

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE PORFIRINA U ERITROCITIMA OSOBA IZLOŽENIH DEJSTVU OLOVA

A. KANSKY, BLAGA KRAMBERGER i H. KOSLER

*Dermatološka klinika Medicinskog fakulteta
i Dispanzer za profesionalne bolesi ŽZU, Ljubljana*

(Priljeno 16. VI 1972)

Kod 30 osoba eksponiranih olovu i kod 30 zdravih ispitanika određivani su koproporfirin i protoporfirin u eritrocitima te koproporfirin, uroporfirin, delta amino levulinska kiselina i porfobilinogen u mokraći. Prema koncentraciji protoporfirina nađenoj u eritrocitima ispitivane osobe su bile podeljene u dve grupe. Grupa B obuhvatala je 14 osoba kod kojih koncentracija protoporfirina na 100 ml eritrocita nije prelazila 18 μg što je gornja granica normale. Ni u jedne od tih osoba nije bilo kliničkih simptoma. Srednje vrednosti za koproporfirin u eritrocitima kao i za uroporfirin, delta amino levulinsku kiselinu i porfobilinogen u mokraći bile su unutar normalnih granica. Samo je srednja vrednost koproporfirina u mokraći bila povećana. Od 16 osoba uključenih u grupu A, 4 su pokazivale znakove trovanja olovom, a 12 nije imalo simptoma. Nađene su ove srednje vrednosti: za protoporfirin 82,9, a koproporfirin 6,8 μg na 100 ml eritrocita, delta amino levulinska kiselina 3,7, a porfobilinogen 0,24 mg/100 ml mokraće, koproporfirin 171, 5 μg , a uroporfirin 26,5 μg /1000 ml mokraće. Sve srednje koncentracije u toj grupi, osim porfobilinogena bile su značajno povišene u usporedbi s onima kod zdravih osoba. Kod 4 bolesnika s otrovanjem olovom koncentracija porfobilinogena u mokraći kretala se između 0,32 i 0,57 mg/100 ml mokraće, što prelazi normalne vrednosti (do 0,32 mg). Prema iskustvu autora ispitivanje protoporfirina u eritrocitima može biti koristan test u zdravstvenoj kontroli osoba eksponiranih olovu.

Van den Bergh i saradnici (3) prvi su saopštili da već male količine olova (Pb) mogu prouzrokovati, pored povećanog izlučivanja koproporfirina (KP) u urinu, i povećanu koncentraciju porfirina (P) u eritrocitima. Oni su opisali metodu za kvantitativno određivanje u eritrocitima. Kasnije su opisali metode za kvantitativno određivanje porfirina u eritrocitima još *Schumm* (31), *Grinstein i Watson* (12), *Watson* (36) i drugi. Dok evropski autori određuju porfirine pretežno po metodama *Wrannea* (37) ili *Rimingtona* (27), američki autori služe se modifikacijama metoda *Schwarza* i *Wickoffa* (30).

Mehanizmi koji dovode do smanjene koncentracije hemoglobina u eritrocitima osoba izloženih delovanju Pb komplicirani su. *Rimington* je

već podavno upozorio na smanjenu aktivnost sintetaze hema (25, 26); istu tvrdnju izneli su i *Goldberg i saradnici* (9), *Kenck* (18) i *Eriksen* (6) ustanovili su da je poremećena i sinteza porfirina. *Gibson i saradnici* (8), *Lichtmann i Feldmann* (21), kao i *de Bruin* (4, 5), dokazali su da je inhibirana dehidraza delta-aminolevulinske kiseline (ALA). *Rubino* (28) smatra da je inhibirana i aktivnost koproporfirinogenaze. Interesantnu hipotezu postavio je *Pecora* (24) koji tvrdi da Pb stimulira sintezu hema, a da do inhibicije ALA dehidraze dolazi usled feed-back-mehanizma. Ovakvom stavu protivureče, međutim, eksperimenti *Gajdosa* i *Gajdos-Török* (7), koji kod kunića otrovanih olovom nisu našli povećane aktivnosti sintetaze ALA.

IZBOR PREGLEDANIH OSOBA

Kod 30 osoba izloženih delovanju Pb napravili smo analizu koproporfirina (KP) i protoporfirina (PP) u eritrocitima. Četiri od ovih roditelja i dvoje njihove dece, ležali su u bolnici Trbovlje odnosno na Klinici za pedijatriju u Ljubljani zbog trovanja olovom. Ostalih 26 bili su radnici fabrika Helios i Arbo, koji su bili na svojim radnim mestima izloženi delovanju Pb u većoj, ili manjoj meri, ali su bili bez kliničkih simptoma. Kod svih 30 izloženih osoba, kao i kod 30 zdravih, odredili smo još koncentracije delta-aminolevulinske kiseline (ALA), porfobilinogena (PBG), KP i uroporfirina (UP) u urinu, a izvršili smo i uobičajena hematološka ispitivanja.

METODE

P u eritrocitima određivali smo po *Rimingtonu* (27): 20–25 ml heparinizovane krvi centrifugirali smo, isprali eritrocite dva puta sa fiziološkim rastvorom, izmerili njihov obim, dodali 15-struku količinu smese etilnog acetata i sirćetne kiseline i ostavili preko noći na -25°C . Posle filtracije izlučili smo P sa 15% HCl, ekstrakt neutralizovali sa acetatom natrija i izlučili P sa eterom. U završnoj fazi izlučili smo prvo KP sa 0,36% HCl, a posle PP sa 5% HCl. Fotometrirali smo u spektrofotometru kod Sorretovog maksima, kao i kod 380 i 421 odnosno 430. ALA i PBG određivali smo prema *Mauzerallu* i *Granicku* (23), a KP i UP u urinu po *Askevoldu*, uzimajući u obzir modifikaciju *Haeger Aronsonove* (13), kao što smo to već opisali (17).

REZULTATI

U eritrocitima 30 kontrolnih osoba (tablica 1, grupa C) našli smo prosečno 2,5 μg KP i 8,2 μg PP. Uzimajući u obzir 3 standardna odstupanja smatrali smo da su rezultati iznad 18 μg PP u 100 ml eritrocita iznad normale. Prema ovome rasporedili smo osobe izložene olovu u dve gru-

Tablica 1.

Prosečna koncentracija kopro (KP) i protoporfirina (PP) u eritrocitima i KP, uroporfirina (UP), delta-aminolevulininske kiseline (ALA) i porfobilinogena (PBG) u mokraći kod radnika izloženih delovanju olova

Grupa N	Eritrociti			Urin				
	KP $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	PP $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	ALA $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	PBG $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	KP $\mu\text{g}/1000\text{ ml}$	UP $\mu\text{g}/1000\text{ ml}$		
A 16 min-max S	6,8 0-23,8 6,26	82,9 18,5-218,0 58,3	3,7 0,60-8,0 2	0,24 0,03-0,57 0,158	171,5 67,0-212,0 32,9	26,5 4,1-126,0 30,2		
B 14 min-max S	3,2 0,4-7,0 2,52	9,4 2,6-17,3 5,02	0,52 0,10-0,85 0,425	0,13 0,06-0,31	70,6 9,5-151 43,5	4,5 0-9,7 3		
C 30 min-max S	2,52 0-7,6 2,11	8,2 4,2-14,1 3,24	0,33 0,12-0,54 0,105	0,16 0-0,32 0,08	52 12-113 26	3,5 0-9,9 3,2		

A: radnici izloženi u većoj meri
B: radnici izloženi u manjoj meri

C: zdrave osobe

X: prosečna vrednost

S: standardna devijacija

min-max: najniže i najviše vrednosti u grupi.

N: broj slučajeva

pe: 1) u grupi B bilo je 14 osoba, kod kojih su bile koncentracije PP u eritrocitima ispod $18 \mu\text{g}$; u grupi A bilo je 16 osoba sa koncentracijom PP iznad normale; tu su bila uključena i spomenuta 4 lica sa simptomima trovanja. Kod grupe B našli smo prosečno $9,4 \mu\text{g}$ PP i $3,2 \mu\text{g}$ KP u 100 ml eritrocita. U mokraći našli smo sledeće prosečne vrednosti: ALA $0,52 \text{ mg}$ i PBG $0,13$ u 100 ml mokraće; koncentracija KP bila je prosečno $70,6 \mu\text{g}$ a UP $4,6 \mu\text{g}$ u 1000 ml urina; t-testom po *Studentu* našli smo da su bili kod ove grupe znatno povećani jedino KP u urinu.

Kod grupe A našli smo sledeće prosečne vrednosti: koncentracija KP bila je $6,8 \mu\text{g}$, a PP $82,9 \mu\text{g}$ u 100 ml eritrocita; koncentracija ALA bila je $3,7 \text{ mg}$, PBG $0,24 \text{ mg}$ u 100 ml urina, dok je koncentracija KP bila $171,5 \mu\text{g}$ i UP $26,5 \mu\text{g}$ u 1000 ml urina; t-testom po *Studentu* našli smo da su razlike prema analognim vrednostima kod zdravih osoba bile statistički na nivou značajnosti od 5%. Jedino nije bilo statistički značajno povećanje koncentracije PBG, no i tu je bila vrednost t na samoj granici značajnosti. U urinu bila je koncentracija ALA povećana kod svih 16 lica, dok su KP bili povećani kod 15 bolesnika (tablica 2).

Tablica 2.

Koncentracije koproporfirina (KP) i protoporfirina (PP) u eritrocitima, kao i delta-aminovulinske kiseline (ALA), porfobilinogena (PBG), koproporfirina (KP) i uroporfirina (UP) u urinu kod 16 osoba jače izloženih olovu

	Eritrociti		Urin			
	KP mikrogr. /100 ml	PP mikrogr. /100 ml	ALA mg/100 ml	PBG mg/100 ml	KP mikrogr. /l	UP mikrogr. /l
1 B. V.	16,4	152,0	8,00	0,32	198	126,0
2 A. J.	5,7	63,0	0,70	0,23	67	8,3
3 G. I.	1,1	56,4	1,25	0,06	180	9,7
4 A. M.	9,1	56,0	2,90	0,13	204	13,8
5 R. A.	23,8	117,0	0,60	0,03	109	4,2
6 C. M.	4,5	150,0	0,70	0,31	191	41,0
7 K. F.	10,3	108,0	1,25	0,06	109	4,1
8 D. A.	8,2	218,0	6,00	0,13	195	33,0
9 S. F. dete	8,2	91,5	7,30	0,57	206	13,8
10 S. F. otac	3,2	47,3	7,80	0,57	185	15,0
11 S. M. dete	1,6	24,0	6,00	0,32	150	41,0
12 S. M. majka	0	33,0	6,30	0,38	191	16,6
13 D. M.	1,1	35,4	1,80	0,25	212	50,0
14 K. M.	8,3	133,0	2,00	0,23	195	33,0
15 Č. F.	1,7	23,8	0,75	0,19	169	9,7
16 Ž. F.	6,3	18,5	1,00	0,06	183	6,0

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Metode pojedinih autora, iako dosta slične u principu, razlikuju se po tehnici ekstrakcije i merenju koncentracije. Iz toga razloga podaci o koncentraciji P u eritrocitima zdravih ljudi razlikuju se. *Bénard i saradnici* (2) našli su prosečno 18 μg celokupnih P, *Koskelo* (19) 17 μg P (8-32), *Rimington i saradnici* (27) 18,8 μg PP, *Goreczky i Roth* (10) 22 μg PP u 100 ml eritrocita. Drugi autori našli su nešto veće prosečne koncentracije: *Krammër i saradnici* (20) 31 μg PP (14-55), *Uranne* (37) 30 μg PP (16-52), *Heilmayer i Clotten* (15) 34 μg (18-51) u 100 ml eritrocita. U toku našeg rada našli smo prosečno 8,2 μg PP u 100 ml eritrocita. Uzimajući u obzir trojno standardno odstupanje, smatrali smo da su bile vrednosti iznad 18 μg u 100 ml eritrocita povećane; ova konstatacija prilično se približuje iskustvima *Haeger-Aronsenove* (14), koja smatra da je kod zdravih ljudi koncentracija PP u eritrocitima ispod 25 μg .

Iz radova autora, kao što su *Vigliani i Angeleri* (34), *Vigliani i Waldenström* (35), *Uševa* (33), *Griffini i saradnici* (11), *Haeger-Aronsen* (14) znamo da je kod bolesnika sa simptomima saturnizma koncentracija P u eritrocitima povišena. Malo pak ima podataka o koncentraciji P u eritrocitima osoba koje, iako izložene delovanju Pb, nemaju kliničkih znakova oboljenja. *Haeger-Aronsen* (14) smatra da postoji kod izloženih osoba korelacija između koncentracije PP u eritrocitima s koncentracijom ALA u urinu.

U detaljnim analizama rezultata naših bolesnika našli smo da je u urinu koncentracija ALA bila povišena kod 22 osobe, koncentracija KP kod 19, dok je koncentracija PP u eritrocitima bila povećana kod svega 16 naših bolesnika (kod svih šesnaestoro sa povećanom koncentracijom PP u eritrocitima bila je znatno povećana koncentracija ALA u urinu). Iz ovakvih podataka zaključujemo da je koncentracija ALA u urinu osetljivi indikator za otkrivanje metaboličkih promena kod osoba izloženih delovanju Pb nego što je koncentracija PP u eritrocitima.

Kod četiri bolesnika sa simptomima saturnizma koncentracija PBG u urinu bila je između 0,32 i 0,57 mg u 100 ml, dok smo kod zdravih osoba našli vrednosti između 0 i 0,32 mg; koncentracija ALA iznosila je kod ove četvorice između 6,0 i 7,8 mg. Takvi nalazi podudaraju se sa zapažanjima *Tishkoffa* (32) i *Schwartz* (29), koji su našli kod bolesnika sa simptomima saturnizma povišene vrednosti PBG u urinu. Želeli bismo istaći da kod 92 radnika izložena delovanju Pb, ali bez kliničkih simptoma, koje smo ispitivali ranije (16), ni u jednom slučaju nismo našli povećane koncentracije PBG, kao što nisu našli ni drugi autori koji su vršili ispitivanja osoba izloženih delovanju Pb (13).

Prema tome zaključujemo da je povišenu koncentraciju PBG u urinu moguće očekivati samo kod osoba sa izraženim simptomima saturnizma, a nikako kod onih koje su samo izložene delovanju Pb, a nemaju kliničkih simptoma.

Literatura

1. *Askevold, R.*: Scand. J. lab. clin. Invest., 3 (1951) 318.
2. *Bénard, H., Gajdos, A., Canivet, J.*: Le sang, 20 (1949) 289.
3. *Van den Berg, H., Grotepass, W., Revers, F. E.*: Klin. Wschr., 11 (1932) 1534.
4. *De Bruin, A., Hoolbrom, H.*: Brit. J. indust. Med., 24 (1967) 203.
5. *De Bruin, A.*: Arh. hig. rada, 20 (1969) 487.
6. *Eriksen, L.*: Scand. J. clin. lab. Invest., 7 (1955) 80.
7. *Gajdos, A., Gajdos-Török, M.*: Arch. environ. Health, 23 (1971) 270.
8. *Gibson, Sh., Goldberg, A.*: Clin. Sci., 38 (1970) 63.
9. *Goldberg, G. A., Ashenbrucker, H., Cartwright, G. E., Wintrobe, M. M.*: Blood, 11 (1956) 821.
10. *Goretzky, L., Roth, I., Bruckner, M.*: Ztsch. klin. Chem. klin. Biochem., 6 (1968) 489.
11. *Griffini, A., Genchi, R., Zurlo, N.*: Med. Lav., 61 (1970) 367.
12. *Grinstein, M., Watson, C. J.*: J. Biol. Chem., 147 (1943) 675.
13. *Haeger-Aronsen, B.*: J. clin. lab. Invest., 12 (1960) suppl. 47.
14. *Haeger-Aronsen, B.*: Brit. J. industr. Med., 28 (1971) 52.
15. *Heilmayer, L., Clotten, R.*: Schweiz. med. Wschr., 90 (1960) 934.
16. *Kansky, A., Kramberger, B., Kosler, H.*: Zdrav. vestn., 41 (1972) 243.
17. *Kansky, A., Kosler, H.*: Zdrav. vestn., 41 (1972) 7.
18. *Kench, I. E., Cillam, A. E., Lauer, R. E.*: Biochem. J., 36 (1942) 384.
19. *Koskelo, P.*: Ann. Med. intern. Fenn., 48 (1959) 55.
20. *Krammer, A., Cartwright, G. E., Wintrobe, M. M.*: Blood, 9 (1954) 183.
21. *Lichtmann, H. C., Feldmann, F.*: J. clin. Invest., 42 (1963) 830.
22. *Meduri, O., Notario, A., Casirola, G.*: Haematologica, 43 (1958) 1213.
23. *Mauzerall, D., Granick, S.*: J. Biol. Chem., 219 (1956) 435.
24. *Pecora, L.*: Med. Lav., 53 (1962) 29.
25. *Rimington, C.*: Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, 22 (1938) 454.
26. *Rimington, C.*: Preliminary Investigations for a Study of Energy Utilised by Surviving Erythrocytes in Haem Synthesis, Ciba Foundation Conference on Isotopes in Biochemistry, Wolstenholme, Churchill, London, 1951.
27. *Rimington, C., Morgan, P. N., Nichols, K., Everall, J. P., Davies, R. R.*: Lancet, 2 (1963) 318.
28. *Rubino, G. F.*: Panminerva, 4 (1962) 340.
29. *Schwartz, H. C.*: Osobno saopštenje, 1960, cit. pod 13.
30. *Schwartz, S., Wikoff, H. M.*: J. Biol. Chem., 194 (1952) 563.
31. *Schumm, O.*: Z. ges. exp. Med., 106 (1939) 252, cit. pod 37.
32. *Tishkoff, G. H., Granville, N. B., Rosen, R., Dameshek, W.*: Acta Haemat. (Basel), 19 (1958) 321.
33. *Uševa G.*: Changes in Porphyrin Metabolism, Employed as a Diagnostical Test in Lead Intoxications, Work of Scientific Institute of Labour Protection and Occupational Diseases, 17 (1938) 103.
34. *Vigliani, E., Angeleri, C.*: Rass. Med. appl. lav. industr., 7 (1938) 91.
35. *Vigliani, E., Waldenstöm, I.*: Dtsch. Arch. klin. Med., 180 (1937) 182.
36. *Watson, C. J.*: Arch. intern. Med., 86 (1950) 797.
37. *Wranne, L.*: Acta Pediat. (Uppsala), 49 (1960) suppl. 124, 1.

*Summary*QUANTITATIVE DETERMINATION OF PORPHYRIN IN RED BLOOD CELLS
IN PERSONS EXPOSED TO LEAD

In 30 persons exposed to lead and in 30 healthy persons the following quantitative analyses were carried out: coproporphyrin (KP) and protoporphyrin (PP) in red blood cells and KP, uroporphyrin (UP), delta-aminolevulinic acid (ALA) and porphobilinogen (PBG) in urine.

According to the concentration of PP in red blood cells, the persons examined were divided into two groups. Group B comprised 14 persons in which the PP concentration in 100 ml red blood cells did not exceed 18 μg , which is the upper normal limit. All were free from clinical symptoms. The mean values for KP in red blood cells as well as for UP, ALA and PBG in urine were well within normal limits. Only the mean value of KP in urine was increased.

Out of 16 persons included in group A four displayed signs of lead intoxication and 12 were symptom free. The following mean values were found: PP 82,9 and KP 6,8 μg in 100 ml red blood cells, ALA 3,7 and PBG 0,24 mg in 100 ml urine, KP 171,5 μg and UP 26,5 μg in 1000 ml urine. All the mean concentrations in this group except the PBG were significantly increased as compared to those in healthy persons. In the four lead intoxicated persons the PBG concentration in urine ranged from 0,32 to 0,57 mg in 100 ml urine, what exceeds the normal values (up to 0,32 mg).

According to our experience the analysis of PP in red blood cells can be a useful test in the medical control of lead exposed persons.

*Received for publication
June 16, 1972.*