

Słowa kluczowe: fotodegradacja, chlorpromazyna, SOS Chromotest, UMU test

Agata SKRZYPCZAK*, Anita BONISŁAWSKA*, Joanna KOBYLİŃSKA*,
Izabela KOSZYK*, Józef SAWICKI*

WPLYW PROMIENIOWANIA UV NA GENOTOKSYCZNOŚĆ CHLORPROMAZYNY OCENIANĄ W TEŚCIE SOS CHROMOTEST I UMU TEST

Celem badań była ocena genotoksyczności chlorpromazyny, leku neuroleptycznego z grupy fenotiazyn, i produktów jej fotodegradacji. Fotoprodukty chlorpromazyny zostały otrzymane w wyniku naświetlania lampami UV emitującymi promieniowanie z zakresu UVB i UVC. Genotoksyczność oceniono przy użyciu dwóch krótkoterminowych testów bakteryjnych SOS Chromotest i UMU test. Testy przeprowadzone w standardowych warunkach bez dostępu światła nie wykazały genotoksyczności nienaświetlanych roztworów chlorpromazyny. Podobna sytuacja miała miejsce gdy naświetlano próbki oddzielnie, przed wykonaniem testów. Wprowadzona modyfikacja polegająca na naświetlaniu chlorpromazyny razem z organizmem testowym w czasie inkubacji, pozwoliła potwierdzić istnienie krótkożyjących genotoksycznych produktów fotorozkładu, powstających pod wpływem promieniowania z zakresu UVA.

1. WSTĘP

W ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania obecnością pozostałości środków farmaceutycznych w poszczególnych elementach środowiska. Związane jest to z masową produkcją preparatów farmaceutycznych, oddziaływaniem na środowisko zakładów przemysłu farmaceutycznego, zrzucaniem do środowiska przeterminowanych preparatów bez ich utylizacji zarówno z gospodarstw domowych (na małą skalę) jak i ze ściekami i odpadami szpitalnymi (na większą skalę) oraz wydalaniem leków i ich metabolitów przez ludzi i zwierzęta [1]. Po dostaniu się do środowiska, leki ulegają procesom eliminacji, które można podzielić na procesy biotyczne i abiotyczne, z których to te ostatnie odgrywają kluczową rolę [1]. Jednym z ważniejszych przekształceń abiotycznych jest fotodegradacja spowodowana promieniowaniem słonecznym.

* Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1; 02-097 Warszawa; agata.potentas@gmail.com

Podobny rozkład substancji leczniczej może zachodzić również w organizmie pacjenta, gdyż światło słoneczne penetruje przez skórę na odpowiednią głębokość, aby osiągnąć lek krążący w naczyniach krwionośnych lub jeszcze wcześniej, w postaci leku jeśli jego przechowywanie i opakowanie są nieodpowiednie.

Reakcje inicjowane promieniowaniem są bardzo złożone, jednocześnie może zachodzić wiele konkurencyjnych przemian. W zależności od warunków powstaje szereg różnorodnych produktów. Mogą tworzyć się krótkożyjące bardzo reaktywne półprodukty, które mają zdolność do reakcji z substratami biologicznymi. Produkty fotodegradacji mogą wywoływać wiele szkodliwych skutków zdrowotnych, spośród których najważniejsze są mutacje DNA w komórkach, a co za tym idzie możliwy rozwój nowotworów. Ksenobiotyki mogą powodować rozwój nowotworu na dwa sposoby: bezpośrednio oddziałując z DNA, są to pierwotne substancje rakotwórcze lub jako substancje prorakotwórcze, które swoje właściwości uzyskują po aktywacji metabolicznej.

Celem niniejszej pracy było zbadanie genotoksycznych właściwości chloropromazyny oraz fotoproduktów powstałych pod wpływem promieniowania UV, przy użyciu krótkoterminowych testów bakteryjnych SOS Chromotest i UMU test. Wg Gocke [2] po napromieniowaniu chloropromazyny powstają reaktywne, niestabilne cząstki: kationorodnik pod wpływem promieniowania o krótszej długości fali (270nm) oraz produkt odchlorowania rodnik promazyłowy przy zastosowaniu UVA (320–400nm). Rodnik promazyłowy może ulec przekształceniu w cząsteczkę promazyny, polimeryzacji (głównie di- i trymeryzacja) oraz, co najważniejsze, przyłączeniu do cząsteczek guanozyno-5'-monofosforanu (GMP). W konsekwencji jest w stanie łączyć się kowalencyjnie z kwasem dooksyrybonukleinowym. Dowiedzione jest iż fotoprodukty zdolne do działania uszkodzającego DNA są nietrwałe [2]. Dlatego też, aby możliwe było zastosowanie testów UMU test i SOS Chromotest do oceny tego działania potrzebna była modyfikacja metodyki testów umożliwiająca naświetlanie chloropromazyny jednocześnie z organizmem testowym. Fotodegradacja leku zachodziła bezpośrednio w obecności bakterii, co pozwalało na ich natychmiastowy kontakt z produktami rozpadu.

Zbadany został również wpływ kwasów humusowych oraz azotanu (V) potasu, naturalnych składników ekosystemów wodnych, jako substancji potencjalnie modyfikujących właściwości toksyczne i genotoksyczne chloropromazyny.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. KRÓTKOTERMINOWE TESTY BAKTERYJNE

Do oceny genotoksyczności chlorpromazyny oraz produktów jej fotodegradacji zastosowano dwa krótkoterminowe testy bakteryjne: SOS Chromotest oraz UMU test. Obydwa testy wykorzystują zdolność związku działającego genotoksycznie do wywołania u bakterii szeregu funkcji znanych pod nazwą systemu naprawy SOS. SOS Chromotest wykorzystuje genetycznie zmodyfikowany szczep *Escherichia coli* PQ37 [4], a test UMU test, który jest standardem ISO do badania wody i ścieków [3], szczep *Salmonella typhimurium* TA 1535. Indukcja systemu SOS u organizmów testowych, objawia się na zewnątrz wzmożoną aktywnością enzymu β -galaktozydazy, której poziom jest oznaczany jako odpowiedź testowa. Oznaczenia zostały wykonane w obecności postmitochondrialnej frakcji S9 homogenatu wątroby myszy, indukowanej Aroclorem 1254 (mieszanina polichlorowanych bifenyli), jak i bez dodatku frakcji S9. Oba testy przeprowadzono w warunkach standardowych [3,4] bez dostępu światła, dla roztworów chlorpromazyny nienaświetlanych oraz naświetlanych oddzielnie promieniowaniem UV przed wykonaniem oznaczenia. Modyfikacja metody polegała na naświetlaniu płytki testowej w czasie inkubacji bakterii z badanym związkiem. Pozwoliło to na ocenę właściwości genotoksycznych ewentualnych nietrwałych produktów rozpadu chlorpromazyny.

2.2. ANALIZA DANYCH

Aktywność genotoksyczna w teście SOS Chromotest jest wyrażana współczynnikiem indukcji $IF = R/R_0$, gdzie R oznacza specyficzną aktywność β -galaktozydazy w próbce badanej, a R_0 w próbce ślepej. Analogicznie w teście UMU test wylicza się współczynnik indukcji IR. Badana próbka uznawana jest za genotoksynę jeśli współczynnik indukcji jest wyższy od 1,5 oraz aktywność β -galaktozydazy jest istotnie wyższa w porównaniu z próbą kontrolną.

2.3. ROZTWORY BADANE I NAŚWIETLANIE PRÓBEK

W doświadczeniu bez naświetlania przebadano chlorpromazynę (firmy SIGMA) w zakresie stężeń 30 - 0,006 mg/l w teście UMU test oraz 10–1,25 mg/l w teście SOS Chromotest. W wersji z naświetlaniem oznaczany zakres stężeń to 10–1,25 mg/l w obydwu testach.

Zbadany został wpływ kwasów humusowych, których stężenie na płytce wynosiło 50 mg/l. Jest to maksymalna ilość kwasów humusowych spotykana w środowisku. Zbadano także wpływ azotanu (V) potasu. Stężenie KNO_3 na płytce wynosiło 100 mg/l.

Próby naświetlano wykorzystując promieniowanie UV ze wszystkich zakresów tj.: UVA, UVB i UVC.

3. WYNIKI

3.1. WERSJA STANDARDOWA BEZ DOSTĘPU ŚWIATŁA

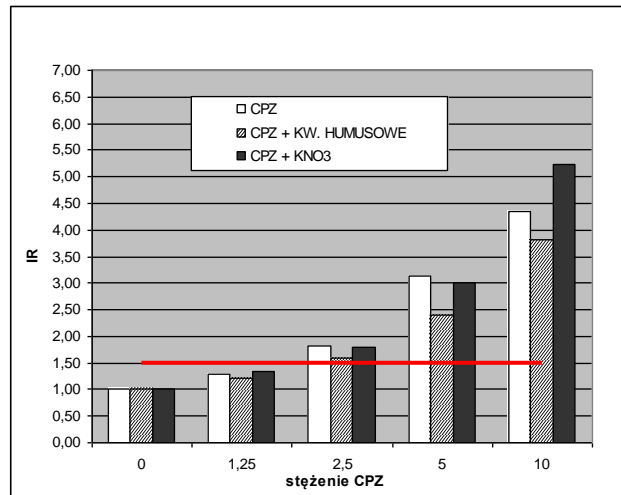
W testach przeprowadzanych w standardowych warunkach bez dostępu światła, w wersji zarówno z aktywacją metaboliczną jak i bez niej, roztwór chlorpromazyny w żadnym stężeniu nie wykazał właściwości genotoksycznych. Dodatek kwasów humusowych i azotanu potasu nie wpłynął w żaden sposób na wynik testów.

3.2. DOŚWIADCZENIE Z NAŚWIETLANIEM

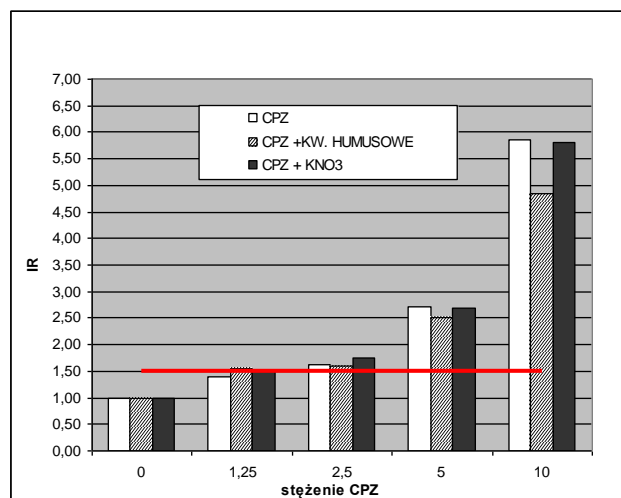
Seria doświadczeń polegająca na naświetlaniu roztworów chlorpromazyny przez 60 minut, oddzielnie przed dodaniem na płytkę, promieniowaniem UV o długości fali 254nm i 302nm, nie wykazała genotoksyczności leku i produktów jego fotorozkładu dla żadnego z badanych stężeń. Aby ocenić czy pod wpływem promieniowania UV powstają nietrwałe produkty zdolne uszkadzać materiał genetyczny zaproponowano modyfikację standardowej wersji testów. Na płytkę dodawano roztwór chlorpromazyny przechowywany w ciemności, po czym naświetlano ją wraz z organizmem testowym w czasie trwania inkubacji. W tej wersji testu stężenia chlorpromazyny wyższe od 10 mg/l były już zbyt toksyczne dla bakterii. Spowodowane to było sumowaniem się szkodliwego działania samego leku i promieniowania UV. Użyto promieniowania z zakresu UVA (360nm) i UVB (302nm). Promieniowanie z zakresu UVC (254nm) było zbyt toksyczne dla bakterii i prawie całkowicie hamowało ich wzrost.

3.2.1. NAŚWIETLANIE PROMIENIOWANIEM 360NM

Po naświetlaniu lampą 360nm genotoksyczne właściwości wykazano dla roztworów chlorpromazyny o pierwotnych stężeniach: 2,5; 5 oraz 10 mg/l w teście UMU test zarówno w oznaczeniach bez aktywacji jak i z nią. Wraz ze wzrostem stężenia wartość współczynnika indukcji także rosła, przekraczając progową wartość 1,5 przy wyżej wspomnianych stężeniach. Kwasy humusowe wpływały ochronnie na organizm testowy. Pod ich wpływem bowiem współczynnik indukcji (IR) zmniejszał się, co było szczególnie widoczne przy stężeniu 5 mg/l (bez aktywacji). Dodatek azotanu potasu nie wykazywał znaczącego wpływu na genotoksyczność chlorpromazyny po jej naświetlaniu.



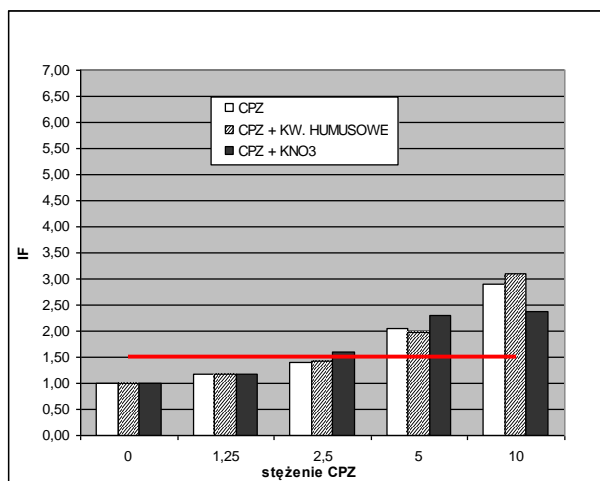
Rys. 1. Zależność współczynnik indukcji IR od stężenia czystej CPZ oraz CPZ z dodatkiem kwasów humusowych i azotanu (V) potasu. UMU test bez aktywacji, naświetlanie 360nm



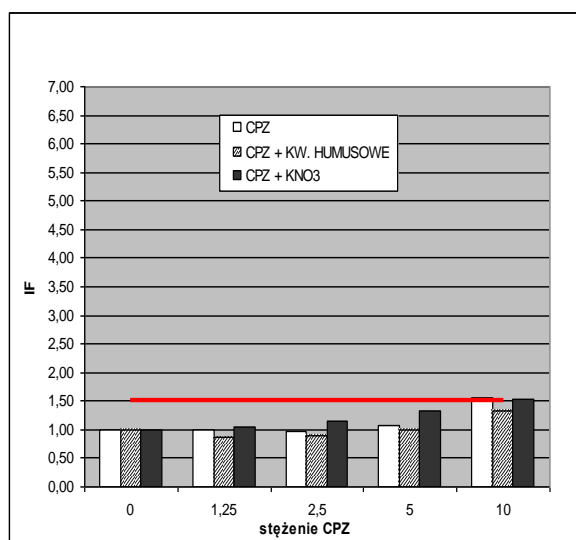
Rys. 2. Zależność współczynnik indukcji IR od stężenia czystej CPZ oraz CPZ z dodatkiem kwasów humusowych i azotanu (V) potasu. UMU test z aktywacją, naświetlanie 360nm

W teście SOS Chromotest po naświetlaniu lampą emitującą promieniowanie UV 360nm genotoksyczność wykazały roztwory gdzie pierwotne stężenie chlorpromazyny

wynosiło 5 i 10mg/l w oznaczeniu bez aktywacji metabolicznej. Dodatek kwasów humusowych nie wpłynął istotnie na otrzymane wyniki, podobnie jak dodatek roztworu azotanu potasu. W teście przeprowadzonym z dodatkiem frakcji S9 właściwości genotoksyczne wykazano tylko dla roztworu o najwyższym badanym stężeniu tj. 10mg/l.



Rys. 3. Zależność współczynnik indukcji IF od stężenia czystej CPZ oraz CPZ z dodatkiem kwasów humusowych i azotanu (V) potasu. SOS Chromotest bez aktywacji, naświetlanie 360nm



Rys. 4. Zależność współczynnik indukcji IF od stężenia czystej CPZ oraz CPZ z dodatkiem kwasów humusowych i azotanu (V) potasu. SOS Chromotest a aktywacją, naświetlanie 360nm

3.2.2. NAŚWIETLANIE PROMIENIOWANIEM 312NM

Po przeprowadzeniu obu testów z aktywacją metaboliczną jak i bez niej, oraz w obecności kwasów humusowych i azotanu (V) potasu, nie stwierdzono dla żadnego stężenia działania genotoksycznego chlorpromazyny i produktów fotodegradacji. Współczynnik indukcji w żadnym przypadku nie osiągnął wartości powyżej 1,5, co mogłoby wskazywać na ewentualne właściwości uszkodzające DNA. Wysokie wartości aktywności β -galaktozydazy, które uzyskano w teście nie były efektem działania CPZ, tylko użycie promieniowania nadfioletowego, które przy tej długości fali ($\lambda=312$ nm) posiada właściwości uszkodzające DNA. Dowodem na to była aktywność β -galaktozydazy w próbie negatywnej – $U_{Tsr}=6,82-6,95$, podczas gdy w teście przeprowadzonym w standardowych warunkach wartość ta była zawsze mniejsza niż 1.

4. WNIOSKI

Chlorpromazyna badana w warunkach standardowych, bez dostępu światła, nie wykazuje działania genotoksycznego, tak samo jak roztwory leku naświetlane osobno przed inkubacją z organizmem testowym. Pod wpływem promieniowania UVA o długości fali 360nm chlorpromazyna rozkłada się z wytworzeniem krótkożyjących produktów o właściwościach genotoksycznych. Zostało to potwierdzone przy użyciu krótkoterminowych testów bakteryjnych SOS Chromotest oraz Umu test. Metodyka testów została zmodyfikowana tak, aby naświetlanie chlorpromazyny miało miejsce razem z organizmem testowym na płycie, co umożliwiło zbadanie właściwości mało trwałych produktów rozpadu poprzez ich bezpośredni kontakt z bakteriami. Pod wpływem promieniowania UVB o długości fali 312nm powstają produkty nie wykazujące działania genotoksycznego w zastosowanych testach.

LITERATURA

- [1] Fent K., Weston A.A., Caminada D. 2006. *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. *Aquat. Toxicol.* 76: 122-159.
- [2] Gocke E. 1996. *Review of the genotoxic properties of chlorpromazine and related phenothiazines*. *Mutat. Res.* 366: 9-21
- [3] International Standard ISO/FDIS 13829; 1999 *Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test*.
- [4] Quillardet p., Hofnung M. 1985. *The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures*. *Mutat. Res.* 147: 65-78.

INFLUENCE OF UV IRRADIATION ON GENOTOXICITY OF CHLORPROMAZINE,
EVALUATED IN SOS CHROMOTEST AND UMU TEST

The goal of the investigation was to evaluate the influence of UV irradiation on genotoxic properties of chlorpromazine, psychotropic agent of phenothiazine group. Genotoxicity was assessed with two short-term bacterial tests SOS Chromotest and UMU test. Chlorpromazine preirradiated with UV didn't appear to be genotoxic under standard tests' condition. When performed in modified version where the compound and bacteria were irradiated together during the incubation, tests indicated genotoxic properties of chlorpromazine photoproducts obtained with UVA (360nm).