

2-Nitroanizol

Dokumentacja proponowanych dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego^{1,2}

2-Nitroanisole

Documentation of occupational exposure limits (OELs)

prof. dr hab. ANDRZEJ STAREK

<https://orcid.org/0000-0002-5448-8174>

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

NDS	1,6 mg/m ³
NDSCh	nie ustalono
NDSP	nie ustalono
DSB	nie ustalono
Carc. 1B	substancja rakotwórcza kategorii zagrożenia 1B (wykazuje potencjalne działanie rakotwórcze na ludzi)

Data zatwierdzenia przez Zespół Ekspertów: 26.10.2017 r.

Data zatwierdzenia przez Komisję ds. NDS i NDN: 06.12.2018 r.

Streszczenie

2-Nitroanizol jest bezbarwną lub słabo żółtą cieczą, słabo rozpuszczalną w wodzie. Stosowany jest do produkcji *o*-anizydyny i *o*-dianizydyny będących półproduktami do syntezy barwników azowych.

2-Nitroanizol ma zharmonizowaną klasyfikację w Unii Europejskiej:

- Carc. 1B – rakotwórczy, kategoria zagrożenia 1B,
- H350 – może powodować raka po narażeniu drogą oddechową lub skórą,
- Acute Tox. 4 – toksyczność ostra 4,
- H302 – działa szkodliwie po połknięciu.

Narażenie zawodowe na ten związek występuje podczas jego produkcji i stosowania. W Polsce w 2016 r. narażonych na 2-nitroanizol było 203 pracowników.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych na temat ostrych i przewlekłych zatruc 2-nitroanizolem. Brak jest informacji dotyczących badań epidemiologicznych nad skutkami zdrowotnymi narażenia na ten związek.

U gryzoni 2-nitroanizol wykazywał niewielką toksyczność po podaniu jednorazowym. W warunkach narażenia powtarzanego zwierząt toksyczne działanie związku manifestowało się: wzrostem masy narządów mięsnych, zahamowaniem przyrostu masy ciała oraz methemoglobinemią i niedokrwistością hemolityczną.

¹ Wartość NDS 2-nitroanizolu została w dniu 6.12.2018 r. przyjęta na 90. posiedzeniu Międzyresortowej Komisji do spraw Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy i następnie została przedłożona Ministrowi Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej (wniosek nr 106) w celu jej wprowadzenia do rozporządzenia w załączniku nr 1 w części A wykazu najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych w środowisku pracy.

² Publikacja opracowana na podstawie wyników IV etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2017-2019 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

Związek ten działał mutagennie w testach bakteryjnych, indukował mutacje genowe, aberracje chromosomowe i wymianę chromatyd siostrzanych oraz uszkadzał DNA (dodatni wynik testu kometowego).

U zwierząt laboratoryjnych 2-nitroanizol indukował zmiany przednowotworowe i nowotworowe głównie w: pęcherzu moczowym, nerkach i jelicie grubym.

Podstawą wartości NDS 2-nitroanizolu są wyniki badań krótkoterminowych na szczurach narażanych drogą dożołądkową. Za skutki krytyczne narażenia na 2-nitroanizol przyjęto: wzrost masy wątroby i śledziony oraz niedokrwistość hemolityczną. Wychodząc z wartości NOEL, wynoszącej 8 mg/kg mc./dzień, i współczynników niepewności o łącznej wartości 36, obliczono wartość NDS na poziomie 1,6 mg/m³. Na podstawie danych z literatury obliczono, że ryzyko wystąpienia raka pęcherza moczowego przy tym stężeniu, w warunkach 40-letniego narażenia, wynosi $2 \cdot 10^{-3}$, co można uznać za ryzyko dopuszczalne. Normatyw oznaczono „Carc. 1B” – substancja rakotwórcza kategorii zagrożenia 1B.

Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia zdrowia oraz bezpieczeństwa i higieny środowiska pracy będące przedmiotem badań z zakresu nauk o zdrowiu oraz inżynierii środowiska.

Słowa kluczowe: 2-nitroanizol, mutagenność, rakotwórczość, NDS, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

Abstract

2-Nitroanisole is a colorless to yellowish liquid poorly soluble in water. It is used primarily to *o*-anisidine and *o*-dianiline synthesis, which are precursors of azo dyes. 2-Nitroanisole has harmonized classification in the European Union: Carc. 1B 4 – carcinogenic, 1B category; H350 – may cause cancer after exposure through the respiratory tract or skin; Acute Tox. 4 – acute toxicity 4; H302 – it acts adversely after swallowing. Occupational exposure to this compound occurs during its production and application. In Poland in 2016 203 workers were exposed to 2-nitroanisole. No data on 2-nitroanisole toxicity in humans were found in the available literature. In rodents 2-nitroanisole did not demonstrate large toxicity after administration in a single dose. In these animals repeatedly treated with this compound an increase in parenchymatous organ weights, decrease in body weight and also methemoglobinemia and hemolytic anemia were observed. 2-Nitroanisole was mutagenic in bacterial tests, induced gene mutations, chromosomal aberrations and sister chromatid exchange, and also damaged DNA (positive comet test). In rodents 2-nitroanisole induced both preneoplastic and neoplastic alterations mainly in urinary bladder, kidneys, and large intestine. The maximum admissible concentration (MAC) value for 2-nitroanisole has been calculated on the basis of the results of a short term experiment performed on rats. The critical effects observed were an increase in both liver and spleen weight and hemolytic anemia. On the basis of the NOEL value at the level of 8 mg/kg bw./day and uncertainty factors of 36, a MAC value at the level of 1.6 mg/m³ was obtained. On basis of literature data urinary bladder cancer risk associated with 1.6 mg/m³ concentration of 2-nitroanisole and a lifetime occupational exposure (40 years) was calculated at 2×10^{-3} , which may be recognized as acceptable risk. The MAC has "Carc. 1B" notation (carcinogenic substance, 1B category). This article discusses the problems of occupational safety and health, which are covered by health sciences and environmental engineering.

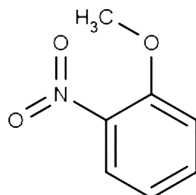
Keywords: 2-nitroanisole, mutagenicity, cancerogenicity, MAC value, health sciences, environmental engineering.

CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI, ZASTOSOWANIE, NARAŻENIE ZAWODOWE

Ogólna charakterystyka substancji

Ogólna charakterystyka 2-nitroanizolu (IARC 1996; IPCS 2004-2012; HSDB 2009):

- wzór sumaryczny C₇H₇NO₃
- wzór strukturalny



- nazwa CAS 1-metoksy-2-nitrobenzen
- nazwa IUPAC *o*-nitroanizol

- numer CAS 91-23-6
- numer RTECS BZ8790000
- numer UN 2730
- numer indeksowy 609-047-00-7
- numer WE 202-052-1
- synonimy: 2-metoksynitrobenzen, 2-metoksy-1-nitrobenzen, *o*-nitroanizol, eter metylowy *o*-nitrobenzenu, 2-nitrometoksybenzen, *o*-nitrometoksybenzen, 1-nitro-2-metoksybenzen, eter *o*-nitrofenylometylowy.

2-Nitroanizol ma zharmonizowaną klasyfikację w Unii Europejskiej (rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 r. z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchy-

lającego dyrektywy 67/648/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie WE nr 1907/2006 ze zm., rozporządzenie (WE) nr 790/2009), którą przedstawiono na rysunku 1. i w tabeli 1.



Rys. 1. 2-Nitroanizol. Kody hasła ostrzegawczego: Niebezpieczeństwo. Piktogramy określone w załączniku do rozporządzenia WE nr 1272/2008 (CLP) mają czarny symbol na białym tle z czerwonym obramowaniem na tyle szerokim, aby było wyraźnie widoczne

Tabela 1.

Zharmonizowana klasyfikacja 2-nitroanizolu (rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008; tabela 3.1. załącznika VI do rozporządzenia CLP), (<https://echa.europa.eu>)

Zharmonizowana klasyfikacja 2-nitroanizolu
Carc. 1B; H350 Acute Tox. 4; H302

Objaśnienia:

Carc. 1B – rakotwórczy, kategoria zagrożenia 1B.

Acute Tox. 4 – toksyczność ostra 4.

H302 – działa szkodliwie po połknięciu.

H350 – może powodować raka po narażeniu drogą oddechową lub skórą.

Właściwości fizykochemiczne

Właściwości fizykochemiczne 2-nitroanizolu (ChemIDplus 2009; HSDB 2009; IARC 1996; IPCS 2004-2012):

– postać	ciecz bezbarwna lub o barwie słabo żółtej
– masa cząsteczkowa	153,13
– temperatura topnienia	9,4 °C
– temperatura wrzenia	277,0 °C
– gęstość względna (woda = 1)	1,25
– względna gęstość par (powietrze = 1)	5,29
– prężność par	$4,8 \cdot 10^{-2}$ hPa (w temp. 25 °C)
– temperatura zapłonu	124 °C
– temperatura samozapłonu	464 °C
– granice wybuchowości w powietrzu	1,04 ÷ 1,66% obj.
– log Pow	1,73

– rozpuszczalność w wodzie	1,690 g/l (w temp. 30 °C)
– rozpuszcza się w:	etanolu, eterze dietylowym
– reaktywność	reaguje wybuchowo z NaOH i cynkiem
– czystość	handlowy 2-nitroanizol cechuje się czystością 98 ÷ 99%
– współczynniki przeliczeniowe:	1 ppm \approx 0,16 mg/m ³ , 1 mg/m ³ \approx 6,26 ppm.

Otrzymywanie, zastosowanie, narażenie zawodowe

2-Nitroanizol nie jest związkiem naturalnym lecz syntetycznym. Jego synteza polega na stopniowym dodawaniu metanolowego roztworu wodorotlenku sodu do metanolowego roztworu 2-chloronitrobenzenu w temperaturze 70 °C, a następnie stopniowym ogrzewaniu do 95 °C w warunkach podwyższonego ciśnienia. Po dodaniu wody do mieszaniny reakcyjnej nitroanizol jest oddzielany jako substancja oleista z wydajnością 90% (IARC 1996).

W Zachodniej Europie w 1983 r. produkcja 2-nitroanizolu wynosiła około 7 200 t/rok, w tym oko-

ło 4 000 t/rok w Niemczech (IARC 1996). Związek ten był produkowany przez: 5 zakładów w Japonii, 4 w Chinach, 3 w Indiach oraz po 1 zakładzie w Brazylii, Niemczech i Ukrainie (CIS 1994).

2-Nitroanizol jest stosowany do produkcji *o*-anizydyny i *o*-dianizydyny będących półproduktami do syntezy barwników azowych, które są używane w drukarstwie oraz do barwienia papieru i tekstyliów. Ponadto jest stosowany jako półprodukt do otrzymywania różnych farmaceutyków (The Merck Index 2001).

Narażenie zawodowe na 2-nitroanizol drogą oddechową lub przez skórę występuje podczas jego produkcji i stosowania. Jednak brak jest danych o wielkości narażenia na ten związek, wyrażonej jego stężeniem w powietrzu. Dane o liczbie osób narażo-

nych na 2-nitroanizol w Polsce w latach 2012-2016, pochodzące z Centralnego Rejestru Danych o Narażeniu na Substancje, Preparaty, Czynniki i Procesy Technologiczne o Działaniu Rakotwórczym lub Mutagennym, przedstawiono w tabeli 2. W jednym z zakładów przemysłowych w Niemczech monitorowano narażenie na 2-nitroanizol u pracowników sprzątających pomieszczenia robocze. W moczu tych osób wykrywano glukuronidy i siarczany *o*-nitrofenolu. Natomiast nie stwierdzono obecności 2-nitroanizolu lub *o*-anizydyny. Ponadto u 50 pracowników tej grupy oznaczono stężenie methemoglobiny we krwi. Uzyskane wartości nie odbiegały od normy (Schuckmann, Mayer 1993).

2-Nitroanizol jest składnikiem dymu papierosowego (IARC 1982).

Tabela 2.

Narażenie na 2-nitroanizol w Polsce w latach 2012-2016 (Centralny Rejestr Danych... 2017)

Rok	Liczba województw	Liczba zakładów pracy	Liczba narażonych mężczyzn	Liczba narażonych kobiet	
				ogółem	< 45 lat
2012	2	2	52	204	86
2013	2	2	45	120	67
2014	1	1	47	172	85
2015	1	1	29	88	45
2016	2	2	45	158	84

DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA LUDZI

Obserwacje kliniczne

Zatrucia ostre

W dostępnym piśmiennictwie nie ma informacji na temat ostrego zatrucia 2-nitroanizolem u ludzi.

Zatrucia przewlekłe

W dostępnym piśmiennictwie nie ma informacji na temat przewlekłego zatrucia 2-nitroanizolem u ludzi.

Badania epidemiologiczne

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono wyników badań epidemiologicznych dotyczących negatywnych skutków zdrowotnych u pracowników narażonych na 2-nitroanizol.

DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA ZWIERZĘTA

Toksyczność ostra

U gryzoni 2-nitroanizol jest substancją szkodliwą (wg klasyfikacji toksyczności ostrej substancja jest

zaliczana do kategorii zagrożenia 4.), której wartości LD_{50} po podaniu dożołądkowym mieszczą się w zakresie $740 \div 1\,300$ mg/kg mc. (tab. 3.).

Tabela 3.

Toksyčność ostra 2-nitroanizolu po narażeniu zwierząt laboratoryjnych (The MAK... 2012)

Gatunek zwierząt	Płeć	Sposób narażenia	Mediany wartości LD ₅₀ , mg/kg mc.
Szczur	♂, ♀	<i>p.o.</i>	872
	♂		760
	♀		740
	♂		1 000
	♀		890
Mysz	♀	<i>p.o.</i>	1 300
Szczur	♂, ♀	na skórę	> 2 000

Objaśnienia:

♂ – samiec.

♀ – samica.

p.o. – doustnie (łac. *per os*).

U szczurów (obojga płci) po jednorazowym podaniu 2-nitroanizolu do żołądka obserwowano: krańcowe wyczerpanie, chwiejny chód, nieregularny oddech, zwichrzoną sierść, częściowe zamknięcie powiek, zmniejszoną spontaniczną aktywność ruchową, osłabienie odruchów i łzawienie. Podczas autopsji, wykonanej u zwierząt które padły, wykazano niewielkie zaczerwienienie śluzówki żołądka lub śluzówki całego przewodu pokarmowego, wskazujące na drażniące działanie związku, a w niektórych przypadkach: bladeść nerek, ciemne zabarwienie nadnerczy oraz czerwono-brązowe zabarwienie płuc (The MAK 2012).

Toksyczne działanie 2-nitroanizolu u gryzoni manifestowało się niedokrwistością hemolityczną oraz sinicą związaną ze wzrostem stężenia metemoglobinu we krwi (NTP 1993).

2-Nitroanizol w postaci nierozcieńczonej (0,5 ml) podany na ogoloną, nieuszkodzoną skórę boków królików nowozelandzkich (6 zwierząt), w ciągu 4 h bezpośredniego kontaktu nie wywołał podrażnienia skóry (Hoechst 1985a). 2-Nitroanizol (0,1 ml) wprowadzony do worka spojówkowego oka królika (6 zwierząt) już po 1 h spowodował: obrzęk i rozsiane zaczerwienienie spojówek oraz nieznaczne łzawienie. Po 24 h wszystkie objawy podrażnienia zniknęły. Czas obserwacji w tym doświadczeniu wyniósł 4 dni (Hoechst 1985b).

W dostępnym piśmiennictwie nie ma informacji na temat alergicznego działania 2-nitroanizolu u zwierząt.

Toksyczność krótkoterminowa, podprzewlekła i przewlekła

Szczury F344/N obojga płci w wieku 7 ÷ 8 tyg., w grupach liczących po 5 zwierząt, otrzymywa-

ły z paszą 2-nitroanizol o stężeniach: 0; 583; 1 166; 2 322; 4 665 lub 9 330 mg/kg paszy przez 14 dni. Pobranie związku u samców wynosiło: 0; 48; 106; 209; 435 lub 881 mg/kg mc., podczas gdy u samic: 0; 48; 93; 197; 387 lub 787 mg/kg mc. W tym samym doświadczeniu, myszy szczepu B6C3F₁ w wieku 8 ÷ 9 tyg., otrzymywały 2-nitroanizol o stężeniach: 0; 250; 500; 1 000, 2 000 lub 4 000 mg/kg paszy. Pobranie związku u samców wynosiło: 0; 25; 51; 96; 198 lub 394 mg/kg mc., a u samic: 0; 36; 48; 142 lub 215 mg/kg mc. Odnotowano spadek masy ciała u szczurów samców otrzymujących związek w dawce 435 oraz 881 mg/kg mc. Wykazano również zwiększenie bezwzględnej masy wątroby u szczurów samców narażonych na 2-nitroanizol w zakresie 106 ÷ 881 mg/kg mc. oraz u samic po podaniu wszystkich dawek tego związku. Również u myszy obserwowano zahamowanie przyrostu masy ciała, u samców przy wszystkich dawkach 2-nitroanizolu, natomiast u samic tylko przy największej dawce (215 mg/kg mc.), (NTP 1993).

Grupy szczurów Wistar obojga płci, w grupach liczących po 5 zwierząt, otrzymywały zgłębnikiem do żołądka 2-nitroanizol w dawkach: 0; 1,6; 8; 40 lub 200 mg/kg mc., codziennie przez 28 dni. W żadnej grupie zwierząt nie wykazano wpływu narażenia na spożycie paszy i przyrost masy ciała. Zachowanie się zwierząt i ich stan ogólny były niezmiennymi przy dwóch najmniejszych dawkach 2-nitroanizolu (1,6 lub 8 mg/kg mc.). Natomiast u zwierząt narażonych na dwie największe dawki związku (40 lub 200 mg/kg mc.) obserwowano zwiększenie masy wątroby bez zmian histopatologicznych w tym narządzie. Po podaniu 2-nitroanizolu w największej dawce (200 mg/kg mc.) stwierdzono słabo zaznaczoną niedokrwistość hemolityczną oraz zwiększoną masę śledziony. Wartość NOEL określono na poziomie 8 mg/kg mc. (Hoechst 1989).

W 13-tygodniowym doświadczeniu samce i samice szczurów F344/N oraz myszy B6C3F₁ (w grupach liczących po 10 zwierząt) otrzymywały w paszy 2-nitroanizol o stężeniach odpowiednio: 0; 200; 600; 2 000; 6 000 lub 18 000 mg/kg paszy oraz 0; 60; 200; 600; 2 000 lub 6 000 mg/kg paszy. Pobrane dawki związku wynosiły u szczurów: 10; 30; 100; 300 lub 900 mg/kg mc., podczas gdy u myszy: 9; 30; 90; 300 lub 900 mg/kg mc. U szczurów samców bezwzględna masa nerek była podwyższona przy dawce 100 mg/kg mc. i większej. U szczurów samic wykazano zwiększoną bezwzględną masę wątroby przy dawce 100 mg/kg mc. i większej. U szczurów narażonych na 2-nitroanizol w dawkach 300 lub 900 mg/kg mc. obserwowano: spadek spożycia paszy i zahamowanie przyrostu masy ciała, wzrost masy śledziony i stężenia methemoglobiny we krwi, niedokrwistość, hiperplazję nabłonka przejściowego pęcherza moczowego i złogi hemosydersyny w śledzionie. W grupie szczurów otrzymujących dawkę 900 mg

2-nitroanizolu/kg mc. stwierdzono brodawczaka pęcherza moczowego u jednego samca oraz raki pęcherza u 2 samców i 3 samic. Ponadto w grupie tej wykazano: przekrwienie śledziony, przerost hepatocytów, zwyrodnienie nabłonka plemnikotwórczego i zanik macicy (NTP 1993).

U myszy samców obserwowano przerost hepatocytów zależny od dawki w zakresie dawek 30 ÷ 900 mg/kg mc. U samic narażonych na 2-nitroanizol w dawce 90 mg/kg mc. stwierdzono istotnie zwiększoną bezwzględną i względną masę wątroby. Względna masa wątroby była również zwiększona u samców i samic otrzymujących badany związek w dawkach odpowiednio 300 lub 900 mg/kg mc. W tych samych grupach zwierząt wykazano ponadto spadek stężenia hemoglobiny i hematokrytu we krwi obwodowej. Podanie 2-nitroanizolu w dawce 900 mg/kg mc. prowadziło do zmniejszenia spożycia paszy i przyrostu masy ciała (NTP 1993).

ODLEGŁE SKUTKI DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

Działanie mutagenne

Działanie mutagenne 2-nitroanizolu oceniono w testach bakteryjnych na *Salmonella* Typhimurium: TA100, TA98, TA97, TA1535 i TA1537 z aktywacją metaboliczną i bez aktywacji metabolicznej (Haworth i in. 1983). Związek działał mutagenie na szczep TA100 (z udziałem i bez udziału układu aktywującego) oraz na szczep TA1535 (bez udziału układu aktywującego) przy dawkach począwszy od 2,18 µM/płytkę. W przypadku szczepów TA100 i TA98 związek był mutageny z aktywacją metaboliczną i bez aktywacji metabolicznej (Chiu i in. 1978; Kawai i in. 1987). W innym badaniu, w przypadku szczepu TA100, związek był słabo mutageny w obecności układu aktywującego przy stężeniu 0,33 µM/płytkę (Tokiwa i in. 1981). W podobnym badaniu 2-nitroanizol indukował zależny od dawki wzrost mutacji punktowych u szczepów: TA98, TA1538 i TA100 bez udziału aktywacji metabolicznej w zakresie dawek 0,125 ÷ 12,5 µg/płytkę (Shimizu, Yano 1986).

Związek ten indukował aberracje chromosomowe i wymianę chromatyd siostrzanych w komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO). Aberracje chromosomowe obserwowano tylko w testach z aktywa-

cją metaboliczną, podczas gdy wymianę chromatyd siostrzanych zarówno z aktywacją, jak i bez aktywacji metabolicznej. Aberracje chromosomowe w komórkach CHO występowały preferencyjnie w długich ramionach chromosomu X w obecności układu aktywującego, przy stężeniu 2-nitroanizolu wynoszącym 1 060 µg/ml (Galloway i in. 1987).

W badaniu w warunkach *in vivo* przeprowadzonym na izolowanych komórkach nerek szczurów samców Sprague-Dawley, którym podawano 2-nitroanizol *per os* w dawkach jednorazowych 250 lub 500 mg/kg mc., wykazano niewielkie statystycznie znamienne uszkodzenie DNA w teście kometowym po 22 ÷ 26 h od podania związku (Nesslany i in. 2007).

W podobnym badaniu, przeprowadzonym na komórkach pęcherza moczowego i wątroby również u szczurów samców Sprague-Dawley, otrzymujących 2-nitroanizol dożołądkowo w dawce 350 mg/kg mc. przez dwa kolejne dni, uzyskano wynik ujemny testu kometowego (Wada i in. 2014).

U strażaków narażonych równocześnie na 2-nitroanizol i inne chemikalia podczas gaszenia pożaru po 19 dniach od zdarzenia wykazano niewielkie, statystycznie znamienne pęknięcia pojedynczej nici DNA w komórkach jednojądrowych krwi obwodowej (Hengstler i in. 1995).

2-Metoksyanilina (*o*-anizydyna) oraz *N*-(2-metoksyfenilo)-hydroksylamina i metabolity 2-nitroanizolu, tworzyły addukty z deoksyguanozyną obecną w DNA (Naiman i in. 2011).

Na podstawie przytoczonych danych z piśmiennictwa można stwierdzić, że 2-nitroanizol jest czynnikiem mutagennym i genotoksycznym.

Działanie rakotwórcze

Działanie rakotwórcze na ludzi

Tylko w jednej publikacji zwrócono uwagę na ryzyko nowotworowe wyrażone standaryzowanymi współczynnikami umieralności (SMR) i współczynnikami zagrożenia (HR) wśród populacji zamieszkującej obszary skażone 27 różnymi substancjami, w tym nitroarenami, wśród których dominował 2-nitroanizol (25%, jego zawartość w glebie wynosiła do 2 mg/m²). Do skażenia doszło w lutym 1993 r. w wyniku awarii w zakładach chemicznych Hoechst AG Frankfurt (Main, RFN), które zaworem bezpieczeństwa uwolniły do atmosfery 12 t chemikaliów. Badaniami objęto wszystkich mieszkańców terenu Schwanheim/Goldstein, łącznie 19 730 osób, w tym 47,9% mężczyzn i 52,1% kobiet. Grupa kontrolna pochodziła z populacji Hessen (RFN). W badaniu tym nie wykazano istotnego zwiększenia umieralności ogólnej i umieralności specyficznej

z powodu chorób sercowo-naczyniowych i nowotworów o różnej lokalizacji (jelita, płuca i oskrzela, wątroba, nerki, drogi moczowe, białaczka), wyrażonych wartościami SMR i HR (Weyer i in. 2014).

Działanie rakotwórcze na zwierzęta

Działanie rakotwórcze 2-nitroanizolu zostało ocenione na myszach B6C3F₁ i szczurach Fischer 344/N karmionych paszą zawierającą ten związek przez 27 i 103 tyg. (Irwin i in. 1996; NTP 1993; 1996).

Myszy obojga płci w wieku 40 dni, w grupach liczących po 50 zwierząt, karmiono *at libitum* paszą zawierającą 2-nitroanizol w ilości: 0; 666; 2 000 lub 6 000 mg/kg przez 103 tyg. Samce pobierały związek w dawkach: 0; 80; 240 i 830 mg/kg mc./dzień, podczas gdy samice pobierały go w ilościach: 0; 100; 320 i 1 200 mg/kg mc./dzień. Średnie masy ciała samców i samic w grupach narażonych na średnie i największe dawki związku były mniejsze w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej (na końcu doświadczenia). Czas przeżycia zwierząt narażonych nie różnił się od zwierząt z grup kontrolnych. U myszy z grup kontrolnych oraz u narażonych na badany związek wykazano w wątrobie obecność: gruczolaków wątrobowokomórkowych, raków wątrobowokomórkowych i wątrobiaków zarodkowych (Irwin i in. 1996; NTP 1993), (tab. 4).

Tabela 4.

Występowanie zmian nowotworowych w wątrobie u myszy B6C3F₁ narażonych na 2-nitroanizol drogą pokarmową przez 103 tyg. (NTP 1993)

Gatunek zwierząt, płeć	Rodzaj zmian nowotworowych	Dawka, mg/kg mc./dzień		
		0	80	240
Myszy B6C3F ₁ , samce	gruczolak wątrobowokomórkowy	14/50	26/50	41/50
	rak wątrobowokomórkowy	7/50	12/50	11/50
	wątrobiak zarodkowy	0/50	3/50	17/50
	gruczolaki i raki wątrobowokomórkowe łącznie	21/50	33/50	46/50
Myszy B6C3F ₁ , samice		Dawka, mg/kg mc./dzień		
		0	100	320
		14/50	20/50	36/50
		5/50	2/50	8/50
		1/50	1/50	2/50
	17/50	22/50	37/50	

Szczury F344/N obojga płci w wieku około 40 dni, w grupach liczących po 60 zwierząt, karmiono paszą zawierającą: 0; 222; 666 lub 2 000 mg/kg 2-nitroanizolu przez 103 tyg. Pobierane dawki związku wynosiły około: 0; 10; 30 lub 100 mg/kg mc./dzień.

Wskaźnik przeżycia zwierząt w kolejnych grupach wynosił u samców: 32/50, 34/50, 24/50 i 9/50, natomiast u samic: 33/50, 41/50, 26/50 i 33/50. U samców wystąpił spadek przyrostu masy ciała w grupie narażonej na największą dawkę związku (100 mg/kg mc./

dzień) oraz nefropatia i ogniskowy rozrost nabłonka w kanalikach nerkowych w grupach narażonych na 10 mg/kg mc./dzień i 100 mg/kg mc./dzień. W grupie samców narażonych na największą dawkę związku (100 mg/kg mc./dzień) stwierdzono obecność gruczolaka (u 1 szczura) i raka (u 2 szczurów) w kanalikach nerkowych, przy braku tego rodzaju zmian u zwierząt w grupie kontrolnej. W pęcherzu moczowym wykazano rozrost nabłonka przejściowego u 2/50 samców i 6/50 samic (100 mg/kg mc./dzień). Ponadto u jednej samicy w grupie o największym narażeniu (100 mg/kg mc./dzień) stwierdzono obecność raka nabłonka przejściowego, czego nie obserwowano u zwierząt z grupy kontrolnej (NTP 1993).

U zwierząt obojga płci obserwowano ogniskowy rozrost komórek w przedłożądku, zależny od dawki związku. W kolejnych grupach samców jego częstość występowania wynosiła: 3/50, 16/50, 25/50 i 32/50, podczas gdy u samic: 8/50, 8/50, 13/50 i 28/50. Również częstość występowania owrzodzeń przedłożądku była zależna od dawki. Ponadto wykazano obecność brodawczaków i raków płaskonabłonkowych, których częstość występowania nie różniła się od grupy kontrolnej. Częstość występowania białaczki limfatycznej u szczurów samców narażonych na 2-nitroanizol w dawkach 30 i 100 mg/kg mc./dzień wynosiła odpowiednio 42/50 oraz 34/50 i była statystycznie wyższa w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej (26/50), ($p \leq 0,001$). Również u samic, pobierających związek w dawce największej (100 mg/kg mc./dzień), częstość białaczki (26/50) była znamienne większa w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej (14/50), (NTP 1993).

W innym doświadczeniu szczury F344/N obojga płci w wieku około 41 dni, w grupach liczących po 60 zwierząt, karmiono paszą zawierającą: 0; 6 000 lub 18 000 mg/kg 2-nitroanizolu przez 27 tyg., co odpowiadało dawkom: 0; 340 i 1020 mg/kg mc./dzień, po czym zwierzęta pozostawiano bez narażenia na 77 tyg. w celu obserwacji. Łączny czas trwania doświadczenia wynosił 104 tyg. W trakcie badania uśmiercano z każdej podgrupy po 1 ÷ 10 szczurów w: 12.; 24.; 36.; 60. i 104. tygodniu doświadczenia w celu przeprowadzenia badań histopatologicznych. Wskaźnik przeżycia szczurów w kolejnych grupach wynosił: samce – 13/60, 1/60, 0/60; samice – 14/60, 4/60, 0/60. U wszystkich zwierząt narażonych obserwowano umiarkowaną redukcję przyrostu masy ciała, która nie cofała się w okresie przerwy w narażeniu, oraz rozrost komórek pęcherza moczowego i odprowadzających dróg moczowych (Irwin i in. 1996; NTP 1993). W pęcherzu moczowym stwierdzono: brodawczaki nabłonka przejściowego i brodawczaki płaskonabłonkowe, raki nabłonka przejściowego, raki płaskonabłonkowe i mięsaki. Częstość występowania zmian nowotworowych w pęcherzu moczowym szczurów narażonych na 2-nitroanizol, w ciągu całego doświadczenia, była statystycznie znacznie większa w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej. Ponadto wykazano obecność nowotworów w nerkach i jelicie grubym (NTP 1993), (tab. 5).

Tabela 5.

Częstość występowania nowotworów (w pęcherzyku moczowym, nerkach i jelicie grubym) u szczurów F344/N narażonych na 2-nitroanizol drogą pokarmową przez 27 tyg., a następnie poddanych obserwacji przez 77 tyg. (NTP 1993)

Rodzaj zmian nowotworowych	Samce, dawka 2-nitroanizolu, mg/kg mc./dzień			Samice, dawka 2-nitroanizolu, mg/kg mc./dzień	
	0	340	1020	0	340
Pęcherz moczowy:					
– brodawczaki nabłonka przejściowego	0/59	9/59 ^b	1/60	0/58	2/59
– raki nabłonka przejściowego	0/59	27/59 ^b	50/60 ^b	0/58	28/59 ^b
– brodawczaki płaskonabłonkowe	0/59	0/59	4/60	0/58	0/59
– raki płaskonabłonkowe	0/59	0/59	6/60 ^a	0/58	0/59
– mięsaki	0/59	2/59	9/60 ^b	0/58	2/59
Nerki:					
– brodawczaki nabłonka przejściowego	0/60	0/60	4/60	0/60	0/60
– raki nabłonka przejściowego	0/60	1/60	8/60 ^a	0/60	0/60
Jelito grube:					
– polipy	0/60	26/60 ^b	30/60 ^b	0/60	8/60 ^b
– raki	0/60	0/60	5/60 ^a	0/60	0/60

Objaśnienia:

^a – $p \leq 0,05$,

^b – $p \leq 0,01$.

Unia Europejska rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 sklasyfikowała 2-nitroanizol jako czynnik rakotwórczy „Carc. 1B”, który może powodować raka po narażeniu drogą oddechową lub skórą (H350).

Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) uznała, że istnieją wystarczające dowody działania rakotwórczego 2-nitroanizolu na zwierzęta laboratoryjne, natomiast dowody działania rakotwórczego tego związku na ludzi uznała za niewystarczające. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) zaliczyła 2-nitroanizol do grupy 2B,

tj. do czynników przypuszczalnie rakotwórczych dla ludzi (IARC 1996).

Według NTP 2-nitroanizol został zaklasyfikowany do kategorii R, tj. do substancji, co do których istnieje uzasadnione przypuszczenie, że są one rakotwórcze dla ludzi (ACGIH 2003).

Niemiecka Komisja do Badań Zagrożenia Zdrowia Związkami Chemicznymi w Miejscu Pracy zaliczyła 2-nitroanizol do kategorii 2. kancerogenów, tj. do substancji potencjalnie rakotwórczych dla ludzi (DFG 2002).

DZIAŁANIE EMBRIOTOKSYCZNE, FETOTOKSYCZNE, TERATOGENNE, WPŁYW NA ROZRODCZOŚĆ

Szczury F344/N, w grupach liczących po 10 samców i 10 samic, otrzymywały w 13-tygodniowym doświadczeniu paszowym 2-nitroanizol o stężeniach: 0; 200; 600; 2 000; 6 000 lub 18 000 mg/kg paszy (co odpowiadało dawkom: 0; 10; 30; 100; 300 lub 900 mg/kg mc.) przez 13 tygodni. Przy największej dawce związku (900 mg/kg mc.) stwierdzono zwyrodnienie nabłonka plemnikotwórczego u samców i zanik macicy u samic (NTP 1993).

Cieżarne samice szczurów Sprague-Dawley, po 20 zwierząt w grupie, otrzymywały zgłębnikiem do żołądka 2-nitroanizol w dawkach: 0; 20; 80 lub 320 mg/kg mc. w okresie od 6. do 15. dnia ciąży. U zwierząt narażonych na największe dawki związku

(80 lub 320 mg/kg mc.) obserwowano nieswoiste objawy kliniczne zatrucia oraz zmniejszenie spożycia paszy. Masa ciała zwierząt pozostawała niezmienną. Przy największej dawce związku (320 mg/kg mc.) wystąpił niewielki wzrost częstości resorpcji płodów (8,5%, kontrola 5,0%) i umiarkowane zmiany embriotoksyczne wyrażone niewielkim wzrostem częstości występowania zmian trzewnych w postaci fuzji narządów wewnętrznych. Nie obserwowano działania teratogenne (Hoechst 1993).

Przedstawione dane wskazują na możliwość oddziaływania 2-nitroanizolu na płodność oraz wykazywania toksyczności rozwojowej w okresie przedurodzeniowym.

TOKSYKOKINETYKA

Wchłanianie

2-Nitroanizol jest łatwo wchłaniany z przewodu pokarmowego. Po podaniu szczurom samcom Fischer 344 [¹⁴C] 2-nitroanizolu w dawkach jednorazowych: 5; 50 lub 500 mg/kg mc. po 6 h stwierdzono w żołądku obecność 10% podanej dawki 50 mg/kg mc. oraz 36% dawki 10-krotnie większej, wynoszącej 500 mg/kg mc. Wskazuje to na kinetykę wysycenia procesu wchłaniania 2-nitroanizolu (Miller i in. 1985).

Rozmieszczenie

Generalnie, rozmieszczenie i eliminacja 2-nitroanizolu z tkanek zachodzi bardzo szybko.

Po dożylnym podaniu [¹⁴C]2-nitroanizolu szczurom samcom Fischer 344, w dawce 25 mg/kg mc., znacznik ulegał szybkiemu rozmieszczeniu do wszystkich tkanek. W ciągu 15 min osiągał największe stężenia w mięśniach (20% dawki) i skórze (10%), a następnie w tkance tłuszczowej (6,8%) i we krwi (6,5%). Pozostałe tkanki zawierały poniżej 5% podanej dawki znacznika. Po 8 h stwierdzono mniej niż 1% podanej dawki znacznika w badanych tkankach. Eliminacja znacznika z tkanek miała charakter dwufazowy z czasami biologicznego półtrwania ($t_{1/2}$) wynoszącymi odpowiednio 1 ÷ 2 h dla szybkiej fazy i około 4 dni dla wolnej fazy eliminacji. Czasy biologicznego półtrwania ($t_{1/2}$) wolnej fazy

eliminacji znacznika z: osocza, wątroby, płuc, jelita cienkiego i nerek wynosiły około 2,5 dnia. Z kolei wolna faza eliminacji znacznika z: jąder, śledziony, krwi oraz mięśni trwała odpowiednio: 6,2; 5,2; 4,5 i 4,4 dni. Również eliminacja związku macierzystego z krwi miała przebieg dwufazowy z początkowym $t_{1/2}$ 30 min i końcowym 2,2 h. Z innych tkanek związek macierzysty był eliminowany jednofazowo z $t_{1/2}$ 0,25 ÷ 2 h (Miller i in. 1985).

Metabolizm

Biotransformacja 2-nitroanizolu zachodzi na dwóch drogach – oksydacyjnej *O*-demetylacji i hydroksylacji pierścienia benzenowego odpowiednio do 2-nitrofenolu i dihydroksynitrobenzenów oraz nitroredukcji do *o*-anizydyny i innych związków z grupą aminową. Pierwsza droga metaboliczna, pod względem wydajności, jest dominująca w odniesieniu do powstającego 2-nitrofenolu, podczas gdy druga droga jest mniej wydajna. Proces utleniania 2-nitroanizolu ma charakter detoksykacji, natomiast redukcja grupy nitrowej tego związku prowadzi do jego aktywacji metabolicznej (Miller i in. 1985).

Proces utleniania 2-nitroanizolu przebiega przy udziale mikrosomalnych monoooksygenaz zależnych od 12 różnych CYP, pochodzących z wątroby i nerki królika oraz szczura. 2-Nitroanizol jest induktorem *O*-deetylazy 7-etoksyresorufiny, markera aktywności CYP1A1 i 1A2 (Rýdlová i in. 2005). 2-Nitroanizol ulega utlenieniu do 2-nitrofenolu, który jest dominującym metabolitem, oraz do 2,6-dihydroksynitrobenzenu, powstającego z mniejszą wydajnością. Powstający w tej reakcji 2-nitrofenol ulega dalszej hydroksylacji do 2,5-dihydroksynitrobenzenu (Stiborová i in. 2009). Aktywność mikrosomalnych monoooksygenaz zależnych od CYP zarówno u człowieka, jak i u gryzoni jest odpowiedzialna za biotransformację 2-nitroanizolu. Udział CYP1A1 i 2E1 w procesie utleniania tego związku jest silniej zaznaczony u człowieka niż u szczura. U szczura najbardziej aktywnymi podrodzinami mikrosomalnych monoooksygenaz, biorącymi udział w procesie utleniania 2-nitroanizolu, są CYP2E1, a następnie: 2D, 2C, 2B i 1A. Proces utleniania 2-nitroanizolu do 2-nitrofenolu, 2,5-dihydroksynitrobenzenu i 2,6-dihydroksynitrobenzenu u człowieka zachodzi w obecności rekombinowanego: CYP1A1, 2B6, 2C9, 2C19 i 2E1, natomiast u szczura przy udziale CYP2E1 i 3A1 (Svobodová i in. 2008). Utlenianie 2-nitrofenolu do 2,5-dihydroksynitrobenzenu przez CYP2E1 szczura i człowieka w warunkach *in vitro* cechuje

kinetyka Michaelisa-Mantena z wartościami V_{max} i stałymi substratowymi (K_m) bardzo podobnymi (Svobodová 2010).

Proces redukcji 2-nitroanizolu do 2-nitroanizolu, *o*-anizydyny (2-metoksyaniliny), a następnie *N*-(2-metoksyfenilo)hydroksylaminy przebiega przy udziale cytozolowych reduktaz, m.in. oksydazy ksantynowej (XO), NAD(P)H: oksydoreduktazy chinonowej (NQO1) i oksydazy aldehydowej i/lub takich enzymów mikrosomalnych, jak NADPH – reduktaza cytochromu P450 (Arlt i in. 2003; Stiborová i in. 2003; 2004).

W reakcjach II fazy metabolity 2-nitroanizolu z wolnymi grupami hydroksylowymi ulegają sprzężaniu z aktywnym kwasem siarkowym i glukuronowym przy udziale sulfotransferaz i glukuronotransferaz. Z kolei *N*-hydroksyaryloaminy mogą być dalej metabolizowane przez *N,O*-acetylotransferazy (NATs) lub sulfotransferazy (SULTs) do reaktywnych takich estrów, jak *N*-acetoksy- lub *N*-sulfoksyaryloaminy, które w procesie heterolizy wiązań N-O lub S-O tworzą elektrofilowe jony nitreniowe, zdolne do bezpośredniej reakcji z nukleofilowymi cząsteczkami DNA, co prowadzi do powstawania adduktów (Arlt i in. 2002; Glatt 2000).

Wydalanie

2-Nitroanizol i jego metabolity są wydalane przez nerki. U szczurów samców, które otrzymywały znakowany [¹⁴C]2-nitroanizol, jedynie 0,5% podanej dawki wydalano się z moczem w postaci niezmienionej. W ciągu 24 h po podaniu wydalano się przez nerki 82% znacznika, natomiast w czasie 7 dni – 86% znacznika. Metabolity 2-nitroanizolu, obecne w moczu, występowały głównie w formie sprzężonej jako siarczan (63%) i glukuronidy (11%). Profile metabolitów w moczu po 24 h od podania 2-nitroanizolu drogą *per os* i dożylną w dawce 25 mg/kg mc. były podobne; obejmowały one 63% siarczanu *o*-nitrofenolu, 11% glukuronidu *o*-nitrofenolu, 1,5% wolnego *o*-nitrofenolu, 0,6% *o*-anizydyny, 16% niezidentyfikowanych metabolitów polarnych, 5,5% metabolitów kwasowych oraz 1,3% metabolitów zasadowych i obojętnych. Wydalenie z żółcią i kałem było podobne i wynosiło 7,5 i 9% podanej dawki odpowiednio w ciągu 24 h i 7 dni (Miller i in. 1985).

MECHANIZM DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

2-Nitroanizol jest chemicznym kancerogenem o genotoksycznym mechanizmie działania. Związek ten indukuje nowotwory u szczurów i myszy głównie w pęcherzu moczowym, a w mniejszym stopniu w: śledzionie, wątrobie i nerkach. Oksydaza ksantynowa jest enzymem aktywującym metabolicznie 2-nitroanizol na drodze nitroredukcji, prowadzącej do powstania *N*-(2-metoksyfenilo)hydroksylaminy i *o*-anizydyny. *N*-(2-metoksyfenilo)hydroksylamina tworzy addukty z deoksyguanozyną w DNA w warunkach *in vivo*, głównie w pęcherzu moczowym szczurów narażonych na 2-nitroanizol, jak również w warunkach *in vitro* po inkubacji *o*-nitroanizolu z cytozolem ludzkich hepatocytów lub oksydazą ksantynową wyizolowaną z maślanki (Stiborová i in. 2004).

Ludzki mikrosomalny CYP jest zdolny do oksydacyjnej demetylacji 2-nitroanizolu do 2-nitrofenolu. Reakcja ta ma charakter procesu detoksykacyjnego (Mikšanová i in. 2004).

o-Anizydyna, będąca metabolitem 2-nitroanizolu lub związkiem macierzystym, ulega utlenieniu z udziałem CYP2E1, CYP1A i CYP2B6 do kancerogennego metabolitu *N*-(2-metoksyfenilo)hydroksylaminy (Stiborová i in. 2004; 2005).

U szczurów F344/N narażonych na 2-nitroanizol obserwowano zmiany przednowotworowe i nowotworowe w nabłonku pęcherza moczowego ewoluujące od hiperplazji do brodawczaków, a następnie do raków brodawczakowatych. Zmianom morfologicznym towarzyszyła odpowiednia ekspresja białek związanych z cyklem komórkowym (cyklina D1 i białko p53) oraz z różnicowaniem się komórek (cytokeratyna 20 i uroplakina III). W reakcjach immunohistochemicznych wykazano progresywne zwiększenie poziomu cykliny D1, przy niezmiennym poziomie białka p53. Cytokeratyna uległa zmniejszeniu w komórkach powierzchniowych śluzówki, podczas gdy odczyn na uroplakinę III nasilał się w komórkach pośrednich i komórkach warstwy podstawnej z progresją od hiperplazji do raka. Wyniki badań wskazują na: rozregulowanie cyklu komórkowego lub proliferacji (cyklina D1), upośledzenie

różnicowania się komórek (cytokreatyna 20) i nieprawidłowego różnicowania (uroplakina III) jako wyraz uszkodzeń w trakcie rozwoju złośliwości guza (Willson i in. 2016).

2-Nitroanizol podany dootrzewnowo myszom szczepu NMRI, wolnym od patogenów, w jednorazowych dawkach: 0,1; 5 lub 10% LD₅₀ (0,052; 2,6 lub 5,2 mg/mysz) łącznie z lipopolisacharydem (LPS) z *Escherichia coli* jako czynnikiem aktywującym makrofagi i octanem 12-*O*-tetradekanyloforbolu-13, powodował transformację tych komórek. Transformowane makrofagi, po wyizolowaniu z otrzewnej i podaniu podskórnym zdrowym myszom, indukowały nowotwory pochodzenia mezenchymalnego typu mięsaków. Nowotwory te były widoczne po 3 tyg. po iniekcji makrofagów. Histologicznie, nowotwory były zbudowane z nieodróżnicowanych komórek złośliwych o kształcie wrzecionowatym z licznymi mitozami, z jądrem bogatym w chromatynę i powiększonym jąderkiem. Transformowane makrofagi były powiększone i cechowały się brakiem zdolności do przylegania. Podczas procesu transformacji obserwowano dysocjację między wzrostem i różnicowaniem się komórek. Linia komórek transformowanych wykazywała niekontrolowany wzrost w porównaniu do normalnych makrofagów. Zasugerowano utratę zdolności regulacji wzrostu komórek spowodowaną aktywacją protoonkogenów. W komórkach tych wykazano nadmierną ekspresję onkoproteiny *c-jun*, stymulującej mitozę na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. Ponadto wykazano zahamowanie ekspresji onkoprotein *c-fos* i *c-myc* oraz produkcję wielu czynników białkowych istotnych dla autonomicznego zwiększenia komórki. W badaniach zależności struktura-aktywność stwierdzono, że 4-nitroanizol nie posiada zdolności do transformacji makrofagów, zaś potencjał transformujący 2-nitrofenol, który jest głównym metabolitem 2-nitroanizolu, jest większy od związku macierzystego (Esmaeili i in. 2006).

DZIAŁANIE ŁĄCZNE

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono informacji na temat łącznego działania toksycznego 2-nitroanizolu z innymi ksenobiotykami.

ZALEŻNOŚĆ SKUTKU TOKSYCZNEGO OD WIELKOŚCI NARAŻENIA

Zależność skutku toksycznego od wielkości narażenia (drogą pokarmową), na podstawie wyników badań na szczurach i myszach, zamieszczono w tabeli 6.

U szczurów samców i samic F344/N 2-nitroanizol podawany w dawkach 106 ÷ 787 mg/kg mc. przez 14 dni spowodował zwiększenie masy wątroby, podczas gdy w dawce 881 mg/kg mc. – zmniejszenie masy ciała (NTP 1993).

U szczurów Wistar obojga płci, którym podawano 2-nitroanizol w paszy w dawkach 1,6 ÷ 200 mg/kg mc. przez 28 dni, obserwowano zwiększenie masy wątroby (40 mg/kg mc.) oraz masy śledziony, a także niedokrwistość hemolityczną (200 mg/kg mc.), (Hoechst 1989).

Szczury F344/N, obojga płci, otrzymujące 2-nitroanizol w dawkach 10 ÷ 900 mg/kg mc. przez 13 ty-

godni nie wykazywały żadnych zmian (10 i 30 mg/kg mc.) lub wykazywały zwiększenie masy nerek (samce) i wątroby (samice) po podaniu związku w dawce 100 mg/kg mc. 2-Nitroanizol podawany w dawkach 300 lub 900 mg/kg mc. spowodował: zmniejszenie spożycia paszy, zahamowanie przyrostu masy ciała, wzrost masy śledziony, methemoglobinemię i niedokrwistość. U samic po podawaniu związku w dawkach 100 ÷ 900 mg/kg mc. obserwowano: zwiększenie masy wątroby, zmniejszenie spożycia paszy i zahamowanie przyrostu masy ciała (NTP 1993).

U myszy B6C3F₁ obojga płci, narażonych na 2-nitroanizol w dawkach 25 ÷ 394 mg/kg mc. stwierdzono zahamowanie przyrostu masy ciała. Samice wykazywały mniejszą wrażliwość na toksyczne działanie związku niż samce (NTP 1993).

Tabela 6.

Zależność skutku toksycznego od wielkości narażenia na podstawie wyników badań na zwierzętach

Gatunek zwierząt, płeć	Dawka, mg/kg mc.	Czas narażenia	Skutki narażenia	Piśmiennictwo
Szczury F344/N, ♂	48 106 209 435 881	14 dni	brak zmian zwiększenie masy wątroby zwiększenie masy wątroby zwiększenie masy wątroby zmniejszenie masy ciała	NTP 1993
Szczury F344/N, ♀	48 93 197 387 787	14 dni	zwiększenie masy wątroby zwiększenie masy wątroby zwiększenie masy wątroby zwiększenie masy wątroby zwiększenie masy wątroby	NTP 1993
Szczury Wistar, ♂ + ♀	1,6 8 40 200	28 dni	bez zmian bez zmian zwiększenie masy wątroby zwiększenie masy śledziony, niedokrwistość hemolityczna	Hoechst 1989
Szczury F344/N, ♂	10 30 100 300 900	13 tygodni	bez zmian bez zmian zwiększenie masy nerek zmniejszenie spożycia paszy, zahamowanie przyrostu masy ciała, zwiększenie masy śledziony, methemoglobinemia, niedokrwistość	NTP 1993
Szczury F344/N, ♀	10 30 100 300 900	13 tygodni	bez zmian bez zmian zwiększenie masy wątroby zwiększenie masy wątroby, zmniejszenie spożycia paszy zwiększenie masy wątroby, zmniejszenie spożycia paszy, zahamowanie przyrostu masy ciała	NTP 1993

cd. tab. 6.

Gatunek zwierząt, płeć	Dawka, mg/kg mc.	Czas narażenia	Skutki narażenia	Piśmiennictwo
Myszy B6C3F ₁ , ♂	25 51 96 198 394	14 dni	zahamowanie przyrostu masy ciała zahamowanie przyrostu masy ciała zahamowanie przyrostu masy ciała zahamowanie przyrostu masy ciała zahamowanie przyrostu masy ciała	NTP 1993
♀	36 48 142 215		bez zmian bez zmian bez zmian zahamowanie przyrostu masy ciała	
Myszy B6C3F ₁ , ♂ + ♀	9 30 90 300 900	13 tygodni	bez zmian przerost hepatocytów zwiększenie masy wątroby, zmniejszenie stężenia HGB i hematokrytu zwiększenie masy wątroby, zmniejszenie stężenia HGB i hematokrytu zwiększenie masy wątroby, zmniejszenie stężenia HGB i hematokrytu	NTP 1993

Objaśnienia:

♂ – samiec.

♀ – samica.

U myszy tego samego szczepu obojga płci, narażonych na 2-nitroanizol w dawkach 9 ÷ 900 mg/kg mc. przez 13 tygodni wykazano: przerost hepatocytów (30 mg/kg mc.), wzrost masy wątroby i zmiany

hematologiczne we krwi obwodowej (90 ÷ 900 mg/kg mc.). Najmniejsza dawka związku (9 mg/kg mc.) nie spowodowała żadnych zmian (NTP 1993).

NAJWYŻSZE DOPUSZCZALNE STĘŻENIE (NDS) W POWIETRZU ŚRODOWISKA PRACY ORAZ DOPUSZCZALNE STĘŻENIE W MATERIALE BIOLOGICZNYM (DSB)

Istniejące wartości NDS

Tylko w Federacji Rosyjskiej w 1993 r. ustalono dopuszczalne stężenie chwilowe (STEL) dla 2-nitroanizolu na poziomie 1 mg/m³ (RTECS 2003). W innych państwach nie ustalono normatywów higienicznych dla tego związku (ACGIH 2015; DFG 2002; RTECS 2003).

Podstawy proponowanej wartości NDS

W dostępnym piśmiennictwie nie ma danych z obserwacji ludzi narażonych na 2-nitroanizol, które mogą stanowić podstawę do zaproponowania wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS). Dostępne dane toksykologiczne dotyczą biologicznych skutków narażenia krótkoterminowego, podprzewlekłego lub przewlekłego myszy lub szczurów na 2-nitroanizol drogą pokarmową. Skutki krytycz-

ne toksycznego działania związku były wyrażone wzrostem bezwzględnej i względnej masy: wątroby, nerek i śledziony oraz methemoglobinemią i niedokrwistością hemolityczną. Drugi rodzaj skutków indukowanych przez 2-nitroanizol to zmiany przednowotworowe i nowotworowe – głównie w pęcherzu moczowym, a w mniejszym stopniu – w nerkach i jelicie grubym. W pęcherzu moczowym szczurów F344 narażonych na 2-nitroanizol, obok metaplastji i hiperplastji nabłonka przejściowego, obserwowano brodawczaki i raki nabłonka przejściowego oraz raki płaskonabłonkowe i mięsaki. Częstość występowania raka nabłonka przejściowego była zależna od wielkości narażenia. W nerkach występowały raki nabłonka przejściowego, podczas gdy w jelicie grubym polipy gruczolakowate i raki. Częstość występowania polipów gruczolakowatych zależała od czasu narażenia (Irvin i in. 1996; NTP 1993).

Na podstawie wyników uzyskanych w krótkoterminowym doświadczeniu na szczurach Wistar, którym podawano *per os* 2-nitroanizol (Hoechst 1989) wartość NOEL tego związku, wyrażony wzrostem masy wątroby i śledziony oraz niedokrwistością hemolityczną, wynosiła 8 mg/kg mc./dzień (D_w). Wychodząc z tej wartości obliczono jego równoważne stężenie w powietrzu dla człowieka o masie ciała 70 kg (W_h) i wentylacji płuc 10 m³/8 h (V_h) na podstawie wzoru:

$$D_h = D_w \cdot W_h / V_h$$

$$D_h = 8 \text{ mg/kg/dzień} \cdot 70 \text{ kg} / 10 \text{ m}^3$$

$$D_h = 56 \text{ mg/m}^3.$$

Do obliczenia wartości NDS 2-nitroanizolu zastosowano następujące współczynniki niepewności:

- A = 2 – współczynnik związany z wrażliwością osobniczą,
- B = 3 – współczynnik związany z różnicami międzygatunkowymi i drogą podania (podanie drogą pokarmową),
- C = 2 – współczynnik związany z narażeniem krótkoterminowym,
- D = 1 – do obliczeń przyjęto wartość NOEL,
- E = 3 – współczynnik modyfikujący związany z działaniem rakotwórczym związku.

Zatem, po podstawieniu wartości współczynników, obliczamy wartość NDS na podstawie wzoru:

$$NDS = D_h / A \cdot B \cdot C \cdot D \cdot E$$

$$NDS = 56 \text{ mg/m}^3 / 36$$

$$NDS = 1,6 \text{ mg/m}^3.$$

Jako podstawę wartości NDS dla 2-nitroanizolu można również przyjąć wyniki ilościowej oceny ryzyka nowotworowego, związanego z narażeniem na ten związek u szczurów F344, wyrażonego częstością występowania raka pęcherza moczowego, który ma największe szanse rozwoju od innych nowotworów u narażonych ludzi (Szymańska, Szymczak 2003). Na podstawie obliczeń cytowanych autorów w warunkach narażenia na 2-nitroanizol o stężeniu 1,6 mg/m³ przez 40 lat ryzyko raka pęcherza moczowego wynosi $2 \cdot 10^{-3}$, a więc na poziomie akceptowalnym dla narażenia zawodowego. Dla stężenia 1 mg/m³ ryzyko to wynosi $1,29 \cdot 10^{-3}$.

W związku z powyższym zaproponowano stężenie 2-nitroanizolu na poziomie 1,6 mg/m³ jako wartość NDS. Nie ma podstaw do ustalenia wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia chwilowego (NDSch) i dopuszczalnego stężenia w materiale biologicznym (DSB). Ponadto proponuje się oznakowanie normatywu symbolem „Carc. 1B” – substancja rakotwórcza kategorii zagrożenia 1B (substancja, która ma potencjalne działanie rakotwórcze dla ludzi).

Ze względu na stosunkowo małą wartość log Pow = 1,73 nie ma podstaw do zaproponowania notacji „Sk”.

PIŚMIENNICTWO

ACGIH (2003). Guide to Occupational Exposure Values.

ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists (2015). Guide to Occupational Exposure Values, p. 147.

Arlt V.M., Glatt H., Muckel E., Pabel U., Sorg B.L., Schmeiser H.H. i in. (2002). Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. *Carcinogenesis* 23, 1937–1945.

Arlt V.M., Stiborová M., Hewer A., Schmeiser H.H., Phillips D.H. (2003). Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: evidence for reductive activation by human NADPH: cytochrome P450. *Cancer Res.* 63, 2752–2761.

ChemIDplus (2009). ChemIDplus Advanced. National Library of Medicine [dostęp: [http://chemsis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemid heavy.jsp](http://chemsis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemid%20heavy.jsp) and selected Registry Number and search on CAS number. Last accessed: 2/19/09].

Chiu C.W., Lee L.H., Wang C.Y., Bryan G.T. (1978). Mutagenicity of some commercially available nitro compounds for *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 58, 11–22.

Centralny Rejestr Danych o narażeniu na substancje, pasożyty, czynniki i procesy technologiczne o działaniu rakotwórczym (2017).

CIS, Chemical Information Services (1994). Directory of World Chemical Producers 1995/96 Edition, Dallas, TX, 524.

DFG (2002). List of MAK and BAT Values.

Esmaili A., Schlatterer K., Demirhan I., Schlatterer B., Nauck M., Chandra P. i in. (2006). Tumorigenic potential and the molecular mechanism of the carcinogenic effect exerted by 2-nitroanisole. *Anticancer Res.* 26, 4203–4212.

Galloway S.M., Armstrong M.J., Reuben C., Colman S., Brown B., Cannon C. i in. (1987). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells:

- evaluations of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 10 (Suppl. 10), 1–175.
- Glatt H. (2000). Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* 129, 141–170.
- Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K., Speck W., Zeiger E. (1983). Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ. Mutagen* 5(Suppl. 1), 3–142.
- Hengstler J.G., Fuchs J., Bolm-Audorff U., Meyer S., Oesch F. (1995). Single-strand breaks in deoxyribonucleic acid in fire fighters accidentally exposed to *o*-nitroanisole and other chemicals. *Scand. J. Work Environ. Health* 21, 36–42.
- Hoechst (1985a). Acute dermal irritation study in rabbits. CIT (Centre International de Toxicologie). Study No. 1071 TAL [cyt. za: The MAK 2012].
- Hoechst (1985b). Acute eye irritation study in rabbits. CIT (Centre International de Toxicologie). Study No. 1072 TAL [cyt. za: The MAK 2012].
- Hoechst (1989). *o*-Nitroanisol, subakute orale Toxizität an SPF-Wistar-Ratten. Report No. 89.0021 [cyt. za The MAK 2012].
- Hoechst (1993). Examination of the influence of *o*-nitroanisole on the pregnant rat and the fetus by oral administration. LPT (Laboratory of Pharmacology and Toxicology). Report No. 7940/2/93 [cyt. za: The MAK 2012].
- HSDB, Hazardous Substances Data Bank (2009). National Library of Medicine [dostęp: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?> HSDB and search on CAS number. Last accessed: 2/19/09].
- IARC, International Agency for Research for Cancer (1982). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals in Humans. Ortho- and para-anisidine and their hydrochlorides. Vol. 27, 63–80.
- IARC, International Agency for Research for Cancer (1996). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Printing Processes and Printing Inks, Carbon Black and Some Nitro Compounds, vol. 65, 369–380.
- IPCS (2004-2012). The International Programme on Chemical Safety and the European Commission.
- Irwin R.D., Chhabra R., Eustis S., Pinter A., Prejean J.D. (1996). Tumors of the bladder, kidney, and intestine of F344 rats and liver of B6C3F₁ mice administered *o*-nitroanisole in feed. *Fund. Appl. Toxicol.* 30(1), 1–12.
- Kawai A., Goto S., Matsumoto Y., Matsushita H. (1987). Mutagenicity of aliphatic and aromatic nitro compounds. *Jpn. J. Ind. Health* 29, 34–54.
- Mikšanová M., Šulc M., Rýdlová H., Schmeiser H.H., Frei E., Stiborová M. (2004). Enzymes involved in the metabolism of the carcinogen 2-nitroanisole: evidence for its oxidative detoxication by human cytochromes P450. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 663–671.
- Miller M.J., Sipes I.G., Perry D.F., Carter D.E. (1985). Pharmacokinetics of *o*-nitroanisole in Fischer 344 rats. *Drug Metab. Dispos.* 13(5), 527–531.
- Naiman K., Martínková M., Schmeiser H.H., Frei E., Stiborová M. (2011). Human cytochrome-P450 enzymes metabolize N-(2-methoxyphenyl)hydroxylamine, a metabolite of the carcinogens *o*-anisidine and *o*-nitroanisole, thereby dictating its genotoxicity. *Mutat. Res.* 726, 160–168.
- Nesslany F., Zennouche N., Simar-Meintières S., Talahari I., Nkili-Mboui E-N., Marzin D. (2007). In vivo Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. *Mutat. Res.* 630, 28–41.
- NTP (1993). Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of *o*-nitroanisole (CAS No. 91-23-6) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (Feed Studies). No. 416. NIH Publ No. 93-3147 [cyt. za: The MAK 2012].
- NTP (1996). National Toxicological Programme Report on Carcinogens Background Document for *o*-Nitroanisole. Research Triangle Park, North Carolina 27709 NIEHS Contract No. N01-ES-25346.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 [Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006]. *Dz. Urz. UE* z dnia 31.12.2008 (L 353).
- RTECS, Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (2003). Komputerowa baza danych.
- Rýdlová H., Mikšanová M., Ryšlavá H., Stiborová M. (2005). Carcinogenic pollutants *o*-nitroanisole and *o*-anisidine are substrates and inducers of cytochromes P450. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 149(2), 441–447.
- Shimizu M., Yano E. (1986). Mutagenicity of mono-nitrobenzene derivatives in the Ames test and rec assay. *Mutat. Res.* 170, 11–22.
- Schuckmann F., Mayer D. (1993). Der Störfall im Hoechst-Werk Griesheim. *Hess. Ärztebl.* 54, 216–218 [cyt. za: The MAK 2012].
- Stiborová M., Frei E., Sopko B., Sopková K., Marková V., Laňková M. i in. (2003). Human cytosolic enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid: evidence for reductive activation by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Carcinogenesis* 24, 1695–1703.
- Stiborová M., Mikšanová M., Smrček S., Bieler C.A., Breuer A., Klokow K.A. i in. (2004). Identification of a genotoxic mechanism for 2-nitroanisole carcinogenicity and of its carcinogenic potential for humans. *Carcinogenesis* 25(5), 833–840.

- Stiborová M., Mikšanová M., Šulc M., Rýdlová H., Schmeiser H.H., Frei E.* (2005). Identification of a genotoxic mechanism for the carcinogenicity of the environmental pollutant and suspected human carcinogen *o*-anisidine. *Int. J. Cancer* 116, 667–678.
- Stiborová M., Naiman K., Martínková M., Martínek V., Svobodová M., Schmeiser H.H.* i in. (2009). Genotoxic mechanisms for the carcinogenicity of the environmental pollutants and carcinogens *o*-anisidine and 2-nitroanisole follow from adducts generated by their metabolite *N*-(2-methoxyphenyl)-hydroxylamine with deoxyguanosine in DNA. *Interdisciplinary Toxicology* 2(1), 24–27.
- Svobodová M.* (2010). Metabolism of carcinogenic *o*-nitroanisole, its metabolite *o*-nitrophenol and environmental pollutants 2-nitrobenzanthrone and 3-nitrobenzanthrone. Charles University in Prague Faculty of Science Department of Biochemistry. Summary of PhD Thesis.
- Svobodová M., Dračínská H., Martínková M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.* i in. (2008). Oxidation of carcinogenic 2-nitroanisole by rat cytochromes P450 – similarity between human and rat enzymes. *Interdisc. Toxicol.* 1(2), 182–185.
- Szymańska J., Szymczak W.* (2003). 2-Nitroanizol. Wytyczne Szacowania Ryzyka Zdrowotnego dla Czynn timer Rakotwórczych. Łódź, Instytut Medycyny Pracy 17, 89–102.
- The MAK Collection for Occupational Health and Safety (2012). Vol. 9, 103–114.
- The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals (2001). 13th Edition, Merck & CO., INC. Whitehouse Station, NJ, 1181.
- Tokiwa H., Nakagawa R., Ohnishi Y.* (1981). Mutagenic assay of aromatic nitro compounds with *Salmonella Typhimurium*. *Mutat. Res.* 91, 321–325.
- Wada K., Yoshida T., Takahashi N., Matsumoto K.* (2014). Effects of seven chemicals on DNA damage in the rat urinary bladder. A comet assay study. *Mutat. Res.* 769, 1–6.
- Weyer V., Blettner M., Cholmakow-Bodechtel C., Heudorf U.* (2014). Chemical accident at Hoechst AG Frankfurt/Main, Germany, 1993: a 15 year follow-up analysis of mortality. *Eur. J. Epidemiol.* 29, 73–76.
- Willson C.J., Flake G.P., Sils R.C., Kissling G.E., Cesta M.F.* (2016). Immunohistochemical expression of cyclin D1, cytokeratin 20, and uroplakin III in proliferative urinary bladder lesions induced by *o*-nitroanisole in Fischer 344/N rats. *Vet. Pathol.* 53(3), 682–690.

Adres do korespondencji/Contact details:

prof. dr hab. ANDRZEJ STAREK
e-mail: mfstarek@cyf-kr.edu.pl
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9
POLAND

ZAKRES BADAŃ WSTĘPNYCH I OKRESOWYCH, NARZĄDY (UKŁADY) KRYTYCZNE, PRZECIWSKAZANIA LEKARSKIE DO ZATRUDNIENIA W NARAŻENIU NA 2-NITROANIZOL

dr hab. n. med. Marta Wiszniewska
Instytut Medycyny Pracy
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera
91-348 Łódź
ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8

Zakres badania wstępnego

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na: wątrobę, śledzionę, objawy niedokrwistości.
Badania pomocnicze: morfologia krwi z rozmazem.

Zakres badania okresowego

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na: wątrobę, śledzionę, objawy niedokrwistości.
Badania pomocnicze: morfologia krwi z rozmazem, w zależności od wskazań badanie poziomu metemoglobiny (MetHb).
Częstotliwość badań okresowych: co roku lub co 2 lata.

U w a g a

Lekarz przeprowadzający badanie profilaktyczne może poszerzyć jego zakres o dodatkowe specjalistyczne badania lekarskie oraz badania pomocnicze, a także wyznaczyć krótszy termin następnego badania jeżeli stwierdzi, że jest to niezbędne dla prawidłowej oceny stanu zdrowia osoby przyjmowanej do pracy lub pracownika.

Zakres ostatniego badania okresowego przed zakończeniem aktywności zawodowej

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na: wątrobę, śledzionę, objawy niedokrwistości.
Badania pomocnicze: morfologia krwi z rozmazem, w zależności od wskazań badanie poziomu metemoglobiny (MetHb).

Narządy (układy) krytyczne

Narządami krytycznymi podczas pracy w narażeniu na 2-nitroanizol są narządy mięsne (wątroba, śledziona), krwinki czerwone.

Przeciwwskazania lekarskie do zatrudnienia

Przeciwwskazaniami lekarskimi do zatrudnienia w narażeniu na 2-nitroanizol są:

- methemoglobinemia
- choroby przebiegające z ciężkim uszkodzeniem wątroby, śledziony, nerek.

U w a g a

Wymienione przeciwwskazania dotyczą kandydatów do pracy.

O przeciwwskazaniach w przebiegu zatrudnienia powinien decydować lekarz sprawujący opiekę profilaktyczną, biorąc pod uwagę wielkość i okres trwania narażenia zawodowego oraz ocenę stopnia zaawansowania i dynamikę zmian chorobowych.

Ze względu na potencjalne działanie rakotwórcze na ludzi i szkodliwe na płód w narażeniu na 2-nitroanizol nie wolno zatrudniać: kobiet w ciąży, kobiet karmiących piersią i pracowników młodocianych. Pracownicy powinni być informowani o potencjalnym działaniu rakotwórczym 2-nitroanizolu.

