

OTTO A. WEBER i FEDOR VALIĆ

O ODNOSU KONCENTRACIJE OLOVA U KRVI I KOPROPORFIRINA U URINU

Izvršeno je određivanje olova u krvi i koproporfirina u urinu kod 154 radnika.

Istražena je korelacija između količine olova u krvi i koproporfirina u urinu. Regresija, koja povezuje logaritme koncentracija obiju varijabla je linearna. Izračunana je jednadžba regresije i granice pouzdanosti nepoznate koncentracije koproporfirina u urinu iz poznate koncentracije olova u krvi i obratno.

Raspravljeno je značenje rezultata analiza olova i koproporfirina kod povišene ekspozicije olovu.

Za dijagnozu profesionalnih oboljenja upotrebljavaju se dvije vrste testova:

1. Određivanje toksične supstancije, koja je ušla u tijelo, odnosno njenog raspadnog produkta.

2. Utvrđivanje patoloških promjena u organizmu, odnosno određivanje produkata štetnog djelovanja toksične supstancije na organizam.

Kod otrovanja olovom prvoj grupi testova pripada određivanje olova u biološkom materijalu, u prvom redu u krvi i urinu, a drugoj grupi brojenje bazofilno punktiranih eritrocita, određivanje porfirina u krvi i urinu, određivanje hemoglobina i t. d.

Već prije više od 70 godina primijetio je *Binniendijk* (1) povišeno izlučivanje porfirina u urinu kod otrovanja olovom. Od tog vremena objavljen je velik broj radova, koji tretiraju to pitanje (na pr. 2-8). Mnogi autori imaju različita mišljenja o tome, da li je za prosuđivanje ekspozicije olovu, odnosno stepena otrovanja olovom, mjerodavna količina olova u krvi, odnosno u urinu, ili koncentracija porfirina u urinu, odnosno broj bazofilno punktiranih eritrocita. Od 1948., kada su *De Langen* i *ten Berg* (9) predložili, da se kao prvi znak otrovanja olovom uzme pojava povišene količine koproporfirina u urinu, taj se test sve više upotrebljava za ranu dijagnozu otrovanja olovom pa i kao kriterij za prosuđivanje povećane apsorpcije olova. Vrlo se često u istu svrhu upotrebljava broj bazofilno punktiranih eritrocita u perifernoj krvi, premda su oni samo indeks povećane regeneracije koštane srži. Bazo-

filno punktirani eritrociti pojavljuju se i kod drugih oboljenja i otrovanja, kad su napadnuta crvena krvna tjelešca, pa je time stimulirana eritropoeza. Prema tome pojava bazofilno punktiranih eritrocita nije specifična za otrovanje olovom. S druge je strane količina olova u krvi ili urinu mjera za ekspoziciju, apsorpciju, transport, odnosno izlučivanje olova iz organizma. Prema nekim autorima (10) poznavanje sadržaja olova u krvi može koristiti pri zaključivanju o onečišćenju atmosfere olovom u onim slučajevima, kad se iz bilo kakvih razloga ne može mjeriti koncentracija u atmosferi.

Za dijagnozu otrovanja olovom redovno se određuje koncentracija olova u urinu ili krvi i koncentracija koproporfirina u urinu.

Ostavimo li po strani pitanje, da li olovo djeluje hemolitički ili uzrokuje disfunkciju hematopoetskog sustava, činjenica je, da otrovanje olovom uzrokuje pojavu povišene količine koproporfirina u urinu. Ako bi se ustanovilo, da je korelacija između koncentracije olova i koproporfirina dovoljno visoka, te da je koeficijent korelacije između obje varijable značajan, mogla bi se jedna od te dvije analize izostaviti, pa bi bilo dovoljno izvesti samo jednostavniji test.

Da bismo to ustanovili, odredili smo koncentracije olova u krvi i koproporfirina u urinu kod 154 radnika, istražili stepen asocijacije između obje veličine i ispitali mogućnost spomenutog pojednostavnjenja laboratorijskih pretraga za dijagnozu otrovanja olovom.

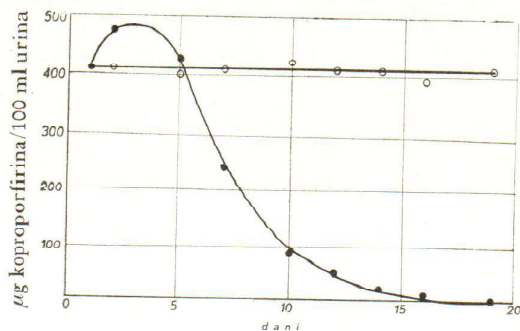
SAKUPLJANJE UZORAKA I METODIKA ODREĐIVANJA

Za kvantitativno određivanje koproporfirina u urinu upotreбили smo jednostavnu fluorimetrijsku metodu (11). Alikvotni dio 24-satnog urina zakiseli se ledenim octom i ekstrahira eterom, a koproporfirin se iz etera ekstrahira sumpornom kiselinom. Koncentracija se koproporfirina određuje mjerenjem intenziteta fluorescencije sumporno-kiselog ekstrakta. Baždarnu krivulju, koja pokazuje zavisnost intenziteta fluorescencije od koncentracije koproporfirina, dobili smo pomoću otopina čistog koproporfirina u sumpornoj kiselini.

Kako je veći dio analiza bio izveden na terenu, gdje nismo mogli mjeriti fluorescenciju, trebalo je naći pogodan način za transportiranje uzoraka. Mnogi autori (12-15) upozoravaju na činjenicu, da se duljim stajanjem urina na svjetlu, a pogotovu utjecajem povišene temperature, porfirin razgrađuje, odnosno mijenja tako, da ga uobičajenim metodama više ne možemo odrediti ili da se dobivaju pogrešni rezultati.

S obzirom na to, što nismo mogli transportirati sakupljene uzorke urina i analizirati ih u intervalu od 8 dana, ispitali smo utjecaj stajanja urina na rezultat analize. Ustanovili smo, da uzorci urina ne mogu stajati tako dugo, a da to ne bi bitno utjecalo na rezultate analiza, ali ako se svježi urin ekstrahira i sačuva samo sumporno-kiseli ekstrakt, onda se taj u roku od 14 dana ne mijenja, stoji li u dobro začepljenim

epruvetama. To vrijedi i onda, ako epruvete stoje pri normalnoj sobnoj temperaturi nezaštićene od difuznog dnevnog svjetla. Tipičan primjer prikazan je na slici 1.



Slika 1. Utjecaj stajanja urina i sumporno-kiselog ekstrakta na rezultat fluorimetrijske analize.

Ispunjeni krugovi predstavljaju rezultate analize alikvotnih dijelova urina, koji je stajao na dnevnom svjetlu i pri sobnoj temperaturi. Neispunjeni krugovi predstavljaju rezultate mjerenja prvog sumporno-kiselog ekstrakta, koji je također stajao na dnevnom svjetlu i pri sobnoj temperaturi.

Osim porfirina, koji imaju sposobnost fluoresciranja, u urinu se nalaze i leuko-oblici porfirina, koji ne fluoresciraju (14-16). Mnoge dosad upotrebljavane metode određivanja ne obuhvaćaju spomenute leuko-oblike. U novije se vrijeme pojavilo nekoliko prijedloga za ispravljenje tog nedostatka. De Langen i ten Berg (9) preporučuju, da se doda nekoliko kapi 3% H_2O_2 , koji oksidira leuko-oblike i prevodi ih u oblik, koji fluorescira, pa se može fluorimetrijski odrediti. Raine (16) preporučuje oksidaciju s kinhidronom. Watson i suradnici (14) su međutim našli, da djelovanje H_2O_2 nije pouzdano, a ni s kinhidronom nisu imali najbolja iskustva, nego preporučuju upotrebu otopine joda za istu svrhu. Oni međutim upozoravaju na činjenicu, da leuko-oblici stajanjem u slabo alkaličnom urinu prelaze u roku od 24 sata u oblik, koji fluorescira.

Zbog toga smo uzorke urina prije izvođenja analize ostavili stajati 24 sata uz dodatak 5 g Na_2CO_3 . Za analizu smo uzeli 100 ml urina.

Za kvantitativno određivanje olova u krvi upotrebili smo ditizonsku metodu (17), koja se upotrebljava u našem institutu. Zbog opasnosti onečišćenja uzoraka krvi egzogenim olovom izvršene su naročite mjere opreza pri uzimanju uzoraka. Za vadenje krvi bile su upotrebene igle od V2A čelika. Igle su najprije temeljito isprane redestiliranom vodom, a zatim, radi steriliziranja, 10 minuta kuhane u redestiliranoj vodi u staklenoj posudi. Krv se uzimala iz vene u pregibu lakta. Okolina

mjesta, gdje je bio izvršen ubod, najprije je isprana sapunom i vodom, a zatim alkoholom i eterom. Samo vađenje krvi izvršeno je na ovaj način: Iгла je zabodena u venu, i u štrcaljku navučeno malo krvi. Štrcaljka je nakon toga skinuta. Nekoliko prvih kapi krvi je zabačeno, a zatim je pod iglu podmetnuta suha epruveta. Slobodnim kapanjem sakupljeno je na taj način toliko krvi, da se iz epruvete mogla otpipetirati potrebna količina u Kjehldahlove tikvice.

Za jednu analizu uzeto je 5 ml krvi. Za svakog ispitanika bile su izvršene dvije analize, a kao rezultat uzeta je srednja vrijednost.

Kod svih ispitanika izvršen je na dan uzimanja fizikalni i laboratorijski (hematološki) pregled.

REZULTATI I OBRADA REZULTATA

Ukupni raspon koncentracija olova u krvi i koproporfirina u urinu kao i raspodjela ispitanika s obzirom na normalne vrijednosti olova i koproporfirina prikazani su u tablici 1.

Tablica 1.

		Raspon
Olovo		11—227 $\mu\text{g}/100$ ml krvi
Koproporfirin		0—400 $\mu\text{g}/100$ ml urina

1	Povišena količina olova	96 radnika
	Povišena količina koproporfirina	
2	Povišena količina olova	23 radnika
	Normalna količina koproporfirina	
3	Normalna količina olova	5 radnika
	Povišena količina koproporfirina	
		S povišenim nalazima 124 radnika
4	Normalna količina olova	30 radnika
	Normalna količina koproporfirina	
		<u>Ukupno</u> 154 radnika

Kao gornje granice normalnih vrijednosti uzeli smo za olovo 60 $\mu\text{g}/100$ ml krvi (18), a za koproporfirin 9 $\mu\text{g}/100$ ml urina (19).

Radnike smo podijelili u dvije grupe prema količini jedne, odnosno druge komponente. U prvu smo grupu (red. br. 1–3 tablice 1) svrstali radnike, kojima je sadržaj olova u krvi ili koproporfirina u urinu, odnosno i olova u krvi i koproporfirina u urinu bio iznad gornjih granica normalnih vrijednosti. U drugu su grupu (red. br. 4 tablice 1) ušli

radnici s obje komponente ispod gornjih granica normalnih vrijednosti. Rezultate analiza spomenute grupe od 124 radnika statistički smo obradili.

Ispitivanjem raspodjele rezultata ustanovili smo, da su i rezultati koncentracija olova u krvi i vrijednosti za koproporfirin u urinu logaritmički normalno raspoređeni. Koeficijent korelacije između koncentracije olova i koproporfirina izračunali smo iz negrupiranih rezultata. Vrijednost koeficijenta korelacije iznosi 0.487, sa standardnom pogreškom 0.074. Ta je vrijednost značajno različita od 0, ako se upotrebi 5%-ni nivo značajnosti.

Kako je koeficijent korelacije vrlo dobra mjera za stupanj asocijacije samo onda, ako je odnos između obje varijable linearan, izvršili smo regresiju i analizu varijance te izračunali granice pouzdanosti procjenjivanja koncentracije olova iz poznate koncentracije koproporfirina i obratno.

U prvom slučaju, kada smo kao nezavisnu varijablu uzeli logaritam koncentracije olova u krvi, a kao zavisnu logaritam koncentracije koproporfirina u urinu, dobili smo ovu jednadžbu regresije:

$$y = 1.391 x - 1.020. \quad (1)$$

U toj je jednadžbi $y = \log C_{\text{porf}}$ u $\mu\text{g}/100$ ml urina, a $x = \log C_{\text{Pb}}$ u $\mu\text{g}/100$ ml krvi. Analiza varijance za taj slučaj prikazana je u tablici 2.

Tablica 2.

Varijacija	Suma kvadrata	Broj stepena slobode	Varijanca
Zbog regresije	6.1875	1	6.1875
Oko regresije	28.6230	122	0.2346
Ukupno	34.8105	123	
F = 26.37			

U drugom slučaju, kada smo kao nezavisnu varijablu uzeli logaritam koncentracije koproporfirina u urinu, a kao zavisnu varijablu logaritam koncentracije olova u krvi, dobili smo na jednak način jednadžbu najboljeg pravca kroz eksperimentalne točke. Ta jednadžba glasi:

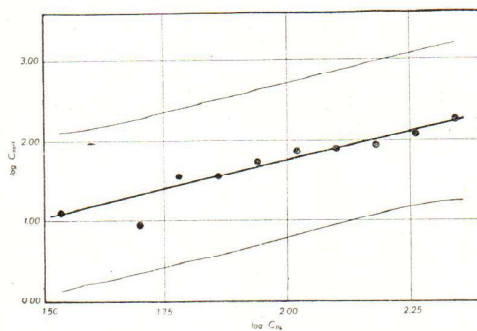
$$y = 0.170 x + 1.669. \quad (2)$$

U toj je jednadžbi $y = \log C_{\text{Pb}}$, a $x = \log C_{\text{porf}}$. Analiza varijance za taj slučaj prikazana je u tablici 3.

Tablica 3.

Varijacija	Suma kvadrata	Broj stepena slobode	Varijanca
Zbog regresije	0.7581	1	0.7581
Oko regresije	3.5071	122	0.0288
Ukupno	4.2652	123	
F = 26.37			

Kritična F-vrijednost za 5% -tnu razinu značajnosti za 1, odnosno 122 stepena slobode iznosi 3.92. Kako je izračunana F-vrijednost iznosi 26.37, izlazi, da je regresija zaista linearna.

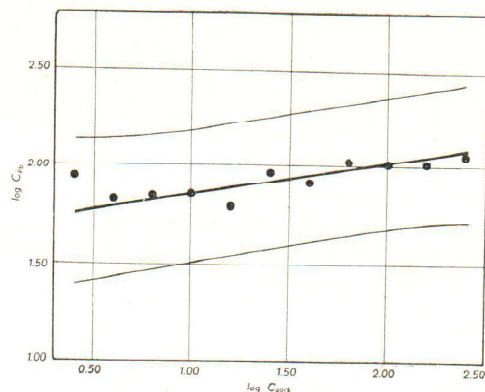


Slika 2. Regresijski pravci i 95% -ne granice pouzdanosti procjenjivanja nepoznatog logaritma koncentracije koproporfirina u urinu iz poznatog logaritma koncentracije olova u krvi.

Krugovi predstavljaju srednje vrijednosti logaritama koncentracije koproporfirina u urinu za srednje vrijednosti razreda, u koje su svrstani logaritmi koncentracija olova u krvi.

Na slici 2 ucrtan je regresijski pravac za slučaj, da je $x = \log C_{pb}$, a $y = \log C_{porf}$. Označene točke predstavljaju srednje vrijednosti logaritama koncentracije porfirina za srednje vrijednosti razreda (oznake razreda), u koje su svrstani logaritmi koncentracija olova. Stvarna su rasipanja znatno veća. Izvučene krivulje predstavljaju 95 % -ne granice pouzdanosti procjenjivanja nepoznatog logaritma koncentracije koproporfirina u urinu iz poznatog logaritma koncentracije olova u krvi.

Na slici 3 prikazani su analogni podaci kao na slici 2, s tom razlikom, da smo u ovom slučaju kao nezavisnu varijablu uzeli logaritam koncentracije koproporfirina u urinu, a kao zavisnu varijablu logaritam koncentracije olova u krvi.



Slika 3. Regresijski pravci i 95% -ne granice pouzdanosti procjenjivanja nepoznatog logaritma koncentracije olova u krvi iz poznatog logaritma koncentracije koproporfirina u urinu.

Krugovi predstavljaju srednje vrijednosti logaritama koncentracije olova u krvi za srednje vrijednosti razreda, u koje su svrstani logaritmi koncentracija koproporfirina u urinu.

S obzirom na to, da su na slikama 2 i 3 prikazane vrijednosti koncentracija i granice pouzdanosti u logaritmičkom mjerilu, prikazani su radi bolje ilustracije u tablicama 4 i 5 neki antilogaritmirani rezultati. Za određenu koncentraciju olova u krvi označena je u tablici 4

Tablica 4.

Izmjerena C_{Pb} $\mu\text{g}/100$ ml krvi	Koncentracija koproporfirina $\mu\text{g}/100$ ml urina			
	Izračunana iz regresijskog pravca	Granice pouzdanosti		Interval pouzdanosti
		Donja	Gornja	
35	13	1	127	126
50	22	2	206	204
72	37	4	340	336
105	62	7	567	560
151	103	11	956	945
219	172	18	1632	1614

izračunana koncentracija koproporfirina u urinu, gornja i donja 95%-na granica pouzdanosti procjenjivanja, te intervali između gornje i donje granice. Odavde se vidi, da na pr. za dobivenu koncentraciju olova od 50 $\mu\text{g}/100$ ml krvi, koncentracija koproporfirina izračunana iz regresijskog pravca iznosi 22 $\mu\text{g}/100$ ml urina, ali da je prava vrijednost bilo koji rezultat između 2 i 206 $\mu\text{g}/100$ ml urina, a u jedan od dvadeset slučajeva i izvan tih granica. To znači, da bismo za koncentraciju olova, koju još smatramo normalnom, mogli dobiti normalnu koncentraciju koproporfirina, ali i koncentraciju, koju smatramo izrazito patološkom. Osim toga, kako se iz tablice vidi, interval između granica raste, dok raste i koncentracija olova u krvi, pa procjenjivanje u području visokih koncentracija olova postaje još nesigurnije.

Slična je situacija i u obrnutom slučaju izračunavanja koncentracije olova u krvi iz izmjerene koncentracije koproporfirina u urinu, kao što se to vidi iz tablice 5.

Tablica 5.

Izmjerena C_{porf} $\mu\text{g}/100$ ml urina	Koncentracija olova $\mu\text{g}/100$ ml krvi			
	Izračunana iz regresijskog pravca	Granice pouzdanosti		Interval pouzdanosti
		Donja	Gornja	
3	55	25	121	96
6	64	29	140	111
16	75	34	163	129
40	88	40	190	150
100	102	47	222	175
251	120	55	261	206

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati omogućuju stvaranje ovih zaključaka:

1. Količina olova do 60 $\mu\text{g}/100$ ml krvi (što smatramo normalnom količinom) vjerojatno ne izaziva koproporfinuriju. To potvrđuju nalazi 30 ispitanika, koji su svrstani u 4. grupu tablice 1. Protiv tog zaključka ne govore ni nalazi petorice ispitanika treće grupe iste tablice, jer su za trojicu od njih nađeni drugi razlozi* pojave povišenog koproporfirina.

* Porfirin u urinu pojavljuje se kod nekih bolesti kao na pr. artritisa, poliomi-jelitisa, ciroze jetara, perniciozne anemije, Hodgkinsonove bolesti, leukemije, pelagre i t. d., zatim kod uživanja nekih droga i lijekova kao na pr. sulfonala, trionala, etanola, salvarzana, acetanilida, fenacetina, amidopirina, sulfonamida i barbiturata. Od profesionalnih oboljenja porfirin se pojavljuje kod otrovanja s As. Be, Se, P, anilinom, kloriranim ugljikovodicima i t. d.

2. Povišena količina olova u krvi ne mora neposredno izazvati povišeno izlučivanje koproporfirina u urinu, ako ekspozicija povišenoj koncentraciji olova nije dovoljno dugo trajala. Trajanje ekspozicije 23 ispitanika, koji su svrstani u drugu grupu tablice 1, nije još bilo dovoljno dugo, da izazove oštećenje organizma.

3. Kako povišeno izlučivanje koproporfirina nije uvijek popraćeno povišenim sadržajem olova u krvi (3 slučaja opisana pod točkom 1), treba određivanjem olova kvalitativno dokazati, da je koproporfirinurija posljedica ekspozicije olovu, a da nije nastala zbog nekog drugog razloga.

4. Zbog preširokih granica pouzdanosti procjenjivanja ne može se iz rezultata određivanja koproporfirina u urinu ni približno zaključiti vrijednost koncentracije olova u krvi i obratno, pa prema tome treba kod dijagnoze izvoditi obje analize, od kojih svaka ima svoje značenje.

*Institut za higijenu rada,
Zagreb*

LITERATURA

1. *Binnendijk J.*, (1880) prema A. Tannenbaum: Toxicology of Uranium, New York, 1951. str. 292.
2. *Gabel, U.*, Arch. exptl. Path. Pharmacol., 195 (1940) 365.
3. *Guenther, H.*, Ergeb. d. allg. Path. u. path. Anat., 20 (1922) 608.
4. *Watson, C. J.*, J. Clin. Invest., 15 (1936) 327.
5. *Vigliani, E. C.* i *Angeleri C.*, Klin. Wochschr., 15 (1936) 700.
6. *Mertens, E.*, Ibid., 16 (1937) 61.
7. *Vigliani, E. C.* i *Libowitzky H.*, Ibid., 16 (1937) 1243.
8. *Franke, K.* i *Litner St.*, Z. Klin. Med., 129 (1935) 115.
9. *De Langen, C. D.* i *ten Berg J. A. G.*, Acta Med. Scandinav., 130 (1948) 37.
10. *Harrold, G. C.*, *Meek S. F.* i *Padden D. A.*, Arch. Ind. Hyg. & Occ. Med. 6 (1952) 24.
11. *Weber, K.* i *Ruždić I.*, Experientia, 7 (1951) 354.
12. *Waldman, R. K.* i *Seideman R. M.*, Arch. Ind. Hyg. & Occ. Med., 1 (1950) 290.
13. *Meek, S. F.*, *Mooney T.* i *Harrold G. C.*, Ind. Med. 17 (1948) 469.
14. *Schwartz, S.*, *Zieve L.* i *Watson C. J.*, J. Lab. & Clin. Med. 37 (1951) 843.
15. *Watson, C. J.*, *De Mello R. P.*, *Schwartz S.* i *sur.*, Ibid., 37 (1951) 831.
16. *Raine, D. N.*, Biochem. J., 47 (1950) 14.
17. *Weber, O. A.*, *Voloder K.* i *Uouk U. B.*, Arh. hig. rada 3 (1952) 296.
18. *Uouk, U. B.*, *Voloder K.*, *Weber O. A.* i *Purec Lj.*, referat na II. sastanku stručnjaka za higijenu rada, Zagreb, 1953.
19. *Watson, C. J.* i *Larson K. A.*, Physiol. Rev., 27 (1947) 478.

SUMMARY

ON BLOOD LEAD CONTENT AND URINARY COPROPORPHYRIN RELATIONSHIP

In order to investigate the correlation between the urinary coproporphyrin concentrations of lead in blood (17) and coproporphyrin in urine (11) of 154 subjects have been determined.

The regression of the logarithms of the urinary coproporphyrin concentrations upon the logarithms of the concentrations of lead in blood and vice versa were found to be linear in the concentration range above the normal values. The regression equation was computed and the 95% confidence limits for the predicted values of the concentration of coproporphyrin in urine from the measured concentration of lead in blood and vice versa are given.

On the basis of these results the following conclusions may be drawn:

1. The lead content up to 60 μg per 100 ml blood, which is the upper limit for normal values (18), does not produce coproporphyrinuria.
2. The increased amount of lead in blood will not increase the excretion of coproporphyrin in urine if the exposure to lead is not long enough.
3. The 95% confidence limits for the prediction of the lead concentration from the concentration of the coproporphyrin in urine and vice versa are too wide to enable even approximately good estimation.

In the diagnosis of lead poisoning it is therefore necessary to perform both analyses. Each of them has its own meaning.

*Institute of Industrial Hygiene,
Z a g r e b*