

PROUČAVANJE UTJECAJA
EKOLOŠKIH FAKTORA NA POJAVU
TOKSIČKIH PORFIRIJA.
II. UTJECAJ ALKOHOLA NA D-DALK
KOD OTROVANJA OLOVOM

DANICA PRPIĆ-MAJIĆ, T. BERITIĆ,
VIŠNJA PANJKOTA, ANTONIJA KERŠANČ,
VIŠNJA KARAČIĆ

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU, Zagreb
(Primljeno 5. X 1972.)

Aktivnost D-DALK određivana je prije i poslije davanja iste doze alkohola kod 9 bolesnika i to kod 6 bolesnika bez poznate ekspozicije olovu i kod 3 bolesnika otrovana olovom. Svim ispitanicima su određivani i drugi laboratorijski parametri karakteristični za djelovanje olova. Ovim je kliničkim pokusom nađeno da je alkohol privremeno inhibirao aktivnost D-DALK i to unutar normalnih granica kod ispitanika bez ekspozicije olovu, a do izrazito patoloških vrijednosti kod otrovanih olovom.

Prethodna istraživanja (1) su pokazala da kronični alkoholičari imaju u značajnom broju ($> 50\%$ ispitanika) nižu aktivnost dehidrataze delta-aminolevulinske kiseline (D-DALK) u usporedbi sa zdravim ljudima nealkoholičarima. U to vrijeme nije bilo moguće određivati koncentracije alkohola u krvi paralelno s određivanjem aktivnosti D-DALK, a niti je određivano olovo u krvi za koje je poznato da je do sada jedan od najpoznatijih inhibitora D-DALK in vivo. To je dalo poticaja da se u daljnjim ispitivanjima odrede sva tri parametra istodobno i to uz točno određenu konzumaciju alkohola.

Tako proširena ispitivanja obuhvaćaju dva egzogena faktora, etilni alkohol i olovo; oba sudjeluju u poremećajima metabolizma porfirina. Kada se uzme u obzir oba faktora potrebno je ispitati utjecaj etanola na aktivnost D-DALK i kod ispitanika koji nisu bili izloženi olovu i kod bolesnika otrovanih olovom. Kod izbora doze alkohola dana je prednost niskim koncentracijama, kako bi se što bolje utvrdila osjetljivost D-DALK na etanol.

ISPITANICI I METODE

U testu s alkoholom uključeno je 9 ispitanika, od toga 6 dobrovoljaca, koji nisu bili u poznatoj ekspoziciji olovu i 3 bolesnika otrovana olovom. U grupi od 6 dobrovoljaca, 5 su bili muškarci, životne dobi 39–62 godine, a jedan ispitanik je bila žena (T. D.) od 39 godina. Među otrovanima olovom, 2 bolesnika su bili muškarci (u dobi od 22 i 39 godina), a jedna žena (P. J., 60 godina).

Bolesnik T. M. dobio je otrovanje olovom na radnom mjestu (priprema olovnih glazura za keramičke pločice), a kod bolesnika P. J. i H. G. do otrovanja je došlo zbog upotrebe posuđa glaziranog olovnom gledi.

Svim ispitanicima primijenjena je ista doza alkohola, koja je računski odgovarala koncentraciji alkohola u krvi od 0,750 g‰, što se u klasifikaciji označava kao »pripito stanje«. Za izračunavanje potrebne količine alkohola upotrebljena je standardna formula:

$$\text{alkohol u g} = 0,750 \times \text{težina tijela} \times 0,68$$

u kojoj 0,750 se odnosi na željenu koncentraciju alkohola u krvi (0,750 g‰), a 0,68 je faktor raspodjele alkohola u tijelu. Kao alkoholno piće izabran je vinjak »Trenk«, koji sadrži 40 vol.% etanola. Ukupna količina alkoholnog pića, već prema težini tijela ispitanika kretala se od 100 do 132 ml. Tu količinu vinjaka je svaki ispitanik popio polako kroz jedan sat.

Neposredno prije uzimanja alkoholnog pića svakom ispitaniku je izvađena krv u kojoj je određena aktivnost D-DALK, koncentracija alkohola, olova i hemoglobina (Hb), te broj bazofilno punktiranih eritrocita (BpE) i retikulocita (Rtc). Računajući početak uzimanja alkoholnog pića kao 0 – vrijeme, D-DALK i alkohol u krvi su analizirani nakon 1, 2, 3, 5 i 24 sata, olovo u krvi je određeno nakon 3 i 24 sata, a koncentracija Hb, broj BpE i Rtc nakon 24 sata. Bolesnik T. M. je odbio vađenje krvi nakon drugog i petog sata, a kod ispitanika O. L. nisu analizirani BpE i Rtc.

Kroz tri sukcesivna dana, jedan dan prije, za vrijeme i jedan dan poslije testa s alkoholom, kod svih ispitanika izuzev O. L. i T. M., skupljena je 24-satna mokraća za analizu koncentracije olova, koproporfirina, delta-aminolevulinske kiseline (DALK) i porfobilinogena (PBG). Uroporfirini su također analizirani kod svih ispitanika osim kod T. J. Ispitanici O. L. i T. M. su odbili da skupljaju mokraću kontinuirano kroz tri dana. Pored toga, kod bolesnika T. M. mokraća od trećeg dana je skupljana za vrijeme početka terapije s Na₂Ca EDTA, pa se ti rezultati ne mogu uzeti u obzir.

Koncentracija olova u krvi i mokraći određena je ditizonskom metodom (2). Za određivanje aktivnosti D-DALK primijenjena je metoda *Bonsignore* i sur. (3), a za DALK metoda *Davis-Andelman* (4). Analiza alkohola u krvi izvršena je prema standardnoj tehnici *Widmarka* i sur.

(5). Koproporfirini u mokraći su određivani modificiranom *Fisherovom* metodom (6), uroporfirini spektrofotometrijski po metodi *Askevolda* (7), a porfobilinogen po metodi *Mauzerall-Granick* (8).

REZULTATI I DISKUSIJA

U tablici 1 prikazani su rezultati aktivnosti D-DALK, koncentracije alkohola i olova u krvi i hematološki nalazi za sve ispitanike koji su bili uključeni u test s alkoholom. Za istu grupu rezultati analize mokraće na olovo, koproporfirine, DALK, PBG i uroporfirine prikazani su u tablici 2. U tablici 3 posebno su izdvojene srednje vrijednosti aktivnosti D-DALK u ispitivanim satima za šest ispitanika koji nisu bili u poznatoj ekspoziciji olovu.

Kod svih ispitanika maksimalna koncentracija alkohola u krvi, koja je bila postignuta nakon prvog ili drugog sata, prema redu veličine je bila blizu predviđene koncentracije od 0,750 g‰. Poslije te maksimalne vrijednosti nivo alkohola u krvi se potpuno smanjivao i nakon 24 sata je bio u redu veličina 0-tog uzorka (tablica 1).

Tablica 1.

Laboratorijski nalazi u krvi prije i poslije ingestije alkoholnog pića

Ispita- nik	Vrijeme (h)	C ₂ H ₅ OH g‰	D-DALK		Pb μg/100 ml	Hb g/100 ml	BpE/ 10 ⁶ E	Rtc ‰
			jedi- nice	% od po- četne vri- jednosti				
T. J.	0	0,033	180	100,0	16	16,3	0	21
	1 ↑	0,724	164	91,1				
	2	0,692	165	91,6				
	3	0,537	152	84,4	11			
	5	0,378	155	86,1				
	24	0,056	155	86,1	10	16,4	0	22
B. A.	0	0,047	182	100,0	5	18,6	0	9
	1 ↑	0,771	161	88,5				
	2	0,674	158	86,8				
	3	0,442	135	74,2	9			
	5	0,168	157	86,3				
	24	0,037	182	100,0	11	18,6	0	10
K. M.	0	0,043	165	100,0	10	16,1	0	12
	1 ↑	0,719	158	95,8				
	2	0,478	139	84,2				
	3	0,306	139	84,2	10			
	5	0,154	112	67,9				
	24	0,046	184	111,5	10	16,7	0	—

nastavak tablice 1.

Ispita- nik	Vrijeme (h)	C ₂ H ₅ OH g ‰	D-DALK		Pb μg/100 ml	Hb g/100 ml	BpE/ 10°E	Rtc ‰
			jedi- nice	% od po- četne vri- jednosti				
B. J.	0	0,041	111	100,0	12	15,1	0	11
	1 ↑	0,585	107	96,4				
	2	0,608	114	102,7				
	3	0,280	109	98,2	8			
	5	0,176	105	94,6				
	24	0,036	113	101,8	10	15,0	0	12
O. L.	0	0,042	105	100,0	16	15,4	—	—
	1 ↑	0,664	96	91,4				
	2	0,678	98	93,3				
	3	0,367	104	99,0	15			
	5	0,164	92	87,6				
	24	0,029	94	89,5	18	15,1	—	—
T. D.	0	0,024	185	100,0	8	14,3	0	13
	1 ↑	0,585	136	73,5				
	2	0,676	145	78,4				
	3	0,377	145	78,4	7			
	5	0,154	171	92,4				
	24	0,051	174	94,1	5	14,6	0	12
T. M.*	0	0,057	36	100,0	48	11,5	25.400	94
	1 ↑	0,683	39	108,3	95			
	2	—	—	—				
	3	0,171	1	27,8	97			
	5	—	—	—				
	24	0,024	36	100,0	48	—	—	—
P. J.*	0	0,044	4	100,0	39	10,6	21.000	140
	1 ↑	0,665	2	50,0				
	2	0,578	3	75,0				
	3	0,284	2	50,0	25			
	5	0,098	3	75,0				
	24	0,059	2	50,0	30	10,2	22.000	141
H. G.*	0	0,018	7	100,0	63	13,3	19.600	56
	1 ↑	0,591	4	57,1				
	2	0,666	6	85,7				
	3	0,360	5	71,4	58			
	5	0,175	6	85,7				
	24	0,019	5	71,4	48	13,2	17.900	51

↑ Ingestija alkoholnog pića

* Otrovanje olovom

Tablica 2.
Laboratorijski nalazi u mokraći prije, za vrijeme i poslije ingestije alkoholnog pića

Ispitanik	Vrijeme (dani)	Pb $\mu\text{g}/24\text{h}$	Koproporfirini $\mu\text{g}/24\text{h}$	DALK $\text{mg}/24\text{h}$	PBG $\mu\text{g}/24\text{h}$	Uroporfirini $\mu\text{g}/24\text{h}$		
						Ukupni	III	I
T. J.	1	38	9	1,98	1247	—	—	—
	2 \uparrow	43	9	3,00	237	—	—	—
	3	29	7	2,13	333	—	—	—
B. A.	1	21	11	3,30	756	tragovi		
	2 \uparrow	20	35	2,16	309	"		
	3	19	23	2,01	401	"		
K. M.	1	20	tragovi	1,25	786	11	5	6
	2 \uparrow	46	"	1,40	1008	44	10	34
	3	36	"	1,93	1003	39	11	28
B. J.	1	20	115	0,80	189	16	8	8
	2 \uparrow	32	142	1,90	1260	22	17	5
	3	54	154	2,85	1701	34	25	9
O. L.	1	26	68	4,18	354	24	4	20
	2 \uparrow	—	—	—	—	—	—	—
	3	10	24	0,67	221	11	1	10
T. D.	1	10	34	1,26	227	29	9	20
	2 \uparrow	9	44	2,79	103	18	2	16
	3	8	15	2,59	204	18	4	14
T. M.*	1	—	—	—	—	—	—	—
	2 \uparrow	154	3980	62,28	1210	682	463	218
	3**	1404	3226	38,99	1304	469	368	101
P. J.*	1	57	508	22,75	5806	205	159	45
	2 \uparrow	68	645	49,35	7560	320	231	88
	3	83	232	42,96	7660	178	171	7
H. G.*	1	145	640	41,52	869	334	177	147
	2 \uparrow	172	1420	34,92	454	323	172	154
	3	212	2210	16,74	1134	507	384	261

\uparrow ingestija alkoholnog pića u prvom satu skupljanja mokraće
* otrovanje olovom
** početak terapije sa $\text{Na}_2\text{Ca EDTA}$

Tablica 3.

Srednje vrijednosti aktivnosti dehidrataze delta-aminolevulinske kiseline (D-DALK) prije i poslije ingestije alkoholnog pića kod ispitanika bez otrovanja olovom

Vrijeme (h)	D-DALK					
	% od početne vrijednosti			jedinice		
	\bar{x}	SD	SE	\bar{x}	SD	SE
0	100,00	0,000	0,000	154,7	36,85	15,04
1	89,45	8,372	3,418	137,0	29,42	12,01
2	89,50	8,387	3,424	136,5	25,85	10,55
3	86,40	10,195	4,162	130,7	19,64	8,02
5 ↓	85,82	9,434	3,851	132,0	32,88	13,42
24	97,17	9,226	3,766	150,3	38,17	15,58

↑ ingestija alkoholnog pića

Aktivnost D-DALK je imala tendenciju pada poslije ingestije alkoholnog pića. S obzirom na široki raspon normalnih vrijednosti (prema posljednjim vlastitim ispitivanjima: 157 ± 40 jedinica), rezultati su preračunati na postotke početnih vrijednosti da bi se mogli međusobno uspoređivati (tablica 1). Na taj način svaki ispitanik je bio svoja vlastita kontrola. Najveće pojedinačno smanjenje aktivnosti D-DALK između šest ispitanika bez otrovanja olovom je iznosilo 32,1% (K. M.). Statističkom analizom srednjih vrijednosti aktivnosti D-DALK izraženih u postocima početnih vrijednosti kod ispitanika bez otrovanja olovom (tablica 3), utvrđeno je značajno smanjenje aktivnosti u vremenu od 1 i 2 sata ($p < 0,02$) i u vremenu od 3 i 5 sati ($p < 0,01$) nakon uzimanja alkoholnog pića. Međutim, kod rezultata izraženih u jedinicama za tu istu grupu, razlika u aktivnosti D-DALK nakon uzimanja alkoholnog pića nije bila statistički značajna zbog velikog rasipanja rezultata, što je u stvari odraz širokog raspona normalnih vrijednosti. Kod bolesnika otrovanih olovom, rezultati preračunavanja iz apsolutnih vrijednosti u postotke, ne mogu se brojčano uspoređivati s rezultatima grupe koja nije eksponirana olovu, s obzirom na znatno nižu enzimsku aktivnost kod otrovanja olovom. Ipak je, međutim, značajno da je i kod tih bolesnika aktivnost D-DALK padala nakon ingestije alkohola.

Koncentracija olova u krvi (tablica 1) u grupi ispitanika bez otrovanja olovom nije se bitno promijenila pod djelovanjem alkohola. Kod otrovanja olovom samo je kod bolesnika T. M. porast koncentracije olova u krvi bio značajan, pa se može reći da je kod tog bolesnika učinak olova na inhibiciju D-DALK bio primaran. Izlučivanje olova mokraćom (tablica 2) također ne pokazuje bitne promjene, iako je kod nekoliko ispitanika (tri bez ekspozicije olovu i dva otrovana olovom) koncentracija olova u mokraći bila nešto viša upravo u danu uzimanja alkoholnog pića. Međutim, to može biti puka slučajnost, jer te razlike izlučivanja mogu biti i posljedica različite ingestije olova hranom iz dana u dan. Slično se ponašaju i koproporfirini. Jedan nalaz se ipak bitno razlikuje od osta-

lih: kod bolesnika H. G. s otrovanjem olovom je izlučivanje koproporfirina u danu uzimanja alkohola bilo za više od dva puta veće od prethodnog dana.

Od šest bolesnika koji nisu bili eksponirani olovu, kod četiri (T. J., K. M., B. J. i T. D.) je izlučivanje DALK mokraćom u danu uzimanja alkoholnog pića bilo nešto više od prethodnog dana (tablica 2). U istoj grupi porfobilinogen se povećao samo kod dva ispitanika (K. M. i B. J.). Kod dva bolesnika otrovana olovom, koji su skupljali mokraću kroz tri sukcesivna dana, bolesnik P. J. je izlučivao u danu uzimanja alkoholnog pića značajno više, a bolesnik H. G. značajno manje DALK u usporedbi sa izlučivanjem prije alkoholnog testa. Kod ta dva bolesnika slično se ponašao i porfobilinogen.

Uroporfirini su varirali; prema nalazima iz prethodnog dana kod ispitanika B. A. ostali su nepromijenjeni, kod K. M. su se lagano povisili, a kod H. G. lagano snizili za vrijeme uzimanja alkoholnog pića (tablica 2).

Etanol u koncentraciji koja odgovara 0,750 g‰ alkohola u krvi nije imao prema našim nalazima utjecaja na koncentraciju Hb, broj BpE i broj Rtc (tablica 1).

Inhibiciju aktivnosti D-DALK u krvi čovjeka pod djelovanjem alkohola dosada su opisali samo *Morre* i sur. (9). U njihovim eksperimentima s ljudima in vivo primijenjene su, međutim, znatno veće količine alkohola (300 ml viskija), a koncentracija alkohola u krvi od 2,25 g‰ odgovarala je »pijanom stanju«. U našim eksperimentima doza etanola je bila znatno niža, jer se nismo usudili dovoditi ispitanike u »pijano stanje«, ali je ipak bila dostatna da lagano snizi aktivnost D-DALK. Ta inhibicija je reverzibilna i nakon 24 sata aktivnost D-DALK se vraća na svoju normalu.

Koncentracija olova u krvi kod ispitanika bez otrovanja olovom nije se statistički značajno promijenila pod opisanim uvjetima eksperimenta. To je indirektni dokaz da je inhibicija D-DALK kod zdravih ispitanika u našem eksperimentu rezultat djelovanja etanola, a ne olova. Kod bolesnika otrovanih olovom nakon ingestije alkoholnog pića može doći do naglog povećanja olova u krvi, kao što je to bio slučaj s bolesnikom T. M., ali isto tako može se i nešto smanjiti (P. J., H. G.). Zbog velike osjetljivosti aktivnosti D-DALK na olovo, naglo povećanje koncentracije olova u perifernoj krvi vjerojatno je primarni uzrok inhibicije D-DALK, a direktno djelovanje etanola je od sekundarnog značenja. Zbog niske aktivnosti D-DALK u bolesnika T. J. i H. G. ne može se sa sigurnošću govoriti o učinku etanola na inhibiciju enzimatske aktivnosti. Bolesnik T. M. je bio vrlo kratko eksponiran olovu (2–3 mjeseca), a bolesnici T. J. i H. G., kroz najmanje nekoliko godina. Na osnovu mobilizacije olova kod bolesnika T. M. može se pretpostaviti da taj bolesnik ima više olova u mekim tkivima iz kojih se ono i lakše oslobađa. S druge strane čini se da je kod bolesnika T. J. i H. G. veći dio olova pohranjen u depoima iz kojih se i teže mobilizira, a to su kosti. Međutim, to tuma-

čenje koje je na prvi pogled jednostavno, vjerojatno ima mnogo zamršeniju kinetiku, u kojoj i drugi faktori kao npr. pH krvi imaju važnu ulogu.

Izlučivanje preteča hema i olova mokraćom pod djelovanjem primijenjene količine alkohola je bilo različito. Budući da su kod ispitanika bez otrovanja olovom te varijacije bile unutar normalnih vrijednosti, ne može se tvrditi da su one uvjetovane etanolom. Međutim, kod otrovanja olovom čini se da alkohol ima stanovitu ulogu na izlučivanje olova i preteča hema.

ZAKLJUČAK

Iz rezultata ispitivanja mogu se izvesti ovi najvažniji zaključci:

1. Ingestija alkoholnog pića, koja odgovara »pripitom stanju« (0,750 g‰ alkohola u krvi), lagano inhibira aktivnost dehidrataze delta-amino-levulinske kiseline (D-DALK) u krvi. Ta promjena je očito i kod ispitanika bez ekspozicije olovu i kod otrovanih olovom reverzibilna, jer se nakon 24 sata aktivnost D-DALK većinom vraća na svoju normalu.

2. Primijenjena doza etanola ne utječe značajno na koncentraciju olova kod osoba koje nisu bile izložene olovu. Kod otrovanja olovom čini se da etanol može mobilizirati olovo iz depoa.

Literatura

1. Dimov, D., Prpić-Majić, Danica, Berić, T., Keršanc Antonija, Karačić Višnja: Arh. hig. rada, 23 (1972) 11.
2. Weber, A. O., Voloder Kata, Vouk, U. B.: Arh. hig. rada, 3 (1952) 296.
3. Bonsignore, D., Callisano, P., Cartasegna, C.: Med. Lavoro, 56 (1965) 199.
4. Davis, R. J., Andelman, S. L.: Arch. Environ. Health, 15 (1967) 53.
5. Widmark, E.: Die theoretischen Grundlagen & die praktische Verwendbarkeit der gericht. medizinischen Alkoholbestimmung, Urban & Schwarzenberg, Berlin, 1932.
6. Weber, K., Ruždić, I.: Experientia, 7 (1951) 354.
7. Askevold, R.: Scan. J. Clin. & Lab. Invest., 3 (1951) 318.
8. Mauzerall, O., Granick, S.: J. Biol. Chem., 232 (1958) 1141.
9. Moore, M. R., Beattie, A. D., Thompson, G. G., Goldberg, A.: Clinical Science, 40 (1971) 81.

*Summary*STUDIES ON TOXIC PORPHYRIA
II. THE INFLUENCE OF ETHANOL ON ALA-D ACTIVITY
IN LEAD POISONING

Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity was measured before and after the same dose of alcohol administered to nine subjects; six of them were the patients with no known exposure to lead and three were the patients with overt lead poisoning. In all these subjects other laboratory parameters characteristic of lead action were also determined.

It was found that alcohol induced temporary inhibition of the ALA-D activity; in subjects with no lead exposure this activity was depressed though still maintained within the normal limits, while in patients with lead poisoning the already low activity was more depressed.

*Institute for Medical Research and
Occupational Health,
Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb*

*Received for publication,
October 3, 1972*