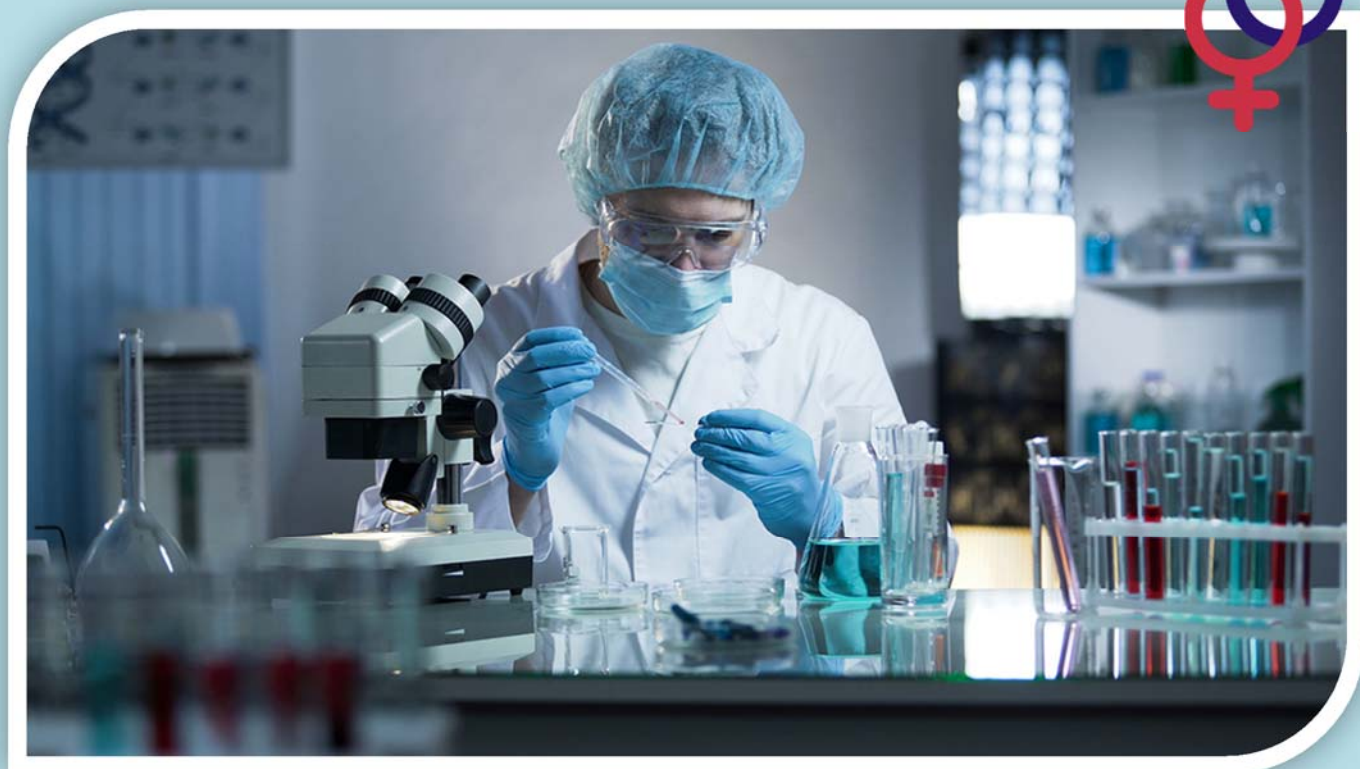


**Katarzyna Miranowicz-Dzierżawska, Lidia Zapór, Jolanta Skowroń,  
Luiza Chojnacka-Puchta, Dorota Sawicka, Lilianna Marciniak**

# **Materiały informacyjne na temat działania łącznego substancji działających szkodliwie na rozrodczość, w tym zaburzających gospodarkę hormonalną organizmu**



*Materiały informacyjne na temat działania łącznego substancji działających szkodliwie na rozrodczość, w tym zaburzających gospodarkę hormonalną organizmu*

*Opracowano i wydano na podstawie wyników V etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (projekt nr II.PB.11 pt. „Ocena działania łącznego w warunkach in vitro wybranych składników produktów przemysłu chemicznego i kosmetycznego działających szkodliwie na rozrodczość, w tym zaburzających gospodarkę hormonalną organizmu”).*

*Koordinator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.*

Autorzy: dr Katarzyna Miranowicz-Dzierżawska, dr Lidia Zapór, dr Jolanta Skowroń,  
dr Luiza Chojnacka-Puchta, dr Dorota Sawicka, techn. Lilianna Marciniak  
Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

Opracowanie redakcyjne:  
redakcja CIOP-PIB

Okładka i skład:  
Anna Borkowska, fot. na okładce motortion/Bigstock

© Copyright by Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy  
Warszawa 2022

**CIOP**  **PIB**

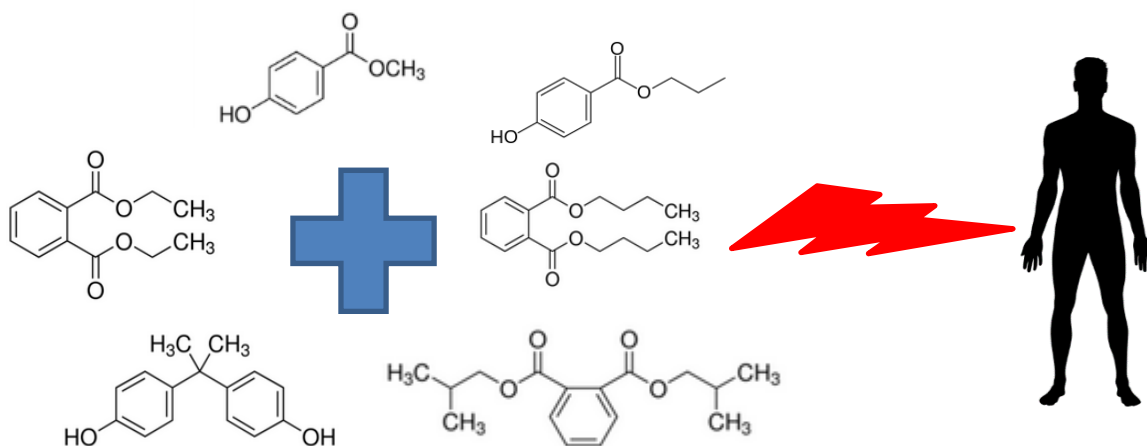
Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Czerniakowska 16, 00-701 Warszawa  
tel. (48-22) 623 36 98, [www.ciop.pl](http://www.ciop.pl)

## Jakie mogą być skutki jednoczesnego narażenia na kilka substancji chemicznych?

Końcowy wynik działania na organizm człowieka „koktajlu” chemikaliów nie musi odzwierciedlać działania poszczególnych składników mieszaniny, gdy organizm jest narażony na nie pojedynczo (osobno), ale może być istotnie zmieniony występującymi interakcjami.

### Co to są interakcje?

Interakcje to wzajemne oddziaływanie kilku substancji chemicznych w obrębie dowolnego układu.



<https://freesvg.org/man-shape>

### Jakie interakcje mogą wystąpić przy narażeniu organizmu na „koktajl” chemikaliów?

Interakcje mogą dotyczyć modyfikacji procesów wchłaniania, rozmieszczenia, wiązania, przemian w organizmie (biotransformacji) i wydalania jednej substancji chemicznej w obecności innej/innych. Takie interakcje noszą nazwę „toksykokinetycznych”.

Interakcje mogą także obejmować wpływ jednego związku na zdolność bądź możliwość drugiego związku do wiązania się z makrocząsteczkami w miejscu działania. Oddziałują też na procesy wstępnego pobudzenia, zmiany działania aż do wystąpienia objawów zatrucia (konkurencyjny wpływ składników mieszaniny na receptor komórkowy, docelowy narząd lub tkankę). Są to interakcje określane mianem „toksykodynamicznych”.

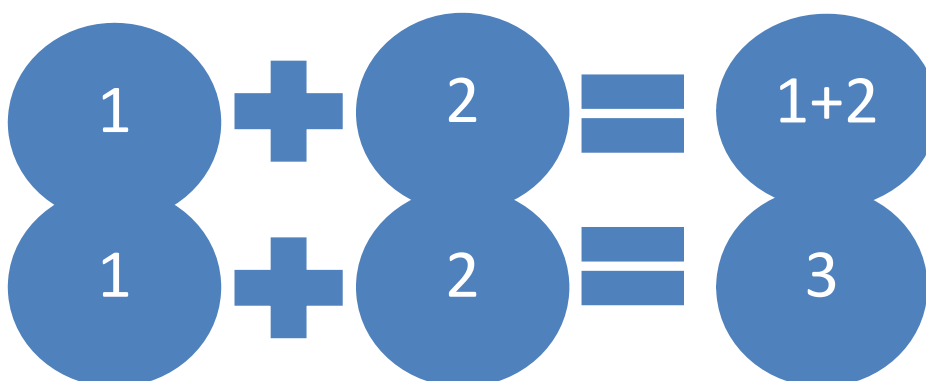
## Jakie rodzaje działania mogą wystąpić przy narażeniu organizmu na „koktajl” chemikaliów?

W przypadku narażenia organizmu na działanie kilku substancji jednocześnie może mieć miejsce kilka sytuacji:

1. każda z substancji chemicznych występuje w dawce lub stężeniu, które nie powoduje możliwego do wykrycia działania niepożądanego w przypadku ekspozycji na tę substancję chemiczną pojedynczo, a ich mieszanina również nie powoduje działania niepożądanego (brak możliwego do zaobserwowania efektu);

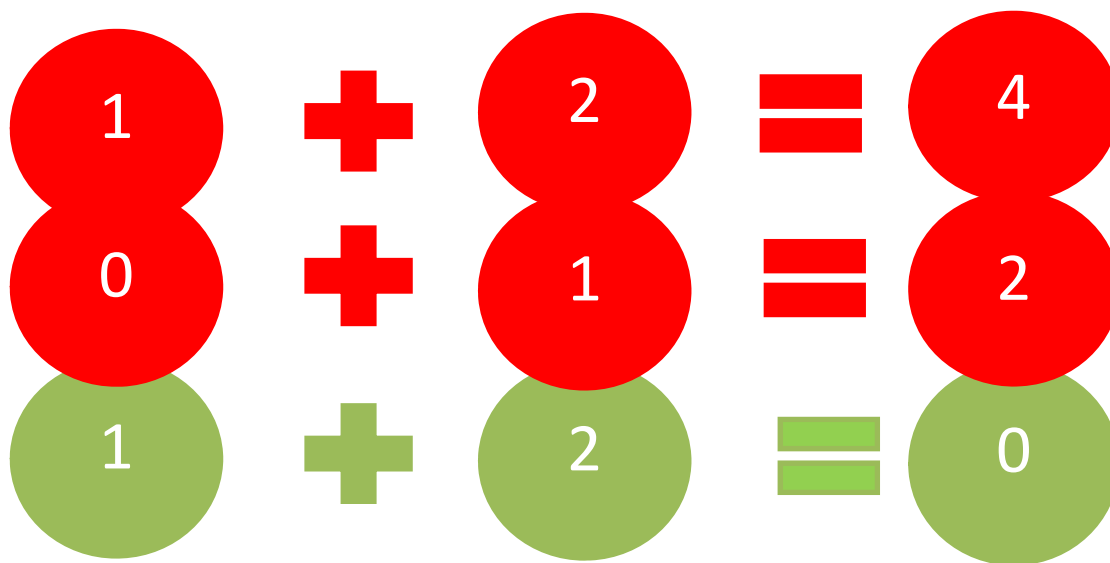


2. każda z substancji chemicznych występuje w dawce lub stężeniu, które albo wywołuje działanie niepożądane w przypadku ekspozycji na tę substancję pojedynczo, albo nie wywołuje takiego działania, natomiast mieszanina tych substancji wykazuje działanie, które można przewidzieć na podstawie zależności dawka-odpowiedź każdej z substancji chemicznych tworzących mieszaninę. Efekt działania takiej mieszaniny może być równoważny sumie odpowiedzi indukowanych przez każdą z substancji chemicznych osobno, w dawce, w której jest ona obecna w mieszaninie (tak dzieje się w przypadku działania niezależnego, określanego również jako „sumowanie odpowiedzi”), lub efektowi jednego z chemikaliów w dawce odpowiadającej sumie dawek wszystkich chemikaliów (tak dzieje się w przypadku efektu addytywnego, określanego też jako „sumowanie dawki”);



3. każda z substancji chemicznych występuje w dawce lub stężeniu, które albo wywołuje działanie niepożądane w przypadku ekspozycji na tę substancję chemiczną pojedynczo, albo nie wywołuje takiego działania, a mieszanina wykazuje działanie, którego nie można przewidzieć na podstawie zależności dawka-odpowiedź każdej z substancji chemicznych – efekt mieszaniny

może być silniejszy (określony mianem **synergizmu**) lub słabszy (**antagonizm**) niż suma efektów każdej substancji chemicznej osobno [Demeneix i Slama, 2019].



### **Cytotoksyczność jakich substancji i mieszanin działających szkodliwie na rozrodczość/zaburzających gospodarkę hormonalną organizmu była badana w ramach projektu II.PB.11?**

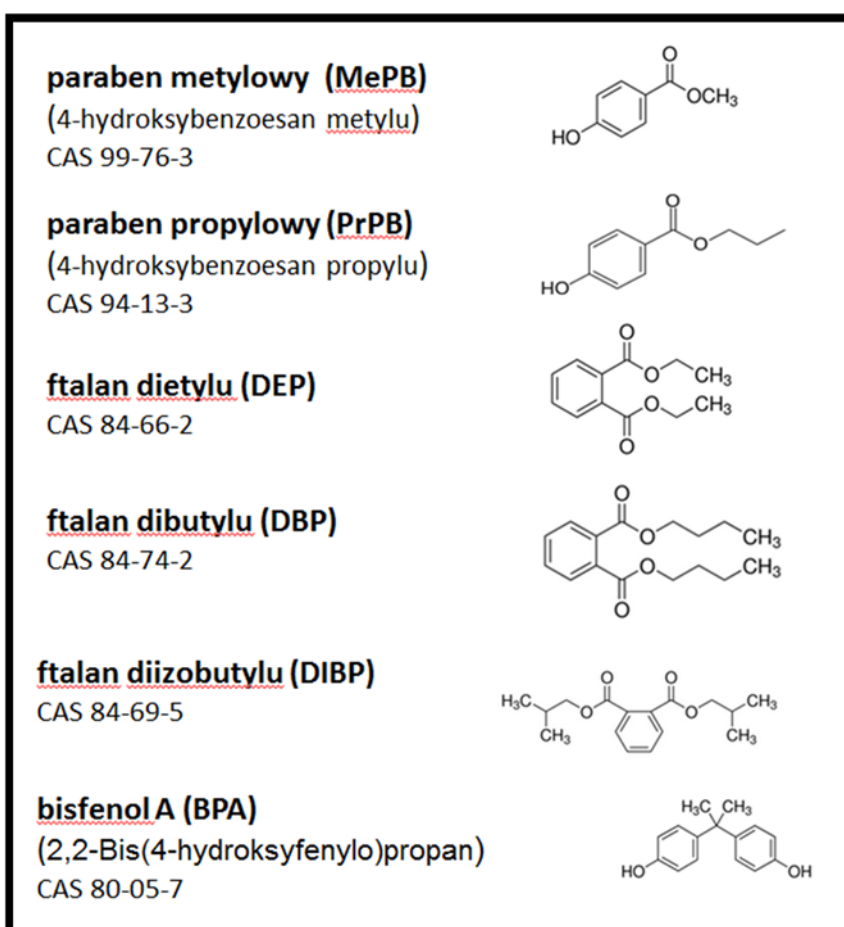
W ramach projektu badano działanie (pojedynczo oraz w dwuskładnikowych mieszaninach) ftalanów: ftalanu dietylu (DEP), ftalanu dibutyłu (DBP) i ftalanu diizobutyłu (DIBP), oraz dwóch parabenów (metyloparabenu – MePB i propyloparabenu – PrPB) (ryc. 1 i 2).

Badane parabeny należą do portfolio najbardziej popularnych i najczęściej stosowanych konserwantów w kosmetykach i/lub lekach [Dębowska, 2016; Muszyński i Ratajczak, 2009], takich jak: kremy, mydła, perfumy i dezodoranty; środki do pielęgnacji włosów, do golenia i depilacji, do makijażu, paznokci oraz środki z filtrami UV. Estry metylowe i propylowe kwasu *p*-hydroksybenzoesowego znalazły też zastosowanie w lekach do oczu w stężeniach 0,065 – 0,15% oraz w maściach i lekach doustnych w stężeniu 0,5%.

Ftalan są stosowane przy produkcji szerokiej gamy produktów przeznaczonych zarówno dla użytkowników zawodowych, jak i ogółu konsumentów, w tym kosmetyków, produktów do higieny osobistej, farmaceutyków, tworzyw sztucznych, tuszów drukarskich, urządzeń medycznych, opakowań do żywności, zabawek dla dzieci oraz środków czyszczących czy materiałów budowlanych, farb, lakierów i klejów. Dodatkowo podczas produkcji, transportu, wyrobu produktów oraz niewłaściwej utylizacji ftalany przenikają do gleby, wody i powietrza, a ponadto ich obecność stwierdzono np. w wielu produktach żywnościowych, co jest związane z migracją tych związków

z opakowań do przechowywanej w nich żywności. Warto podkreślić, że obecność ftalanów, m.in. dietylu (DEP) i dibutyłu (DBP), stwierdzono u ludzi w surowicy krwi (5,71 mg/l), w nasieniu (0,30 mg/l) oraz w tłuszczu (0,72 mg/kg) [Dobrzyńska, 2016]. DBP wykryto również w wodach powierzchniowych w Europie i Stanach Zjednoczonych w stężeniach od 0,01 do 622,9  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  [Wypych, 2004]. Obecność DBP stwierdzono nawet w kurzu domowym na poziomie od 36 do 50 mg/kg [Heudorf i wsp., 2007; Nagorka i wsp. 2010]. Wszystko to sprawia, że dodatkowo zwiększa się narażenie ludzi na działanie ww. ftalanów oraz rośnie niebezpieczeństwo wystąpienia interakcji z innymi, współwystępującymi z nimi w środowisku pracy i życia człowieka substancjami.

Do badań włączono także 4,4'-izopropylidenodifenol (Bisfenol A; BPA), który (podobnie jak DBP) na mocy *Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009* został wprowadzie zakazany w produktach kosmetycznych, ale nadal jest powszechnie stosowany w przemyśle m.in. przy produkcji poliwęglanowych tworzyw sztucznych i żywic epoksydowych, obecnych niemal we wszystkich branżach przemysłu [Dere i wsp., 2018], a także chociażby termicznych paragonów kasowych i biletów [Lee i wsp., 2018], płyt CD i DVD czy puszek do żywności [Rutkowska i wsp., 2018] i w dalszym ciągu zajmuje poczesne miejsce wśród zagrożeń tak dla pracowników, jak i ogółu społeczeństwa.



Ryc. 1. Wzory chemiczne i numery CAS badanych substancji chemicznych

Siłę działania cytotoksycznego badanych substancji aplikowanych na komórki pojedynczo porównano z analogicznym działaniem na te komórki dwuskładnikowych równomolowych (1:1) mieszanin tych związków, a także wybranych mieszanin różnomolowych (w stosunku molowym 1:3 i 3:1).

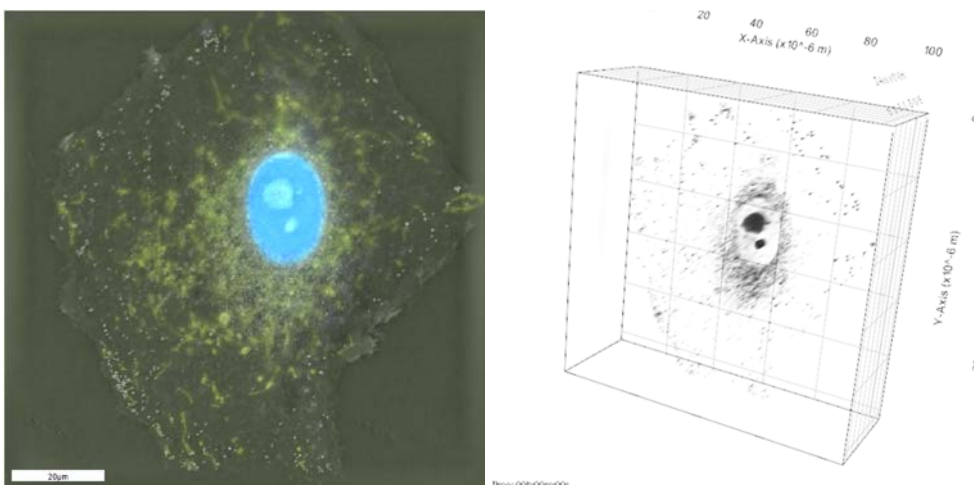
1. DEP+DBP
2. DEP+DIBP
3. DBP+ DIBP
4. DEP+BPA
5. DBP+BPA
6. DIBP+BPA
7. MePB+DEP
8. MePB+DBP
9. MePB+DIBP
10. MePB+BPA
11. PrPB+DEP
12. PrPB+DBP
13. PrPB+DIBP
14. PrPB+BPA
15. MePB+PrPB

Ryc. 2. Badane mieszaniny

## Jakie komórki narażano *in vitro* na działanie badanych substancji (pojedynczo i w dwuskładnikowych mieszaninach)?

Badania wykonano na ssaczych modelach komórkowych:

- linii komórkowej A431 (ATCC® CRL-1555™) wyprowadzonej z ludzkiego raka naskórkowego sromu,
- linii komórkowej A549 (ATCC® CCL-185™) wyprowadzonej z komórek nabłonkopodobnych ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca,
- komórkach linii CHO-9 (ATCC® CCL-61™) wywodzących się z unieśmiertelnionych komórek jajnika chomika chińskiego.



**Ryc. 3.** Prawidłowe komórki A431 (nienarażane) – zdjęcie z mikroskopu holotomograficznego wraz z trójwymiarowym obrazem struktury wewnętrznej. Kolorem zielonym wyznakowano mitochondria, kolorem niebieskim jądra komórkowe. Zdjęcia wykonano pod powiększeniem 60x

### Jakimi testami i na jakiej podstawie ocenialiśmy cytotoksyczność badanych substancji?

Do oceny toksycznego działania badanych związków i ich dwuskładnikowych mieszanin na komórki *in vitro* zastosowano:

- test redukcji soli tetrazolowej MTT określający aktywność metaboliczną komórek (test MTT);
- test pochłaniania czerwieni obojętnej oceniający integralność błon komórkowych (*Neutral Red Uptake Assay*, test NRU);
- test klonogeny (test wydajności tworzenia kolonii - *Colony Forming Efficiency Assay*, test CFEA) oceniający zdolność komórek do proliferacji.

Dla każdej z badanych równomolowych (1:1) dwuskładnikowych mieszanin obliczono indeks synergii (SI) [Suzuki i wsp., 2001], będący stosunkiem obserwowanego (rzeczywistego) efektu działania mieszaniny i efektu oczekiwanego, obliczonego na podstawie efektów wywoływanych przez pojedyncze substancje według wzoru:

$$SI = \frac{E_{A+B} (obs.)}{E_{A+B} (kalk.)}$$

gdzie:

$E_{A+B} (obs.)$  – obserwowany/rzeczywisty efekt działania mieszaniny A+B

$E_{A+B} (kalk.)$  – obliczony/oczekiwany efekt działania mieszaniny A+B na bazie efektów wywoływanych przez pojedyncze substancje.



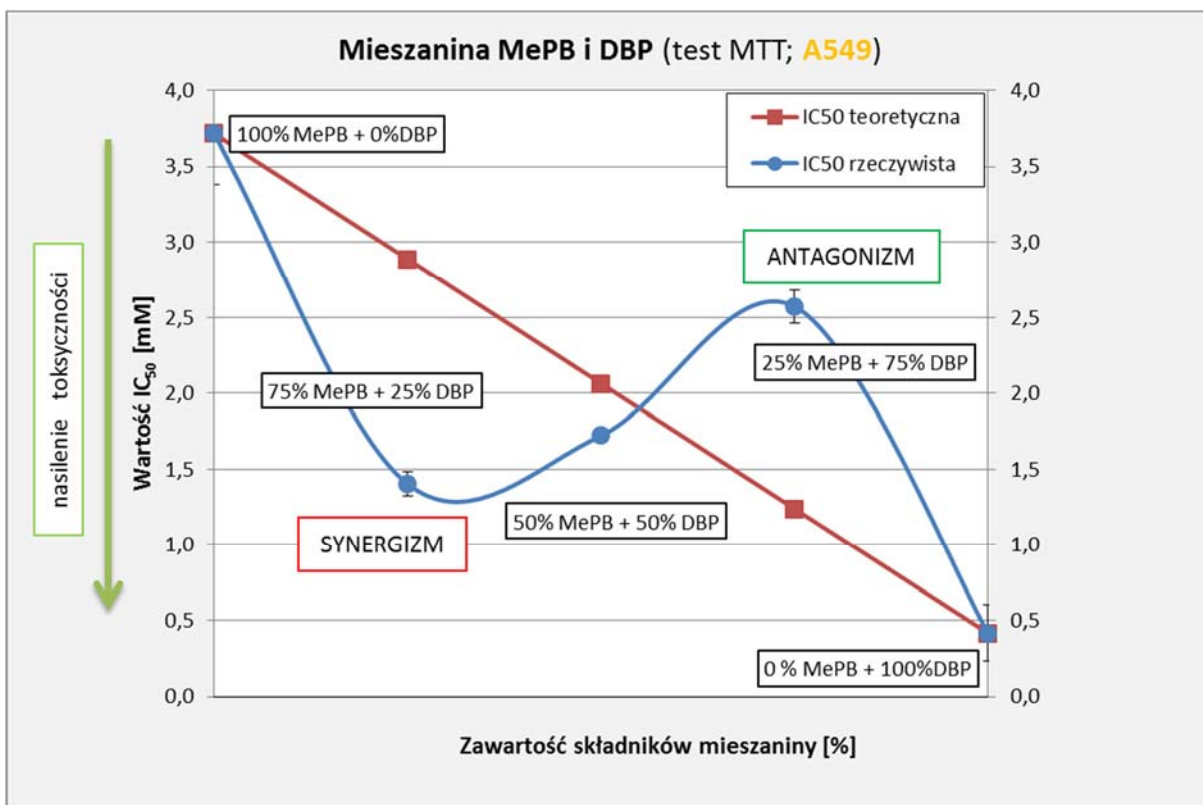
Dla badanych mieszanin równo- i różnomolowych przeprowadzono również analizę graficznych interpretacji efektu łącznego działania mieszanin (wykreślane krzywe noszą nazwę „izoboli”).

## Co stwierdziliśmy badając działanie łączne wybranych ftalanów i parabenów na komórki *in vitro*?

- Dla komórek wszystkich linii komórkowych **najmniej toksycznym** związkiem okazał się metyloparaben (**MePB**). Jedynym wyjątkiem było jego cytotoksyczne działanie na aktywność metaboliczną komórek żeńskiego układu rozrodczego (komórki jajnika chomika chińskiego; CHO-9), które okazało się zdecydowanie silniejsze niż we wszystkich pozostałych badaniach.
- **Największą toksyczność** stwierdzono w testach oceniających aktywność metaboliczną komórek oraz integralność ich błon komórkowych przy narażeniu wszystkich komórek na dwa spośród trzech badanych ftalanów (**DBP** i **DIBP**) oraz bisfenol A (**BPA**) dla komórek A431 i CHO-9. Większą toksyczność względem komórek rozrodczych (w porównaniu z pozostałymi liniami) wykazywał paraben propylu (PrPB).
- Pomędzy badanymi substancjami działającymi szkodliwie na rozrodczość/zaburzającymi gospodarkę hormonalną zaobserwowano interakcje toksykodynamiczne w komórkach wszystkich badanych linii komórkowych – końcowy wynik działania na organizm człowieka „koktajlu” badanych chemikaliów może być istotnie zmieniony występującymi interakcjami.
- Otrzymane wartości współczynników synergii (SI) oraz analiza izobolograficzna wskazują, że między badanymi substancjami działającymi szkodliwie na rozrodczość/zaburzającymi gospodarkę hormonalną w dwuskładnikowych różnomolowych (1:1) mieszaninach może występować zarówno synergizm, jak i antagonizm działania cytotoksycznego.
- **Synergizm** działania cytotoksycznego składników w mieszaninie w zakresie aktywności metabolicznej komórek oraz integralności ich błon komórkowych występuje przy narażeniu komórek **wszystkich badanych linii komórkowych (CHO-9, A431 i A549) na trzy mieszaniny zawierające bisfenol A (BPA):** z ftalanem dietylu (**DEP**), z ftalanem diizobutyli (**DIBP**) i z metyloparabenem (**MePB**).
- Obecność bisfenolu A (**BPA**) w mieszaninach wiąże się z wystąpieniem działania **synergistycznego** w zakresie działania cytotoksycznego ocenianego testem MTT i NRU na komórki wyprowadzone z układu oddechowego człowieka (A549) – zjawisko to było

obserwowane we wszystkich badanych przypadkach bez względu na zawartość BPA w mieszaninie (25%; 50%; 75%).

- Obecność ftalanu dibutyli (**DBP**) w mieszaninach (z wyjątkiem mieszaniny z bisfenolem A) wiąże się z wystąpieniem działania **antagonistycznego** w zakresie cytotoksyczności ocenianej testem MTT i NRU na komórkach wyprowadzonych ze skóry człowieka (A431); zjawisko to było obserwowane w niemal wszystkich przypadkach (poza mieszaniną DBP+DIBP) przy dużej zawartości DBP w mieszaninie (>50%).
- Pomiedzy składnikami mieszanin metyloparabenu i ftalanu dibutyli (**MePB+DBP**) występuje zmiana kierunku interakcji w zakresie działania cytotoksycznego na komórki A549 oraz A431 w zależności od proporcji składników w mieszaninie (wraz ze wzrostem zawartości ftalanu powyżej 50% w mieszaninie zamiast synergizmu działania występuje antagonizm) (ryc. 4).
- Po narażeniu komórek układu rozrodczego na mieszaniny MePB i DBP nie zaobserwowano zmiany kierunku interakcji wraz ze zmianą proporcji składników w mieszaninie.
- Izomeria strukturalna składników mieszaniny wydaje się predysponować ją do wystąpienia antagonizmu pomiędzy składnikami w zakresie działania toksycznego na komórki (substancje będące izomerami: ftalan dibutyli (DBP) i ftalan diizobutyli (DIBP) w mieszaninie równomolowej wykazywały na komórkach A549 i CHO-9 **antagonizm w zakresie działania cytotoksycznego** we wszystkich przeprowadzonych testach (MTT, NRU i CFEA)).
- Komórki układu rozrodczego wydają się bardziej wrażliwe na cytotoksyczne działanie badanych związków niż komórki wyprowadzone z układu oddechowego i skóry.
- Ocena ryzyka przy łącznym narażeniu na badane związki działające szkodliwie na rozrodczość/wpływające na gospodarkę hormonalną organizmu wymaga uwzględnienia możliwości występowania interakcji pomiędzy tymi składnikami mieszanin.



**Ryc. 4.** Graficzna interpretacja efektu łącznego działania metyloparabenu (MePB) i ftalanu dibutyłu (DBP) na komórki A549 ocenianego na podstawie testu MTT w porównaniu z wartościami teoretycznymi

\* - Szczegółowe dane (występowanie interakcji i jej kierunek) dotyczące interakcji poszczególnych substancji działających w mieszaninach dwuskładnikowych na komórki wyprowadzone ze skóry, układu oddechowego oraz układu rozrodczego zostały zamieszczone w Ulotce informacyjnej: „Interakcje w warunkach *in vitro* zachodzące w równomolowych/równotoksycznych (1:1) mieszaninach pomiędzy składnikami produktów przemysłu chemicznego i kosmetycznego działającymi szkodliwie na rozrodczość/ zaburzającymi gospodarkę hormonalną organizmu”.

## Co związane z możliwością występowania interakcji pomiędzy substancjami chemicznymi działającymi szkodliwie na rozrodczość, jak i zaburzającymi gospodarkę hormonalną jest szczególnie niepokojące?

Poszczególne substancje chemiczne same w sobie mogą być nieszkodliwe, ale ich łączne działanie z innymi substancjami może spowodować niebezpieczne skutki (tzw. efekt koktajlu) dla zdrowia. Biorąc pod uwagę możliwość występowania interakcji pomiędzy poszczególnymi składnikami mieszaniny, ocena ryzyka staje się niezwykle złożona.

Niestety dla większości substancji chemicznych działających szkodliwie na rozrodczość, jak i zaburzających gospodarkę hormonalną (tzw. dysruptory endokrynne, EDC) brak jest danych o możliwych interakcjach między nimi w przypadku łącznego narażenia. W dalszym ciągu aktualne są obserwacje Yanga z 1994 roku, że ponad 95% zasobów badań toksykologicznych jest

poświęconych oddziaływaniu pojedynczych związków chemicznych z niemal całkowitym zaniedbaniem badań mieszanin.

Co niezwykle istotne, modyfikacji działania przy narażeniu łącznym na związki zaburzające gospodarkę hormonalną można spodziewać się nawet w dawkach znacznie poniżej poziomu NOAEL (z ang. *no observable adverse effect level* – poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków) [Kortenkamp, 2008].

Trzeba pamiętać, że związki takie mogą kumulować się w tkance tłuszczowej organizmu. Związki te mają tendencję do kumulacji również w tkance tłuszczowej zwierząt, skąd mogą dostawać się do organizmu człowieka będącego ostatnim ogniwem łańcucha pokarmowego. U ludzi obecność dysryptorów endokrynych wykryto i w tkance tłuszczowej, i w płynach ustrojowych: surowicy, moczu, mleku, a nawet płynie owodniowym [Rutkowska i wsp., 2018].

## **Co należy brać pod uwagę przy ocenie ryzyka związanego z łącznym narażeniem na substancje chemiczne?**

Wyniki badań wskazują na możliwość występowania pomiędzy substancjami działającymi szkodliwie na rozrodczość lub zaburzającymi gospodarkę hormonalną organizmu, które mogą znajdować się w składzie powszechnie stosowanych produktów przemysłu, trudnych do przewidzenia – bez badań empirycznych – interakcji, które modyfikują w sposób znaczący nie tylko obraz łącznego narażenia na nie komórki *in vitro*, ale także skutki dla organizmu narażonego na ich mieszaninę człowieka – pracownika przemysłu, a także użytkownika produktu, w którego skład dana mieszanina wchodzi.

Badacze zajmujący się kwestią interakcji chemikaliów wyraźnie podkreślają, że ocena ryzyka związana z oddziaływaniem mieszanin związków chemicznych, oparta na danych dla pojedynczych substancji może prowadzić do niedoszacowania zagrożenia, zatem skutki ich oddziaływania powinny być zawsze szacowane na podstawie badań narażenia łącznego.

## **Bibliografia**

Demeneix B, Slama R (2019) Endocrine Disruptors: from Scientific Evidence to Human Health Protection. Policy Department for Citizens' Rights and Constitutional Affairs. Directorate General for Internal Policies of the Union. PE 608.866, European Union, 2019. [https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2019/608866/IPOL\\_STU\(2019\)608866\\_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2019/608866/IPOL_STU(2019)608866_EN.pdf) (accessed September 25, 2020).

Dere E, Anderson LM, Huse SM, Spade DJ, McDonnell-Clark E, Madnick SJ, Hall SJ, Camacho L, Lewis SM, Vanlandingham MM, Boekelheid K (2018). Effects of continuous bisphenol A exposure from early gestation on 90 day old rat testes function and sperm molecular profiles: A CLARITY-BPA consortium study. *Toxicology and Applied Pharmacology* 347: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.03.021>.

Dębowska R (2016) Konserwanty znane i nieznanne. *Przemysł Farmaceutyczny* 2: 88-94.

Dobrzyńska MM (2016) Phthalates – Widespread Occurrence And The Effect On Male Gametes. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 67(2): 97-103.

Heudorf U, Mersch-Sudermann V, Angerer J (2007). Phthalates Toxicology and Exposure. *Int J Hyg Environ Health.* 210(5): 623-634.

Kortenkamp A (2008) Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology. *International Journal of Andrology* 31: 233–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00862.x>

Lee I, Kim S, Kim KT, Kim S, Park S, Lee H, Jeong Y, Lim JE, Moon HB, Choi K (2018) Bisphenol A exposure through receipt handling and its association with insulin resistance among female cashiers. *Environment International* 117: 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.05.013>

Muszyński Z, Ratajczak M (2009) Konserwacja przeciwdrobnoustrojowa leków. *Farmacja Polska* 65(2): 132-137.

Nagorka R, Conrad A, Scheller C, Süßenbach B, Moriske HJ (2010) Weichmacher und Flammschutzmittel im Hausstaub – Teil 1 Phthalate. *Gefahrstoffe- Reinhaltung der Luft* 70(3): 70-76.

Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych (Dz.Urz. UE L 342 z dnia 22 grudnia 2009 roku; ze zm.).

Rutkowska A, Szczepańska N, Namieśnik J, Rachoń D (2018) Canned food as a source of bisphenol A (BPA) exposure – estimation of consumption among young women from Gdańsk, Poland. *Medycyna Środowiskowa – Environmental Medicine* 21(1): 31-34.

Suzuki T, Ide K, Ishida M. (2001) Response of MCF-7 human breast cancer cells to some binary mixtures of oestrogenic compounds in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 2001 Nov; 53(11): 1549-1554. <https://doi.org/10.1211/0022357011777927>. PMID: 11732758.

Wypych G (2004) Handbook of plasticizers. ChemTech Publishing, Ontario, Canada. *Ecotoxicology* 27: 420–429. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1905-9>.

Yang RSH (1994) Introduction to the toxicology of chemical mixtures. In: R.S.H. Yang (Ed), *Toxicology of Chemical Mixtures: Case Studies, Mechanisms and Novel Approaches*, Academic Press New York, pp. I-10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-768350-8.50007-4>.