4     | 8    |      |
|   |                                    | %                           | 33,3  | 9,1   | 14,8  | 13,3 | 16,3 |
|   | Норма<br><i>Normal</i>             | n                           | 2     | 9     | 22    | 51   | 40   |
|   |                                    | %                           | 66,7  | 81,8  | 81,5  | 85,0 | 81,6 |
| Жени<br><i>Women</i><br>( $P < 0.001$ ) | Остеопороза<br><i>Osteoporosis</i> | n                           | 14    | 39    | 191   | 106  |      |
|   |                                    | %                           | 2,1   | 2,5   | 11,8  | 30,8 |      |
|   | Остеопения<br><i>Osteopenia</i>    | n                           | 14    | 139   | 311   | 540  | 148  |
|   |                                    | %                           | 8,3   | 20,4  | 20,0  | 33,4 | 43,0 |
|   | Норма<br><i>Normal</i>             | n                           | 155   | 529   | 1205  | 888  | 90   |
|   |                                    | %                           | 91,7  | 77,6  | 77,5  | 54,8 | 26,2 |

### Risk factors and bone status

The analysis of osteometric data and those from the survey revealed significantly higher prevalence of osteoporosis and osteopenia among subjects with one or more RF than among those without RF for both men and women ( $P < 0.01$ ) – Table 3.

Table 2. Prevalence of osteoporosis and low bone mass in various age groups

### Рискови фактори и костен статус

Анализът на остеометричните данни и тези от анкетното проучване показва статистически значима по-висока честота на остеопороза и остеопения при лицата с един или повече РФ в сравнение с тези, които не съобщават за РФ, като разликите са статистически значими както при мъжете, така и при жените ( $P < 0.01$ ) – Табл. 3.

Таблица 3. Разпространение на остеопороза и ниска костна маса при лицата с различен рисков профил

Early menopause (34.0%), low-trauma fractures (36.7%), followed by family history of osteoporosis (23.7%) and height reduced by more than 3 cm (23.2%) were the most important risk factors for women with osteoporosis. Women with osteopenia showed the same risk profile, but with 1,4 to 2 times lower prevalence of RF, respec-

Table 3. Prevalence of osteoporosis and low bone mass in subjects with different risk profile

|                      |  | Остеопороза<br><i>Osteoporosis</i> | Остеопения<br><i>Osteopenia</i> | Норма<br><i>Normal</i> |      |
|----------------------|--|------------------------------------|---------------------------------|------------------------|------|
| Мъже<br><i>Men</i>   | Без РФ<br><i>NO RF</i>                         | n                                  | 10                              | 73                     |      |
|                      |  | %                                  | 12,0                            | 88,0                   |      |
|                      | Един или повече<br>РФ<br><i>One or more RF</i> | n                                  | 4                               | 11                     | 45   |
|                      |  | %                                  | 6,7                             | 18,3                   | 75,0 |
| Жени<br><i>Women</i> | Без РФ<br><i>NO RF</i>                         | n                                  | 92                              | 512                    | 1849 |
|                      |  | %                                  | 3,8                             | 20,9                   | 75,4 |
|                      | Един или повече<br>РФ<br><i>One or more RF</i> | n                                  | 250                             | 606                    | 962  |
|                      |  | %                                  | 13,8                            | 33,3                   | 52,9 |

С най-голямо значение при жените с остеопороза са ранната менопауза (34.0%), наличието на нискоенергийни фрактури (36.7%), следвани от фамилната анамнеза за остеопороза (23.7%) и намаленият с над 3 cm ръст (23.2%). Подобен е рисковият профил на жените с остеопения, но честотата на РФ е от 1,4 до 2 пъти по-ниска, съответно – 22.9%, 18.0% и 18.0%, като малко на брой жени от тази група съобщават за намален ръст (5.6%).

Факторът фамилна предиспозиция към остеопороза – 10.2%, е с най-висока честота в групата на жените с нормална костна маса. Разпространението на останалите РФ не превишава тази стойности.

Малкият брой изследвани мъже не позволява да бъдат направени категорични изводи по отношение на разпространението на определени РФ в групите лица с остеопороза, остеопения и нормална костна маса.

#### Оценка на предикторна значимост на рисковите фактори за остеопороза и ниска костна маса при жените

Резултатите от логистичната регресия на дихотомната зависима променлива “нормална костна маса: намалена костна маса (остеопения и остеопороза)”, която включва като детерминанти пола, възрастта, броя рискови фактори и отделните РФ от въпросника, показват, че определящи остеопорозния риск са: женският пол (OR 4,165; 95CI=2,588-6,702), възраст над 50 г. (OR 14,454; 95CI=8,008-26,088), броят на рисковите фактори (OR 1,854; 95CI=1,622-2,119),

В **Таблица 4** са представени резултатите от регресионния анализ, отчитащи предикторната значимост на всички изследвани фактори (възраст, брой рискови фактори и всички айтеми от въпросника) за промените в стойностите на Т-скор при жените. Възрастта, броят на рисковите фактори, наличието на ранна менопауза, положителната анамнеза за остеопороза и регулярното пушене над 20 цигари дневно обясняват над 19% от дисперсията на Т-скор.

Получените чрез този метод данни дават възможност за прогноза на Т-скор при жените чрез включените в регресионното уравнение фактори.

**Таблица 4.** Резултати от регресионния анализ

| Жени<br>Women  |       |                |        |         |
|--|-------|----------------|--------|---------|
| Множествен регресионен модел / <i>multiple regression model</i>  |       |                | ANOVA  |         |
| <i>Регресионно уравнение / regression equation</i>   | R     | R <sup>2</sup> | F      | P       |
| <b>Т-скор</b> / <i>T-score</i> = 0.979 - 0.032*(Възраст / <i>Age</i> ) - 0.264*(Брой РФ / <i>number of RF</i> ) - 0.264*(Ранна менопауза / <i>early menopause</i> ) + 0.133* (Фамилна анамнеза за остеопороза / <i>familial predisposition to osteoporosis</i> ) + 0.211* (Тютюнопушене / <i>Smoking</i> ) | 0.428 | <b>0.194</b>   | 172.19 | <0.0001 |

## Обсъждане

Анализът на данните от анкетното проучване дава възможност да се оцени разпространението на водещите рискови фактори за остеопороза в различните възрастови групи мъже и жени и показва, че те са застъпени почти в еднаква степен при двата

tively - 22.9%, 18.0% and 18.0%. Few women in this group reported a reduced height (5.6 %).

The highest prevalence of familial predisposition to osteoporosis - 10.2%, compared to other RF was found in the group of women with normal bone mass. The prevalence of the other RF was lower.

The small number of male subject did not allow to draw definite conclusions concerning the prevalence of RF in the groups with osteoporosis, osteopenia and normal bone mass.

#### Evaluation of the predictive significance of risk factors for osteoporosis and low bone mass among women

The results of logistic regression of dichotomous dependent variable “normal bone mass”: “low bone mass” (osteopenia and osteoporosis), including determinants like gender, age, number of risk factors and individual RF from the questionnaire, showed that the risk of osteoporosis was determined by: the female gender (OR 4,165; 95CI = 2,588-6,702), the age above 50 years (OR 14,454; 95CI = 8,008-26,088), the number of risk factors (OR 1,854; 95CI = 1,622-2,119).

**Table 4** shows the results of backward multiple regression analysis, which take into account the predictive significance of all investigated factors (age, number of risk factors and all questionnaire’s items) with respect to the changes in T-score values among women. Age, number of risk factors, early menopause, positive osteoporosis history and regular smoking of over 20 cigarettes a day accounted for over 19% of T-score variance.

Data obtained using this method allow predicting the T-score among women through the factors, included into the regression equation.

## Discussion

The analysis of survey data allowed to assess the prevalence of leading risk factors for osteoporosis among various age groups of men and women and showed that they were

**Table 4.** Results of the regression analysis

almost equally present among both genders. The number of RF was found to increase with age among women, but not among men.

A gender-specific distribution of various RF was observed – hormonal factors (early menopause) and

пола. С възрастта броят им нараства при жените, докато при мъжете подобен възрастов градиент не се установява.

Разпределението на различните РФ показва определена полова специфика - при жените водещи са хормоналните фактори (ранна менопауза) и фамилна предиспозиция към остеопороза, докато при мъжете водещата триада включва тютюнопушене, положителна фамилна анамнеза, а хормоналната компонента на риска (ниското ниво на тестостерон) е на предпоследно място. Жените и мъжете се отличават и в разпределението на основните индикатори за наличие на остеопороза – за една или повече фрактури при минимална травма съобщават по-често мъжете и обратно – намаленият с 3 и повече cm ръст (индикатор за компресионни фрактури на прешлените) се отчита при жените и отразява междуполовата специфика в локализацията на остеопорозните фрактури (5). От друга страна е доказано, че индивиди, претърпели фрактура при нискоенергийна травма са с двукратно по-висок риск от бъдещи фрактури, независимо от възрастта, костната минерална плътности и РФ (9). Водещият поведенчески рисков фактор и при двата пола е регулярното пушене над 20 цигари дневно. Еднопосочни са анализирани от нас резултати, от проведената през 2003 г. анкета, сред 1611 лица от 18 до 89-годишна възраст (7).

Доказано е, че остеопорозата е заболяване с мултифакторна генеза и е пряко свързана с намаляване на костната маса, определящо намалената здравина на костите и устойчивостта им на физически въздействия (2,3,8).

Данните от проведената ултразвукова остеометрия сочат, че случаите на остеопения и остеопороза са съответно 1.2 и 1.8 пъти повече при жените в сравнение с мъжете. Резултатите от логистичната регресия, която включва като детерминанти пола, възрастта, броя рискови фактори и отделните РФ от въпросника, показват, че водещите предиктори на остеопенията и остеопорозата са: женският пол, възраст над 50 г., броят на рисковите фактори. Получените от нас резултати съответстват на данните от световната литература, доказващи, че жените, особено след 50-годишната си възраст, са значимо по-засегнати от остеопороза и свързаните с нея фрактури в сравнение с мъжете, независимо от техниките за измерване на костната маса (4,10). Разликите могат да бъдат обяснени с това, че мъжете, от една страна, натрупват значимо по-голяма пикова костна маса поради 2-те допълнителни години на предпубертетен растеж и по-дългия период на пубертетно съзряване, т.е. по-големия “период на скелетна консолидация” (като величина и продължителност) (11). От друга страна, липсата на менопаузален еквивалент води до значимо по-късна и по-слаба възрастово обусловена костна загуба при тях (4).

Представеният регресионен модел сочи, че костният статус при жените се определя в значима степен освен от възрастта и броя на РФ, от фамилната анамнеза за остеопороза, хормоналния статус и тютюнопушенето. Костната маса се намира под силен генетичен контрол, доказателствата за което се основават както на изследвания на двойки близнаци, така и на данни от фамилни проучвания. Приема се, че около 70% (50-90%) от вариативността на костната

familial predisposition to osteoporosis were leading among women and the triade of smoking, hormonal risk component (low testosterone levels) and positive family history, arranged according to their significance, were leading among men. Differences were found between women and men in the distribution of basic indicators for osteoporosis – men reported more frequently one or more fractures at minimal trauma while women reported 3 cm and more reduced height (indicator of compression vertebral fractures), which illustrated the gender-specific localization of osteoporosis fractures (5). On the other hand, it has been shown that individuals who have suffered from fracture at low-trauma injury, have two times greater risk of further fractures, in spite of their age, bone mineral density and RF (9). Regular smoking of over 20 cigarettes a day was found to be the leading behavioral risk factor for both genders. The analyzed results from the survey, carried out in 2003 among 1611 individuals, aged from 18 to 89 years, were similar (7).

It has been shown that osteoporosis is a disease with multifactorial genesis, which is directly related to the decreased bone mass, determining the reduced bone strength and the lower resistance to physical load (2,3,8).

Data from QUS indicated 1.2 and 1.8 times higher prevalence of osteopenia and osteoporosis among women compared to men. Results from logistic regression, including determinants like gender, age, number of risk factors and individual RF from the questionnaire, pointed out that the female gender, age above 50 years, number of risk factors were the leading predictors of osteopenia and osteoporosis. Our results are consistent with world literature data, providing evidence that women, especially after the age of 50, suffer significantly more from osteoporosis and related fractures compared to men, regardless of the techniques for bone mass measurement (4, 10). These differences can be explained, on one hand, by the significantly greater peak bone mass, accumulated in men during the two additional years of prepubertal growth and the longer period of pubertal maturation, i.e. the longer “period of skeletal consolidation” (with respect to its magnitude and duration) (11). On the other hand, the lack of menopausal equivalent among men induces a significantly later and lower age-related bone loss (4).

The presented regression model shows that the bone status of women is significantly more dependent not only on the age and the number of RF, but also on the family history of osteoporosis, hormonal status and smoking. The bone mass is under strong genetic control, according to the evidence from twin and family studies. It is estimated that about 70% (50-90%) of the bone density variation in is due to heredity. The degree of genetic determination expression changes with age and varies in various skeletal sections – being more pronounced in younger age and in spine compared to extremities (12,13).

A great number of epidemiological studies provide evidence for an inverse correlation between bone mineral

плътност се дължи на наследствеността. Степента на проява на генетичната обусловеност се променя с възрастта и е различна в различните скелетни точки – по-силно изразена в млада възраст и в гръбначния стълб в сравнение с крайниците (12,13).

Множество епидемиологични проучвания доказват обратна корелационна зависимост между костната минерална плътност и хормоналните промени и сочат, че късното менархе или аменореята при спортистки, балерини или момичета, болни от анорексия, е значим рисков фактор за остеопения, субоптимална ПКМ и развитие на остеопороза в зряла възраст (14,15). Естрогенният дефицит преди настъпването на менопаузата (аменорея над 3 месеца), ранната менопауза и хипогонадизмът са също едни от водещите рискови фактори за остеопороза и последващи фрактури (4,10).

Тютюнопушенето е поведенчески рисков фактор, повлияващ в значима степен костния метаболизъм. Никотинът и кадмият, съдържащи се в цигарите, оказват директен токсичен ефект върху костните клетки. Предполага се, че никотинът потиска функциите на остеобластите. Индиректно тютюнопушенето влияе върху костната хомеостаза, като намалява калциевата абсорбция в червата (3,16).

Жените, които пушат системно, са с по-ниска костна плътност в сравнение с непушачките и поради това, че тютюнопушенето се свързва с по-ниски нива на естрогените, по-ранна менопауза и намалена телесна маса (17). Доказано е, че тютюнопушенето повишава риска от бедрени фрактури с 31% при жените и с 40% при мъжете пушачи в сравнение с непушачите, при еднаква костна плътност, индекс на телесна маса и възраст (16).

Трябва да подчертаем, че въпросите на “Едноминутен тест за оценка на риска от остеопороза” не обхващат цялата рискова констелация за развитие на заболяването и не дават възможност да бъде отчетено влиянието на такива фактори като: телесна конституция (телесна маса и ръст); възраст на настъпване на менопаузата; обездвижване и намалена двигателна активност; намален прием на Са; състояния, водещи до намалено усвояване на Са (лактозен дефицит, хранителните алергии и др.) или повишена загуба на Са (в случая болестта на Крон не може да даде пълна картина на малабсорбционния синдром); ендокринни или гинекологични заболявания и други ятрогенно обусловени състояния, отговорни за развитието на вторична остеопороза.

## Изводи

1. От направеното проучване чрез анкетен въпросник и ултразвукова денситометрия се установява наличието и обхватът на проблема остеопороза сред здрави индивиди в активна възраст.
2. Резултатите от ултразвуковата остеометрия показват, че от остеопороза са засегнати 7,8% от изследваните - почти три пъти повече жени (8,0%), отколкото мъже (2,7%). Още 26,0% от извадката са с остеопения (26,40% жени и 14,70% мъже).
3. Установява се, че популационният риск за остеопороза е статистически значимо по-нисък при мъжете в сравнение

density and hormonal changes, indicating that the late menarche or amenorrhea among sportswomen, ballet-dancers or girls, suffering from anorexia, is a significant risk factor for osteopenia, suboptimal peak bone mass and OP in adult age (14,15). The estrogenic deficit before the onset of menopause (amenorrhea for more than 3 months), early menopause and hypogonadism are also among the leading risk factors for osteoporosis and subsequent fractures (4,10).

Smoking is a behavioral risk factor, significantly influencing bone metabolism. Nicotine and cadmium, contained in cigarettes, have a direct toxic effect on bone cells. It is presumed that nicotine inhibits osteoblast function. Smoking indirectly affects bone homeostasis, reducing intestinal calcium absorption (3,16).

Women smokers have lower bone density compared to non-smokers also because smoking is associated with lower estrogen levels, earlier menopause and reduced body weight (17). It has been demonstrated that the smoking increases the risk of hip fractures by 31% in women and 40% smokers men compared to non-smokers with same bone density, body mass index and age (16).

We must emphasize that the questions of “One-minute osteoporosis risk test” do not cover the whole risk constellation for the disease and do not allow to assess the influence of factors like: body constitution (body mass and height), age of menopause onset; lack of physical activity and reduced motor activity; reduced Ca intake; medical conditions leading to reduced Ca absorption (lactase deficiency, nutritional allergies etc.) or increased Ca loss (in this case the Crohn’s disease is only a part of the malabsorption syndrome); endocrine or gynecological diseases and iatrogenic conditions, responsible for the development of secondary osteoporosis.

## Conclusions

1. The present study, using questionnaire and QUS, identifies the presence and extent of osteoporosis among healthy and active-age individuals.
2. The results of ultrasound osteodensitometry show that osteoporosis affected 7.8% of subjects - almost three times more women (8.0%) than men (2.7%). Another 26.0 % of the sample had osteopenia (26.40% women and 14.70% men).
3. It has been found that the population risk of osteoporosis was significantly lower among men and increased with age among women. The higher risk status was observed among women aged above 50 years. The leading determinants of osteopenia and osteoporosis: female gender, age above 50 years and number of risk factors were identified through logistic regression.
4. The leading predictors of reduced bone mass in women were hormonal factors, positive family history and regular smoking of over 20 cigarettes a day as well as indicators for the presence of osteoporosis - one or more

с жените и при жените нараства с възрастта. С най-висок рисков статус са жените след 50-годишна възраст. Чрез логистична регресия са посочени водещите детерминанти на остеопенията и остеопорозата - женски пол; възраст над 50 г. и брой на рисковите фактори.

4. Водещи предиктори на намалената костна маса при жените са хормоналните фактори, положителната фамилна анамнеза и регулярното тютюнопушене над 20 цигари дневно, както и индикаторите за наличие на остеопороза – една или повече фрактури при минимална травма и намален ръст с повече от 3 см. Предложеното регресионно уравнение може да послужи за прогнозиране на стойностите на Т-скор при изследване с ултразвукова остеометрия. Малкият брой изследвани мъже не позволява да бъдат направени категорични изводи по отношение на връзката на рисковите фактори и състоянието на костната система.

5. За да се извърши по-прецизна оценка на въздействието на рисковите фактори за разпространението на остеопорозата, се налага да бъде разработен, стандартизиран и валидиран въпросник, който да включва по-голям брой фактори и дименсии на остеопорозния риск. Само по този начин ранното идентифициране на рисковата констелация в различните възрастови периоди при мъже и жени ще даде научно обоснована основа за насочени интервенционни подходи, които ще доведат до редуциране на индивидуалното и популационното равнище на риска за остеопороза и свързаните с нея фрактури.

## Книгопис/ References

1. Доклад по остеопорозата в Европейския съюз. Остеопороза, 2000. Сигнален брой, Ноември, 17-20./ Report on Osteoporosis in EU, 2000.
2. National Institutes of Health. Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. Consensus Development Conference Statement. March 27-29, 2000. Available at: <http://consensus.nih.gov/2000/2000Osteoporosis1111.html>. (Accessed Sept 9, 2008).
3. Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville, MD: US Dept of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General; 2004. Available at: <http://www.surgeongeneral.gov/library/bonehealth/content.html>. (Accessed Sept 9, 2008).
4. Bonnick, SL. Osteoporosis in men and women. Clin Cornerstone. 2006;8:28-39.
5. Cummings SR, Melton LJ III. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. Lancet 2002; 359:1761-1767.
6. Boyanov M, Poivanov P. Epidemiology of osteoporosis in Bulgaria. Bulgarian Journal of Osteoporosis. 2001, 1: 2-16.
7. Manolova A. Osteoporosis risk factors in Bulgarian adult population. Application of MSD questionnaire for osteoporosis risk evaluation. Bulgarian Journal of Osteoporosis. 2004, 2: 12-23
8. Kanis J.A. and Gluer C.C. for the Committee of Scientific Advisors, IOF. An Update on the Diagnosis and Assessment of Osteoporosis with Densitometry. Osteoporosis Int. 2000, 11: 192-202
9. Klotzbuecher C, et al. Patients with prior fractures have an increased risk

low trauma fractures and height loss by more than 3 cm. The proposed regression equation could be used to predict the T-score values at examination through ultrasound osteodensitometry. The small number of studies among men do not allow to draw definite conclusions concerning the relationship between risk factors and bone status.

5. In order to provide a more precise assessment of the impact of risk factors on the prevalence of osteoporosis, a standardized validated questionnaire, covering a larger number of factors and dimensions of the risk for osteoporosis, should be developed. Thus the early identification of the risk constellation in various age periods of men and women will provide a scientific basis for targeted intervention approaches that will lead to reduction of individual and population level of risk for osteoporosis and related fractures.

of future fractures: A summary of the literature and statistical synthesis. J Bone Miner Res. 2000;15; 4: 721-39.

10. Geusens P, Dinant G. Integrating a gender dimension into osteoporosis and fracture risk research. Gen Med. 2007;4 Suppl B:S147-61.
11. Bonjour JP, Rizzoli R. Bone acquisition in adolescence. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. Osteoporosis. San Diego: Academic Press; 1996, 465-476.
12. Nguyen TV, Blangero J, Eisman JA. Genetic epidemiological approaches to the search for osteoporosis genes. J Bone Miner Res. 2000, 15;3: 392-401.
13. Ralston SH. Genetics of osteoporosis. Proc Nutr Soc. 2007;66; 2:158-65.
14. Cooke R, Sawyer SM. Eating disorders in adolescence. An approach to diagnosis and management. Aust Fam Physician. 2004; 33; 1-2:27-31.
15. Fenichel RM, Warren MP. Anorexia, bulimia, and the athletic triad: evaluation and management. Curr Osteoporosis Rep. 2007; 5; 4:160-4.
16. Ward KD, Klesges RC. A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. Calcif-Tissue-Int. 2001; 68;5: 259-70
17. Tansavatdi K, McClain B, Herrington DM. The effects of smoking on estradiol metabolism. Minerva Ginecol. 2004; 56; 1:105-14.

## Адрес за кореспонденция:

Д-р А. Манолова, дм  
Национален център по опазване на общественото здраве  
бул. Акад. Ив. Гешов № 15, София  
Тел: 02/ 8056 294  
E-mail: a.manolova@ncphp.government.bg

## Address for correspondence:

Antoaneta Manolova  
National Center of Public Health Protection  
15, Blvd „Akad. Ivan Evst. Geshov”, Sofia 1431  
Tel: +359 2/ 8056 294  
E-mail: a.manolova@ncphp.government.bg

## ПРОУЧВАНЕ НА ФАКТИЧЕСКОТО НАЛИЧИЕ НА УЛТРАВИОЛЕТОВИ (UV) ФИЛТРИ В БЪЛГАРСКИ СЛЪНЦЕЗАЩИТНИ КОЗМЕТИЧНИ ПРОДУКТИ

Стоянка Узунова, Антон Тачев, Диана Чохаджиева,  
Надя Василева

Национален център по опазване на общественото здраве

### Резюме

Защитата от UV лъчи се определя от вложените UV филтри в козметичните продукти. Съдържанието им е строго регламентирано в европейското и в българското законодателство. Необходим е строг контрол за спазване на тези норми. За разделяне и определяне на UV филтри, при тяхното съвместно присъствие в слънцезащитни козметични продукти, се използват предимно високочувствителни методи с високоефективна течна хроматография.

Целта на проучването е да се установи реалното съдържание на UV филтрите, обявени от производителя върху етикетите и в досието на български слънцезащитни козметични продукти и съответствието с изискванията на законодателството.

Проучването е проведено с 18 български слънцезащитни козметични продукта на четири български производители. За разделянето и определянето на всички, съдържащи се в изпитваните козметични продукти UV филтри са използвани разработени и валидирани в НЦООЗ методи с високоефективна течна хроматография (HPLC) и спектрофотометрични методи.

Общо са изпитани 56 UV филтъра в 18 проби козметични продукти. Получените резултати показват несъвпадение на установеното реално съдържание на UV филтри, при 34 (60,7%) от всички изпитвания (общо 56), като при 3 от тях (5,3%) UV филтрите не се откриват, при 22 (39,3%) - са пониски от обявените в рецептурата средно с 40,76%, а при 9 (16,1%) - са по-високи средно с 23,5%.

Тези данни доказват отсъствието на контрол от страна на производителите при влагането на UV филтри в козметичните продукти за стриктно спазване на рецептурата, при хомогенизирането на продуктите, а също така и при следене за стабилността на UV филтрите в козметичните продукти. Необходимо е провеждането на подобни изследвания от страна на контролните органи за недопускане на такива несъответствия.

Независимо, че получените концентрации не превишават максимално допустимите по европейското и българското законодателство, всяко намалено влагане, отсъствие или предозирание спрямо рецептурата води до промяна на обявената върху етикета категория на защита от UV лъчи и до дезинформация на потребителите, с риск от увреждане при продължителна експозиция на слънце.

**Ключови думи:** UV филтри, слънцезащитни козметични продукти, методи за изпитване, концентрация

## STUDY ON THE PRESENCE OF ULTRAVIOLET (UV) FILTERS IN BULGARIAN SUNSCREEN PRODUCTS

Stoyanka Uzunova, Anton Tachev,  
Diana Chohadjieva, Nadia Vasileva

National Center of Public Health Protection

### Abstract

The protection against UV rays is determined by the incorporated UV filters in cosmetic products. The content of UV filters is strictly regulated by European and Bulgarian legislation. Strict control is needed for the observation of these regulations. For separation and determination of UV filters in their combined presence in sunscreens high performance liquid chromatography (HPLC) methods with highly effective liquid chromatography were mainly used.

The aim of this study was to establish the real content of UV filters, indicated on the labels by producers and in the dossier of Bulgarian sun protection products, as well as the compliance with legislation requirements.

The study was conducted on 18 Bulgarian sunscreens produced by four Bulgarian companies. For separation and determination of all UV filters contained in tested sunscreens HPLC methods with high effective liquid chromatography and spectrophotometric methods developed and validated at the National Center for Public Health Protection (NCPHP) were used.

A total of 56 UV filters in 18 samples of cosmetic products were tested. The results obtained showed a discrepancy of the established real content of UV filters in 34 (60,7%) of all tests (a total of 56), as in 3 of them (5,3%) UV filters were not detected, in 22 (39,3%) – they were lowered than the declared ones in the formulation by average of 40,76%, and in 9 (16,1%) – higher by average of 23,5%.

These data show the lack of strict control on the observation of formulations on behalf of the producers for the incorporation of UV filters, homogenization of the products as well as ascertainment of the stability of UV filters in cosmetic products. The conduction of similar studies is necessary for the regulatory bodies in order to avoid the above mentioned discrepancies.

Independently of the fact that the received concentrations do not exceed the maximum admissible concentrations adopted by European and Bulgarian legislation each decreased incorporation, absence or overdosing versus the stated formulation leads to a change in the factor of sun protection against UV rays declared on the label and misleads the consumers which can cause a risk for damages at long-term sun exposure.

**Key words:** UV filters, sun protection cosmetic products, test methods, concentrations

В козметичните продукти за продължително излагане на слънце, с цел максимална защита на кожата, се влагат различни UV филтри за съчетана защита от UVB и UVA лъчи – химични и физични. Съдържанието на UV филтри в козметичните продукти е строго регламентирано в европейското (DIR.76/768/ЕЕС и нейните изменения и допълнения) и в българското законодателство - Наредба № 36 на МЗ и нейните изменения и допълнения (1). Необходим е строг контрол за спазване на тези норми. От друга страна, недостатъчната концентрация на UV филтри за постигане на обявената върху етикета защита, довежда до неблагоприятни ефекти от въздействието на UV лъчи.

За разделяне и определяне на UV филтри при тяхното съвместно присъствие в слънцезащитни козметични продукти, се използват предимно високочувствителни методи с високоефективна течна хроматография. Kedor-Hackman et al. (2) разделят и определят количествено с високоефективна течна хроматография пет от най-често използваните в слънцезащитни козметични продукти UV филтри ( оксibenзон, бутил метоксибензоил метан, октил метоксицианат, октил салицилат и хомосалат). Други автори (3) предлагат аналитичен метод за определяне на UV филтри, основаващ се на твърдофазова екстракция, последвана от високоефективна течна хроматография. L.Dencausse et al (4) също предлагат метод с високоефективна течна хроматография с диодарей детектор за съвместно определяне на Тиносорб S и три други слънцезащитни UV филтри – оксibenзон, бутилметоксибензоил метан и октилметоксицианат. A.Chisvert et al. (5) определят най-използваните водоразтворими UV филтри – сулисобензон (бензофенон-4), терефталиден дикамфор сулфонова киселина и 2-фенилбензимидазол-5-сулфонова киселина, в слънцезащитни спрейове и на водна основа. Те използват течнохроматографска техника с подвижна фаза етанол: ацетатен буфер pH=4,6 (30:70 v/v).

Целта на проучването е да се установи реалното съдържание на UV филтрите, обявени от производителя върху етикетите и в досието на български слънцезащитни козметични продукти и съответствието с изискванията на законодателството.

## Материали и методи

Проучването е проведено с 18 български слънцезащитни козметични продукта на четири български производители, които са кодирани с кодове B1, B2, B3 и B4, с цел запазване на фирмената тайна:

Проба 1 на производител B1 - Слънцезащитен лосион, съдържащ UV филтри: Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Octyl Salicylate, Homosalate, 2-Phenylbenzimidazole-5-sulfonic Acid, Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate.

Проба 2 на производител B1 – Слънцезащитен крем за лице, съдържащ UV филтри: Octyl Triazone, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Titanium Dioxide.

Проба 3 на производител B2 – Масло за интензивен загар, съдържащо UV филтър: Octyl Methoxycinnamate.

Cosmetic products applied for maximal skin protection against long-term sun exposure contain UV filters for combined protection against UVA and UVB radiation – physical and chemical. The content of UV filters in cosmetic products is definitely regulated by EU legislation (DIR 76/768/EEC and its amendments and annexes) and by Bulgarian regulations (Ordinance № 36 of the Ministry of Health and its amendments and annexes) (1). The observation of the stipulated limits has to be strictly controlled. On the other hand, the insufficient concentration of UV filters for achieving the safety indicated on the label can lead to adverse effects of UV radiation.

Chromatographic methods (HPLC) were applied for separation and quantitative determination of UV filters in sunscreen formulations. Kedor-Hackman et al. (2) separate and determine quantitatively 5 UV filters widely used in sun protection cosmetics by HPLC method (Oxybenzone, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octyl Methoxycinnamate, Octyl Salicylate and Homosalate). Other authors (3) propose an analytical method based on solid phase extraction followed by HPLC determination of UV filters. L.Dencausse et al (4) also propose a HPLC method with a diode array detector for determination of Tinosorb S and three other sunscreen agents – oxybenzone, butyl methoxydibenzoylmethane and octyl methoxycinnamate. A.Chisvert et al., (5) determine the three most used water soluble UV filters – sulisobenzon (benzophenone-4), terephthalidene dicamphor sulfonic acid and 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid in aqueous sunscreen sprays. They use a liquid chromatography technique with a mobile phase of ethanol-acetate buffer of pH 4.6 (30:70, v/v).

The aim of this study was to establish the real content of UV filters, indicated on the labels by producers and in the dossier of Bulgarian sun protection products, as well as the compliance with legislation requirements.

## Materials and methods

The study was conducted on 18 Bulgarian sunscreens produced by four Bulgarian companies coded with B1, B2, B3 and B4 in order to protect trade secrets.

Sample #1 of the Company B1 – Sun protection lotion containing UV filters: Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Octyl Salicylate, Homosalate, 2-Phenylbenzimidazole-5-sulfonic Acid, Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate.

Sample #2 of the Company B1 – Sun protection cream for face containing UV filters: Octyl Triazone, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Titanium Dioxide.

Sample #3 of the Company B2 – intensive sun (tanning) oils, containing UV filter: Octyl Methoxycinnamate.

Sample #4 of the Company B2 – Sun protection milk, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Titanium Dioxide.

Проба 4 на производител Б2 – Слънцезащитно мляко, съдържащо UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Titanium Dioxide.

Проба 5 на производител Б2 – Слънцезащитно мляко, съдържащо UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Titanium Dioxide.

Проба 6 на производител Б2 – Слънцезащитно мляко, съдържащо UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium Dioxide.

Проба 7 на производител Б2 – Слънцезащитно мляко, съдържащо UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium Dioxide.

Проба 8 на производител Б2 – Слънцезащитно мляко, съдържащо UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium Dioxide.

Проба 9 на производител Б2 – Слънцезащитно мляко, съдържащ UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium Dioxide.

Проба 10 на производител Б2 – Слънцезащитен крем за лице, съдържащ UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium Dioxide.

Проба 11 на производител Б3 – Слънцезащитен лосион, съдържащ UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane.

Проба 12 на производител Б3 – Слънцезащитен лосион, съдържащ UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane

Проба 13 на производител Б3 – Слънцезащитен лосион, съдържащ UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Titanium Dioxide.

Проба 14 на производител Б3 – Слънцезащитен лосион, съдържащ UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Titanium Dioxide.

Проба 15 на производител Б3 – Слънцезащитен лосион, съдържащ UV филтри: Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Titanium Dioxide.

Проба 16 на производител Б4 – Слънцезащитен крем с екстракт от алое вера, съдържащ UV филтри: Oxybenzone, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Octyl Salicylate, Titanium Dioxide.

Проба 17 на производител Б4 – Слънцезащитно плажно мляко за деца с Д-пантенол + растителен и витаминен комплекс, съдържащо UV филтри: Oxybenzone, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Octyl Salicylate.

Проба 18 на производител Б4 – Слънцезащитен крем за лице с розова вода, витамин Е, масло от шеа и макадамия, съдържащ UV филтри: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Octyl Salicylate .

За разделянето и определянето на всички, съдържащи се в изпитваните козметични продукти UV филтри, са използвани разработени и валидирани в НЦООЗ методи

Sample #5 of the Company B2 – Sun protection milk, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Titanium Dioxide.

Sample #6 of the Company B2 – Sun protection milk, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium Dioxide.

Sample #7 of the Company B2 – Sun protection milk, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium Dioxide.

Sample #8 of the Company B2 – Sun protection milk, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium Dioxide.

Sample #9 of the Company B2 – Sun protection milk, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium Dioxide.

Sample #10 of the Company B2 – Sun protection face cream, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium Dioxide.

Sample #11 of the Company B3 – Sun protection lotion, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane.

Sample #12 of the Company B3 – Sun protection lotion, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane

Sample #13 of the Company B3 – Sun protection lotion, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Titanium Dioxide.

Sample #14 of the Company B3 – Sun protection lotion, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Titanium Dioxide.

Sample #15 of the Company B3 – Sun protection lotion, containing UV filters: Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Titanium Dioxide.

Sample #16 of the Company B4 – Aloe Vera sun protection cream, containing UV filters: Oxybenzone, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Octyl Salicylate, Titanium Dioxide.

Sample #17 of the Company B4 – Sun protection milk for kids with D-panthenol + herbal and vitamin complex, containing UV filters: Oxybenzone, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Octyl Salicylate.

Sample #18 of the Company B4 – Sun protection face cream with rose water, vitamin E, shea butter and macadamia nut oil, containing UV filters: Octyl Methoxycinnamate, Oxybenzone, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Octyl Salicylate.

At the National Center of Public Health Protection (NCPHP) HPLC and spectrophotometric methods (6) for separation and determination of UV filters in sunscreens were developed and validated.

HPLC methods for the separation and determination of chemical UV filters were used following the

с високоефективна течна хроматография (HPLC) (6) и спектрофотометрични методи (6).

За разделянето и определянето на химичните UV филтри са използвани HPLC методи, при следната хроматографска система: течен хроматограф – „Agilent” HP1050 UV-детектор; колона-LiChrospher®100 RP-18 – 5 µm Merck; термостат за колоната – 30°C; инжектор: Rheodyne 750; софтуер за обработка на данни: ChemStation.

За приготвяне на пробите, на аналитична везна с точност ± 0,0001g, са претегляни 0,01g от козметичния продукт в бехерова чаша от 25 cm<sup>3</sup> и количествено са прехвърляни с етилов алкохол в мерителна колба от 50 cm<sup>3</sup>. От така получения разтвор на пробата са филтрувани две успоредни проби през филтър 0.45 µm и са инжектирани по 50 µl в инжектора на течния хроматограф.

Хроматографското разделяне и определяне на Octyl Methoxycinnamate в проби 3, 4, 5, Octyl Methoxycinnamate в проби 11, 12, 13, 14, 15 (при съвместно присъствие с Butyl Methoxydibenzoylmethane), Octyl Methoxycinnamate и Oxybenzone в проби 6, 7, 8, 9, 10, Octyl Salicylate и Octocrylene в проба 1 (при съвместно присъствие с Butyl Methoxydibenzoylmethane, Homosalate, 2-Phenylbenzimidazole 5-Sulfonic Acid и Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate), Octocrylene в проба 2 (при съвместно присъствие с Butyl Methoxydibenzoylmethane и Octyl Triazone) и в проба 15 (при съвместно присъствие с Butyl Methoxydibenzoylmethane), Oxybenzone, Octocrylene и Octyl Salicylate в проби 16, 17 (при съвместно присъствие с Butyl Methoxydibenzoylmethane), Oxybenzone, Octocrylene, Octyl Salicylate и Octyl Methoxycinnamate в проба 18 (при съвместно присъствие с Butyl Methoxydibenzoylmethane) е проведено при следните хроматографски условия: подвижна фаза: ацетонитрил : дейонизирана вода (80 : 20) (V/V), поток - 1,2 ml/min, детекция - 310 nm, обем на инжектиране – 50 µl.

Определянето на Octyl Triazone в проба 2 (при съвместно присъствие с Butyl Methoxydibenzoylmethane и Octocrylene) е проведено при следните хроматографски условия: подвижна фаза : тетраhydroфуран : ацетонитрил (8 : 92) (V/V), поток - 1,2 ml/min, детекция - 295 nm, обем на инжектиране – 50 µl, работна температура на колоната – 30°C.

Определянето на Butyl Methoxydibenzoylmethane, при съвместно присъствие с Octocrylene, Octyl Salicylate, Homosalate, 2-Phenylbenzimidazole 5-Sulfonic Acid и Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate – в проба 1, при съвместно присъствие с Octocrylene и Octyl Triazone – в проба 2, при съвместно присъствие с Octyl Methoxycinnamate – в проби 11, 12, 13, 14, при съвместно присъствие с Octocrylene – в проба 15, при съвместно присъствие с Oxybenzone, Octocrylene и Octyl Salicylate – в проби 16, 17, при съвместно присъствие с Oxybenzone, Octocrylene, Octyl Salicylate и Octyl Methoxycinnamate – в проба 18, е проведено при следните хроматографски условия: подвижна фаза : метанол : дейонизирана вода : ацетонитрил (64 : 16 : 20) (V/V/V), поток – 1,0 ml/min, детекция - 357 nm, обем на инжектиране – 50 µl, работна температура на колоната – 30°C.

chromatographic scheme: liquid chromatograph – „Agilent” HP1050 UV-detector; column – LiChrospher®100 RP-18 – 5 µm Merck; column thermostat – 30°C; injector: Rheodyne 750; ChemStation. software for data processing.

For the sample preparation 0,01g of the cosmetic product contained in beher glass of 25 cm<sup>3</sup> were weighed on analytical scales with accuracy of ± 0,0001g and quantitatively with ethyl alcohol were transferred to a measuring flask of 50 cm<sup>3</sup>. From the received solution of the sample two parallel samples were filtered through 0.45 µm filter and were injected by 50 µl in the injector of liquid chromatography.

The chromatographic separation and determination of Octyl Methoxycinnamate in samples #3, 4, 5, Octyl Methoxycinnamate in samples #11, 12, 13, 14, 15 (combined with content of Butyl Methoxydibenzoylmethane), Octyl Methoxycinnamate and Oxybenzone in samples #6, 7, 8, 9, 10, Octyl Salicylate and Octocrylene in sample 1 (in combination with content of Butyl Methoxydibenzoylmethane, Homosalate, 2-Phenylbenzimidazole 5-Sulfonic Acid and Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate), Octocrylene in sample #2 (in combination with content of Butyl Methoxydibenzoylmethane and Octyl Triazone) and in sample #15 (in combination with content of Butyl Methoxydibenzoylmethane), Oxybenzone, Octocrylene and Octyl Salicylate in samples #16, 17 (in combination with content of Butyl Methoxydibenzoylmethane), Oxybenzone, Octocrylene, Octyl Salicylate and Octyl Methoxycinnamate in sample #18 (in combination with content of Butyl Methoxydibenzoylmethane) was carried out in the following chromatographic conditions: mobile phase : acetonitrile : deionized water (80 : 20) (V/V), flow rate – 1,2 ml/min, detection - 310 nm, injection volume – 50 µl.

The determination of Octyl Triazone in sample #2 (in combination with content of Butyl Methoxydibenzoylmethane and Octocrylene) was conducted at the following chromatographic conditions: mobile phase : tetrahydrofuran : acetonitrile (8 : 92) (V/V), flow rate - 1,2 ml/min, detection - 295 nm, injection volume – 50 µl, work column temperature – 30°C.

The determination of Butyl Methoxydibenzoylmethane, in combination with content of Octocrylene, Octyl Salicylate, Homosalate, 2-Phenylbenzimidazole 5-Sulfonic Acid and Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate – in sample #1, in combination with content of Octocrylene and Octyl Triazone – in sample #2, in combination with content of Octyl Methoxycinnamate – in samples #11, 12, 13, 14, in combination with content of Octocrylene – in sample #15, in combination with content of Oxybenzone, Octocrylene and Octyl Salicylate – in samples #16, 17, in combination with content of Oxybenzone, Octocrylene, Octyl Salicylate and Octyl Methoxycinnamate – in sample #18, was performed in chromatographic conditions as follows: mobile phase : methanol : deionized water :

Определянето на Homosalate в проба 1 (при съвместно присъствие с Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Octyl Salicylate, 2-Phenylbenzimidazole 5-Sulfonic Acid и Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate) е проведено при следните хроматографски условия: подвижна фаза: ацетонитрил : 2% -ен разтвор на ледена оцетна киселина в дейонизирана вода (80:20) (V/V), поток – 1,4 ml/min, детекция – 309 nm, обем на инжектиране – 50 µl, работна температура на колоната – 30°C.

Определянето на химичния UV филтър: 2-Phenylbenzimidazole 5-Sulfonic Acid и неговата натриева сол в проба 1 е извършено с валидиран спектрофотометричен метод на НЦООЗ (6). С този метод UV филтърът може да се определя при съвместното присъствие с други химични и физични UV филтри, тъй като се разтваря в 0,05 M натриев хидроксид (воден разтвор).

Определянето на физичния UV филтър Титанов диоксид в проби 2,4,5,6,7,8,9,10,13,14,15,16 (при съвместно присъствие с други химични UV филтри) е извършено с валидиран тегловен метод на НЦООЗ (6), основаващ се на изгаряне на органичните вещества на козметичния продукт при висока температура (550-600°C) и последващо тегловно определяне на сухия остатък.

## Резултати

Данните от проведените химични изпитвания на 18-те слънцезащитни козметични продукта, за установяване на фактическото наличие на обявените от производителите UV филтри в състава на слънцезащитните козметични продукти, са представени на **Табл.1** и **Табл.2**. В състава на продуктите са използвани в различни съчетания и самостоятелно 10 различни UV филтъра (9 химични и 1 физични): Octyl Methoxycinnamate, Octyl Salicylate, 2-Phenylbenzimidazole-5-Sulfonic Acid и нейната натриева сол - Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate, Octyl Triazone, Octocrylene, Oxybenzone, Homosalate, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Titanium Dioxide.

Общо са изпитани 56 UV филтъра в 18 проби козметични продукти. Случаите, при които намерените количества UV филтри са с отклонения в рамките на допустимия процент  $\pm 10\%$  от вложените количества, са 21 (37.5%). Съвпадение на данните от изпитванията, с данните, обявени от производителя, има само при едно от изпитванията. При 22 (39,3%) от изпитванията са установени по-ниски от обявените в досието концентрации, средно с 40,76% (от 13,6 до 80%), а при 9 (16,1%) от изпитванията – по-високи концентрации – средно с 23,5% (от 11% до 46%). Има три случая, при които обявеното съдържание на UV филтри не се открива, което означава 100% различие в данните. Колкото по-малки са обявените количества, толкова по-малка е вероятността реално да бъдат открити във вложените количества или изобщо да не бъдат открити.

Откроява се производител Б2. При изпитването на негови продукти се намират абсолютни несъответствия на обявените и намерени количества. От проведените 20 изпитвания на UV филтри на 7-те му продукта, съвпадение и в рамките на допустимите 10% отклонения са само 2 (10%). От останалите,

acetonitrile (64 : 16 : 20) (V/V/V), flow rate – 1,0 ml/min, detection – 357 nm, injection volume – 50 µl, work column temperature – 30°C.

The determination of Homosalate in sample #1 (in combination with content of Butyl Methoxydibenzoylmethane, Octocrylene, Octyl Salicylate, 2-Phenylbenzimidazole 5-Sulfonic Acid and Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate) was carried out in the following conditions: mobile phase : acetonitrile : 2% of solution of frozen acetic acid in deionized water (80:20) (V/V), flow rate – 1,4 ml/min, detection – 309 nm, injection volume – 50 µl, work column temperature – 30°C.

The determination of chemical UV filter: 2-Phenylbenzimidazole 5-Sulfonic Acid and its sodium salt in a sample #1 was conducted by validated spectrophotometric method of the NCPHP (6). By using this method the UV filter can be determined in combination with the presence of other chemical and physical UV filters, as it is dissolved in 0,05 M sodium hydroxide (aqueous solution).

The determination of the physical UV filter of titanium dioxide in samples #2,4,5,6,7,8,9,10,13,14,15,16 (in combination with other chemical UV filters) was performed by validated weighing method of the NCPHP (6), based on burning of the organic substances of cosmetic product at high temperature (550-600°C) and following determination by weighing of the dry residue.

## Results

The data obtained from chemical tests on 18 sunscreen cosmetic products for determination of the real content of UV filters in sunscreen formulations announced by the producers are given in **Table 1** and **Table 2**. Ten different UV filters (9 chemical and 1 physical) were used in the composition of products both in different combinations and independently: Octyl Methoxycinnamate, Octyl Salicylate, 2-Phenylbenzimidazole-5-Sulfonic Acid and its sodium salt - Disodium Phenyl Dibenzimidazole Tetrasulfonate, Octyl Triazone, Octocrylene, Oxybenzone, Homosalate, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Titanium Dioxide.

A total of 56 UV filters in 18 samples of cosmetic products were tested. There were 21 cases (37.5%) in which the detected contents of UV filters showed admissible percentage deviation of  $\pm 10\%$  from the declared contents. A coincidence of the data from the tests with the data declared by the producer was observed in only one of the tests. In 22 tests (39,3%) concentrations were established lower than those ones declared in the dossier by average of 40,76% (from 13,6 to 80%), and in 9 (16,1%) of the tests – higher concentrations – by average of 23,5% (from 11% to 46%). There are three cases in which the declared content of UV filters was not detected which means 100% of differences in the data. In case of less declared contents, the possibility to detect or not to find real contents incorporated into cosmetic formulations

**Таблица 1. Резултати от определяне на съдържанието на UV филтри в козметични продукти – проби 1,2,16,17 и 18**  
**Table 1. Results from determination of the content of UV filters in cosmetic products – samples 1,2,16,17 and 18**

| №. | Слънцезащитен продукт   | Съдържание на UV филтър, в %; отклонение от обявеното в рецептурата ( - + % )<br>Content of UV filter in %, deviation from the declared one in the formulation ( - + % ) |               |            |                               |             |                  |             |  |                  |             |         |             |         |             |         |             |         |             |         |
|----|---|--|---------------|------------|-------------------------------|-------------|------------------|-------------|--|------------------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|
|    |   | Ocyl Methoxy cinnamate   | Ocyl Triazone | Oxybenzone | Butyl Methoxydibenzoylmethane | Octocrylene | Octyl Salicylate | Homo-salate | 2-Phenyl benzimidazole-5-Sulfonic Acid и натриевата сол 2-Phenyl benzimidazole-5-Sulfonic Acid and its sodium salt | Titanium Dioxide |             |         |             |         |             |         |             |         |             |         |
|    | <b>Sunscreen</b>  |  |               |            |                               |             |                  |             |  |                  |             |         |             |         |             |         |             |         |             |         |
| 1  | Б1 / слънцезащитен лосион / висока защита SPF 30  | Вложено  | Детектирано   | Вложено    | Детектирано                   | Вложено     | Детектирано      | Вложено     | Детектирано  | Вложено          | Детектирано | Вложено | Детектирано | Вложено | Детектирано | Вложено | Детектирано | Вложено | Детектирано | Вложено |
| 1  | В1 / sun protection lotion / high protection SPF 30   | -  | -             | -          | 3,0                           | 2,96        | -1,3%            | 6,0         | 5,58   | -7%              | 4,5         | 5,58    | +24%        | 4,5     | 5,26        | 4,89    | 5,23        | -       | -           | -       |
| 2  | Б1 / слънцезащитен крем за лице / висока защита   | -  | 1,0           | 0,90       | -10%                          | -           | -                | 3,0         | 4,38   | 5,0              | 5,40        | +8%     | -           | -       | -           | -       | -           | -       | 22          | 3,2     |
| 16 | В1 / Sun protection cream for face / high protection  | -  | -             | -          | -                             | -           | -                | -           | 46%  | -                | -           | -       | -           | -       | -           | -       | -           | -       | 5,0         | 4,5     |
|    | Б4 / слънцезащитен крем с екстракт от алое вера / висока защита SPF 50  | -  | -             | -          | 7,0                           | 6,23        | -11%             | 3,0         | 2,98   | 8,0              | 7,20        | -10%    | 4,0         | 4,45    | -           | -       | -           | -       | 5,0         | 4,5     |
|    | В4 / Aloe Vera sun protection cream / high protection SPF 50  | -  | -             | -          | -                             | -           | -                | -           | -0,7%  | -                | -10%        | +11,3%  | -           | -       | -           | -       | -           | -       | -           | -10%    |
| 17 | Б4 / слънцезащитно плажно мляко за деца с Д-пантенол + растителен и витаминен комплекс / висока защита SPF 30           | -  | -             | -          | 9,0                           | 7,59        | -15,7%           | 4,5         | 3,89   | 9,0              | 9,31        | +3,4%   | 4,0         | 4,03    | -           | -       | -           | -       | -           | -       |
|    | В4 / Sun protection milk for kids with D-panthenol + herbal and vitamin complex / high protection SPF 30                | -  | -             | -          | -                             | -           | -                | -13,6%      | -  | 9,0              | 9,31        | +3,4%   | 4,0         | 4,03    | -           | -       | -           | -       | -           | -       |
| 18 | Б4 / слънцезащитен крем за лице с розо ва вода, витамин Е, масло от шеа и макадамия / средна защита SPF 20              | Вложено  | Детектирано   | Вложено    | Детектирано                   | Вложено     | Детектирано      | Вложено     | Детектирано  | Вложено          | Детектирано | Вложено | Детектирано | Вложено | Детектирано | Вложено | Детектирано | Вложено | Детектирано | Вложено |
|    | В4 / Sun protection face cream with rose water, vitamin E, shea butter and macadamia nut oil / medium protection SPF 20 | 2,0  | 1,53          | -23,5%     | 3,0                           | 2,71        | -9,7%            | 5,5         | 5,81   | 5,5              | 5,81        | +5,6%   | 3,5         | 3,62    | -           | -       | -           | -       | -           | -       |
|    | В4 / Sun protection face cream with rose water, vitamin E, shea butter and macadamia nut oil / medium protection SPF 20 | -  | -             | -          | 3,0                           | 2,71        | -9,7%            | 5,5         | 5,81   | 5,5              | 5,81        | +5,6%   | 3,5         | 3,62    | -           | -       | -           | -       | -           | -       |

Таблица 2. Резултати от определяне на съдържанието на UV филтри в козметични продукти – проби 3 - 10 и 11 - 15  
 Table 2. Results from determination of the content of UV filters in cosmetic products – samples 3 - 10 and 11 - 15

| №  | Слънцезащитен продукт                               | Съдържание на UV филтър, в %; отклонение от обявеното в рецептурата (- + %)<br>Content of UV filter in %, deviation from the declared one in the formulation (- + %) |                   |                      |                                |                               |                   |                      |                   |                      |                   |  |  |
|----|---|--|-------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--|--|
|    |   | Octyl Methoxycinnamate   |                   | Oxybenzone           |                                | Butyl Methoxydibenzoylmethane |                   | Octocrylene          |                   | Titanium Dioxide     |                   |  |  |
|    |   | Вложено Incorporated   | Намерено Detected | Вложено Incorporated | Намерено Detected              | Вложено Incorporated          | Намерено Detected | Вложено Incorporated | Намерено Detected | Вложено Incorporated | Намерено Detected |  |  |
| 3  | B2 / масло за интензивен загар / ниска защита       | 5,0  | 3,86<br>-23%      | -                    | -                              | -                             | -                 | -                    | -                 | -                    | -                 |  |  |
| 4  | B2 / intensive sun (tanning) oil / low protection   | 2,0  | 1,54<br>-23%      | -                    | -                              | -                             | -                 | -                    | -                 | 0,6                  | 0,45<br>-25%      |  |  |
| 5  | B2 / sun protection milk / low protection SPF 8     | 2,0  | 1,84<br>-8%       | -                    | -                              | -                             | -                 | -                    | -                 | 0,6                  | 0,40<br>-33%      |  |  |
| 6  | B2 / слънцезащитно мляко / ниска защита SPF 12      | 2,3  | 1,65<br>-28,2%    | 0,3                  | не се открива<br>not available | -                             | -                 | -                    | -                 | 1,0                  | 0,50<br>-50%      |  |  |
| 7  | B2 / sun protection milk / medium protection SPF 16 | 2,5  | 2,5<br>0          | 0,4                  | не се открива<br>not available | -                             | -                 | -                    | -                 | 1,0                  | 0,40<br>-60%      |  |  |
| 8  | B2 / слънцезащитно мляко / средна защита SPF 20     | 3,0  | 1,43<br>-52,3%    | 0,6                  | не се открива<br>not available | -                             | -                 | -                    | -                 | 1,0                  | 0,32<br>-68%      |  |  |
| 9  | B2 / sun protection milk / medium protection SPF 26 | 3,5  | 0,94<br>-73,1%    | 0,6                  | 0,15<br>-75%                   | -                             | -                 | -                    | -                 | 0,5                  | 0,40<br>-20%      |  |  |
| 10 | B2 / слънцезащитно мляко / висока защита            | 3,5  | 0,93<br>-73,4%    | 1,0                  | 0,16<br>-84%                   | -                             | -                 | -                    | -                 | 0,5                  | 0,38<br>-24%      |  |  |

| Слънцезащитен продукт |   | Съдържание на UV филтър, в %, отклонение от обявеното в рецептурата (- + %)<br>Content of UV filter in %, deviation from the declared one in the formulation (- + %) |                   |                      |                   |                      |                   |                               |                   |                      |                   |                      |                   |                      |                   |
|-----------------------|---|--|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
|                       |   | Oxy Methoxycinnamate   |                   |                      | Oxybenzone        |                      |                   | Butyl Methoxydibenzoylmethane |                   |                      | Octocrylene       |                      |                   | Titanium Dioxide     |                   |
| №                     | Sunscreen   | Вложено Incorporated   | Намерено Detected | Вложено Incorporated | Намерено Detected | Вложено Incorporated | Намерено Detected | Вложено Incorporated          | Намерено Detected | Вложено Incorporated | Намерено Detected | Вложено Incorporated | Намерено Detected | Вложено Incorporated | Намерено Detected |
| 11                    | Б3 / слънцезащитен лосион / ниска защита SPF 6        | 2,0  | 2,14<br>+ 7 %     | -                    | -                 | 1,0                  | 0,93<br>- 7 %     | -                             | -                 | -                    | -                 | -                    | -                 | -                    | -                 |
|                       | B3 / sun protection lotion / low protection SPF 6     |  |                   |                      |                   |                      |                   |                               |                   |                      |                   |                      |                   |                      |                   |
| 12                    | Б3 / слънцезащитен лосион / ниска защита SPF 10       | 3,0  | 2,43<br>- 19 %    | -                    | -                 | 2,0                  | 0,75<br>- 62,5 %  | -                             | -                 | -                    | -                 | -                    | -                 | -                    | -                 |
|                       | B3 / sun protection lotion / low protection SPF 10    |  |                   |                      |                   |                      |                   |                               |                   |                      |                   |                      |                   |                      |                   |
| 13                    | Б3 / слънцезащитен лосион / средна защита SPF 15      | 4,0  | 2,97<br>- 25,7 %  | -                    | -                 | 2,5                  | 3,30<br>+ 32 %    | -                             | -                 | -                    | -                 | 1,0                  | 1,2<br>+ 20 %     | -                    | -                 |
|                       | B3 / sun protection lotion / medium protection SPF 15 |  |                   |                      |                   |                      |                   |                               |                   |                      |                   |                      |                   |                      |                   |
| 14                    | Б3 / слънцезащитен лосион / средна защита SPF 20      | 5,0  | 5,5<br>+ 10 %     | -                    | -                 | 3,0                  | 3,54<br>+ 18 %    | -                             | -                 | -                    | -                 | 2,0                  | 1,5<br>- 25 %     | -                    | -                 |
|                       | B3 / sun protection lotion / medium protection SPF 20 |  |                   |                      |                   |                      |                   |                               |                   |                      |                   |                      |                   |                      |                   |
| 15                    | Б3 / слънцезащитен лосион / висока защита SPF 30      | -  | -                 | -                    | -                 | 5,5                  | 5,3<br>- 3,6 %    | 6,5                           | 8,6<br>+ 32,3 %   | 3,0                  | 3,0               | 2,8<br>- 6,6 %       | -                 | -                    | -                 |
|                       | B3 / sun protection lotion / high protection SPF 30   |  |                   |                      |                   |                      |                   |                               |                   |                      |                   |                      |                   |                      |                   |

при 3 от изпитванията (15%) не се откриват UV филтрите с високоефективна течна хроматография, което означава, че не са вложени или са лошо хомогенизирани. И при останалите 15 изпитвания (75%) се установяват стойности по-ниски с 19% до 84% от обявените в рецептурата стойност.

При производител B3 също има несъответствия. При 62.5% от изпитваните UV филтри се отбелязва както занижено съдържание (с 19% до 62.5%), така и намиране на завишени количества спрямо обявените (с 18% до 32%).

Независимо от несъответствията между вложените и намерените количества на UV филтри, което дава отражение върху осигуряването на обявената защита и дезинформира потребителите, намерените концентрации са в рамките на допустимите по Наредба № 36 на МЗ за изискванията към козметичните продукти от 2005г. и нейните изменения и допълнения (1).

## Обсъждане и заключение

Проучването на реалното съдържание на UV филтри в български слънцезащитни козметични продукти е проведено със съвременни валидирани методи с високоефективна течна хроматография, които по мнението и на други автори (7, 8) са най-чувствителни и подходящи за разделяне и определяне на UV филтри в козметичните продукти. Подобни изпитвания с високоефективна течна хроматография са проведени от S. Bouzid (9), с цел установяване на стабилността на UV филтри в козметични продукти, съдържащи октилметоксицинамат и бутилметоксибензоил метан, в присъствие на Optisol (микрофин титанов диоксид, съединен с манган в кристалната решетка). Резултатите показват, че наличието на титанов диоксид осигурява фотостабилност на UVB филтъра октилметоксицинамат и на UVA филтъра бутилметоксибензоил метан, като Optisol показва подобри резултати. Друг автор (10) изпитва съдържанието на 18 разрешени химични UV филтъра в 75 слънцезащитни продукта за съответствие с изискванията на Директива 76/768/ЕЕС за козметичните продукти. Той установява, че 81% от продуктите съдържат 14 от изпитваните UV филтри, които са в рамките на максимално допустимите концентрации. Останалите не съдържат нито един от изпитваните химични UV филтри, а разчитат за осигуряване на защита само на физичните UV филтри – титанов диоксид и цинков оксид.

Получените резултати от настоящото проучване показват несъвпадение на установеното реално съдържание на UV филтри при 34 (60,7%) от всички изпитвания (общо 56), като при 3 от тях (5,3%) UV филтрите не се откриват изобщо, при 22 (39,3%) са по-ниски от обявените в рецептурата – средно с 40,76%, а при 9 (16,1%) – са по-високи – средно с 23,5%.

Тези данни доказват отсъствието на контрол от страна на производителите при влагането на UV филтри в козметичните продукти за стриктно спазване на рецептурата, при хомогенизирането на продуктите, а също така и при следене за стабилността на UV филтрите в козметичните продукти. Необходимо е провеждането на подобни изследвания от страна на контролните органи за недопускане на такива несъответствия.

is far too little.

In the conducted test the producer B2 was noticed by cosmetic products showing absolute discrepancies between the declared and detected contents. From the conducted 20 tests on UV filters of 7 products only two formulations (10%) showed coincidence and were in admissible percentage deviation of 10%. From the rest tests in 3 of them (15%) UV filters were not detected by HPLC, which means that they were not incorporated or were poorly homogenized. In the rest 15 tests (75%) values from 19% to 84%. lower than the declared ones in the formulations were established.

In the producer B3 discrepancies were also observed. In 62.5% of the tested UV filters a lowered content was indicated (from 19% to 62.5%), as well as detection of elevated contents against the declared ones (from 18% to 32%).

Independently on the discrepancies between incorporated and detected contents of UV filters, which has an effect on the provision of declared safety and leads to consumers' disinformation, the detected concentrations were in line with the admissible ones according to the Ordinance № 36 of 2005 of Ministry of Health for the requirements for cosmetic products and its amendments and annexes (1).

## Discussion and conclusion

The study on real contents of UV filters in Bulgarian sunscreens was conducted by modern validated HPLC methods, which are the most sensitive and suitable for separation and determination of UV filters in cosmetic formulations according to the opinion of other authors (7, 8). Similar HPLC tests were conducted by S. Bouzid (9) in order to establish the stability of UV filters in cosmetic products, containing Octyl Methoxycinnamate and Butyl Methoxydibenzoylmethane in the presence of Optisol (microfine titanium dioxide incorporating a small amount of manganese in the crystal lattice). The results show that the presence of titanium dioxide provides photostability of the UVB filter Octyl Methoxycinnamate and the UVA filter Butyl Methoxydibenzoylmethane as Optisol has shown better results. Another author (10) tested the content of 18 allowed chemical UV filters in 75 sunscreen formulations for the compliance with the requirements of Directive 76/768/EEC for cosmetic products. He established that 81% of the products contain 14 of the tested UV filters, which are in line with the maximum admissible concentrations. The rest ones contain none of the tested chemical UV filters because for sun protection they rely only on the physical UV filters – titanium dioxide and zinc oxide.

The results obtained from the current study show a discrepancy in the real content of UV filters in 34 (60,7%) of all tests (a total of 56), as in 3 of them (5,3%) UV filters were not found at all, and 22 (39,3%) have contents lower than the declared ones in the formulations by average of

Независимо, че получените концентрации не превишават максимално допустимите по европейското и българското законодателство, всяко намалено влагане, отсъствие или предозиране спрямо рецептурата води до промяна на обявената върху етикета категория на защита от UV лъчи и до дезинформация на потребителите, с риск от увреждания при продължителна експозиция на слънце.

## Книгопис/References

1. Наредба № 36 от 30 ноември 2005 г. за изискванията към козметичните продукти (обн., ДВ, бр. 101 от 2005 г., изм. и доп., бр. 44 от 2006 г., изм., бр. 75 от 2006 г., изм. и доп., бр. 39 от 2007 г., изм. и доп., бр. 106 от 2007 г.). / Ordinance № 36 of 30 November 2005 for the requirements for cosmetic products (published in State Gazette, No. 101 of 2005; amendments and annexes, No. 44 of 2006; amendment, No. 75 of 2006; amendments and annexes, No. 39 of 2007; amendments and annexes, No. 106 of 2007).
2. Kedor-Hackman, E.R.M., M.L. De Lourdes Perez Gonzalez, A.K. Singh, M.I.R.M. Santoro. Validation of a high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of five sunscreen in lotion preparation. *Internacional Journal of Cosmetic Science*, 2006; 28:219.
3. Rosario R., Jose Benito Quintata, Purification Lopez-Mahia, Soledad Muniategui-Lorenzo. Multiclass Determination of sunscreen chemicals in water samples by liquid chromatography. *Anal.Chem.*, 2008; 80(4):1307-1315.
4. Dencausse L., Audrey Galland, Jean-Luc Clamou, Jerome Basso. Validation of HPLC method for quantitative determination of Tinosorb S and three other sunscreens in a high protection cosmetic product. *International Journal of Cosmetic Science*, 2008; 30:373-382.
5. Chisvert A., A. Salvador. Determination of water-soluble UV-filters in sunscreen sprays by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2002; 977: 277-280.
6. Узунова С., М. Иванова, А. Тачев, Д. Чохаджиева, Л. Мечкуева, Н. Василева Проучване на защитата на козметичните продукти от UVA и UVB лъчи: Етерични масла, парфюмерия и козметика, Пловдив, 2007, 33, 14-20. / Uzunova S., M. Ivanova, A. Tachev, D. Chohadjieva, L. Mechkueva, N. Vasileva. Study on the cosmetic products providing protection against UVA and UVB rays: Etheric oils, perfumery and cosmetics, Provddiv, 2007, 3: 14-20.
7. Dutra, E.A., E.R.M. Kedor-Hackman, M.I.R.M. Santoro. Validation of a high performance liquid chromatography method for sunscreen determination in cosmetics. *Internacional Journal of Cosmetic Science*, 2002; 24:97.
8. Salvador A., De la Ossa, M.D., A. Chisvert. Determination of butyl methoxydibenzoylmethane, benzophenone-3, octyl dimethyl PABA and octyl methoxycinnamate in lipsticks. *Internacional Journal of Cosmetic Science*, 2003; 25(3): 97-102.
9. Bouzid, S. HPLC/formulation stabilization. Optisol UV Absorber improves the retention of organic UV absorbers during solar exposure. *Oxonica Commercial Solutions from Nanotechnology (2005)*.
10. Rastogi, S.C. UV filters in sunscreen products - a survey. *Contact dermatitis*, 2002; 46 (6): 348.

40,76%, and in 9 (16,1%) – higher by average of 23,5%.

These data show the lack of strict control on the observation of formulations on behalf of the producers for the incorporation of UV filters, homogenization of the products as well as ascertainment of the stability of UV filters in cosmetic products. The conduction of such studies is necessary for the controlling bodies in order to avoid the above mentioned discrepancies.

Independently of the fact that the received concentrations do not exceed the maximum admissible concentrations adopted by European and Bulgarian legislation each decreased incorporation, absence or overdosing versus the stated formulation leads to a change in the factor of sun protection against UV rays declared on the label and misleads the consumers which can cause a risk for damages at long-term sun exposure.

### Адрес за кореспонденция:

Проф. д-р Стоянка Великова Узунова, дмн  
Национален център по опазване на общественото здраве  
София 1431, ул. Акад.Иван Евстатиев Гешов №15  
тел. 8056 296, 954 1188  
E-mail: st.uzunova@ncphp.government.bg

### Address for correspondence:

Professor Dr. S. Uzunova, DSc  
National Center of Public Health Protection (NCPHP)  
15, Ivan Ev.Geshov Blvd, 1431 Sofia, Bulgaria  
Tel.: +359 2 8056 296, +359 2 954 1188  
E-mail: st.uzunova@ncphp.government.bg

## НАНОТЕХНОЛОГИЯ – ПОТЕНЦИАЛЕН ЗДРАВЕН РИСК

Ивайло Хинков<sup>1</sup>, Констанца Ангелова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Химикотехнологичен университет

<sup>2</sup>Национален център по опазване на общественото здраве

### Резюме

Нанонауката представлява интердисциплинарна научна област и система от иновативни методи за контрол на процеси в нанодименсии ( $10^{-9}$  m). Нанотехнологията създава функционални системи на молекулно ниво с приложения в много сектори на обществото, както и в новите области бionанотехнология и наномедицина. Значително различаващите се свойства и експозиция на наноматериалите налагат нови предизвикателства към оценката и управлението на потенциалния риск и безопасност на нанотехнологията. Представени са ключовите аспекти и приложенията на нанонауката и нанотехнологията, оценката на риска, взаимодействието на наноматериалите с биологичните системи и регулаторната рамка на управлението на риска.

**Ключови думи:** нанонаука, нанотехнология, бionанотехнология, наномедицина, оценка на риска, управление на риска

### Въведение

Нанонауката, като интердисциплинарна научна област и система от иновативни методи за контрол на процеси в нанодименсии ( $10^{-9}$  m), продуцира нови материали и структури на атомно, молекулно и макромолекулно ниво със свойства, значително различаващи се от тези на аналогичните вещества с по-големи размери (1,2,3). Нанотехнологията е инженерна дисциплина, която създава функционални системи на молекулно ниво, релевантни на химията, биологията, инженерните науки и медицината. Тя представлява експоненциално нарастваща индустрия в света и предлага потенциал за научен напредък в много сектори на обществото. В допълнение на приложенията на нанотехнологията в информационните технологии, електрониката и енергопродукцията, възникват нови области като бionанотехнология и наномедицина (1,2). Успоредно с това, свойствата на наночастиците и съответната експозиция на наноматериали налагат нови предизвикателства към оценката и управлението на потенциалния риск и безопасност на нанотехнологията. Стимулира се провеждането на анализи с цел отговорно развитие на наноприложения с благоприятен ефект и минимизиран потенциален риск (2,3). Развитието на нанонауката представлява база за оценка на риска, формулиране на регулаторни политики и вземане на решения за управление на риска, с цел протекция на общественото здраве (4).

## NANOTECHNOLOGY – POTENTIAL HEALTH RISK

Ivaylo Hinkov<sup>1</sup>, Konstanza Angelova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Chemical Technology

<sup>2</sup>National Center of Public Health Protection

### Abstract

Nanoscience is an interdisciplinary research area and a system of innovative methods to control matter at nanoscale dimensions ( $10^{-9}$  m). Nanotechnology creates functional systems at molecular scale with applications in many sectors of the society, as well as in the new areas bionanotechnology and nanomedicine. The significantly differing properties and exposure to nanomaterials pose new challenges to evaluate and manage the potential risk and safety of nanotechnology. Nanoscience and nanotechnology key aspects and applications, risk assessment, interaction of nanomaterials with biological systems and regulatory framework of risk management are presented.

**Key words:** nanoscience, nanotechnology, bionanotechnology, nanomedicine, risk assessment, risk management

### Introduction

Nanoscience as interdisciplinary research area and a system of innovative methods to control matter at nanoscale dimensions ( $10^{-9}$  m) produce new materials and structures at atomic, molecular and macromolecular scales with properties significantly differing from those at a larger scale (1,2,3). Nanotechnology, as engineering of functional systems at molecular scale, relevant to chemistry, biology, engineering and medicine, is exponential growing industry in the world offering a potential for scientific advancement in many sectors of the society. In addition to applications of nanotechnology in information technology, electronics and energy production – new areas as bionanotechnology and nanomedicine are developing (1,2). At the same time, properties of nanoparticles and respective exposure to nanomaterials pose new challenges to evaluate and manage the potential risk and safety of nanotechnology. Analyses are promoted to create responsible development of beneficial applications while minimizing the possible risk (2,3). The development of nanoscience is the basis for risk assessment, formulation of regulatory policies and risk management decisions for protection of public health (4).

## Нанонаука и нанотехнология

Точната дефиниция и идентификацията на характеристиката на наноматериалите са много трудни и представляват обект на интензивна дискусия в научната, метрологичната и управленската общност (4). Наноматериалите като едно-дименсионални активноповърхностни покрития, бидименсионални нанотръбички и тридименсионални наночастици, имат размери в диапазона от 1 до 100 nm и показват различна и усилена функционална характеристика в сравнение с аналогичните материали с по-голям размер (5). Нанонауката засяга инженерно-техническите (антропогенни) наноматериали с техните химични, физични и биологични свойства, независимо, че естествено срещани се и случайно продуцирани наночастици съществуват в околната среда. Инженерно-техническите наночастици включват различни категории – въглерод-базирани материали или “carbonacea” (напр. фулерени  $C_{60}$ , въглеродни нанотръбички CNT – едностенни и многостенни SWCNT, MWCNT), метал-базирани материали (метали и метални оксиди, напр. наночастици Au,  $TiO_2$ ), органични дендримери (напр. нанополимери), неметали, нанокompозитни материали (6, 7).

Физикохимичните характеристики на наночастиците, като размер, форма, площ, повърхностен заряд, химични свойства, разтворимост, оксидантен генериращ потенциал и степен на агломерация, модулират произведения ефект върху биологичните системи (3). Увеличената относителна повърхност (на единица маса) води до нарастване на химичната реактивност за единица маса, на структурния интегритет, с доминиране на квантови ефекти и промяна на оптичните, магнитните и електричните свойства. Високата стойност на отношението на площта към обема на наночастиците (напр. – повърхността за литър разтвор с 1% концентрация на наночастици с размер 70 nm заема площ от 800 m<sup>2</sup>) индуцира многократно усиление на адхезионния потенциал към биомолекулите, редокс потенциала, потенциала на агрегация, тъканната адсорбция и експозицията (8). Поради високата специфичност на тези явления някои автори използват терминология като “новият свят на бионанонауката” (9).

Изследванията в нанонауката се фокусират върху широк набор продукти като козметични препарати, потребителски продукти за здравето и бита, пластмаси, бои, катализатори за пречиствателни процеси в околната среда, адитиви за горива, компоненти за електрониката и т.н. Съгласно Проект за регистрация на възникващите нанотехнологии, към 2008 година, нанотехнологични процеси са включени в производството на над 600 продукта на повече от 300 фирми и компании в 20 страни на света (10). Възникващата наномедицина се дефинира от Европейската технологична програмна (ETP) група като приложение на нанотехнологията за постигане на революционен поврат в здравеопазването (11). Подобластите в наномедицината включват *in vivo* диагностика, с потенциал за усиление на чувствителността и специфичността на биомаркери: в биомедицински модалности на образната диагностика – еднофотонно-емисионна компютърна томография (СТ), магнитен резонанс (MRI), позитрон-емисионна томография (PET); в системи за

## Nanoscience and nanotechnology

Precise definition and quality characteristics identification of nanoscale materials are difficult and subject of substantial discussion in scientific, metrological and regulatory communities (4). Nanomaterials as one-dimensional active surface coating, two-dimensional nanotubes and three-dimensional nanoparticles, range from 1 to 100 nm and impose different and enhanced functionality compared with the same materials at a larger scale (5). Nanoscience is concerned with engineered (anthropogenic) nanomaterials and their chemical, physical and biological properties, nevertheless that naturally occurring or unintentionally produced nanoparticles exist in the environment. Engineered nanoparticles comprise different categories – carbon-based materials or carbonaceous (eg fullerenes  $C_{60}$ , carbon nanotubes CNT – singlewalled and multiwalled SWCNT, MWCNT), metal-based materials (metals and metaloxides, eg gold,  $TiO_2$  nanoparticles), organic dendrimers (eg nano-sized polymers), non-metals, nanocomposites (6, 7).

Physicochemical characteristics of nanoparticles as size, shape, surface area, surface charge, chemical properties, solubility, oxidant generation potential and degree of agglomeration modulate the effect on biological systems (3). The increased relative surface area (per unit mass) results in a corresponding increase in chemical reactivity per unit of mass, in structural integrity with dominance of quantum effects and changes of optical, magnetic or electrical properties. The huge surface to volume ratio of nanoparticles, (eg – the surface area per litre solution at 1% concentration of 70 nm particles is 800 m<sup>2</sup>), induces amplification of biomolecule adhesion potential, redox potential, aggregation potential, tissue adsorption and exposure (8). The highly specificity of these phenomena promotes some authors to use the terminology bionanoscience world (9).

Nanoresearch is focused on wide range of products, such as cosmetics and health care products, consumer goods, plastics, paints, remediation catalysts, fuel additives, electronics, etc – according to the Project on Emerging Nanotechnologies inventory, by 2008, nanotechnology is incorporated into more than 600 products of more than 300 companies in 20 countries (10). The emerging nanomedicine is defined by European Technology Platform (ETP) group as application of nanotechnology to achieve breakthroughs in healthcare (11). Subdomains of nanomedicine include *in vivo* diagnostics with potential to enhance sensitivity and specificity of biomarkers as: in biomedical imaging modalities – single-photon-emission computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET); in drug delivery systems – liposomes, polymer nanoparticles, nano-suspensions, polymer therapeutics (eg for passive tumor targeting, penetration through blood-brain-barrier etc); in emerging nanobiotechnology with advances of stem cell research of regenerative medicine (12,13).

лекарствено насочване – липозоми, полимерни наночастици, наносуспенсии, полимерни терапевтични препарати (напр. пасивна система към таргетна туморна маса, проникване през кръвно-мозъчната бариера и т.н.); във възникващата нанобиотехнология с напредъка в изследванията на стволови клетки в регенеративната медицина (12,13).

## Оценка на риска

Новият тип и безпрецедентно големият брой на различните видове наноматериали, потенциално високата им реактивоспособност, съчетана с характеристика на висока мобилност и проникваща способност - от една страна, а от друга – отделяне на наночастици в околната среда от вторични източници (индустриални производства и потребителски продукти) и при процеси, насочени към околната среда, с поява на вторичен екоотоксичен ефект върху хранителната верига, всичко това създава потенциални разклонения на пътищата за човешка експозиция и за здравен риск (14).

Приетата структура на оценка на здравния риск и риска за околната среда не може да бъде приложена и проведена спрямо нанотехнологията, тъй като съществува бариера на незнание, свързана с характеристиката, методите за детекция и анализ, непознаване процесите на освобождаване, транспорт и трансформация на наноматериалите в околната среда и потенциалните токсични ефекти (6, 14, 15). Биологичните системи възприемат наноматериалите като нови субстанции без естествен аналог в природата, като напр. флуоресцентните наночастици QD (quantum dots), съдържащи тежки метали, наночастици с покритие от сърфактант, полимер или полиелектролит. Като допълнение може да се изтъкне, че трансформацията на повърхностното покритие, предизвикана биотично или абиотично, променя характеристиката на наноматериалите, напр. отстраняването на лизофосфатидилхолиновото покритие на SWCNT (едностранни въглеродни нанотръбчици) редуцира резистентността им към агрегация.

При изследването на биологичния ефект трябва да се вземат предвид разликите в кривите доза-отговор, които зависят от начина на изразяване на отношението – на база маса на наночастиците, брой на частиците или площ на взаимодействие, както и кой от изследваните параметри е релевантен на токсичността (16). Съществуват съмнения, че токсикологичните методи не са адекватни за оценка на наноматериалите, тъй като тяхната токсикокинетика и токсикодинамика са различни от тези на изследваните досега ксенобиотици. Явява се необходимост от разработване на специфични физиологично-базирани фармакокинетични (PbPk) модели или моделиране на количествени структурно-функционални взаимоотношения (QSAR), с цел предсказване на биологичните взаимодействия и ефекти (4). Агенцията за храна и лекарства на САЩ (FDA) счита, че е наложително разработването на нови аналитични методи и методи за характеризирани на стандартни наночастици за постигане адекватност при тестването на новите биологични реакции към наноматериалите (4).

O'Brien и Cummins предлагат концептуална полу-количествена тристепена стратегия за оценка на риска от

## Risk assessment

The novel and unprecedented number of nanomaterials, their potential high reactivity coupled with high mobility characteristics, as well as the release of nanoparticles into the environment from secondary sources - industrial manufacturing and consumer products and from intentional environmental application with secondary ecotoxic effects on the food chain, create potential ramification of human exposure pathways and health risk (14).

The conventional environmental and health risk assessment cannot be conducted for nanomaterials since there is a knowledge gap associated with nanomaterials characteristics, detection, analysis, release, transport, transformation in the environment and potential toxic effects (6,14, 15). Biological systems encounter nanomaterials as novel substances without natural analogs like QD (quantum dots) containing heavy metals, nanoparticles coated with surfactant, polymer, or polyelectrolyte. In addition surface coating transformation, biotical or abiotical, affects nanomaterial characteristics, eg removing lysophosphatidylcholine coating from SWCNT reduces nanotube resistance to aggregation.

Investigation of biological effect should consider the differences in dose-response curves which depend on whether the expression of relationship is by mass, number of particles or surface area, as well as which parameter is relevant to toxicity (16). Concerns exist that toxicological methods are not adequate to assess nanoscale materials since their toxicokinetics and toxicodynamics are different. Specific physiologically-based pharmacokinetic (PbPk) or quantitative structure activity relationship (QSAR) models are needed for prediction of biological interactions and effects (4). FDA considers that new analytical methods and standard particle characterization methods should be developed for the adequacy in testing novel biological responses to nanomaterials (4).

O'Brien and Cummins propose a conceptual semi-quantitative three-level risk assessment strategy for nanomaterials (14). The frame comprises module with formulation of exposure risk equations (level 1), three inter-related modules – characteristics, treatment and behavior (level 2) and exposure scenarios module (level 3). Analysis involves input of basic factors as nanoscale material, size distribution, aggregation/disaggregation status, surface area, surface charge, concentration (eg ppm,  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), transformation, adsorption, redox activity, exposure scenarios and primary routes of human exposure – inhalation, ingestion and dermal exposure.

Analyses applying probabilistic qualitative risk models with significant degree of uncertainty, could be converted to a quantitative risk assessment model after input of critical exposure points and generation of parameterized data (14).

наноматериали (14). Рамката обхваща модул с формулиране на уравненията на риска от експозиция (ниво 1), три взаимосвързани модула – характеристика, трансформация и поведение в средата (ниво 2) и модул, описващ сценариите на експозиция (ниво 3). Анализът включва приложение на основните фактори като вид наноматериали, разпределение на размера, статус на агрегация/деагрегация, площ, повърхностен заряд, концентрация (напр. ppm,  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), трансформация, адсорбция, редокс активност, сценарии на експозиция и първичните пътища на човешка експозиция – инхалация, инжестивен акт и дермална експозиция. Анализите, които прилагат вероятностни качествени модели на оценка на риска, със значима степен на неопределеност, могат да бъдат превърнати в количествени модели за оценка на риска след прилагане на “критични точки на експозиция”, след генериране на данни и използване на получените параметри (14).

### Взаимодействие на наноматериалите с биологични системи

Изследванията на взаимодействието на наноматериалите с биологични функционални елементи налагат прилагането на интердисциплинарен подход, релевантен на химията, молекулярната биология, токсикологията, медицина и биоинформатика (4). С цел анализ и сравнимост на резултатите от експозицията на наноматериали, от съществено значение се явява разработването на протокол за стандартизирана оценка на характеристиките на наночастиците и набор от референтни стандарти (17).

Първичните пътища на експозиция на наноматериали включват респираторния тракт, гастроинтестиналния тракт и кожата, а така също трябва да се вземат предвид и специалните приложения – интравенозен и интрадермален портал на проникване. Тъй като размерът на наночастиците е сравним с този на биомолекулите, предложен е механизъм на т.нар. “персорбция” посредством парацелуларни пътища при преминаването на наночастиците от интестиналния лумен в кръвта (18,19). Прилагане на наночастици ZnO (26-30 nm) в слънцезащитни формули върху човешка кожа показва процес на акумулиране на наночастици в stratum corneum (роговия слой) с минимално проникване (20). При инхалиране на наночастици се демонстрира транслокация в екстрапулмонарни тъкани, вкл. в мозъка (21). След експозиция, значителна част от инхалираните наночастици TiO<sub>2</sub> се откриват в алвеоларните епителни клетки, интерстициума и кръвните клетки (22). Нановъглеродът, под формата на сажиди, въглеродни нанопибри и многостенни въглеродни нанотръбички, индуцира в бял дроб при хора морфологични промени на клетките след 24-часова експозиция (23).

Физикохимичните и биологични свойства на наночастиците включват много висок потенциал за транслокация и насочване от дихателната система и гастроинтестиналния тракт към други системи на организма, проникване през дермални бариери, висока скорост на депозиране в белия дроб, взаимодействие с биомолекули като липиди и макромолекули като белтъци и нуклеинови киселини, генериране на оксидирали или реактивни кислородни видове (ROS), цитотоксичност и висок потенциал на единица маса за индуциране на възпалителен процес (3,8).

### Interaction of nanomaterials with biological systems

Research of the interaction of nanoscale materials with biological functional elements should apply interdisciplinary approach relevant to chemistry, molecular biology, toxicology, medicine and bioinformatics (4). In order to analyze and compare nanomaterial exposure there is a crucial need to develop a standardized assessment of nanoparticle characteristics and a set of reference nanomaterials (17).

Primary route of exposure to nanomaterials include respiratory tract, gastrointestinal tract and skin/integumentary systems, as well as if specialized application – the intravenous and intradermal portal of entry should be considered. Due to the size of nanoscale particles comparable to biomolecules, a mechanism of ‘persorption’ via paracellular pathways for the transport from intestinal lumen to the blood has been suggested (18,19). Application of ZnO nanoparticles (26-30 nm) in a sunscreen formulation to human skin shows accumulation of nanoparticles in stratum corneum with minimal penetration (20). Translocation to extrapulmonary tissue, incl. the brain is demonstrated for inhaled nanosized particles (21). Substantial fraction of inhaled nanosized TiO<sub>2</sub> particles could be found in alveolar epithelial cells, interstitium, and blood cells after exposure (22). Nanoscale carbon – black, nanofibers and multiwalled nanotubes induce in human lung cells morphological changes 24 h after exposure (23).

The physicochemical and biological properties of nanoparticles include a greatest potential for transition from respiratory system and gastrointestinal tract to systemic targets, penetration through dermal barriers, high rate of pulmonary deposition, interaction with biomolecules as lipids and macromolecules as proteins and nucleic acids, generation of oxyradicals or reactive oxygen species (ROS), cytotoxicity and a high inflammatory potency per unit mass (3,8).

Interaction of nanomaterials with biomolecules is critical component of risk assessment (8). Nanoparticles adsorb high affinity proteins and form complex (nanoparticle-protein corona concept), (9), which is associated with the mediation of potential toxicity effects (8,9,24). It is considered that metal (gold) nanoparticles and carbon nanotubes adsorb phospholipid component of lung surfactant (dipalmitoylphosphatidylcholine) and modulate its function (8, 25). The degree to which biodistribution depends on interaction of the nanoparticle surface with endogenous proteins and lipids is still unknown (8).

In assessment of toxicity magnitude and drug effect – surface area per unit of volume and surface activity are better determinants of biological interaction than mass-based dose measurement and dose metrics in general (26). Surface charge modification alter blood-brain barrier (BBB) permeability – positively charged nanoscale lipid

Взаимодействието на наноматериалите с биомолекулите се явява ключов компонент на процеса на оценка на риска (8). Наночастиците адсорбират белтъците, с висок афинитет към тях и формират комплекс (концепция за “белтъчна корона” на наночастицата), (9), което се асоциира с медиацията на потенциалните токсични ефекти (8,9,24). Счита се, че металните (Au) наночастици и въглеродните нанотръбички адсорбират фосфолипидния компонент на белодробния сърфактант (дипалмитоилфосфатидилхолин) и модулират неговата функция (8, 25). Степента на зависимост на биоразпределението на наночастиците от взаимодействието между тяхната повърхност и ендогенните белтъци или липиди е все още неизвестна (8).

При оценка на степента на токсичност и лекарствения ефект, площта на единица обем и повърхностната активност представляват по-добри детерминанти на биологичните взаимодействия, в сравнение с дозата, определена на единица маса (26). Изменението на повърхностните заряди на нанолипиди се явява от значение за пермеабилитета на кръвно-мозъчната бариера (BBB) – положително заредените нанолипидни везикули индуцират церебрален оток, докато неутралните нанолипидни везикули и ниските концентрации от отрицателно заредени нанолипиди не упражняват ефект върху интегритета на BBB (27). При еквивалентни нива, скоростта на проникване в мозъка на ниски концентрации наночастици-аниони е по-добра в сравнение с неутралните или катионни формули. Заключение, че катионните наночастици проявяват незабавен токсичен ефект върху мозъка, за разлика от неутралните и анионни наночастици (27), има отношение към разработване на системи за лекарствено насочване с колоидни носители, оценка на токсичността, биосъвместимостта и биоразпределението в различни компартименти на организма. Очакваните взаимодействия могат да претърпят промени, при условие на генериране на ROS, тъй като експозицията нараства при намаляване на размерите на наночастиците и при нарастване на площта – следователно провъзпалителният ефект и оксидативният стрес зависят от размера на наночастиците (28).

### Регулаторна рамка на управление на риска

Политиките за регулация и стратегията на управление на риска, с цел опазване здравето на потребителите, работната и околната среда, са формулирани на базата на все още съществуваща значителна неопределеност на научните изследвания при оценка на риска по отношение на нанотехнологията. Правителствените агенции и производителите приемат като предпазен принцип за осигуряване на безопасност при работа – прилагането на добри лабораторни практики и стандартни процедури в допълнение на инженерно-техническия контрол спрямо формулирани неизвестни вредни агенти с потенциална токсичност, с цел редукция на риска и протекция на работниците (29).

Предложена е система за управление на риска, подпомагаща вземането на управленски решения, която класифицира наноматериалите в различни рискови категории посредством мултикритериален анализ на дефиниране на решения (30). Критериите включват характеристики на наночастиците

vesicles induce cerebral edema, while neutral nanovesicles and low concentrations of negatively charged nanoscale lipid vesicles have no effect on BBB integrity (27). The brain uptake rates of anionic nanoparticles at lower concentrations were superior to neutral or cationic formulations at the equivalent levels. Conclusions that cationic nanoparticles have an immediate toxic effect in contrast to neutral and anionic nanoparticles to the brain (27), are relevant to development of drug targeted delivery systems with colloidal drug carriers, evaluation of toxicity, biocompatibility and biodistribution in different compartments of the organism. Predictability of interaction is affected in case of generation of ROS since exposure may increase as particle size range decreases and surface area increases – so proinflammatory effect and oxidative stress are particle size-dependant (28).

### Regulatory framework of risk management

Regulatory policy frameworks and risk management strategy formulated to ensure consumer, occupational and environmental health in relation to nanotechnology are based on significant scientific uncertainty in risk assessment. Regulatory agencies and manufacturers consider good laboratory practices and standard operating procedures in administrative control to be a supplement to the engineering control against unknown hazards with potential toxicity as safety precaution principle in order to decrease risk and to protect workers of occupational exposure (29).

A decision support system for risk management purpose is proposed which classifies nanomaterials into different risk categories by multi-criteria decision analysis (30). The criteria include nanoparticle characteristics (agglomeration, size, reactivity/charge, functional groups) and processes – bioavailability, bioaccumulation, translocation, toxicity potential (cytotoxicity, oxidative stress, inflammation, dissolution of free metal from metal nanoparticles). Risk classification supports decision-making by prioritizing the high risk category in risk management process.

The regulation of engineered nanoscale materials in US is enforced by regulatory authorities as Environmental Protection Agency (EPA), Food and Drug Administration (FDA), Occupational Safety and Health Administration (OSHA) coordinated by National Nanotechnology Initiative (NNI) – research and development program, established to support multi-agency efforts in nanoscience, engineering, technology, food industry (31,32). European legislation covers nanomaterials in principle (33) and the European Commission aims at reinforcing nanotechnology and support R&D in the potential impact on human health and environment via toxicological and ecotoxicological studies. European Food Safety Authority (EFSA) prepares a guidance document on assessment of potential risk arising from food-related uses of nanotechnology, which as a draft project is due to be completed by July 2010 (34,35).

(агломерация, размер, реактивност / заряд, функционални групи) и процесите – биоаккумуляция, биодостъпност, транслокация, токсичен потенциал (цитотоксичност, оксидативен стрес, възпалителен потенциал, освобождаване на метали от метални наночастици). Класификацията на риска подпомага вземането на управленски решения чрез приоритизиране на високорисковите категории в процеса на управление на риска.

Регулацията на нанотехнологиите и наноматериалите в САЩ се определя от Агенцията за опазване на околната среда (EPA), Администрацията за храни и лекарства (FDA), Администрацията за безопасност и здраве при работа (OSHA), с координация от страна на Националната нанотехнологична инициатива (NNI) – програма за научни изследвания и развитие, учредена за подкрепа работата на тези агенции по отношение на внедряването на нанонауката в инженерно-техническото и технологично развитие, в хранителната индустрия (31,32). Европейското законодателство принципно засяга наноматериалите (33), като Европейската комисия цели засилване развитието на нанотехнологията и подкрепя научните изследвания върху потенциалното повлияване на човешкото здраве и състоянието на околната среда чрез токсикологични и екотоксикологични проучвания. Европейският орган по безопасност на храните (EFSA) подготвя официален документ по оценка на потенциалния риск, възникващ при прилагането на нанотехнологията в производството на храни, който, под формата на проектодокумент, ще бъде оформен към м.юли 2010 година (34,35).

В заключение, съществува значително предизвикателство по отношение управлението на риска, поради наличието на диспропорция между ускорената поява на нови нанотехнологични продукти и съответното развитие на научните нанотоксикологични изследвания.

## Книгопис / References

1. *The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. The Royal Society, 2004.*
2. *CDC / NIOSH (Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health). Progress toward safe nanotechnology in the workplace. A Rep. NIOSH Nanotechnology Research Center, 2007.*
3. *CDC / NIOSH (Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health). Approaches to safe nanotechnology. Managing the health and safety concerns associated with engineered nanomaterials. 2009.*
4. *FDA/NTF. Nanotechnology. A Report of the US Food and Drug Administration Nanotechnology Task Force. 2007*
5. *Oberdorster G, Stone V, Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. Nanotoxicology 2007; 1(1): 2-25.*
6. *Meicallie C, Bennett E, Chappell M, Steevens J, Depledge M, Goss G, Goudey S, Kaczmar S, O'Brien N, Picado A, Ramadan AB. SMARTEN Strategic management and assessment of risks and toxicity of engineered nanomaterials. In: Nanomaterials: Risks and Benefits (eds) I Linkov & J Steevens, NATO Science for Peace and Security Ser.-C:Environmental Security. Springer 2009: 95-109.*
7. *ICON (International Council on Nanotechnology) A review of current practices in the nanotechnology industry – phase two report: Survey of current practices in the nanotechnology workplace. UCSB 2006.*
8. *Lynch I, Elder A. Deposition of nanoparticles as a function of their interactions with biomolecules. In: Nanomaterials: Risks and Benefits (eds) I Linkov & J Steevens, NATO Science for Peace and Security Ser.-C:Environmental Security. Springer 2009: 31-41.*
9. *Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S, Dawson KA. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21<sup>st</sup> century. Journal Colloid Interface Science 2007; 134-135: 167-174.*
10. *Woodrow Wilson International Center for Scholars. Project on Emerging Nanotechnologies. Consumer Products Inventory, <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>.*
11. *EC (European Commission) Nanomedicine Nanotechnology for Health: Strategic research agenda for nanomedicine office for official publications of the European Communities. EC Luxemburg. 2006, <http://cordis.europa.eu/nanotechnology/nanomedicine.htm>.*
12. *Adlakha-Hutcheon G, Khaydarov R, Korenstein R, Varma R, Vaseashta A, Stamm H, Abdel-Mottaleb M. nanomaterials, nanotechnology. In: Nanomaterials: Risks and Benefits (eds) I Linkov & J Steevens, NATO Science for Peace and Security Ser.-C:Environmental Security. Springer 2009: 195-207.*
13. *Emerich DF, Halberstadt C, Thanos C. Role of nanobiotechnology in cell-based nanomedicine: A concise review. Journal of Biomedicine & Nanotechnology 2007; 3:235-244.*
14. *O'Brien N, Cummins E. Development of a three-level risk assessment strategy for nanomaterials. In: Nanomaterials: Risks*

- and Benefits (eds) I Linkov & J Steevens, NATO Science for Peace and Security Ser.-C:Environmental Security. Springer 2009; 161-178.
15. Lowry GV, Casman EA. Nanomaterial transport, transformation, and fate in the environment. In: Nanomaterials: Risks and Benefits (eds) I Linkov & J Steevens, NATO Science for Peace and Security Ser.-C:Environmental Security. Springer 2009; 125-137.
  16. Teeguarden JG, Hinderliter PM, Orr G, Thrall BD, Pounds JG. Pharmacokinetics in vitro: Dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences* 2007; 95: 300-312.
  17. Elder A, Lynch I, Grieger K, Chan-Remillard S, Gatti A, Gnewuch H, Kenawy E, Korenstein R, Kuhlbusch T, Linker F, Matias S, Monteiro-Riviere N, Pinto VRS, Rudnitsky R, Savolainen K, Shedova A. Human health risks of engineered nanomaterials. Critical knowledge gaps in nanomaterial risk assessment. In: Nanomaterials: Risks and Benefits (eds) I Linkov & J Steevens, NATO Science for Peace and Security Ser.-C:Environmental Security. Springer 2009; 3-29.
  18. Volkheimer G. Hematogenous dissemination of ingested polyvinyl chloride particles. *Annals of NY Academy of Sciences* 1975; 246: 164-171.
  19. Hillyer JF, Abrecht RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 90(12): 1927-1936.
  20. Cross SE, Innes B, Roberts MS, Tsuzuki T, Robertson TA, McCormick P. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles : in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacology & Physiology* 2007; 20: 148-154.
  21. Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environmental Health Perspective* 2006; 114 (8): 1172-1178.
  22. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental Health Perspective* 2005; 113: 1555-1560.
  23. Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo J, Celio M, Catsicas S, Schwaller B, Forro L. Cellular toxicity of carbon based nanomaterials. *Nano Letters* 2006; 6(6): 1121-1125.
  24. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Kenneth A, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impact. *Proceedings of National Academy of Sciences* 2008; 105: 14265-14270.
  25. Bakshi MS, Zhao L, Smith R, Possmayer F, Petersen NO. Metal nanoparticle pollutants interfere with pulmonary surfactant function in vitro. *Biophysical Journal* 2008; 94: 855-868.
  26. Warheit DB, Webb TR, Colvin VL, Reed KL, Sayes CM. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: Toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicological Sciences* 2007; 95: 270-280.
  27. Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *Journal of Drug Targeting* 2004; 12: 635-641.
  28. Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependant proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2001; 175: 191-199.
  29. Chan-Remillard S, Kapustka L, Goudey S. Nanotechnology. The occupational health and safety concerns. In: Nanomaterials: Risks and Benefits (eds) I Linkov & J Steevens, NATO Science for Peace and Security Ser.-C:Environmental Security. Springer 2009; 53-66.
  30. Linkov I, Steevens J, Chappell M, Tervonen T, Figueira JR, Merad M. Classifying nanomaterial risk using multi-criteria decision analysis. In: Nanomaterials: Risks and Benefits (eds) I Linkov & J Steevens, NATO Science for Peace and Security Ser.-C:Environmental Security. Springer 2009; 179-191.
  31. Satterstrom FK, Arcuri ASA, Davis TA, Gullledge W, Foss Hansen S, Shafiq Haraza MA, Kapustka L, Karan D, Linkov I, Melkonian M, Monica J, Owen R, Palma-Oliveira JM, Srdjevic B. Considerations for implementations of manufactured nanomaterial policy and governance. In: Nanomaterials: Risks and Benefits (eds) I Linkov & J Steevens, NATO Science for Peace and Security Ser.-C:Environmental Security. Springer 2009; 329-350.
  32. IOM (Institute of Medicine) Nanotechnology in Food Products: Workshop Summary. The National Academies Press, Washington DC. 2009
  33. EC (European Commission) Communication to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee: Regulatory Aspects of Nanomaterials. Summary of legislation in relation to health, safety and environmental aspects of nanomaterials, regulatory research needs and related measures {COM (2008) 366 final}. [http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/com\\_regulatory\\_aspects\\_nanomaterials\\_2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/com_regulatory_aspects_nanomaterials_2008_en.pdf).
  34. EFSA (European Food Safety Authority) Nanotechnology. 2009 [http://efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178680051172.htm](http://efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178680051172.htm)
  35. EFSA (European Food Safety Authority) The Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnology on Food and Feed Safety [1]. 2009 [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1211902361968.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902361968.htm)

**Адрес за кореспонденция:**

Доц. К. Ангелова дм  
 Национален център по опазване на общественото здраве  
 k.angelova@ncphp.government.bg

**Address for correspondence:**

Assoc.Prof. K. Angelova PhD  
 National Center of Public Health Protection  
 k.angelova@ncphp.government.bg

## ЕНДОГЕННИ ТОКСИНИ: ЦЕЛИ ЗА ЛЕЧЕНИЕ И ПРЕВЕНЦИЯ НА ЗАБОЛЯВАНИЯ

Под редакцията на Питър О'Брайън и Уилям Брус

Дата на публикуване: Октомври 2009

Издателство: Wiley, John & Sons Ltd

Формат: твърди корици, 994 стр.

ISBN: 978-3-527-32363-0

Противоположно на популярното мнение, значителен брой от болестите при човека не зависят от външни фактори, а се причиняват от молекули, които се генерират в човешкия организъм. Тези, така наречени ендогенни токсини са много видове и могат да се образуват при хранителни дефицити, небалансирано хранене, свръхприем на храни и напитки или при генетични дефекти. През последните години непрекъснато се увеличават доказателствата за присъстващите навсякъде "тихи токсини", които в голяма степен определят риска на човека за развитие на такива хронични заболявания като диабет, метаболитен синдром или невродегенерация.

Монографията "Ендогенни токсини: цели за лечение и превенция на заболявания" е истинско събитие в областта на превантивната медицина. Тя е написана от голям брой изтъкнати професионалисти от цял свят. Редактори са проф. Питър О'Брайън и проф. Уилям Брус от Университета в Торонто, Канада, които са лидери в областта. Проф. Питър О'Брайън от Департамента по фармацевтични науки получава през 1996 г. престижната награда МакНийл-Янсен-Орто за изследователската си работа. Уилям Брус е професор към Департамента по медицинска биофизика и професор към Департамента по хранителни науки на Университета в Торонто. Той е изследовател на Кралското общество на Канада и бивш директор на Американската асоциация за изследвания на рака. През 1997 г. проф. Брус получава приза Н.О. Уоруик на Националния институт по рака на Канада за приносите му в превенцията на рака.

Предназначена за наръчник от първа необходимост за изследователи и професионалисти в областта на храненето, токсикологията, медицината и фармакологията, монографията "Ендогенни токсини: цели за лечение и превенция на заболявания" е първата, която обединява познанията от много различни дисциплини, извлечени от своя страна от голям брой литературни източници. Тя представя пълна картина на съвременните познания за ендогенните токсини, включително техните производни и начина им на действие, които предизвикват създаване на условия за развитие на заболявания, както и наличните мерки за противодействие.

Книгата е ясно разделена на четири части. Първата част систематично обхваща важните видове токсични молекули, включително метаболитните междинни продукти и видовете реактивен кислород. Читателят може да намери интересна детайлна информация за образуването на ендогенни

## ENDOGENOUS TOXINS: TARGETS FOR DISEASE TREATMENT AND PREVENTION

Peter J. O'Brien, William Robert Bruce (Editors)

Publication Date: October 2009

Publisher: Wiley, John & Sons Ltd

Format: Hardcover, 994 pages

ISBN: 978-3-527-32363-0

Contrary to popular belief, a fair number of human diseases are not dependent on outside factors but are caused by molecules generated within the human body. These so-called endogenous toxins come in many varieties and can be due to nutrient deficiencies, an imbalanced diet, excessive eating or drinking, or genetic defects. During the past years there is a growing awareness of these ever-present "silent toxins", which largely determine human risk of developing such chronic diseases as diabetes, metabolic syndrome or neurodegeneration.

The book "Endogenous toxins: targets for disease treatment and prevention" is truly event in the field of preventive medicine. It is written by great number of famous professionals from all over the world, the editors Prof. Peter J. O'Brien and Prof. William R. Bruce from University of Toronto, Canada are the leaders in the field. Prof. Peter J. O'Brien from Department of Pharmaceutical Sciences at the University of Toronto has been awarded the prestigious McNeil-Janssen-Ortho award for his research in 1996. William R. Bruce is Professor at the Departments of Medical Biophysics and Nutritional Sciences at the University of Toronto. He is a fellow of the Royal Society of Canada and a former director of the American Association for Cancer Research. In 1997 he received the H. O. Warwick Prize of the National Cancer Institute of Canada for his contributions to cancer prevention.

Designed as a first-stop handbook for researchers and professionals in nutrition, toxicology, medicine and pharmacology, the book "Endogenous toxins: targets for disease treatment and prevention" is the very first to tie together the knowledge from many disciplines that has so far been available only from widely dispersed sources in the primary literature. As such, it presents the complete picture on what is currently known about endogenous toxins, including their generation, mode of action, resulting disease conditions, and available countermeasures. Clearly divided into four parts, the first systematically covers important toxic molecule species, including metabolic intermediates and reactive oxygen species. The reader could find new interesting detailed information about production of endogenous pro-carcinogen peroxides by iron from meat, short chain sugars as endogenous

проканцерогенни пероксиди под въздействие на желязото, съдържащо се в месото; за късоверижните захари като ендогенни токсини; за ендогенните токсини, получени от фруктозата; за естрогените като ендогенни токсини и други.

Втората част обсъжда ролята на генетично детерминирани нарушения в метаболитните функции, като: галактоземия, хиперлипидемия, порфирия, хемокроматоза и свързаните с тях състояния. Представено е виждането за хомоцистеина като ендогенен токсин при развитието на сърдечносъдовите заболявания.

Третата част разглежда хронични заболявания и процеси, които се причиняват или обострят от ендогенните токсини, като например чернодробни увреждания и заболявания, астма, ревматизъм, рак на гърдата, колоректален рак, невродегенерация, стареене и др. Интересен проблем, който се дискутира, е ролята на образувалите се от хранителни вещества ендогенни токсини в патогенезата на диабет тип 2 и влиянието на ендогенните токсини върху чувствителността или резистентността към усложненията на диабета.

Последната част разглежда съвременните ефективни стратегии за контрол и минимизиране на ефекта на ендогенните токсини чрез хранителни интервенции или чрез фармакологично третиране. Представени са съвременни подходи за дизайн на ефективни хранителните интервенции за контрол на клетъчната оксидация.

Със своя широк обхват, включващ молекулни и системни аспекти на биохимичната база до развитие на условия за заболявания при човека, тази монография ще бъде от голяма полза за специалисти по хранене, токсиколози, биохимици и лекари.

Доц. д-р Стефка Петрова, дм

toxins, fructose-derived endogenous toxins, estrogens as endogenous toxins, etc.

The second part discusses the role of genetically determined metabolic malfunctions, such as galactosemia, hyperlipidemia, porphyria, hemochromatosis and related conditions. Point of view for homocysteine as an endogenous toxin in cardiovascular disease is presented.

Part three looks at acquired and chronic diseases caused or exacerbated by endogenous toxins, such as hepatic injuries and diseases, asthma, rheumatism, breast and colorectal cancer, neurodegeneration, aging, etc. Interesting issue related to the role of nutrient derived endogenous toxins in the pathogenesis of type 2 diabetes and the impact of endogenous toxins on susceptibility or resistance to diabetes complications is discussed.

The final part reviews current strategies to control and minimize the effect of endogenous toxins, either by nutritional or pharmacological interventions. Modern approaches on design of effective nutritional interventions for control of cellular oxidation are presented.

With its complete coverage integrating molecular and systemic aspects from the biochemical basis to human disease conditions, this comprehensive reference will appeal to a broad target group of toxicologists, nutrition specialists, biochemists and physicians.

Assoc. Prof. Stefka Petrova, MD, PhD

## НОВО РЪКОВОДСТВО НА НАЦИОНАЛНИЯ ЦЕНТЪР ПО ОПАЗВАНЕ НА ОБЩЕСТВЕННОТО ЗДРАВЕ

На 13.01.2010 г., в Министерството на здравеопазването, се проведе конкурс за избор на директор на Националния център по опазване на общественото здраве (НЦООЗ).

За директор на НЦООЗ е избрана **Доц. д-р Стефка Петрова, дм.**

Доц. Петрова е изтъкнат специалист с дългогодишен опит в областта на храненето и хранителната токсикология, национален консултант по хранене и диететика към МЗ, национален координатор на Националния план за действие „Храни и хранене“ 2005-2010 г.; редовен професор по хранене в Интернешънъл Юниверсити Колидж към Университета в Портсмут – Англия, експерт и консултант по хранене към Европейското бюро на Световната здравна организация в Копенхаген.

Новоизбраните заместник-директори на НЦООЗ са:

Доц. д-р Пламен Димитров – заместник-директор по научната, лабораторната и международната дейност;

Д-р Христо Хинков – заместник-директор по учебната дейност, национални и международни програми;

Доц. Теодор Панев – заместник-директор по административно-стопанската дейност и управлението на собствеността.

Доц. д-р Стефка Петрова поема функциите на главен редактор на *Българско списание за обществено здраве* от проф. д-р Любомир Иванов, който излезе в пенсия. Доц. Петрова увери, че списанието ще запази своята концепция, ще продължи да изпълнява заложените цели, ще се търсят и популяризират актуални и иновативни изследвания и ще се привличат нови партньори и експерти в областта на общественото здраве.

Редакторският колектив на списанието пожелава успех на новото ръководство на НЦООЗ.

## NEW BOARD OF DIRECTORS OF THE NATIONAL CENTER OF PUBLIC HEALTH PROTECTION

In January 2010, Assoc. Prof. Stefka Petrova, MD, PhD has been appointed Director of the National Center of Public Health Protection (NCPHP) after a competition, held by the Ministry of Health.

**Assoc. Prof. Petrova** is a prominent specialist, who has long-standing experience in nutrition and food toxicology. She is a National Consultant on Nutrition and Dietetics at the Ministry of Health and a National Coordinator of the National Action Plan “Food and Nutrition”, 2005 – 2010. She is also a Regular Professor of Nutrition at the International University College of the University in Portsmouth - England, expert and consultant on nutrition to the WHO Regional Office for Europe in Copenhagen.

The newly elected Deputy Directors of NCPHP are: Assoc. Prof. Plamen Dimitrov, MD, PhD – Deputy Director in charge of scientific and laboratory activities and international cooperation;

Dr. Hristo Hinkov, MD – Deputy Director in charge of education and training activities, national and international programmes;

Assoc. Prof. Teodor Panev, PhD – Deputy Director in charge of administration, logistics and property management.

Assoc. Prof. Petrova takes the responsibilities of the Editor-in-Chief of the Bulgarian Journal of Public Health from Prof. Lyubomir Ivanov, MD, DSc, who was retired. She confirmed the Journal will continue its mission and pursue agreed goals. It will promote current innovative research, inviting submission of articles from new partners and experts in the field of public health.

The Editorial Staff wish successful work to the New Board of the NCPHP.

## УКАЗАНИЯ ЗА АВТОРИТЕ

“Българско списание за обществено здраве” е много-профилно списание, което включва публикации в областта на здравната политика, здравен мениджмънт и икономика, епидемиология на неинфекциозните и заразните болести, здравето на населението /жените/децата/, промоция на здравето и профилактика на болестите, околна среда и здраве, храни и хранене, трудова медицина, психично здраве, кризисни ситуации и обществено здраве. Материалите се отпечатват на български и английски език. В списанието се публикуват:

- *Научни статии* (до 12 стр.): Статиите включват Въведение, Цел, Материал и методи, Резултати, Обсъждане, Заключение и Книгопис.
- *Обзори* (до 12 стр.): Обзорите трябва да представят значими теми в областта на общественото здраве.
- *Дискусия, позиции* (до 6 стр.) - засягат всяка област на общественото здраве.
- *Мнения, събития* (до 1 стр.) - представят актуални, значими или дискуссионни проблеми и важни събития.
- *Представяне на нови книги или софтуер* (до 1 стр.)

**Отговорност на автора.** Всички представени за публикуване материали трябва да бъдат оригинални разработки, които не са публикувани до този момент и не са подадени за публикуване другаде. Приетите ръкописи не могат да бъдат публикувани след това в други издания в същия вид, изцяло или на части и на какъвто и да било език, без съгласието на “Българско списание за обществено здраве”. Авторите отговарят за всички части от материала си.

**Научна етика.** Отговорност на авторите е да удостоверят, че всяко изследване върху хора е било одобрено от комисия по медицинска етика.

**Подаване на ръкописите.** Материалите трябва да бъдат подавани в електронен вид (по електронна поща или на CD/дискета) и като печатно копие (2 копия, формат А4). Материалите от българските автори трябва да бъдат на български и английски език, а на авторите от чужбина на английски език.

### Подготовка на ръкописа

**Придружително писмо:** Ръкописът трябва да бъде придружен с писмо, удостоверяващо, че материалът и данните или части от тях не са били публикувани досега (освен като резюме), както и че материалът не е под печат и не е възложен за рецензиране в друго издание.

### Заглавна страница:

- Вид на ръкописа (оригинална статия, обзор и др.)
- Заглавие, имена на авторите и месторабота по време на изготвяне на материала
- Име и пълен адрес на кореспондиращия автор, телефон, електронна поща
- Благодарности към лица и колеги с принос за изследването.

**Указания за оформление на материалите:** Използват се мерни единици на международната система SI. Да се избягват акроними, освен ако не са общоприети. Акронимите и съкращенията се дефинират при първата им употреба в текста. Файловете на ръкописа се подават във формат на Microsoft Word. Форматът на страниците трябва да бъде А4 с полета от 2,5 cm от всички страни, шрифтът 12-point Times New Roman с 1,5 интервал между редовете. Текстът се подравнява само от ляво.

**Резюме:** За научни статии се подготвя резюме със следната структура и подзаглавия: Обосновка, Цел, Методи, Резултати и Заключение. При материали без структура (например, методологични материали) се допускат резюмета, неструктурирани по горния начин. Резюмето трябва да съдържа не повече от 250 думи.

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

**Bulgarian Journal of Public Health** is a multidisciplinary journal, which covers the following fields of public health: health policy, health management and economics, epidemiology of noncommunicable and communicable diseases, population / women’s/ children’s health, health promotion and disease prevention, environmental health, foods and nutrition, occupational health, mental health, public health and disasters.

The papers are published in both Bulgarian and English. The Journal publishes:

- *Original Research Articles* (up to 12 pages): Articles should begin with Introduction, followed by Aims, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References.
- *Review Articles* (up to 12 pages): Reviews should concern topics of current interest in the field of public health.
- *Discussion, positions* (up to 6 pages) - may address any topic of interest for public health.
- *Opinions, events* (up to 1 pages) – represent current, relevant or disputable issues and important events.
- *New books or Software Reviews* (up to 1 page).

**Author Responsibility.** All submitted manuscripts should be original contributions, not previously published and not under consideration for publication elsewhere. Accepted manuscripts cannot subsequently be published elsewhere in similar form, in whole or in part, in any language, without the consent of Bulgarian Journal of Public Health. Authors are responsible for all parts of their paper.

**Scientific Ethics.** It is the authors’ responsibility to verify that any investigation involving human subjects has been approved by a committee on research ethics.

**Manuscript Submission.** Materials may be submitted by e-mail or on CD/diskette and as a hard copy (2 copies, A4 format). Materials of Bulgarian authors should be written in Bulgarian and English, and those of foreign authors – only in English.

### Manuscript Submission Directions

**Cover Letter:** The submitted manuscript should be accompanied by a cover letter stating that the paper and the data have not been previously published, either in whole or in part (unless as an abstract), and that no similar paper is in press or under review elsewhere.

### Title Page:

- Type of manuscript (Original Article, Review Article, etc.)
- Title, Authors names and affiliations at the time the work has been created
- Corresponding author’s name, mailing address, telephone number, e-mail
- Acknowledgements, including colleagues who contributed to the research.

**Directions:** Use SI units of measure. Avoid acronyms unless they are widely recognized. Define acronyms and abbreviations at first mention in text. Provide submitted manuscript files in a Microsoft Word processing format. Format the manuscript files for A4 size paper with 2.5 cm margin on all sides. Use 12-point Times New Roman, 1.5 spaced. Align text only on the left side.

**Abstract:** For research articles, provide a structured abstract, with headings for Background, Methods, Results, and Conclusions. Unstructured abstracts are allowed for papers of different kind (eg, methodology papers). Abstracts are limited to 250 words.

**Ключови думи:** Представят се след резюмето.

**Таблицы:** Всяка таблица трябва да бъде подадена като отделен документ. Таблиците трябва да имат ясни заглавия и при необходимост обяснителни бележки под черта. В материалите на българските автори заглавията и текстът в таблиците трябва да бъдат на български и английски език. За подготовка на таблиците се използва опцията “Таблица” на текстообработващия софтуер. Те се номерират по реда на представянето им в текста. В таблиците се използва двоен интервал и само хоризонтални линии.

**Фигури:** Всяка фигура се подава като отделен документ/файл. Фигурите се номерират по реда на цитирането им в текста. Всяка фигура трябва се придружава с кратка легенда на отделна страница, която следва Книгописа и е част от текстовия файл. В материалите на българските автори заглавията и текстът към фигурите трябва да бъдат на български и английски език.

**Книгопис:** Цитираните източници се номерират по реда на посочването им в текста и се описват непосредствено след основния текст. В текста номерът на цитирания източник се поставя в скоби. Книгописът трябва да бъде написан с 1,5 интервал.

#### **Примери за представяне на различни източници**

##### **Статия в списание**

- Христова Д, Захариев З. Най-чести грешки в диагностиката на Паркинсоновата болест. *Българска неврология* 2004; 4; 1: 32-47.

- Gonzalez MA, Artalejo FR, Calero JR. Relationship between socioeconomic status and ischaemic heart disease in cohort and case-control studies. *International Journal of Epidemiology* 1998; 27: 350-358.

**Глава от книга** - Jacobsen S, Schulsinger F. The Danish Adoption Register. In: Mednick SA, Baert AE, eds. *Prospective Longitudinal Research: An Empirical Basis for the Primary Prevention of Psychosocial Disorders*. Oxford: Oxford University Press, 1981:225-230.

**Книга** - Neale M, Cardon LR. *Methodology for Genetic Studies of Twins and Families*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992: 122-130.

**Софтуер** - SAS/STAT Software [computer program]. Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2006.

##### **Източник от Интернет**

- Javaras KN, Laird NM, Hudson JI, et al. Estimating the prevalence of disease using relatives of case and control probands. COBRA preprint series. Article 31. Available at: <http://biostats.bepress.com.proxy1.cl.msu.edu:2047/cobra/ps/art31>. 2007. (Accessed March 4, 2008.)

**Авторските права** върху публикуваните материали принадлежат на Издателя.

Материали, които не отговарят на горепосочените изисквания, няма да бъдат приемани за рецензиране и публикуване.

##### **АДРЕС:**

Доц. д-р С. Петрова, дм

Главен редактор

“Българско списание за обществено здраве”

Национален център по опазване на общественото здраве

Бул. “Акад. Иван Гешов” 15, София 1431, България

E-mail: s.petrova@ncphp.government.bg

**Key words:** After the abstract key words should be provided.

**Tables:** Each table should be submitted as a separate document. Tables should have clear titles and explanatory footnotes. Please prepare tables using the “Table” feature of your word processing software. Number the tables consecutively in the order of presentation in the text. Double-space the tables and use only horizontal lines.

**Figures:** Each figure should be submitted as a separate document. Submit figures in final form, suitable for publication. Number figures consecutively in the order they are discussed. Provide brief legends for each figure on a separate manuscript page. This page should follow the references and be included as part of the text file.

**References:** References should be numbered consecutively in order of appearance in the text, and listed immediately after the main text. Reference numbers in the text should be in parenthesis. 1,5 space the references.

#### **Examples of Reference Submission:**

##### **Journal Article**

- Gonzalez MA, Artalejo FR, Calero JR. Relationship between socioeconomic status and ischaemic heart disease in cohort and case-control studies. *International Journal of Epidemiology*. 1998; 27: 350-358.

##### **Book Chapter**

- Jacobsen S, Schulsinger F. The Danish Adoption Register. In: Mednick SA, Baert AE, eds. *Prospective Longitudinal Research: An Empirical Basis for the Primary Prevention of Psychosocial Disorders*. Oxford: Oxford University Press; 1981:225-230.

##### **Book**

- Neale M, Cardon LR. *Methodology for Genetic Studies of Twins and Families*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1992.

##### **Software**

- SAS/STAT Software [computer program]. Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2006.

##### **World Wide Web**

- Javaras KN, Laird NM, Hudson JI, et al. Estimating the prevalence of disease using relatives of case and control probands. COBRA preprint series. Article 31. Available at: <http://biostats.bepress.com.proxy1.cl.msu.edu:2047/cobra/ps/art31>. 2007. (Accessed March 4, 2008.)

The publisher owns the **copyright** for the published materials. Materials that do not comply with the above stated requirements shall not be accepted for reviewing and publishing.

##### **EDITORIAL ADDRESS:**

Assoc. Prof. S. Petrova, MD, PhD

Editor-in-Chief

Bulgarian Journal of Public Health

National Center of Public Health Protection

15, Acad Ivan Geshov Blvd, 1431 Sofia, Bulgaria

E-mail: s.petrova@ncphp.government.bg