

Pozostałości lotnych substancji gazowych w tkankach lisów polarnych

BOŻENA NOWAKOWICZ-DĘBEK, GRZEGORZ BUSZEWICZ*,
ANNA CHMIELOWIEC-KORZENIOWSKA, LEON SABA,
HANNA BIS-WENCEL, WIOLETTA WNUK

Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin
*Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin

Nowakowicz-Dębek B., Buszewicz G., Chmielowiec-Korzeniowska A., Saba L., Bis-Wencel H., Wnuk W.
Residues of volatile gaseous substances in the tissues of polar foxes

Summary

The investigations were performed to determine the air gas pollutants in the tissues of polar foxes. The caged animals maintained in the pavilion system constituted the control group (20 animals), while the experimental group were constituted by the individuals born in enclosed spaces and transported to the farm after the raising time (12 animals). The chromatographic analyses were made on the samples of lungs, liver, kidneys and perirenal fat of the foxes from both groups. The highest content of gaseous residues was recorded in the fox lung tissue. Methanol, ethanol, benzene, trichloroethanol and acrolein were identified at the highest concentrations. The analysis results showed higher concentrations of most substances in the tissues of the experimental foxes, which may result from a higher concentration of pollutants in the air exhaled.

Keywords: residues, air pollutants, polar fox

Rozwój cywilizacji wpływa na usprawnienie funkcjonowania zakładów przemysłowych czy ferm hodowlanych, a jednocześnie niesie ze sobą wiele nowych niebezpieczeństw dla żyjących w ich otoczeniu organizmów. Wśród środowiskowych czynników stanowiących zagrożenie dla zdrowia należy wymienić gazowe zanieczyszczenia powietrza. Oddziaływanie tych związków może obejmować szeroką gamę skutków zdrowotnych w różnym nasileniu, a u zwierząt również obniżenie wyników produkcyjnych. Szacowanie szkodliwości poszczególnych substancji dokonuje się jednak w badaniach na zwierzętach laboratoryjnych czy też u ludzi uczestniczących w awariach przemysłowych. Prowadzone analizy materiału biologicznego obejmują zazwyczaj obecność metali ciężkich w poszczególnych tkankach, zaś u ludzi przede wszystkim różnorodnych używek. Niewiele jest danych odnośnie do oddziaływania mieszanin substancji gazowych zawartych w powietrzu środowiska bytowania zwierząt hodowlanych, a zwłaszcza ich zawartości w poszczególnych narządach. Stąd celem niniejszych badań była analiza i ocena pozostałości lotnych substancji gazowych w wybranych tkankach lisów polarnych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w fermie lisów polarnych (*Alopex lagopus*) ze średnią obsadą stada podstawowego 50 szt.

zwierząt. Spośród lisów stada podstawowego wybrano losowo grupę 20 sztuk, które umieszczono w pomieszczeniu z ograniczonym (około 0,1 m/s) przepływem powietrza, lecz zachowanym jego dopływem i odpływem. W warunkach tych samice przebywały od momentu pokrycia do momentu odsadzenia szceniąt. Z urodzonych w tych warunkach młodych lisów wybrano losowo 12 szceniąt – grupa doświadczalna (A), które w wieku ok. 3 miesięcy przeniesiono do fermy, gdzie przebywały do uboju, do ostatniej dekady listopada. Z grupy młodych lisów pochodzących od pozostałych samic stada podstawowego utrzymywanych w systemie pawilonowym wybrano losowo 20 zwierząt, które stanowiły grupę kontrolną (B).

Przeniesienia zwierząt doświadczalnych dokonano ze względów ekonomicznych (zachowania dobrej – wysokiej jakości okrywy włosowej do oceny licencyjnej).

Lisy z obu grup otrzymywały taką samą karmę, przygotowaną zgodnie z normami żywienia zwierząt futerkowych (1). Zwierzęta objęte były opieką weterynaryjną i zootechniczną. W trakcie doświadczenia prowadzono stały monitoring jakości powietrza z wykorzystaniem chromatografii gazowej (2). Dla określenia pozostałości gazowych zanieczyszczeń w tkankach od wszystkich zwierząt z grupy A i B pobrano wycinki: wątroby, nerek, tłuszczu okołonerkowego i płuc. Do analizy pozyskanych próbek wykorzystano chromatografię gazową kapilarną. Użyto chromatografu gazowego FISIONS 8160 z dwoma detektorami FID i dozownikiem split-splitless oraz automatycznego dozownika head-space Thermo Finnigan HS-2000. Zastosowano

dwie kolumny kapilarne w układzie równoległym firmy Restek BAC-1 i BAC-2 z programowaną temperaturą kolumn 40-150°C, gazem nośnym – helem i przepływem – 1,8 ml/min. Próbkę materiału biologicznego odważano po 0,2 g do fiolek head-space i dodawano 0,2 ml standardu wewnętrznego (1 g/l tert-butanolu). Podobnie postępowano z wzorcami. Wyniki badań przedstawiono w formie tabelarycznej.

Wyniki i omówienie

Stan środowiska hodowlanego doskonale charakteryzują oznaczenia próbek części nieożywionej środowiska, tj. wody, gleby oraz powietrza. Jednak pełny obraz jego stanu udostępnia dopiero analiza próbek pobranych z części biotycznej środowiska, tj. płynów ustrojowych i tkanek pobranych od zwierząt, które nieustannie narażone są na działanie szerokiego spektrum zanieczyszczeń występujących w obszarze ich przebywania. Zanieczyszczenia powietrza w omawianej fermie stanowiły już wielokrotnie przedmiot monitoringu (6-8). Prowadzona wówczas analiza chromatograficzna potwierdziła obecność szeregu gazowych zanieczyszczeń, zarówno w próbkach powietrza pobieranego w fermie, pomiędzy klatkami w tzw. strefie oddychania zwierząt, jak i w zamkniętym pomieszczeniu, gdzie przebywały lisy grupy doświadczalnej (8). W pomieszczeniu, w którym zmniejszono przepływ powietrza (w granicach norm higienicznych) uzyskiwano wyższe stężenia dla większości oznaczanych związków w porównaniu do fermy. Najliczniej i w najwyższych stężeniach występowały alkohole oraz węglowodory aromatyczne. Dokładny skład gazowych zanieczyszczeń oraz ich poziom zamieszczono w publikacjach z tego zakresu (7, 8). Wiele z oznaczanych w fermie związków ma szkodliwy lub potencjalnie szkodliwy wpływ na tkanki i narządy zwierząt wystawionych na długotrwałe ich działanie, prowadzący niejednokrotnie do nieodwracalnych, patologicznych zmian (7). Zidentyfikowane w powietrzu fermy lisów, a tym samym wdychane przez zwierzęta organiczne związki, oprócz negatywnego odczucia sensorycznego (odory) mogą oddziaływać negatywnie na układ immunologiczny. Związki te wprowadzone do płuc przenikają do krwi i tkanek, wywołują efekt toksykologiczny, stymulują sensory nerwowe i indukują neurochemiczne zmiany, które mogą usposabiać do wystąpienia infekcji (4, 5). Potencjalny wpływ poszczególnych składników, a także ich mieszanin powstaje już podczas absorpcji, dalej dystrybucji, biotransformacji, a także sekrecji ksenobiotyków. Pominięcie tzw. bariery wątrobowej w przypadku zanieczyszczeń wprowadzanych drogą oddechową wzmacnia ich niekorzystny efekt toksyczny. Aby oszacować ryzyko ekspozycji i zapobiec niekorzystnym efektom oddziaływania tych substancji prowadzi się monitoring biologiczny, który polega na oznaczaniu stężeń, obecności związków lub ich metabolitów w różnych biologicznych mediach, takich jak: krew, pęcherzyki płucne, powiet-

rze wydychane, mocz oraz tkanki. Otrzymane wyniki uwzględniają jedynie pierwotną postać zanieczyszczeń, które przedostały się do organizmu w wyniku ekspozycji środowiskowej, inhalacyjnej, bez analizowania produktów ich przemian w organizmie (tab. 1-2).

Rozprowadzanie zanieczyszczeń w organizmie i magazynowanie ich zależy w znacznej mierze od ich rozpuszczalności w wodzie lub tłuszczach. Udział w tkance wody i tłuszczów decyduje o rozmieszczeniu substancji w poszczególnych narządach w zależności od ich lipo- lub hydrofilności. Paulin i Krishan (9) metodami allometrycznymi obliczyli wartość współczynnika rozdziału PCs tkanka : powietrze dla 45 różnych związków, w tym: ketonów, alkoholi, estrów, eterów, alkanów, haloalkanów i węglowodorów aromatycznych dla tkanek (wątroby, mięśni i tłuszczu) szczura. Im wyższa wartość tego współczynnika, tym większa ilość substancji, która może gromadzić się w danej tkance. Słabo ukrwiona tkanka tłuszczowa, z nieznaczną zawartością wody wolniej absorbuje rozpuszczone po ustroju ksenobiotyki lub ich metabolity, ale dłużej związki te w niej są magazynowane. Również tkanka ta charakteryzuje się niską aktywnością metaboliczną w porównaniu do dobrze ukrwionych płuc, nerek czy wątroby – tkanki metabolizującej. Wybiórcze rozmieszczenie ksenobiotyków w narządach zależy również od ich pojemności wiązania związków chemicznych. Dużą zdolnością wiązania przez białka wewnątrztkankowe wykazują się wątroba i nerki, narządy newralgiczne w procesie eliminacji, detoksykacji i usuwania trucizn z organizmu.

W przeprowadzonych badaniach najczęściej pozostałości gazowych zanieczyszczeń powietrza występujących w fermie stwierdzono w tkance płucnej lisów. W najwyższych stężeniach i najliczniej zidentyfikowano alkohole, głównie metanol i etanol, a także benzen, trichloroetanol czy toksyczną akroleinę (tab. 1). Koncentracja tych związków była wyższa w tkance płucnej lisów grupy doświadczalnej, co korelowało z wyższymi stężeniami tych zanieczyszczeń w powietrzu, gdzie utrzymywano zwierzęta tej grupy, a tym samym wyższej dawki inhalacyjnej. W nerkach lisów grupy kontrolnej (tab. 2) stwierdzono jedynie śladowe ilości metanolu (0,01 mg/l), podczas gdy w nerkach zwierząt grupy doświadczalnej wykazano obecność większości zanieczyszczeń na relatywnie wysokich poziomach. Stężenia te były niejednokrotnie wyższe niż w tkance płucnej (tab. 1 i 2). Oznaczane alkohole oraz związki aromatyczne, szczególnie benzen, działają drażniąco na błony śluzowe (5). Udowodniono również występowanie interakcji między alkoholami a innymi ksenobiotykami. W połączeniu z aromatycznymi nitro- i aminozwiązkami prowadzą do methemoglobinemii czy pogłębiają toksyczne działanie trichloroetyleny toluenu i benzenu. Alkohole jako związki rozpuszczalne w wodzie, głównie rozmieszczają się w tkankach bogatych w wodę, płyny ustrojowe, a zatem w tkankach dobrze ukrwionych, tj.: płucach, ner-

Tab. 1. Pozostałości gazowych zanieczyszczeń w płucach i wątrobie (mg/l) ($\bar{x} \pm SD$)

Nazwa substancji	Płuca		Wątroba	
	Grupa A	Grupa B	Grupa A	Grupa B
Metanol	9,54 ± 7,33	5,10 ± 5,47	9,70 ± 6,31	5,58 ± 3,49
Etanol	2,19 ± 1,58	0,49 ± 0,53	10,12 ± 5,29	4,00 ± 3,12
n-propanol	0,15 ± 0,10	0,08 ± 0,07	0,16 ± 0,09	0,19 ± 0,11
3-metylobutanol	0,00	0,00	0,00	0,00
Pentanal	0,00	0,00	0,00	0,05 ± 0,03
Izobutanol	0,13 ± 0,08	0,07 ± 0,05	0,11 ± 0,05	0,06 ± 0,02
Izopropanol	0,13 ± 0,50	0,45 ± 0,30	5,95 ± 3,22	5,56 ± 5,29
Akroleina	0,31 ± 0,10	0,19 ± 0,11	0,13 ± 0,05	0,03 ± 0,02
Dodekan	0,00	0,00	0,00	0,00
Aceton	0,44 ± 0,21	0,41 ± 0,09	7,35 ± 4,61	5,30 ± 2,66
1-prop/me-ke-ton	0,00	0,00	0,00	0,00
2-metylopentan	0,00	0,00	0,00	0,00
Metyloetyloketon	0,00	0,00	0,00	0,00
Toluen	0,00	0,00	0,00	0,00
p-xylen	0,00	0,00	0,00	0,00
o/m-xylen	0,00	0,00	0,00	0,00
Benzen	0,03 ± 0,01	0,00	0,00	0,05 ± 0,01
Etylobenzen	0,00	0,00	0,00	0,00
Trichloroetylen	1,27 ± 0,82	0,69 ± 0,31	0,00	0,74 ± 0,62
Octan etylu	0,15 ± 0,07	0,16 ± 0,09	0,00	0,00

Tab. 2. Pozostałości gazowych zanieczyszczeń w nerkach i tłuszczu okołonerkowym (mg/l) ($\bar{x} \pm SD$)

Nazwa substancji	Nerki		Tłuszcz okołonerkowy	
	Grupa A	Grupa B	Grupa A	Grupa B
Metanol	10,13 ± 7,51	0,01 ± 6,32	2,23 ± 1,62	1,48 ± 1,03
Etanol	2,04 ± 1,33	0,00	0,85 ± 0,51	0,59 ± 0,29
n-propanol	0,15 ± 0,07	0,00	0,00	0,00
3-metylobutanol	0,00	0,00	0,00	0,00
Pentanal	0,02 ± 0,01	0,00	0,00	0,03 ± 0,01
Izobutanol	0,30 ± 0,05	0,00	0,00	0,03 ± 0,03
Izopropanol	1,01 ± 0,29	0,00	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Akroleina	0,34 ± 0,10	0,00	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,02
Dodekan	0,00	0,00	0,00	0,00
Aceton	2,15 ± 1,02	0,00	0,15 ± 0,10	0,19 ± 0,08
1-prop/me-ke-ton	0,00	0,00	0,00	0,00
2-metylopentan	0,00	0,00	0,00	0,00
Metyloetyloketon	0,00	0,00	0,00	0,00
Toluen	0,00	0,00	0,00	0,00
p-xylen	0,00	0,00	0,00	0,00
o/m-xylen	0,00	0,00	0,00	0,00
Benzen	0,01 ± 0,01	0,00	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,05
Etylobenzen	0,00	0,00	0,00	0,00
Trichloroetylen	0,76 ± 0,11	0,00	0,00	0,00
Octan etylu	0,58 ± 0,10	0,00	0,00	0,002 ± 0,002

kach i wątrobie, mają najwyższy współczynnik PCs wątroba : powietrze oszacowany dla szczurów (9). Stąd w próbkach wątroby lisów grupy doświadczalnej oznaczono wysokie stężenia metanolu, etanolu, a także izobutanolu (tab. 1). Publikowane prace toksokinetyczne i toksodynamiczne wykazują, że niska koncentracja metanolu w powietrzu nie stanowi ryzyka środowiskowego (7). Najniższy poziom wywołujący efekt (LOAEL) dla metanolu wynosi aż 2000 ppm, czyli 2660 mg/m³, zaś najwyższy poziom nie wywołujący efektu (NOAEL) to 1000 ppm. Są to stężenia, których w warunkach środowiskowych powyższe związki nigdy nie osiągają. Według Clary (3), dopiero zawartość metanolu we krwi ludzi na poziomie 10 mg/l może dawać niekorzystny efekt. Takie stężenie uzyskać można już po 8 h inhalacji, gdy w powietrzu koncentracja metanolu osiąga 200 ppm, czyli 266 mg/m³. Koncentracja metanolu w osoczu rośnie wraz ze wzrostem jego stężenia w powietrzu wdychanym. Również przy braku metanolu w powietrzu obserwowano w osoczu zwierząt doświadczalnych jego koncentrację na poziomie 1,6 mg/l.

Analiza próbek wątroby wykazała obok alkoholi również obecność akroleiny (grupa B – 0,03 mg/l) i acetonu (grupa B – 5,30 mg/l) (tab. 1). Stężenia również tych związków były wyższe u lisów z grupy doświadczalnej (A) i osiągały odpowiednio poziomy: 0,13 mg/l oraz 7,35 mg/l. Węglowodory aromatyczne, takie jak: benzen, ksyleny czy toluen rozprzodowane są po organizmie z preferencją do tkanki tłuszczowej. Wydalane są z moczem lub powietrzem wdychanym w postaci niezmięnionej. Analiza materiału doświadczalnego wykazała obecność benzenu w próbkach nerek i tłuszczu okołonerkowego grupy doświadczalnej (tab. 2). Pomimo wysokiego współczynnika rozdziału PCs tkanka tłuszczowa : powietrze dla wspomnianych węglowodorów nie stwierdzono ich obecności w tłuszczu okołonerkowym. Analiza materiału wykazała również wysokie wartości benzenu w płucach grupy A (0,03 mg/l), co wskazywałoby główną drogę jego wchłaniania oraz metabolizmu. Podobnie trichloroetylen – w 50-60% zatrzymywany w drogach oddechowych, o czym świadczyła jego wysoka koncentracja w próbkach płuc (1,27

mg/l) (tab. 1). Jest to związek również lipofilny i z łatwością pokonujący układy o strukturze lipidowo-białkowej. Nie potwierdzono jednak jego obecności w tłuszczu okołonerkowym (tab. 2). W analizowanych tkankach stwierdzono również obecność akroleiny. U ludzi substancja ta, obok działania silnie drażniącego, wydaje się odgrywać ważną rolę urykotoksyczną (10). Prowadzi do chromosomalnej aberracji i mutacji. Wykazuje wysoką reaktywność z proteinami (lizyną, histydyną, cysteiną). Wywiera efekt cyto- i genotoksyczny m.in. fibroblastów przewodu oddechowego, limfocytów tkanki dziąseł, limfocytów i fibroblastów skóry. Może być także produktem preoksydacji lipidów oraz mediatorem uszkodzeń oksydacyjnych (10, 11). Aż 95% publikowanych prac poświęconych ksenobiotykom ocenia pojedyncze związki chemiczne (12). Idealną sytuacją pracy toksykologicznej jest ocena toksykokinetyki oraz oddziaływania jednego, czystego związku. W rzeczywistości mamy jednak do czynienia z mieszaniną związków. Badania prowadzone nad mieszaninami ksenobiotyków wskazują na możliwość obniżania dopuszczalnego poziomu w materiale biologicznym. Przy kilku różnych związkach w powietrzu biotransformacja ich w organizmie może być różna, nietypowe mogą być także ich metabolity. Badania Viau (12) wykazały, że przy ekspozycji ksyleny i chloroformu metylowego nie znaleziono we krwi tego drugiego. Przy ekspozycji zaś na sam chloroform, identyfikowano go we krwi. Również stężenia metabolitów mogą ulegać obniżaniu. Autorzy podkreślają, że przy mieszaninach trudno rozpatrywać pewne związki jako biomarkery. Koncentracja biomarkerów przy zawodowej ekspozycji obniża się, gdyż najczęściej spotykamy się z mieszaniną różnych toksycznych substancji. Dlatego też dopuszczalny próg koncentracji w materiałach biologicznych powinien być obniżany. Wpływ zanieczyszczenia powietrza trudno oszacować, gdyż ten zależy nie tylko od stężenia związków w powietrzu, ale także od czynników zewnętrznych, mikroklimatu, żywienia, zdrowia i kondycji oraz właściwości osobniczych wystawionej na ekspozycję populacji. Podstawową informację stanowi jednak znajomość dróg wchłaniania, magazynowania, metabolizmu, dystrybucji i biotransformacji oraz sposób usuwania z organizmu tych zanieczyszczeń.

W przeprowadzonych badaniach poddano ocenie newralgiczne narządy, tj. tkanki, w których są wchłaniane zanieczyszczenia powietrza (płuca) lub magazynowane (tkanka tłuszczowa), które ulegają biotransformacji (wątroba), a także z których są wydalane (nerki). Ze względu na brak dopuszczalnych stężeń dla analizowanych tkanek, nie można ocenić ryzyka, jakie stanowią identyfikowane substancje. Odmienne wielkości zidentyfikowanych związków w poszczególnych tkankach trudno jest wytłumaczyć, gdyż nie dla wszystkich substancji znane są miejsca lub narządy ich kumulacji, a warunki utrzymania połączone ze stresem, mogą je znacznie modyfikować. Pomimo krót-

kiego czasu ekspozycji doświadczalnej grupy lisów przeprowadzona ocena może być pomocna przy typowaniu krytycznych narządów u zwierząt gospodarskich, tzn. takich, w których związki wdychane z powietrza środowiska hodowlanego gromadzą się, a w wyniku tej kumulacji mogą je uszkadzać.

Piśmiennictwo

1. Barabasz B., Bielański P., Niedźwiadek S., Sławoń J.: Normy żywienia mięsożernych i roślinożernych zwierząt futerkowych. IFiZZ PAN, Jabłonna 1994.
2. Bartulewicz J., Gawłowski J., Bartulewicz E.: Zastosowanie chromatografii gazowej i cieczowej do analizy zanieczyszczeń środowiska. Państwowa Inspekcja Środowiska. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa 1997.
3. Clary J. J.: Methanol, is it a developmental risk to humans? Regulat. Toxicol. Pharmacol. 2003, 37, 83-91.
4. Medinsky M. A., Dorman D. C.: Recent developments in methanol toxicity. Toxicology Lett. 1995, 82/83, 707-711.
5. Nimmermark S.: Odour influence on well-being and health with specific focus on animal production emissions. Ann. Agric. Environ. Med. 2004, 11, 163-173.
6. Nowakowicz-Dębek B., Bis-Wencel H., Molenda-Pyzik M., Likos B., Wnuk W.: Emisja niektórych związków organicznych przez fermę lisów z uwzględnieniem uwarunkowań środowiskowych. Zesz. Nauk. PTZ 2002, 6, 169-179.
7. Nowakowicz-Dębek B., Łopuszyński W.: Wpływ zanieczyszczeń powietrza na zmiany w organizmie lisów polarnych. Medycyna Wet. 2004, 60, 845-848.
8. Nowakowicz-Dębek B., Saba L., Bis-Wencel H., Wnuk W.: Uwalnianie lotnych substancji gazowych w zależności od warunków utrzymania lisów polarnych (*Alopex lagopus*). Annales UMCS sec. EE 2004, 47, 351-357.
9. Paulin P., Krishaman K.: A tissue composition - based algorithm for predicting tissue : air partition coefficients of organic chemicals. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1996, 136, 126-130.
10. Sakura N., Nishimura S., Fujita N., Namera A., Yashiki M., Kojami T.: Determination of acrolein in human urine by headspace gas chromatography and mass spectrometry. J. Chromatography B. 1998, 719, 209-212.
11. Uchida K.: Current status of acrolein as lipid peroxidation product. Trends Cardiovasc. Med. 1999, 9, 109-113.
12. Viau C.: Biological monitoring of exposure to mixtures. Toxicology Lett. 2002, 134, 9-16.

Adres autora: dr inż. Bożena Nowakowicz-Dębek, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin; e-mail: bozena.nowakowicz@ar.lublin.pl