

Katarzyna Miranowicz - Dzierżawska

**Doświadczalna ocena interakcji
metabolicznych i toksykodynamicznych
1,1,2,2-tetrachloroetyleny,
etylobenzenu i n-heksanu.**

Praca doktorska wykonana

**w Pracowni Toksykologii Zakładu
Zagrożeń Chemicznych i Pyłowych
Centralnego Instytutu Ochrony
Pracy – Państwowego Instytutu
Badawczego w Warszawie**

pod kierunkiem

**prof. dr. hab. Andrzeja Staraka
kierownika Zakładu Biochemii
Toksykologicznej *Collegium
Medicum* Uniwersytetu
Jagiellońskiego w Krakowie**

PROMOTOR:

prof. dr hab. Andrzej Starek

Warszawa 2004

Panu Profesorowi dr. hab.

Andrzejowi Starkowi

promotorowi mojej pracy

pragnę złożyć najgorętsze
podziękowania za ogromną
życzliwość, nieocenioną pomoc,
codzienną troskę, wyrozumiałość i
opiekę naukową oraz wiele
inspirujących uwag, które zaważyły na
ostatecznej formie tej pracy.

Najlepsze, co mogło mnie spotkać, to
mieć takiego promotora.

Pani Profesor dr hab. med.

Danucie Koradeckiej

Dyrektor Centralnego Instytutu
Ochrony Pracy – Państwowego
Instytutu Badawczego

składam serdeczne podziękowania za
zainicjowanie mojej myśli o pracy
doktorskiej, wiarę w mój sukces,
wielką życzliwość i pomoc oraz
umożliwienie mi przeprowadzenia
przewodu doktorskiego na Wydziale
Farmaceutycznym *Collegium Medicum*
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Wszystkim Koleżankom i Kolegom

z Zakładu Zagrożeń Chemicznych i
Pyłowych Centralnego Instytutu
Ochrony Pracy – Państwowego
Instytutu Badawczego

oraz

Zakładu Biochemii Toksykologicznej
Collegium Medicum Uniwersytetu
Jagiellońskiego

dziękuję za codzienną życzliwość,
pomoc i słowa zachęty w trakcie
wykonywania tej pracy.

1. SPIS TREŚCI

1. SPIS TREŚCI	1
2. STRESZCZENIE	4
3. WSTĘP	8
4. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	21
5. MATERIAŁ I METODY	23
5.1 ODCZYNNIKI	23
5.2 ZWIERZĘTA LABORATORYJNE	23
5.3 PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA I ZAKRES BADAŃ	23
5.3.1 <i>Dawkowanie rozpuszczalników</i>	23
5.3.1.1 Ekspozycja powtarzana krótkoterminowa	23
5.3.1.2 Ekspozycja podprzewlekła	24
5.3.2 <i>Zakres badań laboratoryjnych</i>	24
5.3.2.1 Ocena metabolizmu badanych związków	24
5.3.2.1.1 Oznaczanie kwasu trichlorooctowego w moczu	25
5.3.2.1.2 Oznaczanie kwasu hipurowego w moczu	26
5.3.2.1.3 Oznaczanie 2,5-heksanodionu w moczu	27
5.3.2.2 Ocena neurotoksyczności za pomocą testów behawioralnych	28
5.3.2.2.1 Badanie odruchu rogówkowego	29
5.3.2.2.2 Badanie odruchu postawy	29
5.3.2.2.3 Pomiar aktywności eksploracyjnej (psychoruchowej) w wolnym polu	29
5.3.2.2.4 Pomiar czasu utrzymywania się na walcu obrotowym	30
5.3.2.2.5 Badanie aktywności unikania bodźca termicznego (test „gorącej płytki”)	31
5.3.2.2.6 Próba wysiłkowa na bieżni ruchomej	32
5.3.2.3 Ocena hepatotoksyczności za pomocą wskaźników biochemicznych	33
5.4 STATYSTYCZNA OCENA WYNIKÓW	34
6. WYNIKI	35
6.1 DOŚWIADCZENIE WSTĘPNE	35
6.1.1 <i>Ustalenie zasad kwalifikacji zwierząt do badań</i>	35
6.1.2 <i>Ustalenie optymalnego czasu trwania treningu na walcu obrotowym</i>	35
6.1.3 <i>Ustalenie optymalnej szybkości obrotów walca</i>	36

6.1.4	<i>Ustalenie optymalnej temperatury „gorącej płytki”</i>	38
6.1.5	<i>Ustalenie optymalnej prędkości bieżni ruchomej</i>	40
6.1.6	<i>Wybór dawki TET do oceny łącznego działania toksycznego z n-H i EB</i>	42
6.1.6.1	Behawior zwierząt po podskórnym podawaniu tetrachloroetyleny w dawkach 75, 150 lub 225 mg/kg m.c.	42
6.1.6.1.1	Odruch rogówkowy i odruch postawy	42
6.1.6.1.2	Aktywność psychoruchowa w wolnym polu.....	43
6.1.6.1.3	Utrzymywanie się szczurów na walcu obrotowym.....	44
6.1.6.1.4	Percepcja bólu przy zastosowaniu bodźca termicznego (test „gorącej płytki)	45
6.1.6.1.5	Próba wysiłkowa na bieżni ruchomej.	46
6.1.6.2	Aktywność enzymów w surowicy krwi zwierząt po podawaniu tetrachloroetyleny w dawkach 75, 150 lub 225 mg/kg m.c.	47
6.1.6.3	Stężenia frakcji lipidowych i dialdehydu malonowego w surowicy krwi zwierząt po podawaniu tetrachloroetyleny w dawkach 75, 150 lub 225 mg/kg m.c.	48
6.1.6.4	Stężenia niebiałkowych grup tiolowych i dialdehydu malonowego w narządach zwierząt po podaniu tetrachloroetyleny w dawkach 75, 150 lub 225 mg/kg m.c.	50
6.2	DOŚWIADCZENIE POWTARZANE, KRÓTKOTERMINOWE (28 DNI).....	53
6.2.1	<i>Ocena metabolizmu badanych związków</i>	53
6.2.1.1	Wydalenie kwasu trichlorooctowego z moczem	53
6.2.1.2	Wydalenie kwasu hipurowego z moczem	54
6.2.1.3	Wydalenie 2,5-heksanodionu z moczem.....	55
6.2.2	<i>Ocena neurotoksyczności za pomocą testów behawioralnych</i>	56
6.2.2.1	Odruch rogówkowy i odruch postawy	56
6.2.2.2	Badanie aktywności eksploracyjnej (psychoruchowej) w wolnym polu.....	56
6.2.2.3	Czas utrzymywania się szczurów na walcu obrotowym	58
6.2.2.4	Aktywność unikania bodźca termicznego (test „gorącej płytki”).....	60
6.2.2.5	Próba wysiłkowa na bieżni ruchomej	61
6.2.3	<i>Ocena hepatotoksyczności za pomocą wskaźników biochemicznych</i>	63
6.3	DOŚWIADCZENIE PODPRZEWLEKŁE (90 DNI).....	68
6.3.1	<i>Ocena metabolizmu badanych związków</i>	68
6.3.1.1	Wydalenie kwasu trichlorooctowego z moczem	68
6.3.1.2	Wydalenie kwasu hipurowego z moczem	69
6.3.1.3	Wydalenie 2,5-heksanodionu z moczem.....	70
6.3.2	<i>Ocena hepatotoksyczności za pomocą wskaźników biochemicznych</i>	71

6.3.2.1	Aktywność enzymów wskaźnikowych w surowicy krwi	71
6.3.2.2	Stężenia frakcji lipidowych i MDA w surowicy krwi	75
6.3.2.3	Procesy pro- i antyoksydacyjne w tkankach	80
7.	DYSKUSJA	87
7.1	INTERAKCJE METABOLICZNE	87
7.2	INTERAKCJE TOKSYKODYNAMICZNE	94
7.2.1	<i>Działanie neurotoksyczne</i>	94
7.2.2	<i>Działanie hepatotoksyczne</i>	96
8.	WNIOSKI	103
9.	PIŚMIENNICTWO	104
10.	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	117
11.	SPIS RYCIN	119
12.	SPIS TABEL	123

2. STRESZCZENIE

n-Heksan (n-H), etylobenzen (EB) i tetrachloroeten (TET) są szeroko stosowane w przemyśle, głównie jako rozpuszczalniki organiczne gum, żywic naturalnych i syntetycznych, klejów, barwników, lakierów; do odtłuszczenia detali, części maszyn i urządzeń; do czyszczenia na sucho (pralnie chemiczne) oraz jako półprodukty do syntezy organicznej. W Polsce istnieje 12 zakładów produkujących farby i lakiery, zatrudniających ok. 5200 pracowników, z których połowa narażona jest na rozpuszczalniki organiczne. W zakładach tych zidentyfikowano ok. 40 pojedynczych substancji lotnych, które dodatkowo mogą przechodzić do środowiska ogólnego, stanowiąc potencjalne zagrożenie dla populacji generalnej. Narażenie zawodowe i środowiskowe na te substancje ma charakter złożony, ponieważ jest związane z obecnością w środowisku mieszaniny substancji lotnych, a większość dostępnych danych toksykologicznych dotyczy pojedynczych substancji, a nie ich mieszanin.

Wiadomo, że n-H, EB i TET w wysokich stężeniach działają depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) oraz drażniąco na błony śluzowe górnych dróg oddechowych i spojówki oczu. Efekty te są przypisywane substancjom macierzystym. Ostra toksyczność tych związków, wyrażona wartościami medialnych dawek (LD_{50}) i stężeń (LC_{50}) śmiertelnych, jest stosunkowo niewielka. U szczurów po podaniu dożołądkowym wynosi od kilku tysięcy do kilkudziesięciu tysięcy miligramów na kilogram masy ciała, podczas gdy w przypadku narażenia inhalacyjnego kilkadziesiąt, a nawet kilkaset tysięcy mg/m^3 . Wartości wymienionych mierników toksyczności rosną w kolejności: EB, TET i n-H, co wskazuje na spadek toksyczności tych substancji.

Z drugiej strony, biotransformacja tych związków do 2,5-heksanodionu w przypadku n-H, kwasu hipurowego w przypadku EB i kwasu trichlorooctowego w przypadku TET w warunkach narażenia powtarzanego może prowadzić do zaburzeń układowych, a zwłaszcza neuropatii obwodowej w przypadku n-H oraz hepatotoksyczności w przypadku EB i TET.

Brak danych odnośnie interakcji wymienionych związków uzasadniał podjęcie badań nad ich wzajemnym wpływem na metabolizm i toksyczność u zwierząt laboratoryjnych. Choć n-H, EB i TET reprezentują różne grupy związków organicznych, to jednak możliwość ich łącznego występowania w środowisku oraz ich metabolizm przy udziale mikrosomalnych monooksygenaz zależnych od tych samych lub pokrewnych izoform cytochromu P-450 (CYP) potwierdzają celowość podjętych badań.

Celem pracy była ocena interakcji metabolicznych i toksykodynamicznych między n-H i EB; n-H i TET oraz EB i TET u szczurów w warunkach narażenia powtarzanego

krótkoterminowego (28 dni) oraz podprzewlekłego (3 miesiące). Badania przeprowadzono na szczurach Wistar, samcach, w wieku ok. 3 miesiące, pochodzących z hodowli Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie.

Badania przeprowadzono na dwóch modelach doświadczalnych: narażenie powtarzane krótkoterminowe (28 dni): szczury otrzymywały podskórnice olejowe roztwory badanych związków pojedynczo lub w mieszaninach równomolowych (1:1) (dawka pojedynczego związku wynosiła 0,45 mmola/kg m.c.) oraz narażenie podprzewlekłe: szczury otrzymywały w wodzie do picia TET, n-H lub EB w stężeniach odpowiednio 905, 226 i 226 $\mu\text{mol/l}$ lub dwuskładnikowe mieszaniny TET z n-H lub TET z EB w stosunku molowym 1:0,25 (TET = 1) codziennie przez okres 90 dni. Do obu doświadczeń wprowadzono grupy kontrolne nie narażone na badane związki. Zakres badań obejmował: ocenę metabolizmu badanych związków, ocenę neurotoksyczności za pomocą testów behawioralnych oraz ocenę hepatotoksyczności za pomocą wskaźników biochemicznych.

Przebieg metabolizmu badanych związków oceniono w doświadczeniu 28 i 90-dniowym. W celu jego oceny oznaczano metabolity badanych związków w dobowych porcjach moczu. Stężenie 2,5-heksanodionu oznaczano metodą chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC-FID), natomiast stężenia kwasu hipurowego i kwasu trichlorooctowego oznaczano metodami spektrofotometrycznymi. Wszystkie metody były walidowane z określeniem progu oznaczalności, zakresu liniowości i precyzji metody. Równocześnie prowadzono wewnątrzlaboratoryjną kontrolę oznaczeń.

Badania behawioralne obejmowały odruchy: rogówkowy i postawy; aktywność psychoruchową w wolnym polu; ocenę stanu czynnościowego narządu ruchu w teście utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym; aktywność unikania bodźca termicznego (test „gorącej płytki”) oraz próbę wysiłkową na bieżni ruchomej. W badaniach tych ustalono kryteria kwalifikacyjne zwierząt do dalszych doświadczeń przez określenie m.in. optymalnego czasu trwania treningu, optymalnej szybkości obrotów walca lub bieżni ruchomej oraz wielkości bodźca termicznego w teście „gorącej płytki”. Badania te miały na celu ustalenie warunków zapewniających powtarzalność otrzymywanych wyników pomiarów, a zatem najmniejszy błąd pomiaru. Badania behawioralne wykonano tylko u zwierząt narażonych na badane związki przez okres 28 dni i w grupie kontrolnej.

Ocenę hepatotoksycznego działania badanych związków oparto na aktywności enzymów wskaźnikowych surowicy krwi, tj. aminotransferazy alaninowej (ALT), dehydrogenazy sorbitolowej (SDH), dehydrogenazy glutaminianowej (GIDH), γ -glutamylotranspeptydazy (GGTP) oraz frakcji lipidowych surowicy – cholesterolu całkowitego (T-C), cholesterolu lipoprotein wysokiej gęstości (HDL-C), cholesterolu lipoprotein niskiej gęstości (LDL-C) i triglicerydów (TG), a także stężenia dialdehydu malonowego (MDA), będącego produktem peroksydacji lipidów. Ponadto oznaczano

stężenie MDA i niebiałkowych grup tiolowych (NPSH) w wątrobie, nerkach, jądrach i śledzionie celem oceny procesów prooksydacyjnych. Oznaczenia aktywności enzymów przeprowadzono testami kinetycznymi, frakcji lipidowych zestawami diagnostycznymi, MDA metodą z kwasem tiobarbiturowym, podczas gdy NPSH oznaczano metodą kolorymetryczną. Badania te wykonano zarówno w doświadczeniu 28-dniowym, jak i 90-dniowym.

Stwierdzono, że w doświadczeniu 28-dniowym n-H i EB działały hamująco na proces utleniania TET do kwasu trichlorooctowego przez pierwsze dwa tygodnie narażenia. Z kolei n-H i TET stymulowały przemianę EB do kwasu hipurowego przez dwa ostatnie tygodnie narażenia. EB działał hamująco na przemianę n-H do 2,5-heksanodionu w ostatnim tygodniu doświadczenia. W warunkach narażenia podprzewlekłego nie obserwowano interakcji metabolicznych w żadnej z badanych grup zwierząt.

Poza niewielkim upośledzeniem aktywności poznawczej szczurów w teście wolnego pola nie obserwowano istotnych różnic w zachowaniu się zwierząt w grupach badanych w porównaniu z grupami kontrolnymi.

W doświadczeniu 28-dniowym w żadnej grupie doświadczalnej nie obserwowano zmian enzymatycznych w surowicy krwi w stosunku do grupy kontrolnej, podczas gdy w doświadczeniu 90-dniowym u szczurów narażonych na TET i mieszaninę TET i EB obserwowano pod koniec doświadczenia wzrost aktywności ALT i SDH w surowicy krwi. Nieco słabiej zaznaczony wzrost aktywności ALT występował u szczurów narażonych na TET i n-H. Zmiany biochemiczne w postaci wzrostu stężenia TG w surowicy krwi stwierdzono u szczurów narażonych na TET i jego mieszaniny z EB lub n-H po 3 miesiącach doświadczenia.

W doświadczeniu 28-dniowym w profilu lipidowym surowicy obserwowano spadek stężenia HDL-C i wzrost stężenia LDL-C we wszystkich grupach zwierząt z wyjątkiem szczurów otrzymujących sam TET. Ponadto u szczurów narażonych na n-H, EB oraz mieszaninę n-H i EB wystąpiła hipertriglicerydemia. Stężenia MDA w surowicy szczurów otrzymujących EB, n-H lub mieszaninę n-H i EB były znamienne niższe niż w grupie kontrolnej.

Stężenia NPSH w doświadczeniu 28-dniowym były znamienne niższe w wątrobie szczurów narażonych na n-H i EB oraz w nerkach po narażeniu na n-H, TET i mieszaninę n-H i EB. Z drugiej strony, stężenie MDA było podwyższone w wątrobie po narażeniu na TET oraz kombinację n-H i TET oraz w nerkach u zwierząt narażonych na n-H i TET, a także w jądrach w przypadku łącznego narażenia na n-H i TET. W badaniu toksyczności podprzewlekłej wzrost poziomu MDA w homogenatach nerek stwierdzono pod koniec doświadczenia u szczurów narażonych na TET i jego mieszaniny z EB lub n-H. W tym samym czasie u szczurów ekspozowanych na kombinację TET i n-H obserwowano wzrost

poziomu MDA w wątrobie. Stężenie NPSH uległo obniżeniu u szczurów narażonych łącznie na TET i EB w wątrobie i nerkach po 3 miesiącach narażenia.

Wyniki uzyskane w doświadczeniu 28-dniowym wskazują na występowanie interakcji metabolicznych pomiędzy badanymi związkami. Interakcje te nie ujawniły się przy wielokrotnym, trzymiesięcznym podawaniu badanych rozpuszczalników i ich mieszanin w niskich stężeniach. Stwierdzono, że badane rozpuszczalniki organiczne podawane przez 28-dni nie wydają się wpływać uszkadzająco na komórki wątrobowe, co mogłoby prowadzić do wzrostu aktywności enzymów wskaźnikowych. Jedynymi zmianami obserwowanymi w surowicy krwi szczurów była dyslipidemia manifestująca się spadkiem stężenia HDL-C i wzrostem stężenia LDL-C i TG. Do uszkodzenia komórek wątroby może dochodzić natomiast po 3 miesiącach podawania TET, na co wskazuje wzrost aktywności enzymów wskaźnikowych w surowicy krwi oraz triglicydemia u szczurów. Najwyraźniej zaznaczone, zarówno w doświadczeniu powtarzanym, krótkoterminowym (28 dni), jak i podprzewlekłym, były zmiany narządowe wyrażone spadkiem stężenia NPSH w wątrobie i nerkach. Zmianom tym towarzyszył wzrost stężenia MDA, wskazujący na stymulację procesów prooksydacyjnych przez badane związki.

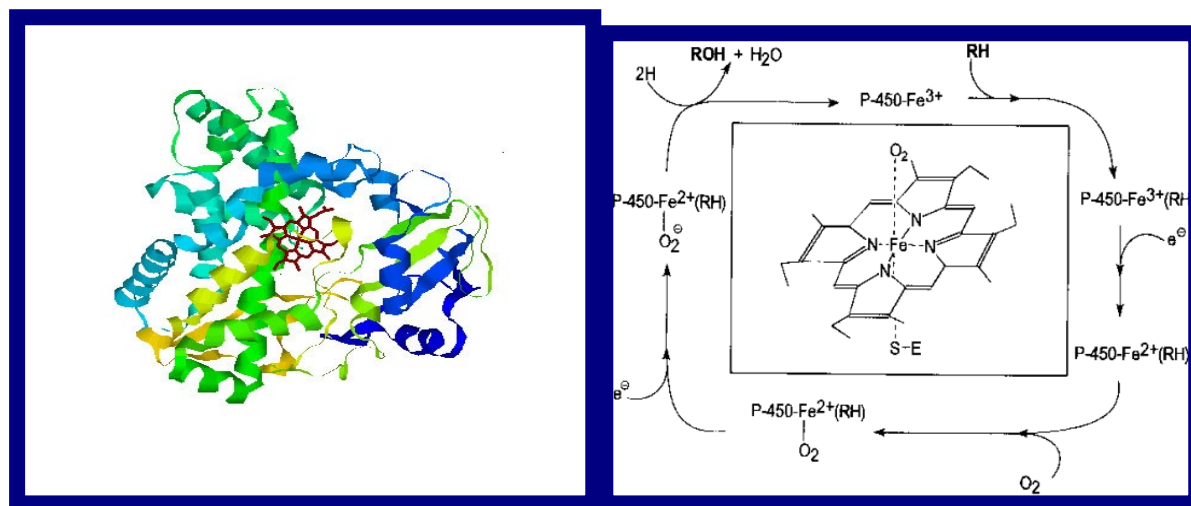
W konkluzji można stwierdzić, że dla wystąpienia interakcji metabolicznych pomiędzy badanymi związkami kluczową rolę odgrywa wielkość dawek ksenobiotyków. Z drugiej strony dla ujawnienia się patologicznych zmian narządowych istotne znaczenie posiada również czas trwania narażenia.

3. WSTĘP

Rozpuszczalniki organiczne, do których należą węglowodory alifatyczne i aromatyczne oraz ich pochodne chlorowcowe i nitrowe, alkohole, etery, ketony i estry są szeroko stosowane w przemyśle. Są one cieczami lotnymi, na ogół nierozpuszczalnymi w wodzie, z wyjątkiem związków polarnych. Główną drogą narażenia na te związki jest układ oddechowy, chociaż część z nich w wyniku dużej lipofilności wchłania się wydajnie również przez skórę. Chociaż niemal cała populacja ludzka jest narażona na rozpuszczalniki organiczne, to jednak duże zużycie rozpuszczalników w przemyśle sprawia, że są one zaliczane do ksenobiotyków przemysłowych.

Na toksyczność rozpuszczalników organicznych składają się dwa rodzaje działania: nieswoiste tj. drażniące na błony śluzowe, w tym górne drogi oddechowe, a także depresyjne na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) oraz swoiste – układowe, związane z ich budową chemiczną, wchłanianiem, rozmieszczeniem w tkankach, kumulacją, a przede wszystkim z aktywacją metaboliczną w procesie biotransformacji (Klaassen, 1996).

Rozpuszczalniki organiczne są utleniane lub redukowane przez mikrosomalny układ oksydaz o funkcji mieszanej (MFO), przy udziale cytochromów P-450 (CYP) (ryc. 1) oraz przez dehydrogenazy – alkoholową (ADH) i aldehydową (AIDH).



Rycina 1. **Cytochrom P-450: schemat budowy oraz procesu utleniania ksenobiotyków** (<http://quanta.synchem.kyoto-u.ac.jp/bioquant/images/p450.jpg>)

W toksycznym działaniu związków egzogennych, ulegających aktywacji metabolicznej, istotną rolę odgrywa indukcja CYP, zarówno drogą inicjacji transkrypcji odpowiednich izoform, jak i stabilizacji mRNA lub białek poszczególnych hemoproteidów.

Zwiększona zawartość cytochromu CYP w komórkach ma olbrzymie znaczenie praktyczne. Trzeba pamiętać, że metabolizowane przez CYP1A1 i A2 wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i aminy aromatyczne stają się w wyniku aktywacji metabolicznej mutagenami i kancerogenami, ponadto wzrasta gwałtownie toksyczność metabolitów pośrednich w porównaniu z substancjami wyjściowymi, ulega obniżeniu zdolność komórek do utylizacji wolnorodnikowych metabolitów oraz reaktywnych form tlenu, a także zmienia się istotnie toksykokinetyka przemian związków egzogennych.

U ssaków cytochromy uczestniczące w biotransformacji ksenobiotyków należą do 4 rodzin CYP1 – CYP4, a każda z nich jest aktywowana przez odmienny typ induktora. I tak, rodzina CYP1 wykazuje szczególną wrażliwość na związki należące do grupy policyklicznych węglowodorów aromatycznych (WWA), gdzie modelowymi induktorami są: 3-metylocholanren, β -naftoflawon oraz 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyna (TCDD). Rodzina CYP2 pobudzana jest do efektywnej syntezy *de novo* cytochromu przez fenobarbital, rodzina CYP3 – przez glukokortykoidy reprezentowane przez deksametazon oraz 16α karbonitryl pregnenolonu. Kolejna rodzina CYP4 podlega indukcji poprzez proliferatory peroksysomów, których przykładem jest clofibrat. Poza wymienionymi związkami, induktory stanowi obszerna grupa rozpuszczalników organicznych i produkty ich przemian, takie jak kwas trichlorooctowy, które indukują cytochromy CYP należące do rodziny czwartej, zaangażowane w hydroksylację kwasu laurowego i arachidonowego, poprzez uruchomienie proliferacji peroksysomów, siateczki śródplazmatycznej oraz uaktywnienie enzymów uczestniczących w β -oksydacji kwasów tłuszczowych. Indukcja ta dokonuje się za pośrednictwem jądrowego receptora zwanego PPAR (ang. Peroxisome Proliferator Activated Receptor), który po związaniu z substratem wyszukuje specyficzne sekwencje w DNA, aktywując transkrypcję pożądanego genu. Być może oddziaływanie pomiędzy PPAR i wspomnianymi induktorami odbywa się za pośrednictwem dotąd jeszcze niepoznanych przekaźników II rzędu (Kamiński i wsp., 2001).

Toksyczność rozpuszczalników organicznych jest bardzo zróżnicowana, podobnie różne są mechanizmy ich działania. Podobne jest jednak toksyczne działanie tych związków na ośrodkowy układ nerwowy, wątrobę i nerki (Chmielewski i wsp., 1976; Costa i Ivanetich, 1980; Døssing i Skinhoj, 1985; Elovaara i wsp., 1985).

Pomimo szerokich badań nad toksycznym działaniem rozpuszczalników organicznych na OUN niewiele wiadomo na temat mechanizmów prowadzących do zmian behawioralnych i osłabienia czynności motorycznych organizmu (Muti i Franchini, 1987).

Poza kilkoma substancjami, które wywołują typowe zmiany patologiczne w postaci obwodowej neuropatii, jak i dysfunkcji OUN, większość rozpuszczalników organicznych powoduje raczej efekty niespecyficzne, począwszy od zmian nastroju po utratę pamięci, choć najczęściej występującym efektem jest upośledzenie wykonania czynności wzrokowo-

ruchowych lub wydłużenie czasu reakcji na bodźce (Muti i Franchini, 1987).

Żadna z właściwości rozpuszczalników organicznych nie wyjaśnia obserwowanych efektów toksycznych, może z wyjątkiem powinowactwa do układu nerwowego, spowodowanego znaczną lipofilnością większości rozpuszczalników.

Sugeruje się, że za efekty toksyczne rozpuszczalników organicznych w układzie nerwowym może być odpowiedzialny spadek poziomu dopaminy w obszarach kory wzrokowej (*area striata*) i w drodze guzowo-lejkowej (*tractus tuberoinfundibularis*) (Muti i Franchini, 1987). Taki mechanizm postulowano w przypadku podostrej ekspozycji na styren. Jest on wspólny dla wielu monocyklicznych węglowodorów z grupami alkilowymi, metabolizowanych do produktów posiadających ugrupowanie alfa-ketokarboksyłowe w łańcuchu bocznym.

Wpływ na metabolizm dopaminy w mózgu jest częściej związany ze strukturą chemiczną metabolitów, a nie związków macierzystych. Dlatego wiele rozpuszczalników organicznych może wywoływać podobne efekty w OUN. Jest to wynikiem nieenzymatycznej kondensacji dopaminy z metabolitami ksenobiotyków, które mają reaktywną grupę karbonyłową w cząsteczce. Metabolity różnych rozpuszczalników, m.in. kwas fenyloglioksalowy powstający z etylobenzenu, styrenu i winylotoluenu, aldehyd trichlorooctowy będący produktem przemiany chlorowanych węglowodorów alifatycznych (trichloroetyleny, tetrachloroetyleny i in.), kwas glioksalowy powstający z glikolu etylenowego i jego pochodnych oraz formaldehyd i aldehyd octowy generowane w wyniku oksydacji odpowiednio metanolu i etanolu kondensują z dopaminą *in vitro*, tworząc tetrahydroizochinoliny (Muti i Franchini, 1987).

Reaktywne metabolity pośrednie tych związków, powodujące efekty narkotyczne lub prenarkotyczne są wspólne lub podobne do metabolitów narkotyków wziewnych. Na przykład, zarówno enfluran jak i metoksyfluran są metabolizowane *in vivo* do kwasu szczawiowego. Z kolei halotan jest metabolizowany do kwasu trifluorooctowego. Związki te powstają poprzez wspólne ogniwo - aldehyd trifluorooctowy, który jest chemicznie (i prawdopodobnie farmakologicznie) podobny do aldehydu trichlorooctowego, będącego metabolitem pośrednim (prekursorem kwasu trichlorooctowego) różnych chlorowanych węglowodorów alifatycznych o właściwościach narkotycznych (Muti i Franchini, 1987).

Z metabolicznego punktu widzenia występują więc uderzające podobieństwa pomiędzy narkotykami wziewnymi i niektórymi rozpuszczalnikami organicznymi, wywołującymi jak wiadomo ostre efekty neurobehawioralne. Fakt, że wszystkie reaktywne metabolity powyższych rozpuszczalników reagują z dopaminą sugeruje, że wyczerpanie zasobów dopaminy (spowodowane jej kondensacją do formy tetrahydroizochinolin) może odgrywać istotną rolę w toksycznym działaniu tych związków na OUN.

Odmienna teoria neurotoksycznego działania została zaproponowana dla n-heksanu,

którego głównym efektem toksycznego działania jest obwodowa polineuropatia czuciowo - ruchowa. Wykazano ją u ludzi eksponowanych na n-heksan lub 2-heksanon w warunkach przemysłowych oraz u zwierząt laboratoryjnych poddanych działaniu n-heksanu, 2-heksanonu, 2-heksanolu, 2,5-heksanodiolu, 5-hydroksy-2-heksanonu lub 2,5-heksanodionu (Couri i Milks, 1982). Działanie neurotoksyczne wymienionych związków wiązane jest ze strukturą γ -diketonów, będących ich metabolitami. Wskazują na to doświadczenia z 1-heksanolem, który u szczurów nie wywoływał objawów klinicznych, neurofizjologicznych i morfologicznych polineuropatii podczas 8-miesięcznego narażenia (Perbellini i wsp., 1978).

Cechą strukturalną polineuropatii wywołanej przez związki sześciowęglowe jest ogniskowa kumulacja 10 nm neurofilamentów powodująca obrzęk aksonów powyżej przewężenia Ranviera (*nodus neurofibrae*) (Chang, 1987; Chauplannaz i wsp., 1982; Ladefoged i wsp., 1989). Te strukturalne zmiany połączone były z blokadą szybkiego transportu aksonowego, co tłumaczono uszkodzeniem metabolizmu energetycznego poprzez hamowanie aktywności enzymów glikolitycznych - dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego i fosfofruktokinazy [Spencer i wsp. (cyt. za Couri i Milks, 1982); Jorgensen i Cohr, 1981; Ladefoged i wsp., 1989]. Z kolei Graham (cyt. za Couri i Milks, 1982) i Abou-Donia (1982) postulują, że między i wewnątrzcząsteczkowe usieciowanie neurofilamentów prowadzi do ich agregacji, co powoduje zaburzenia w szybkim transporcie aksoplazmatycznym i degenerację aksonów. Zgodnie z tym neurotoksyczne działanie γ -diketonów można częściowo wyjaśnić ich różną rozpuszczalnością w wodzie, a także zdolnością do wytwarzania zasad Schiffa z grupami aminowymi białek. Inne mechanizmy biochemiczne działania neurotoksycznego γ -diketonów to hamowanie biosyntezy steroli i ubichinonu, inaktywacja tiaminy, efekty chelatowania wapnia oraz zahamowanie aktywności esterazy cholinowej (Couri i Milks, 1982; Ladefoged i wsp., 1989).

Niezależnie od mechanizmu powstawania zaburzeń ze strony układu nerwowego za najczulszą metodę dla wykazania toksycznego działania rozpuszczalników organicznych u zwierząt laboratoryjnych uważane są przez wielu badaczy testy behawioralne.

Analiza zachowania może służyć jako przydatne narzędzie do oceny neurotoksyczności substancji chemicznych. Produktem aktywności układu nerwowego jest m.in. zachowanie, a więc zmiany wywołane czynnikiem toksycznym w obrębie OUN będą znajdowały odzwierciedlenie w zachowaniu zwierząt. I dlatego wpływ czynników fizycznych i chemicznych na organizmy żywe może być oceniany na podstawie różnorodnych form zachowania (behawioru) tych organizmów, zwłaszcza że wiele substancji chemicznych może być przyczyną bardzo subtelnych uszkodzeń układu nerwowego. Ponadto, układ nerwowy (a więc także zachowanie) podlega wpływom ze strony innych układów i narządów. Dlatego niezależnie czy miejscem działania czynnika toksycznego jest układ nerwowy, czy inne układy, efektem ostatecznym będzie ograniczenie zdolności organizmu

do interakcji ze środowiskiem zewnętrznym, przejawiające się w formie zaburzenia funkcji czuciowo - ruchowych lub poznawczych (Goldberg i wsp., 1964).

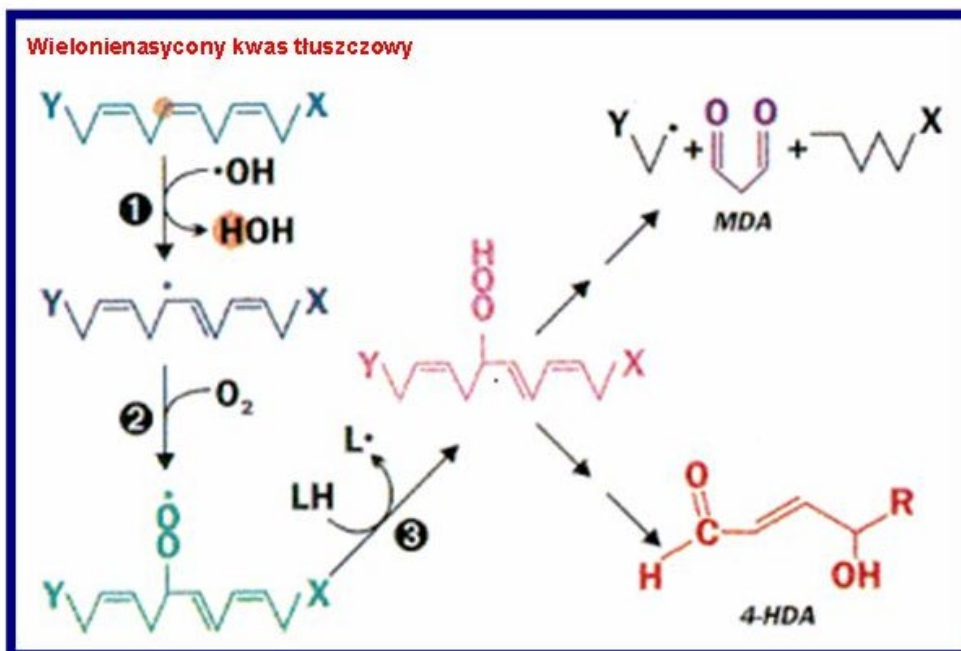
Niektórzy autorzy podają (Puchalska, 1985; Feldman i wsp., 1985; White i Proctor, 1997), że testy wykrywające wczesne zaburzenia czynnościowe w układach i narządach, a w szczególności w OUN, są czulsze od badań histopatologicznych, wykazujących w większości przypadków nieodwracalne zmiany w narządach wewnętrznych. Z drugiej strony wskaźniki elektrofizjologiczne są tylko w nieznacznym stopniu modyfikowane w wyniku zawodowego narażenia na niskie poziomy mieszanin rozpuszczalników organicznych i wykazują podobieństwo do narażenia na pojedyncze rozpuszczalniki (Muti i Franchini, 1987).

Często zdarza się, że przy zawodowym narażeniu na rozpuszczalniki organiczne objawy ze strony układu nerwowego są znacznie wyraźniej postrzegane niż inne skutki narażenia (Døssing i Skinhoj, 1985). Dotyczy to zwłaszcza hepatotoksyczności, której objawy kliniczne są często niespecyficzne i odwracalne, a ich wystąpienie jest konsekwencją aktywacji metabolicznej tych związków (Cottrel, 1976).

Wątroba odgrywa zasadniczą rolę w przemianach metabolicznych większości związków chemicznych. Główny układ metabolizujący ksenobiotyki i niektóre substancje endogenne jest zlokalizowany w siateczce śródplazmatycznej gładkiej (frakcja mikrosomalna), przy czym elementami odgrywającymi tu zasadniczą rolę katalityczną są: CYP i reduktaza CYP NADPH-zależna. Zwykle przemiany metaboliczne na drodze oksydo-redukcyjnej aktywują substancję macierzystą (reakcje I fazy), podczas gdy sprzęganie z substancjami endogennymi (reakcje II fazy) prowadzi do wzrostu polarności i rozpuszczalności w wodzie, co sprzyja wydalaniu ich z organizmu i jest znamienne dla procesów detoksykacyjnych. Pomimo ważnej roli wątroby w metabolizmie substancji toksycznych stosunkowo rzadko dochodzi do jej uszkodzenia w ostrych zatruciach, a częściej w przebiegu zatruc przewlekłych. Hepatocyty przeciążone ksenobiotykiem w zatruciu ostrym mniej wydajnie metabolizują ksenobiotyki w porównaniu do zatrucia przewlekłego. Substancje hepatotoksyczne lub ich metabolity działają na miąższ wątrobowy w złożony sposób: przez uszkodzenie systemu błonowego samej komórki, przez zmniejszenie ilości grup tiolowych (-SH) w hepatocycie lub poprzez upośledzenie oddychania tkankowego. W efekcie doprowadza to do upośledzenia procesów oksydoredukcyjnych, zaburzeń w przemianach białkowych, tłuszczowych i węglowodanowych oraz zaburzeń transportu wewnątrzkomórkowego (Costa i Ivanetich, 1980; Plewka i wsp., 1998).

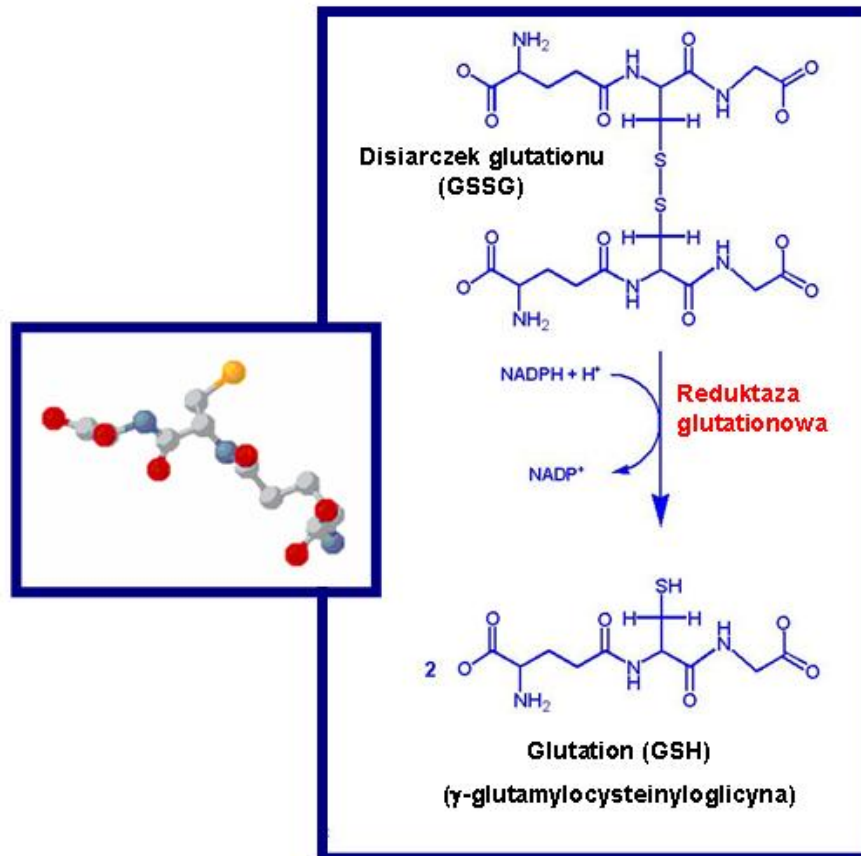
Uszkodzenia lipidowych struktur błonowych komórki zachodzą pod wpływem m.in. chlorowcopochodnych węglowodorów i niektórych innych rozpuszczalników, takich jak alkany. Substancje te generują rodnikowe metabolity pośrednie lub aktywne formy tlenu,

które działają na nienasycone kwasy tłuszczowe błon komórkowych i struktur błonowych komórki powodując ich peroksydację (ryc. 2). Uszkodzenie błon leży u podstaw niektórych efektów hepato-, nefro- i neurotoksycznych (Guder i wsp., 1990, Stetkiewicz, 1992; Gago-Dominguez i wsp., 2002).



Rycina 2. **Peroksydacja lipidów z udziałem rodnika hydroksylowego**
http://www.rndsistemas.com/asp/g_sitebuilder.asp?bodyId=222

Zjawisko to występuje w przypadku zaburzenia równowagi między proutleniaczami (związki uwalniające aktywne formy tlenu) a przeciwutleniaczami, które usuwają te postacie tlenu, „zmiatają” je, ograniczają lub przeciwdziałają ich tworzeniu. Zmiataczami aktywnych form tlenu są enzymy antyoksydacyjne, takie jak dyzmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (KT) oraz zawierająca selen peroksydaza glutationowa (GPx), która wykorzystując zredukowany glutation (GSH) rozkłada nadtlenek wodoru (H_2O_2), w wyniku czego powstaje H_2O i glutation utleniony (GSSG), zredukowany ponownie przy udziale reduktazy glutationowej NADPH-zależnej (ryc. 3). Zaburzenie równowagi pro-/antyoksydacyjnej, zwane stresem oksydacyjnym, może prowadzić do poważnych uszkodzeń komórki, w tym także do jej śmierci nekrotycznej.



Rycina 3. **Cząsteczka glutationu i działanie reduktazy glutationowej**
 (<http://www.cfsn.com>; <http://www.med.unibs.it/~marchesi/ppp.html>).

Ważnym zagadnieniem, nie w pełni poznany, jest ryzyko zdrowotne związane z narażeniem łącznym na kilka substancji równocześnie. Ekspozycja na alkohole alifatyczne i związki ketogenne, jak aceton mogą nasilać hepatotoksyczność chlorowanych – i prawdopodobnie również – aromatycznych rozpuszczalników organicznych. Te obserwacje są wynikiem głównie doświadczeń na zwierzętach, lecz także wskazują na nie dane z obserwacji w przemyśle.

Obserwowano ciężkie uszkodzenia wątroby u pracowników narażonych na różne związki chemiczne, spośród których żaden nie był silnym czynnikiem hepatotoksycznym a poziomy ekspozycji były znacznie poniżej wartości dopuszczalnych (Døssing i Skinhoj, 1985).

Jest to bardzo istotny problem, bowiem pracownicy w środowisku pracy oraz użytkownicy różnych preparatów chemii gospodarczej są na ogół narażeni na kilka substancji toksycznych równocześnie. Łączne narażenie na kilka substancji toksycznych może prowadzić do różnych skutków w stosunku do tych, które występują w warunkach narażenia na pojedyncze substancje.

Wzajemne oddziaływanie dwu lub więcej substancji chemicznych w obrębie dowolnego układu nosi miano interakcji. Teoretyczna możliwość interakcji znanych substancji chemicznych przekracza zdolności przewidywania. Ważne są również ilościowe różnice skutków interakcji, wynikające ze zróżnicowanych dawek lub stężeń substancji chemicznych wchłanianych do organizmu. Badania łącznego działania toksycznego stanowią obecnie jedno z ważnych i trudnych zadań toksykologii o znaczeniu praktycznym. Obejmują one ocenę możliwych modyfikacji toksycznego działania jednej substancji przez inną i mechanizmów odpowiedzialnych za te modyfikacje.

Już od czasów, kiedy to Ikeda i wsp. (1972) wykazali supresję oksydacji benzenu i styrenu przez toluen w warunkach *in vivo*, liczba doniesień na temat interakcji metabolicznych i toksykodynamicznych różnych substancji znacznie wzrosła. Najwięcej doniesień z tego zakresu dotyczyło najczęściej stosowanych rozpuszczalników organicznych, zwłaszcza węglowodorów aromatycznych i alifatycznych oraz ich halogenopochodnych. Liczne doniesienia dotyczyły wpływu etanolu oraz niektórych leków na metabolizm ksenobiotyków. Generalnie uważa się, że interakcje metaboliczne występują przy wyższych poziomach narażenia. W przypadku ksenobiotyków przemysłowych powyżej wartości normatywnych (NDS). Interakcje te mają na ogół podłoże metaboliczne wynikające z różnic w powinowactwie ksenobiotyków do enzymów biotransformujących. Można je również wiązać z indukcją odpowiednich form molekularnych CYP o zróżnicowanym powinowactwie do substratu. Dla przykładu: fenobarbital indukuje u szczurów hydroksylazę benzenową o małym powinowactwie do benzenu, podczas gdy sam benzen indukuje ten sam enzym o znacznie większym powinowactwie, zaś etanol indukuje dwa izoenzymy hydroksylazy benzenowej różniące się między sobą siedmiokrotnie powinowactwem substratowym. Obserwowano również zróżnicowane powinowactwo ksenobiotyków do swoistych receptorów. Dla przykładu: dioksyny i związki pokrewne wykazują większe powinowactwo do cytozolowego receptora Ah niż wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.

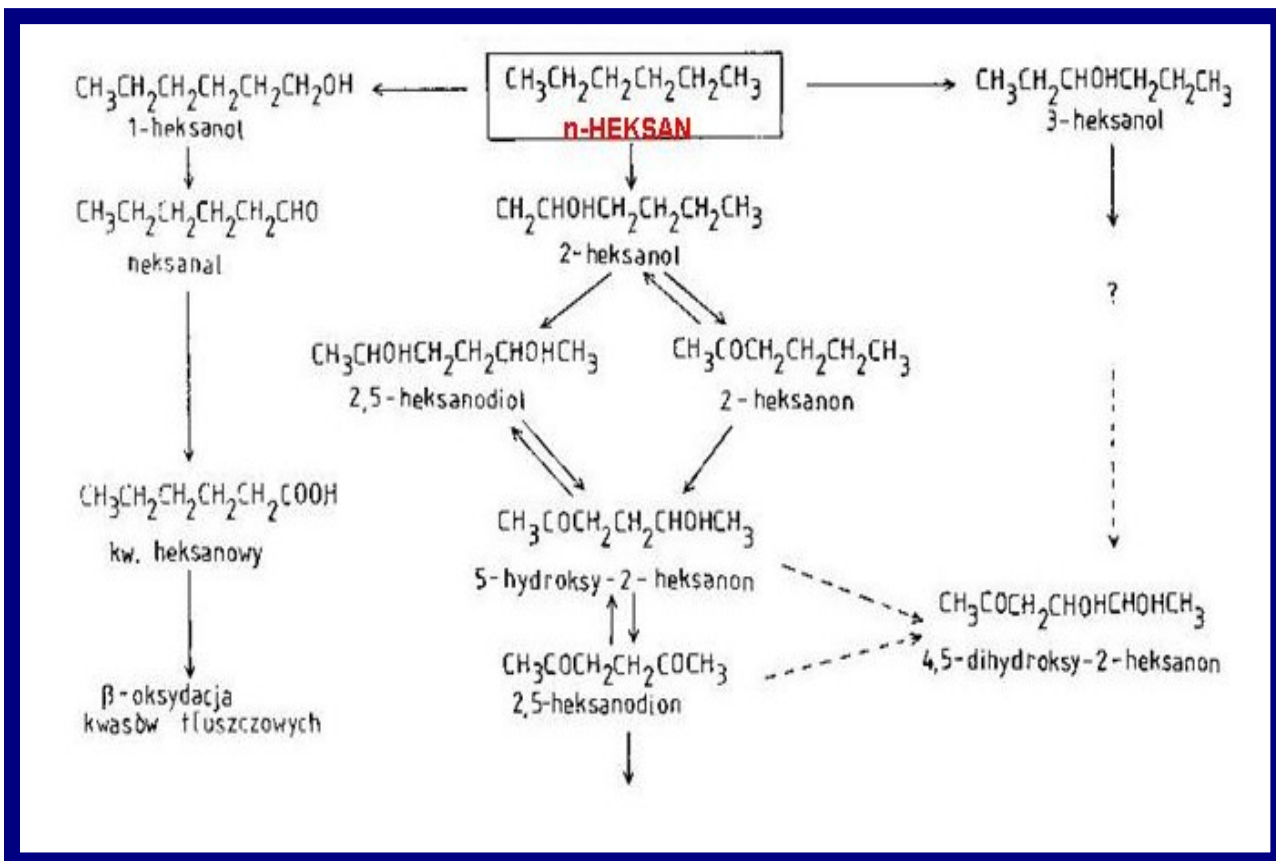
W związku z rozwojem chemii istnieje potencjalna możliwość występowania tysięcy kombinacji substancji chemicznych, których działanie toksyczne jest teoretycznie trudne do przewidzenia, a w praktyce niemożliwe do oceny. Badania ostatnich lat wykazały, że większość znanych interakcji toksykologicznych ma charakter toksykokinetyczny, obejmuje bowiem procesy biotransformacji, wewnątrzustrojowej dystrybucji i wydalania. O łącznym efekcie działania dwu lub więcej substancji decydują ich mechanizmy działania, które mogą być bardzo różne i nie zawsze dostatecznie poznane. Niektóre z możliwych mechanizmów obejmują konkurencyjne lub niekonkurencyjne wiązanie się z białkami przENOŚNIKOWYMI, enzymatycznymi lub receptorowymi, w tym także indukcję lub inhibicję ich biosyntezy (Klaassen, 1996; Bandiera i wsp., 1983; Keys i wsp., 1986).

Z punktu widzenia oceny narażenia zawodowego szczególne znaczenie posiadają interakcje metaboliczne. Z drugiej strony znajomość interakcji toksykodynamicznych, zwłaszcza addytywności, synergizmu i potencjalizacji, istotnie wpływa na szacowanie ryzyka zdrowotnego.

Narażenie pracowników na równoczesne działanie wielu substancji chemicznych, to zjawisko powszechnie występujące w środowisku pracy. Jest to szczególnie widoczne w przemyśle farb i lakierów, gdzie są stosowane wieloskładnikowe mieszaniny rozpuszczalników organicznych. Ocena narażenia przeprowadzona w 5 zakładach tego przemysłu w Polsce wykazała, że pracownicy są narażeni na prawie 40 różnych substancji chemicznych (Wesołowski i Gromiec, 1997).

Zarówno n-heksan (n-H), etylobenzen (EB) jak i tetrachloroetylen (TET) są szeroko stosowane w przemyśle m.in. jako rozpuszczalniki farb, lakierów, żywic, gumy i klejów. Są również składnikami wielu preparatów do czyszczenia na sucho oraz rozcieńczalników. Stosowane są w przemyśle gumowym, obuwniczym, spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym i chemicznym (Jorgensen i Cohr, 1981; Elovaara i wsp., 1985; Marth, 1987), tak więc liczba pracowników narażonych na ich oddziaływanie jest bardzo duża. Zważywszy, że obok narażenia zawodowego na rozpuszczalniki organiczne znaczącą rolę odgrywa również narażenie pozazawodowe związane z ich szerokim zastosowaniem w życiu codziennym, celowa wydaje się ocena ich łącznego toksycznego działania. Jest to tym bardziej uzasadnione, że związki te posiadają wspólne ogniwo metaboliczne, jakim jest oksydacja zachodząca przy udziale MFO. Heterogenność i indukcyjność CYP, będącego komponentem MFO warunkują interakcje metaboliczne lipofilnych ksenobiotyków na poziomie enzymów mikrosomalnych.

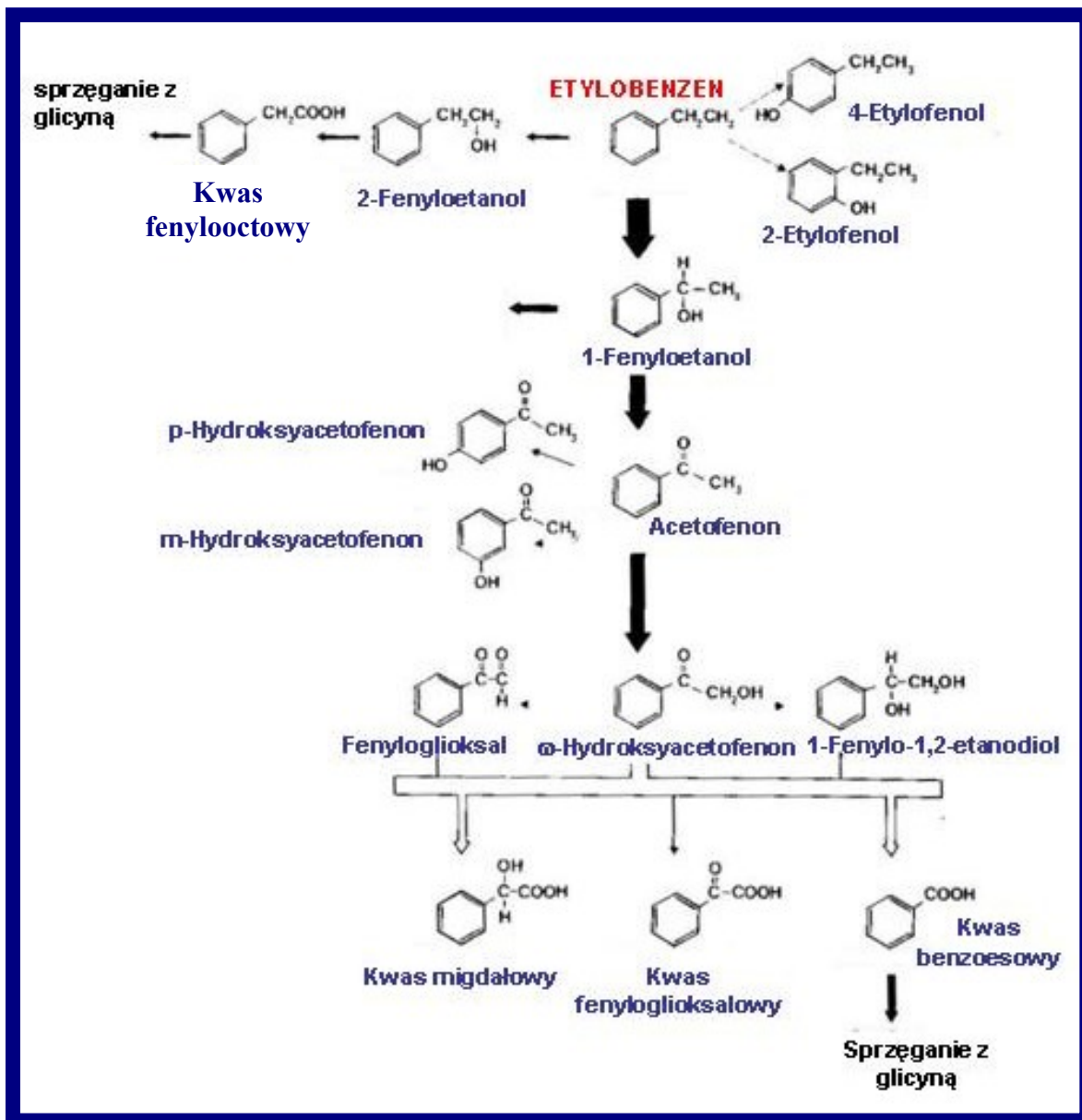
W przypadku narażenia na n-H układem krytycznym jest obwodowy układ nerwowy. Efektem krytycznym jest zespół objawów klinicznych, zmian elektrofizjologicznych i morfologicznych w nerwach czuciowych i ruchowych oraz włóknach mięśni szkieletowych określane mianem polineuropatii obwodowej. Za działanie neurotoksyczne n-H jest odpowiedzialny jego metabolit - 2,5-heksanodion (2,5-HD), który powstaje wskutek utleniania n-heksanu w wątrobie przez mikrosomalne monooksydazy z udziałem CYP (ryc. 4). Metabolit ten jest wydalany przez nerki (Jorgensen i Cohr, 1981). Upośledzenie przemian metabolicznych n-heksanu do γ -diketonu może osłabiać neurotoksyczne działanie n-heksanu, natomiast stymulacja przemian metabolicznych może je nasilać.



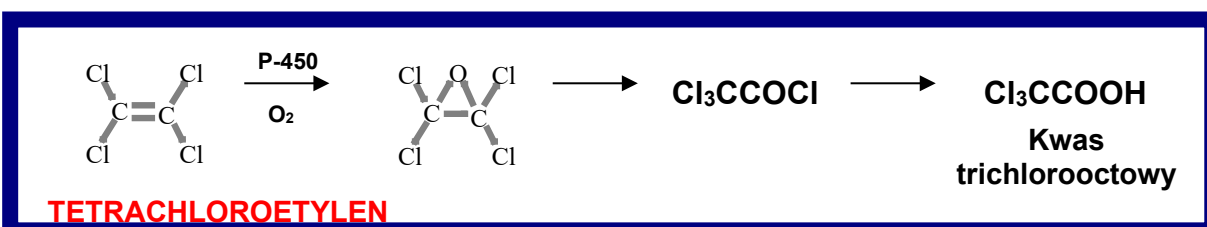
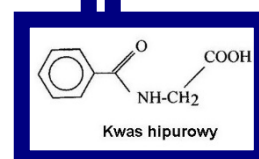
Rycina 4. Schemat biotransformacji n-heksanu (Perbellini i wsp., 1980; Fedtke i Bolt, 1987; Manini i wsp., 1999)

Etylobenzen w postaci par działa drażniąco na błony śluzowe i skórę. W wysokich stężeniach wywiera działanie narkotyczne. Biotransformacja EB zachodzi w komórkach wątroby i innych narządów przy udziale mikrosomalnych monoooksygenaz. Głównym metabolitem EB u ludzi jest kwas migdałowy, a u gryzoni kwas hipurowy (HA) (Elovaara i wsp., 1985; Engström, 1984) (ryc. 5).

Tetrachloroetylen wykazuje działanie drażniące i narkotyczne, pobudza wegetatywny układ nerwowy oraz wywołuje neuropatie obwodowe. Działa również toksycznie na wątrobę (hepatotoksyczność) i nerki (nefrotoksyczność). Także przemiany metaboliczne TET zachodzą na drodze utleniania do odpowiedniego epoksydu przy udziale mikrosomalnej monoooksygenazy. Końcowym produktem tej przemiany jest kwas trichlorooctowy (TCA) wydalany z moczem (ryc. 6).

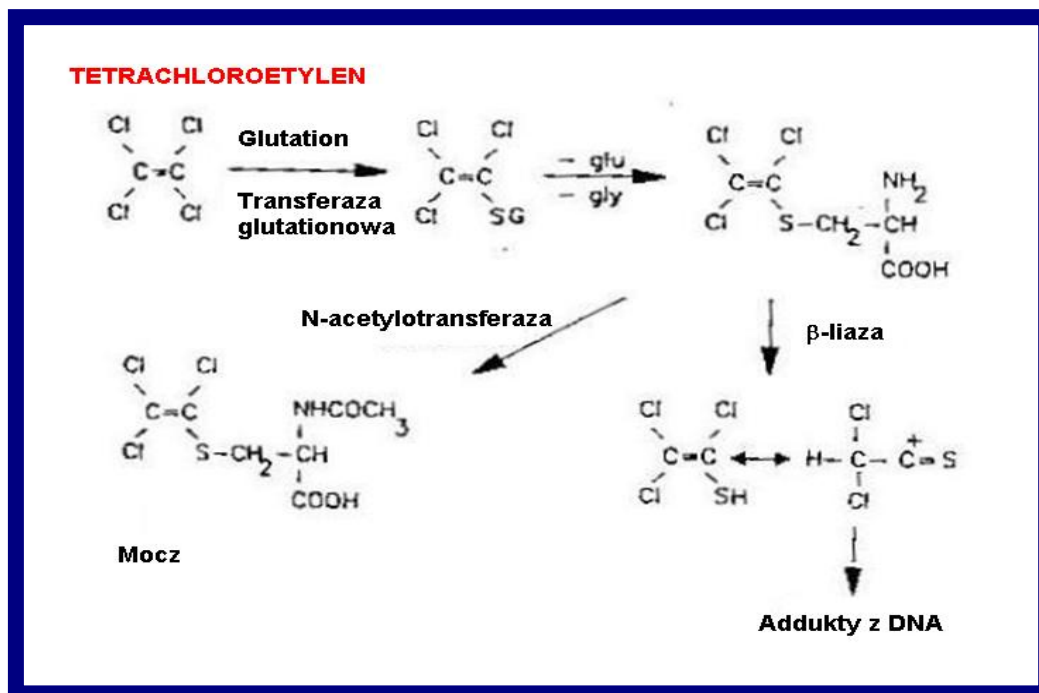


Rycina 5. Schemat biotransformacji etylobenzenu
(<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc186.htm>)



Rycina 6. Schemat biotransformacji tetrachloroetyleny do kwasu trichlorooctowego (Green, 1990).

W wyższych stężeniach istnieje możliwość sprzęgania tetrachloroetyleny z glutationem (GSH) (ryc. 7) i tworzenie adduktów. Mechanizm taki, częściej niż u człowieka (u którego aktywność S-transferazy glutationowej jest niższa) spotykany jest u szczurów i myszy. Jest to przemiana metaboliczna odpowiedzialna za działanie nefrotoksyczne, mutagenne oraz kancerogenne TET u gryzoni na komórki nabłonkowe kanalików nerkowych, w których wysoką aktywność wykazuje β -liaza. Produktem tej przemiany jest aktywny elektrofil – tioketon.



Rycina 7. Schemat biotransformacji tetrachloroetyleny zachodzącej poprzez sprzężenie z glutationem (Green, 1990).

Proces biotransformacji TET u ludzi i gryzoni cechujący się małą wydajnością (ok. 10 - 20% dawki), wykazuje kinetykę wysycenia tzn. wzrost narażenia na TET prowadzi do przebiegu reakcji z graniczną szybkością maksymalną (V_{max}) zgodnie z kinetyką zerowego rzędu. U zwierząt doświadczalnych przeważa działanie hepatotoksyczne i nefrotoksyczne tego związku (Marth, 1987).

TET, podobnie jak n-H i EB, kumuluje się w tkankach bogatych w lipidy, podczas gdy metabolity n-H i TET mogą łączyć się z białkami i kwasami nukleinowymi tworząc addukty, co prowadzi do polineuropatii obwodowej u ludzi oraz efektów genotoksycznych i rakotwórczych u gryzoni (Jorgensen i Cohr, 1981; Elovaara i wsp., 1985; Marth, 1987; Engström, 1984).

W przypadku większości rozpuszczalników organicznych główną i najlepiej zbadaną drogą narażenia (zawodowego) jest układ oddechowy, ale związki te wchłaniają się również przez skórę i z przewodu pokarmowego. TET ulega wchłanianiu w postaci ciekłej przez

nieuszkodzoną skórę z szybkością 1,64 mg/cm²/godz., natomiast szybkość wchłaniania n-H tą drogą wynosi 0,31 mg/cm²/godz.(Jakubowski, 1997).

Do oceny narażenia łącznego wykorzystuje się dane pochodzące z badań epidemiologicznych, badań ochotników oraz badań doświadczalnych na zwierzętach. Te ostatnie mogą dostarczyć pełniejszych informacji odnośnie możliwych interakcji pomiędzy substancjami toksycznymi, co ma znaczenie praktyczne dla prognozowania skutków narażenia na mieszaniny substancji chemicznych w środowisku pracy.

Badania doświadczalne są istotne dla wyjaśnienia mechanizmów łącznego działania ksenobiotyków oraz do jakościowej oceny interakcji. Dane te mogą być wykorzystane do ukierunkowania obserwacji ludzi narażonych.

4. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Podjęcie pracy mającej na celu ustalenie, czy pomiędzy stosowanymi łącznie rozpuszczalnikami organicznymi o różnej budowie chemicznej (TET, EB i n-H) występują interakcje, określenie ich ewentualnego rodzaju oraz układu, w obrębie którego wystąpią, wynika z następujących przesłanek:

- istnieje realne, bardzo często obserwowane w przemyśle, duże ryzyko zdrowotne związane z narażeniem łącznym na kilka substancji równocześnie, które ze względu na ogromną różnorodność stosowanych związków stanowi wciąż jeszcze *terra incognita* tak dla toksykologów, jak i pracowników narażonych równocześnie na te substancje;
- wybrane rozpuszczalniki organiczne są często stosowane w przemyśle, ale także i życiu codziennym, co znacząco zwiększa populację osób narażonych na ich działanie;
- wybrane związki posiadają wspólne ogniwo metaboliczne, a biorąc pod uwagę istotne znaczenie aktywacji metabolicznej w patogenezie zatruc, istnieją podstawy do domniemywania, iż łączne narażenie na te związki będzie wpływało modyfikująco na obraz zatrucia;
- należałoby wyjaśnić, w jakim kierunku zmiany te prowadzą.

Celem pracy jest więc ocena możliwych interakcji metabolicznych TET, EB i n-H podawanych w mieszaninach dwuskładnikowych różnymi drogami w sposób powtarzany.

Dodatkowym celem była ocena interakcji toksykodynamicznych tych związków w zakresie działania neurotoksycznego i hepatotoksycznego oraz procesów prooksydacyjnych w narządach mięsnych.

Przyjęto następującą hipotezę roboczą:

Łączne podawanie tetrachloroetylenu (TET) w mieszaninach dwuskładnikowych z etylobenzenem (EB) lub n-heksanem (n-H) w sposób powtarzany skutkuje wystąpieniem interakcji toksykokinetycznych w zakresie metabolizmu badanych związków. Możliwe są także interakcje toksykodynamiczne w zakresie działania neurotoksycznego i hepatotoksycznego oraz prooksydacyjnego.

Podstawą analizy jest porównanie zmian występujących w szybkości i kierunku przemian metabolicznych ocenianych na podstawie stężeń metabolitów związków macierzystych wydalanych z moczem, modyfikacje działania hepatotoksycznego wyrażonego zmianami enzymatycznymi i biochemicznymi, modyfikacje działania prooksydacyjnego oraz neurotoksyczności ocenianej metodami behawioralnymi u zwierząt laboratoryjnych narażanych na poszczególne rozpuszczalniki oddzielnie oraz podawanych w mieszaninach dwuskładnikowych.

5. MATERIAŁ I METODY

5.1 Odczynniki

Do badań użyto następujące rozpuszczalniki organiczne cz.d.a.:

- 1,1,2,2-tetrachloroetylen,
- etylobenzen i
- n-heksan,

produkowane przez firmę Riedel-de Haën.

5.2 Zwierzęta laboratoryjne

Badania przeprowadzono na szczurach Wistar, samcach, pochodzących z hodowli Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie, w wieku 3 - 4 miesiące, o masie ciała 204 - 368 g. Badania doświadczalne wykonano w latach 1995 – 1997, tj. w okresie, kiedy nie wymagano zgody Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach.

Przez okres 14 dni przed doświadczeniem i podczas doświadczenia zwierzęta przebywały w metalowych klatkach po 5 sztuk w standardowych warunkach światło/ciemność (LD: 06.00-18.00 / 18.00 - 6.00). Temperatura powietrza wynosiła średnio 21 °C, a wilgotność względna 45 - 50%. Standardową paszę LSM i wodę wodociągową (filtrowaną) zwierzęta otrzymywały *ad libitum*.

5.3 Przebieg doświadczenia i zakres badań

Badania przeprowadzono na dwóch modelach doświadczalnych:

- narażenie powtarzane krótkoterminowe (28 dni) drogą podskórną,
- narażenie podprzewlekłe (90 dni) drogą pokarmową (badane substancje pobierane z wodą do picia).

5.3.1 Dawkowanie rozpuszczalników

5.3.1.1 Ekspozycja powtarzana krótkoterminowa

W eksperymencie 28-dniowym szczury otrzymywały podskórną roztwory TET, EB i n-H w oliwie z oliwek pojedynczo lub w mieszaninach dwuskładnikowych, równomolowych (1:1). Dawka pojedynczego związku wynosiła 0,45 mmola/kg m.c., co dla tetrachloroetylen

odpowiada 75 mg/kg m.c., dla etylobenzenu 48 mg/kg m.c. a dla n-heksanu 39 mg/kg m.c. Dawki te stanowiły odpowiednio 1/118; 1/114 oraz 1/736 dawek LD₅₀ poszczególnych związków wyznaczonych dla szczura po podaniu *per os*.

Grupa kontrolna otrzymywała podskórnie oliwę z oliwek.

Objętość podawanych roztworów lub oliwy wynosiła 1 ml/kg m.c.

5.3.1.2 Ekspozycja podprzewlekle

Zwierzęta otrzymywały w wodzie do picia TET, n-H lub EB w stężeniach odpowiednio 905, 226 i 226 µmol/l lub dwuskładnikowe mieszaniny TET z n-H lub TET z EB w stosunku molowym 1:0,25 (TET = 1) codziennie przez okres 90 dni. Podawane roztwory miały charakter roztworów nasyconych.

Grupa kontrolna otrzymywała tylko wodę. Średnie pobranie tetrachloroetyleny, etylobenzenu i n-heksanu z wodą do picia wynosiło odpowiednio 3,04; 0,49 i 0,39 mg/kg/dzień.

5.3.2 Zakres badań laboratoryjnych

Zakres badań obejmował ocenę metabolizmu badanych związków, ocenę neurotoksyczności za pomocą testów behawioralnych oraz ocenę hepatotoksyczności za pomocą wskaźników biochemicznych.

5.3.2.1 Ocena metabolizmu badanych związków

Przebieg metabolizmu badanych związków oceniono w doświadczeniu 28 i 90-dniowym. Metabolity badanych związków oznaczano w dobowych porcjach moczu zbieranych na końcu każdego tygodnia (doświadczenie 28-dniowe) lub na końcu miesiąca (doświadczenie 90-dniowe) trwania narażenia.

W moczu zwierząt eksponowanych na badane rozpuszczalniki oznaczano stężenia następujących metabolitów:

- kwasu trichlorooctowego (TCA) przy narażeniu na tetrachloroetylen,
- kwasu hipurowego (HA) przy narażeniu na etylobenzen,
- 2,5-heksanodionu (2,5-HD) przy narażeniu na n-heksan.

Wszystkie metody były walidowane z określeniem progu oznaczalności, zakresu liniowości i precyzji metody. Równocześnie prowadzono wewnątrzlaboratoryjną kontrolę oznaczeń za pomocą niekomercyjnych roztworów wzorcowych (tab.1).

Tabela 1. Walidacyjne wskaźniki metod oznaczania TCA, HA i 2,5-HD w moczu.

Oznaczany metabolit	Próg oznaczalności	Zakres liniowości	Precyzja
TCA	4,1 µg/ml	0,0 – 98,1 µg/ml	4,5 %
HA	0,4 mg/ml	0,0 – 1,6 mg/ml	9,8 %
2,5-HD	0,5 mg/ml	0,0 – 5,0 mg/ml	4,3 %

5.3.2.1.1 Oznaczanie kwasu trichlorooctowego (TCA) w moczu (wg Ogata i wsp., 1974)

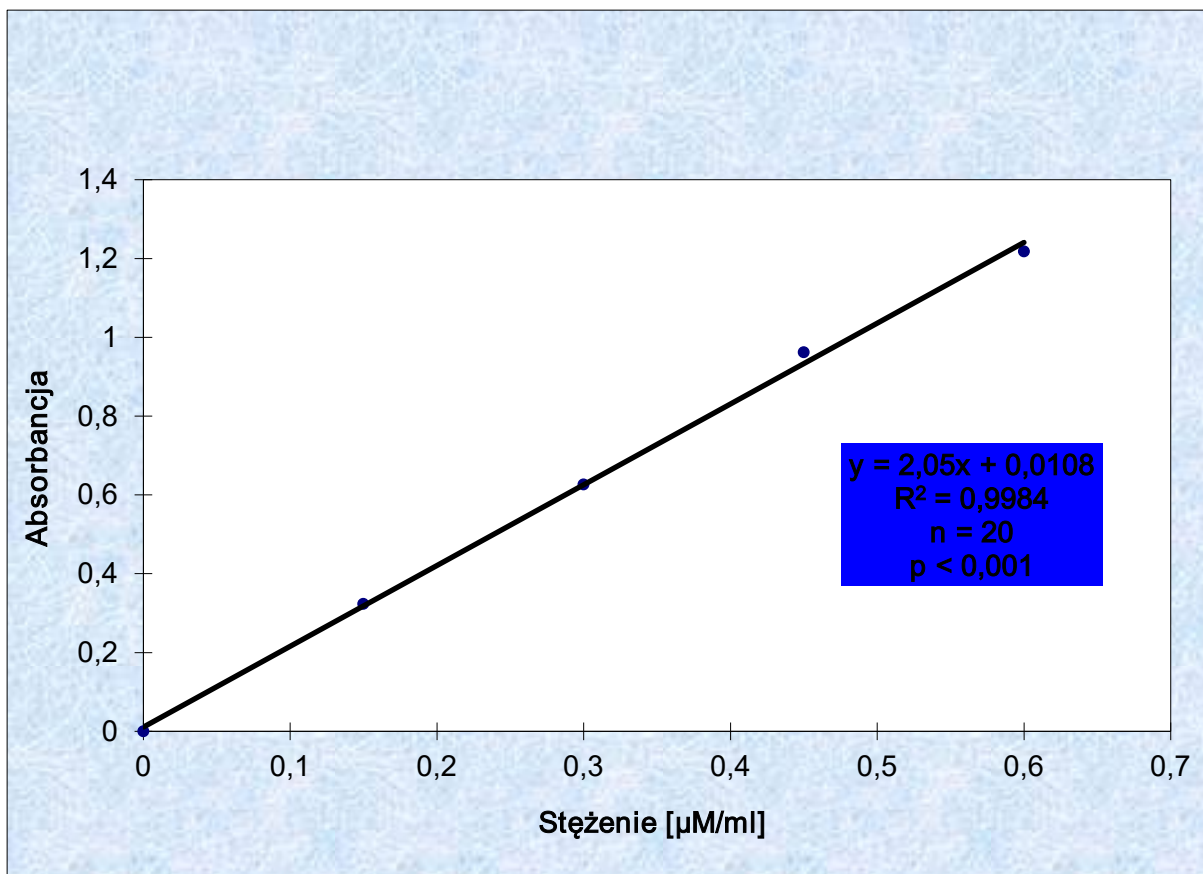
Oznaczanie kwasu trichlorooctowego oparte jest na reakcji Fujiwary polegającej na tworzeniu się czerwonego produktu reakcji chlorowcopochodnych alifatycznych z pirydyną w środowisku alkalicznym.

Do 0,5 ml moczu (próbna ślepa zawiera zamiast moczu 0,5 ml wody) umieszczonego w probówce z korkiem na szlifie dodaje się 0,5 ml odczynnika utleniającego¹ i natychmiast neutralizuje trzymając probówkę w lodzie poprzez dodanie 3 ml 10 N roztworu KOH oraz 3 ml pirydyny. Mieszaninę należy dobrze wytrząsnąć. Następnie probówkę umieszcza się we wrzącej łaźni wodnej na 3 min. dla rozwinięcia barwy, po czym oziębia w łaźni z lodem przez 5 min. Do oznaczenia pobiera się 2 ml warstwy pirydynowej i dodaje 0,5 ml odczynnika p-toluidyna - kwas mrówkowy². Mieszaninę reakcyjną po wymieszaniu pozostawia się na 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie mierzy absorbancję przy 500 nm.

W celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej przygotowuje się roztwory kwasu trichlorooctowego zawierające kolejno: 0,0; 0,15; 0,30; 0,45 i 0,60 µM/ml tego związku (ryc. 8).

¹ Utleniacz: roztwór bezwodnika chromowego (CrO₃) w stężonym HNO₃

² Wywoływacz barwy: roztwór chlorowodoru p-toluidyny w 85% kwasie mrówkowym.

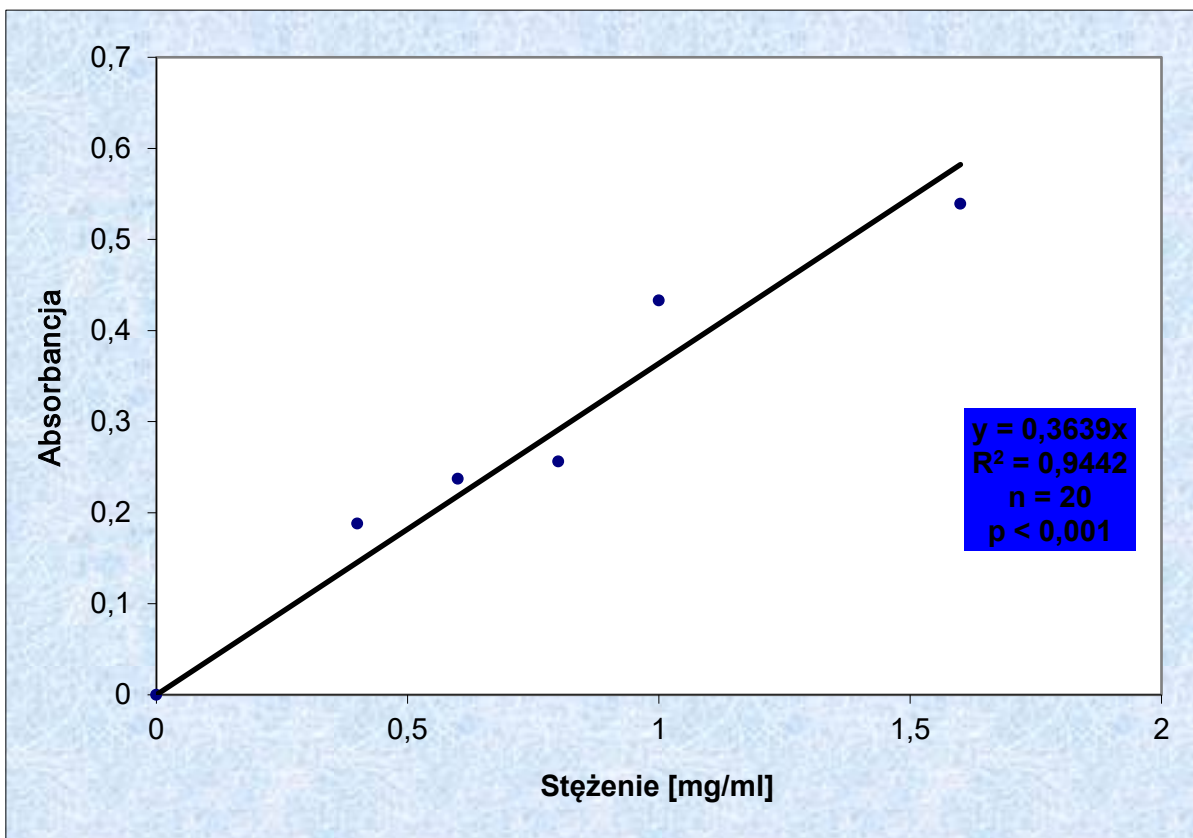


Rycina 8. Krzywa kalibracji dla kwasu trichlorooctowego.

5.3.2.1.2 Oznaczanie kwasu hipurowego w moczu (wg Ogata i wsp., 1969)

1 ml moczu przenosi się do probówki z korkiem na szlifie, doprowadza pH do 2,0 za pomocą stężonego HCl (ok. 0,1 ml) i wysyca NaCl (0,4 g). Kwas hipurowy ekstrahuje się dwukrotnie 2 ml octanu etylu przez 5 minut. Następnie 0,2 ml ekstraktu przenosi się do probówki i odparowuje rozpuszczalnik azotem. Do pozostałości dodaje się 2 ml pirydyny. Do kolejnej probówki pobiera się 0,5 ml roztworu pirydynowego, dodaje 0,2 ml chlorku benzenosulfonylu i pozostawia na 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodaje się 4,3 ml chloroformu i mierzy absorbancję przy 380 nm wobec roztworu chlorku benzenosulfonowego w pirydynie.

Krzywą wzorcową otrzymano używając wodnych roztworów kwasu hipurowego w stężeniach od 0,4 do 1,6 mg/ml zamiast moczu (ryc. 9).



Rycina 9. Krzywa kalibracji dla kwasu hipurowego.

5.3.2.1.3 Oznaczenie 2,5-heksanodionu w moczu (wg Saito i wsp., 1991)

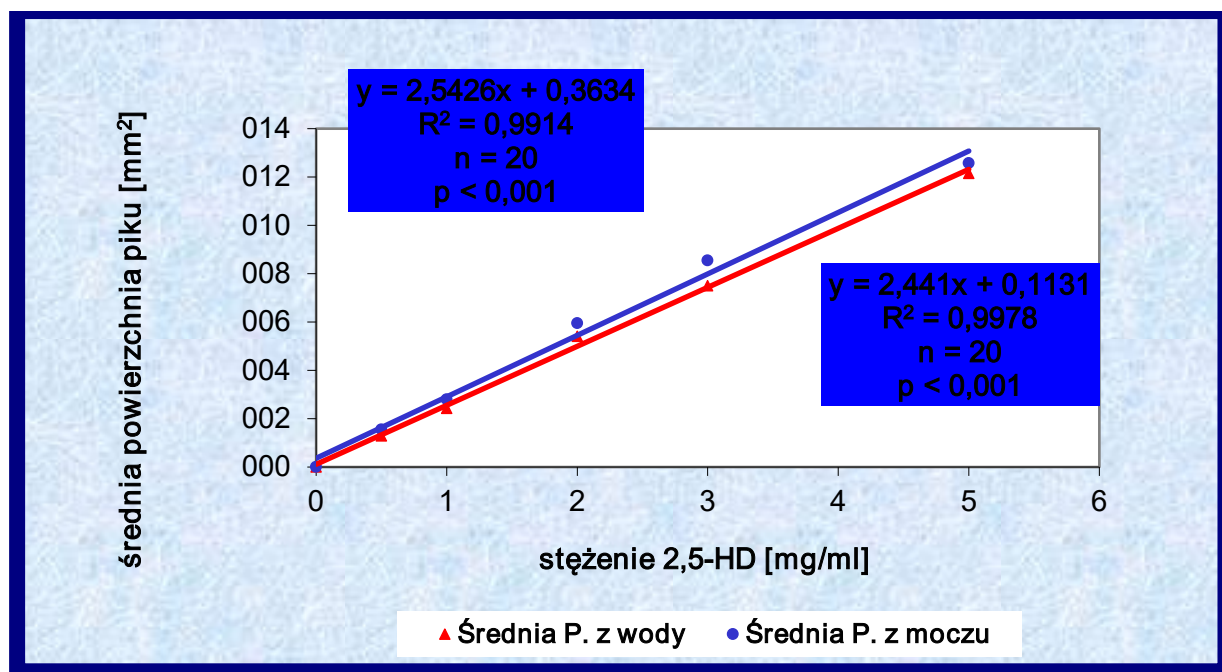
Do próbki szklanej (zamykanej nakrętką) o poj. 10 ml, wprowadza się 5 ml moczu i 0,2 ml stężonego HCl. Mieszaninę ogrzewa się 30 min. w łaźni wodnej o temperaturze 90-100°C, a następnie chłodzi w wodzie i dodaje 1,5 g stałego NaCl oraz 2 ml dichlorometanu zawierającego po 20 nl/ml 3-metylocykloheksanonu jak i cykloheksanonu jako wzorców wewnętrznych. Zawartość próbki wytrząsa się energicznie przez 3 minuty i odwirowuje 2 x przez 5 minut przy 3000 obr./min. Następnie oddziela się warstwę dichlorometanową i suszy bezwodnym Na₂SO₄.

Badany roztwór analizuje się metodą chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC-FID) w następujących warunkach:

- kolumna ULTRA-2 o długości 25 m i średnicy wewnętrznej 0,32 mm, usieciowana 5% fenylometylosilikonem
- temperatura kolumny:
 - temperatura początkowa 85 °C przez 7 minut
 - przyrost temperatury 35 °C/min
 - temperatura końcowa 290 °C przez 10 minut

- temperatura dozownika 120 °C
- temperatura detektora 300 °C
- szybkość przepływu helu 2 ml/min
- przepływ wodoru 40 ml/min
- przepływ powietrza 450 ml/min
- gaz uzupełniający (make up) 43 ml/min
- dzielnik próbki 10 : 1

W celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej do 5 ml moczu dodaje się 0; 2,5; 5; 10; 15 i 20 µg wzorca 2,5-heksanodionu i 1,5 g NaCl. Dalej postępuje się jak wyżej. Miarą stężenia była średnia powierzchnia pików (P) 2,5-HD wyizolowanego z moczu lub wody (ryc. 10).



Rycina 10. Krzywa kalibracji dla 2,5-heksanodionu.

5.3.2.2 Ocena neurotoksyczności za pomocą testów behawioralnych

Badania behawioralne obejmowały odruchy: rogówkowy i postawy; aktywność psychoruchową w wolnym polu; ocenę stanu czynnościowego narządu ruchu w teście utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym; aktywność unikania bodźca termicznego (test „gorącej płytki”) oraz próbę wysiłkową na bieżni ruchomej.

W badaniach tych ustalono kryteria kwalifikacyjne zwierząt do dalszych doświadczeń przez określenie m.in. optymalnego czasu trwania treningu, optymalnej szybkości obrotów walca lub bieżni ruchomej oraz wielkości bodźca termicznego w teście „gorącej płytki”.

Badania te miały na celu ustalenie optymalnych warunków doświadczenia zapewniających powtarzalność wyników pomiarów. Badania behawioralne wykonano tylko u zwierząt narażonych na badane związki przez okres 28 dni i w grupie kontrolnej.

5.3.2.2.1 Badanie odruchu rogówkowego (Rump i Kleinrok, 1982)

Badanie polega na dotykaniu włosem rogówki obu gałek oczu zwierzęcia. Zniesienie odruchu rogówkowego występuje wtedy, gdy drażnienie rogówki obu gałek oczu przez 1 s nie powoduje zamknięcia powiek. Świadczy ono o ogólnie znieczulającym działaniu badanego związku.

5.3.2.2.2 Badanie odruchu postawy (Rump i Kleinrok, 1982)

W badaniu zwierzę delikatnie układa się na grzbiecie. Zniesienie odruchu postawy występuje wtedy, gdy zwierzę w ciągu 30 s nie zmienia nadanej mu pozycji ciała, co świadczy o zaburzeniach koordynacji ruchowej.

5.3.2.2.3 Pomiar aktywności eksploracyjnej (psychoruchowej) w wolnym polu (Flório, i wsp., 1993; Ikeda i wsp., 1980; Nieminen i wsp., 1990; Oliveira, Palermo-Neto, 1993; Sirkka i wsp., 1992a; 1992b)

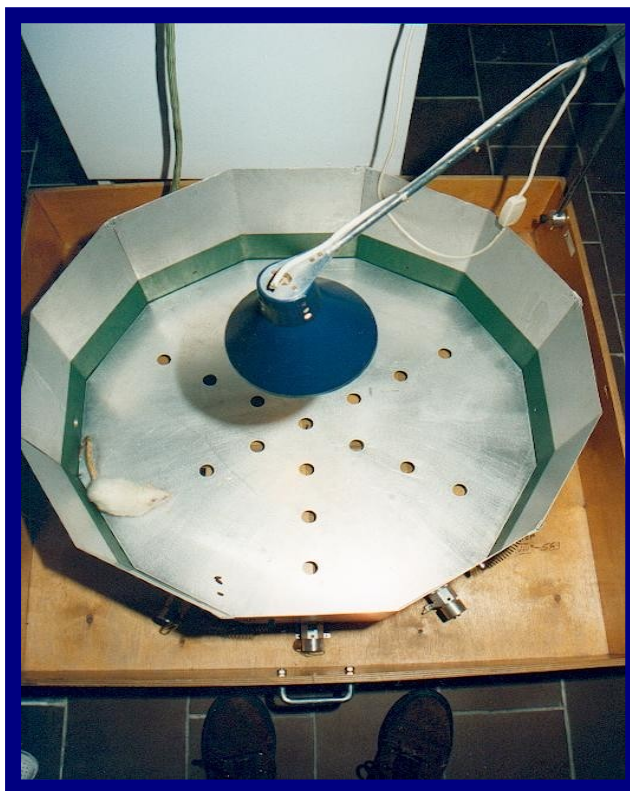
Aktywność zwierząt była oceniana na przyrządzie konstrukcji Centralnego Ośrodka Techniki Medycznej w Białymstoku (ryc. 11). Badane zwierzę umieszczano w urządzeniu składającym się z klatki w kształcie dwunastościanu zamontowanej w skrzyni drewnianej. W dnie klatki znajdują się trzy rzędy otworów o średnicy 20 mm rozstawionych co 60° i przechodzących przez jej środek. Przy zewnętrznej powierzchni ścian klatki znajduje się 6 tubusów wyposażonych w żarówki (4,8 V; 0,3 A), których światło kierowane jest przez soczewki Lu 5x na fototranzystory umieszczone po przeciwnej stronie klatki. Trzy tubusy i trzy fototranzystory znajdują się na wysokości 30 mm nad dnem między rzędami otworów (do pomiaru ruchliwości), a pozostałe trzy tubusy i fototranzystory 5 mm pod dnem w linii trzech rzędów otworów (do pomiaru aktywności poznawczej wyrażonej zagładaniem do otworów). Zliczanie unoszenia się na tylnych łapach odbywa się metodą rezystancyjną. Elektrodamy są ścianki boczne oraz dno klatki. Do skrzyni drewnianej przymocowana jest lampa zapewniająca stałe oświetlenie. Szczury były obserwowane w wolnym polu przez 5 minut zawsze o tej samej porze dnia między godziną 10 a 13.

Rejestrowano następujące wskaźniki zachowania się zwierzęcia:

1. liczbę słupków z podparciem przednimi łapami o ścianki pionowe
2. liczbę przebytych pól charakteryzującą ogólną ruchliwość zwierzęcia,
3. efekt „norkowy” (zagładanie do otworów w podłodze pola)

4. liczbę słupków bez podparcia
5. liczbę epizodów czyszczenia się i mycia łapek

W celu uniknięcia zafałszowania zachowania poznawczego badanego zwierzęcia, wynikającego z wyczuwania zapachu innego osobnika, wolne pole zmywano 5 % etanolem między kolejnymi pomiarami (Oliveira i Palermo-Neto, 1993).

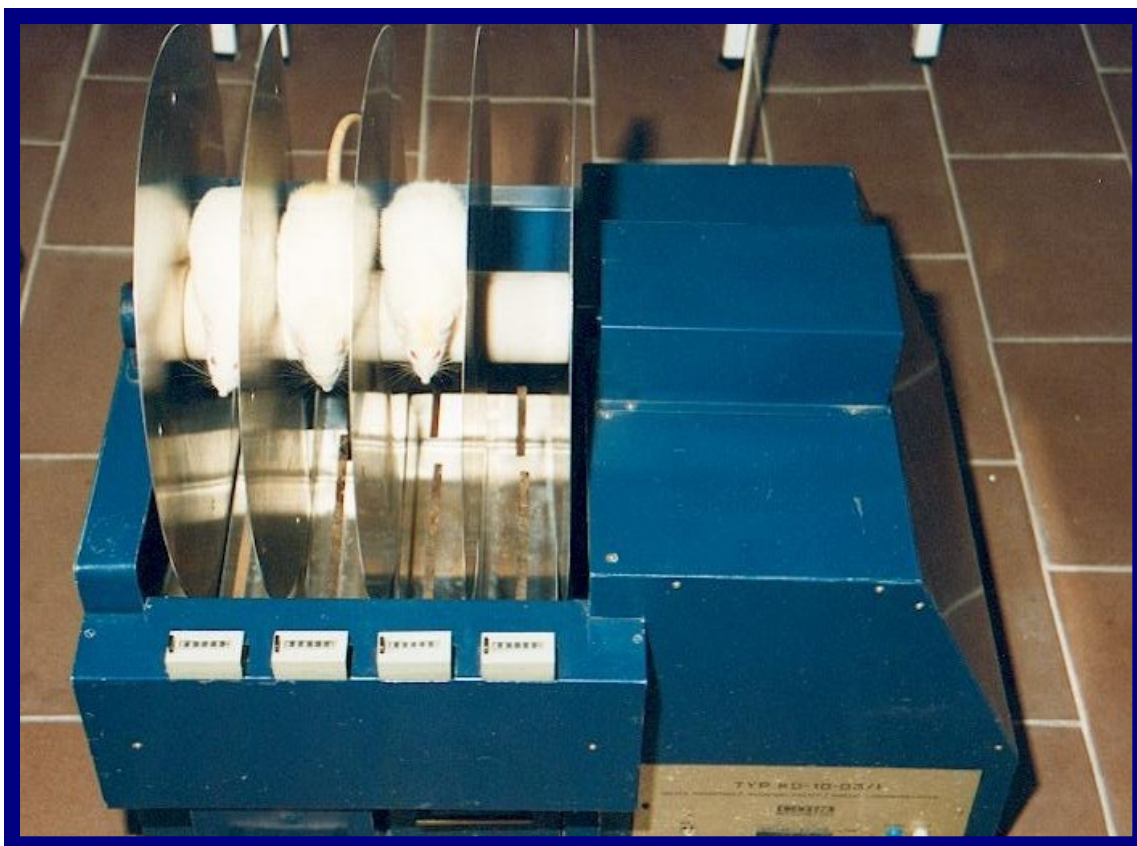


Rycina 11. Wolne pole, widok ogólny.

5.3.2.2.4 *Pomiar czasu utrzymywania się na walcu obrotowym (Ikeda i wsp., 1980; Kaplan i Murphy, 1972; Sirkka i wsp., 1992a; 1992b; Muti i Franchini, 1987)*

Metoda ta pozwala na ocenę koordynacji ruchowej zwierząt oraz stanu czynnościowego narządu ruchu. Badania wykonano na przyrządzie skonstruowanym przez Centralny Ośrodek Techniki Medycznej w Białymstoku (ryc. 12). Stosowany do badań walec obrotowy zbudowany jest z zawieszonoego horyzontalnie pręta o średnicy 8 cm, podzielonego na cztery pola dla pojedynczych zwierząt, oddzielone od siebie przegrodami uniemożliwiającymi kontaktowanie się zwierząt między sobą. Pręt (o regulowanej prędkości obrotów) obracał się z prędkością 20 obr./min. Czas utrzymywania się zwierząt na walcu zliczany jest automatycznie - licznik zostaje zatrzymany z chwilą spadnięcia zwierzęcia z walca.

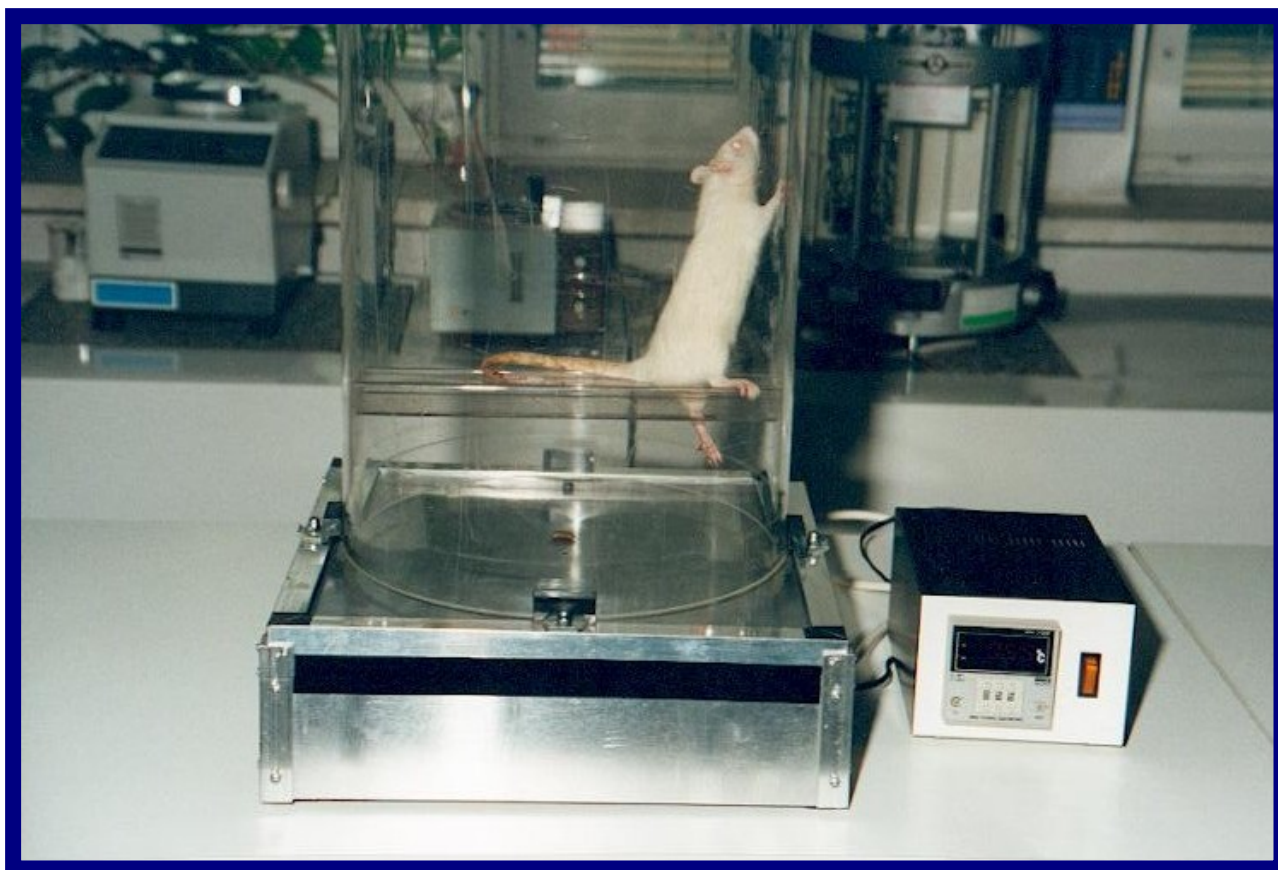
Przed rozpoczęciem właściwego pomiaru przeprowadzono selekcję zwierząt mającą na celu skompletowanie grupy o zbliżonym czasie utrzymywania się na walcu obrotowym.



Rycina 12. **Walec obrotowy, widok ogólny.**

5.3.2.2.5 *Badanie aktywności unikania bodźca termicznego (test „gorącej płytki”) (Rump i Kleinrok, 1982; Sirkka i wsp., 1992a; 1992b)*

Metoda „gorącej płytki” wykorzystuje kontaktowy bodziec cieplny do wywołania reakcji bólowej. Do badania zastosowano płytkę ogrzaną do temperatury 55°C skonstruowaną w Centralnym Instytucie Ochrony Pracy (ryc. 13). Notowano czas upływający od chwili bezpośredniego kontaktu zwierzęcia z płytką do jego ucieczki na półkę zawieszoną na wysokości 12 cm od powierzchni płytki.



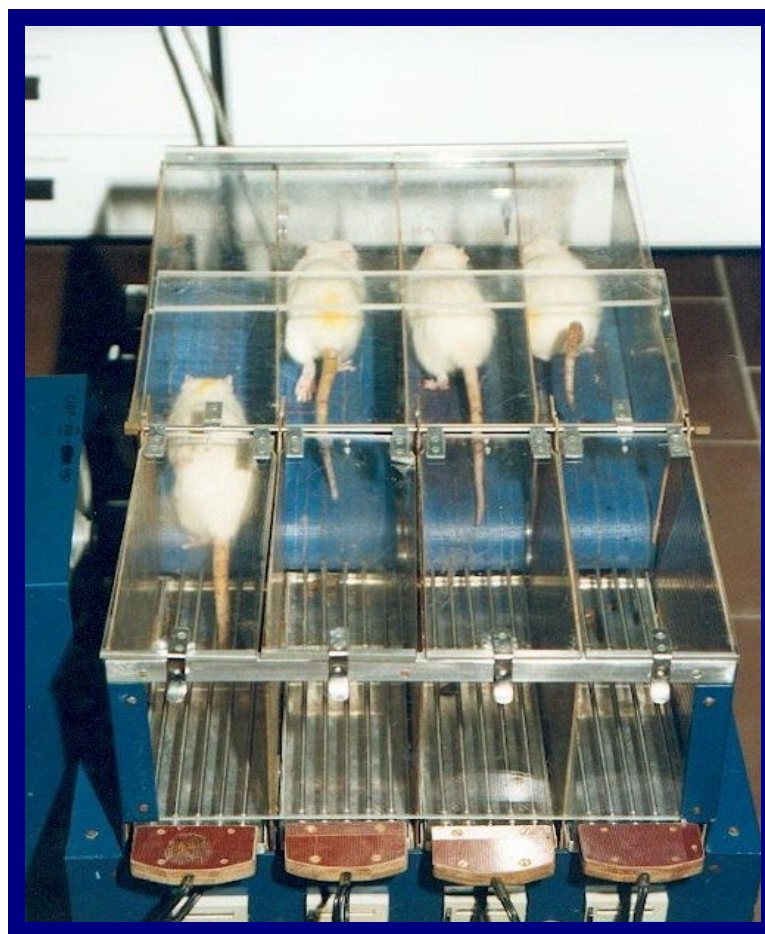
Rycina 13. „Gorąca płytką”, widok ogólny.

5.3.2.2.6 *Próba wysiłkowa na bieżni ruchomej*

Badanie wykonano na bieżni ruchomej skonstruowanej przez Centralny Ośrodek Techniki Medycznej w Białymstoku (ryc. 14). W badaniu tym oceniano kondycję fizyczną i stan czynnościowy narządu ruchu za pomocą automatycznego pomiaru indywidualnego czasu biegu zwierzęcia na elektromechanicznej bieżni taśmowej („bez końca”, o regulowanym kącie nachylenia oraz prędkości biegu wymuszonego napędem taśmy i bodźcem elektrycznym), od momentu startu aż do określonego nastawieniem czasu dopingu - stanu wyczerpania badanego osobnika.

Zwierzę umieszczano w komorze startowej na polu dopingowym. Z chwilą wciśnięcia przycisku „start” pole startowo - dopingowe zostaje włączone pod napięcie, a zwierzę zmuszone jest do biegu pod wpływem elektrycznego bodźca bólowego. Prędkość chwilowa biegu zwierzęcia oscylowała wokół prędkości stabilizowanej regulatorem bieżni. W miarę utraty sił zwierzęcia, oscylacje były większe i zwierzę było wyrzucane przez poruszającą się taśmę na pole dopingowe, gdzie było drażnione prądem i ponownie wracało na bieżnię.

Badania wysiłkowe przeprowadzono w pomieszczeniu z dobrą wentylacją (ze względu na wzmożone zapotrzebowanie na tlen podczas intensywnego wysiłku). Temperatura powietrza w pomieszczeniu wynosiła 18 - 20 °C. Szybkość przesuwu taśmy bieżni wynosiła 25 m/min.



Rycina 14. **Bieżnia ruchoma, widok ogólny.**

5.3.2.3 Ocena hepatotoksyczności za pomocą wskaźników biochemicznych

Ocenę hepatotoksycznego działania badanych związków oparto na pomiarze aktywności enzymów wskaźnikowych, stężenia frakcji lipidowych a także poziomu dialdehydu malonowego (MDA) jako produktu peroksydacji lipidów w surowicy krwi. Ponadto oznaczano stężenie MDA i niebiałkowych grup tiolowych (NPSH) w wątrobie, nerkach, jądrach i śledzionie celem oceny procesów prooksydacyjnych i antyoksydacyjnych.

W tym celu po zakończeniu doświadczenia zwierzęta głodzono przez 24 godziny, usypiano metohexitalem (Brietal sodium ok. 20 mg/kg m.c.), skrwawiano przez bezpośrednią punkcję serca i pobierano wątrobę, śledzionę, nerki, jądra, płuca i serce. Krew pobierano do suchych próbek heparynizowanych. Narządy ważono, a skrawki wątroby, nerek, śledziony i jąder homogenizowano w 1,15 mol. KCl sporządzając 10 % w/v homogenaty, w których oznaczano stężenia NPSH i MDA.

NPSH oznaczano wg Sedlaka i Lindsay'a (1968) wykorzystując metodę Ellman'a, opartą na redukcji kwasu 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowego) przez grupy -SH do kwasu 2-nitro-5-merkaptobenzoesowego, którego stężenie oznacza się spektrofotometrycznie przy $\lambda = 412$ nm.

MDA oznaczano spektrofotometrycznie metodą Mihara i wsp. (1980) w modyfikacji Starka (1998) po reakcji z kwasem tiobarbiturowym w środowisku 1% roztworu kwasu fosforowego. Stężenie białka w homogenatach oznaczono metodą Lowry'ego i wsp. (1951).

W osoczu krwi oznaczono aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT), dehydrogenazy sorbitolowej (SDH) i dehydrogenazy glutaminianowej (GIDH) metodami kinetycznymi opartymi na teście optycznym Warburga, odpowiednio zestawem diagnostycznym firmy Alpha Diagnostics oraz metodami według Gerlacha (1963) i Schmidta (1963). Aktywność γ -glutamylotranspeptydazy (GGTP) oznaczano metodą kolorymetryczną według Orłowskiego i Meistera (1965).

Ponadto w osoczu oznaczano stężenia następujących frakcji lipidowych: cholesterolu całkowitego (T-C), cholesterolu frakcji lipoprotein wysokiej gęstości (HDL-C) i triglicerydów (TG). Oznaczenia wykonano za pomocą zestawów diagnostycznych firmy Alpha Diagnostics, opartych na reakcjach enzymatycznych i teście optycznym Warburga. Stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein niskiej gęstości (LDL-C) obliczano ze stężenia T-C, HDL-C i TG.

Badania te wykonano zarówno u szczurów z doświadczenia 28-dniowego, jak i 90-dniowego.

5.4 Statystyczna ocena wyników

Otrzymane wyniki poddano ocenie statystycznej testem t-Studenta do analizy cech niepołączonych lub testem „C” Cochran-Coxa po wcześniejszej analizie wariancji za pomocą testu F-Fischera. Korelacje liniowe obliczono stosując program komputerowy STATISTICA 6.

6. WYNIKI

6.1 Doświadczenie wstępne

6.1.1 Ustalenie zasad kwalifikacji zwierząt do badań

Krzywe regresji uzyskane dla walca obrotowego, „gorącej płytki” oraz bieżni obrazują ryciny 15, 16 i 17. Zostały one przyjęte jako „normy”, według których kwalifikowane były zwierzęta do badań właściwych.

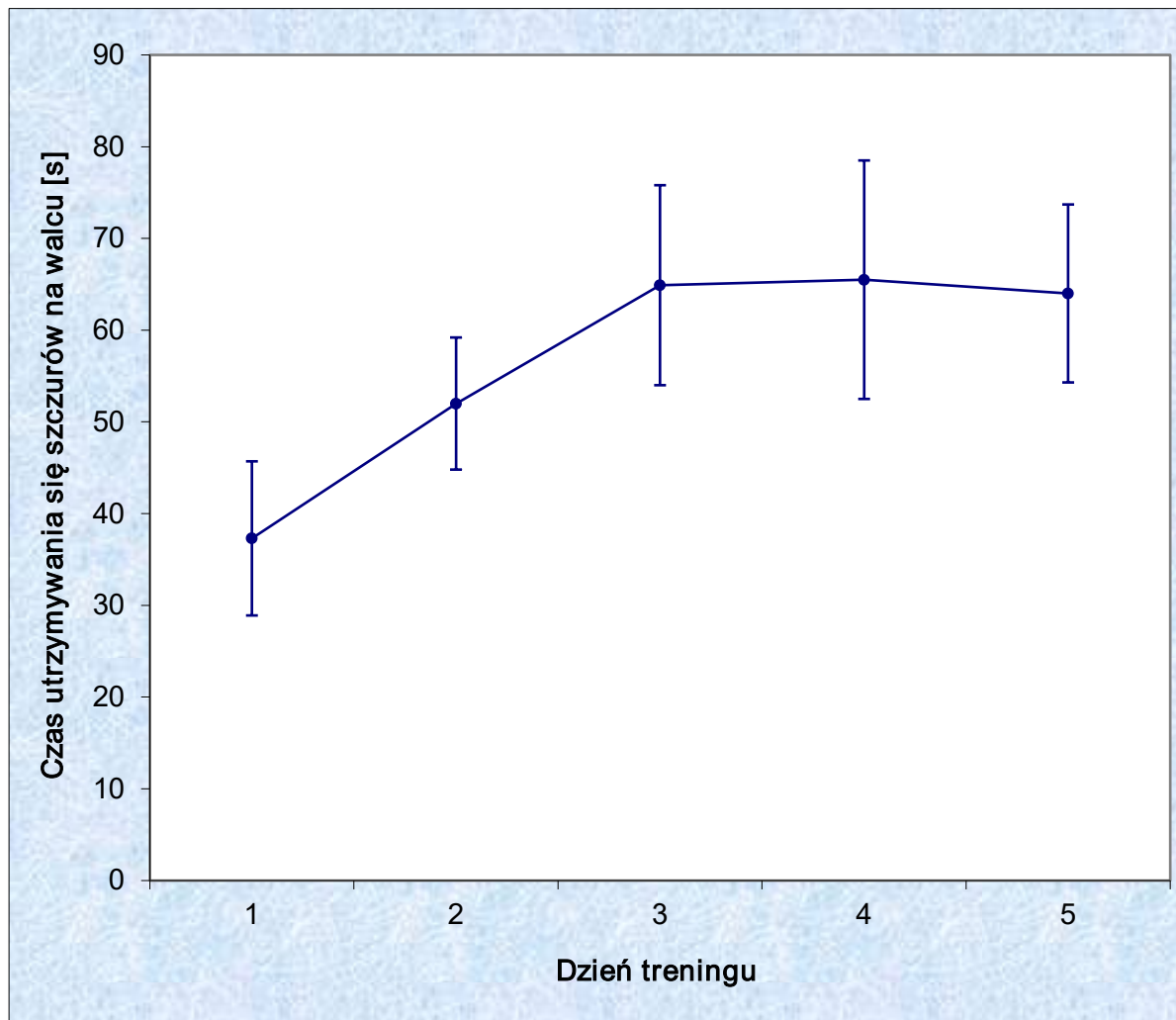
6.1.2 Ustalenie optymalnego czasu trwania treningu na walcu obrotowym

Czas utrzymywania się na walcu obrotowym każdego indywidualnego szczura w kolejnych pięciu dniach obrazuje tabela 2.

Tabela 2. **Czas [s] utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym w kolejnych dniach treningu.**

Nr szczura	Czas utrzymywania się na walcu [s] w kolejne dni treningu				
	dzień: 1	2	3	4	5
1	26	30	50	25	19
2	83	27	104	101	100
3	27	53	15	8	5
4	37	92	34	270	66
5	23	129	79	31	64
6	30	62	40	17	8
7	164	32	173	64	108
8	30	74	52	96	98
9	11	31	138	48	66
10	47	105	63	129	36
11	18	16	62	88	161
12	28	84	42	38	118
13	24	78	57	62	69
14	47	21	58	80	72
15	13	33	41	28	26
16	92	49	184	74	24
17	13	32	11	35	7
18	3	15	27	15	40
19	25	47	46	58	113
20	4	29	22	44	79
M	37,3	52,0	64,9	65,5	64,0
SD	37,6	32,0	48,8	57,9	43,4
SEM	8,4	7,2	10,9	13,0	9,7
V	100,7%	61,6%	75,1%	88,8%	67,8%

Dla każdego dnia badania (po odrzuceniu wartości skrajnych) obliczono średni czas utrzymywania się zwierząt na walcu. Wartości tego czasu \pm SEM w kolejnych dniach treningu przedstawiono na ryc. 15.



Rycina 15. **Czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym w kolejnych dniach treningu.** Wartości wyrażono jako $M \pm SEM$.

Stwierdzono, że czas utrzymywania się szczurów na walcu obrotowym stabilizuje się w okresie 3 – 5 dnia treningu. Do właściwych pomiarów stosowano trening 4-dniowy.

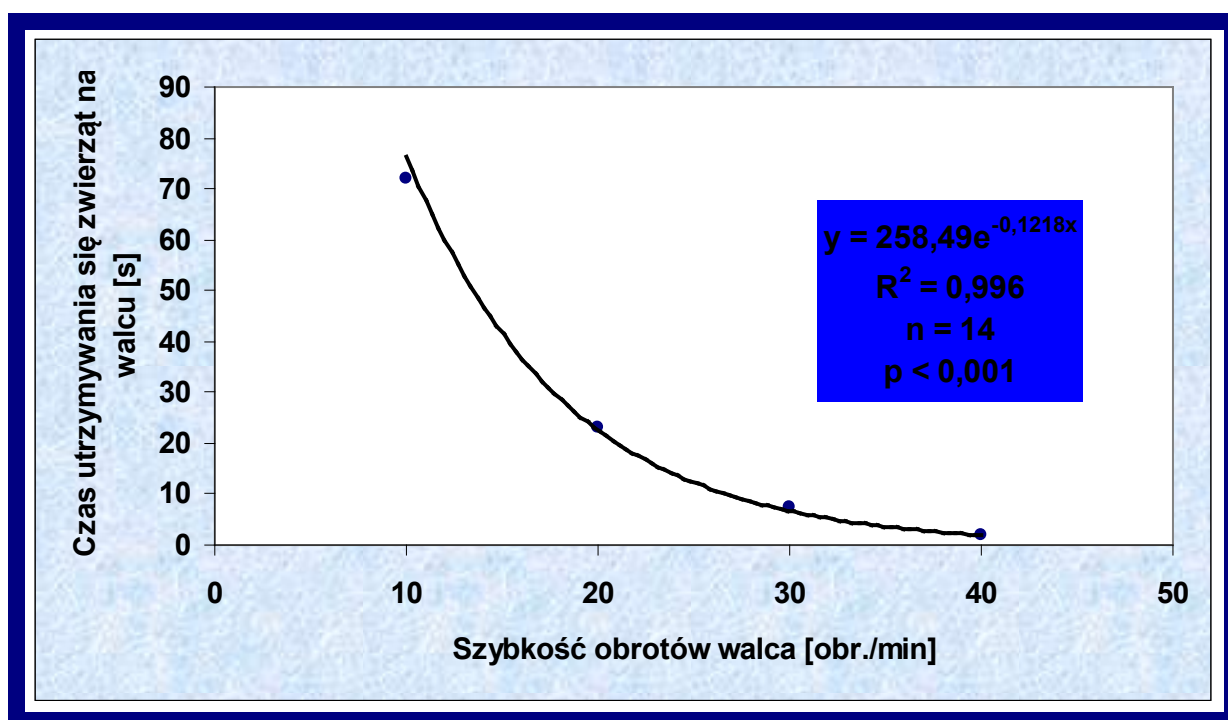
6.1.3 Ustalenie optymalnej szybkości obrotów walca

Wyniki otrzymane dla każdego zwierzęcia indywidualnie ilustruje tabela 3.

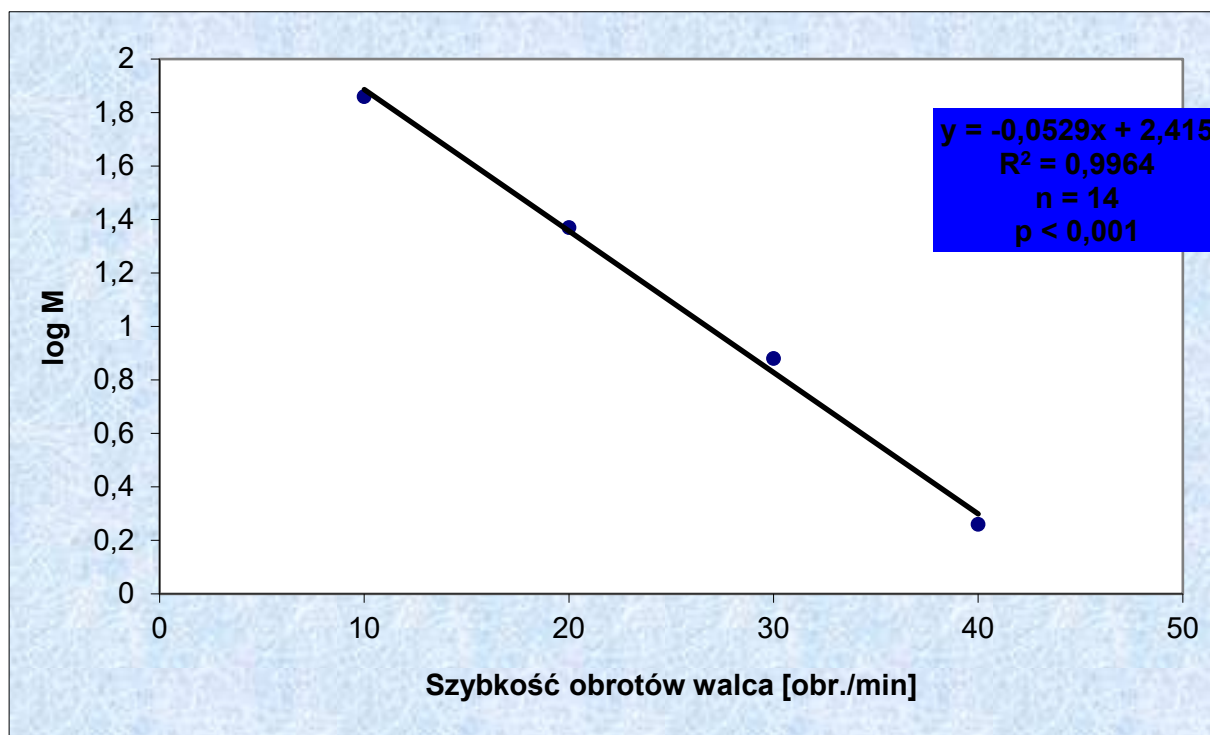
Tabela 3. Czas utrzymywania się szczurów na walcu obrotowym [s] w zależności od szybkości obrotów walca.

Nr szczura	Obroty walca			
	10 obr./min	20 obr./min	30 obr./min	40 obr./min
1	48	31	3	1
2	74	16	3	0
3	45	15	12	6
4	280	16	5	3
5	35	4	2	0
6	189	35	24	42
7	52	7	3	3
8	25	21	3	2
9	39	47	14	3
10	171	47	30	3
11	27	12	1	0
12	22	31	0	0
13	67	19	4	2
14	144	17	6	2
M	72,0	23,2	7,6	1,8
log M	1,86	1,37	0,88	0,26
SD	57,4	13,9	6,8	1,8
V	79,8%	60,0%	89,5%	100,0%

W oparciu o uzyskane wartości średnich arytmetycznych określono korelację między czasem utrzymywania się szczurów na walcu obrotowym a szybkością obrotów (ryc. 16a i 16b).



Rycina 16a. Korelacja między czasem utrzymywania się szczurów na walcu obrotowym a szybkością obrotów (skala liniowa).



Rycina 16b. Korelacja między czasem utrzymywania się szczurów na walcu obrotowym a szybkością obrotów (skala półlogarytmiczna).

Najmniejszą zmienność wyników wyrażoną wariancją stwierdzono przy 20 obr./min. Szybkość tę wybrano do doświadczeń właściwych.

6.1.4 Ustalenie optymalnej temperatury „gorącej płytki”

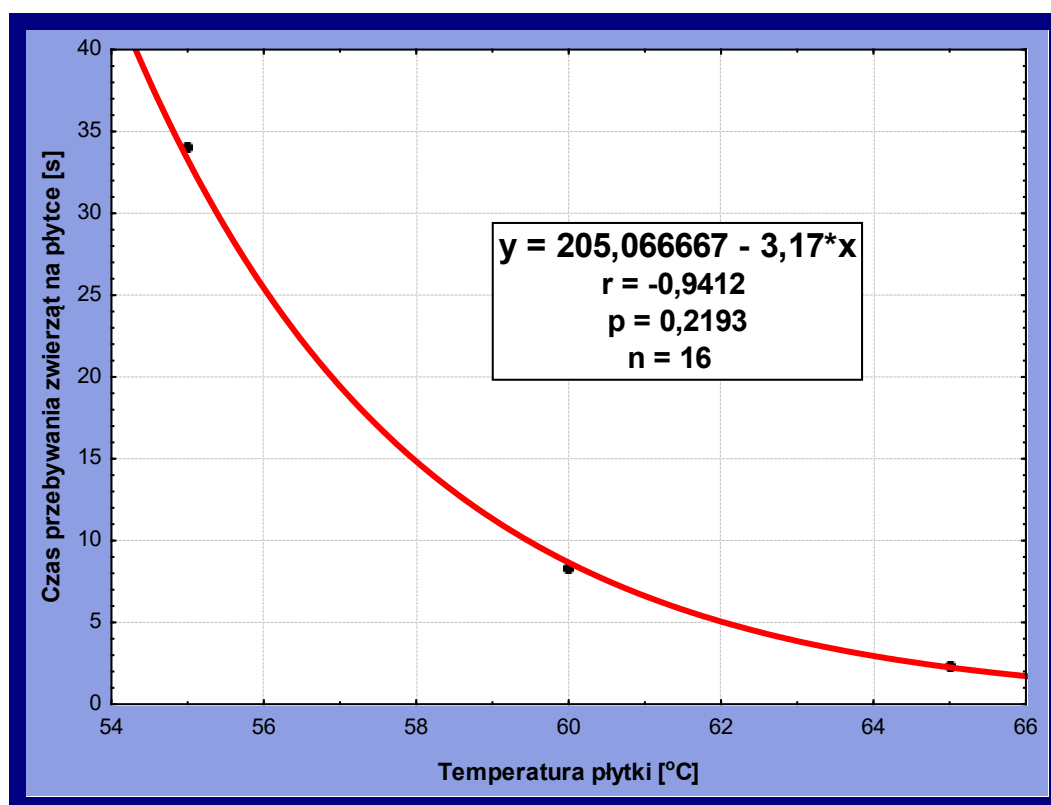
Czas przebywania poszczególnych szczurów na „gorącej płytce” w zależności od temperatury płytki obrazuje tabela 4.

Tabela 4. Czas [s] przebywania szczura na „gorącej płytce” w zależności od temperatury.

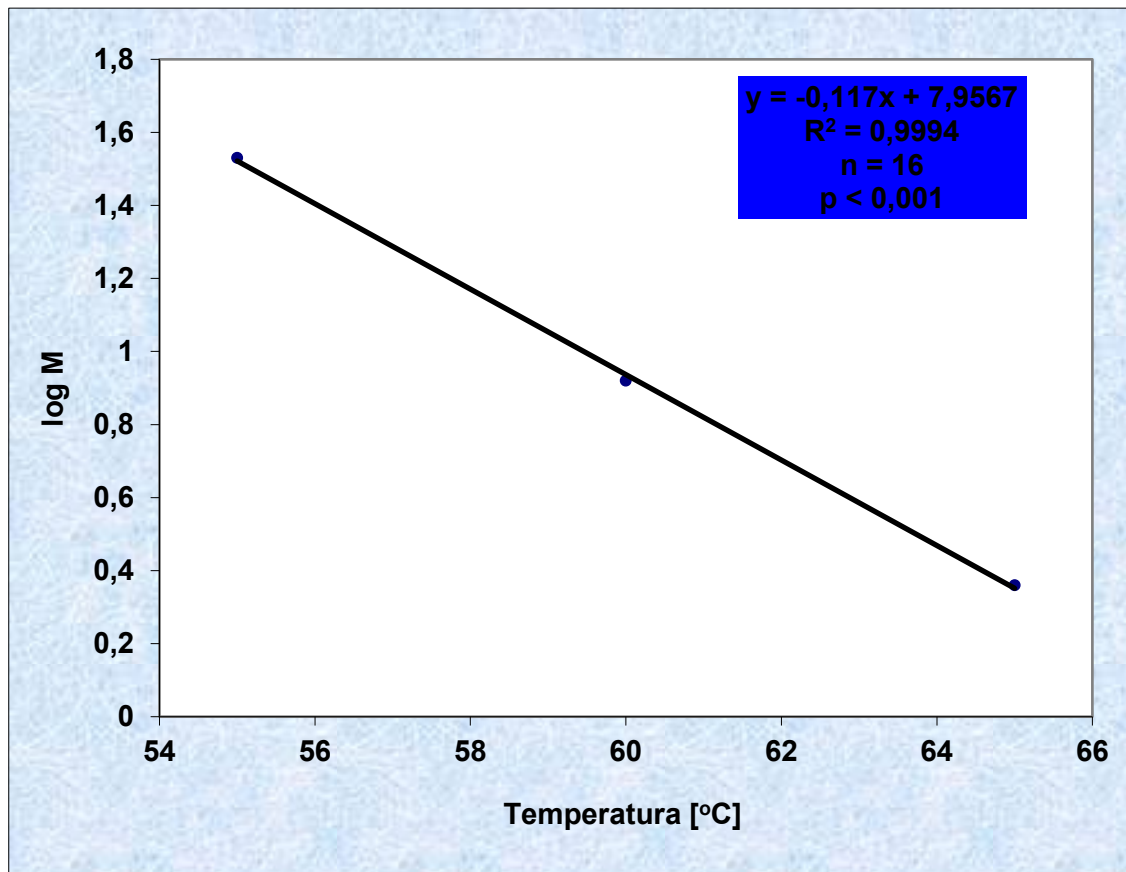
Nr szczura	Temperatura „gorącej płytki”		
	55 °C	60 °C	65 °C
1	27,9	10,16	-
2	54,3	3,59	2,5
3	33,5	4,8	4,4
4	32,3	4,5	1,7
5	36,3	4,0	1,6
6	46,9	7,2	1,9
7	24,5	10,0	1,6
8	22,8	7,2	1,3
9	22,1	7,9	1,6

Nr szczura	Temperatura „gorącej płytki”		
	55 °C	60 °C	65 °C
10	11,0	11,4	1,8
11	19,6	8,9	3,8
12	47,4	11,7	2,0
13	40,6	7,4	3,0
14	64,0	15,4	1,8
15	51,1	11,1	5,1
16	9,3	7,0	1,7
M	34,0	8,3	2,3
log M	1,53	0,92	0,36
SD	15,8	3,3	1,2
V	46,5%	39,2%	52,0%

Na podstawie uzyskanych średnich arytmetycznych określono korelację między temperaturą a czasem przebywania zwierząt na "gorącej płytce" (ryc. 17a i b).



Rycina 17a. Korelacja między czasem przebywania zwierząt na "gorącej płytce" a temperaturą płytki (skala liniowa).



Rycina 17b. **Korelacja między czasem przebywania zwierząt na "gorącej płytce" a temperaturą płytki (skala półlogarytmiczna).**

Biorąc pod uwagę bardzo zbliżone wartości współczynnika zmienności (V) dla wszystkich trzech temperatur „gorącej płytki”, do badania właściwego, kierując się względami humanitarnymi w celu uniknięcia uszkodzenia tkanek wybrano temperaturę 55°C.

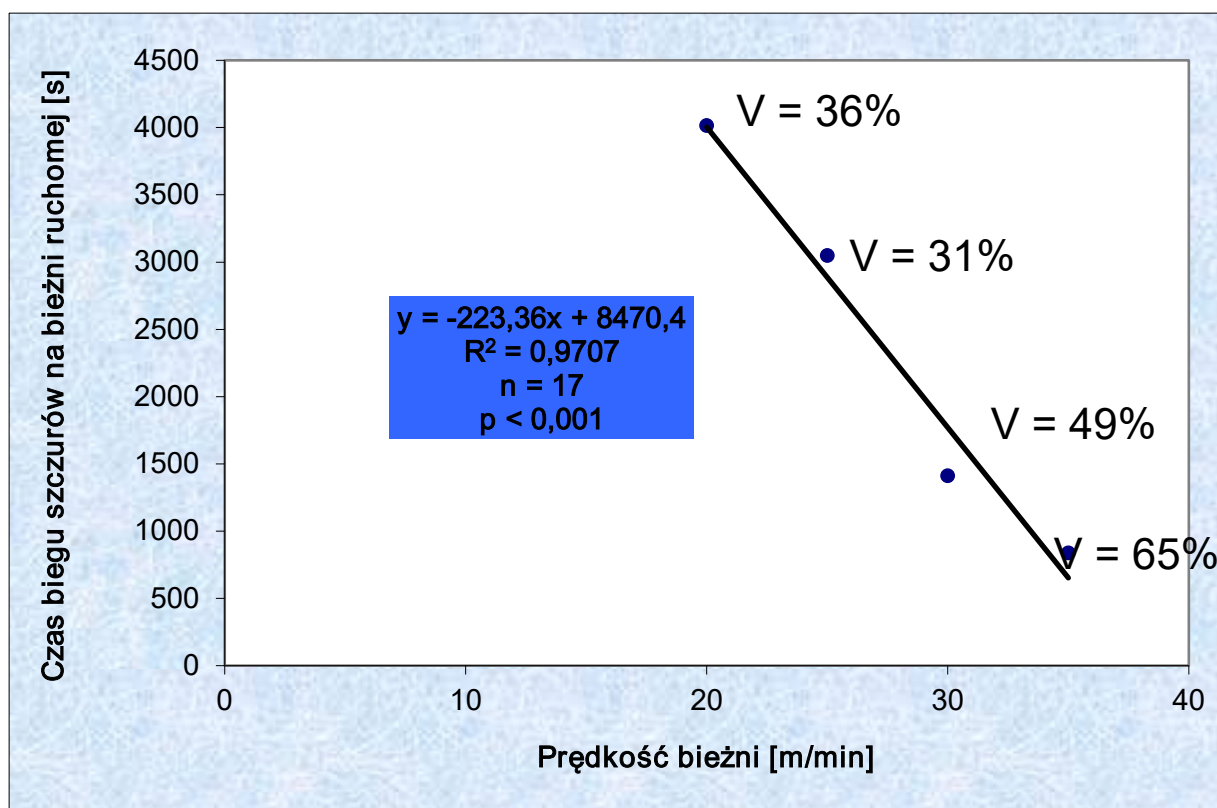
6.1.5 Ustalenie optymalnej prędkości bieżni ruchomej

Czas biegu poszczególnych zwierząt (do momentu wyczerpania fizycznego) w zależności od prędkości bieżni podano w tabeli 5. Badania przy prędkości bieżni 35 m/min zaniechano po badaniu jednej grupy zwierząt (4 osobniki) ze względu na zbyt duży hałas urządzenia.

Tabela 5. Czas biegu szczura [s] na bieżni w zależności od prędkości bieżni [m/min].

Nr szczura	Prędkość bieżni [m/min]			
	20 m/min	25 m/min	30 m/min	35 m/min
1	5880		2572	
2	4477		980	
3	3512		523	
4	4360		1036	
5		3034		
6		2359		
7		4596		
8	6068		2028	
9	3214		-	
10	2524		1284	
11	2078		1464	
12				1421
13				352
14				738
15		1820		
16		3466		
17		3020		
M	4014,0	3049,2	1412,4	837,0
SD	1458,7	954,4	690,7	541,3
SEM	515,4	389,6	260,6	312,9
V	36,3%	31,3%	48,9%	64,6%

Na podstawie obliczonych wartości M wykreślono korelację między czasem biegu zwierząt na bieżni ruchomej a prędkością bieżni (ryc. 18).



Rycina 18. Korelacja między czasem biegu zwierząt na bieżni ruchomej a prędkością bieżni.

Biorąc pod uwagę wartości współczynników zmienności (V) dla każdej prędkości bieżni do doświadczenia właściwego wybrano prędkość 25 m/min.

6.1.6 Wybór dawki TET do oceny łącznego działania toksycznego z n-H i EB

6.1.6.1 Behawior zwierząt po podskórnym podawaniu tetrachloroetyleny w dawkach 75, 150 lub 225 mg/kg m.c.

6.1.6.1.1 Odruch rogówkowy i odruch postawy

Tetrachloroetylen podawany podskórnie w dawkach 75 – 250 mg/kg m.c. przez 28 dni nie powodował zniesienia odruchów rogówkowego i postawy u żadnego z badanych szczurów.

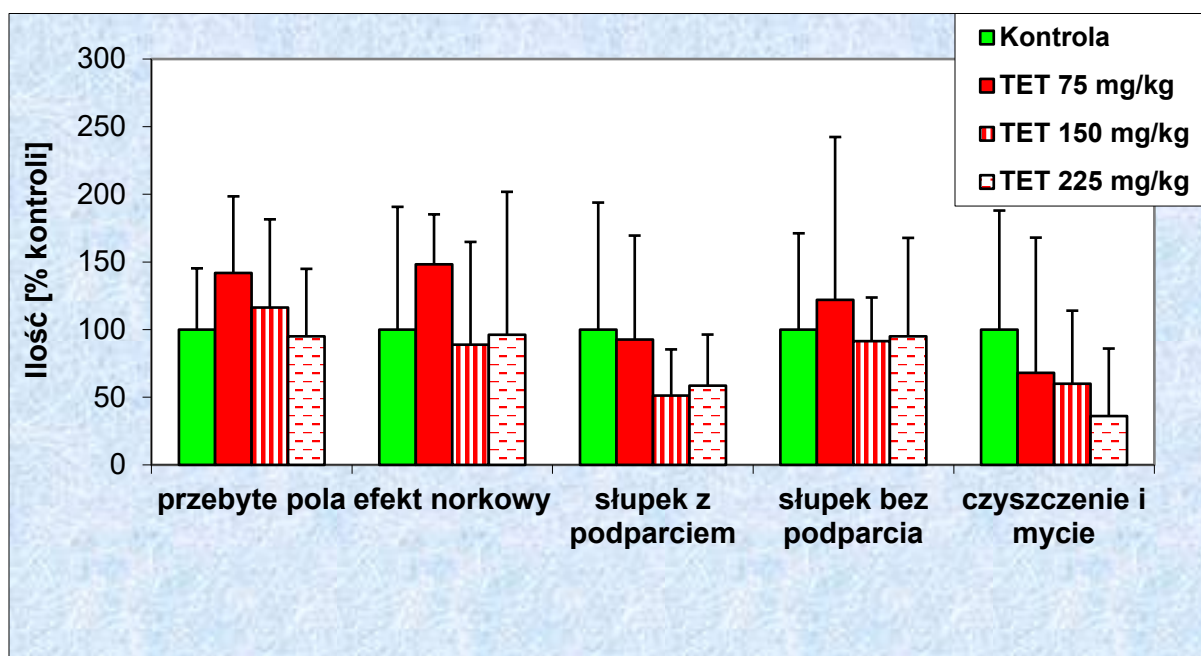
6.1.6.1.2 Aktywność psychoruchowa w wolnym polu

Nie zaobserwowano istotnych różnic w zachowaniu się zwierząt w wolnym polu po 4 tygodniach podskórnego podawania tetrachloroetylenu w dawkach 75 - 225 mg/kg m.c. w porównaniu z zachowaniem się zwierząt w grupie kontrolnej. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 6 oraz zobrazowano w postaci zmian procentowych w stosunku do grupy kontrolnej przyjętej za 100% (ryc. 19).

Tabela 6. Zachowanie się zwierząt w wolnym polu po 4 tygodniach podskórnego podawania tetrachloroetylenu.

GRUPA	Zachowanie w wolnym polu				
	przebyte pola	efekt norkowy	słupki z podparciem	słupki bez podparcia	liczba zabiegów czyszczenia
Kontrolna	26,5 ± 12,0	5,4 ± 4,9	8,2 ± 7,7	5,9 ± 4,2	5,0 ± 4,4
TET 75 mg/kg	37,6 ± 15,0	8,0 ± 2,0	7,6 ± 6,3	7,2 ± 7,1	3,4 ± 5,0
TET 150 mg/kg	30,8 ± 17,3	4,8 ± 4,1	4,2 ± 2,8	5,4 ± 1,9	3,0 ± 2,7
TET 225 mg/kg	25,2 ± 13,2	5,2 ± 5,7	4,8 ± 3,1	5,6 ± 4,3	1,8 ± 2,5

Każda grupa liczyła po 5 szczurów.



Rycina 19. Zachowanie się zwierząt w wolnym polu po 4 tygodniach podskórnego podawania różnych dawek tetrachloroetylenu (M ± SD).

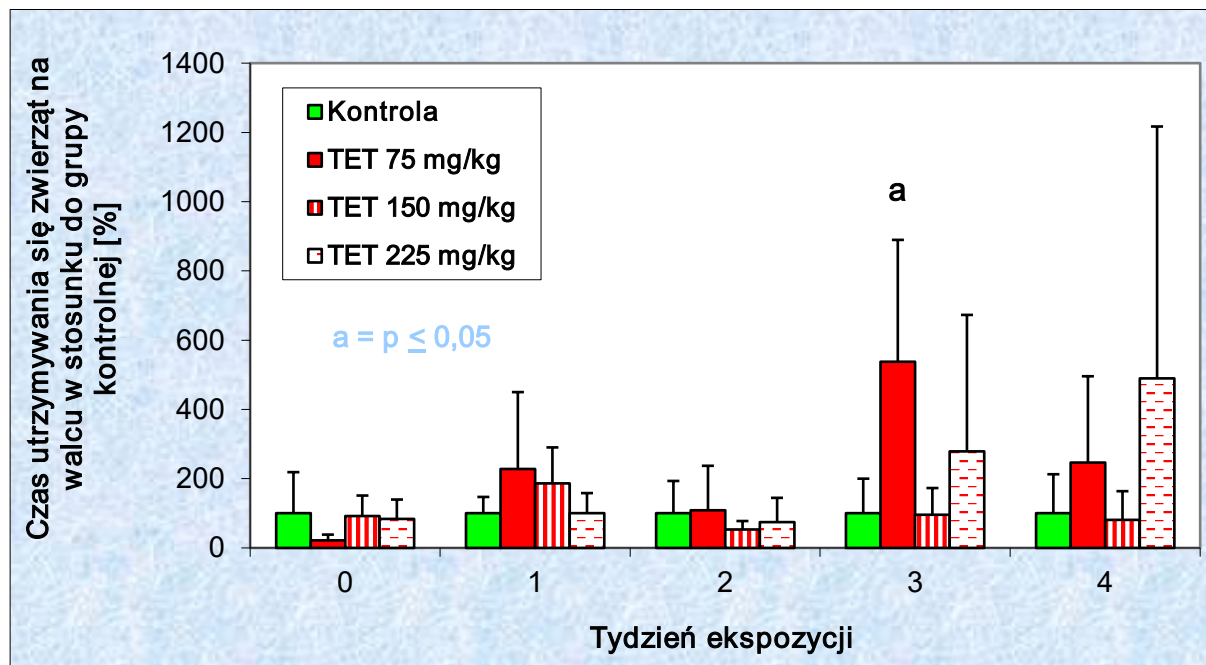
6.1.6.1.3 Utrzymywanie się szczurów na walcu obrotowym

Poza wydłużonym czasem utrzymywania się zwierząt na walcu po 3 tygodniach podskórnego podawania TET w dawce 75 mg/kg m.c. w zasadzie nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą kontrolną i pozostałymi grupami badanymi. Otrzymane wyniki zamieszczono w tab. 7 oraz na ryc. 20.

Tabela 7. Średni czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym po podskórnym podawaniu tetrachloroetylenu. Wartości przedstawiono jako M ± SD.

Grupa	Czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym [s]				
	przed podaniem	po 1 tygodniu podawania	po 2 tygodniach podawania	po 3 tygodniach podawania	po 4 tygodniach podawania
Kontrolna	23,4 ± 27,8	7,2 ± 3,4	12,1 ± 11,3	4,8 ± 4,8	4,7 ± 5,3
TET 75 mg/kg	5,0 ± 4,0	16,4 ± 16,0	13,2 ± 15,5	25,8 ^a ± 16,9	11,6 ± 11,7
TET 150 mg/kg	21,6 ± 13,8	13,4 ± 7,5	6,4 ± 3,0	4,6 ± 3,7	3,8 ± 3,9
TET 225 mg/kg	19,6 ± 13,1	7,2 ± 4,2	9,0 ± 8,5	13,4 ± 18,9	23,0 ± 34,2

Każda grupa liczyła 5 szczurów; a = p ≤ 0,05.



Rycina 20. Średni czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym po podskórnym podawaniu różnych dawek tetrachloroetylenu.

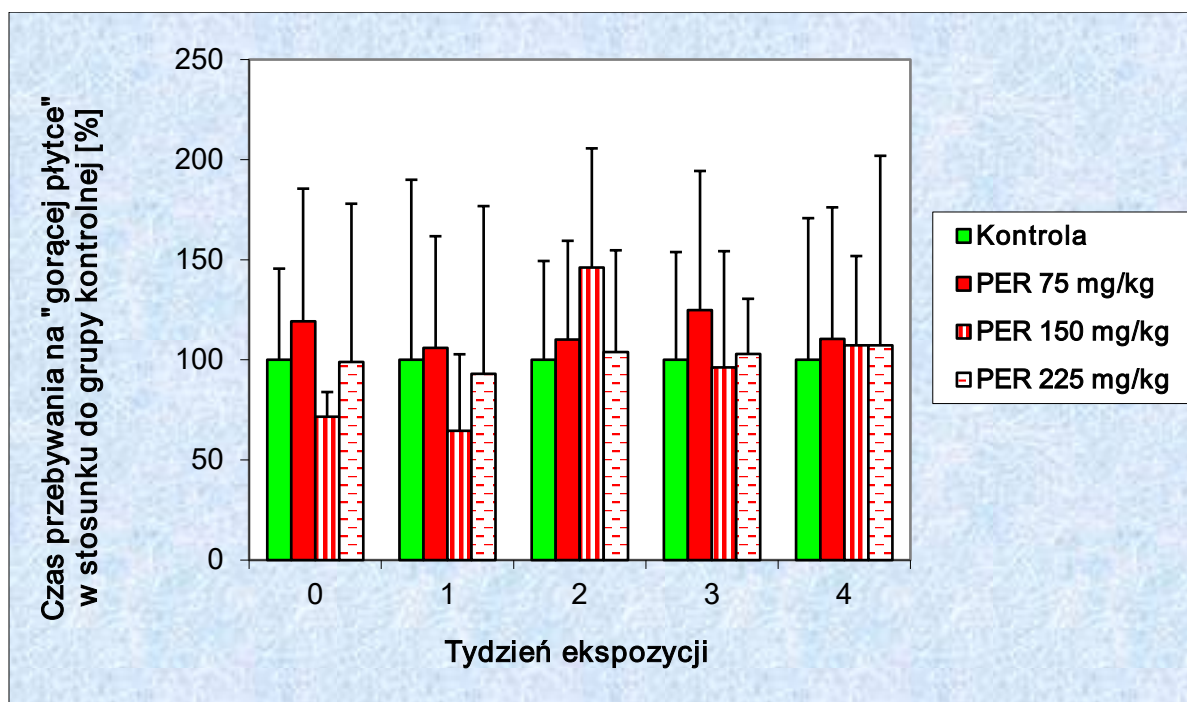
6.1.6.1.4 Percepcja bólu przy zastosowaniu bodźca termicznego (test „gorącej płytki”).

Nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie różnic czasu przebywania zwierząt na „gorącej płytce” po podskórnym podawaniu tetrachloroetylenu w dawkach 75 - 225 mg/kg/dobę. Otrzymane wyniki zamieszczono tab. 8 oraz na ryc. 21.

Tabela 8. Średni czas przebywania zwierząt na gorącej płytce po podskórnym podawaniu różnych dawek tetrachloroetylenu. Wartości przedstawiono jako $M \pm SD$.

Grupa	Czas przebywania zwierząt na gorącej płytce [s]				
	przed podaniem	po 1 tygodniu podawania	po 2 tygodniach podawania	po 3 tygodniach podawania	po 4 tygodniach podawania
Kontrolna	15,8 ± 7,2	15,4 ± 13,8	9,9 ± 4,9	9,2 ± 5,0	7,8 ± 5,5
TET 75 mg/kg	18,9 ± 10,5	16,3 ± 8,6	10,9 ± 4,9	11,5 ± 6,4	8,6 ± 5,1
TET 150 mg/kg	11,3 ± 1,9	9,9 ± 5,9	14,5 ± 5,9	8,9 ± 5,4	8,3 ± 3,5
TET 225 mg/kg	15,7 ± 12,5	14,3 ± 12,9	10,3 ± 5,0	9,5 ± 2,5	8,3 ± 7,4

Każda grupa liczyła 5 szczurów.



Rycina 21. Średni czas przebywania zwierząt na „gorącej płytce” po podskórnym podawaniu tetrachloroetylenu.

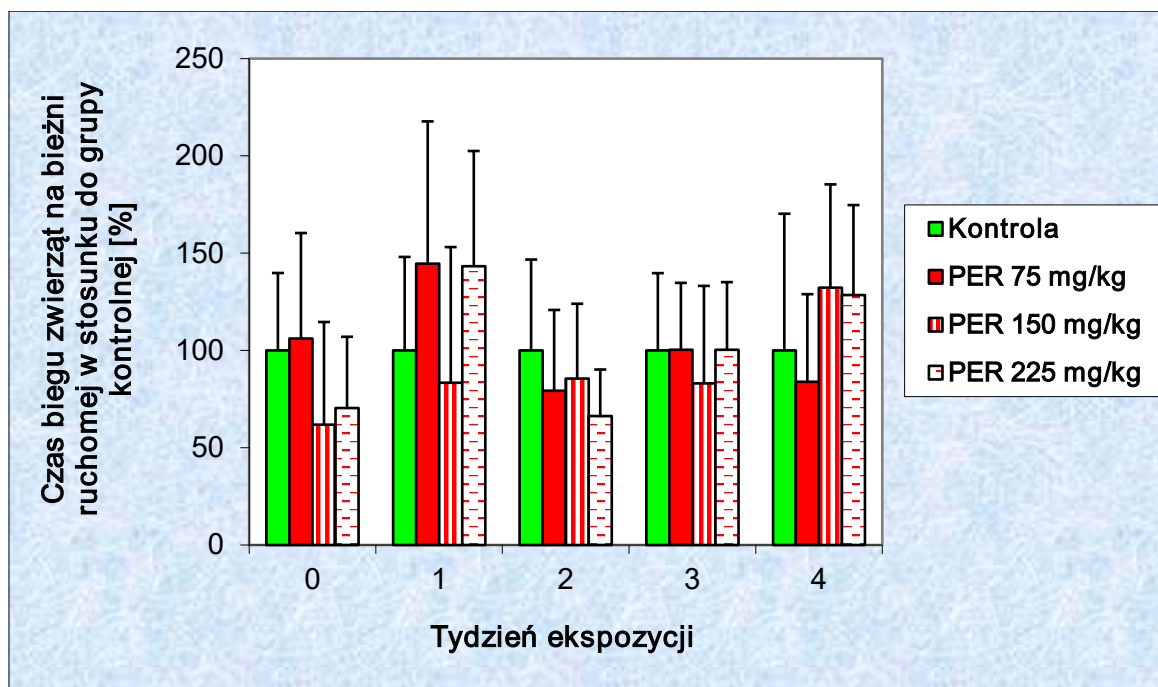
6.1.6.1.5 Próba wysiłkowa na bieżni ruchomej.

Nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie różnic czasu biegu zwierząt na bieżni ruchomej po podskórnym podawaniu tetrachloroetylenu w dawkach 75 - 225 mg/kg/dobę. Otrzymane wyniki zamieszczono w tab. 9 oraz na ryc. 22.

Tabela 9. Średni czas biegu zwierząt na bieżni ruchomej po podskórnym podawaniu różnych dawek tetrachloroetylenu. Wartości przedstawiono jako $M \pm SD$.

Grupa	Czas przebywania zwierząt na bieżni ruchomej [s]				
	przed podaniem	po 1 tygodniu podawania	po 2 tygodniach podawania	po 3 tygodniach podawania	po 4 tygodniach podawania
Kontrolna	3645 ± 1451	2268 ± 1090	3766 ± 1759	2899 ± 1152	2690 ± 1890
TET 75 mg/kg	3865 ± 1980	3278 ± 1660	2987 ± 1563	2908 ± 998	2256 ± 1212
TET 150 mg/kg	2256 ± 1922	1892 ± 1581	3220 ± 1450	2409 ± 1452	3556 ± 1430
TET 225 mg/kg	2567 ± 1334	3249 ± 1344	2498 ± 899	2911 ± 1006	3455 ± 1245

Każda grupa liczyła 5 szczurów.



Rycina 22. Średni czas biegu zwierząt na bieżni ruchomej po podskórnym podawaniu różnych dawek tetrachloroetylenu.

6.1.6.2 Aktywność enzymów w surowicy krwi zwierząt po podawaniu tetrachloroetylenu w dawkach 75, 150 lub 225 mg/kg m.c.

Po podskórnym podawaniu tetrachloroetylenu w różnych dawkach przez 28 dni stwierdzono wzrost aktywności SDH i GIDH w surowicy krwi szczurów otrzymujących TET w dawkach 150 oraz 225 mg/kg m.c. U zwierząt tych nie uległa zmianie aktywność ALT i GGTP. Nie zaobserwowano również żadnych zmian aktywności enzymów u szczurów otrzymujących TET w dawce 75 mg/kg m.c. Uzyskane wartości liczbowe aktywności enzymów zostały zamieszczone w tab. 10 oraz zobrazowane graficznie na ryc. 23 jako % kontroli otrzymującej podskórnie oliwę z oliwek.

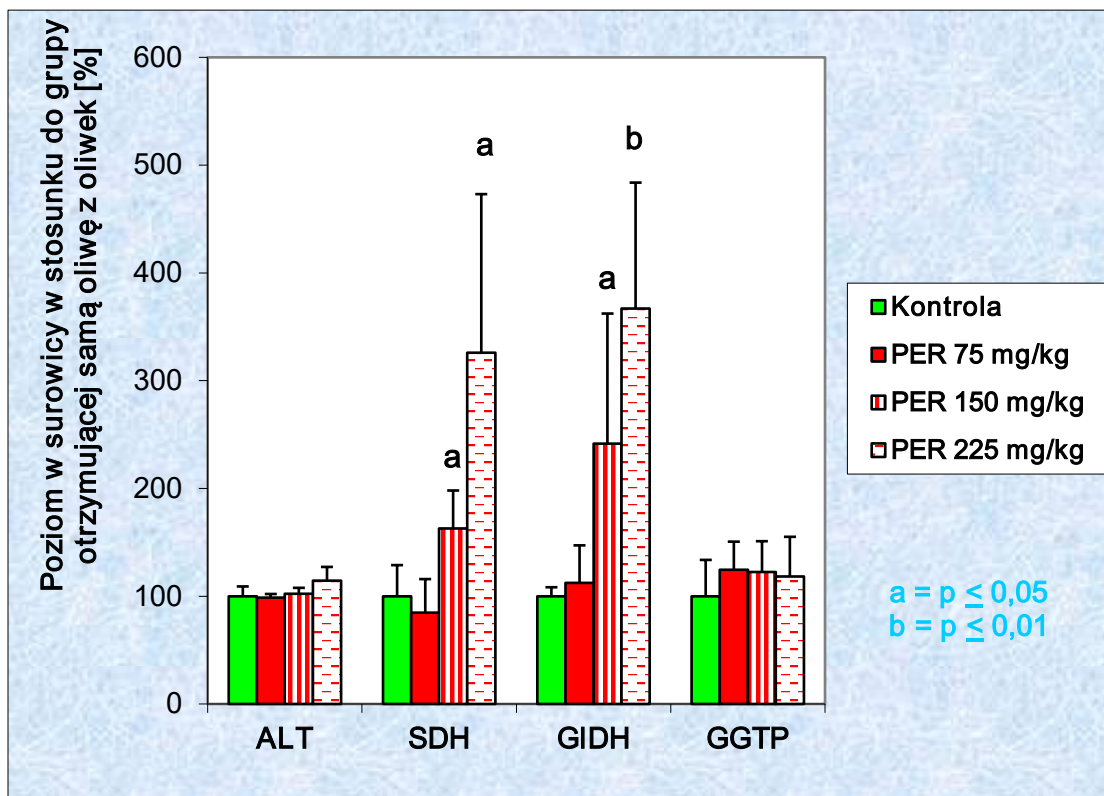
Tabela 10. **Aktywność enzymów w surowicy krwi zwierząt eksponowanych podskórnie na różne dawki tetrachloroetylenu przez 28 dni.** Wartości przedstawiono jako $M \pm SD$.

Grupa	Surowica krwi			
	ALT [IU/l]	SDH [IU/l]	GIDH [IU/l]	GGTP [IU/l]
Kontrolna	25,4 ± 2,3	2,08 ± 0,60	2,65 ± 0,22	4,90 ± 1,65
TET 75 mg/kg	25,1 ± 0,82	1,76 ± 0,65	2,98 ± 0,92	6,10 ± 1,28
TET 150 mg/kg	26,0 ± 1,37	3,39^a ± 0,73	6,40^a ± 3,20	6,00 ± 1,40
TET 225 mg/kg	29,1 ± 3,2	6,78^a ± 3,06	9,72^b ± 3,10	5,80 ± 1,80

Każda grupa liczyła 5 szczurów;

a = $p \leq 0,05$;

b = $p \leq 0,01$.



Rycina 23. Aktywność enzymów w surowicy krwi zwierząt eksponowanych podskórnie na różne dawki tetrachloroetyleny przez 28 dni.

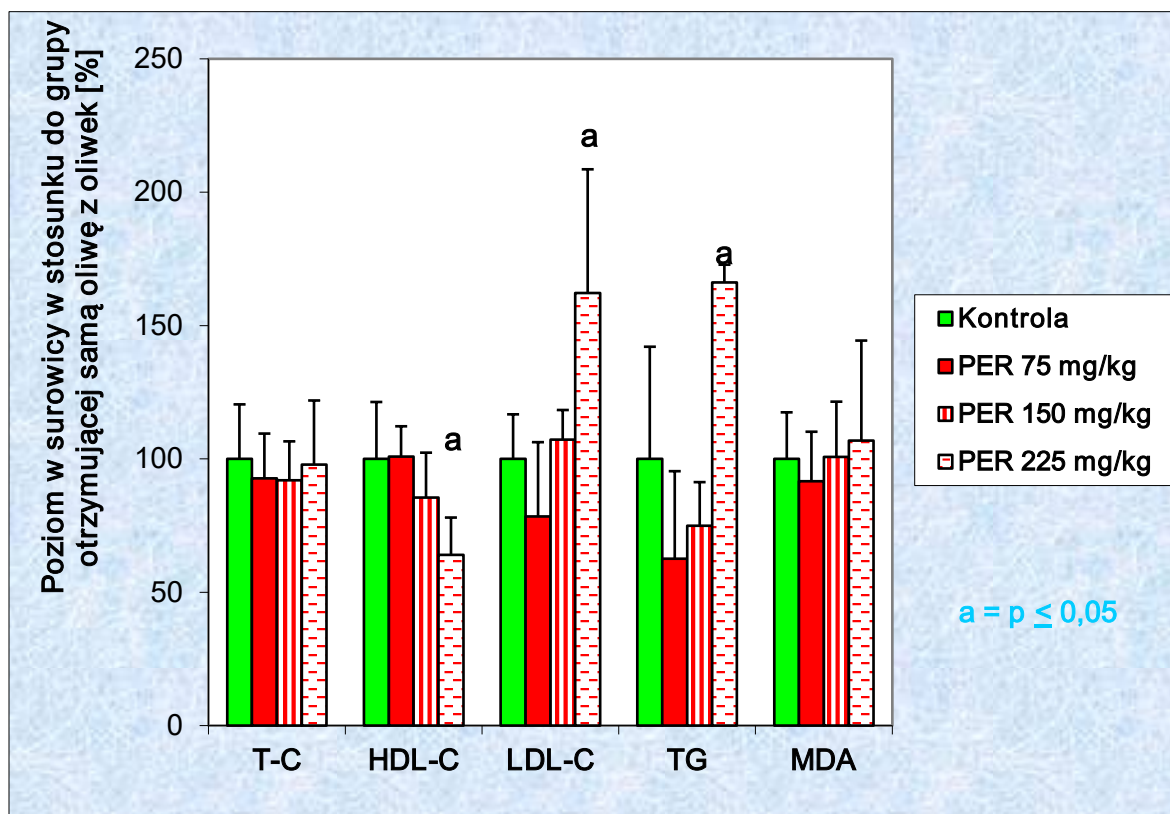
6.1.6.3 Stężenia frakcji lipidowych i dialdehydu malonowego w surowicy krwi zwierząt po podawaniu tetrachloroetyleny w dawkach 75, 150 lub 225 mg/kg m.c.

Spadek stężenia HDL-C oraz wzrost poziomu LDL-C i TG zaobserwowano tylko w surowicy krwi zwierząt otrzymujących tetrachloroetylen w dawce największej (225 mg/kg m.c.). Przy pozostałych dawkach TET nie występowały zmiany w poziomie frakcji lipidowych w surowicy krwi. Nie zanotowano też zmian stężenia MDA w żadnej z badanych grup zwierząt w stosunku do kontroli (tab.11, ryc. 24).

Tabela 11. Stężenia frakcji lipidowych oraz dialdehydu malonowego w surowicy krwi zwierząt eksponowanych podskórnie na różne stężenia tetrachloroetylenu przez 28 dni. Wartości przedstawiono jako M ± SD.

Grupa	Surowica krwi				
	T-C [mmol/l]	HDL-C [mmol/l]	LDL-C [mmol/l]	TG [mmol/l]	MDA [μmol/l]
Kontrolna	1,370 ± 0,280	0,900 ± 0,192	0,431 ± 0,072	0,195 ± 0,082	2,75 ± 0,48
TET 75 mg/kg	1,270 ± 0,230	0,908 ± 0,102	0,338 ± 0,120	0,122 ± 0,064	2,52 ± 0,51
TET 150 mg/kg	1,260 ± 0,200	0,769 ± 0,152	0,462 ± 0,048	0,146 ± 0,032	2,77 ± 0,57
TET 225 mg/kg	1,340 ± 0,330	0,576^a ± 0,126	0,699^a ± 0,200	0,324^a ± 0,013	2,94 ± 1,03

Każda grupa liczyła 5 szczurów; a = $p \leq 0,05$.



Rycina 24. Stężenia frakcji lipidowych oraz dialdehydu malonowego w surowicy krwi zwierząt eksponowanych podskórnie na różne stężenia tetrachloroetylenu przez 28 dni.

6.1.6.4 Stężenia niebiałkowych grup tiolowych (NPSH) i dialdehydu malonowego (MDA) w narządach zwierząt po podaniu tetrachloroetyleny w dawkach 75, 150 lub 225 mg/kg m.c.

Tetrachloroetylen podawany podskórnie we wszystkich trzech dawkach przez 28 dni powodował istotne obniżenie stężenia NPSH w nerkach i śledzionie. Zawartość NPSH w wątrobie uległa obniżeniu tylko w przypadku podawania TET w dawce 150 mg/kg m.c. Przy żadnej z dawek TET nie wystąpiły zmiany stężenia NPSH w jądrach zwierząt. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 12 oraz na ryc. 25.

Tabela 12. Tkankowa zawartość NPSH u szczurów eksponowanych podskórnie na różne stężenia tetrachloroetyleny przez 28 dni. Wartości przedstawiono jako $M \pm SD$.

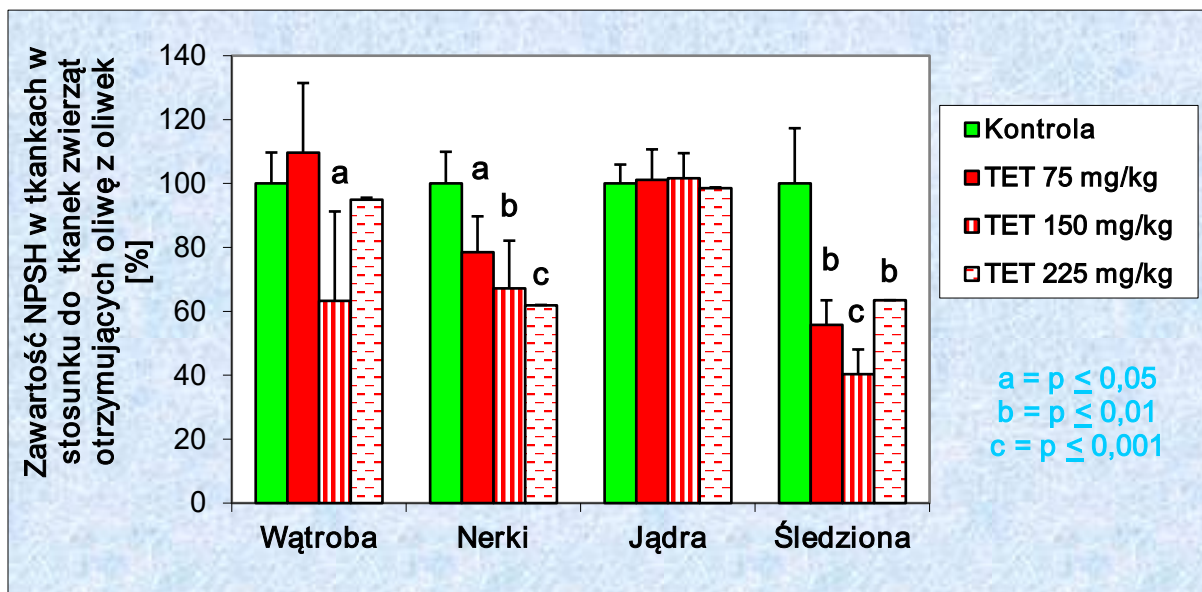
Grupa	NPSH [$\mu\text{mol/g}$]			
	Wątroba	Nerki	Jądra	Śledziona
Kontrolna	5,15 $\pm 0,50$	3,02 $\pm 0,30$	4,21 $\pm 0,25$	0,52 $\pm 0,09$
TET 75 mg/kg	5,65 $\pm 1,12$	2,37^a $\pm 0,34$	4,26 $\pm 0,40$	0,29^b $\pm 0,04$
TET 150 mg/kg	3,26^a $\pm 1,44$	2,03^b $\pm 0,45$	4,28 $\pm 0,33$	0,21^c $\pm 0,04$
TET 225 mg/kg	4,89 $\pm 1,38$	1,87^c $\pm 0,19$	4,15 $\pm 0,50$	0,33^b $\pm 0,05$

Każda grupa liczyła 5 szczurów;

a = $p \leq 0,05$;

b = $p \leq 0,01$;

c = $p \leq 0,001$.



Rycina 25. Tkankowa zawartość NPSH u szczurów eksponowanych podskórnice na różne stężenia tetrachloroetyleny przez 28 dni.

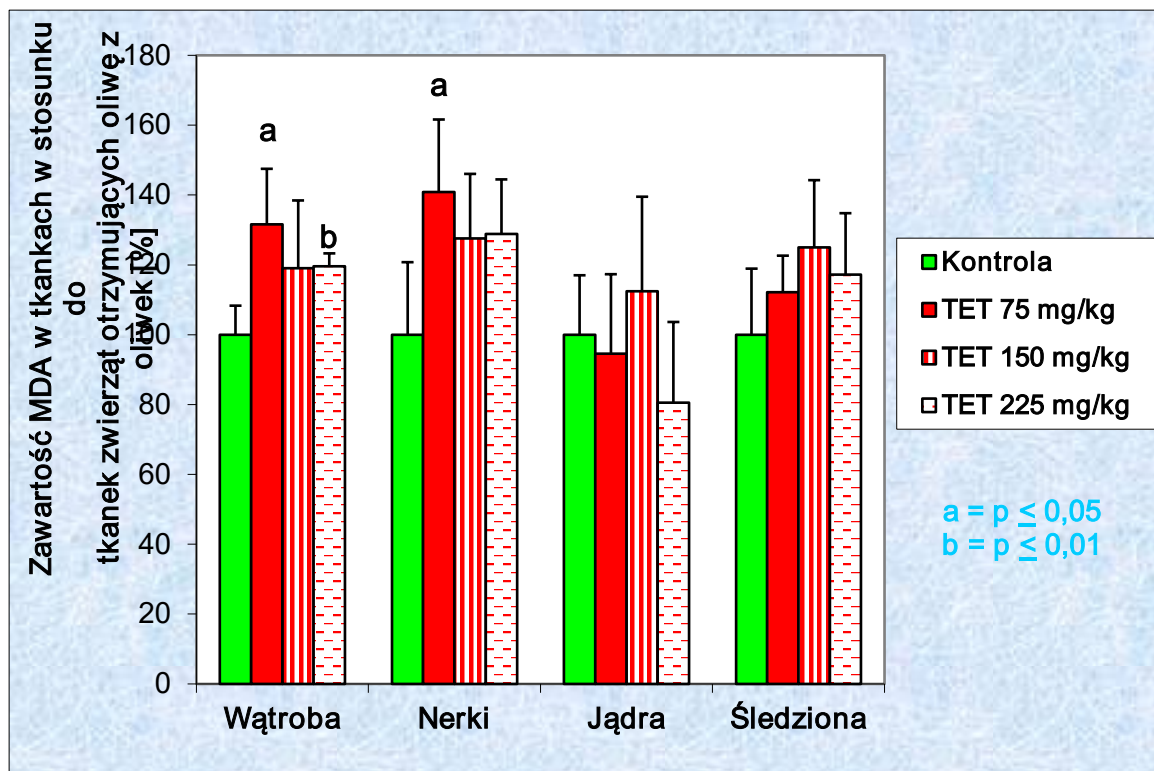
Zawartość MDA uległa podwyższeniu w wątrobie i nerkach zwierząt otrzymujących TET w dawce 75 mg/kg m.c. oraz wątrobie po ekspozycji na dawkę 225 mg/kg m.c.

Tetrachloroetylen podawany podskórnice w dawce 150 mg/kg m.c. nie powodował zmian zawartości MDA w żadnej z badanych tkanek. Nie zaobserwowano również zmian poziomu MDA w jądrach i śledzionie przy żadnym z trzech poziomów dawkowania. Uzyskane wyniki podano w tab. 13 i przedstawiono graficznie na ryc. 26 w % w stosunku do grupy kontrolnej, otrzymującej podskórnice samą oliwę z oliwek.

Tabela 13. Tkankowa zawartość MDA u szczurów eksponowanych podskórnice na różne stężenia tetrachloroetyleny przez 28 dni. Wartości przedstawiono jako $M \pm SD$.

Grupa	MDA [nmol/g]			
	Wątroba	Nerki	Jądra	Śledziona
Kontrolna	54,1 ± 4,5	44,3 ± 9,2	32,9 ± 5,6	29,6 ± 5,6
TET 75 mg/kg	71,2 ^a ± 8,6	62,4 ^a ± 9,2	31,1 ± 7,5	33,2 ± 3,1
TET 150 mg/kg	64,4 ± 10,5	56,5 ± 8,2	37,0 ± 8,9	37,0 ± 5,7
TET 225 mg/kg	64,7 ^b ± 2,0	57,1 ± 6,9	26,5 ± 7,6	34,7 ± 5,2

Każda grupa liczyła 5 szczurów; a = $p \leq 0,05$; b = $p \leq 0,01$.



Rycina 26. Tkankowa zawartość MDA u szczurów eksponowanych podskórnie na różne stężenia tetrachloroetyleny przez 28 dni.

Biorąc pod uwagę wyżej przedstawione wyniki wybrano tetrachloroetylen w dawce 75 mg/kg m.c. (0,45 mmola/kg m.c.) do badania interakcji z innymi rozpuszczalnikami organicznymi.

Dawki pozostałych rozpuszczalników dostosowano do dawki TET. W doświadczeniu 28-dniowym wynosiły one 0,45 mmol/kg m.c. (stosunek molowy TET i pozostałych rozpuszczalników 1:1), podczas gdy w doświadczeniu 90-dniowym 0,11 mmol/kg m.c. (stosunek molowy 1:0,25).

6.2 Doświadczenie powtarzane, krótkoterminowe (28 dni)

6.2.1 Ocena metabolizmu badanych związków

6.2.1.1 Wydalanie kwasu trichlorooctowego (TCA) z moczem

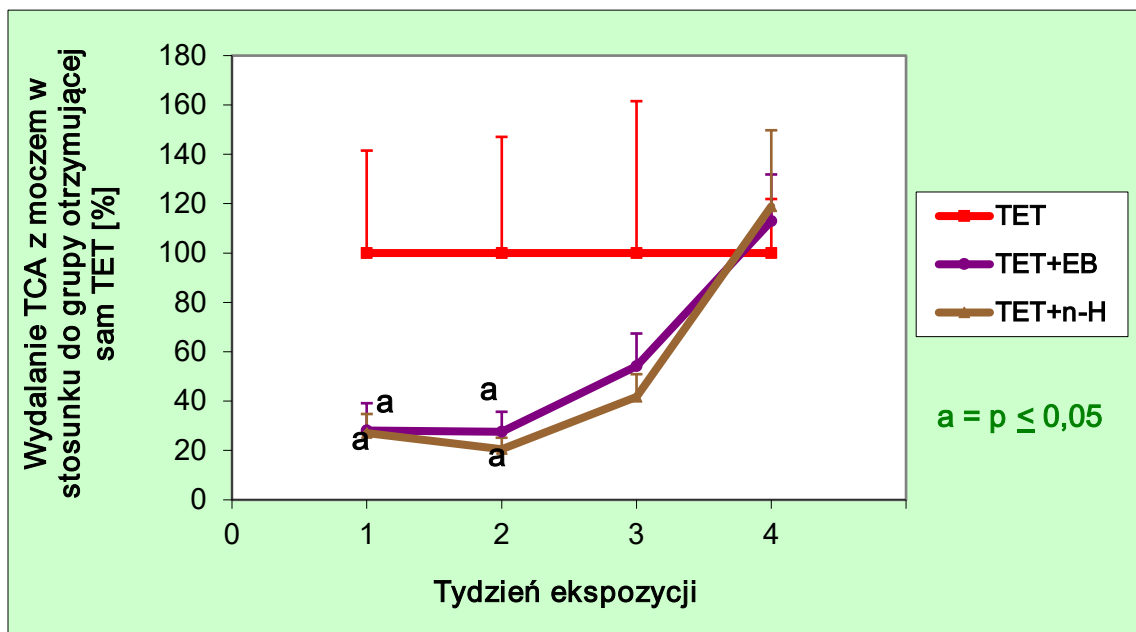
Dane liczbowe dotyczące wydalania TCA z moczem u szczurów otrzymujących TET podskórnie lub kombinację tego związku z EB oraz z n-H uzyskane po każdym z czterech tygodni narażenia zostały zamieszczone w tabeli 14. Zostały one również przedstawione graficznie na rycinie 27, w postaci wartości względnych w stosunku do zwierząt otrzymujących sam TET. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że n-H i EB działały hamująco na proces utleniania TET do kwasu trichlorooctowego przez pierwsze dwa tygodnie narażenia.

Tabela 14. **Wydalanie TCA z moczem u szczurów eksponowanych podskórnie na TET lub kombinacje TET z EB lub TET z n-H.**

GRUPA	Czas trwania ekspozycji [tyg.]			
	1 [nmol/kg/h]	2 [nmol/kg/h]	3 [nmol/kg/h]	4 [nmol/kg/godz]
TET	595 ± 247	580 ± 273	273 ± 168	201 ± 44
TET + EB	167^a ± 66	160^a ± 47	148 ± 36	227 ± 38
TET + n-H	161^a ± 46	119^a ± 27	114 ± 25	239 ± 62

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

a = $p \leq 0,05$.



Rycina 27. Wydalanie TCA z moczem u szczurów eksponowanych podskórnie na TET lub kombinacje TET z EB lub TET z n-H. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

6.2.1.2 Wydalanie kwasu hipurowego (HA) z moczem

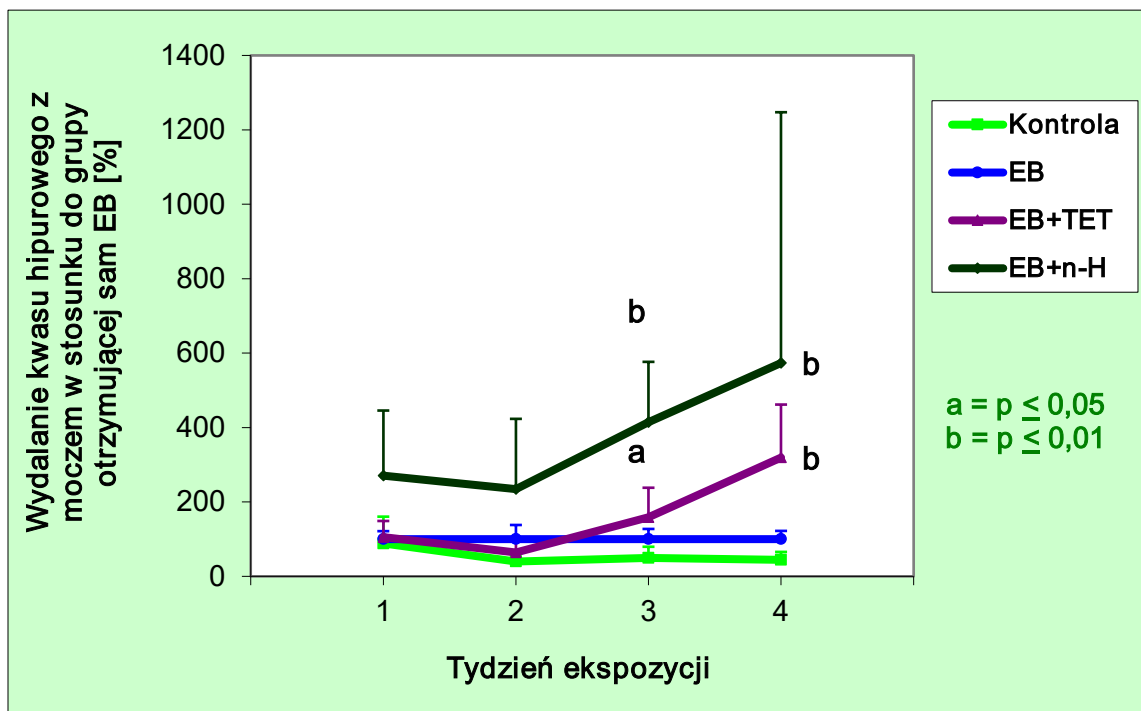
Stwierdzono, że n-H i TET stymulowały przemianę EB do kwasu hipurowego przez dwa ostatnie tygodnie narażenia. Średnie stężenia HA oznaczone w moczu zwierząt otrzymujących podskórnie oliwę z oliwek, sam etylobenzen oraz kombinacje EB z tetrachloroetylenem lub n-heksanem przedstawiono w tabeli 15, graficznie zaś wydalanie HA zobrazowano na rycinie 28 (w stosunku do grupy otrzymującej sam EB, której wartości przyjęto jako 100 %).

Tabela 15. Wydalanie kwasu hipurowego z moczem u szczurów eksponowanych podskórnie na oliwę z oliwek, EB lub mieszaninę EB z TET lub EB z n-H.

GRUPA	Czas trwania ekspozycji [tyg.]			
	1 [mg/kg/h]	2 [mg/kg/h]	3 [mg/kg/h]	4 [mg/kg/h]
Kontrolna	5,86 ± 4,76	3,10 ± 1,01	2,43 ± 1,49	2,92 ± 1,38
EB	6,62 ± 1,42	7,78 ± 2,96	4,93 ± 1,35	6,55 ± 1,45
EB + TET	6,97 ± 2,88	4,99 ± 2,69	7,82 ^a ± 3,92	20,91 ^b ± 9,33
EB + n-H	17,92 ± 11,58	18,24 ± 14,69	20,41 ^b ± 8,01	37,56 ^b ± 44,14

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

a = $p \leq 0,05$; b = $p \leq 0,01$.



Rycina 28. Wydalanie kwasu hipurowego z moczem u szczurów ekspozowanych podskórnie na oliwę z oliwek, EB lub kombinacje EB z TET lub EB z n-H. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

6.2.1.3 Wydalanie 2,5-heksanodionu (2,5-HD) z moczem

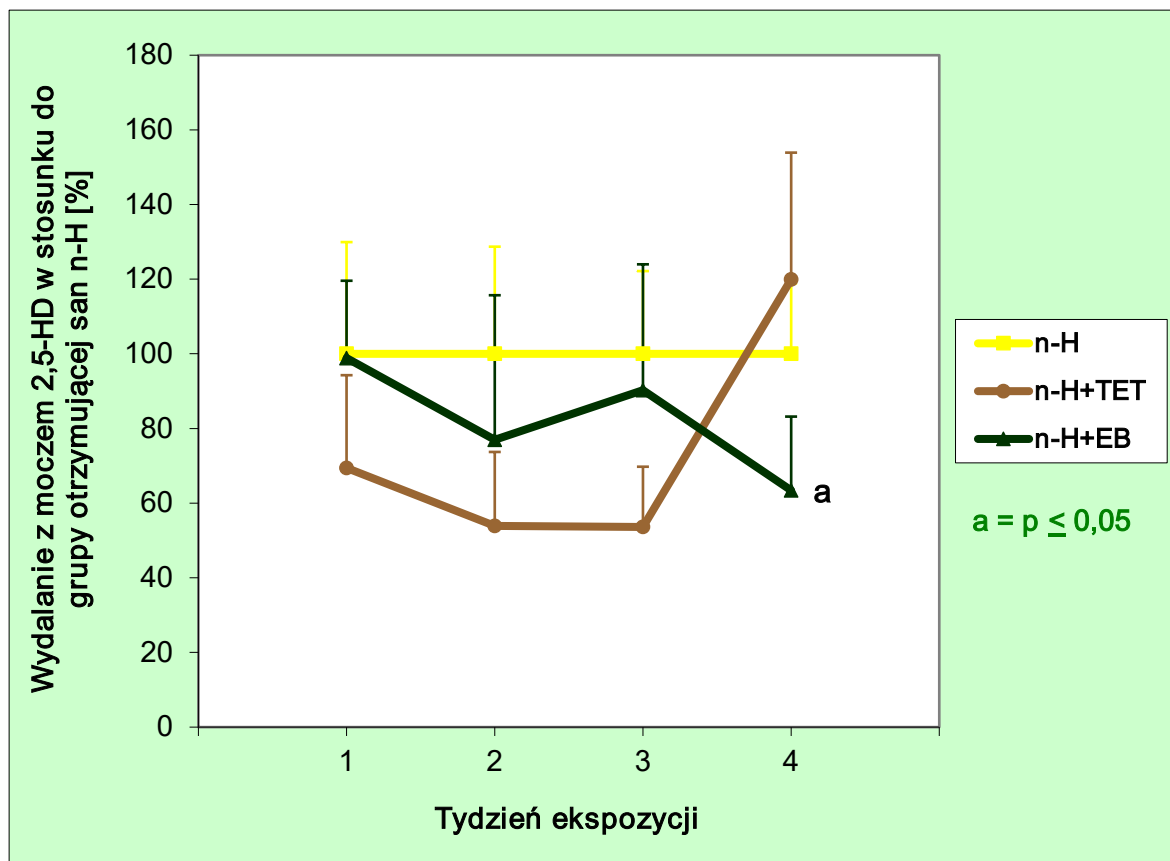
EB działał hamująco na przemianę n-H do 2,5-heksanodionu tylko w ostatnim tygodniu doświadczenia. Otrzymane wartości średnie podano w tab. 16 oraz przedstawiono na ryc. 29.

Tabela 16. Wydalanie 2,5-heksanodionu z moczem u szczurów ekspozowanych podskórnie na n-heksan lub kombinacje n-H z TET lub n-H z EB.

GRUPA	Czas trwania ekspozycji [tyg.]			
	1 [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$]	2 [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$]	3 [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$]	4 [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$]
n-H	26,56 $\pm 7,95$	29,75 $\pm 8,54$	21,56 $\pm 4,78$	17,31 $\pm 3,27$
n-H + TET	18,43 $\pm 6,61$	16,03 $\pm 5,90$	11,56 $\pm 3,48$	20,76 $\pm 5,88$
n-H + EB	26,26 $\pm 5,50$	22,89 $\pm 11,53$	19,47 $\pm 7,26$	10,98^a $\pm 3,42$

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

$a = p \leq 0,05$.



Rycina 29. Wydalanie 2,5-heksanodionu z moczem u szczurów eksponowanych podskórnie na n-heksan lub kombinacje n-H z TET lub n-H z EB. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

6.2.2 Ocena neurotoksyczności za pomocą testów behawioralnych

6.2.2.1 Odruch rogówkowy i odruch postawy

Żadna z dwuskładnikowych mieszanin badanych rozpuszczalników podawana podskórnie przez 28 dni nie powodowała zniesienia odruchów rogówkowego i postawy u któregośkolwiek z badanych zwierząt.

6.2.2.2 Badanie aktywności eksploracyjnej (psychoruchowej) w wolnym polu

Sam n-H oraz jego kombinacja z EB upośledzały aktywność poznawczą szczurów w teście wolnego pola po 4 tygodniach podskórnego podawania. W przypadku n-heksanu manifestowało się to zmniejszoną liczbą wykonanych przez zwierzęta słupków bez podparcia, natomiast w przypadku kombinacji n-H i EB mniejszą liczbą przebytych pól oraz zmniejszeniem liczby słupków (zarówno z podparciem, jak i bez podparcia). W pozostałych grupach brak było znaczących różnic w porównaniu z kontrolą w zachowaniu się zwierząt. Wyniki uzyskane w teście wolnego pola po 4 tygodniach podskórnego podawania rozpuszczalników organicznych przedstawiono w tab. 17 oraz na ryc. 30.

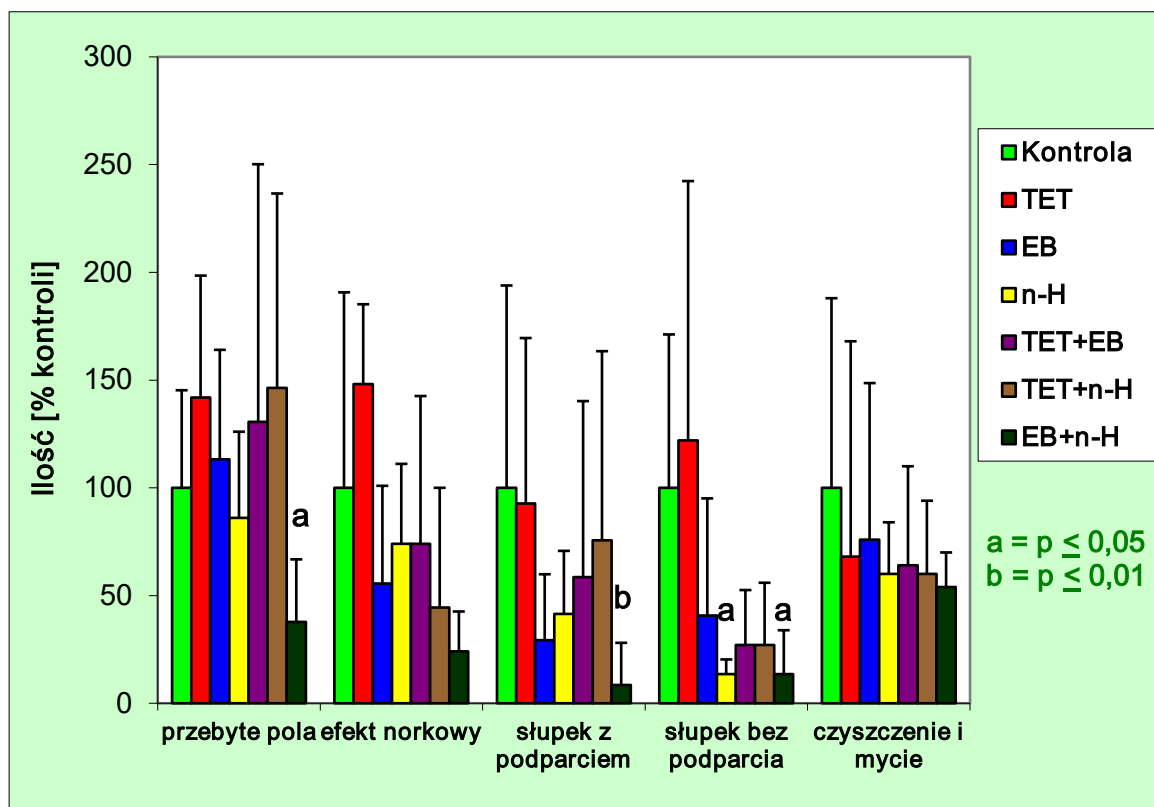
Tabela 17. Zachowanie się zwierząt w wolnym polu po 4 tygodniach podskórnego podawania rozpuszczalników organicznych.

GRUPA	przebyte pola	efekt norkowy	słupek z podparciem	słupek bez podparcia	liczba zabiegów czyszczenia łapek i sierści
Kontrolna	26,5 ± 12,0	5,4 ± 4,9	8,2 ± 7,7	5,9 ± 4,2	5,0 ± 4,4
TET	37,6 ± 15,0	8,0 ± 2	7,6 ± 6,3	7,2 ± 7,1	3,4 ± 5,0
EB	30,0 ± 13,5	3,0 ± 2,5	2,4 ± 2,5	2,4 ± 3,2	3,8 ± 3,6
n-H	22,8 ± 10,6	4,0 ± 2	3,4 ± 2,4	0,8^a ± 0,4	3,0 ± 1,2
TET + EB	34,6 ± 31,7	4,0 ± 3,7	4,8 ± 6,7	1,6 ± 1,5	3,2 ± 2,3
TET + n-H	38,8 ± 23,9	2,4 ± 3,0	6,2 ± 7,2	1,6 ± 1,7	3,0 ± 1,7
EB + n-H	10,0^a ± 7,7	1,3 ± 1,0	0,7^b ± 1,6	0,8^a ± 1,2	2,7 ± 0,8

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

a = $p \leq 0,05$;

b = $p \leq 0,01$.



Rycina 30. Zachowanie się zwierząt w wolnym polu po 4 tygodniach podskórnego podawania rozpuszczalników organicznych. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

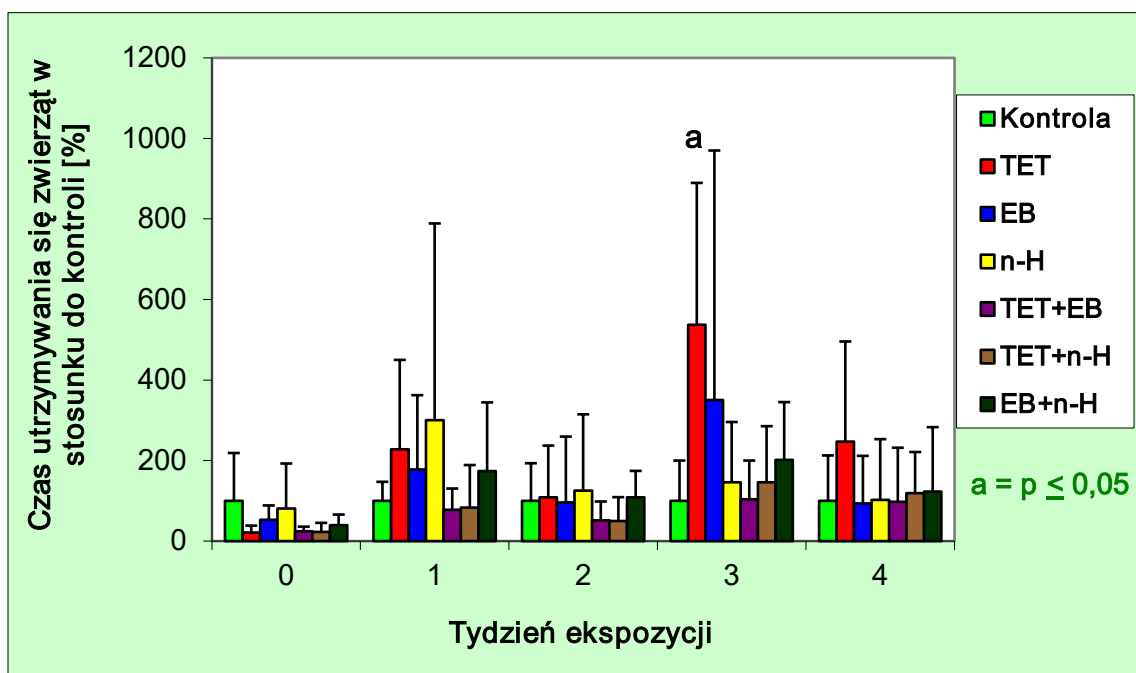
6.2.2.3 Czas utrzymywania się szczurów na walcu obrotowym

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w czasie utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym po podskórnym podawaniu poszczególnych rozpuszczalników oraz ich dwuskładnikowych mieszanin. Wyjątkiem był jedynie wydłużony czas utrzymywania się na walcu w grupie zwierząt otrzymujących sam TET po 3 tygodniach jego podawania. Otrzymane wyniki zamieszczono w tab. 18, graficznie zaś przedstawiono je na ryc. 31.

Tabela 18. Średni czas [s] utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników organicznych przez 28 dni.

Grupa	Czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym [s]				
	przed podaniem	po 1 tygodniu podawania	po 2 tygodniach podawania	po 3 tygodniach podawania	po 4 tygodniach podawania
Kontrolna	23,4 ± 27,8	7,2 ± 3,4	12,1 ± 11,3	4,8 ± 4,8	4,7 ± 5,3
TET	5,0 ± 4,0	16,4 ± 16,0	13,2 ± 15,5	25,8 ^a ± 16,9	11,6 ± 11,7
EB	12,4 ± 8,3	12,8 ± 13,3	11,6 ± 19,8	16,8 ± 29,76	4,4 ± 5,55
n-H	19,0 ± 26,1	21,6 ± 35,2	15,2 ± 22,9	7,0 ± 7,2	4,8 ± 7,1
TET + EB	5,8 ± 2,6	5,6 ± 3,8	6,2 ± 5,7	5,0 ± 4,6	4,6 ± 6,3
TET + n-H	5,4 ± 5,2	6,0 ± 7,6	6,0 ± 7,2	7,0 ± 6,7	5,6 ± 4,8
EB + n-H	9,3 ± 6,1	12,5 ± 12,3	13,2 ± 7,9	9,7 ± 6,9	5,8 ± 7,5

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;
a = $p \leq 0,05$.



Rycina 31. Średni czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników organicznych przez 28 dni. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

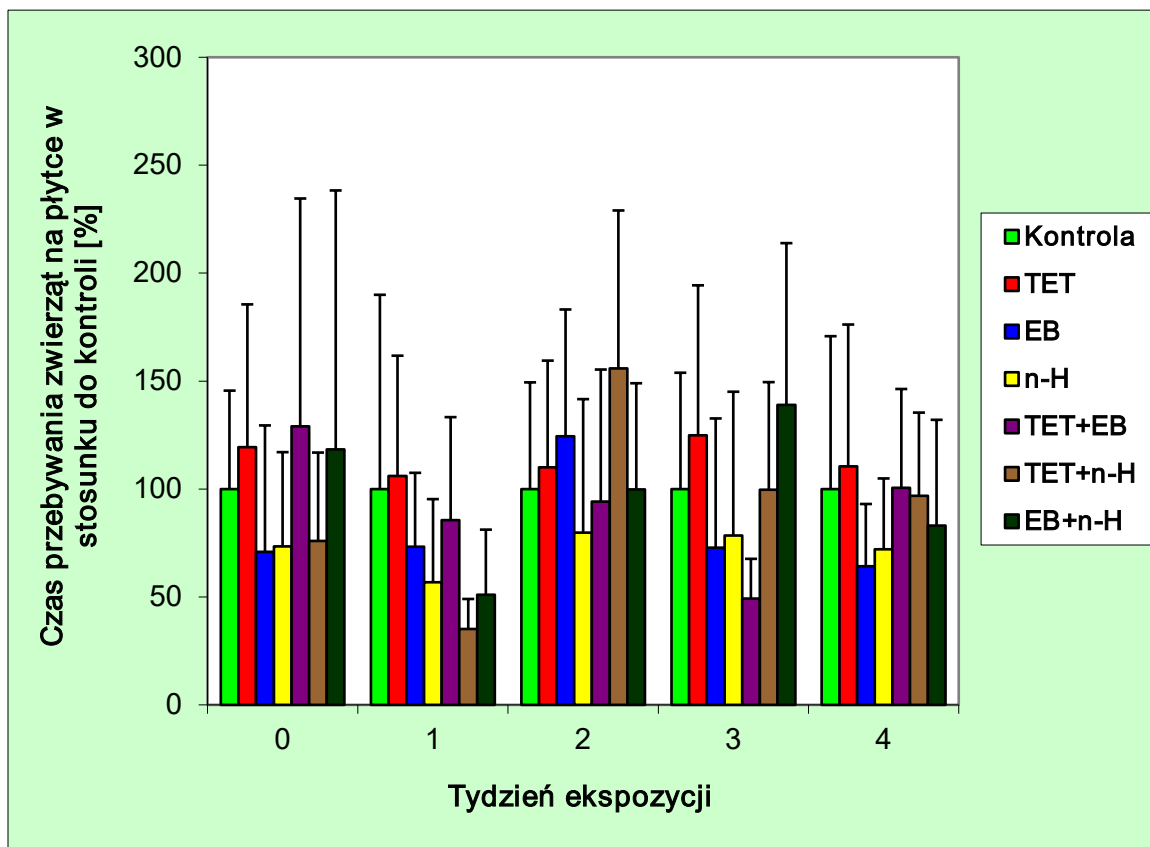
6.2.2.4 Aktywność unikania bodźca termicznego (test „gorącej płytki”)

Nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie różnic w czasie przebywania zwierząt na „gorącej płytce” zarówno po podskórnym podawaniu pojedynczych rozpuszczalników, jak i ich dwuskładnikowych mieszanin. Otrzymane wyniki zamieszczono w tab. 19 oraz na ryc. 32.

Tabela 19. Średni czas [s] przebywania zwierząt na „gorącej płytce” po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników przez 28 dni.

Grupa	Czas przebywania zwierząt na „gorącej płytce” [s]				
	przed podaniem	po 1 tygodniu podawania	po 2 tygodniach podawania	po 3 tygodniach podawania	po 4 tygodniach podawania
Kontrolna	15,82 ± 7,21	15,35 ± 13,81	9,92 ± 4,90	9,21 ± 4,96	7,77 ± 5,50
TET	18,88 ± 10,47	16,28 ± 8,55	10,92 ± 4,90	11,50 ± 6,40	8,58 ± 5,11
EB	11,21 ± 9,27	11,25 ± 5,25	12,34 ± 5,83	6,71 ± 5,51	4,99 ± 2,24
n-H	11,62 ± 6,90	8,73 ± 5,90	7,92 ± 6,13	7,23 ± 6,13	5,60 ± 2,55
TET + EB	20,41 ± 16,70	13,13 ± 7,33	9,34 ± 6,07	4,53 ± 1,70	7,81 ± 3,56
TET + n-H	12,02 ± 6,47	5,40 ± 2,13	15,46 ± 7,26	9,18 ± 4,59	7,53 ± 2,99
EB + n-H	18,73 ± 18,97	7,82 ± 4,64	9,90 ± 4,88	12,80 ± 6,90	6,45 ± 3,81

Każda grupa liczyła po 5 szczurów.



Rycina 32. Średni czas [s] przebywania zwierząt na „gorącej płytce” po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników przez 28 dni. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

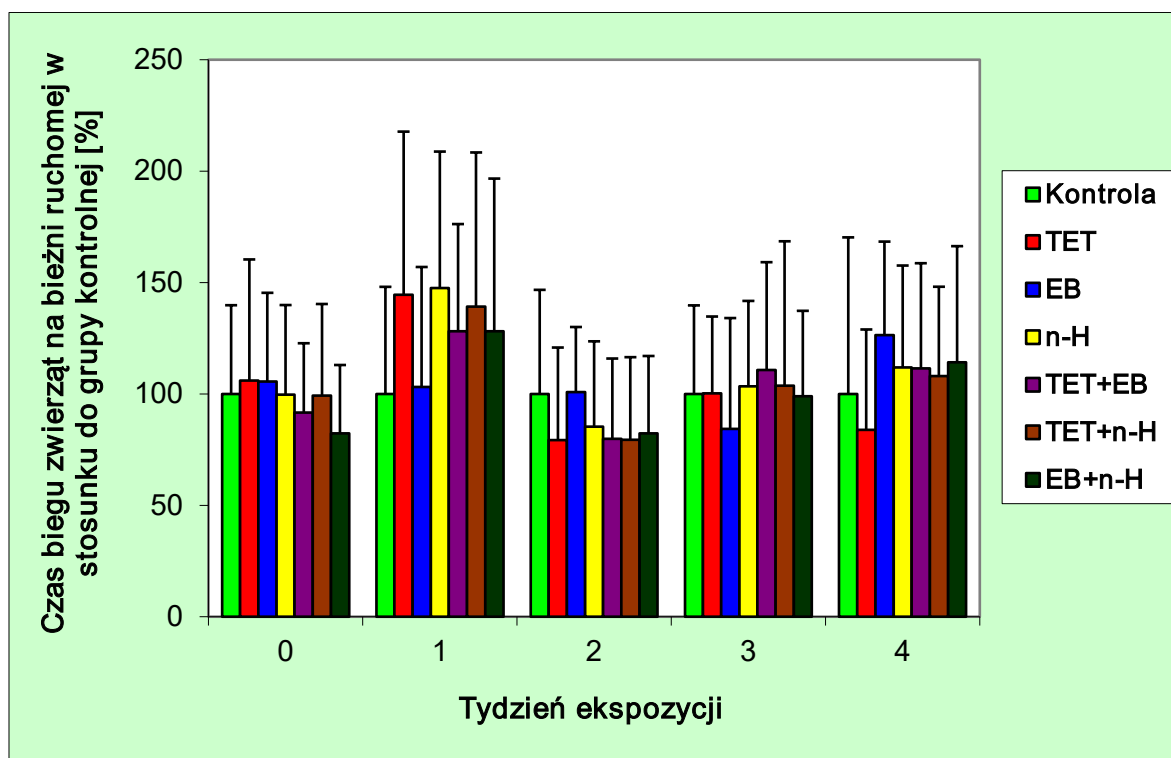
6.2.2.5 Próba wysiłkowa na bieżni ruchomej

Nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie różnic czasu trwania biegu zwierząt po bieżni ruchomej w tym modelu doświadczenia. Otrzymane wyniki zamieszczono w tab. 20 i na ryc. 33.

Tabela 20. Średni czas [s] biegu zwierząt na bieżni ruchomej po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników.

Grupa	Czas przebywania zwierząt na bieżni ruchomej [s]				
	przed podaniem	po 1 tygodniu podawania	po 2 tygodniach podawania	po 3 tygodniach podawania	po 4 tygodniach podawania
Kontrolna	3645 ± 1451	2268 ± 1090	3766 ± 1759	2899 ± 1152	2690 ± 1890
TET	3865 ± 1980	3278 ± 1660	2987 ± 1563	2908 ± 998	2256 ± 1212
EB	3849 ± 1450	2340 ± 1220	3798 ± 1099	2445 ± 1441	3400 ± 1129
n-H	3632 ± 1467	3345 ± 1390	3210 ± 1445	2999 ± 1110	3010 ± 1230
TET + EB	3340 ± 1134	2907 ± 1090	3008 ± 1356	3210 ± 1403	2998 ± 1270
TET + n-H	3618 ± 1498	3156 ± 1570	2989 ± 1398	3005 ± 1880	2905 ± 1079
EB + n-H	2998 ± 1120	2905 ± 1555	3098 ± 1309	2870 ± 1110	3070 ± 1404

Każda grupa liczyła po 5 szczurów.



Rycina 33. Średni czas biegu zwierząt na bieżni ruchomej po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników. Wartości wyrażono jako M ± SD.

6.2.3 Ocena hepatotoksyczności za pomocą wskaźników biochemicznych

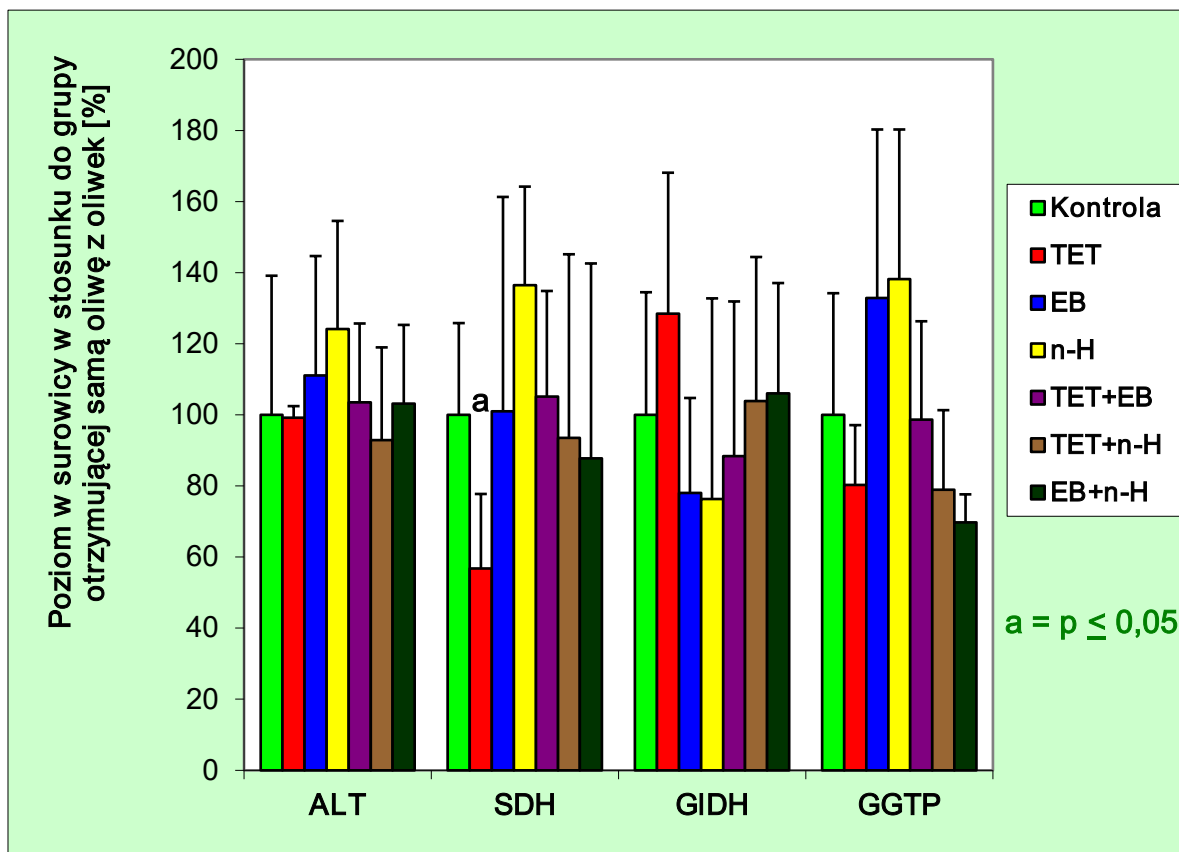
Poza niższą aktywnością SDH u zwierząt otrzymujących sam TET nie obserwowano zmian enzymatycznych w surowicy krwi w stosunku do grupy kontrolnej. Wyniki oznaczeń aktywności enzymów w surowicy zamieszczono w tab. 21 i przedstawiono na ryc. 34.

Tabela 21. **Aktywność enzymów wskaźnikowych w surowicy krwi zwierząt otrzymujących podskórnie badane związki przez 28 dni.**

GRUPA	ALT [IU/l]	SDH [IU/l]	GIDH [IU/l]	GGTP [IU/l]
Kontrolna	25,3 ± 9,9	3,10 ± 0,80	2,32 ± 0,80	7,60 ± 2,60
TET	25,1 ± 0,8	1,76^a ± 0,65	2,98 ± 0,92	6,10 ± 1,28
EB	28,1 ± 8,5	3,13 ± 1,87	1,81 ± 0,62	10,10 ± 3,60
n-H	31,4 ± 7,7	4,23 ± 0,86	1,77 ± 1,31	10,50 ± 3,20
TET + EB	26,2 ± 5,6	3,26 ± 0,92	2,05 ± 1,01	7,50 ± 2,10
TET + n-H	23,5 ± 6,6	2,90 ± 1,60	2,41 ± 0,94	6,00 ± 1,70
EB + n-H	26,1 ± 5,6	2,72 ± 1,70	2,46 ± 0,72	5,30 ± 0,60

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

a = $p \leq 0,05$.



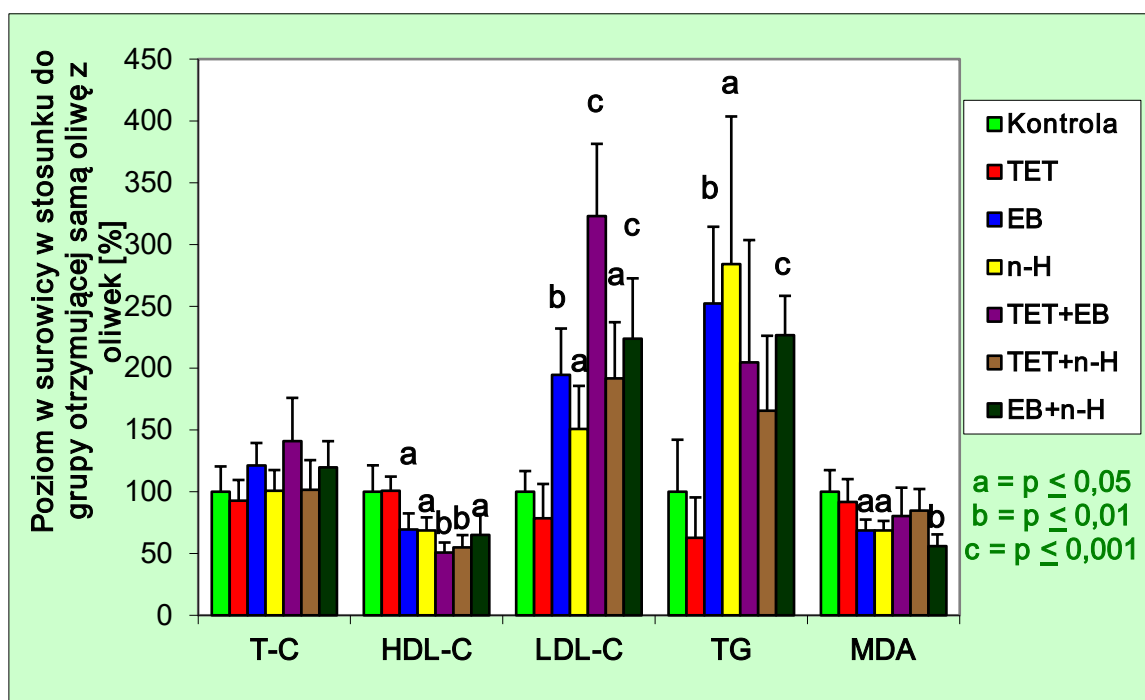
Rycina 34. Procentowe zmiany aktywności enzymów wskaźnikowych w surowicy krwi zwierząt eksponowanych na badane związki w stosunku do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

W profilu lipidowym surowicy krwi obserwowano obniżone stężenie HDL-C oraz podwyższone stężenie LDL-C we wszystkich grupach zwierząt otrzymujących badane rozpuszczalniki, z wyjątkiem grupy, której podawano sam TET. Wzrost stężenia TG zaobserwowano u zwierząt narażonych na EB i n-H oraz ich mieszaninę. Obniżenie stężenia MDA wystąpiło również u zwierząt narażonych na sam EB i sam n-H oraz łącznie na EB i n-H. Uzyskane wyniki są przedstawione w tab. 22 i na ryc. 35.

Tabela 22. Stężenie frakcji lipidowych oraz MDA w surowicy krwi zwierząt eksponowanych na badane rozpuszczalniki organiczne pojedynczo i w mieszaninach dwuskładnikowych przez 28 dni.

GRUPA	T-C [mmol/l]	HDL-C [mmol/l]	LDL-C [mmol/l]	TG [mmol/l]	MDA [μ mol/l]
Kontrolna	1,370 \pm 0,280	0,900 \pm 0,192	0,431 \pm 0,072	0,195 \pm 0,082	2,75 \pm 0,48
TET	1,270 \pm 0,230	0,908 \pm 0,102	0,338 \pm 0,120	0,122 \pm 0,064	2,52 \pm 0,51
EB	1,680 \pm 0,250	0,626 ^a \pm 0,116	0,838 ^b \pm 0,162	0,492 ^b \pm 0,121	1,89 ^a \pm 0,24
n-H	1,380 \pm 0,230	0,619 ^a \pm 0,094	0,650 ^a \pm 0,150	0,554 ^a \pm 0,233	1,89 ^a \pm 0,21
TET + EB	1,930 \pm 0,480	0,458 ^a \pm 0,072	1,392 ^c \pm 0,252	0,399 \pm 0,193	2,21 \pm 0,63
TET + n-H	1,390 \pm 0,330	0,494 ^b \pm 0,090	0,826 ^a \pm 0,196	0,323 \pm 0,118	2,33 \pm 0,48
EB + n-H	1,640 \pm 0,290	0,585 ^a \pm 0,152	0,965 ^c \pm 0,210	0,442 ^c \pm 0,062	1,54 ^b \pm 0,26

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;
a = $p \leq 0,05$; b = $p \leq 0,01$; c = $p \leq 0,001$.



Rycina 35. Stężenie frakcji lipidowych oraz MDA w surowicy krwi zwierząt eksponowanych na badane rozpuszczalniki organiczne. Wartości wyrażono jako M \pm SD.

Stężenia NPSH były znacząco niższe w wątrobie szczurów narażonych na n-H i EB oraz w nerkach po narażeniu na n-H, TET oraz kombinację n-H i EB. Z drugiej strony, stężenie MDA było podwyższone w wątrobie po narażeniu na TET oraz kombinację n-H i TET oraz w nerkach u zwierząt narażonych na n-H i TET, a także w jądrach w przypadku łącznego narażenia na n-H i TET (tab. 23, ryc. 36 i 37).

Tabela 23. Stężenie NPSH i MDA w tkankach zwierząt eksponowanych podskórnie na rozpuszczalniki organiczne przez 28 dni.

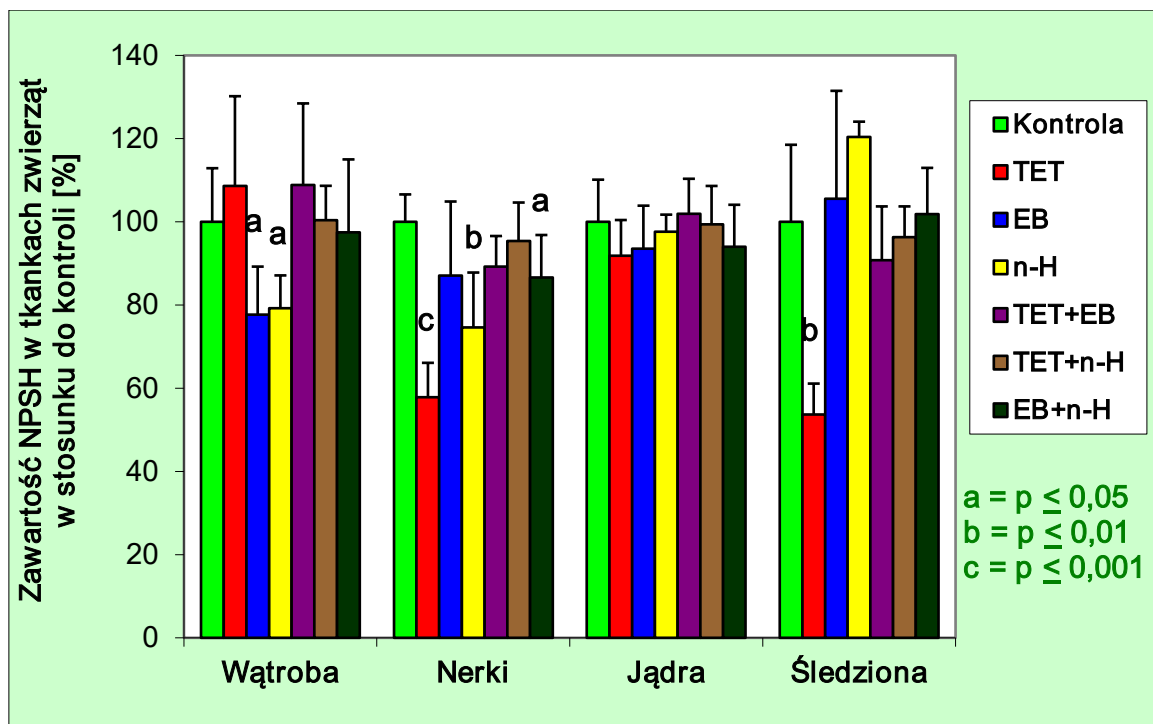
GRUPA	NPSH [$\mu\text{mol/g}$]				MDA [nmol/g]			
	Wątroba	Nerki	Jądra	Śledziona	Wątroba	Nerki	Jądra	Śledziona
Kontrolna	5,20 $\pm 0,67$	4,10 $\pm 0,27$	4,64 $\pm 0,47$	0,54 $\pm 0,10$	55,8 $\pm 8,8$	45,6 $\pm 10,1$	33,2 $\pm 6,5$	28,4 $\pm 13,0$
TET	5,65 $\pm 1,12$	2,37^c $\pm 0,34$	4,26 $\pm 0,40$	0,29^b $\pm 0,04$	71,2^a $\pm 8,6$	62,4^a $\pm 9,2$	31,1 $\pm 7,5$	33,2 $\pm 3,1$
EB	4,04^a $\pm 0,60$	3,57 $\pm 0,73$	4,34 $\pm 0,48$	0,57 $\pm 0,14$	51,7 $\pm 5,8$	40,3 $\pm 4,0$	33,2 $\pm 9,4$	18,9 $\pm 6,4$
n-H	4,12^a $\pm 0,41$	3,06^b $\pm 0,54$	4,53 $\pm 0,19$	0,65 $\pm 0,02$	66,6 $\pm 4,2$	76,0^b $\pm 10,4$	29,4 $\pm 6,6$	22,1 $\pm 3,8$
TET + EB	5,66 $\pm 1,02$	3,66 $\pm 0,30$	4,73 $\pm 0,39$	0,49 $\pm 0,07$	58,4 $\pm 9,0$	61,8 $\pm 12,0$	39,9 $\pm 4,4$	30,5 $\pm 7,1$
TET + n-H	5,22 $\pm 0,43$	3,91 $\pm 0,38$	4,61 $\pm 0,43$	0,52 $\pm 0,04$	69,9^a $\pm 8,6$	62,0 $\pm 10,5$	50,0^b $\pm 7,4$	25,2 $\pm 2,9$
EB + n-H	5,07 $\pm 0,91$	3,55^a $\pm 0,42$	4,36 $\pm 0,47$	0,55 $\pm 0,06$	63,4 $\pm 5,1$	54,8 $\pm 7,22$	35,4 $\pm 5,5$	14,7 $\pm 5,8$

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

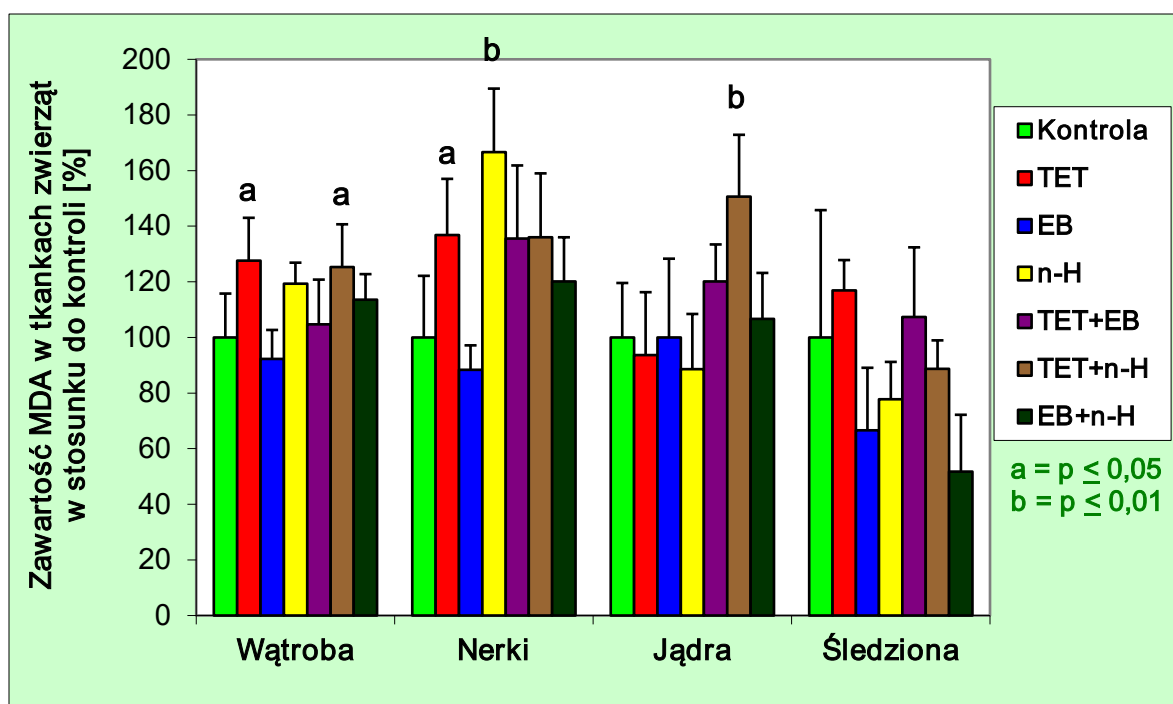
a = $p \leq 0,05$;

b = $p \leq 0,01$;

c = $p \leq 0,001$.



Rycina 36. Stężenie NPSH w tkankach zwierząt eksponowanych podskórną na rozpuszczalniki organiczne przez 28 dni. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.



Rycina 37. Stężenie MDA w tkankach zwierząt eksponowanych podskórną na rozpuszczalniki organiczne przez 28 dni. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

6.3 Doświadczenie podprzewlekłe (90 dni)

6.3.1 Ocena metabolizmu badanych związków

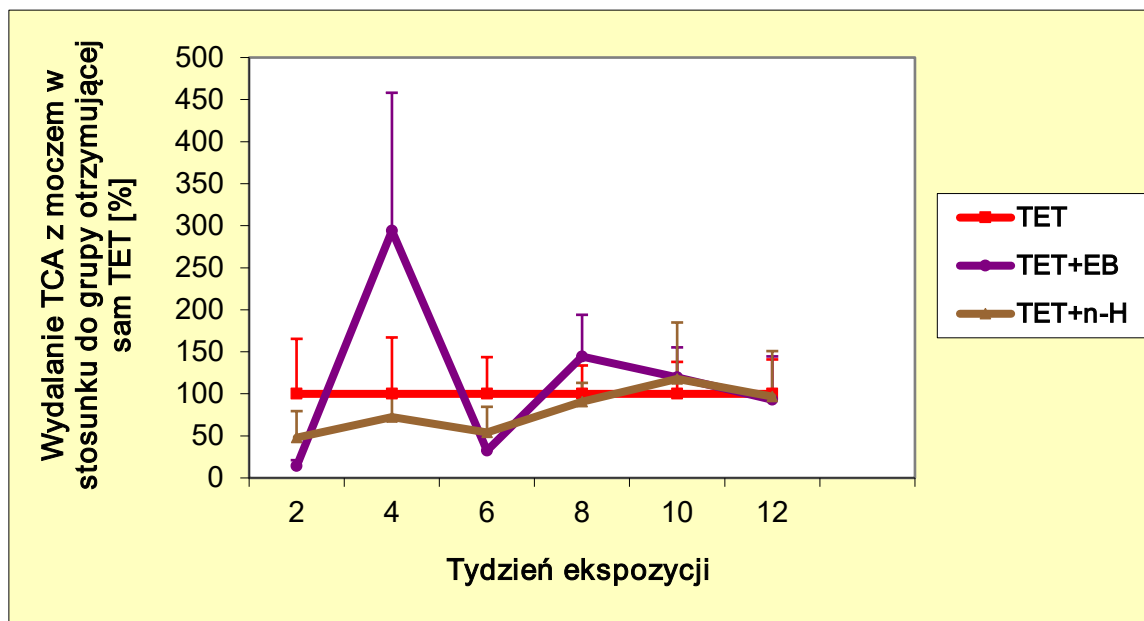
6.3.1.1 Wydalanie kwasu trichlorooctowego (TCA) z moczem

W warunkach narażenia podprzewlekłego nie obserwowano statystycznie znamiennych zmian w wydalaniu TCA z moczem u zwierząt eksponowanych na sam TET oraz kombinacje TET z EB lub z n-H (tab. 24, ryc. 38).

Tabela 24. Wydalanie TCA z moczem [nmol/kg/h] u szczurów pobierających TET lub mieszaninę TET z EB lub TET z n-H z wodą do picia.

Grupa	Tydzień narażenia					
	2	4	6	8	10	12
TET	220,89 ± 144,51	88,50 ± 59,38	159,37 ± 69,59	49,69 ± 16,78	66,69 ± 25,35	66,55 ± 27,22
TET + EB	31,10 ± 15,56	260,14 ± 145,28	51,68 ± 9,41	71,76 ± 24,65	79,87 ± 23,69	61,75 ± 34,44
TET + n-H	105,82 ± 69,72	63,98 ± 22,13	86,03 ± 48,80	44,99 ± 11,19	78,56 ± 44,74	64,32 ± 36,08

Każda grupa liczyła po 5 szczurów.



Rycina 38. Wydalanie TCA z moczem u szczurów pobierających z wodą do picia TET lub mieszaninę TET z EB lub n-H. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

6.3.1.2 Wydalanie kwasu hipurowego (HA) z moczem

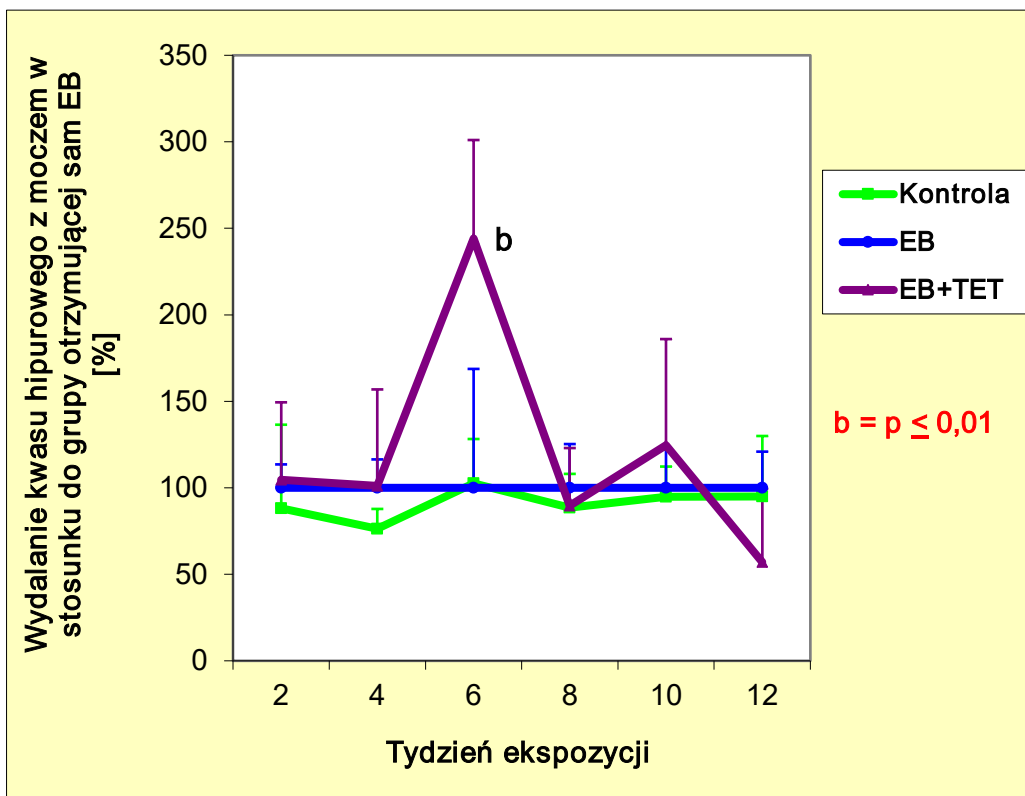
Nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian w wydalaniu z moczem HA w wyniku podawania EB łącznie z TET przez 90 dni w porównaniu z grupą otrzymującą sam EB. Wyjątkiem był szósty tydzień narażenia, kiedy to wystąpił przejściowy wzrost wydalania tego metabolitu. Wyniki zamieszczono w tab. 25 i przedstawiono w procentach, przyjmując za 100% wartości uzyskane w grupie pobierającej z wodą sam EB (ryc. 39).

Tabela 25. Wydalanie kwasu hipurowego [mg/kg/h] z moczem u szczurów pobierających z wodą do picia EB lub mieszaninę EB z TET.

Grupa	Tydzień narażenia					
	2	4	6	8	10	12
Kontrolna (woda)	1,50 ± 0,82	2,00 ± 0,30	2,00 ± 0,50	1,54 ± 0,34	1,62 ± 0,30	1,68 ± 0,62
EB	1,70 ± 0,23	2,62 ± 0,43	1,95 ± 1,34	1,74 ± 0,44	1,71 ± 0,38	1,77 ± 0,37
EB + TET	1,78 ± 0,76	2,65 ± 1,46	4,76^b ± 1,11	1,56 ± 0,58	2,13 ± 1,05	1,01 ± 0,75

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

b = $p \leq 0,01$.



Rycina 39. Wydalanie kwasu hipurowego z moczem u szczurów pobierających z wodą do picia EB lub mieszaninę EB z TET. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

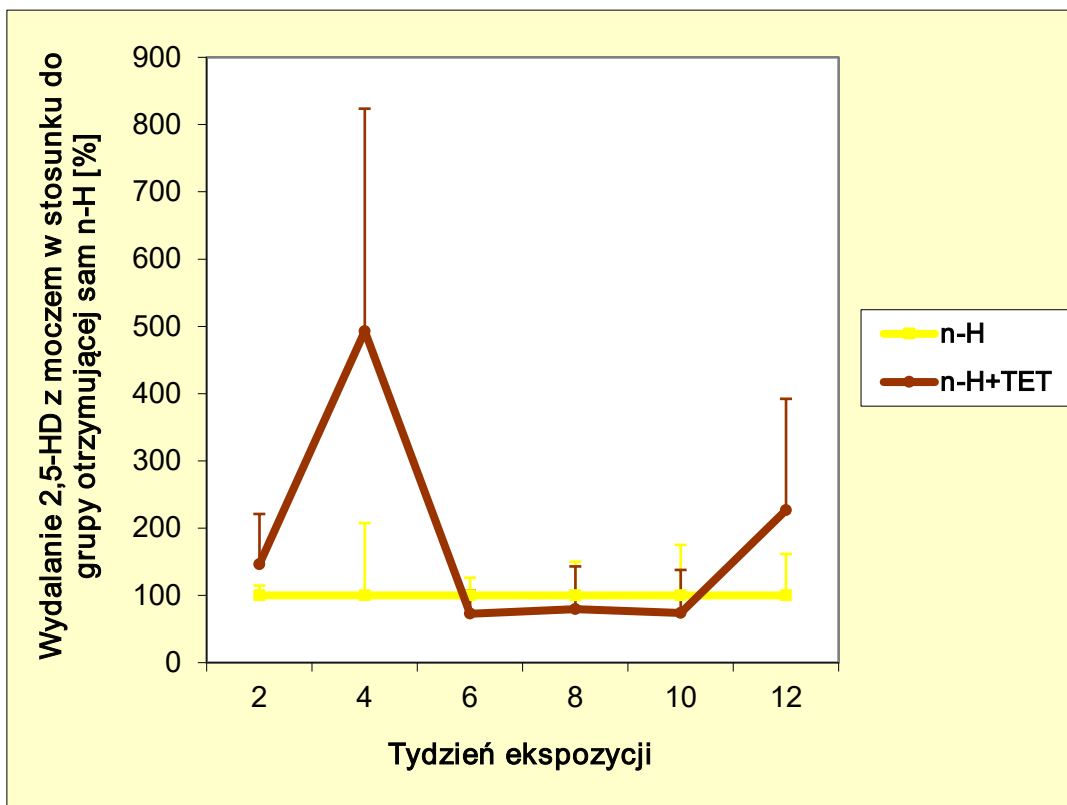
6.3.1.3 Wydalanie 2,5-heksanodionu (2,5-HD) z moczem

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w wydalaniu 2,5-HD z moczem u szczurów otrzymujących n-H łącznie z TET przez 90 dni w stosunku do grupy otrzymującej sam n-H (tab. 26, ryc. 40).

Tabela 26. Wydalanie 2,5-heksanodionu [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$] z moczem u szczurów pobierających z wodą do picia n-H lub mieszaninę n-H z TET.

Grupa	Tydzień ekspozycji					
	2	4	6	8	10	12
n-H	31,19 $\pm 4,56$	11,66 $\pm 12,55$	43,43 $\pm 11,40$	91,85 $\pm 46,02$	44,32 $\pm 33,29$	26,79 $\pm 16,51$
n-H + TET	45,64 $\pm 23,31$	57,47 $\pm 38,57$	31,57 $\pm 15,03$	73,06 $\pm 58,36$	32,68 $\pm 28,43$	60,73 $\pm 44,36$

Każda grupa liczyła po 5 szczurów.



Rycina 40. **Wydalenie 2,5-heksanodionu z moczem u szczurów pobierających z wodą do picia n-H lub mieszaninę n-H z TET.** Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

6.3.2 Ocena hepatotoksyczności za pomocą wskaźników biochemicznych

6.3.2.1 Aktywność enzymów wskaźnikowych w surowicy krwi

U szczurów narażonych na TET oraz mieszaninę TET i EB obserwowano wzrost aktywności ALT i SDH w surowicy krwi pod koniec doświadczenia. Nieco słabiej zaznaczony wzrost aktywności ALT wystąpił u szczurów narażonych łącznie na TET i n-H. Aktywności pozostałych enzymów nie różniły się od wartości oznaczonych w grupie kontrolnej. Wyniki oznaczeń poszczególnych enzymów zamieszczono w tabelach 27 – 30, oraz na rycinach 41 - 44.

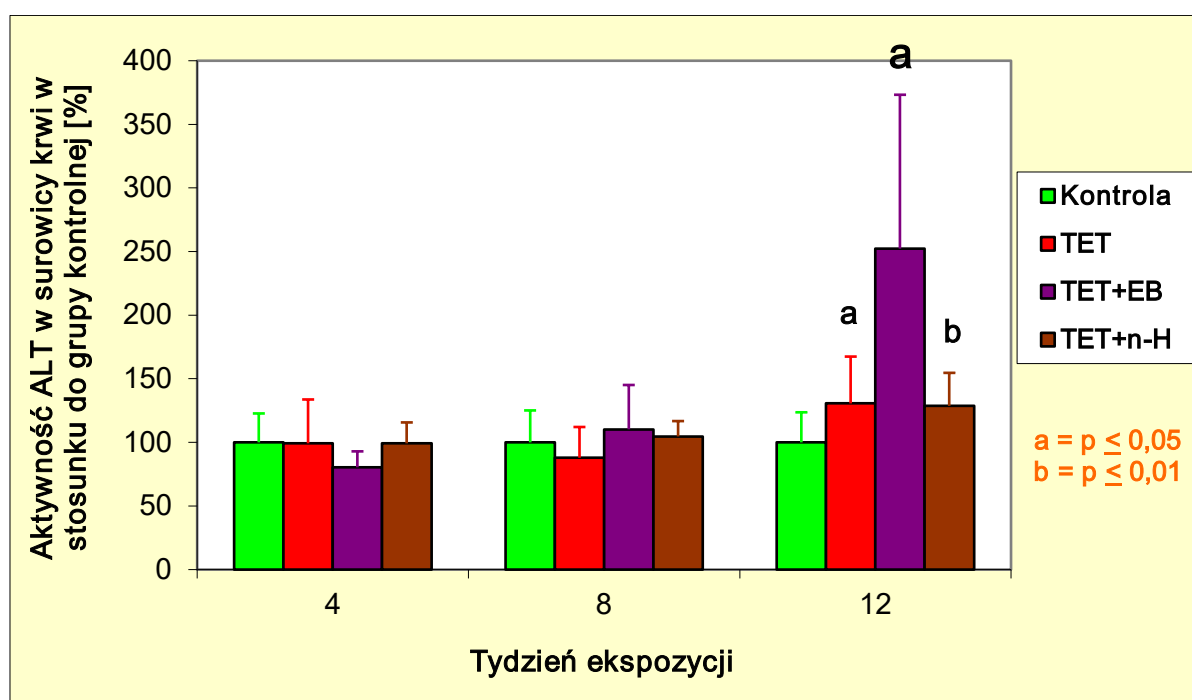
Tabela 27. Aktywność ALT w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy.

Grupa	ALT [IU/l]		
	po 1miesiącu	po 2miesiącach	po 3 miesiącach
Kontrolna	25,5 ± 5,8	21,5 ± 5,4	25,8 ± 6,1
TET	25,3 ± 8,8	18,9 ± 5,2	33,7 ^a ± 9,5
TET + EB	20,5 ± 3,2	23,7 ± 7,5	65,1 ^a ± 31,2
TET + n-H	25,3 ± 4,2	22,5 ± 2,6	33,2 ^b ± 6,7

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

a = $p \leq 0,05$;

b = $p \leq 0,01$.



Rycina 41. Aktywność ALT w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w stosunku do grupy pobierającej samą wodę. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

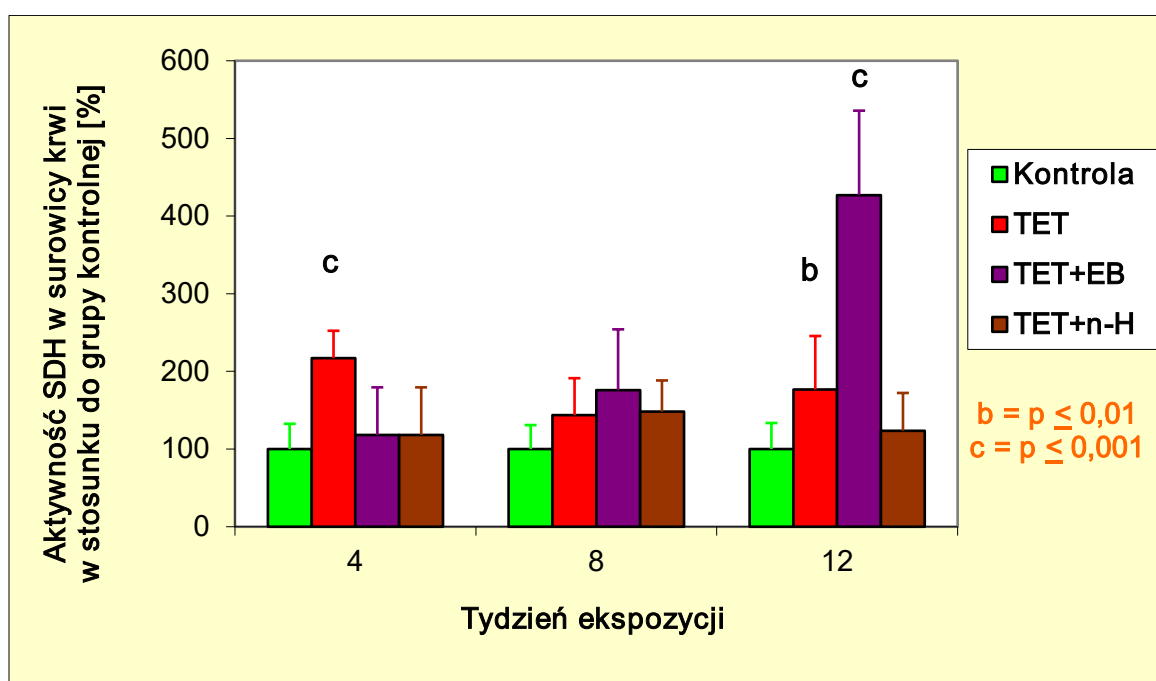
Tabela 28. Aktywność SDH w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy.

Grupa	SDH [IU/l]		
	po 1miesiącu	po 2miesiącach	po 3 miesiącach
Kontrolna	4,24 ± 1,38	5,50 ± 1,70	2,74 ± 0,92
TET	9,20 ^c ± 1,50	7,90 ± 2,62	4,84 ^b ± 1,89
TET + EB	5,01 ± 2,60	9,68 ± 4,30	11,70 ^c ± 2,98
TET + n-H	5,01 ± 2,60	8,16 ± 2,20	3,39 ± 1,33

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

b = $p \leq 0,01$;

c = $p \leq 0,001$.



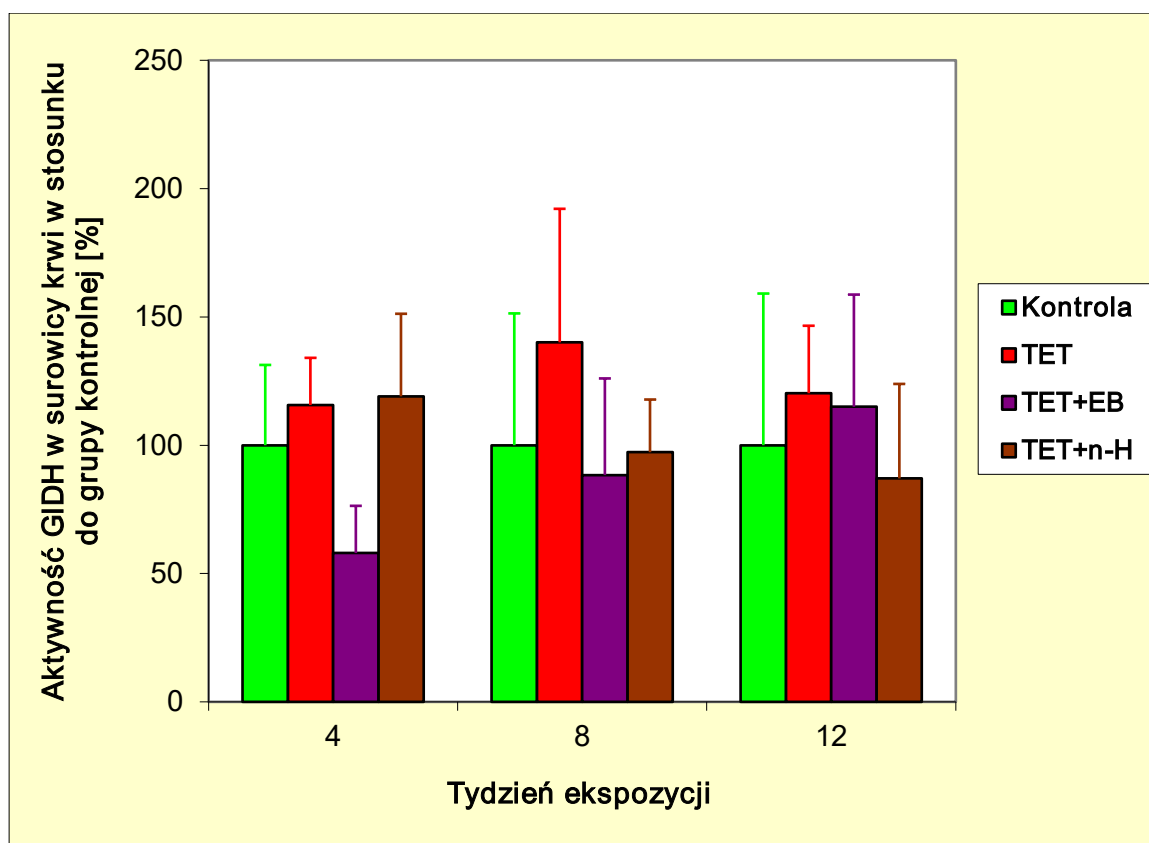
Rycina 42. Aktywność SDH w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w stosunku do grupy pobierającej samą wodę. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

Tabela 29. Aktywność GIDH w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy.

Grupa	GIDH [IU/l]		
	po 1miesiącu	po 2miesiącach	po 3 miesiącach
Kontrolna	3,26	2,92	2,47

Grupa	GIDH [IU/l]		
	po 1 miesiącu	po 2 miesiącach	po 3 miesiącach
	± 1,02	± 1,50	± 1,46
TET	3,77 ± 0,60	4,09 ± 1,52	2,97 ± 0,65
TET + EB	1,89 ± 0,60	2,58 ± 1,10	2,84 ± 1,08
TET + n-H	3,88 ± 1,05	2,84 ± 0,60	2,15 ± 0,91

Każda grupa liczyła po 5 szczurów.



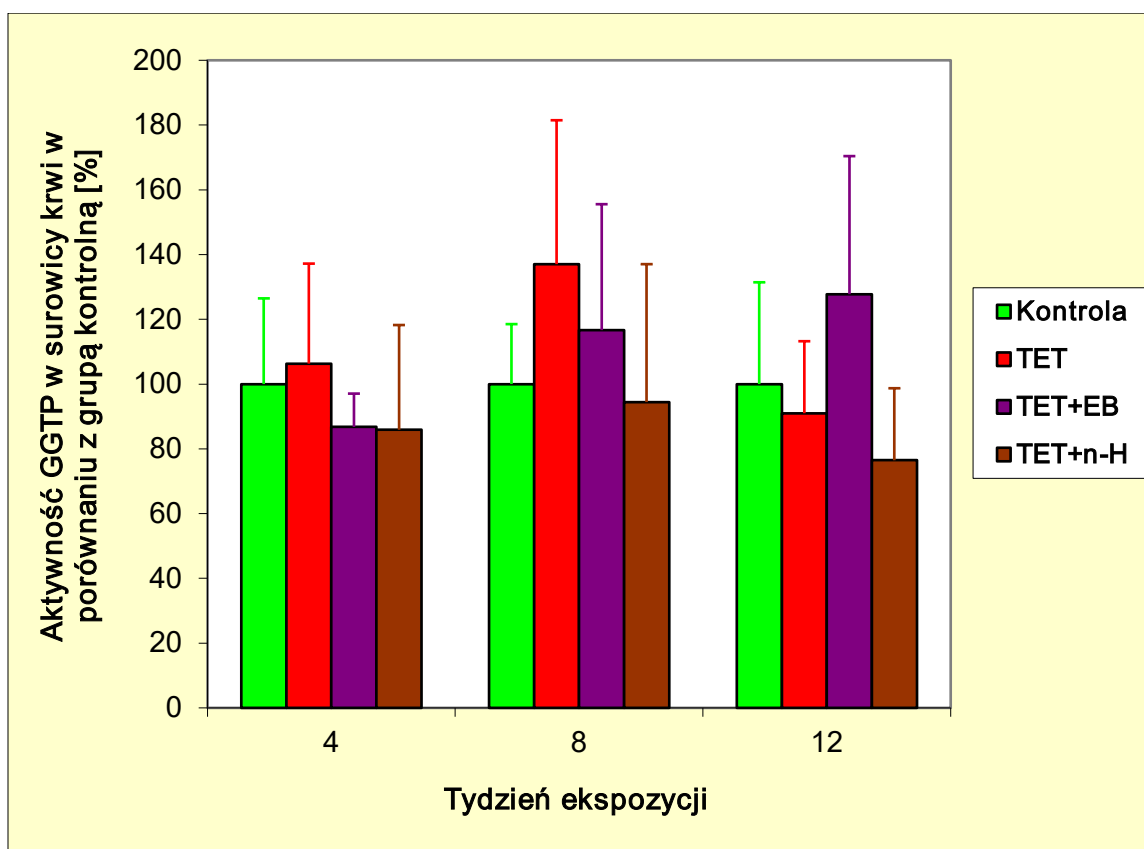
Rycina 43. Aktywność GIDH w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w stosunku do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

Tabela 30. Aktywność GGTP w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy.

Grupa	GGTP [IU/l]		
	po 1 miesiącu	po 2 miesiącach	po 3 miesiącach
Kontrolna	6,80	5,40	5,44

Grupa	GGTP [IU/l]		
	po 1miesiącu	po 2miesiącach	po 3 miesiącach
	± 1,80	± 1,00	± 1,71
TET	7,23 ± 2,10	7,40 ± 2,40	4,95 ± 1,21
TET + EB	5,90 ± 0,70	6,30 ± 2,10	6,95 ± 2,32
TET + n-H	5,84 ± 2,20	5,10 ± 2,30	4,16 ± 1,21

Każda grupa liczyła po 5 szczurów.



Rycina 44. Aktywność GGTP w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w stosunku do grupy kontrolnej. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

6.3.2.2 Stężenia frakcji lipidowych i MDA w surowicy krwi

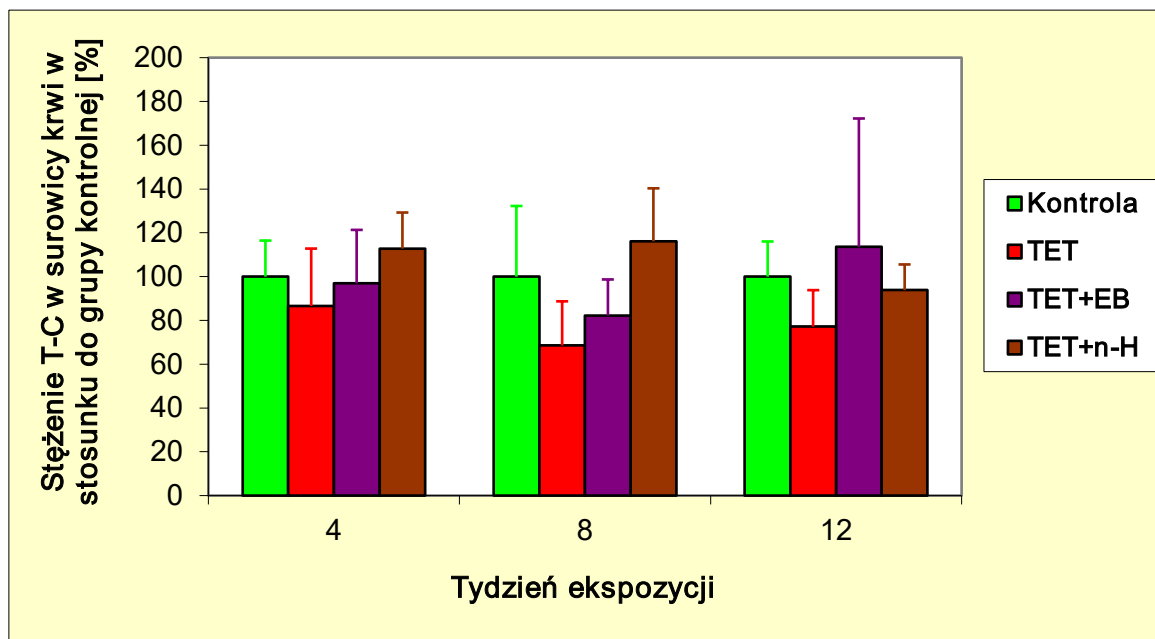
Zmiany biochemiczne w postaci wzrostu stężenia TG w surowicy krwi stwierdzono u szczurów narażonych na TET i jego mieszaninę z EB lub n-H po 3 miesiącach doświadczenia. Nie odnotowano zmian stężenia cholesterolu całkowitego ani jego frakcji HDL i LDL, z wyjątkiem krótkotrwałego spadku stężenia LDL-C w grupie szczurów otrzymujących sam TET po 2 miesiącach narażenia. Wyniki oznaczeń stężenia frakcji lipidowych surowicy przedstawiono w tabelach 31 i 32 oraz zobrazowano graficznie na rycinach 45 - 48 (jako procent wartości uzyskanych w grupie kontrolnej). Nie wystąpiły także zmiany stężenia MDA w surowicy krwi zwierząt w żadnej z badanych grup. Wyniki oznaczania MDA w surowicy przedstawia tab. 33 oraz ryc. 49.

Tabela 31. Stężenie cholesterolu całkowitego i jego frakcji HDL i LDL w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy.

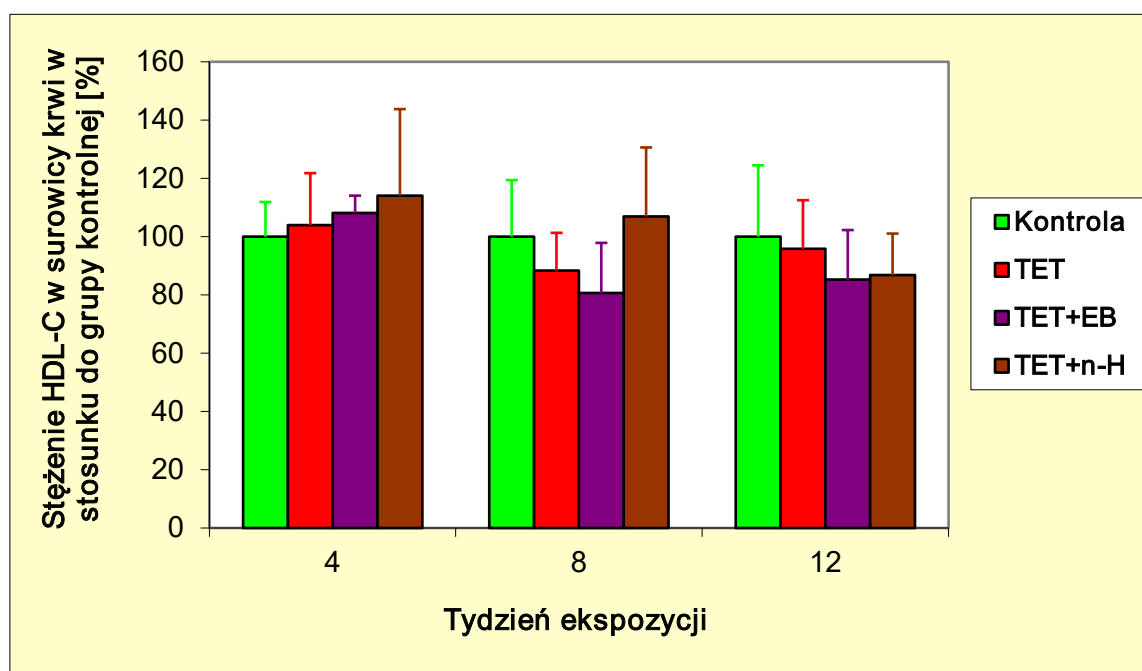
Grupa	CHOLESTEROL [mmol/l]								
	po 1miesiącu			po 2miesiącach			po 3 miesiącach		
	T-C	HDL-C	LDL-C	T-C	HDL-C	LDL-C	T-C	HDL-C	LDL-C
Kontrolna	1,640 ± 0,270	0,505 ± 0,060	1,055 ± 0,130	1,240 ± 0,400	0,464 ± 0,090	0,720 ± 0,180	1,620 ± 0,260	0,576 ± 0,141	0,977 ± 0,178
TET	1,420 ± 0,430	0,525 ± 0,090	0,775 ± 0,240	0,850 ± 0,250	0,410 ± 0,060	0,377^b ± 0,090	1,250 ± 0,270	0,552 ± 0,096	0,596 ± 0,126
TET + EB	1,590 ± 0,400	0,546 ± 0,030	0,973 ± 0,290	1,020 ± 0,204	0,374 ± 0,080	0,612 ± 0,112	1,840 ± 0,950	0,491 ± 0,098	1,247 ± 0,561
TET + n-H	1,850 ± 0,270	0,576 ± 0,150	1,167 ± 0,210	1,440 ± 0,300	0,496 ± 0,110	0,882 ± 0,190	1,520 ± 0,190	0,500 ± 0,082	0,910 ± 0,122

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

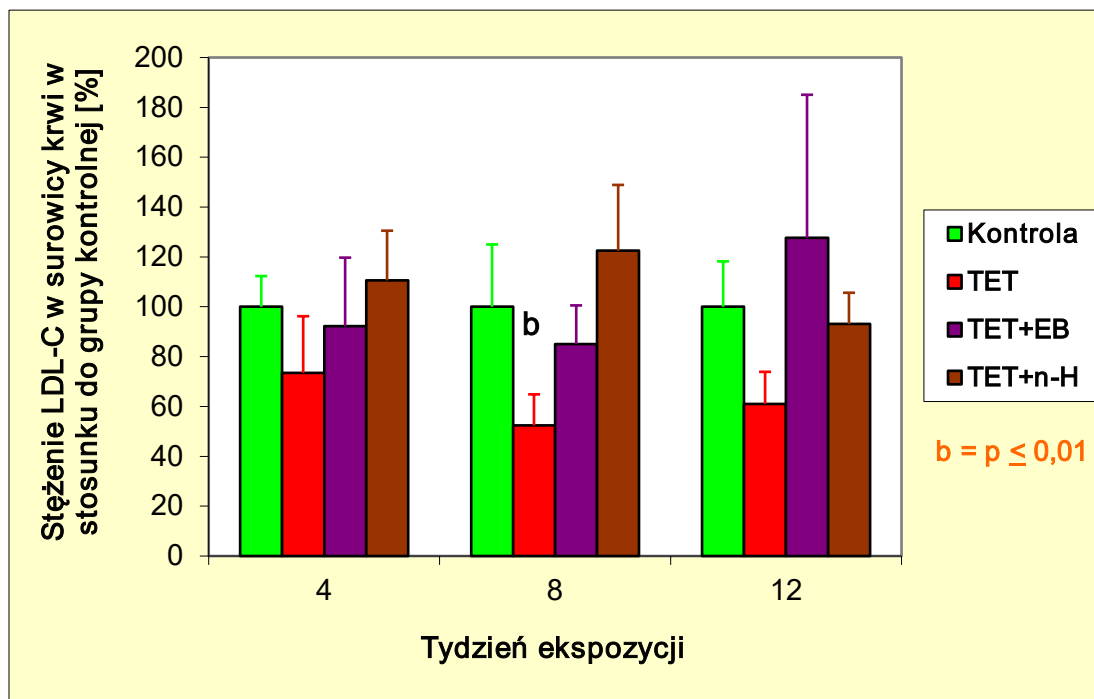
b = $p \leq 0,01$.



Rycina 45. **Stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną.** Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.



Rycina 46. **Stężenie cholesterolu HDL u surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną.** Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.



Rycina 47. Stężenie cholesterolu LDL u surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

Tabela 32. Stężenie triglicerydów w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy.

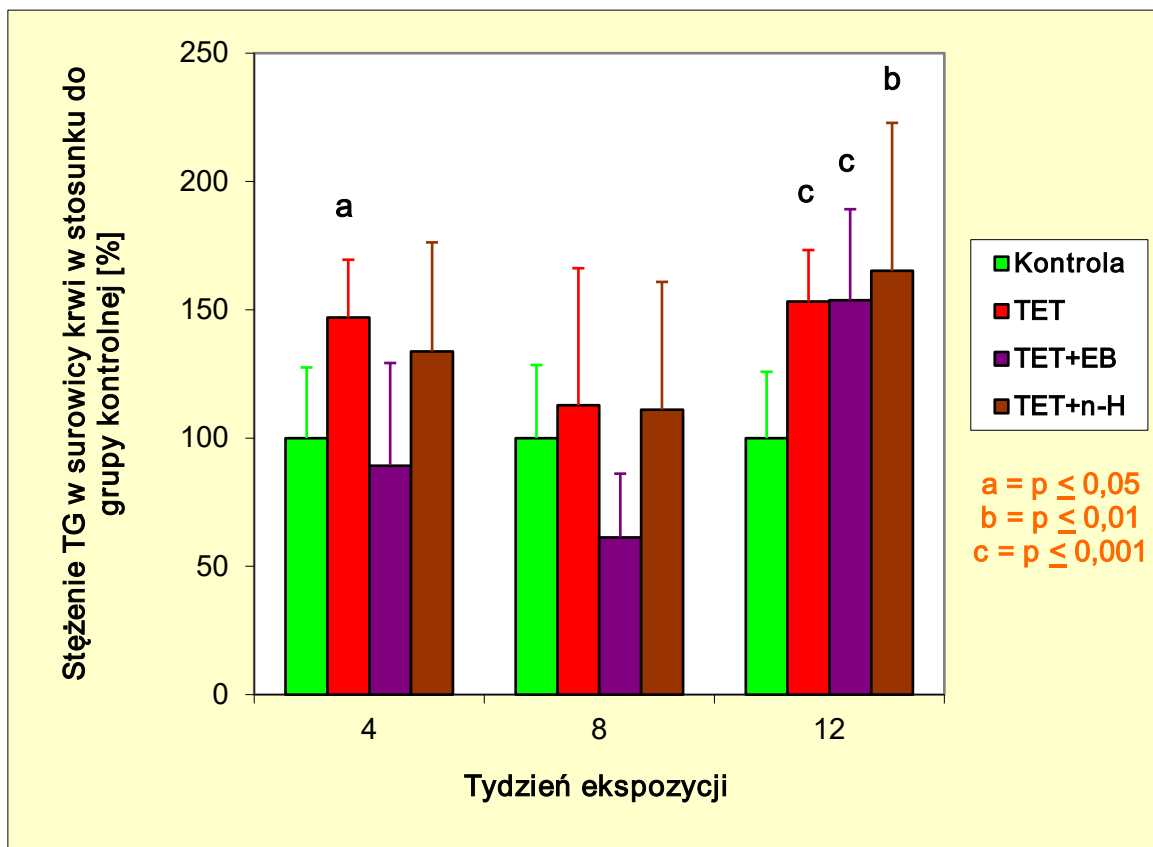
Grupa	T-G[mmol/l]		
	po 1miesiącu	po 2miesiącach	po 3 miesiącach
Kontrolna	0,400 $\pm 0,110$	0,281 $\pm 0,080$	0,333 $\pm 0,086$
TET	0,588^a $\pm 0,090$	0,317 $\pm 0,150$	0,510^c $\pm 0,067$
TET + EB	0,357 $\pm 0,160$	0,172 $\pm 0,070$	0,512^c $\pm 0,118$
TET + n-H	0,535 $\pm 0,170$	0,312 $\pm 0,140$	0,550^b $\pm 0,192$

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

a = $p \leq 0,05$;

b = $p \leq 0,01$;

c = $p \leq 0,001$.

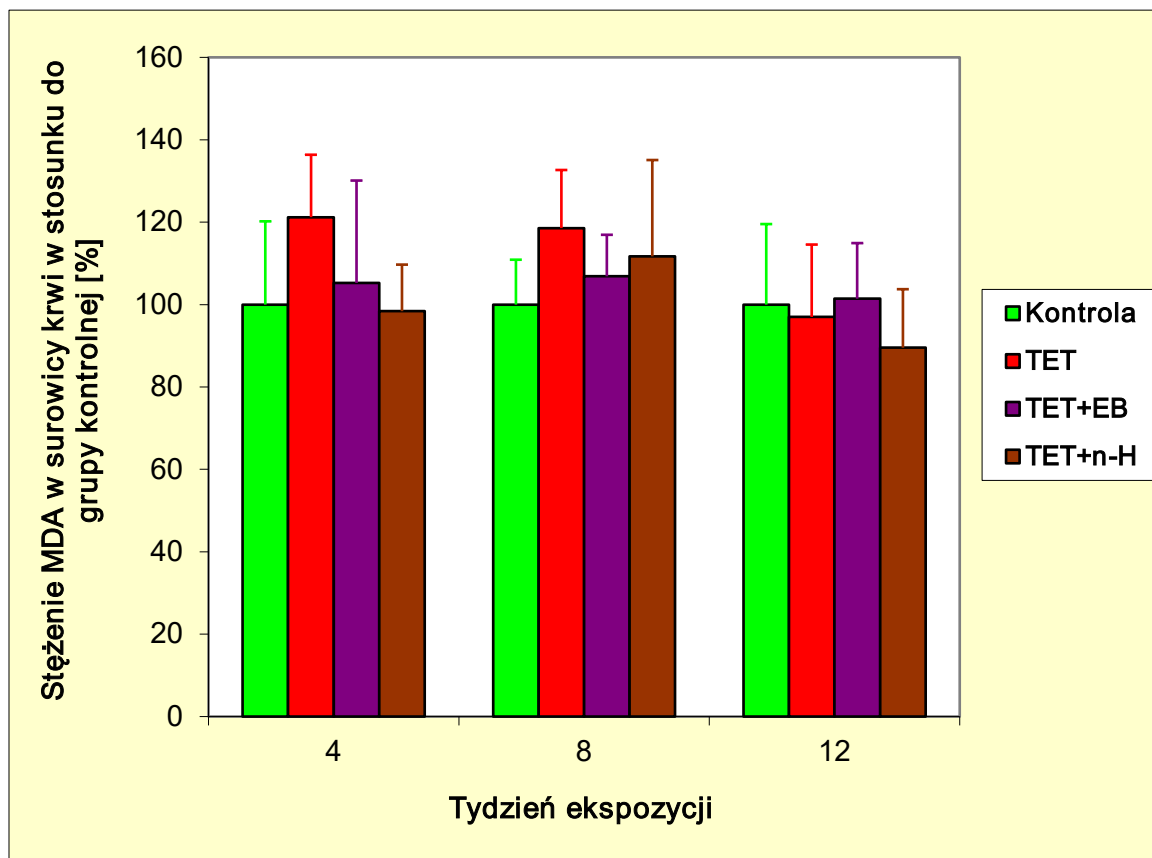


Rycina 48. Stężenie triglicerydów u surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

Tabela 33. Stężenie MDA w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy.

Grupa	MDA [$\mu\text{mol/l}$]		
	po 1miesiącu	po 2miesiącach	po 3 miesiącach
Kontrolna	4,95 $\pm 1,00$	4,96 $\pm 0,54$	5,63 $\pm 1,10$
TET	6,00 $\pm 0,75$	5,88 $\pm 0,70$	5,46 $\pm 0,99$
TET + EB	5,21 $\pm 1,23$	5,30 $\pm 0,50$	5,71 $\pm 0,76$
TET + n-H	4,87 $\pm 0,56$	5,54 $\pm 1,16$	5,04 $\pm 0,80$

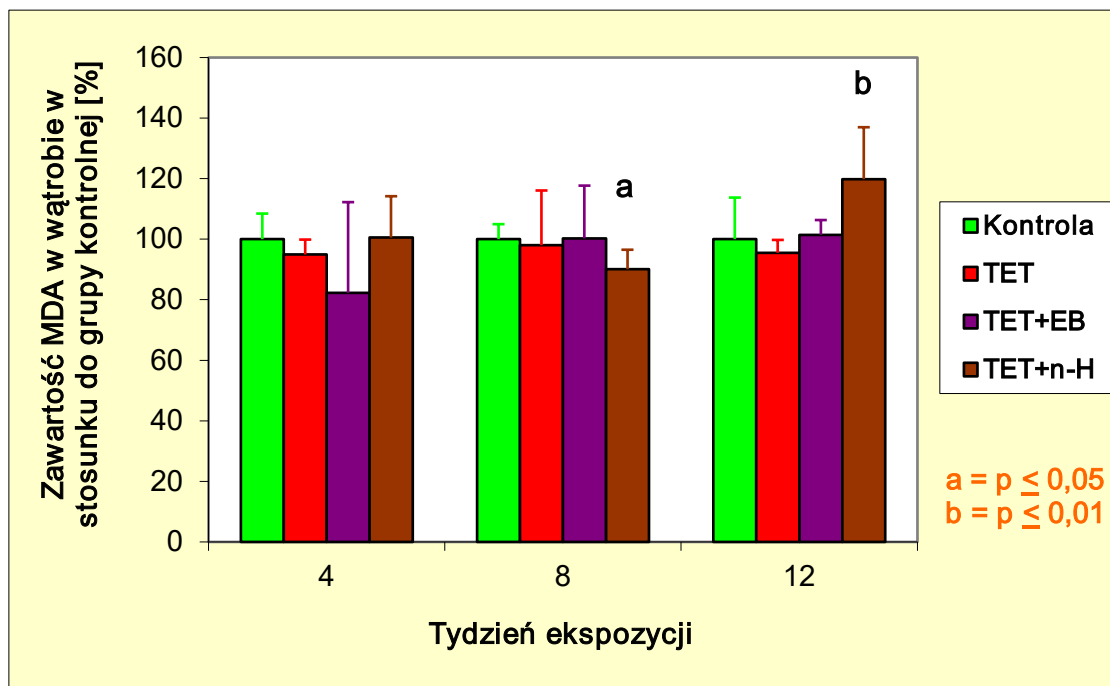
Każda grupa liczyła po 5 szczurów.



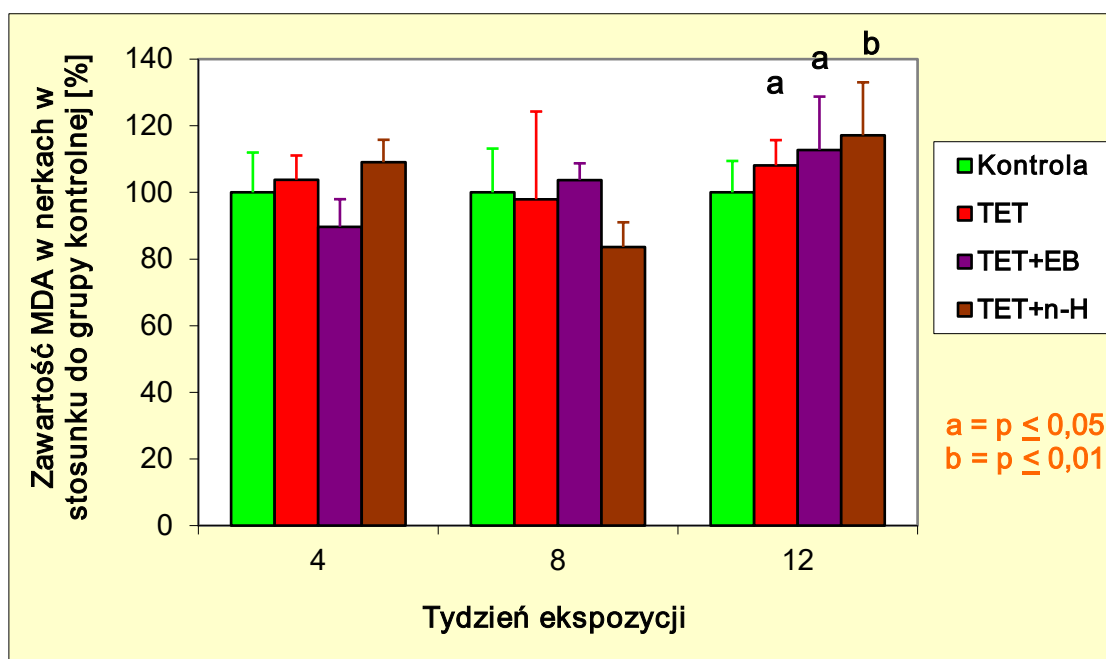
Rycina 49. Stężenie MDA w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

6.3.2.3 Procesy pro- i antyoksydacyjne w tkankach

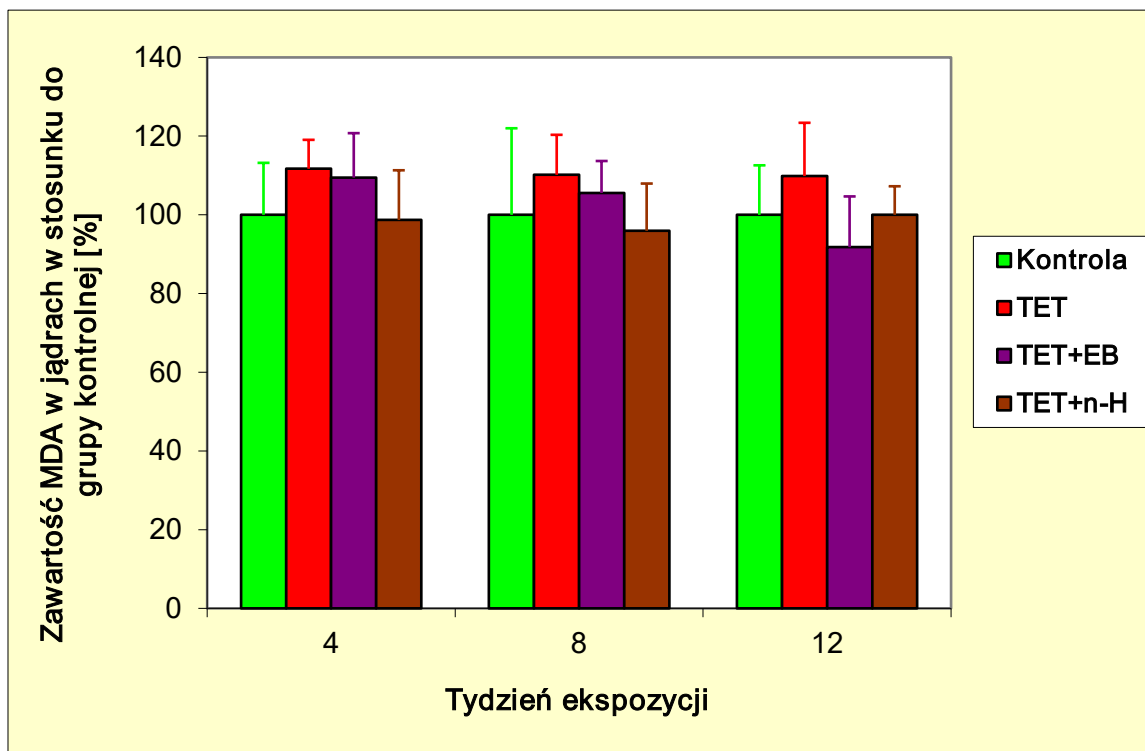
Wzrost poziomu MDA w homogenatach nerek stwierdzono pod koniec doświadczenia u szczurów narażonych na TET i jego mieszaniny z EB lub n-H. W tym samym czasie u szczurów ekspozowanych na kombinację TET i n-H obserwowano wzrost poziomu MDA w wątrobie. Wzrost ten miał miejsce już po 8 tygodniach narażenia. W trakcie całego doświadczenia nie obserwowano natomiast zmian poziomu MDA ani w jądrach ani w śledzionie żadnego z badanych zwierząt. Z kolei stężenie NPSH uległo obniżeniu w wątrobie i nerkach po 3 miesiącach ekspozycji u szczurów narażonych łącznie na TET i EB. Podobnie jak w przypadku MDA brak było również zmian poziomu NPSH w jądrach i śledzionie badanych szczurów. Poziomy MDA i NPSH w poszczególnych tkankach przedstawiono odpowiednio na rycinach 50 – 53 oraz 54 – 57, zaś dane liczbowe umieszczono odpowiednio w tabeli 34 i 35.



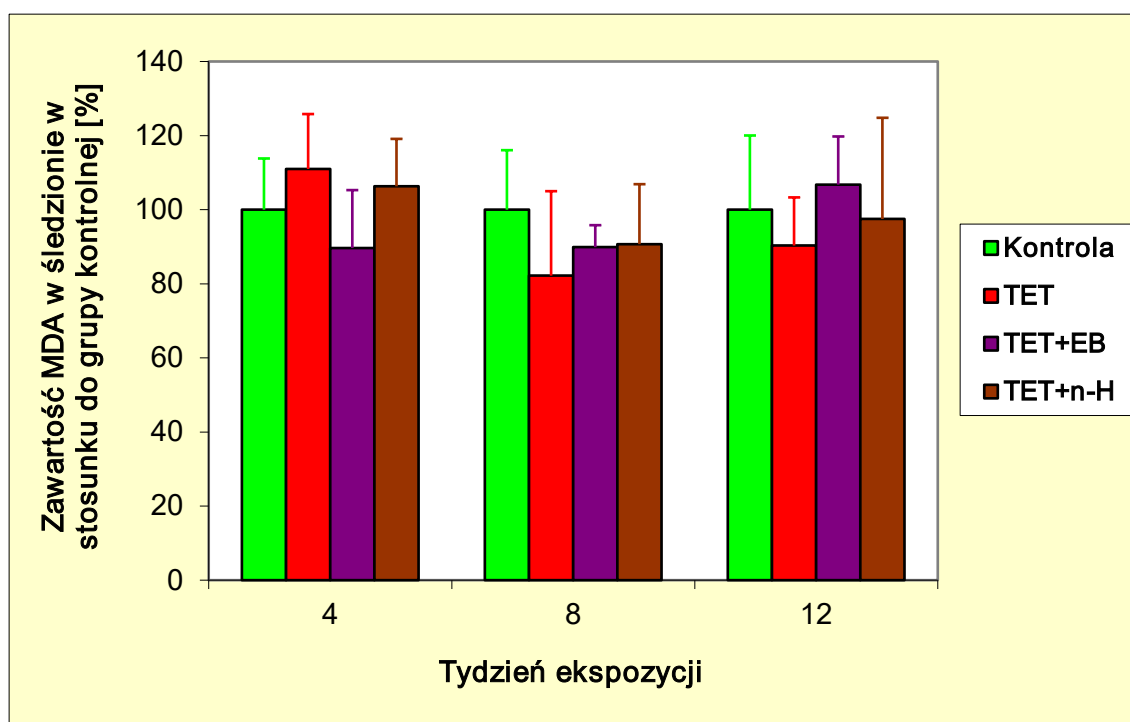
Rycina 50. Poziom MDA w wątrobie szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.



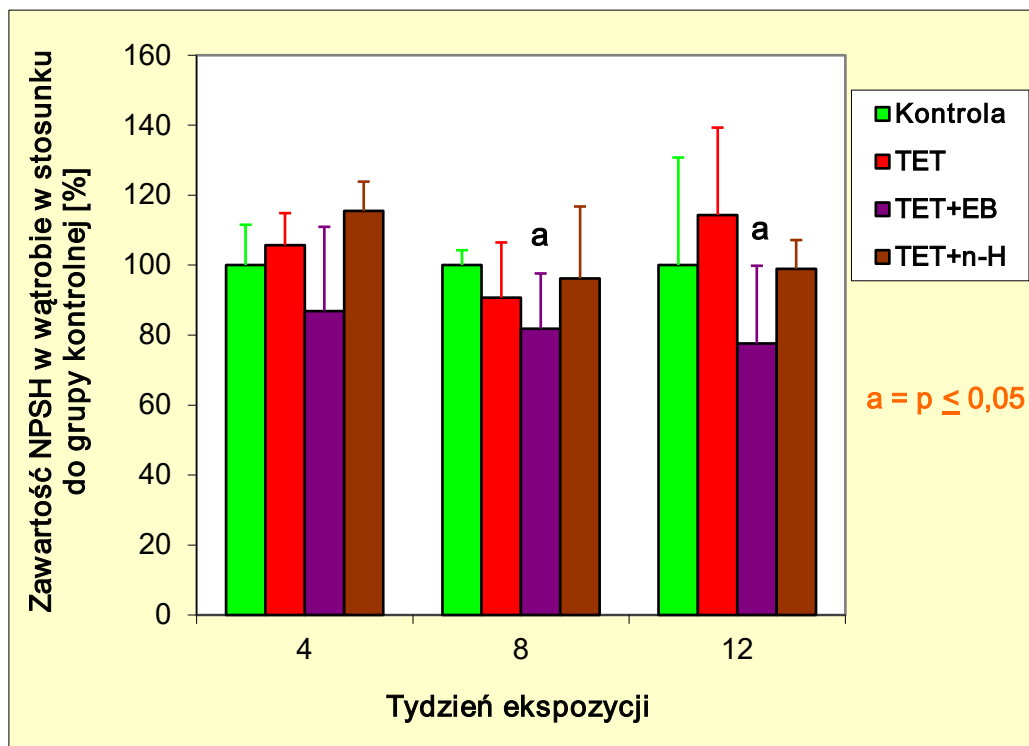
Rycina 51. Poziom MDA w nerkach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.



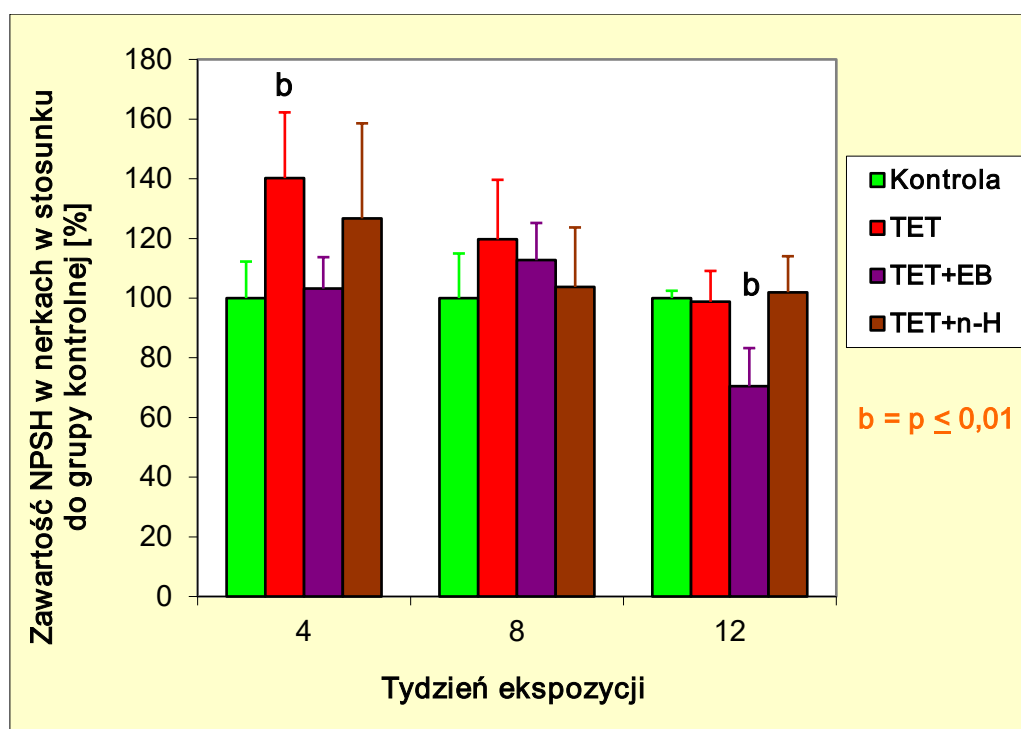
Rycina 52. Poziom MDA w jądrach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.



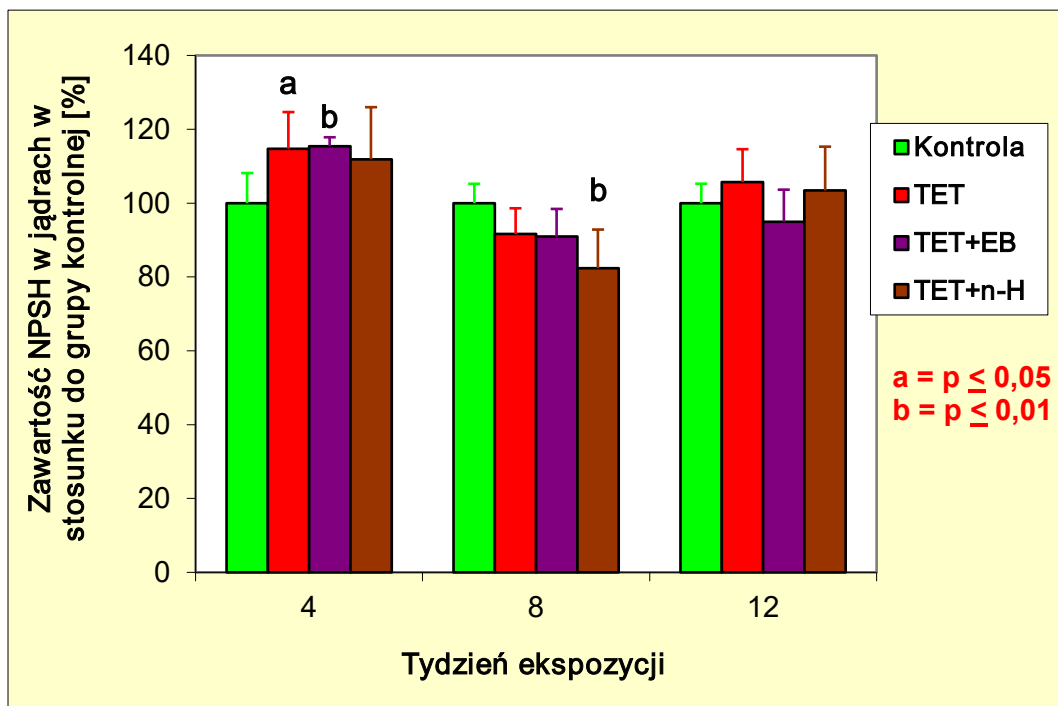
Rycina 53. Poziom MDA w śledzionie szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.



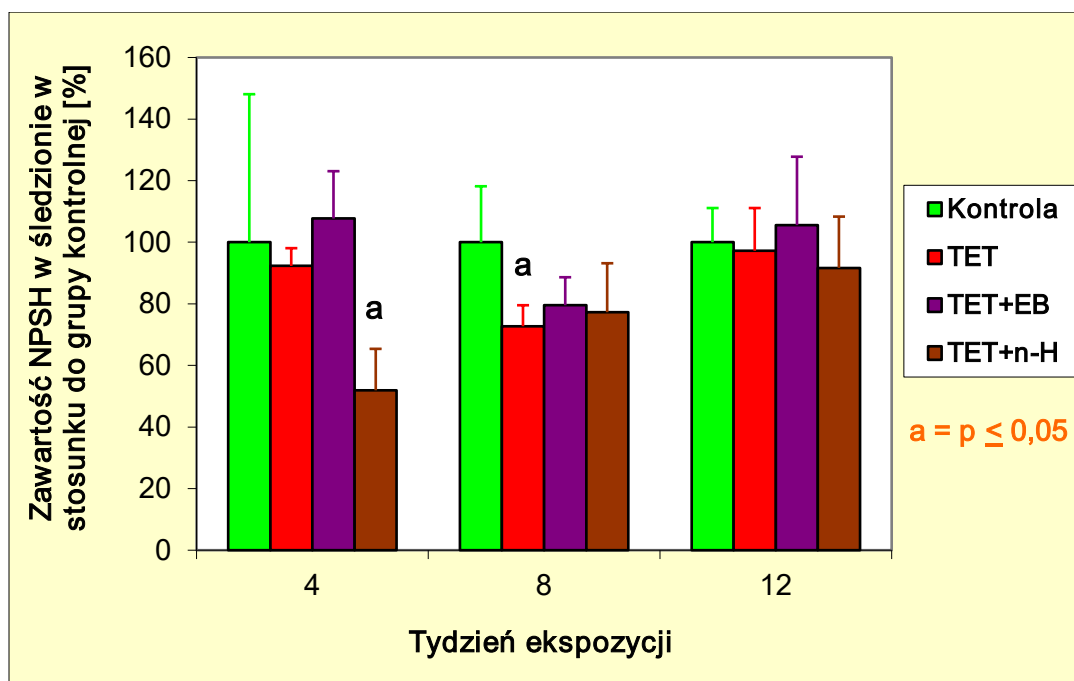
Rycina 54. Poziom NPSH w wątrobie szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.



Rycina 55. Poziom NPSH w nerkach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.



Rycina 56. Poziom NPSH w jądrach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.



Rycina 57. Poziom NPSH w śledzionie szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$.

Tabela 34. Poziomy MDA w tkankach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy.

Grupa	MDA [nmol/g]											
	Wątroba	Nerki	Jądra	Śledziona	Wątroba	Nerki	Jądra	Śledziona	Wątroba	Nerki	Jądra	Śledziona
	po 1 miesiącu				po 2 miesiącach				po 3 miesiącach			
Kontrolna	76,8 ± 6,5	78,5 ± 9,4	53,0 ± 7,0	49,2 ± 6,8	74,6 ± 3,7	83,6 ± 11,0	54,1 ± 11,9	74,1 ± 11,9	82,2 ± 11,3	91,1 ± 8,6	62,0 ± 7,8	75,4 ± 15,1
TET	72,9 ± 3,8	81,5 ± 5,7	59,2 ± 3,9	54,6 ± 7,3	73,1 ± 13,5	81,9 ± 22,0	59,6 ± 5,5	60,9 ± 16,9	78,5 ± 3,5	98,5^a ± 6,9	68,1 ± 8,4	68,1 ± 9,8
TET + EB	63,2 ± 23,0	70,4 ± 6,5	58,0 ± 6,0	44,1 ± 7,7	74,8 ± 13,0	86,7 ± 4,2	57,1 ± 4,4	66,6 ± 4,4	83,4 ± 4,0	102,7^a ± 14,6	56,9 ± 8,0	80,5 ± 9,8
TET + n-H	77,2 ± 10,5	85,6 ± 5,3	52,3 ± 6,7	52,3 ± 6,3	67,2^a ± 4,8	69,9 ± 6,2	51,9 ± 6,5	67,2 ± 12,0	98,5^b ± 14,1	106,7^b ± 14,5	62,0 ± 4,5	73,5 ± 20,6

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

Wartości wyrażono jako M ± SD;

a = p ≤ 0,05;

b = p ≤ 0,01.

Tabela 35. Poziomy NPSH w tkankach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy.

Grupa	NPSH [$\mu\text{mol/g}$]											
	Wątroba	Nerki	Jądra	Śledziona	Wątroba	Nerki	Jądra	Śledziona	Wątroba	Nerki	Jądra	Śledziona
	po 1 miesiącu				po 2 miesiącach				po 3 miesiącach			
Kontrolna	5,11 $\pm 0,59$	4,08 $\pm 0,50$	4,54 $\pm 0,37$	0,52 $\pm 0,25$	6,32 $\pm 0,27$	4,01 $\pm 0,60$	5,73 $\pm 0,30$	0,44 $\pm 0,08$	5,85 $\pm 1,80$	4,06 $\pm 0,10$	4,38 $\pm 0,23$	0,36 $\pm 0,04$
TET	5,40 $\pm 0,47$	5,72^b $\pm 0,90$	5,20^a $\pm 0,45$	0,48 $\pm 0,03$	5,73 $\pm 1,00$	4,80 $\pm 0,80$	5,25 $\pm 0,40$	0,32^a $\pm 0,03$	6,69 $\pm 1,46$	4,01 $\pm 0,42$	4,63 $\pm 0,39$	0,35 $\pm 0,05$
TET + EB	4,44 $\pm 1,23$	4,21 $\pm 0,43$	5,24^b $\pm 0,11$	0,56 $\pm 0,08$	5,17^a $\pm 1,00$	4,52 $\pm 0,50$	5,21 $\pm 0,43$	0,35 $\pm 0,04$	4,54^a $\pm 1,30$	2,86^b $\pm 0,52$	4,16 $\pm 0,38$	0,38 $\pm 0,08$
TET + n-H	5,90 $\pm 0,43$	5,17 $\pm 1,30$	5,08 $\pm 0,64$	0,27^a $\pm 0,07$	6,08 $\pm 1,30$	4,16 $\pm 0,80$	4,72^b $\pm 0,60$	0,34 $\pm 0,07$	5,79 $\pm 0,48$	4,14 $\pm 0,49$	4,53 $\pm 0,52$	0,33 $\pm 0,06$

Każda grupa liczyła po 5 szczurów;

Wartości wyrażono jako $M \pm SD$;

a = $p \leq 0,05$;

b = $p \leq 0,01$.

7. DYSKUSJA

7.1 Interakcje metaboliczne

Istniejące dane wskazują, że w warunkach łącznego narażenia na kilka substancji chemicznych może dochodzić do interakcji metabolicznych modyfikujących ich działanie toksyczne. Interakcje te są wynikiem zróżnicowanego powinowactwa ksenobiotyków do enzymów biotransformujących oraz indukcji lub inhibicji różnych izoform cytochromu P450 (CYP), odgrywających istotną rolę w I fazie metabolizmu ksenobiotyków (Krishnan i Brodeur, 1991).

Takie obserwacje, poczynione u ludzi i zwierząt laboratoryjnych, przytacza wielu autorów. Stwierdzono, że równoczesne narażenie ludzi na etylobenzen i m-ksylen prowadziło do wzajemnej supresji metabolizmu skutkującej zarówno opóźnieniem jak i spadkiem ilości metabolitów obu związków wydalanych z moczem (Angerer i Lehnert, 1979; Engström i wsp., 1984). Łączne narażenie na n-heksan i 2-butanon spowodowało spadek stężenia 2,5-heksanodionu (metabolit n-heksanu) w surowicy krwi i moczu badanych osób (Shibata i wsp., 1997; van Engelen i wsp., 1997). Odwrotnie, u szczurów przewlekłe narażonych równocześnie na n-heksan o stężeniu 7000 mg/m³ i 2-butanon o stężeniu 5900 mg/m³ wystąpił wzrost stężenia 2,5-heksanodionu w moczu oraz nasilenie objawów neuropatii obwodowej w porównaniu ze zwierzętami narażonymi na sam n-heksan o tym samym stężeniu (Ichihara i wsp., 1998).

Narażenie na mieszaninę toluenu i m-ksylenu w stężeniach odpowiednio 360 i 400 mg/m³ prowadziło do wzrostu stężenia kwasu hipurowego we krwi oraz opóźnienia jego wydalania w moczu, przy braku zmian wydalania kwasu m-metylohipurowego będącego metabolitem m-ksylenu (Tardif i wsp., 1991). Natomiast nie występowały interakcje metaboliczne podczas narażenia na 2-krotnie niższe stężenia obu substancji (odpowiednio 180 i 200 mg/m³). Również brak interakcji metabolicznych odnotowano u pracowników narażonych na niskie stężenia mieszaniny toluenu, styrenu i metanolu (Kawai i wsp., 1992). U ochotników narażonych na niskie stężenia m-ksylenu (190 - 320 mg/m³) oraz toluenu, octanu butylu, n-heksanu, n-butanolu lub ketonu metyloizobutyloвого (120 - 340 mg/m³) przez 4 godz., tylko pod wpływem octanu butylu obserwowano wzrost wydalania kwasu m-metylobenzoowego będącego metabolitem m-ksylenu (Jakubowski i Kostrzewski, 1989).

Wyniki własnych badań, kiedy to pobieranie przez szczury dwuskładnikowych mieszanin TET i EB lub TET i n-H przez okres 3 miesięcy nie prowadziło do interakcji metabolicznych, wydają się być zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów (Tardif i wsp., 1991). Przyczyną braku interakcji metabolicznych były zapewne zbyt niskie dawki badanych rozpuszczalników pobierane przez szczury, wynoszące w przypadku TET, EB i n-H odpowiednio 3,04; 0,49 i 0,39 mg/kg/dzień. Dawki te były limitowane rozpuszczalnością tych substancji w wodzie (roztwory nasycone), co stanowiło symulację narażenia na te substancje w środowisku generalnym. Ksenobiotyki te są pobierane przez ludzi głównie z wodą do picia i powietrzem (Ziglio i wsp., 1985; Webler i Brown, 1993).

Nieco inne wyniki badań uzyskali Starek i wsp. (1998) u szczurów, którym TET (50 $\mu\text{mol/kg}$) podawali równocześnie z n-H (12,5 lub 200 $\mu\text{mol/kg}$) przez 5 kolejnych dni. O ile przy niższym stosunku molowym obu związków (1:0,25) obserwowali zahamowanie metabolizmu TET, o tyle przy wyższym stosunku molowym (1:4) wykazali stymulację metabolizmu tego związku. Choć w cytowanej pracy dzienna dawka TET podana podskórnie była ok. 4-krotnie mniejsza niż w badaniach własnych, to jednak biodostępność tego związku lipofilowego była wielokrotnie większa niż po pobraniu dożołądkowym. Dawki n-H w cytowanej pracy były 8-krotnie mniejsze (12,5 $\mu\text{mol/kg}$) i 2-krotnie większe (200 $\mu\text{mol/kg}$) niż w badaniach własnych.

Wśród doniesień na temat interakcji metabolicznych dość często można spotkać pozornie sprzeczne dane, co może świadczyć o złożonej naturze tych zjawisk i mnogości czynników wpływających na ich przebieg. O ile Tardif i wsp. (1991) obserwowali interakcje metaboliczne między toluenem i m-ksylenem, o tyle Huang i wsp. (1994) oraz Jakubowski i Kostrzewski (1989) nie wykazali tego zjawiska w warunkach narażenia na niskie stężenia obu związków.

Wg Inoue i wsp. (1988) w warunkach narażenia zawodowego na pary benzenu i toluenu dochodzi do spadku wydalania w moczu fenolu i hydrochinonu jako metabolitów benzenu oraz kwasu hipurowego powstającego z toluenu. Należy jednak podkreślić, że supresja metabolizmu benzenu przez toluen jest silniej zaznaczona niż zahamowanie metabolizmu toluenu przez benzen. Interakcje te nasilały się wraz ze wzrostem stężenia obu związków w powietrzu. Wyniki te są spójne z obserwacjami Sato i Nakajimy (1979), którzy nie obserwowali zmian stężenia benzenu i toluenu we krwi i powietrzu wydechowym u pracowników narażonych łącznie na niskie stężenia benzenu (80 mg/m^3) i toluenu (380 mg/m^3).

Biorąc pod uwagę przytoczone wyniki badań wydaje się, że dla poznania możliwych interakcji metabolicznych ksenobiotyków byłoby celowe badanie wszystkich możliwych ich kombinacji, co z oczywistych względów nie jest osiągalne. Pozostaje zatem wybór

pojedynczych substancji, istotnych z punktu widzenia praktycznego, oraz zastosowanie ściśle określonych warunków doświadczalnych. Należy przy tym pamiętać o ostrożnym wyciąganiu zbyt daleko idących wniosków i uogólnianiu obserwowanych zjawisk. Wynika to z faktu, iż podobieństwo chemicznej budowy ksenobiotyków nie zawsze gwarantuje prawidłowe przewidywanie możliwych interakcji metabolicznych. Na przykład 2-butanon hamował biotransformację ksylenu u ludzi (Liira i wsp., 1988), natomiast nie wykazywał takiego działania w stosunku do toluenu, należącego do tego samego szeregu homologicznego (Dick i wsp., 1984; Tolos i wsp., 1987).

Wyniki własnych badań wskazują, że u szczurów w warunkach narażenia 28-dniowego, zarówno n-heksan jak i etylobenzen podawane podskórnie w większych dawkach niż w doświadczeniu 90-dniowym (dzienna dawka TET 24-krotnie większa; dawka n-H i EB około 100-krotnie większa) hamowały metabolizm TET do kwasu trichlorooctowego. Podobne zjawisko wykazali Seiji i wsp. (1989) u pracowników narażonych na pary TET i trichloroetyleny, u których stwierdzili spadek wydalania metabolitów obu związków w moczu. Również u szczurów otrzymujących TET i trichloroetylen podskórnie w małych dawkach (10 lub 40 $\mu\text{mol/kg}$) przez 28 dni obserwowano zahamowanie metabolizmu tych związków, głównie do trichloroetanolu, przez cały okres narażenia (Starek, 1998). Ponadto u szczurów pobierających TET razem z 1,1,1,2-tetrachloroetanem w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy wystąpiła supresja metabolizmu obu związków również głównie do trichloroetanolu (Skowroń i wsp., 2003).

Jak wynika z przytoczonych danych z piśmiennictwa, obok hamowania metabolizmu jednego ksenobiotyku przez inny ksenobiotyk, zwłaszcza o podobnej strukturze chemicznej lub należący do tego samego szeregu homologicznego, może również dochodzić do wzajemnej stymulacji metabolizmu. O ile hamowanie może wynikać z konkurencji ksenobiotyków w stosunku do enzymów metabolizujących lub inhibicji określonej izoformy CYP, o tyle stymulacja metabolizmu może być następstwem indukcji enzymatycznej. Dowiedzono poza wszelką wątpliwość, że aktywność mikrosomalnych monooksygenaz wzrasta nawet o rząd wielkości w wyniku indukcji CYP i jego reduktazy NADPH-zależnej (Whitlock i Denison, 1995).

U człowieka występuje ponad 100 genów kodujących CYP o zróżnicowanej swoistości substratowej, nakładającej się na siebie, ale nie wszystkie izoformy podlegają indukcji. Dla przykładu w rodzinie CYP2 indukowalne są podrodziny CYP2B i CYP2E, podczas gdy pozostałe 15 podrodzin nie ulega indukcji (Okey, 1990). Niemal 3,5-krotny, chociaż krótkotrwały (poniżej 18 godz.), wzrost ekspresji mRNA CYP2B w wątrobie szczurów wykazano po 6 godz. od dootrzewnowego podania TET w jednorazowej dawce 500 mg/kg m.c. (Mizuno i wsp., 2001).

TET hamuje aktywność monoooksygenaz indukowanych przez fenobarbital, zależnych od CYP2B1 (O-depentylazy 7-pentoksyresorufiny i O-debenzylazy 7-benzyloksiresorufiny) oraz równocześnie od CYP1A1 lub CYP2B1 (O-deetylazy 7-etoksykumaryny). Dowodzi to, że zarówno CYP2B1 jak i CYP1A1 uczestniczą w biotransformacji TET (Hanioka i wsp., 1995). Stopień indukcji enzymów biotransformujących wykazuje różnice tkankowe (Aarstad i wsp., 1984; Wrighton i Stevens, 1992; Nakajima, 1997). Wielkość indukcji enzymatycznej, podobnie jak stopień inhibicji, zależą od poziomu narażenia na ksenobiotyk(i), metabolicznego klirensu tkankowego oraz przepływu krwi przez metabolizujący narząd. Gdy szybkość dyfuzji ksenobiotyku jest porównywalna z szybkością przepływu krwi, przepływ krwi decyduje o transporcie ksenobiotyku do tkanek. W przypadku dużych cząsteczek nie polarnych lub małych cząsteczek polarnych dyfuzja błonowa jest wolniejsza od szybkości transportu ze strumieniem krwi. Wówczas klirens tkankowy zależy od tzw. wewnętrznej pojemności tkankowej narządu (Johanson, 1997). Jest to szczególnie istotne w przypadku rozpuszczalników organicznych, których klirens tkankowy poprzedzający indukcję enzymatyczną jest większy od przepływu krwi np. w wątrobie. W takim przypadku, przy niskich poziomach narażenia, nie występują zmiany toksykokinetyczne w warunkach indukcji metabolicznej. Odwrotnie, w przypadku wysokich poziomów narażenia dochodzi do wysycenia metabolizmu (kinetyka wysycenia), który osiąga graniczną szybkość maksymalną (V_{max}). Oczywiście w przypadku rozpuszczalników organicznych, których klirens tkankowy jest mniejszy od szybkości przepływu krwi przez tkanki, indukcja enzymów metabolizujących będzie modyfikowała toksykokinetykę tych substancji przy każdym poziomie narażenia (Sato, 1991).

Dowiedziano, że wiele rozpuszczalników organicznych może indukować CYP u ludzi i zwierząt. Szczególnie CYP2E1 jest podatny na indukcję przez niewielkie cząsteczki organiczne, do których należy większość rozpuszczalników organicznych (Wrighton i Stevens, 1992). Stwierdzono, że najbardziej efektywnymi induktorami hydroksylazy pierścienia aromatycznego toluenu u szczurów były etylobenzen, n-propylobenzen i m-ksylen (Backes i wsp., 1993). Z kolei metylo-n-alkiloketony i n-alkilobenzeny indukowały CYP2B1/2 w stopniu zależnym od długości łańcucha alkilowego, podczas gdy indukcja CYP2E1 nie wykazywała takiej zależności (Imaoka i Funae, 1991).

Przewlekłe narażenie zawodowe na dany ksenobiotyk może czasem wpływać na jego metabolizm w wyniku autoindukcji metabolicznej. Takie zjawisko obserwowano m.in. w przypadku narażenia pracowników na styren, kiedy to spadkowi stężenia styrenu we krwi i wzrostowi klirensu metabolicznego tego związku towarzyszył wzrost poziomu odpowiedniego glukuronianu we krwi oraz kwasów merkapturowych w moczu (Døssing, 1983; Löf i wsp., 1986).

Zjawisko to obserwowano również u pracowników narażonych na stosunkowo niskie stężenie styrenu (320 mg/m^3) przez krótki okres czasu (2 godz.), którzy w przeszłości byli narażeni na wysokie stężenia tego związku (Löf i wsp., 1986).

Istotny wydaje się być fakt, że określone rozpuszczalniki organiczne mogą indukować kilka izoform CYP. Dotyczy to zwłaszcza benzenu i jego homologów, które u szczurów indukują zarówno CYP2B1, jak i CYP2E1. Indukcja CYP2E1 była najsilniej zaznaczona pod działaniem benzenu i malała w kolejności benzen > toluen > etylobenzen > styren > ksylen, natomiast odwrotną kolejność wymienionych rozpuszczalników zaobserwowano w przypadku indukcji CYP2B1. Ponadto benzen okazał się silniejszym induktorem CYP2E1 niż etanol, natomiast alkilobenzeny słabiej indukowały CYP2B1/2 od fenobarbitalu (Gut i wsp., 1993). Już pojedyncza dawka benzenu, toluenu lub m-ksylenu może indukować CYP2E1 u szczurów, co prowadzi do nasilenia metabolizmu dichlorometanu i w konsekwencji do wzrostu stężenia karboksyhemoglobiny we krwi (Kim i Kim, 1996). Zarówno jednorazowe jak i powtarzane narażenie szczurów Fischer 344, samców, zwiększało ekspresję CYP2B, CYP2E1 i CYP3A2 (Serron i wsp., 2000).

Również n-heksan wykazuje właściwości indukcyjne u zwierząt laboratoryjnych. Podobnie jak styren może on modyfikować własny metabolizm na drodze autoindukcji. Hewitt i wsp. (1980a) oraz Howd i wsp. (1982) obserwowali narastanie stężenia 2,5-heksanodionu we krwi szczurów narażonych na heksan w warunkach powtarzanych. Notten i Henderson (1975) oraz Nakajima i wsp. (1991) wykazali indukujące działanie n-heksanu na CYP2E1. Z drugiej strony metabolit n-heksanu, 2-heksanon, indukował CYP2E1, CYP2B1/2 i CYP2C11/6 w wątrobie świnek morskich i szczurów.

Haddad i wsp. (1999a; 1999b) podjęli próbę oceny możliwych interakcji metabolicznych 10 lotnych ksenobiotyków (dichlorometanu, benzenu, trichloroetyleny, toluenu, tetrachloroetyleny, etylobenzenu, styreny i ksyleny) oraz ich wpływu na stężenia tych związków we krwi. Wykazali zmiany kinetyki poszczególnych związków we krwi wyrażone wzrostem stężenia substancji macierzystych, co wskazuje na wzajemną supresję metabolizmu.

Dane te znajdują potwierdzenie w wynikach niniejszej pracy, gdzie w warunkach narażenia 28-dniowego wykazano również interakcje metaboliczne. Zarówno n-heksan jak i etylobenzen hamowały utlenianie TET do TCA, etylobenzen działał hamująco na przemianę n-heksanu do 2,5-heksanodionu, podczas gdy TET i n-heksan stymulowały metabolizm etylobenzenu do kwasu hipurowego. Tak więc TET i n-heksan wykazywały właściwości indukcyjne w stosunku do metabolizmu etylobenzenu, podczas gdy n-heksan i etylobenzen działały hamująco na procesy biotransformacji TET, a etylobenzen hamował metabolizm n-

heksanu. Jest to spójne z teorią Haddada i wsp. (2000) mówiącą, że ksenobiotyki wysoce ekstrahowalne, których współczynnik ekstrakcji wątrobowej (E) jest $\geq 0,9$ wykazują działanie hamujące na metabolizm innych ksenobiotyków. Z drugiej strony substancje, których E jest $\leq 0,9$, jak np. TET ($E = 0,14$), stymulują przemiany metaboliczne ksenobiotyków. Ciekawe jest, że zahamowanie metabolizmu badanych związków (TET i n-H) występowało tylko w pierwszych dwóch tygodniach narażenia, a następnie cofało się całkowicie osiągając wartości grupy kontrolnej. Dane te wydają się korespondować z wynikami badań Bergeron i wsp. (1999) nad ekspresją CYP2E1 u szczurów narażonych na etylobenzen. Poziom CYP2E1 rośnie na początku narażenia, a następnie wraca do wartości kontrolnych. Należy podkreślić, że zarówno TET jak i etylobenzen są substratami dla CYP2E1 (Guengerich i wsp., 1991). Tak więc interakcje metaboliczne TET, etylobenzenu i n-heksanu, obserwowane w badaniach własnych, wynikały ze wspólnego ogniw metabolicznego jaki stanowiły CYP2E1, CYP2B1/2 i CYP1A1.

Nawiązując do badań Haddada i wsp. (2000) interesujące wydaje się, że w przypadku 9 substancji na 10 (z wyjątkiem TET) stężenia mierzone we krwi żyłnej nigdy nie osiągały górnej wartości teoretycznej obliczonej dla współczynnika $E = 0$. Tak więc TET okazał się związkiem najbardziej problematycznym, dla którego nie doszacowano danych empirycznych. Ponadto stwierdzono, że w modelu fizjologicznej toksykokinetyki (PBTK) TET krytycznym parametrem jest współczynnik podziału krew/powietrze (Reitz i wsp., 1996). Każda, nawet niewielka zmiana wartości tego współczynnika ma istotny wpływ na toksykokinetykę TET u zwierząt narażonych inhalacyjnie na ten związek. Istnieje możliwość, że wartości współczynników podziału krew/powietrze niektórych ksenobiotyków lotnych ulegają obniżeniu w obecności innych substancji wskutek wysycenia miejsc wiążących w hemoglobinie, albuminach, globulinach lub lipoproteinach krwi. Chociaż można polemizować, że takie zmiany są mało prawdopodobne u zwierząt narażonych na niskie stężenia lub dawki rozpuszczalników organicznych, to wydaje się korzystniejsze stosowanie innej drogi narażenia, niż droga oddechowa, w przypadku oceny interakcji metabolicznych TET.

Innym, ważnym zagadnieniem toksykokinetycznym jest możliwość wysycenia metabolizmu substancji chemicznych. Stwierdzono, że przy niskich poziomach narażenia, co najczęściej ma miejsce z wyjątkiem sytuacji awaryjnych lub zatruc ostrych, procesy metaboliczne ksenobiotyków przebiegają zgodnie z kinetyką I rzędu, tj. proporcjonalnie do stężenia substratu. W tych warunkach istnieje liniowa zależność pomiędzy wielkością narażenia, wchłoniętą dawką, dawką w narządzie docelowym a ilością generowanych metabolitów. Przy wysokich poziomach narażenia biotransformacja ulega wysyceniu, a jej przebieg wykazuje kinetykę 0 rzędu osiągającą szybkość graniczną równą V_{max} . Wysycenie metabolizmu obserwowano w przypadku takich

rozpuszczalników organicznych jak m.in. 2-butanon (Liira i wsp., 1990), metylochloroform, trichloroetylen i TET (Ward i wsp., 1988). Wysycenie metabolizmu powoduje wyższy od oczekiwanego wzrost stężenia związku macierzystego we krwi i innych tkankach, spadek stężenia metabolitów, a czasem zmianę szlaku metabolicznego. Zmiany te prowadzą do zaburzeń przebiegu krzywych dawka-efekt i dawka-odpowiedź, w kierunku zależnym od tego, czy biologicznie aktywny jest związek macierzysty, czy też jego metabolit.

Wysycenie metabolizmu trichloroetyleny i TET obserwowano u myszy po dożołądkowym podawaniu tych związków (Buben i O'Flaherty, 1985). O ile biotransformacja trichloroetyleny miała liniowy przebieg w stężeniach do 2700 mg/m³ o tyle metabolizm TET osiągał kinetykę wysycenia już przy stężeniu 340 mg/m³ (Nakajima i wsp., 1988; Kaneko i wsp., 1994). Również w badaniach własnych w warunkach narażenia na stosunkowo małe dawki TET, wynoszące 75 mg/kg m.c. przez 28 dni, można było zaobserwować wysycenie metabolizmu tego związku w ostatnich dwóch tygodniach narażenia.

U gryzoni wysycenie metabolizmu TET do kwasu trichlorooctowego, będącego proliferatorem peroksysomów, ma istotne znaczenie z punktu widzenia działania rakotwórczego na wątrobę. Podawanie myszom i szczurom kwasu trichlorooctowego w wodzie do picia prowadziło do indukcji raka wątrobowokomórkowego (Herren-Freund i wsp., 1987). Podobne wyniki uzyskano na hepatocytach mysich i szczurzych w badaniu *in vitro*. Gdy natomiast zwierzętom podawano związek macierzysty (TET) to raka wątrobowokomórkowego obserwowano tylko u myszy. Zważywszy, że proliferacja peroksysomów indukowana przez kwas trichlorooctowy jest procesem progowym, to przyczynę gatunkowych różnic obserwowanych zjawisk można upatrywać w toksykokinetyce TET (Green, 1990). U myszy metabolizm TET przebiega liniowo w szerokim zakresie dawkowania, zatem próg działania proliferacyjnego kwasu trichlorooctowego jest łatwo przekraczany. Natomiast u szczurów metabolizm TET ulega wysyceniu przy stosunkowo niskich dawkach i tym samym próg działania proliferacyjnego kwasu trichlorooctowego nie zostaje osiągnięty nawet przy wysokich dawkach związku macierzystego. Również u człowieka, podobnie jak u szczura, wysycenie metabolizmu TET przeciwdziała indukcji procesu nowotworowego w wątrobie przez jego metabolit (Monster i wsp., 1983; Ikeda i wsp., 1972; Ohtsuki i wsp., 1983).

7.2 Interakcje toksykodynamiczne

7.2.1 Działanie neurotoksyczne

Wbrew niektórym opiniom (Puchalska, 1985; Feldman i wsp., 1985; White i Proctor, 1997) o dużej czułości testów behawioralnych i możliwości oceny za ich pomocą subklinicznych i klinicznych zmian neurotoksycznych, zastosowane testy w niniejszej pracy okazały się zbyt podatne na indywidualne reakcje zwierząt. Standaryzacja tych testów wskazuje na dużą zmienność uzyskanych wyników tak w odniesieniu do poszczególnych osobników jak i między osobnikami. Sprawilo to, iż uchwycenie zmian neurobehawioralnych u szczurów w warunkach narażenia powtarzanego stało się bardzo trudne, a nawet niemożliwe.

Nawet sam TET podawany wstępnie w dawkach 75 - 225 mg/kg m.c. podskórnice przez 4 tygodnie nie spowodował statystycznie istotnych różnic w wartościach testów behawioralnych w porównaniu z grupą kontrolną pomimo, że jest to związek o depresyjnym działaniu na OUN. Oczekiwano więc zmian aktywności antynocycyptywnej, motorycznej i eksploracyjnej. Takie zmiany obserwowano jedynie po podaniu szczurom TET w dużych dawkach jednorazowo, drogą dootrzewnową (Miranowicz-Dzierżawska i wsp., 2003).

Ponieważ zmiany behawioralne praktycznie nie występowały w przypadku powtarzanego narażenia na pojedyncze rozpuszczalniki, dlatego trudno było oczekiwać tego rodzaju zmian w warunkach narażenia łącznego.

Z drugiej jednak strony, biorąc pod uwagę rodzaj ksenobiotyków będących przedmiotem badań było niemal pewne, że w wyniku obserwowanych interakcji metabolicznych powinny wystąpić zmiany w ich działaniu neurotoksycznym. Wiadomo bowiem, że neurotoksyczne działanie n-heksanu jest związane z jego metabolitem, 2,5-heksanodionem (Krasavage i wsp., 1980; Perbellini i wsp., 1980). Małą neurotoksyczność n-heksanu obserwowano u kur (*Gallus gallus*), u których wątrobowe poziomy CYP są około 4-krotnie niższe w porównaniu ze szczurami i w skutek tego przemiana n-heksanu do 2,5-heksanodionu jest upośledzona (Abou-Donia i wsp., 1985).

Zmiany neurotoksycznego działania n-heksanu w wyniku interakcji metabolicznych z innymi ksenobiotykami były obserwowane przez wielu autorów. Stwierdzono, że równoczesne narażenie szczurów na n-heksan i toluen powoduje nie tylko zahamowanie powstawania 2,5-heksanodionu i spadek jego wydalania w moczu, ale również zmniejsza stopień nasilenia

objawów neurotoksycznych (Takeuchi i wsp., 1981; Perbellini i wsp., 1982; Iwata i wsp., 1983; 1984).

Podobnych wyników można było oczekiwać w badaniach własnych, w warunkach łącznego narażenia na n-heksan i etylobenzen przez okres 28 dni. Na podstawie spadku stężenia 2,5-heksanodionu w moczu można sądzić o obniżonej neurotoksyczności n-heksanu, która zapewne wystąpiła, ale jej objawów nie udało się potwierdzić zastosowanymi testami behawioralnymi.

Być może i w tym przypadku jedną z przyczyn braku odpowiedzi ze strony testów behawioralnych był zbyt niski poziom dawek badanych rozpuszczalników. Jest to spójne z wynikami badań Umezu i wsp. (1997), którzy u myszy oznaczyli wartość ED_{50} dla utraty odruchu postawy dla TET podawanego dootrzewnowo na poziomie 4209 mg/kg m.c. Z kolei inne testy behawioralne zastosowane w ich badaniu dawały odpowiedzi przy dawkach rzędu 2000 mg/kg m.c. Natomiast Chen i wsp. (2002) wykazali, że TET w jednorazowej dawce dożołądkowej 50 mg/kg m.c. nie spowodował u szczurów istotnych statystycznie zmian behawioralnych ocenianych trzema testami. Z drugiej strony w doświadczeniu 8-tygodniowym autorzy ci obserwowali efekt antynocyceptywny, co mogłoby sugerować kumulację ksenobiotyku w OUN. Również i Bælum (1999) nie wykazał objawów działania neurotoksycznego u ochotników, którym podawał *per os* toluen, trichloroetylen (w dawkach 90 i 240 mg) lub n-heksan (18 lub 60 mg). Natomiast Seeber (1989) obserwował zmiany w testach psychologicznych (m.in. prędkość postrzegania, pamięć wzrokowa, symbole cyfrowe, korygowanie błędów) u pracowników narażonych przewlekle na TET, gdzie w przypadku 88% badanych osób stężenie tego związku w powietrzu nie przekraczało 340 mg/m³.

W konkluzji należy stwierdzić, że testy behawioralne zastosowane w pracy okazały się nie najlepszym narzędziem badawczym neurotoksycznego działania rozpuszczalników organicznych przy niskich poziomach narażenia u zwierząt laboratoryjnych. Należy przypuszczać, że do oceny obwodowej neuropatii charakterystycznej dla n-heksanu testem z wyboru jest pomiar szybkości przewodnictwa w nerwach obwodowych lub elektromiografia (Głuszczyk-Zielińska, 1999; Seppäläinen i wsp., 1978; Pastore i wsp., 2002), a w przypadku większości rozpuszczalników organicznych tomografia komputerowa lub rezonans magnetyczny (Juntunen i wsp., 1985; White i wsp., 1993; Filley i wsp., 2004). Wskazują na to wyniki badań Moshe i wsp. (2002), którzy u 61-letniego artysty malarza, narażonego na rozpuszczalniki farb przez okres 30 lat, stwierdzili parestezje w obrębie kończyn oraz upośledzenie koncentracji uwagi i pamięci. Podczas gdy testy behawioralne ujawniły nieznaczne zaburzenia, to pomiar przewodnictwa nerwowego wykazał poważne zmiany w układzie nerwowym tego chorego w stopniu wyjaśniającym objawy kliniczne.

Podobne wyniki testów behawioralnych uzyskano u osób zamieszkałych w pobliżu dwóch zakładów przemysłowych emitujących do środowiska chlorowane rozpuszczalniki organiczne (trichloroetylen, metylochloform, tetrachloroetylen i chlorek winylu), zgłaszających dolegliwości ze strony układu nerwowego (Kilburn, 2002).

Jak widać, mimo że testy neurobehawioralne są zwykle zalecane do oceny skutków narażenia na substancje neurotoksyczne, zwłaszcza w środowisku pracy (Triebig i Hallermann, 2001; Anger, 2003), to ich przydatność potwierdza się nie w każdym warunkach narażenia. Szczególnie w badaniach na zwierzętach, jak to miało miejsce w niniejszej pracy, zastosowana bateria testów ze zrozumiałych względów była inna od tej jaka służy do oceny określonych zachowań czy umiejętności u człowieka poddającego się badaniu w sposób świadomy i celowy.

7.2.2 Działanie hepatotoksyczne

Piśmiennictwo toksykologiczne wskazuje, że narażenie na substancje chemiczne może prowadzić do nieoczekiwanych efektów szkodliwych ze strony różnych narządów oraz do znacznie większych skutków od przewidywanych. Zjawiska te obserwowano na ogół w warunkach narażenia na mieszaniny ksenobiotyków.

Zeliger (2003) rozpatrując szkodliwe efekty działania mieszanin substancji chemicznych przedstawił przykłady 23 grup pracowników, liczących od 1 do 200 osób, u których występowały nieoczekiwane zmiany szkodliwe wywołane przez mieszaniny ksenobiotyków występujące w stężeniach niższych od dopuszczalnych. Autor skonstatował, że mieszaniny te zawierały co najmniej jedną substancję względnie lipofilową i co najmniej jedną o charakterze hydrofilowym, co znalazło potwierdzenie w wartościach współczynników podziału n-oktanol/woda (K_{ow}). Wiadomo, że substancje lipofilowe łatwiej pokonują barierę błon biologicznych niż związki hydrofilowe (Alessio, 1996) i mogą promować wchłanianie substancji hydrofilowych do organizmu. Manganaro (1997) podaje, że większość leków nie pokonałaby bariery błon komórkowych w ilościach wystarczających do działania terapeutycznego bez udziału czynników wspomagających wchłanianie. Potts i Guy (1992) stwierdzili, że wchłanianie przez skórę jest funkcją K_{ow} . Witte i wsp. (1995) zaobserwowali, że substancje uszkadzające błony komórkowe w stężeniach subtoksycznych nasilały cytotoksyczne działanie ksenobiotyków hydrofilowych. Autorzy skonkludowali, że kombinacja substancji lipo- i hydrofilowych wywiera działanie synergistyczne. Wykazali również liniową zależność pomiędzy logarytmem stężenia, przy którym nie obserwowali działania szkodliwego, a wartością K_{ow} .

Przytoczone dane mogą do pewnego stopnia wyjaśniać skutki działania mieszanin TET i etylobenzenu oraz TET i n-heksanu na równowagę pro-/antyoksydacyjną w tkankach szczurów w wyniku narażenia 90-dniowego. Otóż można by stwierdzić, że obserwowany wzrost poziomu MDA w wątrobie po 12 tygodniach narażenia występował tylko po narażeniu na mieszaninę TET i n-heksanu, natomiast nie występował w przypadku kombinacji TET i etylobenzenu. Zgodnie z hipotezą Witte i wsp. (1995) n-heksan o wartości $K_{ow} = 3,90$, w przeciwieństwie do etylobenzenu ($K_{ow} = 3,15$), ułatwia wchłanianie bardziej polarnego TET ($K_{ow} = 2,60$). Nie jest to jednak spójne z wynikami oznaczeń NPSH w wątrobie po 8 i 12 tygodniach narażenia, kiedy to spadek niebiałkowych tioli w wątrobie i nerkach wystąpił tylko u zwierząt pobierających TET razem etylobenzenem. Należy jednak podkreślić, że jest to jednak pozorna sprzeczność. MDA jest produktem peroksydacji lipidów błonowych, powstającym w środowisku lipofilnym, podczas gdy NPSH będące głównie zredukowanym glutationem (GSH) występują w cytozolu (środowisko hydrofilowe) i częściowo w mitochondriach komórek. Z drugiej strony MDA i NPSH są biomarkerami równowagi pro-/antyoksydacyjnej.

Mutti i wsp. (1982) obserwowali objawy ze strony OUN podczas narażenia na mieszaninę n-heksanu, cykloheksanu ($K_{ow} = 3,44$), 2-butanonu ($K_{ow} = 0,29$) i octanu etylu ($K_{ow} = 0,73$). Døssing i Ranek (1984) opisali przypadki uszkodzenia wątroby po narażeniu na mieszaninę disiarczku węgla ($K_{ow} = 1,94$), toluenu ($K_{ow} = 2,73$) i metanolu ($K_{ow} = -0,77$). Valentini i wsp. (1994) wykazali objawy neuropatii obwodowej po narażeniu na niskie stężenia mieszaniny 2-butanonu, octanu etylu, cykloheksanu i n-heptanu ($K_{ow} = 4,66$). Ponadto Burkhart i wsp. (1996) zaobserwowali szybkie zaburzenia ze strony układu oddechowego podczas łącznego narażenia na izobutan ($K_{ow} = 2,76$), octan etylu, n-heptan i fluoroalkany ($K_{ow} = 0,75$). We wszystkich przypadkach stężenia poszczególnych substancji nie przekraczały wartości dopuszczalnych.

Od dawna znana jest kluczowa rola wątroby w lipidowej homeostazie organizmu. Ponieważ wątroba syntetyzuje i metabolizuje lipoproteiny obecne w surowicy krwi, dlatego można oczekiwać zmian stężenia lipidów i lipoprotein w surowicy w przewlekłych chorobach tego narządu (Cicogniani i wsp., 1997). Zmiany te wiązano z zaburzeniami biosyntezy lipoprotein, deficytem acylotransferazy lecytyno-cholesterolowej i lipazy wątrobowej (lizosomalnej), nieprawidłowym kliresem lipoprotein, zwłaszcza LDL-C, jak również zawracaniem lipidów żółciowych do osocza krwi (Glickman i Sabesin, 1988).

Jedni autorzy obserwowali hypercholesterolemię i krótkotrwałą hypertriglicydemię u chorych ze schorzeniami wątroby (Glickman i Sabesin, 1988; Powell i Kroon, 1992), natomiast

inni odnotowali spadek stężenia cholesterolu całkowitego oraz lipoprotein frakcji HDL i VLDL w surowicy krwi (McIntyre, 1978; Palombo, 1987).

Cicogniani i wsp. (1997) u pacjentów z marskością wątroby klasy C, wg skali Child, wykazali spadek stężenia cholesterolu całkowitego, co było związane z ciężkością choroby. Jako przyczynę podawano spadek syntezy cholesterolu w wątrobie, co potwierdzono w badaniach na zwierzętach, na marskich hepatocytach *in vitro* oraz w warunkach zespolenia wrotno-czczego (Nosadini i wsp., 1984; Starzl i wsp., 1973). Poziom LDL-C w surowicy krwi wykazywał odwrotną zależność od stopnia uszkodzenia wątroby, upośledzenia biosyntezy apoproteiny B-100 w wątrobie lub zaburzonego klirensu cząstek VLDL. Postępujący spadek poziomu HDL-C w surowicy u chorych z marskością wątroby prawdopodobnie odzwierciedlał spadek biosyntezy apoproteiny A-1 w wątrobie (Kroon i Powell, 1992) lub niedobór acylotransferazy lecytynocholesterolowej (Jahn i wsp., 1985). Cicognianiemu i wsp. (1997) nie udało się skorelować zmian aktywności aminotransferaz z poziomami lipoprotein w surowicy u pacjentów cierpiących na przewlekłe aktywne zapalenie wątroby, co sugeruje że ten typ schorzenia nie wpływa na poziom lipoprotein w surowicy. We wcześniejszych badaniach zaobserwowano istotny statystycznie, bezpośredni związek pomiędzy poziomem lipoprotein w surowicy i czasem protrombinowym oraz stężeniem albumin w surowicy u chorych z marskością wątroby (Zoli i wsp., 1991). Obserwacje te wskazują na ścisłą zależność pomiędzy metabolizmem białek i lipidów. Ponieważ integralność błonowych struktur komórki jest niezbędna do efektywnej biosyntezy białek, w tym także apoprotein i enzymów, jest zatem zrozumiałe zapotrzebowanie organizmu na homeostazę lipidową.

Również w niniejszej pracy, w doświadczeniu 28-dniowym, obserwowano wyraźną dyslipidemię wyrażoną spadkiem stężenia HDL-C oraz wzrostem stężenia LDL-C i triglicerydów w surowicy krwi. Zmiany te występowały w grupach zwierząt otrzymujących etylobenzen lub n-heksan oraz mieszaninę TET i etylobenzenu, TET i n-heksanu oraz etylobenzenu i n-heksanu. Wskazują one tylko na zaburzenia czynnościowe hepatocytów pod wpływem badanych ksenobiotyków.

Do oceny stanu wątroby zalecane są testy enzymatyczne, takie jak aktywność ALT, SDH, GIDH, GGTP i poziom transferyny w surowicy krwi. Aktywność tych enzymów rośnie w wyniku uszkodzenia komórek mięszszowych wątroby. Oczywiście w badaniach u ludzi należy pamiętać, że aktywność tych enzymów jest istotnie modyfikowana przez spożywanie alkoholu, otyłość oraz przebyte zapalenie wątroby (*hepatitis B*) (Chen i wsp., 1997). Również takie testy jak pomiar klirensu galaktozy lub zieleni indocyjaninowej są zalecane do oceny stanu czynnościowego wątroby (Lundberg i wsp., 1994). Jednakże ze względu czasochłonność i możliwość powikłań,

do oceny skutków działania substancji hepatotoksycznych, zalecane są raczej testy enzymatyczne.

Również i w niniejszej pracy pomiar aktywności enzymów wskaźnikowych w surowicy u szczurów narażonych na rozpuszczalniki organiczne przez 3 miesiące okazał się właściwy. Obserwowany wzrost aktywności ALT i SDH u szczurów narażonych na TET i mieszaninę TET i etylobenzenu, wzrost aktywności ALT u szczurów narażonych na mieszaninę TET i n-heksanu wskazują na uszkodzenie komórek wątrobowych. Z kolei hipertriglicydemia obserwowana pod działaniem TET oraz mieszaniny n-heksanu i etylobenzenu świadczą o zmianach czynnościowych w wątrobie nawet przy bardzo niskim poziomie narażenia na te ksenobiotyki. Oznacza to, że czas trwania narażenia jest czynnikiem krytycznym warunkującym hepatotoksyczne działanie rozpuszczalników organicznych.

Zmiany w wątrobie mogą być wynikiem zaburzeń w innych narządach. Zaobserwowano, że u 30% pacjentów cierpiących na zaburzenia żołądkowo-jelitowe dochodzi do zmian przynajmniej jednego wskaźnika czynności wątroby (Samuellsen i wsp., 1981). Tamburro i Greenberg (1981) zasugerowali, że jednym z najbardziej specyficznych objawów łagodnego, przewlekłego uszkodzenia wątroby przez czynniki środowiskowe jest wzrost alkalicznej fosfatazy w surowicy krwi. Również inni badacze (Svensson i wsp., 1992) wykazali wzrost aktywności tego enzymu w surowicy u pracowników narażonych na mieszaninę rozpuszczalników organicznych zawierających toluen. Nie obserwowano tego zjawiska u pracowników narażonych na pojedyncze rozpuszczalniki organiczne, pobierających leki o działaniu hepatotoksycznym.

Zaobserwowane zmiany enzymatyczne w badaniach własnych były możliwe do uchwycenia dzięki pomiarom aktywności enzymów w trakcie narażenia lub bezpośrednio po jego zakończeniu. Zgodnie z danymi wielu autorów aktywność enzymów wskaźnikowych wraca do wartości normalnych wkrótce po przerwaniu narażenia lub w wyniku znacznej jego redukcji (Kurppa i Husman, 1982; Lundberg i Håkansson, 1985; Waldron i wsp., 1982; Franco i wsp., 1986).

Na podstawie badań Lundberga i wsp. (1994) można stwierdzić, że w niniejszej pracy słusznie wybrano działanie hepatotoksyczne rozpuszczalników organicznych jako efekt krytyczny. Uzyskane przez nich wyniki wskazują, że narażenie na wysokie stężenia rozpuszczalników farb i lakierów prowadzi do zmian wątrobowych, przy braku zmian ze strony kłębuszków nerkowych. Jest to prawdopodobnie wynikiem 10 - 20-krotnie większego poziomu CYP2E1 w wątrobie aniżeli w nerkach i płucach (Wheeler, Wrighton i Guenther, 1992). Ta izoforma CYP bierze bowiem udział w aktywacji metabolicznej rozpuszczalników organicznych.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że hepatotoksyczne działanie rozpuszczalników organicznych jest w znacznym stopniu modyfikowane przez interakcje metaboliczne. I tak nefrotoksyczne i hepatotoksyczne działanie tetrachloru węgla, chloroformu, trichloroetyleny, tetrachloroetyleny i 1,1,2-trichloroetanu ulegało nasileniu pod wpływem etanolu podanego 16-24 godz. przed narażeniem na te związki. Sformułowano wniosek, że etanol stymuluje metabolizm związków chloroalifatycznych, co prowadzi do wzrostu stężenia toksycznych metabolitów (Sato, Nakajima i Koyama, 1983; Zimmerman, 1986). Również takie substancje, jak alifatyczne alkohole i ketony nasilają hepatotoksyczne działanie rozpuszczalników chloroorganicznych (Hewitt i wsp., 1980a; 1980b; 1987; Strubelt, 1980; Plaa i wsp., 1982; Døssing, 1986; Traiger i wsp., 1989). Nasilenie działania hepatotoksycznego związków chloroalifatycznych przez ketony jest skorelowane z długością łańcucha węglowego. Ketony o dłuższych łańcuchach węglowych silniej indukują enzymy metabolizujące ksenobiotyki i w ten sposób nasilają działanie hepatotoksyczne rozpuszczalników chloroalifatycznych (Hewitt i wsp., 1983; 1987). Na przykład izopropanol w wyniku utlenienia do acetonu nasilał hepatotoksyczne i nefrotoksyczne działanie tetrachloru węgla w warunkach narażenia zawodowego (Folland i wsp., 1976). Efekt indukcji CYP2E1 przez alkohole i ketony wydaje się drugoplanowy z punktu widzenia toksyczności narządowej wobec faktu powstawania aktywnych metabolitów pośrednich z węglowodorów chlorowanych (Johansson i Ingelman-Sundberg, 1985; Hewitt i wsp., 1987). Zarówno n-heksan, 2-heksanon, jak i 2,5-heksanodion mogą nasilać hepatotoksyczne działanie chloroformu poprzez stymulację powstawania fosgeny (Hewitt i wsp., 1980a; Branchflower i Pohl, 1981; Branchflower i wsp., 1983). 2-Propanol silniej niż metanol i etanol nasilał toksyczne działania związków chloroalifatycznych prawdopodobnie w wyniku metabolizmu do acetonu (Cantilena, Cagen i Klaassen, 1979).

Kolejnym zagadnieniem będącym przedmiotem badań w niniejszej pracy jest rola GSH, a szerzej NPSH (suma GSH i cysteiny) oraz problem stresu oksydacyjnego i związanej z nim peroksydacji lipidów. GSH, obok α -tokoferolu i askorbinianu, odgrywa istotną rolę w zachowaniu tkankowej homeostazy przeciwdziałając stresowi oksydacyjnemu indukowanemu przez aktywne formy tlenu i inne wolne rodniki (Parke i Piotrowski, 1996).

Z tego powodu w badaniach własnych oceniano stężenia NPSH i MDA, będącego końcowym produktem peroksydacji lipidów, w wątrobie, nerkach, jądrach i śledzionie szczurów poddanych działaniu rozpuszczalników organicznych. Zarówno w doświadczeniu 28-dniowym jak i 3-miesięcznym obserwowano wyraźny spadek poziomów NPSH w wątrobie i nerkach szczurów. Jest to zgodne z wynikami badań Starka (1999), który u szczurów pobierających TET w wodzie do picia (roztwory o stężeniu 0,15 – 0,50 mmol/l) przez 28 dni obserwował zależny od dawki

spadek stężenia NPSH w jądrach, co tłumaczył bezpośrednią reakcją TET z grupami tiolowymi GSH.

Obserwowany spadek stężenia NPSH w tkankach, który wydaje się być spójny ze wzrostem poziomów MDA, pozostaje w sprzeczności z tezą Szymańskiej i wsp. (cyt. za Parke i Piotrowski, 1996) mówiącą, że do utraty GSH dochodzi pod wpływem jednorazowej, dużej dawki ksenobiotyku. Natomiast powtarzane podawanie ksenobiotyku prowadzi do wzrostu poziomów GSH, co jest związane z mechanizmem regulacji biosyntezy GSH, kiedy to aktywność syntazy γ -glutamylcysteiny jest regulowana poziomem komórkowego GSH na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Cytowani autorzy stosowali silnie hepatotoksyczny bromobenzen i acetaminofen jako ksenobiotyki. Również w badaniach własnych obserwowano znamiennej statystycznie wzrost stężenia NPSH w nerkach pod działaniem samego TET oraz w jądrach szczurów otrzymujących TET lub TET z etylobenzenem po 4 tyg. narażenia (doświadczenie 90-dniowe).

Oczywiście poziom i czas trwania deficytu GSH zależy w istotny sposób od chemicznej natury ksenobiotyku. Wydaje się, że na poziom glutationu w tkankach ma także wpływ mechanizm jego utraty. Może on być utleniany do disulfidu glutationu lub sprzęgany z czynnikami elektrofilowymi. Poza komórką GSH ulega enzymatycznej degradacji przy udziale GGTP zlokalizowanej w zewnętrznej części błony komórkowej. Brak zmian aktywności GGTP w surowicy krwi wyklucza udział tego enzymu w utylizacji GSH. Zatem proces utleniania przez reaktywne formy tlenu lub sprzęgania z TET jest najbardziej prawdopodobną przyczyną spadku stężenia tego tripeptydu w tkankach.

Ważną konsekwencją stresu oksydacyjnego jest peroksydacja lipidów błonowych przez reaktywne formy tlenu lub inne, wolne rodniki. Prowadzi to m.in. do powstawania MDA, który został uznany za jeden z lepszych biomarkerów peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (Szymańska i i wsp., 1996; Gil i wsp., 2002; Block i wsp., 2002). Stwierdzono, że czynnikami sprzyjającymi powstawaniu MDA jest stres, proces starzenia, otyłość, nadciśnienie tętnicze, niedokrwienie i reoksygenacja, reumatoidalne zapalenie stawów i in. (Kuloglu i wsp., 2002; Karatas i wsp., 2003). MDA w reakcji z cysteiną tworzy addukty przypominające budową lipofuscynę, która uczestniczy w wielu stanach patologicznych (zwyrodnienie żółtej plamki oka, choroba Alzheimera, choroba Creutzfelda-Jacoba) (Chowdhury i wsp., 2004). Niektórzy twierdzą, że MDA jest dobrym markerem starzenia się organizmu (Gil i wsp., 2002), chociaż jego stężenia w surowicy/osoczu, ale nie w erytrocytach są istotnie modyfikowane przez antyoksydanty obecne w diecie (Mayne, 2003).

W podsumowaniu należy stwierdzić, że TET, n-heksan i etylobenzen w warunkach narażenia 28-dniowego wykazują interakcje metaboliczne, których kierunek i mechanizm jest zgodny z danymi z piśmiennictwa. Potwierdza to hipotezę o wspólnym ogniwie metabolicznym badanych rozpuszczalników jakie stanowią, co najmniej trzy izoformy CYP. Interakcje te nie wystąpiły w przypadku 3-miesięcznego narażenia na badane rozpuszczalniki organiczne z powodu niskich dawek badanych związków.

Testy behawioralne, zastosowane do oceny neurotoksycznych interakcji toksykodynamicznych badanych rozpuszczalników, okazały się nie najlepszym narzędziem badawczym u zwierząt laboratoryjnych. Było to wynikiem zbyt niskich poziomów narażenia na badane substancje.

W doświadczeniu 28-dniowym, pomimo wystąpienia interakcji metabolicznych oraz wzrostu aktywności enzymów wskaźnikowych w surowicy krwi w funkcji dawki u szczurów otrzymujących TET, nie wystąpiły interakcje toksykodynamiczne. Być może zastosowana w tym doświadczeniu dawka TET, wynosząca 75 mg/kg/dzień, była za mała do wystąpienia zmian hepatotoksycznych.

Interakcje toksykodynamiczne w zakresie działania hepatotoksycznego w warunkach narażenia podprzewlekłego były słabo zaznaczone. Ujawniły się tylko u zwierząt narażonych na mieszaninę TET i etylobenzenu, kiedy to wystąpił 2-krotny wzrost aktywności ALT i SDH w surowicy szczurów w porównaniu ze zwierzętami pobierającymi tylko sam TET.

W przeciwieństwie do TET, pozostałe rozpuszczalniki i ich mieszaniny z TET zaburzały równowagę pro-/antyoksydacyjną i powodowały peroksydację lipidów.

8. WNIOSKI

1. Dawki ksenobiotyków odgrywają kluczową rolę w interakcjach metabolicznych. Interakcje występowały przy wyższym poziomie narażenia 28-dniowego, natomiast nie występowały przy niskim poziomie narażenia w okresie 3-miesięcznym.
2. Czas trwania narażenia na rozpuszczalniki organiczne posiada istotne znaczenie dla zmian wątrobowych. W warunkach narażenia 28-dniowego doszło do zaburzeń czynnościowych w hepatocytach (dyslipidemia), podczas gdy w wyniku narażenia podprzewlekłego wystąpiło również uszkodzenie hepatocytów wyrażone wzrostem aktywności enzymów wskaźnikowych w surowicy krwi.
3. Niski poziom narażenia uniemożliwił ujawnienie interakcji toksykodynamicznych w zakresie neurotoksycznego działania badanych rozpuszczalników.
4. Badane rozpuszczalniki organiczne w warunkach przeprowadzonych doświadczeń ujawniły ograniczone interakcje toksykodynamiczne w zakresie działania hepatotoksycznego.
5. Badane rozpuszczalniki organiczne, zarówno w doświadczeniu 28-dniowym jak i podprzewlekłym, zaburzały równowagę pro-/antyoksydacyjną oraz indukowały peroksydację lipidów w narządach mięszszowych. TET, chociaż nie działał prooksydacyjnie, to jednak nie znosił działania prooksydacyjnego n-heksanu i etylobenzenu.
6. Łączne narażenie na niskie dawki tetrachloroetylenu, etylobenzenu i n-heksanu może prowadzić do szkodliwych zmian układowych.

9. PIŚMIENICTWO

Aarstad K., Zahlsen K., Nilsen O.G. (1984). Induction of microsomal enzymes after inhalation of methanol. *Arch. Toxicol., Suppl.* 7, 295-298.

Abou-Donia M., Lapadula D., Campbell G., Timmons P.R. (1985). The synergism of n-hexane-induced neurotoxicity by methyl isobutyl ketone following subchronic (90 days) inhalation in hens: induction of hepatic microsomal Cytochrome P-450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 81, 1-16.

Abou-Donia M.B., Makkawy H-A.M., Graham D.G. (1982). The relative neurotoxicities of n-hexane, methyl n-butyl ketone, 2,5-hexanediol, and 2,5-hexanedione following oral or intraperitoneal administration in hens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62, 369-389.

Alessio L. (1996). Multiple exposure to solvents in the workplace. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 69, 1-4.

Anger W.K. (2003). Neurobehavioural tests and system to assess neurotoxic exposure in the workplace and community. *Occup. Environ. Med.*, 60, 531-538.

Angerer J., Lehnert G. (1979). Occupational chronic exposure to organic solvents. VIII. Phenolic compounds – metabolites of alkylbenzenes in man. Simultaneous exposure to ethylbenzene and xylenes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 43, 145-150.

Backes W.L., Sequeira D.J., Cawley G.F., Eyer C.S. (1993) Relationship between hydrocarbon structure and induction of P450: effects on protein levels and enzyme activities. *Xenobiotica*, 23, 1353-1366.

Bandiera S., Sawyer T., Campbell M.A., Fujita T., Safe S. (1983). Competitive binding to the cytosolic 2,3,7,7-TCDD receptor: effects of structure on the affinities of substituted halogenated biphenyls – a QSAR approach. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 3801-3813.

Bergeron R.M., Desai K., Serron S.C., Cawley G.G.F., Eyer C.S., Backes W.L. (1999). Changes in the expression of cytochrome P450s 2B1, 2B2, 2E1, and 2C11 in response to daily aromatic hydrocarbon treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 157, 1-8.

Bælum J. (1999). Acute symptoms during non-inhalation exposure to combinations of toluene, trichloroethylene, and n-hexane. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 72, 408 – 410.

Block G., Dietrich M., Norkus E.P., Morrow J.D., Hudes M., Caan B., Packer L. (2002). Factors associated with oxidative stress in human population. *Am. J. Epidemiol.*, 156, 274-285.

Branchflower R.V., Pohl L.R. (1981). Investigation of the mechanism of the potentiation of chloroform-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity by methyl n-butyl ketone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 61, 407-413.

Branchflower R.V., Schulick R.D., George J.W., Pohl L.R. (1983). Comparison of the effects of methyl-n-butyl ketone and phenobarbital on rat liver Cytochromes P450 and the metabolism of chloroform to phosgene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71, 414-421.

Buben J.A., O'Flaherty E.J. (1985). Delineation of the role of metabolism in the hepatotoxicity of trichloroethylene and perchloroethylene: a dose effect study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 78, 105-122.

Burkhart K.K., Britt A., Petrini G. (1996). Pulmonary toxicity following exposure to an aerosolized leather protector. *Clin. Toxicol.*, 34, 21-24.

Cantilena L.R., Cagen S.Z., Klaassen C.D. (1979). Methanol potentiation of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 162, 90-95.

Chang Y-Ch. (1987). Neurotoxic effects of n-hexane on the human central nervous system: evoked potential abnormalities in n-hexane polyneuropathy. *J. Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 50, 269-274.

Chauplannaz G. Bady B., Kopp N., Levrat R., Trillet M. (1982). Peripheral neuropathy due to n-hexane in a drug addict. *Rev. Neurol. (Paris)*, 138, 249-251.

Chen H.-H., Chan M.-H., Fu S.-H. (2002). Behavioural effects of tetrachloroethylene exposure in rats: acute and subacute studies. *Toxicology*, 170, 201-209.

Chen J.-D., Wang J.-D., Tsai S.-Y., Chao W.-I. (1997). Effects of occupational and nonoccupational factors on liver function tests in workers exposed to solvent mixtures. *Archiv. Environ. Health*, 52, 270-274.

Chmielewski J., Tomaszewski R., Głombiowski P., Kowalewski W., Kwiatkowski S.R., Szczekocki W., Winnicka A. (1976). Clinical observations of the occupational exposure to tetrachlorethylene. *Biul. Inst. Med. Morskiej*, 27, 197-205.

Chowdhury P.K., Halder M., Chowdhury P.K., Kraus G.A., Desai M.J., Armstrong D.W., Casey T.A., Rasmussen M.A., Petrich J.W. (2004). Generation of fluorescent adducts of malondialdehyde and amino acids: toward an understanding of lipofuscin. *Photochemistry and Photobiology*, 79, 21-25.

Cicognani C., Malavolti M., Morsellini-Labate A.M., Zamboni L., Sama C., Barbara L. (1997). Serum lipid and lipoprotein patterns in patients with liver cirrhosis and chronic active hepatitis. *Arch. Int. Med.* 157, 792-796.

Costa A.K., Ivanetich K.M. (1980). Tetrachloroethylene metabolism by the hepatic microsomal cytochrome P-450 system. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 2863-2869.

Cottrel R.C. (1976). Histochemical and biochemical studies of chemically induced acute kidney damage in the rat. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 14, 593-598.

Couri D., Milks M. (1982). Toxicity and metabolism of the neurotoxic hydrocarbons n-hexane, 2-hexanone and 2,5-hexanedione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22, 145 - 166.

- Dick R.B., Setzer J.V., Wait R., Hayden M.B., Taylor B.J., Tolos B., Putz-Anderrson V. (1984). Effects of acute exposure of toluene and methyl ethyl ketone on psychomotor performance. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 54, 91-109.
- Døssing M. (1983). Antipyrine clearance during occupational exposure to styrene. *Br. J. Ind. Med.*, 40, 224-228.
- Døssing M. (1986) Metabolic interactions between organic solvents and other chemicals. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 220, 97-105.
- Døssing M., Ranek L. (1984). Isolated liver damage in chemical workers. *Br. J. Ind. Med.*, 40, 199-203.
- Døssing M., Skinhoj P. (1985). Occupational liver injury. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 56, 1-2.
- Elovaara E., Engström K., Nickels J., Aito A., Vainio H. (1985). Biochemical and morphological effects of long-term inhalation exposure of rats to ethylbenzene. *Xenobiotica*, 15, 299-308.
- Engström K.M. (1984). Metabolism of inhaled ethylbenzene in rats. *Scand. J. Work Environ. Health*, 10, 83-87.
- Engström K., Riihimäki V., Laine A. (1984). Urinary disposition of ethylbenzene and m-xylene in man following separate and combined exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 54, 355-363.
- Fedtke N., Bolt H.M. (1987). 4,5-Dihydroxy-2-hexanone: a new metabolite of n-hexane and of 2,5-hexanedione in rat urine. *Biomed. Environ. Mass. Spectr.*, 14, 563-572.
- Feldman R.G., White R.F., Currie J.N., Travers P.H., Lessell S. (1985). Long-term follow-up after single exposure to trichloroethylene. *Am. J. Ind. Med.*, 8, 119-126.
- Filley C.M., Halliday W., Kleinschmidt-DeMasters B.K. (2004). The effects of toluene on the Central Nervous System. *J. Neuropath. Exp. Neu.*, 63, 1-12.
- Flório J.C., Sakate M., Palermo-Neto J. (1993). Effects of amitraz on motor function. *Pharmacol.Toxicol.*, 73, 109-114.
- Folland D.S., Schaffner W., Ginn H.E., Crofford O.B., McMurray D.R. (1976). Carbon tetrachloride toxicity potentiated by isopropyl alcohol. *JAMA*, 236, 1853-1856.
- Franco G., Fonte R., Tempini G., Candura F. (1986). Serum bile acid concentrations as a liver function test in workers occupationally exposed to organic solvents. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 58, 157-164.
- Gago-Dominguez M., Castelao J.E., Yuan Y.-M., Ross R.K., Yu M.C. (2002). Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Cause & Control*, 13, 287-293.
- Gerlach U. (1963). "Sorbitol dehydrogenase" W: *Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. Bergmayer (ed.). Verlag Chemie – Academic Press, 761-764.

Gil P., Fariñas F., Casado A., López-Fernández E. (2002). Malondialdehyde: a possible marker of ageing. *Gerontology*, 48, 209-214.

Glickman R.M., Sabesin S.M. (1988). Lipoprotein metabolism. *The Liver Biology and Pathobiology*. New York, NY, Raven Press, 123-142.

Głuszcz-Zielińska A. (1999). Zawodowa toksyczna polineuropatia po narażeniu na n-heksan – obserwacja kliniczna i elektrofizjologiczna. *Med., Pr.*, 1, 31-36.

Goldberg M.E. i wsp. (1964). Effect of repeated inhalation of vapors of industrial solvents on animal behavior. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 25, 369 - 375.

Green T. (1990). Chloroethylenes: A mechanistic approach to human risk evaluation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30, 73-89.

Guder W.G. Schmidt D., Hofmann W., Sackerer D., Hartinger A. (1990). Biochemical markers to monitor nephrotoxic effects in patients. *Toxicol. Lett.*, 53, 37-38.

Guengerich F.P., Kim D.H., Iwasaki M. (1991). Role of human cytochrome P-450IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspect. *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 168-179.

Gut I., Terelius Y., Frantik E., Linhart I., Soucek P., Filipcová B., Kluckova H. (1993). Exposure to various benzene derivatives differently induces Cytochrome P450 2B1 and P450 2E1 in rat liver. *Arch. Toxicol.*, 67, 237-243.

Haddad S., Charest-Tardif G., Krishnan K. (2000). Physiologically based modelling of the maximal effect of metabolic interactions on the kinetics of components of complex chemical mixtures. *J. Toxicol. Environ. Health*, 61, 209-223.

Haddad S., Tardif R., Viau C., Krishnan K. (1999a). A modelling approach to account for toxicokinetic interaction in the calculating of biological hazard index for chemical mixtures. *Toxicol. Lett.*, 108, 303-308.

Haddad S., Charest-Tardif G., Tardif R., Viau C., Krishnan K. (1999b). Physiological modelling of the toxicokinetic interactions in a quaternary mixture of aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 161, 249-257.

Hanioka N., Jinno H., Takahashi A., Nakano K., Yoda R., Nishimura T., Ando M. (1995). Interaction of tetrachloroethylene with rat hepatic microsomal P450-dependent monooxygenases. *Xenobiotica*, 25, 151-165.

Herren-Freund S.L., Pereira M.A., Olson G. (1987). The carcinogenicity of trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid, in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 90, 183-189.

Hewitt W.R., Miyajima H., Coté M.G., Plaa G.L. (1980a). Acute alteration of chloroform-induced hepato- and nephrotoxicity by n-hexane, methyl n-butyl ketone, and 2,5-hexanedione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 53, 230-248.

Hewitt W.R., Miyajima H., Coté M.G., Plaa G.L. (1980b). Modification of haloalkane-induced hepatotoxicity by exogenous ketones and metabolic ketosis. *Fed. Proc.*, 39, 3118-3123.

Hewitt W.R., Plaa G.L. (1979). Potentiation of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by 1,3-butanediol. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 47, 177-180.

Hewitt W.R., Valiquette C., Plaa G.L. (1987). The role of biotransformation – detoxication in acetone-, 2-butanone-, and 2-hexanone-potentiated chloroform-induced hepatotoxicity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65, 2313-2318.

Howd R.A., Bingham L.R., Steeger T.M., Rebert C.S. Prryor G.T. (1982). Relation between schedules of exposure to hexane and plasma levels of 2,5-hexanedione. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 4, 87-91.

Huang M.-Y., Jin C., Liu Y.-T., Li B.-H., Qu Q.-S., Uchida Y., Inoue O., Nakatsuka H., Watanabe T., Ikeda M. (1994). Exposure of workers to a mixture of toluene and xylenes. I. Metabolism. *Occup. Environ. Med.*, 51, 42-46.

Ichihara G., Saito I., Kamijima M., Yu X., Shibata E., Toida M., Takeuchi Y. (1998). Urinary 2,5-hexanodione increases with potentiation of neurotoxicity in chronic coexposure to n-hexane and methyl ethyl ketone. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 71, 100-104.

Ikeda T., Kishi R., Yamamura K., Miyake H., Sato M., Ishizu S. (1980). Behavioural effects in rats following repeated exposure to methyl bromide”, *Toxicol. Lett.*, 6, 293-299.

Ikeda M., Ohtsuji H., Imamura T., Komoike Y. (1972). Urinary excretion of total trichloro-compounds, trichloroethanol and trichloroacetic acid as a measure of exposure to trichloroethylene and tetrachloroethylene. *Br. J. Ind. Med.*, 29, 328-333.

Imaoka S., Funae Y. (1991). Induction of Cytochrome P450 isoenzymes in rat liver by methyl n-alkyl ketones and n-alkylbenzenes. Effects of hydrophobicity of inducers on inducibility of Cytochrome P450. *Biochem. Pharmacol.*, 42, S143-S150.

Inoue O., Seiji K., Watanabe T., Kasahara M., Nakatsuka H., Yin S., Li g., Cai S., Jin C, Ikeda M. (1988). Mutual metabolic supression between benzene and toluene in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 60, 15-20.

Iwata M., Takeuchi Y., Hisanaga N., Ono Y. (1983). Changes of n-hexane metabolites in urine of rats exposed to various concentrations of n-hexane and to its mixture with toluene or MEK. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 53,1-8.

Iwata M., Takeuchi Y., Hisanaga N., Ono Y. (1984). Changes of n-hexane neurotoxicity and its urinary metabolites by long-term co-exposure with MEK or toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 54, 273-281.

Jahn C.E., Schaefer E.J., Taam L.A. (1985). Lipoprotein abnormalities in primary biliary cirrhosis: association with hepatic lipase inhibition as well as altered cholesterol esterification. *Gastroenterology*, 89, 1266-1278.

Jakubowski M. (red.) (1997). Monitoring biologiczny narażenia na czynniki chemiczne w środowisku pracy. IMP.

Jakubowski M., Kostrzewski P. (1989). Excretion of methylbenzoic acid in urine as a result of single and combined exposure to m-xylene. *Pol. J. Occup. Med.*, 2, 238-247

Johanson G. (1997). Toxicokinetics: modelling disposition. *Comprehensive Toxicology*, Vol. 1, Sipes I.G., McQueen C.A., and Gandolfi A.J., Eds., Elsevier, New York, 167.

Johansson I., Ingelman-Sundberg M. (1985). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal Cytochrome P450. *FEBS Lett.*, 183, 265-269.

Jorgensen N.K., Cohr K-H. (1981). n-Hexane and its toxicologic effects. *Scand. J. Work. Environ. Health*, 7, 157-168.

Juntunen J., Matikainen E., Anti-Poika M., Suoranta H., Valle M. (1985). Nervous system effects of long-term exposure to toluen. *Acta Neurol. Scand.*, 66, 89-102.

Kamiński M., Wiaderkiewicz R, Orschulik M. (2001). Układ monooksygenaz zależnych od cytochromu P450 w metabolizacji ksenobiotyków i endogennych produktów przemian. *Med. Pr.*, 52, Supl. 14, 19 – 26.

Kaneko T., Wang P.-Y., Sato A. (1994). Enzymes induced by ethanol differently affect the pharmacokinetics trichloroethylene and 1,1,1-trichloroethane. *Occup. Environ. Med.*, 51, 113-119.

Kaplan M.I., Murphy S.D.(1972). Effect of acrylamide on rotarod performance and sciatic nerve β -glucuronidase activity of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 22, 259-268.

Karatas F., Ozates I., Canatan H., Halifeoglu I., Karatepe M., Colak R. (2003). Antioxidant status & lipid peroxidation in patient with rheumatoid arthritis. *Indian J. Med. Res.*, 118, 178-181.

Kawai T., Yasugi T., Mizunuma K., Horiguchi S., Morioka I., Miyashita K., Uchida Y., Ikeda M. (1992). Monitoring of workers exposed to a mixture of toluene, styrene and methanol vapours by means of diffusive air sampling, blood analysis and urinalysis. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 63, 429-435.

Keys B., Piskorska-Pliszczyńska J., Safe S. (1986). Polychlorinated dibenzofurans as 2,3,7,8-TCDD antagonist: in vitro inhibition of monooxygenase enzyme induction. *Toxicol. Lett.*, 31, 151-158.

Kilburn K. (2002). Is neurotoxicity associated with environmental trichloroethylene (TCE)? *Arch. Environ. Health*, 57, 113-120.

Kim S.K., Kim Y.C. (1996). Effect of a single administration of benzene, toluene or m-xylene on carboxyhaemoglobin elevation and metabolism of dichloromethane in rats. *J. Appl. Toxicol.*, 16, 437-444.

Klaassen C.D. (1996). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 5th ed. McGraw-Hill Companies, New York, 17-18.

Krasavage W.J., O'Donoghue J.L., di Vincenzo G.D., Terhaar C.J. (1980). The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 52, 433-441.

Krishnan K., Brodeur J. (1991). Toxicological consequences of combined exposure to environmental pollutants. *Arch. Complex Environ. Stud.*, 3, 1-106.

Kuloglu M., Atmaca M., Tezcan E., Ustundag B., Bulut S. (2002). Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology*, 46, 186-189.

Kurppa K., Husman K. (1982). Car painters exposure to a mixture of organic solvents. Serum activities of liver enzymes. *Scand. J. Work. Environ. Health*, 8, 137-140.

Ladefoged O., Hass U., Simonsen L. (1989). Neuropsychological and behavioural effects of combined exposure to 2,5-hexanedione and acetone or ethanol in rats", *Pharm.Toxicol.*, 65, 372-375.

Liira J., Riihimäki V., Engström K., Pfäffli P. (1988). Coexposure of man to m-xylene and methyl ethyl ketone: kinetics and metabolism. *Scand. J. Work Environ. Health*, 14, 322-327.

Liira J., Johanson G., Riihimäki V. (1990). Dose-dependent kinetics of inhaled methylethylketone in man. *Toxicol. Lett.*, 50, 195-201.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Löf A., Lundgren E., Byfält Nordqvist M. (1986). Kinetics of styrene in workers from a plastics industry after controlled exposure: a comparison with subject not previously exposed. *Br. J. Ind. Med.*, 43, 537-543.

Lundberg I., Håkansson M. (1985). Normal serum activities of liver enzymes in Swedish paint industry workers with heavy exposure to organic solvents. *Br. J. Ind. Med.*, 42, 596-600.

Lundberg I., Nise G., Hedenborg G., Högberg M., Vesterberg O. (1994). Liver function tests and urinary albumin in house painters with previous heavy exposure to organic solvents. *Occup. Environment. Med.*, 51, 347-353.

Manganaro A.M. (1996). Review of transmucosal drug delivery. *Mil. Med.*, 162, 27-30.

Manini P., Andreoli R., Mutti A., Bergamaschi E., Franchini I. (1999). Determination of free and glucuronated hexane metabolites without prior hydrolysis by liquid- and gas-chromatography coupled with mass spectrometry. *Toxicol. Lett.*, 108, 225-231.

Marth E. (1987). Metabolic changes following oral exposure to tetrachloroethylene in subtoxic concentrations. *Archiv. Toxicol.*, 60, 293-299.

Mayne S.T. (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiological research. *J. Nutrition*, 133, 933S-940S.

McIntyre N. (1978). Plasma lipids and lipoproteins in liver disease. *Gut.*, 19, 526-530.

Mihara M., Uchlyama M., Fukuzawa K. (1980). Thiobarbituric acid values on fresh homogenate of rats as a parameter of lipid peroxidation in ageing CCl₄ intoxication and vitamin E deficiency. *Biochem. Med.*, 23, 302-311.

Miranowicz-Dzierżawska K., Skowroń J., Zapór L., Gołofit-Szymczak M. (2003). Behavioural effects of mixtures of organic solvents in rats exposed to two-component mixtures of tetrachloroethylene and n-hexane or ethylbenzene. *Book of Abstracts, 27th International Congress on Occupational Health, Iguassu Falls, Brazil.*

Mizuno M., Nakahama T., Inouye Y. (2001). Comparative Study on Correlation between Chemical Structure and Effect on Expression of Cytochrome P450 mRNAs in Rat among Chlorinated Ethylenes, Tetrachloroethylene, Trichloroethylene, 1,1-Dichloroethylene. *J. Health Sci.*, 47, 373-377.

Monster A., Regouin-Peeters W., van Schijndel A., van der Tuin I. (1983). Biological monitoring of occupational exposure to tetrachloroethylene. *Scand. J. Work. Environ. Health*, 9, 273-281.

Moshe S., Bitchatchi E., Goshen J., Attias J. (2002). Neuropathy in an artist exposed to organic solvents in paints: a case study. *Arch. Environ. Health*, 57, 127-129.

Mutti A., Cavatorta A., Lommi G. (1982). Neurophysiological effects of long-term exposure to hydrocarbon mixtures. *Arch. Toxicol., Suppl.* 5, 120-124.

Muti A., Franchini I. (1987). Toxicity of metabolites to dopaminergic system and the behavioural effects of organic solvents. *Br. J. Ind. Med.*, 44, 721-723.

Nakajima T. (1997). Cytochrome P450 isoforms and the metabolism of volatile hydrocarbons of low relative molecular mass. *J. Occup. Health*, 39, 83-86.

Nakajima T., Elovaara E., Park S.C., Gelboin H.V., Vainio H. (1991). Immunochemical detection of Cytochrome P450 isozymes induced in rat liver by n-hexane, 2-hexanone and acetonyl acetone. *Arch. Toxicol.*, 65, 542-547.

Nakajima T., Okino T., Okuyama S., Kaneko T., Yonekura I., Sato A. (1988). Ethanol-induced enhancement of trichloroethylene metabolism and hepatotoxicity: difference from the effect of phenobarbital. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 94, 227-237.

Nieminen S.A. i wsp. (1990). Acute behavioural effects of the organophosphates sarin and soman in rats, *Pharmacol.Toxicol.*, 67, 36-40.

Nosadini R., Avogaro A., Mollo F. (1984). Carbohydrate and lipid metabolism in cirrhosis: evidence that hepatic uptake of gluconeogenic precursors and free fatty acids depends on effective hepatic flow. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58, 1125-1132.

Notten W.R.F., Henderson P.T. (1975). The influence of n-hexane treatment on the glucuronic acid pathway and activity of some drug-metabolizing enzymes in guinea-pig. *Biochem. Pharmacol.*, 24, 127-131.

Ogata M., Tomokuni K., Takatsuka Y. (1969). Quantitative determination in urine of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid metabolites of toluene and m- or p-xylene. *Br. J. Ind. Med.*, 26, 330-334.

Ogata M., Tokomuri K., Asahara H. (1974). Simple microdetermination of trichloroethanol glucuronide and trichloroacetic acid in urine", *Int. Arch. Arbeitsmed.*, 32, 203-215.

Ohtsuki T., Sato K., Koizumi A., Kumai M., Ikeda M. (1983). Limited capacity of humans to metabolize tetrachloroethylene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 51, 381-390.

Okey A.B. (1990). Enzyme induction in the Cytochrome P450 system. *Pharmacol. Ther.*, 45, 241-298.

Oliveira G.H., Palermo-Neto J. (1993). Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on open-field behaviour and neurochemical parameters of rats. *Pharmacol. Toxicol.*, 73, 79-85.

Orłowski M., Meister A. (1965). Isolation of gamma-glutamyl-transpeptidase from dog kidney. *J. Biol. Chem.*, 240, 339-343.

Palombo J.D., Lopes S.M., Zeisel S.H. (1987). Effectiveness of orthotopic liver transplantation on the restoration of cholesterol metabolism in patients with endstage liver disease. *Gastroenterology*, 93, 1170-1177.

Parke D.V., Piotrowski J.K. (1996). Glutathione: its role in the detoxication of reactive oxygen and environmental chemicals. *Acta Pol. Toxicol.*, 4, 1-14.

Pastore C., Izura V., Marhuenda D., Prieto M.-J., Roel J., Cardona A. (2002). Partial conduction blocks in n-hexane neuropathy. *Muscle Nerve*, 26, 132-135.

Perbellini L., Brugnone F., Pavani I. (1980). Identification of the metabolites of n-hexane, cyclohexane, and their isomers in men's urine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 53, 220-229.

Perbellini L., De Grandis D., Semenzato F., Rizzuto N., Simonati A. (1978). An experimental study on the neurotoxicity of n-hexane metabolites: hexanol-1 and hexanol-2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 46, 421-427.

Perbellini L., Leone R., Fracasso M.E., Brugnone F., Venturini M.S. (1982). Metabolic interaction between n-hexane and toluene in vivo and in vitro. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 50, 351-358.

Plaa G.L., Hewitt W.R., du Souich P., Caillé G., Lock S. (1982). Isopropanol and acetone potentiation of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: single exposure versus repetitive pretreatments in rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 235-250.

Plewka A., Kamiński M., Zielińska-Psuja B., Orłowski J., Kowalówka J., Rutkowski T. (1998). Effects of ethanol, toluene and/or trichloroethylene on cytochrome P450-dependent monooxygenases in rat liver. *Acta Pol. Toxicol.*, 6, 45-53.

Potts R.O., Guy R.H. (1992). Predicting skin permeability. *Pharm. Res.* 9, 663-669.

Powell E., Kroon P. (1992). Liver, lipoproteins and disease. *J.Gastroenterol. Hepatol.*, 7, 225-231.

Puchalska H. (1985). Fizjologiczne kryteria i metody prognozowania toksyczności preparatów olejowych", *Prace CIOP*, XXXV, 195-211.

Reitz R.H., Gargas M.L., Mendrala A.I., Schumann A. (1996). In vivo and in vitro studies of perchloroethylene metabolism for physiologically based pharmacokinetic modeling in rats, mice, and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 136, 289-306.

Rump S., Kleinrok Z. (red.) (1982). *Farmakometria. Doświadczalne metody badania leków*, PZWL.

Saito I., Shibata E., Huang J., Hisanaga N., Ono Y., Takeuchi Y. (1991). Determination of urinary 2,5-hexanedione concentration by an improved analytical method as an index of exposure to n-hexane. *Br. J. Ind. Med.*, 48, 568-574.

Samuelsson K., Aly A., Johansson C., Norman A. (1981). Evaluation of fasting serum bile acid concentration in patients with liver and gastrointestinal disorders. *Scand. J. Gastroent.*, 16, 225-234.

Sato A. (1991). The effect of environmental factors on the pharmacokinetic behaviour of organic solvent vapours. *Ann. Occup. Hyg.*, 35, 525-541.

Sato A., Nakajima T. (1979). Dose-dependent metabolic interaction between benzene and toluene in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 48, 249-256.

Sato A., Nakajima T., Koyama Y. (1983). Interaction between ethanol and carbohydrate on the metabolism in rat liver of aromatic and chlorinated hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 68, 242-249.

Schmidt E. (1963). „Glutamic dehydrogenase”. W: *Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. Bergmayer (ed.). Verlag Chemie – Academic Press, 752-756.

Sedlak J., Lindsay R.H. (1968). Estimation of total protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 25, 192-205.

Seeber A. (1989). Neurobehavioral toxicity of long-term exposure to tetrachloroethylene. *Neurotoxicol. Teratol.*, 11, 579-583.

Seiji K., Inoue O., Jin C., Liu Y.-T., Cai S.-X., Ohashi M., Watanabe T., Nakatsuka H., Kawai T., Ikeda M. (1989). Dose-excretion relationship in tetrachloroethylene-exposed workers and the effect of tetrachloroethylene co-exposure on trichloroethylene metabolism. *Am. J. Ind. Med.*, 16, 675-684.

Seppalainen A.M., Husman K., Martenson C. (1978). Neurophysiological effects of long-term exposure to a mixture of organic solvents. *Scand. J. Work. Environ. Health*, 4, 304-314.

Serron S.S., Dwivedi N., Backes W.L. (2000). Ethylbenzene induces microsomal oxygen free radical generation: antibody-directed characterization of the responsible Cytochrome P450 enzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 164, 305-311.

Shibata E., Löf A., Johanson G., Ernstgård L., Gullstrand E., Sigvardsson K. (1997). Changes in n-hexane kinetics in human volunteers due to coexposure to methyl ethyl ketone. *International Society of Exposure Analysis (ISEA) Annual Meeting*, Research Triangle Park, NC.

Sirkka U., Pohjanvirta R., Nieminen S.A., Tuomisto J., Ylitalo P. (1992a). Acute neurobehavioural effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in han/Wistar rats. *Pharmacol.Toxicol.*, 71, 284-288.

Sirkka U., Nieminen S.A., Ylitalo P. (1992b). Acute neurobehavioural toxicity of trichothecene T-2 toxin in the rat. *Pharmacol.Toxicol.*, 70, 111-114.

Skowroń J., Miranowicz-Dzierżawska K., Zapór L., Gołofit-Szymczak M., Starek A. (2003). Interactions between tetrachloroethylene and tetrachloroethane in rats. *Sigurnost*, 45, 211-221.

Starek A. (1998). Interaction between trichloroethylene and tetrachloroethylene in rats". *Acta Pol. Toxicol.*, 6, 199-207.

Starek A. (1999). A comparative study on the toxicity of methylchloroform, trichloroethylene, and tetrachloroethylene administered with drinking-water in rats. *Acta Pol. Toxicol.*, 7, 55-62.

Starek A., Lepiarz W., Starek-Świechowicz B. (1998). The effect of some alkanes on methylchloroform, trichloroethylene, and tetrachloroethylene metabolism in rats. *Acta Pol. Toxicol.*, 6, 79-87.

Starzl T., Chase H., Porter K. (1973). Portacaval shunt in hyperlipoproteinaemia. *Lancet*, 2, 940-944.

Stetkiewicz J. (1992). Zastosowanie badań morfometrycznych w ocenie toksycznego działania substancji chemicznych. Praca na stopień doktora habilitowanego. *Studia i Materiały Monograficzne, IMP, Łódź*, 39.

Svensson B.G., Nise G., Erfurth E.M., Olsson H. (1992). Neuroendocrine effects in printing workers exposed to toluene. *Brit. J. Ind. Med.*, 49, 402-408.

Szymańska J.A., Bruchajzer E., Piotrowski J.K. (1996). Malondialdehyde levels in rat liver and kidney under the influence of stress. *Acta Pol. Toxicol.*, 4, 74-78.

Takeuchi Y., Ono Y., Hisanaga N. (1981). An experimental study on the combined effects of n-hexane and toluene on the peripheral nerve of the rat. *Br. J. Ind. Med.*, 38, 14-19.

Tamburro G., Greenberg R. (1981). Effectiveness of federally required medical laboratory screening in the detection of chemical injury. *Environ. Health Perspect.*, 41, 117-122.

Tardif R., Laparé S., Plaa G.L., Brodeur J. (1991). Effect of simultaneous exposure to toluene and xylene on their respective biological exposure indices in humans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 63, 279-284.

Tolos W., Setzer J., MacKenzie B., Lowry L., Dick R. (1987). Biological monitoring of experimental human inhalation exposure of methyl ethyl ketone and toluene. *Biological Monitoring of Exposure to Chemicals Organic Compounds*, Ho, M.H. and Dillon, H.K., Eds., John Wiley & Sons, 133.

Traiger G.J., Bruckner J.V., Jiang W.-D., Dietz F.K., Cooke P.H. (1989). Effect of 2-butanol and 2-butanone on rat hepatic ultrastructure and drug metabolizing enzyme activity. *J. Toxicol. Environ. Health*, 28, 235-248.

Triebig G., Hallermann J. (2001). Survey of solvent related chronic encephalopathy as an occupational disease in European countries. *Occup. Environ. Med.*, 58, 575-581.

Umezū T., Yonemoto J., Soma Y., Miura T. (1997). Behavioral effects of trichloroethylene and tetrachloroethylene in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58, 665-671.

Valentini F., Agnesi R., DalVecchio L. (1994). Does n-heptane cause peripheral neurotoxicity? A case report in a shoemaker. *Occup. Med.*, 44, 102-104.

van Engelen J.G.M., Rebel-de Haan W., Opdam J.J.G., Mulder G.J. (1997). Effect of coexposure to methyl ethyl ketone (MEK) on n-hexane toxicokinetics in human volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 144, 385-395.

Waldron H.A., Cerry N., Venables H. (1982). Solvent exposure and liver function. *Lancet*, 2, 1276.

Ward R.W., Travis C.C., Hetrick D.M., Andersen M.E., Gargas M.L. (1988). Pharmacokinetics of tetrachloroethylene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 93, 108-117.

Webler T., Brown H.S. (1993). Exposure to tetrachloroethylene via contaminated drinking water pipes in Massachusetts: a predictive model. *Arch. Environ. Health*, 48, 293-297.

Wesołowski W., Gromiec J.P. (1997). Occupational exposure in Polish paints and lacquer industry. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 10, 79-88.

Wheeler C.W., Wrighton S.A., Guenther T.M. (1992). Detection of human lung Cytochromes P450 that are immunochemically related to Cytochrome P450IIE1 and Cytochrome P450IIIA. *Biochem. Pharmacol.*, 44, 183.

White R.F., Feldman R.G., Moss M.B., Proctor S.P. (1993). Magnetic resonance imaging (MRI), neurobehavioral testing, and toxic encephalopathy: two cases. *Environ. Res.*, 61, 117-123.

White R.F., Proctor S.P. (1997). Solvents and neurotoxicity. *Lancet*, 349, 1239-1243.

Whitlock J.P., Denison M.S. (1995). Induction of Cytochrome P450 enzymes that metabolize xenobiotics. *Cytochrome P450 (2nd ed.): Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Ortiz de Montellano, P.R., Ed., Plenum Press, New York, 367.

Witte I., Jacobi H., Juhl-Strauss U. (1995). Correlation of synergistic cytotoxic effects of environmental chemicals in human fibroblasts with their lipophilicity. *Chemosphere*, 31, 4041-4049.

Wrighton S.A., Stevens J.C. (1992). The human hepatic Cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22, 1-21.

Zeliger H.I. (2003). Toxic Effects of Chemical Mixtures. *Archiv. Environ. Health*, 58, 23-29.

Ziglio G., Beltramelli G., Pregliasco F., Ferrari G. (1985). Metabolites of chlorinated solvents in blood and urine of subjects exposed at environmental level. *Sci. Total Environ.*, 47, 473-477.

Zimmerman H.J. (1986). Effects of alcohol on other hepatotoxins. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 10, 3-15.

Zoli M., Cordiani M.R., Marchesini G. (1991). Prognostic indicators in compensated cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.*, 86, 1508-1513.

10. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADH	dehydrogenaza alkoholowa
AIDH	dehydrogenaza aldehydowa
ALT	aminotransferaza alaninowa
cz.d.a.	czysty do analizy
EB	etylobenzen
GC-FID	chromatografia gazowa z detekcją płomieniowo-jonizacyjną
GIDH	dehydrogenaza glutaminianowa
GGTP	γ -glutamylotranspeptydaza
GPx	peroksydaza glutationowa
GSH	glutation (zredukowany); γ -glutamylcysteinyloglicyna
GSSG	glutation (utleniony); disiarczek glutationu
HA	kwas hipurowy
2,5-HD	2,5-heksanodion
HDL-C	cholesterol lipoprotein wysokiej gęstości
KT	katalaza
LD	dawka śmiertelna
LDL-C	cholesterol lipoprotein niskiej gęstości
m.c.	masa ciała
MDA	dialdehyd malonowy
MFO	mikrosomalny układ oksydaz o funkcji mieszanej
mRNA	matrycowy RNA (kwas rybonukleinowy)
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego – postać zredukowana
NDS	najwyższe dopuszczalne stężenie
n-H	n-heksan
NPSH	niebiałkowe grupy tiolowe
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
SDH	dehydrogenaza sorbitolowa
-SH	grupa tiolowa
SOD	dyszmutaza ponadtlenkowa
T-C	cholesterol całkowity

TCA	kwasy trichlorooctowe
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyna
TCE	trichloroetanol
TET	1,1,2,2-tetrachloroetylen
TG	triglicerydy
V_{max}	graniczna szybkość maksymalna
WWA	policykliczne węglowodory aromatyczne

11. SPIS RYCIN

- Rycina 1. Cytochrom P-450: schemat budowy oraz procesu utleniania ksenobiotyków
- Rycina 2. Peroksydacja lipidów z udziałem rodnika hydroksylowego
- Rycina 3. Cząsteczka glutationu i działanie reduktazy glutationowej
- Rycina 4. Schemat biotransformacji n-heksanu
- Rycina 5. Schemat biotransformacji etylobenzenu
- Rycina 6. Schemat biotransformacji tetrachloroetyleny do kwasu trichlorooctowego
- Rycina 7. Schemat biotransformacji tetrachloroetyleny zachodzącej poprzez sprzężanie z glutationem
- Rycina 8. Krzywa kalibracji dla kwasu trichlorooctowego
- Rycina 9. Krzywa kalibracji dla kwasu hipurowego
- Rycina 10. Krzywa kalibracji dla 2,5-heksanodionu
- Rycina 11. Wolne pole, widok ogólny
- Rycina 12. Walec obrotowy, widok ogólny
- Rycina 13. „Gorąca płytka”, widok ogólny
- Rycina 14. Bieżnia ruchoma, widok ogólny
- Rycina 15. Czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym w kolejnych dniach treningu
- Rycina 16a. Korelacja między czasem utrzymywania się szczurów na walcu obrotowym a szybkością obrotów (skala liniowa)
- Rycina 16b. Korelacja między czasem utrzymywania się szczurów na walcu obrotowym a szybkością obrotów (skala półlogarytmiczna)
- Rycina 17a. Korelacja między czasem przebywania zwierząt na "gorącej płytce" a temperaturą płytki (skala liniowa)
- Rycina 17b. Korelacja między czasem przebywania zwierząt na "gorącej płytce" a temperaturą płytki (skala półlogarytmiczna)
- Rycina 18. Korelacja między czasem biegu zwierząt na bieżni ruchomej a prędkością bieżni
- Rycina 19. Zachowanie się zwierząt w wolnym polu po 4 tygodniach podskórnego podawania różnych dawek tetrachloroetyleny
- Rycina 20. Średni czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym po podskórnym podawaniu różnych dawek tetrachloroetyleny
- Rycina 21. Średni czas przebywania zwierząt na gorącej płytce po podskórnym podawaniu tetrachloroetyleny

- Rycina 22. Średni czas biegu zwierząt na bieżni ruchomej po podskórnym podawaniu różnych dawek tetrachloroetyleny
- Rycina 23. Aktywność enzymów w surowicy krwi zwierząt eksponowanych podskórnice na różne dawki tetrachloroetyleny przez 28 dni
- Rycina 24. Stężenia frakcji lipidowych oraz dialdehydu malonowego w surowicy krwi zwierząt eksponowanych podskórnice na różne stężenia tetrachloroetyleny przez 28 dni
- Rycina 25. Tkankowa zawartość NPSH u szczurów eksponowanych podskórnice na różne stężenia tetrachloroetyleny przez 28 dni
- Rycina 26. Tkankowa zawartość MDA u szczurów eksponowanych podskórnice na różne stężenia tetrachloroetyleny przez 28 dni
- Rycina 27. Wydalanie TCA z moczem u szczurów eksponowanych podskórnice na TET lub kombinacje TET z EB lub TET z n-H
- Rycina 28. Wydalanie kwasu hipurowego z moczem u szczurów eksponowanych podskórnice na oliwę z oliwek, EB lub kombinacje EB z TET lub EB z n-H
- Rycina 29. Wydalanie 2,5-heksanodionu z moczem u szczurów eksponowanych podskórnice na n-heksan lub kombinacje n-H z TET lub n-H z EB
- Rycina 30. Zachowanie się zwierząt w wolnym polu po 4 tygodniach podskórnego podawania rozpuszczalników organicznych
- Rycina 31. Średni czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników organicznych przez 28 dni
- Rycina 32. Średni czas [s] przebywania zwierząt na „gorącej płytce” po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników przez 28 dni
- Rycina 33. Średni czas biegu zwierząt na bieżni ruchomej po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników
- Rycina 34. Procentowe zmiany aktywności enzymów wskaźnikowych w surowicy krwi zwierząt eksponowanych na badane związki w stosunku do grupy kontrolnej
- Rycina 35. Stężenie frakcji lipidowych oraz MDA w surowicy krwi zwierząt eksponowanych na badane rozpuszczalniki organiczne
- Rycina 36. Stężenie NPSH w tkankach zwierząt eksponowanych podskórnice na rozpuszczalniki organiczne przez 28 dni
- Rycina 37. Stężenie MDA w tkankach zwierząt eksponowanych podskórnice na rozpuszczalniki organiczne przez 28 dni
- Rycina 38. Wydalanie TCA z moczem u szczurów pobierających z wodą do picia TET lub mieszaninę TET z EB lub n-H

- Rycina 39. Wydalanie kwasu hipurowego z moczem u szczurów pobierających z wodą do picia EB lub mieszaninę EB z TET
- Rycina 40. Wydalanie 2,5-heksanodionu z moczem u szczurów pobierających z wodą do picia n-H lub mieszaninę n-H z TET
- Rycina 41. Zawartość AIAT w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w stosunku do grupy pobierającej samą wodę
- Rycina 42. Zawartość SDH w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w stosunku do grupy pobierającej samą wodę
- Rycina 43. Aktywność GIDH w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w stosunku do grupy kontrolnej
- Rycina 44. Aktywność GGTP w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w stosunku do grupy kontrolnej
- Rycina 45. Stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną
- Rycina 46. Stężenie cholesterolu HDL u surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną
- Rycina 47. Stężenie cholesterolu LDL u surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną
- Rycina 48. Stężenie triglicerydów u surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną
- Rycina 49. Stężenie MDA u surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną
- Rycina 50. Poziom MDA w wątrobie szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną
- Rycina 51. Poziom MDA w nerkach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną
- Rycina 52. Poziom MDA w jądrach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną
- Rycina 53. Poziom MDA w śledzionie szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną
- Rycina 54. Poziom NPSH w wątrobie szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną
- Rycina 55. Poziom NPSH w nerkach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną

Rycina 56. Poziom NPSH w jądrach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną

Rycina 57. Poziom NPSH w śledzionie szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia w porównaniu z grupą kontrolną

12. SPIS TABEL

Tabela 1. Walidacyjne wskaźniki metod oznaczania TCA, HA i 2,5-HD w moczu

Tabela 2. Czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym w kolejnych dniach treningu

Tabela 3. Czas utrzymywania się szczurów na walcu obrotowym w zależności od szybkości obrotów walca

Tabela 4. Czas przebywania szczura na „gorącej płytce” w zależności od temperatury

Tabela 5. Czas biegu szczura na bieżni w zależności od prędkości bieżni

Tabela 6. Zachowanie się zwierząt w wolnym polu po 4 tygodniach podskórnego podawania tetrachloroetylenu

Tabela 7. Średni czas utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym po podskórnym podawaniu tetrachloroetylenu

Tabela 8. Średni czas przebywania zwierząt na gorącej płytce po podskórnym podawaniu różnych dawek tetrachloroetylenu

Tabela 9. Średni czas biegu zwierząt na bieżni ruchomej po podskórnym podawaniu różnych dawek tetrachloroetylenu

Tabela 10. Aktywność enzymów w surowicy krwi zwierząt eksponowanych podskórnice na różne dawki tetrachloroetylenu przez 28 dni

Tabela 11. Stężenia frakcji lipidowych oraz dialdehydu malonowego w surowicy krwi zwierząt eksponowanych podskórnice na różne stężenia tetrachloroetylenu przez 28 dni

Tabela 12. Tkankowa zawartość NPSH u szczurów eksponowanych podskórnice na różne stężenia tetrachloroetylenu przez 28 dni

Tabela 13. Tkankowa zawartość MDA u szczurów eksponowanych podskórnice na różne stężenia tetrachloroetylenu przez 28 dni

Tabela 14. Wydalanie TCA z moczem u szczurów eksponowanych podskórnice na TET lub kombinacje TET z EB lub TET z n-H

Tabela 15. Wydalanie kwasu hipurowego z moczem u szczurów eksponowanych podskórnice na oliwę z oliwek, EB lub kombinacje EB z TET lub EB z n-H

Tabela 16. Wydalanie 2,5-heksanodionu z moczem u szczurów eksponowanych podskórnice na n-heksan lub kombinacje n-H z TET lub n-H z EB

Tabela 17. Zachowanie się zwierząt w wolnym polu po 4 tygodniach podskórnego podawania rozpuszczalników organicznych

- Tabela 18. Średni czas [s] utrzymywania się zwierząt na walcu obrotowym po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników organicznych przez 28 dni
- Tabela 19. Średni czas [s] przebywania zwierząt na „gorącej płytce” po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników przez 28 dni
- Tabela 20. Średni czas [s] biegu zwierząt na bieżni ruchomej po podskórnym podawaniu badanych rozpuszczalników
- Tabela 21. Aktywność enzymów wskaźnikowych w surowicy krwi zwierząt otrzymujących podskórnie badane związki przez 28 dni
- Tabela 22. Stężenie frakcji lipidowych oraz MDA w surowicy krwi zwierząt eksponowanych na badane rozpuszczalniki organiczne pojedynczo i w mieszaninach dwuskładnikowych przez 28 dni
- Tabela 23. Stężenie NPSH i MDA w tkankach zwierząt eksponowanych podskórnie na rozpuszczalniki organiczne przez 28 dni
- Tabela 24. Wydalanie TCA z moczem [nmol/kg/h] u szczurów pobierających TET lub mieszaninę TET z EB lub TET z n-H z wodą do picia
- Tabela 25. Wydalanie kwasu hipurowego [mg/kg/h] z moczem u szczurów pobierających z wodą do picia EB lub mieszaninę EB z TET
- Tabela 26. Wydalanie 2,5-heksanodionu [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$] z moczem u szczurów pobierających z wodą do picia n-H lub mieszaninę n-H z TET
- Tabela 27. Aktywność AIAT w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy
- Tabela 28. Aktywność SDH w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy
- Tabela 29. Aktywność GIDH w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy
- Tabela 30. Aktywność GGTP w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy
- Tabela 31. Stężenie cholesterolu całkowitego i jego frakcji HDL i LDL w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy
- Tabela 32. Stężenie triglicerydów w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy
- Tabela 33. Stężenie MDA w surowicy krwi szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy

Tabela 34. Poziomy MDA w tkankach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy

Tabela 35. Poziomy NPSH w tkankach szczurów pobierających rozpuszczalniki organiczne w wodzie do picia przez okres 3 miesięcy