

HANNA CZECZOT, MAŁGORZATA KOBIERSKA-SZELIGA

OKREŚLENIE WPŁYWU NITROFURAZONU I FURAZOLIDONU  
NA INDUKCJĘ CYTOCHROMU P-450 W TEŚCIE- CYPIA\*

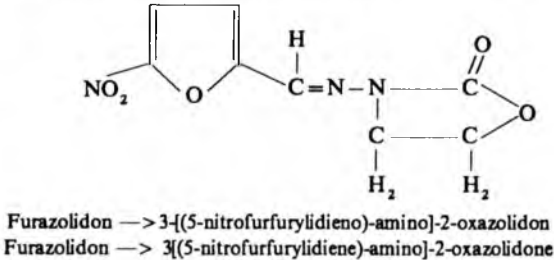
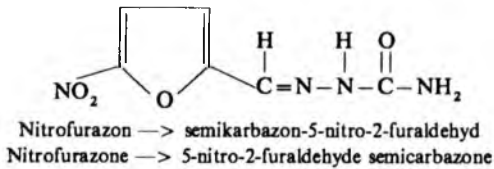
THE EFFECT OF NITROFURAZONE AND FURAZOLIDONE ON THE INDUCTION  
OF CYTOCHROME P-450 STUDIED BY CYP1A-TEST

Z Katedry i Zakładu Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. T. Szymczyk-Wasiluk

*Praca przedstawia wyniki badań wpływu wybranych nitrofuranów: nitrofurazonu i furazolidonu na indukcję form molekularnych cytochromu P-450 w teście – Cyp1a.*

WSTĘP

Nitrofurazon (semikarbazon-5-nitro-2-furaldehyd) i furazolidon (N-5-nitro-2-furfurylidienio-3-amino-2-oxazolidon) są przeciwbakteryjnymi lekami stosowanymi w terapiach mieszanych infekcji bakteryjnych (głównie dróg moczowych i skóry).



Ryc. 1 Struktura chemiczna nitrofurazonu i furazolidonu  
Fig. 1. Chemical structures of nitrofurazone and furazolidone

Powszechnie są stosowane w leczeniu weterynaryjnym w postaci mieszanych preparatów. Obok cennego działania farmakologicznego związku te wywierają jednak

\* Praca wykonana w ramach realizacji tematu CPBR 05.08 „Badanie genotoksyczności wybranych leków weterynaryjnych”.

szereg efektów niepożądanych (działanie nefrotoksyczne, hepatotoksyczne). Odnotowano również dla obu związków efekty mutagenne i kancerogenne [6]. Mimo, że działanie genotoksyczne nitrofurazonu i furazolidonu jak również innych 5-nitrofuranów jest dobrze udokumentowane [6] mechanizmy nadal pozostają niewyjaśnione. Przypuszcza się, że za efekt genotoksycznego działania tych związków odpowiedzialne są głównie ich metabolity powstające w trakcie przemian redukcyjnych grupy 5-nitro: rodnik nitrofuranoanionowy, nitrozo- i hydroksyloaminopochodne furanowe [6]. Dodatkowo w wyniku autooksydacji rodnika nitrofuranoanionowego dochodzi do powstawania produktów niepełnej redukcji tlenu: nadtlenu wodoru, rodników nadtlenkowych i hydroksylowych, które również mogą powodować szereg uszkodzeń DNA. Badania przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie wykazały, że udział wolnych rodników tlenowych w genotoksyczności nitrofuranów jest niewielki [2]. Wydaje się, że zdecydowanie większe znaczenie w genotoksyczności tych związków (nitrofurazonu i furazolidonu) mają ich metabolity powstające niezależnie od warunków tlenowych: odpowiednie rodniki nitrozofuranowe i pochodne hydroksyloaminowe [2].

Wiadomo, że większość substancji chemicznych (leki, trucizny, używki, środki ochrony roślin, dodatki do żywności, zanieczyszczenia przemysłowe) jest chemicznie nieczynna, dopiero swoją aktywność biologiczną ujawnia w wyniku metabolicznej aktywacji w organizmie. Metaboliczna aktywacja prowadzi bowiem do przekształcenia związków w reaktywne metabolity silnie oddziaływujące z komórkowymi makrocząsteczkami (DNA, RNA, białka) [8]. Metaboliczna aktywacja związków chemicznych jest możliwa dzięki istnieniu w organizmie ssaków wielu grup enzymów, zwłaszcza systemu monooksygenaz o mieszanej funkcji, zależnych od cytochromu P-450. System monooksygenaz łatwo reaguje na zmianę aktywności w momencie pojawienia się odpowiedniego substratu [8].

Leki i inne ksenobiotyki mogą indukować w procesach biotransformacji syntezę białka enzymatycznego oraz różnych form molekularnych cytochromu P-450. Ze względu na rodzaj indukowanej formy cytochromu P-450 przez związki chemiczne zastosowano ich podział między innymi na:

- induktory typu 3-metylocholantrenu (indukcja form molekularnych rodziny cytochromu P-4501A);
- induktory typu fenobarbitalu (indukcja form molekularnych rodziny cytochromu P-4502B);
- induktory typu 16  $\gamma$ -karbonyltryl pregnenolonu (indukcja form molekularnych rodziny cytochromu P-4503A) [8].

Przedstawione badania prowadzone testem CYPIA [8] mają na celu określenie przynależności nitrofurazonu i furazolidonu do jednego z dwóch głównych typów induktorów systemu monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 (typu fenobarbitalu lub 3-metylocholantrenu).

Test Cypia obejmuje:

I - Preparatykę posmitochondrialnego supernatantu 9000  $\times$  g (frakcji S9) z wątroby zwierząt otrzymujących nitrofurazon, furazolidon, fenobarbital, 3-metylocholantren i olej;

II - Test na mutagenność bromku etydy (EtBr) w szczepie *S. typhimurium* TA98 i cyklofosfamidu (CPA) w szczepie TA 100 zgodnie z metodyką (Lesca i wsp. 1984).

## TEST NA MUTAGENNOŚĆ

INDUKCJA CYTOCHROMU P-4501A TYPY 3-METYLOCHOLANTRENU <i>Salmonella typhimurium</i> TA98	INDUKCJA CYTOCHROMU P-4502B TYPY FENOBARBITALU <i>Salmonella typhimurium</i> TA100
PROMUTAGEN	
Bromek etydyny (BrEt) 0.5, 1, 2, 5 µg/płytkę	Cyklofosfamid (CFA) 200, 500, 800 µg/płytkę
S-9 mix 500 µl/płytkę	
100 µl S-9 + 400 µl mix	100 µl S-9 + 400 µl mix
INKUBACJA: 37°C PRZEZ 48 GODZIN	

Ocena ilości rewertantów *his*<sup>+</sup> w układach doświadczalnych

Zasada tej metody jest oparta na szeroko rozpowszechnionej, klasycznej już dziś technice testu *Ames'a* [1,7].

Opiera się ona na obserwacji, że frakcja S-9 uzyskana z wątroby szczurów indukowanych związkami zwiększającymi aktywność cytochromu P-4501A (typu 3-metylocholantrenu), specyficznie katalizuje przemianę bromku etydyny do mutagennych metabolitów. Natomiast induktory typu fenobarbitalu zwiększające aktywność cytochromu P-4502B stymulują aktywność cyklofosfamidu do związków mutagennych przez frakcję S9 z wątroby szczurów indukowanych tymi związkami.

Pośrednie (mutagenne) metabolity obu promutagenów, powstające w wyniku działania monoooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 obecnych w frakcji S9 z wątroby zaindukowanej nitrofurazonem (nitrofurazonem lub furazolidonem) wg. typu fenobarbitalu lub typu 3-metylocholantrenu wywołują rewersję *his*<sup>+</sup> w testowych szczepach *S. typhimurium* TA98 i TA100.

## MATERIAŁ I METODY

Związki chemiczne. Nitrofurazon i furazolidon – firmy Polfa; bromek etydyny (BrEt) i cyklofosfamid (CFA) – firmy Sigma; 2-nitrofluoren i tlenek 4-nitrochinoliny – firmy Serva; Wszystkie pozostałe odczynniki produkcji polskiej – P.O.CH-Gliwice.

Szczepy bakteryjne. Szczepy *S. typhimurium* TA98 (*hisD3052 chl (bio, uvrB, gal) 100B-rfa1004* pkM101) i TA100 (*hisG46 chl (bio, uvrB, gal) 1005 rfa-1001* pkM101) wykorzystane w teście Cypia otrzymano od Prof. B.N. *Ames'a* (Biochemistry Department, University of California, Berkley, CA, U.S.A.). Fenotypy użytych szczepów w każdym doświadczeniu były sprawdzane zgodnie z procedurą opisaną przez *Amesa i wsp.* [1].

Zwierzęta: Samce szczurów rasy *Wistar* o masie ciała od 90-100 g pochodziły ze zwierzętarni Akademii Medycznej w Warszawie. W czasie doświadczenia zwierzęta były przetrzymywane w plastikowych klatkach w jednakowych warunkach z zachowaniem cyklu dobowego (dzień/noc). Wszystkie otrzymywały paszę standardową firmy Bacutil i wodę *ad libitum*. Szczury dzielono na grupy doświadczalne, w każdej po 5 sztuk. Badania były prowadzone równolegle we wszystkich grupach doświadczalnych szczurów. Wykonano 3 oddzielne/równoległe doświadczenia.

Sposób podawania zwierzętom badanych związków. Samce rasy *Wistar* otrzymywały badane związki: nitrofurazon i furazolidon rozpuszczone w oleju jadalnym:

I – jednorazowo drogą dootrzewnowej iniekcji w dawce wynoszącej 80 mg/kg masy ciała; zwierzęta dekapitowano po 48 godzinach;

II – dootrzewnowo przez 3 kolejne dni w odstępach dobowych dawkę wynoszącą 80 mg/kg masy ciała (łączna dawka – 240 mg/kg masy ciała). Zwierzęta zabijano po 24 godzinach od ostatniego podania związków przez dyslokację rdzenia nerwowego.

Fenobarbital rozpuszczony w wodzie podawano szczurom w dawce 80 mg/kg masy ciała przez 3 kolejne dni. Zwierzęta dekapitowano po 24 godzinach od ostatniego podania.

3-metylocholanren rozpuszczony w oleju podawano szczurom jednorazowo w dawce 80 mg/kg masy ciała drogą dootrzewnowej iniekcji na 48 godzin przed dekapitacją.

Grupy kontrolne zwierząt otrzymywały olej lub wodę.

Przygotowanie frakcji S9 z wątroby szczurów po podaniu nitrofurazonu, furazolidonu, 3-metylocholanrenu i fenobarbitalu.

Frakcję S9 i mieszaninę S9 mix używaną do aktywacji metabolicznej 2 standardowych promutagenów: bromku etydy w szczepie TA98 i cyklofosfamidu w szczepie TA100 *S. typhimurium* przygotowano zgodnie z metodą opisaną przez *Amesa* i wsp. [1, 7]. W każdej frakcji S9 oznaczano stężenie białka według metody *Lowry* i wsp. [5] i stężenie cytochromu P-450 określano metodą *Omura* i *Saito* [9]. Frakcję S9 przechowywano w temperaturze -80°C.

Badanie mutagenności bromku etydy (BrEt) i cyklofosfamidu (CFA)

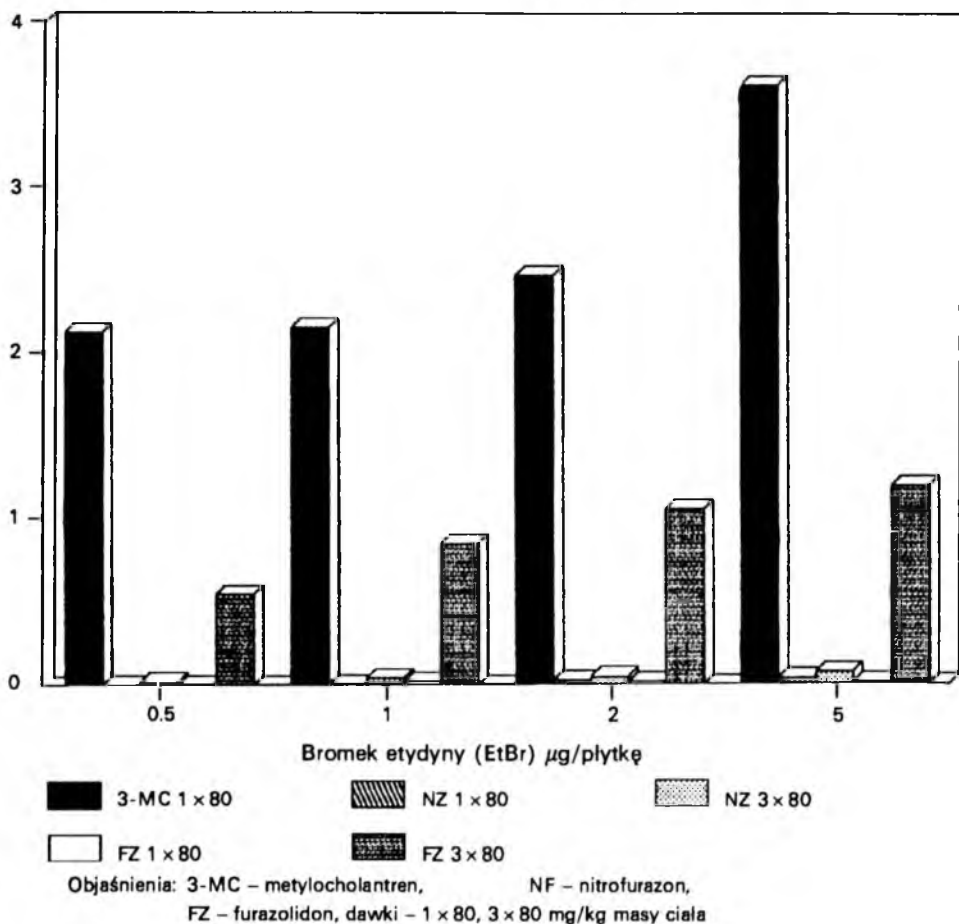
Dla wykazania indukcji cytochromu P-450A (typu 3-metylocholanrenu) i cytochromu P-450B (typu fenobarbitalu) wykonano badanie mutagenności bromku etydy (BrEt) i cyklofosfamidu (CFA) zgodnie z metodą testu *Amesa* [1] dodając 100  $\mu$ l S9 na płytkę. Dodatkowo dla każdego układu doświadczalnego wykonano kontrole pozytywne w celu określenia zdolności szczepów testowych *S. typhimurium* do rewersji prototrofów histydynowych *his* stosując dla szczepu TA98 2-nitrofluoren w stężeniu 2  $\mu$ g/płytkę oraz dla szczepu TA100 tenek-4-nitro-chinoliny w stężeniu 4  $\mu$ g/płytkę. Obserwowana ilość rewertantów *his*<sup>+</sup> w szczepach testowych *S. typhimurium* w obecności w/w standardowych mutagenów była zgodna z danymi literaturowymi [1, 7]. Każdą frakcję S9 mix badano również bez substratu (BrEt lub CFA) w celu wykluczenia rewersji *his*<sup>+</sup> spowodowanej przez samą frakcję S9. Rewersje spontaniczne (bez S9 mix) były na poziomie 29  $\pm$  9 kolonii dla szczepu TA98 *S. typhimurium* oraz 164  $\pm$  33 kolonii dla szczepu TA100 *S. typhimurium*.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki badań przedstawiono w tabelach I, II i na rycinach 2, 3.

Stwierdzono, że nitrofurazon podawany szczurom jednorazowo oraz trzykrotnie w odstępach dobowych w dawce 80 mg/kg masy ciała nie indukuje form molekularnych cytochromu P-450A (typu 3-metylocholanrenu) (Tab. I, Ryc. 2). Natomiast furazolidon podany w łącznej dawce (3  $\times$  80 mg/kg masy ciała) indukuje ten typ cytochromu P-450 (Tab. I, Ryc. 2).

Według *Lesca* i wsp. [4] badanego związku nie zalicza się do induktorów cytochromu P-450A (typu 3-metylocholanrenu) jeśli liczba rewertantów *his*<sup>+</sup> jest poniżej 40-60 kolonii/ $\mu$ g bromku etydy (BrEt). Do silnych induktorów tych form cytochromu P-450 są klasyfikowane związki indukujące od 600 do ponad 2000 rewertantów *his*<sup>+</sup>/ $\mu$ g bromku etydy (np. 3-metylocholanren, Aroclor).

Liczba rewertantów his<sup>+</sup> (w tysiącach)

Objaśnienia: 3-MC – metylocholantrén, NF – nitrofurazon,  
FZ – furazolidon, dawki – 1 × 80, 3 × 80 mg/kg masy ciała

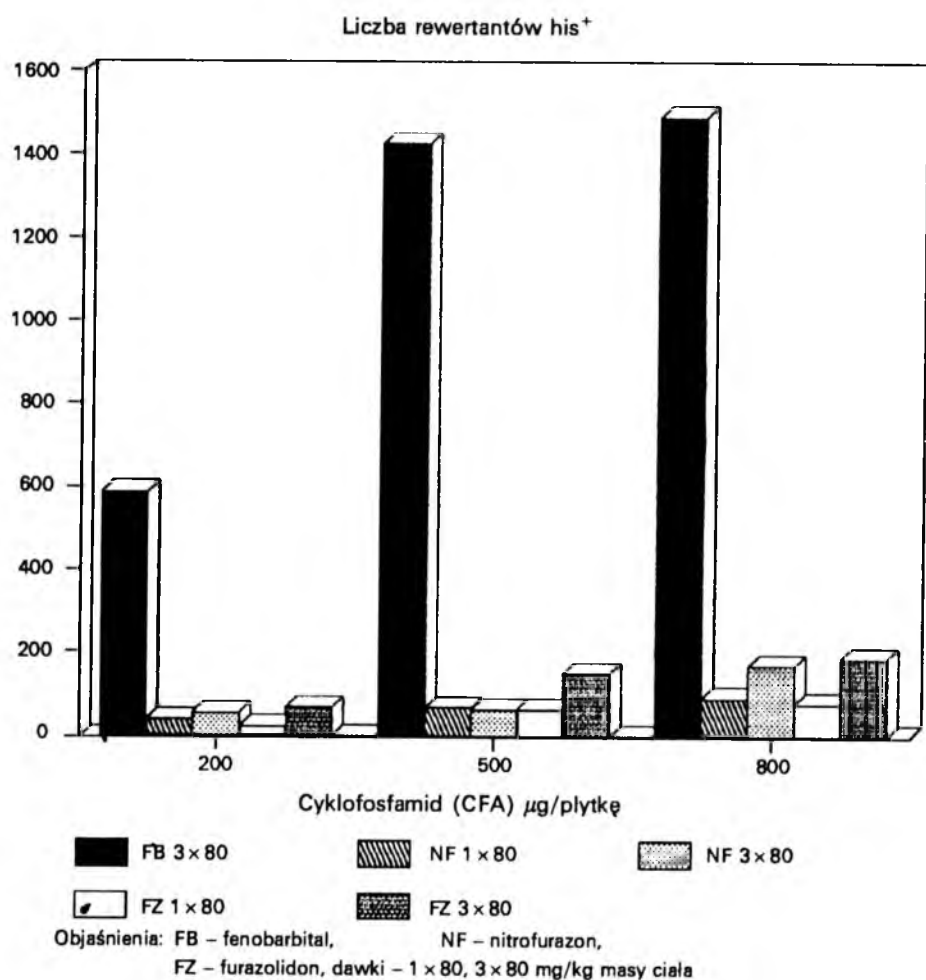
Ryc. 2 Mutagenność bromku etydyny (BrEt) w szczepie TA98 *S. typhimurium* w obecności frakcji S9 (100 µl) z wątroby szczurów po podaniu: 3-metylocholantrenu (3-MC-) – 80 mg/kg masy ciała; nitrofurazonu (NF) – 1 × 80 mg/kg masy ciała; nitrofurazonu (NF) – 3 × 80 mg/kg masy ciała; furazolidonu (FZ) – 1 × 80 mg/kg masy ciała; furazolidonu (FZ) – 3 × 80 mg/kg masy ciała.

Wyniki są wartością średnią z 3 oddzielnie przeprowadzonych doświadczeń.

Fig. 2 Mutagenicity of ethidium bromide (EtBr) to *S. typhimurium* TA98 in the presence of S9 (100 µl): S9 was isolated from livers of rats treated with: 3-methylocholantréne (3-MC-) – 1 × 80 mg/kg body weight; nitrofurazone (NF) – 1 × 80 mg/kg body weight; nitrofurazone (NF) – 3 × 80 mg/kg body weight; furazolidone (FZ) – 1 × 80 mg/kg body weight; furazolidone (FZ) – 3 × 80 mg/kg body weight.

The results are expressed as mean values from 3 separate experiments.

Nitrofurazon i furazolidon w opisanych warunkach doświadczalnych zarówno w jednorazowej jak i wielokrotnej dawce nie indukują również systemu monooksygenaz zależnych od form molekularnych cytochromu P-450<sub>2B</sub> (Tab. II, Ryc. 3).



Ryc. 3 Mutagenność cyklofosfamid (CFA) w szczepie TA100 *S. typhimurium* w obecności frakcji S9 (100 µl) z wątroby szczurów po podaniu: fenobarbitalu (FB) – 3 × 80 mg/kg masy ciała; nitrofurazonu (NF) – 1 × 80 mg/kg masy ciała; nitrofurazonu (NF) – 3 × 80 mg/kg masy ciała; furazolidonu (FZ) – 1 × 80 mg/kg masy ciała; furazolidonu (FZ) – 3 × 80 mg/kg masy ciała.

Wyniki są wartością średnią z 3 oddzielnie przeprowadzonych doświadczeń.

Fig. 3 Mutagenicity of cyclophosphamide (CPA) to *S. typhimurium* TA100 in the presence of S9 (100 µl) S9 was isolated from livers of rats treated with: phenobarbital (PB) – 3 × 80 mg/kg body weight; nitrofurazone (NF) – 1 × 80 mg/kg body weight; nitrofurazone (NF) – 3 × 80 mg/kg body weight; furazolidone (FZ) – 1 × 80 mg/kg body weight; furazolidone (FZ) – 3 × 80 mg/kg body weight.

The results are expressed as mean values from 3 separate experiments.

Badany związek może być zaliczany do klasy induktorów cytochromu P-4502B (typu fenobarbitalu) jeśli obserwuje się indukcję rewersji his<sup>+</sup> w szczepie TA100 *S. typhimurium* w wyniku metabolicznej aktywacji (obecności frakcji S9 z wątroby szczura) (Tab. II).

Tabela I. Mutagenność bromku etydydy (BrEt) w szczepie TA98 *S. typhimurium* oraz stężenie cytochromu P-450 we frakcji S9 (100  $\mu$ l) z wątroby szczurów po podaniu 3-metylocholantrenu, nitrofurazonu i furazolidonu

Mutagenicity of ethidium bromide (EtBr) in *S. typhimurium* TA98 and cytochrome P-450 concentration in fraction S9 (100  $\mu$ l) from rat liver after administration of 3-methylcholantrene, nitrofurazone and furazolidone

Związek chemiczny	Ilość podanego związku mg/kg masy ciała	Liczba rewertantów <i>his</i> <sup>+</sup> / $\mu$ g BrEt $\bar{x} \pm SD$	Stężenie cytochromu P-450 nmole/mg białka $\bar{x} \pm SD$
Kontrola olejowa	0,2 – 0,4 ml	20 $\pm$ 3	0,146 $\pm$ 0,04
3-metylocholantrén	1 $\times$ 80	2148 $\pm$ 143	0,664 $\pm$ 0,09
Nitrofurazon	1 $\times$ 80	28 $\pm$ 6	0,111 $\pm$ 0,03
	3 $\times$ 80	71 $\pm$ 18	0,115 $\pm$ 0,02
Furazolidon	1 $\times$ 80	45 $\pm$ 14	0,110 $\pm$ 0,05
	3 $\times$ 80	844 $\pm$ 64	0,171 $\pm$ 0,03

Tabela II. Mutagenność cyklofosfamidu (CFA) w szczepie TA100 *S. typhimurium* oraz stężenie cytochromu P-450 we frakcji S9 (100  $\mu$ l) z wątroby szczurów po podaniu fenobarbitalu, nitrofurazonu i furazolidonu

Mutagenicity of cyclophosphamide (CFA) in *S. typhimurium* TA100 and cytochrome P-450 concentration in fraction S9 (100  $\mu$ l) from rat liver after administration of phenobarbital, nitrofurazone or furazolidone

Związek chemiczny	Ilość podanego związku mg/kg masy ciała	Liczba rewertantów <i>his</i> <sup>+</sup> /800 $\mu$ g CFA $\bar{x} \pm SD$	Stężenie cytochromu P-450 nmole/mg białka $\bar{x} \pm SD$
Kontrola olejowa	0,2 – 0,4 ml	220 $\pm$ 30	0,146 $\pm$ 0,04
Fonobarbital	3 $\times$ 80	1194 $\pm$ 317	0,822 $\pm$ 0,085
Nitrofurazon	1 $\times$ 80	138 $\pm$ 42	0,111 $\pm$ 0,03
	3 $\times$ 80	190 $\pm$ 36	0,115 $\pm$ 0,02
Furazolidon	1 $\times$ 80	158 $\pm$ 28	0,110 $\pm$ 0,05
	3 $\times$ 80	161 $\pm$ 31	0,171 $\pm$ 0,03

Uzyskane wyniki wskazują, że w opisanych warunkach doświadczenia zarówno nitrofurazon jak i furazolidon w obu dawkach (1  $\times$  80 mg/kg masy ciała i 3  $\times$  80 mg/kg masy ciała) nie indukują form molekularnych cytochromu P-4502B (typu fenobarbitalu). Wyrażone jest to liczbą rewertantów *his*<sup>+</sup>/800  $\mu$ g cyklofosfamidu, powstałych w obecności frakcji S9 z wątroby szczurów indukowanych badanymi związkami w szczepie TA100 *S. typhimurium* w stosunku do liczby rewertantów *his*<sup>+</sup> powstałych w obecności frakcji S9 z wątroby szczurów otrzymujących fenobarbital (Tab. II).

Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie cytochromu P-450 we frakcjach S9 otrzymanych z wątroby szczurów indukowanych nitrofurazonem i furazolidonem zarówno po jednorazowym jak i wielokrotnym podawaniu badanych związków.

Stężenie cytochromu P-450 nmol/mg białka we frakcji S9 otrzymanych z wątroby szczurów indukowanych standardowymi induktorami: 3-metylocholanrenem i fenobarbitem są zgodne z danymi piśmiennictwa [3, 4, 10].

#### WNIOSKI

1. Nitrofurazon i furazolidon nie indukują cytochromu P-4502B (typu fenobarbitalu).
2. Nitrofurazon nie indukuje również cytochromu P-4501A (typu 3-metylocholanrenu).
3. Jedynie furazolidon w łącznej dawce ( $3 \times 80$  mg/kg masy ciała) jest induktorem systemu monooksygenaz zależnych od cytochromu P-4501A (typu 3-metylocholanrenu).
4. Test Cypia wydaje się być prostą i czułą metodą do wykrywania induktorów monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 typu 3-metylocholanrenu i/lub typu fenobarbitalu.

H. Czeczot, M. Kobierska-Szeliga

#### THE EFFECT OF NITROFURAZONE AND FURAZOLIDONE ON THE INDUCTION OF CYTOCHROME P-450 STUDIED BY CYP-TEST

##### Summary

The double CYP-TEST (cytochrome P-450 induction assay) was used to discriminate between the forms of cytochrome P-450 (the 3-methylcholantrene type (3-MC) or phenobarbital type (PB)) induced by nitrofurans; nitrofurazone and furazolidone.

The test consisted of the studies by the technique of Ames of the ability of the S9 preparation obtained from livers of rats induced by nitrofurans to cause the metabolic activation of ethidium bromide (EtBr) – for induction of 3-MC type or cyclophosphamide (CPA) for PB type of cytochrome P-450.

The mutagenicity of activated EtBr and CPA was checked with TA98 and TA100 of *S. typhimurium* respectively.

It was found that only furazolidone at cumulative dose  $3 \times 80$  mg/kg of body weight induce -the 3-MC-type of cytochrome P-450.

##### PIŚMIENNICTWO

1. Ames B.N., Mc Cann J., Yamasaki E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 1975, 31, 347.
- 2. Gajewska J., Szczyпка M., Tudek B., Szymczyk-Wasiluk T.: Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone. *Mutation Res.*, 1990, 232, 191.
- 3. Harada M., Omura T.: Selective induction of two different molecule species of cytochrome P-450 by phenobarbital and 3-methylcholantrene. *J. Biol. Chem.*, 1981, 89, 239.
- 4. Lesca P., Fournier A., Lecoine P., Cresteil T.: A dual assay for the specific screening of 3-methylcholantrene- and phenobarbital- like chemical inducers of cytochrome P-450 monooxygenases. *Mutation Res.*, 1984, 129, 299.
- 5. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.:



Protein measurement with Folin phenol reagent.: J. Biol. Chem., 1951, 193, 265. – 6. *Mac Calla D.R.*: Mutagenicity of nitrofurazone derivatives: review. Environ. Mutagen., 1983, 5, 745. – 7. *Maron D.M., Ames B.N.*: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Res., 1983, 113, 173. – 8. *Miller E.C., Miller J.A.*: The metabolism of chemical carcinogens to reactive electrophiles and their possible mechanism of action in carcinogenesis. In C.E. Searle (Ed) Chemical Carcinogens (ACS Monograph Series No. 173), American Chemical Society, Washington, 1976, 737. – 9. *Omura T., Saito R.*: The Carbon monoxide binding pigment of liver microsomes, I. Evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem., 1964, 239, 2370. – 10. *Le Prevoist E.T., Gresteel T., Columelli S., Leroux J.P.*: Immunological and enzymatic comparison of hepatic cytochrome P-450 fractions from phenobarbital- 3-methylcholantrene,  $\beta$ -naphthoflavone and 2, 3, 7, 8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats.: Biochem. Pharmacol., 1983, 32, 1673.

Dn. 1994.12.17

02-097 Warszawa, ul. Banacha 1