

Izvorni znanstveni rad
UDK 614.35:615.11(479.1)

CITOTOKSIČNOST NEKIH NITROAROMATSKIH SPOJEVA

M. KORBELIK

*Inštitut za biofiziko Medicinske fakultete, Univerza Edvarda Kardelja,
Ljubljana*

(Primljeno 17. XII 1979)

Ispitivano je citotoksično djelovanje nekih nitroaromatskih spojeva koji imaju terapijske učinke u različitim područjima medicine. Citotoksični učinak ispitivane skupine spojeva ovisi o dva osnovna parametra, vremenu inkubacije u prisutnosti spoja i njegovoj koncentraciji, a očituje se u području od mikromolarnih do milimolarnih koncentracija. Na kulturi animalnih stanica *in vitro* citotoksičnost se iskazuje kao akutno citostatsko ili citocidno kronično djelovanje.

Niklozamid i nitrofuranski derivati pokazali su se kao izrazitiji citostatski agensi, dok se kod nitroimidazolskih derivata, nitroksolina i nitrazepama citostatsko i citocidno djelovanje javlja pri jednakim koncentracijama.

Razvoj nitroaromatskih kemoterapijskih lijekova započeo je četrdesetih godina, na temelju opažanja da prisutnost nitro-skupine u furanskim i tiofenskim derivatima pridonosi bakteriostatskoj aktivnosti tih spojeva (1, 2). Do danas je sintetiziran velik broj nitroaromatskih spojeva, a najbrojniji su nitrofuranski (opisano ih je nekoliko tisuća), nitroimidazolski i nitrotiazolski derivati.

Zbog svoje baktericidne i antiprotozoalne aktivnosti brojni se nitroaromati široko primjenjuju u medicini i veterini, te kao aditivi ljudskoj i životinjskoj hrani. Pritom vrsta osnovnog heterocikličkog ili običnog aromatskog prstena odlučuje o djelotvornosti protiv određene klase organizama, dok priroda i mjesto supstituenata utječe na stupanj aktivnosti spoja. Bitna je, međutim, prisutnost nitro-skupine (3).

Nitro-skupina vezana za aromatsku strukturu odgovorna je za snažno izraženo svojstvo elektronskog afiniteta, koje je presudno pri iskazivanju složene metaboličke aktivnosti i velike radiokemijske reaktivnosti te

vrste spojeva (4). Upravo zbog tih svojstava, koja bi se mogla iskoristiti u radioterapiji i kemoterapiji nekih vrsta tumora, u posljednjih su nekoliko godina nitroaromatski spojevi izazvali zanimanje radiobiologa i onkologa (5, 6). Budući da postoji mogućnost da neki od već upotrebljivanih nitroaromatskih lijekova nađu novu primjenu u liječenju malignih tumora koji sadržavaju frakcije hipoksičnih stanica (7), ukazala se potreba da se ponovo preispita njihovo biološko djelovanje, posebno toksično, jer bi se u tom slučaju aplicirale maksimalne moguće doze tih lijekova (7, 8).

U ovom je radu, upotrebom *in vitro* kultura animalnih stanica, ispitana citotoksičnost potencijalnih lijekova od kojih se neki pojavljuju i u jugoslavenskoj farmakopeji, a po svome su kemijskom sastavu nitroaromati.

MATERIJAL I METODE

Nitroaromatski spojevi

Analizirano je ukupno 11 nitroaromatskih spojeva, pet nitroimidazolskih, tri nitrofuranska, te po jedan nitrokinolinski, nitrofenolni i nitrobenzodiazepinski derivat.

Metronidazol (Flagyl — Alkaloid, Efloran — Krka, Medazol — Belupo, Ovargil — Galenika) jedan je od najčešće upotrebljivanih antitrihomonadnih (trihomonacid i lamblijacid). Po kemijskom je sastavu 2-metil-5-nitroimidazolil-1-etanol.

Tinidazol (Fasigym — Krka, Glongyn — Lek), 1-[2 (etilsulfonil) etil]-2-metil-5-nitroimidazol je svjetski poznat trihomonacid. U kliničkoj je praksi vrlo cijenjen kao sredstvo protiv intestinalne lamblijaze i amebijaze.

Et-79 (Krka), 1-(2-metil-5-nitro-1-imidazolil)-etil kloretileter je derivat 5-nitroimidazola a sličan je metronidazolu i tinidazolu. Sintetiziran je u razvoju novih potencijalnih trihomonacida.

Br-80 (Krka), 1-(2-metil-5-nitro-1-imidazolil)-2-brom-etan, također je 5-nitroimidazolski derivat sintetiziran u programu razvoja novih trihomonacidnih kemoterapeutika.

Mizonidazol ili Ro-07-0582 (Roche Products Ltd.), Chemical Abstracts Service (CAS) registarski broj 13551-87-6 je 1-(2-nitro-1-imidazolil)-3-metoksi-2-propanol. Nije uvršten u jugoslavensku farmakopeju a izabran je zbog velikog zanimanja u svijetu za taj spoj kao radiosenzitizator hipoksičnog tumorskog tkiva. Sintetiziran je prije nekoliko godina kao potencijalni trihomonacid.

Nitrofurantoin (Nifurantin — Lek, Alfuran — Alkaloid, Furatin — Hemofarm), N-(5-nitro-2-furfuriliden)-1-aminohidantoin mnogo je upotrebljavan uroantiseptik izrazito antibakterijskog djelovanja.

Hidroksimetilnitrofurantoin (Urfandyne — Lek, Impharzan — München), N-(5-nitro-2-furfuriliden)-1-amino-3-hidroksimetilhidantoin, po kemijskom sastavu i djelovanju sličan je nitrofurantoinu.

Furagin (Pliva-Medexport, Moskva), 1- $[\beta$ -(5-nitrofuril-2) akriliden-amino]hidantoin je širokospektralni uroantiseptik.

Nitroksolin (5-Nok — Lek, Isinok — Isis, Nikinol — Pliva, Galinon — Galenika, Nikopet — Farmakos, Nobrin — Zdravlje) je 5-nitro-8-hidroksikinolin, uroantiseptik širokog antibakterijskog djelovanja.

Nitrazepam (Mogadon — Galenika; Cerson — Belupo), 1,3-dihidro-7-nitro-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on upotrebljava se u tretiranju nesanice s anksioznim stanjima.

Niklozamid (Yomesan — Bayer-Pharma, Vermitin — Farmakos), N-(2'-klor-4'-nitrofenil)-5-klor-salicilamid. Lijek je afirmiran kao sredstvo protiv trakavice (tenicid).

U eksperimentima su te tvari upotrebljavane kao kemijski čisti spojevi. Prema potrebi pročišćeni su s pomoću odgovarajućih otapala. Za svaki je pokus upotrijebljena svježa otopina u staničnom hranjivom mediju. Od nekih slabo topljivih spojeva nije bilo moguće pripremiti visoko koncentrirane otopine. Zato je prvo pripremljena otopina u DMSO (dimetilsufoksidu), koja je zatim razrijeđena u mediju, pri čemu konačna koncentracija DMSO nije bila veća od 2%. DMSO u toj koncentraciji ne utječe na preživljenje stanica.

Stanične kulture bile su trovrstne:

— V79-379A, plućni fibroblasti kineskog hrčka; kontinuirana višegodišnja kultura, populacijsko vrijeme duplikacije 11—12 sati;

— KNRK, bubrežne stanice štakora transformirane mišjim virusom Kirstenova sarkoma; duplikacijsko vrijeme 23—24 sata;

— HeLa, stanice humanog karcinoma grla maternice; duplikacijsko vrijeme 20—21 sat.

Kulture su uzgajane pri 37°C u inkubatoru u atmosferi zasićenoj vlagom uz 10% ugljičnog dioksida. Hranjivi medij sastojao se od Eaglova minimalnog esencijalnog medija (MEM) s Earlovim solima (Gibco-Biocult Ltd.) uz streptomycin (100 mg/l) i benzilpenicilin (100 jedinica/ml). Medij za V79-379A kulturu sadržavao je 15%, a za ostale stanične kulture 10% fetalnog telećeg seruma (Gibco-Biocult Ltd.). Kontinuirano uzgajanje stanica, koje su rasle jednoslojno prilijepljene uz dno Demetrijevih staklenih posuda, omogućeno je presađivanjem pomoću 0,2%-tne otopine tripsina u Hanksovu puferu.

Ispitivanje citotoksičnog djelovanja

Citostatsko djelovanje ispitivano je na temelju praćenja krivulje rasta asinkrone populacije stanica u prisutnosti određene koncentracije toksičnog agensa u hranjivom mediju. Niz paralelnih uzoraka jednog broja stanica, nasadenih u plastične Petrijeve zdjelice promjera 6 cm, ostavljeno je u inkubatoru do idućeg dana, da bi se dobila populacija u logaritamskoj fazi rasta. Nato je odstranjen medij i dodan novi s određenom koncentracijom toksične supstancije. Kontrolnim uzorcima ponovo je

doban čisti medij. Uzorci su ponovo stavljeni u inkubator i zatim se u određenim vremenskim razmacima broj naraslih stanica u pojedinom uzorku određivao brojenjem u hemocitometru. Za svaku točku na kri- vulji uzeta je srednja vrijednost iz tri Petrijeve zdjelice.

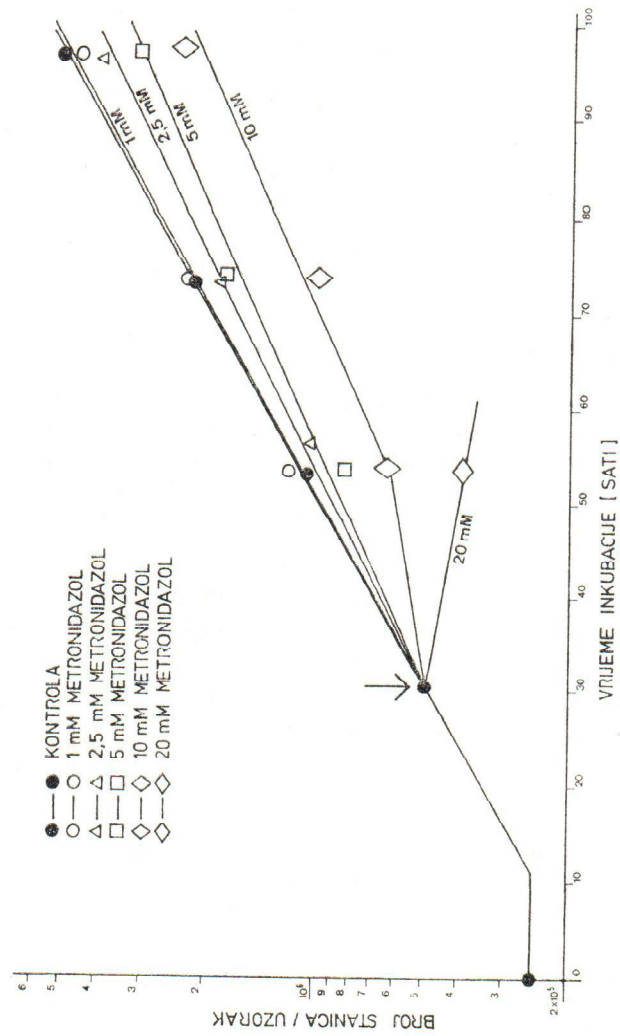
Citocidno djelovanje analizirano je na temelju praćenja promjene spo- sobnosti formiranja kolonija (djelotvornosti nasađivanja) stanica, koje su određeno vrijeme inkubirane u prisutnosti određene koncentracije toksične supstancije u hranjivom mediju. Po 200—300 stanica nasađeno je u plastične Petrijeve zdjelice promjera 6 cm, i uzorci su ostavljeni dva sata, da se stanice pričvrste za dno. Nakon toga je odstranjen medij i dodan novi s određenom koncentracijom ispitivane supstancije u ukup- nom volumenu od 3 ml. Pri određivanju akutne toksičnosti (kraće vrije- me ekspozicije) medij je sadržavao 10%, dok je pri ispitivanju kronične citotoksičnosti u mediju bilo 15% fetalnog telećeg seruma. Uzorci su in- kubirani pri 37°C. Pošto je isteklo vrijeme ekspozicije, odstranjen je medij i uzorci su dva puta isprani s po 2 ml čistog medija. Dodan je ponovo hranjivi medij i Petrijeve su zdjelice ostavljene u inkubatoru 7 dana da narastu vidljive kolonije. Kod ispitivanja kronične citotoksič- nosti to je vrijeme u nekim slučajevima produženo na 10—12 dana. Ko- lonije su zatim obojene 10%-tnom Giemsinom otopinom (metilensko mo- drilo). U tim je uvjetima kod kontrolnih uzoraka prosječno 60—70% stanica formiralo kolonije, a u nekim je eksperimentima taj postotak bio i veći.

REZULTATI I DISKUSIJA

Citotoksičnost nekog spoja iskazuje se djelovanjem na osnovno biološ- ko svojstvo animalnih stanica, sposobnost kontinuiranog razmnožavanja diobom. Pritom se taj štetni utjecaj očituje u dva osnovna oblika: cito- statskom (inhibicija proliferacije stanične populacije) i citocidnom učin- ku (inhibicija tvorbe staničnih kolonija). Za razliku od ireverzibilnog le- talnog djelovanja, koje obilježava citocidni učinak, citostatski je učinak po svojoj prirodi reverzibilan jer se može ukinuti uklanjanjem citotok- sičnog agensa. Samo pak citostatsko djelovanje ipak je često praćeno i ugibanjem dijela stanica, pogotovo prilikom jače izraženog citotoksičnog učinka.

Citostatsko djelovanje

Na sl. 1. prikazano je djelovanje metronidazola na rast asinkrone po- pulacije HeLa stanica. Strelicom je označen trenutak dodavanja raznih koncentracija metronidazola u uzorke koji su sadržavali populacije sta- nica u eksponencijalnoj fazi rasta. Uočljivo je da je veličina citostatskog učinka ovisna o koncentraciji supstancije prisutne u staničnom hranji- vom mediju. Tako, dok 1 mM koncentracija metronidazola ne pokazuje nikakvo djelovanje, već 2,5 mM koncentracija usporava staničnu proli-



Sl. 1. Citostatsko djelovanje raznih koncentracija metronidazola na proliferaciju HeLa stanica

feraciju. S daljnjim povećavanjem koncentracije metronidazola dolazi do sve značajnije inhibicije normalne proliferacije HeLa stanica uz degenerativne promjene u njihovu morfološkom izgledu, dok se pri 20 mM i višim koncentracijama proliferacija potpuno zaustavlja, a stanice se odljepljuju sa dna Petrijeve zdjelice i plutaju u mediju. Isti rezultati s ovim koncentracijama metronidazola mogu se dobiti i na drugim vrstama *in vitro* kultura animalnih stanica (9).

Citostatsko djelovanje nekog spoja ovisno je o njegovoj koncentraciji i može se prikazati pomoću faktora rasta (10). Taj se parametar stanične proliferacije izračunava po formuli:

$$\text{faktor rasta} = \frac{N_x - N_o}{N_c - N_o} \times 100\% \quad (1)$$

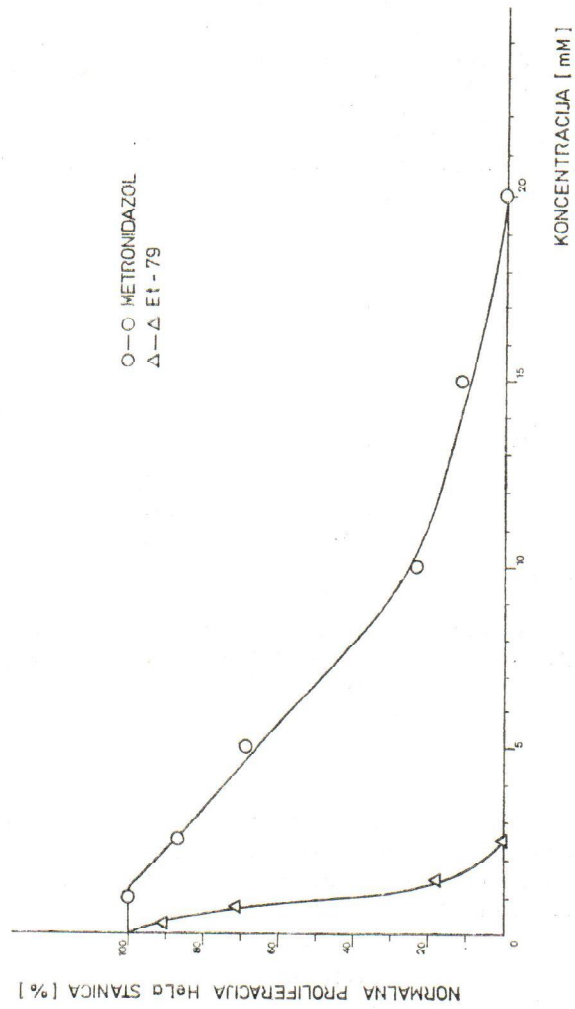
gdje je N_x broj stanica u uzorku nakon 24 sata rasta u prisutnosti x koncentracije određene supstancije, N_o je broj stanica u uzorku u trenutku nula (tj. u vremenu dodavanja supstancije), a N_c je broj stanica u uzorku nakon 24 sata rasta bez prisutnosti ispitivane supstancije.

Na taj se način može jasnije prikazati kretanje citostatskog učinka ovisno o koncentraciji supstancije (sl. 2), a moguće je i uspoređivati citostatska svojstva raznih spojeva, kao i utjecaje raznih eksperimentalnih uvjeta na tu pojavu. Isto tako, iz takve krivulje citostatskog djelovanja supstancije može se grafički odrediti koncentracija koja pokazuje 50%-tnu inhibiciju proliferacije, što se uzima kao karakteristična vrijednost, koja omogućuje usporedbu citostatskih svojstava različitih agensa. Na slici 2. prikazane su krivulje koje ilustriraju citostatsko djelovanje dvaju nitroimidazolskih derivata, metronidazola i Et-79. Očito je da Et-79 pokazuje snažnije citostatsko djelovanje jer koncentracija nešto veća od 1 mM inhibira staničnu proliferaciju za 50%, dok se taj učinak kod metronidazola dobiva s približno 7 mM koncentracijom. Rezultati dobiveni analizom citostatskog djelovanja ostalih spojeva iz ove studije navedeni su u tablici 1, zajedno s rezultatima ispitivanja njihova citocidnog djelovanja. Uočljivo je da se citostatski učinak ispitivanih nitroaromatskih spojeva javlja kod različitih koncentracija na prilično širokom području od 1 (niklozamid) do 5 mM (metronidazol).

Citocidno djelovanje

Citocidno djelovanje nekog spoja odražava se kao utjecaj na sposobnost stanice, te samostalne distinktno jedinice, da diobom formira makroskopski vidljivu koloniju svojih potomaka. S povećanjem citocidnog učinka smanjuje se postotak stanica koje formiraju svoje kolonije, što se često definira kao smanjenje preživljenja.

Prema tome citocidno djelovanje, isto kao i letalno djelovanje drugih kemijskih i fizičkih agensa (npr. raznih vrsta zračenja), utječe na sta-



Sl. 2. Citostatsko djelovanje metronidazola i Et-79 na proliferaciju HeLa stanica

Tablica 1.
Citotoksično djelovanje nitroaromatskih lijekova na V79-379A i KNRK stanice u aerobnim uvjetima

Nitroaromatski spoj	Koncentracija (mM) koja pokazuje 50%-tni citotoksični učinak na V79-379A stanice	Citostatsko djelovanje na KNRK stanice	
		Koncentracija (mM)	% inhibicije proliferacije
Metronidazol	50	5	15
Tinidazol	19	3	36
Et-79	11	1	46
Br-80	3,3	1	63
Mizonidazol	15	1	25
Nitrazepam	1	0,2	71
Nitrofurantoin	0,72	0,02	18
Hidroksimetilnitrofurantoin	0,54	0,02	55
Furagin	0,18	0,01	34
Niklozamid	0,21	0,001	57
Nitroksolin	0,0075	0,003	34

nično preživljenje. Citotoksični učinak direktno je ovisan o dva osnovna parametra: vremenu inkubacije u prisutnosti citotoksične supstancije i koncentraciji te supstancije u hranjivom mediju. Preživljenje (S) se, prema tome, može izraziti kao funkcija produkta koncentracije (C) i vremena inkubacije (T):

$$S = f(C \times T) \quad (2)$$

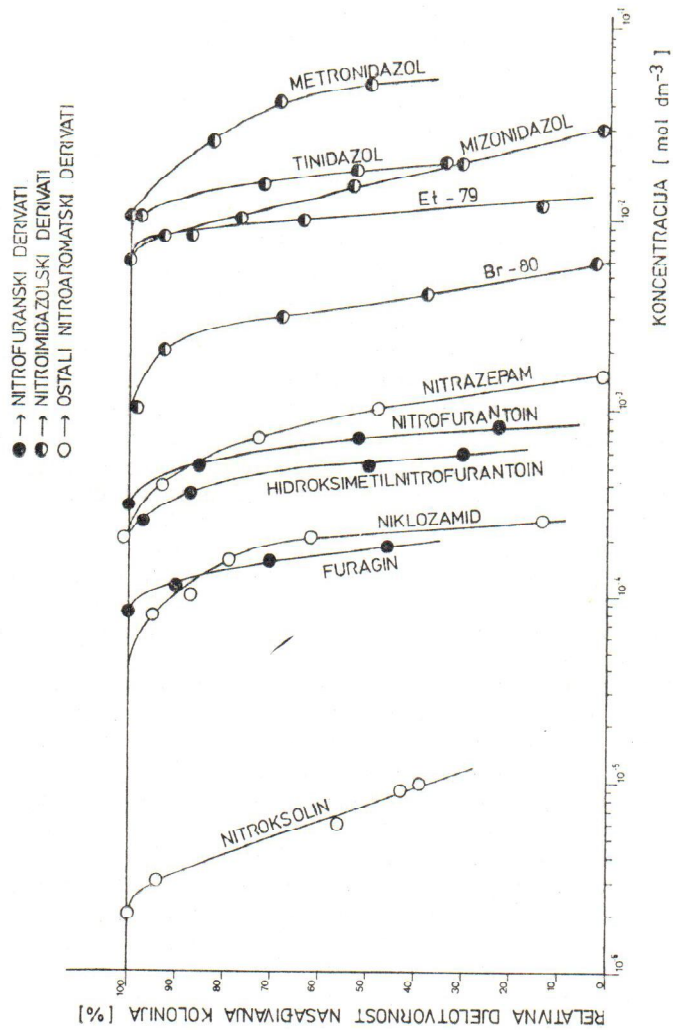
Taj se produkt definira kao ekspanzijska doza (exposure dose). Međutim, ako koncentracija citotoksične supstancije u mediju nije konstantna, nego se u kontekstu sa stanicama supstancija mijenja, mora se umjesto formule (2) upotrijebiti izraz:

$$S = \int_0^t C(t) dt \quad (3)$$

Ovdje je dakle potrebno znati stvarnu koncentraciju supstancije u vremenu u kojem se određuje citotoksični učinak, C(t) (11).

Citotoksično djelovanje u ovisnosti o koncentraciji supstancije

Citotoksično djelovanje svih nitroaromatskih spojeva koji su ispitani u ovom radu prikazano je na slici 3. U tom je slučaju izabrano fiksno vri-



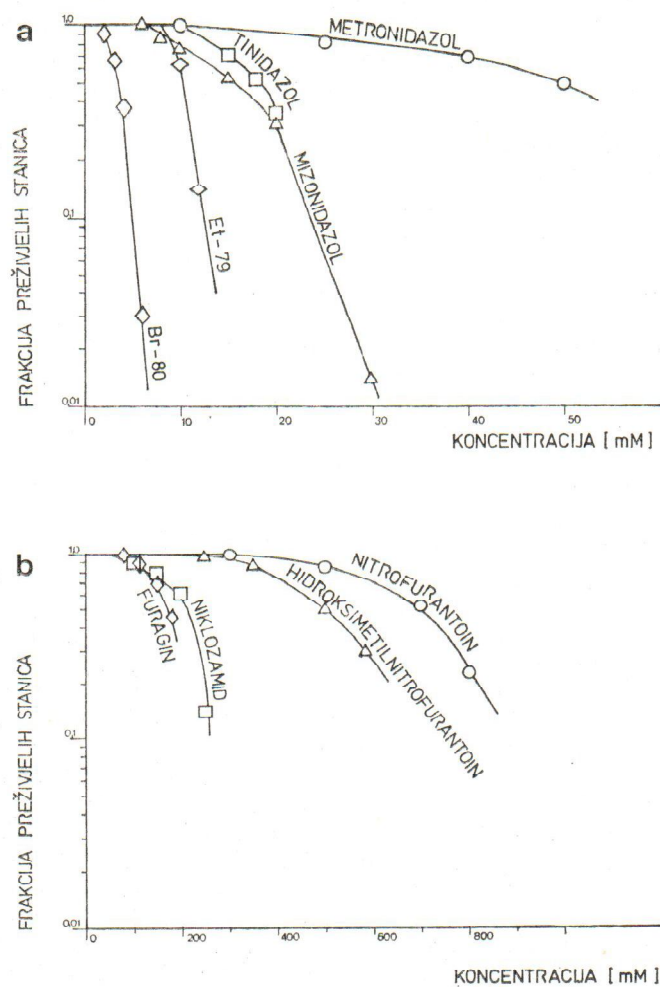
Sl. 3. Akutno citotično djelovanje (šestosatna inkubacija) nitroaromatskih lijekova na V79-379A stanice u aerobnim uvjetima

jeme inkubacije od 6 sati, te je određivan citocidni učinak za razne koncentracije ispitivanih spojeva. Dobivene krivulje prikazane na ovoj slici opisuju porast citocidnog učinka ovisno o porastu koncentracije supstancije prisutne u staničnom mediju za vrijeme inkubacije, koja je nanosena na logaritamsku skalu. Sve su te krivulje slična oblika, a sastavljene su od dva dijela. U prvom je dijelu citotoksični učinak slabo izražen i s porastom koncentracije raste sporije. U drugom dijelu krivulje prelaze u linearni oblik, što u semilogaritamskom sistemu karakterizira eksponencijalni porast toksičnosti. U tom dijelu krivulje citocidni učinak raste s povećanjem koncentracije mnogo brže. Koncentracija supstancije koja smanji preživljenje, odnosno relativnu djelotvornost nasađivanja kolonija za 50%, uzeta je kao standardna mjera akutnog aerobnog citocidnog djelovanja određenog spoja (tablica 1).

Iz sl. 3. se može uočiti da izabrani nitroaromatski spojevi pokazuju citocidni učinak na prilično širokom koncentracijskom području reda veličine 10^4 , od mikromolarnih do desetmilimolarnih koncentracija. Karakteristično je da su spojevi koji spadaju u kemijski srodne skupine grupirani u približno istim koncentracijskim područjima, iako međusobno pokazuju značajne razlike u citotoksičnosti. U skupini nitroimidazolskih derivata, koji su najmanje toksični među proučavanim spojevima, treba istaknuti metronidazol, koji pokazuje najmanji citocidni i citostatski učinak. Nitrofuranski derivati u usporedbi s nitroimidazolskim toksični su već pri mnogo nižim koncentracijama. Kao najtoksičniji pokazao se nitrokinolinski derivat, koji 50%-tni citocidni učinak pokazuje već u 7 μ M koncentraciji. Toksičnost nitrofenolnog derivata (niklozamida) i nitrobenzodiazepinskog derivata (nitrazepama) nalazi se u području djelovanja nitrofurana.

Na sl. 4 prikazani su isti rezultati citocidnog učinka nitroaromatskih spojeva ovisno o njihovoj koncentraciji u staničnom hranjivom mediju, pri čemu je na linearnu skalu (apscisa) nanosena koncentracija, a na logaritamsku (ordinata) relativna djelotvornost nasađivanja kolonija. Tako su dobivene krivulje preživljenja, koje su poznate u radiobiologiji, samo što se na apscisu, pri zračenju, nanose doze.

U novijim se istraživanjima djelovanja citotoksičnih agensa na kulturama animalnih stanica *in vitro* takav semilogaritamski sistem uvriježio kao standardan (12). Iz samih se krivulja preživljenja na ovoj slici može uočiti da ispitivani nitroaromatski spojevi na onom području koncentracija gdje se počne javljati citotoksični učinak ne pokazuju odmah značajan pad u preživljenju, dok se pri većim koncentracijama javlja brz, eksponencijalan pad u preživljenju stanica. Takav oblik krivulje, s karakterističnim koljenom, koje prelazi u linearni dio poznat je iz teorije kao tip C ili »threshold exponential curve« (12). Krivulje preživljenja na slici 4. međusobno se razlikuju prvenstveno u veličini koljena, koja ovisi o sposobnosti stanica da u određenoj mjeri akumuliraju škodljivi učinak tih spojeva bez letalnih posljedica. Ako se usporede krivulje dvaju po kemijskom sastavu vrlo sličnih nitrofuranskih derivata, nitrofurantoina



Sl. 4. a) Citocidno djelovanje raznih koncentracija nitroimidazolskih lijekova na V79-379A stanice nakon šestosatne inkubacije u aerobnim uvjetima. b) Citocidno djelovanje raznih koncentracija nitrofuranskih lijekova i niklozamida na V79-379A stanice nakon šestosatne inkubacije u aerobnim uvjetima

i hidrosimetilnitrofurantoina, može se zaključiti da su po obliku identične, ne razlikuju se ni u izgledu koljena. Jedino se citotoksični učinak hidrosimetilnitrofurantoina javlja pri nešto nižim koncentracijama.

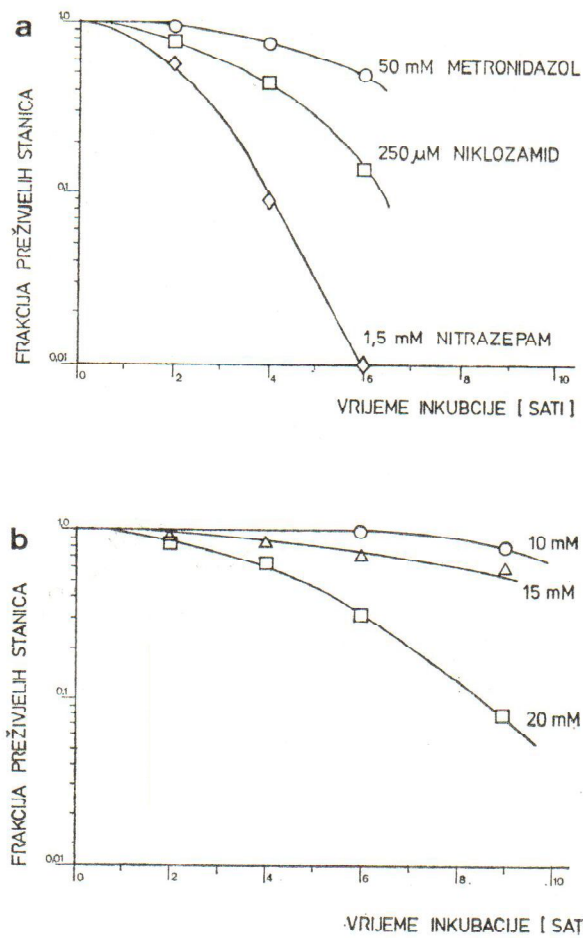
Zbog slabe topljivosti nekih nitroaromatskih spojeva, nije se mogao ispitati učinak njihovih visokotoksičnih koncentracija. Zbog toga kod nekih krivulja preživljenja nije dostignut linearni — eksponentni dio, tako da nije bilo moguće potanje uspoređivati sve tipične parametre, npr. nagib linearnih segmenata krivulja. Najveće koncentracije prikazane na slikama 3. i 4. nalaze se na granici topljivosti većine tih spojeva u hranjivom mediju, a kod nekih su dosegnute tek upotrebom boljeg otapala (DMSO). Ne smije se, međutim, zaboraviti da je osnovna namjena tih spojeva upotreba u terapijske svrhe, i to u koncentracijama koje bi za čovjeka bile neškodljive. Njihova slaba topljivost uvjetuje nisku toksičnost za animalne stanice pri akutnoj ekspoziciji, pa se stoga ne može dogoditi da se u čovječjem organizmu nađu visoke, škodljive koncentracije. Postoji ipak mogućnost da u određenim uvjetima nastanu mnogo topljiviji i toksičniji produkti tih spojeva. Čini se da se to događa upravo u hipoksičnim tkivima (13).

Citocidno djelovanje u ovisnosti o vremenu inkubacije

Drugi je osnovni parametar o kojem ovisi citocidni učinak neke supstancije vrijeme, odnosno trajanje inkubacije u prisutnosti određene koncentracije citotoksičnog agensa. Na slici 5. prikazan je utjecaj vremena inkubacije na citocidno djelovanje nekih od ispitivanih nitroaromatskih spojeva u određenoj stalnoj koncentraciji. Na taj način dobivene krivulje preživljenja imaju isti oblik kao i krivulje koje prikazuju ovisnost citocidnog učinka o porastu koncentracije supstancije. Karakteristično je da do pada u preživljenju ne dolazi odmah u početku inkubacije; postoji određeno vrijeme u kojem štetne posljedice djelovanja citotoksičnog agensa ne dolaze do izražaja. Ovo je vrijeme za isti spoj to kraće što je veća njegova koncentracija (sl. 5b). Kod nižih koncentracija citocidni se učinak može pokazati tek nakon nekoliko dana inkubacije (sl. 6). Od trenutka kada se pojavi, citocidni učinak s vremenom raste sve brže (područje koljena), da bi na području visoke toksičnosti taj porast dostigao maksimalnu brzinu i prešao u eksponencijalnu funkciju.

Zbog relativno slabe toksičnosti maksimalno topljivih koncentracija ispitivanih nitroaromatskih spojeva, većina krivulja prikazanih na sl. 5. nije ni dosegla eksponencijalni dio nakon relativno kratkog vremena inkubacije od nekoliko sati. Ovo je vrijeme inkubacije primijenjeno da bi se ispitao akutan citocidni učinak tih spojeva. Ako se inkubacija produži od nekoliko sati na više dana, akutni citocidni učinak prelazi u kronični.

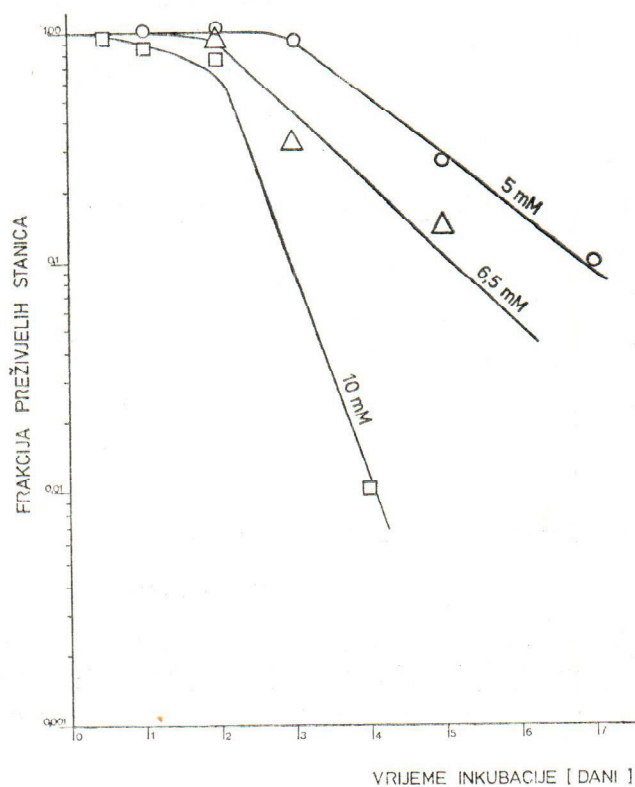
Na sl. 6. prikazano je kronično citocidno djelovanje triju koncentracija metronidazola, koje u akutnoj ekspoziciji nemaju toksičan učinak.



Sl. 5. a) Citocidno djelovanje 50 mM metronidazola, 250 μM niklozamida i 1,5 mM nitrazepama na V79-379A stanice ovisno o vremenu inkubacije u aerobnim uvjetima; b) Citocidno djelovanje 10, 15 i 20 mM tinidazola na V79-379A stanice ovisno o vremenu inkubacije u aerobnim uvjetima

Po svom obliku te su krivulje istoga tipa kao i krivulje preživljenja za akutnu ekspoziciju, samo što se eksponentni dio (koji je ovdje mnogo izraženiji jer je postignuta mnogo veća toksičnost), dostiže nakon tri do četiri dana inkubacije.

Činjenica da je potrebno određeno vrijeme kako bi porast citocidnog učinka prešao u eksponencijalnu fazu, može se, jednako kao i kod krivulja preživljenja ovisno o koncentraciji, tumačiti sposobnošću stanica da u stanovitoj mjeri akumuliraju subletalna oštećenja, koja nastaju citotoksičnim djelovanjem ili tako da tek u tijeku inkubacije osnovna supstancija prelazi u aktivan toksičan oblik. Da ova druga pretpostavka u ovom slučaju ne dolazi u obzir, dokazuje ispitivanje biološke stabilnosti nitroaromatskih spojeva.



Sl. 6. Kronično citocidno djelovanje metronidazola na V79-379A stanice u aerobnim uvjetima

Ispitivanje biološke stabilnosti ispitivanih nitroaromatskih spojeva

Toksični učinak nekog spoja u životinjskom i čovječjem organizmu ovisan je, pored ostalog, o njegovoj biološkoj stabilnosti. U organizmu se nitroheterociklički i ostali nitroaromatski spojevi biotransformiraju i izlučuju u obliku raznih metabolita ili se pak izlučuju nepromijenjeni. Već nakon jedne aplikacije, većina tih spojeva brzo prodire u sve stanice organizma i tako doseže u tkivima maksimalnu koncentraciju, koja se zatim smanjuje ovisno o biološkoj stabilnosti samog spoja.

Uzorci na kojima je proučavano citocidno djelovanje imaju premalo stanica (za kolonije je nasađivano 200—300 stanica u Petrijevu zdjelicu) da bi pri kratkotrajnoj inkubaciji od nekoliko sati mogle u dovoljnoj mjeri metabolički promijeniti testnu supstanciju. U tom se taj eksperimentalni sistem bitno razlikuje od sistema *in vivo*. Radi lakšeg uspoređivanja rezultata težište rada u ovom istraživanju usmjereno je na ispitivanje akutnog citotoksičnog djelovanja. Kada bi se uzela višednevna inkubacija, rezultati za citocidni učinak bili bi manje komparabilni s rezultatima *in vivo*, gdje se koncentracija supstancije u organizmu neprestano brže ili sporije smanjuje, tako da bi se *in vitro* dobila veća toksičnost nego *in vivo*. U životinjskom i ljudskom organizmu visoka se koncentracija supstancije može postići jedino višekratnom aplikacijom.

Biološka stabilnost istraživanih nitroaromatskih spojeva određivana je tako da je otopina određene koncentracije ispitivanog spoja u hranjivom mediju dodana uzorku, koji je sadržavao 10^7 stanica u eksponencijalnoj fazi rasta. Nakon toga je ista otopina dodana uzorcima u kojima je po ustaljenom postupku određen citocidan učinak. Rezultati za citocidno djelovanje ovako predinkubiranih spojeva uspoređeni su s podacima dobivenima za istu koncentraciju spoja bez predinkubacije. Pokazalo se da su stanice u ovako velikom broju kadre da metaboliziraju znatnu količinu biološki manje stabilne supstancije u izabranom vremenu inkubacije.

Dobiveni rezultati sistematizirani u tablici 2. pokazuju da postoje značajne razlike u biološkoj stabilnosti istraživanih nitroaromatskih spojeva. Za spojeve, kojih se citocidni učinak nakon 12-satne predinkubacije nije bitno promijenio može se zaključiti da imaju relativno visoku biološku stabilnost. U tu skupinu spadaju uglavnom nitroimidazolski derivati. Manje biološki stabilni odnosno nestabilni pokazali su se nitrofuranski derivati i nitrazepam, u kojih je citocidni učinak nakon predinkubacije pao na polovicu, i manje. Kod nekih se spojeva citocidni učinak, nakon predinkubacije, povećao, što je osobito izraženo kod nitroksolina. Ta se pojava može protumačiti stvaranjem mnogo toksičnijih metabolita u tijeku predinkubacije.

Rezultati prikazani na tablici 2. u skladu su s rezultatima iz literature (14), koji pokazuju da se nitrofuranski derivati u organizmu vrlo brzo metaboliziraju, za razliku od mnogo stabilnijih nitroimidazolskih derivata metronidazola i mizonidazola.

Tablica 2.
Citocidno djelovanje nitroaromatskih lijekova na V79-379A stanice
nakon 12-satne predinkubacije u aerobnim uvjetima

Nitroaromatski spoj	Konzentracija (mM)	Preživljenje poslije šestosatne inkubacije (A)	Preživljenje poslije šestosatne inkubacije u prisutnosti otopine koja je prije toga bila 12 sati u kontaktu s drugim stanicama (B)		Primjedba
			$\frac{1-B}{1-A}$	$\frac{1-B}{1-A}$	
Br-80	6	0,03	0,11	0,92	stabilan
Metronidazol	50	0,50	0,56	0,88	stabilan
Mizonidazol	25	0,10	0,25	0,83	stabilan
Et-79	10	0,64	0,51	1,36	toksični metaboliti
Tinidazol	18	0,53	0,84	0,34	nestabilan
Nitrazepam	1,2	0,33	0,62	0,57	nestabilan
Furagin	0,15	0,70	0,87	0,56	nestabilan
Hidroksimetilnitrofurantoin	0,65	0,19	0,38	0,77	manje stabilan
Niklozamid	0,25	0,14	0,031	0,13	toksični metaboliti
Nitroksolin	0,006	0,56	0,001	2,27	jako toksični metaboliti

Reparacija oštećenja nastalih pri citocidnom djelovanju

Letalni učinak ionizirajućeg i drugih vrsta zračenja na stanice kultivirane *in vitro* prikazuje se krivuljom preživljenja jednakog oblika kao što su krivulje koje prate citocidno djelovanje ispitivanih nitroaromatskih spojeva.

U tom je slučaju postojanje koljena odraz sposobnosti stanica da pomoću svojih reparatornih mehanizama poprave oštećenja nastala na makromolekulama (DNA) koje su za stanicu od životne važnosti (15). Ako se npr. određena doza zračenja razdijeli na dva dijela, te se nakon prvog dijela doze pričekava s nastavkom zračenja nekoliko sati, rezultati će pokazati značajno veće preživljenje stanica nego nakon jedne doze iste skupne vrijednosti (16).

Taj princip frakcionacije doze primijenjen je i u ovim istraživanjima, kako bi se ispitalo imaju li animalne stanice sposobnost reparacije oštećenja nastalih toksičnim djelovanjem nitroaromatskih spojeva u aerobnim uvjetima. Četverosatna inkubacija u prisutnosti određene koncentracije supstancije razdijeljena je na dvije dvosatne ekspozicije, između kojih je ostavljen dvosatni interval inkubacije bez prisutnosti toksične supstancije. Rezultati te vrste pokusa prikazani su na tablici 3. S iznim-

Tablica 3.

Ocjena reparacije oštećenja nastalih toksičnim djelovanjem nitroaromatskog spoja na V-79-379A stanice u aerobnim uvjetima

Nitroaromatski spoj	Relativna djelotvornost nasađivanja kolonija izražena u ovisnosti o vremenu inkubacije		
	2 sata	4 sata	2×2 sata s dvosatnim međuintervalom
Metronidazol (50 mM)	0,96	0,76	0,67
Timidazol (20 mM)	0,84	0,64	0,63
Nitrazepam (1,5 mM)	0,57	0,09	0,10
Hidroksimetilnitrofurantoin (600 μ M)	0,43	0,26	0,21
Niklozamid (250 μ M)	0,78	0,51	0,78

kom niklozamida, frakcionacijom doze nije se dobilo povećano preživljenje nakon dvije dvosatne doze u odnosu na neprekinutu četverosatnu inkubaciju. Prema tome je, u pravilu, priroda oštećenja stanica koja su nastala citotoksičnim djelovanjem nitroaromatskih lijekova u aerobnim uvjetima takva da ih animalne stanice nisu kadre reparirati. S tog je gledišta citotoksično djelovanje tih spojeva slično drugim nekim citotoksičnim agensima (17).

Postojanje koljena u krivuljama preživljenja nakon citocidnog djelovanja nitroaromatskih spojeva odraz je sposobnosti animalnih stanica da donekle akumuliraju subletalna oštećenja nastala tim djelovanjem, ali tu nije uključena sposobnost reparacije, kakva postoji nakon zračenja. Činjenica je međutim da se niklozamid, jedini nitrofenolni derivat obuhvaćen ovim istraživanjima, s tog gledišta razlikuje od ostalih nitroaromatskih lijekova, tj. da stanice mogu reparirati oštećenja nastala toksičnim djelovanjem ovog spoja. Nakon prve dvosatne inkubacije V79-379A stanica u prisutnosti 250 μM otopine niklozamida, stanice su inkubirane u različitom trajanju u čistom mediju prije početka druge dvosatne frakcije sa 250 μM niklozamidom. Može se opaziti da su stanice već nakon jednog sata reparirale značajan dio oštećenja, dok je nakon dva sata došlo do potpune reparacije oštećenja nastalih za vrijeme prve frakcije jer je preživljenje nakon druge dvosatne frakcije postalo jednako djelovanju samo jedne dvosatne inkubacije. Iz tih se rezultata može zaključiti da je mehanizam citotoksičnog djelovanja ovog nitrofenolnog derivata drugačiji od onog koji pokazuju ostali nitroaromatski lijekovi iz ove studije.

Toksično se djelovanje nekog agensa na kulturi animalnih stanica iskazuje kao akutno citostatsko te kronično citocidno djelovanje. Pokazalo se da se citocidni učinak ispitivanih spojeva, koji ovisi o dva osnovna parametra, koncentraciji toksične supstancije i vremenu inkubacije u prisutnosti toksičnog agensa, očituje u relativno širokom području od mikromolarnih do milimolarnih koncentracija.

Adams i suradnici (18, 19) pokazali su da se razlike u citotoksičnosti nitroaromatskih spojeva mogu povezati s njihovim redukcijskim potencijalom. U pravilu, spojevi s pozitivnijim redukcijskim potencijalom toksičniji su, i obrnuto. Ta pojava upućuje na to da je kemijska reaktivnost nitroaromatskih spojeva, koja dovodi do citotoksičnih posljedica, ovisna o njihovu redukcijskom potencijalu. Prema tome bi razlike u toksičnom citocidnom djelovanju istraživanih spojeva bile posljedica razlika u njihovom redukcijskom potencijalu. Nitrokinolinski derivat, koji se pokazao kao najtoksičniji, ima najpozitivniji redoks potencijal, dok je za nitroimidazolske derivate, koji su kao skupina najmanje toksični, poznato da imaju negativnije redukcijske potencijale (4).

Iz prikazanih rezultata može se uočiti da se citostatski učinak pojedinog spoja, u pravilu javlja kod nižih koncentracija nego što su one za citocidni učinak. Za neke su spojeve koncentracijska područja citostatskog i citocidnog djelovanja međusobno vrlo bliska, kao npr. kod nitroimidazolskih derivata, dok je kod nitrofuranskih derivata razlika očito veća. Vrlo se mala razlika pokazala i kod nitrokinolinskog derivata, dok niklozamid, kao izrazito citostatsko sredstvo, pokazuje citostatski učinak pri 1 μM koncentraciji, a citocidni (50%-tni) tek pri 210 μM . Te su razlike odraz različite kemijske reaktivnosti tih spojeva, kao i interakcija s intracelularnim metaboličkim procesima.

Zanimljivo je da spojevi koji su toksični u milimolarnim koncentracijama imaju područje citostatskog djelovanja bliže citocidnom, u odnosu na spojeve toksične u mikromolarnim koncentracijama. Za one prve, ako se za citocidno djelovanje uzme u obzir i kronična ekspozicija, može se zaključiti da im se ne može razlučiti citostatsko djelovanje od citocidnog djelovanja. Drugi ispitani nitroaromatski spojevi, izuzevši nitroksolin, pokazali su se kao izrazitiji citostatski agensi.

Razlike u veličini i obliku koljena kod krivulja citocidnog djelovanja nitroaromatskih spojeva mogu se objasniti kao odraz razlika u načinu i opsegu njihove interakcije sa staničnim metabolizmom. Osobito se u području slabije izražene toksičnosti snažno odražavaju razlike u većem ili manjem utjecaju na određene metaboličke procese u stanici. Kao što pokazuju rezultati ispitivanja te pojave (13, 20, 21), biološki učinak nitroaromatskih spojeva posljedica je interakcija s osnovnim energetskim procesima u stanici, s respiracijom i metabolizmom ugljikohidrata.

Literatura

1. Dodd, M. C., Stillman, W. B.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 82 (1944) 11.
2. Dam, O., Möller, E. F.: Chem. Ber., 80 (1947) 23.
3. Grunberg, E., Titsworth, E. H.: Ann. Rev. Microbiol., 27 (1973) 317.
4. Wardman, P.: Curr. Top. Radiat. Res. Quart., 11 (1977) 347.
5. Adams, G. E.: Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 4 (1978) 137.
6. Breccia, A., Rimondi, C., Adams, G. E.: Radiosensitizers of hypoxic cells, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1979.
7. Dische, S., Saunders, M. I., Flockhart, I. R., Lee, M. E., Anderson, P.: Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 5 (1979) 851.
8. Dische, S.: Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 4 (1978) 157.
9. Korbelik, M., Crnivec, R.: Period. Biol., 78 (1976) 181.
10. Chapman, J. D., Raleigh, J. A., Borsa, J., Webb, R. G., Whitehouse, R.: Int. J. Radiat. Biol., 21 (1972) 475.
11. Wheeler, K. T., Levin, V. A., Deen, D. F.: Radiat. Res., 76 (1978) 441.
12. Drewinko, B., Roper, P. A., Barlogie, B.: Eur. J. Cancer, 15 (1979) 93.
13. Bryan, G. T.: Nitrofurans: chemistry, metabolism, mutagenesis and carcinogenesis, Raven Press, New York, 1978.
14. Thomson, J. E., Rauth, A. M.: Radiat. Res., 60 (1974) 489.
15. Elkind, M. M., Whitmore, G. F.: The radiobiology of cultured mammalian cells, Gordon and Breach, New York, London, 1967.
16. Elkind, M. M., Sutton, H.: Radiat. Res., 13 (1960) 556.
17. Drewinko, B., Loo, T. L., Gottlieb, J. A.: Cancer Res., 36 (1976) 511.
18. Adams, G. E., Clarke, E. D., Jacobs, R. S., Stratford, I. J., Wallace, R. G., Wardman, P., Watts, M. E.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 27 (1976) 824.
19. Adams, G. E., Clarke, E. D., Jacobs, R. S., Stratford, I. J., Wardman, P., Parrick, J., Wallace, R. G., Smithen, C. E.: Int. J. Radiat. Biol., 35 (1979) 151.
20. Biaglow, J. E., Jacobson, B., Greenstock, C. L., Raleigh, J.: Mol. Pharmacol., 13 (1977) 269.
21. Korbelik, M.: Diferencijalna citotoksičnost heterocikličkih nitro spojeva. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 1979.

Summary

CYTOTOXICITY OF SOME NITROAROMATIC COMPOUNDS

The cytotoxicity of some nitroaromatic compounds used as drugs in the treatment of various diseases was studied on mammalian cells cultured *in vitro*. The cytotoxic effect of these compounds depends on two main parameters: on the time of incubation in the presence of the compound and on its concentration. The effect is exhibited in a relatively wide range of concentrations: from micromolar to millimolar.

The cytotoxic action of the nitroaromatic compounds on mammalian cell cultures is manifested as cytostatic and acute or as cytotoxic and chronic effect. Niklosamide and nitrofurantoin derivatives produce more pronounced cytostatic effects, while nitroimidazole derivatives, nitroxoline and nitrazepam exert cytostatic and cytotoxic effect in the same concentration range.

*Institute of Biophysics,
Medical Faculty, Edvard Kardelj University,
Ljubljana*

*Received for publication
December 17, 1979*