

4-Chloro-2-toliloamina i jej chlorowodorek (w przeliczeniu na 4-chloro-2-toliloaminę) – frakcja wdychalna

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

4-Chloro-*o*-toluidine and its hydrochloride – inhalable fraction

Documentation of proposed values of occupational exposure limits (OELs)

dr hab. ANNA KILANOWICZ, prof. UM

<https://orcid.org/0000-0001-6261-0769>

dr JOANNA STRAGIEROWICZ

<https://orcid.org/0000-0003-1137-8239>

dr MAŁGORZATA SKRZYPIŃSKA-GAWRYSIĄK

<https://orcid.org/0000-0002-2391-1750>

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Medical University of Lodz, Poland

NDS	0,02 mg/m ³
NDSch:	nie ustalono
NDSP	nie ustalono
DSB:	nie ustalono
Carc. 1B	substancja o działaniu rakotwórczym na człowieka kategorii zagrożenia 1B
Skóra	wchłanianie substancji przez skórę może być tak samo istotne, jak przy narażeniu drogą oddechową

Data zatwierdzenia przez Zespół Ekspertów: 25-27.06.2019 r.

Data zatwierdzenia przez Komisję ds. NDS i NDN: 23.06.2020 r.

Streszczenie

4-Chloro-2-toliloamina (4-COT, 4-chloro-*o*-toluidyna) i jej chlorowodorek są ciałami stałymi. W warunkach laboratoryjnych 4-COT jest stosowana jako barwnik w immunochemii i w biologii molekularnej.

W Polsce narażenie na 4-chloro-2-toliloaminę i/lub jej chlorowodorek zgłaszały wyłącznie laboratoria. Zgłoszona do rejestru liczba narażonych na 4-COT wyniosła 262 osoby w 2012 r., a w 2017 – 12 osób.

¹ Wartość NDS 4-chloro-2-toliloaminy – frakcji wdychalnej została w dniu 23.06.2020 r. przyjęta na 95. 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 110) w celu jej wprowadzenia do rozporządzenia w załączniku nr 1 w części A wykazu najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia 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.

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

W warunkach narażenia zawodowego 4-COT wchłania się głównie przez skórę i drogi oddechowe. U osób narażonych stwierdzono działanie methemoglobiniotwórcze związku oraz występowanie objawów ze strony dróg moczowych w postaci ostrego, krwotocznego zapalenia pęcherza moczowego.

Mediany dawek letalnych 4-COT dla gryzoni (drogą pokarmową) wynoszą $860 \div 1\,058$ mg/kg mc. Związek ten wywiera także umiarkowane działanie drażniące na skórę i oczy. Dane na temat toksyczności podprzewlekłej i przewlekłej 4-COT dla zwierząt wskazują na toksyczność ogólnoustrojową.

4-COT wykazuje działanie mutagenne i genotoksycznie zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. Powoduje uszkodzenie DNA oraz tworzy addukty z DNA.

W dostępnym piśmiennictwie nie ma informacji na temat wpływu 4-COT na rozrodczość ludzi. Nie ma danych na temat embriotoksyczności i teratogenności tego związku. W doświadczeniu na myszach wykazano, że 4-COT nie ma wpływu na potencjał rozrodczy samców oraz rozwój potomstwa.

U osób zawodowo narażonych na 4-COT stwierdzano istotny wzrost występowania raka pęcherza moczowego. Brak jest danych o wielkości stężeń 4-COT, na jakie osoby te były narażone.

4-COT jest związkiem rakotwórczym dla zwierząt.

4-COT ma zharmonizowaną klasyfikację jako substancja rakotwórcza kategorii zagrożenia 1B. IARC zaliczyła 4-COT do grupy 2A – związków o prawdopodobnym działaniu rakotwórczym na człowieka.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych dotyczących wydajności i wchłaniania 4-COT różnymi drogami. U zwierząt metabolizm 4-COT może przebiegać szlakami *N*-acetylacji i *N*-hydroksylacji/*N*-oksydacji, przy udziale CYP1A1 i/lub CYP1A2, do aktywnych metabolitów. Związek jest wydalany głównie z moczem w postaci niezmienionej oraz metabolitów, np. kwasu 5-chloroantranilowego i 4-chloro-2-metyloacetanilidu.

Nie ma danych na temat toksykokinetyki 4-COT u ludzi.

W większości państw nie ustalono wartości dopuszczalnych stężeń dla 4-COT w środowisku pracy ze względu na jej potencjał rakotwórczy. Jedynym krajem europejskim, w którym ustalono wartość normatywu, jest Chorwacja, gdzie wartość NDS ustalono na poziomie $0,01$ mg/m³ z jednoczesną notacją „skóra”. Podstawy ustalenia tej wartości nie są znane.

Jako podstawę do zaproponowania wartości NDS przyjęto działanie rakotwórcze 4-COT. Wartość NDS wyprowadzono przy wykorzystaniu współczynnika $SF = 0,27$ (mg/kg-dzień)⁻¹, ustalonego na podstawie występowania nowotworów naczyńowych u myszy. Przy założonym ryzyku $R = 10^{-4}$ obliczona wartość NDS wynosi $0,02$ mg/m³. Nie znaleziono podstaw do ustalenia wartości chwilowej NDSch i dopuszczalnego stężenia w materiale biologicznym (DSB). Narażenie przez skórę może mieć znaczny udział w ilości związku pobranej przez pracowników, wymagana jest więc notacja „skóra”.

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: 4-chloro-2-tolilodamina, toksyczność, narażenie zawodowe, NDS, nauki o zdrowiu, inżynieria środowiska.

Abstract

4-Chloro-*o*-toluidine (4-COT) and its hydrochloride are solids. 4-Chloro-*o*-toluidine is currently used as a dye in immunochemistry and molecular biology. In Poland, exposure to 4-COT and/or its hydrochloride was only reported by laboratories. The number of people exposed was 262 in 2012 and 12 in 2017. Under occupational exposure conditions, 4-COT is absorbed through the skin and airways. Methemoglobinogenic effects and acute hemorrhagic cystitis were diagnosed in exposed individuals. Median lethal doses after administration of 4-COT by the oral route to rodents were 860-1058 mg/kg b.w. The compound had a moderately irritating effect on skin and eyes. Studies of subchronic and chronic toxicity in animals indicate systemic toxicity. 4-COT had mutagenic and genotoxic effects *in vivo* as *in vitro*. It caused damage and adducts of DNA. There are no data on the effects of 4-COT on human reproduction and no data on its embryotoxicity and teratogenicity. In mice, 4-COT did not affect the reproductive potential of males or the development of their offspring. A significant increase in the incidence of bladder cancer was observed in individuals occupationally exposed to 4-COT. There are no data on the concentrations of 4-COT to which these individuals were exposed. 4-COT is an animal carcinogen. 4-COT is classified as a category 1B carcinogen. IARC has classified 4-COT into group 2A – compounds with probable carcinogenic effects in humans. No data are available on the rate and efficiency of absorption of 4-COT by different routes. In animals, the metabolism of 4-COT may be via *N*-acetylation and *N*-hydroxylation/*N*-oxidation routes, involving CYP1A1 and/or CYP1A2, to active metabolites. The compound is excreted mainly with urine in unaltered form and the metabolites, e.g. 5-chloroantranilic acid and 4-chloro-2-methylacetanilide. There are no data on the toxicokinetic of 4-COT in humans. In most countries, no MAC values have been established due to the carcinogenic potential of 4-COT. Only in Croatia the MAC value was set at 0.01 mg/m³, with the notation 'skin'. The basis for establishing this value is unknown. The carcinogenic effect of 4-COT has been used as a basis for proposing the MAC values.

The value of MAC was derived from the factor $SF = 0.27 \text{ (mg/kg-day)}^{-1}$, determined on the basis of the occurrence of vascular tumors in mice. At the assumed risk of $R = 10^{-4}$, the calculated MAC value is 0.02 mg/m^3 . No basis for establishing STEL and BEI values was found. As dermal absorption may be as important as inhalation exposure, a “skin” notation is required. This article discusses the problems of occupational safety and health, which are covered by health sciences and environmental engineering.

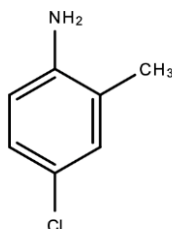
Key words: 4-chloro-*o*-toluidine, toxicity, occupational exposure, MAC, health sciences, environmental engineering.

CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI, ZASTOSOWANIE, NARAŻENIE ZAWODOWE

Ogólna charakterystyka substancji

Ogólna charakterystyka 4-chloro-2-toliloaminy (ChemIDplus 2019a; PubChem 2019a; IARC 2010; Rozporządzenie... 2008):

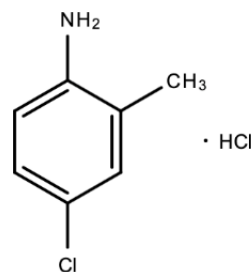
- wzór sumaryczny C_7H_8ClN
- wzór strukturalny



- nazwa CAS 4-chloro-2-metylobenzamina
- nazwa zwyczajowa 4-chloro-*o*-toluidyna
- numer CAS 95-69-2
- numer RTECS XU5000000
- numer WE 202-441-6
- numer indeksowy 612-196-00-0
- synonimy: 2-amino-5-chloro-toluen; 3-chloro-6-aminotoluen; 4-chloro-2-metyloanilina; 4-chloro-6-metyloanilina; (4-chloro-2-metylofenylo)amina; 4-chloro-*orto*-toluidyna; 5-chloro-2-aminotoluen; *para*-chloro-*orto*-toluidyna; 2-metylo-4-chloroanilina; 2-metylo-4-chlorobenzamina.

Ogólna charakterystyka chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy (ChemIDplus 2019b; PubChem 2019b; IARC 2010; Rozporządzenie... 2008):

- wzór sumaryczny $C_7H_8ClN \cdot HCl$
- wzór strukturalny



- nazwa CAS chlorowodorek 4-chloro-2-metylobenzaminy
- nazwa zwyczajowa chlorowodorek 4-chloro-*o*-toluidyny
- numer CAS 3165-93-3
- numer RTECS XU5250000
- numer WE 221-627-8
- numer indeksowy 612-196-00-0
- synonimy: chlorowodorek 2-metylo-4-chloroaniliny; chlorowodorek 4-chloro-2-metyloaniliny; chlorowodorek *para*-chloro-*orto*-toluidyny.

Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywę 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporzą-

dzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz. Urz. UE L353 z dnia 31.12.2008 r. ze zm.) 4-chloro-2-toliloamina i jej chlorowodorek mają zharmonizowaną klasyfikację, wg tabeli 3.1 załącznika VI.

Klasyfikację tę zamieszczono w tabeli 1. i przedstawiono na rysunku 1.

Tabela 1.

Zharmonizowana klasyfikacja oraz oznakowanie 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodoru (Rozporządzenie... 2008)

Międzynarodowa terminologia chemiczna	Klasyfikacja		Oznakowanie	
	klasa zagrożenia i kody kategorii	kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia	piktogram, kody haseł ostrzegawczych	kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia
4-chloro-o-toluidine 4-chloro-o-toluidine hydrochloride	Carc. 1B Muta. 2 Acute Tox. 3* Aquatic Acute 1 Aquatic Chronic 1	H350 H341 H331 H311 H301 H400 H410	GHS06 GHS08 GHS09 Dgr	H350 H341 H331 H311 H301 H410

Objaśnienia:

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

H350 – może powodować raka.

Muta. 2 – mutagenność, kategoria zagrożenia 2.

H341 – podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne.

Acute Tox. 3* – toksyczność ostra (po narażeniu drogą inhalacyjną, w kontakcie ze skórą i po połknięciu), kategoria zagrożenia 3*.

(*) – minimum klasyfikacji.

H331 – działa toksycznie w następstwie wdychania.

H311 – działa toksycznie w kontakcie ze skórą.

H301 – działa toksycznie po połknięciu.

Aquatic Acute 1 – zagrożenie dla środowiska wodnego, kategoria ostra 1.

H400 – działa bardzo toksycznie na organizmy wodne.

Aquatic Chronic 1 – zagrożenie dla środowiska wodnego, kategoria przewlekła 1.

H410 – działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

Dgr – hasło ostrzegawcze – niebezpieczeństwo.



GHS06



GHS08



GHS09

Rys. 1. Kody hasła ostrzegawczego „Niebezpieczeństwo”. Piktogramy określone w rozporządzeniu WE nr 1272/2008 mają czarny symbol na białym tle z czerwonym obramowaniem, na tyle szerokim, aby było wyraźnie widoczne

Właściwości fizykochemiczne

Właściwości fizykochemiczne 4-chloro-2-toliloaminy (ChemIDplus 2019a; PubChem 2019a; IARC 2000; 2010; NTP 2016):

- wygląd szaro-białe krystaliczne ciało stałe lub płatki (listki)
- masa cząsteczkowa 141,60
- temperatura

- wrzenia 244 °C
- temperatura topnienia 30,3 °C
- gęstość 1,19 g/cm³
- prężność par 5,5 Pa w temp. 25 °C
- względna gęstość par 4,9 (powietrze = 1)
- log Pow 2,27
- rozpuszczalność: w wodzie – 954 mg/l w temp. 25 °C; rozpuszczalna

- współczynnik przeliczeniowy (w temp. 25 °C; 101,3 kPa) w etanolu, słabo rozpuszczalna w tetrachlorku węgla 1 ppm $\approx$ 5,79 mg/m³.

Właściwości fizykochemiczne chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy (ChemIDplus 2019b; PubChem 2019b):

- wygląd proszek o barwie pudrowej lub jasnoróżowej
- masa cząsteczkowa 178,07
- temperatura wrzenia 244 °C
- temperatura topnienia 30,3 °C
- gęstość 1,19 g/cm³
- prężność par 5,5 Pa w temp. 25 °C
- względna gęstość par 4,9 (powietrze = 1)
- log Pow 2,27
- rozpuszczalność: w wodzie – 954 mg/l w temp. 25 °C; rozpuszczalna w etanolu, słabo rozpuszczalna w tetrachlorku węgla
- współczynnik przeliczeniowy (w temp. 25 °C; 101,3 kPa) 1 ppm $\approx$ 7,28 mg/m³.

Otrzymywanie, zastosowanie, narażenie zawodowe

4-Chloro-2-toliloaminę (4-COT) wytwarza się na drodze chlorowania: *o*-toluidyny lub 2-formylotoluenu albo 2-acetyloaminotoluenu, a następnie otrzymany produkt poddaje się hydrolizie lub alkoholizacji (IARC 1990).

Produkcję przemysłową 4-chloro-2-toliloaminy rozpoczęto w Niemczech w 1924 r., natomiast w USA w 1939 r. (IARC 2010; NTP 2016). W USA zaprzestano produkcji 4-chloro-2-toliloaminy w roku 1979. Podobnie w Niemczech zakończono produkcję związku w 1986 r. (IARC 1990). W latach 80. XX w. pro-

dukacja i stosowanie 4-chloro-2-toliloaminy także w wielu innych krajach zostały ograniczone (IARC 2000). W 2009 r. 4-chloro-2-toliloamina była wytwarzana przez dwóch producentów w Chinach i jednego w Indiach. Dane dotyczące wielkości produkcji 4-chloro-2-toliloaminy są fragmentaryczne. Dla przykładu, w USA w roku 1986 i 1990 całkowita produkcja, łącznie z importem 4-chloro-2-toliloaminy, wynosiła ok. 4,5 ÷ 227 t, natomiast w roku 2002 spadła poniżej 4,5 t (IARC 2010; NTP 2016).

4-Chloro-2-toliloamina i jej chlorowodorek w przeszłości stosowano głównie do produkcji barwników azowych, np. Red 7 czy Yellow 49, używanych w przemyśle tekstylnym do barwienia gotowych tkanin i przędzy: bawełny, jedwabiu i nylonu (IARC 2000; 2010).

W wielu państwach produkcja i stosowanie 4-chloro-2-toliloaminy zostały ograniczone. Wynika to z obowiązujących przepisów prawnych rozporządzenia REACH (Załącznik XVII do rozporządzenia REACH (1907/2006 WE), zmieniony przez rozporządzenie Komisji (UE) 2018/1513 określa ograniczenia dotyczące produkcji, wprowadzania do obrotu i stosowania niektórych niebezpiecznych substancji i wyrobów). Barwniki azowe, które mogą uwalniać jedną lub więcej amin aromatycznych, wymienionych w wykazie REACH, w wykrywalnych stężeniach nie mogą być stosowane w artykułach tekstylnych lub skórzanym (które mogą wchodzić w bezpośredni i długotrwały kontakt ze skórą ludzką, np.: odzież, pościel czy obuwie). Od 1 listopada 2020 r. nie wolno wprowadzać do obrotu produktów, w których stężenie 4-chloro-2-toliloaminy może przekraczać 30 mg/kg gotowego produktu (rozporządzenie UE 2018/1513).

4-Chloro-2-toliloamina i jej chlorowodorek był stosowany także do produkcji chlordimeformu (*N*-(4-chloro-2-metylfenilo)-*N,N*-dimetylo-metanimidamidu) – insektycydu i akarycydu (np. preparat Galecron), (IARC 2000; 2010). Pestycyd ten od lat 90. XX w. nie jest produkowany ani stosowany (NTP 2016).

W warunkach laboratoryjnych substancja jest stosowana także jako barwnik w immunochemii oraz w biologii molekularnej. W Finlandii w laboratoriach biologii molekularnej 4-chloro-2-toliloamina jest stosowana w niewielkich ilościach (< 1 g rocznie). Pod nazwą Fast Red

TR, 4-chloro-2-toliloamina jest także stosowana w kolorymetrycznej metodzie oceny autentyczności leków (IARC 2010).

Zawodowe narażenie na 4-chloro-2-toliloaminę może występować podczas: produkcji, oczyszczania, przetwarzania i stosowania tego związku w warunkach laboratoryjnych (IARC 2010; NTP 2016).

Do populacji narażonej na 4-chloro-2-toliloaminę należy zaliczyć nie tylko osoby zatrudnione przy produkcji chlordimeformu, lecz także stosujące ten insektycyd w rolnictwie, jednak z uwagi na zaprzestanie produkcji i stosowania chlordimeformu (ok. 30 lat temu) dane te mają jedynie znaczenie historyczne (NTP 2016).

Potencjalnymi drogami narażenia pracowników na 4-chloro-2-toliloaminę jest droga inhalacyjna, pokarmowa i dermalna (NTP 2016). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych dotyczących stężeń 4-chloro-2-tolilo-

aminy występujących w powietrzu środowiska pracy.

Zgodnie z danymi Centralnego Rejestru Danych o Narażeniu na Substancje, Czynniki i Procesy Technologiczne o Działaniu Rakotwórczym lub Mutagennym, prowadzonym w Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi, 4-chloro-2-toliloamina i/lub jej chlorowodorek były stosowane w latach 2012-2017 w 1 ÷ 3 zakładach pracy w Polsce. Narażenie na 4-chloro-2-toliloaminę i/lub jej chlorowodorek zgłaszały wyłącznie laboratoria (uczelnie, instytuty, urzędy kontrolne, zakłady graficzne). Zgłoszona do rejestru liczba narażonych na 4-chloro-2-toliloaminę wyniosła 262 osoby w 2012 r., natomiast w 2017 r. – 12 osób. Odsetek narażonych kobiet wynosił 73 ÷ 83%. Szczegółowe informacje dotyczące narażenia na 4-chloro-2-toliloaminę w ostatnich latach przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2.

Narażenie na 4-chloro-2-toliloaminę i/lub jej chlorowodorek w Polsce w latach 2012–2017 (Centralny Rejestr Danych... 2019)

Rok	Liczba zakładów pracy	Liczba narażonych osób	
		ogółem	kobiet
2012	2	262	214
2013	1	149	109
2014	3	228	179
2015	4	127	95
2016	4	212	167
2017	3	12	10

Dokumentację dla 4-chloro-2-toliloaminy opracowano, biorąc pod uwagę informacje o narażeniu w zakładach pracy w Polsce, zbierane w Centralnym Rejestrze Danych o Narażeniu na Substancje, Czynniki i Procesy Technologiczne o Działaniu Rakotwórczym lub Mutagennym,

prowadzonym w Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi.

Duża liczba pracowników narażonych zawodowo na 4-chloro-2-toliloaminę i jej chlorowodorek (tab. 2.) uzasadnia konieczność ustalenia normatywu higienicznego w Polsce.

DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA LUDZI

Obserwacje kliniczne

Ostre zatrucia 4-chloro-2-toliloaminą występowały przede wszystkim u pracowników zatrudnionych przy produkcji lub przetwarzaniu tego związku. Już jednorazowe, krótkotrwałe narażenie na duże stężenia (nie podano jakie) przez

skórę i drogi oddechowe prowadziło do wystąpienia zatrucia. Klinicznie objawy ostrego zatrucia dominowały ze strony dróg moczowych z mikro- lub makroskopową hematurią. Później występował bolesny częstomocz oraz bóle w podbrzuszu, obserwowano również zmniejszoną pojemność pęcherza moczowego (Stasik 2003).

Ostre objawy w postaci krwimocz, trudności w opróżnianiu pęcherza oraz bóle w okolicy nadłonowej obserwowano u jedenastu pracowników narażonych na 4-chloro-2-toliloaminę. Ponowne badania wykonane u trzech z nich (po 3 latach) wykazały, że jeden pracownik nie miał zaburzeń ze strony pęcherza moczowego, u drugiego stwierdzono niewielkiego stopnia zapalenie pęcherza i cewki moczowej, natomiast u trzeciego – raka pęcherza moczowego (Currie 1933; MAK 1993).

Krwimocz oraz objawy poważnego podrażnienia pęcherza wystąpiły także u trzech pracowników zatrudnionych przy pakowaniu chlordimeformu. Badania przeprowadzone w miejscu pracy ujawniły, że u 9 z 22 pracowników wystąpiły: bóle brzucha, trudności w oddawaniu moczu lub krwimocz. Biopsja pęcherza wykonana u trzech pracowników hospitalizowanych wykazała ostre, krwotoczne zapalenie pęcherza z zanikiem nabłonka i ogniskami owrzodzenia śluzówki pęcherza. Trzy dni po ostatnim narażeniu na substancję na stanowiskach pracy w moczu (obok chlordimeformu) stwierdzano także 4-chloro-2-toliloaminę o stężeniu 4,16 µg/ml (Folland i in. 1978; Kimbrough 1980; MAK 1993).

W latach 80. XX w. ponownie obserwowano przypadki krwimocz u pracowników zatrudnionych przy produkcji 4-chloro-2-toliloaminy, po narażeniu przez skórę i drogi oddechowe w warunkach awaryjnych (wypadek). Hematuria

wystąpiła po okresie opóźnienia (latencji) wynoszącym od 7 h do 2 dni od awarii. W 20 przypadkach (na 22 przypadki) badanie cystoskopowe wykazało krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego; stąd uważa się, że krwotoczne zapalenie pęcherza jest wiodącym skutkiem ostrego zatrucia 4-chloro-2-toliloaminą (Stasik 1982; 2003; MAK 1993).

Methemoglobinemię z sinicą – typowy objaw zatrucia aminami aromatycznymi – stwierdzono w połowie badanych przypadków zatruc 4-chloro-2-toliloaminą, natomiast w ok. ¼ przypadków obserwowano także zmniejszone stężenie hemoglobiny (Stasik 1982; 2003; MAK 1993).

Prześledzono losy pracowników, którzy przebyli ostre, krwotoczne zapalenie pęcherza. U 23 pracowników po ostrym zatruciu 4-chloro-2-toliloaminą i u 2 pracowników po zatruciu chlordimeformem po okresie latencji (trwającym średnio 11,5 lat) stwierdzono 4 przypadki zachorowania na raka pęcherza moczowego. Wysłunęto hipotezę, że ostre, krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego jest stanem przedrakowym (Stasik 2003).

Badania epidemiologiczne

Istniejące dane epidemiologiczne dotyczące wykrywania nowotworów pęcherza moczowego u osób narażonych zawodowo na 4-chloro-2-toliloaminę zostały omówione w rozdziale „Działanie rakotwórcze”.

DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA ZWIERZĘTA

Toksyczność ostra i toksyczność dawki powtarzanej

Wartości LD₅₀ 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodoru dla zwierząt laboratoryjnych przedsta-

wiono w tabeli 3. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych na temat wartości LC₅₀ po narażeniu drogą inhalacyjną.

Tabela 3.

Wartości median dawek letalnych 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodoru dla zwierząt doświadczalnych (EHC 1998; IARC 1990)

Gatunek zwierząt	Droga podania			Piśmiennictwo
	dożołądkowa, wartość LD ₅₀ , mg/kg mc.	dootrzewnowa, wartość LD ₅₀ , mg/kg mc.	na skórę, wartość LD ₅₀ , mg/kg mc.	
4-Chloro-2-toliloamina				
Szczur	1058		~ 1800	EHC 1998

cd. tab. 3.

Gatunek zwierząt	Droga podania			Piśmiennictwo
	dożołądkowa, wartość LD ₅₀ , mg/kg mc.	dootrzewnowa, wartość LD ₅₀ , mg/kg mc.	na skórę, wartość LD ₅₀ , mg/kg mc.	
Chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy				
Szczur	860	560 ♂ 700 ♀	> 2150	EHC 1998 IARC 1990
Mysz		720 ♂ 680 ♀		IARC 1990

Objaśnienia:

♂ – samiec.

♀ – samica.

Ostra toksyczność po podaniu dożołądkowym i na skórę

Zarówno jednorazowe podanie dożołądkowe, jak i na skórę (24 h w warunkach okluzji) dużych dawek 4-chloro-2-toliloaminy lub jej chlorowodoru powodowało u szczurów po 1 ÷ 3 h po podaniu zależną od dawki: sinicę, wytrzeszcz oczu, łzawienie i wysięk z gruczołu Harderiana, bezdech, utratę przytomności, a w niektórych przypadkach – szczękościsk. Obserwowano również takie objawy, jak: jeżenie sierści, prostrację i drgawki toniczno-kloniczne. U zwierząt, które przeżyły objawy ustępowały po 3 ÷ 7 dniach od zakończenia narażenia. Badanie sekcyjne wykazało: wzdęcia wzdłuż całego przewodu pokarmowego, płamistą wątrobę, jasne nerki i powiększoną śledzionę (Sachsse, Bathe 1970a; 1970b; MAK 1993).

Podanie na skórę szczurów w warunkach okluzji 4-chloro-2-toliloaminy w dawkach: 500; 1 000 lub 2 000 mg/kg mc. na 24 h nie powodowało miejscowego podrażnienia skóry. Natomiast naniesienie chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy w dawce 1 000 lub 2 150 mg/kg mc. powodowało jedynie niewielkie czerwone plamki na skórze w miejscu aplikacji (Sachsse, Bathe 1970b; MAK 1993).

Toksyczność dermalna

Po nanoszeniu 4-chloro-2-toliloaminy na skórę kota w dawkach dziennych 4 g w 4 g tłuszczu (przez 5 dni) obserwowano: zmiany w wątrobie (jasne zabarwienie, stłuszczenie), liczne krwotoki w śluzówce pęcherza moczowego oraz ciemnobrązowe koagulatory (złogi) w pęcherzu moczowym (Lehman 1933; MAK 1993).

Podawanie na skórę kotów mniejszej dawki 4-chloro-2-toliloaminy (1 g w 4 g tłuszczu) przez 12 dni nie powodowało działania drażniącego, jedynym skutkiem podania była depilacja (Lehman 1933; cyt. za: MAK 1993).

Toksyczność inhalacyjna

Jedyny opublikowany raport dotyczący toksyczności inhalacyjnej pochodzi z 1933 r. Kota narażano na 4-chloro-2-toliloaminę o stężeniu 60 mg/m³ (0,06 mg/l), 8 h/dzień przez 9 dni. Ślady badanej substancji stwierdzono w powietrzu wydychanym. Obserwacja zwierzęcia przez dodatkowe 3 tygodnie nie wykazała żadnych szkodliwych skutków związanych z narażeniem (Lehman 1933; MAK 1993). W raporcie tym opisano także narażanie kotów na pył 4-chloro-2-toliloaminy o stężeniach 100 ÷ 5 000 mg/m³ (0,1 ÷ 5 mg/l), czasu narażenia nie podano. U zwierząt obserwowano: podrażnienie śluzówki nosa i spojówek, zmętnienie rogówki, zaburzenia w dolnych drogach oddechowych, zapalenie tchawicy i wytwarzanie dużych ilości śluzu w płucach. Sekcja padłych zwierząt wykazała obrzęk płuc (Lehman 1933; MAK 1993).

Toksyczność po podaniu podskórnym

Chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy (jako 2-procentowy roztwór wodny) podawano podskórnym dwóm kotom w dawce 50 mg/kg mc., 5 razy/dzień przez 5 dni. Zwierzęta, które przeżyły, zabijano po 4 dniach od początku narażenia i poddawano badaniu histologicznemu. Stwierdzono: obrzęk i bierne przekrwienie śluzówki pęcherza moczowego, zwyrodnienie nabłonka przejściowego pęcherza oraz w niektórych miejscach całkowity zanik nabłonka przejściowego.

Ponadto u jednego kota obserwowano zwyrodnienie wodniczkowe hepatocytów (Folland i in. 1978; Kimbrough 1980; MAK 1993).

Toksyczność podprzewlekła i przewlekła

Badania toksyczności podprzewlekłej i przewlekłej 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodoru prowadzono po narażeniu zwierząt (szczury i myszy) drogą pokarmową (dożołądkowo lub w paszy).

Samce szczurów Wistar, w grupach liczących po 6 zwierząt, otrzymywały 4-chloro-2-toliloaminę dożołądkowo w dawkach: 25; 50; 100; 150; 200 lub 250 mg/kg mc./dzień przez 28 dni. Po tym czasie zwierzęta obserwowano przez 28 dni, a następnie podawano 4-chloro-2-toliloaminę przez kolejne 3 dni. Dawkowanie 4-chloro-2-toliloaminy ustalono na podstawie wstępnego doświadczenia, w którym pojedynczym zwierzętom podawano dawki 100 ÷ 300 mg/kg mc./dzień przez 14 dni. We wstępnym doświadczeniu stwierdzono, że po dawce 250 mg/kg mc./dzień nie odnotowano zmniejszenia masy ciała, począwszy od 4. dnia narażenia. We właściwym eksperymencie narażenie zwierząt na 4-chloro-2-toliloaminę powodowało zmniejszony przyrost masy ciała w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej. W drugiej fazie narażenia (3 dni, 50 ÷ 350 mg/kg mc./dzień) stwierdzono zależne od dawki zmniejszenie masy ciała. U narażanych zwierząt obserwowano ponadto: niewielkie zmniejszenie aktywności ruchowej, ślinotok, wzmożenie kopania trocin (podściółki) i odruchów pielęgnacyjnych. Po narażeniu na największe dawki we krwi zwierząt występowała methemoglobinemia i retikulocytoza. W innych parametrach hematologicznych nie stwierdzono zmian związanych z narażeniem. Badanie histopatologiczne wykazało zależne od dawki zmiany w wątrobie: minimalne do silnie zaznaczonych, od centralnej strefy zrazika do rozsianej, wakoulizacja mikropęcherzykowa (≥ 200 mg/kg mc./dzień), której towarzyszył przerost komórek wątroby. W pęcherzu moczowym stwierdzono obrzęk tkanki podnabłonkowej (≥ 200 mg/kg mc./dzień), bez wpływu na tkankę nabłonkową. Nie stwierdzono zależnych od narażenia zmian histopatologicznych w: jelicie cienkim, nerkach i szpiku kostnym (Guerard i in. 2018).

Badania toksyczności chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy prowadzono na szczurach (Tif:RAI) i myszach (Tif:NMRI), (po 30/płeć/grupę), którym podawano związek w paszy o stężeniach: 0; 750; 1 500; 3 000 lub 6 000 mg/kg paszy przez 60 dni (oszacowane dawkiienne były rzędu 75 ÷ 600 mg/kg mc. dla szczurów i 150 ÷ 1 200 mg/kg mc. dla myszy). U wszystkich narażanych zwierząt obserwowano: anemię hemolityczną z retikulocytozą, wielobarwność erytrocytów (ang. *polychromatophilia*), tworzenie ciałek Heinza, methemoglobinemię oraz zmniejszone stężenie hemoglobiny, wartości hematokrytu i liczby erytrocytów. U zwierząt otrzymujących dwie największe dawki 4-chloro-2-toliloaminy nastąpiło zmniejszenie stężenia białka całkowitego we krwi w porównaniu do zwierząt z grup kontrolnych. Parametry moczu u zwierząt narażanych były w normie, z wyjątkiem wzrostu przypadków krwimoczu u samców szczurów, otrzymujących największą dawkę związku. W badaniu sekcyjnym wykazano zależne od dawki powiększenie wątroby i śledziony oraz łagodną do umiarkowanej wakoulizację hepatocytów. W pęcherzu moczowym u myszy obu płci obserwowano przekrwienie oraz zależną od dawki proliferację nabłonka przejściowego (MAK 1993; Suter i in. 1976a; 1976b).

W celu określenia poziomu dawkowania chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy dla eksperymentu przewlekłego myszom B6C3F1 (5/płeć/grupę) i szczurom F344 (5/płeć/grupę) podawano przez 7 tygodni badany związek (w paszy) w zakresie stężeń: 250 ÷ 10 000 mg/kg paszy (szczury samce) i 1 000 ÷ 50 000 mg/kg paszy (szczury samice) oraz 2 000 ÷ 15 000 mg/kg paszy (myszy samce) i 15 000 ÷ 20 000 mg/kg paszy (myszy samice). Po zakończeniu narażenia u zwierząt stwierdzono powiększenie śledziony u szczurów obu płci przy narażeniu na związek (w paszy) o stężeniu 10 000 mg/kg paszy (oszacowane dawkiienne: 1 000 mg/kg mc./dzień dla samców oraz 1 130 mg/kg mc./dzień dla samic). Stwierdzono także zależne od dawki zmniejszenie masy ciała u obu gatunków zwierząt. Na podstawie 10-procentowego zmniejszenia masy ciała wyznaczono wartości NOAEL, które wynosiły: 677 mg/kg mc./dzień dla szczurów oraz 1 800 mg/kg mc./dzień dla myszy (NCI 1979).

W niepublikowanym badaniu, prowadzonym przez Ciba-Geigy (1992b), myszy ICR (30/płeć/grupę) otrzymywały 4-chloro-2-toliloaminę (w paszy) o stężeniach: 0; 20; 100 lub 500 mg/kg paszy przez 80 tygodni. Oszacowane dawki dziennowynosiłyodpowiednio dla samców: 0; 3,60; 18,0 lub 89,9 mg/kg mc./dzień, natomiast dla samic: 0; 3,69; 18,4 lub 92,2 mg/kg mc./dzień. Narażanie zwierząt na 4-chloro-2-toliloaminę spowodowało istotny, zależny od dawki, wzrost ich padnięć, zwłaszcza samic. Wszystkie samice padły w ciągu 67 tygodni po podaniu największej dawki. Autorzy badania podają, że nie było zauważalnych, związanych z narażeniem, zmian w parametrach moczu i parametrach hematologicznych. Względne masy narządów wewnętrznych wykazywały istotne różnice:

- nerki - zmniejszenie masy u samców otrzymujących dawkę 18,0 mg/kg mc./dzień,
- tarczycza - zwiększenie masy u samców z grupy otrzymującej dawkę 3,60 mg/kg mc./dzień,

- śledziona - zwiększenie masy u samic z grupy otrzymującej dawkę 18,4 mg/kg mc./dzień.

Z parametrów biochemicznych istotną zmianę w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej stwierdzono dla zmniejszenia stężenia białka całkowitego w surowicy krwi u obu płci, oraz zwiększenie aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) u samic z grupy otrzymującej dawkę 18,4 mg/kg mc./dzień. Na podstawie wzrostu śmiertelności obu płci oraz wzrostu aktywności ALT wyznaczono wartości NOAEL na poziomie 3,69 mg/kg mc./dzień, a wartość LOAEL (ang. *Frank Effect Level*, FEL) na poziomie 18,0 mg/kg mc./dzień (EPA 2010).

Wyniki badań toksyczności podprzewlekłej i przewlekłej 4-chloro-2-toliloaminy u zwierząt doświadczalnych dotyczące skutków nienowotworowych nie wykazały konkretnego narządu krytycznego. Wskazały głównie na toksyczność ogólnoustrojową.

ODLEGŁE SKUTKI DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

Działanie mutagenne i genotoksyczne

Wyniki badań mutagenności i genotoksyczności 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodorku

w warunkach *in vitro* i *in vivo* przedstawiono w tabelach 4. i 5.

Tabela 4.
Wyniki badań mutagenności 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodorku w warunkach *in vitro*

Rodzaj testu	Układ badawczy	Wynik testu		Piśmiennictwo
		-S9	+S9	
Mutacje powrotne	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA100 (c)	-	+	Zimmer i in. 1980
		-	-	Haworth i in. 1983
		-	nb.	Rashid i in. 1984
	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA100	-	+	Suzuki i in. 2018
	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA100	-	+	Goggelmann i in. 1996
	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA1535	-	-	
	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA1535 (c)	-	-	Haworth i in. 1983
		+	nb.	Rashid i in. 1984
	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA1537	-	-	Goggelmann i in. 1996
	<i>Salmonella</i> T TA1537 (c)	-	-	Zimmer i in 1980, Haworth i in. 1983
		-	nb.	Rashid i in. 1984
	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA1538 (c)	-	nb.	Rashid i in. 1984
	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA98	-	+	Goggelmann i in. 1996, Suzuki i in. 2018

cd. tab. 4.

Rodzaj testu	Układ badawczy	Wynik testu		Piśmiennictwo
		-S9	+S9	
Naprawa DNA (<i>differential toxicity in deficient strains</i>)	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA98 (c)	–	–	Zimmer i in. 1980, Haworth i in. 1983
		–	nb.	Rashid i in. 1984
	<i>Escherichia coli</i> WP2 uvrA (c)	–	–	Rashid i in. 1984
	<i>Escherichia coli</i> WP2 (c)	–	–	
	<i>Escherichia coli</i> WP67 (c)	–	–	
	<i>Escherichia coli</i> CM611 (c)	–	–	
	<i>Escherichia coli</i> CM571 (c)	–	–	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7	–	–	EHC 1998
	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA1538	+	nb.	Rashid i in. 1984
	<i>Salmonella</i> Typhimurium TA1978	+	nb.	
Zaburzenia wrzeciona	<i>Escherichia coli</i> rec	–	nb.	
	komórki V79 chomika chińskiego	–	–	Goggelmann i in. 1996
Mutacje postępowe	komórki chłoniaika myszy L5178Y tk+/-	–	–	McGregori in. 1988
Nieplanowa synteza DNA (UDS)	ludzkie fibroblasty	–	–	EHC 1998
	hepatocyty szczura	+	nb.	Williams i in. 1989
Wymiana chromatyd siostrzanych (SCE)	komórki jajnika chomika chińskiego (CHO) (c)	+	+	Galloway i in. 1987
	ludzkie limfocyty	–	–	Goggelmann i in. 1996
Aberracje chromosomowe	komórki jajnika chomika chińskiego (CHO) (c)	+	+	Galloway i in. 1987
	ludzkie limfocyty	–	–	Goggelmann i in. 1996
Pęknięcia nici DNA	komórki V79 płuc chomika chińskiego (c)	(+)	nb.	Zimmer i in. 1980
Transformacja komórkowa	komórki myszy BALB/c 3T3 (c)	+	nb.	Matthews i in. 1993

Objaśnienia:

nb. – nie badano.

(+) – wynik słabo dodatni.

(c) – chlorowoderek 4-chloro-2-toliloaminy.

Tabela 5.

Wyniki badań genotoksyczności 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodoru w warunkach *in vivo*

Rodzaj testu	Układ badawczy	Dawka/stężenie	Wynik	Piśmiennictwo
Test plamkowy	myszy C57BL6JxT (c)	3 · 100 mg/kg <i>p.o.</i> (8 ÷ 10 dzień ciąży)	+	Lang 1984
Test dziedzicznej translokacji	myszy NMRI/SPF (c)	49 · 200 mg/kg <i>p.o.</i>	–	Lang i Adler 1982
Test kometowy (uszkodzenie DNA)	myszy ddY, samce:	1 · 600 mg/kg <i>p.o.</i>		Sekihashi i in. 2002
	- wątroba, pęcherz, płuca, mózg, - żołądek, jelito grube, szpik;		+	
	szczury Wistar, samce:	1 · 500 mg/kg <i>p.o.</i>	–	Guerard i in. 2018
	- wątroba, nerki, - żołądek, jelito grube, pęcherz, płuca, mózg;		+	
	szczury Wistar, samce:	28 · 25 – 250 mg/kg <i>p.o.</i> ; 28 dni przerwy, następnie 3 · 150 – 350 mg/kg <i>p.o.</i>	–	
	- wątroba, pęcherz moczowy, - krew obwodowa, jelito cienkie		+	
			–	

cd. tab. 5.

Rodzaj testu	Układ badawczy	Dawka/stężenie	Wynik	Piśmiennictwo
Test mikrojądrowy	szczury Wistar, samce – krew obwodowa	8 · 25 ÷ 250 mg/kg <i>p.o.</i>	+	<i>Guerardi</i> in. 2018
	komórki szpiku kostnego chomika chińskiego	2 · 100 ÷ 400 mg/kg <i>p.o.</i>	–	EHC 1998
Wymiana chromatyd siostrzanych	komórki szpiku kostnego chomika chińskiego	2 · 100 ÷ 400 mg/kg <i>p.o.</i>	–	EHC 1998
Aberracje chromosomowe	komórki szpiku kostnego chomika chińskiego	2 · 100 ÷ 400 mg/kg <i>p.o.</i>	–	EHC1998
Uszkodzenie chromosomów	spermatogonie myszy	5 · 85 ÷ 500 mg/kg <i>p.o.</i>	–	EHC 1998
	spermatocyty myszy	5 · 85 ÷ 500 mg/kg <i>p.o.</i> co drugi dzień	–	
Test dominującej mutacji letalnej	myszy, samce	1 · 110 lub 330 mg/kg <i>p.o.</i>	–	EHC 1998
Wiązanie kowalencyjne z makrocząsteczkami (RNA > białka > DNA)	szczury Osborne-Mendel: - wątroba - nerki	1 · 14 mg/kg <i>i.p.</i>	+ +	<i>Hilli</i> in. 1979
Wiązanie kowalencyjne z makrocząsteczkami (białka > RNA > DNA)	wątroba myszy samców (c)	1 · 25 mg/kg <i>p.o.</i>	+	<i>Bentley</i> i in. 1986ab
	wątroba szczurów SpragueDawley (c)	1 · 25 mg/kg <i>p.o.</i>	+	
Wiązanie z hemoglobina	szczury Wistar, samice	1 · 0,5 mmol/kg	+	<i>Birner, Neumann</i> 1988
	myszy B6C3F1, samice	1 · 2 mmol/kg	+	

Objaśnienie:

(c) – chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy.

Badania działania mutagennego 4-chloro-2-toliloaminy w niezależnych testach (z wykorzystaniem różnych szczepów *Salmonella* Typhimurium) wskazywały w większości przypadków wyniki ujemne (wyjątek stanowiły szczepy: TA100, TA98 – z aktywacją metaboliczną; TA1535 – bez aktywacji metabolicznej), a z użyciem szczepów *Escherichia coli* wyniki ujemne we wszystkich przypadkach. Ponadto testy naprawy DNA (tylko bez aktywacji metabolicznej) potwierdziły u *Escherichia coli* wyniki ujemne, jednak u *Salmonella* Typhimurium – dodatnie, co wskazuje na indukcję uszkodzeń DNA.

Badania w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem komórek ssaków wykazały, że 4-chloro-2-toliloamina powoduje: pęknięcia nici DNA, nieplanową syntezę DNA w pierwotnych hepatocytach szczura, wzrost wymiany chromatyd siostrzanych i aberracji chromosomowych (tylko w obecności zewnętrznego układu metabo-

lizującego) w komórkach chomika chińskiego oraz transformację nowotworową komórek myszy BALB/c 3T3. Ponadto w warunkach *in vivo* w teście płamkowym u myszy także otrzymano wyniki dodatnie.

W badaniach w warunkach *in vivo* przeprowadzonych na myszach i szczurach wykazano, że 4-chloro-2-toliloamina wiąże się z wątrobowym DNA i RNA, przy czym poziom adduktów był większy u myszy niż u szczurów. Natomiast ujemne wyniki otrzymano zarówno w testach w warunkach *in vitro* wymiany chromatyd siostrzanych (SCE), jak i aberracji chromosomowych w ludzkich limfocytach oraz w warunkach *in vivo* w teście dziedzicznej translokacji u myszy.

Najnowsze badania oceniające genotoksyczność w warunkach *in vivo* (*Guerard* i in. 2018) u samców szczura Wistar, które były narażane *per os* przez 28 dni na 4-chloro-2-toliloaminę w dawkach 25 ÷ 250 mg/kg mc./dzień i dodat-

kowo po 28 dniach wolnych od narażenia jeszcze przez kolejne 3 dni na dawki 150 ÷ 350 mg/kg mc./dzień wykazały dodatni wynik testu kometowego w wątrobie i pęcherzu moczowym. Wyniki te (szczególnie dla wątroby) są zgodne z wcześniejszymi badaniami zarówno u szczurów, jak i myszy (Sekihashi i in. 2002). Guerard i in. (2018) uzyskali również dodatni wynik testu mikrojądrowego dla krwi obwodowej pobranej od samców szczura Wistar narażanych *per os* na 4-chloro-2-toliloaminę (25 ÷ 250 mg/kg mc./dzień) przez 8 kolejnych dni.

Potwierdzono także, że 4-chloro-2-toliloamina wykazuje działanie mutagenne u *Salmonella* Typhimurium szczepu TA98 i TA100 jedynie w obecności aktywacji metabolicznej (Suzuki i in. 2018).

Wiązanie z makrocząsteczkami

Znakowany radioizotopowo ^{14}C chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy podano jednorazowo, do otrzewnowo szczurom Osborne-Mendel w dawce 14 mg/kg mc. Po 24 h określono ilość nieodwracalnie związanego radioaktywnego związku w narządach. Uzyskane wyniki wskazują, że 4-chloro-2-toliloamina wiązała się głównie w wątrobie z: RNA > białkami > DNA; wiązanie w nerkach było kilka do kilkunastokrotnie mniejsze. W pozostałych narządach wiązanie 4-chloro-2-toliloaminy z makrocząsteczkami było śladowe (Hill i in. 1979).

W badaniach wiązania kowalencyjnego chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy z makrocząsteczkami u szczurów i myszy wykazano, że stopień tego wiązania z wątrobowym DNA u myszy był około dwukrotnie większy niż u szczurów we wszystkich badanych punktach czasowych, tj. po: 6, 12, 28 i 68 h po podaniu *per os* pojedynczej dawki 25 mg/kg mc. chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy znakowanego węglem ^{14}C (Bentley i in. 1986a). Stopień wiązania kowalencyjnego z DNA zmniejszał się w czasie po narażeniu, co wskazuje, że uszkodzenie DNA było odwracalne, a zakres i szybkość naprawy był podobny u obu gatunków. Ocena wiązania kowalencyjnego (20 h po narażeniu) wykazała, że stopień wiązania był proporcjonalny do całkowitej podanej dawki, po wielokrotnym (do 5 dni) podawaniu 4-chloro-2-toliloaminy zarówno u szczu-

rów, jak i u myszy. U obu gatunków stwierdzono dwa główne hydrofobowe addukty z DNA (szczegółowo nie scharakteryzowane), przy czym jeden z nich występował od 6 do 30 razy częściej u myszy niż u szczurów.

W innym badaniu (Bentley i in. 1986b) wykazano, że we wszystkich punktach czasowych po jednorazowym podaniu ^{14}C -4-chloro-2-toliloaminy stopień wiązania z makrocząsteczkami zmniejszał się w kolejności: białko > RNA > DNA u obu gatunków. Badania w warunkach *in vitro* udowodniły, że frakcje subkomórkowe wątroby myszy katalizowały wiązanie 4-chloro-2-toliloaminy do DNA cięcej grasicy łatwiej niż frakcje wątroby szczura. Wyniki te sugerują, że tworzenie reaktywnych metabolitów 4-chloro-2-toliloaminy zachodzi wydajniej u myszy niż u szczurów. Jednak wiązanie z białkiem i RNA było intensywniej zaznaczone u szczura niż u myszy. Dwadzieścia godzin po jednorazowym podaniu ^{14}C -4-chloro-2-toliloaminy ilość związana z białkami wątroby szczurów wynosiła 199 ± 18 pmol/mg, co stanowiło ponad 3 razy większą wartość niż u myszy (62 ± 16 pmol/mg).

Można przypuszczać, że z 4-chloro-2-toliloaminy powstają różne reaktywne metabolity: u myszy więcej metabolitów reagujących z DNA, podczas gdy u szczurów więcej metabolitów o wysokim powinowactwie do białek i RNA. Różnice gatunkowe w metabolizmie 4-chloro-2-toliloaminy mogą tłumaczyć fakt, że myszy są również bardziej podatne na działanie rakotwórcze tej substancji.

Duża częstość występowania naczynek krwionośnych związanych z przewlekłym podawaniem 4-chloro-2-toliloaminy sugeruje, że komórki śródbłonna naczyń krwionośnych są najbardziej podatne na działanie tego związku. Bentley i in. (1986b) wykonali badania nad wiązaniem 4-chloro-2-toliloaminy do DNA wyizolowanego z komórek niemięszeniowej wątroby myszy, ale nie wykazali preferencyjnego wiązania do DNA w tych komórkach.

Birner i Neumann (1988) przeprowadzili badania, podając 4-chloro-2-toliloaminę doustnie (*per os*) samicom szczurów Wistar i samicom myszy B6C3F1. Wykazano, że wskaźnik wiązania z hemoglobina (HBI) dla 4-chloro-2-toliloaminy był 11-krotnie większy ($\text{HBI} = 28$ mmol/mol Hb na dawkę w nmol/kg) u szczurów niż

u myszy (HBI 2,5 mmol/mol Hb/nmol/kg). Z kolei wyznaczony przez Sabbioniego i Neumanna (1990) HBI dla 4-chloro-2-toliloaminy był ponad 10-krotnie mniejszy (HBI 2,4) i dotyczył narażenia *per os* samiec szczura Wistar na pestycyd chlordimeform (prekursor 4-chloro-2-toliloaminy). Różnice te są uwarunkowane koniecznością zmetabolizowania chlordimeformu do 4-chloro-2-toliloaminy, a następnie związania z Hb.

Działanie rakotwórcze

Działanie rakotwórcze na ludzi

Pierwsze doniesienia o występowaniu nowotworów pęcherza moczowego, formułowane na podstawie retrospektywnych obserwacji niewielkich grup mężczyzn zawodowo narażonych na 4-chloro-2-toliloaminę, pojawiły się już w latach 30. XX wieku. Currie (1933) opisał wówczas jeden przypadek raka pęcherza, który wystąpił w grupie 9 mężczyzn zatrutych 4-chloro-2-toliloaminą, u których stwierdzono krwimocz.

Pierwsze badania epidemiologiczne, przeprowadzone wśród pracowników narażonych zawodowo na 4-chloro-2-toliloaminę, prowadzono w Szwajcarii (Uebelin, Pletscher 1954) i w USA (Ott, Langner 1983). Uebelin i Pletscher (1954) badali grupę 35 pracowników zatrudnionych w latach 1924-1953 przy produkcji 4-chloro-*o*-toluidyny z *o*-toluidyny i nie stwierdzili występowania raka pęcherza moczowego. Ott i Langner (1983) wydzielili spośród 342 pracowników (zakładu produkującego barwniki) podkohortę 117 mężczyzn, którzy mogli mieć bezpośredni kontakt z 4-chloro-2-toliloaminą i dokonali retrospektywnej analizy epidemiologicznej za 35 lat. Badacze stwierdzili w tej grupie jedynie nieistotny wzrost zgonów z powodu nowotworów łącznie (12 obserwowanych wobec 8 oczekiwanych). Nie stwierdzono natomiast żadnego przypadku raka pęcherza.

Stasik i in. (1985) prowadzili badanie umieralności w historycznej kohorcie 335 pracowników, którzy w latach 1929-1982 byli zatrudnieni przy produkcji i przetwarzaniu 4-chloro-2-toliloaminy przez co najmniej 12 miesięcy. Nie stwierdzono żadnego przypadku zgonu z powodu raka pęcherza, stwierdzono natomiast pięć zgonów z powodu nowotworów o innej lokalizacji. Te pięć zgonów wystąpiło w grupie 116 pracowni-

ków, którzy pracowali przy produkcji 4-chloro-2-toliloaminy przed 1970 r., kiedy panowały tam gorsze warunki pracy i duże (bliżej nieokreślone) stężenia 4-chloro-2-toliloaminy. W tej subkohorcie zdiagnozowano osiem przypadków raka pęcherza moczowego; w siedmiu przypadkach nowotwór miał charakter urotelialnego raka brodawkowatego, a u jednej osoby miał lite utkanie z komponentą gruczolową. Pracownicy, u których stwierdzono raka pęcherza, byli narażeni na 4-chloro-2-toliloaminę średnio przez 25 lat ($1,5 \div 30$ lat), w tym przed rokiem 1970 (większe stężenia) średnio przez 14 lat ($1,5 \div 20$ lat). Należy jednak podkreślić, że wśród ośmiu osób z nowotworami cztery były narażone jedynie przez $1,5 \div 4$ lat, a dwie z nich przeszły krwotoczne zapalenie pęcherza na 4 i 14 lat przed wystąpieniem raka pęcherza. Okres latencji u tych ośmiu pacjentów wynosił $17 \div 38$ lat (mediana 27,5). Spośród sześciu pacjentów, u których udało się określić szybkość procesu *N*-acetylacji, u czterech stwierdzono fenotyp wolnej acetylacji. Standaryzowany współczynnik zachorowalności dla raków pęcherza moczowego w badanej subkohorcie, przy wartości oczekiwanej 0,11, był 72,7-krotnie większy (Stasik 1988). Późniejsze (po 10 latach) badanie tej samej subkohorty 116 pracowników wykazało, że liczba zachorowań na raka pęcherza moczowego wzrosła do 12, co oznacza, że zachorowało 12,3% tej subkohorty (Stasik 2003).

Boyle i Macferlane (EHC 1998) obserwowali zachorowania na raka pęcherza w historycznej kohorcie 847 osób narażonych na 4-chloro-2-toliloaminę przy produkcji chlordimeformu w: Szwajcarii, USA, Wielkiej Brytanii i Australii. W badanej kohorcie stwierdzono 10 zachorowań na raka pęcherza moczowego (oczekiwano 2,63), a standaryzowany współczynnik zachorowalności (SIR) wyniósł 3,8. W samej tylko Szwajcarii stwierdzono 4 zachorowania (wobec 0,72 oczekiwanych), a SIR wynosił 5,6 (EHC 1998).

Popp i in. (1992) przeprowadzili analizę występowania raka pęcherza moczowego w kohorcie 49 mężczyzn zatrudnionych przy syntezie chlordimeformu z 4-chloro-2-toliloaminy. Pracownicy byli narażeni jedynie przez $8 \div 12$ tygodni w roku. Łączny czas narażenia wynosił $3 \div 956$ dni (średnio 271 dni) w okresie $10 \div 25$ lat (średnio 18 lat). W dostępnym piśmiennictwie

nie ma informacji na temat wielkości narażenia, ponieważ w latach 1965-1976 nie prowadzono pomiarów stężeń w powietrzu ani wydalania z moczem. Produkcji zaprzestano w 1976 r., poprawiono warunki pracy i produkcję ponownie wznowiono w 1980 r. W 1986 r. produkcja chlordimeformu została całkowicie wstrzymana. Po poprawie warunków pracy prowadzono monitoring 4-chloro-2-toliloaminy i chlordimeformu w moczu i wykazano, że narażenie było minimalne (brak danych liczbowych). W obserwowanej kohorcie (49 mężczyzn) stwierdzono siedem przypadków raka pęcherza moczowego. W chwili wykrycia nowotworu wiek pracowników wynosił 43 ÷ 62 lat (średnio 56 lat), okres latencji od pierwszego narażenia – 15 ÷ 23 lat (średnio 19 lat), natomiast łączny okres narażenia – 291 ÷ 766 dni (średnio 575 dni). Sześć wykrytych nowotworów miało typ histologiczny raka z nabłonka przejściowego (urotelialnego), a u jednej osoby wystąpił rak brodawkowy pęcherza. U pięciu osób określono fenotyp *N*-acetylacji i stwierdzono, że 4/5 osób było „wolnymi acetylatorami”. Do zakończenia obserwacji kohorty (1990 r.) spośród siedmiu osób z rozpoznaniem raka pęcherza dwie zmarły – jedna z powodu zawału serca, druga z powodu nowotworu mózgu. W analizowanej kohorcie wystąpiła znaczna nadwyżka przypadków raka pęcherza moczowego; zależnie od przyjętej wartości oczekiwanej (dane z rejestrów niemieckich i duńskich) od 35 do 90 razy więcej niż w populacji referencyjnej. Należy jednak podkreślić, że osoby te w okresie obserwacji były narażone na 4-chloroanilinę, jednak w mniejszych ilościach i przez krótszy czas niż na 4-chloro-2-toliloaminę.

IARC uznała, że dowód na rakotwórcze działanie 4-chloro-2-toliloaminy na ludzi jest ograniczony (ang. *limited evidence*). W ogólnej ocenie IARC zaliczyła 4-chloro-2-toliloaminę do grupy 2A – związków o prawdopodobnym działaniu rakotwórczym na człowieka (IARC 2010).

Działanie rakotwórcze na zwierzęta

Działanie rakotwórcze badano tylko dla chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy po długotrwałym narażeniu szczurów i myszy na badany związek podawany z paszą (tab. 6. ÷ 11.). Nie prowadzono badań po narażeniu inhalacyjnym.

Badanie działania rakotwórczego Weisburger i in. (1978) przeprowadzili na 6- ÷ 8-tygodniowych myszach CD-1 (uzyskanych ze szczepu HaM/ICR) obu płci, które były narażane na chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy (o czystości 97 ÷ 99%) z paszą przez 18 miesięcy. Przez kolejne 3 miesiące zwierzęta obserwowano. W badaniu wykorzystano równolegle grupę kontrolną dla obu płci oraz dodatkową grupę kontrolną z innego, większego badania. Charakterystykę tego doświadczenia przedstawiono poniżej:

Zwierzęta: myszy, HaM/ICR, CD-1:
25 ♂ i 25 ♀ w grupie,
grupa kontrolna:
25 ♂ i 25 ♀;
spulowana grupa kontrolna
z większego badania:
99 ♂ i 102 ♀.

Dawkowanie: ♂ 0; 750 lub 1 500 mg/kg
paszy przez 18 miesięcy;
♀ 0; 2 000 lub 4 000 mg/kg
paszy przez 18 miesięcy.

ADD ♂ 0; 90 lub 180 mg/kg mc.;
(skorygowana ♀ 0; 260 lub
dawka dzienna), 520 mg/kg mc.
(ang. *adjusted daily dose*):

HED* (dawka ♂ 19,7 lub 39,4 mg/kg mc.;
równoważna dla ♀ 52,5 lub
człowieka – 105,0 mg/kg mc.
ang. *human equivalent dose*):

Sekcja: po 21 miesiącach.

Toksyczność: nieokreślona.

* – wyliczenie HED wykonane przez EPA (2010) na podstawie danych Weisburger i in. 1978.

HED = dawka · spożycie paszy na dzień · (1/masa ciała) · (czas dawkowania w dniach/czas trwania badania w dniach) · (średnia masa ciała samca myszy/średnia masa ciała człowieka)^{1/4}.

HED = 2 000 mg/kg · (0,0057 kg/dzień) · (1/0,0317 kg) · (560 dni/560 dni) · (0,0317 kg/70 kg)^{1/4} = 52,5 mg/kg/dzień.

Przypadki występowania nowotworów u zwierząt narażonych porównano statystycznie ze zwierzętami z grup kontrolnych. Wykazano, że narażenie na chlorowodorek 4-chloro-

-2-toliloaminy prowadzi przede wszystkim do naczynek i naczynekomięsaków, głównie w śledzionie oraz tkance tłuszczowej podskór-

nej i z przestrzeni pozaotrzewnowej. Częstość występowania tych nowotworów przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6.
Częstość występowania nowotworów u myszy, otrzymujących chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy (Weisburger i in. 1978)

Rodzaj nowotworu	Płeć	Stężenie chlorowodorku 4-chloro-2-toliloaminy, mg/kg paszy					
		0 (spulowana kontrola)	0	750	1 500	2 000	4 000
Guzy naczyniowe (naczyniaki i naczynekomięsaki przestrzeni pozaotrzewnowej, śledziony i podskórne)	♂	5/99	0/14	12/20*	13/20*	18/19*	12/16*
	♀	9/102	0/15				
Inne nowotwory	♂	14/99	1/14	7/20	6/20		

Objaśnienia:
♂ – samiec.
♀ – samica.
* $p < 0,025$ (test Fischera)

W badaniu przeprowadzonym przez Sachsse i in. (1978) również wykorzystywano narażenie na chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy podawany myszom Tif:MAG/SPF obu płci w paszy przez 24 miesiące. Obserwację zwierząt prowadzono do czasu ich padnięcia. Krótką charakterystykę tego badania przedstawiono poniżej:
Zwierzęta: myszy, Tif:MAG/SPF: 50 ♂ i 50 ♀ w grupie,
grupa kontrolna: 50 ♂ i 50 ♀.
Dawkowanie: 0; 2; 20; 100 lub 500 mg/kg paszy przez 24 miesiące.
Sekcja: po padnięciu.

Toksyczność: zależny od dawki wzrost śmiertelności, padnięcie spowodowane rozwojem nowotworu.

Autorzy badania odnotowali zależność pomiędzy wielkością zastosowanej dawki związku badanego a śmiertelnością zwierząt. Padnięcie myszy spowodowane było rozwojem nowotworów – złośliwych naczynekomięsaków krwionośnych z komórek śródbłonkowych, których częstość występowania przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7.
Częstość występowania nowotworów u myszy, otrzymujących chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy (Sachsse i in. 1978)

Rodzaj nowotworu	Płeć	Stężenie chlorowodorku 4-chloro-2-toliloaminy, mg/kg paszy				
		0	2	20	100	500
Złośliwe naczynekomięsaki krwionośne z komórek śródbłonkowych	♂	2/50	0/50	10/50	31/50	40/50
	♀	3/50	1/50	8/50	31/50	34/50

Objaśnienia:
♂ – samiec.
♀ – samica.

Kolejny niepublikowany raport dotyczy badań (Ciba-Geigy 1992b; EPA 2010), które były przeprowadzone na myszach szczepu ICR obu płci. Zwierzęta narażano na chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy podawany w paszy przez 80 tygodni. Autorzy badania odnotowali niewielkie zmniejszenie przyrostu masy ciała (♀) dla największego stężenia w paszy oraz istotną statystycznie większą śmiertelność (♂ i ♀) dla

stężenia 100 oraz 500 mg/kg paszy (test Fischera, $p < 0,05$). Ponadto wykazano zmiany nowotworowe o różnej lokalizacji, głównie: raki, gruczolaki, mięsaki, białaczki, których szczegółowy opis przedstawiono w tabeli 8. Charakterystykę tego badania podano poniżej:
Zwierzęta: myszy, ICR: 30 ♂ i 30 ♀ w grupie;
grupa kontrolna: 30 ♂ i 30 ♀.
Dawkowanie: 0, 20, 100 i 500 mg/kg paszy

ADD:	przez 80 tygodni. ♂: 0; 3,6; 18 lub 89,9 mg/kg mc.; ♀: 0; 3,69; 18;4 lub 92,2 mg/kg mc.	Toksyczność:	niewielkie zmniejszenie przyrostu masy ciała w grupie ♀ 500 mg/kg paszy, istotny wzrost śmiertelności (♂ i ♀) dla środkowej i największej dawki.
HED:	0; 0,525; 2,62 lub 13,1 mg/kg mc.		
Sekcja:	po 80 tygodniach.		

Tabela 8.

Częstość występowania nowotworów u myszy, otrzymujących chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy (Ciba-Geigy 1992b)

Rodzaj nowotworu	Płeć	Stężenie chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy, mg/kg paszy			
		0	20	100	500
Wątroba: raki i gruczolaki ^a	♂	48,5 (26,7)	56,3 (30,0)	53,3 (27,6)	63,9 (20,7)
	♀	14,8 (6,9)	7,4 (3,3)	0,0 (0,0)	18,8 (10,7)
Płuca: gruczolaki ^a	♂	38,7 (20,0)	41,4 (20,0)	8,7 (3,4)	61,4 (17,2)
	♀	14,8 (6,9)	37,5 (20,0)	59,0 (13,8)	10,6 (7,1)
Białaczki i mięsaki limfatyczne ^a	♂	20,1 (16,7)	3,4 (3,3)	19,9 (10,3)	0,0 (0,0)
	♀	38,0 (24,1)	17,3 (10,0)	32,8 (20,7)	3,6 (3,6)
Mięsaki siateczkowokomórkowe ^a	♂	7,7 (3,3)	3,8 (3,3)	0,0 (0,0)	6,2 (3,4)
	♀	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Prawdopodobnie mięsaki siateczkowokomórkowe ^a	♂	0,0 (0,0)	8,3 (3,3)	41,8 (24,1)	84,6 (20,7)
	♀	0,0 (0,0)	17,3 (17,3)	14,3 (6,9)	84,9 (21,4)
Niesklasyfikowane nowotwory złośliwe ^a	♂	0,0 (0,0)	23,1 (10,0)	72,8 (48,3)	62,2 (48,3)
	♀	0,0 (0,0)	70,0 (46,7)	70,8 (41,4)	87,0 (64,3)
Częstość występowania nowotworu ^a	♂	72,7 (56,7)	83,3 (60,0)	96,1 (86,2)	100,0 (86,2)
	♀	56,3 (37,9)	85,5 (70,0)	93,6 (79,3)	100,0 (92,9)

Objaśnienia:

(^a) – wyniki podano w procentach wyliczonych przez Ciba-Geigy (1992b) obliczone metodą Naïve (EPA 2010).

♂ – samiec.

♀ – samica.

W 1979 r. NCI opublikowało wyniki badań narażenia przewlekłego myszy B6C3F1 ($n = 50$ dla grup narażonych; $n = 20$ dla grup kontrolnych) na największe z przedstawionych dotychczas poziomów chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy (o czystości > 99%) w paszy, ♂: 0; 3 750 lub 15 000 mg/kg przez 99 tygodni oraz ♀: 0; 1 250 mg/kg paszy przez 99 tygodni lub 5 000 mg/kg paszy przez 92 tygodnie (tab. 9.). Narażenie na chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy prowadziło do istotnego zmniejszenia masy ciała w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej, przy czym skutek ten był bardziej zaznaczony u samic. Ponadto odnotowano istotne zwiększenie liczby padnięć zwierząt obu płci. Wyniki badań histopatologicznych potwierdziły istotny wzrost częstości występowania zarówno naczyń mięsaków, jak i łącznie ocenianych naczyń mięsaków oraz naczyń krwionośnych u obu płci w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej (tab. 9.). Dane te są zgodne z otrzymanymi

wcześniej wynikami badań przez Weisburger i in. (1978). Doświadczenie to opisano poniżej:

Zwierzęta: myszy, B6C3F1: 50 ♂ i 50 ♀ w grupie, grupa kontrolna: 20 ♂ i 20 ♀.

Dawkowanie: ♂ 0, 3 750 i 15 000 mg/kg paszy przez 99 tygodni;
♀ 0 i 1 250 mg/kg paszy przez 99 tygodni;
♀ 5 000 mg/kg paszy przez 92 tygodnie.

ADD: ♂ 0; 450 lub 1 800 mg/kg mc.;
♀ 0; 162 lub 648 mg/kg m.c.

HED: ♂ 0; 98,4 i 393 mg/kg mc.;
♀ 0; 32,8 i 131 mg/kg mc.

Sekcja: po 92 lub 99 tygodniach.

Toksyczność: zależny od dawki wzrost śmiertelności, padnięcia spowodowane rozwojem nowotworu.

Tabela 9.
Częstość występowania nowotworów u myszy, otrzymujących chlorowoderek 4-chloro-2-toliloaminy (NCI 1979)

Rodzaj nowotworu	Płeć	Stężenie chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy, mg/kg paszy				
		0	1 250	3 750	5 000	15 000
Naczyniakomięsaki krwionośne	♂ ♀	0/20 0/18	40/49	3/50	39/50	37/50
Naczyniaki i naczyniakomięsaki krwionośne	♂ ♀	0/20 1/18	44/49	6/50	39/50	41/50

Objaśnienia:
♂ – samiec.
♀ – samica.

Ocenę działania rakotwórczego chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy u szczurów przeprowadzili Weisburger i in. (1978). Poniżej podano krótką charakterystykę tego doświadczenia:

Zwierzęta: szczury Crl:CD: 25 ♂ w grupie, grupa kontrolna: 25 ♂, spulowana grupa kontrola z większego badania: 111 ♂.
Dawkowanie: 0; 2 000 lub 4 000 mg/kg paszy przez 3 miesiące; następnie: 0; 500 lub 1 000 mg/kg paszy przez kolejne 15 miesięcy.
HED: 35,4 oraz 70,8 mg/kg mc.
Sekcja: po 24 miesiącach (6 miesięcy obserwacji).
Toksyeczność: konieczne było zmniejszenie dawki, ponieważ przyrost masy ciała zmniejszał się o ponad 10%.
Nowotwory: brak istotnego wzrostu częstości występowania nowotworów.

Chlorowoderek 4-chloro-2-toliloaminy (czystość nieznana) podawano w paszy jedynie samcom szczurów Crl:CD przez 3 miesiące, następnie zmniejszone dawki związku podawano przez 15 miesięcy. Przez kolejnych 6 miesięcy zwierzęta podlegały obserwacji, podczas której były żywione paszą dla zwierząt z grupy kontrolnej. Sekcji dokonywano po 24 miesiącach trwania doświadczenia. Autorzy badania udokumentowali brak istotnego wzrostu częstości występowania nowotworów u szczurów z grup badanych w porównaniu z odpowiednimi grupami kontrolnymi (Weisburger i in. 1978).

W innym badaniu Ciba-Geigy (1992a) również wykorzystywano chlorowoderek 4-chloro-2-toliloaminy (nieznana czystość), który podawano w paszy szczurom Sprague-Dawley

obu płci przez 94 (♂) lub 104 (♀) tygodnie. Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w masie ciała pomiędzy zwierzętami narażonymi na chlorowoderek 4-chloro-2-toliloaminy a grupami kontrolnymi. Wykazano natomiast, że badany związek przyczyniał się do zależnego od dawki częstszego występowania (a u samic również większego nasilenia) nowotworów w wątrobie (złośliwych i łagodnych), jak i nadnerczach. Ponadto odnotowano zmiany nowotworowe w przysadce i gruczole piersiowym, jednak nie były one skorelowane z wielkością podanej szczurom dawki (tab. 10.). Charakterystykę badania podano poniżej:

Zwierzęta: szczury, Sprague-Dawley: 30 ♂ i 30 ♀ w grupie; grupa kontrolna: 30 ♂ i 30 ♀.
Dawkowanie: 0; 20; 100 i 500 mg/kg paszy przez 94 (♂) lub 104 (♀) tygodnie
ADD: ♂: 0; 1,38; 6,88 lub 34,4 mg/kg mc.; ♀: 0; 1,64; 8,2 lub 41,0 mg/kg mc.
HED: ♂: 0; 0,405; 2,02 lub 10,1 mg/kg mc.; ♀: 0; 0,421; 2,11; lub 10,5 mg/kg mc.
Sekcja: po 94 (♂) lub 104 (♀) tygodniach.
Toksyeczność: zależny od dawki wzrost śmiertelności samic (po 104 tyg. odpowiednio: 52; 60; 66 i 80%).

Tabela 10.
Częstość występowania nowotworów u szczurów, otrzymujących chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy (Ciba-Geigy 1992a)

Rodzaj nowotworu	Płeć	Stężenie chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy, mg/kg paszy			
		0	20	100	500
Guzy wątroby ^a	♂	0,0 (0,0)	11,1 (3,3)	45,1 (16,7)	80,3 (43,3)
	♀	0,0 (0,0)	25,9 (10,0)	81,8 (31,0)	91,8 (66,7)
Złośliwe i prawdopodobnie złośliwe nowotwory wątroby ^a (wątrobiaki)	♂	0,0 (0,0)	11,1 (3,3)	12,5 (3,5)	45,5 (16,7)
	♀	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	14,5 (3,4)	48,7 (16,7)
Prawdopodobnie łagodne nowotwory wątroby (wątrobiaki) i rozrost gruczolakowaty ^a	♂	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	36,8 (13,3)	56,1 (26,7)
	♀	0,0 (0,0)	25,9 (10,0)	76,2 (27,6)	78,0 (50,0)
Gruczolaki nadnerczy i rozrost gruczolakowaty ^a	♂	33,3 (13,3)	47,8 (20,0)	45,1 (16,7)	38,4 (20,0)
	♀	58,0 (27,6)	72,6 (40,0)	87,2 (55,2)	82,7 (53,3)
Gruczolaki przysadki ^a	♂	44,7 (23,3)	71,8 (36,7)	50,0 (16,7)	43,2 (20,0)
	♀	83,9 (58,6)	86,6 (60,0)	80,4 (55,2)	90,5 (60,0)
Całkowita częstość występowania nowotworu ^a	♂	74,8 (46,7)	86,1 (56,7)	86,2 (43,3) ^b	92,5 (56,7)
	♀	93,9 (82,8)	98,0 (83,3)		100,0 (96,7)

Objaśnienia:

♂ – samiec.

♀ – samica.

^a – wyniki podano w procentach wyliczonych przez Ciba-Geigy (1992a), obliczone metodą Naïve (EPA 2010).

^b – wartość nie wyliczona w tym badaniu.

NCI (1979) przeprowadziło 2-letnie (107 tygodni) badanie działania rakotwórczego chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy (czystość > 99%) podawanego szczurom szczepu F344 obu płci w paszy. Charakterystykę badania podano poniżej:

Zwierzęta: szczury F344: 50 ♂
i 50 ♀ w grupie;
grupa kontrolna: 20 ♂ i 20 ♀.
Dawkowanie: 0; 1 250 oraz 5 000 mg/kg
paszy przez 107 tygodni.
HED: (♂): 0; 26,8 lub 107 mg/kg m.c.;
(♀): 0; 27,4 lub 110 mg/kg m.c.
Sekcja: po 107 tygodniach.
Toksyczność: istotne zmniejszenie przyrostu
masy ciała ♂ i ♀ narażonych
na największą dawkę związku.

Narażenie na większą dawkę chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy skutkowało istotnym statystycznie zmniejszeniem masy ciała zwierząt (♂ i ♀) narażanych w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej. Nie odnotowano natomiast zależności pomiędzy wielkością zastosowanej dawki a wzrostem padnięć zwierząt. Ocena histopatologiczna wykazała istotne statystycznie zwiększenie częstości występowania gruczolaków barwnikoopornych w przysadce u szczurów obu płci (tab. 11.). Wszystkie uznano za łagodne zmiany nowotworowe. Ze względu na fakt, że istotność statystyczna została potwierdzona dla największej dawki (♂) jedynie w teście Cochran-Armitage’a, a dla (♀) – tylko w teście Fishera, nie uznano chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy za związek rakotwórczy dla szczurów szczepu F344.

Tabela 11.
Częstość występowania nowotworów u szczurów, otrzymujących chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy (NCI 1979)

Rodzaj nowotworu	Płeć	Stężenie chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy, mg/kg paszy		
		0	1 250	5 000
Powłoki ciała – włókniaki	♂	1/20	4/50	2/50
Płuca – raki lub gruczolaki pęcherzykowe/ oskrzelikowe	♂	1/20	6/50	2/49
Układ krwiotwórczy – chłoniaki lub białaczki	♂	6/20	1/50	1/50
	♀	3/20	4/50	1/50

cd. tab. 11.

Rodzaj nowotworu	Płeć	Stężenie chlorowodorku 4-chloro-2-toliloaminy, mg/kg paszy		
		0	1 250	5 000
Wątroba – raki lub gruczolaki wątrobowokomórkowe	♂	0/20	5/50	4/50
Przysadka – gruczolaki barwnikoooporne	♂	2/19	6/48	15/47 ^b
	♀	1/19	13/47	15/48 ^a
Nadnercza – guzy chromochłonne	♂	0/20	0/49	4/49
Tarczycza – raki lub gruczolaki pęcherzykowe	♂	1/19	0/49	4/49
Jądra – guzy śródmiaższowe	♂	16/20	39/48	42/50
Oślonka pochwowa jądra – międzylbłoniak, NOS	♂	2/20	0/50	0/50
Gruczoł piersiowy – gruczolaki, NOS	♀	0/20	6/50	1/50
Gruczoł piersiowy – gruczolakowłókniki	♀	4/20	10/50	6/50
Macica – endometrialny polip podścieliska	♀	5/19	5/49	8/49

Objaśnienia:

♂ – samiec.

♀ – samica.

NOS – ang. *Not Otherwise Specified*.

^a – istotna statystycznie różnica w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej, test Fishera ($p < 0,05$)

^b – istotna statystycznie różnica w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej, test Cochran-Armitage'a ($p < 0,05$).

Badania na zwierzętach dostarczyły wystarczających dowodów rakotwórczego działania 4-chloro-2-toliloaminy. Wykazano, że związek ten podawany myszom w paszy indukował zależny od dawki wzrost liczby nowotworów naczyniowych (naczyniaki i naczyniakomięsaki), głównie w śledzionie i tkance tłuszczowej. Działania takiego nie stwierdzono u szczurów.

W Polsce pierwsze szacowanie ryzyka nowotworowego dla 4-chloro-2-toliloaminy zostało przeprowadzone przez Stetkiewicza i in. (1995). Korzystając ze współczynnika kierunkowego (SF), prostej dawka-odpowiedź dla człowieka, wynoszącego $0,27 \text{ (mg/kg-dzień)}^{-1}$ (Cal/EPA 1992) autorzy oszacowali ryzyko wystąpienia nowotworów w ciągu 20 lat zawodowego narażenia na 4-chloro-2-toliloaminę o stężeniu 12 mg/m^3 (wartości NDS obowiązującej w tym czasie w Szwajcarii). Obliczone ryzyko wyniosło $R = 0,03$, co wskazuje na możliwość wystąpienia nowotworu u 3 ze 100 osób narażonych na działanie 4-chloro-2-toliloaminy (Stetkiewicz i in. 1995). Ryzyko takie jest nieakceptowalne i wskazuje na potrzebę znacznego zmniejszenia wartości NDS.

Szymańska i in. (2008) przeprowadzili ilościową ocenę rakotwórczości 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodorku, biorąc za podstawę częstość występowania nowotworów pęcherza moczowego u samic myszy, karmionych paszą zawierającą chlorowodorek 4-chloro-2-tolilo-

aminy przez 99 tygodnie, na podstawie wyników innego badania (NCI 1979). Do wyników narażenia dopasowano model dwustopniowy.

W celu przeliczenia stężenia w paszy na dawkę dzienną chlorowodorku 4-chloro-2-toliloaminy przyjęto, że dobowe spożycie paszy przez myszy (samice) wynosiło 5 g. Podczas ekstrakcji wyników uzyskanych na zwierzętach do rezultatów dla narażonych ludzi przyjęto, że w czasie zmiany roboczej człowiek zużywa 10 m^3 powietrza, pracuje przez 240 dni w roku przez maksymalnie 40 lat, średnia masa ciała człowieka wynosi 70 kg a średni czas życia człowieka – 70 lat. W celu przeliczenia średniej dawki dla okresu całego życia człowieka na średnią dawkę dla całego życia myszy przyjęto masę samic myszy w eksperymencie równą $0,025 \text{ kg}$.

Z przyjętego do obliczeń modelu wynika, że założonemu dodatkowemu ryzyku powstania raka pęcherza moczowego, wynoszącemu 10^{-4} odpowiada stężenie chlorowodorku 4-chloro-2-toliloaminy w powietrzu środowiska pracy wynoszące $0,8 \text{ mg/m}^3$. Rozważono także sytuację, w której człowiek pracuje przez 40 lat w narażeniu na chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy o stężeniu $0,3 \text{ mg/m}^3$; otrzymana wartość ryzyka raka pęcherza moczowego wynosiła $4,05 \cdot 10^{-5}$ (Szymańska i in. 2008).

Należy jednak zaznaczyć, że jakkolwiek u ludzi 4-chloro-2-toliloamina lub jej chlorowodorek

powoduje nowotwory pęcherza moczowego (raki z nabłonka przejściowego i/lub rak brodawkowaty) to nowotwory pęcherza, obserwowane u myszy w badaniu NCI były naczyniakomięsaki, nie miały charakteru nowotworów pierwotnych, a częstość ich występowania nie zależała od dawki (dawka mała 6/39, dawka duża 6/34). W badaniu NCI na myszach najczęściej stwierdzanym typem nowotworu były naczyniakomięsaki, głównie w tkance tłuszczowej w okolicy narządów płciowych. Autorzy raportu NCI w dyskusji podkreślili, że naczyniakomięsaki obserwowane u myszy pochodziły z tkanki tłuszczowej, przylegającej do narządów płciowych, a nie z konkretnego narządu. W niektórych przypadkach stwierdzano ich infiltrację do: mięśni jamy brzusznej, macicy, jajników czy pęcherza moczowego (NCI 1979). W świetle powyższych rozważań szacowanie ryzyka nowotworowego 4-chloro-2-toliloaminy i zastosowanie go dla wyprowadzenia wartości NDS wydaje się niezasadne.

Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) uznała, że dowody na rakotwórcze działanie 4-chloro-2-toliloaminy u ludzi są ograniczone, natomiast dowody działania rakotwórczego u zwierząt doświadczalnych są wystarczające. W ogólnej ocenie IARC zaliczyła 4-chloro-2-toliloaminę do grupy 2A – związków prawdopodobnie rakotwórczych na człowieka (IARC 2010).

W państwach Unii Europejskiej 4-chloro-2-toliloamina ma zharmonizowaną klasyfikację Carc.1B, czyli jest substancją o potencjalnym działaniu rakotwórczym na człowieka (Rozporządzenie 1272/2008).

Działanie embriotoksyczne, teratogenne i wpływ na rozrodczość

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono informacji na temat wpływu 4-chloro-2-toliloaminy na rozrodczość ludzi. Nie ma również informacji na temat embriotoksyczności i teratogenności tego związku.

Badania toksyczności reprodukcyjnej 4-chloro-2-toliloaminy przeprowadzono na 125 samcach myszy NMRI/SPF, otrzymujących 4-chloro-2-toliloaminę dożołądkowo w dawce 200 mg/kg mc./dzień przez 7 tygodni. Po zakończeniu narażenia samce były kojarzone z nienarażanymi samicami i oceniano płodność u męskiego potomstwa z generacji F1. Nie stwierdzono: zmniejszenia liczebności miotów, wzrostu przypadków bezpłodności oraz zmian cytogenetycznych. Na podstawie liczebności miotów autorzy stwierdzili, że 4-chloro-2-toliloamina nie powodowała dominujących mutacji letalnych w pokoleniu F1. Dane te potwierdzają, że 4-chloro-2-toliloamina nie wywołuje szkodliwego działania na rozrodczość (Lang, Adler 1982).

W innym badaniu samce myszy Tif:MAG/SPF otrzymywały jednorazową, dożołądkową dawkę chlorowodoru 4-chloro-2-toliloaminy wynoszącą 110 lub 330 mg/kg mc., a następnie były kojarzone z nienarażanymi samicami. Nie stwierdzono skutków cytotoksycznych lub mutagennych w komórkach rozrodczych samców. Nie stwierdzono również zmian w liczbie implantacji czy obumarcia zarodków (Fritz i in. 1978).

TOKSYKOKINETYKA

4-Chloro-2-toliloamina wchłania się do organizmu drogą pokarmową, przez drogi oddechowe i przez skórę. O możliwości wchłaniania tego związku przez skórę świadczy występowanie ostrego, krwotocznego zapalenia pęcherza moczowego u zwierząt laboratoryjnych po aplikacji na skórę (Lehman 1933).

Z uwagi na fakt, że 4-chloro-2-toliloamina jest głównym metabolitem insektycydu – chlordimeformu, w literaturze są dostępne dane dotyczące toksykokinetyki 4-chloro-2-toliloaminy

po narażeniu zwierząt doświadczalnych bezpośrednio na ten związek, jak i na chlordimeform. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono informacji dotyczących toksykokinetyki 4-chloro-2-toliloaminy u ludzi.

Knowles i Gupta (1970) badali metabolizm obu tych związków u szczurów Sprague-Dawley. W pierwszym badaniu chlordimeform znakowany węglem ^{14}C (^{14}C -Galecron^R) podawano *per os*. Wydalanie z moczem (ocenione po 72 h) stanowiło 88%, a z kałem 7,5% podanej dawki.

Poza Galecronem w moczu wykryto: demetylo-Galecron, *N*-formylo-4-chloro-2-toliloaminę, 4-chloro-2-toliloaminę oraz trzy inne (niezidentyfikowane) metabolity. Największe poziomy radioaktywności zaobserwowano w wątrobie, następnie w mięśniach, a najmniejsze w tkance tłuszczowej. W drugim badaniu podawano również *per os* [^{14}C]-4-chloro-2-toliloaminę. Wydalanie z moczem (po 72 h) stanowiło 71% dawki, a z kałem 25%. Oprócz 4-chloro-2-toliloaminy w moczu zidentyfikowano kwas 5-chloroantranilowy oraz 4-chloro-2-metyloacetanilid, jak również pięć niezidentyfikowanych szczegółowo metabolitów. Największe poziomy [^{14}C]-4-chloro-2-toliloaminy stwierdzono tym razem kolejno w: tkance tłuszczowej, wątrobie i nerkach.

Birner i Neumann (1988) przeprowadzili badania 4-chloro-2-toliloaminy podawanej *per os* samicom szczurów Wistar i samicom myszy B6C3F1. Wykazano, że wskaźnik wiązania z hemoglobina (HBI) dla 4-chloro-2-toliloaminy był 11-krotnie większy ($\text{HBI} = 28 \text{ mmol/mol Hb/nmol/kg}$) u szczurów niż u myszy ($\text{HBI} 2.5 \text{ mmol/mol Hb/nmol/kg}$). Z kolei wyznaczony przez Sabbionego i Neumanna (1990) HBI dla 4-chloro-2-toliloaminy był ponad 10-krotnie mniejszy (2,4) i dotyczył narażenia *per os* samic szczura Wistar na chlordimeform. Różnice te są warunkowane koniecznością zmetabolizowania chlordimeformu do 4-chloro-2-toliloaminy, a następnie wiązania z Hb.

W przeciwieństwie do innych amin aromatycznych *N*-acetylacja wydaje się nie odgrywać kluczowej roli w metabolizmie i aktywacji 4-chloro-2-toliloaminy. U szczurów Osborne-Mendel, którym podano dootrzewnowo chlorowodorek 4-chloro-orto-[metyl- ^{14}C]toluidyny w dawce 14 mg/kg mc. wykazano, że poziomy adduktów związanych z: białkiem, RNA i DNA były istotnie większe w wątrobie niż w 10 innych badanych tkankach (Hill i in. 1979). Ponadto badania w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem frakcji mikrosomalnej wątroby potwierdziło powstawanie nieodwracalnego wiązania zależnego od: NADPH, czasu inkubacji i stężenia białka. Wiązanie z makrocząsteczkami w warunkach *in vitro* było zwiększone we frakcji mikrosomalnej szczurów, którym podawano dootrzewnowo fenobarbital (100 mg/kg mc. przez 2 dni), co sugeruje udział cytochromu P450

w reakcji. Głównymi metabolitami były 5-chloro-2-hydroksyaminotoluen i 4,4'-dichloro-2,2'-dimetyloazobenzen. Zidentyfikowanie pierwszego z nich sugeruje powstawanie związku pośredniego – pochodnej *N*-hydroksylowej (*N*-OH), która jest dalej utleniana do pochodnej *N*-nitrozowej, na co wskazuje obecność drugiego metabolitu (Hill i in. 1979).

Zgodnie z opisanymi wcześniej badaniami Birner i Neumann (1988) oraz Sabbioni i Neumann (1990) sugerują, że pochodne *N*-OH monocyklicznych amin aromatycznych są utleniane w krwinkach czerwonych do metabolitów nitrozowych, które dalej wiążą się z grupami -SH w hemoglobinie.

Wiązanie kowalencyjne 4-chloro-2-toliloaminy zarówno z DNA, jak i z białkiem wykazano także w kolejnych badaniach z wykorzystaniem samców szczurów Sprague-Dawley [Tif: RAIf (SPF)] i myszy [Tif: MAGf (SPF)], którym podawano badany związek *per os* w dawce 25 mg/kg mc. (Bentley i in. 1986a). Potwierdzono trzykrotnie większą liczbę wiązań kowalencyjnych z białkiem wątroby szczura ($199 \pm 18 \text{ pmol/mg}$) niż z białkiem wątroby myszy ($62 \pm 126 \text{ pmol/mg}$). Wyniki te są zgodne z opisanym wcześniej wskaźnikiem wiązania z Hb dla 4-chloro-2-toliloaminy, który był jedenastokrotnie większy u szczurów niż u myszy (Birner, Neumann 1988). Z kolei u myszy wykryto dwa razy więcej wiązań z wątrobowym DNA niż u szczurów. Jeden z dwóch adduktów z DNA był wykrywany u myszy w ilości od 6 do 30 razy większej niż u szczurów. Podobnie większą radioaktywność odnotowano w DNA grasicy, gdy [^{14}C]-4-chloro-2-toliloaminę aktywowano mysimi w porównaniu do szczurzych frakcji subkomórkowych. Większy stopień tworzenia się adduktu 4-chloro-2-toliloaminy u myszy może wyjaśniać większą wrażliwość tego gatunku w porównaniu ze szczurami na powstawanie naczyniakomięsaków po narażeniu na 4-chloro-2-toliloaminę.

Wyniki oceny wpływu chlordimeformu i 4-chloro-2-toliloaminy na biotransformację w wątrobie u samców szczurów Sprague-Dawley (Leslie i in. 1988) dowiodły, że chlordimeform nie prowadził do zmian stężenia całkowitego cytochromu P-450, aktywności *p*-hydroksylazy anilinowej ani *S*-transferazy glutationowej, lecz indukował *O*-deetylazę etoksyresorufinową, *O*-deetylazę etoksykumarynową i hydrolazę epok-

sydową, zmniejszając jednocześnie aktywność epoksydazy aldryny i *N*-demetylasy aminopirynowej. Skutki te obserwowano po siedmiu kolejnych dziennych dootrzewnowych podaniach chlorordimeformu w większych dawkach: 50 lub 100 mg/kg mc., ale nie 1 lub 10 mg/kg mc. (z wyjątkiem zmniejszenia aktywności *N*-demetylasy aminopirynowej w dawce 10 mg/kg mc.). Natomiast narażenie na siedem dawek 100 mg/kg mc. 4-chloro-2-toliloaminy prowadziło do zwiększenia stężenia całkowitego cytochromu P-450, aktywności *O*-deetylasy etoksyresorufinowej, *O*-deetylasy etoksykumaryny, *S*-transferazy glutationowej i hydrolazy epoksydowej. Dawka dziesięciokrotnie mniejsza (10 mg/kg mc.) 4-chloro-2-toliloaminy także zwiększała aktywność *O*-deetylasy etoksyresorufinowej i *O*-deetylasy etoksykumaryny. Oba związki zwiększały stopień hydroksylacji androstendionu oraz prowadziły do niewielkiego zmniejszenia syntezy testosteronu. Zwiększona biotransformacja uwarunkowana była prawdopodobnie indukcją izoform CYP 1A1 i 1A2 (Leslie i in. 1988).

W badaniu (metabolizm chlordimeformu), ([¹⁴C]-Galecron®) u zwierząt wykazano,

że łączny odsetek dawki wydalonej z moczem w 24-godzinnej zbiórce wynosił: 75% u psów mieszańców, 65% u kóz mlecznych i 80% u samców kóz. Procent dawki wydalonej z kałem po 72 h wynosił odpowiednio: 0,6 i 1,8% u psów i kóz. U wszystkich trzech badanych gatunków zwierząt wykryto: demetylo-Galecron, *N*-formylo-4-chloro-2-toliloaminę, 4-chloro-2-toliloaminę, kwas *N*-formylo-5-chloroantranilowy i kwas 5-chloroantranilowy. Konwersja chlordimeformu do kwasu *N*-formylo-5-chloroantranilowego i kwasu 5-chloroantranilowego była największa u kóz, następnie u psów i najmniejsza u szczurów. Wydalanie z żółcią oceniano również u psów narażonych na chlordimeform w dawce 0,3 mg/kg mc. Maksymalną radioaktywność w żółci odnotowano po 8 h od narażenia, natomiast po 72 h – 5% podanej dawki. Zidentyfikowano metabolity w postaci wolnej i sprzężonej, które obejmowały wszystkie dotychczas wymienione i kilka niescharakteryzowanych. Głównym metabolitem w żółci była *N*-formylo-4-chloro-2-toliloamina (Knowles 1970; Knowles, Gupta 1970).

MECHANIZM DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

4-Chloro-2-toliloamina jest aminą aromatyczną, powodującą u ludzi nowotwory pęcherza moczowego. Dokładny mechanizm działania 4-chloro-2-toliloaminy nie jest znany, jak również nie jest znany jej metabolizm u ludzi, można jednak przypuszczać, że mechanizm działania rakotwórczego będzie taki sam, jak dla innych amin o udowodnionym działaniu kancerogennym.

Mechanizm rakotwórczego działania amin aromatycznych jest ściśle powiązany z ich metabolizmem. Metabolizm aryloamin przebiega poprzez szlak hydroksylacji (*N*- i *C*-hydroksylacji) katalizowanych przez CYP1A2. Za toksyczne metabolity są uważane *N*-hydroksyloaminy, które mogą przechodzić w toksyczny kation arylnitreniowy. Kation ten ma zdolność tworzenia wiązań kowalencyjnych z makrocząsteczkami. Hydroksylowane aminy ulegają w organizmie reakcjom sprzęgania, a produkty sprzęgania są wydalane przez nerki, najczęściej

w postaci glukuronianów. Kwaśne środowisko panujące w pęcherzu moczowym oraz obecność β -glukuronidaz powodują częściową hydrolizę i ponowne uwalnianie hydroksyloamin, które mogą tworzyć w pęcherzu toksyczne kationy. Uwolnione hydroksyloaminy mogą ulegać acetylacji z udziałem NAT1, co prowadzi do silnie elektrofilowych acetoksyaryloamin, zdolnych do tworzenia wiązań kowalencyjnych z urotealnym DNA. Brak naprawy powstałego defektu DNA inicjuje mutacje w protoonkogenach oraz/lub nowotworowych genach supresorowych, co prowadzi do transformacji nowotworowej. Natomiast acetylacja, zachodząca przy udziale NAT2 prowadzi do detoksykacji polegającej na przekształceniu amin w acetamidy, które ulegają wydalaniu z organizmu (Carreon i in. 2010). W nabłonku pęcherza moczowego obserwowano znaczną aktywność NAT1, kontrastującą z niską aktywnością NAT2. W procesie kance-

roogenezy znaczenie mają również szlaki wolno-rodnikowe.

Ponieważ aminy aromatyczne mogą być aktywowane poprzez acetylację, należy spodziewać się, że osoby, które są „wolnymi acetylatorami” będą bardziej podatne na rozwój raka pęcherza moczowego, niż „szybcy acetylatorzy” (Johansson, Cohen 1997). Jest tak w przypadku osób narażonych na 4-chloro-2-toliloaminę, gdzie wykazano, że rak pęcherza moczowego występuje istotnie częściej u wolnych acetylatorów (Popp i in. 1992; Stasik 1988).

Dokładny mechanizm działania 4-chloro-2-toliloaminy u zwierząt nie jest ostatecznie poznany. Jednak istniejące dowody na jej dzia-

łanie genotoksyczne sugerują, że działanie rakotwórcze 4-chloro-2-toliloaminy może zachodzić poprzez genotoksyczny mechanizm działania, podobnie jak i u innych amin aromatycznych o dobrze poznanym działaniu rakotwórczym. Dowodem potwierdzającym genotoksyczny mechanizm działania 4-chloro-2-toliloaminy jest fakt, że jest to związek tworzący addukty: hemoglobiną (Birner, Neumann 1988), tkankowym DNA i białkami (Bentley i in. 1986a; 1986b; Hill i in. 1979). Jest to zgodne z proponowanym mechanizmem kancerogenezy chemicznej, obejmującym tworzenie chemicznych adduktów z DNA poprzez wiązania kowalencyjne.

DZIAŁANIE ŁĄCZNE

W dostępnej literaturze nie znaleziono informacji dotyczących łącznego narażenia na 4-chloro-2-toliloaminę lub jej chlorowoderek i inne

związki chemiczne (o znaczeniu przemysłowym), badanego w warunkach doświadczalnych.

ZALEŻNOŚĆ SKUTKU TOKSYCZNEGO OD WIELKOŚCI NARAŻENIA

Dostępne dane dotyczące toksycznego wpływu 4-chloro-2-toliloaminy na ludzi nie pozwalają na wyprowadzenie zależności dawka-skutek. Z podprzewlekłych i przewlekłych badań na zwierzętach, otrzymujących 4-chloro-2-toliloaminę drogą pokarmową wynika, że najczulszymi skutkami działania tego związku jest działanie

rakotwórcze i działanie na wątrobę. Tabela 12. przedstawia wartości NOAEL i LOAEL (mg/kg/dzień) występujące u zwierząt doświadczalnych narażanych na 4-chloro-2-toliloaminę drogą pokarmową w warunkach narażenia podprzewlekłego i przewlekłego.

Tabela 12.
Wartości NOAEL i LOAEL występujące u zwierząt narażanych na 4-chloro-2-toliloaminę drogą pokarmową (EPA 2010)

Gatunek, płeć, liczba zwierząt w grupie	Dawka 4-chloro-2-toliloaminy, mg/kg mc./dzień	Czas i sposób narażenia	NOAEL, mg/kg mc./dzień	LOAEL, mg/kg mc./dzień	Obserwowany efekt krytyczny	Piśmiennictwo
Szczury, 5/ płeć/grupę	♂ – 25 ÷ 1 000 ♀ – 113 ÷ 5 650	7 tygodni, w paszy	677	700	zmniejszenie średniej masy ciała u samic (10%)	NCI 1979
Szczury, 30/ płeć/grupę	♂ – 1,38 ÷ 34,4 ♀ – 1,64 ÷ 41,0	♂: 94 tyg. ♀: 104 tyg., w paszy	8,20	34,4	zwiększenie masy wątroby u obu płci	Ciba-Geigy 1992a
Myszy, 5/płeć/grupę	♂ – 361 ÷ 2 710 ♀ – 2 930 ÷ 3 900	7 tygodni, w paszy	1800	2710	zmniejszenie średniej masy ciała u obu płci (10%)	NCI 1979

cd. tab. 12.

Gatunek, płeć, liczba zwierząt w grupie	Dawka 4-chloro-2-toliloaminy, mg/kg mc./dzień	Czas i sposób narażenia	NOAEL, mg/kg mc./dzień	LOAEL, (mg/kg mc./dzień)	Obserwowany efekt krytyczny	Piśmiennictwo
Myszy, 30/płeć/grupę	♂ – 3,60 ÷ 89,9 ♀ – 3,69 ÷ 89,9	przez 18 miesięcy, w paszy	3,69	18,0 (FEL)	zwiększenie padnięć zwierząt u obu płci; wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej	Ciba-Geigy 1992b

Objaśnienia:

♂ – samiec.

♀ – samica.

4-Chloro-2-toliloamina jest aminą aromatyczną, która będzie wywoływała raczej nowotwory pęcherza moczowego (obserwowane u ludzi) niż nowotwory naczyniowe (obserwowane w badaniach na myszach).

Dane dotyczące działania rakotwórczego u ludzi są ograniczone i nie pozwalają na wyprowadzenie zależności dawka-odpowiedź.

W badaniach na zwierzętach najczęściej występującymi nowotworami były nowotwory naczyniowe (naczyniaki i naczyńniakomięsaki

krwionośne) obserwowane u myszy obu płci. Częstość występowania nowotworów naczyniowych (naczyniaków i naczyńniakomięsaków krwionośnych) u myszy, otrzymujących chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy w paszy, w warunkach narażenia przewlekłego, przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13.

Częstość występowania nowotworów naczyniowych u myszy narażanych przewlekłe na chlorowodorek 4-chloro-2-toliloaminy

Gatunek zwierząt, płeć	Stężenie w paszy, mg/kg paszy	Średnia dawka, mg/kg mc./dzień	Częstość występowania nowotworów	Piśmiennictwo
Myszy CD-1, samce	0 750 1500	0 90 180	0/14 12/20 13/20	Weisburger i in. 1978
Myszy CD-1, samice	0 2000	0 260	0/15 18/19	Weisburger i in. 1978
Myszy B6C3F1, samce	0 3750 15000	0 450 1800	0/20 6/50 41/50	NCI 1979
Myszy B6C3F1, samice	0 1250	0 162	1/20 43/50	NCI 1979

Na podstawie przedstawionych danych Cal/EPA (1992) wyznaczyła współczynnik potencjału rakotwórczego (odpowiednik SF – współczynnik nachylenia dawka-odpowiedź), który dla 4-chloro-2-toliloaminy (po uwzględnieniu różnicy wynikającej z mas cząsteczkowych) wynosi $0,27 \text{ (mg/kg-dzień)}^{-1}$. Wyliczono także

wartość ryzyka jednostkowego, uwzględniając masę ciała człowieka – 70 kg i wentylację – $20 \text{ m}^3/\text{dzień}$. Dla 4-chloro-2-toliloaminy ryzyko jednostkowe wynosi $7,7 \cdot 10^{-5} \text{ (}\mu\text{g/m}^3\text{)}^{-1}$ (OEHHA online 2019).

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

Istniejące wartości NDS i ich podstawy

W USA żadna z agencji (ACGIH, OSHA, NIOSH) nie ustaliła wartości normatywów higienicznych dla 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodorku, a w NTP przyjęto ich klasyfikację jako R – związek rozpatrywany jako prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi (ang. *reasonably anticipated to be a human carcinogen*), (ACGIH 2018).

W Niemczech nie ustalono normatywu dla 4-chloro-2-toliloaminy, uznając ten związek jako kancerogen kategorii 1 oraz mutagen kategorii 3A, wchłaniający się przez skórę (H), (DFG 2018).

Także w Polsce, zgodnie z rozporządzeniem MRPiPS z dnia 12.06.2018 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy (DzU 2018, poz. 1286) nie ustalono wartości NDS w środowisku pracy dla 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodorku.

Jedynym krajem europejskim, w którym ustalono wartość normatywu, jest Chorwacja, gdzie wartość NDS ustalono na poziomie $0,01 \text{ mg/m}^3$ z jednoczesną notacją „skóra” (Ordinance... 2013). Podstawy ustalenia tej wartości nie są znane.

Podstawy proponowanej wartości NDS

Jako podstawę do zaproponowania wartości NDS przyjęto działanie rakotwórcze 4-chloro-2-toliloaminy. Ponieważ 4-chloro-2-toliloamina jest genotoksycznym kancerogenem, wobec tego wartość normatywu higienicznego oparto o szacowanie ryzyka nowotworowego dla tego związku.

Do wyliczenia wartości NDS dla 4-chloro-2-toliloaminy wykorzystano współczynnik nachylenia krzywej dawka-odpowiedź (*SF*) na poziomie $0,27 \text{ (mg/kg-dzień)}^{-1}$, podany przez OEHA. Przy założonym poziomie ryzyka, wynoszącym $R = 10^{-4}$, obliczono średnią dawkę całodzienną (pokarmową) na podstawie wzoru:

$$R = SF \cdot D,$$

gdzie:

- *R* – ryzyko,
- *SF* – współczynnik nachylenia (ang. *slope factor*),
- *D* – dawka średnia całodzienna, mg/kg-dzień .

Dawka ta wynosi:

$$D = \frac{1 \cdot 10^{-4}}{0,27} = 3,7 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \cdot \text{dzień}.$$

Wartość NDS dla 4-chloro-2-toliloaminy obliczono ze wzoru:

$$\text{NDS} = D \cdot \frac{24}{8} \cdot \frac{365}{240} \cdot \frac{70}{40} \cdot \frac{1}{10} \cdot 70,$$

gdzie:

- *D* – dawka całodzienna, mg/kg-dzień ,
- 24 – doba (godziny),
- 8 – liczba godzin pracy,
- 365 – liczba dni w roku,
- 240 – liczba dni pracy w roku,
- 70 – wiek (lata),
- 40 – staż pracy (lata)
- 10 – wentylacja płuc człowieka, m^3 ,
- 70 – masa ciała człowieka, kg .

Po podstawieniu do wzoru uzyskuje się odpowiednią wartość NDS:

$$\begin{aligned} \text{NDS} &= 3,7 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{24}{8} \cdot \frac{365}{240} \cdot \frac{70}{40} \cdot \frac{1}{10} \cdot 70 = \\ &= 206,8 \cdot 10^{-4} \text{ mg/m}^3 \approx 0,02 \text{ mg/m}^3. \end{aligned}$$

Przy założonym ryzyku $R = 10^{-4}$ obliczona wartość NDS 4-chloro-2-toliloaminy i jej chlorowodorku wynosi $0,02 \text{ mg/m}^3$ (w przeliczeniu na 4-chloro-2-toliloaminę). Ponieważ narażenie przez skórę może mieć znaczny udział w ilości 4-chloro-2-toliloaminy pobranej przez pracowników, wymagana jest notacja „skóra”.

Nie znaleziono podstaw do ustalenia wartości chwilowej NDS_{ch} i dopuszczalnego stężenia w materiale biologicznym (DSB).

PIŚMIENNICTWO

- ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists (2018). Guide to occupational exposure values.
- Bentley P., Waechter F., Bieri F., Staubli W., Muecke W. (1986a). Species difference in the covalent binding of *p*-chloro-*o*-toluidine to DNA. Arch. Toxicol. Suppl. 9, 163–166.
- Bentley P., Bieri F., Muecke W., Waechter F., Staubli W. (1986b). Species difference in the toxicity of *p*-chloro-*o*-toluidine to rats and mice. Covalent binding to hepatic macromolecules and hepatic non-parenchymal cell DNA and an investigation of effects upon the incorporation of [3H] thymidine into capillary endothelial cells. Chem. Biol. Interact. 57(1), 27–40.
- Birner G., Neumann H.G. (1988). Biomonitoring of aromatic amines II: hemoglobin binding of some monocyclic aromatic amines. Arch. Toxicol. 62, 110–115.
- Cal/EPA, California Environmental Protection Agency (1992). Expedited cancer potency values and proposed regulatory levels for certain proposition 65 carcinogens.
- Carreon T., Hein M.J., Viet S.M., Hanley K.W., Ruder A.M., Ward E.M. (2010). Increased bladder cancer risk among workers exposed to *o*-toluidine and aniline: a reanalysis. Occup. Environ. Med. 67, 348–350.
- Centralny Rejestr Danych o Narażeniu na Substancje, Mieszaniny, Czynniki lub Procesy Technologiczne o Działaniu Rakotwórczym lub Mutagennym (2019). IMP, Łódź [dane niepublikowane].
- ChemIDplus (2019a). 4-Chloro-*o*-toluidine [dostęp: 04.02.2019; <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/95-69-2>].
- ChemIDplus (2019b). 4-Chloro-*o*-toluidine hydrochloride [dostęp: 4.02.2019; <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/3165-93-3>].
- Ciba-Geigy Corporation (1992a). Initial submission: effects of 4-chloro-*o*-toluidine in oral prolonged administration to rat for 92 (male) and 104 (female) weeks with cover letter dated 073192. U.S. EPA, Washington, DC [cyt. za: EPA 2010].
- Ciba-Geigy Corporation (1992b). Initial submission: effects of 4-chloro-*o*-toluidine in oral prolonged administration to mice for 80 weeks (volume I-II) with cover letter dated 081492. U.S. EPA, Washington, DC [cyt. za: EPA 2010].
- Currie A.N. (1933). Chemical haematuria from handling 5-chloro-*o*-toluidine. J. Ind. Hyg. 15, 205–213 [cyt. za: MAK 1993; Popp i in. 1992].
- DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft (2018). List of MAK and BAT values.
- EHC, Environmental Health Criteria (1998). Chlordimeform, Vol. 199. WHO, Geneva.
- EPA, United States Environmental Protection Agency (2010). Provisional peer-reviewed toxicity values for 4-chloro-2-methylaniline. EPA/690/R-10/003F.
- Folland D.S., Kimbrough R.D., Cline R.E., Swiggart R.C., Schaffner W. (1978). Acute hemorrhagic cystitis. Industrial exposure to the pesticide chlordimeform. J. Amer. Med. Assoc. 239, 1052 [cyt. za: MAK 1993].
- Fritz H., Becker H., Muller D. (1978). Dominant lethal study (mouse). Unpublished report, Ciba-Geigy Ltd., Basle, Switzerland [cyt. za: MAK 1993].
- Galloway S.M., Armstrong M.J., Reuben C., Colman S., Brown B., Cannon C., Bloom A.D., Nakamura F., Ahmed M., Duk S., Rimpo J., Margolin B.H., Resnick M.A., Anderson B., Zeiger E. (1987). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. Environ. Mol. Mutagen. 10, 1–175 [cyt. za: IARC 2010].
- Goggelmann W., Bauchinger M., Kulka U., Schmid E. (1996). Genotoxicity of 4-chloro-*o*-toluidine in Salmonella typhimurium, human lymphocytes and V79 cells. Mutat. Res. 370(1), 39–47.
- Guerard M., Marchand C., Funk J., Christen F., Winter M., Zeller A. (2018). DNA damage response of 4-chloro-*ortho*-toluidine in various rat tissues. Toxicol. Sci. 163(2), 516–524.
- Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K., Speck W., Zeiger E. (1983). Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. Environ. Mutagen. Suppl. 1, 3–142 [cyt. za: IARC 2010].
- Hill D.L., Shih T.W., Struck R.F. (1979). Macromolecular binding and metabolism of the carcinogen 4-chloro-2-methylaniline. Cancer Res. 39, 2528–2531.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1990). *para*-Chloro-*ortho*-toluidine and its strong acid salts. IARC Monographs vol. 48. Some flame retardants and textile chemicals, and exposures in the textile manufacturing industry.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2000). 4-Chloro-*ortho*-toluidine. IARC Monographs vol. 77. Some industrial chemicals.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2010). 4-Chloro-*ortho*-toluidine. IARC Monographs, vol. 99. Some aromatic amines, organic dyes, and related exposures.
- Johansson S.L., Cohen S.M. (1997). Epidemiology and etiology of bladder cancer. Semin. Surg. Oncol. 13, 291–298.
- Kimbrough R.D. (1980). Human health effects of selected pesticides. Chloroaniline derivatives. J. Environ. Sci. Health B15, 977–992 [cyt. za: IARC 1990; MAK 1993].
- Knowles C.O. (1970). Metabolism of two acaricidal chemicals, N^o-(4-chloro-*o*-tolyl)-N,N-dimethylformamidine (chlorphenamidine) and *m*-([dimethylamino)methylene]amino)phenyl methylcarbamate hydrochloride (formetanate). J. Agric. Food Chem. 18, 1038–1047 [cyt. za: IARC 2010].
- Knowles C.O., Gupta A.K. (1970). N^o-(4-chloro-*o*-tolyl)-N,N-dimethylformamidine-14C (Galecron) and

- 4-chloro-*o*-toluidine-14C metabolism in the white rat. *J. Econ. Entomol.* 63(3), 856–859 [cyt. za: IARC 2010].
- Lang R. (1984). The mammalian spot test and its use for testing of mutagenic and carcinogenic potential: experience with the pesticide chlordimeform, its principal metabolites and the drug lisuride hydrogen maleate. *Mutat. Res.* 135(3), 219–224.
- Lang R., Adler I.D. (1982). Studies on the mutagenic potential of the pesticide chlordimeform and its principal metabolites in the mouse heritable translocation assay. *Mutat. Res.* 92(1-2), 243–248.
- Lehman K.B. (1933). Studies on the action of chloroaniline and chlorotoluidine and of 5-chloro-2-toluidine hydrochloride. (German). *Arch. Hyg. Bakteriol.* 110, 12–32 [cyt. za: IARC 1990; MAK 1993].
- Leslie C., Reidy G.F., Murray M., Stacey N.H. (1988). Induction of xenobiotic biotransformation by the insecticide chlordimeform, a metabolite 4-chloro-*o*-toluidine and a structurally related chemical *o*-toluidine. *Biochem. Pharmacol.* 37(13), 2529–2535.
- MAK (1993). MAK value documentation. 4-Chloro-*o*-toluidine and its hydrochloride [online; dostęp: 31.01.2012].
- Matthews E.J., Spalding J.W., Tennant R.W. (1993). Transformation of BALB/c-3T3 cells: V. Transformation responses of 168 chemicals compared with mutagenicity in *Salmonella* and carcinogenicity in rodent bioassays. *Environ. Health Perspect.* 101, suppl. 2, 347–482 [cyt. za: IARC 2010].
- McGregor D.B., Brown A., Cattanch P., Edwards I., McBride D., Riach C., Caspary W.J. (1988). Responses of the L5178Y tk⁺/tk⁻ mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 2, 85–154 [cyt. za: EPA 2010].
- NCI, National Cancer Institute (1979). Bioassay of 4-chloro-*o*-toluidine for possible carcinogenicity. *Techn. Rep. Ser. No 165, DHEW Publ. No. (NIH) 79–1721.*
- NTP, National Toxicology Program (2016). *p*-Chloro-*o*-toluidine and its hydrochloride. Report on Carcinogens, 14th edition, National Toxicology Program. Department of Health and Human Services.
- OEHHA, Office of Environmental Health Hazard Assessment (2002). No significant risk level (NSRL) for the proposition 65 carcinogen *p*-chloro-*o*-toluidine hydrochloride. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section, Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). California Environmental Protection Agency.
- OEHHA, Office of Environmental Health Hazard Assessment (2019). *p*-Chloro-*o*-toluidine. Appendix B. Chemical-specific summaries of the information used to derive unit risk and cancer potency values. Updated 2011 [dostęp: 08.02.2019; <https://oehha.ca.gov/chemicals/p-chloro-o-toluidine>].
- Ordinance on limits for exposure to hazardous substances at work and biological limit values (2009). *Official Gazette* No 13/2009, 17/2013.
- Ott M.G., Langner R.R. (1983). A mortality survey of men engaged in the manufacture of organic dyes. *J. Occup. Med.* 25, 763–768 [cyt. za: IARC 2010; Stasik 2003].
- Popp W., Schmieding W., Speck M., Vahrenholz C., Norpoth K. (1992). Incidence of bladder cancer in a cohort of workers exposed to 4-chloro-*o*-toluidine while synthesizing chlordimeform. *Brit. J. Ind. Med.* 49, 529–531.
- PubChem (2019a). 4-Chloro-2-methylaniline [dostęp: 1.02.2019; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Chloro-2-methylaniline>].
- PubChem (2019b). 4-Chloro-2-methylaniline hydrochloride [dostęp: 1.02.2019, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Chloro-2-methylaniline-hydrochloride>].
- Rashid K.A., Ercegovic C.D., Mumma R.O. (1984). Evaluation of chlordimeform and degradation products for mutagenic and DNA-damaging activity in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Environ. Sci. Health. Part B Pestic. Food. Contam. Agric. Wastes* 19(1), 95–110.
- 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 rozporządzenia (WE) nr 1907/2006 (ze zm.) [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 (L353).
- Rozporządzenie Ministra Rodziny, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 12.06.2018 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. *DzU* 2018, poz. 1286 [Polish legal act].
- Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18.12.2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywę Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE. *Dz. Urz. UE* L396 z dnia 30.12.2006, s. 1, z późn. zmianami.
- Rozporządzenie Komisji (UE) 2018/1513 z dnia 10.10.2018 r. zmieniające załącznik XVII do rozporządzenia (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) w odniesieniu do niektórych substancji sklasyfikowanych jako rakotwórcze, mutagenne lub działające szkodliwie na rozrodczość, kategorii 1A lub 1B. *Dz. Urz. UE* z dnia 12.10.2018, s. 1 (L256).
- Sabbioni G., Neumann H.G. (1990). Biomonitoring of arylamines: hemoglobin adducts of urea and carbamate pesticides. *Carcinogenesis* 11, 111–115.
- Sachsse K., Bathe R. (1970a). Report on the determination of acute oral LD₅₀ of 5-chloro-2-aminotoluene-HCl to the rat. Unpublished report, Schering AG, Berlin, Germany [cyt. za: MAK 1993].

- Sachsse K., Bathe R. (1970b). Report on the determination of acute dermal LD₅₀ of 5-chloro-2-aminotoluene-HCl to the rat. Unpublished report, Schering AG, Berlin, Germany [cyt. za: MAK 1993].
- Sachsse K., Suter P., Zak F., Hess R. (1978). 4-Chloro-*o*-toluidine-HCl lifespan feeding study in mice. Unpublished final report, Ciba-Geigy Ltd., Basle, Switzerland [cyt. za: EPA 2010; MAK 1993].
- Sekihashi K., Yamamoto A., Matsumura Y., Ueno S., Watanabe-Akanuma M., Kassie F., Knasmüller S., Tsuda S., Sasaki Y.F. (2002). Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutat. Res.* 517, 53–74.
- Stasik M.J. (1982). Differentialdiagnose der Hamaturie. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 107, 77 [cyt. za: MAK 1993].
- Stasik M.J., Lange H.J., Ulm K., Schuckmann F. (1985). A historic cohort study of 4-chloro-2-methylaniline workers. Medichem meeting in Bahia, Brazil [cyt. za: Stasik 2003].
- Stasik M.J. (1988). Carcinomas of the urinary bladder in a 4-chloro-*o*-toluidine cohort. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 60(1), 21–24.
- Stasik M.J. (2003). 4-Chloro-*o*-toluidyna: etiologiczny czynnik indukcji raka pęcherza moczowego, historia jednego odkrycia. *Med. Pracy* 54(4), 355–359.
- Stetkiewicz J., Szadkowska-Stańczyk I., Szymczak W. (1995). *p*-Chloro-*o*-toluidyna. Wytyczne Szacowania Ryzyka Zdrowotnego dla Czynn timer Rakotwórczych 1, 125–142 [publication in Polish].
- Suter P., Luetkemeier H., Sachsse K., Zak F., Hess R. (1976a). 4-Chloro-*o*-toluidine-HCl 60 day feeding study in the rat. Unpublished report, Ciba-Geigy Ltd., Basle, Switzerland (cyt. za: MAK 1993).
- Suter P., Luetkemeier H., Sachsse K., Zak F., Hess R. (1976b). 4-Chloro-*o*-toluidine-HCl 60 day feeding study in mice. Unpublished report, Ciba-Geigy Ltd., Basle, Switzerland (cyt. za: MAK 1993).
- Suzuki H., Ninoseki T., Hayashi A., Hase Y., Matsui T., Naito M., Sugai S. (2018). Comparison of stabilities of nitrenium ions and in vitro and in vivo genotoxic potential, between four aniline derivatives. *Fundam. Toxicol. Sci.* 5, 21–32.
- Szymańska J., Frydrych B., Szymczak W. (2008). 4-Chloro-*o*-toluidyna i jej chlorowodorek. Wytyczne Szacowania Ryzyka Zdrowotnego dla Czynn timer Rakotwórczych 26, 5–26 [publication in Polish].
- Uebel F., Pletscher A. (1954). Etiology and prophylaxis of occupational tumors in dye workers. *Schweitz Med. Wochenschr.* 84, 917–920 (cyt. za: IARC 2010; Stasik 2003).
- Weisburger E.K., Russfield A.B., Homburger F., Weisburger J.H., Boger E., Van Dongen C.G., Chu K.C. (1978). Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2, 325–356 (cyt. za: MAK 1993).
- Williams G.M., Mori H., McQueen C.A. (1989). Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals. *Mutat. Res.* 221, 263–286.
- Zimmer D., Mazurek J., Petzold G., Bhuyan B.K. (1980). Bacterial mutagenicity and mammalian cell DNA damage by several substituted anilines. *Mutat. Res.* 77(4), 317–326.

ZAKRES BADAŃ WSTĘPNYCH I OKRESOWYCH, NARZĄDY (UKŁADY) KRYTYCZNE, PRZECIWSKAZANIA LEKARSKIE DO ZATRUDNIENIA W NARAŻENIU NA 4-CHLORO-2-TOLILOAMINĘ I JEJ CHLOROWODOREK

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 skórę i pęcherz moczowy, w zależności od wskazań badanie dermatologiczne.

Badania pomocnicze: badanie ogólne moczu, morfologia z rozmazem, AST, ALT, spirometria.

Zakres badania okresowego

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na skórę i pęcherz moczowy, w zależności od wskazań badanie dermatologiczne,

Badania pomocnicze: badanie ogólne moczu, morfologia z rozmazem, AST, ALT, spirometria, w zależności od wskazań badanie poziomu methemoglobiny (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 do prawidłowej oceny stanu zdrowia pracownika lub osoby przyjmowanej do pracy.

Zakres ostatniego badania okresowego przed zakończeniem aktywności zawodowej

Ogólne badanie lekarskie ze zwróceniem uwagi na skórę i pęcherz moczowy, w zależności od wskazań badanie dermatologiczne.

Badania pomocnicze: badanie ogólne moczu, morfologia z rozmazem, AST, ALT, spirometria, w zależności od wskazań badanie poziomu methemoglobiny (MetHb).

Narządy (układy) krytyczne

Narządami krytycznymi podczas pracy w narażeniu na 4-chloro-2-toliloaminę i jej chlorowodorek są pęcherz moczowy i wątroba.

Przeciwwskazania lekarskie do zatrudnienia

Przeciwwskazaniami lekarskimi do zatrudnienia w narażeniu na 4-chloro-2-toliloaminę i jej chlorowodorek są:

- methemoglobinemie,
- nawracające stany zapalne skóry,
- przewlekłe zapalenie pęcherza moczowego,
- nowotwory pęcherza moczowego w wywiadzie,
- ciąża.

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 działanie rakotwórcze na człowieka (Carc. 1B) do pracy w narażeniu na 4-chloro-2-toliloaminę i jej chlorowodorek nie wolno zatrudniać pracowników młodocianych, kobiet w ciąży lub karmiących piersią.

Wskazane informowanie pracowników o potencjalnym działaniu rakotwórczym związku i zwiększonym ryzyku nowotworów pęcherza moczowego.