

*Anna Długosz, Ewa Sawicka, Beata Szymańska,
Zofia Marchewka, Dorota Kowalczyk*

WPLYW PRZEWLEKŁEGO NARAŻENIA NA SIARKOWODÓR NA WYDALANIE SIARCZANÓW I *N*-ACETYLO- β -*D*-GLUKOZAMINIDAZY Z MOCZEM

Katedra i Zakład Toksykologii Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik Katedry: prof. dr hab. *A. Długosz*

*W pracy oceniono zawartość siarczanów w moczu u mieszkańców Sobięcina (dzielnica Wałbrzycha), narażonych środowiskowo na siarkowodór. Badaniami objęto grupę 40 osób. Wstępną ocenę nefrotoksyczności wykonano badając aktywność *N*-acetylo- β -*D*-glukozaaminidazy (NAG) i jej izoenzymu NAG-B. W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano tendencję wskazującą na większą wrażliwość na siarkowodór i wolniejszy proces detoksykacyjny u kobiet.*

Hasła kluczowe: siarkowodór, *N*-acetylo- β -*D*-glukozaaminidaza, narażenie środowiskowe, siarczany w moczu.

Key words: hydrogen sulphide, *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminidase, environmental exposure, sulphate in urine.

Skutki biologiczne przewlekłego narażenia na niskie dawki ksenobiotyku są trudne do oceny. Siarkowodór należy do toksyn, które wyczuwalne są powonieniem w stężeniach niższych od dopuszczalnych (0,0007 mg/m³, NDS średnie roczne w powietrzu atmosferycznym 5 μ g/m³). W jednej z dzielnic Wałbrzycha (Sobięcín) zapach siarkowodoru w powietrzu wyczuwalny był od ponad pół roku. Badania nie wykazały przekroczenia dopuszczalnych stężeń, jednak zapach siarkowodoru był wyraźnie wyczuwalny, a mieszkańcy uskarżali się na liczne dolegliwości.

Siarkowodór zaliczany jest do tzw. gazotransmiterów, podobnie jak tlenek azotu czy tlenek węgla. Jednak w wyższych stężeniach działa toksycznie w sposób zbliżony do cyjanowodoru, blokuje bowiem oksydazę cytochromową. W organizmie utleniany jest głównie do siarczanów, które są wydalane z moczem (1).

Celem naszych badań była ocena narażenia mieszkańców Sobięcína na siarkowodór przez pomiar wydalania siarczanów z moczem oraz wstępna ocena nefrotoksyczności narażenia przez badanie aktywności czułych markerów do których należy *N*-acetylo- β -*D*-glukozaaminidaza (NAG) i jej izoenzym NAG-B.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto grupę 40 osób (grupa A) z wałbrzyskiej dzielnicy Sobięcín: 25 osób płci żeńskiej oraz 15 – płci męskiej, w wieku od 2 do 74 lat, średnia wieku

– 32 lata. Grupę kontrolną (K) stanowiło 35 osób z terenu Wrocławia: 22 – płci żeńskiej oraz 13 – płci męskiej, w wieku od 2 do 56 lat, średnia wieku – 29 lat. Badani zgłaszali dolegliwości takie, jak: ogólne złe samopoczucie, bóle głowy, nudności, wymioty, zmęczenie, podrażnienie oczu i dróg oddechowych.

Materiałem do badań był mocz poranny (I), ale w celu oceny narażenia w ciągu dnia pobierano także mocz wieczorny (II). W moczu oznaczano zawartość siarczanów (2), poziom kreatyniny (3) i aktywność *N*-acetylo- β -*D*-glukozaaminidazy (4).

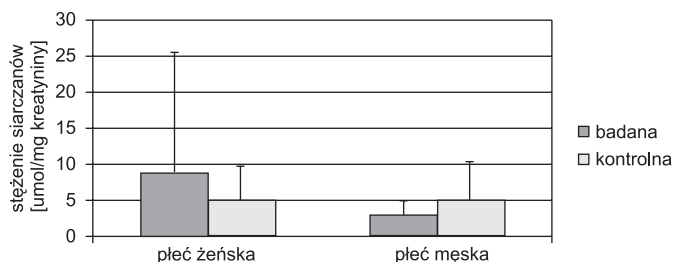
Pośród mieszkańców wyodrębniono grupę 14 osób poniżej 18 roku życia (od 2–18 lat) – grupa B, oraz grupę powyżej 18 roku życia (od 19–65 lat) 21 osób (grupa C). Dla każdej z podgrup B, C, itd. zastosowano odpowiednią kontrolę, np. dla B – Kb dla C – Kc, itd. Wartości uzyskane po badaniu moczu porannego oznaczono cyfrą I, np. I Kb oznacza mocz poranny w grupie kontrolnej dla grupy B, w odróżnieniu od moczu wieczornego w tej grupie (II Kb). Kryterium następnego podziału badanych stanowiła płeć (D – grupa mężczyzn; E – grupa kobiet).

Celem potwierdzenia istotności uzyskanych wyników, poddano je analizie statystycznej. Przebieg rozkładu sprawdzono za pomocą testu *Shapiro-Wilka*. Do obliczeń statystycznych nieparametrycznych użyto testu *U Manna-Whitneya*, testu znaków oraz korelacji rang Spearmana. W każdym przypadku za poziom istotności przyjmowano $p < 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

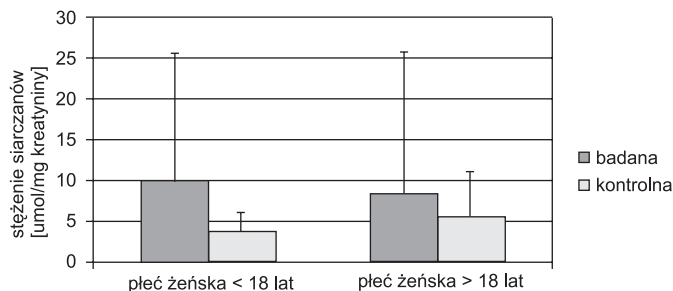
Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zawartości siarczanów w moczu między grupą badaną, a kontrolną (IA/IK). Średnie stężenie siarczanów w porannym moczu w grupie badanej wynosiło $3,04 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$, a w grupie kontrolnej $3,15 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$. Odnosząc uzyskane wyniki do zawartości kreatyniny w moczu uzyskano wartości $6,28 \mu\text{mol}/\text{mg}$ kreatyniny w grupie badanej oraz $5,07 \mu\text{mol}/\text{mg}$ kreatyniny w grupie kontrolnej. Średnie stężenie w grupie badanej było więc wyższe niż w kontrolnej, lecz nieistotnie statystycznie. Nie stwierdzono także zwiększonego stężenia siarczanów w moczu zebrany pod koniec dnia, zarówno w odniesieniu do grupy kontrolnej, jak i do zawartości siarczanów w moczu porannym.

Nie zaobserwowano również istotnych różnic między grupami wiekowymi B i C oraz w odniesieniu do kontroli. Wykazano natomiast zwiększone wydalanie siarczanów w moczu porannym u osób płci żeńskiej zarówno względem kontroli, jak i w porównaniu do osób płci męskiej. Stężenie siarczanów w porannym moczu kobiet i dziewcząt narażonych (gr. ID) wynosiło $8,95 \mu\text{mol}/\text{mg}$ kreatyniny, podczas



Ryc. 1. Porównanie średnich wartości siarczanów w moczu w zależności od płci względem kontroli.

Fig. 1. Comparison of mean value of sulphate in urine in dependence to sex against control.



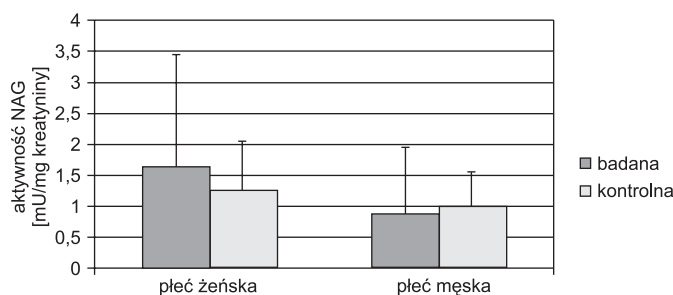
Ryc. 2. Porównanie średnich wartości siarczanów w moczu u płci żeńskiej względem kontroli.

Fig. 2. Comparison of mean value of sulphate in urine in female against control.

gdy w grupie kontrolnej płci żeńskiej 4,94 $\mu\text{mol/mg}$ kreatyniny. Natomiast u osób płci męskiej uzyskano wartości 3,05 $\mu\text{mol/mg}$ kreatyniny (gr. IE), a w grupie kontrolnej 5,29 $\mu\text{mol/mg}$ kreatyniny (gr. Ke) (ryc.1). Analiza danych z równoczesnym uwzględnieniem podziału wiekowego i płci wskazuje na wzmożone wydalanie siarczanów zarówno u dziewcząt (gr. F), jak i kobiet (gr. L). Uzyskane wartości to 10,05 $\mu\text{mol/mg}$ kreatyniny (gr. F), 8,44 $\mu\text{mol/mg}$ kreatyniny (gr. L), podczas gdy w grupach kontrolnych wynosiły odpowiednio 3,65 (Kf) i 5,58 (Kl) $\mu\text{mol/mg}$ kreatyniny (ryc. 2).

Tak więc podsumowując, pomimo braku istotnych statystycznie różnic między całą grupą badaną, a kontrolną (duże odchylenie standardowe) można zauważyć zwiększoną zawartość siarczanów w moczu u osób płci żeńskiej tj. kobiet i dziewcząt. Wyniki sugerują odmienne mechanizmy detoksykacyjne u kobiet i mężczyzn w narażeniu na siarkowodór.

Badając aktywność NAG nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupą badaną a kontrolną, zarówno w moczu porannym, jak i wieczornym (IA/IK oraz IIA/IJK). Uzyskane wyniki to 1,33 mU/mg kreatyniny (IA); 1,15 mU/mg kreatyniny (IK) oraz 1,72 mU/mg kreatyniny (IIA). Także nie wykazano różnic w aktywności NAG-B między grupą badaną a kontrolną (0,73 mU/mg kreatyniny – IA; 0,71 mU/mg kreatyniny – IK). Nie stwierdzono różnic między wiekowymi grupami B i C a kontrolnymi w aktywności NAG oraz NAG-B. Podział zależnie od płci wskazuje na wyższą aktywność NAG u narażonych kobiet niż u mężczyzn (ID – 1,63 mU/mg kreatyniny; IE – 0,83 mU/mg kreatyniny), jednak nie są to różnice istotne w stosunku do kontroli (IKd – 1,25 mU/mg kreatyniny; IKe – 1,0 mU/mg kreatyniny) (ryc. 3). Podsumowując można stwierdzić, że przewlekłe kilkumiesięczne narażenie na niskie dawki siarkowodoru nie wyraża się istotnymi zmianami zawartości siar-



Ryc. 3. Porównanie średnich wartości aktywności NAG w zależności od płci względem kontroli.

Fig. 3. Comparison of mean activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase in urine in dependence to sex against control.

czanów w moczu, czy aktywności NAG i NAG-B. Obserwuje się jedynie tendencję wskazującą na zwiększoną wrażliwość i wolniejszy proces detoksykacyjny u kobiet. Zaobserwowana tendencja wskazuje na celowość badań poszerzonych.

Siarkowodor w organizmie dysocjuje uwalniając anion wodorosiarkowy i siarczanowy. Metabolity są wydalane z moczem głównie w formie wolnych anionów (ok. 90%), ale także w postaci estrów np. z cukrami, steroidami czy fenolami (ok. 10%). Siarkowodor ulega, także w organizmie metylowaniu i częściowemu rozkładowi z wydzieleniem siarki (5).

Działanie toksyczne H_2S jest zbliżone do cyjanowodoru, lecz słabsze. Blokuje bowiem oksydazę cytochromową, enzym szlaku oddechowego, co prowadzi do niedotlenienia, szczególnie OUN, porażenia oddychania i gwałtownej śmierci (stęż. > 1,4 mg/dm³). Działa także drażniąco na skórę i błony śluzowe. Oddziałuje niekorzystnie na szereg enzymów, szczególnie z grupy metaloprotein, unieczynnia grupy sulfhydrylowe, redukuje mostki disiarkowe w białkach. U pracowników narażonych na H_2S (stęż. > 28 mg/m³) występowały bóle głowy, utrata apetytu, zmęczenie, osłabienie pamięci, splątanie myślowe, podrażnienie spojówek, nosa i gardła (6).

Aktualnie brak jest znaczących badań nad przewlekłą ekspozycją na H_2S . Nie wyjaśniono powiązań między wpływem chronicznej ekspozycji na zapach siarkowodoru a efektami zdrowotnymi. Dotychczasowe dane nie wskazują na kumulację. Nieliczne badania wskazują na zwiększone ryzyko infekcji dróg oddechowych, zaburzenia neurologiczne i sercowo-naczyniowe. Wykazano także wpływ występującego w otoczeniu przykrogo zapachu na nastrój przejawiający się zwiększonym napięciem, depresją oraz zmęczeniem u ekspozowanych osób (7, 8).

Siarkowodor pełni także fizjologiczną funkcję gazotransmitera, a wytwarzany jest z aminokwasów zawierających grupy sulfhydrylowe (np. cysteiny). Proces wytwarzania katalizowany jest przez enzymy: *beta*-syntazę cystationinową (CBS) oraz *gamma*-liazę cystationinową (CSE, cystationaza). Oba enzymy są zależne od 5'-fosforanu pirydoksalu (witaminy B₆-zależne), ale różnią się specyfiką formowania H_2S . CSE katalizuje konwersję cysteiny (disiarczku cysteiny) do tiocysteiny i pirogronianu amoniaku. W wyniku nieenzymatycznej przemiany tiocysteiny do cysteiny powstaje H_2S . Główny mechanizm produkcji siarkowodoru przez CBS to prawdopodobnie kondensacja homocysteiny z cysteiną, w wyniku której wytwarzana jest cystationina. CBS i CSE są szeroko obecne w tkankach, jednak dominującym źródłem H_2S w ośrodkowym układzie nerwowym jest CBS, w układzie sercowo-naczyniowym natomiast przeważa CSE. W nerkach i wątrobie wpływy obu enzymów równoważą się (9, 10, 11).

Siarkowodor wpływa na przekaz sygnałów komórkowych. Stymuluje lub hamuje kinazy ERK regulujące przekazywanie sygnału (ang. extracellular signal-regulated kinases), stymuluje ATP-zależne kanały potasowe, zwiększa wrażliwość receptorów *N*-metyl-D-asparaginianowych (NMDA), stymulujących kapsaicyno-wrażliwe transmitery nerwowe. Liczne badania potwierdziły udział H_2S w reakcji zapalnej i podwyższone stężenia w sepsie (12). W prezentowanych badaniach interesująca jest zaobserwowana tendencja wskazująca na większą zawartość siarczanów w moczu kobiet. W toksykologii odnotowano wiele przykładów odmiennej detoksykacji i zwiększonej lub zmniejszonej wrażliwości osobników płci żeńskiej na działanie toksyczne ksenobiotyków. Wynika to z wpływu hormonów płciowych na aktyw-

ność enzymów mikrosomalnych uczestniczących w przemianach związków chemicznych. Sprzęganie z siarczanami, zarówno substancji endogennych (steroidy, neuroprzekazniki, cholesterol) jak i ksenobiotyków (fenole, alkohole, aminy) jest ważnym szlakiem detoksykacji, chociaż znane są przykłady zwiększania toksyczności (toksykacji). Sprawność procesu sprzęgania zależy przede wszystkim od puli cysteiny (źródło siarczanów), ATP (wytwarzanie aktywnego siarczanu PAPS) i aktywności enzymów biorących udział w reakcjach sprzęgania tj. sulfotransferaz (SULT). Przypuszcza się, że toksyczny wpływ polichlorowanych bifenyli na reprodukcję związany jest z ich silnym hamowaniem sulfonowania estrogenów (inhibitory SULT1E1) (13). W literaturze pojawiają się dane o znaczącym wpływie hormonalnej regulacji na aktywność sulfotransferaz i różnicach w ich aktywności u męskich i żeńskich szczurów np. 3-krotnie większy poziom wątrobowych sulfotransferaz fenolowych ST, a 10-krotnie wyższy poziom węglowodorowych sulfotransferaz (ST1C1) u szczurów płci męskiej niż u osobników żeńskich (14). Dane te wskazują na większą sprawność w przenoszeniu (usuwaniu) siarczanów u osobników męskich. Być może podobny proces ma miejsce w badanej przez nas przewlekłej ekspozycji na siarkowodór. Zaobserwowane różnice w stężeniach wydalanych siarczanów u kobiet i mężczyzn korelują z odpowiedzią nerek. Stwierdza się zwiększoną aktywność NAG w moczu kobiet w stosunku do kontroli, podczas gdy u mężczyzn obserwujemy spadek wartości NAG względem kontroli (ryc. 3).

Uzyskane przez nas wyniki są przykładem jak trudne do oceny są skutki przewlekłej ekspozycji na niskie stężenia substancji toksycznej, jednak zaobserwowane tendencje wskazują na celowość poszerzonych badań.

WNIOSKI

1. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu siarczanów i aktywności NAG oraz NAG-B w moczu w całej badanej grupie względem kontroli.
2. Zwiększona zawartość siarczanów i wyższa aktywność NAG oraz NAG-B u osób płci żeńskiej wskazuje na odmienny, wolniejszy proces detoksykacyjny u kobiet niż u mężczyzn.

A. Długosz, E. Sawicka, B. Szymańska, Z. Marchewka, D. Kowalczyk
THE SULPHATE LEVEL AND N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE ACTIVITY DURING
EXPOSURE TO LOW DOSES OF HYDROGEN SULPHIDE

Summary

In Sobięcín, one of Wałbrzych districts, there was a noticeable smell of hydrogen sulphide in the ambient air that persisted for longer than six months. Although the level was within the admissible limit, the inhabitants reported various complaints. The aim of the study was to evaluate the exposure of Sobięcín inhabitants to hydrogen sulphide by determinations of their urinary sulphate levels and to pre-assess the nephrotoxic effect of the chemical estimated by determination of the activity of two sensitive markers: N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and NAG-B (NAG isoenzyme). The study group comprised 40 inhabitants of Sobięcín, 25 women and 15 men. The control group (n=35, including 22 men and 13 women) consisted of inhabitants of Wrocław. Although no statistically significant differences were observed in sulphate level and NAG or NAG-B activities between the total study group and the control, increased

sulphate level was noted in female urine compared to male and control. This result suggests different detoxification mechanisms in men and women exposed to hydrogen sulphide. Our results illustrate difficulties that may arise while assessing effects of prolonged exposures to low levels of a toxic agent, while the observed tendency indicates that the problem needs to be further investigated.

PIŚMIENICTWO

1. *Seńczuk W.*: Toksykologia Współczesna. Wyd. PZWL, Warszawa, 2005; 28-29, 205, 476-477, 717-721. – 2. *Długosz A., Lembas-Bogaczyk J., Marchewka Z.*: Ćwiczenia z toksykologii. Skrypt dla studentów IV roku Wydziału Farmaceutycznego, A.M. im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wrocław 2005. – 3. Biochemtest Kreatynina MPK, Przedsiębiorstwo Przemysłowo-Handlowe „Polskie Odczynniki Chemiczne”, Gliwice. – 4. *Jung K., Mattenheimer H., Burchardt V.*: Urinary Enzymes in Clinical and Experimental Medicine, pub: New York: Springer-Verlag, 1991; 118-123. – 5. *Durand M., Weinstein P.*: Thiosulfate in human urine following minor exposure to hydrogen sulfide: implications for forensic analysis of poisoning. *J. Forensic Toxicology*, Springer Japan, 2007; 25(2): 92-95. – 6. Karta charakterystyki ATSDR: Hydrogen sulfide, CAS # 7783-06-4; Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology and Environmental Medicine, Atlanta 2006; (ATSDR). – 7. *Morgan O.*: Chronic Effects of Hydrogen Sulphide Exposure: A brief review. *Chemical Incident Report 2002*; 24: 13-15. – 8. *Bates M. N., Garrett N., Shoemack P.*: Investigation of health effects of hydrogen sulfide from a geothermal source. *Arch. Environ. Health.*, 2002; Sep-Oct, 57(5): 405-411. – 9. *Li L., Moore P.K.*: Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air?. *Trends Pharmacol. Sci.* 2008; Feb, 29(2): 84-90. – 10. *Fiorucci S., Distrutti E., Cirino G., Wallace J.L.*: The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology*, 2006; 131: 259-271.
11. *Zhao W.*: Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2003; 8: 848-853. – 12. *Bhatia M., Li L., Moore P.*: The role of hydrogen sulfide in lung inflammation *Drug. Discovery Today: Disease Mechanisms* (3)1, Spring 2006; 71-75. – 13. *Coughtrie M.W.H.*: Sulfation through the looking glass-recent advances in sulfotransferase research for the curious. *Pharmacogenomics J.* 2002; 2: 297-308. – 14. *Liu L., Klassen C.D.*: Ontogeny and hormonal basis of male-dominant rat hepatic sulfotransferases. *Mol. Pharmacol.*, 1996; 50(3): 565-572.

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