

MAGDALENA SZCZYPKA

WŁAŚCIWOŚCI GENOTOKSYCZNE ZWIĄZKÓW 5-NITROFURANOWYCH

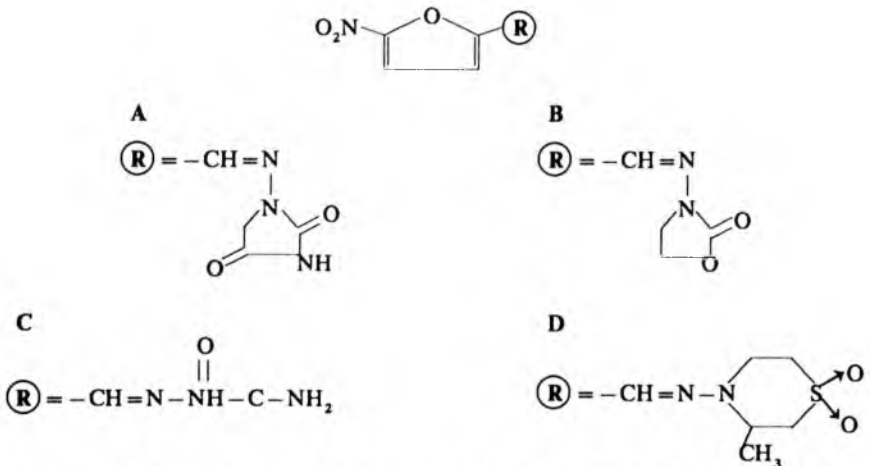
GENOTOXIC PROPERTIES OF 5-NITROFURAN COMPOUNDS

Z Zakładu Biochemii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. T. Laskowska-Klita

W pracy omówiono aktualny stan wiedzy dotyczący mechanizmów działania genotoksycznego 2-podstawionych pochodnych 5-nitrofuranu. Omówiono główne tory metaboliczne prowadzące do powstawania aktywnych metabolitów tych związków.

WŁAŚCIWOŚCI FARMAKOLOGICZNE I TOKSYCZNOŚĆ ZWIĄZKÓW 5-NITROFURANOWYCH

Od czasu, gdy w 1944 r *Dodd* i *Stilman* odkryli właściwości przeciwbakteryjne dwupodstawionych pochodnych 5-nitrofuranu (ryc. 1) zsyntetyzowano kilkadziesiąt takich pochodnych. Niektóre z nich (np. nitrofurazon, furazolidon, nitrofurantoina, nifuroksazyd, nifuroksym) znalazły szerokie zastosowanie w medycynie klinicznej i weterynaryjnej, a także jako dodatki konserwujące do żywności.



Ryc. 1. Struktura chemiczna pochodnych 5-nitrofuranowych: A-nitrofurantoina, B-furazolidon, C-nitrofurazon, D-nifurtimoks

Fig. 1. Chemical structure of 5-nitrofuran derivatives: A-nitrofurantoin, B-furazolidone, C-nitrofurazone, D-nifurtimox

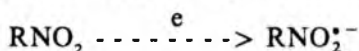
Działanie bakteriobójcze nitrofuranów obejmuje szerokie spektrum mikroorganizmów – paciorkowce, gronkowce, pałeczki Gram ujemne. Ponadto nitrofurany mają właściwości przeciwpierwotniakowe i grzybobójcze [4, 6]. Główne wskazania do terapii nitrofuranami to zakażenia dróg moczowych, przewodu pokarmowego oraz skóry. Ostatnio stwierdzono przydatność furazolidonu w leczeniu choroby wrzodowej żołądka [45]. Czynione są także próby zastosowania tego związku w leczeniu zapalenia płuc wywołanych *Pneumocystis carinii*, częstej infekcji chorych na AIDS [40].

Bakteriobójcze działanie związków nitrofuranowych wiąże się przede wszystkim z ich toksycznością względem DNA komórek bakteryjnych [20, 22], aczkolwiek mają w nim znaczenie również zaburzenia w przemianie kwasu pirogronowego i w syntezie ATP [19].

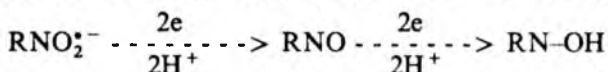
Stosowanie leków z grupy 5-nitrofuranów ograniczają ich liczne działania niepożądane. Niewątpliwie najbardziej niepokojące spośród nich to efekty mutagenne – wykazywane prawie przez wszystkie związki z tej grupy, i efekty kancerogenne, jakie dają niektóre spośród tych związków [7, 23, 42]. Inne działania niepożądane wywierane przez te związki to m.in. hepatotoksyczność [42], uszkodzenia płuc [3], uszkodzenia mięśnia sercowego [9].

METABOLIZM NITROFURANÓW

W piśmiennictwie istnieje generalna zgodność, że mechanizm działania biologicznego nitrofuranów związany jest z redukcją grupy 5-nitro [21, 24, 31]. W pierwszym etapie redukcji powstaje odpowiedni rodnik nitrofuranoanionowy:



Dalsza redukcja tego rodnika prowadzi do utworzenia pośrednich metabolitów nitrozofuranowych (RNO) i hydroksyloaminofuranowych (RNH-OH):



Pochodne hydroksyloaminofuranowe mogą ulegać z kolei redukcji do nieaktywnych pochodnych aminowych (RNH₂) lub też tworzyć w wyniku rozerwania pierścienia furanowego odpowiednie pochodne nitrylowe [10, 21, 23].

Rodniki nitrofuranoanionowy, oraz pochodne nitrozofuranowe i hydroksyloaminowe nitrofuranów są wysoce reaktywne i mogą kowalencyjnie łączyć się z makromolekułami komórkowymi [35, 37].

Przemiany redukcyjne nitrofuranów katalizowane są w komórkach bakteryjnych przez nitroreduktazy: typu I – nie wrażliwą na tlen i typu II hamowaną przez tlen [22]. W komórkach organizmów wyższych podobne przemiany katalizują przede wszystkim mikrosomalna reduktaza NADPH – cyt P 450, a także cytozolowa oksydaza ksantynowa i cytozolowa oksydaza aldehydowa [38, 41]. Redukcja związków nitrofuranowych może także następować pod wpływem katecholoamin [31].

W warunkach tlenowych rodnik nitrofuranoanionowy może ulegać jeszcze innej przemianie – utlenieniu do macierzystego związku z jednoczesnym utworzeniem anionu ponadtlenkowego (O₂⁻) [21]. W obecności dysmutazy ponadtlenkowej dochodzi

Spornym jest czy nitrofurany mogą tworzyć wiązania poprzeczne (cross-links) między niciami podwójnego DNA. *Chatterjee* i *Gosh* [8] obserwowali pod wpływem furazolidonu wzrost frakcji DNA łatwo denaturującego w komórkach *Vibrio cholerae*, co wytłumaczyli powstawaniem wiązań poprzecznych. Podobnych efektów nie obserwowano w DNA *E. coli* [23]. Te międzygatunkowe różnice w tworzeniu wiązań poprzecznych można wg *McCalla* [23] wytłumaczyć dużo większą wydajnością systemów reperacji DNA w *E. coli* nie pozwalającą na akumulację wiązań poprzecznych, w stopniu dającym się zaobserwować.

W badaniach genotoksyczności, wykonywanych na komórkach bakteryjnych, aby lepiej odnieść uzyskane wyniki do sytuacji w komórkach organizmów wyższych, do układu doświadczalnego dodaje się często frakcji S9 (najczęściej stosuje się supernatant 9000 g z wątroby szczurów, indukowanych preparatem Aroclor 1254). Wzbożać się w ten sposób system testowy o nieobecne w komórkach bakteryjnych enzymy mikrosomalne i cytozolowe, pochodzenia eukariotycznego, odpowiedzialne za metabolizm pośredni szeregu substancji endogennych jak i wielu ksenobiotyków. Dodatek frakcji S9 w różnym stopniu niwelował efekt genotoksyczny większości spośród badanych nitrofuranów [2, 13, 32].

Wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania zewnętrznego eukariotycznego układu metabolizującego, na efekty mutagenne nitrofuranów w komórkach bakteryjnych, jest dość trudne, ze względu na fakt, iż same komórki bakteryjne posiadają bardzo aktywne nitroreduktazy metabolizujące te związki [23]. W przypadku furazolidonu wyizolowano szereg końcowych produktów powstających w obecności mikrosomów z wątroby szczura i okazały się one niemutagenne w teście *Amesa* (szczep TA 100) [1, 39]. Ponadto po dodaniu furazolidonu do mieszaniny zawierającej mikrosomy wątroby oraz DNA obserwowano, że związek ten łączy się preferencyjnie z białkami mikrosomów, a nie z DNA [39]. Wydaje się więc, że frakcja S9 z wątroby szczura może obniżać efekt genotoksyczny furazolidonu w dwojaki sposób: poprzez reakcje detoksykujące, prowadzące do niegenotoksycznych metabolitów oraz poprzez obniżanie efektywnego stężenia nitrofuranu wynikające z jego absorbancji na białku.

UDZIAŁ WOLNYCH RODNIKÓW TLENOWYCH W GENOTOKSYCZNOŚCI ZWIĄZKÓW NITROFURANOWYCH

Rozważając możliwe mechanizmy działania genotoksycznego nitrofuranów, wydaje się, że pewną rolę mogą odgrywać również wolne rodniki tlenowe, uwalniające się w wyżej opisanych przemianach rodnika nitrofuranoanionowego. Powstanie takiej hipotezy uzasadniają wyniki badań ostatnich lat, świadczące o powodowaniu przez wolne rodniki tlenowe uszkodzeń w DNA [16, 18] oraz efektu mutagennego w testach bakteryjnych [17]. Zagadnienie udziału wolnych rodników w genotoksyczności związków nitrofuranowych nie zostało dotychczas w pełni wyjaśnione. W doświadczeniach własnych nitrofurazon i furazolidon wywoływały spadek (aczkolwiek niewielkiego stopnia) indukcji systemu SOS w *E. coli* PQ 37 (SOS-chromotest) i aktywności mutagennej w *S. typhimurium* TA 97 test *Amesa* w obecności klasycznych przeciwutleniaczy takich jak kwas askorbinowy i selen (w postaci seleninu sodowego) [12]. Zjawisko to może świadczyć o pewnym udziale aktywnych form tlenu w efekcie genotoksycznego nitrofurazonu i furazolidonu.

W komórkach bakteryjnych istnieje zorganizowany system obronny przeciwko wolnym rodnikom tlenowym – regulon OxyR. Indukcja tego regulonu, prowadząca do zwiększonej syntezy enzymów przeciwutleniających takich jak katalazy, reduktaza glutationowa, a także reduktazy nadtlenków alkilowych. Choć produkty genów pozostających pod kontrolą tego systemu zasadniczo nie należą do enzymów naprawczych DNA, to jednak odgrywają one ważną rolę w zapobieganiu oksydacyjnym uszkodzeniom DNA, poprzez obniżanie stężenia genotoksycznych aktywnych form tlenu [15]. W doświadczeniach własnych porównano efekt genotoksyczny badanych nitrofuranów (mierzony jako indukcja systemu SOS) w szczepie z nieczynnym regulonem OxyR – *E. coli* OG 100 (charakteryzującym się delecją genu regulatorowego systemu *OxyR*) i w szczepie referencyjnym *E. coli* OG 10 *OxyR*⁺. Nitrofurazon i furazolidon wykazywały zbliżoną toksyczność wobec obu szczepów testowych. Niemniej jednak w całym zakresie stosowanych stężeń oba te związki okazały się być silniejszymi induktorami systemu SOS w szczepach OG 100 niż w szczepie OG 10. Można więc sądzić, że sprawne działanie regulonu OxyR ma znaczenie w obronie DNA komórek bakteryjnych przed genotoksycznym działaniem nitrofuranów. Sugeruje to pewien udział wolnych rodników tlenowych w genotoksyczności tych związków [36].

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej informacje na temat mutagennych właściwości nitrofuranów uzyskano głównie na podstawie doświadczeń wykonywanych w układach bakteryjnych. Aktywność nitroreduktaz bakteryjnych, odpowiedzialnych za aktywację związków nitrofuranowych do czynnych metabolitów, jest znacznie wyższa, niż enzymów katalizujących analogiczne przemiany w komórkach organizmów wyższych. Stąd też wielu autorów wyrażało pogląd, że w przypadku związków nitrofuranowych, silny efekt genotoksyczny obserwowany w testach bakteryjnych jest wyolbrzymiony w stosunku do organizmów eukariotycznych [23]. Niemniej jednak wyniki nowszych badań coraz liczniej wskazują na możliwość wywierania przez te związki efektu genotoksycznego także w komórkach organizmów wyższych [13, 25]. Dla licznych związków z grupy nitrofuranów wykazano również właściwości kancerogenne [42, 44]. Dlatego też w większości krajów wysokorozwiniętych podjęto działania legislacyjne, zmierzające do zaprzestania używania tych związków, także w medycynie weterynaryjnej i jako dodatków do żywności.

M. Szczyпка

GENOTOXIC PROPERTIES OF 5-NITROFURAN COMPOUNDS

Summary

5-nitrofurans are a large group of nitrocompounds and worldwide as human and veterinary drugs, food additives or preservatives. However, many adverse effects of these compounds and among mutagenic as well as carcinogenic activities create doubts about safety of their use.

Present paper deals with various mechanisms of genotoxic action of 5-nitrofurans. Main metabolic pathways leading to the formation of their active metabolites are discussed.

PIŚMIENICTWO

1. *Abraham R.T., Knapp J.E., Minnigh M.B., Wang L.K., Zemaitis M.A., Alvin J.D.*: Reductive metabolism of furazolidone by *Escherichia coli* and rat liver *in vitro*. *Drug Metab. Dispos.* 1984, 12, 732. – 2. *Alejandre-Duran E., Charamunt R.M., Sanz D., Vilaplana M.J., Molina P., Pueyo C.*: Study on the mutagenicity of nifurtimox and eight derivatives with the L-arabinose resistance test of *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 1980, 206, 193. – 3. *Boyd M.R.*: Biochemical mechanisms in pulmonary toxicity of furan derivatives. *Reviews Biochem. Toxicol.*, 1980, 2, 71. – 4. *Brander G.C., Pugh D.M., Byrater R.J.*: Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics, 1982, 4th Edition, Balleire Tindall, London. – 5. *Bryant D.W., Mc Calla D.R.*: Nitrofurans induced mutagenesis and error prone repair in *Escherichia coli*. *Chem. Biol. Interact.* 1980, 31, 151. – 6. *Chamberlain R.E.*, Chemotherapeutic properties of prominent nitrofurans, *J. Antimicrob. Chemother.*, 1976, 2, 325. – 7. *Cohen S.M.*: Toxicity and carcinogenicity of nitrofurans. W; *Bryan G.T.* (red) Nitrofurans: Chemistry, Metabolism, Mutagenesis and Carcinogenesis, Raven Press, New York, 1978, str 171. – 8. *Chatterjee S.N., Ghosh S.*: Mechanism of action of furazolidone inter-strand cross-linking in DNA and liquid holding recovery of *Vibrio cholerae* cells. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 1979, 16, 125. – 9. *Czarnecki C.M.*: Changes in myocardial ultrastructure during development of furazolidone-induced cardiomyopathy in turkeys. *J. Comp. Path.*, 1986, 96, 77.

10. *Debnath A.K., Hansch C., Kim K.H., Martin Y.C.*: Mechanistic interpretation of the genotoxicity of nitrofurans (antibacterial agents) using quantitative structure-activity relationships and comparative molecular fields analysis. *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 1007. – 11. *Ebringer L., Bencova M.*: Mutagenicity of nitrofurans in bacterial systems. *Folia Microbiol.*, 1980, 25, 388. – 12. *Gajewska J., Szczypka M., Tudek B., Szymczyk T.*: Studies on the effects of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone, *Mutation Res.*, 1990, 232, 191. – 13. *Gao N., Ni Y-C., Thornton-Manning J.R., Fu P.P., Heflich R.H.*: Mutagenicity of nitrofurantoin and furazolidone in Chinese hamster ovary cell strains. *Mutation Res.*, 1989, 225, 181. – 14. *Goodman D.R., Hakkinen P.J., Neurenzo J.H., Vore M.*: Mutagenic evaluation of nitrofurans derivatives in *Salmonella typhimurium* by the micronucleus test and by *in vivo* cytogenetics. *Mutation Res.*, 1977, 48, 295. – 15. *Farr S.B., Kogoma T.*: Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Microbiol. Rev.*, 1991, 55, 561. – 16. *Halliwel B., Aruoma O.J.*: DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Lett.*, 1991, 281, 9. – 17. *Imlay J.A., Linn S.*: Mutagenesis and stress responses in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.*, 1987, 169, 2967. – 18. *Joenje H.*: Genetic toxicology of oxygen. *Mutation Res.*, 1987, 219, 193. – 19. *Lu C., Mc Calla D.R.*: Action of some nitrofurans derivatives on glucose metabolism, ATP levels, and macromolecule synthesis in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, 1978, 24, 650.

20. *Lu C., Mc Calla D.R., Bryant D.W.*: Action of nitrofurans on *E. coli*. *Mutation and induction and repair of daughter strand gaps in DNA*, *Mutation Res.*, 1979, 67, 133. – 21. *Mason R.P., Joseph P.D.*: Free radicals mechanisms of nitroreductase. w: *Rickert D.* (red.) Toxicity of Nitroaromatic Compounds, Hemisphere, New York, 1985, str 121-140. – 22. *Mc Calla D.R., Reuvers A., Kaiser C.*: Mode of action of nitrofurazone. *J. Bacteriol.*, 1970, 104, 1126. – 23. *Mc Calla D.R.*: Mutagenicity of nitrofurans derivatives. Review, *Environ. Mutagenesis*, 1983, 5, 745. – 24. *Moreno S.N., Docampo R.*: Mechanism of toxicity of nitro compounds used in chemotherapy of trichomonias. *Environ. Hlth. Perspect.*, 1985, 64, 199. – 25. *Moraga A.A., Graf U.*: Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis*, 1989, 2, 105. – 26. *Ni Y-C., Heflich R.H., Kadlubar F.F., Fu P.P.*: Mutagenicity of nitrofurans in *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 98NT, TA 98/1,8 DNP6, *Mutation Res.*, 1987, 192, 15. – 27. *Obaseiki-Ebor E.E., Akere J.O.*: Nitrofurans mutagenicity: induction of frameshift mutations, *Mutation Res.*, 1986, 175, 149. – 28. *Pal A.K., Chatterjee S.N.*: Induction of lambda prophage by furazolidone, *Mutation Res.*, 1985, 156, 69. – 29. *Pal A.K., Rahman Md.S., Chatterjee S.N.*: On the induction of *umugene* expression in *Salmonella typhimurium* strain TA 1535/pSK 1002 by some nitrofurans, *Mutation Res.*, 1992, 280, 51.

30. Pryor W.: Oxy-radicals and related species, *Annu. Rev. Physiol.*, 1986, 48, 657.
- 31. Ramakrishna Rao D.N., Mason R.P.: Generation of nitro radical anions of some 5-nitrofurans, 2- and 5-nitroimidazoles by norepinephrine, dopamine and serotonin, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 11731.
- 32. Skeggs H.R., Berglund R.M., Vandentleuvel W.J.A., Mrozik H., Wislocki P.G., Wolf F.J.: Effect of liver enzymes on the mutagenicity of nitroheterocyclic compounds: activation of 3a, 4, 5, 6, 7, 7a-hexahydro-3-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-1, 2-benzisoxazole and deactivation of nitrofurans and nitroimidazoles in the Ames test, *Mutation Res.*, 1984, 136, 1.
- 33. Streeter A.J., Hoener B-A.: Evidence for the involvement of a nitrenium ion the covalent binding of nitrofurazone to DNA. *Pharmacol. Res.*, 1984, 5, 434.
- 34. Stricker B.H., Roeland Blok A.P., Claas F.H.J., Van Parys G.E., Desmet V.J.: Hepatic injury associated with the use of nitrofurans. A clinicopathological study of 52 reported cases. *Hepatology*, 1988, 8, 599.
- 35. Swaminathan S., Lower Jr G.M., Bryan G.T.: Nitroreductase-mediated metabolic activation of 2-amino-4(5-nitro-2-furyl) thiazole and binding to nucleic and proteins, *Cancer Res.*, 1982, 42, 4479.
- 36. Szczypka M., Gajewska J., Laskowska-Klita T.: Screening for the involvement of free radicals in genotoxicity of nitrofurans with bacterial short-term tests, *Abstracts of Polish-Austrian Conference on Free Radicals in Biology and Medicine*, Zwierzyniec, 1993, 43.
- 37. Tatsumi K., Kitamura S., Yoshimura H.: Binding of nitrofurans derivatives to nucleic acids and protein, *Chem. Pharm. Bull.*, 1977, 25, 2948.
- 38. Tatsumi K., Yamada H., Yoshimura H., Kawazoe Y.: Metabolism of furazolidone by milk xanthine oxidase and rat liver 9000 g supernatant. Formation of a unique nitrofurans metabolite and an nitrofurans derivative, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981, 208, 167.
- 39. Vroomen L.H.M., van Omnen B., van Bladeren P.J.: Quantitative studies of the metabolism of furazolidone by rat liver microsomes, *Toxicol. in vitro*, 1987, 1, 97.
40. Walzer P.B., Kurtis Kim C., Foy J., Zhang J.: Furazolidone and Nitrofurantoin in the treatment of experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1991, 35, 158.
- 41. Wang C.Y., Behrens B.C., Ichikawa M., Bryan G.T.: Nitroreduction of 5-nitrofurans derivatives by rat liver xanthine oxidase and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate – cytochrome c reductase, *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 3395.
- 42. Wang C.Y., Croft W.A., Bryan G.T.: Tumor production in germ-free rats fed 5-nitrofurans, *Cancer Lett.*, 1984, 21, 303.
- 43. Wentzell B., Mc Calla D.R.: Formation and excision of nitrofurans-DNA adducts in *Escherichia coli*, *Chem. Biol. Interact.*, 1980, 31, 133.
- 44. Yahagi T., Nagao M., Hara K., Matsushima T., Sugimura T., Bryan G.T.: Relationships between the carcinogenic and mutagenic or DNA-modifying effects of nitrofurans derivatives, including 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide, a food additive, *Cancer Res.*, 1974, 34, 2266.
- 45. Zheng Z.T., Wang Y.B.: Treatment of peptic ulcer disease with furazolidone, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1992, 7, 513.

Dn. 1995.02.27

01-211 Warszawa, ul. Kasprzaka 17a