

Słowa kluczowe: chlorpromazyna, *Brachionus calyciflorus*, fotodegradacja

Łukasz SZCZĘSNY*, Małgorzata MŁYNARCZYK*, Józef SAWICKI*

OCENA TOKSYCZNOŚCI PRODUKTÓW FOTODEGRADACJI CHLORPROMAZYNY PRZY UŻYCIU TESTÓW OSTRYCH NA *BRACHIONUS CALYCIFLORUS* (WROTKI)

Jako modelowy farmaceutyk ulegający fotodegradacji zastosowano chlorpromazynę (CPZ). Naświetlano jej roztwory lampami UVC i UVB (254 i 302 nm). Oprócz roztworów CPZ naświetlano także próbki leku z dodatkiem kwasów humusowych, azotanu (V) potasu i wodorowęglanu sodu. Toksyczność próbek przebadano dwoma testami toksyczności ostrej na *B. calyciflorus*: Rotoxkit F oraz Rotox Rapid (1 – godzinny test pokarmowy). Pomiędzy powyższymi próbkami wynikły różnice toksyczności. W przypadku próbek z dodatkiem azotanów i węglanów, większą czułość wykazał test Rotoxkit F. Z kolei oba testy były tak samo czułe dla próbek chlorpromazyny, oraz roztworów zawierających kwasy humusowe, zarówno naświetlanych jak i nienaświetlanych. Ponadto przy wyższej długości fali (302 nm) wszystkie omawiane dodatki podnosiły toksyczność chlorpromazyny.

1. WSTĘP

Chlorpromazyna należy do leków neuroleptycznych (przeciwpowrotkowych) i jest stosowana od ponad 50 lat. Jej degradacja w środowisku odbywa się głównie w wodach powierzchniowych w procesie fotodegradacji, pod wpływem promieniowania UV z zakresu UVA (340–320nm) i UVB (320–280nm). Fotodegradacja może mieć charakter bezpośredni i pośredni. Bezpośrednia przebiega poprzez absorpcję światła słonecznego, natomiast w przebiegu pośredniej uczestniczą takie związki jak azotany, węglany czy kwasy humusowe. Związki te są odpowiedzialne za generowanie wysoce reaktywnych form tlenu przyczyniających się do rozkładu farmaceutyków.

Na podstawie badań przeprowadzonych przez Gocke [1], wiemy, że naświetlanie CPZ w zakresie bliskiego UV przy długości fali 270nm powoduje fotojonizację, podczas gdy promieniowanie o długości fali 320–400nm, skutkuje utworzeniem wolnego rodnika promazyloвого w procesie dehalogenacji. Przy udziale reaktywnego rodnika tlenowego może zachodzić reakcja utlenienia, do sulfotlenku.

* Warszawski Uniwersytet Medyczny, Zakład Badania Środowiska ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, lukas_szczesny@wp.pl

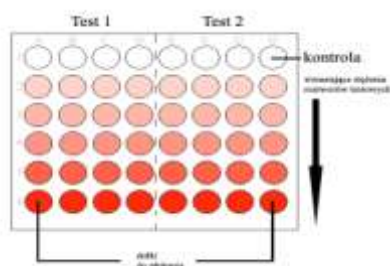
Powstający podczas naświetlania rodnik promazyłowy jest wysoce aktywny biologicznie.

Celem pracy była ocena toksyczności chlorpromazyny oraz mieszaniny po fotodegradacji z wykorzystaniem testów ostrych na *B. calyciflorus*. Zastosowano dwa testy: standardowy 24 – godzinny test (Rotokit F™, MicroBioTests®) [2] oparty na reakcji letalnej oraz szybki 1 – godzinny test zahamowania pobierania pokarmu opracowany w Zakładzie Badania Środowiska (RotoxRapid).

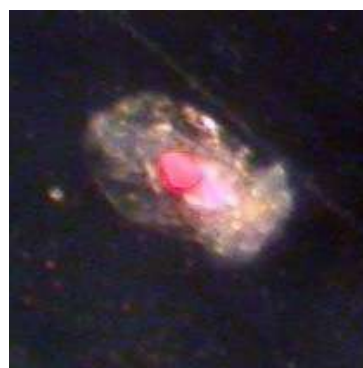
2. MATERIAŁY I METODY

METODYKA NAŚWIETLANIA CHLORPROMAZYNY. W badaniach naświetlano roztwory czystej chlorpromazyny (CPZ) – 60 mg/l oraz leku wraz z dodatkami: azotanem potasu (100 mg/l), wodorowęglanem sodu (100 mg/l) oraz kwasami humusowymi (50 mg/l). Zastosowano 2 lampy UV Bench Lamp (UVP Upland, USA) o długościach fali UVC – 254 nm i UVB – 302 nm. Próbkę naświetlano przez 60 minut. Po naświetlaniu wszystkie roztwory przenoszono do naczynek z ciemnego szkła i przechowywano w temperaturze pokojowej. Analizy wykonano w ciągu jednego dnia.

TESTY TOKSYCZNOŚCI. Wykonano testy toksyczności z wykorzystaniem słodkowodnego wrotka - *Brachionus calyciflorus* (*Rotifera*). Cysty pochodziły z pakietu Rotokit F™ MicroBioTests® (Belgia). Badania przeprowadzono w mikropłytkę z 48 dołkami, do których dodawano po 0,5 ml roztworu. Jedna płytkę pozwala na równoczesne przebadanie dwóch próbek (24 celki na jeden roztwór). Schemat płytki przedstawia rys. 1. Kontrolę dla każdego testu wykonywano w dwóch powtórzeniach, natomiast każde badane stężenie w trzech. Do każdej celki dodano po 10 organizmów testowych.



Rys. 1. Schemat płytki testowej 48 – dołkowej



Rys. 2. Organizm testowy – *B. calyciflorus*

TEST POKARMOWY (ROTOX RAPID). Uzupełnioną płytkę z dodanymi organizmami umieszczano w ciepłarni o temperaturze 25°C. Po 1-godzinnej inkubacji do wszystkich dołków testowych dodawano po 50 µl zawiesiny wodnej karminu o stężeniu 135 tys. cząstek/ml. Następnie płytkę odstawiano na 15 minut, po czym organizmy uśmiercano za pomocą roztworu Lugola.

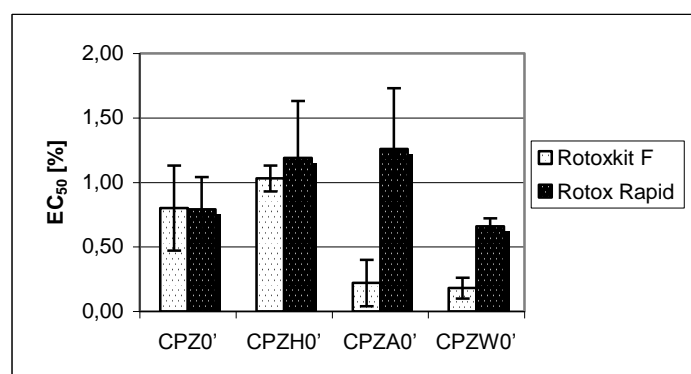
Efekt testowym w RotoxRapid jest zahamowanie pobierania pokarmu przez wrotki. W przypadku braku toksyczności próbki w żołądku *B. calyciflorus* pojawia się czerwony pokarm (rys. 2). Wyniki podawano w procentach efektu toksycznego (ilość nienajedzonych/ilość wszystkich wrotków*100%), dla każdego stężenia wyrażonego w procentach nierozcieńzonego roztworu. Następnie wyznaczono wartość EC₅₀ dla każdego przeprowadzonego testu.

TEST 24-GODZINNY (ROTOXKIT F) Z MODYFIKACJAMI. Czas trwania testu wynosił 24h. Płytkę napełnioną odpowiednimi roztworami i z dodanymi organizmami, inkubowano w ciepłarni o temperaturze 25 °C, w ciemności przez 24 godziny. Efektem testowym była śmierć organizmu. Po inkubacji zliczano liczbę martwych organizmów w każdym dołku. Dalsze obliczenia wykonano jak dla Rotox Rapid.

3. WYNIKI

Oznaczenia próbek: CPZ – chlorpromazyna; 0' – próbka nie poddawana naświetlaniu; 60' – czas naświetlania [min]; (254/302) – długość fali użytej do naświetlania [nm]; H – dodatek kw. humusowych; A – dodatek azotanów; W – dodatek węglanów

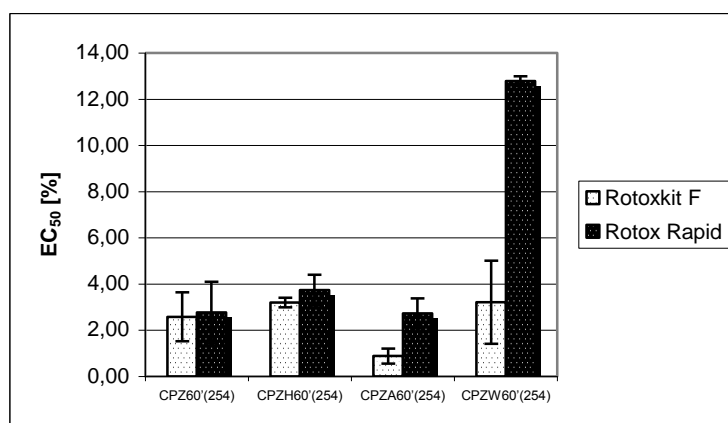
PRÓBKIE NIENAŚWIETLANE. W przypadku próbek z dodatkiem azotanów i węglanów Rotoxkit F był odpowiednio 5- i 3-krotnie czulszy niż Rotox Rapid. Dla próbek chlorpromazyny oraz CPZ z dodatkiem kwasów humusowych oba testy były tak samo wrażliwe.



Rys. 3. Toksyczność próbek nienaświetlanych w testach Rotoxkit F i Rotox Rapid

W teście Rotoxkit F zarówno dodatek azotanów jak i węglanów powodował 4-krotny wzrost toksyczności chlorpromazyny. W teście pokarmowym próbki z azotanami miały półtorakrotnie wyższą wartość EC_{50} niż próbki bez dodatków, lecz była to różnica nieistotna statystycznie. Węglany także nie wpływały na toksyczność CPZ w teście pokarmowym. W obu testach dodatek kwasów humusowych obniżał toksyczność CPZ, jednak nie były to różnice istotne statystycznie.

PRÓBKİ NAŚWIETLANE PRZY $\lambda = 254\text{NM}$: Dla próbki CPZW60'(254) w teście Rotoxkit F efekt toksyczny wystąpił w 4-krotnie niższym stężeniu niż w Rotox Rapid. Dla próbek zawierających azotany czułość testu letalnego była trzykrotnie wyższa niż pokarmowego. W przypadku próbek samej chlorpromazyny oraz CPZ z dodatkiem kwasów humusowych oba testy wykazały podobną wrażliwość.



Rys. 4. Toksyczność próbek naświetlanych przy $\lambda = 254\text{nm}$ w użytych testach Rotoxkit F i Rotox Rapid

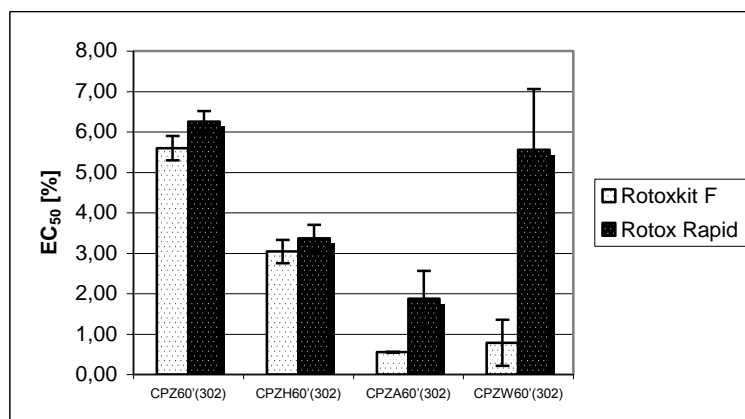
W teście 24-godzinnym azotany spowodowały 4-krotny wzrost toksyczności CPZ. Próbki z węglanami zaś okazały się tak samo toksyczne jak próbki z dodatkiem kwasów humusowych, i tak jak one nie wykazały istotnego wpływu na toksyczność badanego związku.

W teście pokarmowym dodatek azotanów oraz kwasów humusowych nie zmienił toksyczności chlorpromazyny, natomiast w przypadku węglanów spadek jej toksyczności był ponad 4-krotny.

PRÓBKİ NAŚWIETLANE PRZY $\lambda = 302\text{NM}$: Próbki z węglanami były aż 7-krotnie bardziej toksyczne w teście Rotoxkit F, a z azotanami 3-krotnie w porównaniu do testu pokarmowego, natomiast sama CPZ oraz roztwory zawierające kwasy humusowe, wykazały zbliżoną toksyczność w obu testach.

Wyniki otrzymane po naświetlaniu przy tej długości fali rozkładają się dla każdego z testów w podobnych proporcjach, do obu poprzednich porównań. Świadczy to

o utrzymującym się trendzie, na który nie ma wpływu zmiana długości fali przy naświetlaniu próbek.



Rys. 5. Toksyczność próbek naświetlanych przy $\lambda=302\text{nm}$ w użytych testach Rotoxkit F i Rotox Rapid

W teście Rotoxkit F w największym stopniu toksyczność podwyższały azotany (10-krotnie), następnie węglany (7-krotnie), zaś kwasy humusowe tylko 2-krotnie.

Dla testu Rotox Rapid największy wzrost toksyczności CPZ odnotowano dla azotanów (3-krotny) oraz kwasów humusowych (2-krotny). Węglany nie wpływały na toksyczność badanego leku.

4. WNIOSKI

Rotoxkit F był czulszy niż Rotox Rapid w przypadku próbek z dodatkiem azotanów i węglanów zarówno nienaświetlanych jak i naświetlanych (254 i 302nm).

Azotany, węglany oraz kwasy humusowe nasilają toksyczność CPZ w teście 24-godzinnym w przypadku naświetlania lampą o $\lambda=302\text{ nm}$. Natomiast w teście pokarmowym taki sam efekt wywierają azotany oraz kwasy humusowe.

Z pośród próbek naświetlanych przy $\lambda=254\text{ nm}$ jedynie azotany podnoszą toksyczność CPZ w teście Rotoxkit F, natomiast odwrotną tendencję obserwujemy w teście Rotox Rapid w przypadku próbek z dodatkiem węglanów.

Toksyczność CPZ wzrosła także w teście letalnym dla próbek nienaświetlanych z dodatkiem azotanów i węglanów.

LITERATURA

- [1] Gocke E. 1996. Review of the genotoxic properties of chlorpromazine and related phenothiazines. *Mutation Res.*, 366, 9-21.
- [2] Rotoxkit F™. Standardowa procedura Obsługi. *Metodyka*. 1999.

EVALUATION OF TOXICITY OF CHLORPROMAZINE PHOTODEGRADATION PRODUCTS
WITH ACUTE TOXICITY TESTS ON BRACHIONUS CALYCIFLORUS (ROTIFERS).

Human pharmaceuticals are widespread in the aquatic environment. One of the main way of elimination them from aquatic ecosystems is photodegradation. Chlorpromazine (CPZ) is photolabile under irradiation with UV light. The solutions of chlorpromazine (60 mg/l) were irradiated with UVC (254 nm) and UVB (302nm) light. CPZ was also exposed in solutions containing humic acids (50mg/l), potassium nitrate (100 mg/l) and sodium bicarbonate (100mg/l). Toxicity of samples was assessed with two acute tests with rotifer *Brachionus calyciflorus*: Rotoxkit F and Rotox Rapid (ingestion test). Between samples were observed some differences of toxicity. Rotoxkit F was more sensitive for samples of chlorpromazine with nitrates and bicarbonates, but both tests had the same sensitivity for samples of CPZ and for samples with addition of humic acids (irradiated as well as no irradiated). The toxicity of CPZ increased in both tests after irradiation of solutions with additions under UVB = 302 nm.