

## 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.

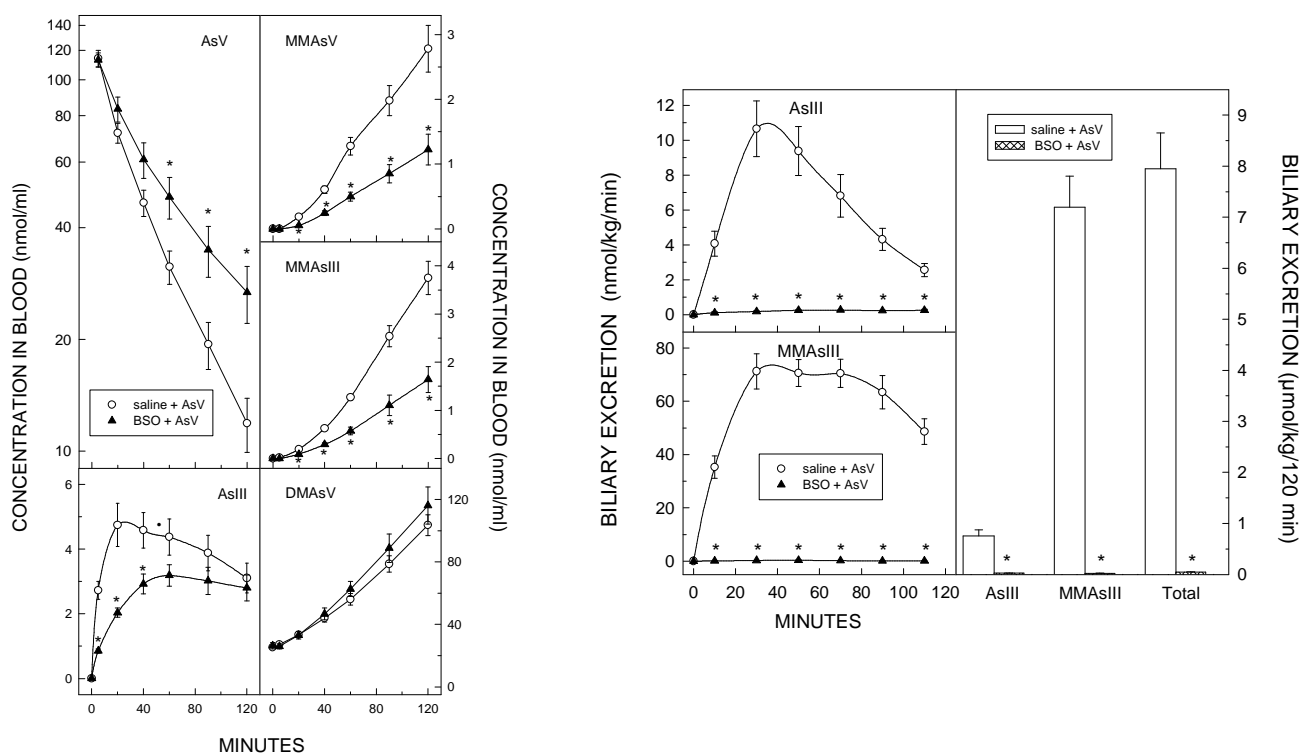
**EREDMÉNYEK.** Kutatásaink két fő témában folytak: **1.** A szervetlen arzénvegyületek (AsV és AsIII) *in vivo* sorsát (biotranszformációját és exkrécióját) befolyásoló tényezők vizsgálata. **2.** Az AsV redukciójáért felelős enzimek azonosítása, *in vivo* szerepük elemzése. Kísérleteinkben az AsV-ot, 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<sub>III</sub> a legtoxikusabbnak tartott arzén metabolit, míg az ezt követő lépésben képződő DMA<sub>V</sub> 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 µmol/kg-ról 50, illetve 125 µmol/kg-ra történt emelésével. Ezzel szemben a metilált metabolitok (MMA<sub>III</sub>, MMA<sub>V</sub>, DMA<sub>V</sub>) 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<sub>III</sub>, 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<sub>V</sub>, MMA<sub>III</sub>, DMA<sub>V</sub>) 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-sulfoximin (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<sub>III</sub> epével való kiválasztását is szinte teljesen megszüntette (2. ábra), a MMA<sub>III</sub> és MMA<sub>V</sub> 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  $\gamma$ -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%), mérsékelten 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  $\mu$ 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 vörösvértestek (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 vörösvértestekben (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

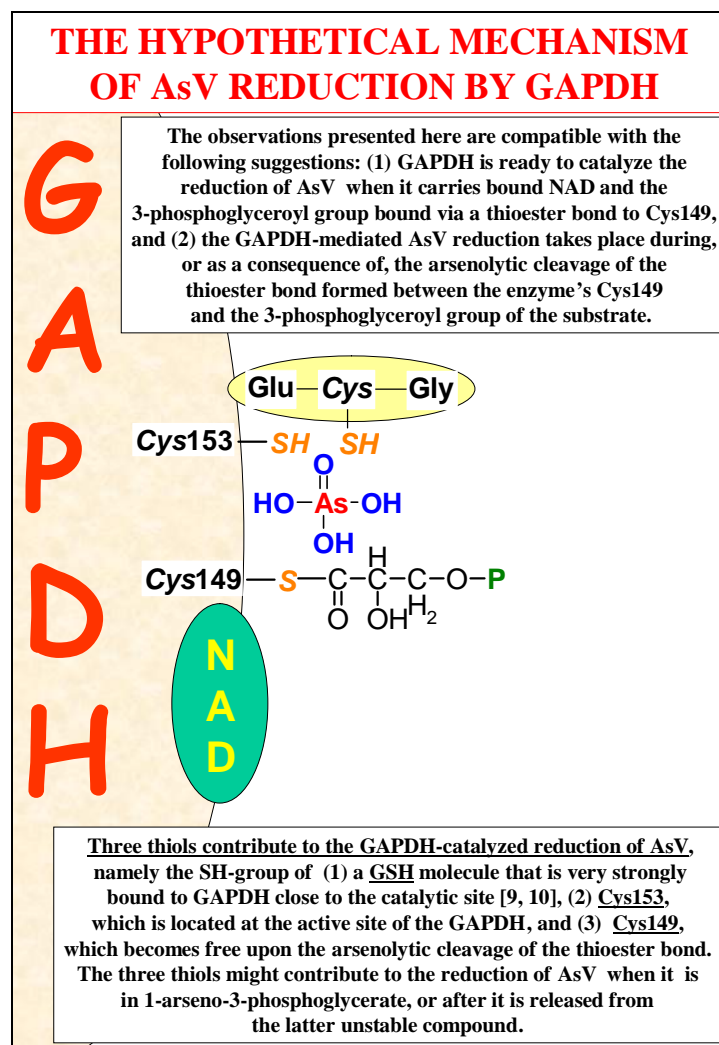
patkányoknak iv adott BCX-1777 gátolja-e a PNP-t *in vivo*, és csökkenti-e az iv. injektált AsV-ból képződő AsIII és a metilált AsIII metabolitok mennyiségét az epében és a szövetekben. Igazoltuk, hogy a BCX-1777 valóban megszüntette a PNP enzimaktivitását a patkányok májában. Ezzel szemben ez a kezelés 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, dehidroaszorbinsav, 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 enzimaktivitás GSH-t, NAD-ot és glikolitikus szubsztrátot igényel. Az eredmények alapján valószínűsítettük, hogy a funkcionálisan kapcsolt glikolitikus enzimpár, a gliceraldehid-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 gliceraldehid-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 gliceraldehid-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 szubsztrátkínálatot. 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- $\alpha$ -klorohidrinnel (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 *in vivo* 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. 10<sup>th</sup> 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  $\gamma$ -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.