

OCENA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA POLIMORFIZMÓW TYPU SNP GENÓW KODUJĄCYCH DEHYDRATAZĘ KWASU δ-AMINOLEWULINOWEGO (ALAD) W POPULACJI DZIECI Z GÓRNEGO I DOLNEGO ŚLĄSKA

FREQUENCY OF SNP GENETIC POLYMORPHISMS IN δ-AMINOLEVULINATE DEHYDRATASE GENE IN POPULATION OF CHILDREN FROM UPPER AND LOWER SILESIA

*Elżbieta Olewińska¹, Agata Kowalska-Pawlak¹, Agnieszka Kozłowska¹,
Lucyna Kapka^{2,3}, Krystyna Pawlas⁴, Natalia Pawlas¹*

¹ Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Zakład Toksykologii Genetycznej,
Kierownik Zakładu: dr n. przyr. Agata Kowalska-Pawlak

² Instytut Medycyny Wsi im. W. Chodźki w Lublinie, Samodzielna Pracownia Biologii Molekularnej,
Kierownik Pracowni: dr n. med. Lucyna Kapka

³ Wyższa Szkoła Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie, Katedra Zdrowia Publicznego,
Kierownik Katedry: prof. zw. dr hab. n. med. Leszek Wdowiak

⁴ Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra Higieny i Epidemiologii,
Kierownik Katedry: dr hab. n. med. Krystyna Pawlas

Streszczenie

Dehydrataza kwasu δ-aminolewulinowego (ALAD) jest enzymem biorącym udział w biosyntezie hemu. ALAD jest polimorficznym genem, który charakteryzuje się zróżnicowaną częstością występowania w poszczególnych populacjach i grupach etnicznych.

Celem pracy była ocena częstości występowania trzech wybranych polimorfizmów typu SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) genu dehydratazy kwasu δ-aminolewulinowego: G/C (Lys68Asn) w eksonie 4 (rs 1800435), A/G w intronie 3 (rs 8177800) oraz C/T (Tyr65Tyr) w eksonie 4 (rs 1139488) w populacji dzieci rasy kaukaskiej, pochodzących z Górnego i Dolnego Śląska. W celu identyfikacji genotypów dokonano izolacji DNA z krwi żyłnej. Interesujące fragmenty genu ALAD zostały zamplifikowane w reakcji PCR (ang. *polymerase chain reaction*)

z zastosowaniem odpowiednich dla każdego miejsca polimorficznego sekwencji starterów i warunków reakcji, a następnie poddane restrykcji odpowiednimi enzymami (RFLP – ang. *restriction fragment length polymorphism*). Polimorfizm rs 1800435 poddano także analizie metodą real-time PCR z zastosowaniem odpowiednich sekwencji sond TaqMan.

Wyniki pracy wykazały, iż częstości poszczególnych alleli i genotypów dla rs 1800435 i rs 1139488 dla analizowanej populacji są porównywalne z opisywanymi w innych populacjach europejskich. Natomiast częstość występowania rzadszego allelu A w rs 8177800 była dwukrotnie wyższa niż w innych populacjach europejskich.

Słowa kluczowe: *olów, polimorfizmy genetyczne, dehydrataza kwasu delta-aminolewulinowego, PCR-RFLP*

Nadesłano: 7.12.200

Zatwierdzono do druku: 26.02.2010

Summary

Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) is an enzyme involved in heme biosynthesis pathway. *ALAD* is a polymorphic gene which shows differences in the distribution in different populations and ethnic groups.

The aim of this study was to estimate the frequency of three SNP genetic polymorphisms in delta-aminolevulinic acid dehydratase gene: G/C (Lys68Asn) in exon 4 (rs 1800435), A/G in intron 3 (rs 8177800) and C/T (Tyr65Tyr) in exon 4 (rs 1139488) in caucasian population of children from Upper and Lower Silesia. In order to genotype identification, the genomic DNA was extracted from venous blood. The interesting fragments of *ALAD*

gene was amplified in PCR (polymerase chain reaction) reaction with appropriate primers and reaction conditions and then the RFLP technique (restriction fragment length polymorphism) was used. The rs 1800435 polymorphism was also analyzed with real-time PCR reaction with TaqMan probes.

The frequencies of the alleles and genotypes for rs 1800435 and rs 1139488 were similar to those reported in other European populations. The frequency of minor allele A for 8177800 was twofold higher than in other populations.

Key words: *lead, genetic polymorphisms, delta-aminolevulinic acid dehydratase, PCR-RFLP*

Wstęp

Rozwój urbanizacji i uprzemysłowienie sprawiły, iż zawartość metali ciężkich takich jak rtęć, kadm i ołów w środowisku przyrodniczym (glebie, wodzie i powietrzu) tak niezwykle wzrosła, że zaczęła stwarzać zagrożenie dla prawidłowego rozwoju wszystkich organizmów, w tym człowieka. Ołów dostaje się do środowiska zarówno ze źródeł naturalnych jak i antropogenicznych. Jest składnikiem skorupy ziemskiej i dostaje się do pokarmów oraz zasobów wody. Jest absorbowany w dużej mierze przez warzywa liściaste. Są tereny zanieczyszczone, w których w glebie ołów występuje w 90% jako PbS. Zwiększone stężenie ołowiu w glebie może być wynikiem przetrwałego zanieczyszczenia spalinami z benzyny ołowiowej, zanieczyszczenia odpadami lub związane z naturalnym składem skorupy ziemskiej. Do antropogenicznych zanieczyszczeń ołowiem zaliczamy ołowiane rury w wodociągach, przemysł, farby, materiały budowlane, benzynę z dodatkiem tetraetylu ołowiu, spaliny samochodowe, akumulatory, dym papierosowy (0,017-0,98 µg w papierosie), ceramikę i szkło, amunicję, akcesoria wędkarskie i inne [1, 2].

Kontakt z jonami ołowiu w postaci par i pyłu może wywołać ołowicę, czyli ostre lub przewlekłe zatrucie. Początkowe objawy zatrucia ołowiem są niespecyficzne, co utrudnia postawienie rozpoznania, zwłaszcza w przypadku narażenia środowiskowego. Przejawiają się utratą apetytu, ogólnym osłabieniem organizmu, bólami głowy, nudnościami. Przewlekające się zatrucie jonami ołowiu prowadzi do uszkodzenia nerek, układu nerwowego, krwiotwórczego, krwionośnego, rozrodczego oraz wątroby [3, 4].

Dzieci wchłaniają z przewodu pokarmowego ok. 45–50% z ołowiu, podczas gdy dorośli jedynie 10%. Szczególna wrażliwość dzieci na toksyczne działanie jonów ołowiu wynika z większego wchłaniania, co wynika ze specyficznych wzorców zachowania,

wolniejszej eliminacji z ustroju, większego tempa przemian metabolicznych, zwłaszcza w szybko rozwijającym się ośrodkowym układzie nerwowym. Badania z ostatnich lat pokazują, że nawet niskie dawki ołowiu mogą powodzić do zaburzeń rozwoju umysłowego dzieci, stwarzając tym samym problem z ustaleniem biologicznie bezpiecznego poziomu ołowiu we krwi.

Wrażliwość na toksyczne działanie ołowiu zależy od wielu czynników, w tym: wieku, stanu odżywienia (konkurowanie z mikroelementami), zasobem organizmu w wapń i żelazo oraz witaminę D, rodzajem związku ołowiu (organiczny albo nieorganiczny), stylu życia, wykonywanego zawodu, środowiska i czynników genetycznych [1]. Ołów może być uwalniany z kości w stanach nasilonego metabolizmu, na przykład w ciąży i może wówczas wpływać niekorzystnie na rozwój płodu.

Skutki zdrowotne zarówno środowiskowego jak i zawodowego narażenia na ołów są osobniczo zmienne i przypuszczalnie uwarunkowane interakcjami geny-środowisko. W odniesieniu do populacji eksponowanych na ołów badania naukowe wykazały zmienność zaobserwowanych efektów zdrowotnych w zależności od polimorfizmu genu dehydratazy kwasu δ-aminolewulinowego (*ALAD*) [5]. Dehydrataza kwasu δ-aminolewulinowego zwana również syntazą porfobilinogenu (E.C. 4.2.1.24) odpowiedzialna jest za powstawanie kwasu δ-aminolewulinowego podczas drugiego etapu biosyntezy hemu [6]. Ołów działa jako inhibitor tego enzymu, co prowadzi do gromadzenia się kwasu aminolewulinowego (ALA), który działa genotoksycznie i neurotoksycznie [7, 8].

Gen *ALAD* ma długość 16 kpz i zlokalizowany jest w chromosomie 9q34 (9). Gen ten występuje w polimorficznych wariantach. Najczęściej badanym polimorfizmem w tym genie jest G177C, którego warianty określane są jako: *ALAD 1* i *ALAD 2*

[10]. Warunkują one trzy formy izoenzymatyczne tego genu lub też przy badaniach techniką PCR-RFLP (ang. *polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*) trzy warianty genotypowe (*ALAD* 1-1, 1-2, 2-2). Polimorfizm G177C polega na transwersji G/C w pozycji 177 regionu kodującego, co skutkuje podstawieniem asparaginy w miejsce lizyny. U ludzi allel *ALAD* 2 występuje z mniejszą częstością (0–20%) niż allel *ALAD* 1 [7].

Allel *ALAD* 2 wywiera częściowo ochronny efekt, co może wynikać z mocniejszego wiązania ołowiu przez ten enzym, dzięki czemu metal ten występuje w mniej dostępnej biologicznie formie [5, 9–11]. Stąd u osób z genotypem *ALAD* 1-2 lub *ALAD* 2-2 narażonych na ołów pomimo występowania podwyższonego poziomu ołowiu we krwi, stwierdza się niższy poziom ZPP i wyższy hemoglobiny [4, 13, 14]. U osób z genotypem *ALAD* 1-1 obserwuje się wyższy o 30% poziom ALA w osoczu w porównaniu do pozostałych genotypów [4].

Coraz większa ilość badań wskazuje na możliwy wpływ na toksyczność ołowiu innych, mniej dotychczas przebadanych miejsc polimorficznych w genie *ALAD* [15, 16]. Obecność haplotypu Rsa39488/*ALAD* 2-2 może wywierać ochronny efekt przed toksycznym działaniem ołowiu i wpływać na funkcje neurobehawioralne [17].

Celem badań była ocena częstości występowania polimorfizmów typu SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) genu dehydratazy kwasu delta-aminolewulinowego: G/C (Lys59Asn) w eksonie 4 (dbSNP ID: rs 1800435), A/G w intronie 3 (dbSNP ID: rs 8177800) oraz C/T (Tyr65Tyr) w eksonie 4 (dbSNP ID: rs 1139488) w populacji dzieci rasy kaukaskiej, pochodzących z Górnego i Dolnego Śląska.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły próbki krwi żyłnej pobrane od 7-letnich dzieci do próbek próżniowych Vacutainer zawierających K₃EDTA. Przebadano populację łączną 85 dzieci dla SNP rs 1800435 i rs 8177800 oraz 195 dzieci dla SNP rs1139488.

Izolacja DNA

DNA izolowano z krwi pełnej mrożonej (200 µl) za pomocą gotowych zestawów kolumnowych DNA QIAmp Blood Mini Kit (QIAGEN) zgodnie z załączonym protokołem. Stężenie wyizolowanego DNA zostało oznaczone spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorpcji światła UV przy długości fali 260 nm (A₂₆₀) i 280 nm (A₂₈₀). Na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych dokonano również oceny czystości otrzymanego DNA. Wyizolowane DNA przetrzymywano w temperaturze –20° C.

Genotypowanie

Do badania polimorficznych wariantów genu *ALAD* zastosowano metodę PCR-RFLP. Interesujące fragmenty genu *ALAD* zostały zamplifikowane w reakcji PCR z zastosowaniem odpowiednich dla każdego miejsca polimorficznego sekwencji starterów i warunków reakcji, a następnie poddane inkubacji ze specyficznym działającym enzymem restrykcyjnym. Wystąpienie polimorfizmu w genie *ALAD* wprowadza lub znosi miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez odpowiedni enzym.

Mieszanina reakcyjna wykorzystywana podczas powielania fragmentów genu *ALAD* dla rs 1800435 i rs 8177800 o całkowitej objętości DNA 12,5 µl zawierała: 50 ng DNA; 200 µM każdego startera: forward 5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3' i reverse 5'-GGCAAAGACCACGTCATTC-3' [12]; 0,2 µM dNTPs, 1 x bufor PCR (750 mM Tris-HCl, pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20; Syngen); 1,5 mM MgCl₂ i 1,0 U polimerazy Taq (Silver-Taq DNA Polymerase, Syngen). Reakcja PCR prowadzona była w termocyklerze DNA Engine Thermal Cycler (Bio-Rad). Warunki reakcji PCR były następujące: denaturacja wstępna 94° C, 4 minuty; 35 cykli składających się z denaturacji 94° C, 30 sek, przyłączania starterów 61° C, 30 sek, wydłużania 72° C, 30 sek; końcowe wydłużanie 72° C, 4 minuty. Produkt reakcji PCR (3 µl) został poddany trawieniu enzymem restrykcyjnym *Msp*I (3U) (MBI Fermentas), w temperaturze 37° C przez 16 godzin. Enzym ten rozpoznaje sekwencje znajdujące się dokładnie w miejscu polimorficznym wariantu C/C genu *ALAD* dla rs 1800435 i wariantu G/G dla rs 8177800 (Tab. I). W celu analizy fragmentów uzyskanych po trawieniu enzymem restrykcyjnym przeprowadzono ich rozdział elektroforetyczny w 3% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (0,5 µg/ml). Żele odczytywane były niezależnie przez dwie osoby. Dla rs 1800435 w przypadku wariantu C/C (*ALAD* 2-2) produkt PCR ulega fragmentacji na odcinki o długości 513, 158, 139, 71 i 36 pz, a wariant G/G (*ALAD* 1-1) na odcinki o długości 584, 158, 139 i 36 pz. Dla rs 8177800 w przypadku wariantu G/G produkt PCR ulega fragmentacji na odcinki o długości 584, 158, 139 i 36 pz, a wariant A/A na odcinki o długości 584, 297 i 36 pz.

W reakcji PCR dla rs 1139488 mieszanina reakcyjna o całkowitej objętości 12,5 µl zawierała: 50 ng DNA; 200 µM dNTPs; 0,2 µM każdego startera zaprojektowanego z wykorzystaniem programu Primer Select: forward 5'-AGGAGCCTTCCACAGC-CGAAT-3' i reverse 5'-CCTTCCTTTTCTGTTT-GTATTGGAGAC-3'; 1 x bufor PCR (750 mM Tris-HCl, pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20; Syngen); 2,5 mM MgCl₂ i 1,0 U polimerazy Taq

(SilverTaq DNA Polymerase, Syngen). Reakcja PCR prowadzona była w termocyklerze DNA Engine Thermal Cycler (Bio-Rad). Warunki reakcji PCR były następujące: denaturacja wstępna 94° C, 4 minuty; 35 cykli składających się z denaturacji 94° C, 30 sek, przyłączania starterów 63° C, 30 sek, wydłużania 72° C, 30 sek; końcowe wydłużanie 72° C, 4 minuty. Produkt reakcji PCR (3 µl) został poddany trawieniu enzymem restrykcyjnym *RsaI* (3U) (MBI Fermentas), w temperaturze 37° C przez 16 godzin. Enzym ten rozpoznaje sekwencje znajdujące się w miejscu polimorficznym wariantu C/C genu *ALAD* (tab. I). W celu analizy fragmentów uzyskanych po trawieniu enzymem restrykcyjnym przeprowadzono ich rozdział elektroforetyczny w 3% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (0,5 µg/ml). Żele odczytywane były niezależnie przez dwie osoby. W przypadku wariantu C/C produkt PCR ulega fragmentacji na odcinki o długości 427 i 112 pz, a wariant T/T pozostaje nienaruszony.

Ze względu na niewielką różnicę w długości fragmentów pozwalających na identyfikację wariantów *ALAD* 1-1 i *ALAD* 2-2 oraz ograniczoną rozdzielczość żelu agarozowego, badany polimorfizm rs 1800435 dodatkowo poddano analizie metodą real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym) z sondami TaqMan.

Mieszanina reakcyjna o całkowitej objętości 10 µl zawierała: 10 ng DNA; 1 x bufor IQ Supermix (Bio-Rad); 0,9 µM każdego startera: forward 5'TGCCTTCCTTCAACCCCTCTA-3' i reverse 5'CCAAGGGCCTCAGCATCTC-3'; 0,05 µM sondy 5'-Fam-TGTGAAGCGGCTGG-3' dla wariantu G i 0,05 µM sondy 5'-Vic-TGTGAACCGGCTGG-3' dla wariantu C. Reakcja PCR prowadzona była w termocyklerze CFX96 Real Time PCR (Bio-Rad) w następujących warunkach: 50 µC, 2 minuty, denaturacja wstępna 95 µC, 10 minut; 40 cykli: denaturacja 95 µC, 15 sek, przyłączanie starterów 60 µC, 1 minuta, odczyt płytki.

Tabela I. Charakterystyka badanych polimorfizmów.
Table I. Characteristics of studied polymorphisms.

SNP/ polimorfizm	Enzym	Sekwencja rozpoznawana	Produkt PCR (pz)	Długości otrzymanych fragmentów po restrykcji (pz)
rs1800435 G/C	<i>MspI</i>	C↓CGG	917	GG: 584, 158, 139, 36 CC: 513, 158, 139, 71, 36
rs 8177800 A/G	<i>MspI</i>	C↓CGG	917	GG: 584, 158, 139, 36 AA: 584, 297, 36
rs 1139488 C/T	<i>RsaI</i>	GT↓AC	646	CC: 424, 222 TT: 646

Analiza statystyczna

W celu określenia rozkładu genotypów poszczególnych polimorfizmów genu *ALAD* określono częstość występowania poszczególnych alleli i genotypów. Rejestrowana liczba każdego z genotypów była porównywana z oczekiwaną na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga z użyciem testu χ^2 . Wartość $p < 0,05$ przyjęto za istotną statystycznie.

Wyniki

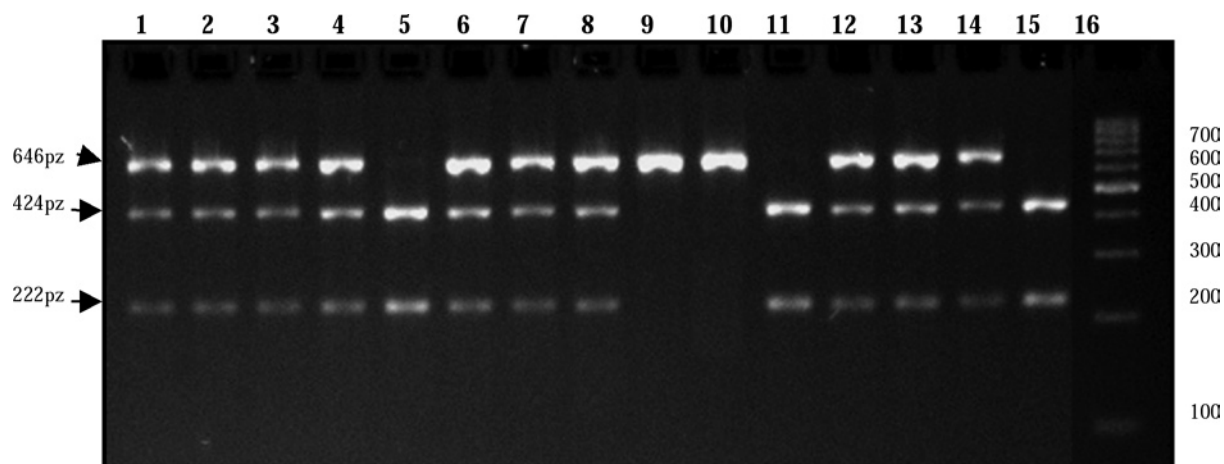
Uzyskane wyniki genotypowania dla trzech badanych polimorfizmów metodą PCR-RFLP przedstawiono na ryc. 1 i 2.

Rozkłady genotypów i alleli dla polimorfizmów rs 1800435, rs 8177800 oraz rs 1139488 w genie *ALAD* zostały przedstawione w tabeli II.

Wśród badanych polimorfizmów tylko rs 1139488 wykazuje częstość alleli zgodną z prawem Har-

dy'ego-Weinberga. W dwóch pozostałych przypadkach wartości obserwowane i oczekiwane nie są w równowadze genetycznej Hardy'ego-Weinberga, co może wynikać z faktu, iż przebadano zbyt małą populację.

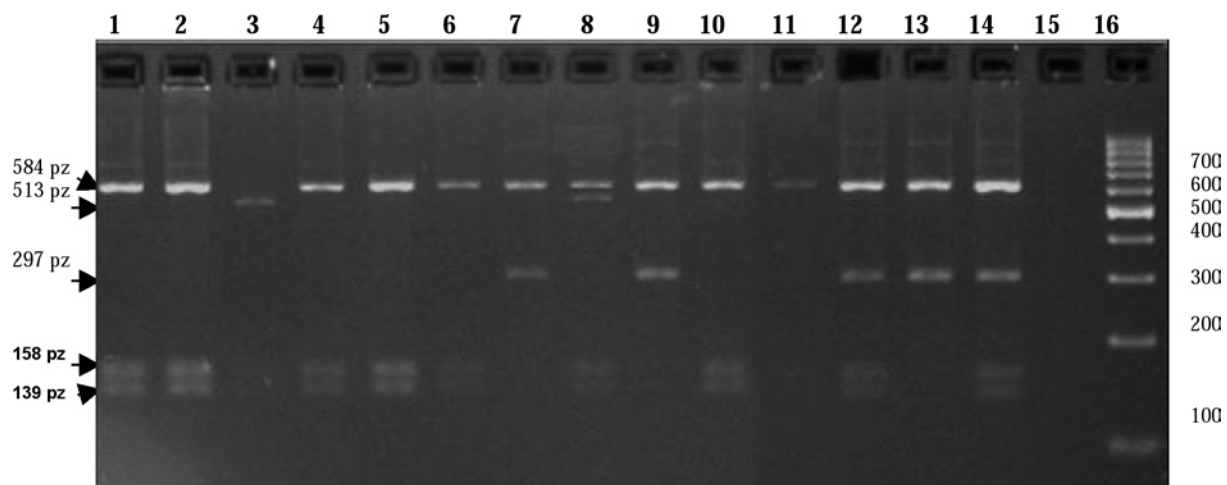
W badanej populacji na podstawie analizy, techniką PCR-RFLP enzymem *MspI*, wykryto jedną homozygotę CC. W analizie z zastosowaniem sondy Taqman metodą real-time PCR wynik ten potwierdził się, ale zidentyfikowano również drugą homozygotę CC, która w analizie RFLP została oceniona jako homozygota GG. Metoda real-time PCR z zastosowaniem sondy Taqman zgodnie z przewidywaniami, okazała się być bardziej czuła i specyficzna w identyfikacji genotypów, co można tłumaczyć m.in. możliwą modyfikacją zasad w miejscu restrykcji, które może wpłynąć na zafałszowanie wyników w tradycyjnej metodzie PCR-RFLP.



ścieżka: 1,2,3,4,6,7,8,12,13,14 heterozygota CT; 5,11,15 homozygota CC; 9,10 homozygota TT; 16 marker wielkości 100 pz
line: 1,2,3,4,6,7,8,12,13,14 CT heterozygote; 5,11,15 CC homozygote; 9,10 TT homozygote ; 16 100 bp DNA ladder

Rycina 1. Elektroforetyczny obraz trawienia enzymem restrykcyjnym *RsaI* fragmentu genu *ALAD* (rs1139488).

Figure 1. Band pattern of electrophoresis after *RsaI* restriction of *ALAD* gene PCR product (rs1139488)



rs1800435 – ścieżka: 1,2,4,5,6,7,9,10,11,12,13,14 homozygota GG (ALAD 1-1); 3 homozygota CC (ALAD 2-2); 8 heterozygota GC (ALAD 1-2); 16 marker wielkości 100 pz

rs8177800 – ścieżka: 1,2,3,4,5,6,8,10,11 homozygota GG; 7,9,13 homozygota AA; 12,13 heterozygota GA; 16 marker wielkości 100 pz

rs1800435 – line: 1,2,4,5,6,7,9,10,11,12,13,14 GG homozygote (ALAD 1-1); 3 CC homozygote (ALAD 2-2); 8 GC heterozygote (ALAD 1-2); 16 100 bp DNA ladder

rs8177800 – line: 1,2,3,4,5,6,8,10,11 GG homozygote ; 7,9,13 AA homozygote; 12,13 GA heterozygote; 16 100 bp DNA ladder

Rycina 2. Elektroforetyczny obraz trawienia enzymem restrykcyjnym *MspI* fragmentu genu *ALAD* (rs1800435 i rs 8177800).

Figure 2. Band pattern of electrophoresis after *MspI* restriction of *ALAD* gene PCR product (rs1800435 and rs 8177800).

Tabela II. Rozkład genotypów oraz częstość alleli dla polimorfizmu rs 1800435, rs 8177800, rs 1139488.
Table II. Distribution of genotypes and allels frequency in rs 1800435, rs 8177800, rs 1139488 polymorphisms.

SNP	Genotyp	N (obserwowane)	Częstość genotypu	N (oczekiwane)	Częstość allelu
rs1800435	G/G	75	0,89	73,4	G: 0,93 C: 0,07
	G/C	8	0,09	11,2	$\chi^2 = 6,793$ p = 0,009
	C/C	2	0,02	0,4	
rs8177800	G/G	71	0,84	65,3	G: 0,88 A: 0,12
	G/A	7	0,08	18,4	$\chi^2 = 32,64$ p = 0,000
	A/A	7	0,08	1,3	
rs1139488	T/T	59	0,30	60,9	T: 0,56 C: 0,44
	T/C	100	0,51	96,1	$\chi^2 = 0,314$ p = 0,57
	C/C	36	0,18	37,9	

Dyskusja

Znanych jest wiele polimorfizmów w genie dehydratazy kwasu δ -aminolewulinowego, które występują z różną częstością w poszczególnych grupach etnicznych. Obecnie w bazie danych NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) znajduje się 219 polimorfizmów typu SNP w ludzkim genie *ALAD* [18]. W niniejszej pracy oceniono częstość występowania trzech wybranych polimorfizmów (rs 1800435, rs 8177800, rs 1139488) w populacji dzieci rasy kaukaskiej.

Uzyskane wyniki wykazały, że częstości poszczególnych alleli i genotypów są porównywalne z opisywanymi w innych populacjach europejskich (tab. III) dostępnych w bazie danych NCBI. Jedynie częstość występowania rzadszego allelu A w rs 8177800 jest dwukrotnie wyższa niż w innych populacjach europejskich, gdzie wynosi 0,058. Analiza piśmien-

nictwa wskazuje, że polimorfizm ten nie był dotąd szeroko badany. Zgodnie z danymi zamieszczonymi w bazie NCBI genotyp A/A spotykany jest wyłącznie wśród Europejczyków. W populacji afrykańskiej oraz azjatyckiej częstość allelu A jest bliska zeru, jedynie w populacji Chińczyków wynosi 0,011.

Dla polimorfizmu rs 1139488 uzyskany rozkład genotypów i częstości alleli jest zgodny z danymi pochodzącymi z międzynarodowego projektu HapMap. Podobne wyniki uzyskano również w badaniach prowadzonych wśród rumuńskich kobiet, gdzie częstość rzadszego allelu C wyniosła 0,41 [15]. Zbliżony rozkład częstości poszczególnych alleli (T – 0,58, C – 0,42) został stwierdzony w populacji 323 wietnamskich pracowników, narażonych zawodowo na ołów, u których stwierdzono istnienie korelacji między genotypem i poziomem ołowiu we krwi [16].

Tabela III. Porównanie częstości występowania alleli w różnych populacjach.

Table III. Comparison of allels frequency in different populations.

SNP	Badana populacja		HapMap-CEU (populacja europejska)		PDR90 (global)	
	G	C	G	C	G	C
rs1800435	0,93	0,07	0,933	0,067	0,946	0,054
rs8177800	G 0,88	A 0,12	G 0,942	A 0,058	G 0,953	A 0,047
rs1139488	T 0,56	C 0,44	T 0,517	C 0,483	T 0,698	C 0,302

Do najczęściej badanych i szeroko opisywanych polimorfizmów genu *ALAD* należy polimorfizm G177C (rs 1800435). Częstość allelu *ALAD* 2 odnotowana w Europie we wcześniejszych badaniach waha się od 0,05 do 0,11 (19–23). Otrzymany w prezentowanej pracy rozkład częstości alleli *ALAD* 1 (0,93) i *ALAD* 2 (0,07) jest zgodny z danymi odnoszącymi się do innych populacji europejskich, jak również z globalnym rozkładem dla tego polimorfizmu (populacja PDR90, tab. V). W uprzednio prowadzonych badaniach wśród dzieci na terenie Polski zaobserwowane częstości allelu *ALAD* 2 wynosiły 0,06 [21] i 0,10 [24].

Zgodnie z wcześniejszymi badaniami u ludzi allel *ALAD* 2 występuje z mniejszą częstością (5–20% w populacji kaukaskiej, 3–11% w populacji azjatyckiej, 3% w populacji afroamerykańskiej) niż allel *ALAD* 1 [7, 22]. Rzadszy allel jest najbardziej rozpowszechniony w populacji Żydów aszkenazyjskich, gdzie wynosi 0,20 [25].

Fujihara i wsp. [26] wykazali, że w populacji afrykańskiej allel *ALAD* 2 nie występuje, a częstość tego allelu w populacji kaukaskiej i azjatyckiej może być równa. Na częstość występowania poszczególnych alleli w populacji mogą mieć wpływ czynniki środowiskowe, takie jak ołów. Długotrwała ekspozycja na ołów może prowadzić do zwiększenia częstości allelu *ALAD* 2, który znany jest ze swego protekcyjnego działania [27]. Duża częstość rzadszego allelu wśród Włochów, Hiszpanów, a także Izraelczyków i Turków może być wynikiem ekspozycji na ołów związanej z obecnością na tych terenach już w czasach starożytnych kopalni ołowiu [26]. Wykazano również, iż rozpowszechnienie alleli genu *ALAD* jest różne wśród białych i czarnych ludzi, niezależnie od ich geograficznego pochodzenia [28].

Powszechnie wiadomo, że istnieje duża zmienność osobnicza w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. W związku z tym coraz częściej zwraca się uwagę na interakcje genów ze środowiskiem. Istnienie polimorfizmów genu *ALAD* rozpowszechnionych w populacji ludzkiej, jak również stwierdzenie hamującego działania ołowiu na ten enzym pozwala na wykorzystanie tych polimorfizmów jako biomarkerów wrażliwości osobniczej na ołów. Biomarkery indywidualnej wrażliwości umożliwiają poznanie profilu genetycznego populacji oraz zidentyfikowanie osób szczególnie narażonych na negatywny wpływ czynników środowiskowych, takich jak ołów.

Wnioski

1. Częstości poszczególnych alleli i genotypów dla polimorfizmu rs1800435 i rs1139488 określone dla analizowanych populacji były porównywalne z opisywanymi w innych populacjach europejskich.

2. Częstość występowania rzadszego allelu A w rs 8177800 była dwukrotnie większa niż w innych populacjach europejskich.

3. Metoda real-time PCR z sondami Taqman jest bardziej czuła i specyficzna w wykrywaniu genotypów.

Praca została sfinansowana częściowo z tematu statutowego Instytutu Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego nr 501-09-01 oraz Projektu PHIME nr FOOD-CT-2006-016253 (Acronym: PHIME).

Praca finansowana przez Unię Europejską w ramach 6. Programu Ramowego nr kontraktu FOOD-CT-2006-016253 (Acronym: PHIME). Opinie w niej wyrażone są wyłącznie odzwierciedleniem poglądów autorów. Komisja nie odpowiada za informacje w niej zawarte.

This work was supported by the EU through its Sixth Framework Programme for RTD (contract no FOOD-CT-2006-016253). Reflects only the author's views. The Community is not liable for any use that may be made of the information contained therein.

Piśmiennictwo

1. Toscano C.D., Guilarte T.R.: Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Res Rev* 2005; 49: 529-554.
2. Lanphear B.P., Roghmann K.J.: Pathways of lead exposure in urban children. *Environ Res.* 1997; 74: 67-73.
3. Kakkar P., Jaffery F.N.: Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005; 19:335-349.
4. Onalaja A.O., Claudio L.: Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ. Health Perspect.* 2000; 108:23-28.
5. Kapka L., Pawlas N., Olewińska E., Kozłowska A., Pawlas K.: Rola genu *ALAD* w patogenezie szkodliwego działania ołowiu w populacjach dzieci narażonych środowiskowo na ołów – analiza piśmiennictwa. *Medycyna Środowiskowa*, 2007; 10 (2), 83-90.
6. Silbergeld E.K., Waalkes M., Rice J.M.: Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am.J.Ind.Med.* 2000; 38:316-323.
7. Kelada S.N. i wsp.: δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGe review. *Am. J. Epidemiol.* 2001; 154 (1), 1-13.
8. Silbergeld E.K.: Facilitative mechanisms of lead as carcinogen. *Mutat. Res.* 2003; 533: 121-133.
9. Wetmur J.G. i wsp.: "Human delta-aminolevulinic acid dehydratase: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone.". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986; 83: 7703-7707
10. Battistuzzi G. i wsp.: delta-Aminolevulinic acid dehydratase: a new genetic polymorphism in man. *Ann.Hum.Genet.* 1981; 45: 223-229.
11. Bergdahl I.A.: Lead-binding proteins – a way to understand lead toxicity? *Analysis* 1998; 26 (6): 81-84.
12. Wetmur J.G. i wsp.: Molecular characterization of the human delta-aminolevulinic acid dehydratase 2 (*ALAD2*) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am.J.Hum.Genet.* 1991; 49: 757-763.
13. Wetmur J.G., Lehnert G., Desnick R.J.: The delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: higher blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1-2 and 2-2 isozymes. *Environ. Res.* 1991; 56:109-119.

14. Scinicariello F. i wsp.: Lead and δ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: where does it lead? A meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 2007; 115:35-41.
15. Rabstein S. i wsp.: Lack of association of delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphisms with blood lead levels and hemoglobin In Romanian women from a lead-contaminated region. *J. Toxicol. Environ. Health* 2008, 71: 716-724
16. Chia, S.E., Zhou, H.J., Tham, M.T., Yap, E., Dong, N.V., Tu, N.T.H., Chia, K.S.: Possible influence of delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism and susceptibility to renal toxicity of lead: a study of a Vietnamese population. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113, 1313–1317.
17. Chia, S.E. i wsp.: Possibilities of newer ALAD polymorphism influencing human susceptibility to effects of inorganic lead on the neurobehavioral functions. *NeuroToxicology.* 2007; 28: 312-317.
18. NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> wersja 18.11.2009
19. Benkmann H. G., Bogdanski P., Godde H. W.: Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in various populations. *Hum. Hered.* 1983, 33:62-64.
20. Kapotis Ch. i wsp.: The genetic polymorphism of aminolevulinic acid dehydratase (ALADH) in Greece. *Hum. Hered.* 1998, 48:155-157.
21. Raczek E.: Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in the Upper Silesian population, Poland, *Hum. Hered.* 1994; 44:172-174.
22. Petrucci R., Leonardi A., Battistuzzi G.: The genetic polymorphism of delta aminolevulinic acid dehydratase in Italy. *Hum. Genet.* 1982, 60:289-290.
23. Süzen H.S., Dudu Y., Aydin A.: Molecular analysis of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) gene polymorphism in a Turkish population. *Biochem. Genet.* 2004, 42: 461-467.
24. Kapka L. Rozprawa doktorska. Biomarkery wczesnych skutków biologicznych i wrażliwości osobniczej u dzieci narażonych środowiskowo na ołów. Śląska Akademia Medyczna, (2006).
25. Ben-Ezzer J., Oelsner H., Szeinberg A. Genetic polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in several population groups in Israel. *Hum. Hered.* 1987, 37:229.
26. Fujihara J i wsp.: Ethnic variation in genotype frequencies of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD). *Toxicol. Lett.* doi: 10.1016/j.toxlet.2009.09.005
27. Pérez-Bravo F. i wsp.: Association between aminolevulinic acid dehydratase genotypes and blood lead levels in children from a lead-contaminated area in Antofagasta, Chile. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2004; 47:276-80.
28. Montenegro M.F. i wsp.: Ethnicity affects the distribution of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) genetic variants. *Clinica Chimica Acta* 2006; 367: 192–195.

Adres do korespondencji:
 mgr Elżbieta Olewińska
 Zakład Toksykologii Genetycznej
 Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego
 ul. Kościelna 13; 41-200 Sosnowiec
 tel. (32) 266 08 85; fax (32) 266 11 24
 e.olewinska@imp.sosnowiec.pl