

*Aleksandra Augustyniak, Anna Niezgoda, Janusz Skolimowski¹⁾,
Renata Kontek, Alina Błaszczuk*

CYTOTOKSYCZNOŚĆ I GENOTOKSYCZNOŚĆ DIMERÓW ETOKSYQUINU^{*)}

Pracownia Cytogenetyki
Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. R. Osiecka

¹⁾ Katedra Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. J. Zakrzewski

Przebadano cytotoksyczność i genotoksyczność dwóch produktów utlenienia etoksyquinu (dimerów EQ), antyoksydanta stosowanego powszechnie w paszach i karmach dla zwierząt oraz jako pestycyd. Stwierdzono, że związki te obniżają żywotność limfocytów człowieka i indukują w nich uszkodzenia DNA.

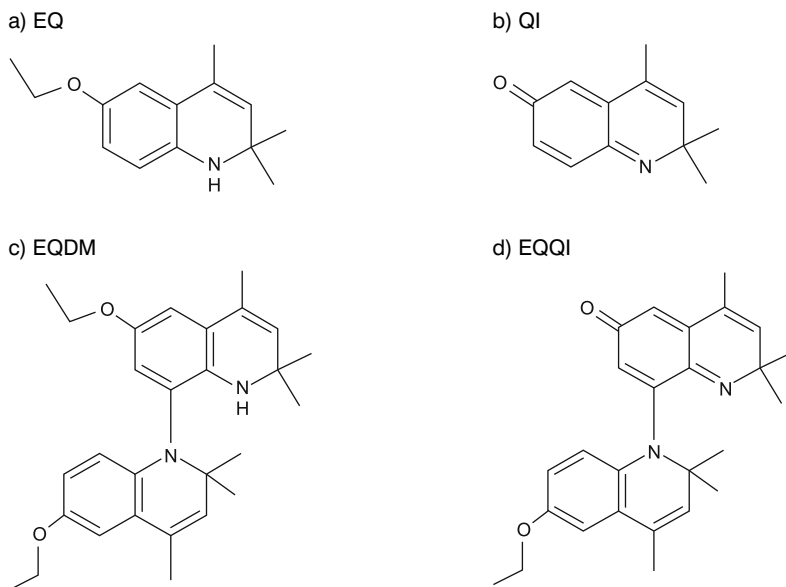
Hasła kluczowe: etoksyquin, antyoksydanty, cytotoksyczność, genotoksyczność, test komety.

Key words: ethoxyquin, antioxidants, cytotoxicity, genotoxicity, comet assay.

Stosowane w paszach dla zwierząt syntetyczne antyoksydanty chronią przed utlenianiem występujących w nich lipidów przedłużając ich trwałość i przydatność do spożycia. Etoksyquin (6-etoksy-2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolina, EQ) jest jednym z najpowszechniej stosowanych przeciwutleniaczy, wysoce efektywnym w wymiataniu wolnych rodników tlenowych i zapobieganiu reakcjom rodnikowym. Właściwości antyoksydacyjne posiadają również produkty jego utlenienia, a także jego pochodne oraz kompleksy z innymi cząsteczkami np. z kwercetyną (1, 2, 3, 4, 5). Etoksyquin stosowany jest głównie jako dodatek do pasz dla zwierząt hodowlanych i karm dla zwierząt domowych, ale dodawany jest również do mączki rybnej, sproszkowanej papryki i chili dla ochrony koloru tych przypraw, również jako pestycyd. Mimo tego, że EQ posiada antyoksydacyjne, jak i antykarcynogenne właściwości, u zwierząt spożywających karmę zawierającą ten związek, szczególnie u psów, obserwowano niekorzystne efekty uboczne (6). Było to prawdopodobnie spowodowane stosowaniem tego antyoksydanta w coraz większych ilościach, jego dodawaniem nie tylko do produktu końcowego ale także do półproduktów. W 1977 r. FDA (Agencja do spraw Żywności i Leków, USA) zaleciła producentom pasz obniżenie maksymalnej ilości EQ w karmach dla psów z dopuszczalnej dawki 150 mg kg⁻¹ do 75 mg kg⁻¹. Niekorzystne efekty związane z oddziaływaniem etoksyquinu obserwowano również u ludzi zawodowo narażonych na jego działanie (7).

^{*)} Praca finansowana przez Uniwersytet Łódzki (506/996).

Efekty uboczne stosowania EQ mogą wynikać nie tylko z działania tego związku, ale mogą być również spowodowane przez produkty jego utlenienia. Główne produkty utlenienia EQ, takie jak dimer EQ (6,6'-dietoksy-2,2,2',2',4,4'-heksametylo-1',2'-dihydro-2H-1,8'-bichinolina, EQDM), i chinolin-6(2H)-on (2,2,4-trimetylocholin-6-(2H)-on, QI), zostały wykryte przez *De Koninga* (5) w przechowywanych paszach i w mące rybnej. Stwierdzono, że okres półtrwania dimeru EQ był znacznie dłuższy niż okres półtrwania EQ. Produkty utlenienia EQ obserwowano również zarówno w surowym, jak i smażonym mięsie brojlerów, karmionych wcześniej paszą zawierającą EQ (8). W badaniach *Bohne* i współpr. (9), w których łososie atlantyckie karmiono przez 12 tyg. karmą z EQ, stwierdzono obecność w mięśniach ryb: EQ, dimeru EQ (EQDM), chinolin-6(2H)-onu (QI), EQ pozbawionego grupy etylowej oraz jednego niezidentyfikowanego związku. Stężenie EQ w mięśniach ryb było proporcjonalne do jego zawartości w paszy i czasu trwania ekspozycji. Obserwowano również podobną zależność jeśli chodzi o wzrost zawartości dimeru EQ (główny metabolit EQ) w mięśniach ryb, jak również sumy EQ i EQDM. *Bohne* i współpr. (9) uważają, że poziom EQ i jego metabolitów w mięśniach ryb może być przewidywany i kontrolowany na podstawie poziomu EQ w diecie. Dieta ryb hodowlanych nie jest jednak jedynym czynnikiem od którego zależy poziom EQ i jego metabolitów w mięśniach ryb (innymi mogą być np. masa i wiek ryby, poziom lipidów w diecie). W badaniach *Bohne* i współpr. (9) analizowano również, jak przebiega eliminacja EQ i EQDM z ciała ryb karmionych wcześniej paszą zawierającą EQ. Stwierdzono, że zalecany 14-dniowy okres karencji nie jest wystarczający dla usunięcia pozostałości EQ. Wprawdzie biologiczny czas życia samego EQ wyniósł



Ryc. 1. Budowa chemiczna związków wyjściowych i badanych dimerów.

Fig. 1. Chemical structure of the parent compounds and the tested dimers.

2,4 dnia, to jednak eliminacji etoksyquinu towarzyszył jednocześnie wzrost poziomu dimeru EQ, którego okres półtrwania jest znacznie dłuższy. Po 14-dniowym okresie karencji EQDM stanowił 99% sumy EQDM i EQ wykrywanych w mięsie badanych łososi. Podobne poziomy EQ i EQDM wykrywano w mięśniach innych ryb hodowlanych, np. halibuta czy pstrąga tęczowego (10). Ryby hodowlane są prawdopodobnie głównym źródłem narażenia konsumentów w Europie na działanie EQ. *Lundebye* i współpr. (10) stwierdzili, że ekspozycja na etoksyquin wynikająca ze spożycia 300 g porcji ryby sięga 15% ADI. Biorąc jednak pod uwagę obecność w mięsie również metabolitów EQ, głównie jego dimeru (EQDM) ta ekspozycja może być wyższa, bliska wartości ADI (10).

Oddziaływanie produktów utlenienia EQ na komórki człowieka nie było do tej pory badane. Celem pracy była ocena cytotoksyczności i genotoksyczności EQDM (6,6'-dietoksy-2,2,2',2',4,4'-heksametylo-1',2'-dihydro-2H-1,8'-bichinolina) oraz innego dimeru (EQQI; 6-etoksy-2,2,2',2',4,4'-heksametylo-2H-1,8'-bichinolin-6'(2'H)-on) będącego kombinacją cząsteczek etoksyquinu (6-etoksy-2,2,4-trimetylo-1,2-dihydrochinolina) oraz chinolin-6(2H)-onu (2,2,4-trimetylocholin-6(2H)-on) (ryc. 1). Badania wykonano z wykorzystaniem limfocytów człowieka.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były dimery EQ: EQDM (6,6'-dietoksy-2,2,2',2',4,4'-heksametylo-1',2'-dihydro-2H-1,8'-bichinolina; $C_{28}H_{36}N_2O_2$) oraz EQQI (6-etoksy-2,2,2',2',4,4'-heksametylo-2H-1,8'-bichinolin-6'(2'H)-on; $C_{26}H_{30}N_2O_2$) zsyntetyzowane w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego. Toksyczne działanie badanych związków przebadano z wykorzystaniem limfocytów człowieka zakupionych w Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi. Komórki zawieszono w podłożu RPMI 1640 (2×10^5 limfocytów na 1 cm^3) poddawano działaniu testowanych związków rozpuszczonych w etanolu przez 1 godz. w temp. 37°C . Doświadczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach, w każdym z nich wykonano dwie próby dla każdego stężenia danego związku.

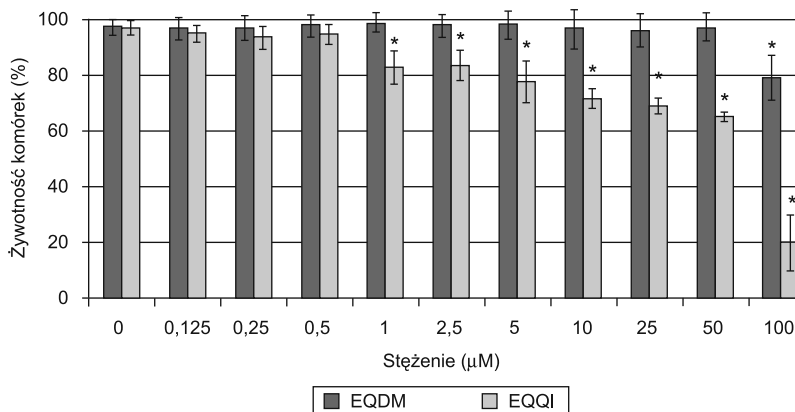
Dla oceny żywotności komórek zastosowano stęż. od 0,125 do $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Po inkubacji komórek z badanymi związkami do zawiesiny komórkowej dodawano błękit trypanu o stęż. 0,4%, który wybarwia na kolor niebieski komórki martwe (żywe pozostają niewybarwione). Liczbę komórek żywych i martwych analizowano w mikroskopie świetlnym Nikon Optiphot 2 zliczając po 200 komórek w każdej próbce badanej.

Genotoksyczność badanych związków oceniono w teście komety (elektroforeza komórek w żelu agarozowym), w którym możliwe jest zaobserwowanie zaindukowanych uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach. Komórki z uszkodzonym DNA wyglądem przypominają komety, ponieważ fragmenty DNA wędrują w polu elektrycznym. Nieuszkodzony DNA pozostaje na miejscu tworząc głowę komety. Test wykonano zgodnie z procedurą *Singha* i współpr. (11). Badane związki zastosowano w stęż. od 0,125 do $0,5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Wykonano również kontrolę pozytywną z zastosowaniem nadtlenu wodoru ($20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Po traktowaniu, komórki zawieszono w agarozie o stęż. 0,75% o niskiej temperaturze topnienia naniesiono na szkiełka

podstawowe pokryte uprzednio żelazem przygotowanym z agarozy o normalnej temperaturze topnienia. Po zestaleniu agarozy komórki poddawano działaniu roztworu lizującego ($2,5 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$, $100 \text{ milimol/dm}^3 \text{ EDTA}$, $10 \text{ mmol/dm}^3 \text{ Tris}$, $1\% \text{ N-laurylosarkozyna}$, $1\% \text{ Triton X-100}$), a następnie elektroforezie w buforze elektroforetycznym ($1 \text{ milimol/dm}^3 \text{ EDTA}$, $300 \text{ mmol/dm}^3 \text{ NaOH}$; $0,73 \text{ V/cm}$, 300 mA , 20 min , 4°C). Po neutralizacji preparaty barwiono barwnikiem DAPI ($1 \mu\text{g/cm}^3$) i analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym (Olympus BX60F5; 360 nm). Poziom uszkodzeń DNA (procent DNA w ogonie) oceniano za pomocą oprogramowania do analizy obrazów CASP (12). Analizowano po 50 komórek z każdej badanej próbki. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm błąd standardowy (S.E.M.). Analizę statystyczną wykonano stosując test *U Manna-Whitney'a* (próby z rozkładem nienormalnym) lub test *t-Studenta* (próby z rozkładem normalnym).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

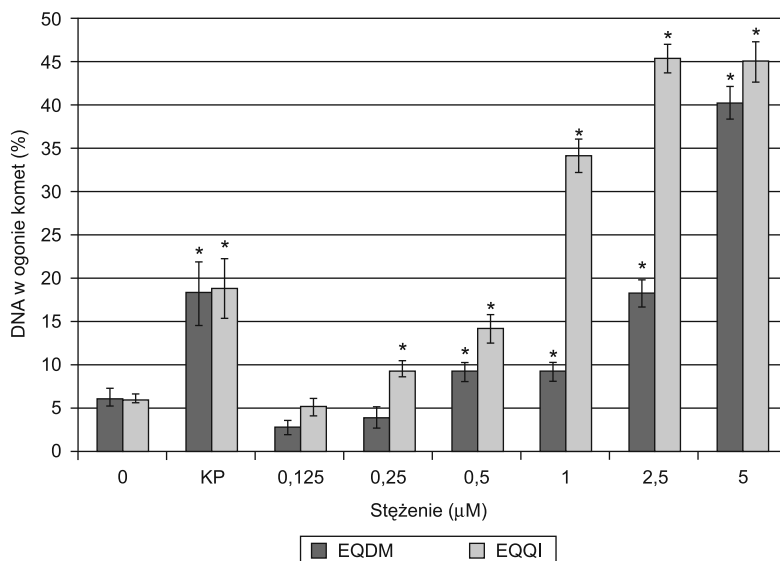
Celem przeprowadzonych badań była ocena cytotoksyczności i genotoksyczności dwóch dimerów etoksyquinu: EQDM, który jest kombinacją dwóch cząsteczek etoksyquinu oraz EQQI, będącego kombinacją cząsteczek EQ i chinolin-6(2H)-onu (QI). W literaturze dostępne są jedynie ograniczone dane dotyczące efektów działania pierwszego z tych związków. Badania wykazały, że EQDM, podobnie jak etoksyquin, wykazuje właściwości antyoksydacyjne (13). Toksykologiczne efekty EQDM badane były przez *Ørnsrud* i współpracowników (14); autorzy stwierdzili, że podawanie badanego związku przez 90 dni szczurom F344 powodowało aktywację enzymów I i II fazy detoksykacji, które aktywowane są również przez EQ. Więcej informacji dostępnych jest na temat toksycznego działania etoksyquinu. Związek ten był cytotoksyczny dla limfocytów człowieka po zastosowaniu go w stęż. $100 \mu\text{mol/dm}^3$ i wyższych; redukował on żywotność komórek i indukował apoptozę (15, 16). Po działaniu EQ w stęż. $1\text{--}50 \mu\text{mol/dm}^3$ obserwowano również uszkodzenia DNA w teście komety (15). Antyoksydant ten w wyższych stężeniach indukował również powstawanie aberracji chromosomowych (17). Cytotoksyczność i genotoksyczność EQ mogą być jedną z przyczyn niekorzystnych efektów zdrowotnych obserwowanych u zwierząt i ludzi mających zawodowy kontakt z tym antyoksydantem (6, 7). Wyniki uzyskane w pracy wskazują, że nie tylko EQ ale także produkty jego utlenienia mogą być odpowiedzialne za efekty uboczne stosowania tego związku w karmach dla zwierząt. Oba badane dimery EQ powodowały efekty cytotoksyczne i genotoksyczne (ryc. 2 i 3). EQQI powodował silniejszy efekt cytotoksyczny w porównaniu z EQDM (ryc. 2). EQDM obniżał żywotność limfocytów człowieka jedynie w stęż. $100 \mu\text{mol/dm}^3$ (żywotność $79,3\%$ w porównaniu z żywotnością na poziomie $97,3\%$ w kontroli negatywnej); po zastosowaniu niższych stężeń EQDM prawie wszystkie komórki pozostawały żywe (96% lub więcej). Z drugiej strony po traktowaniu komórek EQQI redukcję żywotności komórek obserwowano począwszy od stęż. $1 \mu\text{mol/dm}^3$; po zastosowaniu najwyższego badanego stężenia żywotność komórek była na poziomie $19,8\%$. Silniejszy efekt cytotoksyczny EQQI może wynikać z obecności chinolin-6(2H)-onu (QI) w cząsteczce dimeru. QI jest jednym z produktów utlenienia EQ, który jest wykrywany w paszy dla zwierząt traktowa-



Ryc. 2. Żywotność komórek obserwowana po 1-godz. traktowaniu badanymi dimerami (EQDM i EQQI).

* Statystycznie istotna różnica w porównaniu z kontrolą ujemną (kontrola z etanolem użytym jako rozpuszczalnik związków; 0,5%, v/v).

Fig. 2. Cells viability observed after 1-h treatment with the tested dimers (EQDM and EQQI).



Ryc. 3. Wyniki testu komety przedstawione jako średnie wartości procentu DNA w ogonach komet \pm S.E.M. uzyskane po 1 godz. traktowaniu limfocytów EQDM (A) lub EQQI (B).

KP – nadtlenek wodoru ($20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$); kontrola pozytywna.

* Statystycznie istotny wzrost w porównaniu z kontrolą ujemną (kontrola z etanolem użytym jako rozpuszczalnik związków; 0,5%, v/v).

Fig. 3. Results of the comet assay expressed as mean values of the percentage of DNA in comet tails \pm S.E.M. obtained after 1-h lymphocyte treatment with EQDM (A) or EQQI (B).

KP – hydrogen peroxide ($20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$); the positive control.

nej wcześniej EQ, a także w mięśniach ryb, np. łososia atlantyckiego, karmionych paszą zawierającą ten antyoksydant (9). Toksyczność QI nie była dotąd badana ale uzyskane wyniki pośrednio wskazują, że związek ten może być cytotoksyczny dla limfocytów człowieka. Jest to również widoczne, gdy analizujemy wyniki testu komety. W teście tym, zgodnie z obowiązującym protokołem, zastosowano niższe stężenia badanych związków od tych użytych w metodzie barwienia błękitem trypanu, takie, które nie obniżały istotnie żywotności limfocytów (ryc. 3). Zarówno EQDM, jak i EQQI powodowały statystycznie istotny wzrost poziomu uszkodzeń DNA w porównaniu z kontrolą negatywną, począwszy od stężenia, odpowiednio, 0,5 $\mu\text{m}/\text{dm}^3$ i 0,25 (ryc. 3). Poziom uszkodzeń DNA obserwowany po zastosowaniu badanych związków w poszczególnych stężeniach był zawsze wyższy w przypadku użycia EQQI.

WNIOSKI

Przedstawione powyżej wyniki wskazują, że badane dimery EQ obniżają żywotność komórek i indukują w nich uszkodzenia DNA, podobnie jak wyjściowy związek – EQ. Ponieważ produkty oksydacji EQ są obecne w paszach dla zwierząt, a także mogą być obecne w tkankach ryb i drobiu, które są spożywane przez człowieka, mogą one oddziaływać również na jego organizm. Poziom pozostałości niezmienionego EQ wykrywany w komercyjnie dostępnych produktach żywnościowych jest zawsze poniżej wartości MRL (dopuszczalny poziom pozostałości) (18), jednakże poziomy produktów oksydacji etoksyquinu takich, jak dimer EQ czy chinolin-6(2H)-on (OI) nie są kontrolowane. Biorąc pod uwagę to, że okres półtrwania dimeru EQ (EQDM) jest znacznie dłuższy niż okres półtrwania wyjściowego EQ, to produkt jego utlenienia może dostawać się do organizmu człowieka i powodować niekorzystne efekty uboczne. Powinny więc być podejmowane badania mające na celu ocenę możliwości narażenia organizmu człowieka na produkty utlenienia EQ i ich poziomu w spożywanych przez konsumentów produktach.

A. Augustyniak, A. Niezgoda, J. Skolimowski,
R. Kontek, A. Błaszczyk

CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF ETHOXYQUIN DIMERS

Summary

Ethoxyquin dimer (EQDM) and quinolone (QI) are the main oxidation products of ethoxyquin (6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline, EQ), an antioxidant commonly used in animal feeds. This study analyses cytotoxicity and genotoxicity of two EQ dimers: ethoxyquin dimer (EQDM) formed as the result of combination of two EQ molecules and EQQI formed by combination of EQ and QI molecules. Viability of human lymphocytes treated with those compounds was assessed by trypan blue exclusion assay. The alkaline single cell gel electrophoresis assay (comet assay) was used to determine DNA damage induced by the compounds. The cells were treated for 1 h with EQDM or EQQI at doses ranging from 0.125 μM to 100 μM . The results show that both compounds reduced cell viability: EQDM when it was used at 100 μM , and EQQI when used at concentrations ranging from 1 μM to 100 μM . Both EQ dimers have been shown to be genotoxic, while EQQI caused more DNA damage.

PIŚMIENICTWO

1. Skolimowska U., Skolimowski J., Wędzisz A.: Badanie właściwości przeciwutleniających 1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4,7-tetrametylocholinoliny (THTMQ). *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2009; 42(4): 1111-1116.
- 2. Skolimowska U., Skolimowski J., Wędzisz A.: Wpływ kompleksu etoxyquin-palmitynian askorbylu na trwałość oleju wiesiołkowego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 38(3): 259-264.
- 3. Skolimowska U., Skolimowski J., Wędzisz A.: Wpływ kompleksu etoxyquin-kwercetyna na trwałość oleju wiesiołkowego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2006; 39(2): 135-140.
- 4. Skolimowska U., Skolimowski J., Wędzisz A.: Wpływ soli etoxyquin-kwas salicylowy [EQ-S] na trwałość oleju wiesiołkowego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2007; 40(4): 351-357.
- 5. de Koning A.J.: The antioxidant etoxyquin and its analogues: A review. *Int. J. Food Prop.*, 2002; 5(2): 451-461.
- 6. Dzanis D.A.: Safety of etoxyquin in dog foods. *J. Nutr.* 1991; 12: S163-S164.
- 7. Alanko K., Jolanki R., Estlander T., Kanerva L.: Occupational 'multivitamin allergy' caused by the antioxidant etoxyquin. *Contact Dermatitis*, 1998; 39(5): 263-264.
- 8. Hobson-Froehock A.: Residues of etoxyquin in poultry tissues and eggs. *J. Sci. Food Agricult.*, 1982; 33(12): 1269-1274.
- 9. Bohne V.J.B., Lundebye A.K., Hamre K.: Accumulation and depuration of the synthetic antioxidant etoxyquin in the muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Chem. Toxicol.*, 2008; 46(5): 1834-1843.
- 10. Lundebye A.K., Hove H., Mage A., Bohne V.J.B., Hamre K.: Levels of synthetic antioxidants (ethoxyquin, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole) in fish feed and commercially farmed fish. *Food Add. Contam.*, 2010; 27(12): 1652-1657.
11. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 1988; 175(1): 184-191.
- 12. Koňca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., Koza Z., Wojcik A.: A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat. Res.*, 2003; 534(1-2): 15-20.
- 13. Skolimowska U., Skolimowski J., Wędzisz A.: Badanie właściwości przeciwutleniających dimeru 1,8-ethoxyquinu. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011; 44(2): 188-193.
- 14. Ørnsrud R., Arukwe V., Bohne A., Pavlikova N., Lundebye A.K.: Investigations on the metabolism and potentially adverse effects of etoxyquin dimer, a major metabolite of the synthetic antioxidant etoxyquin in Salmon muscle. *J. Food Protect.*, 2011; 74(9): 1574-1580.
- 15. Blaszczyk A.: DNA damage induced by etoxyquin in human peripheral lymphocytes. *Toxicol. Lett.*, 2006; 163(1): 77-83.
- 16. Blaszczyk A., Skolimowski J.: Apoptosis and cytotoxicity caused by etoxyquin and two of its salts. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2005; 10(1): 15-21.
- 17. Blaszczyk A., Osiecka R., Skolimowski J.: Induction of chromosome aberrations in cultured human lymphocytes treated with etoxyquin. *Mutat. Res.*, 2003; 542(1-2): 117-128.
- 18. Aoki Y., Kotani A., Miyazawa N., Uchida K., Igarashi Y., Hirayama N., Hakamata H., Kusu F.: Determination of etoxyquin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and its application to the survey of residues in food products of animal origin. *J. AOAC Int.*, 2010; 93(1): 277-283.

Adres: 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16.