Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXVIII, knj. 25.

Rezaković, Džemal

1991

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/3bff7ae5-1a58-4336-9010-7be80dd2e58a

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082) YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

EKOTOKSIKOLOŠKO ISPITIVANJE RIZIKA OD INHALIRANIH PARA LAKIH I TEŠKIH BENZINA KAO I TRIHLORETILENA U TOKU GESTACIJE

JASNA ĐURIČIĆ
Institut za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 616—099:547.3:599.32

Apstrakt. Istraživani su organski rastvarači iz grupe petrolejskih ugljikovodonika (laki i teški benzini), kao i trihloretilen i njihov uticaj na proces embriogeneze i neuromišićne transmisije u pacova. U eksperimentu je korišteno 216 ženki pacova vrste wistar (160 eksperimentalnih i 56 kontrolnih). Za vrijeme prvog i drugog gestacionog perioda eksperimentalne ženke su bile tretirane sa organskim rastvaračima u inhalatornoj dozi od 0,5/4500 ml. Klinički znakovi intoksikacije i hematološke promjene su praćeni u toku eksperimenta. Dva do tri dana pred porod polovina eksperimentalnih ženki je žrtvovana, a njihovi fetusi su pregledani i vađeni. Želudac i mokraćni mjehur su izolovani od ženki, njihovih mladih i iz fetusa, te je ispitivana neuromišićna transmisija. Rezultati istraživanja su pokazali da su svi ispitivani organski rastvarači izazvali kliničke znakove intoksikacije u gravidnih ženki, uz promjene hematoloških parametara. Trihloretilen je jedino uticao na proces razvoja tako što je uslovio rađanje mladih manje težine kao i uginuća. Svi ispitivani organski rastvarači su manifestovali inhibitorni efekat na funkciju neuromišićne sinapse fetusa mladih i odraslih ženki.

Ključne riječi: benzini, trihloretilen, pacovi, gestacija, hematološki parametri, neuromišična transmisija.

UVOD

U okviru borbe za očuvanje čovjekove okoline danas se sve više vrše ispitivanja individualne izloženosti mnogim ekotoksinima. Tako su Hajimirgha i sar. (1986), ispitujući halogenirane ugljikovodonike, našli prisustvo trihloretilena u krvi kod trećine neprofesionalno eksponiranih ispitanika.

U ispitivanjima fetalne distribucije nekih alifatskih ugljikovodonika i trihloretilena, koja su Withey i Karpinch (1989) vršili na pacovima od 17 dana trudnoće, pokazali su da postoji pozitivna korelacija između koncentracija trihloretilena u majki i fetusa. Efekte trihloretilena na reproduktivnu funkciju mužjaka pacova ispitivali su Zenick i sar. (1984), dajući od 10—1000 mg/kg trihloretilena u toku 5 dana sedmično kroz šest nedelja i našli su da, i pored znatne kon-

centracije trihloretilena i njegovih metabolita u muškim reproduktivnim organima, nije bilo znakova spermatotoksičnosti. Nasuprot ovim zapažanjima, Mauson i sar. (1984) su, izlažući ženke pacova trihloretilenu u koncentraciji od 1000 mg/kg dnevno dvije sedmice prije začeća i u toku gestacionog perioda od 21 dan, uslovili uginuće ženki, a težina mladih je bila znatno smanjena, uz pojavu uginuća mladih pri rođenju.

Ispitivanja djelovanja nafte i njenih derivata na razvoj mnogih životinjskih vrsta su pokazala da mogu da imaju embriotoksično djelovanje. Hoffman (1979) je pokazao na embrionu pataka da direktno aplicirana sirova nafta izaziva značajne promjene u smislu preživljavanja embriona, dok je Ellenton (1982) ukazala na značajno smanjenje težine i dužine pilećih embriona. Cavanaugh i sar. (1983) su pokazali da ingestija sirove nafte usporava sazrijevanje gonada kod pataka. Carpenter i sar. (1978) su, ispitujući djelovanje petrolejskih ugljikovodonika na ljude i životinje, izazvali pojavu tremora i uginuća pacova. Istraživanja djelovanja trihloretilena na miševima Anne Tucker i sar. (1981) dovela su do pojave ataksije, gubitka refleksa ispravljanja i uginuća životinja.

Rao i Panday (1980) su, ispitujući hepatički metabolizam hema u pacova, utvrdili da benzen smanjuje koncentraciju hepatičnog hema, dok benzini uzrokuju supresiju aktivnosti bubrežne ALA dehidrataze. Fujita i sar. (1984) su našli depresiju stvaranja eritrocita i jetrene D DALK u pacova izloženih trihloretilenu.

Zbog različitih aspekata toksičnosti koje pokazuju petrolejski i hlorirani ugljikovodonici kako za ljude tako i za životinje, odlučili smo se da ispitamo njihovo djelovanje na ženke pacova u periodu gestacije i razvoj mladih uz praćenje hematoloških parametara. S obzirom na afinitet ovih toksina za nervno tkivo, a još nedovoljno istraženo njihovo djelovanje na osjetljive strukture neuromišićne spojnice u procesu njenog razvoja od fetusa do odraslih ženki, odabrali smo izolovane organe za ispitivanje neuromišićne transmisije.

MATERIJAL I METODE

U eksperimentu smo koristili lake i teške benzine iz grupe petrolejskih ugljikovodonika, kao i trihloretilen iz grupe hloriranih ugljikovodonika. Ukupno je korišteno 216 ženki Wistar pacova istog legla i starosti, težine oko 200 grama koje su bile podijeljene u 5 grupa po 32 ženke, a kontrolnu grupu je sačinjavalo 56 ženki. Eksperimentalne ženke su bile izložene djelovanju para lakih benzina (frakcije od 0,2—U5 i 0,2—U10), zatim parama teških benzina (frakcije od 0,2—U6 i 0,2—U11), dok je peta grupa bila izložena djelovanju trihloretilena. Prije pristupa izvođenju eksperimenta ispitali smo ponašanje ženki u staklenom zvonu volumena 4500 ml i bez aplikacije toksičnih supstanci i ustanovili da životinje dobro podnose boravak u zvonu i kroz duži period vremena. Pošto smo životinje namjeravali da eksponiramo organskim rastvaračima u toku pola, odnosno cijelog gestacionog perioda, koji kod pacova

iznosi 21 dan, morali smo i utvrditi dozu rastvarača koju su životinje mogle podnijeti u svakodnevnoj ekspoziciji i našli smo da ona iznosi 0,5 ml toksične supstance raspršene iz šprice u staklenom zvonu volumena 4500 ml. Vrijeme držanja životinja u staklenom zvonu je iznosilo 5 minuta. Ispitivanje navedenih supstanci je rađeno u prvom i drugom gestacionom periodu da bi se odredio njihov uticaj na fetogenezu i embriogenezu, tako da je svaka grupa od 32 ženke bila podijeljena u podgrupe od 16 ženki. Nakon izvršene koncepcije u toku 5 dana zajedničkog držanja u kavezu sa mužjacima, ženke su bile odvojene i uključene u tretman sa odgovarajućom supstancom počevši od 5-og dana koncepcije za prvi, odnosno od 12-og dana koncepcije za drugi gestacioni period.

Na početku kao i na kraju eksperimenta, radi praćenja toksičnih efekata na hematopoezni sistem, uzeta je krv od ženki i određivani su standardnim metodama broj eritrocita, leukocita, retikulocita i diferencijalna krvna slika. U toku ekspozicije praćeno je vrijeme latence, znaci intoksinacije, dužina trajanja simptoma kao i vrijeme oporavka, odnosno uginuća životinja. Na jedan do dva dana pred porod polovina ženki iz svake podgrupe je bila žrtvovana, a od uzete krvi su urađene hematološke pretrage. Dobiveni podaci su statistički obrađeni na kompjuteru. Također je registrovan broj i izgled fetusa.

Od žrtvovanih ženki, kao i njihovih fetusa i mladunčadi korišteni su izolovani inervirani organi radi ispitivanja djelovanja pomenutih organskih rastvarača na neuromišićnu transmisiju. Kao model za ispitivanje poslužili su izolovani inervirani želudac i mokraćni mjehur preparirani standardnom metodom prema H u k o v i ć u i sar. (1963, 1967). Ispitivane supstance su aplicirane u vodeno kupatilo u rastvoru Thyrode u koncentracijama od 0,01; 0,1 i 1,0 ml/20 ml. Električna stimulacija je vršena pomoću stimulatora II impulsima veće jačine (30—40 mA, 20 Hz) za izolovane organe fetusa.

REZULTATI

Ustanovljeno je da već u prvoj minuti tretmana životinje pokazuju znakove intoksikacije u smislu uznemirenosti ili obamrlosti, koji su kod primjene lako isparljivih benzina bili ispoljeni sa kraćim vremenom latence, ali i sa bržim oporavkom (tabela 1). Pri aplikaciji teških benzina razlike su postojale ne samo u vremenu pojave i trajanja oporavka već su se uz tahipneu javljali podrhtavanje i grčevi pojedinih dijelova tijela kao što su glava, trup i ekstremiteti. Također je zapažena mnogo češća pojava kolapsa kod ženki koje su bile inhalirane sa teškim benzinima. Sve ove navedene pojave su bile daleko najizraženije pri aplikaciji trihloretilena koji je u četiri slučaja doveo i do egzitusa životinja. Rezultati pretraga krvi su pokazali smanjen broj eritrocita, leukocita, retikulocita kao i vrijednosti hemoglobina i to statistički značajan kod primjene ispitivanih supstanci od početka gestacionog perioda (tabela 2). Pomjeranja unutar diferencijalne krvne slike su bila u smislu relativne limfocitoze na račun smanjenja neutrofilnih granulocita.

Tabela 1. SIMPTOMI INTOKSIKACIJE U TOKU TRETMANA GRAVIDNIH ŽENKI LAKIM BENZINOM 0,2—U5

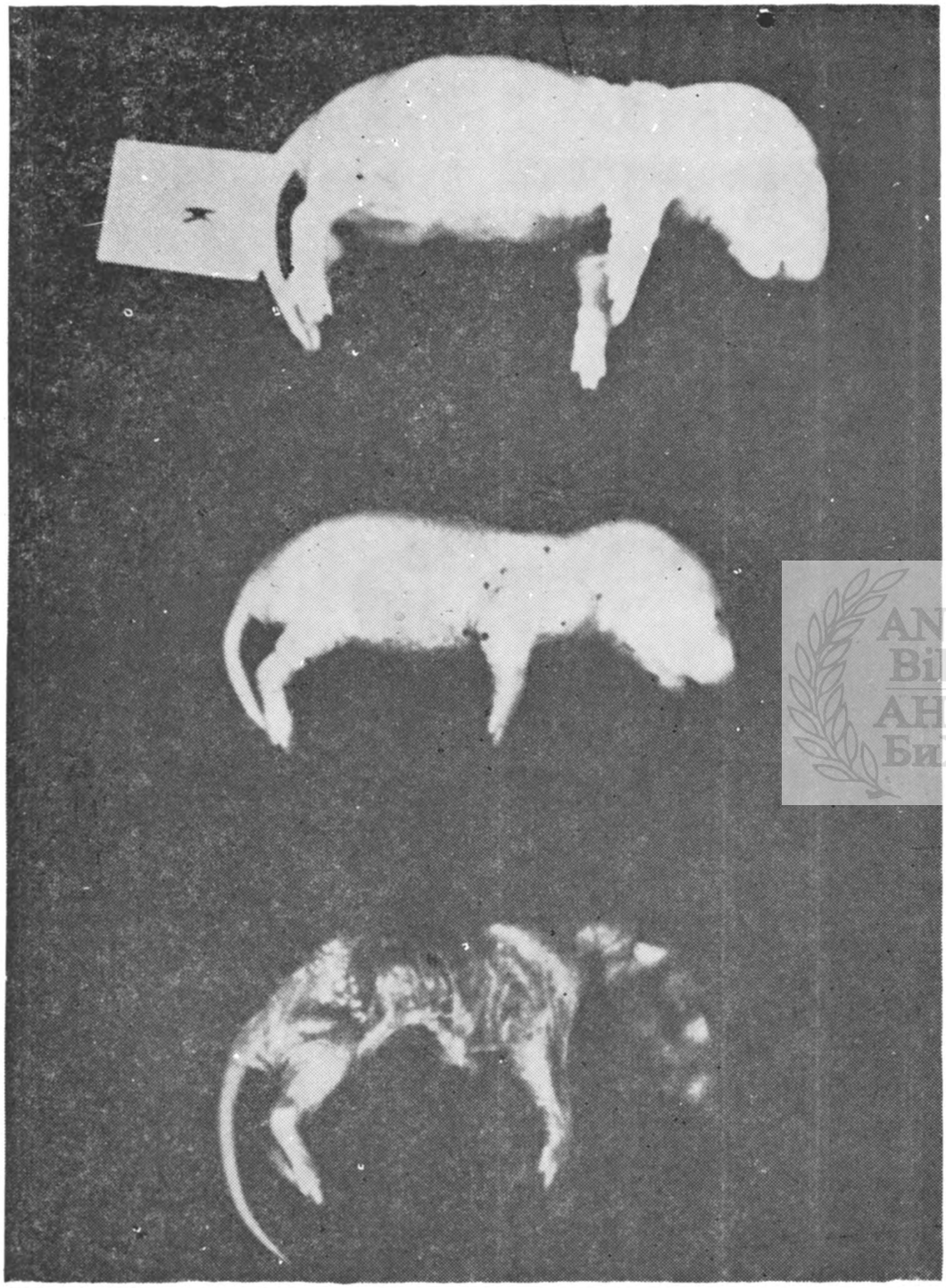
Broj ženki	Vrijeme latence	Vrijeme oporavka	Ekscitacija	Klonulost	Tahipnea	Drhtanje	Kolaps
1	1	1,5	++	+	+	—	—
2	1	1	+	++	—	—	—
3	1	1	++	+	+	—	—
4	2	1	++	++	—	—	—
5	1	1,5	++	++	+	—	—
6	2	2	++	++	+	+	—
7	2	1	++	+++	—	+	—
8	1	1,5	++	++	+	—	—
9	1	1,0	+++	++	+	—	—
10	2	1,0	++	++	+	—	—
11	2	1,5	+++	++	—	—	—
12	1	2	++	+++	+	+	—
13	2	2	+++	++	+	—	—
14	2	2	++	++	—	+	—
15	1	2	+++	++	++	—	—
16	1	1	+++	++	+	—	—

Tabela 2. HEMATOLOŠKE PROMJENE POD UTICAJEM LAKOG BENZINA 0,2—U10 U I GESTACIONOM PERIODU

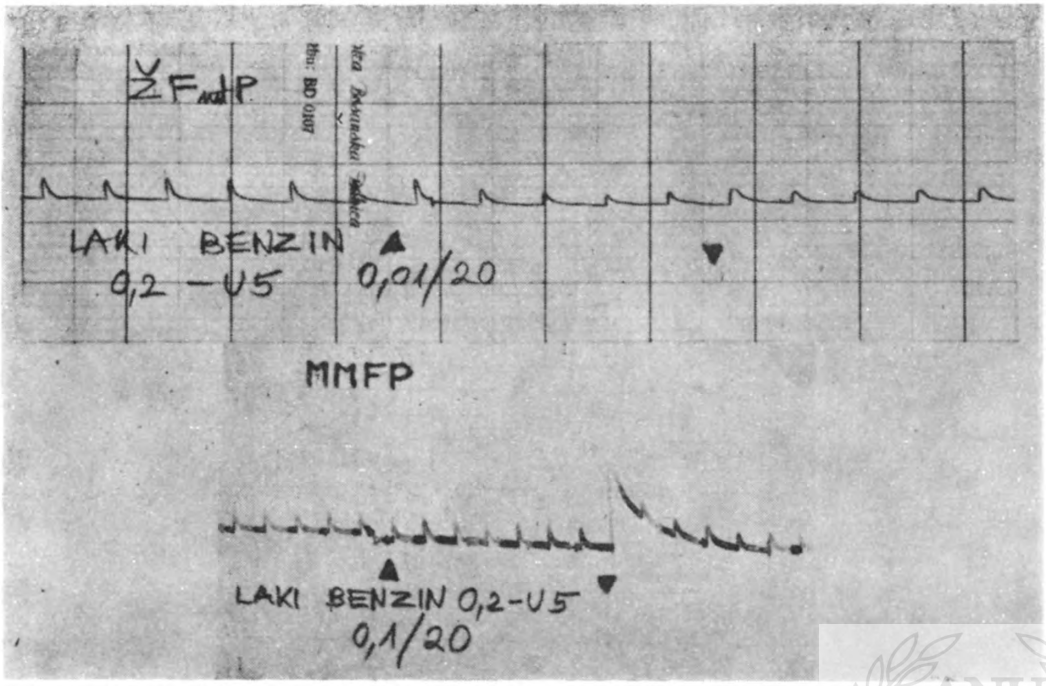
Ispitivane vrijednosti $(n = \frac{32}{2})$	Eritrociti	Leukociti	Hemoglobin	Retikulociti
X na početku eksperimenta	6,750.630	10516,8	70,31	36,13
X na kraju eksperimenta	6,303.130	9415,6	66,25	30,56
t test	4,77 S p < 0,01	3,28 p < 0,01	3,19 S p < 0,01	6,45 S p < 0,01

HEMATOLOŠKE PROMJENE NASTALE U II GESTACIONOM PERIODU

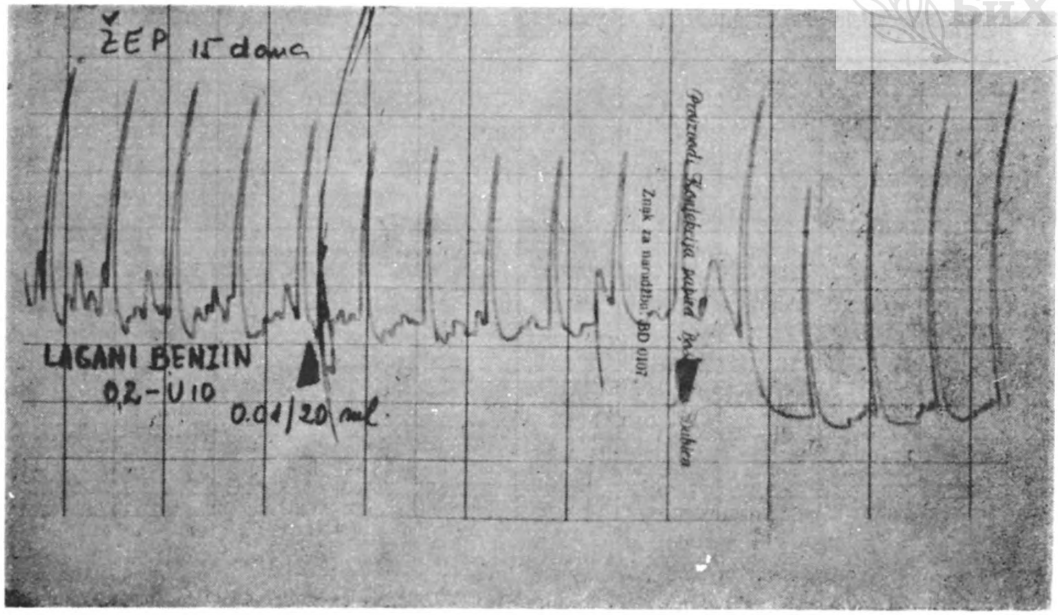
Ispitivane vrijednosti $(n = \frac{32}{2})$	Eritrociti	Leukociti	Hemoglobin	Retikulociti
X na početku eksperimenta	6,701.880	11437,5	79,88	32,13
X na kraju eksperimenta	6,450.000	10287,5	73,38	26,69
t test	1,80	1,42	4,91	1,12



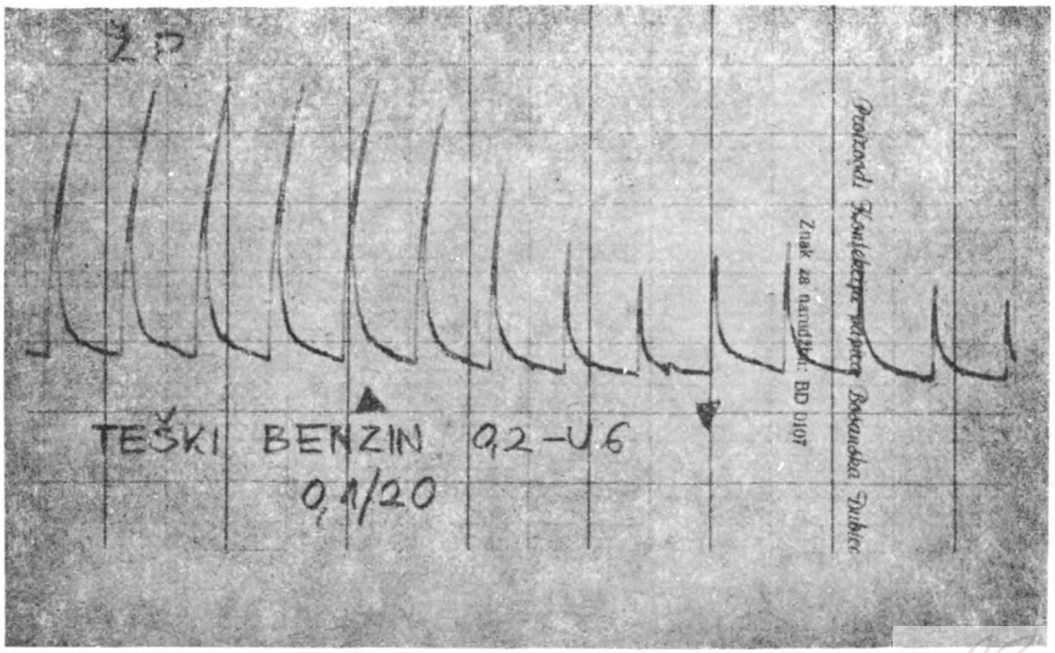
Slika 1. Prikazani su jedan neonatus pacova kontrolne grupe i dva tek rođena pacova od ženki koje su bile inhalirane sa trihloretilenom. Vidi se razlika u veličini, a također postoji i razlika u boji kože (jedan je mrtvorođen).



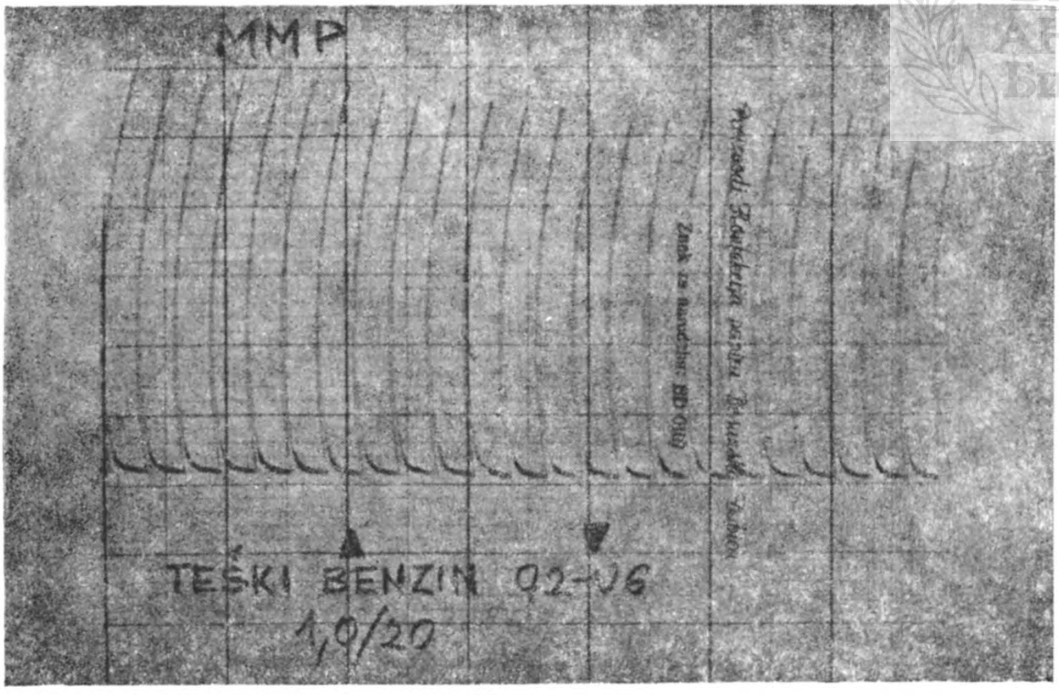
Slika 2. Efekti lakog benzina 0,2—U5 na mišićne kontrakcije izolovanog želuca i mokraćnog mjehura iz fetusa pacova. Kod znaka ▲ dodat je benzin u vodeno kupatilo, a kod znaka ▼ je isprano



Slika 3. Kontrakcije izolovanog inerviranog želuca pacova starog petnaest dana. Kod znaka ▲ dodat je lagani benzin 0,2—U10 u koncentraciji od 0,01/20 ml, a kod znaka ▼ izvršeno je ispiranje

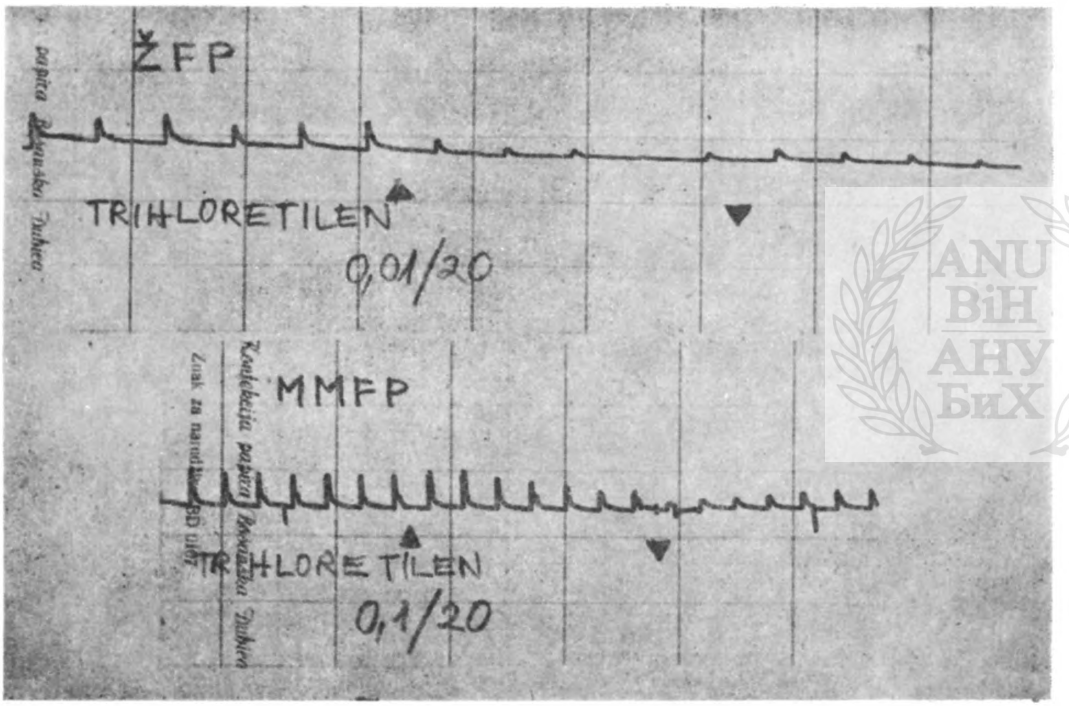


Slika 4. Kontrakcije izolovanog želuca pacova. Kod znaka ▲ dodat je teški benzin 0,2—U6, a kod znaka ▼ izvršeno je ispiranje. Visina kontrakcije se ne vraća na kontrolne vrijednosti



Slika 5. Kontrakcije izolovanog inerviranog mokraćnog mjehura pacova. Kod znaka ▼ dodat je teški benzin 0,2—U6, a kod znaka ▼ izvršeno je ispiranje

Vanjskim pregledom fetusa, kao i tek rođenih životinja ustanovili smo da je jedino primjena trihloretilena od svih ispitivanih supstanci dovela do poremećaja razvoja u smislu rađanja mladunčadi koja su bila bljeđa i manje težine u odnosu na mladunčad ostalih oglednih i kontrolnih ženki (slika 1). Također je bilo mrtvorođenih mladunčadi, a 4 ženke su egzitirale u toku eksperimenta. Aplikacija lakih i teških benzina u koncentraciji od 0,01; 0,1 i 1,0/20 ml Tirode dovela je do smanjenja kontrakcija izazvanih električnom stimulacijom želuca i mokraćnog mjehura izolovanih iz fetusa (slika 2), neonatusa (slika 3) i odraslih ženki. Ovi efekti su bili jače izraženi kod primjene teških benzina (slika 4, 5), tako da se nakon ispiranja kupatila visina kontrakcija nije vraćala na kontrolne vrijednosti.



Slika 2. Efekti trihloretilena na izolovanom inerviranom humanom ureteru. Gornji dio slike: trihloretilen u koncentraciji 7 · 10—3 M. Donji dio slike: trihloretilen u koncentraciji 150 · 10—3 M

Trihloretilen je ispoljio također depresivan efekat na proces neuromišićne transmisije na svim ispitivanim organima, tako da je smanjenje visine izazvanih kontrakcija želuca fetusa bilo izrazito već kod primjene najmanje doze od 0,01/20 ml, a efekat je bio ireverzibilan (slika 6). Osjetljivost na aplikaciju supstanci je bila više izražena kod organa izolovanih iz mlađih životinja u odnosu na odrasle ženke. Jačina efekta je bila proporcionalna datoj dozi.

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Izlažući gravidne ženke pacova parama benzina i trihloretilena u ozi od 0,5/4500 ml dobili smo izraženu sliku trovanja koja je varirala ovisnosti od upotrebljenog rastvarača, ali su kod svih ženki bili izra-ni narkotički simptomi. Neurološki simptomi, kao što su pojava fi-og tremora pa do grčeva pojedinih mišića, se uklapaju u već ranije pisanu sliku trovanja ovim organskim rastvaračima (C a r p e n t e r, 978; T u c k e r, 1981). Među ispitivanim supstancama trihloretilen je okazao najjači neurotropizam.

Ispitujući njihovo djelovanje na neuromišićnoj spojnici pokaza-smo da i na najmlađim strukturama, kao što su to izolovani inervi-ani organi fetusa (želudac i mokraćni mjehur), ispitivani rastvarači ıanifestuju svoje inhibitorno djelovanje, koje je jače izraženo što su napse mlađe. Tako su dobiveni efekti na izolovanim organima tek ro-enih životinja jače izraženi nego kod odraslih. Ovi efekti su bili pro-orcionalni datoj dozi rastvarača, a inhibicija prenosa impulsa kroz si-apsu je bila ireverzibilna kod teško isparljivih benzina kao i kod tri-loretilena, vjerovatno kao posljedica težih promjena u propustljivosti ıembrane. Što se tiče osjetljivosti organa, jači efekti su dobiveni na ıastričnim nervima želuca nego na pelvičnim nervima mokraćnog mje-ura.

Dobiveni rezultati hematoloških pretraga ukazuju na smanjenu egeneratornu moć krvi (smanjen broj eritrocita, retikulocita i hemo-lobina), što je u skladu sa navedenim istraživanjima drugih autora R a o i P a n d y a, 1980; F u j i t a i sar., 1984). Pomijeranje unutar di-erencijalne krvne slike u smislu relativne limfocitoze govori o reakciji rvi na unesene toksine.

Ispitujući djelovanje benzina kao i trihloretilena na formiranje loda, ustanovili smo da, iako nisu nađene morfološki vidljive defor-ıacije fetusa i mladunčadi, trihloretilen je kao najjači upotrebljeni ›ksin u ovoj studiji uticao na razvoj mladunčadi, tako da su se javlja-ı i mrtvorođena mladunčad (M a u s o n, 1984). Također je primjena ·ihloretilena i u ovim malim koncentracijama bila dovoljna da izazove ginuće gravidnih ženki.

Ispoljena izrazita toksičnost ispitivanih organskih rastvarača na iše sistema dokazana in vivo, kao i ispitivanjem in vitro, u ovom ek-perimentu upućuje na opravdanost daljeg sistematskog izučavanja me-anizama njihovog dejstva.

ECOTOXICOLOGICAL RISC INVESTIGATION OF INHALED LIGHT AND HEAVY BENZINE VAPOURS AS WELL AS TRICHLOROETHYLENE IN THE COURSE OF GESTATION

Summary

Organic dissolvers from the group of petroleum hydrocarbons (lighht and eavay benzines) were investigated as well as trichloroethylene, and their influen-e on the process of embryogenesis and neuromuscular transmission in rats. 16 female rats of the Wistar species (160 experimental and 56 controlling) were

used. During the first and the second gestation period the experimental females were treated with organic dissolvers in an inhalatory dose of 0.5/4500 ml. Clinical signs of intoxication and haematologic changes were observed in the course of the experiment. Two to three days before delivery half of the experimental females were killed, and their foetuses investigated and taken out. The stomach and the urinary bladder were isolated from females, their youngs and foetuses, and the neuromuscular transmission was investigated. The results of the investigation showed that all the examined organic dissolvers caused clinical signs of intoxication in the gravid females with changes of haematologic parameters. Trichloroethylene only influenced the process of development causing the birth of the young of a reduced weight and deaths. All the examined organic dissolvers manifested an inhibitory effect on the neuromuscular synapsis function of the foetuses, young and grown females.

LITERATURA

Carpenter, C. P., Geary, L. D., Myers, R. C., et al.: *Petroleum Hydrocarbons Toxicity Studies XVI, Animal Response to N-Nonane Vapor,* Toxicol. Appl. Pharmacol. 44/1, 53—61, 1978.

Cavanaugh, K. P., Goldsmith, A. R., Holmes, W. N. and Follet, B. K. et al.: *Effects of Ingested Petroleum on the Plasma Prolactin Levels During Incubation and on the Breeding Succes of Paired Mallard Ducks.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 12/3, 335—341, 1983.

Ellenton, J. S.: *Teratogenic activity of aliphatic and aromatic fractions of Prudhoe Bay crude and fuel oil in the chicken embryo,* Toxicol. Appl. Pharmacol. 63.209—215, 1982.

Hajimirgha, H., Ewers, U., Jansen-Rosseck, R. and Brockhaus, A. et al.: *Human Exposure to Volatile Halogenated Hydrocarbons from the General Environment.* Int. Arch. Occup. Environ. Health, 58/2, 141—150, 1986.

Fujita, H., Koizumi, A., Yamamoto, M. et al.: *Inhibition of Aminolevulinate Dehydratase in Trichloroethylene Exposed Rats and the Effect of Heme Regulation.* Biochim, Biophys, Acta Ser. Gen. Subj., 800/1, 1—10, 1984.

Hoffman, D. J.: *Embryotoxic and Teratogenic Effects of Crude Oil on Mallard Embryos one Day of Development.* Bull. Environm. Contam. Toxicol, 22, 632—637, 1979.

Huković, S. i Bubić, I.: *Problemi autonomne inervacije mokraćnog mjehura. Izolirani mokraćni mjehur s autonomnim nervima štakora i miša kao model za farmakološka istraživanja,* Acta Medica Iugoslavica, 17, 279—239, 1963.

Huković, S., Begić, M. i Radivojević, M.: *Izolirani želudac štakora i miša sa pripadajućim nervima kao model sistem za ispitivanje u farmakologiji.* Radovi ANU BiH, 40, Odjeljenje medicinskih nauka, 15, 11—118, 1967.

Mauson, J. M., Murphy, M., Richdale, N. and Smith, M. K.: et al.: *Effects of Oral Exposure to Trichloroethylene on Female Reproductive Function.* Toxicology, 32/3, 229—242, 1984.

Rao, G. S. and Pandya, K. P.: *Hepatic Metabolism of Heme in Rats After Exposure to Benzene, Gasoline and Kerosene.* Arch. Toxicol. 46, 313—317, 1980.

Tucker, A. N., Sanders, V. M., Barnes, D. W. et al.: *Toxicology of trichloroethylene in the Mouse.* Toxicol Appl. Pharmacol, 62, 351—375, 1981.

Zenick, H., Blackburn, K., Hope, E. et al.: *Effects of Trichloroethylene Exposure on Male Reproductive Function in Rats.* Toxicology, 31/3—4, 237—250, 1984.

Withey, J. R. and Karpinch, K.: *The Fetal Distribution of Some Aliphatic Chlorinated Hydrocarbons in the Rat After Vapor Phase Exposure,* Biol. Res. Pregnancy Perinatal., 6/2, 79—88, 1985.