

Beata Starek-Świechowicz

Andrzej Starek

ETERY GLIKOLU ETYLENOWEGO I GLIKOLU PROPYLENOWEGO – TOKSYCZNOŚĆ REPRODUKCYJNA I ROZWOJOWA

ETHYLENE GLYCOL AND PROPYLENE GLYCOL ETHERS – REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego / Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland
 Wydział Farmaceutyczny, Zakład Biochemii Toksykologicznej / Faculty of Pharmacy, Department of Biochemical Toxicology

STRESZCZENIE

Etery alkilowe glikolu etylenowego (ethylene glycol alkyl ethers – EGAE) i propylenowego (propylene glycol alkyl ethers – PGAE) są szeroko stosowane w przemyśle i gospodarstwie domowym, głównie jako rozpuszczalniki. Niektóre EGAE wykazują działanie gonadotoksyczne, embriotoksyczne, fetotoksyczne i teratogenne zarówno u ludzi, jak i zwierząt doświadczalnych. Ze względu na szkodliwe działanie tych eterów na rozrodczość i rozwój organizmu EGAE są zastępowane znacznie mniej toksycznymi PGAE. W niniejszej pracy przedstawiono dane na temat mechanizmów toksycznego działania EGAE na komórki rozrodcze, zarodek i płód. Szczególną uwagę zwrócono na metabolizm niektórych EGAE i ich toksyczność narządową, a także na apoptozę spermatocytów związaną ze zmianami ekspresji genów, które kodują czynniki stresu oksydacyjnego, kinazy białkowe i jądrowe receptory hormonów. *Med. Pr.* 2015;66(5):725–737

Słowa kluczowe: etery glikolu etylenowego, etery glikolu propylenowego, toksyczność rozwojowa, mechanizmy toksyczności, toksyczność reprodukcyjna, apoptoza

ABSTRACT

Both ethylene and propylene glycol alkyl ethers (EGAEs and PGAEs, respectively) are widely used, mainly as solvents, in industrial and household products. Some EGAEs demonstrate gonadotoxic, embriotoxic, fetotoxic and teratogenic effects in both humans and experimental animals. Due to the noxious impact of these ethers on reproduction and development of organisms EGAEs are replaced for considerably less toxic PGAEs. The data on the mechanisms of testicular, embriotoxic, fetotoxic and teratogenic effects of EGAEs are presented in this paper. Our particular attention was focused on the metabolism of some EGAEs and their organ-specific toxicities, apoptosis of spermatocytes associated with changes in the expression of various genes that code for oxidative stress factors, protein kinases and nuclear hormone receptors. *Med Pr* 2015;66(5):725–737

Key words: ethylene glycol ethers, propylene glycol ethers, developmental toxicity, mechanisms of toxicity, reproductive toxicity, apoptosis

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Beata Starek-Świechowicz, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydział Farmaceutyczny, Zakład Biochemii Toksykologicznej, ul. Medyczna 8, 30-688 Kraków, e-mail: beata.starek@gmail.com
 Nadesłano: 23 marca 2015, zatwierdzono: 18 sierpnia 2015

WSTĘP

Etery alkilowe glikolu etylenowego (ethylene glycol alkyl ethers – EGAE) i propylenowego (propylene glycol alkyl ethers – PGAE) są produktami addycji odpowiedniego tlenu etylenu i tlenu propylenu z pierwszorzędowymi alkoholami alifatycznymi. Reakcje te przebiegają w warunkach podwyższonego ciśnienia i temperatury oraz w obecności katalizatora. Ponieważ w tych reakcjach dochodzi także do procesu poliaddycji tlenków alkilowych, oprócz eterów monoetylenowych i monopropylenowych powstają również odpowiednie di- i trietery o większych masach cząsteczkowych i mniej-

szej lotności od monomerów. Związki te umownie nazywano eterami serii E i serii P [1].

Do eterów glikolowych serii E należą m.in.:

- metoksyetanol (ethylene glycol methyl ether – EGME) (numer CAS: 109-86-4),
- etoksyetanol (ethylene glycol ethyl ether – EGEE) (110-80-5),
- butoksyetanol (ethylene glycol butyl ether – EGBE) (111-76-2),
- metoksydietanol (diethylene glycol methyl ether – DEGME) (111-77-3),
- etoksydietanol (diethylene glycol ethyl ether – DEGEE) (111-90-0),

- butoksydietanol (diethylene glycol butyl ether – DEGBE) (112-34-5),
- metoksytrietanol (triethylene glycol methyl ether – TEGME) (112-35-6),
- etoksytrietanol (triethylene glycol ethyl ether – TEGEE) (112-50-5),
- n-butoksytrietanol (triethylene glycol butyl ether – TEGBE) (143-22-6),
- octany i dietyry powyższych związków (tab. 1).
Do eterów glikolowych serii P należą m.in.:
- 1-metoksy-2-propanol (2-propylene glycol 1-methyl ether – 2PG1ME) (107-98-2),
- 2-metoksy-1-propanol (1-propylene glycol 2-methyl ether – 1PG2ME) (1589-47-5),
- 3-metoksy-1-propanol (1-propylene glycol 3-methyl ether – 1PG3ME) (1589-49-7),
- 1-etoksy-2-propanol (2-propylene glycol 1-ethyl ether – 2PG1EE) (1569-02-4),
- 1-n-butoksy-2-propanol (2-propylene glycol 1-n-butyl ether – 2PG1nBE) (5131-66-8),
- mieszanina izomerów etoksydipropanolu (dipropylene glycol ethyl ether – DPGEE) (300025-38-8),
- butoksydipropanol (dipropylene glycol butyl ether – DPGBE) (24083-03-2),
- octany i dietyry niektórych z powyższych związków.

Chociaż etery glikolowe są znane od lat 30. XX wieku, to ich powszechne stosowanie datuje się dopiero od lat 70. [1]. Ponad 90% światowej produkcji eterów glikolowych pochodzi z USA i Europy. Amerykańscy producenci tych związków są reprezentowani przez American Chemistry Council (ACC), natomiast europejscy – przez Oxygenated Solvents Producer's Association (OSPA) [2].

Cechą eterów glikolowych jest biodegradowalność oraz mniejsza lotność i palność niż tradycyjnych rozpuszczalników organicznych. Ze względu na strukturę chemiczną etery glikolowe mają właściwości zarówno hydrofilne, jak i lipofilne. Związki te znalazły zastosowanie w przemyśle jako rozpuszczalniki farb, lakierów, barwników, atramentów i czynników adhezyjnych (EGBE, DEGBE, DEGEE, PGME, metoksydipropanol (dipropylene glycol methyl ether – DPGME)), jako składniki preparatów czyszczących (EGBE, DEGBE, PGME, butoksypropanol (propylene glycol butyl ether – PGBE), DPGME, DEGME), kosmetyków (DEGBE, metoksytripropanol (tripropylene glycol methyl ether – TPGME), DPGME), chłodziw (DEGBE, TEGBE) i paliw do silników odrzutowych (DEGME), jako chemikalia rolnicze (EGBE, EGEE, DEGBE, EGME), komponenty płynów hydraulicznych (TEGME,

Tabela 1. Klasyfikacja niektórych eterów alkilowych glikolu etylenowego jako substancji niebezpiecznych [2,5,6]

Table 1. Classification of some ethylene glycol alkyl ethers as hazardous substances [2,5,6]

| Substancja Substance | Niebezpieczne właściwości fizyczne Hazardous physical properties | Toksyczność ostra Acute toxicity | Właściwości żrące i drażniące Corrosive and irritant properties | Toksyczność reprodukcyjna Reproductive toxicity | |
|-------------------------|---|-------------------------------------|--|--|---------------------------|
| | | | | kategoria 2 category 2 | kategoria 3 category 3 |
| EGME | R10 | Xn; R20/21/22 | | T; R60/61 | |
| EGEE | R10 | Xn; R20/21/22 | | T; R60/61 | |
| EGBE | | Xn; R20/21/22 | Xi; R36/38 | | |
| DEGME | | | | | Xn; R63 |
| DEGBE | | | Xi; R36 | | |
| TEGME | | | | | |
| TEGEE | | | | | |
| TEGBE | | | Xi; R41 | | |

EGME – eter metylowy glikolu etylenowego (metoksyetanol) / ethylene glycol methyl ether, EGEE – eter etylowy glikolu etylenowego (etoksyetanol) / ethylene glycol ethyl ether, EGBE – eter butylowy glikolu etylenowego (butoksyetanol) / ethylene glycol butyl ether, DEGME – eter metylowy glikolu dietylenowego (metoksydietanol) / diethylene glycol methyl ether, DEGBE – eter butylowy glikolu dietylenowego (butoksydietanol) / diethylene glycol butyl ether, TEGME – eter metylowy glikolu trietylenowego (metoksytrietanol) / triethylene glycol methyl ether, TEGEE – eter etylowy glikolu trietylenowego (etoksytrietanol) / triethylene glycol ethyl ether, TEGBE – eter butylowy glikolu trietylenowego (butoksytrietanol) / triethylene glycol butyl ether.

Xi – drażniący / irritant, Xn – szkodliwy / harmful, T – toksyczny / toxic.

R10 – palny / flammable, R20 – szkodliwy podczas wdychania / harmful by inhalation, R21 – szkodliwy w kontakcie ze skórą / harmful in contact with skin, R22 – szkodliwy po połknięciu / harmful if swallowed, R36 – drażniący dla oczu / irritating to eyes, R37 – działa drażniąco na układ oddechowy / irritating to respiratory system, R38 – drażniący dla skóry / irritating to skin, R41 – ryzyko poważnego uszkodzenia oczu / risk of serious damage to eyes, R60 – może osłabiać płodność / may impair fertility, R61 – może szkodzić nienarodzonemu dziecku / may cause harm to an unborn child, R63 – możliwe ryzyko szkody dla nienarodzonego dziecka / possible risk of harm to an unborn child, R67 – pary mogą powodować senność i zawroty głowy / vapors may cause drowsiness and dizziness.

DEGEE) oraz półprodukty do syntezy chemicznej (EGEE, DEGEE, PGME) [1]. Ponadto etery glikolowe są składnikami preparatów chemii gospodarczej – w USA ponad połowa spośród 740 produktów przeznaczonych do użytku domowego zawiera EGBE [3].

Produkcja eterów glikolowych jest wielkotonażowa. Ze względu na gonadotoksyczne działanie EGME i EGEE roczne światowe zużycie tych eterów w 2000 r. było 4,4-krotnie mniejsze w stosunku do lat 70. W Europie oba wyżej wymienione etery stanowią mniej niż 5% całkowitego rynku eterów glikolowych, tj. 18 tys. ton/rok. W tym samym czasie produkcja EGBE oraz uważanych za mniej toksyczne eterów glikolu propylenowego wzrosła o 21% [1,4]. W minionej dekadzie roczna produkcja EGBE w Unii Europejskiej przekraczała 1000 ton [4].

Komercyjnie dostępne EGME, EGEE i ich octany oraz izomer β metoksypropanolu (PGME) i jego octan zostały w 1990 r. zaliczone przez Europejską Wspólnotę Gospodarczą do kategorii 2 substancji toksycznych dla rozrodu, natomiast DEGME – do kategorii 3 [5,6].

Zaburzenia etapów rozwoju ontogenetycznego organizmu pod wpływem ksenobiotyków należą do zagadnień toksykologii rozrodu i rozwoju. Narażenie organizmu na ksenobiotyki w okresie życia wewnątrzmacicznego może prowadzić do zmian embriotoksycznych, fetotoksycznych i teratogennych, mieszczących się w pojęciu toksyczności rozwojowej, a także do samoistnych poronień i przedterminowych porodów. Znajomość tych zagadnień ma istotne znaczenie z punktu widzenia higieny pracy i zdrowia środowiskowego.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie toksycznego działania eterów glikolowych na różne etapy rozwoju ontogenetycznego organizmu oraz mechanizmów tego działania.

METODY PRZEGLĄDU

Przeglądu piśmiennictwa dokonano z wykorzystaniem internetowej bibliograficznej bazy MEDLINE oraz multiwyszukiwarki zasobów informacyjnych EBSCO Discovery Service™ (EDS) według następujących słów kluczowych: etery alkilowe glikolu etylenowego, etery alkilowe glikolu propylenowego, otrzymywanie, zastosowanie, gonadotoksyczność, embriotoksyczność, fetotoksyczność, teratologia, toksyczność rozwojowa. Przeгляд publikacji w języku angielskim objął lata 1979–2015. W niniejszej pracy wykorzystano głównie publikacje oryginalne, ale uwzględniono również pojedyncze publikacje poglądowe.

WYNIKI PRZEGLĄDU

Etery alkilowe glikolu etylenowego

Badania epidemiologiczne

W badaniach epidemiologicznych obejmujących grupy robotników narażonych na EGME i EGEE obserwowano zmiany wskazujące na gonadotoksyczne działanie tych związków. Zmiany te objawiały się zmniejszeniem objętości gonad [7], obniżeniem wartości pH nasienia [8], redukcją liczby plemników w ejakulacji oraz wzrostem odsetka plemników o nieprawidłowym kształcie [9]. W badaniu kliniczno-kontrolnym 1019 mężczyzn z zaburzeniami funkcji gonad (wyrażonymi w zmianie wartości 7 parametrów morfologiczno-czynnościowych nasienia) oraz 475 mężczyzn z prawidłową funkcją gonad wykazano obecność w moczu kwasu etoksyoctowego (ethoxyacetic acid – EAA), metabolitu EGEE u 39 osób z grupy badanej i 6 z porównawczej. Iloraz szans (odds ratio – OR) dla narażenia na EGEE wynosił 3,11 ($p \leq 0,004$). Nie wykazano takiej zależności w przypadku kwasu metoksyoctowego (methoxyacetic acid – MAA), metabolitu EGME [10].

Narażenie zawodowe na EGAE może być przyczyną samoistnych poronień. W badaniu kohortowym kobiet zatrudnionych w amerykańskim przemyśle półprzewodników i narażonych na EGAE w miejscu pracy wykazano niewielki wzrost ryzyka samoistnego poronienia – w kohorcie historycznej standaryzowane względne ryzyko (relative risk – RR) z 95-procentowym przedziałem ufności (confidence interval – CI) wynosiło 1,43 (95% CI: 0,95–2,09), natomiast w kohorcie prospektywnej – 1,25 (95% CI: 0,63–1,76) [11]. W podobnym badaniu, przeprowadzonym w brytyjskim przemyśle półprzewodników, nie wykazano podwyższonego ryzyka samoistnego poronienia u kobiet narażonych na rozpuszczalniki organiczne, w tym na EGAE i ich estry [12]. Natomiast w innym badaniu, w kohorcie liczącej 378 kobiet narażonych na EGAE, stwierdzono 93 przypadki samoistnego poronienia na 561 ciąż mnogich. Iloraz szans wystąpienia samoistnego poronienia był statystycznie istotny i wynosił 2,8 (95% CI: 1,4–5,6) [13].

Działanie gonadotoksyczne i jego mechanizmy

Badania doświadczalne, przeprowadzone na myszach, szczurach, królikach i psach, potwierdziły szkodliwe działanie EGAE i ich octanów na układ rozrodczy samców. Działanie to objawiało się zanikiem jąder, redukcją liczby komórek rozrodczych w ich późnym stadium dojrzenia i bezpłodnością [14]. Atrofia jąder, zależna od dawki, była silniej zaznaczona po naraże-

niu na EGME niż EGEE. Octany tych eterów wykazywały słabsze działanie gonadotoksyczne od związków macierzystych, co zapewne wynika z dłuższego szlaku metabolicznego, obejmującego hydrolizę estrów poprzedzającą właściwą aktywację metaboliczną EGAE do odpowiednich kwasów alkoksyoctowych (alkoxyacetic acids – AAA). W obrazie histologicznym gonad obserwowano znaczną redukcję spermatocytów, spermatyd i plemników w nabłonku plemnikotwórczym, natomiast wewnątrz kanalików nasiennych występowały wyłącznie komórki Sertolego. Zmiany te obserwowano u myszy narażonych na stosunkowo wysokie dawki EGAE (250–2000 mg/kg m.c./dzień) przez 5 tygodni [15]. Zsugerowano, że w mechanizmie atrofii jąder istotne znaczenie ma hamujące działanie EGME i EGEE na procesy podziału komórkowego.

Redukcję liczby wczesnych i późnych spermatocytów, zależną od dawki EGME, obserwowano u szczurów po podaniu tego związku w dawkach jednorazowych 100–750 mg/kg m.c. Podanie najwyższej dawki EGME (750 mg/kg m.c.) spowodowało niemal całkowitą utratę spermatocytów we wszystkich stadiach spermatogenezy. Redukcji liczby spermatocytów towarzyszyły spadek stężenia kreatyny w surowicy i testosteronu w gonadach i surowicy oraz kreatynuria [16]. Zmiany te wskazują na zaburzenia syntezy, metabolizmu i sekrecji kreatyny w jądrach szczurów spowodowane przez EGME.

Badania nad szlakiem metabolicznym kreatyny i fosfokreatyny w kanalikach nasiennych sugerują, że fosfokreatyna jest aktywnie wydzielana do płynu obecnego w pęcherzykach nasiennych, w którym występuje również w wysokim stężeniu kreatyna uwalniana z komórek nabłonkowych pod wpływem testosteronu [17]. Zsugerowano, że spadek stężenia testosteronu nie jest wynikiem uszkodzenia komórek Leydiga, których EGME zasadniczo nie uszkadza, ale jest skutkiem pośrednim zaburzenia czynności układu sygnałowego między tymi komórkami a komórkami kanalików nasiennych. W konsekwencji rozwijające się komórki rozrodcze były niedostatecznie zaopatrzone w testosteron [16].

Wyniki dwóch powyższych badań zostały potwierdzone przez Readera i wsp. [18], którzy zaobserwowali spadek stężenia testosteronu w jądrach i jego wzrost w surowicy, podwyższony poziom folitropiny (follicle-stimulating hormone – FSH) w surowicy oraz wzrost poziomu białka wiążącego androgeny (androgen binding protein – ABP) w surowicy szczurów otrzymujących EGME *per os* w dawkach jednorazowych 100–500 mg/kg m.c. Zmiany histopatologiczne w jądrach

w postaci znacznego ubytku spermatocytów i spermatyd, występujące po 16 godz. od podania ksenobiotyku, były poprzedzone spadkiem aktywności 4. izoenzymu dehydrogenazy mleczanowej (lactate dehydrogenase – LDH₄) w jądrach i wzrostem jego aktywności w surowicy krwi. Wskazuje to na cytotoksyczne działanie EGME prowadzące do labilizacji błon komórkowych, zwłaszcza komórek rozrodczych. Zmiany degeneracyjne tych komórek objawiały się kondensacją cytoplazmy i pyknozą jąder komórkowych. W najądrzach obserwowano wyraźnie uszkodzone plemniki, które dotarły z jąder kanalikami nasiennymi.

Dermalne narażenie szczurów samców na EGME w dawkach do 5000 mg/kg m.c./dzień przez 7 kolejnych dni prowadziło do redukcji liczby spermatyd w jądrach oraz spadku liczby plemników i zmian ich morfologii w części ogonowej najądrzy. Konsekwencją tych zmian była atrofia jąder i najądrzy oraz upośledzenie płodności samców przez 1–14 tygodni od zakończenia narażenia [19].

Metoksyetanol już w jednorazowej dawce 250 mg/kg m.c. wywierał gonadotoksyczne działanie u szczurów rasy Sprague-Dawley, wyrażone brakiem spermatocytów w różnych stadiach spermatogenezy oraz spadkiem masy prostaty [20].

Gonadotoksyczne działanie EGEE wykazano u szczurów otrzymujących ten związek drogą pokarmową w dawkach do 400 mg/kg m.c. Zaobserwowano spadek masy jąder, redukcję liczby spermatyd w jądrach oraz liczby plemników ogółem i ich odsetka o prawidłowej morfologii w najądrzach [21,22]. U szczurów narażonych *per os* na EGEE w dawce 400 mg/kg m.c. przez 4 tygodnie obserwowano istotny spadek liczby rozrodczych komórek haploidalnych i wzrost stosunku liczby komórek diploidalnych do tetraploidalnych, co wskazuje na letalne działanie tego związku na pierwotne komórki rozrodcze, takie jak spermatogonia [23]. Zebrane dane wskazują, że EGEE działa silnie toksycznie na spermatogonia i pierwotne spermatocyty [24].

Wykazano również, że młode szczury w okresie dojrzewania płciowego są mniej wrażliwe na gonadotoksyczne działanie EGEE od zwierząt dojrzałych płciowo [25]. Może to być związane z wolniejszą proliferacją i wolniejszym metabolizmem energetycznym w komórkach rozrodczych zwierząt młodych w porównaniu ze zwierzętami dojrzałymi płciowo. Uważa się, że AAA (główne metabolity EGAE) wywierają toksyczne działanie głównie na komórki szybko dzielące się, o dynamicznym metabolizmie energetycznym, występujące w jądrach i grasicy, a także w płodzie [26].

W warunkach powtarzanego narażenia szczurów na EGAE spadek masy jąder, najądrzy i prostaty korelował z wysokością dawek EGME. Takiej korelacji nie obserwowano w przypadku narażenia zwierząt na EGEE [27].

W badaniach *in vivo* i *in vitro* wykazano, że same AAA powodują degenerację i utratę spermatoctów i spermatyd oraz zaburzają proces ich dojrzewania. Stwierdzono, że siła gonadotoksycznego działania MAA, EAA i kwasu butoksyoctowego (butoxyacetic acid – BAA), metabolitu EGBE, maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego [28].

Zwrócono uwagę na udział procesów oksydacyjnych, w tym peroksydacji lipidów, w mechanizmie gonadotoksycznego działania EGAE. W jądrach szczurów otrzymujących EGEE *per os* w dawkach 200 mg/kg m.c. i 400 mg/kg m.c. przez 14 dni obserwowano spadek stężenia zredukowanego glutationu (reduced glutathione – GSH), aktywności katalazy (catalase – CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (superoxide dismutase – SOD) oraz wzrost aktywności S-transferazy glutationowej (glutathione S-transferase – GST), dehydrogenazy mleczanowej (lactate dehydrogenase – LDH) i stężenia dialdehydu malonowego (malondialdehyde – MDA), produktu peroksydacji lipidów.

Z kolei w plemnikach narażanych zwierząt wykazano spadek aktywności CAT, GST i LDH oraz stężenia witaminy C i GSH oraz wzrost aktywności SOD i stężenia MDA [22]. W innym badaniu u szczurów narażonych drogą podskórną na EGAE wykazano spadek stężenia związków tiolowych w jądrach, korelujący z wysokością dawek EGME, ale nie EGEE. Ponadto obserwowano zmiany aktywności peroksydazy glutationowej (glutathione peroxidase – GPx) przy braku zmian stężenia MDA [27].

W badaniach molekularnych potwierdzono zaburzenia równowagi oksydacyjnej w spermatoctach i komórkach Sertolego w wyniku działania EGME i MAA. W spermatoctach obserwowano regulację w górę specyficznego tiolowego białka antyoksydacyjnego oraz regulację w dół polopodobnej kinazy 1 (polo-like kinase – Plk 1). W komórkach Sertolego doszło do indukcji białka stresu oksydacyjnego homologicznego z białkiem A-170 oraz do represji fosfodiesterazy 3',5'-cAMP [29]. Polopodobna kinaza 1 odgrywa istotną rolę w procesie mejozy jako regulator organizacji mikrotubul i tworzenia wrzeciona kariokinetycznego. Spadek ekspresji tego białka może wskazywać na uszkodzenie DNA i dezorganizację wrzeciona mitotycznego. Białko A-170 jest w 90% identyczne z biał-

kiem p62, które jest czułym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego [26].

W mechanizmie gonadotoksycznego działania EGAE istotny jest proces apoptozy eliminujący uszkodzone komórki rozrodcze z nabłonka plemnikotwórczego [30]. Już po 18 i 24 godz. od podania EGME *per os* w jednorazowej dawce 200 mg/kg m.c. dojrzalym płciowo szczurom F344 obserwowano degenerację spermatoctów i fragmentację jądrowego DNA w tych komórkach. Podobne zmiany z wyraźnymi cechami morfologicznymi apoptozy wykazano w komórkach jąder świnek morskich otrzymujących EGME w takiej samej dawce jak szczury przez 3 kolejne dni. Ponadto stwierdzono, że fragmentacja DNA jest podobna do tej występującej pod wpływem działania endonukleazy. Zasugerowano udział tego enzymu w procesie apoptozy indukowanej przez EGME [31].

Apoptozę spermatoctów w różnych stadiach spermatogenezy obserwowano również w badaniu *in vitro* kultur komórek kanalików nasiennych pobranych od 25-dniowych szczurów. Kultury te poddawano działaniu MAA w stężeniu odpowiadającemu toksycznemu poziomowi tego metabolitu w osoczu krwi (5 mM). Badania immunochemiczne wykazały wzrost ekspresji kilku kinaz białkowych w komórkach Sertolego, otaczających apoptotyczne spermatocty, 16 godz. po narażeniu na MAA. Zaobserwowano istotny wzrost aktywności niektórych kinaz: kinazy białkowej A (protein kinase A – PKA), 3 izoform (μ , ζ , γ) kinazy białkowej C (protein kinase C – PKC), kinazy lekkiego łańcucha miozyny (myosin light chain kinase – MLCK) i kalmodulinowej kinazy II (calmodulin kinase II – CaMK II). Izofomy PKC uczestniczą w różnych czynnościach komórki, takich jak proliferacja komórkowa, promocja nowotworowa i apoptoza. Wykazano również, że MAA kilkakrotnie zwiększała inkorporację ortofosforanu (^{32}P) do fosfoproteiny regulowanej przez endoplazminę (glucose-regulated protein 94 – Grp94). Białko to jest substratem kazeinowej kinazy II regulowanej przez glukozę zlokalizowanym w retikulum endoplazmatycznym. Indukcję Grp94 obserwowano m.in. pod działaniem jonoforów Ca^{2+} , stresu oksydacyjnego i inhibitorów topoizomerazy [32]. Stres oksydacyjny indukowany przez MAA prawdopodobnie nasila syntezę i fosforylację Grp94. Ponadto wykazano, że inhibitory kinaz białkowych (m.in. chlorowodorek N-[2-aminoetylo]-5-izochinoliniosulfonamidu i genisteina) przeciwdziałały apoptozie indukowanej przez MAA, co potwierdziło udział tych białek w programowanej śmierci komórki [32].

Kwas metoksyoctowy zwiększa aktywność transkrypcyjną receptorów jądrowych, takich jak receptor progesteronowy, estrogenowy i androgenowy (androgenic receptor – AR). Wykazano, że MAA moduluje ekspresję AR i zwiększa stężenie białka wiążącego androgeny (ABP) w komórkach Sertolego [32]. Białka te odgrywają kluczową rolę w procesach przeżywania i dojrzewania spermatocytów [33]. W kanalikach nasienych szczurów, pod działaniem MAA, obserwowano szybki spadek stężenia mRNA dla receptora androgenowego w spermatocytach w stadiach VII–VIII spermatogenezy oraz istotny wzrost ekspresji tego białka w stadiach III–IV i X–XIII. Również ekspresja ABP była modulowana w sposób zależny od stadium spermatogenezy. Uważa się, że zmiany powodowane przez MAA mogą przyczynić się do apoptozy komórek rozrodczych [33].

Badania genetyczne RNA pobranego z jąder szczurów otrzymujących EGME w dawce 2000 mg/kg m.c. wykazały indukcję 71 genów i supresję 54. Geny te były związane m.in. z takimi procesami, jak spermatogeneza, apoptoza, transdukcja sygnałów, transkrypcja i aktywność enzymatyczna [34]. Indukowanymi genami, związanymi ze spermatogenezą, były: białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 3 (insulin-like growth factor binding protein 3 – IGFBP-3), S-transferazy glutationowe Yb i Pi, syntaza glutationowa i białko szoku termicznego (heat-shock protein-2 – HSP70-2). Białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 3 hamuje aktywność insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (insulin-like growth factor 1 – IGF-1) i czynnika promującego spermatogenezę, natomiast HSP70-2 odgrywa krytyczną rolę w samej spermatogenezie. Wykazano, że myszy pozbawione genu kodującego to białko są bezpłodne [35].

Indukowany przez EGME stres oksydacyjny, wyrażony spadkiem stosunku stężenia glutationu zredukowanego do disulfidu glutationu (glutathione reduced/glutathione disulphide – GSH/GSSG) [36], prowadził do wzrostu ekspresji i aktywacji czynników proapoptotycznych Bak i Bax, białek z rodziny Bcl-2 [26]. Dimeryzacja Bak i Bax ułatwia uwalnianie z mitochondriów cytochromu c, co skutkuje aktywacją prokaspazy 9 do kaspazy 9, a następnie aktywacją kaspazy 3 i apoptozą [37]. Świadczy to o tym, że apoptoza indukowana przez MAA przebiega na szlaku mitochondrialnym [26,37].

Toksyczność rozwojowa i jej mechanizmy

W badaniu *in vitro* kultury zarodków królika wykazano, że MAA, główny metabolit EGME, w stężeniu 5 mM indukował nieprawidłowości rozwojo-

we u 100% badanych zarodków. Również płody królika okazały się bardzo wrażliwe na toksyczne działanie tego metabolitu [38]. W innym badaniu *in vitro* [39] wykazano, że AAA wywierają teratogenne działanie na postimplantacyjne (9,5-dniowe) zarodki szczura w warunkach 48-godzinnego narażenia. Kwas metoksyoctowy i EAA (5 mM) opóźniały rozwój zarodków i indukowały w nich makroskopowe wady strukturalne. Z kolei kwas propoksyoctowy (propoxyacetic acid – PAA) i BAA (5 mM) były wyraźnie mniej teratogenne – powodowały tylko drobne zmiany strukturalne zarodków. Wyniki powyższego badania wskazują na to, że działanie embriotoksyczne i teratogenne AAA maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego tych metabolitów [39]. Podobną zależność wykazano w przypadku innych kwasów alkoksyalkilokarboksyłowych, takich jak kwas 3-metoksypropionowy i 4-metoksymasłowy oraz EGAE *in vivo* [40].

Podanie MAA ciężarnym samicom szczurów dootrzewnowo w jednorazowych dawkach 0,1–2,5 mM/kg m.c. w 8., 10., 12. lub 14. dniu ciąży powodowało śmierć części zarodków oraz zmiany teratogenne u potomstwa. Najczęściej obserwowanymi wadami rozwojowymi były wodogłowie i rozstrzeń miedniczek nerkowych. Częstość występowania tych zmian zależała od dawki MAA i wieku ciążowego. Wraz z czasem trwania ciąży liczba żywych płodów rosła, a liczba płodów z wadami rozwojowymi oraz odsetek resorpcji, deformacji i płodów z niecałkowitym kostnieniem malały. Wyniki te świadczą o ochronnym działaniu wieku ciążowego na płód [41].

U ciężarnych samic szczurów rasy Sprague-Dawley, otrzymujących EGEE lub jego octan na skórę grzbietu w dawce 0,9 mM/kg m.c. 4 razy dziennie między 7. a 16. dniem ciąży, wykazano wyraźną toksyczność rozwojową objawiającą się obniżoną masą płodów, spadkiem liczby żywych płodów w miotach oraz niemal całkowitą resorpcją martwych płodów. Równocześnie zaobserwowano deformacje trzewiowe i zmiany w układzie kostno-szkieletowym wskazujące na teratogenne działanie badanych związków. Wady rozwojowe obejmowały układ sercowo-naczyniowy, nerki (wodonercze, wodniak moczowodu), mózg (wodogłowie, krwotoki), narząd wzroku (mikroftalmia, nieprawidłowy nerw wzrokowy, pofałdowana siatkówka) i jądra (jądra niezstąpione, ageneza). Zmiany szkieletowe w postaci opóźnionego kostnienia dotyczyły żeber i kręgosłupa. U potomstwa samic narażonych na EGEE lub eter monoetylowy glikolu dietylenowego nie zaobserwowano żadnych zmian rozwojowych [42].

Metoksyetanol podawany myszom w różnych okresach ciąży powodował dwufazowe zaburzenia rozwojowe zależne od dawki ksenobiotyku. Pierwsza faza związana z deformacją przedniej cewy nerwowej występowała w 7–9. dniu ciąży. Druga faza, obserwowana w 11. lub 12. dniu ciąży, cechowała się zaburzeniami procesu różnicowania się palców przednich i tylnych kończyn [43].

Ciężarne króliki nowozelandzkie, myszy CF-1 i szczury F344 narażano na pary EGME o stężeniu 0 mg/m³, 9 mg/m³, 30 mg/m³ lub 150 mg/m³ odpowiednio między 6. a 18. lub 6. a 15. dniem ciąży. U płodów królików narażonych na najwyższe stężenie EGME (150 mg/m³) obserwowano resorpcję płodów, obniżoną masę płodów i wady wrodzone. U szczurów i myszy nie wykazano zmian teratogennych, co wskazuje na różnice międzygatunkowe we wrażliwości tych zwierząt na ten związek [44].

Potencjał teratogeny EGME oceniono u naczelnych nieczłekokształtnych (*Macaca fascicularis*), które narażano na ten związek drogą pokarmową w okresie organogenezy (20–45. dzień ciąży). Metoksyetanol w dawce 0,32 mM/kg m.c. i 0,47 mM/kg m.c. (18 mg/kg m.c. i 35,8 mg/kg m.c.) powodował śmierć zarodków, a w dawce 0,16 mM/kg m.c. (9 mg/kg m.c.) samoistne poronienia. Kwas metoksyoctowy kumulował się w organizmie matek (biologiczny okres półtrwania (biological half-life – $t_{1/2}$) wynosił ok. 20 godz.) i pokonywał barierę łożyskową. Zbadano, że występował w zarodkach i płynie owodniowym w stężeniach podobnych jak w surowicy ciężarnych samic. Ponadto zaobserwowano wysokie stężenia MAA w woreczku żółtkowym [45].

W innym badaniu porównawczym nad teratogenym działaniem EGAE u szczurów narażonych na te związki przez 7 godz./dzień między 7. a 15. dniem ciąży stwierdzono, że EGME był silnie embriotoksyczny (100% resorpcji płodów przy stężeniu 600 mg/m³), obniżał masę płodów i indukował wady rozwojowe w układzie sercowo-naczyniowym i kostnym przy stężeniach 300 mg/m³ i 150 mg/m³. Octan EGEE w stężeniu 3084 mg/m³ powodował całkowitą resorpcję płodów, w stężeniu 2000 mg/m³ obniżał masę płodów i indukował wady rozwojowe układu sercowo-naczyniowego i kostnego, natomiast w stężeniu 670 mg/m³ nie wywoływał żadnych istotnych zmian u płodów. Z kolei EGBE w stężeniu 1000 mg/m³ nie wykazywał działania teratogenne [40].

W badaniu wielopokoleniowym, w którym myszy rasy Swiss CD-1 obojga płci narażano na EGBE w wodzie do picia w dawkach 700 mg/kg m.c./dzień,

1300 mg/kg m.c./dzień lub 2100 mg/kg m.c./dzień przez 105 dni nie zaobserwowano gonadotoksycznego działania tego eteru u samców pokolenia F₀ i F₁. Eter ten w 2 najwyższych dawkach (1300 mg/kg m.c./dzień i 2100 mg/kg m.c./dzień) spowodował śmierć odpowiednio 30% i 59% samic pokolenia F₀. W obu grupach zaobserwowano spadek liczby miotów ogółem, żywych noworodków ogółem, żywych noworodków w miotach, obniżoną masę ciała żywych noworodków oraz wzrost liczby noworodków martwych. U samic pokolenia F₀ narażenie na EGBE w dawce 1300 mg/kg m.c./dzień skutkowało wydłużeniem cyklu estralnego, wyraźnym spadkiem płodności i masy ciała oraz wzrostem względnej masy wątroby i stosunku masy nerek do nadnerczy. U samic pokolenia F₁ nie wykazano zaburzeń płodności lub zmian fetotoksycznych. W grupie samic pokolenia F₁ przyjmujących EGBE w dawce najniższej (700 mg/kg m.c./dzień) obserwowano jedynie wydłużenie cyklu estralnego, wzrost względnej masy wątroby i stosunku masy nerek do nadnerczy [46]. Należy jednak zwrócić uwagę na stosunkowo wysokie dawki EGBE stosowane w powyższym badaniu.

Narażenie ciężarnych samic szczurów szczepu F344 i królików nowozelandzkich na pary EGBE w stężeniach 0–1000 mg/m³ odpowiednio w 6–15. i 6–18. dniu ciąży prowadziło do wyraźnej toksyczności rozwojowej w postaci zwiększonej liczby resorpcji, spadku liczby żywych płodów i opóźnienia procesu kostnienia. Zmiany te występowały przy najwyższych stężeniach EGBE, tj. 500 mg/m³ i 1000 mg/m³. U płodów nie wykazano zmian teratogennych [47].

Teratogenne działanie EGME jest wynikiem aktywacji metabolicznej tego związku do MAA w tkankach matki i płodu. Samice szczurów rasy Sprague-Dawley otrzywały *per os* [1,2-etylo-¹⁴C]ME w jednorazowej dawce 150 mg/kg m.c. w 13. dniu ciąży. W pierwszej dobie po podaniu znakowanego EGME stwierdzono w moczu samic obecność m.in. MAA, N-metoksyacetyloglicyny, glikolu etylenowego i niezmetylizowanego EGME (odpowiednio: 13,5%, 4,9%, 0,9% i 0,6% podanej dawki). Względny procentowy udział tych metabolitów i związku macierzystego w ich całkowitej masie wynosił odpowiednio: 67,8%, 24,6%, 4,5% i 3%. W surowicy samic stężenia MAA i innych metabolitów osiągały wartości maksymalne w 6. godz. po podaniu znakowanego związku macierzystego. W tym samym czasie stężenia MAA w płodach i płynie owodniowym były najwyższe i przewyższały o rząd wielkości stężenia pozostałych metabolitów. We krwi samic i w tkankach płodów wykazano obecność adduktów metoksy-

acetaldehydu (methoxyacetaldehyde – MALD) z białkami. Na podstawie uzyskanych wyników zasugerowano, że MAA powstający w wątrobie pokonuje barierę łożyskową i wykazuje działanie embriotoksyczne i fetotoksyczne. Z kolei MALD po przejściu przez łożysko tworzy addukty z białkami zarodka i płodu [48].

Wykazano, że utlenianie EGME przy udziale dehydrogenazy alkoholowej (alcohol dehydrogenase – ADH) i dehydrogenazy aldehydowej (aldehyde dehydrogenase – ALDH) jest warunkiem wstępnym do wystąpienia embriotoksycznego i teratogenego działania tego eteru. O ile MAA jest stabilnym metabolitem, o tyle MALD cechuje się niską trwałością ze względu na wysoką reaktywność chemiczną. Reaguje on bezpośrednio z białkami, tworząc addukty o charakterze zasad Schiffa, a także szybko ulega enzymatycznemu utlenieniu do MAA. Podanie MALD *per os* ciężarnym myszom w jednorazowej dawce 1 mM/kg m.c. w 11. dniu ciąży prowadziło do wystąpienia jego maksymalnego stężenia w osoczu już po 30 min. Stężenie to utrzymywało się na stałym poziomie przez dalsze 90 min. Zarówno w zarodkach, jak i w płynie owodniowym stężenia MAA były najwyższe po 2 godz. od podania MALD i przewyższały o 50% stężenia stwierdzone w osoczu samic [49]. W tkankach zarodka nie występuje ADH, w przeciwieństwie do ALDH [41], natomiast w wątrobie u większości gatunków wykazano obecność zarówno ADH, jak i ALDH [50], więc MAA może być pochodzenia wątrobowego i częściowo zarodkowego i płodowego.

Za udziałem obu dehydrogenaz NAD-zależnych w aktywacji metabolicznej EGME przemawiają wyniki badań nad hamowaniem aktywności ADH za pomocą 4-metylopirazolu. Podanie tego inhibitora przed narażeniem na EGME wyraźnie osłabiało jego teratogenne działanie wyrażone deformacją palców [49]. Podanie etanolu łącznie z EGME albo po 5 lub 10 godz. od podania metoksyetanolu hamowało teratogenne działanie EGME, ponieważ etanol jest konkurencyjnym substratem dla ADH, która metabolizuje metoksyetanol [51]. Postawiono tezę, że octan jako metabolit etanolu i analog strukturalny MAA może konkurować z kwasem metoksyoctowym w reakcjach odpowiedzialnych za jego toksyczność rozwojową [49].

W badaniach metabolicznych z zastosowaniem [1,2-¹⁴C]-2-EGME wykazano inkorporację znacznika do makrocząsteczek zarodka. Ponadto samice wydychały ok. 6% ¹⁴CO₂ w przeliczeniu na teratogenną dawkę EGME [52,53]. Kiedy MAA znakowany na węglu C-1 i C-2 wprowadzono do kultury zarodków myszy, również obserwowano powstawanie ¹⁴CO₂. Z ko-

lei MAA znakowany na grupie metylowej nie był źródłem znakowanego ditlenku węgla. Dodatek octanu do hodowli zarodków myszy wyraźnie hamował powstawanie CO₂ z MAA. Również fluorooctan, inhibitor akonitazy, wyraźnie blokował powstawanie CO₂ ze znakowanego ¹⁴C octanu i 1-¹⁴C-MAA w sposób zależny od dawki. Wyniki te wskazują, że MAA ulega przemianie na szlaku kwasów trikarboksylowych (w cyklu Krebsa), który jest źródłem CO₂ [53]. Zasugerowano, że MAA ulega bioaktywacji do tioestru w wyniku połączenia z koenzymem A, tworząc jako aktywny produkt metoksyacetylo~CoA. Proces ten jest analogiczny do przemiany octanu do acetylo~CoA, który następnie ulega włączeniu do przemian w cyklu Krebsa. Bioaktywację MAA do formy reaktywnej metabolicznie potwierdza sprzężanie tego metabolitu z glicyną i tworzenie metoksy-N-acetyloglicyny, która należy do polarnych metabolitów EGME występujących w moczu. Proces ten wymaga udziału odpowiedniej acylotransferazy, koenzymu A i cząsteczki ATP [53].

Stwierdzono również, że proste związki przenoszone w postaci reszt jednowęglowych przy udziale formylotransferazy i tetrahydrofolianu (THF) jako jej koenzymu uczestniczą w biosyntezie puryn i tyminy, niezbędnych do syntezy DNA [53]. Syntaza tymidylanowa oprócz grupy formylowej wymaga również udziału THF jako donora wodorów do redukcji formylu do grupy metylowej. Takie związki jak mrówczan, octan, glicyna i D-glukoza, jako donory grupy formylowej, przeciwdziałały powstawaniu wad rozwojowych indukowanych przez MAA [54]. Zwrócono również uwagę na rolę seryny jako donora grupy formylowej. Seryna jest źródłem niemal połowy reszt jednowęglowych niezbędnych dla rozwijającego się zarodka [51]. Innym potencjalnym czynnikiem ochronnym przed teratogennym działaniem MAA jest sarkozyna (N-metyloglicyna) jako prekursor glicyny. Doświadczalne dane wskazują, że glicyna, seryna i sarkozyna przeciwdziałają powstawaniu indukowanych przez MAA wad rozwojowych palców u myszy. Seryna szczególnie skutecznie chroniła zwierzęta przed atrofią gonad i redukcją ilości nasienia. Skuteczność ochronnego działania wymienionych aminokwasów zależała m.in. od ich dawki i czasu, jaki upłynął od podania EGME [51]. Cytowane piśmiennictwo potwierdza hipotezę, że proste fizjologicznie aktywne związki wydają się konkurować jako substraty enzymatyczne z produktami biotransformacji EGME odpowiedzialnymi za toksyczność reprodukcyjną i rozwojową.

Komunikacja międzykomórkowa prawdopodobnie odgrywa istotną koordynującą rolę w morfogenezie. Blokadę specyficznego rodzaju komunikacji międzykomórkowej, pośredniczonej poprzez połączenia szczelinowe (gap junctions), zaproponowano jako mechanizm działania niektórych teratogenów, w tym także EGME i EGEE. Ponieważ obydwie te związki wykazują słabe działanie genotoksyczne, zasugerowano, że są za nie odpowiedzialne mechanizmy błonowe prowadzące do przerwania komunikacji typu komórka–komórka [55].

Etery alkilowe glikolu propylenowego

Etery glikolowe serii P cechują się stosunkowo niewielkim spektrum toksycznego działania (tab. 2). Pod względem ostrego działania toksycznego związki te znajdują się na ogół poza klasyfikacją (wartości $LD_{50} > 2000$ mg/kg m.c.). Metoksypropanol w warunkach powtarzanego narażenia nie obniżał masy jąder i grasicy ani nie redukował liczby limfocytów we krwi obwodowej, tak jak EGME [56]. Podczas przewlekłego, 2-letniego narażenia myszy szczepu B6C3F1 i szczurów szczepu F344 na PGME nie wykazano związanych z narażeniem istotnych zmian patologicznych oraz działania rakotwórczego. Jedynymi widocznymi zmianami były indukcja enzymów metabolizujących w wątrobie i nefropatia specyficzna dla samców szczurów [57].

W badaniu dwupokoleniowym szczury narażano na PGME w stężeniach do $11\ 250$ mg/m³ podczas kojarzenia, ciąży i laktacji. Przy najwyższym stężeniu ($11\ 250$ mg/m³) obserwowano zmniejszenie liczby potomstwa w mio-

tach i jego wskaźnika przeżycia w okresie okołoporodowym, opóźnienie dojrzewania płciowego oraz zmiany histologiczne w wątrobie i grasicy. U zwierząt narażonych na niższe stężenie tego związku (3750 mg/m³) nie wykazano żadnych zmian patologicznych [58].

W rutynowych badaniach nad fetotoksycznym i teratogennym działaniem PGBE i DPGBE nie stwierdzono zmian takich wskaźników, jak liczba żywych płodów w miocie, liczba resorpcji (straty poimplantacyjne) w miocie, stosunek płci płodów i masa ciała płodów. Nie zaobserwowano również związanych z narażeniem zmian w układzie kostnym ani wad rozwojowych w trzewiach [59]. Najwyższy poziom bez obserwowanego działania szkodliwego (no-observed-adverse-effect level – NOAEL) dla eteru n-propylenowego glikolu propylenowego (propylene glycol n-propyl ether – PGPE), PG1BE i DPGBE w odniesieniu do toksyczności rozwojowej jako efektu krytycznego u szczurów oszacowano odpowiednio na poziomie 3624 mg/m³ i powyżej 1 ml/kg m.c. (zarówno dla PG1BE, jak i DPGBE), a u królików na poziomie 7248 mg/m³ i powyżej 100 mg/kg m.c. (zarówno dla PGPE, jak i PG1BE) [6].

Brak toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej PGAE wynika z ich struktury chemicznej i kierunku przemian metabolicznych, odmiennych od przemian EGAE. W procesie syntezy tych eterów powstają 2 izomery o różnej rzędowości węgla wiążącego grupę hydroksylową. Izomer α ma charakter alkoholu II-rzędowego, podczas gdy izomer β jest alkoholem I-rzędowym, podobnie jak etery glikolowe serii E.

Tabela 2. Klasyfikacja niektórych eterów alkilowych glikolu propylenowego jako substancji niebezpiecznych [2,5,6]
Table 2. Classification of some propylene glycol alkyl ethers as hazardous substances [2,5,6]

| Substancja Substance | Niebezpieczne właściwości fizyczne Hazardous physical properties | Toksyczność ostra Acute toxicity | Właściwości żrące i drażniące Corrosive and irritant properties | Ośrodkowy układ nerwowy Central nervous system | Toksyczność reprodukcyjna Reproductive toxicity | |
|-------------------------|---|-------------------------------------|--|---|--|---------------------------|
| | | | | | kategoria 2 category 2 | kategoria 3 category 3 |
| 2PG1ME | R10 | | | | | |
| 1PG2ME | R10 | | Xi; R37/38-41 | | | T; R61 |
| PG1BE | | | Xi; R36/38 | | | |
| DPGBE | | Xn; R21/22 | | | | |
| 2PG1EE | R10 | | | R67 | | |
| TPGME | | | | | | |
| TPGBE | | | | | | |

2PG1ME – eter 1-metylowy glikolu 2-propylenowego (1-metoksy-2-propanol) / 2-propylene glycol 1-methyl ether, 1PG2ME – eter 2-metylowy glikolu 1-propylenowego (2-metoksy-1-propanol) / 1-propylene glycol 2-methyl ether, PG1BE – eter 1-butyłowy glikolu propylenowego (1-butoksypropanol) / propylene glycol 1-butyl ether, DPGBE – eter butylowy glikolu dipropylenowego (butoksydipropanol) / dipropylene glycol butyl ether, 2PG1EE – eter 1-etyłowy glikolu 2-propylenowego (1-etoksy-2-propanol) / 2-propylene glycol 1-ethyl ether, TPGME – eter metylowy glikolu tripropylenowego (metoksytriopropanol) / tripropylene glycol methyl ether, TPGBE – eter butylowy glikolu tripropylenowego (butoksytriopropanol) / tripropylene glycol butyl ether.

Inne skróty jak w tabeli 1 / Other abbreviations as in Table 1.

W przypadku PGME izomer α stanowi 99,5% produktów reakcji [56], więc izomer β PGME nie stwarza istotnego zagrożenia dla zdrowia, ponieważ występuje w bardzo małej ilości obok izomeru α PGME.

Obydwa izomery różnią się kierunkiem biotransformacji, co ma istotne znaczenie dla ich toksyczności. Izomer α jest metabolizowany głównie na drodze mikrosomalnej O-demetylacji do stosunkowo słabo toksycznych metabolitów, takich jak glikol propylenowy, ditlenek węgla oraz glukuronidy i siarczany związku macierzystego. Glikol propylenowy i ditlenek węgla stanowią 50–60% dawki PGME i są wydalane z powietrzem wydechowym. Glukuronidy i siarczany stanowią natomiast 10–20% dawki związku macierzystego i są wydalane z moczem [56]. Z kolei izomer β PGME jako alkohol I-rzędowy jest utleniany podobnie jak EGAE, przy udziale ADH i ALDH, do toksycznego aldehydu i kwasu karboksylowego [60]. Głównymi produktami przemian izomeru β są kwas metoksypropionowy, glikol propylenowy i ditlenek węgla. Należy podkreślić, że niskie stężenie izomeru β (0,5%) nie wpływa istotnie na toksyczność komercyjnego PGME.

WNIOSKI

Cytowane dane z piśmiennictwa jednoznacznie wskazują na toksyczne działanie eterów glikolu etylenowego na różne etapy ontogenetycznego rozwoju organizmu, a zwłaszcza na spermatoocyty, zarodek i płód. Szczególnie silną toksyczność dla rozrodczości i rozwoju wykazują EGME i EGEE. Toksyczność ta jest wynikiem aktywacji metabolicznej tych eterów do odpowiednich kwasów alkoksyoctowych. Siła działania gonadotoksycznego i teratogenego maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego EGAE. W mechanizmie gonadotoksycznego działania tych eterów zwrócono uwagę na zmiany ekspresji kinaz białkowych i genów dla białek związanych m.in. ze spermatogenezą i apoptozą oraz na modulację ekspresji receptorów jądrowych, szczególnie dla androgenów. Indukcja stresu oksydacyjnego i aktywacja czynników proapoptotycznych w komórkach rozrodczych skutkuje uwalnianiem cytochromu c z mitochondriów, aktywacją kaspaz i apoptozą.

Działanie embriotoksyczne, fetotoksyczne i teratogenne EGAE wydaje się wynikiem interferencji AAA z różnymi szlakami metabolicznymi komórek, w tym z cyklem Krebsa i biosyntezą nukleotydów niezbędnych do syntezy DNA.

Z kolei etery glikolu propylenowego stosunkowo słabo toksycznie wpływają na reprodukcję i rozwój orga-

nizmu. Związki te nie wykazują działania gonadotoksycznego, embriotoksycznego, fetotoksycznego ani teratogenego. Jest to wynikiem innego szlaku metabolicznego tych eterów niż szlaku eterów glikolu etylenowego, który ma charakter procesu detoksykacyjnego. Obserwowany trend w zakresie ograniczania produkcji i stosowania eterów glikolu etylenowego, a także zastępowania ich eterami glikolu propylenowego jest właściwą drogą, prowadzącą do zmniejszenia zagrożenia zdrowia ludzi związanego ze stosowaniem tych związków w przemyśle i środowisku życia.

PIŚMIENNICTWO

1. De Ketttenis P.: The historic and current use of glycol ethers: A picture of change. *Toxicol. Lett.* 2005;156:5–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.076>
2. Boatman R.J.: International industry initiatives to improve the glycol ether health effects knowledge base. *Toxicol. Lett.* 2005;156:39–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.08.011>
3. Medinsky M.A., Singh G., Bechtold W.E., Bond J.A., Sabourin P.J., Birnbaum L.S. i wsp.: Disposition of three glycol ethers administered in drinking water to male F344/N rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1990;102:443–455
4. Scientific Committee on Occupational Exposure Limits. Recommendation of the Scientific Committee for Occupational Exposure Limits for 2-butoxyethanol. SCOEL/SUM/70C. Committee, Luksemburg 1998
5. Laudet-Hesbert A.: The activities of INRS in the classification and labeling of glycol ethers. *Toxicol. Lett.* 2005;156: 51–58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.09.018>
6. Spencer P.J.: New toxicity data for the propylene glycol ethers – A commitment to public health and safety. *Toxicol. Lett.* 2005;156:181–188, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.09.023>
7. Cook R.R., Bodner K.M., Kolesar R.C., Uhlman C.S., Vanpeenen F.D., Dickson G.S. i wsp.: A cross-sectional study of ethylene glycol monomethyl ether process employees. *Arch. Environ. Health* 1982;37:346–351, <http://dx.doi.org/10.1080/00039896.1982.10667589>
8. Shih T.S., Hsieh A.T., Liao G.D., Chen Y.H., Liou S.H.: Hematological and spermatotoxic effects of ethylene glycol monomethyl ether in copper clad laminate factories. *Occup. Environ. Med.* 2000;57:348–352, <http://dx.doi.org/10.1136/oem.57.5.348>
9. Ratcliffe J.M., Schrader S.M., Clapp D.E., Halperin W.E., Turner T.W., Hornung R.W.: Semen quality in workers exposed to 2-ethoxyethanol. *Br. J. Ind. Med.* 1989;46: 399–406, <http://dx.doi.org/10.1136/oem.46.6.399>

10. Veulemans H., Steeno O., Masschelein R., Groeseneken D.: Exposure to ethylene glycol ethers and spermatogenic disorders in man: A case-control study. *Br. J. Ind. Med.* 1993;50:71–78, <http://dx.doi.org/10.1136/oem.50.1.71>
11. Schenker M.B., Gold E.B., Beaumont J.J., Eskenazi B., Hammond S.K., Lasley B.L. i wsp.: Association of spontaneous abortion and other reproductive effects with work in the semiconductor industry. *Am. J. Ind. Med.* 1995;28:639–659, <http://dx.doi.org/10.1002/ajim.4700280603>
12. Elliott R.C., Jones J.R., McElvenny D.M., Pennington M.J., Northage C., Clegg T.A. i wsp.: Spontaneous abortion in the British semiconductor industry: An HSE investigation. *Am. J. Ind. Med.* 1999;36:557–572, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0274\(199911\)36:5<557::AID-AJIM8>3.0.CO;2-Q](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0274(199911)36:5<557::AID-AJIM8>3.0.CO;2-Q)
13. Coorrea A., Gray R.H., Cohen R., Rothman N., Shah F., Seacat H. i wsp.: Ethylene glycol ethers and risks of spontaneous abortion and subfertility. *Am. J. Epidemiol.* 1996;143:707–717, <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a008804>
14. Wess J.A.: Reproductive toxicity of ethylene glycol monomethyl ether, ethylene glycol monoethyl ether and their acetates. *Scand. J. Work Environ. Health* 1992;18, Supl. 2:43–45
15. Nagano K., Nakayama E., Koyano M., Oobayashi H., Adachi H., Yamada T.: Testicular atrophy of mice induced by ethylene glycol monoalkyl ethers. *Jpn. J. Ind. Health* 1979;21:29–35
16. Draper R.P., Creasy D.M., Timbrell J.A.: Comparison of urinary creatine with other biomarkers for the detection of 2-methoxyethanol-induced testicular damage. *Biomarkers* 1996;1:190–195, <http://dx.doi.org/10.3109/13547509609079356>
17. Lee H., Gong C., Wu S., Iyengar M.R.: Accumulation of phosphocreatine and creatine in the cells and fluid of mouse seminal vesicles is regulated by testosterone. *Biol. Reprod.* 1991;44:540–545, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod44.3.540>
18. Reader S.C.J., Shingles C., Stonard M.D.: Acute testicular toxicity of 1,3-dinitrobenzene and ethylene glycol monomethyl ether in the rat: Evaluation of biochemical effect markers and hormonal responses. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1991;16:61–70, [http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590\(91\)90135-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590(91)90135-Q)
19. Feuston M.H., Bodnar K.R., Kerstetter S.L., Grink C.P., Belcak M.J., Singer E.J.: Reproductive toxicity of 2-methoxyethanol applied dermally to occluded and nonoccluded sites in male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1989;10:145–161, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(89\)90098-7](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(89)90098-7)
20. Linder R.L., Strader L.F., Slott V.L., Suarez J.D.: Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.* 1992;6:491–505, [http://dx.doi.org/10.1016/0890-6238\(92\)90034-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0890-6238(92)90034-Q)
21. Hurtt M.E., Zenick H.: Decreasing epididymal sperm reserves enhances the detection of ethoxyethanol-induced spermatotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1986;7:348–353, [http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590\(86\)90165-X](http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590(86)90165-X)
22. Adedara I.A., Farombi E.O.: Induction of oxidative damage in the testes and spermatozoa and hematotoxicity in rats exposed to multiple doses of ethylene glycol monoethyl ether. *Hum. Exp. Toxicol.* 2010;29(10):801–812, <http://dx.doi.org/10.1177/0960327109360115>
23. Yoon C.Y., Hong C.M., Cho Y.Y., Chung Y.H., Min H.K., Yun Y.W. i wsp.: Flow cytometric assessment of ethylene glycol monoethyl ether on spermatogenesis in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 2003;65(2):207–212, <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.65.207>
24. Gray T.B.J., Moss E.J., Creasy D.M., Gangolli S.G.: Studies on the toxicity of some glycol ethers and alkoxyacetic acids in primary testicular cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1985;79:490–501, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(85\)90146-2](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(85)90146-2)
25. Yoon C.Y., Hong C.M., Cong J.Y., Cho Y.Y., Choi K.S., Lee B.J. i wsp.: Effect of ethylene glycol monoethyl ether on the spermatogenesis in pubertal and adult rats. *J. Vet. Sci.* 2001;2(1):47–51
26. Bagchi G., Waxman D.J.: Toxicity of ethylene glycol monomethyl ether: Impact on testicular gene expression. *Int. J. Androl.* 2008;31:269–274, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00846.x>
27. Starek-Świechowicz B., Szymczak W., Budziszewska B., Starek A.: Testicular effect of a mixture of 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol in rats. *Pharmacol. Rep.* 2015;67:289–293, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.011>
28. Foster P.M.D., Lloyd S.C., Blackburn M.D.: Comparison of the *in vivo* and *in vitro* testicular effects produced by methoxy-, ethoxy-, and n-butoxy acetic acid in the rat. *Toxicology* 1987;43:17–30, [http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X\(87\)90071-0](http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(87)90071-0)
29. Syed V., Hecht N.B.: Rat pachytene spermatocytes down-regulate a polo-like kinase, and up-regulate a thiol-specific antioxidant protein, whereas sertoli cells down-regulate a phosphodiesterase and up-regulate an oxidative stress protein after exposure to methoxyethanol and methoxyacetic acid. *Endocrinology* 1998;139:3503–3511, <http://dx.doi.org/10.1210/en.139.8.3503>
30. Watanabe A., Nakano Y., Endo T., Sato N., Kai K., Shiraiwa K.: Collaborative work to evaluate toxicity on male

- reproductive organs by repeated dose studies in rats repeated toxicity study on ethylene glycol monomethyl ether for 2 and 4 weeks to detect effects on male reproductive organs in rats. *J. Toxicol. Sci.* 2000;25:259–266, http://dx.doi.org/10.2131/jts.25.SpecialIssue_259
31. Ku W.W., Wine R.N., Chae B.Y., Ghanayem B.I., Chapin R.E.: Spermatoocyte toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: Evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995;134:100–110, <http://dx.doi.org/10.1006/taap.1995.1173>
32. Jindo T., Wine R.N., Li L.H., Chapin R.E.: Protein kinase activity is central to rat germ cell apoptosis induced by methoxyacetic acid. *Toxicol. Pathol.* 2001;29(6):607–616, <http://dx.doi.org/10.1080/019262301753385933>
33. Tirado O.M., Martinez E.D., Rodriguez O.C., Danielson M., Selva D.M., Reventos J. i wsp.: Methoxyacetic acid dysregulation of androgen receptor and androgen-binding protein expression in adult rat testis. *Biol. Reprod.* 2003;68:1437–1446, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.102.004937>
34. Selva D.M., Tirado O.M., Toran N., Suarez-Quian C.A., Reventos J., Munell F.: Meiotic arrest and germ cell apoptosis in androgen-binding protein transgenic mice. *Endocrinology* 2000;141:1168–1177, <http://dx.doi.org/10.1210/en.141.3.1168>
35. Fukushima T., Yamamoto T., Kikkawa R., Hamada Y., Komiyama M., Mori C. i wsp.: Effects of male reproductive toxicants on gene expression in rat testes. *J. Toxicol. Sci.* 2005;30:195–206, <http://dx.doi.org/10.2131/jts.30.195>
36. Eddy E.M.: Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev. Reprod.* 1999;4:23–30, <http://dx.doi.org/10.1530/ror.0.0040023>
37. Rao A.W., Shaha C.: N-acetylcysteine prevents MAA induced male germ cell apoptosis: Role of glutathione and cytochrome c. *FEBS Lett.* 2002;527:133–137, [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03196-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03196-4)
38. Carney E.W.: All glycol ethers are not created equal comparative developmental toxicity of the glycol ether metabolites, methoxypropionic acid and methoxyacetic acid. *Toxicol. Lett.* 2005;156:189–190, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.09.011>
39. Rawlings S.J., Shuker D.E., Webb M., Brown N.A.: The teratogenic potential of alkoxy acids in post-implantation rat embryo culture: Structure-activity relationships. *Toxicol. Lett.* 1985;28(1):49–58, [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90008-6](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274(85)90008-6)
40. Nelson B.K., Setzer J.V., Brightwell W.S., Mathinos P.R., Kuczuk M.H., Weaver T.E. i wsp.: Comparative inhalation teratogenicity of four glycol ethers solvents and an amino derivative in rats. *Environ. Health Perspect.* 1984;57:261–271, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.8457261>
41. Brown N.A., Holt D., Webb M.: The teratogenicity of methoxyacetic acid in the rat. *Toxicol. Lett.* 1984;22:93–100, [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274\(84\)90051-1](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274(84)90051-1)
42. Hardin B.D., Goad P.T., Burg J.R.: Developmental toxicity of four glycol ethers applied cutaneously to rats. *Environ. Health Perspect.* 1984;57:69–74, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.845769>
43. Horton V.L., Sleet R.B., John-Greene J.A., Welsch F.: Developmental phase-specific and dose related teratogenic effects of ethylene glycol monomethyl in CD-1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1985;80:108–118, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(85\)90105-X](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(85)90105-X)
44. Hanley T.R. Jr, Yano B.L., Nitschke K.D., John A.J.: Comparison of the teratogenic potential of inhaled ethylene glycol monomethyl ether in rats, mice, and rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984;75:409–422, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(84\)90178-9](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(84)90178-9)
45. Scott W.J. Jr, Fradkin R., Wittfoht W., Nau H.: Teratologic potential of 2-methoxyethanol and transplacental distribution of its metabolite 2-methoxyacetic acid, in non-human primates. *Teratology* 1989;39:363–373, <http://dx.doi.org/10.1002/tera.1420390408>
46. Heindel J.J., Gulati D.K., Russell V.S., Reel J.R., Lawton A.D., Lamb J.C.: Assessment of ethylene glycol monobutyl and monophenyl ether reproductive toxicity using a continuous breeding protocol in Swiss CD-1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1990;15:683–696, [http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590\(90\)90185-M](http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590(90)90185-M)
47. Tyl R.W., Millicovsky G., Dodd D.E., Pritts I.M., France K.A., Fisher L.C.: Teratogenic evaluation of ethylene glycol monobutyl ether in Fischer 344 rats and New Zealand white rabbits following inhalation exposure. *Environ. Health Perspect.* 1984;57:47–68, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.845747>
48. Cheever K.L., Swearingin T.F., Edwards R.M., Nelson B.K., Werren D.W., Conover D.L. i wsp.: 2-Methoxyethanol metabolism, embryonic distribution, and macromolecular adduct formation in the rat: The effect of radiofrequency radiation-induced hyperthermia. *Toxicol. Lett.* 2001;122:53–67, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00346-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00346-0)
49. Welsch F.: The mechanism of ethylene glycol ether reproductive and developmental toxicity and evidence for adverse effects in humans. *Toxicol. Lett.* 2005;156:13–28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.08.010>
50. Moslen M.T., Kaphalia L., Balasubramanian H., Yin Y.M., Au W.W.: Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology*

- 1995;96:217–224, [http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X\(94\)02921-G](http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(94)02921-G)
51. Mebus C.A., Welsch F.: The possible role of one-carbon moieties in 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid-induced developmental toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1989;99:98–109, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(89\)90115-4](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(89)90115-4)
52. Sleet R.B., John-Greene J.A., Welsch F.: Localization of radioactivity from 2-methoxyethanol (1,2-ethanol-14C) in maternal and conceptus compartments of CD-1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986;84(1):25–35, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(86\)90413-8](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(86)90413-8)
53. Mebus C.A., Clarke D.O., Stedman D.B., Welsch F.: 2-Methoxyethanol metabolism in pregnant CD-1 mice and embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992;112:87–94, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90283-X](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(92)90283-X)
54. Welsch F., Sleet R.B., Greene J.A.: Attenuation of 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid-induced digit malformations in mice by simple physiological compounds: Implications for the role of further metabolism of methoxyacetic acid in developmental toxicity. *J. Biochem. Toxicol.* 1987;2:225–240, <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.2570020307>
55. Loch-Carusio R., Trasko J.E., Corsos I.A.: Interruption of cell-cell communication in Chinese hamster V79 cells by various alkyl glycol ethers: Implication for teratogenicity. *Environ. Health Perspect.* 1984;57:119–123
56. Miller R.R., Hermann E.A., Young J.T., Landry T.D., Calhoun L.L.: Ethylene glycol monomethyl ether and propylene glycol monomethyl ether: Metabolism, disposition and subchronic inhalation toxicity studies. *Environ. Health Perspect.* 1984;57:233–239, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.8457233>
57. Spencer P.J., Crissman J.W., Stott W.T., Corley R.A., Cieslak F.S., Schumann A.M. i wsp.: Propylene glycol monomethyl ether (PGME): Inhalation toxicity and carcinogenicity in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicol. Pathol.* 2002;30(5):570–579, <http://dx.doi.org/10.1080/01926230290105848>
58. Corney E.W., Crissman J.W., Liberacki A.B., Clements C.M., Breslin W.J.: Assessment of adult and neonatal reproductive parameters in Sprague-Dawley rats exposed to propylene glycol monomethyl ether vapors for two generations. *Toxicol. Sci.* 1999;50(2):249–258, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/50.2.249>
59. Verschuuren H.G.: Toxicological studies with propylene glycol n-butyl ether. *Occup. Hyg.* 1996;2:311–318
60. Miller R.R., Langvardt P.W., Calhoun L.L., Yahrmarkt M.A.: Metabolism and disposition of propylene glycol monomethyl ether (PGME) β isomer in male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986;83(1):170–177, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(86\)90334-0](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(86)90334-0)