

Istituto d'Igiene dell'Università di Padova
Direttore: Prof. R. Vendramini

Azione in vitro dell'ossido di carbonio e del piombo
sull'attività dell'enzima acido delta-amino-levulinico
deidratasi di eritrociti umani

G. RAUSA - L. DIANA - G. PERIN

INTRODUZIONE

È noto da tempo che in soggetti esposti al piombo è dimostrabile una aumentata escrezione urinaria di acido delta-amino-levulinico (ALA) (HAEGER 1957; GRIGGS e HARRIS 1958; TANABE 1959; HAEGER-ARONSEN 1960; RUBINO 1961; STICH 1961; SAITA e MOREO 1961; RUBINO 1962; CHIESURA e BRUGNONE 1962; BALBO e MARUCCI 1962; RASETTI e PARIGI 1962; BUSKUP e MAPPES 1962; DE KRETSEER e WALDRON 1963; PECORA e coll. 1963; URBANOWICZ e coll. 1963; SROCCZYNSKI 1964; CRAMÉR e SELANDER 1965 e 1967; BONSIGNORE 1966; DE BRUIN e HOOLBLOOM 1967; DE BRUIN 1968).

Tale metabolita è un precursore del porfobilinogeno (PBG) ed è quindi indispensabile per la formazione dell'eme. La diminuita possibilità del soggetto intossicato da piombo di sintetizzare PBG da ALA spiegherebbe l'aumentata eliminazione urinaria di quest'ultimo, che, d'altra parte, è strettamente correlata alla quantità di piombo che può essere escreta dall'organismo durante terapia antisaturina. (CRAMÉR e SELANDER 1965).

Poiché la trasformazione di ALA in PBG è un processo enzimatico catalizzato dalla acido delta-amino-levulinico deidratasi (ALA deidratasi), alcuni AA. hanno indagato sull'attività di questo enzima in eritrociti di soggetti affetti da intossicazione cronica da piombo (GOLDBERG e coll. 1956; RUBINO 1962; HEILMEYER

1963; LICHTMAN e FELDMAN 1963; MOLÈ e PESARESI 1964). I risultati sono stati però contrastanti ed hanno lasciato adito al dubbio di essere condizionati da fattori sperimentali, come hanno suggerito e dimostrato BONSIGNORE (1966) e BONSIGNORE e coll. (1965). Questi AA. hanno messo in evidenza che l'inibizione della ALA deidratasi è di tipo competitivo ed è parzialmente eliminata da citostina in quanto dotata di gruppi sulfidrilici (4) e che la diminuzione di attività enzimatica ALA deidratasi eritrocitaria nell'intossicazione saturnina sia florida che cronica è di grado elevato (circa dell'80 %) (3).

Queste interessanti osservazioni, che forniscono una plausibile spiegazione per alcuni aspetti biochimici dell'intossicazione saturnina, quali l'aumentata escrezione urinaria di ALA, PBG, uropropioformine, inducono a rivolgere l'attenzione nei problemi di tossicologia alle attività enzimatiche che finora non sono state indagate in modo esteso.

D'altra parte, la complessità delle situazioni di intossicazione vera e propria o, più semplicemente, di esposizione a determinati tossici, è tale da far ritenere che lo studio singolo di un solo tossico non sia in grado di delucidare appieno gli effetti sull'organismo.

In realtà, limitandoci al settore dell'esposizione a determinati inquinanti atmosferici, appare evidente che certi soggetti vengono a trovarsi esposti a più inquinanti. Tipico a questo riguardo il caso dell'inquinamento atmosferico causato dalla circolazione motorizzata, per il quale un notevole numero di soggetti si può trovare esposto ad una rilevante serie di inquinanti.

Se il problema può non avere raggiunto, in alcune città, un limite di allarme, sussiste certamente in situazioni particolari, ad esempio in garage. Come infatti avevamo comunicato in una nota precedente (23), l'inquinamento da prodotti di scarico degli autoveicoli, segnatamente CO e Pb, può raggiungere livelli di allarme in garage nei quali non vengano adottati validi sistemi di ventilazione.

Abbiamo pertanto voluto studiare gli effetti del CO e del Pb sull'attività dell'enzima ALA deidratasi in eritrociti umani di soggetti non presentanti segni di ossicarbonismo o saturnismo, per poter controllare se l'esposizione contemporanea al CO sia in grado o meno di alterare ulteriormente l'attività della ALA deidratasi già diminuita dal Pb.

MATERIALE E METODI

Campioni di sangue eparinizzati: sono stati ottenuti da soggetti non intossicati da CO e Pb, e sono stati sottoposti all'azione del Pb o del CO e Pb insieme.

Il CO, prodotto per azione dell'ac. solforico sull'ac. formico, veniva fatto gorgogliare attraverso una sospensione di eritrociti in soluzione di KCl (v. in seguito) per un tempo sufficiente ad ottenere diversi gradi di saturazione rilevati mediante determinazione della COHb secondo FELDSTEIN e KLENDSHOJ (13).

Il Pb, sotto forma di piombo acetato, veniva aggiunto nel seguente modo: si ponevano al fondo di beute da 50 ml quantità diverse di una soluzione di acetato di piombo a titolo noto e si lasciava evaporare a bagnomaria tiepida; si aggiungeva quindi la sospensione di eritrociti in KCl e si attendevano 30 min. per ottenere lo stato di equilibrio.

Per le prove effettuate con CO e Pb insieme si procedeva come suddetto, facendo precedere il trattamento con CO.

Come risulta da quanto suesposto, abbiamo preferito attuare l'aggiunta del CO e del Pb direttamente su sospensione di eritrociti e non su emolizzati di globuli rossi, in quanto ci sembrava di metterci, in tal modo, in condizioni più rispondenti a quelle reali.

Allestimento delle sospensioni di eritrociti: dopo separazione dal plasma mediante centrifugazione a 3000 giri/min per 10 min, gli eritrociti venivano lavati tre volte con KCl 0,15 M e, dopo ogni lavaggio, centrifugati a 3000 giri/min per 10 min; gli eritrociti erano infine risospesi in KCl 0,15 M per essere sottoposti al trattamento suddetto.

Determinazione dell'attività enzimatica ALA deidratasi: dopo lisi degli eritrociti con acqua distillata, l'attività enzimatica veniva dosata in base alla determinazione colorimetrica del PBG formato da ALA per azione dell'enzima, secondo il metodo di BONSIGNORE e coll. (2). I risultati venivano espressi in U/ml di eritrociti, tenendo conto del valore ematocrito.

RISULTATI

Per quanto riguarda l'azione del Pb, le nostre indagini hanno fornito risultati vicini a quelli ottenuti da BONSIGNORE e coll. (3). Come si vede infatti dalla Tabella 1, l'attività della ALA deidrata- si in eritrociti sottoposti all'azione del Pb, a concentrazione e per tempi diversi, dimostra una diminuzione rispetto ai controlli compresa tra il 60-75 %, mentre secondo BONSIGNORE e coll. la riduzione dell'attività dell'enzima raggiungeva circa l'80 %. Questa diversità può essere spiegata con la diversa tecnica sperimentale, saggiando gli AA. suddetti l'azione del Pb direttamente su emolisati di eritrociti e consentendo in tal modo al Pb di agire su enzima « nudo ».

TABELLA 1. — Diminuzione dell'attività della ALA deidrata- si di eritrociti umani ad opera del piombo. (I valori riportati sono percentuali di riduzione dell'attività enzimatica).

Tempo	Pb $\mu\text{g \% ml}$				
	50	100	200	400	
Media	50	56	60	67	
E.S.	$\pm 1,1$	$\pm 1,3$	$\pm 2,0$	$\pm 2,1$	
Media	52	56	61	72	
E.S.	$\pm 1,3$	$\pm 1,6$	$\pm 1,5$	$\pm 1,7$	
Media	52	57	61	75	
E.S.	$\pm 1,6$	$\pm 1,5$	$\pm 2,3$	$\pm 1,9$	
Media	53	57	63	75	
E.S.	$\pm 1,7$	$\pm 1,9$	$\pm 1,7$	$\pm 1,6$	

TABELLA 2. — Diminuzione dell'attività della ALA deidrata- si di eritrociti umani ad opera di CO e Pb (tempo di contatto 120'). (I valori riportati sono percentuali di riduzione dell'attività enzimatica).

	Pb $\mu\text{g \% ml}$					
	50	100	200	400		
Media	52	55	65	75		COHb 10%
E.S.	$\pm 2,1$	$\pm 1,3$	$\pm 2,2$	$\pm 1,9$		
Media	54	57	67	79		COHb 20%
E.S.	$\pm 2,3$	$\pm 2,1$	$\pm 1,6$	$\pm 1,5$		
Media	56	63	72	88		COHb 40%
E.S.	$\pm 1,7$	$\pm 1,3$	$\pm 2,3$	$\pm 3,5$		
Media	58	65	77	90		COHb 80%
E.S.	$\pm 1,5$	$\pm 2,2$	$\pm 2,6$	$\pm 2,3$		

Si osserva che mentre per concentrazioni di Pb comprese tra 50 e 200 $\mu\text{g/ml}$, non vi è un netto aumento dell'inibizione dell'attività ALA deidrata- si in funzione del tempo, con concentrazioni invece di 400 $\mu\text{g/ml}$ si rende evidente un aumento dell'inibizione enzimatica all'aumentare del tempo di contatto. (v. diagramma n. 1).

Le prove relative all'azione combinata di CO e Pb sono riportate nella Tabella n. 2, dalla quale si osserva come la sperimenta-

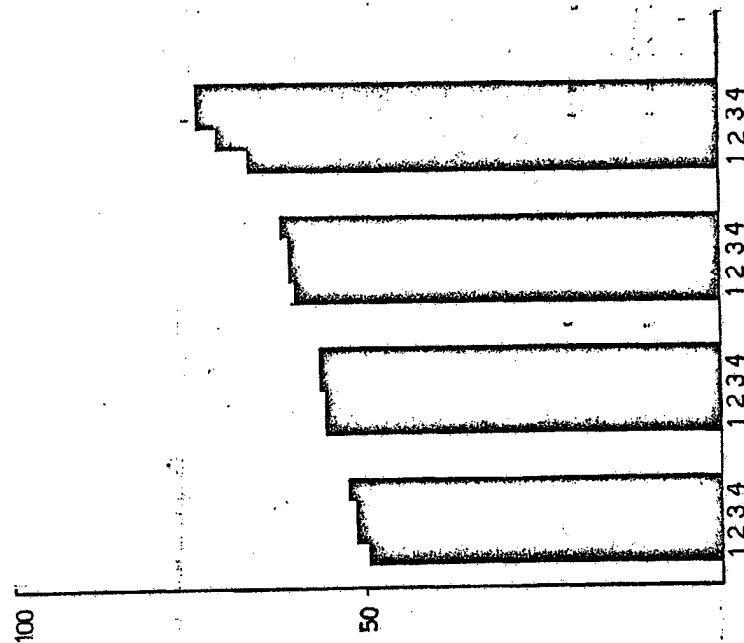


DIAGRAMMA 1. — I numeri 1, 2, 3 e 4 si riferiscono ai tempi di trattamento di 30, 60, 90, 120 min. rispettivamente; la prima serie di colonne corrisponde alle prove effettuate con 50 $\mu\text{g \% ml}$ di Pb; la seconda, la terza e la quarta alle prove con 100, 200 e 400 $\mu\text{g \% ml}$, rispettivamente. Sull'ordinata le percentuali di inibizione enzimatica.

tazione, attesi i risultati delle precedenti prove, sia stata effettuata con concentrazioni variabili di CO (COHb pari a: 10, 20, 40, 80 % rispettivamente) e di Pb (50, 100, 200, 400 µg/ml, rispettivamente), dopo un periodo di contatto di 120 min.

I risultati indicano chiaramente che mentre con percentuali di COHb dell'ordine del 10 % l'inibizione dell'ALA deidratasi è praticamente simile a quella ottenuta senza CO, con percentuali invece di COHb del 20 % l'enzima viene inibito in maniera più marcata e statisticamente significativa a partire dalle concentrazioni di Pb di 200 e 400 µg % ml, essendo il valore del t superiore al valore richiesto per $P = 0,05$. Per concentrazioni di COHb del 60 e dell'80 %. l'inibizione diventa molto marcata e raggiunge, con concentrazioni di Pb di 400 µg %/ml, il valore del 90 %.

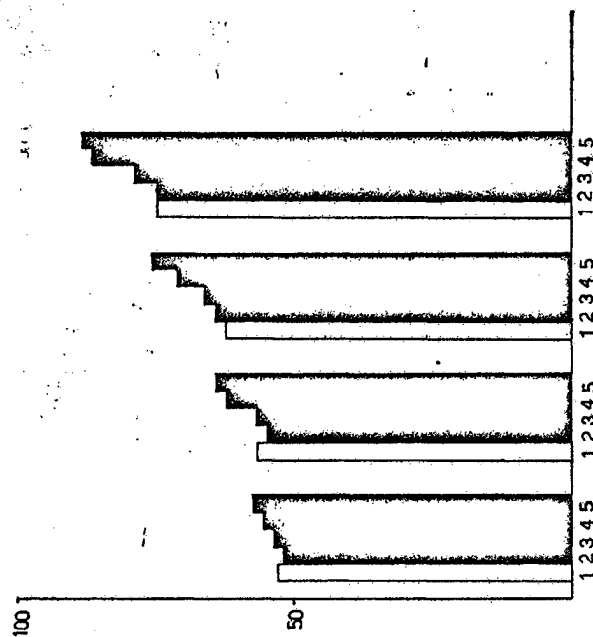


DIAGRAMMA 2. — Le quattro serie di colonne corrispondono alle prove effettuate con 50, 100, 200 e 400 µg % ml di Pb, rispettivamente; il numero 1 di ogni serie (colonna bianca) rappresenta i campioni trattati con solo Pb; i numeri 2, 3, 4 e 5 rappresentano campioni trattati con Pb, alle concentrazioni suddette, e con CO per concentrazioni finali di COHb pari a 10, 20, 40 ed 80 % rispettivamente. Sull'ordinata le percentuali di inibizione enzimatica.

TABELLA 3. — Risultati dell'applicazione del t di Student alla differenza delle medie di perdita nelle prove eseguite con solo Pb (colonna dx.) e con CO e Pb insieme (colonna sin.).

COHb 10%		t		Pb µg % ml	
Pb µg % ml					
50		N.S.		50	
100		N.S.		100	
200		N.S.		200	
400		N.S.		400	
COHb 20%					
Pb µg % ml					
50		N.S.		50	
100		N.S.		100	
200		M.S. (2,35)		200	
400		M.S. (2,44)		400	
COHb 40%					
Pb µg % ml					
50		M.S. (2,49)		50	
100		M.S. (2,87)		100	
200		M.S. (2,57)		200	
400		M.S. (2,79)		400	
COHb 80%					
Pb µg % ml					
50		M.S. (2,78)		50	
100		M.S. (2,98)		100	
200		M.S. (3,11)		200	
400		M.S. (3,01)		400	

N.S. = non significativa. - M.S. = molto significativa ($P = 0,05$).

CONCLUSIONI

I risultati delle nostre prove in vitro sembrano suggerire le seguenti conclusioni:

— l'inibizione dell'enzima ALA deidratasi di eritrociti di soggetti non affetti da intossicazione da CO e Pb, ottenuta per esposizione in vitro a questi tossici è sempre ben evidente e raggiunge valori molto elevati soprattutto quando all'azione del Pb si associa quella del CO;

— l'aumentata inibizione, a parità di concentrazione di Pb, presente nelle prove effettuate con CO e Pb rispetto a quella rilevata nelle prove eseguite con il solo Pb, benché evidente a partire

da concentrazioni non indifferenti da COHb (20%), può rivestire un certo interesse in quelle situazioni, che sono poi la maggioranza, nelle quali si abbia una contemporanea esposizione dell'organismo a più inquinanti. Se, infatti, è vero che concentrazioni ematiche di Pb di 100 µg % ml e di CO pari al 20 % di COHb, non sono facilmente rilevabili al di fuori di situazioni tossicologiche strettamente professionali e pertanto limitate, pure è opportuno considerare che nelle prove in vitro, per evidenti motivi, il tempo di contatto è sempre limitato, mentre in condizioni reali CO e Pb possono aver modo di agire nell'organismo, sia pure a concentrazioni minime, per tempi molto più lunghi e con meccanismi non sempre sovrapponibili a quelli semplificati delle prove in vitro;

— è quindi opportuno estendere la sperimentazione su animali di laboratorio.

RIASSUNTO

L'A. riferisce sui risultati di prove in vitro effettuate sottoponendo eritrociti umani sospesi in soluzione fisiologica all'azione combinata di ossido di carbonio e piombo e dosando quindi l'attività dell'enzima delta-amino-leulinico deidratasi (ALA deidratasi). È stata rilevata una notevole inibizione dell'enzima, il che, secondo gli AA., può rivestire un certo interesse se confermato anche in vivo.

SUMMARY

Human red blood cells, suspended in physiological solution, are been subjected to treatment with carbon monoxide and lead. The ALAD activity of red blood cells has been tested.

The results pointed out a noticeable decrease of ALAD activity, that can result interesting if confirmed by tests in vivo.

ZUSAMMENFASSUNG

Rote Blutzellen, in physiologischer Lösung aufgeschwemmt, wurden mit Kohlenoxyd und Blei behandelt. Die ALAD Tätigkeit der roten Blutzellen wurde getestet.

Die Ergebnisse der Versuche zeigten eine bemerkenswerte Hemmung der ALAD Tätigkeit, was von besonderem Interesse sein könnte, sollte dies von Tests « in vivo » bestätigt werden.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BALBO W., MARUCCI V. — *Zacchia*, 37, 43, 1962.
- (2) BONSIGNORE D., CALISSANO P., CARTASEGNA C. — *Med. Lav.*, 56, 199, 1965.
- (3) BONSIGNORE D., CALISSANO P., CARTASEGNA C. — *Med. Lav.*, 56, 727, 1965.
- (4) BONSIGNORE D. — *Med. Lav.*, 57, 647, 1966.
- (5) BONSIGNORE D., CARTASEGNA C., VERGNANO C., ARDINO V. — *Med. Lav.*, 59, 419, 1968.
- (6) BUSKUP H., MAPPER R. — *Zbl. Arbeitsmed. Arbeitsschutz*, 12, 293, 1962.
- (7) CHIESURA P., BRUGNONE F. — *Lav. Umato*, 14, 11, 1962.
- (8) CRAMÉR K., SELANDER S. — *Brit. J. Ind. Med.*, 22, 311, 1965.
- (9) CRAMÉR K., SELANDER S. — *Brit. J. Ind. Med.*, 24, 283, 1967.
- (10) DE BRUIN A., HOOLELOOM H. — *Brit. J. Ind. Med.*, 24, 203, 1967.
- (11) DE BRUIN A. — *Med. Lav.*, 59, 411, 1968.
- (12) DE KRETZER A. J., WALDRON H. A. — *Brit. J. Ind. Med.*, 29, 35, 1963.
- (13) FELDSTEIN M., KLENSHOJ N. C. — *J. Forensic Sci.*, 2, 39, 1957.
- (14) GOLDBERG A., ASHENERUCKER H., CARTWIGH F. E., WINTROBE M. M. — *Blood*, 11, 281, 1956.
- (15) GRIGGS R. C., HARRIS J. W. — *Clin. Res.*, 6, 188, 1958.
- (16) HAEGER B. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 9, 211, 1957.
- (17) HAEGER ARONSEN B. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 12, 1960.
- (18) HELMEYER L. — *Med. Wochenschrift*, 105, 277, 1963.
- (19) LICHTMAN H. C., FELDMAN F. J. — *Clin. Inv.*, 42, 830, 1963.
- (20) MOLÉ R., PESARESI G. — *Folia Med.*, 47, 73, 1964.
- (21) PECORA L., FAI S., MOLÉ R., BALLETTA A., DANIELE E. — *Folia Med.*, 46, 2, 1963.
- (22) RASETTI L., PARIGI A. — *Folia Med.*, 45, 480, 1962.
- (23) RAUSA G., PERIN G., DIANA L. — *Riv. Ital. d'Ig.*, 27, 402, 1967.
- (24) RUBINO G. F. — *Simpósio sul metabolismo normale e patologico delle Porfirine*, Torino, 1961.
- (25) RUBINO G. F. — *Paumieria Med.*, 4, 340, 1962.
- (26) SAITA G., MOREO L. — *Med. Lav.*, 11, 668, 1961.
- (27) SROCCZYNSKI J. — *Polski Iłgodnik Jekarski*, 19, 541, 1964.
- (28) STICH W. — *Klin. Wochenschrift*, 39, 338, 1961.
- (29) TANABE Y. — *Jap. J. Nation's Health*, 28, 386, 1959.
- (30) URBANOWICZ H., SROCCZYNSKI J., PEIKARSKI B. — *Medycyna Pracy*, 14, 205, 1963.