

Az arzén toxicitás metabolikus háttere

Zárójelentés a kutatási eredményekről

OTKA T 042974 számú kutatási pályázat (2003-2006), témavezető: Dr. Gregus Zoltán

HÁTTÉR. Az arzén – egy ősidők óta ismert mérgező – első helyen szerepel *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* listáján (<http://www.atsdr.cdc.gov>). Mai népegészségügyi jelentőségét idült toxikus hatása és karcinogenitása adja. Fő expozíciós forrás az arzén-szennyezett ivóvíz, amely milliókat veszélyeztet világszerte. Nálunk egyes dél-alföldi kutak vize tartalmaz a megengedettnél több arzént. Egy Közép-Kelet Európára kiterjedő tanulmány az ivóvíz és az emberi vizelet arzénkoncentrációját Magyarországon (Csongrád és Békés megyékben) találta a legmagasabbnak (Lindberg et al., 2006).

Az ivóvízben jellemzően domináns arsenát (AsV) a szervezetbe jutva arsenitté (AsIII) redukálódik. Az AsIII aztán tovább biotranszformálódhat; váltakozó metilációk és redukciónak eredményeként monometilarzenáttá (MMAsV), monometilarzenitté (MMAsIII), dimetilarzenáttá (DMAsV) alakul. A metabolikus séma tehát: $AsV \rightarrow AsIII \rightarrow MMAsV \rightarrow MMAsIII \rightarrow DMAsV$ (Thomas et al., 2001).

Kiemelendő, hogy az AsV-ot a szervezet biokémiailag a szerves foszfáthoz hasonlóan kezeli és hogy az AsV önmaga (biotranszformáció nélkül) valószínűleg igen kevésbé lenne toxikus. Ezzel szemben a háromvegyértékű arzén vegyületei – mint az AsIII, és MMAsIII – tiol-reaktivitásuk miatt sokkal mérgezőbbek, mint az ötvegyértékűek (AsV, MMAsV és DMAsV). A háromvegyértékű arzénvegyületek jelentős szerepet játszhatnak a szerves arzén mérgező és tumorkeltő (bőr, hólyag, vese, tüdő) hatásaiban. Ezért fontos ismerni képződésük mechanizmusait és befolyásoló tényezőit, valamint sorsukat a szervezetben.

ELŐTANULMÁNYOK. Előző kutatásaink eredményei képezték OTKA T 042974 számú pályázat alapjait. Ezek a következőkben foglalhatók össze.

Már korábban megállapítottuk, hogy az AsV-tal vagy AsIII-tel injektált patkányok gyorsan ürítik az arzént az epébe (Gyurasics et al., 1991a) mégpedig a hepatikus glutation (GSH) kénát függvényében (Gyurasics et al., 1991b; 1992). Magyarán feltételeztük, hogy az arzén – az AsV is – trivalens formában, instabil GSH-konjugátumként ürül, mely könnyen hidrolizál. HPLC-HG-AFS analízissel igazoltuk is, hogy patkányok – az AsV-tal injektáltak is – valóban csak trivalens formában – AsIII és MMAsIII-ként – ürítenek arzént az epébe (Gregus et al., 2000). MMAsIII in vivo képződését elsőként mutattuk ki, és azt is demonstráltuk, hogy ez a szupertoxikus metabolit megjelenik más fajok epéjében is (Csanaky and Gregus, 2002).

Mivel az AsV toxicitásában sejtekbe való felvétele majd intracelluláris redukciója AsIII-té kulcsfontosságú, tanulmányoztuk e folyamatok befolyásoló tényezőit és mechanizmusát. Megállapítottuk, hogy a Na-foszfát kotranszportert használó antivirális gyógyszer, a foscarnet patkányban csökkenti az AsV toxikus metabolitjainak képződését, mert gátolja az AsV hepatikus felvételét és renális reabszorpcióját (amelyet részben a Na-foszfát kotranszporter mediál), ezáltal gyorsítja ürülését a vizelettel (Csanaky and Gregus, 2001). Kimutattuk, hogy AsV-ot képesek AsIII-té redukálni a máj mitokondriumjai (Németi and Gregus, 2002a) és citoszólja is (Németi and Gregus, 2002b). Bebizonyítottuk, hogy egy citoszól-enzim, a purin-nukleozid-foszforiláz (PNP) AsV-reduktázként is működik. A PNP purin nukleozidok (pl. inozin) hasítását katalizálja foszfát felhasználásával (foszforolízis), de az enzim foszfát helyett AsV-ot is elfogad (arsenolízis). A PNP csak akkor redukálta az AsV-ot, ha nukleozid szubsztrátja (pl. inozin) és ditiotreitolt (DTT) jelen volt, de a fiziológiás tiol, a

GSH – sokkal kevésbé támogatta a PNP-katalizált AsV redukciót (Gregus and Némethi, 2002). Nem tudtuk azonban, hogy a PNP *in vivo* is szerepet játszhat-e az AsV redukciójában a sokkal mérgezőbb AsIII-té.

EREDMÉNYEK. Kutatásaink két fő témában folytak: **1.** A szervetlen arzénvegyületek (AsV és AsIII) *in vivo* sorsát (biotranszformációját és exkrécióját) befolyásoló tényezők vizsgálata. **2.** Az AsV redukciójáért felelős enzimek azonosítása, *in vivo* szerepük elemzése. Kísérleteinkben az AsV-ot, AsIII-et és metabolitjaikat HPLC elválasztást követően on-line hidridekké alakítva atomfluoreszcenciás spektrométerrel mértük (HPLC-HG-AFS).

Ad 1.

A szervetlen AsIII részben exkréció (epe és vizelet), részben metiláció révén eliminálódik. A metiláció során keletkező MMA_{III} a legtoxikusabbnak tartott arzén metabolit, míg az ezt követő lépésben képződő DMA_V viszonylag ártalmatlan. Az arzén metilációját *S*-adenozil-metionin (SAME) függő metiltranszferázok katalizálják, amelyeket az AsIII *in vitro* dózisfüggő módon gátol. Mivel a metiláció szerepe a szervetlen arzén toxicitásában és eliminációjában nem tisztázott, megvizsgáltuk, hogy hogyan változik az AsIII dózisének emelésével az AsIII és a belőle képződő metilált metabolitok kiválasztása és szöveti retenciója patkányokban. Megállapítottuk, hogy az AsIII ürülése az epével, vizelettel és szöveti koncentrációja a dózissal arányosan, vagy annál nagyobb mértékben nő. Az AsIII hepatikus koncentrációja például 5-szörösére illetve 36-szorosára nőtt a dózis 20 $\mu\text{mol/kg}$ -ról 50, illetve 125 $\mu\text{mol/kg}$ -ra történt emelésével. Ezzel szemben a metilált metabolitok (MMA_{III}, MMA_V, DMA_V) exkréciója és szöveti koncentrációja a dózis emelésénél kisebb mértékben nőtt, vagy még csökkent is a legnagyobb AsIII dózis adása után. A metiláció dózis-függő csökkenésének okát keresve megmértük AsIII-injektált patkányok májában az SAME, *S*-adenozil-homocisztein (SAH), össz-glutation (GSH), ATP, ADP, és AMP koncentrációját. Azt észleltük, hogy AsIII dózisének növelésével csökken a GSH és az ATP hepatikus koncentrációja, valamint az „energy charge”, nő viszont az SAME és az SAH mennyisége a májban. Arra következtethetünk tehát, hogy a nagy AsIII dózis adása után megfigyelt metiláció csökkenés nem a metildonor SAME kínálatának kimerülésével magyarázható, hanem valószínűleg azzal, hogy az AsIII koncentráció-függő módon gátolja a résztvevő metiltranszferáz(oka)t. Úgy tűnik, hogy az AsIII akut toxicitásához nem járul hozzá jelentősen a belőle képződő MMA_{III}, hozzájárul viszont az AsIII eliminációs kapacitásának kimerülése. A GSH depléciót követően a retineált AsIII fokozottan gátolhat SH-enzimeket, ezáltal ATP depléciót és energetikai zavart okozhat (Csanaky et al., 2003).

A környezetből az arzén elsősorban AsV formájában jut a szervezetbe. Az AsV metabolizmusa során előbb AsIII-té redukálódik, majd az utóbbi metilált metabolitokká (MMA_V, MMA_{III}, DMA_V) alakul. A GSH fontos szerepet játszik az arzén metabolizmusában. Ismert, hogy az arzén epével való kiválasztása GSH-függő folyamat, amelynek során trivalens arzén-GSH konjugátumok hepatobiliáris transzportja történik. Ezzel szemben nem tisztázott a GSH *in vivo* szerepe az AsV-nak a jóval toxikusabb AsIII-et eredményező redukciójában. Ezért megvizsgáltuk, hogy a szöveti GSH-t depletáló butionin-szulfoximin (BSO) hogyan befolyásolja az AsV sorsát patkányokban. Megfigyeléseink mellett szólnak, hogy az AsV *in vivo* redukciója GSH-t igénylő folyamat. A BSO előkezelés ugyanis lassította az AsV eliminációját a vérből (1. ábra), fokozta az AsV retencióját a szövetekben, valamint csökkentette az AsIII megjelenését a vérben (1. ábra), az epében (2. ábra) a vizeletben. A BSO előkezelés a MMA_{III} epével való kiválasztását is szinte teljesen megszüntette (2. ábra), a MMA_{III} és MMA_V vérben való megjelenését késleltette (1. ábra),

a monometilált arzénmetabolitok koncentrációját a vesében pedig csökkentette a kontroll csoporthoz képest. Meglepő módon azonban a DMAsV vérben és vizeletben való megjelenése változatlan maradt, sőt a vesében és az izomban kissé emelkedett is a koncentrációja BSO előkezelés hatására. Összefoglalva: a szöveti GSH csökkenése nem csak az arzén hepatobiliáris transzportját csökkenti, hanem gátolja az AsV redukcióját, a monometilált arzénmetabolitok képződését is, de nem gátolja a DMAsV képződését. A GSH tehát valószínűleg hármas szerepet tölt be: (1) szükséges az AsV redukciójához AsIII-té, (2) támogatja az AsIII metilációját, és (3) elősegíti a trivalens arzénvegyületek (AsIII, MMAsIII) hepatobiliáris transzportját, azokkal GSH-konjugátumot képezve (Csanaky and Gregus, 2005)

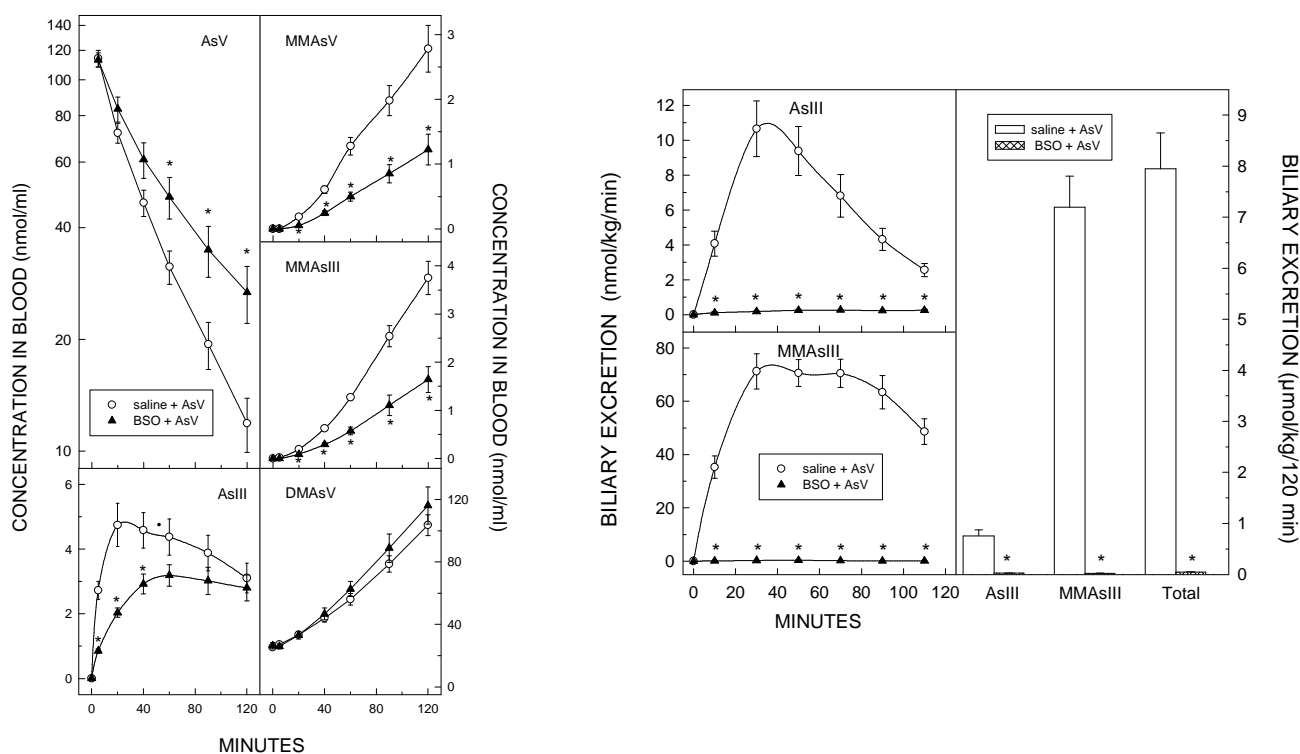


FIG. 1. Effect of BSO on the blood concentration of AsV and its metabolites in rats injected with AsV.

FIG. 2. Effect of BSO on the biliary excretion of arsenic metabolites in rats injected with AsV.

A vesetubulusok kefeszegély membránjában és az epekanalikulusok membránjában található γ -glutamyl transzferáz (GGT) hidrolizálja a GSH-t és a GSH konjugátumokat. Mivel a képződött hidrolízis-termékek jellemzően reabszorbeálódnak a vesetubulusokból, a GGT-katalizált degradáció a GSH és GSH-reaktív xenobiotikumok exkrécióját mérsékli. A GGT gátlása tehát fokozhatja nem csak a GSH hanem a kiválasztott arzén-GSH konjugátumok mennyiségét is. A GGT arzén metabolizmusban betöltött esetleges szerepét az enzimet gátló acivicin segítségével vizsgáltuk AsIII-injektált patkányokban. Az acivicin csökkentette a GGT aktivitást a májban (-81%) és a vesében (-98%), mérsékeltén növelte az epével és drámaian emelte a vizelettel kiválasztott GSH mennyiségét. A fokozott GSH exkréció ellenére nem változott az AsIII és metabolitjainak epével és vizelettel történő kiválasztása, sem pedig vér és szöveti koncentrációja. Tehát amíg a GSH fontos szerepet játszik az arzén diszpozíciójában és toxicitásában (lásd feljebb), addig a GGT – amely a GSH-t és a GSH-konjugátumokat hidrolizálja – nem befolyásolja a GSH-reaktív trivalens arzénmetabolitok sorsát patkányokban (Csanaky and Gregus, 2005).

Fenobarbitál (FB)-előkezelt patkányokban az AsIII hepatotoxicitása fokozódik, ennek mechanizmusa azonban nem tisztázott. Pleiotróp induktor lévén, a FB befolyásolhatja az arzénmetabolizmust, esetleg az AsIII-nél toxikusabb MMAAsIII képződését. Ezt a hipotézist tesztelve megvizsgáltuk, hogy FB előkezelés hatására hogyan változik az AsV és az AsIII metabolizmusa és kiválasztása AsIII-el vagy AsV-al injektált patkányokban. Megfigyeléseink alapján arra következtethetünk, hogy a FB két fő hatást gyakorol az arzén sorsára. (1). A FB fokozza az AsIII hepatobiliáris transzportját. Ezért az AsIII-injektált állatokban nő az AsIII kiválasztás az epével, csökken a máj MMAAsIII és DMAAsV koncentrációja, valamint az utóbbiak kiválasztása az epével illetve a vizelettel. (2). A FB fokozza az AsV redukcióját AsIII-té. Ezért az AsV-tal injektált patkányokban sokszorosára nő az AsIII, mérsékelten fokozódik a MMAAsIII biliáris exkréciója, valamint emelkedik ezek koncentrációja a májban. A fokozott redukció okozhatja a DMAAsV képződésének és vizelettel való kiválasztásának a csökkenését is, hiszen az AsIII erősen gátolja a MMAAsIII metilálását DMAAsV-tá. Megállapítottuk továbbá, hogy a FB-nak a metilált arzénmetabolitok képződését befolyásoló hatása nem a metildonor S-adenozil-metionin (SAME) kínálatának változásával magyarázható, hiszen a FB nem befolyásolta a SAME májkoncentrációját. Kimutattuk, hogy bár a FB emeli a máj GSH koncentrációját, a FB-előkezelt állatokban az AsIII kifejezettebben csökkenti a hepatikus GSH szintet, mint a kontrollokban. Összefoglalva: a FB nem növeli a MMAAsIII képződését AsIII-ból, ezért ez a mechanizmus a FB-nak az AsIII hepatotoxicitását fokozó hatásához nem járul hozzá. A FB növeli az AsV redukcióját a toxikusabb AsIII-té, valamint elősegíti az AsIII hepatobiliáris transzportját. E hatásokban szerepet játszhat a GSH kínálat növekedése a májban, AsIII-triglutationt szállító karrier fokozott expressziója a májsejtek epekanalikuláris membránjában, valamint még nem azonosított AsV reduktáz(ok) indukciója (Gregus et al., 2004). E vizsgálatainkat még csak kivonat formájában közöltük, mert további kísérleteket tervezünk a FB-indukált változások mechanizmusának alátámasztására (pl. az arzén metabolizmusban szerepet játszó transzporterek és enzimek expressziójának mérése). Csanaky Iván jelenleg e módszerek alkalmazását sajátítja el USA-beli tanulmányútján, részben abból a célból is, hogy hazatérése után a fentebb ismertetett munkánkat kiegészítsük.

Ad 2.

Előző OTKA támogatásunk (T029549) zárójelentésében beszámoltunk arról, hogy a purin-nukleozid-foszforiláz (PNP) gyorsan redukálja az AsV-ot AsIII-té *in vitro* inozin és megfelelő ditiol jelenlétében. A redukció az inozinnak a PNP által katalizált „arzenolitikus” hasítása során megy végbe, és azt a specifikus PNP gátló BCX-1777 (1 μ M) teljesen gátolja. Felmerült a kérdés, hogy van-e szerepe a PNP-nak az AsV *in vivo* redukciójában. E kérdés megválaszolására a következő két megközelítést használtuk. (1) Mivel az emberi vörösvértettek (vvt) magas PNP aktivitással bírnak, meghatároztuk, hogy olyan vegyületek, amelyek a tiszta PNP által katalizált AsV redukciót jelentősen befolyásolták (nukleozidok, tiolok, amelyek fokozták, valamint PNP gátlók, amelyek gátolták), milyen hatással vannak az AsV redukciójára mosott emberi vörösvértettekben (vvt). Megállapítottuk, hogy a vvt-k redukálják az AsV-ot, és ezt a folyamatot inozin vagy inozin + ditiotreitol (DTT) jelentősen fokozza. Az inozin + DTT által a fokozott AsIII képződés PNP-függő volt, ugyanis PNP gátlók erősen gátolták a stimulációt. Ezzel szemben a PNP gátlók gyakorlatilag nem befolyásolták a redukció sebességét, ha az inkubáló médium nem tartalmazott kívülről hozzáadott inozint. Ez arra utal, hogy a vvt alap AsV redukáló aktivitása független a PNP-től. (2) Megvizsgáltuk továbbá, hogyan befolyásolja a specifikus PNP gátló BCX-1777 az AsV szervezetben való sorsát kontroll és DTT-vel kezelt patkányokban. A kérdés az volt, hogy a

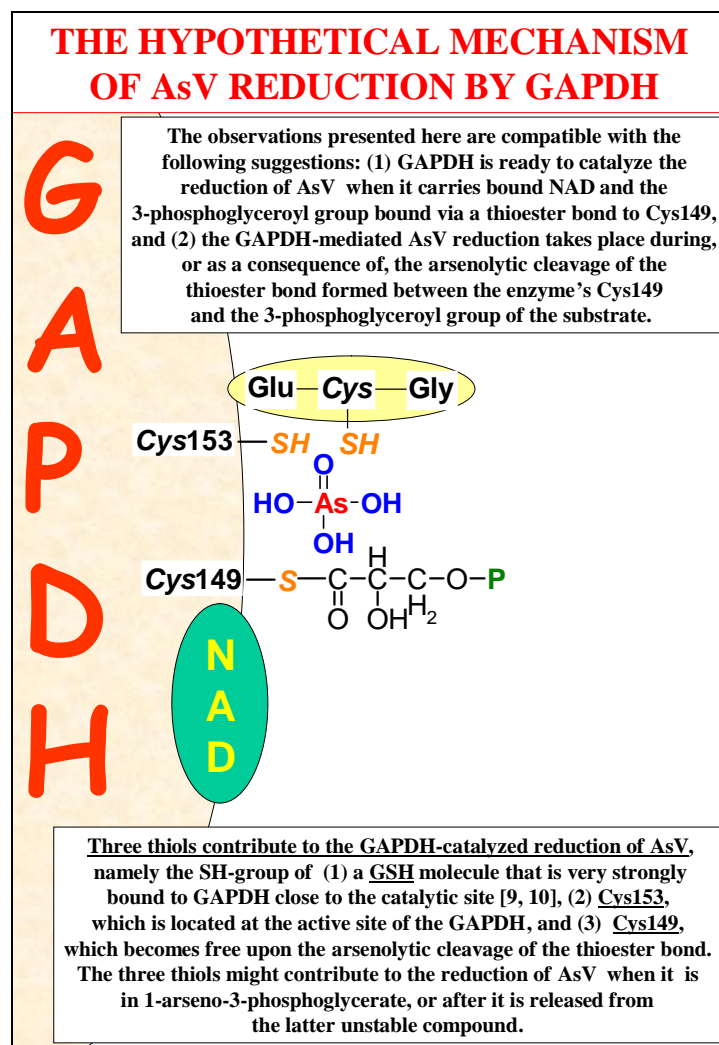
patkányoknak iv adott BCX-1777 gátolja-e a PNP-t *in vivo*, és csökkenti-e az iv. injektált AsV-ból képződő AsIII és a metilált AsIII metabolitok mennyiségét az epében és a szövetekben. Igazoltuk, hogy a BCX-1777 valóban megszüntette a PNP enzimaktivitását a patkányok májában. Ezzel szemben ez a kezelés nem befolyásolta sem az AsIII, sem a monometilarzenit epével történő kiválasztását, sem pedig az AsV és metabolitjainak szöveti koncentrációit egyik csoportban sem a BCX-1777-tel nem kezelt állatokhoz képest. Ebből arra következtetünk, hogy annak ellenére, hogy a PNP képes az AsV redukciót katalizálni *in vitro*, a PNP nem játszik lényeges szerepet az AsV redukciójában, sem emberi vvt-ben, sem patkányban *in vivo*. (Németi et al., 2003).

Emberi vörösvértesteken végzett kísérleteink szerint (lásd feljebb), a vvt-kben legalább két AsV redukáló mechanizmus van. Az egyik a PNP enzim, amely - úgy tűnik - csak arteficiális körülmények között (exogén inozin és ditiol jelenlétében) működik AsV reduktázként. A másik egy eddig ismeretlen mechanizmus, amely azonban az „alap” (exogén stimulánsok nélküli) aktivitás döntő részéért felelős. Noha a vvt-k AsV redukáló szerepe vélhetően mennyiségileg elhanyagolható *in vivo*, e sejtek viszonylag egyszerű anyagcserével bírnak, ami megkönnyítheti a bennük zajló AsV redukció biokémiai jellemzését és az *in vivo* releváns AsV reduktáz(ok) azonosítását. Ezért további kutatásokat folytattunk azzal a céllal, hogy azonosítsuk azt a mechanizmust, amely a vvt-k „alap” AsV redukáló aktivitásáért felelős. Eredményeink a következő megállapításokhoz vezettek: (1). A vvt-k alap (PNP-től független) AsV reduktáz aktivitása glutation (GSH) függő, mert ezt az aktivitást a sejtek GSH tartalmát kimerítő dietil-maleát (DEM) erősen gátolta. (2). Az AsV reduktáz aktivitás a NAD(P) ellátottságtól is függ, mivel a celluláris NAD(P)H-t NAD(P)-vé oxidáló ágensek (piruvát, ferricianid, metilénkék, nitrit, *t*-butilhidroperoxid, dehidroaszkorbinsav, 4-dimetilaminofenol) erősen fokozták az AsIII képződést. Ez a fokozódás független a PNP-től, mert az enzim gátlása nem befolyásolta, de GSH-függő, mert DEM gátolta. (3). Piruvát előinikubáció, amely a celluláris glükózt depletálja, és emeli a NAD koncentrációját a NADH koncentráció rovására, fokozta a redukciót. Ez arra utal, hogy a redukció nemcsak a NAD jelenlétét igényli, hanem az alsó glikolitikus apparátus működését is a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáztól (GAPDH) kezdődően. Glükóz depléción után ugyanis a GAPDH-t megelőző enzimek szubsztráthiányosak, míg a GAPDH és az utána következő enzimek számára a 2,3-biszfoszfoglicerát lebontása továbbra is biztosítja a szubsztrát ellátást. (4). A fluorid, amely gátolja a glikolízis enoláz enzimjét, gátolta az AsV redukciót olyan vvt-kben, amelyek glükóz ellátása zavartalan volt, míg fokozta az AsIII képződést piruváttal glükózhányossá (és NAD-ban gazdaggá) tett szuszpenzióban. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a redukcióért felelős enzim a glikolízis enoláz előtti szakaszán lehet. A vvt-kben zajló AsV redukció tehát GSH és NAD (vagy NADP) jelenlétét igényli. Következtetésünket igazolja, hogy a hemolizátum AsV redukáló aktivitását GSH és NAD hozzáadása jelentősen fokozta. Összefoglalva, az arteficiális PNP-függő AsV redukció mellett az emberi vvt-kben van egy másik, PNP-független mechanizmus is, amely GSH-t, valamint NAD-ot és/vagy NADP-t igényel. A redukcióért felelős enzim a glikolízis GAPDH és enoláz közötti szakaszán keresendő (Németi and Gregus, 2004).

Annak érdekében, hogy részletesebben jellemezzük az intakt vvt-kben talált PNP-független AsV redukáló aktivitást (lásd feljebb), megvizsgáltuk, hogy BCX-1777 (PNP gátló) jelenlétében kimutatható-e AsV redukáló aktivitás a vvt lizátumában és patkánymáj citoszólban, és ha igen, akkor hogyan befolyásolható ez a PNP-független AsV redukció a GSH, a glikolitikus szubsztrátok, valamint adenin és piridin nukleotidok hozzáadására.

Célunk az volt, hogy az AsV redukció jellemzőiből következtethessünk arra, hogy vajon melyik enzim katalizálhatja a folyamatot. Megállapítottuk, hogy mind a hemolizátum, mind pedig a patkánymáj citoszól PNP-független AsV redukáló aktivitással bír, amelyet GSH koncentrációtól függő módon növel. Glikolitikus szubsztrátok, főleg a fruktóz-1,6-biszfoszfát és a foszfoglicerátok, jelentősen fokozták az AsV átalakulását AsIII-té. A NAD, különösen az előbbi szubsztrátok jelenlétében, igen erősen emelte a redukciós aktivitást, míg az adenin nukleotidok (AMP, ADP és ATP) gyenge gátló hatást mutattak. A hemolizátum AsV-reduktáz aktivitását a NADH erősen gátolta, míg a citoszólét alig befolyásolta. A NADP és a NADPH gyenge gátlónak bizonyultak a hemolizátumban, a citoszólban azonban jelentősen (noha a NAD hatásánál gyengébben) fokozták az AsV redukcióját. Ismert, hogy a 2-foszfoglikolát stimulálja a vvt-ben igen nagy mennyiségben levő (a májban pedig csak nyomokban előforduló) 2,3-biszfoszfoglicerát lebontását 3-foszfogliceráttá, amely a glikolízist táplálja. A 2-foszfoglikolát a hemolizátum AsV redukáló aktivitását megkétszerezte, míg a citoszólét gyengén gátolta. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a PNP-től független AsV-reduktáz aktivitás nemcsak intakt emberi vvt-ben van jelen, hanem hemolizátumban és patkánymáj citoszólban is. Ez az enzimatis aktivitás GSH-t, NAD-ot és glikolitikus szubsztrátot igényel. Az eredmények alapján valószínűsítettük, hogy a funkcionálisan kapcsolt glikolitikus enzimpár, a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz és a foszfoglicerát-kináz egyik vagy mindkét tagja részt vesz az AsV redukációjában. (Németi and Gregus, 2005).

A fenti megfigyeléseink alapján felállított hipotézisünket, miszerint a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) és/vagy a foszfoglicerát-kináz (PGK) katalizálja az AsV redukcióját intakt emberi vörösvértestekben, hemolizátumban, és patkány máj-citoszólban, tiszta GAPDH és PGK enzimek vizsgálatával teszteltük. Megállapítottuk, hogy a tisztított GAPDH és PGK keveréke valóban katalizálja az AsV redukcióját, feltéve, hogy GSH, NAD és glikolitikus szubsztrát van jelen. További analízis feltárta, hogy ténylegesen a GAPDH bír AsV-reduktáz aktivitással; a PGK pusztán egy segédenzim, amely csak akkor támogatja az AsV redukcióját, amikor 3-foszfoglicerát a glikolitikus szubsztrát. A GAPDH-katalizált AsV redukció GSH, NAD és glicerinaldehid-3-foszfát jelenlétét igényelte. Az ADP és ATP mérsékelten, a NADH pedig erősen gátolta az enzim AsV-reduktáz aktivitását NAD jelenlétében. A koninginsav (KS) – a GAPDH specifikus irreverzibilis inhibitora – koncentráció-függő módon egyaránt gátolta a GAPDH klasszikus enzimaktivitását és AsV-redukáló aktivitását. Hogy meghatározzuk a GAPDH részeseését a hemolizátumban, a patkány máj-citoszólban, valamint az intakt vvt-kben végbemenő AsV redukcióban, megvizsgáltuk a KS koncentráció-függő hatását e sejtek, ill. sejt kivonatok AsV-redukáló aktivitására. A GAPDH inaktiválása KS-val gyakorlatilag megszüntette az AsV-redukáló aktivitást az intakt vvt-kben, valamint az olyan hemolizátumban és a máj-citoszólban is, amelyben a GAPDH részére bőségesen biztosítottunk NAD és glikolitikus szubsztrát kínálatot. Exogén NAD és glikolitikus szubsztrát hiányában azonban a máj-citoszólban jelentékeny AsV-redukáló aktivitás maradt akkor is, amikor a GAPDH-t teljesen inaktiváltuk KS-val. Ez arra utal, hogy a GAPDH mellett más citoszólbeli enzim(ek) is hozzájárulhat(nak) az AsV redukációjához a májban (Gregus and Németi, 2005). Összefoglalva: a glikolízisben kulcsfontosságú enzim, a GAPDH, képes katalizálni az AsV redukcióját AsIII-té, ha GSH, NAD és glikolitikus szubsztrát van jelen. Az AsV redukciója valószínűleg annak a tioészter kötésnek az arzenolitikus hasítása során (vagy következtében) megy végbe, amely az enzim 149-es ciszteinje és a szubsztrát 3-foszfogliceroil maradványa között alakul ki (lásd lejjebb az e munkánkat bemutató poszter ábráját). Bár a GAPDH egyedül felelős az AsV redukációjáért emberi eritrocitákban, *in vivo* szerepe az AsV redukációjában még nem volt igazolt.



Bár a GAPDH egyedül felelős az AsV redukciójáért emberi eritrocitákban, *in vivo* szerepe az AsV redukciójában továbbra is kérdéses volt. Ennek vizsgálatára kísérletet terveztünk olyan patkányokon, amelyeket S- α -klorohidrinrel (ACH) előkezeltünk. Az ACH-ről ismert, hogy a májban oxidálódik 3-klorolaktaldehyddé, amely inaktíválja a GAPDH-t. Kimutattuk, hogy 3 órás ACH előkezelés után a patkánymáj citoszólban mind a GAPDH, mind az AsV-reduktáz aktivitás jelentősen csökken, kisebb mértékben csökkennek ezek az aktivitások a vesében, az izomban azonban változatlanok maradnak. Külön kísérletben vizsgáltuk, hogy élő patkányok előkezelése ACH-nel hogyan befolyásolja az iv adott AsV biotranszformációját. Azt találtuk, hogy az állatok vérében sem az AsV, sem pedig az AsIII koncentrációja nem változott lényegesen az előkezelés hatására, míg a metilezett arzén metabolitoké jelentősen csökkent. Az AsV és metabolitjainak szöveti koncentrációit vizsgálva szignifikáns eltérést csak a májban találtunk, vagyis abban a szervben, ahol az ACH-ből a GAPDH-t inaktíváló metabolit keletkezik. Az ACH-val előkezelt patkányok májában az AsV koncentrációja megemelkedett, míg a metilezett metabolitok koncentrációja csökkent. A legszembetűnőbb változást a májban az AsV metabolitjainak AsV-hoz viszonyított arányában tapasztaltuk. Ez az arány a GAPDH gátlását eredményező ACH előkezelés hatására igen jelentősen csökkent. Eredményeink alapján valószínű, hogy a GAPDH *in vivo* is részt vesz az AsV redukciójában. Összefoglalva: a GAPDH nemcsak *in vitro* képes redukálni az AsV-ot a sokkal mérgezőbb AsIII-té, hanem valószínűleg *in vivo* is (Németi et al., 2006).

SZEMÉLYI VÁLTOZÁSOK Két változás történt a négytagú pályázó kutató-csoport összetételében a támogatási periódus alatt. A támogatási periódus első évében közlekedési baleset áldozata lett *Dr. Kispál Gyula* egyetemi tanár (PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézete), akiben egy igen nagy tudású, mindig segítőkész kollégát veszítettünk el. 2005 márciusától *Dr. Csanaky Iván* (2006 óta egyetemi adjunktus) tanulmányúton tartózkodik Curtis D. Klaassen professzor laboratóriumában (Department of Pharmacology and Toxicology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS), azzal a céllal, hogy az ott végzett kutatómunka kapcsán tudást és jártasságot szerezzen, amelyet hazatérése után további kutatásainkban hasznosítani fog. Természetesen mindkét változás negatívan érintette a pályázati periódusban nyújtott teljesítményünket.

KÖZLEMÉNYEK

1. Csanaky, I., Németi, B. and Gregus, Z.: Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats – Not S-adenosylmethionine depletion impairs arsenic methylation at high dose. *Toxicology* 183: 77-91, 2003. (IF=2.061, Független idézet: 10)
2. Németi, B., Csanaky, I. and Gregus, Z.: Arsenate reduction in human erythrocytes and rats – Testing the role of purine nucleoside phosphorylase. *Toxicol. Sci.* 74: 22-31, 2003. (IF=3.067, Független idézet: 15)
3. Németi, B. and Gregus, Z.: Glutathione-dependent reduction of arsenate in human erythrocytes – a process independent of purine nucleoside phosphorylase. *Toxicol. Sci.* 82: 419-428, 2004. (IF=3.391, Független idézet: 6)
4. Gregus, Z., Csanaky, I. and Németi, B.: Effect of phenobarbital on the disposition of arsenate and arsenite in rats. 10th International Congress of Toxicology, Tampere, 2004. (Poster). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 197: 192, 2004. (Abstract)
5. Csanaky, I. and Gregus, Z.: Role of glutathione in reduction of arsenate and of γ -glutamyltranspeptidase in disposition of arsenite in rats. *Toxicology* 207: 91-104, 2005. (IF=2.584, Független idézet: 3)
6. Németi, B. and Gregus, Z.: Reduction of arsenate to arsenite by human erythrocyte lysate and rat liver cytosol – characterization of a glutathione- and NAD-dependent arsenate reduction linked to glycolysis. *Toxicol. Sci.* 85: 847-858, 2005. (IF=3.088, Független idézet: 4)
7. Gregus, Z. and Németi, B.: The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase works as an arsenate reductase in human red blood cells and rat liver cytosol. *Toxicol. Sci.* 85: 859-869, 2005. (IF=3.088, Független idézet: 6)
8. Németi, B., Csanaky, I. and Gregus, Z.: Effect of an inactivator of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a fortuitous arsenate reductase, on disposition of arsenate in rats. *Toxicol. Sci.* 90: 49-60, 2006. (IF=3.088, Független idézet: 1)

Megjegyzés: A Háttér és az Előtanulmányok alatt hivatkozott közlemények adatait nem adtuk meg. Szükség esetén ezek azonosíthatók a PubMed adatbázisban.

PhD DISSZERTÁCIÓ

Dr. Csanaky Iván:

Az arzenát és arzenit biotranszformációja - metilált arzénmetabolitok képződése és kiválasztása kísérleti állatokban

Védés éve: 2003

Az értekezés alapját képező impaktképes folyóirat-cikkek száma: 5
Az értekezés alapját képező folyóirat-cikkek össz-IF értéke: 10,196

Dr. Németi Balázs:

Reduction of arsenate to arsenite - biochemical background of a toxification process

Védés éve: 2006

Az értekezés alapját képező impaktképes folyóirat-cikkek száma: 8

Az értekezés alapját képező folyóirat-cikkek össz-IF értéke: 26,358

ELŐADÁSOK, POSZTEREK

A támogatási periódusban hazai magyar nyelvű konferenciákon 8, nemzetközi konferenciákon szintén 8 előadást vagy posztert mutattunk be a pályázat témájából.