

KATARZYNA SOSNOWIEC¹, RADOSŁAW CZERNYCH¹, LIDIA WOLSKA^{1,2}

¹*Zakład Toksykologii Środowiska
Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i
Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
Powstania Styczniowego 9b, 81-519 Gdynia*
²*Katedra Chemii Analitycznej
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska
G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk
E-mail: kasiaso@gumed.edu.pl*

JAK BADAĆ I OCENIAĆ EFEKTY WSPÓŁDZIAŁYWANIA SUBSTANCJI NA ORGANIZMY ŻYWE?

Względy etyczne, ale także wysokie koszty oraz problemy związane z pozyskaniem zwierząt doświadczalnych, w znacznym stopniu ograniczyły ich wykorzystanie w badaniach toksyczności związków. W ostatnich latach w badaniach efektu toksyczności wykorzystuje się coraz częściej organizmy bezkręgowce (testy ekotoksykologiczne). Niewątpliwą zaletą stosowania ekotestów jest zwiększenie powtarzalności i odtwarzalności rezultatów oraz zmniejszenie zakresu niepewności uzyskanych wyników.

Obecność zanieczyszczeń występujących w środowisku, nawet na niskim poziomie stężeń, może stanowić zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania ekosystemów i zdrowia ludzi. Szczególnie, gdy pod uwagę zostanie wzięty fakt, iż narażenie związane jest z oddziaływaniem na organizm ludzki czy ekosystem mieszaniny, nie zaś pojedynczych związków. Każdy element środowiska stanowi wieloskładnikową mieszaninę, w której skład wchodzi związki o różnicowanym poziomie toksyczności i specyficznym współdziałaniu.

Celem niniejszej pracy jest przeprowadzenie studium literaturowego związanego z wykorzystaniem najstarszego i najczęściej stosowanego biotestu, opartego o bakterie *Vibrio fischeri*, wykorzystującego luminescencję biowskaźnika do określenia poziomu toksyczności związków oraz rodzaju współ-

oddziaływania występującego pomiędzy tymi związkami.

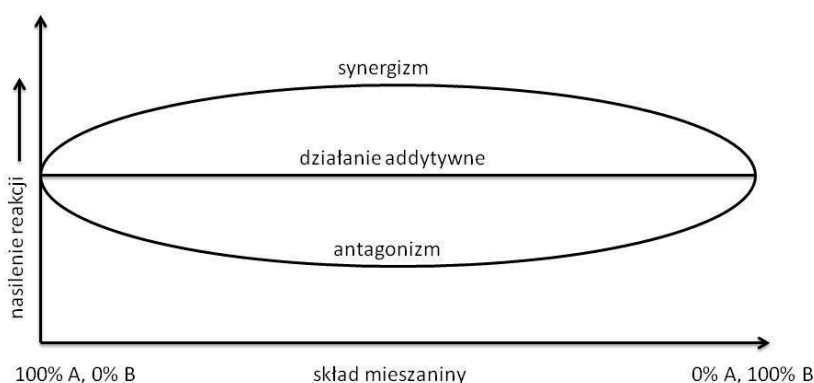
Od wielu lat badania prowadzone w zakresie toksykologii środowiska koncentrowały się na określaniu toksycznego efektu pojedynczych związków. W rzeczywistości takie przypadki występują niezwykle rzadko, najczęściej efekt wywołany jest przez mieszaninę wielu substancji, a obserwowane efekty to antagonizm, synergizm, potencjacja.

Dotychczas stosowane metody analityczne badania jakości środowiska nie uwzględniają efektu współdziaływania, jak również nie dostarczają informacji na temat potencjalnego działania mutagennego czy kancerogennego występujących w próbce zanieczyszczeń. Dodatkowo, zastosowanie wyłącznie metod analitycznych generuje duże koszty pozyskania informacji o jakości badanego środowiska, nie dając pełnego obrazu na temat rzeczywistych zagrożeń.

W zależności od jakościowego i ilościowego występowania związków efekty współdziaływania mogą zachodzić na etapie (SEŃCZUK 2005):

– narażenia – wzajemne oddziaływanie związków zachodzi na etapie środowiskowym oraz prowadzi do powstania nowych produktów o odmiennym poziomie toksyczności względem związków pierwotnych;

– kinetyki – na tym etapie interakcje zachodzące pomiędzy związkami występujący-



Ryc. 1. Graficzna interpretacja efektu łącznego działania substancji A i B (WALKER i współaut. 2002).

mi w mieszaninie wpływają na zmianę kinetyki procesów: wchłaniania, dystrybucji, biotransformacji oraz wydalania;

– dynamiki – substancje wykazują zbieżny lub przeciwny efekt biologiczny względem siebie.

Z praktycznego punktu widzenia rodzaj współdziałania pomiędzy związkami najprościej jest opisać na podstawie modelu uwzględniającego mieszaninę dwuskładnikową (Ryc. 1). W ten sposób można wyróżnić następujące rodzaje działania łącznego (SEŃCZUK 2005):

– addytywność – toksyczność mieszaniny związków jest zbliżona do sumy toksyczności jej składników (zależność ta nie obrazuje zjawiska interakcji, a jedynie niezależne działanie związków);

– antagonizm – toksyczność mieszaniny jest mniejsza od toksyczności pojedynczych substancji;

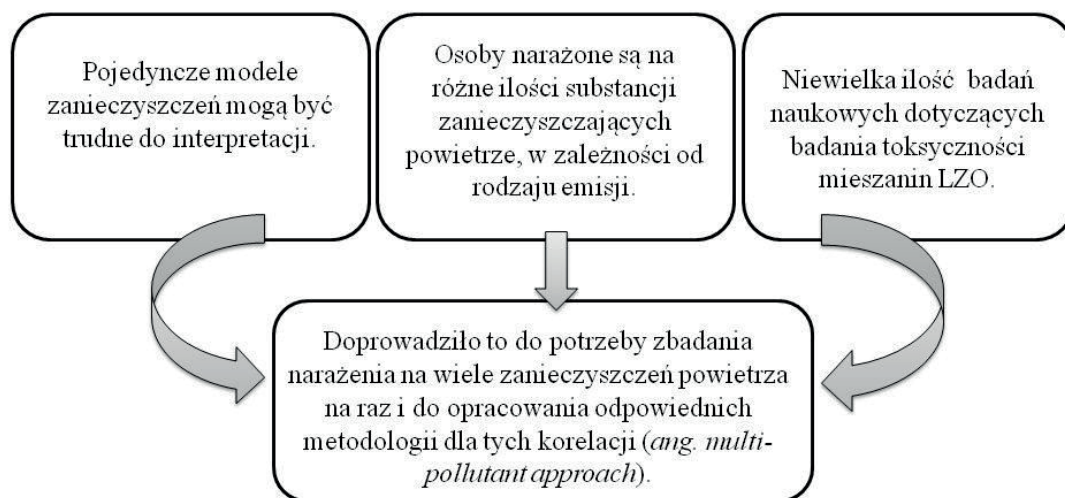
– synergizm – uwzględnia jednoczesne działanie dwóch lub więcej substancji, mogą-

ce być silniejsze niż suma skutków oddziaływania każdej z nich osobno;

– potencjacja – może być definiowana jako szczególny rodzaj synergizmu, gdzie jeden ze składników mieszaniny nie wywołuje efektu toksycznego, ale znacząco wzmacnia efekt składnika toksycznego.

Wprowadzenie metod bioanalitycznych (wykorzystujących biotesty) do rutynowych badań jakości środowiska, uzupełniłoby informację o wyżej wymienione obszary niepewności i przyczyniłoby się do znacznego wzrostu jakości takich ocen.

We współczesnej literaturze (Tabela 1) obserwuje się również trend zmierzający w kierunku tworzenia modeli matematycznych, przewidujących toksyczność związków oraz ich mieszanin na podstawie właściwości fizykochemicznych tych związków. Odejście od metod eksperymentalnych w kierunku modelowania matematycznego można uzasadnić zmniejszeniem kosztów generowanych przez zużycie



Ryc. 2. Wybrane problemy dotyczące współdziałania związków (VEDAL i współaut. 2003).

Tabela 1. Studium literaturowe zastosowania bakterii *Vibrio fischeri* do badania toksyczności mieszanin i rodzaju współdziaływania.

Literatura	Cel badania	Związki	Warunki doświadczenia	Wnioski	Kontekst badania
Lin i współaut. 2003	(1) Uzyskanie informacji na temat toksyczności wybranych związków oraz ich mieszanin. (2) Powiązanie toksyczności mieszanin z właściwościami fizykochemicznymi związków (QSAR) w celu przewidywania toksyczności ich mieszanin.	Halogenowane węglowodory aromatyczne (n=10) oraz mieszaniny tych związków (n=55).	Test: Microtox® Organizm testowy: <i>Vibrio fischeri</i> Czas inkubacji: 15 min. Analizator: DXY-2	(1) Stwierdzono słusność stosowania opracowanej formuły matematycznej opisującej zależność toksyczności -hydrofobowość związków jedynie dla związków o podobnej strukturze chemicznej (związki homologiczne, izomery, kongenery). (2) Autorzy pracy sugerują, iż wyznaczona zależność może być stosowana do przewidywania toksyczności mieszanin o nieznanym składzie.	(1) Stężenie hydrofobowych zanieczyszczeń w ściekach może być relatywnie małe w porównaniu do ilości tych związków, które są pobierane i akumulowane w organizmach wodnych, wywołując efekt toksyczny. (2) Dopuszczalne stężenia ustalone dla pojedynczych związków nie wskazują na faktyczne zagrożenie, wynikające z obecności wielu związków jednocześnie (synergizm i antagonizm).
Lin i współaut. 2004	(1) Zbadanie toksyczności mieszanin wybranych związków. (2) Zbadanie zjawiska addytywnego efektu toksyczności dla mieszanin wybranych związków.	n= 23 oraz mieszaniny (n=44) polarnych, niepolarnych związków o działaniu narkotycznym oraz związków reaktywnych.	Test: Microtox® Organizm testowy: <i>Vibrio fischeri</i> Czas inkubacji: 15 min. Analizator: DXY-2	Badanie wykazało brak współdziaływania pomiędzy badanymi grupami związków (działanie addytywne).	Rosnące zainteresowanie efektem współdziaływania związków występujących w mieszaninach obecnych w środowisku.
Lin i współaut. 2005	(1) Określenie toksyczności mieszanin związków popularnie identyfikowanych w wodach morskich. (2) Zaproponowanie sposobu przewidywania toksyczności mieszanin związków na podstawie ich właściwości fizykochemicznych.	Mieszaniny (n=50) składające się z losowo wybranych halogenowanych benzenów (n=3), fenoli (n=3), węglodorów (n=2), polichlorowanych bifenyli (n=3), pestycydów chloroorganicznych (n=4), insektycydów (n=2).	Test: Microtox® Organizm testowy: <i>Vibrio fischeri</i> Czas inkubacji: 15 min. Analizator: DXY-2	Wiele stosowanych metod oceny ryzyka związanego z narażeniem na mieszaniny związków chemicznych zakłada addytywny charakter działania tych związków, podczas gdy pomijane są tak istotne rodzaje współdziaływania jak synergizm czy antagonizm.	Rosnące zaniepokojenie coraz częściej pojawiającymi się w środowisku morskim mikrozanieczyszczeniami, wymusza podejmowanie badań nad możliwościami oceny ryzyka związków występujących w mieszaninie.

<p>Rosal i współaut. 2010</p>	<p>(1) Ocena toksyczności per fluorowanych surfaktantów. (2) Badanie współdziałania pomiędzy najbardziej toksycznymi surfaktantami a chlorowanymi związkami organicznymi w mieszaninach dwu- i trójskładnikowych.</p>	<p>Per fluorowane surfaktanty (związki powierzchniowo czynne) (n=4), chlorowane związki organiczne (n=2).</p>	<p>Test: BiofixLumi® Organizm testowy: Vibrio fischeri Czas inkubacji: 15 min.</p>	<p>(1) Potwierdzono wysoka czułość i przydatność bakterii Vibrio fischeri do badania efektu współdziałania związków. (2) W mieszaninach dwuskładnikowych chlorowców organicznych występował antagonizm. (3) Mieszaniny dwuskładnikowe dokuzanu sodowego z chlorowcami wykazały efekt synergizmu. (4) Efekt synergizmu został zaobserwowany we wszystkich mieszaninach trójskładnikowych.</p>	<p>W chwili obecnej do wód powierzchniowych (wraz ze ściekami) odprowadzane są duże ilości związków powierzchniowo czynnych (detergenty), które wywierają niszczący efekt na środowisko. Co więcej, związki te mogą współdziałać z innymi zanieczyszczeniami potęgując toksyczny efekt wobec flory i fauny środowiska, które zanieczyszczają.</p>
<p>Wang i współaut. 2011</p>	<p>(1) Zbadanie toksyczności pojedynczych związków i ich mieszanin. (2) Powiązanie toksyczności mieszanin z właściwościami fizykochemicznymi związków (QSAR) w celu przewidywania toksyczności ich mieszanin.</p>	<p>Perfluorowane kwasy karboksylowe (n=12) różniących się długością łańcucha węglowego (C3-C18) oraz ich mieszaniny.</p>	<p>Test: Microtox® Organizm testowy: Vibrio fischeri Czas inkubacji: 15 min. Analizator: BH9507</p>	<p>(1) Przeprowadzone badania wykazały wzrost toksyczności dla homologów o długości łańcucha węglowego C3-C14 oraz spadek toksyczności dla homologów o długości łańcucha węglowego C14-C18. (2) Wyniki toksyczności mieszaniny otrzymane metodą matematyczną wykazały brak współdziałania pomiędzy składnikami mieszaniny (addytywność).</p>	<p>(1) Z uwagi na właściwości fizykochemiczne (stabilność, trwałość) perfluorowane kwasy karboksylowe są szeroko stosowane w przemyśle. (2) W/w właściwości wpływają na akumulowanie się w tkance tłuszczowej żywych organizmów (bioakumulacja, biokoncentracja).</p>

Tian i współaut. 2012	(1) Wyznaczenie parametru ekotoksyczności związków (EC50) oraz ocena efektu współdziałania pomiędzy związkami w mieszaninach dwu-, trój- i czteroskładnikowych.	Związki cyjanoorganiczne, chloroorganiczne oraz aldehydy (n=14), w mieszaninach dwu- (n=176), trój- (n=61) oraz czteroskładnikowych (n=54).	Test: N/A Organizm testowy: <i>Vibrio fischeri</i> Czas inkubacji: 15 min. Analityczny: chemiluminescencyjny analizator immunoenzymatyczny.	(1) Test bakteriacyjny z wykorzystaniem bakterii bioluminescencyjnych <i>Vibrio fischeri</i> jest testem czułym i dokładnym. (2) Badanie mieszanin dwu-, trój- i czteroskładnikowych wykazało różnicowany poziom występowania interakcji. (3) Stosowane modele matematyczne mogą być z powodzeniem stosowane w takich obszarach jak ocena ryzyka czy ocena oddziaływania na środowisko.	Doświadczalne badanie współdziałania związków występujących w mieszaninach wymaga wysokich nakładów finansowych i zajmuje wiele czasu. Zastosowanie modeli matematycznych do badania współdziałania może zarówno zmniejszyć koszty i skrócić czas badania do niezbędnego minimum, przy zachowaniu wiarygodności wyników.
Cedergreen i współaut. 2012	Określenie czy na podstawie znanej toksyczności i rodzaju współdziałania mieszanin dwuskładnikowych możliwe jest ilościowe i jakościowe określenie/przewidzenie efektu współdziałania w mieszaninach trój- i czteroskładnikowych.	Herbicydy (n=6).	Test: Microtox® Organizm testowy: <i>Vibrio fischeri</i> Czas inkubacji: 5 i 15 min.	(1) Najomość poziomu synergicznego współdziałania pomiędzy związkami w mieszaninach dwuskładnikowych może okazać się bardzo przydatna przy ustaleniu poziomu współczynnika bezpieczeństwa dla bardziej złożonych mieszanin. (2) Różnica w efekcie synergizmu pomiędzy mieszaninami dwuskładnikowymi a trój- i czteroskładnikowymi nie była statystycznie istotna.	W środowisku zanieczyszczenia występują w postaci mieszanin. W ostatnich dekadach rozwinięte zostały modele matematyczne, wspomagające przewidywanie efektu współdziałania mieszanin związków na organizmy i procesy zachodzące w środowisku. Nie mniej jednak przewidywanie toksyczności złożonych mieszanin jest w dalszym ciągu bardzo trudne i obciążone dużym współczynnikiem niepewności.

Tian i współaut. 2012	(1) Wyznaczenie parametru ekotoksyczności związków (EC50) oraz ocena efektu współdziałania pomiędzy związkami w mieszaninach dwu-, trój- i czteroskładnikowych.	Związki cyjanoorganiczne oraz aldehydy (n=19).	Test: N/A Organizm testowy: <i>Vibrio fischeri</i> Czas inkubacji: 15 min.	Efekt współdziałania w dużej mierze zależy od następujących czynników: ilości związków występujących w mieszaninie, związków, które w mieszaninie dominują, stężeń toksycznych w mieszaninie, rodzaju związków.	Związki organiczne stanowią najczęściej wymienianą szóstą grupę związków zanieczyszczającą środowisko. W przeciągu ostatnich 30 lat opublikowano kilka prac wskazujących, iż badanie toksyczności mieszanin jest zagadnieniem złożonym i wymaga dogłębnego zbadania procesów wpływających na ich toksyczność.
-----------------------	---	--	--	---	---

odczynników i sprzętu niezbędnego do badań, jak również samych organizmów wskaźnikowych. Jednak każdy model matematyczny wymaga weryfikacji przy pomocy rzeczywistych pomiarów.

Zamieszczony w pracy przegląd literatury świadczy o niewielkiej ilości prac, które dotyczą problematyki związanej ze zjawiskiem współdziałania substancji.

Jednocześnie dokonany przegląd literaturowy (lata 2003–2012) (Tabela 1) wskazuje na przydatność tak prostego organizmu jakim są bakterie *Vibrio fischeri* do ilościowego i jakościowego określania efektów współdziałania. Otrzymane wyniki pokazują zróżnicowany charakter współdziałania zachodzących w rzeczywistym środowisku.

Dane literaturowe wskazują na brak kompleksowych badań dotyczących współdziałania związków oraz odpowiednich modeli pozwalających na wymierne prognozowanie efektów ekologicznych oraz zdrowotnych (Ryc. 2). Pomimo, że parametr toksyczności posiada nadrzędne znaczenie przy ocenie narażenia ekosystemu/populacji na wybrany rodzaj zanieczyszczeń to w dalszym ciągu zjawisko współdziałania jest pomijane przy wykonywaniu ocen oddziaływania na środowisko oraz oceny ryzyka ekologicznego i zdrowotnego.

JAK BADAĆ I OCENIAĆ EFEKTY WSPÓŁDZIAŁANIA SUBSTANCJI NA ORGANIZMY ŻYWE?

Streszczenie

Ocena ryzyka ekologicznego i/lub zdrowotnego wymaga uwzględnienia wzajemnych współdziałania występujących pomiędzy związkami zanieczyszczającymi środowisko. Obiecującym narzędziem wspomagającym ten cel są biotesty. Przeprowadzone studium literaturowe wskazuje na przydatność testu Microtox z użyciem bakterii *Vibrio fischeri* w badaniach zjawiska współdziałania substancji zarówno w warunkach modelowych jak i rzeczywistych.

HOW TO INVESTIGATE AND ASSESS INTERACTIONS' EFFECT OF SUBSTANCES ON LIVING ORGANISMS?

Summary

Correctly carried out ecological/health hazard assessment requires taking into consideration specific interactions between environmental pollutants. These

interactions can be examined by biotests. A literature review indicates the Microtox test usefulness for investigating interactions equally in artificial as well as real conditions.

LITERATURA

- CEDERGREEN N., S RENSEN H., SVENDSSEN C., 2012. *Can the joint effect of ternary mixtures be predicted from binary mixture toxicity results?* Sci. Total Environ. 427-428, 229-237.
- LIN Z., DU J., YIN K., WANG L., YU H., 2004. *Mechanism of concentration addition toxicity: they are different for nonpolar narcotic chemicals, polar narcotic chemicals and reactive chemicals.* Chemosphere 54, 1691-1701.
- LIN Z., SHI P., GAO S., WANG L., YU H., 2003. *Use of partition coefficients to predict mixture toxicity.* Water Res. 37, 2223-2227.
- LIN Z., ZHONG P., NIU X., YIN K., YU H., DU J., 2005. *A simple hydrophobicity-based approach to predict the toxicity of unknown organic micropollutant mixtures in marine water.* Marine Poll. Bull. 50, 617-623.
- ROSAL R., RODEA-PALOMARES I., BOLTES K., FERNDEZ-PINAS F., LEGAN F., PETRE A., 2010. *Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants.* Chemosphere 81, 288-293.
- SENCZUK W., 2005. *Toksykologia współczesna.* PZWL, Warszawa.
- TIAN D., LIN Z., DING JQ., YIN D., ZHANG Y., 2012. *Application of the similarity parameter (λ) to prediction of the joint effects of nonequotoxic mixtures.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 62, 195-209.
- TIAN D., LIN Z., YU J., YIN D., 2012. *Influence factors of multicomponent mixtures containing reactive chemicals and their joint effects.* Chemosphere 88, 994-1000.
- VEDAL S., BRAUER M., WHITE R., PETKAU J. 2003. *Air pollution and daily mortality in a city with low levels of pollution.* Environ. Health Perspect. 111, 45-52.
- WALKER C. H., HOPKIN S. P., SIBLY R. M., PEAKALL D. B., 2002. *Podstawy ekotoksykologii.* PWN, Warszawa.
- WANG T., LIN Z., YIN D., TIAN D., ZHANG Y., KONG D., 2011. *Hydrophobicity-dependent QSARs to predict the toxicity of perfluorinated carboxylic acids and their mixtures.* Environ. Toxicol. Pharmacol. 32, 259-265.