

STANISŁAW SZULIŃSKI, ANDRZEJ CHYBA, STEFAN MAZIARKA

PRZEWLEKŁE TOKSYCZNE DZIAŁANIE SUBSTANCJI  
POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH O RÓŻNEJ BUDOWIE CHEMICZNEJ

CHRONIC TOXIC EFFECTS OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES VARYING IN  
CHEMICAL STRUCTURE

Zakład Higieny Komunalnej, Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24  
Kierownik: doc. dr hab. med S. Maziarka

*Białym szczurom, samcom podawano przez jedenaście miesięcy z wodą do picia detergenty: anionowy – ABSNa/S i niejonowy – Rokamid MRZ 17. Oznaczano aktywność wybranych enzymów krwi, wskaźniki hematologiczne, wykonano test sprawności pamięciowej mózgu oraz określano medianę przeżywalności szczurów.*

WSTĘP

Środki powierzchniowo czynne (detergenty) należą do częstych zanieczyszczeń wody do picia. Są one stosowane przez przemysł, a także używane powszechnie w gospodarstwie domowym. Wody rzeczne zawierają zazwyczaj poniżej 1 mg detergentów w litrze, a w wodzie do picia rzadko stwierdza się powyżej 0,2 mg/l. Maksymalna dopuszczalna zawartość substancji powierzchniowo czynnych w wodzie do picia wynosi 0,2 mg/l. Spośród detergentów większą toksycznością niż związki anionowe i niejonowe, charakteryzują się kationowoczynne, czwartorzędowe sole amonowe. Wartość  $LD_{50}$  tych związków podawanych szczurom *per os* wynosi 50–500 mg/kg m.c., np. dla Sterinolu – 230 mg/kg masy ciała. Detergenty anionowe, których substancją czynną jest alkilobenzenosulfonian sodowy (ABSNa/S), charakteryzują się nieco mniejszą toksycznością ostrą. Na przykład wartość  $LD_{50}$  Sulfapolu dla szczurów wynosi 1510 mg/kg m.c. [13]. Detergenty niejonowe, do których należy Rokamid MRZ 17, mogą osiągać jeszcze wyższe wartości  $LD_{50}$ . Do organizmu człowieka omawiane substancje mogą dostawać się m. in. w postaci resztek pasty do zębów, pozostałości po myciu owoców, naczyń kuchennych, zbiorników do mleka i piwa, a przede wszystkim z wodą do picia. Środki powierzchniowo czynne mogą wywierać niekorzystny wpływ na organizmy stałocieplne [2,4,8,9,12]. Rozpowszechniony jest pogląd, że zdolne są one do potęgowania toksycznego działania innych substancji. Wśród omawianych związków wyróżnia się grupę tzw. twardych detergentów, a więc stosunkowo trwałych w roztworach wodnych. Należy do nich ABSNa/S użyty do badań obok stosunkowo łatwo ulegającego rozpadowi detergentu niejonowego o nazwie Rokamid MRZ 17.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 140 białych szczurów samców ze stada Pzh: WIS hodowli własnej. Podzielono je losowo na siedem grup po 20 sztuk w każdej. Grupa I (kontrolna otrzymywała do picia wodę wodociągową, a pozostałe grupy roztwory wodne badanych substancji. Grupy II, III i IV otrzymywały odpowiednio 2, 6 i 18 mg ABSNa/S w litrze wody, a grupy V, VI, VII w takich samych stężeniach Rokamid MRZ 17. Wszystkie płyny podawano bez ograniczeń, a ich zużycie rejestrowano. Zwierzęta karmiono granulowaną mieszanką standardową LSM Wytwórni Pasz Centralnego Laboratorium Przemysłu Paszowego zawierającą: otręby, śruty zbożowe, mączkę rybną, mleko w proszku, drożdże pastewne, mączkę z suszu zielonek oraz dodatki mineralne i witaminy.

Szczury umieszczano po cztery sztuki w hodowlanych klatkach polietylenowych o powierzchni podłogi 1700 cm<sup>2</sup> każda. W pomieszczeniu, w którym przebywały szczury utrzymywano temperaturę 21–23°C, wilgotność ok. 55% a oświetlenie przez 12 godzin na dobę. W czasie trwania doświadczenia szczury były okresowo ważone, a po dziesięciu miesiącach narażenia wykonano badania hematologiczne i biochemiczne. Zawartość hemoglobiny we krwi oznaczano metodą *Heilmeyera* [7]. Wartość hamatokrytową określano używając kapilar heparynowanych, cienkościennych. Do wyznaczania czasu krzepnięcia krwi stosowano szklane kapilary. Pomiar aktywności cholinoesterazy krwi wykonano metodą *Hestrina* w modyfikacji *Fleischera* [6]. Poziom cholesterolu określano w osoczu metodą *Błaszczyszyna* opartą na próbie *Liebermana* i *Burchardta* [1]. Po jedenastu miesiącach narażenia szczury przełożono do specjalnie przystosowanych do tego celu klatek hodowlanych, w których uczyły się różnicowania i zapamiętywania bodźców wzrokowych. W okresie uczenia wszystkie zwierzęta otrzymywały do picia wodę wodociągową. Oryginalna elektroniczna przystawka rejestrowała wszystkie próby prawidłowe i nieprawidłowe w cyklu całodobowym [17]. Uczenie każdego zespołu składającego się z czterech szczurów przebywających w jednej klatce trwało osiem dób. Aby zminimalizować wpływ niekontrolowanych, zmiennych czynników zewnętrznych trening zwierząt prowadzono równolegle na przedstawicielach wszystkich siedmiu grup. Efektywność uczenia szczurów oceniano na podstawie wskaźnika procentowego – stosunku liczby omyłek do ogólnej liczby prób w każdej grupie. Po przełożeniu zwierząt do klatek bytowych kontynuowano intoksykację i rejestrowano padanie zwierząt. Do statystycznego opracowania wyników zastosowano testy: *t-Studenta* i „u”. Poziom istotności różnic przyjęto przy  $p < 0,05$ .

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Otrzymane wyniki oznaczeń hematologicznych i biochemicznych oraz medianę przeżywalności zwierząt zebrano w tabeli I.

Większość wskaźników biochemicznych i hematologicznych (aktywność cholinoesterazy, zawartość cholesterolu, hemoglobiny, wartość hematokrytu), masa ciała i wygląd zwierząt oraz ich zachowanie nie różniło się między grupami. Czas krzepnięcia krwi uległ wydłużeniu, w porównaniu z grupą kontrolną, u szczurów otrzymujących najwyższe dawki zarówno ABSNa/S jak i Rokamidu MRZ 17. W tych grupach wystąpiło też kilkunastoprocentowe skrócenie długości życia zatrutowanych zwierząt. Mediana przeżywalności w grupie IV wynosiła 734 dni, i była niższa średnio o 15% niż w grupie kontrolnej (863 dni).

Otrzymane wyniki uczenia zwierząt umieszczono w tabeli II i na wykresie. Tabela II zawiera liczby próbek i procenty błędów zestawione w 4-ro, 8-mio i 12-to dobowe okresy uczenia szczurów grup narażonych i grupy kontrolnej. Wykres ilustruje przebieg uczenia się zwierząt z grupy kontrolnej i grup otrzymujących najwyższe stężenia badanych związków 18 mg/l ABSNa/S (grupa IV) i Rokamidu MRZ 17 (grupa VII).

Tabela I Wpływ różnych stężeń ABSNa/S i Rokamidu MRZ 17 na zwierzęta doświadczalne  
Effects of various concentrations of ABSNa/S and Rokamid – MRZ 17 on the experimental animals.

Wskaźniki	Grupa zwierząt						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
AChE (w mg zhydrolizowanego chlorku acetylcholinyl)	2,4±0,3	2,5±0,3	2,5±0,3	2,5±0,3	2,5±0,4	2,5±0,2	2,6±0,4
CHOLESTEROL, mg/100 ml	91±10	95±8	102±9	90±7	110±12	90±7	103±9
HEMOGLOBINA, g/l	170±4	170±5	170±1	167±6	168±6	170±6	170±8
HEMATOKRYT, % obj.	51±2	50±2	50±2	50±1	50±2	50±2	51±2
KRZEPLIWOŚĆ, sek.	158±11	165±13	167*±9	168*±10	164±13	165±20	168*±14
PRZEŻYwalność, dni	863	827	768	734	789	791	696

\* – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej

I – kontrolna

II – ABSNa/S – 2 mg/l

III – ABSNa/S – 6 mg/l

IV – ABSNa/S – 18 mg/l

V – Rokamid – 2 mg/l

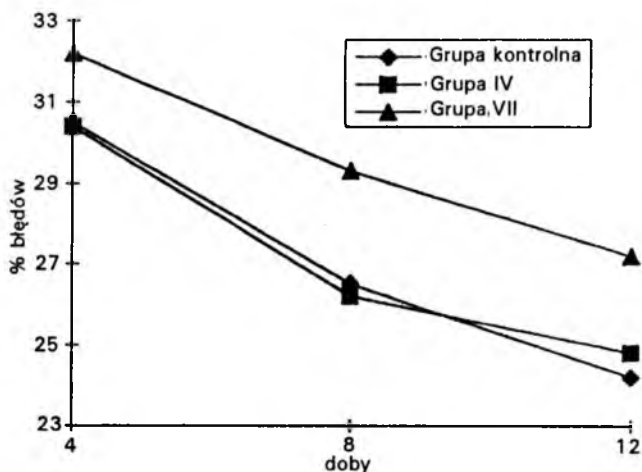
VI – Rokamid – 6 mg/l

VI – Rokamid – 18 mg/l

Tabela II. Liczba prób i błędów w 4-ro, 8-mio, 12-to dobowych okresach uczenia  
Number of trials and errors in 4, 8 and 12-day conditioning periods.

Okres uczenia (w dobach)	4		8		12	
	Liczba prób	% błędów	Liczba prób	% błędów	Liczba prób	% błędów
<b>Grupy zwierząt</b>						
I – kontrolna	5472	30,5	9628	26,5	13530	24,2
II–ABSNa/S – 2 mg/l	5213	30,9	8062	26,3		
III–ABSNa/S – 6 mg/l	4958	31,1	8848	27,3		
IV – ABSNa/S – 18 mg/l	5233	30,4	8937	26,2	12029	24,8
V–Rokamid – 2mg/l	5413	30,2	10027	27,5		
VI–Rokamid – 6 mg/l	4527	30,2	8782	25,7		
V–Rokamid – 18 mg/l	5314	32,2	10125	29,3*	13518	27,2*

\* – różnica istotna statystycznie w porównaniu do wyników grupy kontrolnej



Ryc. 1 Etapy uczenia się szczurów (w % błędów) grupy kontrolnej (I) oraz grup zatrutych detergentami ABSNa/S(IV) i Rokamidem MRZ 17 (VII)  
 Stages of learning of rats /in % of errors/ in control group /I/ and groups exposed to detergents ABSNa/S /IV/ and Rokamid MRZ 17 /VII/.

Na podstawie otrzymanych danych można stwierdzić, że zwierzęta grupy VII po czterech dobach uczenia popełniły proporcjonalnie więcej błędów niż zwierzęta grupy kontrolnej i pozostałych zatrutych grup. Po ośmiu dobach uczenia szczurów różnica uległa powiększeniu i okazała się istotna statystycznie. Kontynuowanie testu spontanicznego całodobowego uczenia szczurów potwierdziło spostrzeżenie o zakłócającym proces różnicowania i zapamiętywania bodźców wzrokowych wpływie Rokamidu. Świadczy to o wystąpieniu subtelnych zmian czynnościowych w zachowaniu przystosowawczym u szczurów pijących wodę zawierającą ten związek w stężeniu 18 mg/l.

Natomiast wszystkie zastosowane w badaniach stężenia detergentu ABSNa/S nie wpłynęły na proces uczenia się zwierząt. Uzyskane wyniki wskazują, iż w warunkach doświadczenia detergent Rokamid MRZ 17 powodował zakłócenia czynnościowe ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.). Może więc być jednym z czynników przyczyniających się do występowania mikrozaburzeń rozwojowych mózgu u potomstwa populacji bezpośrednio narażonej na oddziaływanie substancji chemicznych [3]. Rozpoczynające się już w okresie płodowym narażenie na działanie niskich stężeń substancji chemicznych może bowiem wywołać także kumulację czynnościową polegającą na gromadzeniu się niewielkich uszkodzeń morfologicznych lub biochemicznych w organizmie. Większość ksenobiotyków w warunkach przedłużonego działania małych dawek ma zdolność indukowania odległych skutków w szeregu układach, a szczególnie w układzie nerwowym, ze względu na jego integracyjną funkcję i złożoność biochemiczną [5,14,16]. Ocenia się, że w Polsce u około 0,5% noworodków są rozpoznawane wady rozwojowe ośrodkowego układu nerwowego, choć znacznie więcej z nich wykazuje objawy kliniczne w późniejszym okresie życia [11]. Etiologia tych zmian nie jest dokładnie poznana, ale najbardziej prawdopodobne są czynniki genetyczne, neurobiologiczne, neurotoksykologiczne [15].

Pogląd, że celowe jest konsekwentne eliminowanie ksenobiotyków wykazujących niekorzystny wpływ na ośrodkowy układ nerwowy człowieka, zyskuje coraz więcej

zwolenników. Jak podaje *M. Kossut* [10] badania przeprowadzone w USA wykazały, że choroby neurologiczne i psychiatryczne pochłaniają więcej ofiar niż choroby serca i choroby nowotworowe uważane powszechnie za najgroźniejsze.

### WNIOSKI

1. Długotrwałe podawanie związków powierzchniowo czynnych Rokamidu MRZ 17 i ABSNa/S w dawkach 2, 6 i 18 mg/l spowodowało wydłużenie czasu krzepnięcia krwi u szczurów.

2. W warunkach eksperymentu u szczurów zatrutowanych detergencem anionowym Rokamid MRZ 17 wystąpiły zakłócenia plastyczności pamięciowej mózgu manifestujące się obniżeniem sprawności uczenia się zwierząt.

S. Szuliński, A. Chyba, S. Maziarka

### CHRONIC TOXIC EFFECTS OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES VARYING IN CHEMICAL STRUCTURE

#### Summary

Male white rats were given with drinking water detergents: sodium alkylbenzenesulphonate /ABSNa/S/ and Rokamid MRZ 17, Group I /control/ received tap water. Groups II, III and IV were given ABSNa/S in doses of 2, 6 or 18 mg/l of water, and groups V, VI and VII were given Rokamid MRZ 17 in the same concentrations. After 10 months of exposure to these detergents haematological tests were done: haemoglobin level, haematocrit value and clotting time; biochemical investigations included blood cholinesterase activity, bilirubin and cholesterol levels in plasma. Then memory potential was tested by teaching the rats differentiation and memorising of visual stimuli in a cage specially adapted for that purpose.

On the ground of the obtained results it can be said that in the groups receiving Rokamid MRZ 17 in 18 mg/l concentration and ABSNa/S 6 and 18 mg/l the median survival was decreased by over ten per cent, and blood clotting time was prolonged in relation to the control group. The results of conditioning tests showed that the highest concentration of Rokamid MRZ 17 produced memory impairment in this group.

#### PIŚMIENNICTWO

1. *Błaszczyszyn M.*: Badania nad izolowaniem limfocytów, granulocytów i monocytów oraz nad oznaczaniem cholesterolu całkowitego w poszczególnych rodzajach leukocytów i w surowicy krwi. *Problemy lekarskie* 1970, 9, 2, 219. -2. *Castro C.A., Hogan J.B., Benson K.A., Shehata C.W., Landauer M.R.*: Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80 and emulfor-620. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995, 50/4, 521. - 3. *Chruścielska K.*: Toksyczność pre- i postnatalna enolofosforanów o działaniu insektobójczym z uwzględnieniem zaburzeń funkcjonalnych ośrodkowego układu nerwowego u szczurów. *Organika, Prace naukowe I.P.O.* Wydanie specjalne. Zesz. 2, Warszawa 1992. -4. *Devecerski V., Marianov M., Milicevic S.*: Histoenzymologic features of adrenal medulla ganglionic cells 60 days after exposure to detergents. *Med. Pregl.* 1993, 46, 181. - 5. *Elsner J.*: Testing strategies in behavioral teratology: Mikroanalisis of behavior. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 1986, 8, 573. - 6. *Fleischer J., Pope E.*: Colorimetric method for determination of red blood cholinesterase activity in whole blood. *Arch. Ind. Occup. Med.*, 1954, 9, 323. -7. *Kokot F.*: Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice, PZWL, Warszawa 1969, 136. - 8. *Korting H.C., Herzinger T., Hartinger A., Kerscher M., Angerpoiner T., Maibach H.I.*: Discrimination of the irritancy potential of surfactans in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse

fibroblasts; correlation with *In vivo* data from a soap chamber assay. *J. Dermatol. Sci.* 1994, Apr., 7(2), 119, – 9. *Korting H.C., Schindler S., Hartinger A., Kerscher M., Angerpointner T., Maibach H.I.*: MTT-assay and neutral red release (NRR) – assay; relative role in the prediction of the irritancy potential of surfactans. *Life Sci.* 1994, 55, 533. – 10. Mechanizmy plastyczności mózgu. Pod red. Małgorzaty Kossut. PWN Warszawa 1994.

11. *Lederer R., Elsner J., Zbinden G.*: Animal Models in Behavioural Toxicology and Teratology. Recent Developments in Toxicology: Trends, Methods and Problems., *Arch. Toxicol., Suppl.* 1991, 14, 15. – 12. *Mudryi I.V., Kartseva T.A., Morozowa S.B.*: The effect of sulfonol, lead and nitrates structural-functional status on the liver in animals. *Vrach. Delo.*, 1993, 2–3; 41. – 13. *Pludro G., Malinowski J.*: Toksyczność ostra i podostra syntetycznych środków powierzchniowo-czynnych produkcji krajowej: Sterinolu i Sulfapolu. *Roczn. PZH*, 1966, 17, 543. – 14. Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated With Exposure to Chemicals. *Environmental Health Criteria* 60. WHO, Geneva, 1986. – 15. *Prusiński A.*: Podstawy neurologii klinicznej, PZWL, Warszawa 1983. – 16. *Shaywitz S.E., Cohen D.J., Shaywitz B.A.*: The biochemical basis of minimal brain dysfunction, *J. Pediatr.*, 1978, 92, 179. – 17. *Szuliński S.*: Zastosowanie szybkiej metody oceny sprawności o.u.n. małych zwierząt laboratoryjnych w badaniach sanitarno-toksykologicznych. *Roczn. PZH*, 1978, 29, 403. – 18. *Shaywitz S.E., Cohen D.J., Shaywitz B.A.*: The biochemical basis of minimal brain dysfunction. *J. Pediatr.*, 1978, 92, 179.

Otrzymano: 1994.12.16