



Zastosowanie tokoferolu i kwasu acetylosalicylowego w ochronie tkanki kostnej przed skutkami doświadczalnego zatrucia 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioksyną (TCDD)

*Maciej Dobrzyński, Justyna Bazan, Andrzej Gamian,
Joanna Rosińczuk-Tonderys, Olga Parulska, Ireneusz Całkosiński
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wrocław*

1. Wstęp

Dioksyny jest to grupa związków zaliczanych do trucizn środowiskowych, powstających w szeregu procesów technologicznych jak i w trakcie spalania różnorodnych związków organicznych. Dioksyny powstają w każdym procesie termicznym, jeśli w środowisku spalania znajduje się materiał organiczny, chlor oraz sprzyjające czynniki, tj. temperatura spalania 200–900°C, mały dopływ tlenu i obecność wody [8, 14]. Najbardziej toksyczna z dioksyn – 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioksyna (TCDD) – od dnia 1.06.1997 r. została uznana przez Międzynarodową Agencję Badań nad Nowotworami (IARC) za karcynogen grupy A, co potwierdzono w badaniach doświadczalnych na zwierzętach [15, 23]. Pomimo restrykcyjnych zobowiązań wynikających z zapisów Konwencji Sztokholmskiej dotyczących ograniczania emisji do środowiska trwałych związków organicznych, do których należą dioksyny, jest ona wciąż znacząca i wiąże się przede wszystkim ze spalaniem paliw w gospodarce komunalnej [46]. Uwolnione dioksyny włączają się w łańcuchy pokarmowe oraz kumulują się w organizmach stojących na szczycie piramidy pokarmowej, wywołując szereg negatywnych skutków biologicznych [7, 15, 16].

Emisja dioksyn jest także związana z przemysłem, szerokim stosowaniem tworzyw sztucznych, zagospodarowywaniem odpadów czy występowaniem nieprzewidywalnych zdarzeń tj. pożary, katastrofy ekologiczne czy działania wojenne [16,46]. Największą jak dotychczas katastrofą ekologiczną w przebiegu której do atmosfery przedostało się ponad 30 kg TCDD powodując poważne zatrucie ludności, był wybuch reaktora z trichlorofenolem w Seveso (Włochy, 1976 r.) [13]. Także badania przeprowadzone po ataku terrorystycznym na World Trade Center w Nowym Jorku i towarzyszącym mu pożarach wykazały, że w rejonie strefy zero jak i w znacznej odległości od niej, stężenie dioksyn w powietrzu wielokrotnie przewyższało dopuszczalną normę [38]. Uwalnianie dioksyn do środowiska, jako produktów ubocznych procesów technologicznych ma miejsce, m.in. w przemyśle celulozowo-papierniczym (m.in. produkcja celulozy siarczanowej, bielenie mas celulozowych chlorem elementarnym), metalurgicznym (m.in. przetwarzanie złomu, odzysk metali, hutnictwo żelaza i stali, produkcja aluminium, miedzi, cynku, ołowiu, procesy odlewnicze), włókienniczym (m.in. stosowanie barwników na bazie chloranilu czy barwników azowych), farbiarskim (stosowanie rozpuszczalników, tj. tetrachloroetylen) czy podczas produkcji środków ochrony roślin (stosowanie kwasu 2,4,5-trichlorofenoksyoctowego). W przemyśle chemicznym uwalnianie dioksyn zachodzi m.in. w wyniku syntezy oraz stosowania chlorobenzenu, pentachlorofenolu (PCP), syntezy węglowodorów alifatycznych, chlorowania związków organicznych, produkcji tworzyw PCV oraz rozpuszczalników tj. perchloroetylen, procesów nieorganicznych w których używa się chloru (np. ekstrakcja manganu z jego rud) bądź chlorowanych rozpuszczalników [3]. Równie istotnymi źródłami emisji dioksyn są spaliny wydechowe ze zużytych silników samochodowych (spalanie etyliny), wycieki oleju silnikowego oraz słabo zabezpieczone wysypiska śmieci [14, 15]. Według Brzeskiego [3] głównymi źródłami przemysłowymi dioksyn w Polsce są dwa zakłady chemiczne: *Organika Sarzyna* w Nowej Sarzynie, produkująca herbicyd *Chwastoks* którego komponentem jest kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy zanieczyszczony dioksynami oraz zakłady *Rokita* w Brzegu Dolnym, wytwarzające herbicydy na bazie kwasu 2,4,5-trichlorofenoksyoctowego.

W związku z zawodową ekspozycją na dioksyny osób zatrudnionych, zwłaszcza w przemyśle chemicznym, stale prowadzi się badania eksperymentalne mające na celu określenie wpływu tych ksenobiotyków na poszczególne tkanki i narządy oraz opracowanie skutecznej prewencji farmakologicznej [5, 8, 10, 35, 39].

Dioksyny nie posiadają barwy, smaku ani zapachu przez co są niewyczuwalne organoleptycznie. Wyżej wymienione cechy fizykochemiczne spowodowały, że związki te stały się groźną bronią w rękach terrorystów, czego przykładem było otrucie Prezydenta Ukrainy [41].

U podstaw molekularnego działania dioksyn leży aktywacja transkrypcji genów enzymów metabolizujących ksenobiotyki, w tym różnych form molekularnych cytochromu P-450 (CYP), zwłaszcza rodziny CYP1A1 [15, 21, 36, 42]. W wielu przypadkach reakcje katalizowane przez ten cytochrom prowadzą do powstania toksycznych metabolitów jak i kancerogennych/mutagennych produktów pośrednich [36]. Toksyczne metabolity i produkty pośrednie wpływają na ekspresję genów kontrolujących wzrost i różnicowanie komórek a także ekspresję genów kontrolujących reakcje biochemiczne, tj. synteza hormonów, enzymów, czynników wzrostu [8, 42]. Indukcja genów rodziny CYP1A1 znajduje się pod kontrolą obecnego w znakomitej większości komórek ludzi i zwierząt receptora cytoplazmatycznego AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) oraz białka jądrowego Arnt (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) [8, 36]. Ponadto dioksyny cechują się powinowactwem do receptora estrogenowego przez co przyczyniają się do zaburzeń rozrodczych oraz zaburzeń behawioralnych, związanych z wystąpieniem zmian w ekspresji receptorów w strukturach OUN. U potomstwa szczurów pochodzącego od matek zatrutych dioksynami obserwowano także charłactwo i niedorozwój kośćca, co koreluje obserwacjami innych autorów u ptaków żywiących się rybami zawierającymi dioksyny [6, 14, 18, 43].

W innych badaniach u intoksykowanych zwierząt obserwowano przede wszystkim: porfirię, hepatomegalię, atrofię grasicy oraz obwodowych węzłów chłonnych, nowotwory, zahamowanie owulacji [6, 8, 20, 37, 44, 45]. Z kolei u ludzi do najlepiej udokumentowanych skutków działania dioksyn należą [3, 14, 15, 31, 33]:

1. trądzik chlorowy (*chloracne*), charakteryzujący się hiperkeratozą i hiperplazją naskórka z towarzyszącymi zaburzeniami czynnościowo-morfologicznymi gruczołów łojowych,

2. zmiany w poziomie hormonów tarczycy z towarzyszącym upośledzeniem sprawności psychomotorycznej,
3. zaburzenia płodności bądź bezpłodność,
4. wzrost stężenia alfa- i beta- globulin oraz opóźnienie reakcji immunologicznej,
5. działanie karcynogenne (nowotwory przewodu pokarmowego, chłoniaki, mięsaki, nowotwory płuc),
6. działanie teratogenne prowadzące do obumarcia zarodka bądź wykształcenia wad rozwojowych, tj. jak aplazje kończyn czy rozszczepy podniebienia [3, 8, 11, 13, 14, 20]. Pomimo szerokiego spektrum oceny biologicznych skutków działania dioksyn u ludzi i zwierząt istnieją tylko nieliczne publikacje oceniające wpływ dioksyn na tkankę kostną.

Na podstawie wyników badań eksperymentalnych wykazano, że 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioksyna (TCDD) powoduje destrukcję tkanki łącznej [2], hamuje syntezę kolagenu I oraz indukuje stres oksydacyjny skutkujący wzrostem stężenia interleukin prozapalnych aktywujących osteoklastogenezę [8, 40]. Z badań innych autorów wynika, że zahamowanie przez dioksynę aktywności fosfatazy zasadowej oraz niektórych inicjatorów mineralizacji może wpływać na tworzenie tkanek zmineralizowanych gorszych jakościowo [25, 40]. Wykazano ponadto negatywne skutki oddziaływania dioksyn na biosyntezę wątrobowych białek, obserwowane w obrazie elektroforetycznym surowicy [4, 5], zmiany te wpływają także na proces osteogenezy.

Najważniejszymi składnikami pełnowartościowej kości są fosforany wapnia i magnezu. Od właściwego wysycenia macierzy tkanki kostnej solami tych pierwiastków (mineralizacji) zależą jej twardość oraz sprężystość. Proces mineralizacji młodej kości jest kontrolowany przez grupę białek, z których największą rolę odgrywają osteonektyna, osteokalcyna oraz fosfataza alkaliczna. Na biosyntezę tych białek wpływa negatywnie wiele ksenobiotyków, w tym także dioksyny. Obniżenie zawartości wapnia i magnezu w tkance kostnej może być przejawem zaburzeń jej mikrostruktury [14].

Przyjęto więc założenie, że dioksyna może wpływać na strukturę kości zwłaszcza w okresie rozwojowym. Wydają się to potwierdzać obserwowane zmiany w wyglądzie zewnętrznym potomstwa szczurów, którym podano TCDD [6]. Stwierdzony w powyższych badaniach m.in.

wyraźny niedorozwój kośćca może sugerować istnienie zaburzeń rozwojowych w zakresie tkanek twardych. Jak opisano we wstępie, dioksyny wpływając również na czynność niektórych hormonów (estrogeny, kortykosteron, T_3) mogą modyfikować prawidłowy rozwój tkanek twardych [15, 17, 19, 28]. TCDD, zaburzając gospodarkę estrogenową przyczynia się do zmniejszenia odkładania wapnia w tkankach zmineralizowanych, a zwiększając stężenie kortykosteronu stymuluje rozkład włókien kolagenowych. Wpływając wreszcie na stężenie aktywnej formy witaminy D_3 dioksyna przyczynia się do zahamowania aktywności fibroblastów [34].

Kluczową rolę w patomechanizmie działania TCDD odgrywa aktywacja receptora AhR, której tylko jedną z wielu konsekwencji jest zaburzenie syntezy włókien kolagenowych [1, 40], co może skutkować zaburzeniami struktury przestrzennej tkanki kostnej. Wydaje się więc słuszne poszukiwanie środków farmakologicznych posiadających zdolność łączenia się z receptorem AhR uniemożliwiając w ten sposób dioksynie tworzenia z nim aktywnych połączeń. Jak pokazują ostatnie badania eksperymentalne, dwa dobrze znane leki: tokoferol oraz kwas acetylosalicylowy cechują się właściwościami antagonistycznymi wobec receptora AhR [8, 26, 30], przez co rysuje się perspektywa potencjalnej możliwości poszerzenia wskazań do ich stosowania. Dodatkową właściwością ochronną powyższych substancji jest zdolność hamowania odczynu zapalnego wywołanego przez dioksyny [8].

W świetle powyższego celem pracy było zbadanie wpływu TCDD, tokoferolu i kwasu acetylosalicylowego podanych samicom szczurów na zawartość wapnia i magnezu w tkance kostnej ich przyszlęgo potomstwa.

2. Materiał i metody

2.1. Zwierzęta użyte w doświadczeniu

Przed przystąpieniem do badań eksperymentalnych uzyskano wymagane zezwolenia na wykonanie doświadczeń na zwierzętach (nr zezwolenia UM: 11/2009/0027; nr zgody LKE: 38/2009). W eksperymencie użyto samice szczurów szczepu Buffalo (wiek 9-11 tygodni, waga 130-150 gramów) pochodzące z hodowli Zwierzętarni Doświadczalnej Katedry Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. W trakcie eksperymentu zwierzęta przebywały

w klimatyzowanym pomieszczeniu w których panowały następujące warunki: 1. nadciśnienie, 2. 15 wymian powietrza/godzinę, 3. temperatura powietrza około 22°C, 4. wilgotność powietrza 55%, 4. cykl świetlny 12/12 godzin. Zwierzęta przetrzymywano w klatkach polistyrenowych z dostępem do karmy firmy „Labofeedh” oraz wody.

Podział zwierząt

Samice randomizowano wyodrębniając cztery grupy, zawierające po 6 osobników każda:

- 1. grupę kontrolną samic (SK)**, nie poddanych działaniu żadnych substancji chemicznych.
- 2. grupę samic (STCDD)**, którym podano roztwór 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny (TCDD) w jednorazowej dawce 5 µg/kg m.c. *i.m.*
- 3. grupę samic (STCDD+E)**, którym podano roztwór 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny (TCDD) w jednorazowej dawce 5µg/kg m.c. *i.m.* oraz podawano przez okres 3 tyg. roztwór octanu α -tokoferolu w dawce 30 mg/kg m.c./dzień *s.c.*
- 4. grupę samic (STCDD+ASA)**, którym podano roztwór 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny (TCDD) w jednorazowej dawce 5µg/kg m.c. *i.m.* oraz podawano przez okres 3 tyg. zawiesinę kwasu acetylosalicylowego w roztworze skrobi w dawce 50 mg/kg m.c./dzień *p.o.*

Po okresie 3 tygodni od podania TCDD w poszczególnych grupach (STCDD, STCDD+E, STCDD+ASA) skojarzono w/w grupy samic oraz grupę SK z losowo dobranymi samcami, pochodzącymi z tego samego szczepu, nie poddanymi działaniu żadnych substancji chemicznych. Po 7 dniowym okresie kojarzenia ciężarne samice umieszczono w oddzielnych klatkach (rys. 1).



Rys. 1. Schemat eksperymentu

Fig. 1. Diagram of the experiment

Po porodzie, wyodrębniono cztery grupy noworodków (o liczebności 6-10 sztuk, dobranych losowo, których ilość uwarunkowana była liczebnością miotów) pochodzących od samic ujętych w w/w grupach:

1. **noworodki (NK)** pochodzące od samic SK.
2. **noworodki (NTCDD)** pochodzące od samic STCDD.
3. **noworodki (NTCDD+E)** pochodzące od samic STCDD+E.
4. **noworodki (NTCDD+ASA)** pochodzące od samic STCDD+ASA.

W 2 dniu życia osobniczego z każdej z powyższych grup pobrano materiał do badań stężenia wapnia i magnezu. Materiał badawczy stanowiły wypreparowane: sklepienie czaszki oraz staw kolanowy.

2.2. Substancje i związki użyte w doświadczeniu

W pracy wykorzystano następujące substancje: octan α - tokoferolu (roztwór olejowy leku sporządzony na indywidualne zamówienie przez firmę Hasco-Lek S.A. we Wrocławiu); kwas acetylosalicylowy – Aspirin (Bayer) (zawiesina leku w roztworze skrobi); Thiopental (Biochemie GmbH); roztwór wzorcowy 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny (TCDD) (Greyhound Chromatography And Allied Chemicals) (rozpuszczony w DMSO (dimetylosulfotlenku) w stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$).

2.3. Oznaczenie wapnia i magnezu w tkankach zmineralizowanych

Oznaczenia pierwiastków wykonano w oparciu o metodę spektrometrii atomowej. W pierwszym etapie badane próbki przeprowadza się do postaci roztworu, a następnie rozpyla się go w płomieniu spektrome-

tru powodując dysocjację zawartych w roztworze pierwiastków do stanu atomowego. W końcowym etapie następuje analiza widma promieniowania emitowanego/absorbowanego przez dany pierwiastek, na podstawie czego można określić jego zawartość w próbce.

2.3.1 Mineralizacja materiału badawczego

Przeprowadzono mineralizację próbek „na mokro” w zamkniętym systemie mikrofalowym. Do naważki homogennej próbki (od 0,1 g do 0,5g) dodawano 5 cm³ stężonego kwasu azotowego (V) cz.d.a. i 1 cm³ stężonego nadtlenku wodoru cz.d.a., następnie próbki mineralizowano w mikrofalowym systemie przygotowania prób MARS 5. Mineralizaty przenoszono ilościowo do naczyń miarowych o pojemności 10 cm³ przy użyciu wody redestylowanej. Mineralizację przeprowadzono zgodnie z Polską Normą PN-EN 13805:2003.

2.3.2 Oznaczanie zawartości wapnia metodą atomowej spektrometrii emisyjnej

Przeprowadzono oznaczenie zawartości wapnia w płomieniu acetylen/powietrze metodą emisyjnej spektrometrii atomowej przy wykorzystaniu spektrometru absorpcji atomowej SpectraAA z przystawką do pracy w płomieniu AA240FS firmy Varian.

Oznaczenia zawartości Ca wykonano zgodnie z Procedurą Badawczą PB-01/AAS opracowaną i stosowaną w Laboratorium Badawczym Spektrometrii Absorpcji Atomowej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

2.3.3 Oznaczanie zawartości magnezu metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej

Przeprowadzono oznaczenie zawartości magnezu w płomieniu acetylen/powietrze metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej przy wykorzystaniu spektrometru absorpcji atomowej SpectraAA z przystawką do pracy w płomieniu AA240FS firmy Varian. Oznaczenia zawartości Mg wykonano zgodnie z Procedurą Badawczą PB-02/AAS opracowaną i stosowaną w Laboratorium Badawczym Spektrometrii Absorpcji Atomowej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Procedury badawcze stosowane w laboratorium opracowano na podstawie: Polska Norma PN-EN 14084:2004.

2.4. Analiza statystyczna

Opracowanie wyników badań opierało się na analizie statystycznej wyników pomiarów, która polegała na: oszacowaniu statystyk opisowych (średnia, odchylenie standardowe, mediana, wartości ekstremalne: minimum i maksimum); sprawdzeniu normalności rozkładu cech (wyników stężeń) testem Shapiro-Wilka; sprawdzeniu jednorodności wariancji wyników stężeń testem Bartletta; weryfikacji hipotez o równości poziomu cech mierzalnych o rozkładzie normalnym w więcej niż dwóch grupach za pomocą analizy wariancji (ANOVA); przedstawieniu wyników porównań w postaci wykresów pudełkowych (*Box and Whiskers*). Wszystkie hipotezy weryfikowano na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy pakietu programów statystycznych *STATISTICA 9.0*.

3. Wyniki

Oznaczenie poziomu magnezu w mg/g w kościach sklepienia czaszki noworodków z badanych grup wykazało statystycznie istotne zmniejszenie stężenia magnezu w grupie (NTCDD) - osobników pochodzących od matek poddanych działaniu dioksyny w odniesieniu do grupy kontrolnej (NK), w której matki noworodków nie były poddane działaniu TCDD (Rys. 2, Tabela 1, 2). Stwierdzono ponadto, że w grupie (NTCDD+ASP) jak i (NTCDD+E) dochodzi do wzrostu stężenia magnezu w pokrywie czaszki w odniesieniu do grupy (NTCDD), w której matki noworodków poddano działaniu tylko TCDD.

Tabela 1. Stosunek średniej wartości stężenia magnezu w sklepieniu czaszki w poszczególnych grupach doświadczalnych względem grupy kontrolnej

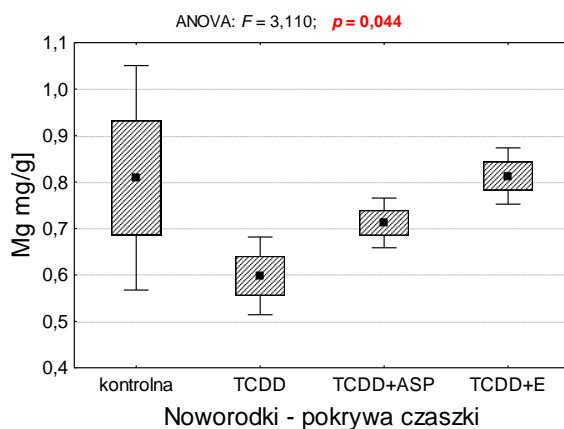
Table 1. The ratio of the mean concentration of magnesium in the cranial vault bones in each experimental group relative to the control group

Zależność danej grupy doświadczalnej względem grupy kontrolnej	Mg _{gr. dośw.} : Mg _{gr. NK}
(NTCDD) : (NK)	0,74 : 1,00
(NTCDD+E) : (NK)	1,01 : 1,00
(NTCDD+ASP) : (NK)	0,88 : 1,00

Tabela 2. Stosunek średnich wartości stężenia wapnia do magnezu w sklepieniu czaszki w poszczególnych grupach doświadczalnych

Table 2. The ratio of the concentration of calcium and magnesium in the cranial vault bones in the different experimental groups

Grupa doświadczalna	Ca _{gr. dośw.} : Mg _{gr. dośw.}
NK	43,39 : 1,00
NTCDD	44,30 : 1,00
NTCDD+E	66,60 : 1,00
NTCDD+ASP	47,80 : 1,00



Rys. 2. Podstawowe statystyki poziomu magnezu [mg/g] w kościach sklepienia czaszki noworodków z badanych grup oraz wynik analizy wariancji

Fig. 2. Basic statistics of magnesium levels [mg/g] in neonatal cranial vault bones and the results of analysis of variance

Analiza poziomu magnezu w stawie kolanowym noworodków szczurów z badanych grup wykazała obniżenie stężenia magnezu w grupie (NTCDD) w odniesieniu do grupy kontrolnej (NK) oraz szczególne podwyższenie poziomu magnezu w grupie poddanej działaniu dioksyny w której podawano tokoferol (NTCDD+E) w odniesieniu do grupy (NTCDD), w której matki poddano działaniu samej TCDD (rys. 3, tabela 3, 4).

Tabela 3. Stosunek średniej wartości stężenia magnezu w stawie kolanowym w poszczególnych grupach doświadczalnych względem grupy kontrolnej

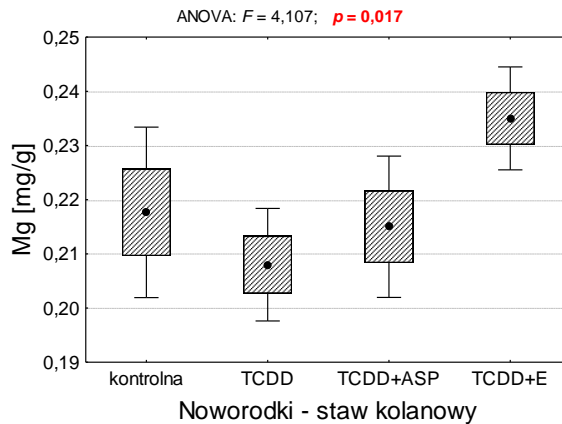
Table 3. The ratio of the average value of the concentration of magnesium in the knee joint in the various experimental groups relative to the control group

Zależność danej grupy doświadczalnej względem grupy kontrolnej	Mg _{gr. dośw.} : Mg _{gr. NK}
(NTCDD) : (NK)	0,95 : 1,00
(NTCDD+E) : (NK)	1,08 : 1,00
(NTCDD+ASP) : (NK)	0,99 : 1,00

Tabela 4. Stosunek średnich wartości stężenia wapnia do magnezu w stawie kolanowym w poszczególnych grupach doświadczalnych

Table 4. The ratio of the average concentration of calcium and magnesium in the knee joint in different experimental groups

Grupa doświadczalna	Ca _{gr. dośw.} : Mg _{gr. dośw.}
NK	22,11 : 1,00
NTCDD	74,04 : 1,00
NTCDD+E	46,01 : 1,00
NTCDD+ASP	76,37 : 1,00



Rys. 3. Podstawowe statystyki poziomu magnezu [mg/g] w stawie kolanowym noworodków szczurów z badanych grup oraz wynik analizy wariancji

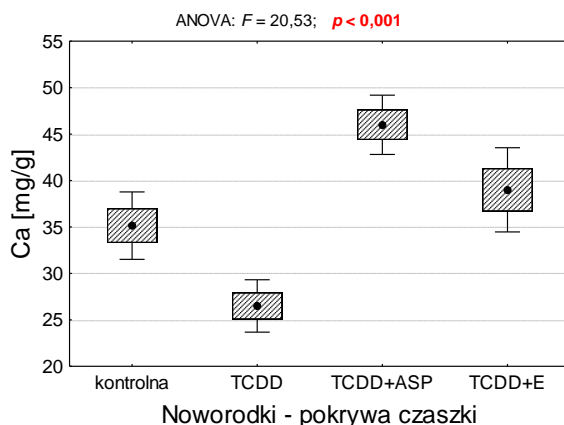
Fig. 3. Basic statistics of magnesium levels [mg/g] in neonatal knee joint bones and the results of analysis of variance

Analiza poziomu wapnia w mg/g w sklepieniu kości czaszki noworodków szczurzych z poszczególnych grup wykazała w grupie noworodków (NTCDD), których matki były poddane działaniu samej TCDD, istotny spadek stężenia wapnia. Natomiast podawanie kwasu acetylosalicylowego jak i tokoferolu powodowało istotny wzrost stężenia wapnia w grupach (NTCDD+ASP) oraz (NTCDD+E) (rys. 4, tabela 2, 5).

Tabela 5. Stosunek średniej wartości stężenia wapnia w sklepieniu czaszki w poszczególnych grupach doświadczalnych względem grupy kontrolnej

Table 5. The ratio of the mean concentration of calcium in the cranial vault bones in each experimental group relative to the control group

Zależność danej grupy doświadczalnej względem grupy kontrolnej	Ca _{gr. dośw.} : Ca _{gr. NK}
(NTCDD) : (NK)	0,76 : 1,00
(NTCDD+E) : (NK)	1,11 : 1,00
(NTCDD+ASP) : (NK)	1,31 : 1,00



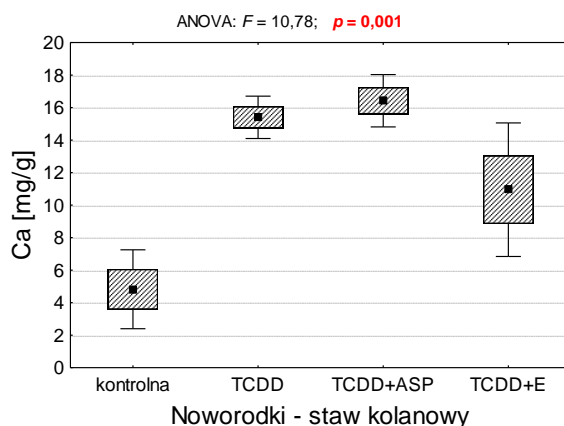
Rys. 4. Podstawowe statystyki poziomu wapnia [mg/g] w kościach sklepienia czaszki noworodków szczurów z badanych grup oraz wynik analizy wariancji
Fig. 4. Basic statistics of calcium levels [mg/g] in neonatal cranial vault bones and the results of analysis of variance

Analiza poziomu wapnia w stawie kolanowym noworodków wykazała, że w grupie (NTCDD) doszło do zmniejszenia stężenia wapnia w odniesieniu do grupy (kontrola). Natomiast w grupach (NTCDD+E

oraz NTCDD+ASA) pochodzących od matek poddanych działaniu TCDD, którym podawano tokoferol lub kwas acetylosalicylowy stwierdzono zwiększone stężenie wapnia w odniesieniu do grupy noworodków (NTCDD), których matki otrzymały samą TCDD (rys. 5, tabela 4, 6).

Tabela 6. Stosunek średniej wartości stężenia wapnia w stawie kolanowym w poszczególnych grupach doświadczalnych względem grupy kontrolnej
Table 6. The ratio of the average value of the concentration of calcium in the knee joint in the various experimental groups relative to the control group

Zależność danej grupy doświadczalnej względem grupy kontrolnej	Ca _{gr. dośw.} : Ca _{gr. NK}
(NTCDD) : (NK)	3,19 : 1,00
(NTCDD+E) : (NK)	2,27 : 1,00
(NTCDD+ASP) : (NK)	3,41 : 1,00



Rys. 5. Podstawowe statystyki poziomu wapnia [mg/g] w stawie kolanowym noworodków szczurów z badanych grup oraz wynik analizy wariancji

Fig. 5. Basic statistics of calcium levels [mg/g] in neonatal knee joint bones and the results of analysis of variance

4. Omówienie wyników

Struktura mineralna kości i zębów składa się z kryształów dihydroksyapatytów wapnia, które tworzą uporządkowaną sieć krystaliczną. Kryształy posiadają trzy przestrzenie, tj. rdzeń, powierzchnię rdzenia i otoczkę hydratacyjną. W rdzeniu kryształu występuje więcej magnezu

i węglanów oraz może dochodzić do wymiany jonów [27]. Jony magnezu mogą zastępować jony wapnia hamując wzrost kryształów. Powyższe dane wskazują, że w tkance kostnej występuje cały czas przebudowa, która może być zależna od działania zanieczyszczeń środowiskowych, do których zaliczamy m.in. dioksyny.

Dowodem na poparcie takiej tezy są badania Finnilä i wsp. [17], w których wykazano wpływ TCDD na właściwości macierzy kostnej. W eksperymencie tym stosowano u ciężarnych samic szczurów jednorazową dawkę TCDD (1 µg/kg m.c.) w 11 dniu ciąży, a pobrane od noworodków kości piszczelowe oceniano pod kątem mineralizacji, morfologii, twardości i ugięcia. Dowiedziono, że ekspozycja na TCDD w okresie rozwojowym powoduje spowolnienie dojrzewania matrycy kości, obniżenie jej mineralizacji, zmniejszenie wymiarów jak i wytrzymałości. W obecnych badaniach podano samicom szczurów TCDD w teratogenicznej dawce 5 µg/kg m.c. (określonej przez Huuskonena i wsp. [22]), wykazując znaczące obniżenie stężenia wapnia w kościach sklepienia czaszki oraz w stawach kolanowych u 2 dniowych noworodków. Powyższe wyniki mogą tłumaczyć wcześniejsze obserwacje własne, związane ze znacznym niedorozwojem kośćca występującym u dojrzałych osobników, pochodzących od samic poddanych działaniu TCDD [6]. Również inni autorzy wykazali wpływ TCDD na powstawanie zmian stężenia wapnia w kościach, wiążąc to m.in. ze zmianami endokrynnymi ze względu na powinowactwo dioksyn do receptora estrogenowego, co może mieć wpływ na rozwój struktury kości. Badania Gierthy i wsp. [19] dotyczące molekularnego mechanizmu biosyntezy macierzy zewnątrzkomórkowej oparte na hodowli szczurzych osteoblastów sklepienia czaszki wykazały, że niezaburzona ekspresja odpowiednich genów odpowiada za powstanie właściwego wzoru struktury tych komórek oraz prawidłowy proces mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej. Podanie TCDD spowodowało wyraźne zahamowanie tworzenia się właściwego układu komórek kościotwórczych oraz wpłynęło na ekspresję fosfatazy zasadowej i osteokalcyny. Na podstawie powyższego eksperymentu stwierdzono, że TCDD działając na estrogeny i witaminę D wpływa na ekspresję genów w komórkach kościotwórczych w trakcie ich różnicowania. Carpi i wsp. [12] w badaniach *in vitro* wykazali, że TCDD przyczynia się do występowania zaburzeń kościotworzenia. Dziesięciodniowa ekspozycja hodowli komórek macierzystych kości na TCDD doprowa-

działa do zmian w stężeniu m-RNA, będącego markerem różnicowania komórek kościotwórczych, jak również do zmian w ekspresji komórkowych białek odpowiedzialnych za właściwą organizację cytoszkieletu i transport komórkowy w osteoblastach. TCDD doprowadziła także do zmniejszenia ekspresji białek wiążących wapń, co może wpływać na proces odkładania tego pierwiastka w osteoblastach. W innych badaniach, w których wykorzystano komórki macierzyste kości pochodzące ze szkieletu kończyny dolnej myszy i szczurów wykazano, że TCDD zmniejsza stężenie m-RNA oraz obniża aktywność fosfatazy zasadowej i osteokalcyny, przy czym spadek ten ściśle korelował z dawką dioksyny [28]. Ponadto wyżej cytowani autorzy podkreślają rolę osteoblastycznego receptora AhR w mechanizmie oddziaływania TCDD na komórki kościotwórcze. Badania Naruse i wsp. [32] określające wpływ dioksyny na hodowlę mysich osteoblastów pobranych ze sklepienia czaszki wykazały spadek aktywności fosfatazy zasadowej, obniżenie depozycji wapnia przez te komórki oraz zwiększenie ekspresji receptora AhR. Zmianom tym towarzyszył spadek ekspresji m-RNA osteokalcyny, która stanowi marker różnicowania osteoblastów. W drugiej części powyższego eksperymentu podanie ciężarnym samicom dioksyny spowodowało u ich potomstwa zahamowanie prawidłowego procesu wapnienia kości. Badania deformacji kostnych zlokalizowanych w zakresie śródstopia oraz stopy u czapli siwych *Ardea cinerea* wykazały, że ich kości posiadały wyraźnie zmniejszoną wytrzymałość mechaniczną oraz znacznie obniżoną zawartość wapnia, co może być związane ze stwierdzeniem bardzo dużego stężenia polichlorowanych dibenzo-*p*-dioksyn i polichlorowanych dibenzofuranów w organizmie tych zwierząt [43]. W badaniach kości udowych mew srebrzystych *Larus argentatus* z Krainy Wielkich Jezior (USA), organizmy których posiadały wysoki współczynnik toksyczności TCDD, stwierdzono zmniejszoną zawartość minerałów, gęstość oraz sztywność [18]. Według cytowanych autorów obniżenie wartości podstawowych parametrów kości wskazuje na zaburzenia w procesie ich mineralizacji. W obecnych badaniach wykazano, że podawanie kwasu acetylosalicylowego jak i tokoferolu powodowało istotny wzrost stężenia wapnia mierzonego w pokrywach czaszek w grupach (NTCDD+ASP) oraz (NTCDD+E) co może sugerować, że kwas acetylosalicylowy i tokoferol przyczyniają się do wzrostu uwapnienia kości, przeciwdziałając destruktywnemu działaniu TCDD. Analiza stężenia wapnia w stawie

kolanowym wskazuje, że kierunek zmian tego pierwiastka w grupach (NTCDD+ASP) oraz (NTCDD+E) w odniesieniu do grupy (NTCDD) jest podobny do kierunku zmian stężenia wapnia mierzonego w pokrywach czaszek w analogicznych grupach.

Skutkiem destrukcyjnego oddziaływania dioksyn na metabolizm tkanki kostnej i kościotworzenie, przejawiającego się opisanym powyżej spadkiem poziomu wapnia, może być prozapalne działanie dioksyn. Związane jest ono z generacją wolnych rodników powodujących wzrost stężenia IL-1, IL-6 i TNF jak i stymulacją COX-2. Wykazano, że aktywacja dwóch dróg odczynu zapalnego: poprzez prozapalne interleukiny oraz poprzez stymulację COX-2 wywiera działanie na przebieg mineralizacji kości, którego skutki można znaleźć nawet w archeologicznym materiale kostnym w postaci pierścieni Harrisa. Wcześniejsze badania Całkosińskiego [8] wykazały, że stosowanie tokoferolu w dużych dawkach przez okres 3 tygodni od podania TCDD przyczyniało się do znacznego obniżenia IL-6 i TNF jak i zabezpieczało kolagen przed degradacją. Koncepcja przyjęta w obecnych badaniach, związania z podawaniem kwasu acetylosalicylowego przez okres 3 tygodni od momentu podania TCDD miała także na celu zmniejszenie reakcji zapalnej indukowanej poprzez stymulację COX-2. Istnieją bowiem doniesienia, że stosowanie kwasu acetylosalicylowego w dużych dawkach blokuje cyklooksygenazę 2 [29, 30].

Antyoksydacyjne właściwości tokoferolu oraz przeciwzapalne kwasu acetylosalicylowego stanowią cenne uzupełnienie wspomnianego we wstępie antagonistycznego działania tych leków wobec receptora AhR [26, 30]. Istnieją nieliczne badania, w których wykazano, że innym antagonistą receptora AhR mogąym ograniczać negatywny wpływ dioksyn na tkankę kostną jest resweratrol. W doświadczeniu Singha i wsp. z wykorzystaniem doświadczalnego modelu osteogenezy u kurcząt oceniono wpływ TCDD oraz resweratrolu na ten proces. W powyższym modelu doświadczalnym wykazano znaczną redukcję przez TCDD poziomu białek, tj. kolagenu typu I, osteopontyny, sialoproteiny oraz fosfatazy zasadowej. Stosowanie resweratrolu spowodowało istotne odwrócenie toksycznego działania dioksyny w stosunku do tkanki kostnej, potwierdzone właściwym poziomem białek jej macierzy [40].

Przeprowadzona w obecnych badaniach analiza stężenia magnezu w kościach noworodków pochodzących od matek poddanych działaniu

dioksyny wykazała znaczący spadek tego pierwiastka w odniesieniu do grupy kontrolnej. Dynamika spadku stężenia magnezu była podobna jak w przypadku wyżej opisanego wapnia. Również analiza wyników poziomu magnezu w stawach kolanowych pochodzących od noworodków szczurzych wykazała podobny kierunek zmian stężenia tego pierwiastka jak w pokrywach czaszek w obrębie badanych grup. Zarówno pomiary stężenia wapnia jak i magnezu w kościach wykazują bezwzględne oddziaływanie TCDD powodujące zaburzenia mineralizacji kości u noworodków. Wyniki uzyskane w oznaczeniu stężenia wapnia i magnezu w pokrywach czaszek sugerują, że kwas acetylosalicylowy jak i tokoferol usprawniają gospodarkę wapniowo-magnezową naruszoną przez działanie TCDD. Przy czym należy podkreślić brak doniesień w piśmiennictwie na temat wpływu TCDD na stężenie magnezu w kościach. Istnieją tylko nieliczne publikacje dotyczące wpływu TCDD na stężenie magnezu w wątrobie i osoczu krwi. Wykazano, że podawanie TCDD nie przyczyniało się do zmian zawartości magnezu w cytozolu komórek wątrobowych [45]. Z kolei w badaniach Kellera, dotyczących określenia wybranych parametrów krwi żółwi morskich *Caretta caretta* skażonych dioksyną, wykazano znaczące obniżenie poziomu magnezu oraz spadek stężenia fosfatazy alkalicznej [24].

Uzyskane wyniki sugerują, że stosowanie tokoferolu bądź kwasu acetylosalicylowego przyczynia się do wzrostu zarówno stężenia wapnia jak magnezu w kościach noworodków poddanych działaniu TCDD.

5. Wnioski

Stwierdzono obniżenie stężenia wapnia i magnezu zarówno w próbach pobranych z kości sklepienia czaszki jak i próbach pobranych ze stawu kolanowego noworodków pochodzących od matek poddanych działaniu TCDD w odniesieniu do wartości kontrolnych. Stwierdzono także, że podawanie matkom poddanym działaniu TCDD tokoferolu lub kwasu acetylosalicylowego zapobiega spadkom stężenia wapnia i magnezu w tkance kostnej.

Praca została wykonana w ramach grantu nr 1820 UM im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Praca współfinansowana ze środków UE w ramach projektu Biomed realizowanego przez WCB EIT+.

Literatura

1. **Andreasen C.H., Stender-Petersen K.L., Mogensen M.S., Torekov S.S., Wegner L., Andersen G., Nielsen A.L., Albrechtsen A., Borch-Johnsen K., Rasmussen S.S., Clausen J.O., Sandbaek A., Lauritzen T., Hansen L., Jorgensen T., Pedersen O., Hansen T.:** *Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation.* Diabetes. 57, 95–101 (2008).
2. **Andreasen E.A., Mathew L.K., Lohr C.V., Hasson R., Tanguay R.L.:** *Aryl hydrocarbon receptor activation impairs extracellular matrix remodeling during zebra fish fin regeneration.* Toxicol Sci. 95, 215–226 (2007).
3. **Brzeski Z.:** *Dioksyny i furany w środowisku i ich wpływ na organizm.* Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu. 17, 161–164 (2011).
4. **Całkosinski I., Rosińczuk-Tonderys J., Bazan J., Dzierzba K., Całkosńska M., Majda J., Dobrzyński M., Bronowicka-Szydelko A.:** *The influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on hematological parameters during experimentally induced pleuritis in rats.* Inflammation. 36, 387–404 (2013).
5. **Całkosinski I., Rosińczuk-Tonderys J., Bronowicka-Szydelko A., Dzierzba K., Bazan J., Dobrzyński M., Majda J., Gamian A.:** *Effect of tocopherol on biochemical blood parameters in pleuritis-induced rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.* Toxicol Ind Health. (2013).
6. **Całkosinski I., Borodulin-Nadzieja L., Stańda M., Wasilewska U., Cegielski M.:** *Influence of a single dose of TCDD on estrogen levels and reproduction in female rats.* Med Wet. 59, (2003).
7. **Całkosinski I., Rosińczuk-Tonderys J., Dobrzyński M., Pałka Ł., Bazan J.:** *Occurrence of Disseminated Intravascular Coagulation in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) treated rats with induced pneumonia.* Advances In Experimental Medicine & Biology. (2013).
8. **Całkosinski I., Rosińczuk-Tonderys J., Szopa M., Dobrzyński M., Gamian A.:** *High doses of tocopherol in the prevention and potentiation of dioxin in experimental inflammation-potential application.* Postepy Hig Med Dosw. 65, 143–157 (2011).
9. **Ciftci O., Aydin M., Ozdemir I., Vardi N.:** *Quercetin prevents 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced testicular damage in rats.* Andrologia. 44, 164–173 (2012).
10. **Couture L. A., Harris M. W., Birnbaum L. S.:** *A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: recent advances toward understanding the mechanism.* Teratology 42, 619–627 (1990).

11. **Carpi D., Korkalainen M., Airoidi L., Fanelli R., Hakansson H., Muhonen V., Tuukkanen J., Viluksela M., Pastorelli R.:** *Dioxin-sensitive proteins in differentiating osteoblasts: effects on bone formation in vitro.* Toxicol Sci. 108, 330–343 (2009).
12. **Di Domenico A., Silano V., Viviano G., Zapponi G.:** *Accidental release of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) at Seveso, Italy. IV. Vertical distribution of TCDD in soil.* Ecotoxicol Environ Saf. 4, 327–338 (1980).
13. **Dobrzyński M.:** *The influence of tocopherol and acetylsalicylic acid on tooth organ structure in offspring of rat dams undergoing 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).* Wrocław Medical University, 2012.
14. **Dobrzyński M., Calkosiński I., Przywitowska I., Kobierska-Brzoza J., Czajczyńska-Waszkiwicz A., Soltan E., Parulska O.:** *The effects of dioxins in environmental pollution on development of teeth disorders.* Polish J of Environ Stud. 18, 319–323 (2009).
15. **Fiedler H.:** *National PCDD/PCDF release inventories under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.* Chemosphere. 67, 96–108 (2007).
16. **Finnila M.A., Zioupos P., Herlin M., Miettinen H.M., Simanainen U., Hakansson H., Tuukkanen J., Viluksela M., Jamsa T.:** *Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on bone material properties.* J Biomech. 43, 1097–1103 (2010).
17. **Fox G.A., Lundberg R., Wejheden C., Lind L., Larsson S., Orberg J., Lind P.M.:** *Health of herring gulls (Larus argentatus) in relation to breeding location in the early 1990s. III. Effects on the bone tissue.* J Toxicol Environ Health A. 71, 1448–1456 (2008).
18. **Gierthy J.F., Silkworth J.B., Tassinari M., Stein G.S., Lian J.B.:** *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits differentiation of normal diploid rat osteoblasts in vitro.* J Cell Biochem. 54, 231–238 (1994).
19. **Gray L. E., Ostby J. S.:** *In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring.* Toxicol Appl Pharmacol 133, 285–294 (1995).
20. **Guengerich F.P.:** *Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes.* J Biol Chem. 266, 10019–10022 (1991).
21. **Huuskonen H., Unkila M., Pohjanvirta R., Tuomisto J.:** *Developmental toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the most TCDD-resistant and -susceptible rat strains.* Toxicol Appl Pharmacol. 124, 174–180 (1994).
22. **IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 69: Polychlorinated Dibenzopara-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans.** International Agency for Research on Cancer. Lyon, 1997.

23. **Keller J.M., Kucklick J.R., Stamper M.A., Harms C.A., McClellan-Green P.D.:** *Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA.* Environ Health Perspect. 112, 1074–1019 (2004).
24. **Kiukkonen A., Viluksela M., Sahlberg C., Alaluusua S., Tuomisto J.T., Tuomisto J., Lukinmaa P.L.:** *Response of the incisor tooth to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in a dioxin-resistant and a dioxin-sensitive rat strain.* Toxicol Sci. 69, 482–489 (2002).
25. **Kloser E., Böhmdorfer S., Brecker L., Kählig H., Netscher T., Mereiter K., Rosenau T.:** *Synthesis of 5-(Fluorophenyl)tocopherols as Novel Dioxin Receptor Antagonists.* European Journal of Organic Chemistry. 13, 2450–2457 (2011).
26. **Kmieć Z.:** *Histologia i cytofizjologia zęba i jamy ustnej.* Elsevier Urban & Partner Wrocław, 2007.
27. **Korkalainen M., Kallio E., Olkku A., Nelo K., Ilvesaro J., Tuukkanen J., Mahonen A., Viluksela M.:** *Dioxins interfere with differentiation of osteoblasts and osteoclasts.* Bone. 44, 1134–1142 (2009).
28. **MacDonald C.J., Cheng R.Y., Roberts D.D., Wink D.A., Yeh G.C.:** *Modulation of carcinogen metabolism by nitric oxide-aspirin 2 is associated with suppression of DNA damage and DNA adduct formation.* J Biol Chem. 284, 22099–22107 (2009).
29. **MacDonald C.J., Ciolino H.P., Yeh G.C.:** *The drug salicylamide is an antagonist of the aryl hydrocarbon receptor that inhibits signal transduction induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.* Cancer Res. 64, 429–434 (2004).
30. **Michalek J.E., Akhtar F.Z., Longnecker M.P., Burton J.E.:** *Relation of serum 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) level to hematological examination results in veterans of Operation Ranch Hand.* Arch Environ Health. 56, 396–405 (2001).
31. **Naruse M., Ishihara Y., Miyagawa-Tomita S., Koyama A., Hagiwara H.:** *3-Methylcholanthrene, which binds to the arylhydrocarbon receptor, inhibits proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro and ossification in vivo.* Endocrinology. 143, 3575–3581 (2002).
32. **Neuberger M., Landvoigt W., Derntl F.:** *Blood levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in chemical workers after chloracne and in comparison groups.* Int Arch Occup Environ Health. 63, 325–327 (1991).

33. **Nishimura N., Nishimura H., Ito T., Miyata C., Izumi K., Fujimaki H., Matsumura F.:** *Dioxin-induced up-regulation of the active form of vitamin D is the main cause for its inhibitory action on osteoblast activities, leading to developmental bone toxicity.* Toxicol Appl Pharmacol. 236, 301–309 (2009).
34. **Oguz F., Ciftci O., Aydın M., Timurkaan N., Beytur A., Altıntaş R., Parlakpınar H.:** *Aminoguanidine prevents testicular damage-induced-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male rats.* Andrologia. 45, 225–231 (2013).
35. **Palut D., Kostka G., Strucinski P.:** *The role of nuclear receptors in cytochrome P-450 induction by xenochemicals.* Roczniki Państwowego Zakładu Higieny. 53, 321–332 (2002).
36. **Pohjanvirta R., Tuomisto J.:** *Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: Effects, mechanisms and animal models.* Pharmacol Rev 46, 483–549 (1994).
37. **Rayne S., Ikonomou M.G., Butt C.M., Diamond M.L., Truong J.:** *Polychlorinated dioxins and furans from the World Trade Center attacks in exterior window films from lower Manhattan in New York City.* Environ Sci Technol. 39, 1995–2003 (2005).
38. **Singh N.P., Singh U.S., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S.:** *Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) protects pregnant mother and fetus from the immunotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.* Mol Nutr Food Res. 55, 209–219, (2011).
39. **Singh S.U., Casper R.F., Fritz P.C., Sukhu B., Ganss B., Girard B., Jr., Savouret J.F., Tenenbaum H.C.:** *Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol.* J Endocrinol. 167, 183–195 (2000).
40. **Sorg O., Zennegg M., Schmid P., Fedosyuk R., Valikhnovskiy R., Gaide O., Kniazevych V., Saurat J.H.:** *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) poisoning in Victor Yushchenko: identification and measurement of TCDD metabolites.* Lancet. 374, 1179–1185 (2009).
41. **Strucinski P., Piskorska-Pliszczynska J., Goralczyk K., Warenik-Bany M., Maszewski S., Czaja K., Ludwicki J.K.:** *Dioxins and food safety.* Roczniki Państwowego Zakładu Higieny. 62, 3–17 (2011).
42. **Thompson H.M., Fernandes A., Rose M., White S., Blackburn A.:** *Possible chemical causes of skeletal deformities in grey heron nestlings (Ardea cinerea) in North Nottinghamshire, UK.* Chemosphere. 65, 400–409 (2006).

43. **Wahba Z.Z., al-Bayati Z.A., Stohs S.J.:** *Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the hepatic distribution of iron, copper, zinc, and magnesium in rats.* J Biochem Toxicol. 3, 121–129 (1988).
44. **Vos J.G., Moore J.A., Zinkl J.G.:** *Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the immune system of laboratory animals.* Environ Health Perspect. 5, 149–162 (1973).
45. **Wielgościński G.:** *Możliwości ograniczania emisji dioksyn – realizacja postanowień Konwencji Sztokholmskiej. Aktualne problemy w ochronie powietrza atmosferycznego.* PZITS Wrocław, 2008.

The Use of Acetylsalicylic Acid and Tocopherol in Protecting Bone Against the Effects of Dioxin Contamination

Abstract

Dioxins are released into the environment as by-products of technological processes, i.a. in the chemical industry, pulp and paper industry, metallurgical industry, textile industry and dyeing industry. Dioxins are a group of compounds recognized by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as carcinogens of Group A since 01/06/1997. The carcinogenic action has been demonstrated on animals. Despite stringent obligations arising from the provisions of The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants on reducing POPs emissions to the environment (including dioxins) emission of these substances is still significant. These compounds often enter the food chain in random or intentional way and accumulate in organisms in the top of the food chain. This leads to the poisoning of the organism and appearance of clinical symptoms. According to the real hazard of poisoning the people, especially employed in the chemical industry, who are exposed to dioxins, research to determine the impact of these xenobiotics on various tissues and organs as well as to develop of effective pharmacological prevention is constantly conducted. Despite of the wide spectrum of the assessment of dioxins biological effects among humans and animals, there are only a few publications evaluating the impact of dioxins on the bone tissue. The main components of the fully functional bone are calcium phosphates and magnesium phosphates. From the proper saturation of bone matrix with salts of these chemical elements (mineralization) depends the hardness and elasticity of the bone. The young bone mineralization is controlled by a group of proteins, from which the most important is osteonectin, osteocalcin and alkaline phosphatase. Many xenobiotics, including dioxins, have a negative influence on the biosynthesis of these proteins. The

measurement of calcium and magnesium concentration in bone is one of the methods for assessing bone destruction. The aim of this study was to investigate the effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats on calcium and magnesium levels in bone tissue of their offspring. Moreover the aim of this study was to check whether the administration of the dioxin receptor antagonists – tocopherol and acetylsalicylic acid – can reduce negative effects of dioxin action. Study was performed on 2-day newborns of Buffalo strain rats. Lower levels of calcium and magnesium was found both in cranial vault bones and the knee from newborns of mothers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. It was shown that administration of mothers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin tocopherol or acetylsalicylic acid prevent decreases in calcium and magnesium concentrations in the bone tissue of the offspring.

Słowa kluczowe: tokoferol, kwas acetylosalicylowy, tkanka kostna, TCDD

Key words: tocopherol, acetylsalicylic acid, bone, TCDD,