

LUBA BILCZUK

WPŁYW PRZEDŁUŻONEGO PODAWANIA AZOTYNU SODU NA ORGANIZM SZCZURA

Z Zakładu Żywienia Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie
Kierownik: dr L. Szponar

Zbadano wpływ azotynu sodu na szczury, w dawkach 20 mg/kg ciężaru ciała, 80 mg/kg ciężaru ciała i 250 mg/kg ciężaru ciała na dobę przez okres 2 miesięcy. U wszystkich zwierząt stwierdzono obniżenie ciężaru ciała, spadek poziomu hemoglobiny, wzrost poziomu metahemoglobiny oraz obniżenie poziomu witaminy A w wątrobie. Nasilenie zmian było proporcjonalne do ilości azotynu sodu w diecie.

WSTĘP

Intensywny wzrost stosowania w rolnictwie nawozów mineralnych powoduje — poza podniesieniem produkcji rolnej — zanieczyszczenia środowiska przyrodniczego głównie azotanami i azotynami. Nagromadzenie w glebie dużych ilości azotanów i azotynów jest między innymi, przyczyną nadmiernej kumulacji tych związków w roślinach [21].

Wysokie poziomy azotynów i azotanów stwierdzone są również w mięsie ze względu na stosowanie do jego konserwacji azotanów. Woda również zanieczyszczona jest wysokimi stężeniami azotanów, które pochodzą z gleby, gnijących roślin, nawozów mineralnych i przemian azotowych zachodzących pod wpływem działania mikroorganizmów [20].

Spożywane z dietą i wodą wysokie dawki azotanów działają toksycznie na organizm człowieka a przede wszystkim dzieci i osób w wieku podeszłym [7, 19]. Azotany są niebezpieczne dla zdrowia szczególnie dlatego, że następuje ich redukcja do azotynów wykazujących 5—7-krotnie wyższą toksyczność.

Wydawało się więc celowe dokonanie ustaleń jakie zmiany wywołuje w organizmie szczura, przedłużone podawanie azotynów w dawkach zbliżonych do spożywanych przez ludzi.

MATERIAŁ I METODA

Doświadczenie prowadzono na szczurach samcach szczepu Wistar, rozpoczynając doświadczenia w 30 dniu ich życia. Zwierzęta żywione były dietą izokaloryczną o zawartości białka 20 Kcal%. Dieta ta była podstawową dla wszystkich grup eksperymentalnych. Do picia szczury otrzymywały wodę destylowaną. Wodę i dietę podawano *ad libitum*.

Działanie azotynów na organizm badano w dwu kolejnych eksperymentach. W pierwszym doświadczeniu wydzielono 4 grupy szczurów po 14 zwierząt w każdej. Pierwszym trzem grupom — przez okres trwania doświadczenia — podawano

w diecie azotyn sodu w następujących dawkach: w grupie pierwszej 20 mg NaNO_2/kg ciężaru ciała/dobę, w drugiej 80 mg NaNO_2/kg ciężaru ciała/dobę i trzeciej 250 mg NaNO_2/kg ciężaru ciała/dobę.

Wysokości dawek ustalono w oparciu o toksyczność ostrą azotynu sodu dla szczurów. Stwierdzono, że dawka 20 mg NaNO_2/kg ciężaru ciała/dobę podawana sondą jest maksymalną, jaka nie daje fizykalnych objawów zatrucia, natomiast dawka 80 mg NaNO_2/kg ciężaru ciała/dobę jest najwyższą dawką, która nie powoduje zgonu zwierząt. Zastosowana w pierwszym doświadczeniu dawka 250 mg NaNO_2/kg ciężaru ciała/dobę podawana w diecie i przekraczająca 2,5 raza dawkę śmiertelną nie powoduje zgonu zwierząt dlatego, że zawarty w diecie azotyn wchłaniał się w przewodzie pokarmowym stopniowo wraz ze spożytą dietą. Wysokość tej dawki w przybliżeniu odpowiada ilości azotanów i azotynów spożywanych przez ludzi. Wielkość dawki obliczono z przeciętnej racji żywnościowej uwzględniając stwierdzone przez różnych autorów zawartości azotanów i azotynów w produktach spożywczych.

Grupa czwarta otrzymywała dietę podstawową i stanowiła kontrolę.

W czasie trwania doświadczenia w odstępach 14-dniowych kontrolowano przyrosty ciężaru ciała, określano spożycie diety oraz oznaczano poziom hemoglobiny metodą cyjanohemiglobulinową wg *Drabkina* [3], poziom methemoglobiny metodą *Evelyna* i *Malloya* [10] i poziom azotynów w surowicy krwi metodą *Schneidera* [17].

W 86 dniu życia szczury uśpiono i u każdego określono ciężary narządów wewnętrznych, oznaczono poziom witaminy A w wątrobie metodą *Amesa* [1], oraz poziom witaminy E. Witaminę E oznaczano kolorymetrycznie po rozdzieleniu na chromatografii cienkowarstwowej w oparciu o reakcję *Emmerie-Engla* [8].

W eksperymencie drugim wydzielono trzy grupy zwierząt po 10 szczurów w każdej. Wszystkie zwierzęta przez czas trwania doświadczenia żywione były dietą podstawową, a do picia podawano wodę destylowaną.

Szczurom z dwu grup podawano codziennie sondą azotyn sodu w następujących jednorazowych dawkach: grupa pierwsza otrzymywała 20 mg NaNO_2/kg ciężaru ciała/dobę, grupa druga 80 mg NaNO_2/kg ciężaru ciała/dobę. Grupa trzecia stanowiła kontrolę i otrzymywała codziennie sondą zamiast azotynu sodu wodę destylowaną.

U wszystkich zwierząt co 7 dni oznaczano poziom hemoglobiny i methemoglobiny, a co 14 dni kontrolowano spożycie diety i określano przyrosty ciężaru ciała. Materiał do oznaczeń chemicznych pobierano zawsze w godzinach porannych — pomiędzy godz. 8—9.

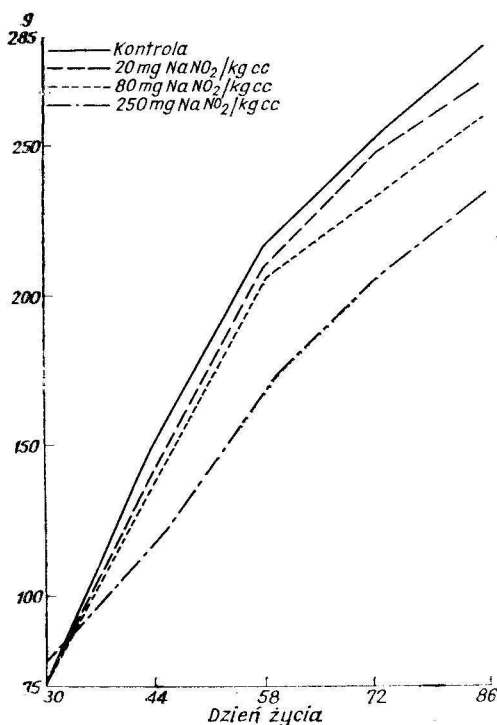
WYNIKI

W przeprowadzonych badaniach wpływu przedłużonego podawania azotynu sodu na organizm zwierzęcia, stwierdzono że spożycie diety wyrażone w g/szczura/dobę jest niższe u szczurów otrzymujących azotyn sodu w porównaniu ze spożyciem zwierząt grupy kontrolnej. Po przeliczeniu jednak ilości spożytej diety na 100 g ciężaru ciała nie stwierdzono istotnych zmian w ilości spożytej diety.

Ciężar ciała szczurów otrzymujących azotyn sodu był niższy od ciężaru ciała zwierząt grupy kontrolnej.

Różnice w ciężarze ciała pogłębiały się wraz z przedłużeniem czasu podawania azotynu sodu. W 86 dniu życia ciężar ciała szczurów otrzymujących 20; 80; 250 mg NaNO_2/kg ciężaru ciała/dobę był niższy w porównaniu z ciężarem ciała zwierząt grupy kontrolnej odpowiednio o 4,1%; 7,5% i 17,2%.

Stwierdzono również zmiany ciężarów narządów wewnętrznych w stosunku do całkowitego ciężaru ciała. Istotne zmiany ($p=0,05$) zaobserwowano w ciężarach śledziony i nadnerczy u szczurów na najwyższej dawce azotynu sodu.



Ryc. 1. Średni ciężar ciała (cc) badanych szczurów.

Ciężar śledziony podwyższał się wraz ze wzrostem dawki azotynu sodu w diecie, zaś ciężar nadnerczy ulegał obniżeniu.

W prowadzonych badaniach stwierdzono, że wraz ze wzrostem azotynu sodu w diecie następowało obniżenie poziomu witaminy A w wątrobie.

W okresie 56 dni podawania azotynu sodu poziom witaminy A u szczurów otrzymujących dawki 20 mg NaNO₂/kg cc/dobę, 80 mg NaNO₂/kg cc/dobę i 250 mg NaNO₂/kg cc/dobę ulegał obniżeniu w porównaniu z poziomem witaminy A u zwierząt grupy kontrolnej odpowiednio o 16,5%, 43,7%, i 66,4%.

Natomiast oznaczony w wątrobie poziom witaminy E u szczurów spożywających azotyn sodu w diecie nie różnił się od poziomu tej witaminy u zwierząt grupy kontrolnej.

Kontrolując w czasie trwania doświadczenia poziom hemoglobiny u szczurów otrzymujących azotyn sodu, stwierdzono jej spadek w porównaniu z poziomem hemoglobiny zwierząt grupy kontrolnej. Obniżenie poziomu hemoglobiny było tym wyższe im wyższa była dawka azotynu.

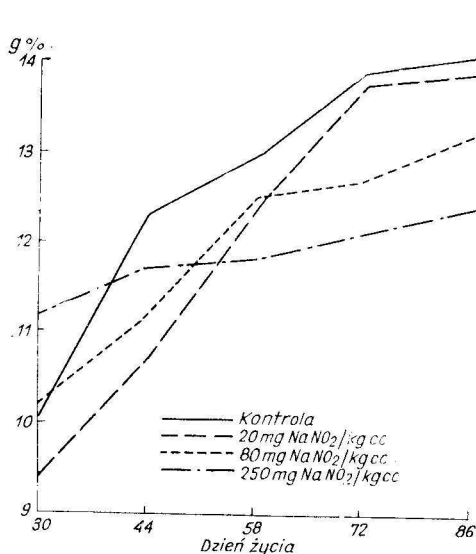
T a b e l a I
Średnie ciężary niektórych narządów wewnętrznych

	Wątroba		Śledziona		Serce		Płuca		Nerki		Nadnerza	
	mg/gcc	σ	mg/gcc	σ	mg/gcc	σ	mg/gcc	σ	mg/gcc	σ	mg/gcc	σ
Kontrola	35,33	2,53	1,94	0,15	3,29	0,22	4,83	0,41	7,39	0,48	0,176	0,02
20 mg NaNO ₂ /kgcc	38,14	2,41	2,02	0,31	3,26	0,21	5,30	0,32	7,29	0,85	0,175	0,02
80 mg NaNO ₂ /kgcc	37,81	3,05	2,13	0,26	3,28	0,21	5,27	0,22	7,41	0,95	0,165	0,02
250 mg NaNO ₂ /kgcc	37,43	4,82	2,55	0,31	3,15	0,29	4,95	0,87	7,03	1,20	0,153	0,02

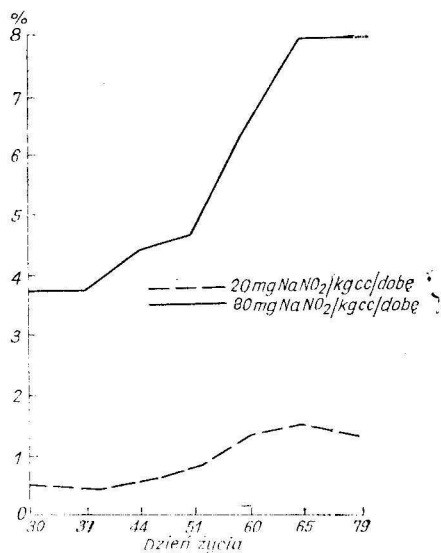
T a b e l a II
Średni poziom witaminy A i E w wątrobie

	Kontrola			20 mg NaNO ₂ /kgcc			80 mg NaNO ₂ /kgcc			250 mg NaNO ₂ /kgcc		
	n	x	σ	n	x	σ	n	x	σ	n	x	σ
Witamina A w jn/l g	14	95,72	4,8	14	79,58	10,07	14	53,88	4,17	14	32,13	3,23
Witamina E w μg/l g	14	26,42	2,40	14	25,16	2,80	14	26,86	3,40	14	27,40	4,70

Głównym objawem toksycznego działania azotynów na organizm jest powstawanie methemoglobiny. Tymczasem u szczurów otrzymujących azotyn sodu w diecie nie wykrywano azotynów ani methemoglobiny we krwi. Skłoniło to do przeprowadzenia doświadczenia II, w którym podawano szczurom codziennie sondą azotyn sodu.



Ryc. 2. Średni poziom hemoglobiny u badanych szczurów.



Ryc. 3. Średni poziom hemoglobiny u szczurów otrzymujących różne dawki azotynu sodu.

Poziom methemoglobiny oznaczono po 1/2, 1, 2 i 3 godz. od chwili podania azotynu sodu. Stwierdzono, że methemoglobina osiąga najwyższą wartość w godz. po podaniu azotynu sodu, co zgodne jest z danymi piśmiennictwa [13].

Równolegle oznaczono w surowicy poziom azotynu i stwierdzono, że osiąga on najwyższą wartość w pół godziny od chwili podania sondą a następnie ulega obniżeniu. U szczurów otrzymujących 20 mg NaNO₂/kg cc/dobę poziom NO₂ w pół godz. po podaniu wynosił 0,36 µg/cm³, a u zwierząt otrzymujących 80 mg NaNO₂/kg cc/dobę 11,0 µg/cm³.

Oznaczona w godzinę po podaniu azotynu sodu methemoglobina wykazywała ścisły związek z wysokością podanej dawki.

U wszystkich szczurów otrzymujących azotyn sodu obserwowano stały wzrost poziomu methemoglobiny do 65 dnia ich życia. W dalszym okresie methemoglobina utrzymywała się na tym samym poziomie.

U szczurów grupy kontrolnej nie stwierdzano methemoglobiny we krwi. Spożycie diety oraz obniżenie ciężaru ciała przebiegało analogicznie jak u szczurów w doświadczeniu pierwszym.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W oparciu o przeprowadzone doświadczenia u zwierząt otrzymujących azotyn sodu stwierdzono obniżenie ciężaru ciała. Obniżenie to jest prawdopodobnie spowodowane bądź ograniczeniem przyswajania białka

[9], bądź też zaburzeniami metabolicznymi wywołanymi obniżeniem poziomu witaminy A w wątrobie a przede wszystkim wzajemnym współoddziaływaniem witaminy A i białka. *Brown i Morgan* [2] w badaniach przeprowadzonych na szczurach stwierdzili, że zwierzęta z niedoborem witaminy A — w porównaniu z kontrolą — mniej przybysują na wadze i więcej wydalają azotu w moczu. Ponadto zaobserwowali, że wraz ze wzrostem niedoboru witaminy A ilość wydalanego z moczem i kałem azotu wzrasta.

Niedobór witaminy A wpływa na zmianę syntezy białka poprzez ograniczenie wbudowywania aminokwasów w białka. Zmiany te dotyczą wczesnego niedoboru witaminy A i prowadzą do zahamowania wzrostu zwierząt [4, 12, 15].

W badaniach własnych pod wpływem podawania azotynu sodu stwierdzono zmiany ciężaru śledziony i nadnerczy. Obniżenie ciężaru nadnerczy jest prawdopodobnie również spowodowane spadkiem poziomu witaminy A. *Grangaud* cyt. [14] w swych badaniach stwierdził, że niedobór witaminy A powoduje u szczurów atrofię nadnerczy. Również *Natanson* [14] wykazał, że dla normalnej funkcji kory nadnerczy niezbędny jest odpowiedni poziom witaminy A, a szczególnie jej formy alkoholowej.

Wzrost ciężaru śledziony jest prawdopodobnie wynikiem nadmiernego rozpadu w ustroju krwinek czerwonych spowodowanego działaniem azotynu sodu [5].

Obniżenie poziomu witaminy A u szczurów spożywających azotyn sodu zachodzi, jak udowodnił *Philips* [16], na skutek oksydacyjnego działania azotynów na witaminę A w przewodzie pokarmowym jeszcze przed jej absorpcją z diety.

W licznych badaniach współzależności w organizmie witaminy A i E stwierdzono, że witamina E działa osłaniająco na witaminę A, zapobiegając jej utlenianiu.

Biorąc pod uwagę znaczny spadek poziomu witaminy A u szczurów spożywających azotyn sodu oraz ogólne antyoksydacyjne działanie witaminy E [6], interesujące było badanie zmian poziomu witaminy E. W badaniach własnych nie stwierdzono różnic poziomu witaminy E u szczurów spożywających azotyn sodu. Obniżenie więc poziomu witaminy A w wątrobie nie było związane ze zmianą poziomu witaminy E.

Niższy poziom hemoglobiny u szczurów otrzymujących azotyn sodu może wynikać według *Erhmana* [5] z obniżenia bądź zahamowania przez jony azotynowe procesów redukcyjnych NAD i NADP w erytrocytach, zaburzenia w nich oddychania komórkowego, lizy czerwonych ciałek krwi i rozpadu w wątrobie hemoglobiny do bilirubiny.

U szczurów spożywających azotyn sodu w diecie nie stwierdzono methemoglobiny we krwi. Spowodowane było to tym, że szczury są zwierzętami żerującymi nocą, a badania dynamiki rozpadu methemoglobiny wykazały, że jej 50% jest redukowane jak udowodnił *Sunderman* [18], w ciągu 90 min. Dlatego też we krwi pobranej do oznaczeń w godzinach rannych nie stwierdzano już methemoglobiny. Systematyczny wzrost poziomu methemoglobiny do 65 dnia życia stwierdzany u szczurów w godzinę po podaniu azotynu sodu sondą może być wynikiem, jak można sądzić na podstawie badań *Lee i wsp.* [11] zmniejszonej aktywności NADH₂ — reduktazy methemoglobiny. Po 65 dniu życia reduktaza methemoglobiny utrzymuje się prawdopodobnie na stałym poziomie.

W surowicy szczurów otrzymujących w diecie azotyn sodu, jak również u zwierząt grupy kontrolnej nie wykrywano azotynów. Spowodo-

wane to było tym — podobnie jak w przypadku methemoglobiny — że czas jaki upłynął od chwili spożycia azotynów przez szczury do momentu ich oznaczania w surowicy był wystarczający, by nastąpiła redukcja azotynów i ich wydalanie z organizmu.

Na podstawie uzyskanych wyników należy sądzić, że określenie stopnia zagrożenia azotynami i azotanami w oparciu o wysokość poziomu methemoglobiny we krwi jest niepełne, ponieważ oznaczana ilość methemoglobiny zależna jest od czasu jaki upłynął od chwili spożycia azotynów.

WNIOSKI

1. Przedłużone podawanie podwyższonych dawek azotynu sodu w diecie powoduje:

- zahamowanie przyrostu ciała;
- podwyższenie ciężaru śledziony oraz obniżenie ciężaru nadnerczy;
- obniżenie poziomu witaminy A w wątrobie przy niezmiennym poziomie witaminy E;
- spadek poziomu hemoglobiny;
- wzrost ilości methemoglobiny.

2. Wzrastające dawki azotynu sodu w diecie powodują nasilenie się niekorzystnych zmian w organizmie szczura.

Л. Бильчук

ВЛИЯНИЕ НИТРИТА НАТРИЯ НА ОРГАНИЗМ КРЫСЫ

На крысах самцах рода Вистар проведены исследования, целью которых было определение изменений в организме животных после экспериментальной длительной подачи нитрита натрия в дозах, приближённых к количествам потребляемым людьми. Применили три следующих дозы нитрита натрия: 20 мг NaNO_2 /кг веса тела в сутки, 80 мг NaNO_2 и 250 мг. Во время опыта, каждые 14 дней контролировали прирост веса тела, потребления корма, определяли уровень гемоглобина, метгемоглобина и уровень нитритов в сыворотке крови.

На 86 день жизни животных усыпляли и у каждой крысы определяли вес внутренних органов, уровень витамина А и витамина Е в печени.

Обнаружено, что длительное потребление повышенных доз нитрита натрия вызывает: торможение прироста веса тела, увеличение веса селезёнки, понижение веса надпочечников, понижение уровня витамина А в печени при прежнем уровне витамина Е, уменьшение содержания гемоглобина и увеличение содержания метгемоглобина.

Наивысший уровень метгемоглобина определили через 1 час после подачи зондом нитрита натрия, в то время как наивысший уровень нитритов — через $\frac{1}{2}$ часа после их подачи. Увеличение доз нитрита натрия вызывают углубление неблагоприятных изменений в организме крысы.

L. Bilczuk

THE EFFECT OF SODIUM NITRITE ON THE ORGANISM OF RAT

In order to determine changes evoked in the organism of experimental animals by long-term administration of sodium nitrite in doses approaching those ingested by humans experiments were carried out on male Wistar rats. Three doses of sodium nitrite were used: 20 mg/kg/24 hrs, 80 mg/kg/24 hrs, and 250 mg/kg/24 hrs. During the experiment weight gain was checked at intervals of 14 days, diet intake

was measured and the levels of haemoglobin, methaemoglobin and sodium nitrites were determined.

The animals were killed at the age of 86 days and the weight of internal organs as well as the liver levels of vitamin A and vitamin E were determined.

In these investigations it was found that long-term administration of high doses of sodium nitrites caused: inhibition of weight gain, increased the weight of the spleen and decreased that of adrenals, reduced the content of vitamin A in the liver without changing that of vitamin E, decreased the haemoglobin level and increased that of methaemoglobin.

The highest level of methaemoglobin was observed one hour after administration of sodium nitrite into the stomach, while the level of nitrites was highest 30 min. after their administration. Increasing doses of sodium nitrite raised the intensity of unfavourable changes in rat organism.

PIŚMIENNICTWO

1. Ames St., Risley H., Harris P.: Simplified procedure from extraction and determination of vitamin A in liver. *Analit. Chem.* 1954, 26, 1378. — 2. Brown E. F., Morgan A. F.: Nitrogen metabolism of the normal and the vitamin A deficient rat as affected by thyroid administration. *J. Nutr.* 1948, 35, 439. — 3. cyt. wg Brus J., Powelski S.: *Pol. Tyg. Lek.*, 1965, 5, 192. — 4. De Luca L., Little E. P., Wolf G.: Vitamin A and protein synthesis by rat intestinal mucosa. *J. Biol. Chem.* 1969, 244, 701. — 5. Ehrman R. A., Treshow M., Lytle I. M.: The hematology of mice exposed to nitrogen dioxide. *Am. Ind. Hyg. Ass. J.* 1972, 9, 751. — 6. Green J., Bunyan J.: Vitamin E and the biological antioxidant theory. *Nutr. Abstr. Rews* 1969, 39, 321. — 7. Shuval H. I., Gruener P.: Epidemiological and toxicological aspects of nitrates and nitrites in the environment. *Am. J. Public. Health* 1972, 26, 1045. — 8. Gronowska-Senger A., Zajac H., Bartnik J.: Wpływ alfa tokoferolu na wykorzystanie beta karotenu przez organizm szczura. *Roczn. PZH* 1972, 23, 217. — 9. Jastrzębska J.: Dane nieopublikowane. — 10. Krawczyński J., Osiński T.: Laboratoryjne metody diagnostyczne PZWL, Warszawa 1967.
11. Lee W. M., Bragg F. E. II, Jaffe E. R.: Reduction of methemoglobin in human adult and cord blood erythrocytes incubated with glucose or inosine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967, 124, 214. — 12. Leutskij K. M.: Dosлідження біологічної дії вітаміну А. *Ukr. Biochim. Журнал* 1972, 44, 771. — 13. Mortensen R. A.: The effect of diet on methemoglobin levels of nitrite-injected rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 1953, 46, 241. — 14. Natanson A. O.: Sistema gipofiz-kora nadpoczecznicow i witamin A. *Probl. Endokrynol.* 1970, 16, 110. — 15. Natanson A. O.: Witamin A i obmien białek. *Wopr. Pit.* 1971, 30, 3. — 16. Philips W. E. J.: Effect of dietary nitrite on the liver storage of vitamin A in the rat. *Can. J. Biochem.*, 1966, 44, 1. — 17. Schneider N. R., Yeary R. A.: Measurement of nitrite and nitrate. *Am. J. Vet. Res.*, 1973, 34, 133. — 18. Sunderman F. W., Sunderman F. W.: Hemoglobin. Its precursors and metabolites. Lippincott. Philadelphia 1964. — 19. Szponar L., Bilczuk L.: Poziom methemoglobiny u ludności wsi położonej w rejonie oddziaływania zanieczyszczeń emitowanych przez Zakłady Azotowe. *Pol. Tyg. Lek.* 1973, 23, 9. — 20. Wolff J. A., Wassermann A. E.: Nitrates, nitrites, and nitrosamines. *Science* 1972, 177, 15.

21. Zalewski W.: Zagadnienia występowania różnych form azotu w warzywach w związku z nawożeniem azotowym. Cz. V. Warzywa o dużej zawartości N_{203} , sałata i rzodkiewka. *Bromat. i Chem. Toksyk.* 1972, 5, 17.

Dn. 14.VII.1975 r.

20-950 Lublin, ul. Szkolna 16.