



## FOTOGENOTOKSYCZNOŚĆ W BADANIACH *IN VITRO* ORAZ TESTACH BAKTERYJNYCH W LATACH 2013-2018 W PORÓWNANIU DO LAT WCZEŚNIEJSZYCH W ŚWIEŁLE ZMIAN PRZEPISÓW PRAWNYCH

Anna Zgadzaj

Zakład Badania Środowiska, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,  
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Tel.: +48 22 572 0740, e-mail: [azgadzaj@wum.edu.pl](mailto:azgadzaj@wum.edu.pl)

Otrzymany 19.08.2018, zaakceptowany 30.09.2018, zamieszczony 15.11.2018

### STRESZCZENIE

Fotogenotoksyczność, określana też jako fotomutagenność lub genotoksyczność fotochemiczna, jest zjawiskiem polegającym na powstawaniu uszkodzeń DNA w wyniku narażenia organizmów żywych na światło oraz na substancje, które pod wpływem promieniowania przekształcają się w związki działające negatywnie na materiał genetyczny. Oznaczanie fotogenotoksyczności związków chemicznych było tematem licznych prac naukowych na przestrzeni ostatnich lat. Jednak w 2012 roku ukazała się nowelizacja dotychczasowych wytycznych Europejskiej Agencji Leków, w której obowiązek oznaczania fotogenotoksyczności *in vitro* w badaniach przedklinicznych uznano za nieuzasadniony. Zmiany te wpłynęły znacząco na kierunek badań nad oceną fotogenotoksyczności, publikowanych w międzynarodowej literaturze naukowej. Zdecydowanie zmniejszyła się intensywność poszukiwań nowych technik *in vitro* do przesiewowej oceny tego zjawiska. Tematyka poruszana najczęściej w publikacjach z tej dziedziny w ciągu ostatnich lat to próby określenia mechanizmów genotoksyczności fotochemicznej wybranych związków, a także fotogenotoksyczność metabolitów leków, nanocząstek, nowych formułacji leków oraz wyciągów roślinnych. Ważną grupę prac stanowią też doniesienia na temat poszukiwania nowych fotosensybilizatorów w terapii fotodynamicznej, które ukazują korzystne medyczne aspekty zjawiska fotogenotoksyczności.

**SŁOWA KLUCZOWE:** fotogenotoksyczność, fotomutagenność, genotoksyczność fotochemiczna.

### ABSTRACT

PHOTOGENOTOXICITY IN *IN VITRO* STUDIES AND IN BACTERIAL TESTS IN THE YEARS 2013-2018 COMPARED WITH EARLIER PUBLICATIONS IN LIGHT OF CHANGES IN LEGAL REGULATIONS

Photogenotoxicity, also known as photomutagenesis or photochemical genotoxicity, refers to DNA damage caused by the exposure of living organisms to light or to substances that, when irradiated, give rise to compounds capable of damaging the genetic material. The determination of photogenotoxicity of chemical compounds was the topic of numerous research papers in the past. However, guidelines of the European Medicines Agency updated in 2012 no longer required an *in vitro* determination of photogenotoxicity in preclinical studies. This decision had a significant impact on the direction of photogenotoxicity research, as reported in the relevant scientific literature. The number of papers on new *in vitro* screening techniques decreased significantly. The subjects discussed most frequently in scientific articles over the past several years included attempts to identify the mechanisms of photochemical genotoxicity of selected compounds, as well as the photogenotoxicity of drug metabolites, nanoparticles, new drug formulations, and plant extracts. Another important group of publications focused on the search for new photosensitizers to be used in photodynamic therapy, illustrating the potential medical beneficial aspects of photogenotoxicity.

**KEYWORDS:** photogenotoxicity, photomutagenesis, photochemical genotoxicity.

### 1. Wstęp

Światło jest czynnikiem fizycznym, który może oddziaływać negatywnie na materiał genetyczny w sposób bezpośredni, powodując dysfunkcyjne zmiany w strukturze DNA. Czynnikiem ten może również przyczyniać się do powstawania modyfikacji w informacji genetycznej w sposób pośredni, przez oddziaływanie na niektóre związki chemiczne. Mechanizm ten opisuje zjawisko fotogenotoksyczności, określanej też jako fotomutagenność lub genotoksyczność fotochemiczna. Może ono zaistnieć na skutek jednoczesnego narażenia organizmów żywych na światło oraz na substancje, które pod wpływem promieniowania przekształcają się

w związki wywołujące uszkodzenia DNA. Produktami fotodegradacji takiej substancji macierzystej mogą być rodniki, reaktywne formy tlenu lub inne molekuly, które pomimo braku rodnikowego charakteru również wykazują negatywne działanie na materiał genetyczny [1-3]. Powstające w ten sposób pęknięcia nici DNA, oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych oraz inne uszkodzenia mogą skutkować zwiększeniem ilości mutacji w komórkach potomnych oraz wzrostem ryzyka wystąpienia procesu onkogenezy. Z tego powodu oznaczanie fotogenotoksyczności związków chemicznych było tematem licznych prac naukowych na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat. Rozwój badań nad tym

zjawiskiem oraz historia postępu w pracach nad przepisami prawnymi, które normalizowały dopuszczalny poziom jego występowania w lekach i kosmetykach, zostały podsumowane przez Mullera i Gocke [1]. Istotny wpływ na wzrost zainteresowań badaniami fotogenotoksyczności miało Europejskie Stowarzyszenie Przemysłu Kosmetycznego, Toaletowego i Perfumeryjnego (COLIPA - The European Cosmetic and Perfumery Association), które w 1990 roku ogłosiło zalecenie oznaczania właściwości fotomutagennych filtrów przeciwsłonecznych stosowanych w kosmetyce [4,5]. Natomiast w 2002 roku Europejska Agencja Leków po raz pierwszy opublikowała wytyczne, dotyczące fotobezpieczeństwa stosowania leków oraz rekomendowanych badań przedklinicznych z tej dziedziny toksykologii [6]. Powyższe wydarzenia znalazły swoje odzwierciedlenie we wzroście zainteresowania nie tylko fototoksycznością, ale też fotogenotoksycznością w licznych publikacjach naukowych.

Jednakże w kolejnych latach zaczęły pojawiać się doniesienia i raporty, które poddawały w wątpliwość słuszność badania fotomutagenności w testach przedklinicznych. Na fakt ten miały istotny wpływ doniesienia z 2006 roku, opisujące wysokie ryzyko uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich w przypadku niektórych oznaczeń i substancji [7]. Z kolei w 2012 roku ukazała się nowelizacja dotychczasowych wytycznych Europejskiej Agencji Leków, w której obowiązek oznaczania fotogenotoksyczności *in vitro* w badaniach przedklinicznych uznano już za nieuzasadniony [8]. Powyższą decyzję podjęto na podstawie opinii, które kwestionowały wartość takich oznaczeń w odniesieniu do ogólnej oceny fotobezpieczeństwa stosowania nowych substancji leczniczych. Poddawano w wątpliwość możliwość przełożenia wyników oznaczania fotogenotoksyczności *in vitro* na faktyczne zwiększenie ryzyka występowania efektów, takich jak nowotwory skóry na etapie testów klinicznych. Uznano również, że mechanizmy odpowiadające za fototoksyczność oraz fotogenotoksyczność danej substancji zwykle są takie same, w związku z czym nie istnieje potrzeba oznaczania obu tych efektów jednocześnie, a przesiewowe testy fototoksyczności powinny być wystarczające [8].

Wszystkie powyższe decyzje oraz rezygnacja z zaleceń oznaczania fotogenotoksyczności w badaniach przedklinicznych miały znaczny wpływ na ilość i kierunek badań naukowych z tej dziedziny toksykologii. W poniższej pracy zostało wykonane podsumowanie i porównanie do lat wcześniejszych tematyki oraz metodologii publikacji z dziedziny fototoksykologii, które ukazały się po 2012 roku i opisywano w nich oznaczenia fotogenotoksyczności *in vitro* lub przy pomocy testów bakteryjnych.

## 2. Poszukiwanie mechanizmów działania fotogenotoksycznego

Na podstawie przeglądu badań naukowych, które spełniają wymienione powyżej kryteria (tabela 1) można zaobserwować zmniejszenie liczby prac poświęconych klasycznym testom przesiewowym wybranych grup substancji chemicznych w stosunku do ilości podobnych prac sprzed zniesienia wytycznych o zalecanej ocenie fotogenotoksyczności [32-39]. Pojawia się natomiast tendencja do wykonywania wielopoziomowych oznaczeń fotogenotoksyczności w poszukiwaniu mechanizmów, które odpowiadają za występowanie tego zjawiska.

Butzbah i Epe [9] zastosowali zestawienie trzech różnych technik oceny fotogenotoksyczności witaminy B9.

Test na wolnym DNA bakteriofaga PM2 pozwolił ocenić uszkodzenia wywołane z pominięciem czynników wewnątrzkomórkowych. Natomiast pozostałe dwa testy przeprowadzone na żywych komórkach *in vitro* pozwoliły na porównanie uszkodzeń materiału genetycznego tuż po narażeniu (ocena stopnia pofragmentowania) oraz trwałych uszkodzeń struktury chromosomów przekazywanych komórkom potomnym (test mikrojądrowy). Dodatkowe informacje na temat rodzajów uszkodzeń DNA wywołanych działaniem fotogenotoksycznym, uzyskano modyfikując powyższe testy przez zastosowanie wybranych enzymów. Wykorzystanie formamidopirymidyno-DNA-glikozylazy pozwoliło na oznaczenie 8-oksoguanidyny, 2,2,4-triaminooksazolonu czy miejsc apurynowych i apirymidynowych [40-42]. Natomiast endonukleaza III pozwoliła na identyfikację oksydacyjnych uszkodzeń pirymidyn [43], a T4 endonukleaza V na identyfikację dimerów cyklobutanu pirymidyny [44]. Z kolei zastosowanie katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej umożliwiło ocenę roli nadtlenu wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego w mechanizmie fotogenotoksyczności kwasu foliowego. Inną modyfikacją, która pozwoliła ocenić wpływ metabolizmu wewnątrzkomórkowego na fotogenotoksyczność, było wykorzystanie metotreksatu, inhibitora dehydrogenazy tetrafolianowej, która przekształca witaminę B9 do formy pozbawionej jednego z chromoforów, co miało istotny wpływ na obserwowaną fotogenotoksyczność substancji badanej.

Z kolei Soldevila i in. [12] w swojej pracy poszukiwali mechanizmów odpowiedzialnych za fotogenotoksyczność lomeflokscyny. Zestawienie wyników uzyskanych dla tego leku oraz jego N-(4')acetylowanej pochodnej umożliwiło określenie znaczenia struktury wolnego pierścienia piperazynowego dla powinowactwa do zasad DNA produktów fotodegradacji tych fluorochinolonów. Natomiast porównanie fotogenotoksyczności antybiotyków o różnej ilości atomów fluoru w cząsteczce pozwoliło na potwierdzenie ich wpływu na stopień uszkodzeń DNA, będących konsekwencją działania rodników halogenkowych. Znaczenie rodnikowych produktów fotodegradacji oraz tlenu singletowego w mechanizmie fotogenotoksyczności fluorochinolonów potwierdzili również Singh i in. [21] na przykładzie ofloksacyny. Ponadto, dzięki zastosowaniu w tej pracy testów *in vitro* z technikami modelowania molekularnego, dokonano oceny powinowactwa głównych produktów fotodegradacji leku do bakteryjnej gyrazy DNA. Zestawienie testów oceny genotoksyczności produktów fotodegradacji z analizą *in silico*, mającą na celu określenie ich mechanizmu działania, opisał również Toolaram i in. [45] dla naświetlanej cyprofloksacyny.

Zastosowanie modyfikacji testów fotogenotoksyczności *in vitro* przez łączenie substancji badanej z antyoksydantem oraz porównanie uzyskanych wyników z wariantem bez udziału przeciwutleniacza zostało również wykorzystane w jednej z prac [31]. Uzyskane wyniki potwierdziły możliwy istotny wpływ wolnych rodników na fotouszkodzenia DNA wywołane przez ciprofloksacynę w komórkach ssaków i bakterii. Dla pozostałych antybiotyków odpowiedź testowa nie była już jednoznaczna.

Natomiast Perruca i in. [14] w poszukiwaniu mechanizmów działania fotogenotoksycznego zastosowali dwa warianty wykonywanych testów: przy normalnym dostępie tlenu oraz w warunkach hipoksji. Ponadto testy według dwóch powyższych schematów przeprowadzono na dwóch różnych

Tabela 1. Zestawienie wybranych publikacji z lat 2013-2018, w których wykorzystywano techniki oceny fotogenotoksyczności *in vitro* lub za pomocą testów bakteryjnych. Wymienione substancje badane oraz parametry naświetlania dotyczą tylko części danego projektu, odnoszącej się do powyższych oznaczeń.

Nr	Substancja badana	Parametry naświetlania (źródło, długość fali, dawka)	Testy bakteryjne i <i>in vitro</i> do oceny fotogenotoksyczności	Wyniki*	Bibliografia
1.	Kwas foliowy	Lampa rtęciowa (125W, $\lambda_{\max}$ = 365nm, 30kJ/m <sup>2</sup> ) lub lampa halogenowa (1000W, 400-800nm, 375W/m <sup>2</sup> ).	Test uszkodzeń wolnego DNA bakteriofaga PM2; test elucji DNA na filtrze membranowym (komórki nowotworowe jamy nosogardła KB, keratynocyty ludzkie HaCaT, komórki czerniaka); test mikrojądrowy (komórki KB).	+	[9]
2.	Pirfenidon	Symulator światła słonecznego SUN-TEST CPS+ (lampa ksenonowa 1500W, 300-800nm, 250W/m <sup>2</sup> ).	Test uszkodzeń wolnego DNA (plazmid pBR 322).	-	[10]
3.	CDRI 97/78	Lampy UVB (290-320nm, 0,6mW/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy (keratynocyty ludzkie HaCaT).	+	[11]
4.	Lomeflokscyna N-acetylo- lomeflokscyna Ciproflokscyna	Reaktor fotochemiczny z lampami fosforowymi (310-390nm, 24-240mJ/cm <sup>2</sup> ).	Test uszkodzeń wolnego DNA wyizolowanego z grasicy cielęcej.	+	[12]
5.	Pochodne proflawiny	Lampa UVA ( $\lambda_{\max}$ = 365nm, 1,05J/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy (ludzkie komórki nowotworowe jajnika A2780).	-	[13]
6.	Ciproflokscyna Lomeflokscyna Oflokscyna	Lampy UVA ( $\lambda_{\max}$ = 366nm, 12mW/cm <sup>2</sup> lub 3,5W/cm <sup>2</sup> ).	Test uszkodzeń wolnego DNA (plazmid pGEX-T4); test kometowy (komórki raka szyjki macicy HeLa i raka płaskonabłonkowego A431).	+	[14]
7.	Oflokscyna	Symulator światła słonecznego SUN-TEST CPS+ (lampa ksenonowa 1500W, 300-800nm, 75mW/cm <sup>2</sup> ).	<i>Umu</i> -test na <i>S. typhimurium</i> TA1535; test na <i>S. cerevisiae</i> D7; test mikrojądrowy (fibroblasty płucne chomika chińskiego V79).	+	[15]
8.	Benzofenon-1	Lampy UVA (2,7J/cm <sup>2</sup> ) lub UVB (1,08J/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy; test mikrojądrowy, test oceny dimerów cyklobutanu pirymidyny (keratynocyty ludzkie HaCaT we wszystkich testach)	+	[16]
9.	Hiperycyna	System świetlówek (530-620nm, 1,46-3,65J/cm <sup>2</sup> )	Test Ames'a ( <i>S. typhimurium</i> TA97, TA98, TA100); test kometowy (limfocyty ludzkie); test aberracji chromosomowych (komórki raka wątroby HepG2).	+/-	[17]
10.	2-amino-3-hydroksypirydyna	Lampy UVB (290-320nm, 0,72J/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy; test mikrojądrowy; test oceny powstawania dimerów cyklobutanu pirymidyny (keratynocyty ludzkie HaCaT we wszystkich testach)	+	[18]
11.	Palmitynian retinyli	Laser helowo-neonowy ( $\lambda_{\max}$ = 632,8nm, 10J/cm <sup>2</sup> ).	Test Ames'a ( <i>S. typhimurium</i> TA97, TA98, TA100, TA102).	-	[19]
12.	Chloropromazyna i jej metabolity	Fotoreaktor LZC-4 ( $\lambda_{\max}$ = 350nm).	Test uszkodzeń wolnego DNA (plazmid pBR 322); test kometowy (fibroblasty ludzkie FSK).	↑	[20]
13.	Oflokscyna	Lampy UVB ( $\lambda_{\max}$ = 312nm, 0,6-0,9mW/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy; test mikrojądrowy; test oceny powstawania dimerów cyklobutanu pirymidyny (keratynocyty ludzkie HaCaT we wszystkich testach)	+	[21]
14.	Róż bengalski	Lampy UVA ( $\lambda_{\max}$ = 365nm, 3,6J/cm <sup>2</sup> ) i UVB ( $\lambda_{\max}$ = 312nm, 3,6J/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy; test mikrojądrowy; test oceny powstawania dimerów cyklobutanu pirymidyny (komórki czerniaka ludzkiego we wszystkich testach).	+	[22]
15.	Wyciągi z <i>Sanionia uncinatata</i>	Lampy UVA ( $\lambda_{\max}$ = 365nm, 0,04-6,5J/cm <sup>2</sup> ).	Test Ames'a ( <i>S. typhimurium</i> TA97, TA98, TA100, TA102, TA104).	-	[23]

16.	N-nitrozoprolina	Lampy UVA (4,5W/m <sup>2</sup> ).	Test oceny uszkodzeń DNA bakteriofaga M13mp2 z wykorzystaniem hodowli <i>E. coli</i> CSH50.	+	[24]
17.	Metylparaben	Lampy UVB (1,08J/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy (keratynocyty ludzkie HaCaT); test mikrojądrowy (keratynocyty ludzkie HaCaT).	+	[25]
18.	Kwas 5-aminolewulinowy	Laser helowo-neonowy ( $\lambda_{\max}$ = 633nm, 5J/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy i mikrojądrowy (komórki gruczołaka piersi MCF-7, komórki raka wątroby HepG2).	+	[26]
19.	Benzofenon-2	Lampy UVA (2,7J/cm <sup>2</sup> ) lub UVB (1,08J/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy; test mikrojądrowy; test oceny powstawania dimerów cyklobutanu pirymidyny (keratynocyty ludzkie HaCaT we wszystkich testach).	+	[27]
20.	Diklofenak i jego metabolity	Fotoreaktor LZC-4 ( $\lambda_{\max}$ = 350nm).	Test uszkodzeń wolnego DNA (plazmid pBR 322); test kometowy (fibroblasty ludzkie FSK).	↑	[28]
21.	Dwa rodzaje nanocząstek tlenku cynku	Komora UVP Chromato-vue C65 UV (3 lampy: 245nm, 304nm, 365nm; dawki UVA: 7J/cm <sup>2</sup> i UVB: 45mJ/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy (keratynocyty ludzkie HaCaT).	≠	[29]
22.	Pefloksacyna	Lampa UVA (2.2mW/cm <sup>2</sup> ).	Test kometowy; test mikrojądrowy; test oceny powstawania dimerów cyklobutanu pirymidyny (keratynocyty ludzkie HaCaT we wszystkich testach).	+	[30]
23.	Ciprofloksacyna Lomefloksacyna Fleroksacyna Klinafloksacyna	Symulator światła słonecznego SUN-TEST CPS+ (lampa ksenonowa 1500W, 300-800nm, 58mW/cm <sup>2</sup> ).	<i>Umu</i> -test na <i>S. typhimurium</i> TA1535; test mikrojądrowy (fibroblasty płucne chomika chińskiego V79).	≠	[31]

+ - potwierdzono właściwości fotogenotoksyczne substancji badanej;

+/- - tylko w części testów potwierdzono właściwości fotogenotoksyczne substancji badanej;

- - nie odnotowano właściwości fotogenotoksycznych substancji badanej;

↑ ↓ - zaobserwowano wzrost lub redukcję fotogenotoksyczności metabolitów w stosunku do związku macierzystego;

≠ - odnotowano istotne różnice w fotogenotoksyczności pomiędzy badanymi wariantami nanocząstek lub mieszanin leków.

liniach komórkowych: HeLa i A431. Ograniczenie ilości tlenu w trakcie naświetlania komórek HeLa narażanych na leki spowodowało znaczne zmniejszenie ilości oksydacyjnych uszkodzeń nici DNA w przypadku lomefloksacyny i ofloksacyny. Podobnego efektu nie zaobserwowano po narażeniu na ciprofloksacyne. Wynik ten sugeruje, że reakcje utleniania i reaktywne formy tlenu w przypadku niektórych fluorochinolonów nie odpowiadają za główne mechanizmy ich działania fotogenotoksycznego. Porównanie wyników pomiędzy komórkami raka płaskonabłonkowego a komórkami nowotworu szyjki macicy pozwoliło zaobserwować znaczne różnice w odpowiedzi na badane leki zarówno w warunkach hipoksji, jak i w warunkach normalnych. Zestawienie powyższej obserwacji z wynikami innych testów pozwoliło na postawienie hipotezy o możliwości wykorzystania 6,8-difluorochinolonów w przeciwnowotworowej terapii fotodynamicznej.

Poszukiwanie mechanizmów działania fotogenotoksycznego i fototoksycznego, dzięki zastosowaniu różnych technik oceny uszkodzeń DNA w połączeniu z innymi testami, zostało również opisane dla benzofenonu-1, różu bengalskiego, pirfenidonu, metylparabenu oraz nowego triksanu opatentowanego pod nazwą CDRI 97/78 [10,11,16,22].

### 3. Fotogenotoksyczność metabolitów

Na podstawie przeglądu prac związanych z zagadnieniem fotogenotoksyczności *in vitro* z ostatnich 5 lat można również zaobserwować zainteresowanie tematyką wpływu

światła na toksyczność metabolitów fototoksycznych leków. Palumbo i in. [20] za pomocą testu uszkodzeń wolnego DNA oraz testu kometowego na fibroblastach ludzkich oznaczali fotogenotoksyczność metabolitów chloropromazyny. Substancja ta należy do leków przeciwpsychotycznych, a ze względu na znaczną fototoksyczność oraz fotogenotoksyczność w wielu testach do oceny tych właściwości jest wykorzystywana jako kontrola pozytywna. Porównano fotogenotoksyczne działanie leku i jego trzech metabolitów. Dwa z nich otrzymano w wyniku demetylacji oraz didemetylacji atomu azotu bocznego łańcucha aminoalkilowego, natomiast metabolit trzeci był sulfotlenkiem substancji macierzystej. Dla dwóch pierwszych z powyższych substancji zaobserwowano znaczący wzrost zdolności uszkodzania materiału genetycznego pod wpływem światła w porównaniu do chloropromazyny. Podobne wyniki uzyskano dla wolnego DNA, jak i dla DNA wchodzącego w skład jąder komórkowych fibroblastów. Powyższe obserwacje mogą wynikać z faktu, że chociaż demetylacja bocznego łańcucha animoalkilowego chloropromazyny nie wpłynęła na strukturę głównego chromoforu cząsteczki ani na zmianę jej szlaku fotodegradacji, to spowodowała wydłużenie okresów półtrwania stanów wzbudzonych niektórych produktów pośrednich tego procesu.

Fotogenotoksyczność metabolitów leków była również tematem pracy Garcia-Lainez i in. [28]. Substancjami badanymi w tym projekcie był diklofenak oraz jego dwa metabolity, powstające w wyniku hydroksylacji pierścienia

aromatycznego w pozycji 4' lub 5'. Zaobserwowano znaczny wzrost uszkodzeń DNA w porównaniu do leku macierzystego tylko dla jednego z metabolitów: 5-hydroksydiklofenaku. Powyższe dane uzupełniono o wyniki zmodyfikowanego testu kometowego, według którego oceniano zdolność komórek do naprawy uszkodzeń DNA wywołanych ekspozycją na związki badane i światło. Odnotowano, że fotouszkodzenia materiału genetycznego wywołane przez 5-hydroksydiklofenak są naprawiane dużo wolniej i mniej efektywnie niż wywołane przez lek macierzysty.

#### 4. Związki pochodzenia roślinnego

Inną grupą związków, których fotogenotoksyczność była oznaczana w wybranych pracach naukowych z ostatnich 5 lat, są substancje pochodzenia roślinnego. Uzasadnieniem badań było poszukiwanie właściwości fotoprotekcyjnych, antymutagennych oraz antyfotomutagennych tych związków. Przykładem takiej pracy jest publikacja Fernandes i in. [23]. Przedmiotem badań w tym przypadku były różne warianty wyciągów uzyskanych z mchu *Sanionia uncinata*. Roślina ta posiada zdolność syntezy fotoprotekcyjnych metabolitów z grupy flawonoidów w wyniku intensywnej ekspozycji na światło. W pracy nie odnotowano działania fotomutagennego żadnego z badanych wyciągów. Natomiast zaobserwowano znaczny spadek ilości mutacji obserwowanych u *S. typhimutium* TA104 w teście Ames'a po narażeniu na samo promieniowanie UVA, jeśli do pożywki jednocześnie dodawano wodne lub wodno-alkoholowe wyciągi roślinne.

Przykładem pracy, w której zaobserwowano działanie antyfotogenotoksyczne, polegające na hamowaniu zdolności uszkodzania DNA pod wpływem światła przez związek wysoce fotomutageny, była publikacja Skrzypczak i in. [46]. Do oceny fotogenotoksyczności również zastosowano w niej krótkoterminowy test bakteryjny. *Umu*-test, w przeciwieństwie do testu Ames'a, nie dostarcza informacji tylko o ilości mutacji indukowanych przez dany czynnik, ale pozwala oznaczyć skalę różnorodnych uszkodzeń DNA za pośrednictwem oceny stopnia aktywacji systemu naprawy materiału genetycznego bakterii. W powyższej pracy odnotowano zmniejszenie właściwości fotogenotoksycznych chloropromazyny przez wyciąg z hodowli *in vitro* tkanki kalusowej *Arnebia euchroma*. Kolejną pracą poświęconą oznaczaniu fotogenotoksyczności substancji pochodzenia roślinnego było badanie hipercyny z *Hypericum perforatum* [17]. W publikacji zastosowano zestaw trzech różnych testów, wykorzystujących bakterie, limfocyty krwi ludzkiej oraz hodowle komórkowe *in vitro*. Pozwoliło to na potwierdzenie zdolności hipercyny do wywoływania pęknięć nici DNA pod wpływem światła, przy jednoczesnym niewielkim wpływie tych zmian na zwiększenie ilości obserwowanych mutacji i aberracji chromosomowych.

#### 5. Przeciwnowotworowa terapia fotodynamiczna

Wyróżniającą się grupą badań na przestrzeni lat 2013-2018, których elementem jest oznaczenie genotoksyczności fotochemicznej, są projekty związane z wykorzystaniem wybranych związków w przeciwnowotworowej terapii fotodynamicznej. Jest to nowoczesna forma leczenia onkologicznego, pozwalająca na selektywne niszczenie tkanki nowotworowej przy jednoczesnym ograniczeniu uszkodzeń sąsiednich tkanek prawidłowych. Elementem niezbędnym do przeprowadzenia tej formy terapii jest fotouczulacz, substancja aktywowana przez światło, której fototoksyczne działanie celowane jest w tkankę nowotworową. Dwa po-

zostałe elementy terapii to źródło promieniowania do aktywacji związku skumulowanego w komórkach zmienionych chorobowo oraz odpowiedni poziom tlenu w tkance docelowej. Fotosensybilizator może działać w komórce na dwa sposoby. Pierwszy z nich to wytworzenie formy rodnikowej związku lub jego produktu fotodegradacji, która może inicjować w komórce dalsze wolnorodnikowe reakcje łańcuchowe. Drugim mechanizmem działania fotosensybilizatora jest przeniesienie zaabsorbowanej energii na cząsteczki tlenu obecne w tkance docelowej i wzbudzenie ich do stanu singletowego [47,48].

Przykładem publikacji poświęconej poszukiwaniu fotosensybilizatorów do terapii fotodynamicznej, w której wykorzystano metody oznaczania fotogenotoksyczności *in vitro* jest praca poświęcona oznaczaniu działania kwasu 5-aminolewulinowego [26]. Związek ten jest prekursorem protoporfiryny IX, wysoce fototoksycznego fotouczulacza, często stosowanego w tej formie terapii. Za pomocą testu kometowego i mikrojądrowego potwierdzono skuteczność substancji badanej w wywoływaniu uszkodzeń nici DNA oraz chromosomów komórek gruczolaka piersi MCF-7 oraz nowotworowych komórek wątroby HepG2, co może mieć pozytywny wpływ na zahamowanie ich proliferacji. Kolejną pracą o podobnej tematyce jest publikacja o fotogenotoksycznym działaniu dwóch pochodnych proflawiny [13]. W pracy tej nie zaobserwowano uszkodzeń DNA w teście kometowym na komórkach raka jajnika linii A2780 po narażeniu na promieniowanie i związki testowe. Jednocześnie w wielu innych oznaczeniach potwierdzono liczne mechanizmy działania fototoksycznego badanych pochodnych proflawiny dla innych linii komórek nowotworowych, co wskazuje na ich potencjalne zastosowanie w onkologii. Inną pracą, łączącą zastosowanie technik oceny fotogenotoksyczności z zagadnieniem terapii fotodynamicznej jest publikacja na temat aktywności palmitynianu retinylu [19]. Związek ten jest pochodną witaminy A i może być stosowany w suplementacji pacjentów przed zabiegiem w celu zwiększenia skuteczności leczenia. W pracy tej właściwości fotomutagenne substancji badanej oceniono za pomocą testu Ames'a. We wszystkich wariantach oznaczeń uzyskane wyniki były negatywne, potwierdzające brak indukcji mutacji pod wpływem światła.

#### 6. Nanocząstki i substancje pomocnicze

Przykładami innych zagadnień podejmowanych w pracach badawczych w ostatnich latach, których elementem stała się ocena fotogenotoksyczności, było porównanie właściwości fototoksycznych nowych form nanocząstek tlenku cynku oraz poszukiwanie właściwości fotoprotekcyjnych nowych formułacji fotolabilnych leków [15,29]. W projekcie Genc'a i in. [29] udowodniono, że różne rodzaje nanocząstek tego samego związku chemicznego mogą istotnie różnić się między sobą pod względem właściwości fotogenotoksycznych. W innej pracy analiza połączeń fotolabilnych fluorochinolonów z kwasem p-kumarowym, o właściwościach przeciwutleniających i antymutagennych, znacznie zmniejszyła fotogenotoksyczność takiej mieszaniny dla jednego z antybiotyków [15].

Należy wymienić też projekty poświęcone oznaczaniu uszkodzeń DNA pod wpływem światła przez substancje aktualnie wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym, jak benzofenon-1 i benzofenon-2, oraz 2-amino-3-hydroksypirydyna [16,18,27]. Dwa pierwsze z powyższych związków są stosowane jako filtry przeciwsłoneczne, trzecia natomiast wchodzi w skład farb do włosów. Za pomocą

testu kometowego, mikrojądrowego oraz oceny powstawania dimerów cyklobutanu pirymidyny na keratynocytach ludzkich potwierdzono ich właściwości fotogenotoksyczne. Chociaż na podstawie wyników uzyskanych w powyższych testach *in vitro* trudno jest oszacować możliwe ryzyko podobnego działania toksycznego u ludzi, ukazują one, że bezpieczeństwo stosowania niektórych kosmetyków powinno być dokładnie monitorowane.

## 7. Metodologia testów do oceny fotogenotoksyczności

Porównując wybrane prace z ostatnich 5 lat z wcześniejszymi publikacjami, można zaobserwować, że rodzaj testów stosowanych do oceny fotogenotoksyczności oraz sposób zestawiania ich ze sobą nie uległy zmianie. Przy oznaczeniach zdolności związku badanego do uszkodzania DNA pod wpływem światła najczęściej wykonywany był panel różnych, uzupełniających się testów. Uzasadnieniem takiego postępowania jest to, że żadna ze znanych dotychczas technik oznaczania genotoksyczności fotochemicznej *in vitro* nie jest pozbawiona wad i nie pozwala na ocenę wszystkich możliwych skutków działania fotogenotoksycznego danego związku. Wyniki otrzymane różnymi metodami wzajemnie się uzupełniają, dając pełniejszy obraz możliwego działania toksycznego substancji badanej. Na przestrzeni ostatnich 5 lat można znaleźć przykłady publikacji, w których wykonywano tylko jeden wybrany rodzaj testu do oceny fotogenotoksyczności [10-13,19,23,29]. Jednakże nawet w takich przypadkach zwykle równolegle wykonuje się również szereg innych oznaczeń mechanizmów fototoksyczności i fotoreaktywności substancji badanej.

Zarówno w pracach wcześniejszych, jak i z ostatnich 5 lat, opisuje się wyniki oceny fotogenotoksyczności na wolnym DNA. Ten rodzaj testów pozwala na ocenę interakcji między materiałem genetycznym a substancją poddaną działaniu światła, z pominięciem wszystkich czynników wewnątrzkomórkowych. Jest to jednocześnie zaletą i wadą powyższej techniki oznaczeń. Zastosowanie dodatkowych enzymów [9] pozwala na precyzyjną identyfikację rodzaju uszkodzeń: pęknięć pojedynczej nici DNA, pęknięć podwójnych, czy rodzaju modyfikacji poszczególnych zasad azotowych. Natomiast implementacja wolnego DNA po ekspozycji do organizmów drożdży lub bakterii pozwala na ocenę trwałości danych uszkodzeń DNA w komórce i ich wpływ na indukcję mutacji w organizmach potomnych. W pracach z ostatnich 5 lat jako materiał badawczy wykorzystywane były najczęściej fragmenty DNA uzyskane z mikroorganizmów, jak plazmid pBR 322 czy PGX-T4, oraz materiał genetyczny komórek grasicy cielęcej. Przykład implementacji wolnego DNA bakteriofaga M13mp2 po ekspozycji do hodowli *E. coli* CSH50 również został opisany w jednej z publikacji [24]. W metodologii powyższych testów nie widać znaczących zmian w stosunku do lat wcześniejszych [2].

W wielu pracach po 2012 roku można znaleźć również przykłady oceny fotogenotoksyczności za pomocą krótkoterminowych testów bakteryjnych. Najczęściej stosowanymi testami były: test Ames'a oraz *umu*-test [15,17,19,23,31]. W latach wcześniejszych wykorzystywano głównie pierwszą z powyższych technik, ponieważ metodologia *umu*-testu, która pozwalała na uwzględnienie wpływu promieniowania na uszkodzenia DNA bakterii w jego klasycznej procedurze została po raz pierwszy opublikowana dopiero w 2010 roku [49,50]. W metodologii testów Ames'a wykonywanych po 2012 roku nie widać znaczących zmian w stosunku do lat wcześniejszych.

Inną techniką oznaczeń genotoksyczności fotochemicznej często opisywaną w ciągu ostatnich lat jest test kometowy na komórkach ssaków. Pozwala on ocenić stopień pofragmentowania materiału genetycznego w jądrze komórkowym w wyniku ekspozycji na czynniki badane. Zmodyfikowana forma testu, uwzględniająca dodatkowy okres regeneracji komórek po narażeniu, pozwala ocenić również sprawność mechanizmów naprawy DNA [28]. Wadą testu kometowego jest brak możliwości oceny wpływu danych uszkodzeń DNA na występowanie konkretnych mutacji w komórkach potomnych. Porównując linie komórkowe wykorzystywane w tym teście do oznaczania fotogenotoksyczności przez ostatnie 5 lat z liniami wykorzystywanymi w pracach z lat ubiegłych, można zauważyć niewielkie zmiany [2]. Nadal jedną z najczęściej wykorzystywanych linii komórkowych są keratynocyty ludzkie HaCaT, natomiast obserwuje się zdecydowanie mniej badań na fibroblastach płucnych chomika chińskiego V79 oraz częstsze stosowanie komórek nowotworowych, ze względu na prace poświęcone poszukiwaniu nowych fotosensybilizatorów w onkologicznej terapii fotodynamicznej [13,26].

Testem do oceny fototoksyczności *in vitro*, stosowanym wielokrotnie w pracach przed, jak i po 2012 roku, jest również test mikrojądrowy. Umożliwia on ocenę uszkodzeń DNA w postaci fragmentacji lub utraty poszczególnych chromosomów w komórkach potomnych. Podobnie jak w przypadku testu kometowego, na przestrzeni ostatnich 5 lat można zaobserwować zmiany w najczęściej wybieranych do badań liniach komórkowych. W pracach wcześniejszych były to głównie komórki V79 [51,52], natomiast ostatnio częściej podobne oznaczenia wykonuje się na komórkach HaCaT [16,18,21,25].

Poza powyższymi spostrzeżeniami, w ciągu ostatnich 5 lat można zaobserwować zdecydowanie mniej przykładów zastosowania do oceny fotogenotoksyczności testu aberracji chromosomowych *in vitro* [2]. Ta technika pozwala na zdecydowanie bardziej precyzyjną identyfikację poszczególnych uszkodzeń chromosomów w komórkach po ekspozycji niż test mikrojądrowy. Wśród omawianych w niniejszym artykule publikacji można znaleźć tylko jeden przykład wykorzystania testu oceny aberracji chromosomowych na ludzkich komórkach nowotworowych wątroby HepG2 [17].

Inną istotną różnicą w pracach badawczych z ostatnich 5 lat w porównaniu do wcześniejszych publikacji jest wyraźne zmniejszenie ilości badań poświęconych poszukiwaniu nowych metod oceny fotogenotoksyczności. Przed rokiem 2012 o tej tematyce było bardzo dużo [52-57], natomiast od zniesienia zaleceń Europejskiej Agencji Leków, związanych z przedkliniczną oceną fotogenotoksyczności, nie ukazała się żadna podobna publikacja.

## 8. Podsumowanie

Zmiany zaleceń Europejskiej Agencji Leków z 2012 roku wpłynęły znacząco na kierunek badań nad oceną fotogenotoksyczności publikowanych w międzynarodowej literaturze naukowej. Zdecydowanie zmniejszyła się intensywność poszukiwań nowych technik *in vitro* do przesiewowej oceny tego zjawiska. Natomiast tematyka poruszana w wielu publikacjach w okresie 2013-2018 to próby identyfikacji mechanizmów genotoksyczności fotochemicznej wybranych związków, fotogenotoksyczność metabolitów leków, nanozwiązków, nowych formułacji leków oraz wyciągów roślinnych. Istotne są badania dotyczące poszukiwania nowych fotosensybilizatorów w terapii fotodynamicznej. Chociaż

omówione tu prace ukazują tylko niewielki wycinek wszystkich publikacji o tej innowacyjnej formie terapii, prezentują możliwość wykorzystania w medycynie pozytywnych aspektów zjawiska fotogenotoksyczności.

## 9. Wykaz skrótów

A2780	human ovarian carcinoma cell line; ludzkie komórki nowotworu jajnika
A431	human epidermoid carcinoma cell line; komórki raka płaskonabłonkowego
DNA	deoxyribonucleic acid; kwas deoksyrybonukleinowy
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FSK	human foreskin fibroblasts; linia komórkowa fibroblastów ludzkich
HaCaT	human keratinocyte cell line; keratynocyty ludzkie
HeLa	human cervical carcinoma cell line; komórki ludzkie raka szyjki macicy
HepG2	human liver cancer cell line; komórki nowotworu wątroby
KB	oral carcinoma cell line; komórki raka jamy ustnej
MCF-7	breast adenocarcinoma cell line; komórki gruczołaka piersi
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
UVA	promieniowanie o długości fali z zakresu 320-400nm
UVB	promieniowanie o długości fali z zakresu 290-320nm
V79	Chinese hamster lung fibroblasts; fibroblasty płucne chomika chińskiego

## 10. Bibliografia

- Muller L, Gocke E. The rise and fall of photomutagenesis. *Mutation Research*. 2013, 752, 67-71.
- Brendler-Schwaab S, Czich A, Epe B, Gocke E, Kaina B, Muller L, Pollet D, Utesch D. Photochemical genotoxicity: principles and test methods Report of a GUM task force. *Mutation Research* 2004, 566, 65-91.
- Meunier JR, Sarasin A, Marrot L. Photogenotoxicity of Mammalian Cells: A Review of the Different Assays for In Vitro Testing. *Photochemistry and Photobiology*. 2002, 75(5): 437-447.
- Loprieno N. Guidelines for safety evaluation of cosmetics ingredients in the EC countries. *Food and Chemical Toxicology*. 1992, 30, 809-815.
- Sargent EV, Travers JB. Examining the differences in current regulatory processes for sunscreens and proposed safety assessment paradigm. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2016, 79, 125-141.
- European Medicines Agency, Note for Guidance on Photosafety Testing, CPMP/SWP/398/01. 2002.
- Dufor EK, Kumaravel T, Nohynek GJ, Kirkland D, Toutain H. Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: Genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*. 2006, 607, 215-224.
- European Medicines Agency. ICH Guidance S10 on Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/752211/2012.
- Butzbach K, Epe B. Photogenotoxicity of folic acid. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013, 65, 821-827.
- Seto Y, Inoue R, Kato M, Yamada S, Onoue S. Photosafety assessments on pirfenidone: Photochemical, photobiological, and pharmacokinetic characterization. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. 2013, 120, 44-51.
- Dwivedi A, Pal MK, Tripathi AK, Yadav N, Majtuba SF, Pant MC, Singh SK, Mishra DP, Ray RS, Prabhu BHM. Role of type-II pathway in apoptotic cell death induction by photosensitized CDRI-97/78 under ambient exposure of UV-B. *Toxicology Letters*. 2013, 222, 122-131.
- Soldevila S, Cuquerella MC, Lhiaubet-Vallet V, Edge R, Bosca F. Seeking the mechanism responsible for fluoroquinolone photomutagenicity: a pulse radiolysis, steady-state, and laser flash photolysis study. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014, 67, 417-425.
- Cizekova L, Grolmusova A, Ipothova Z, Barbierikova Z, Brezova V, Hunakova L, Imrich J, Janovec L, Dvoinova I, Paulikova H. Novel 3,6-bis(imidazolidine)acridines as effective photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014, 22, 4684-4693.
- Perucca P, Savio M, Cazzalini O, Mocchi R, Maccario C, Sommatitis S, Ferraro D, Pizzala R, Pretali L, Fasani E, Albini A, Stivala LA. Structure-activity relationship and role of oxygen in the potential anti-tumour activity of fluoroquinolones in human epithelial cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. 2014, 140, 57-68.
- Zgadzaj A, Skrzypczak A, Welenc I, Ługowska A, Parzonko A, Siedlecka E, Sommer S, Sikorska K, Nałęcz-Jawecki G. Evaluation of photodegradation, phototoxicity and photogenotoxicity of ofloxacin in ointments with sunscreens and in solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. 2015, 144, 76-84.
- Amar SK, Goyal S, Dubey D, Srivastav AK, Chopra D, Singh J, Shankar J, Chaturvedi RK, Ray RS. Benzophenone 1 induced photogenotoxicity and apoptosis via release of cytochrome c and Smac/DIABLO at environmental UV radiation. *Toxicology Letters*. 2015, 239, 182-193.
- Feruszowa J, Imreova P, Bodnarova K, Sevcovicova A, Kyzek S, Chalupa I, Galova E, Miadokova E. Photoactivated hypericin is not genotoxic. *General Physiology and Biophysics*. 2016, 35, 230-230.
- Goyal S, Amar AK, Dwivedi A, Mujtuba SF, Kushwaha HN, Chopra D, Pal MK, Singh D, Chaturvedi RK, Ray RS. Photosensitized 2-amino-3-hydroxypyridine-induced mitochondrial apoptosis via Smac/DIABLO in human skin cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016, 297, 12-21.
- Ibrahim T, El Roubi MN, Al-Sherbini EAM, El Noury AHE, Morsy ME. Photodecomposition, photomutagenicity and photocytotoxicity of retinyl palmitate under He-Ne laser photoirradiation and its effects on photodynamic therapy of cancer cells in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2016, 13, 316-322.
- Palumbo F, Garcia-Lainez G, Limones-Herrero D, Coloma MD, Escobar J, Jimenez MC, Miranda MA, Andreu I. Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016, 313, 131-137.
- Singh J, Dwivedi A, Majtuba SF, Singh KP, Pal MK, Chopra D, Goyal S, Srivastav AK, Dubey D, Gupta SK, Halder C, Ray RS. Ambient UV-B exposure reduces the binding of ofloxacin with bacterial DNA gyrase and induces DNA damage mediated apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016, 73, 111-126.
- Srivastav K, Majtuba SF, Dwivedi A, Amar SK, Goyal S, Verma A, Kushwaha HN, Chaturvedi RK, Ray RS. Photosensitized rose Bengal-induced phototoxicity on human melanoma cell line under natural sunlight exposure. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2016, 156, 87-99.
- Fernandes AS, Mazzei JL, Oliveira CG, Evangelista H, Marques MRC, Ferraz ERA, Felzenszwalb I. Protection against UV-induced toxicity and lack of mutagenicity of Antarctic *Sanionia uncinata*. *Toxicology*. 2017, 376, 126-136.
- Horai Y, Ando Y, Kimura S, Arimoto-Kobayashi S. Mutation spectrum resulting in M13mp2 phage DNA exposed to N-nitrosoproline with UVA irradiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2017, 821, 1-4.
- Dubey D, Chopra D, Singh J, Srivastav AK, Kumari S, Verma A, Ray RS. Photosensitized methyl paraben induces apoptosis via caspase dependent pathway under ambient UVB exposure in human skin cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2017, 108, 171-185.
- Abo-Zeid MAM, Abo-Elfadl MT, Mostafa SM. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid triggered DNA damage of adenocarcinoma breast cancer and hepatocellular carcinoma cell lines. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018, 21, 351-356.

27. Amar SK, Goyal S, Srivastav AK, Chopra D, Ray RS. Combined effect of Benzophenone-2 and ultraviolet radiation promote photogenotoxicity and photocytotoxicity in human keratinocytes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018, 95, 298-306.
28. Garcia-Lainez G, Martinez-Reig AM, Limonez-Herrero D, Jimenez MC, Miranda MA, Andreu I. Photo(geno)toxicity changes associated with hydroxylation of the aromatic chromophores during diclofenac metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2018, 341, 51-55.
29. Genc H, Barutca B, Koparal AT, Ozogut U, Sahin Y, Suvaci E. Biocompatibility of designed MicNo-ZnO particles: Cytotoxicity, genotoxicity and phototoxicity in human skin keratinocyte cells. *Toxicology in Vitro*. 2018, 47, 238-248.
30. Singh J, Srivastav AK, Mandal P, Chandra S, Dubey D, Dwivedi A, Chopra D, Tripathi A, Ray RS. Under ambient UVA exposure, pefloxacin exhibits both immunomodulatory and genotoxic effects via multiple mechanisms. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2018, 178, 593-605.
31. Zgadzaj A, Kornacka J, Jastrzębska A, Parzonko A, Sommer S, Nałęcz-Jawecki G. Development of photoprotective, antiphototoxic, and antiphotogenotoxic formulations of ocular drugs with fluoroquinolones. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2018, 178, 201-210.
32. Onoue S, Igarashi N, Kitagawa F, Otsuka K, Tsuda Y. Capillary electrophoretic studies on the photogenotoxic potential of pharmaceutical substances. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1188, 50-56.
33. Marrot L, Belaidi JP, Chaubo C, Meunier JR, Peres P, Agapakis-Causse C. Fluoroquinolones as chemical tools to define a strategy for photogenotoxicity in vitro assessment. *Toxicology in Vitro*. 2001, 15, 131-142.
34. Seto Y, Ochi M, Onoue S, Yamada S. High-throughput screening strategy for photogenotoxic potential of pharmaceutical substances using fluorescent intercalating dye. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, 52, 781-786.
35. Miolo G, Viola G, Vedaldi D, Dall'Acqua F, Fravolini A, Tabarrini O, Cacchetti V. In vitro phototoxic properties of new 6-desfluoro and 6-fluoro-8-methylquinolones. *Toxicology in Vitro*. 2002, 16, 683-693.
36. Kim MJ, Pal S, Naoghare PK, Song JM. Monitoring the (photo)genotoxicity of photosensitizer drugs: Direct quantitation of single-strand breaks in deoxyribonucleic acid using an oligonucleotide chip. *Analytical Biochemistry*. 2008, 382, 40-47.
37. Martinez L, Chignell CF. Photocleavage of DNA by the fluoroquinolone antibacterials. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. 1998, 45, 51-59.
38. Gocke E, Chetelat AA, Csato M, McGarvey DJ, Jakob-Roetne R, Kirchner S, Muster W, Potthast M, Widmar U. Phototoxicity and photogenotoxicity of nine pyridone derivatives. *Mutation Research*. 2003, 535, 43-54.
39. Gocke E, Albertini S, Chetelat AA, Kirchner S, Muster W. The photomutagenicity of fluoroquinolones and other drugs. *Toxicology Letters*. 1998, 102-103, 375-381.
40. Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, Grollman AP, Nishimura S. 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1991, 88, 4690-4694.
41. Karakaya A, Jaruga P, Bohr VA, Grollman AP, Dizdaroglu M. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *Escherichia coli* Fpg protein. *Nucleic Acids Research*. 1997, 25, 474-479.
42. Tretyakova NY, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Peroxynitrite-induced secondary oxidative lesions at guanine nucleobases: chemical stability and recognition by the Fpg DNA repair enzyme. *Chemical Research in Toxicology*. 2000, 13, 658-664.
43. Asahara H, Wistort PM, Bank JF, Bakerian RH, Cunningham RP. Purification and characterization of *Escherichia coli* endonuclease III from the cloned *nth* gene. *Biochemistry*. 1989, 28, 4444-4449.
44. Nakabeppu Y, Yamashita K, Sekiguchi M. Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *Journal of Biological Chemistry*. 1982, 257, 2556-2562.
45. Toolaram AP, Haddad T, Leder C, Kummere K. Initial hazard screening for genotoxicity of photo-transformation products of ciprofloxacin by applying a combination of experimental and in-silico testing. *Environmental Pollution*. 2016, 211, 148-156.
46. Skrzypczak A, Przystupa N, Zgadzaj A, Parzonko A, Sykłowska-Baranek K, Paradowska K, Nałęcz-Jawecki G. Antigenotoxic, anti-photogenotoxic and antioxidant activities of natural naphthoquinone shikonin and acetylshikonin and *Arnebia euchroma* callus extracts evaluated by the umu-test and EPR method. *Toxicology in Vitro*. 2015, 30, 364-372.
47. Rojkiewicz M, Kozik W, Czapka M, Jarzembek K, Zięba G, Kuś P, Kozik V. Fotodynamiczna terapia nowotworów. *Problemy Ekologii*. 2010, 14(4), 196-204.
48. Nowak-Stępniewska A, Pergoń P, Padzik-Graczyk A. Metoda fotodynamiczna diagnostyki i leczenia nowotworów - mechanizmy i zastosowania. *Postępy Biochemii*. 2013, 59(1), 53-63.
49. Oda Y. Development and progress for three decades in umu test systems. *Genes and Environment*. 2016, 38(24), 2-14.
50. Skrzypczak A, Bonisławska A, Nałęcz-Jawecki G, Kobylińska J, Koszyk I, Demkowicz-Dobrzański K, Sawicki J. Short-term bacterial tests as a convenient method for screening assessment of photogenotoxic properties of pharmaceuticals. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2010, 19, 147-153.
51. Snyder RD, Cooper CS. Photogenotoxicity of fluoroquinolones in Chinese hamster V79 cells: dependency on active topoisomerase II. *Photochemistry and Photobiology*. 1999, 69, 288-293.
52. Kersten B, Kasper P, Brendler-Schwaab SY, Muller L. Effects of visible light absorbing chemicals in the photo-micronucleus test in Chinese hamster V79 cells. *Environmental Mutagen Research*. 2001, 23, 97-102.
53. Toyooka T, Ishihama M, Ibuki Y. Phosphorylation of Histone H2AX Is a Powerful Tool for Detecting Chemical Photogenotoxicity. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011, 131, 1313-1321.
54. Kersten B, Zhang J, Brendler-Schwaab SY, Kasper P, Muller L. The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*. 1999, 445, 55-71.
55. Struwe M, Greulich K, Suter W, Plappert-Helbing U. The photo comet assay—A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. *Mutation Research*. 2007, 632, 44-57.
56. Kersten B, Kasper P, Brendler-Schwaab SY, Muller L. Use of the photo-micronucleus assay in Chinese hamster V79 cells to study photochemical genotoxicity. *Mutation Research*. 2002, 519, 49-66.
57. Marrot L, Laberussiat A, Perez P, Meunier JR. Use of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a pre-screening approach for assessment of chemical-induced phototoxicity. *Toxicology in Vitro*. 2006, 20, 1040-1050.