

**AZ ARZENÁT ÉS ARZENIT BIOTRANSZFORMÁCIÓJA**  
**- METILÁLT ARZÉNMETABOLITOK KÉPZŐDÉSE ÉS KIVÁLÁSZTÁSA**  
**KÍSÉRLETI ÁLLATOKBAN**

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**Dr. Csanaky Iván László**

Akkreditált PhD Program: POTE A-144, Toxikológia  
Program- és témavezető: Dr. Gregus Zoltán egyetemi tanár, DABT



Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs  
2002

### **Bevezetés**

Az arzén az ókor óta ismert elemek közé tartozik. Hirhedtté az arzén-trioxid igen mérgező hatása miatt vált, amely az ókortól a XIX. század közepéig a leggyakrabban használt homicid és suicid szer volt (Jolliffe, 1993). Ma elsősorban a krónikus arzénmérgezés, különösen az arzén karcinogén hatása jelent problémát. A populáció nagyobb része ivóvízzel viszi be szervezetébe az arzént, főként arzénit (AsIII) és arzénát (AsV) formájában. Az arzénvegyületeket a terápiában szintén az ókor óta alkalmazzák. Az arzén rákkeltő hatása miatt az utóbbi évtizedekben az arzénvegyületek terápiás alkalmazása jelentősen visszaszorult. Napjainkban csak a trypanosomiasis kezelésére használják a szerves melarsoprot és a trimelarsant (Jennings, 1990). Újabb vizsgálatok szerint az arzén-trioxid rákkeltő hatása ellenére hatásos acut promyelocytás leukæmiában (APL) szenvedő betegek gyógyításában (Soignet és mtsai, 1998). Az arzén-trioxid, illetve hidratált formája az AsIII nemcsak APL sejtekben indukál apoptózist, hanem humán neuroblastoma (Akao és mtsai, 1999), myeloma (Park és mtsai, 2000), ovarium és cervix carcinoma sejtekben (Du és Ho, 2001) is. Ezért feltételezhetjük, hogy az AsIII-et az APL-n kívül más daganatos betegség gyógyításában is alkalmazni lehetne (Bachleitner-Hofmann és mtsai, 2002). Az arzén terápiás felhasználását azonban magas akut toxicitása korlátozza. A biztonságosabb terápás alkalmazás, valamint toxikológiai és közegészségügyi jelentősége miatt fontos az arzén biotranszformációjának pontos ismerete.

Felszívódás, biotranszformáció és kiválasztás. Az emberben és a legtöbb kísérleti állatban az AsIII és AsV több mint 90%-a abszorbeálódik a gastrointestinalis traktusból (Tam és mtsai, 1979; Vahter, 1983). A felszívódott szervenlen arzén intenzíven biotranszformálódik, és változatlan formában, valamint metabolitokként választódik ki. Az arzén metabolizmusa során redukciós és oxidatív metilációs lépésekben vesz részt. Első lépésben az arzénát (AsV) glutation (GSH) felhasználásával arzénit (AsIII) redukálódik (Cullen és mtsai, 1984), majd az AsIII először oxidatív metilációval monometil-arzenáttá (MMAsV) alakul. Az arzén enzimatikus metilációjában az S-adenozilmetionin (SAME) a fő metil donor, azonban bizonyos körülmények között az arzén metilálódhat metilkobalamin (B<sub>12</sub> vitamin) segítségével is (Buchet és Lauwers, 1988; Zakharyan és Aposthian, 1999a).

A metilációban képződő MMAsV ezt követően feltehetően monometil-arzenit (MMAsIII) redukálódik. Ezt a folyamatot a glutation-S-tranzsferáz enzimsaládhoz

tartozó MMA5V-reduktáz végzi, amely egyes vizsgálatok szerint a szervezetten arzén biotranszformációjának sebesség-meghatározó enzime lehet (Zakharyan és Aposhian, 1999b; Zakharyan és *mtsai*, 2001). A MMA5III *in vivo* képződésére 2000-ig nem volt egyértelmű bizonyíték. A MMA5III-et először munkacsoportunknak sikerült kimutatni patkányok epéjében (I. közlemény).

A MMA5III szintén SAME-függő MMA5III-metiltransferáz segítségével metilálódik dimetil-arzenáttá (DMA5V). Az arzénmetabolizmus feltételezett folyamata tehát: (AsV → AsIII → MMA5V → MMA5III → DMA5V).

Az AsIII-biotranszformáció értékes vonása, hogy bizonyos AsIII koncentráció felett *in vitro* gátolja önmaga metilációját (Buchet és Luwers, 1985; Styblo és *mtsai*, 1996).

Az arzénvegyületek biológiai reaktivitásának, toxicitásának alapjai. Az AsV biotranszformációja során képződő metabolitok kémiai reaktivitását és toxicitását jelentősen befolyásolja oxidációs állapotuk. A pentavalens AsV a szervezetben számos enzimátikus és transzport folyamatban helyettesítheti az ortofoszfátot (Dixon, 1997), így például gátolja az ATP képződését a glükolízis során és az oxidatív foszforlációban (Bhuvanawaran, 1979). Az AsIII stabil komplexeket képez ditiolokkal, a MMA5III pedig mono- és ditiolokkal egyaránt (Knowles és Benson, 1983), ezáltal számos kritikus főlucsoporttal rendelkező enzimet gátolhatnak. A MMA5III az AsIII-nél hatékonyabban gátolja a piruvát dehidrogenázt (Patrick és *mtsai*, 2001), a tiorodoxin redukázt, a glutation peroxidázt, a glutation redukázt, és a glutation S-transzferázt (Chouchane és Snow, 2001).

Korábbi vizsgálatok a metilációt egyértelműen detoxikáló mechanizmusnak gondolták, hiszen a pentavalens metilált metabolitok (MMA5V és a DMA5V) könnyebben választódnak ki a vizelettel, valamint kisebb a szövetekkel való reaktivitásuk és toxicitásuk, mint a szervezetten arzénnek (Buchet és *mtsai*, 1981; Marafante és *mtsai*, 1987; Yamauchi és Yamamura, 1984; Yamauchi és *mtsai*, 1988). Ezzel szemben az újabb eredmények felhívták a figyelmet arra, hogy a MMA5III LD<sub>50</sub>-e háromszorosa a MMA5III *in vitro* a legtoxikusabb trivalens arzénmetabolit (Styblo és *mtsai*, 2000).

A metilációban jelentősek a fajok közti különbségek. Egyes Dél-Amerikából származó fajok, mint a selyemmajom és a tengerimalac, valamint a Közép-Afrikában őshonos csimpánz egyáltalán nem metilálják az arzént (Aposhian, 1997; Vahter, 1999).

A metiláló fajok is nagy heterogenitást mutatnak a vizelettel ürített DMA5V és MMA5V mennyiségének tekintetében (Vahter, 1999). Például úgy tűnik, hogy csak az ember választ ki jelentős mennyiségű MMA5-t (10-20%-a a vizelettel ürített arzénnek) szemben más fajokkal, amelyek ugyan hatékonyan metilálják az arzént DMA5-ná, azonban csak néhány százalékban ürítenek MMA5-t (Vahter, 1999). A kérdést tovább bonyolítja, hogy jelentős eltéréseket detektáltak egyes népcsoportok között, valamint a csoportokon belül interindividuális különbségeket is észleltek a vizelettel ürített arzénmetabolitok között (Vahter, 2000). Úgy tűnik, hogy az egyes fajok eltérő metilációs kapacitása állhat a háttérben a krónikus arzénexpozícióval szembeni eltérő érzékenységek, degranatok kialakulásának.

Az arzén metilációjában a máj játssza a központi szerepet (Vahter, 1981; Healy és *mtsai*, 1999). Ennek ellenére az arzén epével kiválasztott metabolitjait nem ismertük, csak azt valószínűsítettük, hogy azok trivalens arzént tartalmazhatnak (Gyurasics és *mtsai*, 1991b). Feltételeztük, hogy a májban nagy mennyiségben képződő metilált arzénmetabolitok az epével is kiválasztódnak és az enterohepatikus recirkulációval a vérbe jutnak, végül a vizelettel kiválasztódnak. Ezért fontosnak tartottuk kideríteni, hogy milyen arzénmetabolitok ürülnek az epével.

Fontos kérdés továbbá, hogy a legtoxikusabbnak tartott MMA5III képződik-e *in vivo* és lehet-e szerepe a szervezetten AsIII akut illetve krónikus toxicitásában. Képződnek-e olyan mennyiségben a trivalens metilált arzénmetabolitok, hogy fokozhatják az AsIII akut toxicitását? Milyen lehetőségeink vannak a toxikus metilált és nem metilált metabolitok képződésének csökkentésére? Kutatásaink során ezekből a kérdésekből indultunk ki és fogalmaztuk meg céljainkat.

### **Kutatási célok**

1. Milyen formában ürülnek a szervezetten arzénvegyületek (AsIII, AsV) a vizelettel és az epével? Valóban csak trivalens formában választódik-e ki az arzén az epével, mint ahogy ezt korábbi megfigyeléseink alapján feltételeztük? Mennyiben befolyásolja a biotranszformációt és az exkréciót a beadott szervezetten arzén formája (AsIII vagy AsV)?
2. Redukálódik-e a MMA5V *in vivo* és kiválasztódik-e trivalens formában az epével, ahogy ez az arzén feltételezett metabolikus sémájából várható lenne?
3. Milyen eltérések és hasonlóságok vannak különböző kísérleti állatokban az arzén biotranszformációjában, epével és vizelettel való kiválasztásában AsIII és AsV *i.v.*

- adása után? Megjelenik-e a patkányok epéjében az általunk azonosított MMAsIII más, arzént metiláló fajok epéjében is?
- Hogyan változik *in vivo* az AsIII dózisának emelésével az AsIII biotranszformációja, kiválasztása és szöveti retenciója? Gátolja-e az AsIII ónmega metilációját *in vivo* is? Hogyan változik növekvő AsIII expozíció hatására a metilációhoz szükséges kofaktorok (SAME, GSH, ATP) kinálata a májban? Szerepet játszhat-e a nagy dózisban alkalmazott AsIII akut toxicitásában a belőle képződő MMAsIII?
  - Fokozzák-e foszfát-analóg gyógyszerek (fosfomicin és foscarnet) a pentavalens AsV kiválasztását? Gátolható-e ezekkel a szerekkel a toxikus metabolitok (AsIII, MMAsIII) képződése AsV-ből?
  - Lehet-e jelentős szerepe *in vivo* a metilkobalaminnak (B<sub>12</sub> vitamin) az arzén metilációjában? Befolyásolhatja-e a metilkobalamint inaktív N<sub>2</sub>O a metilált arzénmetabolitok képződését?
  - Lehet-e jelentős szerepe *in vivo* a katekol-O-metiltransferáznak (COMT) az arzén metilációjában? Befolyásolhatja-e a specifikus COMT gátló entacapone a metilált arzénmetabolitok képződését?
  - Hogyan befolyásolja az ismert, arzénmetilációt gátló szelént (SeIV) és a peroxid-oxidált adenozin (PAD) az arzén sorsát a szervezetben — az AsV és az AsIII eliminációját a véréből, valamint az AsV-nak, AsIII-nak és ezek metabolitjainak kiválasztását és retencióját a szövetekben?

### Módszerek

A kitűzött célok megvalósításához kísérleteinket narkotizált, épevezeték-kanulált állatokon végeztük. Az állatoknak az arzénvegyületeket i.v. adtuk, hogy az eltérő gastrointesztinális abszorpció ne befolyásolja az arzén-metabolizmust és a kiválasztást. Az arzénmetabolitok kiválasztását az epében és a vizeletben, az eliminációjukat a véréből, valamint a kísérlet végére a szövetekben maradt arzénmetabolitokat vizsgáltuk. A gyűjtött biológiai minták feldolgozásához megfelelő módszert kellett kidolgoznunk, melynek segítségével, jó hatásokkal kinyerhetjük az arzénvegyületeket, majd ezt követően az egyes arzénmetabolitokat azonosítani tudjuk. Módszerünkkel az arzénvegyületeket 95-98%-ban visszanyertük.

### Kísérleti állatok

Munkánk során általában 240-310 grammos hím Wistar patkányokat (*Rattus norvegicus Wistar*) használtunk. Az arzén-metabolizmus fajok közötti összehasonlító vizsgálatához a patkányokon kívül 34-46 g-os CFLP egereket (*Mus musculus CFLP*), 240-260 g-os angol rövidszőrű tengerimalacokat (*Cavia porcellus*), 77-95 g-os aranymacskákat (*Mesocricetus auratus*) és 1,6-2,4 kg-os Új-Zélandi fehér nyulakat (*Oryctolagus cuniculus N. Z. white*) használtunk.

### Állatkísérletek

Az állatoknak gyomorszondán át 30 ml/kg 10 mM KCl tartalmú fiziológiás sóoldatot adtunk hidráliás céljából. Ezt követően az állatokat fentanyiból (0,045 mg/kg), midazolamból (4,5 mg/kg) és droperidolból (5,5 mg/kg) álló keverékkel narkotizáltuk. A bal artéria carotisba kanulit ültettünk, ezt követően alsó medián laparotómias nyíláson keresztül a hólyagot előemeltük, majd felső medián laparotómias nyíláson át a ductus choledocust megkanduláltuk. A megoperált állatoknak vizelettermelés növelése céljából mannitolnak fiziológiás sóoldattal készült 10%-os oldatát adtuk 6 ml/kg-os dózisban a carotis kanulón át, majd a bal vena saphenába arzén vegyületet (nátrium-arzenát (AsV), nátrium-arzenit (AsIII), vagy dinátrium-metilarzenát (MMAsV)) injektáltunk. Ezt követően az epét és a vizeletet előzetesen lemezt 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe 20 perces frakciókban gyűjtöttük. A kísérlet alatt az epegyűjtő csöveket jégben tartottuk. A vizelettermelés 130-180 µl/kg·min sebességének fenntartása céljából 20 percenként 3 ml/kg vagy 9 ml/kg·h sebességgel 10%-os mannitol oldatot adtunk a carotis kanulón keresztül. A gyűjtött epe és a vizelet térfogatát gravimetricusan határoztuk meg sűrűségüket 1,0 g/cm<sup>3</sup>-nek véve. Egyes kísérletekben az arzénmetabolitok szöveti megoszlásának vizsgálatához a vért a carotis kanulón át, a szöveteket a kísérlet végén kivézetést követően nyertük.

### Analitika

Az előkészített mintákban lévő arzénvegyületeket HPLC-vel szeparáltuk, ezt követően hidridekké alakítottuk és atomfluoreszcenciás spektrométerrel mértük (HPLC-HG-AFS). A módszer Gomez-Ariza és munkatársainak (1998) leírásán alapul.

Az SAME, SAH (S-adenozilhomocisztein), ATP, ADP, AMP és GSH méréshez az AsIII beadását követően 1 óra múlva az állatok májából kb. 1 g-ot „freeze clamp” módszerrel eltávolítottunk, majd perklorosavas extrakciót követően analizáltuk.

Az ATP, ADP, és AMP koncentráció meghatározását a Dilis és Klaassen (1985) által leírt HPLC elválasztást követően abszorbancia detektorral mértük.

Az S-adenozilmetionin (SAME) és az S-adenozilhomocisztein (SAH, az SAME demetilált terméke) koncentrációját She és munkatársai (1994) HPLC módszerével határoztuk meg. A glutation koncentrációját glutation-redukáz enzím segítségével Tietze (1969) módszerével mértük.

## **I. Az arzénát, arzénit valamint metabolitjaik kiválasztása az epével és a vizelettel patkányban – a monometil-arzénit azonosítása az epében**

### *Háttér*

Korábbi vizsgálatok szerint patkányoknak *i.v.* adott, radioaktívan jelölt AsIII és AsV jelentős hányada az epével ürül (Klaassen, 1974; Gyurasics és mtsai, 1991a,b). Az arzén kiválasztásával egyidőben és azzal arányosan nagy mennyiségű glutation jelenik meg az AsIII-et vagy AsV-ot kapott patkányok epéjében (Gyurasics és mtsai, 1991b). A glutationt depletáló dietil-maleát előkezelés azonban teljesen megszüntette az arzén biliáris exkrécióját mind az AsV, mind az AsIII-injektált állatokban (Gyurasics és mtsai, 1991a). Magyarázatként azt feltételeztük, hogy az arzén instabil glutation-komplekxként választódik ki, amelyből a glutation az epében felszabadul. A komplexek képződését *in vitro* már bizonyították (Delhommedieu és mtsai, 1994; Galler és Linder, 1998; Styblo és mtsai, 1997). Mivel csak a trivalens arzénvegyületek reagálnak kovariens módon glutationnal, vagy más tiolokkal, arra következteltünk, hogy mind az AsIII, mind az AsV csak háromvegyértékű formá(k)ban választódhatnak ki az epébe. Az epével kiválasztott arzénmetabolitok kémiai formája azonban nem volt ismert, eltérően az AsIII és az AsV vizelettel kiválasztódó metabolitjaitól, amelyeket jól ismerünk emberben és kísérleti állatokban egyaránt (Concha és mtsai, 1998; Hughes és mtsai, 1994; Vahter, 1983).

Ezért kísérletet tervezünk az epével és vizelettel egyidejűleg kiválasztódó arzénmetabolitok vizsgálatára. Kísérleteinkben patkányoknak *i.v.* 50 µmol/kg AsV-ot, AsIII-et, vagy MMAsV-ot adtunk. Az epével és a vizelettel kiválasztott arzénmetabolitokat HPLC-HG-AFS-sel mértük.

Az epében talált ismeretlen metabolit (id. később) azonosításához két kísérletet végeztünk. Először az epében lévő trivalens metabolitokat tömény H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal oxidáltuk, az eredeti MMAsV standardot pedig metabiszulfit-tiosulfát reagenssel redukáltuk Reay

és Asher (1977) leírása alapján. A reakcióelegyet az inkubációt követően vízzel hígítottuk úgy, hogy az arzén végkoncentráció 5 µM-os legyen, majd HPLC-HG-AFS-sel analizáltuk.

Az S-adenozilmetionin (SAME)-függő metiláció szerepét az ismeretlen metabolit képződésében (id. később) periódát-oxidált adenozin (PAD) segítségével vizsgáltuk. Ezért néhány patkányt az AsV vagy AsIII injekció beadása előtt 30 perccel *i.p.* 50 µmol/kg PAD-nal előkezteltük. A PAD-t adenozin és nátrium-peridotát felhasználásával Hoffman (1980) módszere szerint szintetizáltuk, amelyből közvetlenül a felhasználás előtt készített töltött vízes oldat aktuális koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg (Tandon és mtsai, 1986).

### *Eredmények és következtetések*

Az AsIII- illetve AsV-injektált állatok epéjében következetesen két arzénvegyületet találtunk. Ezek közül az egyik vegyület az eredeti AsIII standarddal koelutódott, a másik arzénvegyület azonban kromatográfiásan különbözött a standard vegyületektől (AsIII, DMAsV, MMAsV, AsV). Néhány patkány epéjében igen kis mennyiségű MMAsV-ot is találtunk.

Az epében lévő ismeretlen vegyület metilált arzénmetabolit, mivel PAD előkezelés hatására szinte teljes mértékben eltűnt az AsIII- és az AsV-injektált állatok epéjéből. A PAD gátolja az S-adenozilhomocisztein hidrolízát, amelynek hatására a fejszaporodó S-adenozilhomocisztein gátolja az SAME-függő metiltranszferázokat. Így az ismeretlen arzénvegyület képződésének csökkenése arra utal, hogy az egy SAME-függő metiltranszferáz által katalizált reakcióban képződött metilált metabolit.

Másik vizsgálatunkból az is kiderült, hogy az ismeretlen metabolit trivalens arzénvegyület, mivel hidrogén-peroxid kezelés hatására eltűnt, és átalakult kromatográfiásan MMAsV-nak megfelelő vegyületté. Ennek ellenkezőjét is megfigyelhettük, amikor a standard MMAsV-redukáló ágens hatására átalakult az epében lévő ismeretlen arzénmetabolitnak kromatográfiásan megfelelő vegyületté. Ezen indirekt kísérletes bizonyítékok alapján megállapítottuk, hogy az epében lévő ismeretlen metabolit nem lehet más, mint a MMAsIII.

Epevezeték-kanuláit patkányokban az AsIII és metabolitjai főként az epével, kisebb részben a vizelettel ürültek. Két órán belül az injekciót AsIII dózis 22%-a ürült az epével és mindössze 8%-a a vizelettel. Az első 20 percen az epével főleg AsIII ürült, amelynek kiválasztása később jelentősen visszaesett. A biliáris MMAsIII-kiválasztás

fokozatosan emelkedett, és az AsIII beadását követő 40. perctől a Kísérlet végéig a MMASIII domináns arzénmetabolitná vált: Az injektált AsIII-dózis 9,2%-a választódott ki MMASIII formájában 2 órán belül. Az AsIII-tel injektált állatok vizeletében főként AsIII-et, valamint kis mennyiségű DMAV-ot és elvéve minimális AsV-ot is detektáltunk.

Az AsV-injektált patkányokban 2 órán belül a dózis 46%-a a vizelettel, 8%-a az epével ürült. A vizeletben legnagyobb mennyiségben a változatlan formában ürülő AsV mellett jelentős mennyiségű AsIII-et, valamint igen kis mennyiségű DMAV-ot detektáltunk. Az AsV-injektált állatok epéjében szintén az újonnan azonosított MMASIII volt a fő arzénmetabolit az AsIII mellett, amely mintegy 10-20-szorosa volt az AsIII exkréciójának. Két óra alatt az injektált AsV-dózis 7,3%-a választódott ki MMASIII formájában.

Néhány AsV- és AsIII-injektált patkány epéjében kevés MMASV-ot is találtunk, amely feltehetően inkább a MMASIII intrabiláris oxidációjának, mint a MMASV közvetlen biláris exkréciójának az eredménye. Ezt az elképzelésünket alátámasztja az a megfigyelésünk is, hogy rövid ideig levegőn tartott epemintákban csökken a MMASIII mennyisége, és ezzel egyidejűleg megjelenik a MMASV.

Mivel az arzén általában elfogadott metabolikus sémája szerint a MMASIII közvetlenül a MMASV redukciójából keletkezik, megvizsgáltuk, hogy a MMASV i.v. adását követően is található-e MMASIII az epében. Azt találtuk, hogy a MMASV-injektált patkányokban az exogén MMASV 60%-a 2 órán belül változatlan formában a vizelettel ürült, epéjükben pedig MMASIII-et nem tudtunk detektálni. Ez azt bizonyítja, hogy az exogén MMASV *in vivo* nem redukálódik. Ez a megfigyelésünk összhangban van azokkal a korábbi eredményekkel, amelyek szerint *in vitro*, patkánymáj citoszólban a MMASV nem biotranszformálódik (Slybo és mtsai, 1995b), illetve, hogy az emberek (Buchet és mtsai, 1981) és a hőrcsögdők (Yamauchi és mtsai, 1988) az exogén MMASV-ot változatlan formában ürítik a vizelettel. Ha az arzén feltételezett metabolikus sémája igaz, akkor arra kell következtetnünk, hogy az exogén MMASV nem jut abba a biokémiai kompartmentbe, amelyben az AsIII metilációjával képződött endogén MMASV MMASIII-té redukálódik. Hasonló kompartmentalizációt Thompson (1993) is feltételezett, amely szerint *in vivo* az AsIII egy diltol "kofaktorhoz" kapcsolódik, és ebben a diltol-kötött formában megy végbe az oxidatív metiláció és az azt követő redukció.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy patkányokban AsV adását követően főként a vesével, míg AsIII adása után elsősorban az epével választódnak ki az arzénmetabolitok. Tanulmányunk megértösielte azt a feltételezést, hogy az AsV is

kizárólag trivalens formában választódik ki az epével. Az epében az AsIII mellett MMASIII-et találtunk, amellyel elsődként sikerült bizonyítanunk az akutan legtoxikusabb arzénmetabolit *in vivo* képződését és kiválasztását.

Vizsgálatainkkal megállapítottuk azt is, hogy a MMASV adását követően patkányok epéjében nincs MMASIII, hanem változatlan formában a vizelettel ürül. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy *in vivo* nem, vagy csak igen kis mértékben redukálódik az exogén MMASV.

## **II. Az arzénát, arzénit valamint metabolitjaik kiválasztása az epével és a vizelettel öt Kísérleti állattalban – a monometil-arzénit epében való jelenlétének általános igazolása az arzént metiláló fajokban**

### **Háttér**

A MMASIII feltételezett *in vivo* képződésére az első bizonyítékot munkacsoportunk találta, azonosítva patkányok epéjében a MMASIII-et AsV illetve AsIII i.v. adását követően. Közleményünkkel közel egyidőben MMASIII-et találtak néhány arzénexpozíciónak kiemelt ember vizeletében is, bár többségük vizeletében nem volt kimutatható mennyiségben (Aposhian és mtsai, 2000a), eltekintve attól a vizsgálatról, amikor a vizsgált egyéneknek arzén kelátókat is adtak (Aposhian és mtsai, 2000b; Le és mtsai, 2000). Újabbban beszámoltak arról, hogy India Nyugat-Bengál tartományában a régóta arzénirtalmú ivóvizet fogyasztó populáció felének vizeletében kismennyiségű MMASIII-et találtak (Mandal és mtsai, 2001). Ezzel szemben arzénexpozíciót követően minden patkány epéjében következetesen, mint fő metabolit jelenik meg a MMASIII.

Néhány kutató a patkányt nem tartja jó modellnek az arzén metabolizmusának vizsgálatára (Aposhian, 1997), mivel a patkányok vörösvérsejtjei más fajokéval ellentétben nagymennyiségű arzént kötnék DMAV formájában. Felmerült a kérdés, hogy a MMASIII képződése és epével való kiválasztása más állatfajokra is jellemző-e. Ezért összehasonlítottuk az AsV-nak, AsIII-nek és metabolitjaiknak kiválasztását az epével és a vizelettel patkányban, egérben, nyúlban, hőrcsögdében és tengerimalacban. Vizsgálataink másik célja az volt, hogy megtaláljuk azt a fajt, amelyik a legtöbb MMASIII-et képezi és üríti, és ezért vélhetően leginkább alkalmas a MMASIII képződésének és kiválasztásának *in vivo* tanulmányozására. Az egeret, a nyulát és a hőrcsögdőt azért választottuk, mert ezeket alkalmasnak tartják a humán arzénmetabolizmus modellezésére (Vahter, 1994), míg a tengerimalacról ismert, hogy nem metilálja az arzént (Healy és mtsai, 1997). Az állatoknak i.v. 50 µmol/kg AsV-ot,

vagy AsIII-et adtunk. Az epével és a vizelettel kiválasztott arzénmetabolitokat HPLC-HG-AFS-sel detektáltuk.

#### **Eredmények és következtetések**

A vizsgált speciemek mindegyike redukálta az AsV-ot AsIII-té, hiszen az AsV-tal injektált állatok az epével és a vizelettel AsIII-et is kiválasztottak. A tengerimalacok kivételével minden faj mellátta az arzént, mivel az epével MMAAsIII-et, a vizelettel pedig DMAAsV-ot ürítettek. Érdekes módon egyik faj sem választott ki MMAAsV-ot annak ellenére, hogy a MMAAsV-ot a MMAAsIII prekursorának gondolják, továbbá, hogy a patkányoknak injektált MMAAsV gyorsan kiválasztódik a vizelettel (1. közlemény), valamint, hogy szorveleten arzén-expozíciót követően ép enterohepatikus recirkulációval rendelkező, arzént mellátó fajok vizeletében is megtalálható a MMAAsV (Vahter, 1994). A saját és az idézett megfigyelések együttesen arra utalhatnak, hogy az ép enterohepatikus recirkulációval rendelkező állatokban a vizelettel kiválasztott MMAAsV nagy része az epével kiválasztott MMAAsIII-ből képződhet, amely a bélből reabszorbeálódva oxidált formában választódik ki a vizelettel. Az epével kiválasztott arzén belekből törtnő reabszorpcióját Klaassen (1974) bizonyította.

Azon megfigyelésünk, hogy az AsV-tal és AsIII-tal injektált fajok az arzén beadását követő első 2 órában csupán MMAAsIII-et ürítenek, MMAAsV-ot nem; továbbá, hogy patkányokban AsV illetve AsIII adását követően a májban és a vesében a MMAAsIII koncentrációja magasabb, mint a MMAAsV-é (Id. III. és a V. közlemény). megkérdőjelezhetik azt a feltevést, hogy az arzén biotranszformációjának sebességmegtározó enzime a MMAAsV-reduktáz (Zakharjan és Aposhian, 1999b; Zakharjan és Mitsai, 2001). Hiszen ha a MMAAsV-reduktáz lenne a sebességmegtározó enzim, akkor a MMAAsV szöveti koncentrációjának magasabbnak kellene lennie, mint a MMAAsIII-ének (III. és V. közlemény), valamint a MMAAsV-nak is meg kellene jelennie 2 órán belül az egyes fajok vizeletében. Míndezek alapján joggal feltehetjük, hogy az arzén metabolizmusa során feltételezett első oxidatív mellációs lépés helyett az AsIII közvetlenül MMAAsIII-té mellátódik, és az így képződött MMAAsIII alakul oxidációt követően MMAAsV-tá. Ezt a felvetésünket támogathatja az a korábban kifejtett megfigyelésünk is, amely szerint az exogén MMAAsV adását követően a patkányok az epével nem választották ki a MMAAsIII-et, hanem változatlan formában a vizelettel ürítették a MMAAsV-ot (1. közlemény).

A vizsgált fajok mindegyikében AsV- vagy AsIII-injektációt követően a pentavalens arzénmetabolitok (AsV, DMAAsV) szinte kizárólag a vizelettel választódtak ki. Igen kismennyiségű AsV volt még a nyulak, tengerimalacok, hörcsögök, valamint – az AsV adását követő 20 percben – az egerek epéjében is, azonban minden faj epéjében csaknem kizárólag a háromvegyértékű AsIII és MMAAsIII ürült.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a vizsgált fajok számos hasonlóságot, de jelentős különbségeket is mutatnak az arzén epével és vizelettel történő kiválasztásában. Legfontosabb megfigyelésünk, hogy minden species, amely képes arzént mellátani, az epével MMAAsIII-et választ ki. A vizsgált fajok közül a patkányok képezik messze a legtöbb MMAAsIII-et, feltételezhetően a jóval nagyobb hepatikus AsIII-MT aktivitásuknak köszönhetően. Vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a patkány ezért különösen alkalmas lehet a szupertoxikus MMAAsIII-képződés és kiválasztás *in vivo* tanulmányozására, annak ellenére, hogy a patkányok használatát arzénmetabolizmus vizsgálataiban megkérdőjelezzük, mivel a MMAAsIII-ből képződő DMAAsV megoszlása patkányokban jelentősen eltér más fajoktól (Aposhian, 1997).

### **III. Az arzénit dózistfüggő biotranszformációja – A hepatikus S-adenozilmetionin, glutation és ATP kínálatának változása növekvő arzénit expozíció hatására.**

#### **Háttér**

Az előző vizsgálatainkból egyértelműen kitudt, hogy az arzént mellátó fajok mindegyike képez MMAAsIII-et. Ebből természetesen következik az a kérdés, hogy a rendkívül toxikus MMAAsIII képződése hozzájárulhat-e az AsIII akut toxikus hatásához. Az AsIII mellációs módfelelt összetett és ellentmondásosnak tűnő folyamat, hiszen a pentavalens mellált arzénmetabolitok képződését detoxikálásnak, míg a MMAAsIII (esetleg DMAAsIII) képződését inkább toxikálásnak tekinthetjük. Ezek eredője szabja meg, hogy a melláció csökkenti vagy növeli az AsIII toxicitását. Ha a MMAAsIII képződése nő vagy eliminációja csökken, akkor a MMAAsIII hozzájárulhat az AsIII toxicitáshoz, vagyis ebben az esetben a melláció akár fokozhatja is az AsIII toxicitását. Ezt azonban nem tartjuk valószínűnek, mivel a képződött MMAAsIII a következő mellációs lépésben viszonylag atoxikus DMAAsV-tá alakul, így az egymást követő mellációs lépések együttesen csökkentik a toxikus AsIII mennyiségét. Azért sem biztos, hogy a melláció fokozza az AsIII toxicitását, mivel sejkkultúrában (Slybio és Mitsai, 1999), állatokban (Vahter, 1981; De Kimpe és Mitsai, 1999) és emberekben

(Hopenhayn-Rich és mtsai, 1993; Del Razo és mtsai, 1997) is kimutatták, hogy az Asill-expozíció növekedésével a mellített arzenmetabolitok képződése jelentősen csökken. Az irodalomban azonban nincs arra adat, hogy az Asill dózisának növelése hogyan befolyásolja a képződő MMAAsill mennyiségét. A fokozott Asill-expozíciót követően kialakuló melliláció csökkenés hátterében fellelhetően a gátolt mellitranszferáz-aktivitás állhat. Ismert, hogy *in vitro* az Asill koncentráció-függő módon gátolja a MMAAsill-mellitranszferáz (MMAAsill-MT), a MMAAsill pedig gátolja az Asill-mellitranszferáz (Asill-MT) működését (Zakhranjan és mtsai, 1999). Feltételezhetjük továbbá azt is, hogy nagy mennyiségű Asill melliláció felhasználhatja és ezáltal depletálhatja az SAME-t. A csökkent Asill melliláció pedig nagymértékű szöveti Asill-retenciót is eredményezhet, hiszen az Asill az exkréción kívüli mellilációval eliminálódik. Feltételezésünk szerint inkább ez a fokozott szöveti Asill-retenció, mint a fokozott MMAAsill-képződés lehet a fő oka a nagy dózisú Asill toxicitásának. Ennek a feltételezésnek a tesztelésére kísérleteket tervezünk, amelyben azt vizsgáljuk, hogy vajon hogyan változik *in vivo* az Asill dózisának emelésével (20, 50 és 125 µmol/kg) az Asill és a belőle képződő mellilát metabolitok, különösképpen a MMAAsill kiválasztása és szöveti retenciója. Kísérleteinkhez a patkányokat választottuk, mivel ez a faj bizonyult a legalkalmasabbnak a MMAAsill képződés *in vivo* tanulmányozására (l. közlemény).

Ezen kívül elhatároztuk, ha kísérleteinkben – az Asill dózis emelésének hatására – a mellilát arzenmetabolitok képződésének és kiválasztásának csökkenését tapasztaljuk, akkor megvizsgálunk néhány intracelluláris kofaktort is (SAME, ATP, GSH), amelyek deplációja feloldás lehet *in vivo* a melliláció csökkenéséért. A fokozott Asill-expozíció egyrészt felhasználhatja és kimerítheti az arzén további mellilációjához szükséges SAME-t, másrészt az Asill depletálhatja az SAME szintéziséhez szükséges ATP-t is (Chiang és mtsai, 1996). Nagy dózisban adott Asill kimerítheti a máj GSHraktárát is (Gyurasics és mtsai, 1991a), amely az Asill mellilációjának csökkenését okozhatja (Thompson, 1993; Buchet és Lauwers, 1988; Hirata és mtsai, 1988).

#### Eredmények és következtetések

Ezen tanulmányunk egyik jelentős felismerése az volt, hogy a vizsgált szervezetekben az Asill dózisának emeléséhez képest az Asill koncentrációja aránytalanul nagymértékben nőtt. A kísérlet végén a dózis 20-ról 50 µmol/kg-ra való emelésével az Asill szöveti koncentrációja 3-5-szörösére, 50-ről 125 µmol/kg-ra való emelésével 6-7-szeresére nőtt. Elméletileg egy xenobiotikum szöveti retencióját a xenobiotikum fokozott

szöveti kötődése, valamint gátolt eliminációja növelheti. Munkánk során ugyan nem mértük, de valószínűsíthetjük, hogy nagy dózisú Asill-expozíciót követően az is szerepet játszhat a fokozott Asill-akkumuláció kialakulásában a májban és más szövetekben, hogy az Asill szöveti tehérterhekhez kötődik. Ennek hátterében a dóziszfüggő GSH-depláció állhat, amely a 125 µmol/kg Asill-tel injektált állatok májában közel 50%-os csökkenést is mutatott. Az alacsonyabb szöveti GSH koncentráció lehetővé teszi, hogy több Asill kötődjön a proteinek tolcsoportjaihoz, mint a GSH-hoz. A máj Asill-indukálta GSH-deplációja részben az Asill adását követő fokozott biliáris GSH-kiválasztásnak köszönhető (Anundi és mtsai, 1982; Gyurasics és mtsai, 1991a).

Az Asill szöveti retenciójához az Asill kiválasztási kapacitás feltöltődése is hozzájárulhat. Ezt a feltételezésünket a következő megfigyelések támogatják: Az Asill kumulatív biliáris exkréciója nagyobb mértékben nőtt a dózis 20-ról 50 µmol/kg-ra való növelésekor (négyeszeresére), mint az 50-ről 125 µmol/kg-ra történő emelésékor (kétszeresére). A két óra alatt vizelettel kiválasztott Asill mennyisége a dózis 20-ról 50 µmol/kg-ra való emelésével háromszorosára, 50-ről 125 µmol/kg-ra való emelésével pedig már csak másfélszeresére nőtt. Az Asill renális kiválasztásának mechanizmusát nem ismerjük. Az Asill epével való kiválasztásáról azonban tudjuk, hogy GSH-függő folyamat (Gyurasics és mtsai, 1991b). A legújabb közlemények beszámolnak arról, hogy az Asill a májból a kanalikuláris membránban található mrp2 transzporteren keresztül Asill-triglutation és MMAAsill-diglutation formájában transzportálódik az epébe (Kala és mtsai, 2000; Dietrich és mtsai, 2001). Következésképpen a fokozott Asill-kiválasztás GSH-deplációt indukál a májban, csökkentve az Asill hepatobiliáris transzportját. Ehhez hasonló Asill transzportcsökkenés tapasztalható dietil-maleát kiváltotta GSH-deplációt követően (Gyurasics és mtsai, 1991b). A GSH deplációján kívül a máj ATP tartalmának csökkenése is hozzájárulhat az Asill biliáris kiválasztásának feltöltődéséhez, mivel az mrp2 egy ABC (ATP-binding cassette) transzporter, amely működéséhez ATP-t használ. Ezt az elképzelésünket támasztja alá az a megfigyelés, hogy az 50 és a 125 µmol/kg Asill-tel injektált állatok májában szignifikánsan csökkent az ATP koncentráció, valamint kissé növekedett az AMP koncentrációja is. A sejtek energetikai állapotának becsülésére kiszámítottuk az „energy charge”-ot, vagyis az energiatöltöttségét, amely megmutatja, hogy mennyire van feltöltve nagyenergiájú foszfátcsoportokkal a teljes adenilát-rendszer. Normál sejteknel ez az érték megközelítőleg 0,9. A dózis növelésével csökkent a sejtek „energy charge”-a, a legnagyobb dózisban pedig ez a csökkenés szignifikáns volt.

Az arzén metilációjának dózistfüggő csökkenése a harmadik és egyben igen jelentős mechanizmus, amely szintén hozzájárulhat a szövetekben a fokozott AsIII-retenció kialakulásához. Ez abban mutatkozik meg, hogy az AsIII dózisének emelésével a MMASIII epével és a DMA5V vizelettel történő kiválasztása folyamatosan csökken és aránytalanul kis mértékben növekszik; a legnagyobb dózis adása után pedig egyenesen csökken. Az epében a MMASIII kumulatív kiválasztása az 50 µmol/kg AsIII dózissal injektált állatokban több mint másfélszeresére nőtt, a 125 µmol/kg AsIII-tel injektált patkányokban pedig közel felére csökkent a legkisebb AsIII dózissal injektált állatokhoz viszonyítva. Ehhez hasonlóan a vizeletben a DMA5V kiválasztása a közepes dózisban késett, kumulatív exkrécija pedig elmaradt a kis dózisu AsIII-tel injektált patkányokéhoz képest. A legnagyobb dózissal injektált patkányok vizeletében a DMA5V vizsont meg sem jelent a kísérlet ideje alatt. Az arzén dózisének növelésével a metilált metabollitok kiválasztásához hasonló jelenséget figyelhetünk meg a metilált arzénmetabollitok szöveti koncentrációjának változásában is. A MMASIII és MMASV (MMAS) szöveti koncentrációja az AsIII dózis 20-ról 50 µmol/kg-ra való növelésénél ugyan 2-4-szeressére növekedett, azonban a dózis további növelésével a MMAS szöveti koncentrációja a máj kivételével visszaesett. A szöveti DMA5V koncentráció pedig a dózis 20-ról 50 µmol/kg-ra való növelésével csak a májban nőtt, a vérben és a vesében nem változott, a szívben pedig csökkent. Az AsIII dózis ismételt, 2,5-szeres növelésével, a 125 µmol/kg AsIII-tel injektált állatokban minden szövet DMA5V koncentrációja drasztikusan csökkent. A metilációnak az AsIII eliminációjában betöltött szerepét jól szemlélteti az a megfigyelés is, hogy azokban a fajokban, amelyekben nincs természetes arzén metiltranszferáz-aktivitás, a szövetek fehérjei több arzént kötnek meg (Vahter és mtsai, 1982).

Második kísérlet sorozatunkban megvizsgáltuk, hogy a magas AsIII dózis adása után tapasztalt metiláció-csökkenés hátterében állhat-e valamelyik metilációhoz szükséges hepatikus kofaktor kihalátának csökkenése. Kiderült, hogy az AsIII dózisének emelésével nemhogy nem csökkent, hanem még nőtt is az SAME hepatikus koncentrációja. Az SAME koncentráció növekedése a májban feltehetően az AsIII-nek és/vagy metabollitjainak metiltranszferázokat gátló tulajdonságának köszönhető, amelynek következtében az SAME felhasználása csökken. Az SAME-függő metiltranszferázokat gátló PAD ugyancsak SAME akkumulációt okoz a májban (Hoffman, 1980). Eredményeinkből tehát arra következtethetünk, hogy a PAD-hoz hasonlóan, a nagy dózisu AsIII-tel injektált patkányokban az arzénmetiláció

csökkenésének oka sokkal inkább az arzén-metiltranszferázok gátlásán alapul, mint az SAME fokozott felhasználásából eredő SAME hiányán.

Mind a fentebb említett *in vitro* tanulmányokból, mind a patkányokon végzett kísérleteinkből az derült ki, hogy a monometilált arzénmetabollitok képződése kevésbé érzékeny AsIII túladagolásra mint a DMA5V-é. Az AsIII dózis 20-ról 50 µmol/kg-ra való növelésével a DMA5V kiválasztása csökken, a szöveti DMA5V koncentráció növekedése pedig stagnál. Ezzel szemben ugyanez az AsIII dózisémeles a MMASIII biliáris kiválasztását és a szövetekben lévő monometilált arzénmetabollitok koncentrációját növelte, és csak az AsIII dózis 125 µmol/kg-ra való emelése befolyásolta negatívan a monometilált származékok fenti paramétereit. Észre kell vennünk azonban azt is, hogy a MMASIII csökkent átalakulása DMA5V-tá szintén hozzájárul a MMASIII kiválasztásának, illetve a monometilált arzénmetabollitok szöveti koncentrációjának dózistfüggő növekedéséhez, ezáltal elfedve az AsIII biotranszformáció első metilációs lépésének lehetséges gyengülését. A 125 µmol/kg AsIII-tel injektált állatokban a MMAS koncentráció májban tapasztalt további növekedéshez az is hozzájárulhat, hogy a MMAS májbeli képződésénél nagyobb mértékben csökkent a MMASIII biliáris kiválasztása. E két folyamat eredményeképpen növekedett a májban mérhető MMAS-vegyületek koncentrációja. A MMASIII hepatobiliáris transzportjának csökkenése számos faktorból eredhet, beleértve az AsIII- okozta kompetitív transzportgátlást és a csökkent GSH és ATP kihalátot, hiszen a MMASIII is GSH-komplex formájában az mmp2 segítségével transzportálódik. Azt a következtetésünket, hogy a MMASIII képződés csökken nagy dózisu AsIII adása után, támogatja a hepatobiliáris rendszerből visszanyerhető MMASIII mennyiségének összehasonlítása, amely a 2 óra alatt az epével kiválasztott MMASIII és a máj MMASIII tartalmának összege µmol/rtkg-ban kifejezve. Így 20, 50, 125 µmol/kg AsIII-tel injektált patkányok hepatobiliáris rendszeréből a 2 óra alatt visszanyert MMASIII mennyisége összehasonlítva 2,6; 5,0; és 1,7 µmol/rtkg volt.

Eredményeink alapján összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az AsIII akut toxicitásában valószínűleg csak korlátozott szerepe lehet a belőle képződő MMASIII-nek, hiszen a MMASIII képződése a közel letális AsIII dózis után csökken. Ezt az elképzelésünket alátámasztja az a tény, hogy a subcután adott arzén-trioxid letális hatására a MMASIII-et nem képző tengeformalacok (ld. II. Közlemény) sem érzékenyebbek, mint a MMASIII-et képző egerek (Reichl és mtsai, 1989). A metiláció csökkenése nem az SAME deplációjával magyarázható, hanem valószínűleg az AsIII



metiltranszferázokat gátló hatásával, amelynek következtében csökken az SAME felhasználás. Ezzel szemben az AsV akut toxicitásához a MMAAsIII bizonyos mértékben hozzájárulhat, mivel AsV adását követően a képződő AsIII metilációja révén is gyorsan eliminálódik, továbbá a MMAAsIII a mennyiségileg legjelentősebb trivalens arzénmetabolit, melyet minden metiláló faj űrt. Ennél fontosabb, hogy azáltal, hogy kimutattuk, hogy az AsIII dózis csökkentésével a képződő MMAAsIII relatív mennyisége fokozódik, tanulmányunk támogatja azt az elgondolást, mely szerint a MMAAsIII hosszantartó alacsony AsIII- vagy AsV-expozíciót követően jelentősen hozzájárulhat az arzén krónikus toxicitásához. Akut nagy dózisu expozíció esetén azonban az AsIII lehet a szövetekben felhalmozódó elsődlegesen toxikus vegyület. Ez abból eredhet, hogy az AsIII eliminációs-kapacitás csökken a GSH depleciója és a metiláció gátlása miatt. A GSH-depleciót követően a szövetekben maradó AsIII fokozottan gátolhatja a tiolenzimeket, amely ATP-deplecióhoz és energetikai zavarhoz vezet.

#### IV. Az arzénmetabolizmus befolyásolása gyógyszerekkel

Nyilvánvaló, hogy az ötvegyértékű AsV mérgező hatásához biotranszformációja is hozzájárul. Az AsV először jóval mérgezőbb AsIII-té redukálódik, majd oxidatív metilációval MMAAsV-tá alakul. Ez utóbbi az igen toxikus MMAAsIII-té redukálódik, majd tovább metilálódik a viszonylag atoxikus DMAAsV-tá. Fontos kérdés, hogy hogyan csökkenthető az arzén toxikus metabolitjainak, mint az AsIII-nak és a MMAAsIII-nak a képződése. Az AsV toxikálását két ponton próbáltuk befolyásolni: egyrészt az AsV-transzport gátlásával csökkenteni próbáltuk az AsV renális reabszorpcióját, illetve felvételét a sejtekbe, másrészt megkíséreltük a MMAAsIII képződésének csökkentését néhány metiláció-gátló szerrel.

#### A foszomycin és a foscarnet hatása az arzénát és metabolitjai kiválasztására

##### Háttér

A szervezetben az AsV sok tekintetben a szervezetén foszfáthoz, hasonlóan viselkedik (Dixon, 1997). Például az AsV és a foszfát a Na<sup>+</sup>-függő foszfát-transzporter segítségével jut a sejtekbe és reabszorbeálódik a renális tubulusokban, ezért kompetálnak egymással (Bernier és mtsai, 1976; Ginsburg és Lotspeich, 1963; Swaan és Tucker, 1995). Egyes foszfát-csoportot hordozó vegyületek is kompetitív módon gátolják a Na<sup>+</sup>-függő foszfát-transzporter által mediált foszfát-transzportot (Szczeplanska-Konkel és mtsai, 1986) és – feltételeken – az AsV-transzportot is. Ezek

alapján felmerült a kérdés, hogy vajon a foszfát-analóg vegyületek befolyásolják-e az AsV szervezetben való sorsát, különösen pedig a toxikus AsIII és MMAAsIII képződését AsV-ből. Vizsgálatainkhoz két gyógyszerként használt vegyületet választottunk: az antivirális hatású foscarnetet, valamint az antibiotikum foszomycint. A foszomycint illetve a foscarnetet 1 perccel az AsV (50 µmol/kg) illetve AsIII (50 µmol/kg) beadása előtt i.v. adtuk a humán gyógyszerészatban adható 500 µmol/kg dózisban. A kontroll állatok 3 ml/kg fiziológiás sóoldatot kaptak i.v.

#### Eredmények és következtetések

Megállapítottuk, hogy a foscarnet gátolta az AsV-ből képződő és az epével kiválasztódó AsIII és MMAAsIII mennyiségét, valamint fokozta az AsV ürülését a vizelettel bizonyára azért, mert a foscarnet hatékonyan gátolta az AsV renális reabszorpcióját, és a májba való felvételét. Ezen megfigyelések alapján úgy gondoljuk, hogy a foscarnet alkalmas antitórium lehetne AsV intoxikációban.

#### Metilációgátló szernek hatása az arzénit és metabolitjai kiválasztására

##### Háttér

Az arzén biotranszformációja során kétszer metilálódik. A metilációt az SAME-függő arzenit-metiltranszferáz és monomelilarzenit-metiltranszferáz végzi. Ezeket az enzimeket már több faj szövetéből részlegesen tisztították, de még nem jellemezték kielégítően (Wildfang és mtsai, 1998; Zakharyan és mtsai, 1995). Az első metilációs lépést követő redukció során keletkezik a legtoxikusabb arzénmetabolit, a MMAAsIII. Ezért fontos, hogy a metilációban résztvevő enzimek hatékony, specifikus gátlási lehetőségeit is megismerjük. De Kimpe és munkatársai (1999) felvetették, hogy az arzén metilációjában résztvevő enzimek olyan aktív centrummal rendelkező enzimek csoportjába tartoznak, mint a katekol-O-metiltranszferáz (COMT), mivel a COMT-specifikus pyrogallol *in vitro* gátolja az arzén metilációját. A pyrogallol azonban nemcsak gátlószer, hanem szubsztrátja is a COMT-nak. Ezek alapján felmerült, hogy a tisztán COMT-gátló gyógyszer, az entacapone is gátolja-e az arzén metilációját.

Azt is kimutatták, hogy a melikobalamin (B<sub>12</sub> vitamin) *in vitro* képes metilálni az AsIII-t (Buchet és Lauwers, 1988; Zakharyan és Aposhian, 1999a). A dinitrogén-oxid (N<sub>2</sub>O) pattányokban gyorsan és hosszantartóan inaktiválja a B<sub>12</sub> vitamint a központi Co(I) atom Co(III)-rá való oxidálásával, és ezáltal gátolja a melikobalamin-függő melionin-szintézist (Deacon és mtsai, 1980; Lumb és mtsai, 1983). Ezért megvizsgáltuk

az alkilgázaként is használt  $N_2O$  hatását is az arzén metilációjára. Az entacapone és a  $N_2O$  arzénmetilációra gyakorolt hatásait két csoporttal hasonlítottuk össze. Az entacapone és a  $N_2O$  hatékonyságát az AsIII metilációjára összehasonlítottuk a peroxid-oxidált adenozinnal (PAD) amelyről ismert, hogy indirekt módon gátolja az összes SAME-függő metiltranszferázt. Az abszolút kontrol csoport pedig AsIII-et és fiziológiás sóoldatot kapott.

#### *Eredmények és következtetések*

Összefoglalva az összes SAME-függő metiltranszferázt gátló PAD tökéletesen gátolta a metilált AsIII metabolitok képződését és kiválasztását az epével és a vizelettel. Ezzel szemben sem a COMT enzimet gátló entacapone, sem a metilkobalamin inaktív  $N_2O$  nem csökkentette az epével és vizelettel ürülő metilált arzénmetabolitok mennyiségét. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy sem a COMT, sem a metilkobalamin nem játszik szerepet az arzén metilációjában patkányban.

### **V. A szelenit hatása az arzén biotranszformációjára**

#### *Háttér*

A szelen egy rendkívül toxikus, de a szervezet számára mégis esszenciális nyomelem, amelynek antikarcinogén hatása is ismert. A szelen többek között azért esszenciális, mert számos enzim, közöttük a glutation-peroxidáz, tioredoxin-reduktáz és a jódtironin-dejodiniz aktiv centruma szelenociszteint tartalmaz (Stadtman, 1996).

Régóta ismert az arzén és a szelen interakciója az élő szervezetekben. Alattokban a szervetlen szelen toxikus hatása nátrium-arzenitell (Moxon, 1938; Levander és Argrett, 1969; Hill, 1975), és a szelenit indukálta leukaemiás sejtnekrózis arzénnal (Zeng, 2001) kivédhető. Az AsIII, AsV és egyes szerves arzénvegyületek a szelen epével való kiválasztását jelentősen fokozzák (Levander és Baumann 1966a, b; Gregus és mtsai, 1998; Galler és mtsai, 2000), valamint csökkentik a dimeili-szelenid kilégzését (Foster és mtsai, 1986; Olson és mtsai, 1963; Gregus és mtsai, 2000). Nemcsak az AsIII segíti a szelen kiválasztását, hanem kölcsönösen a szelen is segíti az arzén biliris exkrécióját (Levander és Baumann 1966b; Gregus és mtsai, 1998; Galler és mtsai, 2000).

Ezen interakciók háttérben részben a szervetlen arzén és a szelen hasonló biotranszformációja áll. Mind a szelenit (SeIV), mind az AsV redukálódik és metilálódik. Az arzén és a szelen metabolizmusa egyaránt glutation- és SAME-igényes folyamata.

Így ezeket a kozubsztrátókat versenghetnek egymással. E két metalloid úgy is befolyásolhatja egymás sorsát a szervezetben, hogy egyes SeIV-metabolitok direkt módon reagálnak a trivalens arzénvegyületekkel. Az így képződő közös vegyületek, mint pl. a szeleno-bis (S-glutationil) arzínium ion  $[(GS)_2AsSe^+]$  (Galler és mtsai, 2000) instabilak, és beldőlnek az arzén és a szelen ismét felszabadulhatnak.

Az eddigi tanulmányok túlnyomó többsége az arzén-szelen interakciót a szelenit metabolizmusának és biológiai aktivitásának szempontjából vizsgálta. Viszonylag keveset tudunk a SeIV arzénmetabolizmusra gyakorolt hatásáról. Ezért kísérletet tervezünk annak tanulmányozására, hogy milyen hatást gyakorol a SeIV az AsV és az AsIII metabolizmusára patkányokban.

Ismert, hogy májsejt-extrakumban (Buchet és Lauwers, 1985; Zakharjan és mtsai, 1995) és izolált májsejtekben (Styblo és Thomas, 2001) a SeIV gátolja az AsIII metilációját, ezért egyrészt arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a SeIV *in vivo* gátolja-e a toxikus MMAAsIII képződését, másrészt, hogy SeIV hatására az arzén sorsában bekövetkező esetleges változások mennyiben következmenyei a SeIV arzénmetilációt gátló hatásának. Ezen utóbbi célból a SeIV hatását összehasonlítottuk az SAME-függő metiltranszferázokat indirekt módon gátló PAD hatásával. Kísérleteinkben a SeIV-nek (10  $\mu\text{mol/kg}$ ) és a PAD-nak (50  $\mu\text{mol/kg}$ ) az AsV és az AsIII *in vivo* biotranszformációjára gyakorolt hatásait egyrészt az epével és vizelettel ürülő, másrészt a szövetekben található arzénmetabolitok mérésével vizsgáltuk.

#### *Eredmények és következtetések*

A PAD várakozásunknak megfelelően befolyásolta az arzén sorsát a szervezetben. Mind az AsV-tal, mind az AsIII-tal injektált patkányokban a PAD lényegesen csökkentette a metilált arzénmetabolitok (MMAAsIII, MMAAsV, DMAAsV) megjelenését a vérben és a szövetekben, valamint a MMAAsIII epével és a DMAAsV vizelettel történő kiválasztását. Számothteően növelte a szövetek szervetlen AsIII- és AsV koncentrációját. Az AsV-tal injektált állatokban a PAD növelte a biliris AsIII-kiválasztást és a szöveti AsIII- és AsV retenciót anélkül, hogy befolyásolta volna az AsV vérből való eliminációját. Az AsIII-tal kapott állatokban a PAD szinten jelentősen növelte az AsIII és az AsIII-ből képződött AsV retencióját a vérben és a szövetekben.

Vizsgálataink jelentős különbséget mutattak a PAD és a SeIV arzénmetabolizmusra gyakorolt hatásában. Az AsV-injektált állatokban például a SeIV jelentős mértékben fokozta, a PAD csak kis mértékben növelte az AsIII biliris ürítését. Szintén fontos

különbég, hogy a PAD egyformán csökkentette az összes melittált arzénmetabolitot a szövetekben és az exkrétumokban egyaránt, a SelV viszont eltérő módon befolyásolta a melittált metabolitokat, csökkentette a MMAAsIII és a MMAAsV, de növelte a DMAAsV szöveti koncentrációját. Érdekes különbség továbbá az is, hogy a PAD mind az AsV-, mind az AsIII-injektált állatokban számottevően csökkentette a biliáris MMAAsIII-kiválasztást, míg a SelV csak AsV-injektált patkányokban gátolta jelentősen a MMAAsIII biliáris exkrécióját, az AsIII-injektáltakban azonban alig befolyásolta. Ezekből a példákbból arra következtethetünk, hogy a SelV sokkal komplexebb módon hat az arzén sorsára, mint a PAD, mivel hatása nem korlátozódik tisztán az arzénmetilláció gátlására.

Az arzén és a szelén számos ponton direkt és indirekt módon befolyásolhatja egymás metabolizmusát. A SelV arzénmetabolizmusra gyakorolt hatásának értelmezéséhez az alábbi három ismeret adhat támpontot:

1. *Az AsIII komplexet képez a SelV metabolitjaival.* Régóta feltételezték, hogy az arzén és a szelén (SelI-tartalmú metabolitjai révén) egy rendkívül instabil közös vegyületet képez, amely az epével kiválasztódik (Hsieh és Ganther, 1977; Alexander és Aaseh, 1985; Gregus és mtsai, 1998). Az utóbbi időkig azonban nem volt erre kísérletes bizonyíték. Gailer és munkatársai (2000, 2002) nyulak epéjében kimutattak egy arzén (AsIII) – szelén (SeII) közös vegyületet, amelyet mint szeleno-bis (S-glutatoninil) arzínium ion-t [(GS)<sub>2</sub>AssSe] azonosítottak. Feltételezzük azonban, hogy analitikai eljárásunk során ez az As-Se komplex instabilitásának köszönhetően (Gailer és mtsai, 2002) szétesik, és a belőle felszabaduló AsIII hozzáadódik a szabad (nem komplexált) AsIII-hez. Az As-Se komplex képződésének két fontos következményével számolhatunk. Egyrészt a komplex-képződés közvetlenül befolyásolja a komplexképző fémek megoszlását, biotranszformációját és kiválasztását. Másrészt, a komplex-képződés csökkenti a szabad (nem komplexált) AsIII és SeII koncentrációját és ennek következtében ezek hatását.

2. *A SelV csökkenti az SAME szöveti koncentrációját.* A SelV metabolizmus során redukálódik, majd SAME felhasználásával melittálódik (Ganther, 1984; 1986). Az intravénásan adott SelV jeletősen csökkenti az SAME koncentrációt a májban (Gregus és mtsai, 2001). Az SAME-koncentrációt a SelV nemcsak az SAME felhasználásával, hanem a melitonin-adenozil-transzferáz gátlásával is csökkenti az SAME képződését (Hoffman, 1977). Az SAME-depláció gátolhatja az arzén melittációját. Az As-Se komplex képződése azonban csökkenti a szabad SelI koncentrációját így mérsékli a SelV SAME-depletáló hatását is.

3. *Az AsIII koncentrációfüggően erősen gátolja a DMAs képződést, kevésbé a MMAAs képződést.* Az AsIII *in vitro* és *in vivo* (III. közlemény) dózistfüggő módon gátolja önmaga melittációját. Az As-Se komplex képződése csökkentheti a szabad AsIII koncentrációt, ezáltal mérséklődhet az AsIII melittációjára kifejett gátló hatása is.

A SelV-kezelt állatokban mindhárom mechanizmus egyaránt befolyásolhatja mind az AsIII, mind az AsV metabolizmusát, azonban, hogy melyik jut elsősorban érvényre, azt a szabad AsIII és a SelV (illetve ennek SeII metabolitjai) koncentrációnak aránya befolyásolja.

Az AsV-injektált állatok szövetiben kezdetben sokkal kevesebb AsIII van, mint az AsIII-injektált patkányokban. Ennek legalább két következménye lehet. Egyrészt az AsIII melitranszferázokat gátló hatása kevésbé érvényesül, mint az AsIII-injektált állatokban. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk, hogy AsV adását követően a vér DMAs koncentrációja gyorsabban és magasabba emelkedett, mint AsIII-injektálást követően. Másik következmény az lehet, hogy az AsV-ból képződő kisebb mennyiségű AsIII-hez képest a SeII nagy feleslegben van jelen, így az AsV-tal injektált állatokban az AsIII nagy részét a SeII komplexálhatja, és kevesebb AsIII melittálódhat. Az arzénmetilláció csökkentéséhez hozzájárulhat az is, hogy nem képződik a SeII depletálásához elegendő AsIII, így a nem komplexálódott SeII melittálódik és ezzel depletálja az AsIII melittációjához is szükséges SAME-t. A 90. perctől emelkedik a melittált számmazékok koncentrációja a vérben, sőt a DMAAsV koncentrációja ezután 30-40%-kal meg is haladja a kontroll állatokét. Ennek hátterében az állhat, hogy egyrészt az idővel csökken a szabad SeII koncentrációja, és így annak SAME-szint csökkenti hatása, másrészt a fokozott AsIII-elimináció következtében kisebb lesz a szöveti AsIII koncentráció is, ezért a SelV-kezelt állatokban az AsIII melitranszferázokat gátló hatása kevésbé érvényesül, mint a kontrollokban. Ezen mechanizmusok összességére adhat magyarázatot arra az első pillanatban érdekesnek tűnő megfigyelésre, hogy SelV hatására az AsV-injektált állatokban a monometillált arzénmetabolitok kiválasztása és szöveti koncentrációja csökken, míg a DMAAsV-é növekszik.

Az AsIII-injektált állatokban – az AsV-tal injektáltaktól eltérően – igen sok AsIII van, amely jelentősen gátolhatja saját melittációját (III. közlemény). Az eltérő dózisok miatt (AsIII 50 µmol/kg, SelV 10 µmol/kg) az arzén-szelén-glutaton komplex képződése felhasználhatja a SelV-ből képződő SeII nagy részét, ezáltal csökken a szelén SAME-szintet mérséklő hatása. Ezzel párhuzamosan a komplex-képzés csak az injektált AsIII

törredékét használhatja, az AsIII dózis zöme így szabadon metilálódhat. Ez a két érv összhangban áll azzal a megfigyelésünkkel, hogy SelV-kezelt AsIII-injektált patkányok az epével közeli ugyanannyi MMAsIII-et választottak ki, mint a AsIII-injektált kontroll állatok, valamint azzal is, hogy fokozódott a vizelettel kiválasztott DMAsV mennyisége. A SelV-injektált állatok vérében kezdetben csökkent, majd a 60. perctől közeli kétszeresére emelkedett a MMAsIII – a 90. perctől pedig a DMAsV koncentráció. A májban csökkent a MMAsIII és MMAsV koncentráció, amelynek hátterében a prekursor AsIII koncentrációjának a komplex-képződés miatti csökkenése és a fokozott DMAsV képződés állhat, összehasonlítva a kontroll állatokkal.

A SelV hatására az arzén diszpozícióban bekövetkező számos változást a két metalloid komplex-képzésének tulajdoníthatjuk. A májban képződő As-Se komplex kiválasztódhat az epével, majd belőle az AsIII gyorsan felszabadul. Ez a feltételezhető mechanizmus magyarázhatja meg azt az érdekes megfigyelést, hogy míg a SelV adása az AsV-tal injektált állatokban az AsIII alacsony bilirisz extrakcióját 10-szeresére növelte, addig a SelV-adása az AsIII-injektált patkányokban csak 30%-kal fokozta az AsIII rendkívül gyors ürülését az epével. Jóllehet mindkét esetben az AsIII-kiválasztás abszolút növekedése hasonló volt SelV hatására (kb. 2  $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{hr}$ ). Amennyiben az As-Se-GSH komplex képződése valóban elősegíti az AsIII kiválasztódását, ez az érdekes észlelet arra vezethető vissza, hogy AsV-injektált állatokban az AsIII zöme, AsIII-injektált állatokban viszont csak az AsIII törredéke vesz részt e kollektív komplex képzésében. Az As-Se komplex makromolekuláris kötődése a vérben jó magyarázatot adhatna az AsIII jelentős vérben történő retenciójára SelV-kezelést követően mind az AsV-, mind az AsIII-injektált patkányokban. Az injektált SelV-et a vörösvértestek gyorsan felveszik és SelI-dé redukálják. A keletkezett Sell gyorsan kijut a plazmába és az albumin diszulfid csoportjaihoz kötődik (Sandholm, 1973; Suzuki és Itoh, 1997; Shiobara és Suzuki, 1998). Feltételezésünk szerint az As-Se komplex is kapcsolódhat az albuminhoz, ezáltal visszatarthatja az AsIII (és a Sell) disztribúcióját a plazmából a szövetekbe. Ezt a feltételezésünket alátámasztja az a megfigyelés is, hogy AsIII-tal és SelV-tal injektált patkányok vérében nemcsak az AsIII koncentráció emelkedett, hanem a Se koncentráció is (Palmer és Bonhorst, 1957). Ezzel szemben az AsIII és a SelV koncentrációja a vérben gyorsan visszaesett, ha külön injektáltuk őket. Ez a makromolekuláris komplex-képzés is feltehetően lehet a MMAsIII vértkoncentrációjának kései növekedéséért. A Se-induktált AsIII retenció a vérben szintén hozzájárulhat a máj AsIII koncentrációjának csökkenéséhez az AsIII- és SelV-injektált állatokban.

A SelV-kezelt állatok vérében a metilált arzénmetabolitok koncentrációjának kezdeti csökkenése az arzénmetiláció gátlására utal. A májban a monometilált arzénvegyületek koncentrációja alacsony marad a kontroll állatokhoz viszonyítva a SelV-injektált állatokban, amelynek oka az lehet, hogy képződésük csökken a prekursor AsIII-ből, másrészt növekedhet átalakulásuk DMAsV-tá. Ez utóbbi jelenséget támogatja az a megfigyelésünk, hogy a kísérlet végére a májban és a vérben mérhető DMAsV koncentráció a SelV-kezelt állatokban meghaladta a kontroll állatokét. Az AsIII által visszafogott DMAsV képződését a SelV az AsIII-et komplexálva felszabadítja annak gátló hatása alól, ezáltal az AsIII bilirisz eliminációja nő, másrésztől az AsIII szöveti koncentrációja csökken.

A PAD és a SelV arzénmetabolizmusra gyakorolt hatásának tanulmányozásán kívüli ezek a vizsgálataink néhány új, vagy kevésbé ismert eredményre hívták fel a figyelmet a patkány arzénmetabolizmusában. Vizsgálataink során először követeltük nyomon a különböző arzénmetabolitok koncentrációjának időbeli változását patkányok vérében AsV vagy AsIII *in vivo* adása után. Meglepetésünkre az arzénnal nem injektált patkányok vére is tartalmazott egy arzénvegyületet, amely kromatográfias viselkedése alapján DMAsV-nak bizonyult. Többször leírták már, hogy más fajoktól eltérően a patkányok haemoglobinja nagy affinitással köti a beadott DMAsV-ot (Hunter és *mtsai*, 1942; Stevens és *mtsai*, 1977; Vahter és *mtsai*, 1984) illetve a szervetlen arzént (Lanz és *mtsai*, 1950; Rowland és Davies, 1982; Lerman és Clarkson, 1983.) DMAsV formájában. Az irodalomban összesen egy közleményt találtunk, amely vékonyréteg kromatográfias módszerrel demonstrálta, hogy DMAsV található az arzénnal nem kezelt patkányok vérében (Odanaka és *mtsai*, 1980). Ezt az általában figyelmen kívül hagyott tényít sikerült kvantitatív módon HPLC-vel igazolnunk. Meglepetés volt számunkra azonban, hogy az arzénnal nem kezelt 8-10 hetes patkány vére viszonylag magas  $14.2 \pm 2.55$  nmol/ml koncentrációban tartalmazta a DMAsV-ot. Ennek forrása feltételezésünk szerint a patkányok táplálékában és ivóvizében lévő minimális arzén, amelyet a patkányok DMAsV-ként halmoznak fel vörösvértestjeikben. Vizsgálataink másik fontos melléklete, hogy AsV vagy AsIII injektálását követően a vérben a DMAsV koncentrációja fokozatosan nőtt, míg a vizeletben a DMAsV csak nyomokban jelent meg. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a patkányok alkalmasak lehetnek a DMAsV képződésének *in vivo* időbeli nyomon követésére, a vér DMAsV koncentrációjának meghatározásával. Tanulmányunk rámutatott egy kevésbé feltárt különbségre is az AsV és az AsIII hepatorenális megoszlásában. AsV adását követően a vesében ötször több

arzén volt (főként AsIII formájában), mint a májban, szemben az AsIII-tel injektált állatokban, amelyekben csak kis különbség volt a máj és a vese arzénkoncentrációjában. Ennek a jelenségnek a hátterében az állhat, hogy a beadott AsV szabadon filtrálódik, majd a vesetubulusokból a Na<sup>+</sup>-foszfát szimporterrel keresztüli reabszorbeálódik és redukálódik AsIII-té (Ginsburg, 1965. IV: közlemény) magas AsIII koncentrációt okozva a vesében. Ebből arra következtelhetünk, hogy nagymértékű kórmyezeti AsV-expozíció fokozottan hajlamosíthat vesekárosodásra.

Összefoglalva, megállapítottuk, hogy a melilitranszferáz-gátló PAD előkezelés drasztikusan csökkentette a melilit arzénmetabolitok (MMAsIII, MMAsV, DMAsV) kiválasztását, valamint szöveti koncentrációját és növelte a szervezetben AsV és AsIII kiválasztását és szöveti koncentrációját. A SeIV is jelentősen befolyásolta az arzén *in vivo* metabolizmusát, azonban a változások sokfélék és nagymértékben függték attól, hogy melyik arzénvegyületet (AsV vagy AsIII) kapták az állatok. Úgy tűnik, hogy a SeIV – a PAD-dal ellenében – az arzén *in vivo* metabolizmusát elsősorban nem a melilitranszferázok gátlásán keresztül befolyásolja, hanem sokkal inkább az As-Se komplex képzésén keresztül. A komplexképződés mértékét és hatását lényegesen befolyásolja a szervezetben lévő AsIII és SeIV (SeII) mennyiségének relatív aránya. Azaz a SeII csökkenti az arzén monometilációját, ha az AsIII mennyisége korlátozott (pl. az AsV kezelt patkányokban), kevéssé befolyásolja azonban amikor az AsIII aránya magas a SeII-hez képest. További vizsgálatok szükségesek az As-Se komplex a SeIV arzén-metabolizmust befolyásoló hatásában betöltött szerepének egyértelmű megerősítéséhez.

## A disszertációban szereplő fontosabb új eredmények

1. Elsőként azonosítottuk a MMAsIII-t, mint a szervezetben ténylegesen képződő arzénmetabolitot. Megállapítottuk, hogy ez az AsIII-nél is toxikusabb vegyület az AsV és az AsIII legjelentősebb biotranszformációja.
2. MMAsV intravenás adását követően a patkányok az epével nem választottak ki MMAsIII-t, hanem változatlan formában ürítették a MMAsV-t a vizelettel. Ez a megfigyelésünk arra utalhat, hogy a MMAsIII *in vivo* nem, vagy csak igen kis mértékben képződik az exogén MMAsV-ból, annak ellenére, hogy a MMAsV-t a MMAsIII közvetlen prekursorjának tartják az arzén biotranszformációjában. A MMAsV redukciójának különbözően az arzén metabolizmusában betöltött szerepét megkérdőjelezi az is, hogy AsV és AsIII adása után a májban és a vesében a MMAsIII koncentrációja jóval magasabb volt, mint a MMAsV-é. Mindezek alapján joggal felvethejtük, hogy az arzén metabolizmusa során feltételezett első oxidatív metilációs lépés helyett az AsIII közvetlenül MMAsIII-t metilálódik, és ez a képződött MMAsIII alakul oxidációt követően MMAsV-tá.
3. Az arzénmetabolizmus fajok közötti eltéréseit tanulmányozva megállapítottuk, hogy a vizsgált fajok számos hasonlóságot, de jelentős különbségeket is mutatnak az arzén epével és vizelettel történő kiválasztásában. Legfontosabb megfigyelésünk, hogy az arzént nem metiláló tengerimalacok kivételével minden species, amely képes arzént metilálni, az epével MMAsIII-t választ ki. A vizsgált fajok közül a patkányok képzik messze a legtöbb MMAsIII-t, feltételezhetően a jóval nagyobb hepatikus AsIII-melilitranszferáz aktivitásuknak köszönhetően. Vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a patkány alkalmas lehet a szupertoxikus MMAsIII képződésének és kiválasztásának *in vivo* tanulmányozására. Az általunk vizsgált fajokra (patkány, egér, nyúl, hörcsög és tengerimalac) általánosan jellemző, hogy AsV adását követően főként a vizelettel, míg az AsIII adása után az epével választják ki az arzént. Ezekben a fajokban a szervezetben arzén kizárólag vagy főleg thvalens formában (AsIII, MMAsIII) transzportálódik az epébe; a pentavalens metabolitok (AsV, DMAsV) viszont kizárólag vagy főleg a vizelettel választódnak ki.

4. Az AsIII dóziszfüggő biotranszformációját elemezve megállapítottuk, hogy az AsIII ürülése az epével és vizelettel a beadott AsIII dózissal csaknem arányosan, szöveti koncentrációja pedig exponenciális mértékben nőtt, a mellílt artzénmetabolitok (MMAsIII, MMAsV, DMAsV) exkrécia és szöveti koncentrációja viszont az igen magas (közel letális) AsIII dózis adása után csökkent. Toxikus dózisu AsIII adása után nem csökkent, sőt kissé nőtt az SAME koncentrációja a májban, csökkent viszont a GSH és az ATP hepatikus koncentrációja, valamint az „energy charge”. Ezekből arra következtethetünk, hogy a mellíció csökkentése nem az SAME deplációjával magyarázható, hanem valószínűleg az AsIII mellitranszferázokat gátló hatásával, amelynek következtében csökken az SAME-felhasználás. Az AsIII akut toxicitásban valószínűleg nincs elsődleges szerepe a belőle képződő MMAsIII-nek, hiszen a MMAsIII képződése a kifejezetten toxikus AsIII dózis után csökkent. Az AsIII akut toxicitásában valószínűleg lényeges körülmény, hogy az AsIII eliminációs kapacitását a GSH deplációja és a mellíció gátlása limitálja. GSH-deplációt követően a relineált AsIII fokozottan gátolhat SH-enzimeket, ezáltal ATP-deplációt és energetikai zavart okozhat.

5. Megállapítottuk, hogy a foszfáttal – így az AsV-tal is – analóg szerkezetű foszcamet jelentősen befolyásolja az AsV sorsát a szervezetben: növeli a vizelettel ürülő AsV mennyiségét, és csökkenti a vizelettel és az epével ürülő AsIII, valamint az epével ürülő MMAsIII mennyiségét. A foszcamet valószínűleg azért csökkenti jelentősen az AsV-ból képződő toxikus metabolitok (AsIII, MMAsIII) mennyiségét, mert hatékonyan gátolja az AsV renális reabszorpcióját, valamint feltehetően a máj AsV felvételét is, amelyet a Na<sup>+</sup>-foszfát kotranszporter medálja.

6. A mellílt artzénmetabolitok képzésében az SAME-függő mellitranszferázoknak döntő szerepük van, mivel a PAD előkezelés drasztikusan csökkentette a mellílt artzénmetabolitok (MMAsIII, MMAsV, DMAsV) kiválasztását, valamint szöveti koncentrációját és növelte a szervenlen AsV és AsIII kiválasztását és szöveti koncentrációját. A COMT azonban patkányban nem játszik szerepet az artzén mellíciójában, mert gátlója, az entacapone nem befolyásolta a mellílt artzénmetabolitok kiválasztását. A mellikobalamin sem játszik lényeges szerepet az artzén mellíciójában, mert inaktíválja, a N<sub>2</sub>O nem volt hatással a mellílt artzénmetabolitok kiválasztására.

7. A SeIV artzénmetabolizmusra gyakorolt hatásának vizsgálatkor megállapítottuk, hogy a PAD-kezeléshez hasonlóan a SeIV is erősen befolyásolja az artzén *in vivo* metabolizmusát, ezek a változások azonban soktéték és nagyban függnak attól, hogy melyik artzénvegyületet (AsV vagy AsIII) kapták az állatok. Úgy tűnik, hogy a SeIV – a PAD-nal ellentétben – az artzén *in vivo* metabolizmusát elsősorban nem a mellitranszferázok gátlásán keresztül befolyásolja, hanem sokkal inkább az As-Se komplex képzésén keresztül. A komplex-képződés mértékét és hatását lényegesen befolyásolja a szervezetben lévő AsIII és SeIV (SeIII) mennyiségének relatív aránya, azaz a SeIII csökkenti az artzén monometilációját, ha az AsIII mennyisége korlátozott (pl. az AsV-kezelt patkányokban). Kevésbé befolyásolja azonban, amikor az AsIII aránya magas a SeIII-éhez képest.

8. Megállapítottuk, hogy artzénal nem injektált patkányok vérében jelentős mennyiségű (14,2 ± 2,55 nmol/ml) DMAsV van. Feltételezésünk szerint a patkányok a táplálékban és az ivóvizben lévő minimális artzént DMAsV-ként halmozzák fel vörsvértestjeikben. AsIII vagy AsV adása után a DMAsV vérkoncentrációja fokozatosan emelkedik, míg a vizeletben csak nyomokban van jelen. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a patkányok alkalmasak lehetnek a DMAsV képződésének időbeli nyomon követésére, a vér DMAsV koncentrációjának meghatározásával.

## A tétiszekhez felhasználható irodalom

- Akao et al., (1999). *FEBS Lett.* 455, 59-62.
- Anundri et al., (1982). *FEBS Lett.* 145, 285-288.
- Aposhian (1997). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 397-419.
- Aposhian et al., (2000a). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 165, 74-83.
- Aposhian et al., (2000b). *Chem. Res. Toxicol.* 13, 693-697.
- Bachlauer-Hofmann et al., (2002). *Leuk. Lymphoma* 43, 1535-1540.
- Berner, W. et al., (1976). *Biochem. J.* 160, 467-474.
- Bhuvanawan, (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1201-1206.
- Buchel et al., (1981). *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 48, 71-79.
- Buchel and Lauwerys, (1985). *Arch. Toxicol.* 57, 125-129.
- Buchel and Lauwerys, (1986). *Biochem. Pharmacol.* 37, 3149-3153.
- Chiang et al., (1996). *FASEB J.* 10, 471-480.
- Chouchane and Snow, (2001). *Chem. Res. Toxicol.* 14, 517-522.
- Concha et al., (1998). *Environ. Health Perspect.* 106, 355-359.
- Cullen et al., (1984). *J. Inorg. Biochem.* 21, 179-194.
- De Kimpe et al., (1999). *Drug Chem. Toxicol.* 22, 613-628.
- Del Razo et al., (1997). *Arch. Toxicol.* 71, 211-217.
- Deacon et al., (1980). *Eur. J. Biochem.* 104, 419-422.
- Delhondedieu et al., (1994). *Chem. Biol. Interact.* 90, 139-155.
- Dietrich et al., (2001). *Toxicology* 167, 73-81.
- Dills and Klaassen, (1985). *J. Pharmacol. Methods* 14, 189-197.
- Dixon, H. B. F., (1997). *Adv. Inorg. Chem.* 44, 191-227.
- Du and Ho, (2001). *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47, 481-490.
- Foster et al., (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* 247, 12-19.
- Gailler et al., (2000). *Chem. Res. Toxicol.* 13, 1135-1142.
- Gailler and Lindner, (1998). *J. Chromatography B.* 716, 83-93.
- Gaier et al., (2002). *Appl. Organomet. Chem.* 16, 72-75.
- Ganther, (1984). *Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology*. Eds: Waller de Gruyter & Co., Berlin Vol.3, pp. 4-24.
- Ganther, (1986). *J. Am. Coll. Toxicol.* 5, 1-5.
- Ginsburg and Loitspeich, (1963). *Am. J. Physiol.* 205, 707-714.
- Ginsburg, (1965). *Am. J. Physiol.* 208, 832-840.
- Gomez-Anza et al., (1998). *Appl. Organomet. Chem.* 12, 1-9.
- Gregus et al., (1998). *Biochem. Pharmacol.* 56, 1391-1402.
- Gregus et al., (2000). *Toxicol. Sci.* 57, 22-31.
- Gregus et al., (2001). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 174, 177-187.
- Gyurasics et al., (1991a). *Biochem. Pharmacol.* 41, 937-944.
- Gyurasics et al., (1991b). *Biochem. Pharmacol.* 42, 465-468.
- Healy et al., (1997). *Mutat. Res.* 386, 229-239.
- Healy et al., (1999). *Biol. Tr. El. Res.* 68, 249-266.
- Hill, (1975). *Fed. Proc.* 34, 2096-2100.
- Hoffman, (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 136-140.
- Hoffman, (1980). *Arch. Biochem. Biophys.* 205, 132-135.
- Hoppehajn-Rich et al., (1993). *Environ. Res.* 60, 161-177.
- Hsieh and Ganther, (1977). *Biochim. Biophys. Acta* 497, 205-217.
- Hughes et al., (1994). *Fund. Appl. Toxicol.* 22, 80-89.
- Hunter et al., (1942). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 76, 207-220.
- Jennings, (1990). *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 618-621.
- Jouffe, (1993). *J. Royal Soc. Med.* 86, 287-289.
- Kala et al., (2000). *J. Biol. Chem.* 275, 33404-33408.
- Klaassen, (1974). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 29, 447-457.
- Knowles and Benson, (1983). *Trends Biochem. Sci.* 8, 178-180.
- Lanz et al., (1950). *Univ. Calif. Berkeley Publ. Pharmacol.* 2, 263-282.
- Le et al., (2000). *Anal. Chem.* 72, 5172-5177.
- Lerman and Clarkson, (1983). *Fund. Appl. Toxicol.* 3, 309-314.
- Levander and Argrett, (1989). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 14, 308-314.
- Levander and Baumann, (1966a). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 9, 98-105.
- Levander and Baumann, (1966b). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 9, 106-115.
- Lumb et al., (1963). *Biochim. Biophys. Acta* 756, 354-359.
- Mandal et al., (2001). *Chem. Res. Toxicol.* 14, 371-378.
- Marafante and Vahter, (1987). *Environ. Res.* 42, 72-82.
- Moxon, (1938). *Science* 86, 81.
- Odamaka et al., (1980). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 452-459.
- Olson et al., (1963). *J. Agric. Food Chem.* 11, 531-534.
- Palmer and Bonhorst, (1957). *Agric. Food Chem.* 5, 928-930.
- Park et al., (2000). *Cancer Res.* 60, 3065-3071.
- Reichtl et al., (1989). *Arch. Toxicol.* 63, 419-422.
- Petrick et al., (2001). *Chem. Res. Toxicol.* 14, 851-858.
- Reay and Asher, (1977). *Anal. Biochem.* 78, 557-560.
- Rowland and Davies, (1982). *J. Appl. Toxicol.* 2, 294-299.
- Sandholm, (1973). *Acta Pharmacol. Toxicol.* 33, 1-5.
- She et al., (1994). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1748-1754.
- Shobara, and Suzuki, (1998). *J. Chromatogr. B* 710, 49-56.
- Soignet, (1998). *New Eng. J. Med.* 339, 1341-1348.
- Stadman, (1996). *Annu. Rev. Biochem.* 65, 83-100.
- Stevens et al., (1977). *Environ. Health Perspect.* 19, 151-157.
- Syblo et al., (1995b). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135, 172-178.
- Syblo et al., (1996). *Chem. Biol. Interact.* 99, 147-164.
- Syblo et al., (1997). *Chem. Res. Toxicol.* 10, 27-33.
- Syblo et al., (1999). *Chem. Res. Toxicol.* 12, 560-565.
- Syblo et al., (2000). *Toxicologist* 48, 350.
- Syblo and Thomas, (2001). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 52-61.
- Suzuki and Itoh, (1997). *J. Chromatogr. B.* 25, 15-22.
- Swan and Tucker, (1995). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 242-247.
- Szczepanska-Konkai et al., (1986). *J. Biol. Chem.* 261, 6375-6383.
- Tam et al., (1979). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50, 319-22.
- Tandon et al., (1986). *Biochem. Pharmacol.* 35, 2763-2766.
- Thompson, (1993). *Chem. Biol. Interact.* 88, 89-114.
- Tietze, (1969). *Anal. Biochem.* 27, 502-522.
- Vahter, (1981). *Environ. Res.* 25, 286-293.
- Vahter et al., (1982). *Arch. Toxicol.* 51, 65-77.
- Vahter, (1983). *Effects of Arsenic (B. A. Fowler, Ed.)*, pp. 170-197. Elsevier Sci. Publ. New York.
- Vahter and Envall, (1983). *Environ. Res.* 32, 14-24.
- Vahter et al., (1984). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13, 259-264.
- Vahter, (1994). *Environ. Geochem. Health* 16, 171-179.
- Vahter, (1999). *Sci. Prog.* 82, 69-88.
- Vahter, (2000). *Toxicol. Lett.* 112-113, 209-217.
- Wildfang et al., (1998). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152, 306-375.
- Yamauchi and Yamamura, (1984). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74, 134-140.
- Yamauchi et al., (1986). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 280-286.
- Zakharjan et al., (1995). *Chem. Res. Toxicol.* 8, 1029-1038.
- Zakharjan and Aposhian, (1992a). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 287-291.
- Zakharjan and Aposhian, (1992b). *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1278-1283.
- Zakharjan et al., (1999). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158, 9-15.
- Zakharjan et al., (2001). *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1051-1057.

#### A doktori értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

- I. Gregus Z., Gyurasics A., Csanaky L. (2000). Biliary and urinary excretion of inorganic arsenic: monomethylarsonous acid as a major biliary metabolite in rats. *Toxicol. Sci.* **56**, 18-25. (If: 2,361 – 2000.)
  - II. Csanaky L., Gregus Z. (2002) Species variations in the biliary and urinary excretion of arsenate, arsenite and their metabolites. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **131**, 355-365. (If: 0,930 – 2001.)
  - III. Csanaky L., Némethi B., Gregus Z. (2002). Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats – not S-adenosylmethionine (SAME) depletion impairs arsenic methylation at high dose. *Toxicology* **183**, 77-91. (If: 1,752 – 2001.)
  - IV. Csanaky L., Gregus Z. (2001). Effect of phosphate transporter and methylation inhibitor drugs on the disposition of arsenate and arsenite in rats. *Toxicol. Sci.* **63**, 29-36. (If: 2,734 – 2001.)
  - V. Csanaky L., Gregus Z. (2003). Effect of selenite on the disposition of arsenate and arsenite in rats. *Toxicology*, megjelenés folyamatban (If: 1,752 – 2001.)
- Egyéb közlemények**
- VI. Gregus Z., Gyurasics A., Csanaky L. (2000). Effects of arsenic-, platinum-, and gold-containing drugs on the disposition of exogenous selenium in rats. *Toxicol. Sci.* **57**, 22-31. (If: 2,361 – 2000.)
  - VII. Gregus Z., Gyurasics A., Csanaky L., Pintér Z. (2001). Effects of methylmercury and organic acid mercurials on the disposition of exogenous selenium in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **174**, 177-187. (If: 2,731 – 2001.)
- Előadások**
- I. Csanaky L. A szelén reakciója elektrofil szerves savakkal. POTE TDK konferencia, 1998. március 12-14.
  - II. Csanaky L. A szelén reakciója elektrofil szerves savakkal. SOTE Korányi Tudományos Fórum, 1998. április 23.
  - III. Gregus Z., Gyurasics A., Csanaky L. Biliary and urinary excretion inorganic arsenic identification of methylarsonous acid (MMAsIII) as major biliary metabolite in rats. SECOTOX 6<sup>th</sup> Meeting of the Central and Eastern European Regional Section, Balatonföldvár, 1999. szeptember 19-23.
  - IV. Csanaky L., Gregus Z. Foszfát analóg gyógyszerek, valamint az entacapon hatására az arsenát és arsenit biotranszformációjára patkányokban TOX2000, MTE Kongresszusa, Balatonkenese 2000. október 19-21.
  - V. Csanaky L., Gregus Z. Az arsenit dózistüggő biotranszformációja patkányban – Nem az S-adenozil-metionin depleció okozza a metiláció csökkenését. TOX2001, MTE Kongresszusa, Eger, 2001. október 25-27.

#### Poszterek

- I. Csanaky L., Gregus Z. Effect of sodium selenite on the biotransformation and excretion of inorganic arsenic in rats SECOTOX 6<sup>th</sup> Meeting of the Central and Eastern European Regional Section, Balatonföldvár, 1999. szeptember 19-23.
- II. Gregus Z., Gyurasics A., Csanaky L. Biliary and urinary excretion of inorganic arsenic: identification of methylarsonous acid as a major biliary metabolite in rats. 6<sup>th</sup> International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine, San Juan (Puerto Rico), 2000. május 7-10. (Idézhető abstract: *Metal Ions in biology and Medicine Vol. 6* Eds. J.A. Centeno, P. Collier, G. Vernet, R.B. Finkelstein, H. Gibb, J.-C. Etienne, John Libbey Eurotext, Paris 2000.)
- III. Gregus Z., Gyurasics A., Csanaky L., Pintér Z. Effects of methylmercury and organic acid mercurials on the disposition of exogenous selenium in rats. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Francisco, 2001. március 25-29. (Idézhető abstract: *Toxicol. Sci.*, **60**, (1-S):357, 2001. (If: 2,734 – 2001.)
- IV. Csanaky L., Némethi B., Gregus Z. Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats – not S-adenosylmethionine (SAM) depletion impairs arsenic methylation at high dose. 41<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville, 2002. március 16-22. (Idézhető abstract: *Toxicol. Sci.*, **66**, (1-S):83, 2002. (If: 2,734 – 2001.)
- V. Csanaky L., Némethi B., Gregus Z. Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats – not S-adenosylmethionine (SAM) depletion impairs arsenic methylation at high dose. 40<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Budapest 2002. szeptember 15-18. (Idézhető abstract: *Toxicol Lett.*, **135**, (1-S): S60, 2002. (If: 1,587 – 2001.)
- VI. Gregus Z., Csanaky L. Effect of selenite on the disposition of arsenate and arsenite in rats. 42<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City 2003. március 7-13. (abstract beklüdvé).



## Rövidítések

HPLC-HG-AFS	HPLC-hidrid-generáció-atomfluoreszcens spektrometria
AsIII	arzenit
AsV	arzenát
MMAsIII	monometil-arzenit
MMAsV	monometil-arzenát
MMAAs	monometil-arzenit és -arzenát
DMAAsV	dimetil-arzenát
DMAAs	dimetil-arzenit és -arzenát
SAME	S-adenozilmetionin
SAH	S-adenozilhomocisztein
PAD	perforát-oxidált adenozin
AsIII-MT	arzenit-metiltranszferáz
MMAsIII-MT	monometilarzenit-metiltranszferáz
COMT	katekol-O-metiltranszferáz
SeIV	selenit
SeII	selenid

## Köszönetnyilvánítás

Elsősorban hálaít adok a mindenható Istennek, hogy erőt, kitartást adva segíteti eddigi utamon. Köszönettel tartozom Édesanyámnak, hogy szeretetével leheltséget adott és biztosított munkámhoz, Bátyámnak hasznos tanácsaiért, Menyasszonyomnak türelméért és áldozatos segítségéért.

Rendkívüli hálával és köszönettel tartozom tanítómesteremnek, Dr. Gregus Zoltán egyetemi tanárnak, aki türelmes emberi és szakmai példamutatásával, hasznos tanácsaival, utat mutatott pályámon, valamint, hogy biztosította és megteremtette a feltételeket eredményes munkámhoz.

Ezúton is szeretném külön megköszönni Schweißbert István barátságát és nélkülözhetetlen segítségét az analitikai munkákban. Köszönettel tartozom Dr. Gyurasics Ágnes és Dr. Németi Balázs kollégáimnak tanácsaikért és a kísértetek kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

Doktori disszertációm befejezését a Pécsi Tudományegyetem Donhoffar Szilárd Predoktori Ösztöndíja tette lehetővé, amelyért köszönetet mondok Dr. Tóth József rektor úrnak és Dr. Szolcsányi János professzor úrnak, hogy támogatták az ösztöndíj pályázatomat.

Végül szeretném megköszönni a PTE AOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden munkatársának és a PTE OEC Könyvtár dolgozóinak a kutatómunkámhoz nyújtott segítségét.