

MUTAGÉNNÉ ÚČINKY KAMENNOUHOĽNÉHO DECHTU POUŽÍVANÉHO PRI LIEČBE PSORIÁZY

GARDOŠOVÁ D., MEZENECVOVÁ V., KALINA I., HEJF F., KOPKA M., PETROVIČOVÁ J.

MUTAGENIC EFFECTS OF FARMACEUTICAL COAL TAR IN PSORIATIC PATIENTS

Background: Pharmaceutic tar used in the treatment of psoriasis has a high contents of polycyclic aromatic carbohydrates which are considered to be carcinogenic.

Aim: The study is aimed at the estimation of the genotoxic risk arising from the treatment of psoriatic patients by pharmaceutic tar. The estimation is performed by biomonitoring.

Methods: The used methods included: bacterial test on TA 98 strain of *Salmonella typhimurium* aimed at the assessment of mutagenity of urine and cytogenetic test aimed at the assessment of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes.

Results: The exposition of psoriatic patients to pharmaceutic tar significantly increased the index of mutagenity as an index of the presence of mutagen in urine, as well as the occurrence of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes.

Conclusions: The results of monitoring have indicated that psoriatic patients treated by pharmaceutic tar are endangered by an increased genotoxic risk. (Tab. 2, Ref. 17.)

Key words: pharmaceutic tar, psoriasis, polycyclic aromatic carbohydrates, chromosomal aberrations, mutagenity of urine, genetic risk.

Pozadie problému: Farmaceutický spracovaný kamennouhoľný decht (FKD) používaný pri liečbe psoriázy má vysoký obsah polycyklických aromatických uhľovodíkov, ktoré sa považujú za karcinogény.

Cieľ: Cieľom práce bolo pomocou biomonitorovania zistiť genotoxické riziko u psoriatických pacientov liečených farmaceutickým kamennouhoľným dechtom.

Metódy: Ako metódy sme použili bakteriálny test na kmeni *Salmonella typhimurium* TA 98, pre stanovenie mutagenity moču a cytogenetický test, pre stanovenie výskytu chromozómových aberácií v periférnych lymfocytoch.

Výsledky: Expozícia psoriatických pacientov FKD významne zvyšovala index mutagenity ako ukazovateľa prítomnosti mutagénov v moči, ako aj výskyt chromozómových aberácií v periférnych lymfocytoch.

Záver: Výsledky biomonitorovania ukázali, že psoriatickí pacienti liečení FKD majú zvýšené genotoxické riziko. (Tab. 2, lit. 17.)

Kľúčové slová: farmaceutický kamennouhoľný decht, psoriáza, polycyklické aromatické uhľovodíky, chromozómové aberácie, mutagenita moču, genetické riziko.

Bratisl Lek Listy 1997; 98: 146–149

Bratisl. lek. Listy, 98, 1997, č. 3, s. 146–149

Farmaceutický kamennouhoľný decht (FKD), ktorý sa používa pri liečbe proliferatívneho epidermálneho ochorenia — psoriázy má vysoký obsah polycyklických aromatických uhľovodíkov (PAU) najmä benzo-a-pyrénu (Lijinski a spol., 1963). Výsledky experimentov u zvierat (Kipling, 1976) a epidemiologických štúdií u ľudí (IARC, 1984, 1985) potvrdili, že PAU majú mutagénne a karcinogénne účinky. Pozitívny vplyv PAU na výskyt rakovinového ochorenia podnietil záujem o biomonitorovanie genotoxických účinkov u psoriatických pacientov exponovaných vysokým povrchovým dávkam FKD. Ako biomarker biotoxicity FKD sa sledoval obsah PAU a ich metabolitov v moči, mutagenita moču

(Wheeler a spol., 1981; Venier a spol., 1985; Clonfero a spol., 1989), frekvencia chromozómových aberácií a sesterských chromatidových výmen (Sarto a spol., 1989; Mezencevová a spol., 1994) a DNA a proteínové addukty (Santella a spol., 1995). V predkladanej práci uvádzame výsledky biomonitorovania mutagenity FKD u psoriatických pacientov pri použití bakteriálneho testu pre hodnotenie mutagenity vzoriek moču a cytogenetického testu pre hodnotenie výskytu chromozómových aberácií v periférnych lymfocytoch.

Materiál a metódy

Klinický súbor tvorilo 34 psoriatických pacientov (s priemerým vekom 41,94 roka) liečených farmaceutickým kamennouhoľným dechtom (FKD) na Kožnej klinike FNŠP v Košiciach. Súbor

Tab. 1. Chromozómové aberácie v periférnych lymfocytoch u psoriatických pacientov liečených prípravkom obsahujúcim kamennouhoľný decht Pix lithantracis.**Tab. 1. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of psoriatic patients treated with coal tar (Pix lithantracis).**

Vyšetované skupiny Examined groups	Počet osôb Number of persons	Hodnoty chromozómových aberácií/deň Values of chromosome aberrations/day		
		(0.)	(14.)	(28.)
kontrola control	20	1,46±0,12		
psoriatickí pacienti psoriatic patients	34	2,08±0,26	2,97±0,41	2,91±0,33
fajčiari smokers	17	2,11±0,25	3,24±0,51	3,05±0,48
nefajčiari nonsmokers	17	2,05±0,27	2,67±0,35	2,76±0,20
vek pacientov age of patients				
<40	16	1,87±0,22	2,59±0,39	2,62±0,22 ^a
>40	18	2,27±0,28	3,27±0,47	3,16±0,44

^a p<0,05 medzi vekovými kategóriami u pacientov pred začatím liečby p<0,05 between age categories in patients before treated

sa skladal z 30 mužov a 4 žien, z toho 17 fajčiarov a 17 nefajčiarov. Pacienti boli vyšetrení pred terapiou, počas terapie a po terapii dechtovými externami. Počas liečebného cyklu neboli pod vplyvom iných liekov. Každý pacient bol poučený o dôležitosti zachovania sterility a nekontaminácie vzoriek moču FKD počas odboru.

Intaktná kontrola pre vyšetrenie periférnych lymfocytov pozostávala z 20 pracovníkov Ústavu lekárskej biológie LF v Košiciach s priemerným vekom 36,1 roka.

Terapeutikum: Pre liečebné účely sme použili kamennouhoľný decht — Pix lithantracis vo forme 10—40 % tinktúry, ktorý pozostáva zo zmesi najmenej 10 000 rôznych komponentov prevažne PAU, z ktorých len približne 500 bolo izolovaných a chemicky charakterizovaných, (Fadrhonicová, 1990) sa vyznačuje obsahom benzolových derivátov, anilínových, chinolínových a akridínových báz, antracénu, chryzénu a karbazolu (Farber, 1992).

Kultivácia buniek: Periférne lymfocyty sme kultivovali 48 hodín v 7,5 ml média RPMI 1640 (ÚSOL Praha) obohatenom o 20 % telefacieho séra, glutamín, hydrogénuhlíčan sodný a fytohemaglutinín (PHA, Welcome, stimulujúci mitotické delenie) v termostate pri teplote 37 °C. Dve hodiny pred ukončením kultivácie sme do bunkových kultúr pridali kolchicín (SERVA) 0,4 µl/ml média na zastavenie bunkového delenia v metafáze. Po hypotonizácii buniek (0,075 M KCl, 10 minút) a fixácii (Ibraimov roztok, roztok metanolu a kyseliny octovej v pomere 3:1, metanol) sme bunkovú suspenziu nakvapkali na mokré podložné sklíčka a po vyschnutí sme ich farbili Giemsovým farbivom (5 minút). Z každej vzorky sme hodnotili 100 metafáz so 46 chromozómami. Ako chromozómové aberácie (CA) sme hodnotili chromozómové a chromatidové zlomy, translokácie, bez gapov. Štatistickú významnosť rozdielov medzi porovnávanými skupinami sme hodnotili t-testom na troch úrovniach (na 5 % p<0,05; 1 % p<0,01; 0,1 % p<0,001).

Vzorky moču: Vzorky ranného moču pacientov sme testovali pred začatím liečebného cyklu, po 14 a po 28 dňoch liečenia. Moč sme uchovávali v sklenených fľašiach s objemom 50—100 ml pri -30 °C. Pred testovaním sme vzorky moču rozmrazili vo vodnom kúpeli pri 45—55 °C, filtrovali (Filtrak 388, GDR) a prepustili cez sklenú kolónu (2,6x50 cm) s 20 g Separónu (Tessek, Praha). Aktívne látky boli adsorbované pri prietoku moču kolónou 6—10 min a eluované 50 ml acetónu. Eluát bol odparený (RVO-64, Sklo-Union, Praha) pri teplote do 45 °C a odparok rozpustený v 2 ml dimetylsulfoxidu (DMSO).

Stanovenie mutagénnej aktivity moču: Mutagénnu aktivitu močových extraktov sme stanovili štandardnou platňovou metódou podľa (Maron, 1983) na bakteriálnom kmeni Salmonella typhimurium TA 98 (Bakteriálna zbierka mikroorganizmov, Brno), ktorý deteguje posunové mutácie v prítomnosti aj neprítomnosti metabolického aktivačného systému (500 µl S-9 mix/misku; obsahujúcej 10 % S-9 homogenát). Mikrozomálnu frakciu sme pripravili z pečene potkanov (kmeňa Wistar), indukovali Delorom 103 (Chemko, š.p. Strážske) a obsahovala 196,75 mg proteínov/ml. Platne s bakteriálnymi kultúrami sme inkubovali v termostate počas 72 hodín pri 37 °C. *Negatívna kontrola* pozostávala z 0,1 ml baktérií, 0,1 ml rozpúšťadla (DMSO) a 0,5 ml S-9 frakcie. Ako *pozitívny mutagén* v prítomnosti enzymatickej frakcie (S9) sme zvolili 2-aminofluorén (Serva) s dávkou 20 µg/misku a s priemerným počtom indukovaných revertantov 122±21, a v neprítomnosti enzymatickej frakcie daunomycín (Serva) s dávkou 6 µg/misku a priemerným počtom 94±18 revertantov. Priemerná hodnota spontánne revertovaných kolónií v systéme bez aktivačnej zmesi bola 19,38±1,22 revertantov a v systéme s aktiváciou 27,96±0,82 revertantov. Pri vyhodnocovaní mutagenity sme považovali za pozitívne také výsledky, pri ktorých index mutagenity presiahol hodnotu 2. Index mutagenity bol stanovený na základe pomeru počtu revertovaných kolónií po ovplyvnení mutagénom a počtu spon-

Tab. 2. Mutagénna aktivita močových extraktov u psoriatických pacientov liečených prípravkom obsahujúcim kamennouhoľný decht Pix lithanthracis.**Tab. 2. Mutagenic activity of urine samples in psoriatic patients treated with coal tar (Pix lithanthracis).**

Vyšetované skupiny Examined groups	Počet osôb Number of persons	Hodnoty indexu mutagenity moču/deň Values of index mutagenicity of urine/day		
		(0.)	(14.)	(28.)
kontrola control	20	1,19±0,11		
psoriatickí pacienti psoriatic patients	34	2,49±0,21 ^a	2,82±0,19 ^a	2,67±0,20 ^a
fajčiari smokers	17	2,56±0,19	3,08±0,21 ^b	2,90±0,17
nefajčiari nonsmokers	17	2,36±0,10	2,58±0,18	2,43±0,15
vek pacientov age of patients				
<40	16	2,45±0,09	2,84±0,24	2,64±0,27
>40	18	2,54±0,26	2,85±0,29	2,63±0,27

^ap<0,05 v porovnaní s indexom mutagenity u kontrol p<0,05 compared to control ^bp<0,05 v porovnaní s nefajčiarimi po 14 dňoch liečby p<0,05 compared to nonsmokers after 14 day-treatment

tánne revertovaných kolónií. Pri štatistickom spracovaní výsledkov sme pacientov rozdelili do troch skupín: 1. pacienti pred liečbou (0. deň); 2. pacienti počas liečby (14. deň); 3. pacienti po ukončení liečby (28. deň). Každú z týchto skupín sme rozdelili na dve podskupiny: fajčiari a nefajčiari; pacienti do 40 rokov veku a nad 40 rokov. Štatistickú významnosť rozdielov medzi porovnávanými skupinami sme hodnotili analýzou variancií a Studentovým t-tesom.

Výsledky

Výskyt chromozómových aberácií v periférnych lymfocytoch v kontrolnej skupine a u psoriatických pacientov liečených FKD je v tabuľke 1. Expozícia FKD má za následok signifikantné zvýšenie hladiny chromozómových aberácií u psoriatických pacientov (p<0,05) s prevahou chromatidových zlomov. Výskyt chromozómových aberácií bol mierne zvýšený v podskupine pacientov s vyšším vekom (>40 rokov). Fajčenie neovplyvňovalo hladinu chromozómových aberácií v sledovanej podskupine. V tabuľke 2 sú uvedené hodnoty indexu mutagenity revertovaných kolónií u bakteriálneho kmeňa TA 98 po aplikácii extraktu moču psoriatických pacientov a kontrolnej skupiny. Výsledky ukázali, že hodnoty indexu mutagenity sú u liečených pacientov vyššie s tým, že sme zaznamenali signifikantne vyššie rozdiely (p<0,05) v podskupine pacientov — fajčiarov.

Diskusia

Biomonitorovanie u psoriatických pacientov liečených FKD odhalilo zvýšený obsah PAU a ich metabolitov v moči (Jongeneelen a spol., 1986; Clonfero a spol., 1995, 1989; Sarto a spol., 1989) a zvýšenú mutagénnu aktivitu vzoriek moču (Whiller a spol., 1981; Clonfero a spol., 1989), čo nasvedčuje, že xenobiotiká nachádzajú

ce sa vo FKD sa absorbujú kožou pacientov. S údajmi o zvýšenej mutagenite moču v bakteriálnom teste sú v zhode aj naše skôr publikované výsledky (Gardošová a spol., 1994), ako aj výsledky uvedené v tejto práci, ktoré poukazujú na zvýšený výskyt indexu mutagenity u všetkých vyšetovaných pacientov. Variabilitu mutagénnej aktivity vzoriek moču, ktorú sme pozorovali u psoriatických pacientov, môžeme vysvetliť rozdielnou schopnosťou absorpcie genotoxických látok obsiahnutých vo FKD kožou, rozdielnym metabolizmom PAU, ako aj dietetickými odlišnosťami u sledovaných pacientov. Navyše naše výsledky dokazujú, že vzorky moču pacientov — fajčiarov sú mutagénnejšie ako u pacientov — nefajčiarov, čo ukazuje aditívny, alebo synergický účinok inhalovaných PAU na vylučovanie mutagénnych metabolitov v moči. Mutagénne účinky FKD hodnotené na základe cytogenetickej analýzy sa zistili u 6 psoriatických pacientov (Sarto a spol., 1984), u ktorých autori pozorovali zvýšené hodnoty chromozómových aberácií a sesterských chromatidových výmien. Naše výsledky sú v zhode s uvedeným nálezom s tým, že frekvencia výskytu chromozómových aberácií u pacientov s vyšším vekom bola vyššia v porovnaní s mladšími psoriatickými pacientmi. Napriek tomu, že v literatúre sa údaje o výskyte rakoviny kože u psoriatických pacientov liečených FKD rozchádzajú, pozorované výsledky o zvýšenom obsahu mutagénov v moči, o zvýšenej hladine chromozómových aberácií v periférnych lymfocytoch, ako aj o zvýšenom počte DNA adduktov poukazujú na zvýšené genotoxické riziko u týchto pacientov.

Literatúra

Clonfero E., Zordan M., Venier P., Paleologo M., Levis G., Cottica D., Pozzoli L., Jongeneelen J.F., Bos P.R., Anzion, M.B.R.: Biological monitoring of human exposure to coal tar. Urinary excretion of total polycyclic aromatic hydrocarbons, 1-hydroxypyrene and mutagens in psoriatic patients. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 61, 1989, s. 363–368.

- Clonfero E., Granello M., Marchioro M., Leopardi E.:** Urinary excretion of mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis*, 16, 1995, č. 3, s. 547—554.
- Fadrhonočová A.:** Farmakoterapie kožných nemocí. Praha, Avicenum 1990, 305 s.
- Farber E.M.:** History of the treatment of psoriasis. *J. Amer. Acad. Derm.*, 27, 1992, č. 4, s. 640—645.
- Gardošová D., Kalina I., Hejj F., Mezeceňová V., Šalagovič J., Némethová G.:** Mutagénna aktivita moču psoriatických pacientov liečených farmaceutickým kamennohoľným dechtom. *Čas. Lék. čes.*, 133, 1994, č. 15, s. 463—466.
- IARC:** Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to human. IARC, Lyon, 35, 1985, s. 83—159.
- IARC:** Polynuclear aromatic compounds. Part 1. Chemical environmental and experimental data, IARC, Monographs, 32, 1984, s. 447.
- Jongeneelen F.J., Bos R.P., Anzion R.B.M., Theuvs J.L.G., Henderson P.Th.:** Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolites in urine. *Scand. J. Work Environ. Health*, 12, 1986, s. 137—143.
- Kipling M. D.:** Soots, tars and oils as causes of occupational cancer, chemical carcinogenesis. Searle C.E. (Ed.). ACS, 1976, s. 315—320.
- Lijinski W., Domsy I., Mason G., Ramahy H.Y., Savafi T.:** The chromatographic determination of trace amounts of polynuclear hydrocarbons in petrolatum, mineral oil and coal tar. *Anal. Chem.*, 35, 1963, s. 952—956.
- Maron D., Ames B.N.:** Revised methods for the Salmonella test. *Mutat. Res.*, 113, 1983, s. 73—215.
- Mezeceňová V., Šalagovič J., Némethová G., Hejj F., Kalina I., Gardošová D.:** Výskyt chromozómových aberácií v periférnych lymfocytoch psoriatických pacientov liečených farmaceutickým kamennohoľným dechtom. *ČS. Dermatol.*, 1994.
- Santella R.M., Perera F.P., Young T.L., Zhang Y.J., Chiamprasert S., Tang D., Wang L.W., Beachman A., Lin J.H., DeLeo V.A.:** Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA and protein adducts in coal tar treated patients and controls and their relationship to glutathione S-transferase genotype. *Mutat. Res. Environm.*, 344, 1995, s. 117—124.
- Sarto F., Zordan M., Tomanin R., Mazzotti D., Canova A., Cardin E.L., Bezze G., Levis G.A.:** Chromosomal alterations in peripheral blood lymphocytes, urinary mutagenicity and excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons in six psoriatic patients undergoing coal tar therapy. *Carcinogenesis*, 10, 1989, s. 329—334.
- Sarto F., Faccioli M.C., Comonato I., Levis A.G.:** Aging and smoking increase the frequency of sister chromatid exchanges (SCE) in man. *Mutat. Res.*, 144, 1984, s. 183—187.
- Venier P., Clonfero E., Cottica D., Gava C., Zorda M., Pozzoli L., Levis A.G.:** Mutagenic activity and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in urine of workers exposed to coal tar pitch volatiles in an anode plant. *Carcinogenesis*, 6, 1985, s. 749—752.
- Wheeler L.A., Saperstein M.D., Lowe N.J.:** Mutagenicity of urine from psoriatic patients undergoing treatment with coal tar and ultraviolet light. *J. Invest. Dermatol.*, 77, 1981, s. 181—185.

Do redakcie došlo 1.2.1996.

INFORMÁCIE

ODBORNÉ PODUJATIA SLOVENSKEJ KARDIOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI

Cardiology Update 1997

17.—20. september 1997, Smolenice

Podujatie organizuje Nadácia Srdce k srdcu, Slovenská kardiologická spoločnosť, Ústav pre výskum srdca SAV, Lekárska fakulta UK pod záštitou International Society and Federation of Cardiology. Rokovací jazyk: angličtina.

Témy: Prevention and rehabilitation in cardiology, Epidemiology, Cardiovascular disease research, Cardiovascular health policy of the 21st century.

Kontakt: Doc. MUDr. R. Slezák, DrSc., Ústav pre výskum srdca SAV, Dúbravská cesta 9, 842 33 Bratislava. Tel. 07/374 405, fax: 07/376 637, E-mail: usrdslsz@savba.sk, alebo usrdgaba@savba.sk.

Doc. MUDr. Z. Mikeš, DrSc., Geriatrická klinika LFUK, Ďumbierska 3, 83 01 Bratislava. Tel./fax: 07/373 628.

Kardiologická konferencia 97

18.—21. október 1997, Piešťany

Rokovací jazyk: slovenčina a angličtina. Výročné podujatie Slovenskej kardiologickej spoločnosti. I. informáciu dostanú všetci členovia SKS do 31.1.1997. Hlavné témy: Srdcové zlyhanie: liečba betablokátormi a digitálsom — pre a proti, Vzťah arteriálnej hypertenzie a ischemickej choroby srdca, Posúdenie viability myokardu: diagnostické možnosti, Bypass a PTCA: pre a proti, Komorové tachykardie: rozhodovanie o diagnostickej a liečebnej stratégii.

Kontakt: Doc. MUDr. S. Filipová, CSc., IV. interná klinika LFUK, Bezručova 5, 815 26 Bratislava. Tel. 07/361 432, fax: 07/325 754 alebo Kongresové centrum SLS (S. Kozáková), Legionárska 4, 813 22 Bratislava. Tel. 07/214 015, 211 156, fax: 07/212 363.

III. memoriál prof. Ireny Jakubcovej

20. november 1997, Bratislava

Podujatie Pracovnej skupiny detskej kardiológie SKS. Témy: Detská kardiológia, Detská kardiochirurgia.

Kontakt: MUDr. J. Mašura, CSc., DKC DFN, Limbová 1, 833 40 Bratislava. Tel. 07/3701 864, fax: 07/371 555.