

EWA SIKORSKA

## BADANIA NAD TOKSYCZNOŚCIĄ AMIN BARWNIKOWYCH

### II. WPŁYW AMIN NA GLUTATION *IN VIVO*

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH

Przedmiotem tej pracy, podobnie jak części I (1), jest zagadnienie hemolizującego działania amin barwnikowych: p-aminofenolu (pAF), p-fenylenodwuaminy (pFDA) i p-toluenodwuaminy (pTDA). Aminy te powodują we krwi zwierząt doświadczalnych objawy anemii hemolitycznej (2 — 5). Jak już wspomniano w I części tej pracy, niektóre związki chemiczne mogą powodować hemolizę poprzez obniżenie poziomu glutationu (GSH) w krwinkach czerwonych (6, 7). Wyniki otrzymane w I części pracy wykazały, że wszystkie aminy obniżają poziom GSH we krwi króliczej *in vitro*. Rezultaty te wymagały potwierdzenia w badaniach *in vivo* i określenia, czy spadek ilości GSH może być przyczyną zmian hemolitycznych we krwi. Ponieważ wiadomo, że aminy mogą także powodować patologiczne zmiany wątroby (2, 3), wykonano dodatkowo oznaczenia poziomu GSH w wątrobach chcąc stwierdzić, czy działanie amin na poziom GSH nie rozciąga się poza krew.

Badania wykonano na trzech rodzajach zwierząt: na szczurach, królikach i kotach.

Na szczurach przebadano porównawczo zakres hemolizującego działania pAF, pFDA i pTDA, oznaczając następujące parametry: zmniejszenie ilości czerwonych krwinek i hemoglobiny oraz zwiększenie ilości retykulocytów.

Doświadczenie z królikami miało trzy aspekty: potwierdzenie rozmiaru zmian wywoływanych przez aminy we krwi szczurów, porównanie działania amin na poziom GSH *in vivo* z wykonanymi poprzednio badaniami na krwi króliczej *in vitro* oraz zaobserwowanie, czy zmniejszenie poziomu GSH we krwi jest pierwotną przyczyną rozpadu krwinek.

Badania na kotach wykonano w celu potwierdzenia odmiennego działania pTDA i upewnienia się, że nie można jej uważać za mniej szkodliwą od pFDA pod względem właściwości hemolitycznych.

### CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

#### Używane metody.

Hemoglobinę oznaczano kolorymetrycznie, używając hemoglobinometru Sahliego, w warunkach zalecanych przez Tempkę (8).

Ilość czerwonych krwinek obliczano posługując się kamerą Thoma-Zeissa. Do rozcieńczenia krwi w mieszalnikach używano płynu Hayema.

Ilość retykulocytów, bądź ciałek Heinza obliczano z rozmazów krwi barwionej przyrządowo siarczanem błękitu Nilu (9). Liczono 1 000 kolejnych komórek.

GSH oznaczano metodą glikosalazową w warunkach opisanych w I części tej pracy (1). Przesącze do oznaczeń przyrządzano następująco:

a) do oznaczania GSH we krwi

0,5 ml krwi odbiadczo 2 ml 3<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-owego kwasu sulfosalicylowego. Po dodaniu kwasu mieszano 5', pozostawiano na 30', a potem sączono przez bibułę i pobierano do oznaczenia po 0,5 ml;

b) do oznaczenia GSH w wątrobie

Wyciągi z tkanki wątrobowej przyrządzano wg metody Patersona i Lazarowa (10). Ważono 1 g wątroby i homogenizowano z 1 ml 4<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-owego kwasu sulfosalicylowego w szklanym homogenizatorze przez 10'. Potem tę mieszaninę rozcieńczano 8 ml 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-owego kwasu sulfosalicylowego i homogenizowano aż do zupełnego roztarcia tkanki; mieszaninę przelewano do małej zlewki i pozostawiano na 30', wtedy sączono i do oznaczeń pobierano po 0,25 ml przesącza.

#### BADANIA NA SZCZURACH

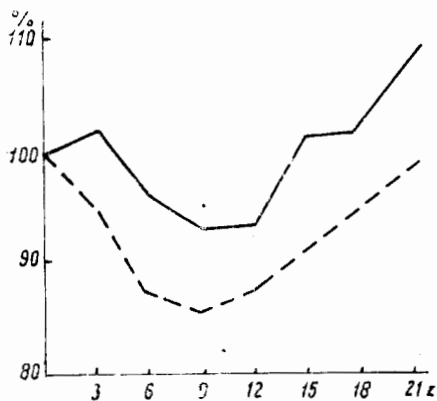
Do badań użyto 12 szczurów białych samców wagi około 200 g. Doświadczenie wykonano w trzech seriach, używając w każdej 3 zwierząt jako doświadczalnych i 1 jako kontrolnego. Szczury doświadczalne otrzymywały przez 10 dni zastrzyki chlorowodoroków badanych amin w ilości po 0,05 g/kg wagi ciała dziennie. Roztwory do zastrzyków sporządzano bezpośrednio przed użyciem w następujący sposób: odpowiednią ilość chlorowodoroku rozpuszczano w 0,25 ml 0,9<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-owego NaCl i zobojętniano roztwór 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-owym NaOH do pH 6. Szczury kontrolne otrzymywały w tym samym czasie po 0,25 ml 0,9<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-owego NaCl. Zastrzyki robiono do żyły ogonowej. Przed podaniem amin oznaczano u zwierząt dwukrotnie w odstępach 3-dniowych poziom GSH i Hb, ilość krwinek czerwonych i retykulocytów. Średnia z oznaczeń stanowiła wartość wyjściową w stosunku do niej przeliczano wartości otrzymane w czasie doświadczenia. Wyniki wyrażano w procentach, przyjmując wartość wyjściową za 100<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Czas doświadczenia każdej serii wynosi 21 dni. Krew do badań pobierano co trzeci dzień od trzeciego do dwudziestego pierwszego dnia przyjmując dzień podania pierwszego zastrzyku za zerowy. Krew pobierano przez ucięcie ogona do naczynka zawierającego mieszaninę szczawianów amonu i potasu. We krwi oznaczano ilość hemoglobiny, krwinek czerwonych, retykulocytów i krwinek z ziarnistością barwiącą się przeżyciowo. Między retykulocytami, a tymi ostatnimi nie robiono rozróżnienia ze względu na trudności identyfikacji (11) i ogólnie przyjmowano za retykulocyty, które były w większości.

Można bowiem zupełnie pewnie stwierdzić, że dana krwinka jest retykulocytom, ale określenie nie budzące wątpliwości, że jest to krwinka z ziarnistością barwiącą się przeżyciowo, czyli ciałkiem Heinza (cH), sprawia duże kłopoty. Identyfikacja przy użyciu mikroskopu elektronowego daje pewniejsze wyniki, ale ta metoda nie nadaje się do ilościowych oznaczeń.

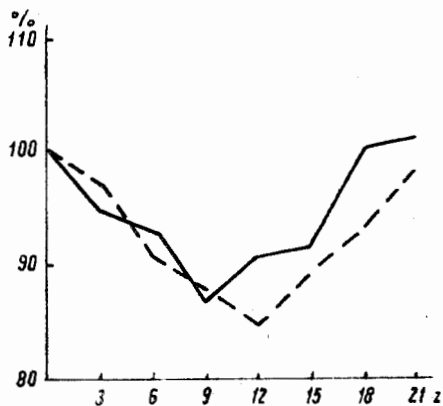
#### WYNIKI

Przy wszystkich badanych aminach stwierdzono zmniejszenie ilości Hb i krwinek czerwonych, a wzrost ilości retykulocytów. Zmiany te przebiegają równolegle i są większe niż w grupie zwierząt kontrolnych (ryc. 1, 2,

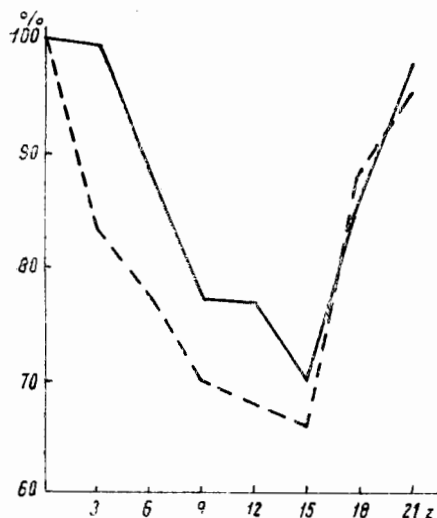
3, 4). Najsilniejsze działanie wykazała pTDA. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika że po zaprzestaniu podawania amin po 8 — 10 dniach zmiany we krwi zanikają i następuje powrót do wartości przed doświadczeniem.



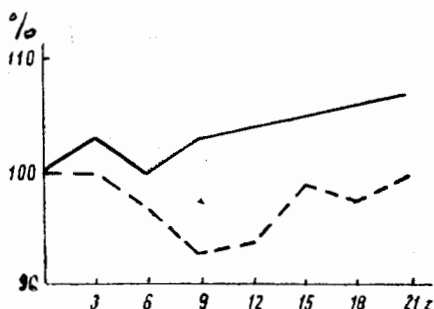
Ryc. 1.



Ryc. 2.



Ryc. 3.



Ryc. 4.

Ryc. 1. Zawartość procentowa Hb i E we krwi szczurów po pAF — Hb, --- E (krwinki czerwone), z — dzień po pierwszym zastrzyku

Ryc. 2. Zawartość procentowa Hb i E we krwi szczurów po pFDA — Hb, --- E

Ryc. 3. Zawartość procentowa E i Hb we krwi szczurów po pTDA — Hb, --- E

Ryc. 4. Zawartość procentowa Hb i E we krwi szczurów po 0,9% NaCl — Hb, --- E

### BADANIA NA KRÓLIKACH

Doświadczenie wykonano na 27 królikach, szarych samcach wagi 2 — 2,5 kg. Badania przeprowadzono w trzech kolejnych seriach używając w każdej serii trzech królików jako kontrolnych i 6 jako doświadczalnych. Króliki doświadczalne otrzymały 6 zastrzyków chlorowodorków badanych amin w ciągu 6 kolejnych dni. Roztwory do iniekcji przyrządzano iden-

tycznie jak w doświadczeniu na szczurach. Króliki kontrolne otrzymały taką samą ilość zastrzyków roztworu fizjologicznego soli. Wszystkie zastrzyki robiono do żyły usznej. Chlorowodorki badanych amin podawano w takiej dawce dziennej, żeby po jednym zastrzyku wytworzył się w przybliżeniu 2 mM roztwór we krwi królika. Miało to na celu umożliwienie przeprowadzenia porównania z wykonanymi badaniami na krwi króliczej *in vitro*. Przyjęto wg Kudriawcewa (12), że waga krwi wynosi  $\frac{1}{19}$  wagi ciała królika i obliczono ilości chlorowodorków amin na jeden zastrzyk zgodnie z poprzednimi założeniami. Ilości te wynosiły po zaokrągleniu: 15 mg pAF. HCl, 19 mg pFDA. 2HCl, 21 mg pTDA. 2HCl/kg wagi królika. Czas doświadczenia każdej serii obejmował 16 dni. W tym czasie pobierano pięciokrotnie krew do badań: pierwszego, czwartego, ósmego, dwunastego i szesnastego dnia, przyjmując dzień podania pierwszego zastrzyku za zerowy. Krew pobierano z żyły usznej do naczynka zawierającego odpowiednią ilość szczawianów amonu i potasu. Po skończonym doświadczeniu króliki uśmiercano przez uderzenie w tył głowy, robiono sekcje i oznaczano poziom GSH w wątrobach. W pobieranej krwi oznaczano poziom Hb i GSH oraz obliczano ilość krwinek czerwonych, retikulocytów i krwinek z ziarnistością barwiącą się przeżywcio, przyjmując je, podobnie jak w doświadczeniu na szczurach, za retikulocyty.

## WYNIKI

Zmiany we krwi królików. Zmiany ilościowe Hb, czerwonych krwinek, retikulocytów (tab. I) i GSH (tab. II) zaobserwowano

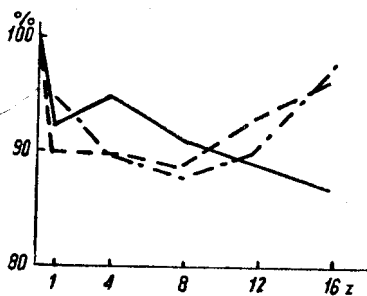
T a b e l a I  
Ilość retikulocytów u królików podana w wartościach bezwzględnych (wyniki średnie w ‰)

Dzień po 1. zastrzyku	pAF	pFDA	pTDA	Kontrola
0	14	15	13	12
1	19	24	18	12
4	16	21	32	13
8	15	20	23	13
12	—	15	31	12
16	15	17	20	14

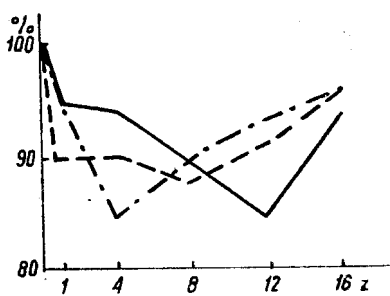
T a b e l a II  
Ilość GSH u królików podana w wartościach bezwzględnych (wyniki średnie w mg ‰)

Dzień po 1. zastrzyku	pAF	pFDA	pTDA	Kontrola
0	41	39	39	39
1	35	37	32	41
4	35	33	33	41
8	36	35	33	39
12	37	37	33	38
16	39	39	35	39

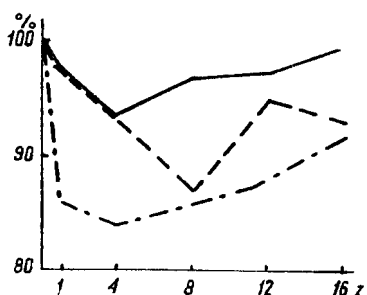
w przypadku wszystkich badanych amin między 4 a 12 dniem. Jedynie w przypadku pTDA spadek zawartości GSH poprzedza spadek ilości Hb i czerwonych krwinek (ryc. 5, 6, 7). Zmiany we krwi zwierząt kontrolnych są znacznie mniejsze (ryc. 8).



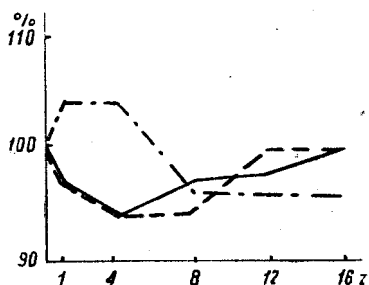
Ryc. 5.



Ryc. 6.



Ryc. 7.



Ryc. 8.

Ryc. 5. Zawartość procentowa Hb, E i GSH we krwi królików po pAF — Hb, —→E, —.—GSH

Ryc. 6. Zawartość procentowa Hb, E i GSH we krwi królików po pFDA — Hb, —→E, —.—GSH

Ryc. 7. Zawartość procentowa Hb, E i GSH we krwi królików po pTDA — Hb, —→E, —.—GSH

Ryc. 8. Zawartość procentowa Hb, E i GSH we krwi po 0,9% NaCl — Hb, —→E, —.—GSH

Ilość GSH w wątrobach. Zmiany zawartości GSH w wątrobach króliczych są nieznaczne, nie stwierdzono ich przy pFDA. (tab. III).

Wyniki sekcji. Nie stwierdzono zmian w narządach wewnętrznych królików, którym podawano pAF. Przy pFDA w 4 przypadkach na 6 zauważono lekki obrzęk śledziony. Zmiany wątroby zauważono w 5

Tabela III  
Ilość GSH w wątrobach królików

	pAF	pFDA	pTDA	Kontrola
GSH w mg/100g tkanki (wyniki średnie)	155	178	161	181
Rozpiętość wyników cyfra przy nawiasie = ilości oznaczeń	(145—170) <sup>3</sup>	(150—210) <sup>5</sup>	(138—195) <sup>4</sup>	(150—235) <sup>4</sup>

przypadkach na 6 badanych. Polegały one na powiększeniu, w dwóch przypadkach były zmiany martwicze i zmieniona konsystencja, w jednym przypadku zauważono ostry zanik wątroby (w wątrobie tej ilości GSH wynosiła 90 mg/100 g tkanki, a więc dużo mniej od ilości przeciętnej wynoszącej 150—180 mg/100 g). Przy pTDA u połowy badanych zwierząt stwierdzono powiększenie śledziony.

#### BADANIA NA KOTACH

Do badań użyto 12 kotów wagi około 2 kg. 6 kotów stanowiło serię doświadczalną i 6 kontrolną. Koty doświadczalne otrzymały podskórnie 6 zastrzyków po 5 mg chlorowodoru pTDA na kg wagi dziennie. Roztwory do zastrzyków przygotowywano analogicznie jak w doświadczeniu na szczurach. W tym samym czasie koty kontrolne otrzymały 6 zastrzyków roztworu fizjologicznego soli. Zastrzyki robiono podskórnie. W doświadczeniu tym nie można było użyć pTDA w dawce stosowanej królikom, ponieważ koty okazały się szczególnie wrażliwe i po podaniu podskórnym tej ilości pTDA, którą króliki otrzymały dożylnie, padały w ciągu paru godzin. Krew do badań pobierano 5 razy co trzeci dzień, licząc od dnia pierwszej iniekcji. Krew pobierano z serca, jako antykoagulanty służyły szczawiany amonu i potasu. W pobieranej krwi oznaczano poziom Hb i GSH oraz obliczano ilość czerwonych krwinek, retykulocytów i krwinek z ziarnistością barwiącą się przeżyciowo. Ponieważ krew kotów zawierała nieznaczną ilość retykulocytów w porównaniu z ilością krwinek z ziarnistościami analogicznymi do cH, przyjmowano wszystkie krwinki o barwiącej się przeżyciowo ziarnistości za cH. Po skończonym doświadczeniu koty usypiano eterem, robiono sekcje i oznaczano poziom GSH w wątrobach.

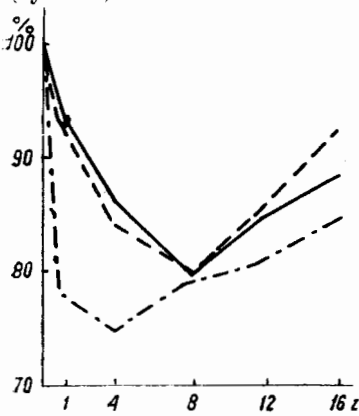
#### WYNIKI

Zmiany we krwi kotów. U kotów doświadczalnych zaobserwowano zmniejszenie ilości Hb, krwinek czerwonych i GSH, a zwiększenie ilości cH, zarówno bezpośrednio po podaniu pTDA, jak i w tydzień po zaprzestaniu iniekcji. 16 dnia zmiany we krwi są mniejsze, ale jeszcze nie na powrotu do wartości wyjściowych. Zmniejszenie ilości Hb pokrywa się ze zmniejszeniem ilości krwinek, najniższe wartości otrzymano 8 dnia doświadczenia. Natomiast największe zmniejszenie ilości GSH, a zwiększenie ilości cH następowało wcześniej 4 dnia (tab. IV, ryc. 9). U kotów

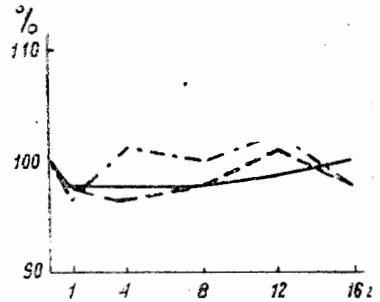
T a b e l a IV  
Zmiany ilości Hb, krwinek czerwonych (E), ciałek Heinza (cH) i GSH we krwi kotów po podaniu pTDA (wyniki średnie w ‰)

Dzień po 1. zastrzyku	Hb	E	cH	GSH
1	94	93	161	78
4	86	84	192	75
8	80	80	163	79
12	85	86	140	81
16	89	93	114	85

kontrolnych były nieznaczne zmiany wszystkich badanych parametrów (ryc. 10).



Ryc. 9.



Ryc. 10.

Ryc. 9. Zawartość procentowa Hb, E i GSH we krwi kotów po pTDA — Hb,  
— — — E, — · — GSH

Ryc. 10. Zawartość procentowa E, Hb i GSH we krwi kotów po 0,9% NaCl — Hb,  
— — — E, — · — GSH

Ilość GSH w wątrobach. Nie stwierdzono różnicy w ilości GSH u zwierząt doświadczalnych w porównaniu z kontrolnymi (tab. V).

Wyniki sekcji. Nie stwierdzono zmian w narządach wewnętrznych zwierząt kontrolnych. U połowy kotów, które otrzymywały pTDA, zaobserwowano powiększenie śledziony. Szczególnie u jednego z tych kotów śledziona była bardzo powiększona i obrzęknięta. Powiększenie wątroby zauważono tylko u jednego kota (tego, który miał silnie powiększoną śledzionę). Wątroba jego miała wyraźną budowę marmurkową i osłabiony mięsz, znaleziono w niej tylko 80 mg GSH/100 g tkanki. Również u tego kota płuca były obrzęknięte i przekrwione. W nerkach zmian nie zaobserwowano.

Tabela V  
Ilość GSH w wątrobach kotów

	pTDA	Kontrola
GSH w mg/100 g tkanki (wyniki średnie)	149	135
Rozpiętość wyników cyfra przy nawiasie = ilości oznaczeń.	(80—223) <sup>a</sup>	(108—188) <sup>b</sup>

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wszystkie badane aminy powodowały u szczurów i królików wystąpienie objawów hemolitycznej anemii, tzn. zmniejszenie ilości Hb i krwinek czerwonych oraz zwiększenie ilości retykulocytów. Zmiany we krwi były największe po podaniu całej ilości amin i po 10 — 14 dniach cofnęły się. Wyniki te są analogiczne do rezultatów badań z innymi środkami

wywołującymi rozpad krwinek, jak np. acetylofenylohydrazyna, pochodne 8-aminochinoliny (13 — 15), również w tych przypadkach zaprzestanie podawania szkodliwego związku prowadziło po 2 tygodniach do powrotu do stanu normalnego. Jeśli chodzi o wrażliwość obu rodzajów badanych gryzoni, to wrażliwsze są króliki, ponieważ po 4-krotnie mniejszej ilości amin zakres zmian w ich krwi był taki sam jak we krwi szczurów. Ze względu na to, że zmiany w ilości erytocyków we krwi królików wynosiły średnio 15%, zrobiono statystyczną analizę wyników uzyskanych w szeregach zwierząt doświadczalnych i w szeregu kontrolnym. Obliczenia wykazały, że w szeregach doświadczalnych zmiany ilości krwinek 8 dnia doświadczenia, tzn. po podaniu całej ilości szkodliwych substancji, są istotne w przypadku wszystkich badanych amin. W szeregu kontrolnym istotnej różnicy w ilościach krwinek nie stwierdzono.

Jeśli chodzi o działanie poszczególnych amin, to między działaniem pAF i pFDA są niewielkie odchylenia, nieznacznie większe liczbowo zmiany powoduje pFDA, natomiast silniejszym działaniem charakteryzuje się pTDA. Rezultat ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami *Nikonorowa* (4) nad działaniem hemolizujących pFDA i pTDA, w których okazało się, że pTDA powoduje większy spadek ilości krwinek u myszy nawet w porównaniu z fenylhydrazyną.

Przeprowadzone badania wykazały, że u wszystkich badanych zwierząt pTDA prowadziła do wytworzenia większej ilości retikulocytów niż pozostałe aminy. Należy dodać, że właśnie pTDA była używana do wytworzenia cH u królików, szczurów i psów (16).

Przechodząc do omówienia działania amin na poziom GSH we krwi należy przypomnieć wyniki otrzymane przy badaniach *in vitro*. W tych badaniach stwierdzono, że wszystkie badane aminy obniżają poziom GSH we krwi, a szczególnie szybko czyni to pAF. Doświadczenia wykonane *in vivo* wykazały, że aminy obniżają ilość GSH we krwi w mniejszym zakresie *in vivo* niż *in vitro*. Można to tłumaczyć tym, że *in vitro* działanie ochronnych systemów enzymatycznych może być zakłócone bądź zmniejszone. Utrzymanie normalnego poziomu zredukowanego GSH zależy od funkcjonowania reduktazy GSH i od aktywności enzymów syntetyzujących GSH z właściwych aminokwasów. Na podstawie badań izotopowych wykazano, że krwinki mają zdolność syntetyzowania GSH z aminokwasów i że okres jego półtrwania wynosi w erytrocycie tylko 4 dni (17). Do syntezy GSH potrzebne są dwie cząsteczki kwasu adenozyntrójfosforowego (ATP) — dają one energię konieczną do wytworzenia dwóch wiązań peptydowych (18). Otóż *in vitro* może się obniżać poziom GSH w krwinkach na skutek braku energii zarówno do syntezy, jak i ochrony. W wielu przypadkach okazało się, że dodanie glikozy może przedłużyć utrzymanie GSH na stałym poziomie (19), a nawet może tę zdolność krwince przywrócić (19 — 21), prawdopodobnie na skutek wznowienia procesów glikolitycznych. Trzeba przypomnieć, że właśnie droga pentozowa przemiany glikozy dostarcza zredukowanej fosfoksymazy (TPN·H<sub>2</sub>) — koenzymu reduktazy GSH, od której aktywności zależy utrzymanie GSH w stanie zredukowanym. Jak już wspomniano, zmiany w ilości GSH w badaniach *in vivo* były mniejsze. Obliczenia statystyczne wykazały, że są one jednak istotne 8 dnia doświadczenia przy wszystkich badanych aminach, podczas gdy w szeregu kontrolnym różnic istotnych nie było.

W świetle otrzymanych wyników pierwotne założenie, że aminy działają hemolizującą poprzez obniżenie poziomu GSH, znajduje potwierdzenie



nie dla pTDA. Jeżeli bowiem spadek ilości GSH prowadzi do destrukcji krwinek to najpierw powinno mieć miejsce zmniejszenie ilości GSH, a potem krwinek i różnica między tymi dwoma badanymi parametrami powinna być istotna. Obliczenia statystyczne wykazały, że te warunki spełnione są w doświadczeniach z pTDA, przy pozostałych aminach różnic istotnych między spadkiem GSH a zmniejszeniem ilości krwinek nie było. Trudno więc wnioskować przy pAF i pFDA, która ze zmian była pierwotna, czy na skutek rozpadu krwinek zmniejszała się ilość GSH we krwi, czy też było odwrotnie. Ponieważ pTDA zachowywała się odmiennie, wykonano dla niej dodatkowe badania na kotach, zwierzętach szczególnie wrażliwych i łatwo wytwarzających ciała Heinza (22, 23). Rzeczywiście koty reagowały bardzo silnie na podanie tej aminy, po zastrzyknięciu 20 mg pTDA.2HCl podskórnie padały już po 3 godz. z objawami śmierci z uduszenia, a więc po niższej dawce niż podają *Stahl* i *Jung* (5). W ich badaniach zwierzęta te wytrzymywały dawkę 50 mg/kg, a po 75 — 100 mg/kg padały w okresie od 11 godzin do 3 dni. W moim doświadczeniu 2 koty padły po 3 godzinach po zastrzyknięciu wspomnianej już dawki pTDA, a z pozostałych 6, które otrzymywały podskórnie po 5 mg pTDA. 2HCl/kg dziennie, jeden padł także po 20 mg, tzn. 4 dnia doświadczenia, a 5 przetrzymało 30 mg. Można z tego wnosić, że stopniowe podawanie aminy jest mniej szkodliwe dla organizmu. Ustrój może wtedy tolerować większe ilości toksycznego związku. Podobne zjawisko zauważyłam również podczas wstępnych doświadczeń z aminami wykonanych na królikach. Zwierzęta te potrafiły przeżyć nawet podanie 1 g pTDA bądź pFDA, o ile otrzymywały te związki stopniowo w zwiększającej się ilości od 0,025 do 0,075 g/kg podskórnie, gdy podanie jednorazowe 0,05 g prowadziło od razu do śmierci królika. Zmiany we krwi kotów podobnie jak u królików były największe po podaniu całej ilości pTDA, były one jednak ilościowo większe i wolniej się cofały. Obliczenia statystyczne pozwoliły przekonać się, że zmiany ilości GSH i erytrocytów w szeregu kotów doświadczalnych podczas całego doświadczenia stanowią różnicę istotną w stosunku do wartości wyjściowych. W szeregu kontrolnym różnic istotnych nie było. Należy tu zaznaczyć, że koty otrzymywały 4-krotnie mniej amin niż króliki i to podskórnie, a nie dożylnie; z całą pewnością są to więc zwierzęta szczególnie wrażliwe. Spadek poziomu GSH podobnie jak w doświadczeniu na królikach poprzedzał spadek krwinek i jak wykazały obliczenia statystyczne różnica między tymi parametrami była istotna. Ponieważ zjawisko to wystąpiło u dwóch rodzajów zwierząt: u kotów i u królików, wydaje się, że rzeczywiście pTDA prowadzi do destrukcji krwinek poprzez obniżenie poziomu GSH. Także wysoka ilość krwinek z ziarnistością barwiącą się przyżyciowo, wyższa niż przy pAF i pFDA i następującą dopiero po uprzednim zmniejszeniu ilości GSH, przemawiałaby za tym założeniem.

Ponieważ wiadomo, że aminy mogą powodować patologiczne zmiany wątroby (2), wykonano dodatkowo oznaczenia poziomu GSH w wątrobach królików i kotów. Niewielka ilość materiału doświadczalnego nie może pozwolić na wyprowadzenie zupełnie pewnych wniosków. Wydaje się jednak, że nie ma specjalnych różnic między poziomem GSH w tkance wątrobowej zwierząt kontrolnych i doświadczalnych. Natomiast w jednym przypadku przy pFDA zaobserwowano ostry zanik wątroby i w tkance tej wątroby ilość GSH była znacznie mniejsza (90 mg/100 g tkanki — przeciętnie zaś, jak zaznaczono, jest 150 — 180 mg/100 g tkan-

ki). Podobnie niski poziom GSH w wątrobie zauważono w badaniach z pTDA na kotach, wspomniana wątroba wykazywała zmiany patologiczne. Wynikałoby z tego, że jeżeli występują zmiany degeneracyjne wątroby, ilość GSH ulega zmniejszeniu. W piśmiennictwie nie spotkałam się z badaniami tego właśnie zagadnienia. Badania poziomu GSH w wątrobie, przy raku wywołanym pochodnymi antracenu, wykazały podwyższenie ilości GSH (24). Znane jest także założenie, że poziom GSH w wątrobie ulega zmniejszeniu po podaniu takich związków chemicznych, z których organizm wytwarza kwasy merkapturowe. Takimi związkami są przede wszystkim chlorowcopochodne benzenu, benzylu i naftalenu (25). Kwas merkapturowy ma bowiem powstawać na koszt GSH w hydrolitycznej reakcji katalizowanej w wątrobie przez glutationazę. Produktami tej reakcji są kwas merkapturowy podanego związku, kwas glutaminowy i glicyna (26). Natomiast stwierdzono, że związki, które powodują spadek ilości GSH we krwi, a nie wytwarzają kwasów merkapturowych, jak np. chloral-hydrat butylu, nie obniżają poziomu GSH w wątrobie (25). Należy przypuszczać, że badane aminy mogą być zaliczone do tych właśnie związków. Stwierdzenie tego wymagałoby obszernych badań, które by wykraczały poza ramy zagadnienia działania hemolizującego amin.

Przy sekcjach największe zmiany narządów wewnętrznych znaleziono u zwierząt, które otrzymywały pFDA, dotyczyły one powiększenia śledziony i wątroby i zmian ich konsystencji. Takich zmian przy pAF nie zaobserwowano, a przy pTDA zauważono u połowy zwierząt doświadczalnych powiększenie śledziony.

#### WNIOSKI

1. Wszystkie badane aminy wywołują we krwi szczurów, królików i kotów objawy anemii hemolitycznej: obniżenie poziomu hemoglobiny i ilości krwinek czerwonych oraz zwiększenie ilości retykulocytów i ciałek Heinza. Ilościowo największe zmiany powoduje pTDA, zmiany wywołane przez pAF i pFDA są zbliżone, nieznacznie większe przy pFDA.

2. Wszystkie badane aminy obniżają poziom GSH we krwi *in vivo*, działanie ich jest jednak słabsze niż *in vitro*. Wyjątkowo szybkie zmniejszanie ilości GSH przez pAF *in vitro*, nie powtarza się przy badaniach *in vivo*.

3. Założenie, że obniżenie poziomu GSH we krwi jest pierwotnym objawem hemolizującego działania amin i przyczyną pozostałych zmian w obrazie krwi, znajduje potwierdzenie dla pTDA. W przypadku tej aminy najpierw następuje obniżenie poziomu GSH we krwi królików i kotów, a potem zmniejszenie ilości krwinek, a różnica jest stwierdzalna statystycznie.

4. Wrażliwość zwierząt na podanie amin jest niejednolita. Najwrażliwsze są koty, następnie króliki, a potem szczury.

5. Przy stopniowym podawaniu amin zwiększa się tolerancja ustroju.

6. Nie wydaje się słuszny przepis polskiego rozporządzenia zezwalający na dopuszczenie do barwienia włosów pTDA, a zabraniający użycie pFDA. Jakkolwiek obie aminy wykazują właściwości hemolizujące, większymi charakteryzuje się pTDA.

Profesorowi doktorowi Aleksandrowi Gruzewskiemu składam serdeczne podziękowanie za pomoc udzieloną mi przy statystycznym opracowaniu wyników.

Э. Сикорска

ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ АМИНОВ КРАСИТЕЛЕЙ  
I. ВЛИЯНИЕ АМИНОВ НА ГЛЮТАТИОН IN VIVO

## Содержание

Исследовано гемолитическое действие *p*-аминофенола (*p*-АФ), *p*-фенилендиамина (*p*-ФДА) и *p*-толуиленадиамина (*p*-ТДА) на крысах и кроликах. В испытаниях определялось количество гемоглобина, эритроцитов и ретикулоцитов до подачи этих соединений, во время их подачи и в течение 2 — 3 недель после их подачи.

Самые большие изменения в крови найдено после подачи всего количества вредных соединений. Изменения вызванные *p*-АФ и *p*-ФДА были приблизительно сходны, а большие вызвала *p*-ТДА. В среднем снижение количества эритроцитов и гемоглобина достигало 20%, а количество ретикулоцитов увеличилось в 2 — 3 раза.

Для доказывания возможности гемолитического действия исследованных аминов через понижение уровня глутатиона (*g*-SH) в эритроцитах определялось *g*-SH в крови глиоксалазовым методом, определяя одновременно гемолитические изменения в крови. Доказано, сообразно как в исследованиях проведенных с кровью кроликов „*in vitro*“, что все испытанные амины снижают уровень *g*-SH. Это действие „*in vivo*“ слабее, а особенно сильное действие *p*-АФ „*in vitro*“ не повторяется „*in vivo*“. Предположение, что действуют гемолитически через снижение уровня *g*-SH в крови утверждено только для *p*-ТДА. Для этого амина снижение *g*-SH превосходило до снижения количества эритроцитов, а разница между величинами этих параметров, как доказали статистические вычисления, была действительна. Исследования проведены с *p*-ТДА на кошках подтвердили результаты полученные в опыте с кроликами и доказали, что кошки гораздо более чувствительны чем крысы и кролики.

Полученные результаты свидетельствуют, что *p*-ТДА сильнее действует гемолитически чем остальные исследованные амины и, вероятно, ее гемолитическое действие выражается снижением уровня *g*-SH.

E. Sikorska

## STUDIES ON THE TOXICITY OF DYE AMINES

## II. THE INFLUENCE OF AMINES ON THE GLUTATHIONE IN VIVO

## Summary

The work is concerned with the investigation of the hemolytic effect of *p*-amino-phenol (*p*AF), *p*-phenylene-diamine (*p*FDA) and *p*-totylenediamine (*p*TDA). The effect was experimented on the rabbits and rats. The experiments resulted in the determination of the content of red corpuscles and hemoglobin (Hb) prior, during and 2 to 3 weeks after the application of these amines. The greatest changes noticed in the blood stepped out after whole dose of injurious compounds has been applied. Noteworthy is the fact that *p*AF and *p*FDA resulted in similar changes, whereas *p*TDA corresponded to greatest ones. The average drop in red corpuscles and Hb amounted to 20 per cent, whereas the rise in reticulocyte was twofold-threelfold.

To prove, that amines through the reduction of the blood glutathione (GSH) level may involve the hemolysis, the amount of GSH in the blood by manometric

glyoxalase method alongside with the hemolytic changes have been determined. It has been found that all examined amines similarly in the investigations with the rabbit blood in vitro, give a decrease in GSH level. This phenomenon was slower in vivo and particularly strong pAF effect in vitro was absent in vivo. The results point out that only pTDA involves the hemolysis by the reduction of GSH level. In this case prior to the GSH drop took place the decrease in red blood cells, and the difference between the values of these parameters, as statistical evaluation proved, was significant.

The experiments with pTDA on cats confirmed the results obtained for rabbits and showed that cats are more sensitive than rats and rabbits.

The results suggest the stronger hemolytic effect of pTDA than that of other two amines and also that this effect is presumably due to the reduction of GSH level.

#### PIŚMIENICTWO

1. Sikorska E.: Roczniki PZH 10, 245, 1959. — 2. Łazarew N. W.: Wrednye weszczestwa w promyszlenosti, Cz. I. Leningrad 1954. — 3. Neureiter F. V., Pietrusky I., Schütt E.: Handwörterbuch der gerichtlichen Medizin und naturwissenschaftlichen Kriminalistik, Berlin 1940. — 4. Nikonow M.: Acta Pol. Pharm., 7, 25, 1950. — 5. Stahl K. E., Jung F.: Arch. exp. Path., Pharmacol., 220, 503, 1953. — 6. Bern R. J., Flanagan C. L., Alving A. S.: J. Lab. Clin. Med., 45, 286, 1955. — 7. Dawson J. P., Thayer W. T., Desjorges J. F.: Blood, 13, 1113, 1958. — 8. Tempka T.: Choroby układu krwiotwórczego, I. Warszawa 1954. — 9. Ławkowicz W., Krzemińska-Ławkowiczowa I.: Atlas hematologiczny — Warszawa 1952. — 10. Glick D.: Methods of Biochemical Analysis, Nowy Jork 1955.
11. Hughes J. P., Treon J. F.: Arch. Ind. Hyg. Occ. Med., 10, 192, 1954. — 12. Kudriawcew A. A.: Issledowanija krwi w weterinarnej diagnostike. Cz. II, Moskwa 1953. — 13. Cruz W. O.: Am. J. Med. Sci., 202, 781, 1941. — 14. Rofe P.: Brit. J. Ind. Med., 16, 15, 1959. — 15. Beutler E., Dern R. J., Alving A. S.: J. Lab. Clin. Med., 44, 171, 1954. — 16. Buckell M., Richardson J. D.: J. Brit. J. Ind., Med., 7, 131, 1950. — 17. Dimont E., Landsberg E., London J. M.: J. Biol. Chem., 213, 769, 1955. — 18. Kochańska Z.: Postępy Biochemii, 3, 135, 1957. — 19. Beutler E.: J. Lab. Clin. Med., 49, 84, 1957. — 20. Beutler E., Robson M., Bittenwieser E.: J. Clin. Invest., 36, 617, 1957.
21. Klebanoff S. J.: J. Gen. Physiol., 41, 725, 1958. — 22. Hecht C., Wingler A.: Arzneimittelforschung 2, 192, 1952. — 23. Walter O., Müller E.: Z. ges. exp. Med., 119, 195, 1952. — 24. Meduski J. W.: Brit. J. Cancer 3, 559, 1949. — 25. Barnes M. M., James S. P., Wood P. B.: Biochem. J., 71, 680, 1959. — 26. Bray M. G., Franklin T. J., James S. P.: Biochem. J., 71, 690, 1959.