

PORFIRINURIJA KAO RANI ZNAK NASTUPA OPASNE
APSORPCIJE OLOVA

Kod svakog otrovanja olovom naći ćemo u urinu povećano izlučivanje koproporfirina izomerije III. To su neki autori pokušali iskoristiti, da pravovremeno otkriju pojavu opasne apsorpcije olova. Na način, koji su oni preporučili, nisu mogli sa sigurnošću utvrditi početak opasne apsorpcije. U dokazivanju povećanih količina koproporfirina u urinu vide oni, međutim, test, koji bi bio korisnije i sigurnije laboratorijsko oruđe u procjeni raznih oblika intoksikacije olovom, nego što su bazofilno punktirani eritrociti. Na osnovu iskustava stečenih u nizu izvršenih istraživanja upotrebili smo našu semikvantitativnu metodu za određivanje koproporfirina u urinu. Na taj smo način mimošli teškoće, koje su opisali prije spomenuti autori. Mogli smo pratiti već prve male promjene u količini koproporfirina, koji je izlučen u urinu, a do kojih dolazi povećanjem apsorpcije olova. Podaci o dokazu koproporfirina u urinu kod 53 radnika pokazuju, da se pojava opasne apsorpcije olova u organizmu može pratiti na taj način.

Olovo, koje cirkulira u krvi, izaziva čitav niz biokemijskih aktivnosti. Njihov zbroj dovodi do raznih poremećaja normalnog metabolizma, pa tako i do poremećaja normalnog metabolizma hemoglobina. Pojava porfirinurije je također jedna od posljedica takvog poremećaja razgradnje, odnosno izgradnje hemoglobina. S obzirom na ranu dijagnostiku otrovanja olovom mišljenja su o važnosti porfirinurije podijeljena.

Mnogi autori smatraju, da je pojava porfirinurije ne samo korisno pomagalo u dijagnostici otrovanja olovom, nego također i siguran znak rane intoksikacije, čak sigurniji i od pojave povećanog broja bazofilno punktiranih eritrocita. (1—8) Oni smatraju povećani broj bazofilno punktiranih eritrocita samo za znak patološke reakcije stanice, a nikako za neki fenomen, koji bi se mogao pripisati specifičnom djelovanju olova.

S tim se mišljenjem dosta autora ne slaže. Za njih je upravo povećan broj bazofilno punktiranih eritrocita, a ne pojava porfirinurije, definitivni kriterij u procjeni otrovanja olovom. Istina, oni priznaju, da je porfirinurija važno obilježje opće slike otrovanja olovom, ali ne priznaju, da je to i pojava, koja je specifična za to otrovanje. (9), (10)

Neki autori opet smatraju, da isti oni faktori, koji dovode do povećanja broja bazofilno punktiranih eritrocita, izazivaju i porfirinuriju. Prema tome bi i kliničko značenje pojave porfirinurije bilo isto tako ograničeno, kao i značenje svih drugih laboratorijskih testova, izuzevši kvantitativno određivanje olova u biološkom materijalu. (9)

Ako rezimiramo mišljenja, koja smo iznijeli, vidjet ćemo, kako se svi slažu u tome, da otrovanje olovom prati povećana količina u urin izlučenog porfirina, i to koproporfirina izomerije III.

Međutim u pitanju, zašto dolazi do povećanog izlučivanja koproporfirina kod otrovanja olovom i u kojoj fazi olovo prekida normalni tok metabolizma hemoglobina, nije postignuta puna suglasnost. Većina autora smatra, da do tog prekida dolazi zato, što olovo sprečava ugradnju željeza u protoporfirinski prsten i time tako reći »blokira« normalnu izgradnju hemoglobina. (11), (12), (13) A protoporfirin, koji na taj način ostaje neiskorišten, prelazi u koproporfirin izomerije III i izlučuje se u urin. Takvo tumačenje patološke sinteze hemoglobina naročito su potkrijepili najnoviji radovi *Vannottija* i njegovih suradnika. (14) Prateći pojavu fluorescencije pod mikroskopom, odnosno prateći smještaj radioaktivnog željeza, oni su dokazali, da se kod otrovanja olovom u eritroblastima gomila protoporfirin. Do tog gomilanja dolazi zato, što eritroblasti više ne mogu da u protoporfirinski prsten ugrade raspoloživo željezo i da time osiguraju normalnu sintezu hemoglobina. Pojava anemije i naročito velik porast količine porfirina u eritrocitima, odnosno u urinu posljedice su takve patološke sinteze.

A drugi autori (15), ne mogavši u svojim istraživanjima utvrditi od takvog tumačenja zavisnu korelaciju između urinom izlučene količine željeza i koproporfirina, dovode pojavu porfirinurije u vezu s preranom razgradnjom eritrocita. Oni olovo smatraju za izraziti hemolitički otrov, koji se apsorbira na lipoidno-proteinskoj membrani eritrocita i na taj način izaziva njihovu preranu razgradnju u perifernoj cirkulaciji krvi. Zbog takve razgradnje dolazi do nadražaja koštane moždine. Kad se olovo u koštanoj moždini nagomila u dovoljnoj količini, inhibira produkciju protoporfirina potrebnog za sintezu hemoglobina. Tako je, po njihovu mišljenju, smanjena količina hemoglobina posljedica smanjenje produkcije protoporfirina, a ne nesposobnost organizma, da stvoreni protoporfirin iskoristi.

U sam problem, kako dolazi do patološkog metabolizma hemoglobina, ne ćemo se detaljnije upuštati, ali se već iz tih tek ukratko sažetih izlaganja jasno vidi, da je porfirinurija neizbježna posljedica poremećaja u metabolizmu hemoglobina, bez obzira na to, na koji način olovo prekida normalni tok izgradnje, odnosno razgradnje hemoglobina.

Kako dugo i u kako velikim količinama mora olovo cirkulirati u krvi da dođe do takvog poremećaja, pitanje je, na koje se nije dovoljno obratila pažnja. Drugim riječima: nastojanja autora, koji su se bavili tim problemom, nisu išla za tim, da otkriju početak opasne apsorpcije, nego su nastojali da pruže što uvjerljivije dokaze o tom, kako je upravo pojava porfirinurije jedan od kardinalnih simptoma otrovanja olovom.

Ta činjenica može biti u diferencijalnoj dijagnostici otrovanja olovom dragocjeno pomagalo kliničaru, ali ne i liječniku, kome je povjereno da očuva zdravlje radnika u industriji olovom. Liječnik ne smije naime dopustiti ni da dođe do oboljenja, a nekad da čeka, da se oboljenje razvije u punoj i izraženoj kliničkoj slici, jer takva oboljenja prečesto ostavljaju trajne i nepopravljive poremećaje u zdravlju radnika. Stoga je njegova prva, a ujedno i najvažnija dužnost, da spriječi oboljenje radnika, t. j. da radnika u pravi čas ukloni iz ugrožene okoline. Da bi to mogao postići, treba da ima takva pomagala, koja mu omogućuju, da svakog časa može procijeniti, koliko je radnik ugrožen na svom radnom mjestu, da otkrije prve znakove, koji ga upozoravaju o nastupu povećane apsorpcije, drugim riječima, o nastupu opasnosti otrovanja olovom.

Sva pomagala, koja mu za to stoje na raspolaganju, mogu se uglavnom svesti na traženje bazofilno punktiranih eritrocita, odnosno na određivanje količine urinom izlučenog olova. I jedan i drugi test zapravo su nezahvalno oruđe u ovom teškom poslu higijeničara. Traženje bazofilno punktiranih eritrocita, naime, ne samo da je test, koji mnogi autori kritiziraju i smatraju kao nespecifičan, nego i samo traženje bazofilno punktiranih eritrocita razmjerno dugo traje. A određivanje urinom izlučene količine olova je, istina, potpuno pouzdan test, ali je njegovo izvođenje dugotrajno, skupo i zahtijeva kvalificirano osoblje, tako, da se može teško primijeniti i u rutinskom poslu kod čuvanja zdravlja radnika ma u iođe većoj industriji olovom.

Te okolnosti dovele su do toga, da su danas uvelike koncentrirana nastojanja, kako da se nađe test, koji bi bio i toliko jednostavan i jeftin, da ga može ne samo liječnik, nego i njegovo tehničko osoblje u samoj tvornici, odnosno ambulanti izvesti, a ujedno i toliko pouzdan, da se liječnik u prosuđivanju opasnosti od otrovanja olovom sa sigurnošću može osloniti na nj.

U novije vrijeme ima sve veći broj autora (7), (8), koji pojavu porfirinurije dovode u vezu s otrovanjem olovom. Oni se nadaju, da bi upravo izučavanje metabolizma porfirina moglo zadovoljiti navedene zahtjeve t. j. pružiti test, koji bi bio rana indikacija nastupa opasne apsorpcije. To pridavanje važnosti pojavi porfirinurije kod otrovanja olovom toliko je zanimljivije, što joj sada ne pridaju važnost samo evropski, nego također i američki autori, koji su sve do nedavna porfirinuriju smatrali za fenomen, na temelju kojeg se ne mogu stvarati bilo kakvi značajniji zaključci čak ni u dijagnostici otrovanja olovom. (9)

Istina, svaki čovjek u vrijeme od 24 sata redovno urinom izluči 14—99 mikrograma porfirina, i to oko 80% koproporfirina izomerije I i oko 20% koproporfirina izomerije III, ali je kod otrovanja olovom količina urinom izlučenog koproporfirina izomerije III veća, tako da može doseći i količinu do 8 mg na dan. (16)

Obje te izomerije, i koproporfirin I i koproporfirin III, topljive su u smjesi etera i octene kiseline, a u ultraljubičastom svijetlu fluoresciraju crveno (17). I jedno i drugo svojstvo koproporfirina zapravo su osobine, koje nam i omogućuju dokazivanje njihova prisustva u urinu. Većina autora preporučuje, da se porfirin iz octeno kiselog urina ekstrahira eterom, iz etera preuzme u solnu kiselinu i fluorescencija solno kisle otopine porfirina promatra u ultraljubičastom svijetlu. Manji broj autora promatra direktno fluorescenciju eternog sloja. Pojava crvene fluorescencije znači, da u istraživanom urinu ima porfirina. (11)

Bilo da na jedan ili na drugi način ekstrahiramo porfirin iz urina, njegovu crvenu fluorescenciju prati još i jedna druga, plava, odnosno prljavo zelena fluorescencija, koja potječe od supstancija, koje su ekstrahirane zajedno s porfirinom u eter, odnosno u solnu kiselinu. Ta fluorescencija, koja je zapravo neodređene boje, to je izrazitija, što je manja koncentracija porfirina. Tako je, ako se radi s malim količinama urina zdravih ljudi, odnosno onih, koji po svom pozivu ne dolaze u dodir s olovom, plava fluorescencija potpuno prekrivena crvenom, kao da urin uopće ni ne sadržava porfirina.

Polazeći od te činjenice nedavno su *de Langen i ten Berg* (7) objavili semikvantitativnu metodu određivanja porfirina u urinu. Oni uzimaju 20 ml urina, zakisele ga s nekoliko kapi octene kiseline i izmućkaju s 2 ml etera pa promatraju fluorescenciju eternog sloja u ultraljubičastom svijetlu. Ako urin sadržava normalne količine porfirina, eterni sloj fluorescira slabo plavo do plavo-zeleno. Međutim, ako je količina porfirina u urinu povećana, eterni sloj fluorescira crveno; porastom koncentracije porfirina raste i intenzitet crvene fluorescencije. U nejasnim slučajevima preporučuju kvantitativno određivanje porfirina. Po mišljenju autora takav način dokazivanja porfirina može poslužiti kao pouzdan test za prosuđivanje već prisutne, odnosno potencijalne intoksikacije olovom. Na osnovu rezultata dobivenih takvim dokazivanjem porfirina u urinu od 87 radnika izvrnutih djelovanju olova, oni zaključuju, da je tako utvrđena porfirinurija mnogo pouzdaniji test za prepoznavanje ranog otrovanja olovom, nego bazofilno punktirani eritrociti. Uvjereni su, da se na taj način može zdravlje radnika u industriji olovom mnogo jednostavnije i sigurnije očuvati, nego praćenjem pojave bazofilno punktiranih eritrocita.

Takva je istraživanja na skoro isti način izvršio *Meek* sa suradnicima. (8) Oni su istražili urin 66 radnika izvrnutih djelovanju olovnog dima i nisu mogli naći velike korelacije između pojava

crvene fluorescencije i količine urinom izlučenog olova. Najveću teškoću u procjeni, da li je urinom izlučena količina porfirina povećana ili nije, predstavljala je gotovo redovna pojava plave fluorescencije. Upravo je pojava te plave fluorescencije, kako se to jasno vidi iz rezultata, koje su oni tabelarno prikazali, bila glavni uzrok njihove nesigurnosti u prosuđivanju boje fluorescencije, odnosno u donošenju konačne odluke, da li je nastupilo povećano izlučivanje porfirina, pa prema tome i opasna apsorpcija olova, ili nije.

Iako rezultati njihovih određivanja ne potvrđuju u cijelosti navode *de Langena* i *ten Berga*, pa prema tome ni ne opravdavaju takvo dokazivanje porfirina kao test, koji bi služio za ranu indikaciju opasne apsorpcije olova, ipak smatraju svoje rezultate za toliko zanimljive, da mogu pobuditi jači interes u izučavanju toga problema. Oni usprkos iznesenih teškoća kao i činjenice, da porfirinuriju može izazvati i čitav niz drugih kemikalija, više cijene taj test nego traženje bazofilno punktiranih eritrocita, kad se radi o prosuđivanju prisutne, odnosno potencijalne intoksikacije olovom. Štaviše, po njihovu je mišljenju utvrđivanje pojave porfirinurije značajnije za ocjenjivanje opasnosti, nego čak i određivanje olova u krvi ili u urinu. Oni stoga u izradi točnog porfirinskog testa gledaju laboratorijsko oruđe, kojim će se liječnik moći u procjeni olovne opasnosti mnogo efikasnije služiti, nego bilo kojim drugim već poznatim pomagalom.

Iako rezultati naših prijašnjih istraživanja nisu opravdavali nadu (18), da će pojava porfirinurije moći poslužiti kao siguran test za indikaciju nastupa opasne apsorpcije olova, ipak su nas iznesena mišljenja spomenutih autora navela, da u našem Institutu ponovo pristupimo istraživanju ovog problema. Tu našu odluku potkrijepila je činjenica, da je tehnika dokazivanja porfirina u urinu sama po sebi čista i brza i jeftina, a i toliko jednostavna, da je i pomoćno osoblje može u samoj tvornici, odnosno ambulanti vršiti.

U svojim smo prijašnjim istraživanjima naime nailazili na one iste poteškoće, koje spominju *Meek* i suradnici, (8) t. j. nailazili smo često na pojavu plave fluorescencije, bez obzira na to, da li je porfirin bio ekstrahiran iz urina u eter ili solnu kiselinu. Ta pojava plave fluorescencije često je otežavala sigurno prosuđivanje, da li uz plavu fluorescenciju postoji i crvena. Drugim riječima, pojava je plave fluorescencije onemogućavala, da se točno prosudi, je li izlučena količina porfirina u urin povećana ili nije. To se naročito događalo kod radnika, kod kojih je postojala samo povećana apsorpcija olova,

a nije bilo znakova otrovanja. Na osnovu takvih iskustava, do kojih smo došli dokazivanjem porfirina u urinu od 100 radnika izvrnutih djelovanju olova, zaključili smo, da se ni ne mogu uočiti neke značajnije ovisnosti između pojave porfirinurije i koncentracije olova u urinu, pa prema tome da ni porfirinski test ne može služiti kao pouzdano oruđe u procjeni početka opasne apsorpcije.

Kad smo se dakle ponovo primili problema, ponovili smo istraživanja na način, koji su preporučili *de Langen* i *ten Berg*, odnosno *Meek* i suradnici. Za ta smo istraživanja uzimali urin radnika, koji nisu bili u svom poslu izvrnuti djelovanju olova, kao i urin onih radnika, koji su bili danomice izvrnuti djelovanju olova. Kod istraživanja smo pored porfirina redovno određivali i količinu olova u urinu, i to ditizonskom metodom. Urin smo sabirali na način, koji je prije opisan, tako, da se za dokazivanje porfirina uvijek upotrebljavao svjež urin. (18)

Stečena iskustva i nakon tih istraživanja nisu mnogo izmijenila mišljenje, koje smo već ranije stekli s obzirom na pojavu porfirinurije kod radnika izvrnutih djelovanju olova. (18)

U nastavku istraživanja smo konačno pokušali dokazati porfirin u urinu i na način, koji smo izradili u našem Institutu (19); t. j. uzeli smo 10 ml urina, zakiselili ga sa 0,2 ml octene kiseline i izmučkali sa 20 ml etera. Pošto smo eterni ekstrakt tri puta oprali sa po 2 ml destilirane vode, izmučkali smo ga sa 5 ml 10% sumporne kiseline i sumporno kiselu otopinu porfirina promatrali u ultraljubičastom svijetlu.

Podaci tih istraživanja prikazani su u tablici 1, gdje je jednim križem označena slabo crvena fluorescencija, sa dva križa jasno crvena fluorescencija, a sa tri križa jaka crvena fluorescencija.

Porfirin smo na taj način mogli dokazati — kako se to vidi iz podataka na tablici 1 — u svakom onom uzorku, koji je sadržavao više od 110 mikrograma na litru urina, dok u uzorcima, koji su sadržavali manje od 110 mikrograma na litru urina, nismo mogli dokazati prisutnost porfirina. Drugim riječima, prisutnost porfirina nismo mogli dokazati u urinu zdravih ljudi, odnosno ljudi, koji nisu izloženi djelovanju olova. Ali uvijek je dokazana prisutnost porfirina u urinu onih ljudi, koji su bili izvrnuti opasnoj apsorpciji olova. Istražujući prisutnost porfirina nismo nikad zamjećivali onu neodređenu boju fluorescencije, koja se kadikad zamjećuje, kad se porfirin ekstrahira iz urina u solnu kiselinu. (20) U svim istraženim slučajevima fluorescencija je uvijek bila jasno crvene boje, bez ikakve druge primjese,

pa je njen intenzitet rastao s porastom koncentracije porfirina u urinu. Ujedno bi se iz podataka te tablice moglo zaključiti i na korelaciju između koncentracije olova i koncentracije porfirina u urinu.

TABLICA 1.

Podaci o pojavi porfirinurije s obzirom na koncentraciju olova u urinu

Redni broj	Količina olova u mikrogramima na 1000 ml urina	Crvena fluorescencija zamiječena	Redni broj	Količina olova u mikrogramima na 1000 ml urina	Crvena fluorescencija zamiječena
1	87	—	28	140	+++
2	69	—	29	135	++
3	53	—	30	133	+++
4	61	—	31	150	+++
5	100	—	32	163	+++
6	98	—	33	134	+++
7	112	+	34	141	+++
8	123	+	35	126	++
9	125	++	36	159	+++
10	115	+	37	147	+++
11	118	+	38	189	+++
12	113	+	39	151	+++
13	126	++	40	165	+++
14	119	++	41	173	+++
15	120	++	42	148	+++
16	128	++	43	177	+++
17	124	++	44	180	+++
18	129	++	45	162	+++
19	131	++	46	144	+++
20	117	++	47	207	+++
21	123	++	48	203	+++
22	119	++	49	192	+++
23	116	++	50	187	+++
24	111	+	51	161	+++
25	109	+	52	172	+++
26	117	++	53	201	+++
27	121	++			

Iako porfirinurija prati i neka druga oboljenja, pa prema tome i nije specifičan znak otrovanja olovom, ipak se iz tih prvih podataka naših istraživanja može očekivati, da će na ovaj način dokazana porfirinurija moći poslužiti liječniku kao pouzdano oruđe u otkrivanju početka opasne apsorpcije olova. To konačno i jeste svrha zajedničke suradnje biokemičara i liječnika na polju higijene rada.

Iz Instituta za higijenu rada
Zagreb

LITERATURA

1. Fischer, H., *Ztschr. f. physiol. Chem.* **132** (1924) 18
2. Van den Bergh, A. A., *Deutsch. med. Wochen.* **54** (1928) 1244
3. Grottepass, W., *Ztschr. f. physiol. Chem.* **205** (1932) 193
4. Franke, K. und Litzner, S., *Ztschr. f. klin. Med.* **129** (1935) 115
5. Vigliani, E. und Waldenström, J., *Deutsch. Arch. f. klin. Med.* **180** (1937) 180
6. Meyar, W., *Süddeutsch. Apot. Zeit.* (1939) 139
7. de Langen, C. D. and ten Berg, J. A. G., *Acta med. Scand.* **130** (1948) 37 cit. prema *J. A. M. A.* **138** (1948) 244
8. Meek, S. F., Mooney, T. and Harrold, G. C., *Indust. Med.* **17** (1948) 469
9. Cantarow, A. and Trumper, M., *Lead poisoning*, Baltimore, Williams et Wilkins Company, (1944) p. 53 et 154
10. Fiarhall, L. T., *J. A. M. A.* **139** (1949) 916
11. Vannotti, A., *Porphyrine und Porphyrinkrankheiten*, Berlin, Springer, J. (1937) p. 142
12. Prader, A., *Schweiz. med. Wochensh.* **12** (1948) 273
13. Rimington, C., *Compt. rend. d. trav. du lab. Carlsberg, serie chim.* **22:454**, (1938) cit. prema *Indust. Med.* **17** (1948) 469
14. Vannotti, A., *Experientia* **4** (1948) 133
15. Kench, J. E., Gillam, A. E. and Lane, R. E., *Biochem J.*, **36** (1942) 384 cit. prema *Indust. Med.* **17** (1948) 469
16. Editorial, *J. A. M. A.* **136** (1948) 627
17. Evereth, M. R., *Medical Biochemistry*, London, P. B. Hoeber, (1948) p. 563
18. Ruždić, I., *Arhiv za med. rada* **2** (1948) 1
19. Ruždić, I., U pripremi za štampu
20. Weber, K. i Ruždić, I., Predano u štampu, (*Experientia*)

SUMMARY

PORPHYRINURIA AS EARLY SIGN OF DANGEROUS LEAD ABSORPTION

Each lead poisoning causes an increased excretion of coproporphyrine, isomer III. Some authors tried to use this fact for an early detection of dangerous lead absorptions. However, the method recommended by them did not vouchsafe for detecting the beginning of dangerous absorptions. But such a detection would be a much more useful and reliable laboratory weapon for estimating various forms of lead intoxication than that of »stippled« erythrocytes. On the basis of experience acquired in a series of investigations we proceeded to use for this purpose our semiquantitative method for detecting coproporphyrine in urine. We thus succeeded in by-passing the difficulties described by the above-named authors. We were able to observe already the first small changes in the amount of coproporphyrine excreted in urine and caused by increased lead absorption. Data on ascertainment of coproporphyrine in urine in 53 workers prove that the phenomenon of dangerous lead absorption in the organism can be observed in this way.

Institute of Industrial Hygiene,
Zagreb