

ZNAČAJ ODREĐIVANJA INDIVIDUALNOG HEMATOKRITA PRI
ODREĐIVANJU PROTOPORFIRINA IX U ERITROCITIMA KOMERCIJALNIM
HEMATOFLUOROMETROM (BUCHLER ZF)

P. Milićević i B. Nikolin

*DOO Zavod za medicinu rada, Zastava, Kragujevac, Farmaceutski fakultet, Sarajevo**Primljeno 10. XII. 1990.*

Autori su određivali protoporfirin IX u eritrocitima komercijalnim hematofluorometrom tipa Buchler ZF, koji je baždaren na prosečni hematokrit 0,42, i zatim korigovanjem tih vrijednosti na individualni hematokrit. Ispitanike je činila grupa od 191 radnika Fabrike akumulatora, kojima je biološkim praćenjem potvrđena značajna profesionalna ekspozicija neorganskom olovu. Na uobičajeni način vršeno je određivanje hematokrita, a individualne vrijednosti bile su u rasponu 0,38 – 0,51. Rezultati istraživanja potvrđuju značajnu razliku koncentracija protoporfirina IX određivanog direktno na hematofluorometru i koncentracija dobivenih korigovanjem na individualni hematokrit.

Ključne riječi: dehidrataza delta-aminolevulinske kiseline u krvi, eritrocitni protoporfirin, olovo u krvi, profesionalna ekspozicija.

U ocjeni povećane apsorpcije olova protoporfirin IX u eritrocitima je vrlo koristan pokazatelj, jer bolje od drugih raspoloživih pokazatelja odražava endogeni učinak olova na hematopoezni organ – koštanu srž (1–3). Nakon što je ustanovljeno da se kod sideropenične anemije i povećane apsorpcije olova protoporfirin IX ne nalazi slobodan, nego vezan sa cinkom u obliku cink-protoporfirina, objavljena je metoda za određivanje cink-protoporfirina pomoću komercijalnih hematofluorometara (4). U ovoj metodi iskorišteno je svojstvo da cink-protoporfirin fluorescira za razliku od normalnog hemoglobina koji ne fluorescira. U istraživanju metoda izbora za određivanje protoporfirina IX, polazeći od specifičnosti, tačnosti i ponovljivosti svake istraživane metode, kao metoda izbora preporučena je spektrofluorometrijska Chisolm-Brownova metoda (5, 6). Za rutinski rad preporučena je i hematofluorometrijska metoda, uz naglašenu nespecifičnost u prisustvu većih koncentracija bilirubina i karboksihemoglobina (7). O ovim nespecifičnostima vođeno je u našem radu računa na

Rad je prezentiran na V. kongresu toksikologa Jugoslavije, Brioni 1990.

taj način što je grupi eksponiranoj olovu određivan bilirubin u serumu i mikrodifuzionom metodom ugljen monoksid u krvi. Rezultati ovih istraživanja isključuju mogućnost značajnih interferencija.

Cilj rada bio je provjeriti potrebu preračunavanja protoporfirina IX u eritrocitima, određenog na komercijalnom hematofluorometru, na individualni hematokrit.

ISPITANICI I METODE

Ispitanici su 191 lice profesionalno eksponirano olovu u Fabrici akumulatora. Krv za analizu protoporfirina IX uzimana je uz antikoagulans K_2EDTA (Koch-light Laboratories Ltd). Uzorci su bili zaštićeni od svjetla, a analiza urađena unutar tri dana. Koncentracija protoporfirina IX određivana je na hematofluorometru tip Buchler ZF, koji je komercijalno baždaren na prosječni hematokrit 0,42. Instrument se svakodnevno baždari komercijalnim fluorescentnim standardima, koji su stabilni i imaju isti emisijski spektar kao cink-protoporfirin (ZPP) u krvi. Konstrukciono rješenje aparata Buchler omogućava da se na ekranu hematofluorometra očita direktno koncentracija protoporfirina IX (EPP-IX), pa smo mjerenjem emisijnog spektra ZPP na ekranu hematofluorometra u radu očitavali koncentracije EPP-IX. Analiza se izvodi iz homogenizirane krvi, koja se na pokrovnom staklu oksigenira miješanjem mikropipetom oko jedan minut, dok se na ekranu aparata ne pojavi ista vrijednost za tri uzastopna mjerenja.

Hematokrit (Hct) je određivan na uobičajeni način na hematokritskoj centrifugi tip Hc 241 Tehnica Železniki. Preračunavanje očitane vrijednosti koncentracije EPP-IX (A) u vrijednost EPP-IX korigovanu na individualni hematokrit (B) obavljeno je prema slijedećoj jednačini, u kojoj je za »prosječni Hct« vrijednost 0,42 (tj. za upotrebljeni hematofluorometar):

$$B = A \cdot \frac{\text{individualni Hct}}{\text{»prosječni Hct«}}$$

Olovo u krvi određivano je na AAS SP-9 Pye Unicam po metodi razrađenoj u Toksikološkoj laboratoriji Instituta za medicinu rada i radiološku zaštitu »Dr. Dragomir Karajović« u Beogradu (8), a aktivnost dehidrataze delta-aminolevulinske kiseline određivana je po metodi Bonsignore (9).

REZULTATI

Opšta svojstva olovu eksponirane grupe ispitanika: starost, ukupni radni staž i ekspozicioni radni staž prikazani su u tabeli 1. Rezultati provedenog biološkog monitoringa: olovo u krvi, dehidrataza delta-aminolevulinske kiseline (D-DALK) i protoporfirina IX u eritrocitima (EPP-IX), dati su u tabeli 2. U tabeli 3. prikazani su broj (n) i postotak ispitanika sa pripadajućim hematokritima (Hct) i prosječna vrijednost \pm standardna devijacija ($\bar{X} \pm SD$) protoporfirina IX dobivena direktno očitovanjem na

Tabela 1.

Prosječna starost, ukupni i ekspozicioni radni staž radnika eksponiranih olovu ($\bar{X} \pm SD$)

Broj ispitanika	Starost (godine)	Ukupni radni staž (godine)	Ekspozicioni radni staž (godine)
191	31,3 ± 7,1	11,4 ± 3,5	8,6 ± 6,2
koeficijent varijacije (%)	22	48	72

Tabela 2.

Statistički parametri analiza krvi (olovo, D-DALK, EPP-IX) grupe eksponirane olovu (E) i kontrolne grupe (K)

Grupa	Broj ispitanika	$\bar{X} \pm SD$		
		Olovo u krvi ($\mu\text{mol/L}$)	D-DALK (nkatal/L krvi)	EPP-IX ($\mu\text{mol/L}$ krvi)
E	191	2,43 ± 0,72	550 ± 334	2,84 ± 1,85
K	30	1,26 ± 0,44	1 460 ± 210	0,42 ± 0,13
Značajnost razlike E – K (t, P)		t = 8,29 P < 0,001	t = 17,83 P < 0,01	t = 8,59 P < 0,001

hematofluorometru (A) i zatim korigovanjem na hematokrit (B). Razlika tih rezultata (B – A) izražena je takođe relativno prema vrijednostima A (%).

RASPRAVA I ZAKLJUČCI

Ispitanici su činili homogenu grupu u odnosu na dob (koeficijent varijacije $K_v = 22\%$), a heterogenu grupu u odnosu na ukupni radni staž ($K_v = 45\%$) i u odnosu na dužinu ekspozicije olovu ($K_v = 72\%$) (tabela 1). Da bismo efekte koje pripisujemo toksičnom učinku olova mogli da vezujemo za profesionalnu ekspoziciju olovu, izvršen je biološki monitoring. Praćeni su isti ispitanici u ekspoziciji olovu ($n = 191$) i kontrolna grupa ($n = 30$). Kontrolnu grupu (K) činili su ispitanici koji su po sociodemografskim karakteristikama bili vrlo slični grupi eksponiranoj olovu (E), ali koji nisu bili profesionalno eksponirani olovu i njegovim jedinjenjima. U biološkom monitoringu određivano je olovo u krvi, kao doza štetne nokse, a odgovor je praćen određivanjem aktivnosti dehidrataze delta-aminolevulinske kiseline (D-DALK) i protoporfirina IX u eritrocitima (EPP-IX). Statističkom obradom i primjenom t-testa ustanovljena je vrlo značajna razlika u srednjim vrijednostima (E – K) u svim rađenim analizama, i to na

Tabela 3.

Prosječna vrijednost \pm stand. devijacija protoporfirina IX (EPP-IX) kod ispitanika sa naznačenim hematokritom (Hct), očitana na hematofluorometru (A) i korigovana prema individualnom Hct (B). Razlika i relativna razlika (%) između tih rezultata.

Broj ispitanika	Hct	EPP-IX ($\mu\text{mol/L}$ krvi)				
		A	B	Razlika (%)		
n	% (L Er/L krvi)	($\bar{X} \pm \text{SD}$)	($\bar{X} \pm \text{SD}$)	B - A	$\frac{B - A}{A} \cdot 100$	
3	1,57	0,38	3,62 \pm 1,83	3,27 \pm 1,65	-0,35	-9,7
3	1,57	0,39	3,71 \pm 2,86	3,44 \pm 2,65	-0,27	-7,3
5	2,62	0,40	4,73 \pm 2,56	4,50 \pm 2,44	-0,23	-4,9
7	3,66	0,41	1,71 \pm 0,34	1,66 \pm 0,33	-0,05	-2,2
23	12,04	0,42	2,48 \pm 1,57		0	0
25	13,09	0,43	2,47 \pm 1,63	2,53 \pm 1,66	+0,06	+2,4
23	12,04	0,44	2,59 \pm 1,89	2,71 \pm 1,89	+0,12	+4,6
36	18,85	0,45	2,51 \pm 1,89	2,67 \pm 2,02	+0,16	+6,4
25	13,09	0,46	2,15 \pm 1,33	2,35 \pm 1,45	+0,20	+9,3
19	9,95	0,47	2,34 \pm 1,78	2,62 \pm 1,99	+0,28	+11,9
5	2,62	0,48	3,03 \pm 1,37	3,46 \pm 1,57	+0,43	+14,1
6	3,14	0,49	2,69 \pm 2,64	3,14 \pm 3,08	+0,45	+16,7
9	4,72	0,50	3,33 \pm 2,33	3,96 \pm 2,77	+0,65	+19,5
2	1,04	0,51	2,42 \pm 1,98	2,94 \pm 2,40	+0,52	+21,5
			2,84 \pm 1,85	2,98 \pm 1,96		

nivou $P < 0,001$ (tabela 2). To daje za pravo da tvrdimo da efekte koje pripisujemo toksičnom učinku olova treba vezati za profesionalnu ekspoziciju. Nadalje, provjerili smo koncentraciju bilirubina u serumu i ugljen monoksida u krvi da bismo isključili moguće interferencije u određivanju. Vrijednosti bilirubina u serumu radnika u ekspoziciji olovu bile su u granicama referentnih vrijednosti (5,1–20,5 $\mu\text{mol/L}$), a koncentracije ugljen monoksida u krvi, određivane mikrodifuzionom metodom, kod 95% ispitanika nisu bile veće od 1,5 ml CO u 100 ml krvi, što u oba slučaja isključuje mogućnost značajnih interferencija.

U našem istraživanju prosječna vrijednost protoporfirina IX je $\bar{X} = 2,84 \mu\text{mol/L}$ krvi i ukazuje na pojačanu profesionalnu ekspoziciju olovu, a velika standardna devijacija $SD = 1,85 \mu\text{mol/L}$ krvi ukazuje na heterogenost ispitanika. Uz navedene razloge (dob, dužinu ekspozicije olovu) valjan uzrok heterogenosti je i različit nivo dugotrajne ekspozicije olovu kao dimu, parama i prašini pojedinih poslova i radnih zadataka. Međutim, vrlo je značajna i individualna razlika u odgovoru na relativno istu apsorpciju olova, tj. aktuelni nivo olova u krvi, što takođe može biti uzrok izraženoj heterogenosti ispitanika.

Ispitanici izraženi brojem (n) i (%) sa vrijednostima hematokrita (Hct) prema kojem je očitana koncentracija protoporfirina IX (A) korigovana i data kao koncentracija (B) prikazani su u tabeli 3. Polazeći od činjenice da se očitana koncentracija odnosi na prosječni hematokrit 0,42, vidi se da je za hematokrite od 0,40 do 0,44 razlika $\pm 5\%$. Za hematokrite 0,38 i 0,39 očitana koncentracija (A) veća je za 8–10% od korigovane koncentracije (B). Nadalje, za hematokrite veće od 0,44 očitane koncentracije su manje u odnosu na korigovanu i ta razlika je od 8 do 21% ($Hct = 0,44 - 0,51$). Kod 102 ispitanika ili 53% određen je hematokrit i veći je od 0,44. Za 22 ispitanika ili 12% utvrđeno je da je hematokrit veći od 0,47 i korigovanjem očitane koncentracije protoporfirina IX u ovim slučajevima razlike mogu imati dijagnostički značaj. Zbog toga ih svakako treba uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata ostalih bioloških pokazatelja ekspozicije olovu.

U zaključku možemo preporučiti obavezno određivanje individualnog hematokrita radi korekcija koncentracija protoporfirina IX u eritrocitima određivanog komercijalnim hematofluorometrom.

Zahvala — U Toksikološkoj laboratoriji Instituta za medicinu rada i radiološku zaštitu »Dr. Dragomir Karajović« u Beogradu vršeno je određivanje protoporfirina IX u eritrocitima. Autori zahvaljuju dr. sc. Sveti Miliću i osoblju ove laboratorije na dugogodišnjoj korektnoj saradnji.

LITERATURA

1. Beritić T. Olovo. U: Štanković D. i sar., ur. Medicina rada, Sarajevo: Udruženje za medicinu rada SFRJ, 1978:172–83.
2. Alessio L, Castoldi MR, Odone P, Franchini I. Behaviour of indicators of exposure and effect after cessation of occupational exposure to lead. Br J Ind Med, 1981;38:262–7.
3. Alessio L, Bertazzi PA, Monelli O, Toffoletto F. Free erythrocyte protoporphyrin as an indicator of the biological effect of lead in adult males. III Behaviour of free erythrocyte protoporphyrin in workers with past lead exposure. Int Arch Occup Environ Health 1976;38:77–86.
4. Lamola AA, Eisinger J, Blumberg WE, Kometani T, Burnham BF. Quantitative determination of erythrocyte zinc protoporphyrin. J Lab Clin Med 1977;89:881–90.
5. Skender Lj, Prpić-Majić D, Karačić V. Odnos između metoda za određivanje eritrocitnog protoporfirina (EP) i cink-protoporfirina (ZPP). Arh hig rada toksikol 1982;33:227–38.
6. Chisolm JJ, Brown DH. Micro-scale photofluorometric determination of »free erythrocyte porphyrin« (Protoporphyrin-IX). Clin Chem 1975;21:1669–82.
7. Karačić V, Prpić-Majić D, Telišman S. The relationship between zinc protoporphyrin (ZPP) and »free« erythrocyte protoporphyrin (FEP) in lead-exposed individuals. Int Arch Occup Environ Health 1980;47:165–77.
8. Prpić-Majić D. Toksikološkokemijske analize. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga 1985:39–43.

9. *Bonsignore D, Callissano D, Cartasegne C.* Un semplice metode per la determinazione della δ -aminolevulinic dehidratase nel sangue. Comonratamento dell'enzim a nell' intossicazione saturnina. *Med Lav* 1965;56:199.

Summary

IMPORTANCE OF INDIVIDUAL HAEMATOCRIT VALUE ASSESSMENT IN DETERMINING PROTOPORPHYRIN IX IN ERYTHROCYTE WITH A COMMERCIAL HAEMATOFUOROMETER (BUCHLER ZF)

The erythrocyte content of protoporphyrin IX was measured in a group of 191 battery plant workers. According to the results of biological monitoring the selected workers had increased occupational exposure to lead. Measurements were done with a commercial haematofluorometer Buchler ZF which was calibrated to the average haematocrit value of 0.42. The values measured were then corrected to individual haematocrit values. Haematocrit was determined in the standard manner and the individual values ranged from 0.38 to 0.51. Test results showed a major difference in protoporphyrin IX concentrations directly determined with a haematofluorometer and the ones calculated by correcting to the individual haematocrit.

Occupational Health Unit, Zastava, Kragujevac, Faculty of Pharmacy, Sarajevo

Key terms: delta-aminolaevulinic acid dehydratase in blood, erythrocyte protoporphyrin, lead in blood, occupational exposure.