

Krystyna Sitarek

## TERATOGENNE DZIAŁANIE NIEKTÓRYCH KOMPONENTÓW GUMY

## TERATOGENIC EFFECT OF RUBBER COMPONENTS

Z Zakładu Toksykologii i Kancerogenezy

Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

**STRESZCZENIE** Monomer Polnoks R 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolina stosowany jest w przemyśle gumowym i przemyśle tworzyw sztucznych jako składnik mieszanek opóźniających starzenie się gumy i tworzyw syntetycznych. Przeprowadzono ocenę teratogennego działania Polnoks R i jego monomeru 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinoliny (TMDHQ).

Oceniano rozwój prenatalny potomstwa szczurów narażanych na Polnoks R i jego monomer 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolinę. Testowane substancje podawano zgłębnikiem do żołądka samic szczura od 6 do 15 dnia ciąży w dawkach równoważnych 6%, 13% i 25% LD50.

Zarówno Polnoks R jak i TMDHQ w dawkach 13% i 25% LD50 wywierały toksyczne działanie u matek, a ponadto powodowały wzrost śmiertelności wewnątrzmacicznej zarodków i płodów oraz wady wrodzone. Polnoks R indukował u płodów wady wrodzone kośćca oraz wodogłowie wewnętrzne i wodonercze. TMDHQ powodował u potomstwa narażanych samic przepuklinę mózgową, wodogłowie, wodonercze, hypoplazję nerek, anoftalmię oraz wady wrodzone żeber i kręgow.

Polnoks R i jego monomer 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolina są teratogenami dla szczurów. Indukują wady wrodzone ośrodkowego układu nerwowego, nerek i kośćca. Med. Pr. 2004; 55 (1): 93–99

**SŁOWA KLUCZOWE:** PolnoksR, 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolina, wady wrodzone, badania doświadczalne

**ABSTRACT** This study was performed to evaluate the effects of prenatal development of rats were exposed to Polnoks R and its monomer 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline (TMDHQ) by gavage every day on days 6-15 of gestation at doses equivalent 6%, 13% and 25% of LD50. Polnoks R and TMDHQ administered per os associated with significant maternal toxicity, embryonal lethality, retarded fetal development and congenital defects.

Polnoks R induced skeletal malformations, internal hydrocephalus, and hydronephrosis. 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline produced internal malformations (exencephale, hydrocephalus, anophthalmia, hydronephrosis and renal hypoplasia) and skeletal malformations of ribs and vertebrae.

Polnoks R monomer - 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline is used as an antioxidant in elastomer and rubber productions.

Polnoks R and its monomer 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline are teratogenic to rats and induces CNS, kidneys and skeletal defects. Med Pr 2004; 55 (1): 93–99

**KEY WORDS:** Polnoks R, 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline, internal and skeletal malformations, experimental study

Adres autorki: Św. Teresy 8, 90-950 Łódź, e-mail: ksitar@imp.lodz.pl

Nadesłano: 15.10.2003

Zatwierdzono: 2.01.2004

© 2004, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

## WPROWADZENIE

Rosnące uprzemysłowienie, związane z tym zanieczyszczenie środowiska oraz fakt, że większość pracującej zawodowo populacji jest w wieku rozrodczym, stwarzają konieczność oceny wpływu związków chemicznych obecnych w środowisku lub wprowadzanych do produkcji na zdolność do rozrodu osób narażonych i zdrowie ich potomstwa. O wielkości zagrożenia i różnorodności związków chemicznych, z którymi styka się człowiek, świadczyć mogą chociażby następujące dane. Agencja Ochrony Środowiska (EPA) w Stanach Zjednoczonych szacuje, że około 55 000 związków chemicznych jest aktualnie używanych, a około 1000 nowych jest corocznie wprowadzanych do użytku. EPA zarejestrowała i dopuściła do obrotu około 35 000 pestycydów, natomiast amerykańskie Ministerstwo Żywności i Leków (FDA) dopuściło do użytku 3600 związków chemicznych, stanowiących dodatki do żywności. Ponad 1500 substancji jest składnikami kosmetyków, a około 1200 – składnikami różnych produktów powszechnie stosowanych w gospodarstwie domowym.

Woda do picia zanieczyszczona jest licznymi, ponad siedmiuset, związkami chemicznymi takimi jak pestycydy, rozpuszczalniki, metale itd. (1).

Spośród wielu substancji chemicznych obecnych w środowisku są również takie, które prócz tego, że niekorzystnie

wpływają na zdrowie osób bezpośrednio narażonych, mogą także powodować zaburzenia rozwoju ich potomstwa. Istotnym sposobem ograniczenia ich szkodliwego wpływu na zdrowie ludzi jest kontrola stężeń tego rodzaju substancji w powietrzu i stosowanie właściwych zabezpieczeń przed zbędnym narażeniem.

Inspiracją do podjęcia badań teratogenności Polnoks R i jego monomeru – 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinoliny (TMDHQ) był z jednej strony fakt, że w badaniach środowiska pracy Olsztyńskich Zakładów Przemysłu Gumowego stwierdzono obecność TMDHQ w powietrzu, głównie na wydziale wulkanizacji (2), z drugiej zaś strony brak normatyw higienicznych (NDS) tego związku nie tylko w Polsce, ale także w innych krajach (3–5).

Celem pracy jest porównawcza ocena toksyczności prenatalnej Polnoks R i jego monomeru 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinoliny (TMDHQ) u szczurów.

## MATERIAŁ I METODY

2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolina jest składnikiem wielu mieszanek opóźniających procesy starzenia gumy i tworzyw sztucznych.



Polnoks R, polimer 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinoliny w postaci olejowanej substancji otrzymano z Instytutu Przemysłu Gumowego w Piastowie. Natomiast 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolinę (monomer), zsyntetyzowano w Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej.

Badania prowadzono na szczurach stada Outbred IMP: WIST z hodowli własnej Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi. Po 10 dniach aklimatyzacji w pomieszczeniach zwierzętarni doświadczalnej kojarzono 10-tygodniowe dziewicze samice z 14-tygodniowymi samcami. Dzień, w którym następowała inseminacja traktowano jako „0” (zerowy) dzień ciąży. Zapłodnione samice przydzielano następnie losowo do grup (kontrola i narażane na różne dawki Polnoksu R lub TMDHQ). Wszystkie zwierzęta przebywały w pomieszczeniach o automatycznie kontrolowanej temperaturze powietrza (około 22°C), wilgotności względnej powietrza 45–55% i regulowanym czasie oświetlenia (12h:12h). Zwierzęta karmiono standardową paszą granulowaną (Wytwórnia Pasz Motycz k/Lublinka) i pojocono wodą wodociągową. Paszę i wodę podawano *ad libitum*.

Polnoks R i 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolinę rozpuszczano w oleju słonecznikowym i podawano zgłębnikiem do żołądka samic od 6 do 15 dnia ciąży w dawkach dziennych odpowiadających 6%, 13% i 25% medialnej dawki śmiertelnej LD<sub>50</sub> każdej z testowanych substancji. Samice kontrolne otrzymywały proporcjonalne do masy ciała objętości oleju słonecznikowego. Stężenia badanych substancji dobierano tak, aby wszystkim kontrolnym i narażanym samicom podawane były każdorazowo podobne objętości (0,4 ml roztworu na 100 g masy ciała).

Przez cały okres doświadczeń obserwowano zachowanie samic ciężarnych, ich wygląd, notowano śmiertelność. Masę ciała, przyrost masy ciała, dobowe spożycie paszy i wody kontrolowano w wybranych dniach (masa ciała – 0, 3, 10, 17 i 20 dzień ciąży, spożycie paszy i wody – 3, 10 i 17 dzień ciąży).

W 20 dniu ciąży wszystkie samice uśmiercano przez dekapitację. Wypreparowywano macicę wraz z płodami oraz wątrobę, nadnercza, jajniki i śledzionę samicy. Narządy wewnętrzne samic ważono. W jajnikach obliczano liczbę ciałek żółtych ciążowych. Następnie otwierano macicę i określano w niej liczbę płodów żywych i martwych oraz liczbę późnych i wczesnych resorpcji.

Po wyjęciu płodów z macicy dokonywano oceny makroskopowej, zwracając uwagę na występowanie ewentualnych, widocznych makroskopowo, wad wrodzonych. Następnie płody z całego miotu ważono i mierzono długość każdego z nich od pyszczka do nasady ogona.

Po dokonaniu oceny makroskopowej płodów połowę miotu każdej samicy przeznaczano do oceny rozwoju kośćca, połowę zaś do makroskopowej oceny rozwoju narządów wewnętrznych. Ocenę kośćca przeprowadzano po uprzednim zabarwieniu szkieletu czerwienią alizarynową S (6). W ocenie zaburzeń rozwojowych kośćca stosowano kryteria podane przez Lorkego (7).

Płody stanowiące drugą połowę miotu każdej samicy utrwalano w płynie Bouina. Przed przystąpieniem do oceny rozwoju narządów wewnętrznych płody płukano w wodzie i wykonywano skalpelem poprzeczne przekroje ich ciała. Przekroje te umożliwiały ocenę podniebienia twardego, przewodów nosowych, wielkości i kształtu gałek ocznych, płatów węchowych, mózgowiaszki, narządów wewnętrznych klatki piersiowej i jamy brzusznej. Narządy wewnętrzne płodów oceniano stosując zalecenie metodyczne Wilsona (8) z uwzględnieniem modyfikacji metody podanej przez Dyban (9). Przy ocenie kośćca i narządów wewnętrznych płodów posługiwano się lupą zwykłą lub lupą stereoskopową.

Analizę statystyczną istotności różnic między średnimi wartościami mierzonych parametrów, w przypadku jednorodności wariancji w porównywanych grupach, przeprowadzano jednoczynnikową analizą wariancji i testem Dunnetta, a w przypadku niejednorodności – nieparametryczną, jednoczynnikową analizą wariancji Kruskala-Wallisa (10). Istotność między częstościami występowania cech jakościowych analizowano testem dokładnego prawdopodobieństwa Fishera (10). Istotności różnic między grupami w zakresie spożycia paszy i wody oraz przyrostu masy ciała samic oceniano testem porównań wielokrotnych (11). We wszystkich analizach statystycznych przyjmowano, że różnica między porównywanymi wartościami jest istotna, jeżeli  $p < 0,05$ .

Badania doświadczalne na zwierzętach prowadzono z zachowaniem obowiązujących przepisów prawa (12). Wszyscy członkowie zespołu realizującego badania posiadali zezwolenia indywidualne na prowadzenie badań na zwierzętach.

Zastosowane w badaniach procedury są zgodne z zaleceniami OECD (Dyrektywa Rady 92/32/EEC zawierająca wytyczne OECD nt. procedury i badania działania teratogenego – gryzonie i niegryzonie) (13).

## WYNIKI

### Toksyczność dla matek

Śmiertelność w grupach samic narażanych na najwyższe dawki Polnoksu R wynosiła: około 8% w grupie 340 mg/kg i około 7% w grupie 670 mg/kg. Zwierzęta z obu tych grup padły w okresie między 12 a 15 dniem ciąży. W grupie kontrolnej i narażanej na Polnoks R w najniższej dawce 170 mg/kg nie padła żadna samica (tab. 1).

Biorąc pod uwagę integralne wskaźniki toksyczności można stwierdzić, że dawka 170 mg/kg Polnoksu R podawana samicom per os od 6 do 15 dnia ciąży jest dawką nietoksyczną. Wyższe bowiem dawki tego związku powodowały wzrost względnej masy wątroby (340 i 670 mg/kg), a także wzrost względnej masy nadnerczy, jajników i śledziony (670 mg/kg) (ryc. 1). Ponadto przyrost masy ciała samic narażanych na testowany związek w najwyższej dawce był w czasie ciąży istotnie niższy niż w kontroli ( $60,0 \pm 26,9$  g vs  $98,3 \pm 23,3$  g) (tab. 1). Dobowe spożycie paszy i wody przez samice narażane na Polnoks R nie różniło się istotnie od odpowiednich wartości w grupie kontrolnej.



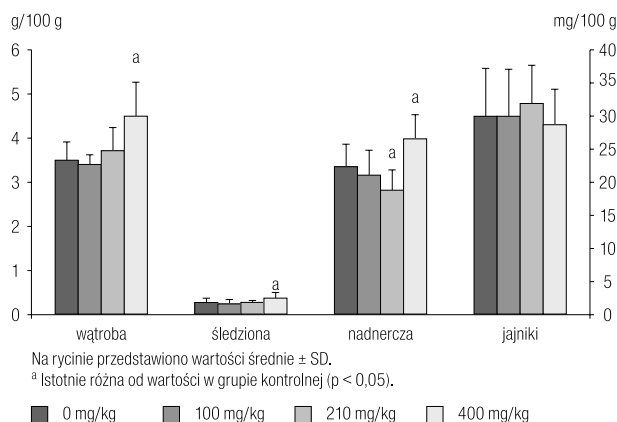
**Tabela 1.** Wpływ Polnoks R podawanego samicom *per os* od 6 do 15 dnia ciąży na płodność i rozwój potomstwa

|                                                     | Dawka Polnoks R<br>mg/kg/dzień |                   |                   |                   |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                                     | 0                              | 170               | 340               | 670               |
| Liczba samic narażanych/padłych                     | 12/0                           | 15/0              | 13/1              | 15/1              |
| Liczba ocenianych miotów                            | 12                             | 15                | 12                | 14                |
| Liczba implantacji ogółem (% żywych płodów)         | 11,8 ± 3,6 <sup>a</sup> (90,7) | 13,1 ± 2,0 (87,8) | 13,4 ± 1,9 (94,0) | 12,9 ± 2,3 (72,9) |
| Średnia liczba wczesnych resorpcji w miocie         | 0,67 ± 0,65                    | 1,47 ± 2,75       | 0,41 ± 0,51       | 2,07 ± 3,38       |
| Średnia liczba późnych resorpcji w miocie           | 0,50 ± 0,67                    | 0,07 ± 0,26       | 0,42 ± 0,90       | 1,28 ± 1,86       |
| Straty postimplantacyjne                            | 1,2 ± 1,1                      | 1,5 ± 2,7         | 0,8 ± 0,8         | 3,4 ± 3,4*        |
| Średnia masa ciała płodu (g)                        | 3,5 ± 0,2                      | 3,2 ± 0,3         | 3,2 ± 0,2         | 2,8 ± 0,4*        |
| Średnia długość płodu (cm)                          | 4,1 ± 0,2                      | 4,0 ± 0,1         | 3,9 ± 0,1         | 3,7 ± 0,2*        |
| Średni przyrost masy ciała samic w czasie ciąży (g) | 98,3 ± 23,3                    | 88,7 ± 26,4       | 86,3 ± 19,2       | 60,0 ± 26,9*      |

<sup>a</sup> Średnia ± SD.\* Istotnie różna ( $p < 0,05$ ) od wartości w grupie kontrolnej.

Nie odnotowano różnic w wyglądzie, zachowaniu i śmiertelności w grupie samic kontrolnych i w grupach narażanych na monomer TMDHQ w dawkach 100 i 210 mg/kg. Natomiast śmiertelność w grupie samic otrzymujących najwyższą dawkę TMDHQ 400 mg/kg wynosiła 40% (tab. 2).

2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolina podawana *per os* w okresie organogenezy jest toksyczna dla samic ciężarnych w dawce 210 mg/kg m.c. i wyższych. Wykonywane systematycznie pomiary masy ciała oraz spożycia paszy i wody przez samice wskazują, że począwszy od 17 dnia ciąży dynamika przyrostu masy ciała samic w grupach narażanych na dwie wyższe dawki testowanej substancji była niższa niż w kontroli mimo, że istotnie niższe spożycie paszy odnotowano w 17 dniu ciąży tylko w grupie otrzymującej najwyższą dawkę TMDHQ – 400 mg/kg. Dobowe spożycie paszy w tej grupie było o około 25% niższe i wynosiło 17,3 g/szczura wobec 23,1 g/szczura w kontroli. Spożycie wody wahało się w granicach od 22,6 do 34,7 ml/szczura i zależało jedynie od dnia ciąży nie zaś od tego, czy były to samice kontrolne, czy narażane na badany związek. Przyrost masy ciała w czasie ciąży

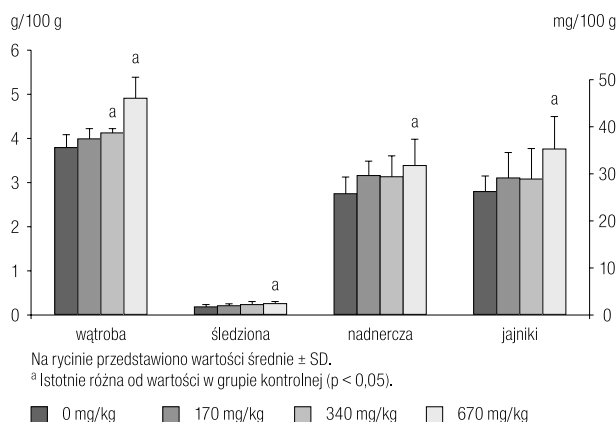
**Ryc. 2.** Względne (na 100 g m.c.) masy narządów samic otrzymujących *per os* 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolinę w okresie organogenezy.

w grupie samic otrzymujących najwyższą dawkę monomeru był ponad 40% niższy, a w grupie 210 mg/kg o ponad 20% niższy niż w kontroli (tab. 2). Względne masy wątroby, nadnerczy i śledziony samic narażanych na 400 mg/kg TMDHQ były istotnie wyższe niż w kontroli (ryc. 2).

Reasumując wyniki badań toksyczności matczynej można przyjąć, że najniższą nieletalną, toksyczną dla samic ciężarnych dawką Polnoks R była dawka 340 mg/kg stanowiąca 13% LD<sub>50</sub>, a najniższą dawką toksyczną jego monomeru – TMDHQ dawka 210 mg/kg m.c., stanowiąca taki sam odsetek medialnej dawki śmiertelnej.

### Toksyczność dla potomstwa

Polnoks R podawany zgłębnikiem do żołądka samic w okresie organogenezy w dawce dziennej 670 mg/kg wywiera działanie embriotoksyczne i fetotoksyczne powodując wzrost śmiertelności wewnątrzmacicznej zarodków i płodów, a także opóźnienie rozwoju wewnątrzmacicznego płodów, przejawiające się mniejszą masą i długością ich ciała (tab. 1). Polnoks R w tej dawce jest także czynnikiem teratogenem dla

**Ryc. 1.** Względne (na 100 g m.c.) masy narządów samic otrzymujących *per os* Polnoks R w okresie organogenezy.

**Tabela 2.** Wpływ 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinoliny podawanej samicom *per os* od 6 do 15 dnia ciąży na płodność i rozwój potomstwa

|                                                     | Dawka TMDHQ<br>mg/kg/dzień     |             |              |              |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------|-------------|--------------|--------------|
|                                                     | 0                              | 100         | 210          | 400          |
| Liczba samic narażanych/padłych                     | 32/0                           | 29/0        | 30/0         | 25/10        |
| Liczba ocenianych miotów                            | 24                             | 23          | 20           | 9            |
| Liczba implantacji ogółem (% żywych płodów)         | 10,1 ± 4,0 <sup>a</sup> (94,1) | 10,8 ± 2,4  | 9,5 ± 3,6    | 9,1 ± 3,5    |
| Średnia liczba wczesnych resorpcji w miocie         | 0,58 ± 0,85                    | 0,43 ± 0,59 | 0,80 ± 0,87  | 1,11 ± 0,93  |
| Średnia liczba późnych resorpcji w miocie           | 0,08 ± 0,28                    | 0,22 ± 0,52 | 0,10 ± 0,31  | 0,78 ± 1,09  |
| Straty postimplantacyjne                            | 0,67 ± 0,92                    | 0,65 ± 0,71 | 0,90 ± 0,85  | 1,89 ± 1,62* |
| Średnia masa ciała płodu (g)                        | 3,4 ± 0,6                      | 3,6 ± 0,4   | 3,2 ± 0,6    | 3,5 ± 0,7    |
| Średnia długość płodu (cm)                          | 3,8 ± 0,2                      | 3,8 ± 0,2   | 3,6 ± 0,3    | 3,3 ± 1,3*   |
| Średni przyrost masy ciała samic w czasie ciąży (g) | 87,0 ± 16,3                    | 83,3 ± 17,6 | 66,5 ± 25,4* | 48,9 ± 26,9* |

\* Średnia ± SD.

\* Istotnie różna ( $p < 0,05$ ) od wartości w grupie kontrolnej.

szczurów. Indukuje on bowiem zarówno wady rozwojowe kośćca (rozszczep podniebienia, brak kręgów ogonowych, wady żeber), jak również wady narządów wewnętrznych (wodogłowie wewnętrzne, wodonercze) (tab. 3).

Monomer Polnoks R – 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolina podawana w okresie organogenezy ciężarnym samicom szczura powoduje, podobnie jak polimer, wzrost śmiertelności wewnątrzmacicznej płodów. Średnia liczba strat postimplantacyjnych w tej grupie różniła się znamienne od kontroli. Związek ten wywiera również działanie fetotoksyczne, o czym świadczy istotnie mniejsza długość płodów samic narażanych na najwyższą jego dawkę (tab. 2).

TMDHQ podawany samicom w okresie organogenezy powodował wady wrodzone kośćca: rozszczep podniebienia, skrzywienie kręgosłupa i zniekształcenia żeber. Najliczniejszą grupę z wadami kośćca stanowiły płody z rozszczepem podniebienia twardego. Skrzywienie kręgosłupa, wada stwierdzona u potomstwa samic narażanych na TMDHQ w dawkach

100 i 210 mg/kg, polegało na wyraźnym tylnobocznym skrzywieniu kręgosłupa w odcinku lędźwiowym (tab. 4).

Spośród wad wrodzonych narządów wewnętrznych indukowanych przez TMDHQ najczęstsze były wady ośrodkowego układu nerwowego (wodogłowie zewnętrzne, przepuklina mózgowa). Prócz wad CNS ujawniono także wady wrodzone nerek. U jednego płodu samicy otrzymującej TMDHQ w dawce 100 mg/kg stwierdzono hypoplazję nerki (zmniejszenie jednej nerki o około 60–70%), a u dwóch innych płodów z tej grupy i u jednego płodu samicy z grupy 210 mg/kg – wodonercze. Ponadto u płodu samicy z grupy 210 mg/kg stwierdzono anoftalmię (brak jednej gałki ocznej) (tab. 4).

## OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Porównanie wyników badań toksyczności 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinoliny i wyników badań toksyczności polime-

**Tabela 3.** Częstość wad wrodzonych kośćca i narządów wewnętrznych u płodów samic narażanych *per os* na Polnoks R od 6 do 15 dnia ciąży

|                                               | Dawka Polnoks R<br>mg/kg/dzień |       |       |             |
|-----------------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------------|
|                                               | 0                              | 170   | 340   | 670         |
| Liczba płodów/miotów do oceny kośćca          | 66/12                          | 88/14 | 77/12 | 67/13       |
| Liczba płodów/miotów do oceny tkanek miękkich | 62/12                          | 85/14 | 74/12 | 65/13       |
| Odstetek płodów/miotów z:                     |                                |       |       |             |
| rozszczepem podniebienia                      | 0                              | 0     | 0     | 6,8*/23,0   |
| zrośniętymi żebrami                           | 0                              | 0     | 0     | 1,5/7,7     |
| ruchomymi żebrami                             | 0                              | 0     | 0     | 1,5/7,7     |
| brakiem jednego lub więcej kręgów ogonowych   | 0                              | 0     | 0     | 19,7*/69,2* |
| wodogłowie wewnętrznym                        | 0                              | 0     | 0     | 30,8*/38,5* |
| wodonerczem                                   | 0                              | 0     | 0     | 9,2*/30,8   |

\* Istotnie różna ( $p < 0,05$ ) od częstości w grupie kontrolnej.

**Tabela 4.** Częstość wad wrodzonych kośćca i narządów wewnętrznych u płodów samic narażanych *per os* na 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolinę od 6 do 15 dnia ciąży

|                                               | Dawka TMDHQ<br>mg/kg/dzień |            |            |             |
|-----------------------------------------------|----------------------------|------------|------------|-------------|
|                                               | 0                          | 100        | 210        | 400         |
| Liczba płodów/miotów do oceny kośćca          | 112/23                     | 115/23     | 85/20      | 29/7        |
| Liczba płodów/miotów do oceny tkanek miękkich | 115/24                     | 118/23     | 87/19      | 34/8        |
| Odsetek płodów/miotów z:                      |                            |            |            |             |
| rozszczepem podniebienia                      | 0                          | 0          | 5,8*/35,0* | 33,3*/75,0* |
| pofalowanymi żebami                           | 0                          | 0          | 1,2/5,0    | 10,3*/14,3  |
| bocznym skrzywieniem kręgosłupa               | 0                          | 4,3*/17,4* | 2,4/10,0   | 0           |
| brakiem gałki ocznej                          | 0                          | 0          | 1,1/5,3    | 0           |
| przepukliną mózgową                           | 0                          | 0          | 1,1/5,3    | 0           |
| wodogłowiem zewnętrznym                       | 0                          | 0,8/4,3    | 8,0*/31,6* | 5,9*/25,0*  |
| wodonerczem                                   | 0                          | 1,7/8,7    | 1,1/5,3    | 0           |
| niedorozwojem nerki                           | 0                          | 0,8/4,3    | 0          | 0           |

\* Istotnie różna ( $p < 0,05$ ) od częstości w grupie kontrolnej.

ru tego związku, Polnoks R, wskazuje, że monomer jest bardziej toksyczny dla samic ciężarnych i ich potomstwa od polimeru.

Z porównania skutków działania toksycznego TMDHQ (monomeru) i Polnoks R (polimeru) w ekwiwalentnych dawkach wynika, że monomer w dawce równej 25%  $LD_{50}$  był letalny dla 40% samic, a toksyczny dla samic ciężarnych, poczynając już od dawki 210 mg/kg (13%  $LD_{50}$ ), podczas gdy polimer w zastosowanych dawkach nie był letalny, a toksyczny dopiero w dawce 670 mg/kg (25%  $LD_{50}$ ).

Polnoks R podawany samicom ciężarnym w dawce 670 mg/kg powodował niższy przyrost masy ciała w czasie ciąży, któremu jednak nie towarzyszyło mniejsze dobowe spożycie paszy i wody przez te zwierzęta. Konsekwencją istotnie niższej masy ciała w 20 dniu ciąży była wyższa względna masa wątroby, jajników, nadnerczy i śledziony samic. Dawka 670 mg/kg nie była jednak dawką letalną dla samic ciężarnych (14).

Dawka monomeru równa 25%  $LD_{50}$  okazała się dawką letalną dla narażanych samic, a niższa, stanowiąca 13%  $LD_{50}$  dawką toksyczną dla matek. U samic narażanych na TMDHQ w dawce 210 mg/kg (13%  $LD_{50}$ ) stwierdzono istotnie niższą niż w kontroli zarówno bezwzględną jak i względną masę nadnerczy, która wydaje się o tyle istotna, że nie była związana z niższą masą ciała tych samic. Wyższe natomiast względne masy narządów wewnętrznych samic z grupy narażanej na ten związek w dawce 400 mg/kg są konsekwencją istotnie niższej niż w kontroli masy ciała samic. Należy jednak zauważyć, że wyniki te pochodzą jedynie od 9 zwierząt najmniej wrażliwych na toksyczne działanie TMDHQ.

Dobowe spożycie paszy przez samice ciężarne, otrzymujące najwyższą dawkę monomeru, było istotnie mniejsze niż w kontroli w 10 i 17 dniu ciąży. Różnica ta wyraźniej zaznaczona w 10 dniu ciąży wiązała się najprawdopodobniej z faktem, iż pomiar przypadał jeszcze na okres ekspozycji

zwierząt (od 6 do 15 dnia ciąży), natomiast następny pomiar wykonywano w drugiej dobie po zakończeniu narażenia. Zauważyć ponadto należy, że spożycie paszy w 10 dniu ciąży stanowiło około 68% dziennego spożycia w grupie samic kontrolnych, a w 17 dniu ciąży około 90% spożycia w kontroli.

Mniejsze spożycie paszy przez samice ciężarne lub karmiące niekorzystnie oddziałuje również na kondycję ich potomstwa. Znane są z literatury naukowej doniesienia o wpływie niedożywienia matek w okresie ciąży i laktacji na rozwój potomstwa zwierząt doświadczalnych. Niedożywienie matek w różnych okresach ciąży może być przyczyną zaburzeń czynności łożyska zarówno u ludzi jak i zwierząt (15). Ograniczenie spożycia paszy do 75% lub 50% dziennego zapotrzebowania w czasie ciąży i laktacji lub tylko w czasie ciąży powodowało zahamowanie wzrostu potomstwa szczurów (16–18). Nie stwierdzono jednakże wad wrodzonych u potomstwa samic traktowanych w podobny sposób (19).

Obserwowany w naszym badaniu efekt fetotoksyczny działania monomeru można tylko częściowo wiązać z mniejszym spożyciem paszy w grupie. Ta zależność była bowiem możliwa do wykazania jedynie w grupie narażanej na najwyższą dawkę ksenobiotyku. Nie stwierdzono jej natomiast w pozostałych grupach, w których, mimo że spożycie paszy nie różniło się od kontroli, występowało opóźnienie rozwoju wewnątrzmacicznego. Pomiar dobowego spożycia paszy pozwala jednakże zorientować się tylko w ilości spożytej paszy, nie pozwala natomiast ocenić, czy pokarm jest we właściwy sposób przyswajany. Zaburzenia przyswajania składników pokarmowych stanowią innego rodzaju problem, którego w tym badaniu nie analizowano. Fetotoksyczne działanie TMDHQ i Polnoks dotyczyło w obu przypadkach efektów stwierdzanych u potomstwa samic narażanych na toksyczne dawki ksenobiotyków.



Analiza wyników badań toksyczności prenatalnej monomeru i polimeru pozwala stwierdzić, że są to czynniki powodujące, prócz opóźnienia rozwoju płodów, również wzrost śmiertelności wewnątrzmacicznej oraz indukujące wady wrodzone u potomstwa. Efekt embriotoksyczny obserwowano w następstwie narażenia na TMDHQ i jego polimer tylko wówczas, gdy zastosowane dawki były wyraźnie toksyczne dla ciężarnych samic. Średnie liczby strat postimplantacyjnych, będące skutkiem działania monomeru i polimeru, były istotnie wyższe w miotach narażonych na najwyższe dawki, równoważne 25% medialnych dawek śmiertelnych dla samic szczura.

TMDHQ indukował wady wrodzone ośrodkowego układu nerwowego, nerek, oczu, kośćca, wówczas gdy zastosowane dawki związku były toksyczne jak i wówczas, gdy były one nietoksyczne dla samic ciężarnych. Rodzaj wad wywołanych działaniem Polnoks R był podobny, jednakże dawka efektywna, jeśli chodzi o ten kierunek działania, była relatywnie wyższa. Z oceny efektów działania Polnoks R i jego monomeru wynika, że są to czynniki powodujące u potomstwa zmiany patologiczne, kwalifikujące się, zgodnie z klasyfikacją rodzajów zaburzeń rozwojowych u zwierząt laboratoryjnych (20) do istotnych zaburzeń rozwoju (rozszerzenie podniebienia, brak gałki ocznej, hipoplazja nerki, wodonercze, przepuklina mózgowa, wodogłowie).

Toksyczność rozwojowa powinna być ostatecznie rozpatrywana kompleksowo w połączeniu z toksycznością matczyną. Pogorszenie stanu zdrowia matki (anemia, zaburzenia przyswajania pokarmów, zatrucie, zaburzenia czynnościowe narządów wewnętrznych, obniżenie odporności, zaburzenia poziomu elektrolitów i równowagi kwasowo-zasadowej) wpływa niekorzystnie na rozwój wewnątrzmaciczny potomstwa (21).

Dla wyjaśnienia, czy obserwowane u potomstwa zaburzenia rozwoju wewnątrzmacicznego są konsekwencją bezpośredniego czy pośredniego działania oraz, czy istnieje ryzyko kumulowania się TMDHQ lub jego metabolitów w następstwie ekspozycji przewlekłej, przeprowadzono badania rozmieszczania wewnątrzustrojowego i wydalania związku u samic oraz badania transportu przezłożyskowego (22)

Wyniki tego badania wskazują, że główną drogą wydalania TMDHQ po jednorazowym podaniu *per os* samicom były nerki. Z moczem wydzieliło się bowiem, w okresie 72 godz. od podania ponad, 78% dawki związku. Istotnie mniejsze (około 5% podanej dawki) było natomiast wydalanie z kałem. Depozyty tkankowego TMDHQ-<sup>14</sup>C wskazują, że związek ten ma wyższe powinowactwo do tkanek bogatych w lipidy, bowiem najwyższe odsetki podanej dawki TMDHQ-<sup>14</sup>C stwierdzono w tkance tłuszczowej i w nerwie kulszowym.

Retencja węgla <sup>14</sup>C w tkankach płodów po podaniu ciężarnym samicom TMDHQ-<sup>14</sup>C wskazuje, że związek ten i/lub jego metabolity przenikają przez łożysko do płodu. Świadczy o tym podwyższony poziom radioaktywności w płynie owodniowym, tkankach i narządach płodów w porównaniu z poziomem w łożyskach (22).

Dynamika rozmieszczania węgla <sup>14</sup>C w tkankach samic ciężarnych po jednorazowym podaniu 2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinoliny-[ring-U-<sup>14</sup>C] *per os* w dawce 210 mg/kg m.c. (160 kBq/szczura) oraz jej wydalanie wskazują, że związek ten należy do substancji, które mogą być zatrzymywane dłużej w ustroju. Z tego też powodu nie można wykluczyć jego kumulacji materialnej w ustroju w następstwie ekspozycji wielokrotnej.

Biorąc pod uwagę z jednej strony fakt iż Polnoks R i jego monomer występuje w powietrzu środowiska pracy zakładów produkujących wyroby gumowe, z drugiej zaś strony wyniki badań wskazujące na toksyczność tych substancji dla potomstwa, celowe wydaje się opracowanie normatywów higienicznych po to, aby kontrolując stężenia w powietrzu środowiska pracy zabezpieczyć przed niekorzystnym wpływem tych substancji na potomstwo narażonych osób.

## PIŚMIENNICTWO

1. Dwivedi R.S., Iannaccone P.M.: Effects of environmental chemicals on early development. W: Korach K.S. [red.]. Reproductive and Developmental Toxicology. Marcel Dekker, New York 1998.
2. Czerczak S.: Model oceny toksyczności dymów wulkanizacyjnych. Z. 46. Studia Mat. Monograf. Instytutu Medycyny Pracy, Łódź 1996.
3. Rozporządzenie Ministra Pracy i Polityki Socjalnej z 29 listopada 2002 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. DzU 2002, nr 217, poz. 1833.
4. Guide to occupational exposure values. American Conference Governmental and Industrial Hygienists, Cincinnati 2003.
5. MAK: Occupational toxicants. Critical data evaluation for MAK values and classification of carcinogens. T. 1. Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 2001.
6. Dawson A.B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red-S. Stain Technol. 1926; 1: 123–124.
7. Lorke D.: Evaluation of skeleton. W: Neuberger D., Merker H.J., Kwasiogroch T.E. [red.]. Methods in Prenatal Toxicology. Georg Thime Publishers, Stuttgart 1977, ss. 145–152.
8. Wilson J.G.: Embryological considerations in teratology. W: Wilson J.G., Warkany J. [red.]. Teratology. Principles and Techniques. University Chicago Press, Chicago 1965, ss. 251–277.
9. Dyban A.P.: Baranov V.S., Akimova I.N.: Osonownye metodiceskie podchody k testirovaniju teratogennoj aktivnosti chimiceskich veshchestv. Arch. Anat. 1970; 10: 89–100.
10. Zar J.H.: Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New York 1974.
11. Fisher L.D., Belle G.: Biostatistics. A Methodology for the Health Sciences. John Wiley and Sons, New York 1993.
12. Ustawa z 21 sierpnia 1997 r. o ochronie zwierząt. Rozdz. 9. Procedury doświadczalne z użyciem zwierząt. DzU 1997, nr 111, poz. 724.
13. Dyrektywa Rady 92/32/EEC zawierająca wytyczne OECD. Nr 407. Procedura. B31. Badania działania teratogennego – gryzonie i niegryzonie. Council of the European Union, Brussels 1992.
14. Sitarek K., Berlińska B., Barański B.: Evaluation of oral exposure to Polnoks R for female rats in developmental toxicity studies. Teratog. Carcinog. Mutagen. 1996; 16: 75–80.



15. Brasel J.A., Winick M.: Maternal nutrition and prenatal growth. Experimental studies of effects of maternal undernutrition on fetal and placental growth. *Arch. Dis. Child* 1972; 47: 479–486.
16. Chow B.F.: Growth of rats from normal dams restricted in diet in previous pregnancies. *J. Nutr.* 1964; 83: 289–294.
17. Chow B.F., Lee C.J.: Effects of dietary restriction of pregnant rats on body weight gain of the offspring. *J. Nutr.* 1964; 82: 10–18.
18. Blackwell B.N., Blackwell R.Q., Yu. T.T.S., Weng Y.S., Chow B.F.: Further studies on growth and feed utilization in progeny of underfed mother rats. *J. Nutr.* 1969; 97: 79–84.
19. Berg B.N.: Dietary restriction and reproduction in the rat. *J. Nutr.* 1965; 87: 344–348.
20. Working P.K., Mattison D.R.: Reproductive and Developmental Toxicity Testing Methods in Animals. W: Paul M. [red.]. *Occupational and Environmental Reproductive Hazards: A Guide for Clinicians*. Williams and Wilkins, Londyn 1993, ss. 91–99.
21. Daston G.P.: Relationships between maternal and developmental toxicity. W: Kimmel C.A., Buelke-Sam J. [red.]. *Target Organ Toxicology Series: Developmental Toxicology*. Wyd. 2. Raven Press, New York 1994, ss. 189–212.
22. Sitarek K., Sapota A.: Maternal-fetal distribution and prenatal toxicity of 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline in the rat. *Birth Defects Res. Develop. Reprod. Toxicol.* 2003; 68 (4): 375–382.

