

UTJECAJ EKOLOŠKIH FAKTORA NA POJAVU
TOKSIČNIH PORFIRIJAI. ALKOHOLIZAM I AKTIVNOST DEHIDRATAZE
DELTA-AMINOLEVULINSKE KISELINED. DIMOV, DANICA PRPIĆ-MAJIĆ, T. BERITIĆ,
ANTONIJA KERŠANČ, VIŠNJA KARAČIĆ*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, JAZU, Zagreb*
(Primitljeno 2. II 1972)

Ispitana je aktivnost dehidrataze delta-aminolevulinske kiseline (D-DALK) kod kroničnih alkoholičara (N = 51) uz paralelno određivanje koncentracije delta-aminolevulinske kiseline (DALK) iz jednokratnog uzorka mokraće. Kod 12 bolesnika s kroničnim oboljenjem jetre, analizirano je u mokraći izlučivanje preteča hema i aktivnost D-DALK u krvi. Rezultati su pokazali, da je kod kroničnih alkoholičara više od 50% ispitanika imalo sniženu D-DALK aktivnost, a izlučivanje DALK je bilo lagano povećano kod 14% ispitanika. U bolesnika s kroničnim bolestima jetre izlučivanje porfirina i njihovih preteča bilo je normalno, a aktivnost D-DALK je bila lagano inhibirana u 6 bolesnika. Iako dobiveni rezultati u grupi kroničnih alkoholičara govore u prilog djelovanja etilnog alkohola na aktivnost D-DALK, ipak se to ne može sa sigurnošću zaključiti, jer nisu isključeni i drugi poznati i potencijalni inhibitori tog enzima. Isto tako da bi se dao konačni sud o inhibiciji D-DALK kod kroničnih bolesti jetre potrebno je ispitati veći broj bolesnika s alkoholnim oštećenjem jetre.

Među egzogenim faktorima koji sudjeluju u poremećenjima metabolizma porfirina etilni alkohol zauzima bitno mjesto. Tako je već dugo poznato da ingestija alkoholnih pića povećava izlučivanje porfirina mokraćom (1). *Zieve, Hill, Schwartz i Watson* (2) su našli da je kod ispitanika koji dnevno konzumiraju znatne količine alkohola (oko pola litre viskija) izlučivanje koproporfirina mokraćom značajno više ($232 \pm 45 \mu\text{g}/24$ sata) nego kod osoba koje uopće ne uzimaju alkoholna pića ($166 \pm 45 \mu\text{g}/24$ sata). Osim toga, značajno je, da je prevalencija alkoholizma u bolesnika s kroničnim porfirijama vrlo visoka. Tako su svih 12 bolesnika s kroničnom porfirijom koje su opisali *Szodoray i Sümegi* (3) bili alkoholičari. Među 17 bolesnika s kroničnom porfirijom i kožnim manifestacijama koje su prikazali *Brunsting, Mason i Aldrich* (4) bilo

je 12 koji su dugo i prekomjerno uživali alkohol. Ti autori smatraju alkohol najvažnijim toksičnim agensom, koji može kod kronične porfirije oštetiti jetru i precipitirati kožne lezije. *Brunsting* još jednom kasnije (5) ističe, da je 24 od ukupno 34 bolesnika pilo znatne količine alkoholnih pića kroz mjesec ili godine prije pojave simptoma porfirije. *Berman* i *Bielicky* (6) opisuju 36 bolesnika s kasnom kožnom porfirijom koji su gotovo svi (osim jednog) bili i alkoholičari. Na osnovu razmatranja vanjskih faktora koji se susreću kod porfirija, isti autori ističu da u nastajanju porfirija vanjski faktori, a naročito oni koji uzrokuju oštećenje jetre, mogu biti čak i važniji od hereditarnih faktora. *Doss et al.* (7) u svom opisu kronične hepatične porfirije tipa C spominju znatno povećanje izlučivanja porfirina od početnih 200 $\mu\text{g}/1000$ ml na konačnih 700 $\mu\text{g}/1000$ ml nakon infuzije 90 g alkohola.

Wüst, Arnold i *Henning* (8) prikazuju shematski djelovanje alkohola na sintezu porfirina u jetri s jedne strane i njegovo djelovanje na samu jetru s druge strane. Kod kasne kožne porfirije stvaranje hema je poremećeno zbog kongenitalnih i egzogenih faktora, u ovome slučaju alkohola, na mjestu pretvorbe uroporfirinogena u koproporfirinogen i kod pretvorbe koproporfirinogena u protoporfirin. Neiskorišteno željezo izaziva siderozu u jetrenim stanicama, koja stimulira stvaranje fibroze s postepenim prelazom u cirozu. S druge strane, alkohol pogoduje odlaganju masti u jetri i stvara tzv. masnu jetru, pa uz hipoksiju, izazvanu nedovoljnom produkcijom hema za prostetske grupe enzima katalaze, peroksidaze i nekoliko citokroma, na taj način također stimulira cirozu jetre. Razumljivo je, da je ova relativno jednostavna shema mnogo složenija u svjetlu novih saznanja, kako o nastajanju porfirija uz (zbog?) indukciju delta-aminolevulinske sinteze (9, 10, 11) tako i o promjenama metabolizma masti pod djelovanjem alkohola (12, 13). *Wüst* i sur. (8) ističu, da je 70% bolesnika s kasnom kožnom porfirijom alkoholičara, a da ih je 50% s povećanom jetrom.

I na životinjama je utvrđeno da etanol izaziva poremećaj u metabolizmu porfirina. *Gajdos, Gajdos-Török, A. Palma-Carlos* i *L. Palma-Carlos* (14) su izazvali akutno trovanje na štakorima intraperitonealnim injekcijama 7,5 ml 33% etanola na kg tjelesne težine kroz 8 dana i pratili izlučivanje porfobilinogena i uroporfirina u mokraći; ustanovili su znatno povećanje i jednog i drugog porfirina, a isto tako su bili povećani i protoporfirini i koproporfirini u eritrocitima i u jetri.

Našem radu je bila svrha ispitati utjecaj alkohola na enzimatske sisteme koji posreduju sintezu hema. Pri tom je kao objekt ispitivanja izabran enzim dehidrataza delta-aminolevulinske kiseline (D-DALK) koji posreduje konverziju delta-aminolevulinske kiseline (DALK) u porfobilinogen (PBG). Taj je enzim nazočan u različitim tkivima, ali je za ovaj rad značajna njegova nazočnost u perifernoj krvi i jetri. Budući da inhibicija D-DALK dovodi do povećanog izlučivanja DALK u mokraći, bilo je uputno paralelno analizirati i koncentraciju DALK u mokraći pod djelovanjem alkohola. S druge strane bilo je uputno ispitati javlja

li se kod bolesnika s kroničnim bolestima jetre, bez obzira na generacijsko oboljenja, povećano izlučivanje porfirina i njihovih preteča, te dolazi li do poremećaja D-DALK aktivnosti. Rezultati tih ispitivanja su prikazani u ovome radu.

ISPITANICI I METODE

Za ispitivanje utjecaja alkohola na aktivnost D-DALK poslužila je skupina alkoholičara ($N = 51$) koja se liječi od alkoholizma na Psihijatrijskom odjelu Opće bolnice »Dra M. Stojanovića« u Zagrebu. Svi ispitanici su bili muškarci životne dobi od 22–59 godina. Među njima 7 je imalo fizičku ovisnost, po jedan ispitanik je imao ili polineuropatiju ili polineuritis ili psihopatiju, kod dvojice su zabilježeni epileptički simptomi (među njima jedan je imao i fizičku ovisnost), jedan bolesnik je bio hipertoničar, a kod trojice je opažen pad tolerancije. Ispitanici s kroničnim bolestima jetre (ukupno 12) su bili bolesnici Interne klinike Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Rebro). Među njima je tri bolesnika imalo kronični hepatitis, a 9 cirozu jetre. Kod bolesnika s cirozom četiri su bila dekompenzirana, a kod jednoga je utvrđeno i nakupljanje masti u jetri. Sedam bolesnika su bili muškarci, a pet žene, svi skupa životne dobi od 27–65 godina.

Za određivanje aktivnosti D-DALK primijenjena je metoda *Bon-signore, Calissano i Cartasegna* (15), a za DALK metoda *Davis-Andelman* (16) koja se temelji na poznatoj metodi *Mauzerall-Granick* (17). Aktivnost D-DALK je mjerena iz heparinizirane krvi, a od vremena uzimanja krvi do mjerenja je prošlo maksimalno jedan sat. Određivanje DALK je vršeno iz jednokratnog uzorka mokraće. Koproporfirini u mokraći su određivani modificiranom *Fisherovom* metodom (18), uroporfirini spektrofotometrijski po metodi *Askevolda* (19), a porfobilinogen po metodi *Mauzerall-Granick* (17).

REZULTATI I DISKUSIJA

Distribucija aktivnosti dehidrataze delta-aminolevulinske kiseline kod kroničnih alkoholičara je prikazana u tablici 6, a distribucija koncentracije delta-aminolevulinske kiseline za istu grupu ispitanika u tablici 2. Prema normalnim vrijednostima više od 50% kroničnih alkoholičara je imalo snižene vrijednosti aktivnosti D-DALK (tablica 1). Kod 18 ispitanika aktivnost D-DALK je bila lagano snižena (41–60 jed.), kod 9 ispitanika inhibicija je bila značajna (21–40 jed.), dok je jedan ispitanik imao aktivnost od samo 13 jedinica. Izlučivanje DALK je u 14% ispitanika bilo iznad 5,1 mg/1000 ml.

Kod bolesnika s kroničnim oboljenjem jetre izlučivanje uroporfirina, koproporfirina, delta-aminolevulinske kiseline i porfobilinogena u mokraći bilo je u granicama normale. Aktivnost delta-aminolevulinske

Tablica 1.
Distribucija aktivnosti dehidrataze delta-aminolevulinske kiseline (D-DALK)
kod kroničnih alkoholičara

D-DALK jedinice/ml E	0—20	21—40	41—60	61—80	81—100	101—120	121—140	141—160
Broj ispitanika	1	9	18	5	10	5	2	1

Normala: 61—161 jedinica/ml E

Tablica 2.
Distribucija koncentracije delta-aminolevulinske kiseline (DALK)
kod kroničnih alkoholičara

DALK mg/100 ml	0,0—1,0	1,1—2,0	2,1—3,0	3,1—4,0	4,1—5,0	5,1—6,0	6,1—7,0	7,1—8,0	8,1—9,0	9,1—10,0
Broj ispitanika	4	8	16	10	6	3	2	1	0	1

Normala: do 5,5 mg/1000 ml

Tablica 3.
 Rezultati laboratorijskih analiza kod bolesnika s kroničnim oboljenjem jetre

Bolesnik - Dijagnoza	Uroporfirini		Koproporfirini		DALK $\mu\text{g}/1000\text{ml}$ 24h	PBG		D-DALK jed./ml E				
	Uro III		Uro I			$\mu\text{g}/1000\text{ml}$ 24h	$\mu\text{g}/1000\text{ml}$ 24h					
	$\mu\text{g}/1000\text{ml}$ 24h	$\mu\text{g}/1000\text{ml}$ 24h	$\mu\text{g}/1000\text{ml}$ 24h	$\mu\text{g}/1000\text{ml}$ 24h	$\mu\text{g}/1000\text{ml}$ 24h			$\mu\text{g}/1000\text{ml}$ 24h				
V. V. Cirrhosis hepatis, steatosis	4,2	7,5	0,5	0,9	3,7	6,7	tragovi	0,7	1,3	0,76	1,36	73
V. J. Cirrhosis hepatis decomp.	10,8	4,3	2,6	1,0	8,2	3,3	184	3,5	1,4	0,13	0,05	27
B. M. " " "		tragovi					tragovi	1,4	0,7	0,13	0,07	74
O. Lj. " " "		tragovi					48	1,3	1,8	0,38	0,53	86
M. M. Hepatitis chronica		tragovi					tragovi	1,6	3,2	0,63	1,26	53
R. J. Cirrhosis hepatis		tragovi					50	3,8	4,8	0,13	0,18	42
S. Z. " " "	7,4	8,5	2,6	2,9	4,8	5,6	41	1,8	2,1	0,63	0,80	90
Ba. M. Hepatitis chronica	2,2	2,9	0,4	0,5	1,7	2,2	38	4,0	5,2	0,50	0,66	85
R. E. Cirrhosis hepatis		tragovi					tragovi	1,6	2,2	0,63	0,92	40
Bo. M. Hepatitis chronica		tragovi					tragovi	2,8	3,9	0,63	0,88	62
B. S. Cirrhosis hepatis	6,4	7,7	2,2	2,6	4,4	5,1	tragovi	3,1	3,7	0,50	0,61	39
M. I. Cirrhosis hepatis decomp.		tragovi					77	4,0	1,6	0,38	1,51	40

Normale (po navedenim metodama):

 Uroporfirini ukupno do 30 $\mu\text{g}/24\text{h}$

 Koproporfirini do 300 $\mu\text{g}/24\text{h}$

 DALK do 5,5 $\text{mg}/1000\text{ml}$

 PBG do 1,7 $\text{mg}/1000\text{ml}$

D-DALK: 61-160 jed./ml E

dehidrataze kod 6 bolesnika je bila normalna, dok je od preostalih 6, kod 2 bolesnika aktivnost bila u intervalu od 41–60 jedinica, a kod 4 bolesnika u intervalu od 21–40 jedinica. Budući da su od 4 bolesnika razreda od 21–40 jedinica, trojica (R. E., B. S., M. I.) imali gornje granične vrijednosti D-DALK toga razreda, može se reći da je 5 bolesnika imalo lagano sniženu aktivnost D-DALK, a kod jednoga (V. J.) je to sniženje bilo značajno.

Snižena aktivnost D-DALK kod kroničnih alkoholičara, koja je u našim ispitivanjima zastupljena u značajnom procentu govori u prilog djelovanja etilnog alkohola na enzime koji sudjeluju u sintezi hema. Međutim, u konkretnom slučaju, teško je utvrditi do koje je mjere to rezultat alkohola, a do koje drugih faktora. Među »drugim« faktorima prvenstveno mislimo na olovo za koje je poznato da i u vrlo malim koncentracijama inhibira aktivnost D-DALK kako *in vivo* (20, 21, 22) tako i *in vitro* (23, 24). Budući da su u našoj zemlji mnoga alkoholna pića kontaminirana olovom može se pretpostaviti da su ti isti ispitanici konzumirajući alkoholna pića uzimali i olovo npr. iz posuda glaziranog olovnom gladi, za koje je dokazano da otpuštaju značajne količine olova (25). Ne valja, međutim, smetnuti s uma ni činjenicu da je alkohol sam po sebi agens, koji precipitira bjelančevinu, a budući da su svi enzimi proteini može se pretpostaviti da i u razređenoj otopini alkohol vrši neki utjecaj na enzime-proteine. Odgovor na to pitanje možda će biti moguće dati ako se uz točno određenu konzumaciju alkohola kod određenog broja ispitanika paralelno odredi aktivnost D-DALK, koncentracija alkohola i koncentracija olova u krvi. To se isto odnosi i na izlučivanje DALK, koju bi bilo uputno pratiti paralelno iz kompletne dnevne količine urina.

Bolesnici s kroničnim oštećenjem jetre nisu pokazali patološko izlučivanje porfirina, porfobilinogena i delta-aminolevulinske kiseline. Lagano sniženje aktivnosti delta-aminolevulinske dehidrataze nije nam moguće protumačiti zbog pomanjkanja informacija o nastajanju bolesti i relativno malog broja ispitanika. U koliko je do oštećenja jetre došlo zbog prekomjernog uživanja alkohola, tada slično kao i kod prve skupine ispitanika, D-DALK može biti inhibiran pod djelovanjem alkohola ili drugog egzogenog faktora. Ispitivanje aktivnosti D-DALK na većoj populaciji bolesnika s alkoholnim oštećenjem jetre uz istovremeno ispitivanje parametara karakterističnih za djelovanje olova, ubacilo bi možda više svjetla u rješavanje ovog problema.

ZAKLJUČAK

Kod kroničnih alkoholičara utvrđena je inhibicija dehidrataze delta-aminolevulinske kiseline (D-DALK) kod više od 50% ispitanika. U bolesnika s kroničnom bolesti jetre je nađeno da aktivnost D-DALK može biti također smanjena. Budući da u skupini kroničnih alkoholičara nisu isključeni i drugi poznati i potencijalni inhibitori D-DALK, ne može se sa sigurnošću zaključiti da etilni alkohol sam za sebe inhibira aktivnost

D-DALK. Isto tako, za davanje konačnog suda o inhibiciji D-DALK kod kroničnih bolesti jetre potrebno je ispitivanje nastaviti na većem broju bolesnika.

* * *

Po zaključenju redakcije ovog broja Arhiva, naišli smo na rad Moore, M. R., Beattie, A. D., Thompson, G. G., Goldberg, A.: *Clinical Science* 40 (1971) 81, kojim se govori o smanjenju aktivnosti D-DALK-a pod djelovanjem etanola. D-DALK je bila značajno snižena u krvi opijenih ispitanika; ta depresija aktivnosti bila je u negativnoj korelaciji s povećanjem alkohola u krvi. U eksperimentima sa životinjama otrovanima etanolom nadalje je značajno sniženje D-DALK-a u krvi, jetri i bubregu, ali ne u srcu i slezeni. Ti nalazi govore u prilog direktnog djelovanja etanola na D-DALK.

Međutim autori se ne osvrću i na druge potencijalne inhibitore, koji mogu djelovati simultano, pa je tim više zanimljivo nastaviti ispitivanja na tom problemu.

Literatura

1. Franke, K., Fikentscher, R.: *Münch. med. Wschr.*, 82 (1935) 171.
2. Zieve, L., Hill, E., Schwartz, S., Watson, C. J.: *J. Lab. & Clin. Med.*, 41 (1953) 663.
3. Szodoray, L., Sümegi, S.: *Dermatologica*, 90 (1944) 224.
4. Brunsting, A. L., Mason, H. L., Aldrich, R. A.: *J. A. M. A.*, 146 (1951) 1207.
5. Brunsting, A. L.: *Arch. Dermat. & Syph.*, 70 (1954) 551.
6. Berman, J., Bielicky, T.: *Dermatologica*, 113 (1956) 78.
7. Doss, M., Strohmeyer, G., Look, D., Henning, H., Nawrocki, P., Egbring, R., Schmidt, A., Korb, G., Lünders, C. J., Krien, E., Zeitler, G., Luchmann, A.: *Klin. Wschr.*, 49 (1971) 773.
8. Wüst, H., Arnold, W., Hennig, N.: *München Med. Wschr.*, 105 (1963) 912.
9. Granick, S.: *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 2247.
10. Tschudy, D. P.: *J. A. M. A.*, 191 (1965) 718.
11. Dowdle, E., Mustard, P., Spong Norma, Eales, L.: *Clin. Sci.*, 34 (1968) 233.
12. Lieber, C. S.: *Gastroenterology*, 50 (1966) 119.
13. Rubin, E., Lieber, S.C.: *Gastroenterology*, 52 (1967) 1.
14. Gajdos, A., Gajdos-Török, M., Palma-Carlos, A., Palma-Carlos, L.: *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 7 (1967) 15.
15. Bonsignore, D., Callisano, P., Cartasegna, C.: *Med. Lavoro*, 56 (1965) 199.
16. Davis, R. J., Andelman, S. L.: *Arch. Environ. Health*, 15 (1967) 53.
17. Mauzerall, O., Granick, S.: *J. Biol. Chem.*, 232 (1958) 1141.
18. Weber, K., Ruždić, I.: *Experientia*, 7 (1951) 354.
19. Askevold, R.: *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 3 (1951) 318.
20. Bruin, A.: *Med. Lavoro*, 59 (1968) 411.
21. Hernberg, A., S., Nikkanen, J.: *Lancet*, 1 (1970) 63.
22. Hernberg, S., Nikkanen, J., Mellin, G., Lilius, H.: *Arch. Environ. Health*, 21 (1970) 140.
23. Bonsignore, D., Callisano, P., Cartasegna, C.: *Med. Lavoro*, 56 (1965) 727.
24. Vergnano, G., Cartasegna, C., Bonsignore, D.: *Boll. Soc. Med. Biol., Spec.*, 43 (1967) 1099.
25. Beritić, T., Đurić, D.: *Higijena*, 8 (1956) 12.

*Summary*EFFECT OF ECOLOGICAL FACTORS
ON THE APPEARANCE OF TOXIC PORPHYRIA.
I. ALCOHOLISM AND D-DALA

The activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase (D-DALA) in chronic alcoholics (N = 51) was analysed along with the parallel determination of the concentration of delta-aminolevulinic acid (DALA) in a single urine sample. In 12 patients with the chronic liver lesions the elimination of hem precursors in the urine and the activity of D-DALA in the blood were also analysed. The results have shown that in chronic alcoholics over 50% of subjects had a reduced D-DALA activity, while the DALA elimination was slightly increased in 14% of subjects. In patients with chronic liver lesions the elimination of porphyrins and their precursors was normal while the activity of D-DALA was slightly inhibited in 6 patients. Although the results obtained in the group of chronic alcoholics speak for the effect of ethyl alcohol on the D-DALA activity, no conclusive statement is possible because some other known potential inhibitors of this enzyme cannot be ruled out. Also, in order to give a definite judgment about the inhibition of D-DALA in chronic liver diseases, it would be necessary to examine a larger number of patients with alcohol-induced liver lesions.

*Institute for Medical Research and Occupational Health,
Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb*

*Received for publication,
February 2, 1972*