



BIULETYN  
Wydziału Farmaceutycznego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2012, 5, 32 - 39  
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

## SUBSTANCJE PROMIENIOCHRONNE A ŚRODOWISKO PRZYRODNICZE

Grzegorz Nałęcz-Jawecki\*, Tomasz Zawadzki, Agata Skrzypczak

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

\* autor korespondujący, tel. +(48) 22 5720 740, e-mail: [gnałecz@wum.edu.pl](mailto:gnałecz@wum.edu.pl)

Otrzymany 7.05.2012, zaakceptowany 5.06.2012, zamieszczony 17.09.2012

### STRESZCZENIE

Substancje promieniochronne, inaczej nazywane filtrami UV, są dodawane do kosmetyków w celu ochrony skóry przed szkodliwym promieniowaniem ultrafioletowym. Wskutek szerokiego stosowania filtrów są one w wielu krajach wykrywane zarówno w ściekach, wodach powierzchniowych, jak i tkankach organizmów wodnych. Niektóre filtry, np. benzofenony, działają na układ dokrewny (działanie estrogenne), co zostało potwierdzone w wielu testach *in vitro* oraz *in vivo*. Celem naszych badań wykonanych w ramach projektu NCN była analiza działania genotoksycznego wybranych filtrów organicznych UV w krótkoterminowych, skringingowych testach bakteryjnych. W teście Ames'a wykazano brak działania mutagennego i fotomutagennego 12 badanych związków. Natomiast kwas metoksycynamonowy i jego ester 2-etyloheksylowy pod wpływem promieniowania UV działały genotoksycznie na bakterie w teście *umu*-test z aktywacją metaboliczną s9.

**SŁOWA KLUCZOWE:** działanie estrogenne, genotoksyczność, substancje promieniochronne, filtry UV

### ABSTRACT

#### SUNSCREENS AND THE ENVIROMENT

Sunscreens or uv-filters are used in cosmetics and in materials as protection against uv-radiation. The widespread occurrence of sunscreens in aquatic environment has been reported in many countries. The UV-filters have been detected in influents and effluents of wastewater treatment plants, freshwaters and in tissues of the aquatic organisms. For some filters, mainly benzophenons, hormonal activity has been documented *in vitro* and *in vivo*. The goal of our study was the evaluation of the genotoxicity of selected sunscreens in the short-term bacterial screening assays. Our results indicated that 12 tested sunscreens were not mutagenic or photomutagenic in Ames MPF™ assay. However, 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate and methoxycinnamic acid irradiated with UVA were genotoxic in *umu*-test after s9 metabolic activation.

**KEYWORDS:** estrogenicity, genotoxicity, sunscreens, UV-filters

### 1. Wprowadzenie

Nadmierna ekspozycja na promieniowanie słoneczne niesie ze sobą wiele zagrożeń. Skutki oddziaływania promieniowania ultrafioletowego (UV) na organizm ludzki zależą od wielu czynników, m.in.: długości fali, dawki promieniowania, czasu narażenia i rodzaju narażonej tkanki. Promieniowanie UVB (280 - 315 nm), pochłaniane w całości przez naskórek, odpowiada za opaleniznę, fotostarzenie, pośrednie uszkodzenia DNA, reakcje fotoalergiczne, ale także wpływa na procesy immunologiczne. Natomiast UVA (315 - 400 nm), penetrujące głębiej skórę właściwą, odpowiedzialne jest głównie za powstawanie rumienia i bezpośrednio uszkodzenia DNA (Sambandan i Ratner, 2011).

### 2. Substancje promieniochronne

Do ochrony skóry przed działaniem promieniowania UV wykorzystywane są substancje promieniochronne, nazywane także filtrami przeciwsłonecznymi. Są to związki chemiczne działające na zasadzie odbicia, pochłaniania lub rozpraszania promieni słonecznych (Giokas i in., 2007). W Unii Europejskiej zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego (Nr 1223/2009) do stosowania w kosmetykach zarejestrowanych jest 28 aktywnych związków promieniochronnych, w Szwajcarii - 22 (Poiger i in., 2004), w

Australii - 34, i tu traktowane są one jako produkty kosmetyczne. W USA FDA (Food and Drug Administration) zatwierdziła 17 związków o działaniu przeciwsłonecznym. W przeciwieństwie do wyżej wymienionych krajów, w USA substancje te traktowane są jako leki dostępne bez recepty (OTC), a więc podlegają bardziej rygorystycznym wymogom dopuszczenia do obrotu (Sambandan i Ratner, 2011).

Związki promieniochronne na podstawie charakteru ich właściwości fotoprotekcyjnych przez długi czas dzielono na dwie kategorie, substancje fizyczne i chemiczne. Nazwa wynikała z faktu, iż pierwsza grupa działa głównie według mechanizmów fizycznych (rozproszenie i odbicie promieniowania), a aktywność drugiej opiera się na chemicznych zdolnościach do pochłaniania promieniowania. Jednak bardziej racjonalny jest podział na filtry nieorganiczne (fizyczne) i organiczne związki promieniochronne (chemiczne), ponieważ substancje nazywane „filtrami fizycznymi”, stanowią także związki chemiczne (Serpone i in., 2007). Spośród zarejestrowanych na terenie UE dwudziestu ośmiu filtrów tylko jeden jest związkiem nieorganicznym (ditylenek tytanu - TiO<sub>2</sub>) (Dyrektywa EU, 1976). Wprowadzenie tlenku cynku (ZnO), dopuszczonego do stosowania w USA, jest obecnie rozważane także w Europie.

Zanim dany związek chemiczny zostanie zaakceptowany jako filtr promieniochronny, musi przejść szereg badań

toksykologicznych prawie równie obszernych i szczegółowych co nowo wprowadzane leki. Substancja jest badana pod kątem toksyczności ostrej, drażniącego, uczulającego i fotouczulającego wpływu na skórę, fototoksyczności, genotoksyczności, fotogenotoksyczności, potencjalnego działania kancerogennego, a w Stanach Zjednoczonych także działania fotokancerogennego (Nohynek i Schaefer, 2001).

Idealny filtr UV powinien być przede wszystkim bezpieczny, zarówno dla dzieci, jak i dorosłych, termo- i fotostabilny, wodoodporny i łatwy w aplikacji (Nohynek i Schaefer, 2001). Ponadto, nie powinien penetrować przez skórę i być transportowany do wnętrza komórek, gdzie mógłby wywierać szkodliwy wpływ na DNA. Idealna substancja promieniochronna musi skutecznie emitować/rozpraszać zaabsorbowaną energię poprzez procesy fotochemiczne i fizyczne, wykluczając przy tym powstawanie reaktywnych form tlenu (Serpone i in., 2007).

Substancje absorbujące promieniowanie UV są szeroko stosowane jako ochrona przed szkodliwym działaniem słońca w produktach kosmetycznych, takich jak kremy i mleczka do opalania. Ich zużycie stale wzrasta, co związane jest z rosnącą świadomością ludzi dotyczącą szkodliwości nadmiernej ekspozycji na promieniowanie słoneczne, która może wywołać ostry (poparzenia, uczulenia) lub chroniczny efekt toksyczny (nowotwory skóry). Filtry UV są również stosowane w kosmetykach codziennego użytku - szminkach, szamponach i kremach, w celu zapewnienia stabilności i trwałości produktu, jak również w różnego rodzaju opakowaniach jako ochrona polimerów i pigmentów przed fotodegradacją.

Działanie mineralnych filtrów UV (tlenki tytanu i cynku) polega na odbijaniu oraz rozpraszaniu promieniowania. Filtry organiczne (chemiczne) głównie absorbują szkodliwe promieniowanie. Możemy je podzielić na filtry promieniowania UVA, UVB oraz filtry o szerokim spektrum działania UVAB (Serpone i in., 2007). Filtry organiczne, absorbując promieniowanie, mogą ulegać przemianom fotochemicznym, polegającym na bezpośredniej lub pośredniej fotolizie. W wyniku reakcji chemicznych inicjowanych promieniowaniem mogą powstać niestabilne, wysoce reaktywne produkty cechujące się nieraz większą toksycznością niż związek macierzysty. Powstałe produkty mają często charakter rodnikowy (rodniki nadtlenkowe, hydroksylowe). Dlatego substancje stosowane jako filtry UV, poza innymi właściwościami, powinny odznaczać się wysoką fotostabilnością.

Filtry chemiczne prawie zawsze używane są w mieszaninach, gdyż żaden związek pojedynczo zastosowany w kosmetyku w dopuszczalnych stężeniach nie zapewnia odpowiedniej ochrony tzn. zabezpieczenia przed promieniowaniem UVA i UVB. Z przeglądu szwajcarskich kosmetyków przeciwslonecznych wynika, że w ponad połowie z nich zastosowano trzy najpowszechniejsze związki (Tabela 1): BM-DBM (butylometoksydibenzoilometan), 4-MBC (3-(4-metylobenzylideno)kamfora) i OMC (4-metoksycynamonian 2-etyloheksylu) (Poiger i in., 2004). Wysoka popularność BM-DBM wynika z faktu, że jest to jedyny zarejestrowany filtr UVA. Jednocześnie okazało się, że cztery filtry: OMC, OC (oktokrylen), 4-MBC oraz BM-DBM są dodawane do kosmetyków w ilości powyżej 1%, przez co stanowią największy „wagowy” udział w puli wszystkich stosowanych substancji promieniochronnych.

Często zdarza się również, że filtr chemiczny występuje w kosmetyku w połączeniu z filtrami fizycznymi - np. tlenkiem tytanu lub cynku. Tlenki te nie wchłaniają się przez skórę i nie wykazują bezpośredniej toksyczności dla organizmu człowieka, jednakże mogą działać jako katalizatory reakcji fotochemicznych. Wówczas generują powstanie wolnych rodników tlenowych i innych reaktywnych form tlenu (ROS), które są cytotoksyczne lub genotoksyczne same w sobie, a dodatkowo mogą wpływać na rozkład filtrów chemicznych z wytworzeniem toksycznych produktów.

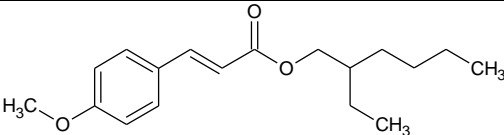
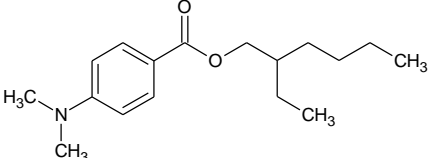
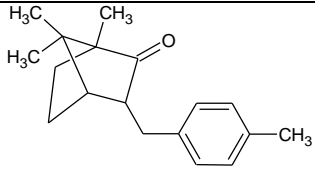
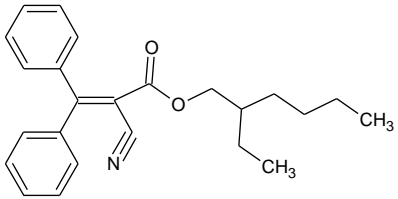
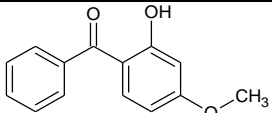
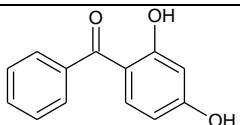
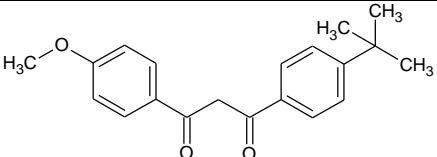
### 3. Substancje promieniochronne w środowisku wodnym

Ilość substancji promieniochronnych trafiających do środowiska jest nieznana. Filtry UV stosowane w kosmetykach są zmywane ze skóry do basenów i wód powierzchniowych podczas działalności rekreacyjnej. Porównywalna ich ilość trafia do ścieków komunalnych po splukaniu z powierzchni ciała oraz po praniu odzieży i ręczników (Poiger i in., 2004). Kosmetyki są sprzedawane zarówno w sklepach, jak i w aptekach, ich roczna sprzedaż jest tajemnicą handlową. Na podstawie ankiet wśród plażowiczów Poiger i in. (2004) oszacowali, że do jeziora Zurich w sezonie turystycznym (maj - wrzesień) dostaje się prawie 1000 kg organicznych substancji promieniochronnych, czyli w najgorszym przypadku ich stężenie w wodzie może wynosić 300 ng/l. Jednakże analizy chemiczne wykazały stężenia 2-20 razy niższe - rzędu kilkudziesięciu ng/l. Rozbieżności te wyjaśnił Straub (2002) szacujący ryzyko środowiskowe dla jednego z najbardziej popularnych filtrów - OMC. W obliczeniach uwzględnił biodegradację w oczyszczalniach ścieków (75% w ciągu 28 dni), 90-procentową absorpcję OMC na osadzie czynnym, a także degradację abiotyczną (67% w ciągu 79 dni). Z szacunków COLIPA (stowarzyszenia reprezentującego europejską branżę kosmetyczną) w Szwajcarii roczna podaż OMC wynosi 20 ton, z czego do środowiska wodnego trafia około 10%, czyli 2000 kg. Z tych szacunków wynika, że maksymalne przewidywane stężenie środowiskowe (PEC - predicted environmental concentration) OMC wynosi 70-80 ng/l.

OMC, BP-3, BP-4, OC oraz 4-MBC oznaczane były w surowych ściekach komunalnych w stężeniach 1,5 - 19 µg/l, zaś w ściekach oczyszczonych - 0,01 - 2,7 µg/l. Pojedyncze analizy wykazały obecność filtrów UV (BP-4 i 4-MBC) w wodach powierzchniowych w Szwajcarii i Korei Południowej nawet do kilkuset ng/l (Fent i in., 2010). Wykryto także obecność substancji promieniochronnych w tkankach organizmów żyjących w rzece Glatt w Szwajcarii: kietzy *Gammarus sp.*, małży *Dreissena polymorpha*, ryb: *Barbus barbus*, *Leuciscus cephalus* i *Salmo trutta* oraz kormoranów (*Phalacrocorax sp.*). Najwyższe poziomy osiągnął lipofilny OMC (Fent i in., 2010). Autorzy odnotowali biokumulację związku w tkankach zwierząt ze wszystkich poziomów troficznych, współczynnik BCF (bioconcentration factor) wyniósł średnio 762. Nie stwierdzono natomiast biomagnifikacji związków w łańcuchu troficznym; od bezkręgowców, przez ryby do kormoranów.

Jeon i in. (2006) w jeziorach i rzekach Korei Południowej oznaczyli benzofenony i ich metabolity w stężeniach 47-87 ng/l. Znacznie większe poziomy tych związków - aż do kilku µg/kg wykryto w osadach dennych jezior. Li i in. (2007) badali obecność podstawowych substancji promieniochronnych w zlokalizowanej w północnych Chinach sta-

Tabela 1. Wzory strukturalne wybranych substancji promieniochronnych.

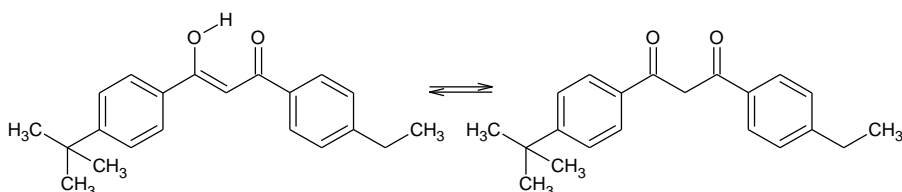
Związek promieniochronny	Wzór strukturalny
OMC 4-metoksycynamonian 2-etyloheksylu CAS No 5466-77-3	
ODP 4-(dimetyloamino)benzoesan 2-etyloheksylu CAS No 21245-02-3	
4-MBC 3-(4-metylobenzylideno)kamfora CAS No 36861-47-9	
OC Oktokrylen CAS No 6197-30-4	
BP-3 2-hydrokso-4-metoksybenzofenon CAS No 131-57-7	
BP-1 2,4-dihydroksobenzofenon CAS No 131-56-6	
BM-DBM Awobenzon CAS No 70356-09-1	

cji uzdatniania ścieków oczyszczonych, przeznaczonych do zastosowań gospodarczych. Zaobserwowali dużą zmienność sezonową stężeń, poziomy BP3, 4-MBC, OMC oraz OC były 2 - 5-krotnie wyższe latem niż zimą. Oznaczane związki były usuwane w toku oczyszczania ścieków średnio w 30-40 procentach. Największe znaczenie miał proces ozonowania, następnie koagulacja i mikrofiltracja.

#### 4. Przemiany substancji promieniochronnych w środowisku wodnym

Filtry organiczne muszą oddać energię pochłoniętą w wyniku absorpcji promieniowania UV. Reakcje mogą być niedestrukcyjne dla cząsteczki: fluorescencja, fosforescencja, odwracalna izomeryzacja, bądź destrukcyjne: fragmentacja, generowanie rodników i trwała izomeryzacja (Damiani i in., 2007). Przemiany destrukcyjne skutkują osłabieniem działania fotoprotekcyjnego związku. OMC ulega izomeryzacji *cis-trans*. Powstający izomer *trans* ma to samo spektrum absorpcji, ale mniejszy współczynnik absorpcji, stąd

jego działanie protekcyjne jest mniejsze. Z uwagi na powstające szkodliwe fotoprodukty, ODP jest wycofywany z użytku i zastępowany nowymi, bardziej stabilnymi związkami (Damiani i in., 2007). BM-DBM - najpowszechniej stosowany filtr UVA, szybko ulega rozpadowi pod wpływem tego promieniowania. Następuje izomeryzacja ketonolowa (Ryc. 1), w wyniku której mogą powstać rodniki, co zostało potwierdzone przez analizę peroksydacji liposomów (Damiani i in., 2007). W obecności BM-DBM nastąpił 3-krotny wzrost ilości produktów rozkładu liposomów, świadczący o obecności ROS (Reactive oxygen species) w roztworze. Stosowanie w kosmetykach niewłaściwych mieszanin filtrów UVA i UVB może wpłynąć na fotorozkład każdego ze składników mieszaniny, na przykład wolne rodniki powstające w czasie fotolizy BM-DBM znacznie przyspieszają rozkład OMC (Diaz-Cruz i in., 2008).



Ryc. 1. Izomeria keto-enolowa BM-DBM (Cantrell i McGarvey, 2001).

Niektóre filtry organiczne podlegają fotodegradacji w procesie bezpośredniej fotolizy bądź w wyniku reakcji z chlorem lub jego związkami. Chlor, podchloryn oraz ditlenek chloru są używane do dezynfekcji wody w basenach kąpielowych, a także ścieków w oczyszczalniach (Diaz-Cruz i in., 2008). W obu przypadkach związki chloru mogą wchodzić w interakcje z substancjami promieniochronnymi. Negreira i in. (2008) zaobserwowali, że jedynie salicylan 2-etyloheksylu (OS) był odporny na działanie wolnego chloru, zaś ODP oraz BP-3 ulegały licznym przemianom. W przypadku ODP powstawały głównie monochloropochodne, natomiast BP-3 ulegał nie tylko reakcji chlorowania do mono i dichloropochodnych, ale również rozkładowi do bardziej stabilnych pochodnych metoksyfenolowych. Śladowe ilości bromków obecnych w wodzie (np. wodociągowej) znacznie przyspieszały te przemiany. Z kolei Nakajima i in. (2009) zidentyfikowali mono i dichloropochodne zarówno ODP, jak i produktów jego demetylacji: p-metyloamino-benzoenu 2-etyloheksylu oraz p-aminobenzoenu 2-etyloheksylu.

Produkty powstające w czasie takiej fotodegradacji mogą odznaczać się zwiększoną toksycznością. Przykładowo fotodegradacja OMC, substancji wchodzącej w skład większości dostępnych w handlu kremów do opalania, prowadzi do podwyższenia toksyczności w teście na komórkach mysich (Butt i Christensen, 2000).

### 5. Toksyczność ostra dla organizmów wodnych

W Zakładzie Badania Środowiska WUM badano wpływ wybranych substancji promieniochronnych na organizmy wodne: bakterie *Vibrio fischeri* (test Microtox®), pierwotniaki *Spirostomum ambiguum* (test Spirotox), wrotki *Brachionus calyciflorus* (test Rotokit F™) i skorupiaki *Thamnocephalus platyurus* (test Thamnotokit F™). Na 17 badanych związków jedynie 7 wywoływało ostre efekty toksyczne w stężeniach poniżej 10 mg/l (Szczęsny i in., 2010). Najsilniejsze działanie wywierał OMC, dla którego wartości EC50 w testach Microtox®, Thamnotokit F™ i Rotokit F™ wyniosły kolejno: 0,38 mg/l (Nowacka, 2011), 0,66 mg/l i 0,71 mg/l (Zagańczyk, 2011). Trzykrotnie mniej toksyczny był ODP. Zaobserwowano silny wpływ detergentu SDS (siarczan dodecylosodowy) na toksyczność filtrów UV dla wrotków (Szczęsny, 2012). W obecności detergentu wartości EC50 zmalały 6 (ODP) i 7-krotnie (OMC) do stężeń 0,14 mg/l (ODP) i 0,10 mg/l (OMC).

### 6. Działanie estrogenne

Schlumpf i in. (2001) zbadali właściwości estrogenne 6 filtrów UV stosując testy *in vitro* na komórkach ludzkiej raka piersi MCF-7 oraz *in vivo* na szczurach Long-Evans w teście uterotropowym. Wszystkie badane filtry z wyjątkiem BM-DBM wykazały dawkozależne działanie estrogenne *in*

*vitro* w zakresie stężeń 0,1-10  $\mu$ M. Najsilniejszy efekt zaobserwowano w przypadku BP-3. Aktywność hormonalna badanych filtrów była porównywalna z aktywnością związków chemicznych klasyfikowanych jako estrogenne zanieczyszczenia środowiskowe: bisfenolu A, metoksychloru, nonylfenylu i o,p'-DDT. Trzy związki: 4-MBC, OMC i BP-3 podane doustnie szczurom wywoływały dawkozależny wzrost masy macicy (*uterus*), co wskazuje na działanie estrogenne próbek. Najsilniejszy efekt *in vivo* obserwowano dla 4-MBC, natomiast BP-3 wykazał jedynie słabą aktywność. Autorzy zasugerowali, że to nie BP-3, lecz jego główny metabolit 2,4-dihydroksybenzofenon (BP-1), wykazuje powinowactwo do receptora estrogenowego i odpowiada za jego aktywację. Należy przy tym pamiętać, że 4-MBC, BP-3 i OMC mogą ulegać bioakumulacji, co zwiększa zagrożenie dla organizmów wyższych.

Morohoshi i in. (2005) do badań składników kosmetyków zastosowali dwa testy oceny aktywności estrogennej. Test ER-ELISA określa zdolność wiązania badanej substancji z ludzkim receptorem estrogenowym  $\alpha$  (hER $\alpha$ ). Drugi test, wykrywający aktywność zarówno agonistyczną, jak i antagonistyczną, wykorzystuje rekombinowane drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, w których hER $\alpha$  jest związany z genem  $\beta$ -galaktozydazy. Oba testy wykonywano bez oraz z aktywacją metaboliczną frakcją s9 z wątroby szczura. Reakcję pozytywną w teście ER-ELISA zaobserwowano dla 5 z 7 badanych benzofenonów, przy czym aktywność BP-1 i BP-2 była wyższa niż bisfenolu-A. Benzofenony 1 i 2 okazały się agonistami hER $\alpha$  o podobnej aktywności jak bisfenol-A, przy czym silniejsze działanie wykazywały *per se*, czyli bez dodatku frakcji s9. Z kolei BP-3 wykazał działanie zarówno agonistyczne, jak i antagonistyczne jedynie w badaniach z aktywacją metaboliczną. Enzymy wątrobowe prawdopodobnie hydrolizują BP-3, co prowadzi do powstawania BP-1. Badacze zasugerowali, że do działania estrogennego niezbędna jest grupa hydroksylowa w pozycji 4, obecność drugiej grupy -OH w pozycji 2 zwiększa aktywność, zaś dodatkowa grupa -OH w pozycji 4' obniża tą aktywność. W przeciwieństwie do badań Schlumpf i in. (2001) 4-MBC oraz OMC nie wykazały żadnej aktywności, jednakże Morohoshi i in. (2005) zastosowali znacznie niższe stężenia badanych związków.

Kunz i in. (2006) badali aktywność estrogeną 23 filtrów UV stosując dwa szczepy zmodyfikowanych genetycznie drożdży zawierających receptor estrogeny pochodzący: z ryb (pstrąga tęczowego) - rER $\alpha$  oraz ludzi - hER $\alpha$ . Aż 10 z 23 filtrów wykazało aktywność estrogeną. Najsilniejszym działaniem charakteryzowały się benzofenony BP-1, BP-2 oraz 4-DHB, mniejszym - 3-benzylideno kamfora (3-BC), salicylan 2-etyloheksylu (OS), BP-3 i BP-4. W przypadku 4-MBC i OMC nie zanotowano reakcji testowych. W przeciwieństwie do Morohoshi i in. (2005) testów nie wyko-

nywano w obecności frakcji s9, dlatego BP-3 miał dużo niższą aktywność, gdyż nie został zmetabolizowany przez drożdże do bardziej aktywnych pochodnych. Rybi receptor rtER $\alpha$  posiada 62 razy niższe powinowactwo niż ludzki - hER $\alpha$  do 17 $\beta$ -estradiolu (E2) stosowanego jako kontrola pozytywna. Natomiast filtry UV wiązały się w równym stopniu z receptorami ludzkimi i rybimi.

W drugiej części pracy Kunz i in. (2006) badali aktywność estrogeną filtrów *in vivo* poprzez pomiar witellogeniny (VTG) u ryb *Pimephales promelas*. VTG jest glikoproteiną, prekursorem białek żółtka wytwarzaną u wielu gatunków bezkręgowców i kręgowców po aktywacji przez estrogeny i substancje mające działanie estrogenne. Pod wpływem nanogramowych stężeń E2 zaobserwowano 8000-krotny wzrost poziomu VTG u badanych ryb. Podobny poziom indukcji VTG odnotowano pod wpływem 3-BC (w stężeniu 0,43-0,95 mg/l), BP-1 (4,9 mg/l) oraz BP-2 (8,8 mg/l). Autorzy zauważyli również, że 3 z 5 filtrów wykazujących aktywność *in vitro*, nie działały *in vivo*.

Stężenia substancji promieniochronnych wywołujące działanie estrogenne w przedstawionych badaniach są znacznie wyższe niż odnotowywane poziomy środowiskowe. Wydaje się, iż w związku z tym substancje te nie powinny stwarzać żadnego zagrożenia dla organizmów wodnych. Jednakże, substancje mające wpływ na układ hormonalny są najczęściej lipofilne, co może doprowadzić do kumulacji, zwłaszcza u organizmów długożyjących. Dodatkowo, substancje te działają zwykle synergistycznie z innymi substancjami rozprzegającymi układ dokrewny (EDC - endocrine disrupting compounds) obecnymi w środowisku. Stąd działania estrogenne filtrów UV nie należy lekceważyć.

## 7. Badania własne: Ocena genotoksyczności i fotogenotoksyczności substancji promieniochronnych

W piśmiennictwie niewiele jest danych na temat właściwości genotoksycznych organicznych substancji promieniochronnych. Nakajima i in. (2009) ustalili, że czyste filtry organiczne były niemutagenne w teście Ames'a. Natomiast reakcja z wolnym chlorem prowadziła do powstania produktów mutagennych. W przypadku OMC liczba rewertantów wzrosła kilkukrotnie. Natomiast ODP przekształcił się w związki toksyczne dla bakterii. W obu przypadkach powstałe związki były nietrwałe, po 6 godzinach kontaktu z chlorem obserwowano zanik reakcji testowych.

W projekcie MNiSW / NCN przy użyciu krótkoterminowych testów bakteryjnych *umu*-test i testu Ames'a oceniono genotoksyczność wybranych 12 organicznych substancji promieniochronnych należących do różnych grup chemicznych.

### 7.1. Metody

#### 7.1.1. Badane związki

MCA - kwas 4-metoksycynamonowy, OMC - 4-metoksycynamonian 2-etyloheksylu, EtPABA - 4-aninobenzoesan etylu, ODP - 4-dimetyloamino benzoesan 2-etyloheksylu, OS - salicylan 2-etyloheksylu, OC - oktokrylen, 4-MBC - 4-metylobenzylidenokamfora, BP1 - 2,4-dihydroksybenzofenon, BP2 - bis(2,4-dihydroksy) benzofenon, BP3 - 2-hydroksy-4-metoksybenzofenon, BP4 - kwas 2-hydroksy-4-metoksybenzofenono-5-sulfonowy, DHB - 4,4'-dihydroksybenzofenon. Wszystkie związki zakupiono w Sigma-Aldrich.

#### 7.1.2. *Umu*-test

*Umu*-test wykorzystuje szczep bakterii *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002. Szczep ten posiada plazmid pSK1002, który zawiera fuzję genu *umuC* (jeden z genów bakteryjnego systemu SOS naprawy DNA) i genu *lacZ* (genu strukturalnego dla  $\beta$ -galaktozydazy). Ponadto, w celu uwrażliwienia na genotoksyny, szczep testowy zawiera dodatkowe modyfikacje genetyczne: mutację *rfa* zwiększającą przepuszczalność błony lipo polisacharydowej, co ułatwia genotoksynom penetrację do środka komórki bakteryjnej oraz delecję regionu *uvrB* skutkującą utratą możliwości naprawy genomu poprzez wycinanie źle sparowanych zasad. Oryginalny szczep testowy *Salmonella typhimurium* TA1535 używany w niniejszej pracy został zakupiony w Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Test wykonywano w 96-dółkowych mikroplótkach wg schematu zamieszczonego na Ryc. 2a.

Bakterie nie posiadają enzymów metabolizujących ksenobiotyki takich jak organizmy wyższe. Dlatego w celu wykrycia genotoksyn, które do ujawnienia swojej aktywności wymagają aktywacji metabolicznej, w testach bakteryjnych stosuje się dodatek wątrobowej frakcji s9 pozyskanej z indukowanych wątrób gryzoni. Frakcję s9 używaną w niniejszej pracy wyizolowano z wątrób szczurów, samców szczepu Sprague - Dawley. Enzymy wątrobowe indukowano roztworem Aroclor 1254. Genotoksyczność w tym teście objawia się wzrostem aktywności  $\beta$ -galaktozydazy. Jej miarą jest współczynnik IR obliczany ze wzoru:

$$IR = U_T / U_N$$

gdzie:

$U_T$  - aktywność  $\beta$ -galaktozydazy dla próbki badanej

$U_N$  - aktywność  $\beta$ -galaktozydazy dla kontroli negatywnej

Wartość  $IR > 1,5$  wskazuje na to, że próbka ma działanie genotoksyczne. Miarą toksyczności w tym teście jest zahamowanie wzrostu bakterii (współczynnik G) obliczany ze wzoru:

$$G = (A_{600T} - A_{600B}) / (A_{600N} - A_{600B})$$

gdzie:

$A_{600T}$  - absorbcja badanej próbki przy długości fali 600 nm

$A_{600N}$  - absorbcja (wartość średnia) kontroli negatywnej przy długości fali 600 nm

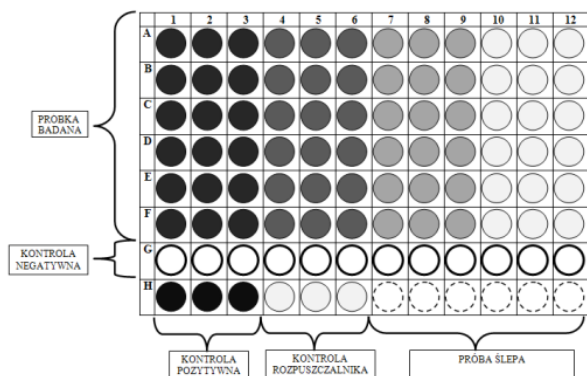
$A_{600B}$  - absorbcja (wartość średnia) ślepej próby przy długości fali 600 nm

#### 7.1.3. Test Ames'a

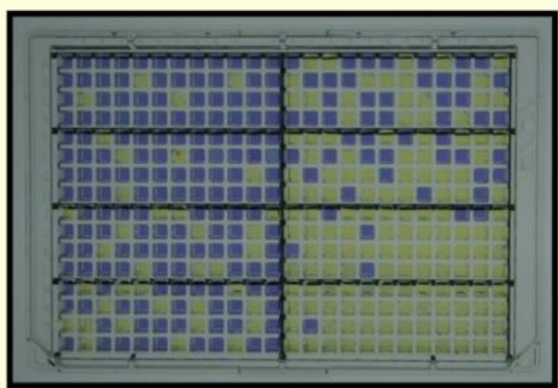
Test Ames'a wykonano w wersji mikroplótkowej (Ryc. 1b) z zastosowaniem sześciu szczepów bakteryjnych wykrywających różne rodzaje uszkodzeń materiału genetycznego: 4 szczepy bakterii *Salmonella typhimurium*: TA98, TA100, TA1535, TA1537 i 2 szczepy *Escherichia coli*: wp2 [pKM101] i wp2 *uvrA*. Szczepy TA100, TA1535 oraz obydwa szczepy *E.coli* wykrywają mutację substytucji par zasad, natomiast TA98 i TA1537 wykrywają mutację zmiany ramki odczytu. Szczepy użyte w teście są szczepami rekomendowanymi przez wytyczną OECD 471. Wykorzystano komercyjną wersję tego testu - „Ames MPF™ Penta I” zakupioną

w firmie Xenometrix (Szwajcaria). Oznaczenia wykonano zarówno z dodatkiem frakcji s9 jak i bez niej. Ponad dwukrotny wzrost liczby kolonii z mutacją powrotną (liczby dołków ze zmienioną barwą) po ekspozycji na badany związek chemiczny w porównaniu z tzw. wartością bazową oznacza mutagenne działanie tego związku w teście Ames MPF™ Penta.

a)



b)



Ryc. 2. Mikroplątki w testach: a) *umu*-test, b) Ames MPF™ Penta I.

#### 7.1.4. Inkubacja badanych próbek z bakteriami testowymi

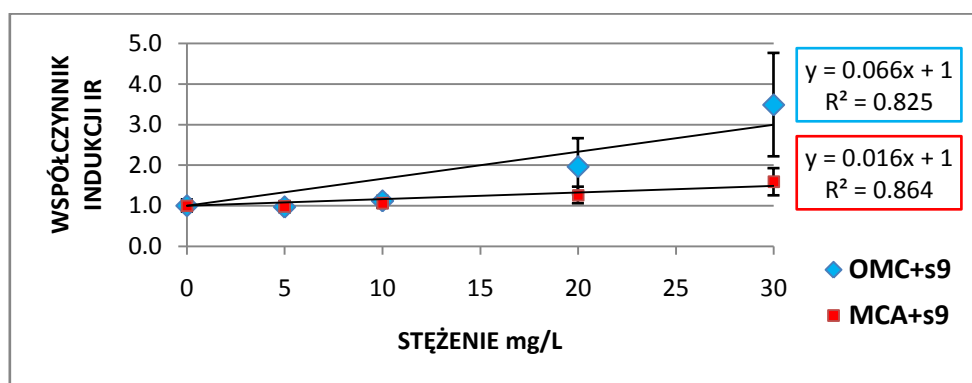
Ocenę genotoksyczności i toksyczności prowadzono zgodnie z procedurą standardową testów inkubując roztwory badanych próbek z bakteriami w ciemności. Natomiast ocenę fotogenotoksyczności i fototoksyczności przeprowadzono stosując zmodyfikowaną procedurę testów (Skrzyp-

czak i in., 2010). Mikroplątki testowe zawierające badane próbki razem z bakteriami naświetlano lampami UVA (365 nm) i UVB (302 nm) przez 120 min (*umu*-test) oraz 90 min (test Ames'a).

#### 7.2. Wyniki

W teście Ames'a żaden z badanych związków promieniotwórczych nie spowodował mutacji powrotnych w żadnym z zastosowanych szczepów testowych bez względu na warunki przeprowadzenia doświadczeń (ciemność/UV, +s9/-s9). Świadczy to o braku aktywności mutagennej oraz fotomutagennej tych związków w stosunku do szczepów testowych w teście Ames MPF™ Penta, niezależnie od obecności lub braku frakcji s9.

W *umu*-teście żaden z omawianych związków nie wykazał potencjału genotoksycznego w ciemności, niezależnie od obecności lub braku w mieszaninie inkubacyjnej frakcji s9. Aktywność  $\beta$ -galaktozydazy pozostawała na stałym poziomie, a wartość współczynnika indukcji IR nie przekroczyła wartości granicznej - 1,5. Właściwości fotogenotoksyczne zostały stwierdzone dla kwasu metokscynamowego (MCA) i jego pochodnej 2-etyloheksylowej (OMC), ale tylko w warunkach naświetlania promieniowaniem UVA i zastosowania aktywacji metabolicznej. Promieniowanie UVB nie miało wpływu na aktywność badanych związków. OMC wykazał silniejszy potencjał fotogenotoksyczny niż MCA. Wraz ze wzrostem stężenia OMC rosła zarówno aktywność  $\beta$ -galaktozydazy jak i wartość współczynnika indukcji (Ryc. 2). Minimalne stężenie fotogenotoksyczne, czyli stężenie, przy którym IR=1,5 zostało wyliczone na podstawie wykresu regresji liniowej na poziomie 7,52 mg/l. MCA wykazywał znacznie słabsze właściwości fotogenotoksyczne w tych samych warunkach. Graniczna wartość współczynnika indukcji została przekroczona tylko dla najwyższego badanego stężenia MCA=30 mg/l (IR=1,59). Minimalne stężenie genotoksyczne dla MCA było czterokrotnie wyższe niż w przypadku OMC. Do ujawnienia własności fotogenotoksycznych zarówno OMC jak i MCA niezbędna była aktywacja metaboliczna. W oznaczeniach bez dodatku frakcji wartość współczynnika indukcji pozostawała na stałym poziomie bez względu na stężenie badanych związków.



Ryc. 3. Zależność współczynnika indukcji (IR) od stężenia MCA i OMC. Oznaczenie w *umu*-teście z aktywacją metaboliczną s9 i naświetlaniem UVA.

## 8. Podsumowanie

Substancje promieniochronne zarówno w środowisku jak i po ich aplikacji na skórę człowieka mogą ulegać przemianom pod wpływem promieniowania UV. Wyniki badań własnych wskazują, że spośród 12 analizowanych związków promieniochronnych, jedynie w dwóch przypadkach przemiany te mogą prowadzić do powstania związków o działaniu genotoksycznym. W dalszej części projektu planowane jest przebadanie wpływu filtrów nieorganicznych na fotorozkład filtrów organicznych. Zarówno w formułacjach kosmetycznych, jak i w środowisku naturalnym filtry UV zawsze występują w mieszankach i w otoczeniu innych związków, które mogą poważnie wpływać na ich stabilność oraz inicjować ich fotodegradację. Przykładem jest chociażby ditlenek tytanu, który oprócz właściwości odbijających i rozpraszających promieniowanie UV jest fotokatalizatorem używanym w przemyśle. Dodatkowo filtry UV jako zanieczyszczenie ekosystemów wodnych są narażone na promieniowanie przez dużo dłuższy czas niż ma to miejsce w doświadczeniach modelowych, w których istotny jest tylko czas ich pozostawiania na skórze człowieka. Przemiany inicjowane światłem słonecznym prowadzą bardzo często do powstania produktów o zwiększonej toksyczności i genotoksyczności w porównaniu do związku macierzystego. Narażenie człowieka na te związki ma miejsce zarówno w momencie celowej aplikacji kosmetyku na skórę, jak i poprzez zanieczyszczone elementy środowiska. Dlatego istotne jest badanie i identyfikacja, obok substancji macierzystych, także produktów fotodegradacji filtrów UV oraz analiza mieszanin, a nie tylko pojedynczych substancji.

## 9. Wykaz skrótów i oznaczeń

4-DHB	- 4,4'-dihydroksybenzofenon
4-MBC	- 4-metylobenzylideno kamfora
BM-DBM	- butylo metoksydibenzoilometan
BP-1	- 2,4-dihydroksybenzofenon
BP-2	- bis(2,4-dihydroksy)benzofenon
BP-3	- 2-hydroksy-4-metoksybenzofenon
BP-4	- kwas 2-hydroksy-4-metoksybenzofenono-5-sulfonowy
EDC	- substancje rozprzegające system dokrewny (endocrine disrupting compounds)
IR	- współczynnik indukcji w teście umu-test (induction ratio)
MCA	- kwas metoksykynamonowy
OC	- oktokrylen
ODP	- dimetyloamino benzoesan 2-etyloheksylu
OMC	- metoksykynamonian 2-etyloheksylu
OS	- salicylan 2-etyloheksylu
OTC	- leki sprzedawane bez recepty (over the counter drugs)
PEC	- przewidywane stężenie środowiskowe (predicted environ. concentration)
ROS	- reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species)

Badania własne były finansowane ze środków MNiSW / NCN, grant nr N N405 422739.

## 10. Bibliografia

- Butt S.T., Christensen T. (2000). Toxicity and phototoxicity of chemical sun filters. *Radiat Protect Dosim* 91: 283-286.
- Cantrell A., McGarvey D.J. (2001). Photochemical studies of 4-*tert*-butyl-4'-methoxy dibenzoilmethane (BM-DBM). *J Photochem Photobiol B: Biology* 64:117-122.
- Damiani E., Baschong W., Greci L. (2007). UV-Filter combinations under UV-A exposure: Concomitant quantification of over-all spectra stability and molecular integrity. *J Photochem Photobiol B: Biology* 87:95-104.
- Díaz-Cruz M.S., Llorca M. and Barcelo D. (2008). Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *Trends Anal Chem* 27:873-887.
- Dyrektywa EU (1976). EU (Cosmetics Directive 76/768/EEC, 2006), Council Directive 76/768/EEC of July 27, 1976 on the approximation of the laws of the member states relating to cosmetic products and its successive amendments, basic act 31976L0768, Off. J. Eur. Commun. L 262 (27.9.1976) p. 169, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/consleg/1976/L/01976L0768-20060809-en.pdf> (dostęp 01.2008).
- Fent K., Zenker A., Rapp M. (2010). Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environ Pollut* 158:1817-1824.
- Giokas D.L., Salvador A., Chisvert A. (2007). UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *Trends Anal Chem* 26:360-374.
- Jeon H.K., Chung Y., Ryu J.C. (2006). Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 113:192-202.
- Kunz P.Y., Galicia H., Fent K. (2006). Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicol Sci* 90:349-361.
- Li W., Ma Y., Guo C., Hu W., Liu K., Wang Y., Zhu T. (2007). Occurrence and behavior of four of the most used sunscreen UV filters in a wastewater reclamation plant. *Water Res* 41:3506-3512.
- Morohoshi K., Yamamoto H., Kamata R., Shiraishi F., Koda T., Morita M. (2005). Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicol in Vitro* 19: 457-469.
- Nakajima M., Kawakami T., Niino T., Takahashi Y., Onodera S. (2009). Aquatic fate of sunscreen agents octyl-4-methoxycinnamate and octyl-4-dimethylaminobenzoate in model swimming pools and the mutagenic assays of their chlorination byproducts. *J Health Sci* 55:363-372.
- Negreira N., Canosa P., Rodriguez I., Ramil M., Rubi E., Cela R. (2008). Study of some UV filters stability in chlorinated water and identification of halogenated by-products by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1178:206-14.
- Nohynek G.J., Schaefer H. (2001). Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regul Toxicol Pharmacol* 33:285-299.
- Nowacka P. (2011). Ocena wpływu detergentu SDS na toksyczność wybranych związków promieniochronnych za pomocą testów Spirotox i Microtox. Praca dyplomowa, Zakład Badania Środowiska WUM.
- Poiger T., Buser H.R., Balmer M.E., Per-Anders B., Müller M.D. (2004). Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere* 55:951-963.
- Sambandan D.R., Ratner D. (2011). Sunscreens: An overview and update. *J Am Acad Dermatol* 64:748-758.
- Schlumpf M., Cotton B., Conscience M., Haller V., Steinmann B. and Lichtensteiger W. (2001). In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ Health Perspect* 109:239-244.
- Serpone N., Dondi D. and Albini A. (2007). Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and skincare products. *Inorg Chim Acta* 360:794-802.
- Skrzypczak A., Bonisławska A., Nałęcz-Jawecki G., Kobylińska J., Koszyk I., Demkowicz-Dobrzański K., Sawicki J. (2010). Short-term bacterial tests as a convenient method for screening assessment of

- photogenotoxic properties of pharmaceuticals. *Fresenius Environ Bull* 19:147-153.
21. Straub J. O. (2002). Concentrations of the UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in the aquatic compartment: a comparison of modelled concentrations for Swiss surface waters with empirical monitoring data. *Toxicol Lett* 131:29-37.
  22. Szczęsny Ł. (2012). Ocena toksyczności substancji promieniotwórczych z wykorzystaniem testów na *Brachionus calyciflorus* (wrotki). Rozprawa doktorska, Zakład Badania Środowiska, WUM.
  23. Szczęsny Ł., Nałęcz-Jawecki G., Sawicki J. (2010) The toxicity of selected sunscreens to *Brachionus calyciflorus*. *Fresen. Environ. Bull.* 19: 2277-2281
  24. Zagańczyk A.N. (2011). Ocena toksyczności związków promieniotwórczych oraz wpływu surfaktantów na ich toksyczność w testach z użyciem skorupiaków i wrotków. Praca dyplomowa, Zakład Badania Środowiska, WUM.
  25. Zawadzki T. (2011). Ocena fototoksyczności substancji promieniotwórczych przy użyciu krótkoterminowego testu bakteryjnego umu-test. Praca dyplomowa, Zakład Badania Środowiska, WUM.