

*Beata Szymańska, Zofia Marchewka, Anna Długosz*

## OCENA WYBRANYCH MARKERÓW NEFROTOKSYCZNOŚCI U PRACOWNIKÓW LABORATORIUM NARAŻONYCH ZAWODOWO NA CZYNNIKI CHEMICZNE

Katedra i Zakład Toksykologii Akademii Medycznej im. *Piastów Śląskich* we Wrocławiu  
Pracownia Markerów Nefrotoksyczności Środowiskowej  
Kierownik: prof. dr hab. *A. Długosz*

*Długotrwałe narażenie na czynniki chemiczne jest częstą przyczyną uszkodzenia nerek. Poszukując markerów nefrotoksyczności u osób narażonych zawodowo, przebadano pracowników laboratoriów chemicznych zatrudnionych na Wydziale Farmacji AM we Wrocławiu. Wstępną ocenę nefrotoksyczności wykonano badając aktywność enzymów lizosomalnych (NAG, NAG-B,  $\beta$ -Gr, GAL) oraz rąbka szczoteczkowego (GGT, AAP) w moczu. Przeprowadzone badania wykazały podwyższoną aktywność AAP oraz wpływ stażu pracy na aktywność NAG i GAL. Stwierdzono wyższą nefrotoksyczność tygodniowego narażenia u pracownic z przewlekłymi chorobami.*

Hasła kluczowe: rozpuszczalniki organiczne, laboratoria doświadczalne, markery nefrotoksyczności, mocz.

Key words: organic solvents, experimental laboratories, markers of nephrotoxicity, urine.

Badanie skutków narażenia zawodowego na czynniki chemiczne jest zagadnieniem niezmiernie ważnym. Nerki są szczególnie podatne na działanie czynników toksycznych, dlatego istotna jest ocena nefrotoksyczności ksenobiotyków. Do związków nefrotoksycznych należą m.in. metale ciężkie, środki ochrony roślin, rozpuszczalniki (1). Rozwijająca się synteza nowych związków chemicznych i tworzy sztucznych skutkuje szerokim wykorzystywaniem rozpuszczalników organicznych jako substratów w przemyśle chemicznym. Znajdują one również zastosowanie jako środki odtłuszczające i czyszczące chemicznie, w urządzeniach zamrażających oraz chroniącym przed zimnem, jako rozpuszczalniki farb w przemyśle farbiarskim czy drukarskim (2, 3). Rozpuszczalniki organiczne są grupą bardzo zróżnicowaną chemicznie. Należą tu alkohole alifatyczne, chlorowane pochodne węglowodorów alifatycznych, ketony, glikole oraz estry kwasu octowego i ftalowego (4, 5). Z toksykologicznego punktu widzenia w normalnych warunkach odznaczają się działaniem drażniącym na skórę, w wyższych dawkach mają działanie narkotyczne, wywołując szereg niekorzystnych zjawisk od depresji ośrodkowego układu nerwowego do znieczulenia ogólnego włącznie (6, 7). Niezależnie od działania ogólnego rozpuszczalniki wykazują swoistą toksyczność narządową. Niektóre z nich mogą mieć

toksyczny wpływ na nerki i wywoływać uszkodzenia o charakterze subklinicznej nefropatii czy klinicznie jawnych zaburzeń funkcji nerek (8, 9). W przypadku narażenia zawodowego najbardziej niebezpieczne jest długotrwałe działanie szkodliwe potęgowane codziennym wchłanianiem i kumulacją. Przewlekła ekspozycja na rozpuszczalniki może prowadzić do uszkodzenia nerek szczególnie w części cewkowej nefronu, jednak nadal pozostaje sporną kwestią wpływ rozpuszczalników na funkcję kłębuszków nerkowych (9, 10).

Zawodowa ekspozycja na rozpuszczalniki może pełnić istotną rolę w rozwoju niektórych nienowotworowych chorób nerek. Zmiany chorobowe nerek dotyczą fragmentów nefronu takich, jak: kłębki nerkowe, kanaliki bliższe i dalsze, śródblenek oraz naczynia krwionośne. Często dochodzi do uszkodzeń w różnych odcinkach nefronu dlatego zasadne jest zastosowanie markerów specyficznych dla tych miejsc. Ze względu na istniejącą potrzebę wykrywania wczesnych zaburzeń funkcjonalnych i metabolicznych w nerkach pojawiających się przed wystąpieniem klinicznych objawów choroby wywołanych ekspozycją zawodową, stale poszukuje się odpowiednich wskaźników uszkodzenia tych narządów. Markery te powinny być precyzyjne, selektywne, oraz identyfikować miejsce uszkodzenia (11, 12).

Celem badań była wstępna ocena wpływu mieszanin chemicznych w tym rozpuszczalników organicznych na nerki pracowników narażonych zawodowo przez pomiar aktywności *N*-acetylo- $\beta$ -glukozaminidazy (NAG) jej izoenzymu (NAG-B),  $\beta$ -Glukuronidazy ( $\beta$ -Gr),  $\beta$ -galaktozydazy (GAL), *L*-alaninoaminopeptydazy (AAP), Gamma-glutamlotransferazy (GGT) w moczu. Markery te są charakterystyczne dla oceny funkcji kanalików bliższych i śródbleńka.

## MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 20 próbkach moczu, pobranych od kobiet będących pracownicami laboratoriów chemicznych Wydziału Farmacji AM we Wrocławiu. Mocz pobrano dwukrotnie: rano na początku tygodnia pracy (I A) i rano po tygodniu pracy (I B). Osoby badane były w wieku od 30 do 60 lat, (średnia wieku 45 lat). Grupę porównawczą (K) stanowiły kobiety z Wrocławia (10 osób), nie mające kontaktu z substancjami chemicznymi będące w wieku od 28 do 61 lat, (średnia wieku 44,5 lat).

Mocz pobierano na czczo do pojemników polietylenowych bez dodatków konserwujących. Następnie wirowano przez 10 min. przy 3000 obr./min. w celu usunięcia elementów morfotycznych. Do czasu oznaczeń materiał przechowywano w temp. – 80°C. Badania przeprowadzono dwukrotnie, w materiale pobranym na początku tygodnia pracy i powtórnie po 5 dniach przepracowanych zawodowo.

Wszystkie badane mocze zostały wstępnie poddane ocenie fizykochemicznej i morfotycznej. Pozwoliło to ocenić stan aktualny pracy nerek w zakresie podstawowym.

W moczu oznaczono poziom kreatyniny, aktywność enzymów lizosomalnych *N*-acetylo- $\beta$ -glukozaminidazy (NAG) jej izoenzymu (NAG-B),  $\beta$ -glukuronidazy ( $\beta$ -Gr),  $\beta$ -galaktozydazy (GAL) oraz enzymów rąbka szczoteczkiowego *L*-alaninoaminopeptydazy (AAP), gamma-glutamlotransferazy (GGT).

Aktywność poszczególnych enzymów oznaczono metodami kolometrycznymi przy użyciu odpowiednich substratów (13). Kreatyninę oznaczono metodą *Jaffe'go* (reakcja kwasu pikrynowego z kreatyniną w środowisku kwaśnym). Otrzymane aktywności poszczególnych enzymów przeliczono na kreatyninę oznaczoną w moczu.

Analizę statystyczną przeprowadzono testem t za pomocą programu *Statistica 9.0.* na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Przeprowadzone badanie fizykochemiczne i mikroskopowe osadu moczu pozwoliły na wyeliminowanie z badań kobiet, u których stwierdzono leukocyturię, bakteriurię (świadczące o aktualnym stanie zapalnym). U pozostałych badanych, wszystkie próbki moczu były klarowne bez śladów białka, cukru, bilirubiny, z prawidłowym poziomem urobilinogenu. W badaniach osadu oprócz nielicznych nabłonków płaskich, pojedynczych leukocytów czy pasm śluzu nie stwierdzono patologicznych elementów. Średni ciężar właściwy moczu był w granicach (1,010–1,025), barwa od słomkowej do intensywnie żółtej, odczyn kwaśny w granicach 5,5–6,8.

W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę wyjaśnienia, czy w narażeniu zawodowym ma miejsce wzrost aktywności czułych enzymów uszkodzenia nerek i w jakim stopniu o wzroście tej aktywności decyduje selektywna przepuszczalność błony podstawowej kłębka. W grupie badanych kobiet aktywność enzymów lizosomalnych (NAG, NAG-B,  $\beta$ -Gr, GAL) zarówno na początku tygodnia pracy (Grupa IA), jak i pod koniec tygodnia pracy (Grupa IB) nie różniła się istotnie statystycznie od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej (tab. I).

Tabela I. Markery nefrotoksyczności u pracowników narażonych zawodowo

Table I. Markers of nephrotoxicity in occupationally exposed workers

(mU/mg kreat)	n	NAG $\bar{x} \pm SD$	NAG-B $\bar{x} \pm SD$	$\beta$ -Gr $\bar{x} \pm SD$	GAL $\bar{x} \pm SD$	GGT $\bar{x} \pm SD$	AAP $\bar{x} \pm SD$
Grupa							
IA	10	1,33±0,45	0,61±0,36	0,77±0,48	0,32±0,31	24,28±16,55	3,48±1,46*
IB	10	1,22±0,55	0,65±0,34	0,54±0,30	0,29±0,25	20,42±5,84	3,44±1,52*
K	10	1,09±0,40	0,56±0,32	0,59±0,32	0,22±0,15	21,20±7,55	1,78±0,16*

\* Wartości istotnie wyższe od grupy kontrolnej.

Wśród enzymów rąbka szczoteczkowego (AAP, GGT) jedynie aktywność L-alaninyloaminopeptydazy była istotnie wyższa ( $p \leq 0,013$ ) od grupy kontrolnej. Uzyskane średnie wartości AAP w grupie IA to 3,48 mU/mg kreatyniny, w grupie IB – 3,44 mU/mg kreatyniny natomiast w grupie kontrolnej 1,78 mU/mg kreatyniny (tab. I).

Aktywność GGT w badanej grupie nie różniła się statystycznie istotnie od średnich wartości grupy porównawczej. Uzyskane niskie wyniki 24,28 mU/mg kreatyniny (grupa – IA) oraz 20,41 mU/mg kreatyniny (grupa – IB) wskazują, że aktywności GGT w moczu badanej grupie nie świadczy o stopniu uszkodzenia błony podstawowej

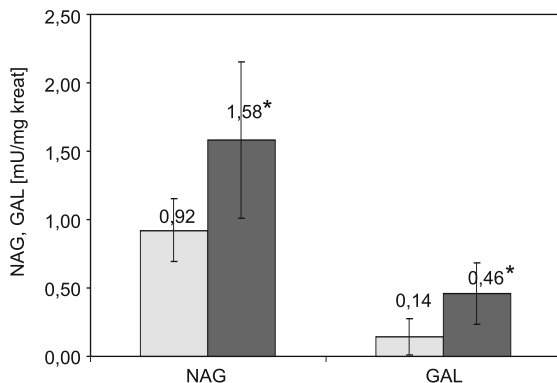
wej kłębka. W analizowanej grupie jedynie aktywność AAP enzymu zlokalizowanego również w rąbku szczoteczkowym kanalików proksymalnych, była istotnie wyższa od grupy porównawczej. Enzym ten wraz z białkami strukturalnymi stanowi integralną część mikrokosmków, tworząc specyficzne struktury przestrzenne. Stwierdzono, że 95% AAP obecnej w komórkach cewki nerkowej bierze udział w tworzeniu błony zewnętrznej mikrokosmków, natomiast GGT, również enzym błonowy, tylko 1/3 swej ilości obecny jest w części luminalnej błony komórkowej, a w 2/3 związany jest z błoną podstawową. Ta powierzchniowa lokalizacja AAP w nerkach, może powodować, że w wyniku przepływu filtratu przez światło kanalików enzym ten jest uwalniany poprzez oderwanie się od błony nie uszkadzając integralności komórek kanalików (12, 14, 15). Z powodu jego zewnętrznej lokalizacji nawet małe uszkodzenia mogą powodować zwiększone jego wydalanie z moczem. Stwierdzona podwyższona aktywność tego enzymu może wynikać z wpływu chemicznych rozpuszczalników na nerki.

W badanej grupie sprawdzono jaki wpływ na badane wskaźniki ma staż pracy. Badanych podzielono na dwie grupy. Grupa A to osoby, które przepracowały od 5 do 22 lat (średnia 13,5 lat), grupa B od 35 do 41 lat (średnia 38 lat). Ponieważ badania wykonano dwukrotnie utworzono podgrupę A1 i B1 (badania wykonane na początku tygodnia pracy) i A2 i B2 (badania po tygodniowym narażeniu zawodowym).

Nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupami A1 i A2, B1 i B2 oraz A1 i B1. W przypadku grupy A2 i B2 średnie wartości aktywności NAG i GAL były istotnie statystycznie wyższe ( $p \leq 0,041$ ,  $p \leq 0,028$ ) w grupie kobiet z dłuższym stażem pracy po przepracowanym zawodowo tygodniu (B2) w stosunku do grupy kobiet z krótszym stażem również po tygodniu pracy (A2) (ryc.1).

NAG oraz GAL należą do enzymów lizosomalnych, będących czułymi wskaźnikami oceny stopnia uszkodzenia komórek nabłonkowych kanalików nerkowych w przebiegu narażenia zawodowego (14). Rozpuszczalniki stosowane w laboratorium mogą wpływać na zaburzenia przepuszczalności błony lizosomalnej i w konsekwencji prowadzić do uwalniania NAG-u i GAL-u, a następnie zwiększonego wydalania ich z moczem.

Uwzględniając obecność lub brak chorób współistniejących badane osoby podzielono na dwie grupy: grupę C (z chorobami np. nadciśnienie, kamica nerkowa, niedoczynność tarczycy) i grupę D (osoby zdrowe). Ze względu na przeprowadze-

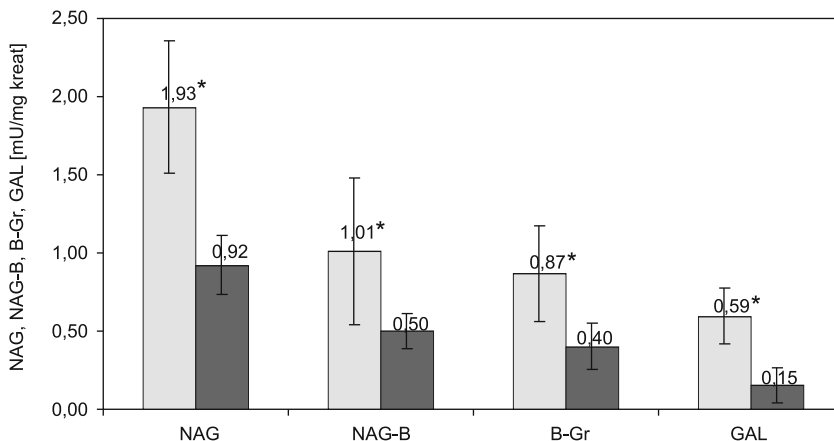


\* wartości grupy B2 istotnie statystycznie wyższe od grupy A2  
\* statistically significant values B2 group vs. A2 group

Ryc.1. Aktywność NAG i GAL w grupach A2, B2 w moczu.

Fig. 1. Activity of NAG and GAL in urine of groups A2, B2.

nie badań dwukrotnie, wyodrębniono podgrupę C1 i D1 (badania wykonane na początku tygodnia pracy), C2 i D2 (po tygodniu pracy). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami C1 i C2, D1 i D2, C1 i D1. Natomiast istotne różnice wystąpiły między grupami C2 i D2. Stwierdzono wyższe istotnie statystycznie wartości aktywności enzymów NAG ( $p \leq 0,0005$ ), NAG-B ( $p \leq 0,002$ ),  $\beta$ -Gr ( $p \leq 0,009$ ), GAL ( $p \leq 0,0014$ ) w grupie C2, czyli pracownicy posiadających współistniejące choroby po tygodniu pracy w porównaniu z grupą D2, czyli zdrowych kobiet po tygodniowej pracy (ryc. 2).



\*wartości grupy C2 istotnie statystycznie wyższe od grupy D2.  
 \* statistically significant values C2 group vs. D2 group

Ryc. 2. Aktywność enzymów NAG, NAG-B,  $\beta$ -Gr, GAL w grupie C2 i D2.

Fig. 2. Activity of NAG, NAG-B,  $\beta$ -Gr and GAL in group C2 and D2.

Źródłem zwiększonej aktywności enzymów lizosomalnych (NAG, NAG-B,  $\beta$ -Gr, GAL) w moczu badanych pracowników mogą być nie tylko uszkodzone lizosomy kanalików proksymalnych nerek, ale także komórki fagocytarne zawierające w swoich ziarnistościach azurochłonnych NAG, NAG-B,  $\beta$ -Gr i GAL. Komórki te mogą być zaangażowane w proces zapalny powodowany zarówno współistniejącymi chorobami jak i stałą ekspozycją mikro dawek toksyn (14).

W przeprowadzonych badaniach wykrycie pewnych odchyień u pracowników, kiedy stężenie poszczególnych rozpuszczalników mieści się w granicach NDS, ma duże znaczenie praktyczne i jest dowodem narażenia zawodowego. Uzyskane wyniki aktywności enzymów w badanej grupie wskazują na celowość ich oznaczeń w moczu w ocenie przewlekłego narażenia zawodowego na rozpuszczalniki.

## WNIOSKI

1. W badanej grupie pracownicy laboratorium stwierdzono podwyższoną aktywność AAP i wpływ stażu pracy na aktywność NAG i GAL.

2. U pracownic z przewlekłymi chorobami stwierdzono wyższą nefrotoksyczność tygodniowego narażenia, co znalazło wyraz w zwiększonej aktywności NAG, NAG-B,  $\beta$ -Gr i GAL.

B. Szymańska, Z. Marchewka, A. Długosz

EVALUATION OF NEPHROTOXICITY MARKERS IN RESEARCH LABORATORY WORKERS  
OCCUPATIONALLY EXPOSED TO CHEMICALS

Summary

Chronic exposure to chemicals is the leading cause of renal dysfunction. Industrial development and automation of the manufacturing processes have significantly reduced occupational exposures to harmful chemicals, however, they have not affected the working conditions of workers exposed to xenobiotics (organic solvents in particular) in research laboratories. In search for possible nephrotoxicity markers, we examined a group of research workers of the Pharmacy Department of Medical University of Wrocław exposed to harmful chemicals. In this study we evaluated activities of lysosomal enzymes (NAG, NAG-B,  $\beta$ -Gr and GAL) and renal brush border domain enzymes (GGT, AAP) found in the urine of subjects included in this study. The results showed increased activity of AAP and an impact of the working period on the activity of NAG and GAL. Higher nephrotoxicity was found in workers with chronic disease after weekly exposure.

PIŚMIENICTWO

1. Merian E., Anke M., Ihnat M., Stoeppler M.: Elements and compounds in the enviromental. Willey-VCH, Germany, 2004; 468-512. – 2. Vleet van T., Schnellmann R. G.: Toxic nephropathy: enviromental chemical. Semin. Nephrol., 2003; (23)5: 500-508. – 3. Antonowicz-Juchniewicz J., Jodkowska A., Kwiecińska D.: Nefropatie wtórne w praktyce lekarza medycyny pracy. I. Nefropatie wtórne w przebiegu narażenia zawodowego. Medycyna Pracy, 2006; 57(64): 389-400. – 4. Lash L., Parker J.C.: Hepatic and renal toxicities associated with perchloroethylene. Pharmacol. Rev., 2001; 53: 177-208. – 5. Hong S.K., Anestis D.K., Ball J.G., Valentovic M.A., Rankin G.O.: In vitro nephrotoxicity induced by chloronitrobenzenes in renal cortical slices from Fischer 344 rats. Toxicol. Lett., 2002; 129: 133-141. – 6. Patrick C. et al.: Organic solvent, silicon-coutaining compouds and pesticides. Clinical Nephrotoxins, 2008; 3: 827-841. – 7. McQueen Ch. A.: Comprehensive toxicology. Renal toxicology. Elsevier, 2010; 7: 459-473. – 8. Marchewka Z., Snoch I.: Nefrotoksyczność rozpuszczalników stosowanych w przemyśle. Bromat. Chem. Toksykol., 2009; 42(2): 213-223. – 9. Voss J., Roller M., Mangelsdorf I.: Nephrotoxicity of organic solvents. Evaluation of the literature. Federal Institute for Occupational Safety and Health, Dortmund/Berlin/Dresden, 2003; 455-525. – 10. Jacob S., Hery M., Protois J.C., Rossert J., Stengel B.: Effect of organic solvent exposure on chronic kidney disease progression: the GN-PROGRESS Cohort study. J. Am. Soc. Nephrol., 2007; 18: 274-281.

11. Voss J., Roller M., Brinkmann E.C.: Nephrotoxicity of organic solvents: biomarkers for early detection. Inter. Arch. of Occup. and Envir. Health, 2005; 78(6): 475-485. – 12. Marchewka Z.: Wartość diagnostyczna transferaz glutationowych i innych parametrów biochemicznych w moczu jako wczesnych wskaźników uszkodzenia nerek. Diagn. Lab., 2004; 40: 567-572. – 13. Jung K., Mattenheimer H., Burchardt U.: Urinary enzymes in Clinical and Experimental Medicine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1992. – 14. Marchewka Z., Stokłosa A., Długosz A.: Lysosomal enzymes in urine for the assessment of renal function in Wolkers expose to gasoline. Acta Toxicologica, 2005; 13(2): 77-83. – 15. Finn W.F. and Porter G.A.: Urinary biomarkers and Nephrotoxicity. Clinical Nephrotoxins, 2008; 1: 92-130.

Adres: 50-417 Wrocław, ul. Traugutta 57/59.