

IZLUČIVANJE 5-HIDROKSIINDOLSIRČETNE  
KISELINE U MOKRAĆI OSOBA IZLOŽENIH  
OLOVU\*M. DUGANDŽIĆ, B. STANKOVIĆ, LJ. MILOVANOVIĆ,  
Z. KORIĆANAC

Zavod za neorgansku i analitičku hemiju, Farmaceutski fakultet, Beograd,  
(Primljeno 16. III 1973)

Određivana je koncentracija 5-hidroksiindol-sirčetne kiseline (5-HISK) u mokraći, kao krajnjeg produkta metabolizma triptofana, kod grupe radnika zaposlenih u proizvodnji olovnih akumulatora. Uporedo, radi utvrđivanja stepena izloženosti i apsorpcije olova, određivana je delta-aminolevulinska kislina (ALK), koproporfirin i olovo u mokraći kao i koncentracija olova u vazduhu radne sredine.

Rezultati ispitivanja su pokazali da je veće izlučivanje 5-HISK kod osoba koje su eksponirane olovu nego kod kontrolne grupe.

*Rapport* (1) izolovao je i opisao serotonin (5-hidroksitriptamin). Serotonin je veoma rasprostranjen u tkivima sisara koja su bogata monoaminoksidazama i aldehidoksidazama (naročito u mozgu, gastrointestinalnom traktu i krvnim pločicama), a oksidacija do 5-hidroksiindolsirčetne kiseline (5-HISK) najčešći je put oksidacije serotonina. Kasnije izvedeni eksperimenti (2) ukazali su na tačnost ove pretpostavke. Proučavanja koja su sprovedili *Underfriend, Titus, Weissbach* (3) pokazuju da je 5-HISK normalna sastojina u mokraći sisara. Oni su, takođe, opisali kolorimetrijski metod za kvantitativno određivanje 5-HISK u mokraći.

Budući da je 5-HISK u mokraći glavni konačni izvod metabolizma triptofana kod životinja i ljudi, to može da služi kao lako merljivi produkt metabolizma u raznim fiziološkim i patološkim procesima. Tako su *Haverback, Sjoedsma, Terry* (5) ispitivali izlučivanje 5-HISK kod pacijenata sa različitim kliničkim oboljenjima.

Dosadašnji radovi ne govore mnogo o ispitivanju serotonina ili njegovih produkata metabolizma kod profesionalnih oboljenja, patoloških procesa usled trovanja ili povećane izloženosti nekim toksičnim agensima.

\* Ova proučavanja su sprovedena u saradnji sa toksikološkom laboratorijom Instituta za medicinu rada SR Srbije.

Ispitivanje je finansirano od Zajednice medicinskih naučnih ustanova SR Srbije.

Mogućnost da izloženost olovu uzrokuje više poremećaja u metabolizmu nekih aminokiselina nije nikada bila odbačena. Velik broj radova posvećen je izlučivanju delta-aminolevulinske kiseline kod ljudi izloženih olovu (6, 7, 8). Vrlo malo pažnje je posvećeno metabolizmu proteinogenih aminokiselina. Na povećano izlučivanje alanina ukazali su *Clarkson* i *Kench* (9), a kasnije i *Spett*, *Bahyrycz*, *Urbanowicz*, *Grabecki*, *Otrozonssec* (10). Međutim, nespecifičnost ovog fenomena ne dozvoljava da se određivanje alanina iskoristi u dijagnostičke svrhe.

Odnedavno je počela da se poklanja nešto veća pažnja triptofanu i jednom od njegovih krajnjih produkata metabolizma 5-HISK. Italijanski autori (11) proučavali su izlučivanje 5-HISK u eksperimentima na životinjama koje su primale tetraetilolovo. Našli su da tetraetilolovo prouzrokuje statistički značajan pad u izlučivanju 5-HISK. Eksperimenti na životinjama trovanim tetraetilolovom respiratornim putem nisu pokazali promene u izlučivanju 5-HISK (12).

Nismo našli podatke o izlučivanju 5-HISK kod osoba koje su profesionalno izložene olovu. Jedini rad koji smo našli u dostupnoj literaturi jeste onaj *Urbanowicza*, *Grabeckog* i *Kozielskog* (13). Taj rad ukazuje da povećano izlučivanje 5-HISK može da se upotrebi kao vredan laboratorijski indeks povećane apsorpcije olova. Povećano izlučivanje 5-HISK kod intenzivnije izloženosti i apsorpcije olova verovatno stoji u vezi sa izmenjenim metabolizmom triptofana usled delovanja tog toksičnog metala. S obzirom na to što biološki parametri dobro reflektuju nastale biohemijske promene u organizmu, smatrali smo da će za laboratorijsku dijagnostiku biti korisno ispitati vrednost izlučivanja 5-HISK na većoj grupi radnika izloženih olovu.

#### MATERIJAL I METODE

Za naša proučavanja odabrali smo 50 radnika koji su, radeći na proizvodnji i opravci olovnih akumulatora, svakodnevno izloženi dejstvu prašine i dimova olovnih oksida. Koncentracija olova u vazduhu radne sredine bila je različita u raznim pogonima i kretala se u granicama od 0,05 do 1,00 mg/m<sup>3</sup>. Ovi nalazi ukazuju da su ispitivani radnici bili izloženi dejstvu olova.

U cilju ispitivanja uticaja olova na metabolizam serotonina, odnosno u krajnjoj liniji triptofana, usmerili smo naš rad na određivanje sadržaja 5-HISK u mokraći i iznalaženju eventualne zavisnosti između stepena izloženosti olovu i količine izlučene 5-HISK.

Metabolit triptofana, 5-HISK određivan je u mokraći spektrofluorometrijskom metodom (14) na sledeći način: U 2 ml mokraće doda se 2,5 ml vode, zatim 1 ml 10% -tnog ZnSO<sub>4</sub> i 0,5 ml N NaOH, promućka i centrifugira 10 min. na 3000 obrtaja. Zatim se otpipetira 4 ml supernatantnog rastvora i u njega se doda 0,3 ml 6 N HCl, 20 ml etra i 2 g NaCl i mućka 20 min. Kad se slojevi dobro odvoje, otpipetira se 15 ml etarskog ekstrakta, doda 3 ml 0,5 M fosfatnog pufera (pH 7), mućka 20 min., iz-

dvoji vodena faza i odredi intenzitet fluorescencije na  $340\text{ m}\mu$  pomoću aktiviranja na  $295\text{ m}\mu$ . Standardna kriva pravi se rastvorom 5-HISK koji sadrži  $0,1\ \gamma$  po ml.

Radi procenjivanja stepena stvarne apsorpcije olova u radnika zaposlenih na proizvodnji akumulatora uporedo su određivani i najvažniji biotoksikološki parametri u mokraći radnika. Ovim proučavanjima prethodilo je ispitivanje istih parametara kod 35 stanovnika koji žive udaljeni od gradova i industrije. Kod radnika i kontrolne grupe – stanovnika određivani su pored 5-HISK i olovo u mokraći polarografskim metodom (15), koproporfirin u mokraći spektrofotometrijskom metodom (16) i delta-aminolevulinska kiselina (ALK) u mokraći metodom koji su objavili *Grabecki, Haduch i Urbanowicz* (17).

Sve laboratorijske analize, 5-HISK, olovo, ALK i koproporfirin, urađene su na svežem uzorku mokraće, koja je uzeta kao prva prepodnevna porcija posle dolaska radnika na posao.

### REZULTATI I DISKUSIJA

Koncentracija olova u vazduhu radnih prostorija od  $0,05$  do  $1,00\text{ mg/m}^3$  upozorava da su radnici bili izloženi olovu često iznad MDK, a koncentracije olova u mokraći tih radnika od  $0,066$  do  $0,596\text{ mg/l}$  (srednja vrednost  $0,213\text{ mg na l}$ ) ukazivale su da je došlo i do znatne apsorpcije olova.

Nalazi olova u vazduhu i biološkim tečnostima ukazuju da u određenoj populaciji postoji izloženost (ekspozicija) olovu u određenom stepenu, ali ne govori koliko je telesno opterećenje olovom, i što je još važnije, kakva je reakcija organizma na unetu-apsorbovanu količinu olova.

Odavno je poznata činjenica da olovo nepovoljno deluje na sintezu hemoglobina (pojava anemije kod saturnizma), koja se u organizmu normalno odvija preko biosinteze porfirina. Mnogi radovi objavljeni za poslednjih desetak godina (6, 8, 18) pokazuju da su ALK i porfirin intermedijarni proizvodi u ovoj biosintezi.

Pojava povećanog sadržaja ALK i koproporfirina kod apsorpcije i trovanja olovom jeste reakcija organizma na toksično dejstvo olova. Ova dva biološka parametra vrlo dobro reflektuju nastale biohemijske poremećaje u organizmu, pa se stoga u industrijskoj toksikologiji smatraju ranim laboratorijskim znacima delovanja olova (pre pojave kliničkih znakova trovanja). Ove vrlo korisne laboratorijske probe obavezno se zahtevaju u praktičnom radu na otkrivanju profesionalnih oboljenja i trovanja. Stoga je bilo interesantno uporediti vrednosti ovih parametara sa praćenjem koncentracije 5-HISK u mokraći.

Rezultati ispitivanja sadržine ovih, kod olova važnih bioloških parametara prikazani su u tablici 1, zajedno sa nalazima olova u mokraći i uporedo su dati i rezultati dobijeni za kontrolnu grupu lica koja nisu bila izložena olovu.

Tablica 1.

Parametri	Mokraća — mg/lit													
	5-hidroksiindolsirćetna kiselina (5-HISK)				Olovo (Pb)				Delta-aminolevulinska kiselina (ALK)				Koproporfirin (kopro)	
	ispitanici izloženi olovu	ispitanici kontrolne grupe	ispitanici izloženi olovu	ispitanici kontrolne grupe	ispitanici izloženi olovu	ispitanici kontrolne grupe	ispitanici izloženi olovu	ispitanici kontrolne grupe	ispitanici izloženi olovu	ispitanici kontrolne grupe	ispitanici izloženi olovu	ispitanici kontrolne grupe	ispitanici izloženi olovu	ispitanici kontrolne grupe
Broj analiza	50	28	50	35	50	35	50	35	50	35	50	35	35	
Granične vrednosti	5.0-33.0	1.15-5.50	0.066-0.596	0.008-0.053	4.4-95.0	1.15-8.55	0.014-2.199	0.008-0.078						
Srednja vrednost	12.84	2.86	0.213	0.019	28.2	5.21	0.329	0.035						
Standardna devijacija	4.92	1.21	0.122	0.011	22.6	2.48	0.660	0.019						
t-test	10.65		8.82		5.42		2.67							
p <	0.001		0.001		0.001		0.01							

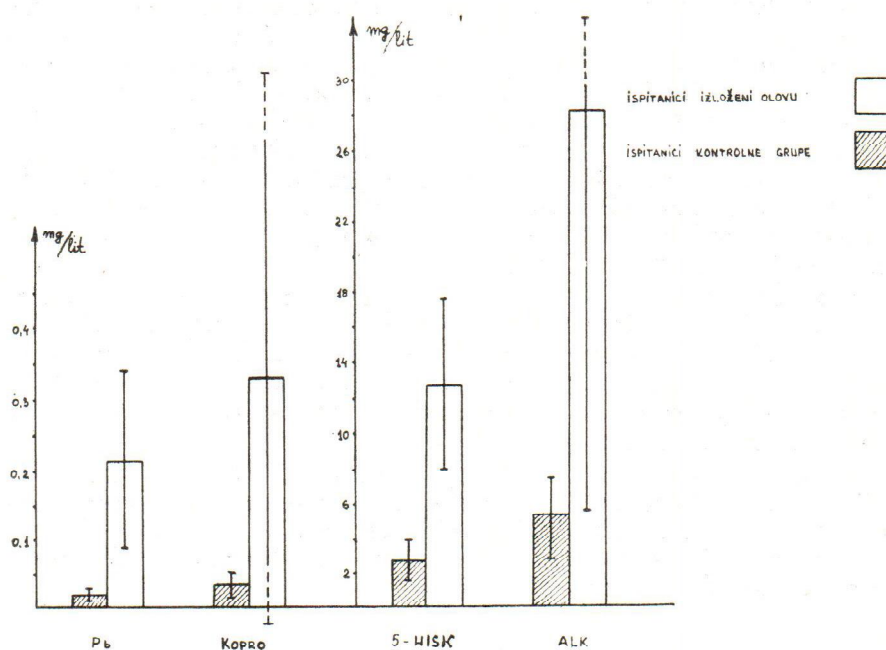
Iz tih rezultata može se jasno videti da su srednje vrednosti za ALK i koproporfirin, kao i za Pb u mokraći znatno povišene u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Srednja vrednost za ALK (28,2 mg/l) i koproporfirin (0,329 mg/l) kao i rezultati t-testa ukazuju da je reakcija organizma na uneti otrov drugojačija nego kod normalnih, neizloženih osoba i da je kod izloženih radnika došlo do finih biohemijskih poremećaja. Razlika u izlučivanju koproporfirina (t-test) nešto je niža nego kod ALK, ali je još uvek statistički značajna. Na vrednost t-testa znatno je uticala visoka standardna devijacija, uzrokovana nekim visokim koncentracijama kod koproporfirina u mokraći.

U svetlosti ovih poremećaja u biosintezi porfirina karakterističnih za toksično delovanje olova nas je naročito interesovao stepen izlučivanja 5-HISK. Dobijeni rezultati, takođe prikazani u tabeli 1, pokazuju da je kod ljudi izloženih olovu povišeno izlučivanje 5-HISK (srednja vrednost je iznosila 12,84 mg/l). To je približno četvorostruko povećanje u odnosu na neizložene, zdrave osobe.

Rezultati t-testa ukazuju da postoji vrlo značajna razlika između srednjih vrednosti izlučene 5-HISK kod eksponovane i kontrolne grupe. Tablica 2. lepo ilustruje distribuciju frekvence rezultata izlučivanja 5-HISK u grupi 50 radnika, koja se bitno razlikuje od distribucije izlučivanja 5-HISK kod zdravih lica.

Tablica 2.

Sadržina 5-hidroksiindol- sirćetne kiseline (5-HISK) mg/lit	Raspodela			
	ispitanici izloženi olovu		ispitanici kontrolne grupe	
	№	%	№	%
0.0— 2.0	0	0	7	25,0
2.1— 4.0	0	0	18	64,3
4.1— 6.0	2	4	3	10,7
6.1— 8.0	5	10	0	0
8.1—10.0	12	24	0	0
10.1—12.0	7	14	0	0
12.1—14.0	7	14	0	0
14.1—16.0	4	8	0	0
16.1—18.0	8	16	0	0
18.1—20.0	5	10	0	0
<b>Ukupno</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>28</b>	<b>100</b>



Sl. 1. Uporedne srednje vrednosti ( $X \pm SD$ ) koncentracije olova (Pb), koproporfirina (kopro), 5-hidroksiindolsirćetne kiseline (5-HISK) i delta-aminolevuliniske kiseline (ALK) u mokraći radnika eksponiranih olovu i kontrolne grupe

Ovi nalazi za 5-HISK upoređeni sa rezultatima izlučivanja olova, ALK i koproporfirina upućuju na zaključak da postoji određena zavisnost između toksičnog delovanja olova i izlučivanja 5-HISK, mada apsolutan paralelizam između olova i izlučivanja 5-HISK nije utvrđen.

Na sl. 1. grafički su prikazane srednje vrednosti i standardne devijacije za olovo, koproporfirin, 5-hidroksiindolsirćetnu kiselinu i delta-aminolevulinisku kiselinu.

Povećana koncentracija izlučivanja 5-HISK ukazuje da olovo, na neki način, ometa metabolizam triptofana. Rezultati naših proučavanja potvrđuju navode *Urbanowicza*, *Grabeckog* i *Kozielske* (13) da se fenomenu povećanja količine 5-HISK u mokraći može upotrebiti kao nov laboratorijski test u sklopu drugih laboratorijskih analiza, kao pouzdan test za otkrivanje povećane apsorpcije olova kod radnika.

Potrebni su dalji naponi za upoznavanje suštine mehanizma delovanja olova na metabolizam triptofana koji uzrokuje povećano izlučivanje 5-HISK.

## ZAKLJUČAK

Ispitivan je uticaj olova na metabolizam triptofana, određivana je koncentracija 5-HISK kao njegovog krajnjeg produkta metabolizma izlučenog u mokraći. Na grupi od 50 radnika zaposlenih u proizvodnji olovnih akumulatora određivan je sadržaj 5-HISK u mokraći. U cilju utvrđivanja stepena izloženosti i apsorpcije olova određivana je takođe i koncentracija olova, delta-aminolevulinske kiseline (ALK) i koproporfirina u mokraći, kao i koncentracija olova u vazduhu radne sredine. Uporedo je ispitivana i sadržina ovih bioloških parametara u grupi zdravih i neizloženih osoba.

Rezultati ispitivanja su ukazali da olovo negativno deluje na metabolizam triptofana i dovodi do povećanog izlučivanja njegovog metabolita 5-HISK. Ova činjenica ukazuje na mogućnost praktičnog korišćenja ove laboratorijske probe, koja bi u sklopu drugih proba (određivanje olova, ALK, koproporfirina) još više poboljšala rad na otkrivanju profesionalne izloženosti olovu i dijagnostici trovanja olovom.

## Literatura

1. *Rapport, M. M.*: J. Biol. Chem., 180 (1949) 961.
2. *Titus, E., Undenfriend, S.*: Federation Proc., 13 (1954) 411.
3. *Undenfriend, S., Titus, E., Weissbach, H.*: J. Biol. Chem., 216 (1955) 499.
4. *Glick, D.*: Methods of Biochemical Analysis, Vol. 6, Intersc. Pub., New-York London, 1958, str. 95.
5. *Haverback, J. B., Sjoerdsma, A., Terry, L. L.*: New Engl. J. Med., 255 (1955) 270.
6. *Haeger-Aronsen, B.*: Scand. J. Clin. Lab. Invest., 42 (1960) suppl. 47.
7. *Đurić, D., Novak, Lj., Milić, S., Kalić-Filipović, D.*: Med. Lav., 57 (1966) 161.
8. *Stanković, M.*: Arch. Environ. Health, 23 (1971) 265.
9. *Clarkson, T., Kench, J.*: Biochem. J., 62 (1956) 361.
10. *Spett, K., Bahyrycz, M., Urbanowicz, H., Grabecki, J., Otróżonsek, N.*: Promyshshlonnaya toksikologiya i klinika professionalnyh zablewani khimicheskoi etiologii, Medgiz, Moskva, 1962.
11. *Galzigna, L., Brugnone, F., Corsi, G.*: Med. Lavoro, 55 (1964) 102.
12. *Crosi, G., Galzigna, L., Brugnone, F.*: Med. Lavoro, 55 (1964) 665.
13. *Urbanowicz, H., Grabecki, J., Kozielska, J.*: Med. Lavoro, 60 (1969) 582.
14. *Kimura, Y., Arai, Y., Shimatani, J., Hirono, H.*: Arerugi, 16 (1967) 463.
15. *Stanković, M., Milić, S.*: Analize biološkog materijala u industrijskoj toksikologiji, Zaštita na radu, Niš, (1972) 205.
16. *Askevold, C.*: J. Lab. Clin. Invest., 3 (1951) 318.
17. *Grabecki, J., Haduch, T., Urbanowicz, H.*: Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg., 23 (1967) 226.
18. *Cramér, K., Selander, S.*: Brit. J. industr. Med., 22 (1965) 311.

## Summary

## URINARY EXCRETION OF 5-HYDROXYINDOLACETIC ACID IN LEAD EXPOSED PERSONS

The effect of lead on the metabolism of tryptophane was investigated by determining the concentration of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) as its metabolic end-product excreted in urine. In a group of 50 workers engaged in the production of lead

batteries the content of 5-HIAA in urine was determined. To establish the degree of exposure and lead absorption, the concentration of lead, delta-aminolevulinic acid (ALA) and coproporphyrin in urine, as well as the concentration of lead in the air of the working environment, were also determined. At the same time, these biological parameters were investigated in a group of healthy and non exposed persons.

The results show that lead has a negative effect on the metabolism of tryptophane bringing about increased excretion of its metabolite, 5-HIAA. This fact points to the possibility of practical use of this laboratory test, which could, together with other tests (determination of lead, ALA, coproporphyrin) improve the work on the detection of occupational exposure to lead and the diagnosis of lead poisoning.

*Institute of Inorganic and Analytical  
Chemistry,  
Faculty of Pharmacy, University of Belgrade,*

*Received for publication,  
March 16, 1973*