

## EFEKTI KSENOBIOTIKA KSILENA I TOLUENA NA UKUPNI ANTIOKSIDATIVNI I LIPIDNI STATUS

Veroljub Knežević<sup>1</sup>, Dragan Joksović<sup>2</sup>, Olgica Knežević<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Služba za laboratorijsku dijagnostiku, Dom zdravlja Kragujevac,  
Kralja Milutina 1, 34000 Kragujevac

<sup>2</sup>Nacionalni centar za kontrolu trovanja, Vojno-medicinska akademija,  
Cmotravska 17, 11000 Beograd

*Kratak sadržaj:* U ovom radu praćen je efekat hronične ekspozicije toluenu i ksilen u radnim uslovima na lipidni status i nivo TAS-a u plazmi. Određivana je hipurna kiselina u urinu pre i posle rada kao mera ekspozicije. Povećana ekskrecija hipurne kiseline u urinu posle rada u grupi izloženih, potvrđuje ekspoziciju ovim ksenobioticima. Koncentracije triglicerida, ukupnog i LDL holesterola u plazmi bile su značajno povećane ( $p < 0,001$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom. Znatno su smanjene koncentracije HDL holesterola u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,001$ ). Povećana produkcija slobodnih radikala pospešuje povećanu produkciju antioksidanata, pa je TAS kod izloženih značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,001$ ). Slobodni radikali menjaju strukturu ćelijske membrane, biomakromolekulske strukturu, a time njihovu fiziološku funkciju. Odbrana od modifikacija lipoproteina i ćelijskih struktura i proteina je određena antioksidativnim statusom u krvi.

*Cljučne reči:* toluen, ksilen, lipidni status, antioksidativni status

### Uvod

Glavni odbrambeni sistem protiv toksičnih nepolarnih ksenobiotika je mehanizam njihove biotransformacije pomoću sistema mešovityh oksidaza (MFO) koji ksenobiotike transformišu u polarne derivate koji se lakše ekskretuju urinom (1). Biotransformacijom toluena i ksilena stvaraju se reaktivni intermedijeri i slobodni radikali koji mogu neenzimski reagovati sa proteinima ili nukleinskim kiselinama što dovodi do promena struktura ovih biomakromolekula, a samim tim i do promena u fiziološkim procesima u kojima učestvuju (2,3).

Hronična ekspozicija ovim ksenobioticima uzrokuje stvaranje kiseoničnih radikala (ROS). ćelije se štite od toksičnog dejstva slobodnih radikala brojnim endogenim radikal-scavenging proteinima, enzimima i neproteinskim biomolekulima, koji skupa čine tzv. antioksidativni sistem. Sveukupnim delovanjem, anti-

oksidativni faktori efikasno preveniraju, u fiziološkim uslovima, njihove toksične efekte čineći ravnotežu prooksidativnim procesima. Svaki poremećaj ove ravnoteže tj. »oksidativni stres« favorizuje prooksidativne procese (4).

Hiperholesterolemija (stećena ili hiperlipoproteinemija tip IIa), povećanje koncentracije triglicerida i lipoproteina, su najvažniji i najviše ispitivani faktori rizika (5). Lipoproteini male gustine (LDL) ulaze u ćeliju vezujući se za LDL-receptore preko apoproteina B. Ako je koncentracija LDL u plazmi povećana, višak LDL koji ostaje u cirkulaciji podleže oksidaciji koja podstiče aterogenezu. Drugi važan lipoprotein u metabolizmu holesterola je lipoprotein velike gustine (HDL). HDL je supstrat lecitin-holesterol-acil-transferaze (LCAT), koja esterifikuje slobodni holesterol i smanjuje njegovu koncentraciju u plazmi (6).

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi povezanost toksičnog efekta toluena i ksilena preko promene vrednosti TAS-a i koncentracije lipida, koji zajedno određuju da li će se i u kojoj meri odvijati aterogeneza. Da bi se definisao status ekspozicije toluenu i ksilen ispitivanja određivana je hipurna kiselina u urinu pre posla i posle posla.

*Adresa autora*

Veroljub Knežević  
Atinska 6/39  
34000 Kragujevac  
Tel.: 034/341 230  
Mob.: 064/229 6036

## Materijal i metode

Analiza je rađena na 80 ispitanika, radnika-auto-lakirera »Lakirnice« u Kragujevcu, profesionalno izloženih dejstvu toluena i ksilena. Neposredna izloženost je kriterijum izbora uzorka (E), prosečne starosti  $44,5 \pm 6,3$ . Kontrolnu grupu činilo je 30 zdravih ispitanika (C) iste prosečne starosti. Krv je sakupljana bez konzervansa i centrifugirana 10 minuta sa 5000 rpm da bi se odvojio serum od koaguluma. Totalni antioksidativni status je određivan u uzorku seruma kolorimetrijskim testom (Randox kit, Cat. No. NX 2332.Lot 1130F). Koncentracije komponenata lipidnog statusa (triglicerida, ukupnog holesterola, HDL holesterola i LDL holesterola) određivane su uzorku seruma, primenom uobičajenih enzimskih kolorimetrijskih testova (»Randox« kit). Takođe je računat odnos koncentracija LDL/HDL.

Hipurna kiselina u urinu je određivana modifikovanom metodom Pagnootto i Liberman-a (7). Hipurna kiselina je metabolit toluola (metil benzena) pa njeno prisustvo u krvi govori o intosikaciji toluolom. Toluol u organizmu oksidacijom prelazi u benzoevu kiselinu, koja se konjuguje sa glicinom u hipurnu kiselinu. Hipurna kiselina se ekstrahuje smešom dietiletra i izopropanola i njen sadržaj u ekstraktu određuje spektrofotometrijski, merenjem na talasnoj dužini od 230 nm.

## Statistička obrada podataka

Pri analizi rezultata primenjene su osnovne metode deskriptivne statistike: srednja vrednost ( $\bar{x}$ ) sa merama disperzije-standardnom devijacijom SD i standardnom greškom SE. Za proveru hipoteza korišćena je tehnika Studentovog t-testa (8).

## Rezultati

Vrednost hipurne kiseline u urinu u grupi izloženih toksičnim agensima (E) u odnosu na kontrolnu grupu (C) pre rada iznosila je  $0,97 \pm 0,28$  g/L, što je statistički značajno viša vrednost u odnosu na  $0,81 \pm 0,14$  g/L, koliko je izmereno u kontrolnoj grupi (C) ( $p < 0,001$ ). U grupi izloženih (E) vrednost hipurne kiseline pre rada iznosila je  $0,97 \pm 0,28$  g/L, što je statistički značajno niže u odnosu na vrednosti iste grupe posle rada ( $p < 0,001$ ), gde je koncentracija hipurne kiseline  $1,85 \pm 0,40$  g/L (Tabela I).

Koncentracija triglicerida ukupnog holesterola, LDL holesterola u serumu izložene grupe bile su statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu, dok je koncentracija HDL holesterola u grupi izloženih statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,001$ ). Odnos LDL/HDL u grupi E bio statistički je značajno veći ( $p < 0,001$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela I).

Vrednost TAS-a u grupi izloženih (E) statistički je značajno niža ( $p < 0,001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu (C) (Tabela I).

## Diskusija

Hipurna kiselina je metabolit toluena i ksilena, koji je nastao biotransformacijom. Ekskretuje se urinom i uobičajeni je sastojak urina kao endogeni metabolit. Da bi se našao specifičan odgovor kao posledica resorpcije toluena i ksilena, analizirano je specifično povećanje ekskrecije hipurne kiseline. Kao posledicu resorpcije ksilena i toluena, nađena je statistički značajno viša vrednost ekskrecije hipurne kiseline kod radnika, kada je izmerna posle rada u odnosu na njene izmerene vrednosti pre rada.

Tabela I Lipidni i antioksidativni status izložene i kontrolne grupe ( $\bar{x} \pm SD$ )

Koncentracija hipurne kiseline pre posla i posle posla izloženih (E) i kontrolne grupe (C)					
Grupe	Hipurna kiselina pre rada, g/L		Hipurna kiselina posle rada, g/L		
K (n = 30)	0,81 ± 0,14		0,89 ± 0,31		
E (n = 80)	0,97 ± 0,28** (+23%)		1,85 ± 0,40**		
Lipidni status izloženih radnika toluenu i ksilenu					
Grupe	TG, mmol/L	H, mmol/L	HDL, mmol/L	LDL, mmol/L	LDL/HDL
K (n = 30)	0,86 ± 0,42	3,95 ± 0,67	1,40 ± 0,23	2,81 ± 0,31	2,21 ± 0,38
E (n = 80)	1,50 ± 0,65** (+76%)	5,28 ± 1,06** (+38%)	1,03 ± 0,29** (-27%)	3,86 ± 1,09** (+37%)	3,87 ± 2,01** (+77%)
Vrednosti TAS izloženih (E) i kontrolne grupe (C)					
Grupe	TAS, mmol/L				
K (n = 30)	1,47 ± 0,19				
E (n = 80)	0,874 ± 0,098 ** (-69%)				
** p<0,001					

Iz prikazanih rezultata lipidnog statusa, odnosno svih njegovih komponenti uočava se da izrazito povećanje koncentracije ukupnog holesterola u toku ekspozicije ovim organskim rastvaračima nastaje zbog povećanja koncentracije LDL holesterola. Uočava se znatno smanjenje koncentracije HDL holesterola. Bio-transformacijom toluena i ksilena stvaraju se reaktivni intermedijeri i slobodni radikali.

Apsolutni nedostatak ili defekt LDL-receptora (hiperlipoproteinemija tip II), kao i relativni nedostatak receptora (alimentarna hiperlipoproteinemija tip IIa) ima za posledicu povećanje koncentracije LDL holesterola u plazmi i povećanje odnosa koncentracija LDL i HDL u plazmi (9).

Povećana koncentracija LDL holesterola je posledica njegove oksidacije nakon produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (ROS). Slobodni kiseonični radikali oštećuju i endotelske ćelije. Ksantin oksidaza se nalazi u endotelskim ćelijama krvnih sudova. Ovo delovanje enzima je omogućeno proteazom čija je aktivnost katalizovana povećanom koncentracijom jona  $Ca^{+2}$  u citosolu. Hipoksantin je supstrat za dejstvo ksantin-oksidade i pretvara je u superoksid anjon  $O_2^-$ . Za pretvaranje  $H_2O_2$  u hidroksi-radikal (preko Fentonove reakcije) potrebno je gvožđe koje se dobija iz samih endotelnih ćelija. Na taj način endotelne ćelije učestvuju u sopstvenom uništenju. U kontaktu sa

endotelom LDL lako prodire u intimu gde se fagocituju tkivni makrofagi (10). Utvrđeno je da su makrofagi i glatke mišićne ćelije ispunjene lipidima penaste ćelije (11). Povećano oslobađanje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u hiperholesterolemiji ili aterosklerozi potvrđuje koncept da je arterijsku zid pod povećanim oksidacionim stresom (12). Prooksidativnim procesima se suprotstavlja endogeni antioksidacioni zaštitni sistem (AOS). Jedan od mehanizama zaštite AOS je inhibicija aterogenih efekata LDL delovanjem SOD (13). Adheziju leukocita za endotel u ranoj aterogenezi stimuliše oksidovani LDL. Ova stimulacija adhezije leukocita za endotel oksidovanim LDL-om odvija se preko  $O_2$  zavisnog puta, a inhibira je SOD (14). GSHPx, enzim vezan za membrane (15) redukuje lipidne perokside i oksidisane intermedijere holesterola. Pokazano je da su vrednosti ukupno antioksidantnog stanja u plazmi statistički značajno niže kod izloženih u odnosu na kontrolnu grupu. Povećana produkcija slobodnih radikala pospešuje povećanu produkciju antioksidanata kao odgovor pri čemu je TAS kod izloženih značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu (16).

Dobijeni rezultati pokazuju da hronična ekspozicija toluenu i ksilenu dovodi do značajnog povećanja koncentracije ukupnog holesterola i LDL holesterola u krvi, dok se s druge strane HDL holesterol značajno smanjuje a u korelaciju s antioksidativnim statusom krvi.

## XENOBIOTICS EFFECT XYLENE AND TOLUENE AT THE TOTAL ANTIOXIDATIVE AND LIPID STATUS

Veroljub Knežević<sup>1</sup>, Dragan Joksović<sup>2</sup>, Olgica Knežević<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory Diagnostics Department, Health Centre of Kragujevac, Kneza Mihajla 1, 34000 Kragujevac

<sup>2</sup>National Centre for Poisoning Control, Military Medical Academy, Cmotravska 17, 11000 Belgrade

*Summary:* In this study the effect of chronic exposure of workers to toluene and xylene in working conditions, and the effect both on lipid status and TAS level in plasma was followed. Hippuric acid in the urine was determined before and after work, as the exposure measure. Hippuric acid was increased in urine excretion after work, within the group of the exposed, which confirms the exposure to xenobiotics. Concentration of triglycerides, overall and LDL cholesterol of the plasma were substantially increased ( $p < 0.001$ ), compared to the control group. HDL concentration was substantially decreased ( $p > 0.001$ ). Increased production of free radicals supports the increased production of antioxidants, that results with TAS lower findings within the exposed group ( $p < 0.001$ ). Free radicals change the structure of the cell membrane, biomacromolecular structure and consequently the physiological function. Defense from the modification of lipoprotein and cell structure, and modification of proteins is defined by antioxidative status in blood.

*Key words:* toluene, xylene, lipid status, antioxidative status

**Literatura**

1. Van Doorn R, Bos RP, Brouns RM, Leijdekkers CM, Hersonson PT. Effect of toluene and xylene on liver glutathione and their urinary excretion as mercapturic acids in the rat. *Arch Toxicol* 1980; 43: 293-304.
2. Hass U, Jakobsen BM. Prenatal toxicity of xylene inhalation in the rat: a teratogenicity and postnatal study. *Pharmacol Toxicol* 1993; 73: 20-23.
3. Angerer J, Schildbach M, Kramer A. S-p-Toluilmercapturic acid in the urine of workers exposed to toluene: a new biomarker for toluene exposure. *Arch Toxicol* 1998; 72: 119-23.
4. Harman D. Free radical theory of ageing: role of free radicals in the origination and evolution of life ageing and disease processes. *Ann NY Acad Sci* 1996; 786: 321-36.
5. Cheng S, Pallaud C, Grow MA, Scharf SJ, Erlich HA, Klitz W. et al. A multilocus genotyping assay for cardiovascular disease. *Clinic Chem Lab Med* 1998; 36: 561-6.
6. Brown MS, Goldstein JL. A receptor/mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.
7. Prpić D, Majić C. Toksikološko-hemijske analize. Medicinska knjiga. Zagreb-Beograd, 1985, 273.
8. Jevtović I. Medicinska statistika. Medicinska knjiga. Krajevac, 1996, 113.
9. Steinberg D, Parhasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-24.
10. Gerity RG. Role of the monocyte in atherogenesis. 1. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981; 103: 181-90.
11. Geer JC, Haust MD. Smooth muscle cells in atherosclerosis. *Monographs on atherosclerosis* 1972; vol 12, Karger, Basel.
12. Mugge A, Brandes RP, Boger RH, Dwenger A, Bode-Boger S, Kienke S, Frolich JC, Lichtlen PR. Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24: 994-8.
13. Frostegard J, Wu R, Giscombe R, Holm G, Lefvert AK, Nilsson J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 461-7.
14. Lehr HA, Becker M, Marklund SL, Hubner C, Arfors KE, Kohlschutter A, Messmer K. Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 824-9.
15. Jacob RA. The integrated antioxidant system *Nutr Res* 1995; 15: 755-66.
16. Rama SV, Kumar S. Antioxidative enzyme in the liver of rats after exposure to xylene, toluene and methyl alcohol separately and in combination. *Physiol Chem Phys Med NMR* 27 (1) 1995; 25-29.

*Rad primljen: 04. 04. 2003*

*Prihvaćen za štampu: 18. 08. 2003*