

UTJECAJ ASKORBINSKE KISELINE NA METABOLIZAM BENZENA

VERA FIŠEROVA-BERGEROVA

Institut za higijenu rada i profesionalne bolesti, Prag, Čehoslovačka

(Priljeno 2. IU. 1958.)

Bio je praćen utjecaj askorbinske kiseline na oksidaciju benzena u fenol u čistim otopinama i homogenatima organa. Utvrđeno je, da askorbinska kiselina u čistim otopinama izaziva oksidaciju benzena na fenol, ali nema takvo djelovanje u biološkom mediju. Dodatak malih količina biološkog materijala (krvi) u osnovnu otopinu potpuno inhibira navedenu reakciju. Praćeno je i inhibiciono djelovanje aminokiselina. Iz izvršenih pokusa može se zaključiti, da askorbinska kiselina ne izaziva oksidaciju benzena na fenol u organizmu.

U posljednje vrijeme naročito je posvećena pažnja hidroksilacionom djelovanju askorbinske kiseline na aromatske spojeve, s obzirom na njezino eventualno sudjelovanje u procesima metabolizma i detoksikacije. *Ekman* (1) je proučavao hidroksilaciono djelovanje askorbinske kiseline na benzen u čistim otopinama i dokazao, da nastaje fenol, pirokatehin i hidrokinon. Zato je u suradnji s *Forssmanom* i *Frykholmom* (1,2) pokušao ubrzati metabolizam benzena aplikacijom vitamina C kod radnika, koji rade u kontaktu s tim otrovom. Međutim, nije utvrdio razliku u izlučivanju fenolskih spojeva kod liječenih i neličenih radnika.

Kako bih objasnila tu diskrepanciju, pratila sam tok reakcije u definiranim otopinama pri uvjetima, koji se pojavljuju u organizmu (koncentracija, pH, temperatura), a i utjecaj nekih inhibitora. U obzir sam uzela aminokiseline, jer je poznato, da neke od njih imaju moć da spriječe djelovanje askorbinske kiseline. Osim toga sam pratila utjecaj askorbinske kiseline na metabolizam benzena u homogenatima organa.

Prema *Tschernikovu*, *Gadaskinovoju* i *Gurewitschu* (3) benzen se uglavnom metabolizira u jetri, ali i drugi organi imaju tu sposobnost. Prema *Fabreu* (4) zadržavaju tu sposobnost i homogenati.

EKSPERIMENTALNI DIO

Reagencije

Sve upotrebijene kemikalije bile su analitički čiste (p. a.). Otopine askorbinske kiseline i aminokiselina pripravljane su svaki dan svježe.

Smjesa aminokiselina (prema sadržaju u krvi [5]) sadržavala je: 1 mg arginina; 1 mg cistina; 1,4 mg histidina; 1,1 mg izoleucina; 1,7 mg leucina; 9 mg lizina; 0,6 mg metionina; 1 mg fenilalanina; 4,5 mg treonina; 0,8 mg triptofana; 1,1 mg tirozina; 2,5 mg valina; 3,5 mg glicina i 5 mg alanina u 10 ml fosfatnog pufera. Prije reakcije otopina je bila razrijeđena u omjeru 1 : 10 s fosfatnim puferom.

Sve otopine sam pripravljala u 1/15 M fosfatnog pufera, pH 6,8 (osim ako nije drugačije navedeno).

Citrirana krv sadržavala je 2 dijela krvi i 1 dio citratne otopine (volumski).

Kod pokusa s organima radila sam sterilno. Homogenizaciju sam provodila u miješalici »Cyklon« čehoslovačke proizvodnje.

Postupak

Benzen sam određivala polarografski kao dinitrobenzen (6), fenol kolorimetrijski s dibromkinonklorimidom (7), a askorbinsku kiselinu kolorimetrijski s dinitrofenilhidrazinom (8). Određivanje pH vršila sam potencijometrijski uz primjenu staklene elektrode.

Metodika

1. Eksperimenti u čistim, definiranim otopinama.

Reakciona smjesa se sastojala od osnovne otopine 5 ml $5,8 \cdot 10^{-4}$ M askorbinske kiseline u fosfatnom puferu sa pH 6,8 te 0,2 ml benzena. Toj osnovnoj otopini dodavala sam aminokiseline ili krv.

U posudicama Warburgova aparata reagirala je smjesa 3 sata (osim ako nije drugačije navedeno) u kupelji pri 37°C uz stalno miješanje, tako da se uzorak stalno zasićivao kisikom iz zraka. Nakon hlađenja uzorci su odmah analizirani na fenol i eventualno na askorbinsku kiselinu. Tamo gdje nisam upotrebila biološki materijal određivala sam fenol direktno bez prethodne destilacije sa vodenom parom.

Pri proučavanju toka reakcije u zavisnosti o koncentraciji askorbinske kiseline, benzena ili pH, mijenjala sam u osnovnoj otopini vrijednost samo jedne komponente. I u ostalim pokusima, kad sam ispitivala inhibiciono djelovanje aminokiselina i krvi, upotrebljavala sam osnovnu otopinu, a mijenjala sam samo koncentraciju aminokiselina ili krvi, u granicama koje su određene u jednadžbama ili tablicama.

2. Eksperimenti u homogenatima organa

5–10 minuta nakon klanja veptra izvađeno je 150–200 g organa, neki put i cijeli organ, te stavljeno u staklene posude obložene ledom. Na-

kon jednog sata organi su izvagani i homogenizirani u istoj težinskoj količini fosfatnog pufera (pH 6,8). 30–40 g homogenata je odvagano u tikvicu od 150 ml sa brušenim grlom. Nastaloj suspenziji dodano je 2–5 ml benzena. Suspenzija je dobro promiješana. Dva uzorka sam ostavila kao kontrolne, a ostalima sam dodala askorbinsku kiselinu u količini od 1 i 2 mg na 10 g tkiva. Tikvice sam zatvorila staklenim čepom. Uz povremeno potresanje ostale su tikvice 3 sata u zračnom termostatu pri 37° C radi oksidacije. Iza toga sam otopinu analizirala na slobodni i vezani fenol. Ograničila sam se na vremenski period od 3 sata zato, jer pri daljoj inkubaciji dolazi do autolize tkiva (4). Kontrolne eksperimente sam radila paralelno i pritom sam umjesto suspenzije upotrebljavala istu količinu pufera.

REZULTATI

1. Ponajprije sam istražila *tok reakcije* u definiranim otopinama pri temperaturi od 37° C u ovisnosti o koncentraciji askorbinske kiseline i benzena, pH i vremenu reakcije.

Količina nastalog fenola (y) *zavisi o koncentraciji askorbinske kiseline*, kako se to vidi na Sl. 1, krivulja br. 1. Za opisane eksperimentalne uvjete krivulja ima oblik parabole, jer se kod prikaza u logaritmičkom mjerilu dobiva pravac.

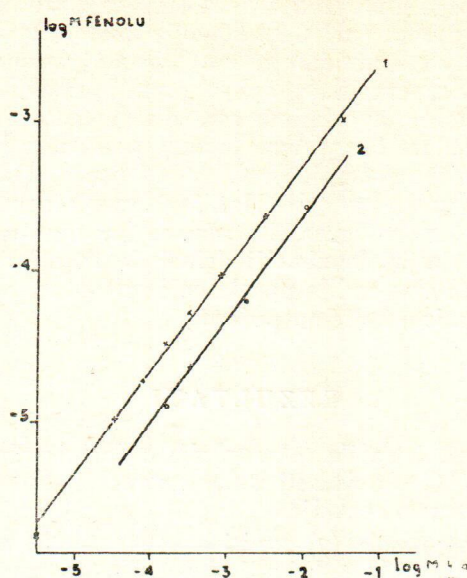
Količina nastalog fenola zavisi i o *koncentraciji benzena*. Količina fenola, koja se daje odrediti, nastajala je pri koncentraciji benzena većoj od 10^{-3} M. Kad je rasla koncentracija benzena, rasla je i količina nastalog fenola u linearnom odnosu, dok nije dostigla maksimalnu vrijednost u zasićenoj otopini benzena. Malim dodatkom benzena (0,1–0,2 ml) vrijednost fenola se nije dalje mijenjala.

U slabo kiselom mediju (pH 5, 3–6, 5) nije pH imao utjecaj na količinu fenola. Kod viših pH opadala je količina nastalog fenola. Tako je pri pH 6,9 nastalo još 23 mikrograma fenola, a pri pH 8,0 samo 16 mikrograma.

Tok reakcije s obzirom na *vrijeme* izražen je eksponencijalno (Sl. 2, krivulja br. 1).

2. Reakciju sam *inhibirala aminokiselinama*. Upotrebila sam: lizin, valin, histamin, metionin, leucin, serin, alanin, glicin, histidin, cistein i glutation u koncentracijama $2,5 \cdot 10^{-6}$ do $5,0 \cdot 10^{-3}$ M. Slika 3 pokazuje da sve aminokiseline u istraženim granicama imaju sposobnost da inhibiraju reakciju. Izuzetak je cistein, koji u manjim koncentracijama (manje od $5 \cdot 10^{-4}$ M) inhibira reakciju, dok je naprotiv pri višim koncentracijama potpomaže.

Dalje sam promatrala inhibicioni utjecaj smjese aminokiselina (načinjene prema sadržaju u krvi) u zavisnosti o vremenu i koncentraciji askorbinske kiseline. I ovdje je tok reakcije sličan kao kod osnovne



Slika br. 1. Ovisnost nastajanja fenola iz benzena o koncentraciji askorbinske kiseline
 Krivulja 1: u otopini, koja sadrži razne koncentracije askorbinske kiseline u 5 ml.
 pufera pH 6,8 te 0,2 ml benzena
 Krivulja 2: u otopini kojoj su još dodane aminokiseline pripravljene prema sastavu
 u krvi. Reakcija je tekla 3 sata

otopine. Količina nastalog fenola je otprilike upola manja nego u odsustvu aminokiselina pod istim eksperimentalnim uvjetima (Sl. 1 i 2, krivulja br. 2).

Pri tim eksperimentima sam pratila i raspad askorbinske kiseline. U odsustvu aminokiselina količina askorbinske kiseline opada od 500 na 70 mikrograma. U prisustvu glutationa askorbinska kiselina opada samo na 280 mikrograma, a u prisustvu smjese aminokiselina na 82 mikrograma. U ostalim eksperimentima aminokiseline ili nisu imale nikakav obrambeni učinak na askorbinsku kiselinu ili je on bio vrlo slabo izražen.

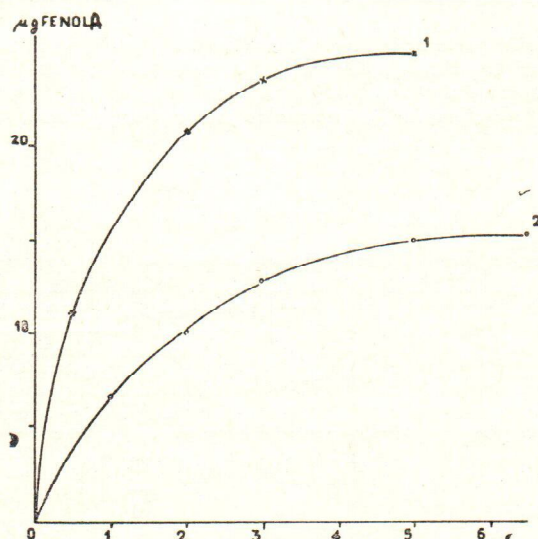
3. U daljim eksperimentima sam pratila *inhibicionu reakciju krvi*. Kad sam krv razrijedila osnovnom otopinom 1 : 10, fenol nije nastajao pa ni onda, kad sam u osnovnoj otopini povišala koncentraciju askorbinske kiseline u omjeru 1 : 10. U daljim eksperimentima sam razređivala krv fosfatnim puferom i dodavala je k 5 ml reakcione smjese. Iz rezultata u tablici 1 razabira se jaka inhibicija stvaranja fenola i raspada askorbinske kiseline.

Tablica 1

Inhibicija stvaranja fenola i raspada AK u krvi

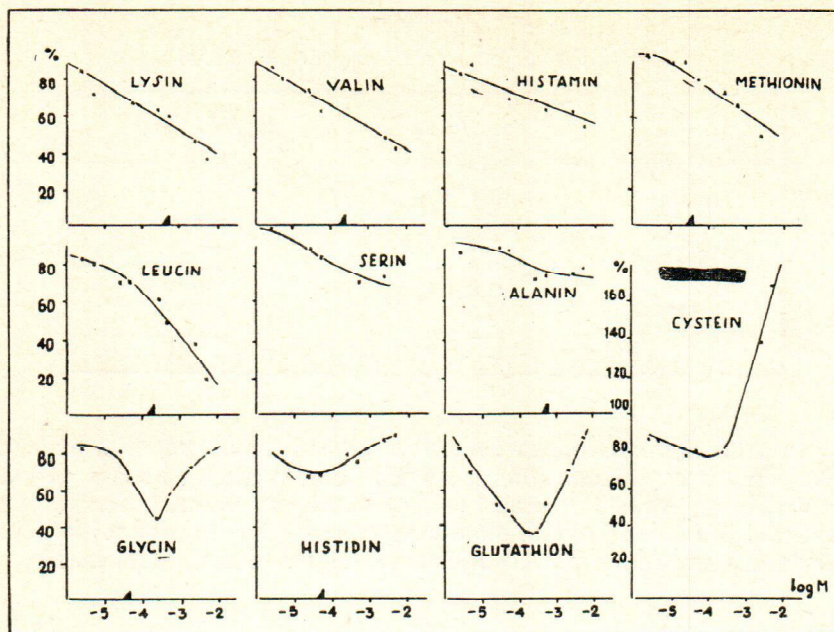
ml krvi	μg fenola / 5 ml	μg AK / 5 mg
0,0000	23,7	70
0,0007	6,8	266
0,0070	2,6	—
0,0350	2,3	—
0,0700	1,8	320
0,2500	1,0	428
0,5000	—	—

4. Pratila sam i *pretvorbu benzena u fenol u homogenatima* ovih organa: jetra, srce, slezena, pluća, mišići, bubreg, mozak i mast. Organi nisu sadržavali slobodan fenol već samo tragove vezanog fenola. Dodani fenol pronađen je kod naknadne analize praktički u punoj količini, tako da nije uopće bio promijenjen u homogenatima, ili vrlo malo.



Slika br. 2. Ovisnost količine nastalog fenola o trajanju reakcije
Krivulja 1: u osnovnoj otopini

Krivulja 2: u osnovnoj otopini, koja još sadrži aminokiseline, pripravljene prema sastavu u krvi



Slika br. 3. Inhibicija nastajanja fenola u osnovnoj otopini pomoću aminokiselina. Na apscisu su naneseni logaritmi molariteta aminokiselina, a na ordinatu procenti nastalog fenola i osnovne otopine. Strelica na ordinati ukazuje koncentraciju aminokiselina, koja se normalno javlja u organizmu

Tablica 2

Promjena benzena u fenol u homogenatima organa – utjecaj askorbinske kiseline

Organ	μg slobodnog fenola / 10 g tkiva		
	bez AK	prirast fenola nakon dodavanja	
		1 mg AK/10 g	2 mg AK/10 g
Jetra	35	13	16
srce	7	—	—
slezena	5	1	1
pluća	5	—	—
mišići	2	—	—
bubreg	3	4	9
mozak	0	7	5
mast	0	—	—
bez organa	0	58	70

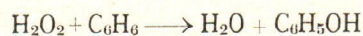
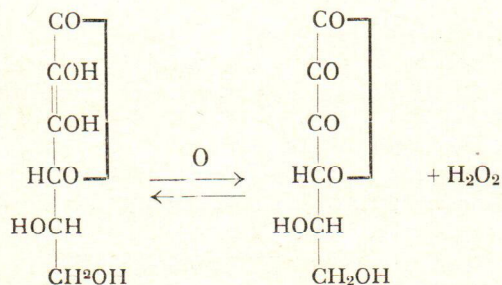
Kako proizlazi iz tablice 2 praktički su svi organi metabolizirali benzen u fenol osim mozga i masti. U stupcu 3 i 4 navedene tablice prikazane su razlike u količini fenola nastalog u homogenatima uz dodatak askorbinske kiseline i bez nje. Svaka vrijednost je prosječna vrijednost rezultata od 2 do 15 ispitanih organa. Iz tablice se vidi, da se dodatkom askorbinske kiseline povećava količina nastalog fenola veoma malo u poređenju sa djelotvornošću askorbinske kiseline u čistim otopinama.

DISKUSIJA

Istražila sam tok oksidacije benzena u puferovanim otopinama askorbinske kiseline pri koncentraciji, temperaturi i pH komponentama, za koje se može pretpostaviti da su prisutni i u organizmu. Male koncentracije benzena, za koje možemo pretpostaviti da se nalaze u organizmu (9) za vrijeme otrovanja, nisu dovoljne da razviju tolike količine fenola, koje bi se mogle analitički utvrditi. Reakcija teče pri dovoljnoj koncentraciji askorbinske kiseline uz pH, koji je u organizmu.

Benzen se metabolizira *in vitro* u jetri, srcu, slezeni, plućima, mišićima i bubregu. Ne može se upoređivati sposobnost metaboliziranja raznih organa među sobom, jer na sposobnost metabolizacije homogenata utječe niz faktora (individualna razlika eksperimentalnih životinja, način homogenizacije, raspršenost suspenzije, vrijeme obrađivanja organa i t. d.). Te faktore sam isključila time, što sam upoređivala metabolizam organa bez dodatka askorbinske kiseline i sa dodatkom.

Mali porast fenola u homogenatima, nakon povećanja nivoa askorbinske kiseline za dva i četiri puta, posljedica je inhibicione reakcije askorbinske kiseline, kako pokazuju rezultati u krvi. Ako oksidaciju benzena pripišemo vodikovu peroksidu, koji nastaje pri oksidaciji askorbinske kiseline na dehidroksiaskorbinsku kiselinu prema shemi:



onda inhibicija može nastati na dva mjesta: inhibicija oksidacije askorbinske kiseline ili inhibicija raspada vodikovog peroksida.

Krv i glutation imaju značajan obrambeni utjecaj na askorbinsku kiselinu, dok isprobane aminokiseline tu osobinu nisu uopće imale ili inhibiraju oksidaciju askorbinske kiseline veoma malo. Zato se može pretpostaviti da aminokiseline inhibiraju drugi dio reakcije. Komplicirana ovisnost inhibicionih učinaka na koncentraciju aminokiseline teško se može detaljnije analizirati, pa se moramo zadovoljiti eksperimentalnim faktima izraženim grafički.

Premda je inhibiciono djelovanje aminokiseline znatno, ne može mu se pripisati cjelokupna inhibicija u krvi i tkivima, jer vjerojatno postoje i drugi inhibitori. O potpunoj inhibiciji benzena djelovanjem AK u organima svjedoče također naši perfuzioni pokusi s jetrima (10), gdje čak ni povećanje askorbinske kiseline za 50 puta nije utjecalo na metabolizam benzena u perfundiranoj jetri.

S obzirom na to, da se benzen metabolizira na fenol u homogenatima nekih organa pri normalno niskim nivoima askorbinske kiseline, može se zaključiti, da reakcija u organizmu nije izazvana prisustvom askorbinske kiseline s obzirom na prisutne inhibitore ne može ubrzati pretvaranje benzena u fenol u organizmu.

Budući da je bilo moguće pretpostaviti da u oksidaciji benzena u biološkom mediju mogu učestvovati enzimi, trudila sam se da ovu mogućnost potvrdim ili dokažem na taj način, da sam prije pokusa prokuhala jetru i druge organe. Na taj način bi se enzimi uništili, a zatim je pokus proveden na isti način kao i sa svježim organima. Stvaranje fenola kod prokuhanih organa bilo je praktički isto kao i kod svježih organa. Osim toga proveden je i niz daljih pokusa. Nekim uzorcima dodala sam, pored askorbinske kiseline, i benzena i inhibitore katalaze, kao što je kalijev cijanid i hidroksilamin, a jedan pokus proveden je s prokuhanom krvi. Ni nakon uništenja katalaze nije nastajao fenol.

Literatura

1. Ekman B.: Acta physiol. Scand., Suppl., 22, 1944.
2. Forssmann S., Frykholm K. O.: Acta med. Scand., 128, 256, 1947.
3. Tschernikov P. D., Gadaskinová I. D., Gurewitsch I. I.: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 154, 222, 1930.
4. Fabre A.: Sem. Hôp. Paris, 25, 75, 1949.
5. Johnson C. A., Bergheim O.: J. Biol. Chem., 188, 833, 1951.
6. Teisinger J., Škramovský S.: Č. L. Č., 82, 621, 1943, Arch. mal. prof. 8, 22, 1947.
7. Fišerová-Bergerová U.: Prac. lék., 7, 153, 1955.
8. Roe J. H., Kuether K. A.: J. Biol. Chem., 147, 399, 1943.
9. Teisinger J., Fišerová-Bergerová U.: Prac. lék., 7, 1, 1955.
10. Teisinger J., Fišerová-Bergerová U., Luštinec K.: Hommage au Doyen René Fabre, Paris 1956, str. 405.

*Summary*EFFECT OF ASCORBIC ACID ON THE METABOLISM
OF BENZENE

The effect of ascorbic acid on the oxidation of benzene in phenol both in pure solutions and homogenized organs was studied. Evidence was given that in pure solutions ascorbic acid produced the oxidation of benzene in phenol, but no such effect was observed in biological medium. Addition of small amounts of biological material (blood) to the basic solution brought about a complete inhibition of the oxidizing reaction. The inhibitory effect of amino acids was also observed. On the basis of the experiments carried out it may be concluded that in the organism ascorbic acid does not produce the oxidation of benzene in phenol.

*Institute of Industrial Hygiene and Occupational
Diseases, Praha*

*Received for publication
April 2, 1958*