

**ARZÉN, SZELÉN ÉS ROKON FÉLFÉMEK KIVÁLASZTÁSA AZ  
EPÉVEL - KÖLCSÖNHATÁSUK A GLUTATIONNAL ÉS  
EGYMÁSSAL**

***DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS***

**Akkreditált PhD program:           POTE A-144, TOXIKOLÓGIA**  
**Program- és témavezető:           Prof Dr Gregus Zoltán DABT**

**GYURASICS ÁGNES DR**

**Pécsi Orvostudományi Egyetem  
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézete**

**Pécs, 1998**

## TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések, kulcsszavak	3
Bevezetés	4
A kutatás fő céljai	6
Eredmények	7
I. Kapcsolat az arzén és a glutation epével való kiválasztódása között (1-3. közlemény)	7
II. Kapcsolat az antimon és a bizmut, valamint a glutation epével való kiválasztása között (4. közlemény)	13
III. A szelén és az Va csoport elemeinek kölcsönhatása az epével való kiválasztásukban (5. közlemény)	17
IV. A glutation és a metiláció szerepe a szelén biliáris exkréciójában (6. közlemény)	25
V. Miért fokozza a brómszulfalein a szelén epével való kiválasztását? (7. közlemény)	29
Összefoglalás	33
Megfigyeléseink jelentőségéről	34
Irodalomjegyzék	
Saját közlemények	36
Felhasznált irodalom	37
Kongresszusi előadások és poszterbemutatók az értekezéshez kapcsolódó eredményekről	41

## **KULCSSZAVAK:**

arzenit, arzenát, szelén, antimon, bizmut

glutation, non-protein tiol, glutation-konjugátum

biliáris exkréción

higany, metilhigany, cink, kadmium

brómszulfalein, indocianinzöld, dietilmaleát, butionin szulfoximin

metiláció, perjodát oxidált adenzin, etionin

## **RÖVIDÍTÉSEK, VEGYJELEK:**

arzen (As), arzenit (AsIII), arzenát (AsV), antimon (Sb), bizmut (Bi)

glutation (GSH), non-protein tiol (NPSH), cisztein (Cys), ciszteinil-glicin (Cys-Gly)

brómszulfalein (BSP), indocianinzöld (ICG), dibrómszulfalein (DBSP)

BSP-GSH konjugátum (BSP-GSH)

dietilmaleát (DEM), butionin-szulfoximin (BSO)

perjodát oxidált adenzin (PAD)

szelenodiglutation (GS-Se-SG), glutation-szelenoperszulfid (GS-Se-H)

hidrogénszelenid (H-Se-H), metilszelenol (CH<sub>3</sub>-Se-H)

trimetilszelenónium ion [CH<sub>3</sub>-Se<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

## BEVEZETÉS

Az arzén évezredek óta ismert toxikus félfém s neve a méreg szó szinonimájaként él ma is a köztudatban, habár ugyanolyan régóta használják gyógyításra is (Frost 1967, Jolliffe 1993). A Salvarsan révén a századelőn a hírhedt elem egycsapásra nélkülözhetetlen gyógyszerre vált a treponemafertőzések gyógyításában, egészen a kevésbé toxikus penicillin megjelenéséig. Habár sok az ellentmondás, manapság egyre több bizonyítékunk van az arzén karcinogenitására (Chan and Huff 1997). A periódusos rendszer Va oszlopában az arzén alatt található – ezért az arzénhoz hasonló tulajdonságokkal is rendelkező – antimon és bizmut szintén régóta ismert elemek. A kórokozók elleni terápia régen szegényes palettáján már évszázadok óta ott szerepeltek, de a szűk terápiás szélesség ill. toxicitás miatt mindkét elem háttérbe szorult. Ma ismét ott találjuk őket a gyógyszerkészletünkben az arzénnal együtt, új, specifikus indikációkkal. Az álomkór központi idegrendszeri formájának szinte egyetlen gyógyszere a szerves arzénvegyület melarsoprol, s régóta tudjuk, sőt a gyakorlatban ki is használják, hogy bizonyos leukémiák jól reagálnak szerves (arzenit) és szerves (melarsoprol) arzénvegyületekre (Chen et al 1997, König et al 1997, Zhu et al 1997). A szerves antimon-vegyület glucantim a leishmaniasis terápiájának sarokköve (Berman 1988), a bizmut pedig szinte forradalmian új terápiás szemléletet hozott a *Helicobacter pylori* okozta tápcsatornabetegségek kezelésében (Forbes et al 1994, Blecker and Gold 1997).

A periódusos rendszerben az arzén után következő elem, a szelén csak 1817 óta ismert; toxicitására, majd esszenciális elem voltára pedig nem régen, századunk második harmadában derült fény (Frost 1960, Diplock 1976, Magee and James 1996). Ma már egyre több adatunk van arról, hogy a glutation peroxidáz (Rotruck et al 1973) mellett több más kulcsfontosságú (főleg antioxidáns funkciójú) enzim prosztetikus csoportja a szelenocisztein, s állatkísérletes, epidemiológiai, és klinikai vizsgálatok szólnak amellet, hogy a szelénnek szerepe lehet bizonyos daganatok kifejlődésének a gátlásában is (Spallholz 1994, Clark LC et al 1996). A szelén terápiás szélessége kicsi, s a talaj szeléntartalmától függően jellegzetes hiánybetegségek (máj-, izomdegeneráció, fatális gyermekkori kardiomiopátia,

megnövekedett daganatelőfordulás), ill. bőr- és neurológiai tünetekkel járó szelénintoxikáció alakulhat ki az emberen és a háziállatokon (Spallholz 1994). A mostanában divatos táplálékkiegészítők véletlen vagy tudatlanságból fakadó túladagolás révén szelénintoxikáció forrásai lehetnek (Clark RF et al 1996). Nem csoda, ha a kutatások és a közvélemény érdeklődésének középpontjába került napjainkra ez a sokarcú félfém (Bopp et al 1982, Rayman 1997).

Az As és a periódusos rendszerben vele egy oszlopban lévő Sb és Bi, valamint az As melletti Se egymáshoz viszonyított helyzetükből adódóan is több hasonló kémiai tulajdonsággal rendelkeznek. Mind a négy elem több vegyértékű formában fordul elő vegyületeiben a környezetünkben. Az Va oszlop félfémeinek három vegyértékű formái valamint a szelenit tiol-reaktívak (Squibb and Fowler 1983, Winship 1987, Winship 1983, Ganther 1986). A tripeptid glutation (GSH, gamma-glutamil-ciszteinil-glicin) a szervezetben előforduló legfontosabb non-protein tiol (NPSH) (Kaplowitz et al 1985). Kulcsszerepet játszik számos elektrofil exogén vegyület, mint pl. az etakrinsav és a brómszulfalein (BSP), vagy biotranszformáció révén elektrofillá váló xenobiotikum, mint a gyógyszer paracetamol és a magas élelmiszereinket fertőző *Aspergillus* gombákból származó, májrákot okozó aflatoxin, továbbá a szintén elektrofil fémionok mint a Hg, Cd, metil higany, valamint több endogén vegyület metabolizmusában, eliminálásában, ezáltal detoxifikálásában is (Ballatori 1994). A frissen szintetizált GSH a májból részben más szövetekhez kerül a vérárammal, részben kiválsztódik az epébe. Az epébe kiválsztódott glutation szubsztrátja a hepatociták kanalikuláris felszínén elhelyezkedő  $\gamma$ -glutamil transzpeptidáznak, így ott részben alkotóelemeire bomlik. A GSH és tiol-csoportot tartalmazó degradációs termékei (ciszteinil-glicin és cisztein) alkotják a non-protein tiolokat (NPSH). Elektrofil vegyületek GSH konjugátumai szintén az epével ürülnek (Kaplowitz et al 1985, Gregus és Varga 1985).

Az arzén és vele rokon félfémek tiolreaktivitásuknál fogva a szervezetben kapcsolatba kerülhetnek a glutationnal, így egyrészt sorsukat befolyásolhatják a GSH-homeosztázis változásai, másrészt interferálhatnak GSH-függő anyagserefoyamatokkal. Ezek az terápiás, toxikológiai és a Se esetében

bizonyítottan élettani szempontokból is fontos metalloidok az epével is kiválasztódnak, biliáris exkréciójuk mechanizmusa és abban a GSH szerepe azonban vizsgálataink kezdetéig ismeretlen volt. Mivel a fenti félfémek tiol-reaktív formái a GSH-val reagálhatnak (Scott et al, 1993, Winship 1983, Winship 1987, Ganther 1986), és a GSH is jelentős mértékben ürül az epébe (Ballatori and Clarkson 1985, Kaplowitz et al 1985), ezek a körülmények befolyásolhatják mind a félfémek, mind az endogén GSH biliáris exkrécióját, valamint számos exogén vegyület GSH-függő biotranszformációját, eliminációját, ezáltal módosíthatják élettani, terápiás vagy toxikus hatását.

## **A KUTATÁS FŐ CÉLJAI**

A dolgozatban ismertetett kísérletsorozatot úgy terveztük, hogy választ kaphassunk a következő kérdésekre:

1. Milyen mértékben választódik ki az arzén, az antimon, a bizmut, valamint a szelén az epébe?
2. Befolyásolja-e a hepatikus GSH-kínálat csökkenése a vizsgált félfémek epével való kiválasztódását?
3. Befolyásolják-e a hepatobiliáris GSH transzport gátlói a fenti fémek epével való kiválasztódását? Mivel a szelén biliáris exkrécióját a GSH hepatobiliáris transzportját gátló brómszulfalein paradox módon jelentősen fokozta, ezen váratlan jelenség molekuláris mechanizmusára is kerestünk magyarázatot.
4. Hat-e az As, Sb, Bi és a Se a glutation epével való kiválasztására?
5. A periódusos rendszer Va csoportjának elemei (As, Sb, Bi) és a VIa csoportba tartozó Se befolyásolják-e egymás, illetve a GSH epével való ürülését?

## EREDMÉNYEK

Eredményeimet öt téma köré csoportosítottam. Ezeken belül röviden taglalom a téma irodalmi előzményeit, a célkitűzéseket, az alkalmazott állatkísérletes és analitikai módszereket, végül az eredményeket és azok tömör diszkusszióját. Az olvasó további részleteket találhat a közleményeim csatolt másolatában. Ezen közleményeket megjelenésük sorrendjében számoztam (l. 36. oldal), a továbbiakban ezekre a sorszámaikkal hivatkozom.

### **I. Kapcsolat az arzén és a glutation epével való kiválasztódása között (1-3. közlemény)**

#### Előzmények

Az arzén a természetben túlnyomórészt öt vegyértékű arzenátként (AsV), kisebb részben három vegyértékű arzenitként (AsIII) fordul elő vegyületeiben. A mérgezőbb arzenit tiol-reaktív, míg a kevésbé toxikus öt vegyértékű forma a foszfátot helyettesítheti (Frost 1967, Squibb and Fowler 1983). Az arzenát a szervezetben részben arzenitté redukálódik (Lerman and Clarkson 1983). A szervesetlen arzén kiválasztásának egyik fő útja az epe (Gregus and Klaassen 1986). Számos fémion (pl. a higany, ólom, réz, kadmium, cink) legalább részben GSH-komplekként ürül az epével, ezért kiválasztásukat lassítja a hepatikus GSH kínálat csökkenése (Ballatori 1994). E fémek biliáris exkrécióját a hepatobiliáris GSH-transzport inhibitorai (pl. BSP, indocianinzöld) is gátolják (Ballatori and Clarkson 1985). Ezzel szemben az arzén biliáris exkréciójának mechanizmusa, a hepatikus GSH-kínálat ill. a hepatobiliáris GSH-transzport jelentősége ezen metalloid epével való ürülésében az alábbi vizsgálataink előtt teljességgel ismeretlen volt. Ismert volt viszont, hogy az arzenit jelentősen növeli a GSH epével való kiválasztását izolált perfundált patkánymájdon (Anundi et al 1982), de az nem volt világos, hogy mi ennek a jelenségnek a mechanizmusa, összefügg-e az arzén epével való exkréciójával és *in vivo* is kimutatható-e.

## Célkitűzés

A fenti előzmények alapján felmerültek a következő kérdések:

1. Milyen sebességgel választódik ki az arzén az epével három ill. öt vegyértékű szervesetlen arzén adása után?
2. Befolyásolja-e a GSH-kínálat csökkenése (GSH-depléción) és a hepatobiliáris GSH-transzport gátlása az arzén epével való kiválasztását arzenit ill. arzenát adása után?
3. Fokozza-e az arzenit *in vivo* is a GSH, illetve a non-protein tiolok (NPSH) epével való kiválasztását? Hogyan hat az arzenát a GSH és az NPSH biliáris exkréciójára? Változik-e az epetermelés üteme arzénhatásban?
4. Van-e idő- és mértékbeli összefüggés az arzén biliáris exkréciója és az arzén által indukált NPSH kiválasztás között kontroll, GSH-deplétórral vagy GSH-transzport gátlóval kezelt patkányokban?
5. Befolyásolja-e az arzén a máj GSH-tartalmát, valamint más - az epébe részben GSH-konjugátumként ürülő - testidegen vegyületek (BSP, fémionok) biliáris exkrécióját?

## Módszerek

Altatott Wistar patkányok epevezetékét megkanüláltuk, majd az állatoknak (esetenként  $^{74}\text{As}$ -jelzett) nátrium-arzenitet (25-100  $\mu\text{mol/kg}$  iv) ill. nátrium-arzenátot (75-300  $\mu\text{mol/kg}$  iv) injektáltunk. Az epét 6x20 percig gyűjtöttük 4%-os, jégen tartott metafoszforsavba, a kiválasztódott GSH oxidációjának kivédésére. Az epével ürült radioaktívan jelzett arzént gamma-számlálóval mértük. A non-protein tiolokat (NPSH) Sedlak és Lindsay (1968), az össz-GSH-t Tietze (1969) szerint határoztuk meg. A máj GSH-tartalmát dietilmaleát (DEM) előkezeléssel depletáltuk (Plummer et al 1981). A GSH hepatobiliáris transzportját indocianinzölddel (ICG) ill. BSP-vel gátoltuk (Gregus and Varga 1985, Gregus et al 1979). A BSP-t, a [ $^{203}\text{Hg}$ ]-higanykloridot, a [ $^{203}\text{Hg}$ ]-metilhiganyt, a [ $^{109}\text{Cd}$ ]-kadmiumkloridot ill. a [ $^{65}\text{Zn}$ ]-cink-kloridot az arzénvegyületet követően injektáltuk. Az epébe kiválasztódott BSP-t és annak GSH-konjugátumát papírkromatográfiával



választottuk szét és fotometriásan (Whelan et al 1970), a fémeket pedig gamma-számlálóval mértük.

### Eredmények és megbeszélés

#### *Az arzén kiválasztása az epébe*

Az arzén biliáris exkréciójának kinetikája függött attól, hogy három vagy öt vegyértékű arzénnal kezeltük az állatokat. Arzenit 50  $\mu\text{mol/kg}$  ill. arzenát 150  $\mu\text{mol/kg}$  dózisának iv adása után két óra alatt az injektált arzenit közel 20%-a, míg az arzenát 6%-a transzportálódott az epébe (2/4, 2/5. és 3/2. ábra). Az arzenit-injektált állatokban az arzén maximális kiválasztódási sebessége kétszerese volt az arzenát-injektált állatokban mért értéknek (290 ill. 130  $\text{nmol/kg}\cdot\text{min}$ ), s ez utóbbiakban időben is később jelentkezett, s elhúzódóbb volt az arzén csúcskiválasztása.

#### *A hepaticus GSH-deplécio és a hepatobiliáris GSH-transzport gátlásának hatása az arzén biliáris exkréciójára*

A máj GSH-tartalmát depletáló DEM, valamint a GSH hepatobiliáris transzportját gátló BSP ill. ICG gátolta az arzén kiválasztását (3/2. ábra). DEM-előkezelés 90-95%-kal csökkentette az arzén biliáris exkrécióját mind arzenit- mind arzenát-injektált patkányokban. Az ICG tartósan, a BSP pedig átmenetileg gátolta az arzén biliáris exkrécióját arzenit és arzenát injekciója után egyaránt. Tehát a GSH hepaticus kínálata alapvetően meghatározza az arzén epével való kiválasztásának sebességét. Eredményeink azt is sugallják, hogy az arzén hepatobiliáris transzportjában szerepet játszhatnak a BSP-vel ill. ICG-vel gátolható transzporterek (GSH-transzporter?). Mivel az arzén biliáris exkrécióját a DEM, a BSP és az ICG is hasonlóan befolyásolta függetlenül attól, hogy az arzént arzenit vagy arzenát formájában kapták az állatok, arra következtethetünk, hogy az arzén mindkét arzénvegyület adása után azonos - bizonyára tiol-reaktív - formában transzportálódik az epébe.

### *Az arzenit ill. arzenát hatása a GSH és az NPSH biliáris exkréciójára*

Az arzén mindkét formája dóziszfüggően, jelentősen megnövelte az NPSH biliáris exkrécióját; 25-100  $\mu\text{mol/kg}$  arzenit injekciója után a kontroll érték 7-17-szeresére, míg 75-300  $\mu\text{mol/kg}$  arzenát adása után a kontroll 6-31-szeresére nőtt a tiolkiválasztás (1/1. és 2/1. ábra). Az epében mérhető össz-glutation kiválasztás teljesen párhuzamosan alakult az NPSH-kiválasztással, s az utóbbi 25-30%-kal haladta meg az össz-GSH-kiválasztást úgy a kontroll, mint az arzén-injektált állatokban (2/2. ábra). Ez arra utal, hogy a fokozott NPSH-kiválasztás az epével döntően a GSH megnövekedett hepatobiliáris transzportjából származik arzén-injektált patkányokban.

### *Összefüggés az arzén és az NPSH biliáris exkréciója között*

A maximális arzén- és NPSH-kiválasztás időben egybeesett: arzenit adásakor közvetlenül az injekció utáni (0-20 perc), arzenát adásakor pedig a második (20-40 perc) epegyűjtési periódusban mértük mind az arzén, mind a tiolok maximális kiválasztási sebességét (2/4. és 2/5. ábra).

Az arzén epébe való kiválasztása nem csupán egyidejű az NPSH- ill. GSH-kiválasztással mind arzenit mind pedig arzenát adása után, hanem a tiol-kiválasztás mértéke is arányos az As-kiválasztás mértékével. A szimultán kiválasztódott As és NPSH mennyiségi aránya szerint egy mól arzén öt, illetve kilenc molekula GSH-t "vitt magával" az epébe arzenit ill. arzenát injekciója után.

Felvetődött a lehetőség, hogy az As és a GSH laza konjugátumot képez a májsejtekben s így transzportálódik az epébe, ami magyarázná szorosán összefüggő kiválasztásukat. Kiválasztódva, az epekanalikulusokban ez az instabil konjugátum hidrolizálódhat, s a szabaddá vált arzén visszaszívódhat a kanalikulusokból a májsejtekbe. Ott az As újabb GSH-molekulákkal kapcsolódhat, mielőtt ismét kiválasztódik az epébe. Feltehetően ezzel, az egyes epesavaknál is megfigyelt recirkulációval (Yoon et al 1986) magyarázható, hogy az arzén a vegyértékéből adódó koordinációs lehetőségnél több GSH molekula epébe való transzportját indukálja. Az arzenát metabolizmusa során arzenitté redukálódik a szervezetben. A közleményünk megjelenését követő években beszámoltak arról, hogy patkány

vörösvérsejtekben az arzenit és a glutation 1:3 komplexe  $[\text{As}(\text{GSH})_3]$  képződik (Scott et al 1993, Delnomdedieu et al 1995). Ez a komplex fiziológias pH-n stabil, lúgos pH-n (pl. epe) azonban instabillá válik. Feltételezzük, hogy a hepatocitákban is hasonló As-GSH konjugátum képződött, ami kolefil, tehát gyorsan transzportálódik az epébe.

Az arzén mindkét formájában adva a dózisfüggő módon maximálisan 50%-kal ill. 70%-kal fokozta az epefolyást (2/3. ábra). Mivel az epetermelés fokozódása szorosan korrelált az As- ill. a GSH-kiválasztás mértékével, feltételezzük, hogy az arzén-okozta kolerézisért az epekanalikulusokba transzportálódott As-GSH és GSH ozmotikus hatása felelős (Ballatori and Truong 1989).

Megvizsgáltuk, hogy a GSH kísérletes depléciója valamint hepatobiliáris transzportjának gátlása hogyan hat az arzén okozta NPSH kiválasztás-növekedésére és elemeztük azt is, hogy kimutatható-e ilyen körülmények között is összefüggés az As és az NPSH biliáris exkréciója között.

Kontroll (arzánnal nem kezelt) patkányokban a máj GSH-készletét gyorsan depletáló DEM-előkezelés tartósan, mintegy 80%-kal csökkentette az NPSH biliáris exkrécióját a kanalikuláris GSH-transzportot gátló ICG beadása után pedig rövidesen a normál felére, majd tartósan 10-30%-ára csökkentette az NPSH kiválasztását (3/1. ábra). A BSP NPSH-kiválasztást gátló hatása viszonylag rövid tartamú volt, mert a tiolkiválasztás a kísérlet második órájában visszatért a normál, sőt az azt meghaladó mértékűre (3/1. ábra). (Ennek az a magyarázata, hogy a GSH-transzportot gátló BSP a hepatocitákból nem csak biliáris exkréció, hanem GSH-val való konjugáció révén is eliminálódik, a BSP-GSH pedig nem gátolja a GSH kanalikuláris transzportját).

A hepatikus GSH deplétor DEM és a hepatobiliáris GSH-transzport gátlói nem csak a normál NPSH kiválasztást, hanem az arzenit és arzenát által fokozott NPSH-exkréciót is nagymértékben csökkentették. Ilyen körülmények között elemezve az arzén és az NPSH biliáris exkréciójának összefüggését azt találtuk, hogy az As- és NPSH-exkréció továbbra is korrelál egymással időben és mértékben. Azaz, a BSP, az ICG és a DEM az arzenit vagy arzenát injekciója után mért arzén-exkréciót százalékosan megközelítőleg hasonló mértékben befolyásolta, mint az egyidejűleg

mért tiol-kiválasztást (3/3. ábra). Ez a megfigyelés megint arra utal, hogy az arzén és a GSH biliáris exkréciója szorosan kapcsolt folyamatok, s alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy az arzenit ill. az arzenát tiol-reaktív metabolitja a GSH-val konjugátumot képezve ürül az epébe.

*Arzenit és arzenát hatása a máj GSH-koncentrációjára és az epébe GSH-konjugátumként ürülő xenobiotikumok kiválasztódására*

A patkányok által közel egyformán tolerált 50  $\mu\text{mol/kg}$  arzenit ill. 150  $\mu\text{mol/kg}$  arzenát iv adásuk után egy órával 25%-kal ill. 37%-kal csökkentették a máj NPSH koncentrációját (2/940-941. oldal). Ez a jelentős csökkenés zavarhatja azon xenobiotikumok eliminációját, amelyek legalább részben glutationnal konjugáltan választódnak ki az epével. Ilyen vegyület a brómszulfalein (BSP), illetve egyes, már említett fémionok. Ugyanakkor több fémion (pl metilhigany, kadmium) kiválasztása fokozódik olyan beavatkozások (pl. fenobarbitál-előkezelés) hatására, amik növelik a GSH hepatobiliáris transzportját (Ballatori and Clarkson 1985). Megvizsgáltuk ezért, hogy az arzenit és arzenát hogyan befolyásolják a BSP, ill. a merkuri-klorid, metilmerkuri-klorid, cink és kadmium biliáris exkrécióját.

A BSP kolefil szerves sav, ami részben változatlanul, részben GSH-konjugátumként (BSP-GSH), transzportálódik az epébe. Mindkét arzénvegyület jelentősen gátolta a BSP-GSH, ezáltal az össz-BSP kiválasztását is, míg egyik sem befolyásolta a szabad, nem konjugálódott BSP epébe való kiválasztását (2/7. ábra). A BSP-GSH csökkent kiválasztása legalább részben annak lehet tulajdonítható, hogy az arzénvegyületek csökkentették a hepatikus GSH-kínálatot és így a BSP-GSH képződését (Whelan et al 1970).

A fenti fémionok kiválasztására gyakorolt hatásukat vizsgálva, az arzenit 50  $\mu\text{mol/kg}$  ill. az arzenát 150  $\mu\text{mol/kg}$  adása csak a szerves higany biliáris exkrécióját fokozta számottevően (közel 3-szorosára), a többi fém kiválasztását nem befolyásolta (2/6. ábra). Megemlítendő még az a megfigyelésünk, hogy az arzenit egészen kis dózisa (10  $\mu\text{mol/kg}$  iv) kétszeresére növelte a metilhigany kiválasztását, de ez a hatás 50  $\mu\text{mol/kg}$  dózisban már eltűnt (1/2. ábra). Megállapíthatjuk tehát, hogy az arzenit és az arzenát által kiváltott jelentős (14-szeres) biliáris GSH-

exkréciót nem kísérte hasonló mértékű növekedés a vizsgált fémek hepatobiliáris transzportjában. Mivel ezen fémek stabil komplexet képeznek a GSH-val annak tiolcsoportján keresztül, az arzén a májban már nem kötődhet a fém-GSH komplexhez, ezért azt - ellentétben a szabad glutationnal - az arzén nem tudja "kivinni magával" az epébe, és ezért nem fokozza a fémkiválasztást. Ez a hipotézis további vizsgálatokat igényel.

## **II. Kapcsolat az antimon és a bizmut, valamint a glutation epével való kiválasztása között (4. közlemény)**

### Előzmények

Az antimon (stibium) és a bizmut a periódusos rendszer arzénal azonos oszlopába tartoznak, ezért azzal kémiai rokonságot mutatnak. Mindkét elemnek az arzénhoz hasonlóan van három vegyértékű, tiol-reaktív formája (Winship 1987, Winship 1983) és szintén kiválasztódnak az epébe (Bailly et al 1991, Gregus and Klaassen, 1986).

Nem tudtuk azonban pontosan, hogy eliminációjában mennyire számottevő a biliáris exkréció, és az sem volt ismert, hogy hepatobiliáris transzportjuk mechanizmusa az arzénhoz hasonló-e, vagyis függ-e a hepatikus GSH-kínálattól és a hepatobiliáris GSH transzporter aktivitásától, továbbá, hogy kiválasztásukat - mint az arzénét - a GSH nagyfokú epébe való exkréciója kíséri-e.

### Célkitűzés:

A fenti előzmények alapján a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen sebességgel válsztódik ki az epével a trivalens szerves antimon és bizmut?
2. Befolyásolja-e a hepatikus GSH-depléció ill. a hepatobiliáris GSH-transzport gátlása az antimon és a bizmut biliáris exkrécióját?
3. Fokozza-e az antimon és a bizmut a GSH és az NPSH kiválasztását az epébe? Hogyan hatnak ezek a félfémek az epetermelés ütemére?

4. Van-e idő- és mértékbeli összefüggés az antimon ill. a bizmut biliáris exkréciója és az általuk indukált NPSH-kiválasztás között kontroll, GSH-deplétorral vagy GSH-transzport gátlóval kezelt patkányokban?

5. Befolyásolja-e az antimon és a bizmut a máj és a vese NPSH-koncentrációját, valamint a BSP (mint részben GSH-val konjugálódó kolefil xenobiotikum) biliáris exkrécióját?

### Módszerek

Az előző fejezetben ismertetett kísérletes ill. analitikai eljárásokat alkalmaztuk. Az antimont és a bizmutot iv injektáltuk stibium kálium tartarát (25-100  $\mu\text{mol/kg}$ ) ill. bizmut ammónium-citrát (50-200  $\mu\text{mol/kg}$ ) formájában. Az epébe kiválasztódott antimont és bizmutot energia-diszperzív röntgen-emissziós spektrométerrel mértük.

### Eredmények és megbeszélés

#### *Az antimon és a bizmut kiválasztódása az epébe*

Az antimon (50  $\mu\text{mol/kg}$  iv) nagy kezdeti sebességgel választódott ki az epébe (4/5. ábra, fölül). Közvetlenül a beadás után 1000 nmol/kg.min csúcs-sebességet mértünk, ami gyorsan ötödére, majd az első óra végére tizedére csökkent. Két óra alatt a beadott antimon több, mint fele kiválasztódott az epébe – ez meghaladja minden más fém és metalloid biliáris exkréciójának mértékét eddigi ismereteink szerint. Összehasonlításképpen: az arzén harmad-ekkorára csúcs-sebességgel ürült az epével 50  $\mu\text{mol/kg}$  iv arzenit injektálása után, bár kiválasztásának időbeli lefutása az antimonéhoz hasonló volt (3/2. ábra, fölül). A periódusos rendszerben az antimon alatt elhelyezkedő bizmut sokkal kevésbé kolefil: 150  $\mu\text{mol/kg}$  iv adása után lassan, a második és a harmadik epegyűjtési periódusban érte el a maximális kiválasztódási rátáját, ami mindössze csak 60 nmol/kg.min volt. Két óra alatt az injektált bizmut alig két százaléka választódott ki az epébe (4/6. ábra).

### *Hepatitis GSH-depléció, ill. a hepatobiliáris GSH-transzport gátlásának hatása az antimon és a bizmut biliáris exkréciójára*

Az antimon és a bizmut kiválasztását is gátolta mind a máj GSH-tartalmát depletáló DEM, mind pedig a GSH hepatobiliáris transzportját gátló BSP és ICG (4/5-6. ábra, felső rész). A DEM előkezelés szinte teljesen blokkolta, alig mérhetően alacsonyra csökkentette mindkét metalloid hepatobiliáris transzportját. Ugyanakkor a DEM-mel előkezelt (altatott) patkányokban mindkét metalloid kifejezetten toxikus volt: az 50  $\mu\text{mol/kg}$  iv antimonnal injektált állatok 80%-a elpusztult a kétórás kísérlet végére, a 150  $\mu\text{mol/kg}$  iv bizmuttal injektált patkányok pedig mind elpusztultak már a kísérlet második órája kezdetén. A BSP hatása hasonló volt az arzénkiválasztásra gyakorolt hatásához: a jelentős kezdeti gátlás (Sb:85%, Bi:100%) után mindkét metalloid biliáris exkréciója fokozatosan emelkedett és a második órában elérte, majd meg is haladta a kontroll állatokban mért antimon- ill. bizmutkiválasztást (4/5-6. ábra, felső rész). Az ICG tartósan csökkentette az antimon exkrécióját (a kontrollhoz képest kb 30%-kal), s 25-60%-kal mérsékelte a bizmut kiválasztását. A máj GSH-készleteinek hozzáférhetősége és a hepatobiliáris GSH transzport tehát alapvetően meghatározzák az epébe gyorsan, a beadott dózis jelentős hányadában kiválasztódó antimon, valamint az epével sokkal kisebb mértékben ürülő bizmut kiválasztását is. A két félfém biliáris exkréciója tehát - hasonlóan a periódusos rendszerben felettük elhelyezkedő arzénéhez - glutationfüggő.

### *Az antimon és a bizmut hatása az NPSH és a GSH biliáris exkréciójára*

Mindkét metalloid dóziszfüggően fokozta a tiolkiválasztást. Az arzénál észlelt maximális tiol-kiválasztási sebességet (a kontroll érték 31-szerese, 2/1. ábra) az antimon közel 70%-kal felülmúlta: a kontroll érték ötvenszeresére fokozta az NPSH biliáris exkréciójának csúcssebességét (4/1. ábra, felül). Nincs tudomásunk más vegyületről, ami hasonló mértékben lenne képes fokozni a GSH biliáris exkrécióját. A bizmut lényegesen kevésbé, a kontroll négyszereséig növelte a GSH-kiválasztást az epébe (4/2. ábra, felül). Antimon ill. bizmut adása után - ahogy az arzén esetében is -, az NPSH-kiválasztás alakulása egyidejű és összevethető mértékű volt a GSH kiválasztásával (4/3. ábra), tehát az antimon ill. a bizmut által indukált fokozódás az

NPSH epébe való kiválasztásában feltehetően a GSH megnövekedett hepatobiliáris transzportjából ered.

*Összefüggés az antimon és a bizmut, valamint az NPSH biliáris exkréciója között*

Az antimon és a bizmut biliáris exkréciója időben párhuzamos, mértékben pedig arányos volt az általuk indukált tiolkiválasztással. Így például a félfémek csúcskiválasztódása (4/5-6. ábra, felül) egybeesett a tiolok egyidejűleg mérhető csúcskiválasztásával (4/1-2. ábra felül és 4/5-6. ábra, alul, saline csoport), továbbá egy mól antimon három, míg egy mól bizmut öt mól tiolt "vitt magával" az epébe.

A DEM-előkezeléssel előidézett hepatikus GSH-depléció szinte teljesen gátolta nemcsak a félfémek, hanem az NPSH egyidejű biliáris exkrécióját is, vagyis a minimális metalloiddkiválasztást alig mérhető tiolkiválasztás kísérte (4/5-6. ábra). A GSH hepatobiliáris transzportját gátló BSP ill. ICG hatására is időben párhuzamosan változott és arányos volt a vizsgált félfémek és az NPSH kiválasztása (4/5-6. ábra): az ICG kb. 20 %-kal, míg a BSP közel 80%-kal csökkentette mind az antimon, mind pedig az egyidejű NPSH-exkréciót a kontrollhoz képest. Az ICG tartósan, a BSP pedig átmenetileg csökkentette mind a bizmut, mind a NPSH szimultán exkrécióját.

Megállapíthatjuk tehát, hogy nemcsak az arzén, hanem az antimon és a bizmut biliáris exkréciója is GSH-val koordinált folyamat (4/5-6. ábra). Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az antimon és a bizmut - akár az arzén - laza glutation-komplexet képezve választódnak ki az epébe. Ezen komplexek azonosítása még hátra van, annyit viszont már tudunk, hogy antimon adása után a patkányok epéjében találtak az antimon diglutation-konjugátumának megfelelő kromatográfias tulajdonságú metabolitot (Bailly et al 1991).

Az antimon 50-100  $\mu\text{mol/kg}$  dózisa közvetlenül a beadása után 45-75%-kal fokozta az epetermelést (4/1. ábra, alul). Ez egybeesik az NPSH kiválasztására gyakorolt hatásának maximumával, így feltételezhető, hogy az antimon-GSH ill. a GSH ozmotikus aktivitása következtében emelkedett meg az epetermelés. Az antimon epehajtó hatása csak átmeneti volt, nagyobb antimondózisok kifejezett epetermelés-csökkenést okoztak a második órában. Ezzel szemben a bizmut még



átmenetileg sem okozott kolerézist, sőt, a 20. perc után a kontrollhoz képest 20-40%-kal csökkentette az epefolyást. Ez arra utal, hogy a bizmut-GSH exkréció ozmotikus hatását felülmúlja a bizmut kolesztatikus effektusa (4/2. ábra, alul).

*Az antimon és a bizmut hatásai a BSP biliáris exkréciójára, és a máj ill. a vese GSH-raktáira*

Hasonlóan az arzénhoz, az antimon is szignifikánsan csökkentette a BSP-GSH képződését és/vagy biliáris exkrécióját, ezáltal az össz-BSP epével való kiválasztását (4/7. ábra, alul). A bizmut viszont nem befolyásolta sem az anyavegyület, sem a glutation-konjugátum (BSP-GSH), ezáltal az össz BSP biliáris exkrécióját sem. Az antimon – feltehetően legalább részben a számottevő hepatobiliáris GSH-exkréció indukálása révén – közel harmadával csökkentette máj GSH-koncentrációját, míg a bizmut nem befolyásolta azt. Így az antimon – vélhetően a GSH hozzáférhetőségének csökkentésével – gátolta a BSP-konjugációt, így a BSP-GSH és az össz-BSP biliáris exkrécióját is. Ezt a következtetést támogatja az a megfigyelés is, hogy a bizmut, ami nem befolyásolta a máj GSH-koncentrációját, nem mérsékelte sem a szabad, sem pedig a GSH-val konjugált BSP kiválasztását (4/4. ábra).

### **III. A szelén és az Va csoport elemeinek kölcsönhatása az epével való kiválasztásukban (5. közlemény)**

A szelén esszenciális elem, de kicsi a terápiás szélessége. Legelőször a toxicitását ismertük meg, s már régen kiderült, hogy az arzén védő hatású a táplálékból (azaz a talaj magas szeléntartalmából) eredő szelén-intoxikációban (Moxon 1938). Az antimon hasonló védő hatását is korán megfigyelték (Moxon et al 1946). Később kimutatták, hogy a szelén és az arzén fokozzák egymás biliáris exkrécióját, és feltételezték, hogy közös As-Se metabolitot képeznek, erre azonban még közvetett kísérleti bizonyíték sem volt (Levander and Baumann 1966).

Mivel korábbi kutatásaink szerint az arzén, antimon és bizmut biliáris exkréciójának mechanizmusa sok szempontból hasonló (1-4), felmerült a lehetőség, hogy a szelén nemcsak az arzén, hanem a periódusos rendszer Va oszlopában az arzén alatt található elemek biliáris exkrécióját is fokozza és viszont. Előző vizsgálataink azt igazolták, hogy az arzén, antimon és bizmut biliáris exkréciójukkal egyidejűleg, azzal arányosan fokozzák a GSH hepatobiliáris transzportját (1-4). Felvetődött ezért, hogy vajon ha a szelén növeli ezen metalloidek biliáris exkrécióját, akkor ezzel együtt a GSH-ürítés is fokozódik-e az epével, ill. súlyosbodik-e a félfémek okozta hepatikus GSH-depléció.

A szelén az oxidatív károsodások megelőzését szolgáló egyik kulcsenzim – a glutation peroxidáz – valamint a fehérje SH-csoportok oxidációját visszafordító (diszulfid-hidakat redukáló) enzimrendszer egy tagjának – a tioredoxin reduktáznak – az aktív centruma (Rotruck et al 1973, Levander 1987, Powis et al 1997). Az arzén és az antimon ritkábban, a bizmut viszont gyakran használatos gyógyszerként. A terápiás célból adott As, Sb és Bi megváltoztathatják a szervezetben lévő szelén eloszlását, ezáltal esetleg a szelén fiziológiás funkcióit is kedvezőtlenül befolyásolhatják. Ezért is fontos minél részletesebben ismernünk interakcióikat.

### Célkitűzés

A fenti előzmények alapján a következő kérdésekre kerestünk választ kísérleteinkkel:

1. Hogyan befolyásolják az arzén, a stibium és a bizmut a szelén biliáris exkrécióját?
2. Hogyan befolyásolja a szelén az Va oszlop elemeinek biliáris exkrécióját?
3. Megváltozik-e a Se és az Va oszlop félfémeinek kölcsönhatása során a GSH biliáris exkréciója, ill. a máj GSH-tartalma?
4. Megváltoztatják-e az Va oszlop elemei a szelén szervezeten belüli megoszlását?
5. Van-e összefüggés időben és mértékben a Se, valamint az AsIII, AsV, Sb ill. Bi biliáris exkréciója között? Ilyen korreláció igazolása támogatná a közös vegyület képződését a szelén és az Va oszlop félfémei közötti *in vivo* reakcióban.

## Módszerek

A vizsgált vegyületek dózisát úgy választottuk meg, hogy az a GSH ill. NPSH exkréciójának az adott metalloidra jellemző fokozódását kiváltsa. Az arzenitet és az antimont 50  $\mu\text{mol/kg}$  iv, az arzenátot és a bizmutot 150  $\mu\text{mol/kg}$  iv, a [ $^{75}\text{Se}$ ]-szelenitet pedig 10  $\mu\text{mol/kg}$  iv dózisban injektáltuk. A non-protein tiolok és a metalloidok biliáris exkrécióját az előző kísérletekben is alkalmazott módszerekkel, a [ $^{75}\text{Se}$ ]-szelént gamma-számlálóval mértük.

## Eredmények és megbeszélés

### *Arzenit, arzenát, antimon és bizmut hatása a szelén biliáris exkréciójára*

Az arzenát (150  $\mu\text{mol/kg}$  iv), az arzenit (50  $\mu\text{mol/kg}$  iv) és az antimon (50  $\mu\text{mol/kg}$  iv) 10  $\mu\text{mol/kg}$  szelenit iv adása után egy perccel injektálva azonnal és jelentősen – a kontroll közel 50-, 30-, ill. 20-szorosára – fokozta a szelén kiválasztásának maximális sebességét (5/1. ábra). E metalloidoknak a szelén biliáris exkrécióját fokozó hatása annál nagyobb volt, minél kisebb az adott metalloid hepatobiliáris transzportjának a sebessége, ill. NPSH-kiválasztást fokozó hatása (AsV – AsIII – Sb: 92 – 290 – 1000 nmol metalloid/kg.min, ill. 950 – 2060 – 3100 nmol NPSH /kg.min; 2/4-5, és 4/5. ábra fölül, ill. 2/4-5, és 4/5. ábra alul).

Ennek a jelenségnek több magyarázata lehet. Feltételezhető például, hogy a gyorsan kiválasztódó, az epébe magukkal sok GSH-t transzportáló metalloidok elvonják a glutationt a szelenit metabolizmusának GSH-igényes kezdeti lépéseitől (7/9. ábra). Márpedig ha az arzén (Levander and Baumann, 1966) és az antimon közös metabolitot képeznek a szelénnel, akkor azok valószínűleg úgy jöhetnek létre, hogy az arzén és az antimon trivalens, tehát tiol-reaktív formájukban reakcióba lépnek valamelyik szelenol formában lévő, tehát a tiolokhoz hasonló kémiai tulajdonságú szelénmetabolittal (GS-Se-H, H-Se-H,  $\text{CH}_3\text{-Se-H}$ ). Ezen szelénmetabolitok képződése azonban GSH-igényes folyamat (7/9. ábra). Mivel az antimon több GSH-t használ az epével gyorsan ürülő GSH-komplexe képzéséhez mint az arzenit és az arzenát (4/5. ábra, 2/4-5. ábra), ezért az antimon jelenlétében viszonylag kevés vele reaktív szelénmetabolit képződhet és így az antimon kevésbé fokozhatja a szelén kiválasztását, mint az arzenit és az arzenát. Ezen túlmenően az is

lehetséges, hogy az epébe páratlanul nagy kezdeti sebességgel ürülő antimonnak kevesebb idő jut a szelénmetabolitokkal való reakcióra a hepatocitákban, mint a lassabban kiválasztódó arzenitnek és arzenátnak. A jelenség egy másik lehetséges mechanizmusa is azon az indirekt bizonyítékokkal alátámasztott és a megbeszélés utolsó alcíme alatt taglalt hipotézisünkön alapul, hogy a szelenittel és Va csoportbeli metalloiddal injektált patkányokban metalloid-Se-GSH komplex képződik. Elképzelhető ugyanis, hogy a metalloid-GSH kettős és a metalloid-Se-GSH hármast komplexet azonos transzporter juttatja az epébe, ezért az előbbi komplex (különösen az antimoné) kompetitív módon gátolja a szelén-tartalmú komplex biliáris exkrécióját. Mindezen feltételezések összeegyeztethetők eredményeinkkel és ismereteinkkel, direkt kísérletes igazolásuk azonban még előttünk áll.

Az arzénnel és az antimonnal szemben a bizmut közel harmadára csökkentette a szelénkiválasztást az epébe (5/1. ábra). Ez a metalloid sokkal kevésbé interferál a GSH-homeosztázissal, mint az arzén és az antimon, így feltehetően más, eddig ismeretlen mechanizmus húzódik meg a bizmut szelénkiválasztást csökkentő hatásának hátterében.

#### *A szelenit hatása az Va oszlop félfémeknek biliáris exkréciójára*

A szelenitnek az arzén kiválasztására gyakorolt hatása – összhangban a korábbi megfigyelésekkel – kölcsönös. Figyelemre méltó azonban, hogy a szelenit az arzenittel is injektált patkányokban mintegy kétszeresére, arzenáttal kezelt állatokban viszont közel nyolcszorosára növelte az arzénkiválasztás maximális sebességét (5/2. ábra).

A fenti megfigyelésünk hipotetikus magyarázatának alapja az, hogy az arzenátnak tiol-reaktív arzenitté kell redukálódni ahhoz, hogy GSH komplexként az epébe transzportálódjon. Ezt a redukciót a hepatikus GSH katalizálhatja (Vahter and Envall 1983). A szelenit metabolitjai közül a szelenolok és a hidrogén-szelenid (7/9. ábra) erős redukálószeres is, így fokozhatják az arzenát redukcióját a tiol-reaktív arzenitté. A szelenolok jelenlétében tehát az arzenátból több GSH-val konjugálódó, ezért az epével gyorsan ürülő arzenit képződhet. Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy a szelenit nagy mértékben fokozza az arzenát formában injektált arzén biliáris

exkrécióját. Hasonló mechanizmus szerepet játszhat a szelenit arzénkiválasztást elősegítő hatásában arzenittal injektált patkányokban is. A három vegyértékű arzén egy része ugyanis öt vegyértékűvé oxidálódik a szervezetben (Lerman and Clarkson 1983). Feltételezzük, hogy a szelenolok ezt az oxidációt mérsékelve három vegyértékű, GSH-konjugátumot képező és így az epébe transzportálható formában tartják az arzént, ezáltal elősegítik annak biliáris exkrécióját. A szelenit arzénkiválasztást fokozó hatásában más mechanizmus is szerepet játszhat (l. *“Az Va oszlop félfémei és a szelenit...”* c. rész 3. bekezdését).

Az arzénéval szemben a szelenit nem befolyásolta a bizmut biliáris exkrécióját, az antimon maximális kiválasztását pedig 34%-kal csökkentette. A szelén antimonkiválasztást csökkentő hatásának mechanizmusa ismeretlen. Lehetséges, hogy a feltételezett Sb-Se-GSH komplex kevésbé kolefil, mint a Sb-GSH komplex.

#### *A szelenit hatása az Va oszlop félfémei által indukált biliáris NPSH-exkrécióra és a máj NPSH-koncentrációjára*

Előző kísérleteinkben demonstráltuk, hogy az arzenit, az arzenát és az antimon jelen kísérleteinkhez választott dózisaiban biliáris exkréciójukkal arányosan igen jelentősen – a kontroll 10-30-szorosára –, míg a bizmut sokkal kisebb mértékben – a kontroll két-hátomszorosára – képes fokozni az NPSH maximális biliáris exkrécióját (2/1, 4/1-2. ábra). Annak ellenére, hogy a szelenit jelentősen fokozta az arzén kiválasztását, nem növelte tovább az NPSH-exkréció arzenit hatására létrejött fokozódását, sőt a tiol-kiválasztás maximális sebességét kb. 25%-kal csökkentette is a szelenit nélküli kontrollhoz képest (5/2-3. ábra). A szelenit ugyancsak csökkentette - közel 30%-kal - az antimon igen jelentős tiol-kiválasztást fokozó hatását (5/3. ábra, bal oldal). Figyelemre méltó, hogy mindkét metalloid esetben időben párhuzamos az NPSH-kiválasztás és a metalloidkiválasztás szelenit jelenlétében ill. hiányában (v.ö. 5/2 és 5/3. ábra, b.o.). A szelenit csak minimálisan csökkentette az arzenát tiolkiválasztást fokozó hatását és nem befolyásolta a bizmutét (v.ö. 5/2 és 5/3. ábra, j.o.). Az arzenát-indukálta jelentős (12-szeres) növekedés az NPSH biliáris exkréciójában szelenit együttes adásakor mértékében

változatlan maradt, de korábban lépett fel, miként az arzénexkréció is korábban tetőzött arzenát és szelenit együttadásakor, mint csak arzenát injektálását követően.

A szelenit önmagában nem változtatta meg a máj GSH-koncentrációját, viszont mérsékelte a vele együtt injektált arzenit, arzenát vagy antimon hepatikus GSH-t depletáló hatását (5/2. táblázat). Ezért – legalább részben – a metalloidok GSH-kiválasztást fokozó hatásának mérséklése lehet felelős (5/3. ábra).

#### *Arzén, antimon és bizmut hatása a szelén megoszlására*

Az arzén mindkét formája igen jelentősen (negyedére) csökkentette a májban a szelén koncentrációját, míg a másik két félfém enyhén fokozta azt (5/1. táblázat). Tehát a szelén fokozott biliáris exkréciójának nem feltétele annak hepatikus felhalmozódása ill. a szelén biliáris exkréciójának jelentős fokozódása nem jár feltétlenül együtt a szelén hepatikus koncentrációjának a csökkenésével (arzén ill. antimon; 5/1. ábra és 5/1. táblázat).

Az arzén és az antimon a kontroll közel háromszorosára fokozta a szelén koncentrációját a vérben. Ez a lényegében változatlan plazmakoncentrációk mellett a szelén vörösvérsejtekben való felhalmozódását jelenti. Ezzel szemben a bizmut számottevően – a kontroll nyolcszorosára – növelte a szelén koncentrációját a plazmában, míg jelentősen csökkentette azt az eritrocitákban. (5/1. táblázat).

#### *Az Va oszlop félfémei és a szelenit kölcsönhatásainak lehetséges hátteréről*

Azon kísérleti állatokban, amelyeknek szelenitet injektáltunk arzénal vagy antimonnal együtt, a szelén, illetve az Va csoportba tartozó megfelelő metalloid epével való kiválasztása időben párhuzamosan alakult (vö 5/1. és 5/2. ábrák megfelelő részeit). Mitöbb, ezekben a patkányokban az NPSH-kiválasztás is időben párhuzamosan alakult az arzén (vagy antimon) illetve a szelén exkréciójával (vö 5/1, 5/2. és 5/3. ábrák megfelelő negyedeit). Vagyis ezek a metalloidok, valamint a GSH és a szelén koordinált módon ürülnek az epével. Ez a megfigyelés támogatja azt a feltételezést, hogy a megelőző kísérletek (lásd I. és II. rész) alapján valószínűsített metalloid–GSH konjugátumba beépül egy szelénmetabolit, kolefil hármas konjugátumot (As-Se-GSH; Sb-Se-GSH) alkotva.

A szelenit metabolizmusa során keletkező szelenolok (R-SeH) kémiaiilag hasonlóak a tiolokhoz, így igen valószínű, hogy reagálnak az Va csoport metalloidjainak tiol-reaktív formáival. Ezzel a reakcióval magyarázható – legalább részben – az a megfigyelésünk is, hogy a szelenittel együtt injektálva az arzenitet, arzenátot ill. antimont, az utóbbi félfémek biliáris NPSH-exkréciót növelő hatása nem fokozódik, hiszen azok GSH-komplexáló (és így a GSH-t az epébe szállító) képességét csökkenti, ha a glutation helyett részben szelenolokkal asszociálnak. Feltételezzük, hogy az ilyen As-Se-GSH és Sb-Se-GSH hármas konjugátumok kiválasztási sebessége nagyobb, mint a GSH-Se kétkomponensű konjugátumé (miként az As és a Sb exkréciójának sebessége is sokkal nagyobb a szelénénél), és ezért fokozza az arzén és az antimon a szelén kiválasztását az epébe. Ezzel ellentétben, a feltételezett Bi-Se-GSH konjugátum biliáris exkréciós sebessége bizonyára nem nagyobb, mint a szeléné önmagában (ill. a Se-GSH konjugátumé, l. következő fejezet), így más korlátozó hatás (lásd később) eredményezheti azt, hogy a bizmut kezdetben nem fokozza, később pedig csökkenti a szelén ürülését az epével (5/1-2.ábra).

A hármas komplex képződése szerepet játszhat a szelenitnek az arzénkiválasztást elősegítő hatásában is, amennyiben az As-Se-GSH komplex stabilabb, mint az As-GSH komplex. Ebben az esetben ugyanis csökkenne az As-nek a komplexből való felszabadulása és következményes reabszorpciója az epeutakból.

A vörösvérsejtekben a szelenit szelenolokká metabolizálódik (Gasiewicz és Smith 1978). Az arzén túlnyomó többsége patkányok vérében a vörösvérsejtekben található (Gregus és Klaassen 1986), nyulak vörösvérsejtjében főleg GSH-komplex formájában (Delnomdedieu et al 1994). A tiolokhoz hasonló kémiai tulajdonságú szelenolok könnyen reagálhatnak az eritrocitákban lévő tiolreaktív arzenittel. Így kialakulhat az arzenit-Se-GSH hármas konjugátum, ami kevésbé tud kilépni a vörösvérsejtekből, mint a gáznemű, diffúzibilis H-Se-H, ezért emelkedhet meg a vér szeléntartalma arzén jelenlétében (5/1. táblázat). Hasonló mechanizmust tételezünk fel az antimonnak a vér szelénkoncentrációját növelő hatásában. A májsejtekben képződött Va-metalloid-Se-GSH hármas komplexek hepatovaszkuláris

transzportjuk révén szintén bejuthatnak a vérbe – hasonlóan ahhoz, ahogy a GSH sem csak az epébe, hanem a vérbe is transzportálódik a hepatocitákból (Kaplowitz et al 1996). Így ezen az úton is emelkedhet a vér szeléntartalma a periódusos rendszer Va csoportjába tartozó metalloidok szelénnel való kölcsönhatása során.

A bizmut a plazma szelénkoncentrációját emeli meg jelentősen (5/1. táblázat). Tudjuk, hogy a bizmut nagy mértékben kötődik plazmafehérjékhez (Gregus and Klaassen 1986), így a plazmába (pl. a hepatocitákból, ill. a vörösvérsejtekből) jutott szelenokat a nagy koncentrációban ott lévő tiolreaktív bizmut könnyen megkötheti. Hasonló jelenség lejátszódhat a májban is, s ez magyarázhatná, hogy miért csökkenti a bizmut a szelén transzportját az epébe.

Közleményünk (5) elfogadását követően, 1998 márciusában a Society of Toxicology konferenciáján számoltak be arról, hogy a feltételezett As-Se-GSH komplex valóban képződik vörösvérsejtekben *in vitro*, arzenit, szelenit és GSH jelenlétében (Gailer and Aposhian 1998). Így direkt megfigyelés is kiegészíti az állatkísérleteink által szolgáltatott közvetett bizonyítékot az ilyen komplexek létezésére.

Összefoglalva: az Va csoport metalloidjai és a szelén kölcsönösen hatással vannak egymás biliáris exkréciójára és szervezeten belüli megoszlására. Eredményeink alapján kétféle kölcsönhatás valószínűsíthető. Egyrészt a szelenitből képződött szelenolok redukálhatják ill. redukált formában (AsIII) tarthatják az arzént. Ez a mechanizmus szerepet játszhat a szelenitnek az arzén biliáris exkrécióját fokozó hatásában. Másrészt a szelenolok kovalens reakcióba léphetnek az Va csoport félfémjeivel. Így fokozhatja az arzenit, az arzenát és az antimon a szelén biliáris exkrécióját szelenittel injektált patkányokban, de ez a mechanizmus szerepet játszhat a szelenit arzénexkréciót elősegítő hatásában is. E kölcsönhatások révén a szelén és az Va oszlop félfémjei módosíthatják egymás farmakológiai, toxikus és élettani hatásait. A szelén komplexálásával ill. kiválasztásának jelentős mértékű fokozásával az arzén és az antimon például csökkenthetik a szelén hozzáférhetőségét a szelenoenzimek szintéziséhez, ezáltal gátolhatják azok (pl. a glutation peroxidáz) fiziológiai funkcióit.



#### IV. A glutation és a metiláció szerepe a szelén biliáris exkréciójában (6. közlemény)

A szelenit metabolizmusának sok részletét ismerjük (Ganther 1986; 7/9. ábra). A folyamatban, mialatt a Se +4 vegyértéke -2-re változik, a GSH több lépésben redukálja a szelenitet. Eközben glutationt is és szelént is tartalmazó vegyületek képződnek; először szelenodiglutation (GS-Se-SG), majd glutationil-szelenol (GS-Se-H), végül pedig hidrogén-szelenid (H-Se-H) keletkezik. A hidrogén-szelenid több lépésben metilálódhat, ennek során az igen reaktív metilszelenol (CH<sub>3</sub>-Se-H), majd a kilélegezhető dimetilszelenid (CH<sub>3</sub>-Se-CH<sub>3</sub>), és a vizelettel ürülő trimetilszelenónium ion [CH<sub>3</sub>-Se<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] képződik.

Bár tudjuk, hogy a szelén az epébe is kiválasztódik (Gregus and Klaassen 1986), nem volt ismert eddig, hogy milyen formában. Az sem volt ismert, hogy a fenti metabolikus folyamatok befolyásolják-e a szelén epével való kiválasztását. Előző vizsgálataink (3, 4) szerint az ICG és a BSP nemcsak a GSH transzportját gátolta, hanem az arzén, az antimon és a bizmut epébe való kiválasztását is. Felmerült a kérdés, hogy vajon a hepatobiliáris GSH-transzporter gátlói csökkentik-e a szelén epébe való kiválasztását is.

#### Célkitűzés

A fentiek alapján kísérleteinkkel arra kerestünk választ, hogy

1. Milyen mértékű az intravénásan adott szelén epével való kiválasztódása a dózis és az idő függvényében?
2. Milyen formában választódik ki az epébe a szelén?
3. Hogyan befolyásolja a szelén biliáris exkrécióját (a) a májbeli glutation hiánya, (b) metilációjának gátlása, és (c) a hepatobiliáris GSH-transzporter gátlása?

E kérdések tisztázásakor váratlanul azt tapasztaltuk, hogy a BSP nagymértékben fokozza a szelén biliáris exkrécióját. Ezzel az új jelenséggel kapcsolatban elsőként a következő kérdésre kerestük a választ:

4. Függ-e a BSP szelénkiválasztást fokozó hatása a szelén és a BSP dózistól?

## Módszerek

A [ $^{75}\text{Se}$ ]-jelzett nátrium-szelenitet 1-10  $\mu\text{mol}/10\mu\text{Ci}/\text{kg}$  iv dózisban injektáltuk az előző pontokban leírtak szerint végzett állatkísérletekben. Az epével ürült radioaktív szelént gamma-számlálóval mértük. Az epébe kiválasztott szelénmetabolitokat HPLC elválasztás után radioaktivitás-detektorral ( $^{75}\text{Se}$ ) detektáltuk, s *in vitro* szintetizált referenciavegyületekhez hasonlítva azonosítottuk. A metabolitok azonosításakor nagy aktivitású jelzett szelenitet (120-200  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ ) injektáltunk a patkányoknak. Az epét jégben tartott csövekbe gyűjtöttük. Az előzőekben használt módszereken túl a máj glutationtartalmát a szintézis kulcsenzimjét gátló butinoin szulfoximin (BSO) előkezeléssel (Griffith 1981), illetve a GSH-t a májból gyorsan kiürítő DEM-mel depletáltuk. A szelén metilációját perjodát-oxidált adenzin (PAD) illetve etionin előkezeléssel gátoltuk. Az előbbi előkezelés a metiltranszferázok gátlásához vezet, az utóbbi pedig az S-adenozil-metionint depletálja (Hoffman 1980, Svardal et al 1988). A hepatobiliáris GSH-transzportert ICG-vel (25  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  iv) ill. BSP-vel (50  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  iv) gátoltuk.

## Eredmények és megbeszélés

### *A szelén biliáris exkréciójának jellemzői; az epébe ürülő szelénmetabolit*

A szelén lassabban választódik ki az epébe, mint az eddig vizsgált metalloidek: maximális kiválasztási sebessége 10  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  iv adása után 3  $\text{nmol}/\text{kg}\cdot\text{min}$  (összehasonlításként: As: 280, Sb: 1000  $\text{nmol}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ). Érdekes jelenség a dózis emelésével csökkenő arányú kiválasztódás: 1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  iv szelenit 16%-a, míg 10  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  iv szelenit 3%-a választódott ki az epébe két óra alatt (6/6. ábra, Se jelzésű görbék). A hepatobiliáris transzport tehát már alacsony szelenit-dózisoknál maximumot ér el, részesedése a szelén eliminációjában pedig a szelenit dózisének növelésével csökken.

Az utóbbi jelenség összefüggésbe hozható azzal a ténnyel, hogy a szelenit dózisének emelkedésével annak egyre nagyobb része eliminálódik a tüdőn keresztül volatilis dimetilszelenid formájában (Hirooka and Galambos 1966, McConnell and Roth 1966, Tandon et al 1986). Igen valószínű, hogy a metiláció ill. dimetilszelenid képződése nem kedvez a szelén hepatobiliáris transzportjának, ezért kisebb arányú a

nagyobb szelenitdózisok adása után a szelén epébe való kiválasztása. Ezt a vélekedést alátámasztják a metiláció kísérletes gátlásával nyert megfigyeléseink is (1. alább).

HPLC analízissel a szelenittel injektált patkány epéjében változatlan, nem metabolizálódott szelenitet nem detektáltunk. Találtunk viszont egy olyan szelénmetabolitot, aminek a kromatográfiás tulajdonságai megegyeztek az *in vitro* szintetizált szelenodiglutationéval. Eszerint a nátrium-szelenit formájában injektált szelén szelenodiglutation (GS-Se-SG) formájában választódik ki az epével (6/2. ábra).

#### *A GSH és a metiláció szerepe a szelén biliáris exkréciójában*

A máj GSH-tartalmának depléciója DEM ill. BSO előkezelés hatására 80 ill 60 %-kal csökkentette a szelén epébe való kiválasztását (6/1. ábra). A metilációt gátló PAD ill. etionin előkezelés viszont közel kétszeresére növelte a kiválasztást (6/3. ábra). A májbeli GSH hozzáférhetősége tehát elősegíti, a metiláció pedig hátráltatja a szelén epébe való kiválasztását.

A szelenit biotranszformációjának ill. az epébe transzportálódó, általunk valószínűsített fő formájának ismeretében megfigyeléseinket azzal magyarázhatjuk, hogy a hepatikus GSH depléciója csökkenti a szelenit GSH-igényes átalakulását szelenodiglutationná (7/9. ábra). Így gátlódik a kolefil szelénmetabolit képződése, s ezért lassul a szelén biliáris exkréciója BSO ill. DEM előkezelés hatására. A kezdeti GSH-igényes reakciók után a szelenit metilációs lépéseken át metabolizálódik tovább. Eredményeink arra utalnak, hogy a metiláció gátlásával (PAD, etionin) lassul a GS-Se-SG metabolikus eliminációja, ezért több GS-Se-SG maradhat a hepatocitákban, s transzportálódhat onnan az epébe.

A hepatobiliáris GSH-transzportot gátló ICG nem befolyásolta a szelénexkréciót (6/4. ábra), ami arra utal, hogy a hepatobiliáris GSH transzporter vagy más, a GSH konjugátumokat az epébe vivő transzporterek nem vesznek részt, vagy nem sebességmeghatározók a szelén hepatobiliáris transzportjában. Váratlan megfigyelésünk volt, hogy a szintén GSH-transzportot gátló BSP sokszorosára növelte a szelén biliáris exkrécióját szelenittel injektált patkányban (6/4. ábra). Ez

utóbbi jelenség ellentétes volt a félfémekkel szerzett eddigi tapasztalatainkkal, hiszen azt vártuk, hogy az ICG és a BSP a szelén (ill. a GS-Se-SG konjugátum) kiválasztását ugyanúgy gátolja majd, mint pl. az arzénét ill. arzén-GSH konjugátumét (lásd I. rész). Ezért tovább elemeztük a BSP paradox hatását a Se biliáris exkréciójára.

#### *A BSP hatása a szelén biliáris exkréciójára – szokatlan dózis-hatás összefüggések*

A BSP (25–200  $\mu\text{mol/kg}$  iv) dózisfüggően, igen jelentősen (maximálisan a kontroll hússzorosaig) fokozta a Se epébe való kiválasztását, ám a megszokottól eltérő dózis-hatás összefüggéseket tapasztaltunk.

A maximális hatást a közepes BSP dózisok váltották ki: 50 ill. 100  $\mu\text{mol/kg}$  BSP jobban fokozta a szelén biliáris exkrécióját a kísérlet időtartama alatt, mint az alacsonyabb és a magasabb dózisok (6/5. ábra). A BSP dózisének emelésével a csúcshatás egyre későbbre tolódott és 100  $\mu\text{mol/kg}$  dózis felett egyre csökkenő volt a BSP maximális hatása a szelénkiválasztásra. Azaz, a kísérlet két órája alatt 150  $\mu\text{mol/kg}$  BSP fele annyira, 200  $\mu\text{mol/kg}$  BSP negyedannyira fokozta a szelén maximális biliáris exkréciós sebességét, mint 50 és 100  $\mu\text{mol/kg}$  BSP. Ennek magyarázatára az V. részben térek ki.

Egy másik szokatlan dózis-hatás összefüggést is megfigyeltünk a szelenit és a BSP együtthatásakor. Azt tapasztaltuk, hogy a BSP szelénkiválasztást fokozó hatásának mértéke a szelenit dóziséhoz is függ. Nevezetesen, minél nagyobb volt a szelenit dózisa, annál jobban fokozta a szelén biliáris exkrécióját a BSP, azaz 1, 2,5, 5 ill. 10  $\mu\text{mol/kg}$  Na-szelenit injekciója után 50  $\mu\text{mol/kg}$  BSP-t injektálva a szelénkiválasztás a kontroll értékek 5-, 8-, 12- ill 18-szorosára nőtt (6/6. ábra). E dózis-hatás összefüggés magyarázatára is visszatérek az V. részben.

Összefoglalva: a periódusos rendszerben az arzént követő elem, a szelén szervezeten belüli sorsában kisebb szerepe van a biliáris exkréciónak, mint az arzén és az alatta elhelyezkedő antimon esetében. Az Va oszlop metalloidjaihoz hasonlóan a szelén epével való kiválasztásához is hepatikus GSH szükséges. Az Va oszlopbeli metalloidoktól eltérően azonban a hepatobiliáris GSH-transzporter gátlói nem

csökkentik – sőt a BSP számottevően fokozza – a szelén kiválasztását. Míg a szelenit GSH-val való reakciója elősegíti, addig metilációja hátráltatja a szelén biliáris exkrécióját.

## **V. Miért fokozza a brómszulfalein a szelén epével való kiválasztását? (7. közlemény)**

Mivel a szelén biológiailag igen fontos elem, az előző fejezetben ismertetett váratlan megfigyelésünknek – miszerint a BSP jelentősen fokozza a szelén biliáris exkrécióját - közvetve elméleti és gyakorlati jelentősége is lehet. Egyrészt, a jelenség tanulmányozása elősegítheti a szelenit szervezetben való sorsának pontosabb megismerését, valamint közelebb vihet a szelén antitoxikus és antikancerogén hatásának a megértéséhez. A szelenitnek a szervezeten belül ugyanis különböző metabolitokká kell átalakulnia, hogy érvényesülhessen élettani szerepe (esszenciális elem: szelenocisztein–szelenoproteinek), valamint antikancerogén (pl. az aflatoxin eredetű endémiás májkarcinóma gyakoriságát csökkentő), antitoxikus (nehézfémekkel, ciszplatinnal szemben) ill. toxikus (túlzott bevitel) hatása (Ganther 1986, Ip et al 1991, Spallholz 1994, Lu et al 1995). Másrészt, a szelén biliáris transzportjának növelése a szervezetből való elimináció fokozásának, tehát a szelén-detoxikálásnak az egyik útja lehet, amit akut szelénintoxikáció kezelésében lehetne kihasználni (manapság divattá vált szelént szedni, s kicsi a terápiás szélessége!). Mindezek miatt tartottuk fontosnak a BSP szelénexkréciót fokozó hatásának elemzését, a hatásmechanizmus tisztázását.

A szelenitnek vannak nukleofil metabolitjai (7/9. ábra), a BSP pedig elektrofil vegyület, így elképzelhető, hogy könnyen reagálnak egymással. A képződött közös metabolit(ok) megtartva a BSP kolefilitását, nagy sebességgel ürülhetnek az epébe. Ezáltal a BSP nemcsak a szelén biliáris exkrécióját növelheti, hanem megváltoztathatja a szelén légutakon keresztüli ill. vizelettel való eliminációját is.

## Célkitűzés

Kísérleteinkkel arra kerestünk választ, hogy

1. A BSP nem elektrofil analógjai is fokozzák-e a szelén biliáris exkrécióját?
2. A BSP-vel együtt adva, milyen formában ürül a szelén az epébe?
3. Reakcióba lép-e a BSP a szelenit valamelyik metabolitjával?
4. Van-e szerepe a metilált szelénmetabolitoknak a BSP szelénkiválasztást fokozó hatásában?
5. Befolyásolja-e a BSP a tüdőn át, ill. a vizelettel kiválasztódó szelénmetabolitok képződését (dimetilszelenid, trimetilszelenónium), ezáltal a szelén eliminációját?

## Módszerek

Az állatkísérleteket az előzőekben ismertetettek szerint végeztük. A BSP nem metabolizálódó analógjait – a dibrómszulfaleint (DBSP), ill. a BSP-GSH-t – a [<sup>75</sup>Se]-nátrium-szelenit (10 μmol/kg iv) beadása után injektáltuk (50 μmol/kg iv), s azonnal elkezdtük az epegyűjtést. Az epével ürült radioaktív szelént gamma-számlálóval mértük. Az epében a a BSP- ill. szelén-metabolitokat HPLC-vel szétválasztottuk, majd egymás után kapcsolt abszorbancia (580 nm, BSP) ill. radioaktivitás (<sup>75</sup>Se) detektorokkal detektáltuk. A talált metabolitokat ismert szelénmetabolitok BSP-vel képzett, *in vitro* szintetizált konjugátumainak kromatogramjaihoz hasonlítottuk azonosítás céljából. A volatilis dimetilszelenid eliminációja azon az elven mérhető, hogy nagy koncentrációjú salétromsav szelektíven megköti ezt a vegyületet (Bopp et al 1982). A tracheába helyezett kanült sorba kapcsolt, 8M-os salétromsavat tartalmazó kémcsövekhez csatlakoztattunk, amiken egy vízlégszivattyú buborékoltatta át a kilégzett levegőt, s a megkötött [<sup>75</sup>Se]-t gamma-számlálóval detektáltuk. A vesén keresztüli szelénkiválasztás meghatározásához a folyamatos vizelettermelést mannitollal tartottuk fenn, s a feltárt és telődő hólyag időnkénti kompressziójával az epével azonos időközökben gyűjtöttük a vizeletet. A metilált szelénmetabolitok képződését a IV. részben leírt PAD- ill. etionin-előkezeléssel gátoltuk.

## Eredmények és megbeszélés

### *A BSP és analóg vegyületeinek hatása a szelén biliáris exkréciójára*

A DBSP és a BSP-GSH a BSP nem elektrofil analógjai, és a BSP-hez hasonlóan kolefil vegyületek (7/1. ábra). Megállapítottuk, hogy sem a DBSP, sem pedig a BSP-GSH nem befolyásolták a szelén epébe való kiválasztását (7/2. ábra). Ez alapján adódott a feltételezés, hogy az elektrofil BSP közös metabolitot képez a szelén nukleofil metabolitjaival s így együtt ürülnek az epébe. Valóban, BSP plusz szelenit-injektált állatok epéit a HPLC-vel sorba kapcsolt radioaktivitás és abszorbancia detektorokkal analizálva, találtunk olyan vegyületeket (X és Y), amiket mindkét detektor egyidejűleg jelzett (7/3. ábra), azaz [<sup>75</sup>Se]-t is és a BSP-re jellemző szerkezetet is tartalmaztak.

### *A BSP és a szelenit-metabolitok in vitro reakciótermékeinek kromatográfiás analízise*

A szelenit metabolizmusa során három nukleofil vegyület – glutation-szelenoperszulfid (GS-Se-H), hidrogénszelenid (H-Se-H) és metilszelenol (CH<sub>3</sub>-Se-H) – is keletkezik, amik reagálhatnak az elektrofil BSP-vel. A BSP és a metilszelenol *in vitro* reakciója olyan terméket adott, ami kromatográfiásan nem különíthető el az epében kimutatott, általunk X-nek jelölt vegyülettől (7/4. ábra). Ezért feltételezzük, hogy az X vegyület a BSP és a metilszelenol reakcióterméke.

Egy másik kísérletsorozatban a BSP-t és a nátrium-szelenitet különböző tiolok (pl. GSH) jelenlétében *in vitro* reagáltattuk. Ekkor a tiol és a szelenit reakciója eredményeként a megfelelő szelenoperszulfid, valamint H-Se-H képződik (l. a 7/9. ábrát), s ezek reagálhatnak a BSP-vel. A reakcióelegyben olyan vegyület(ek) képződését mutattuk ki, amiknek a kromatográfiás tulajdonságai megfeleltek az epében általunk Y-nak jelölt vegyület(ek)ének. Mivel az *in vitro* reakcióban az Y vegyület(ek) mindig képződtek attól függetlenül, hogy melyik tiol (GSH, Cys-Gly, Cys) volt a redukálószer, valószínű, hogy a keletkezett Y jelű BSP-Se közös metabolit nem tartalmaz tiol-maradványt és így az Y a BSP és a hidrogénszelenid közös vegyülete.

### *A metiláció szerepe a BSP szelénkiválasztást fokozó hatásában*

A szelenit metilációját gátló PAD ill. etionin előkezelés nem befolyásolta számottevően a BSP hatását a szelén biliáris exkréciójára, azaz a szelén összkiválasztása nem változott a metiláció gátlásakor (7/5. ábra).

A PAD-dal vagy metioninnal előkezelt és BSP-vel és [<sup>75</sup>Se]-szelenittel injektált patkányok epemintáinak HPLC-analízise azonban jelentős változást mutatott a BSP-Se közös metabolitok arányát illetően az előkezeletlen állatokéhoz viszonyítva (7/6-7. ábra). Mindkét metilációgátló hatására igen jelentősen (90%) megkisebbedett az X csúcs, ami megfelel a BSP és a metilszelenol reakciótermékének. PAD hatására emellett megnőtt az Y csúcs, ami feltehetően a BSP és a hidrogénszelenid reakciójakor képződött termék(ek) (7/6. ábra). Etioninnal gátolva a metilációt az Y csúcs mérete nem változott, de egy új csúcs (E) jelent meg mindkét detektor kromatogramjában (7/7. ábra). Az etionin hatásmechanizmusából következtetve feltételezzük, hogy az E csúcs a BSP és egy etilált szelénmetabolit (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-Se-H?) közös termékének felel meg.

A BSP szelénkiválasztást fokozó hatását a szelén metilációját gátló szerek nem befolyásolták (7/5. ábra). Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a szelenit metabolizmusa során képződő, több fajta, a BSP-vel reagálni képes szelénmetabolit (GS-Se-H, H-Se-H, CH<sub>3</sub>-Se-H) (7/9. ábra) közül csak a CH<sub>3</sub>-Se-H képződését gátolja a PAD vagy az etionin, amivel egyúttal a CH<sub>3</sub>-Se-H prekursora – a H-Se-H – felszaporodik. Így PAD vagy etionin hatására a BSP számára hozzáférhető szelénmetabolitok egymáshoz viszonyított aránya, ezzel pedig az egyedi BSP-Se metabolitok (X és Y) mennyisége változik csak meg, miközben összmennyiségük (azaz a BSP-t is és Se-t is tartalmazó metabolitok összessége) változatlan marad.

### *A BSP hatása a szelén tüdőn és vesén át való eliminációjára*

Miközben a BSP sokszorosára növelte a szelén biliáris exkrécióját, szignifikánsan csökkentette a szelén légutakon keresztüli kiválasztódását. Ez érthető, hiszen a BSP-vel reagáló nukleofil szelenitmetabolitok egyben a volatilis dimetilszelenid prekursorai. Így a BSP metabolikusan eliminálja a szelén egy részét, mielőtt abból a légutakon keresztül kiválasztódó dimetilszelenid képződhetne.



A vizelettel való nem túl jelentős mértékű szelénkiválasztást nem befolyásolta a BSP (7/8. ábra). A dimetilszelenidből keletkező trimetilszelenónium ion a vesén keresztül ürül, de csak több óra elteltével válik domináns metabolittá a vizeletben, ahol emellett még más, azonosítatlan szelénmetabolitok is találhatóak (Ostádalová et al 1982). Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy a BSP nem befolyásolta a szelén kezdeti (0-100 perc) renális exkrécióját.

Összefoglalva: a BSP azért fokozza a szelén biliáris exkrécióját szelenittal injektált patkányban, mert a szelenit nukleofil metabolitjaival közös metabolitokat képez, amik kiválasztódnak az epével. A keletkezett, BSP-t is és szelént is tartalmazó vegyületek sokkal kiválaszthatóbbak az epével, mint a szelenit epében megjelenő metabolitja a szelenodiglutation, ezért nagyobb sebességgel ürül a szelén az epébe szelenit BSP-vel való együttadásakor, mint a szelenit önmagában való adagolását követően.

## ÖSSZEFOGLALÁS

*Legfontosabb megfigyeléseinket röviden az alábbiakban foglalhatjuk össze:*

1. A periódusos rendszer Va oszlopába sorolt As és Sb nagy, a Bi mérsékelt, míg a VIa oszlopba tartozó Se kis sebességgel választódik ki az epével.

2. Az As, az Sb és a Bi hepatobiliáris transzportja szorosan, a Se biliáris exkréciója pedig több szempontból összefügg a szervezet GSH-homeosztázisával. Ezt a következtetést az alábbi észrevételeinkre alapozzuk.

a. A májbeli GSH depléciója az Va oszlop elemeinek kiválasztását gyakorlatilag megszünteti, a Se kiválasztását is jelentősen csökkenti.

b. A hepatobiliáris GSH-transzporter gátlói (ICG, BSP) nemcsak a GSH-kiválasztást, hanem az As, az Sb és a Bi hepatobiliáris transzportját is gátolják. Ezen transzporter blokkolói viszont nem csökkentik a Se epével való kiválasztását.

c. Az As, az Sb és a Bi dóziszfüggően, igen jelentősen fokozzák a GSH epével való kiválasztását, ezáltal csökkentik a máj GSH-tartalmát.

d. Az As, az Sb és a Bi, valamint a GSH általuk indukált biliáris exkréciója időben párhuzamos lefutású, mértékben pedig arányos.

e. Kísérleti eredményeink közvetve arra utalnak, hogy az As, az Sb és a Bi a GSH-val kémiai asszociáltan – instabil konjugátumot képezve – ürülnek az epével és ezáltal növelik a GSH biliáris exkrécióját.

f. Kromatográfias bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a szelenit szelenodiglutation formájában transzportálódik az epébe.

3. Az Va oszlop elemei és a szelén a szervezetben direkt kémiai kölcsönhatásba lépnek, ezáltal:

a. az arzén és az antimon igen jelentősen fokozzák a szelénkiválasztást,

b. a szelén fokozza az arzén epével való kiválasztását annak kémiai formájától függő mértékben.

4. A BSP igen jelentősen növeli a szelén biliáris exkrécióját, mert elektrofil sajátja révén közös metabolitot képez a szelenit nukleofil metabolitjaival, a képződött BSP-szelén metabolitok pedig gyorsan ürülnek az epével.

*Megfigyeléseink jelentőségét a következőkben látom:*

1. Állatkísérleteink hozzájárultak ahhoz, hogy megismerjük az As, Sb, Bi és Se biliáris exkréciójának mechanizmusát és limitáló tényezőit. Megállapítottuk, hogy az As, Sb, Bi és Se biliáris eliminációjának sebességét elsődlegesen a máj GSH kínálata határozza meg, valószínűleg azért, mert ezek az elemek csak GSH-val kapcsolt formában ürülhetnek az epével. Az As, Sb és Bi biliáris exkréciója másodsorban függ egy BSP-vel ill ICG-vel gátolható transzporter (epekanalikuláris GSH-transzporter?) aktivitásától is.

2. Megállapítottuk, hogy az Va oszlop elemei GSH-felhasználás révén csökkentik a máj GSH-tartalmát. Mivel interferálhatnak a máj GSH-homeosztázisával, hatásukra sérülhet az oxidatív károsodások, valamint a toxikus ill. karcinogén xenobiotikumok elleni GSH-függő védelem a szervezetben. E következményekkel számolni kell pl. az arzénnek, az antimonnak és a bizmutnak gyógyszerként használatos vegyületei alkalmazásakor, ill. nagy arzéntartalmú ivóvízzel ellátott területeken.

3. Kimutattuk, hogy az Va oszlop elemei jelentősen beavatkoznak a szelén szervezeten belüli sorsába. Ezáltal csökkenthetik az endogén szelénkészletet, és az esszenciális szelén elérhetőségét a kulcsfontosságú szelenoproteinek (pl. glutation peroxidáz, tioredoxin reduktáz, jodotironin dejodináz) szintéziséhez. Ezért felmerül a lehetőség, hogy a tartós As- vagy Sb-tartalmú gyógyszeres kezelés (tripanoszomiázis ill. leishmaniázis) során fellépő mellékhatások egy részének a terápia következtében kialakult szelénhiány lehet a hátterében.

4. Kísérleteinkben egy szerves elektrofil vegyületről, a BSP-ről kimutattuk, hogy az exogén szelenit szervezetben képződött nukleofil metabolitjaival kovalens reakcióba lép. Eddig is ismert volt a szelén védő hatása egyes szerves elektrofil vegyületekkel szemben, mint a toxikus nehézfémek (Cd, Hg), a daganatgátló fémkomplex ciszplatin, vagy a periódusos rendszer Va oszlopába tartozó arzén és antimon. Mivel számos karcinogén ill. toxikus vegyület elektrofil vagy elektrofil metabolitot képez, felmerül a kérdés, hogy a szelenit antikarcinogén hatásában szerepet játszhat-e – a BSP és szelén kölcsönhatásával analóg módon – a *nukleofil* szelenitmetabolitok és az *elektrofil* karcinogének közötti reakció. E kérdés megválaszolását célzó kísérleteink folyamatban vannak.

5. Megfigyeléseink – miszerint a periódusos rendszer Va oszlopába tartozó elemek valamint a BSP igen jelentősen fokozzák a szelén biliáris exkrécióját és a szervezetből való eliminációját – hozzásegíthetnek a szelénintoxikáció racionális kezelésében alkalmazható antidótum kifejlesztéséhez. Ennek fontosságát alátámasztja az a tapasztalat, hogy napjainkban az egyre elterjedtebb

táplálékkiegészítők szedéséből eredő véletlen (gyártási hiba), vagy a dózis helytelen ismeretéből adódó krónikus, de akár akut szelénintoxikációval is találkozhat a gyakorló orvos.

## IRODALOMJEGYZÉK

### I. Az értekezés elkészítésének alapjául szolgáló saját közlemények

1. Gyurasics Á and Gregus Z, Effect of arsenicals on biliary excretion of endogenous non-protein thiols, mercurials and sulfobromophthalein. *Arch Toxicol Suppl* **13**: 340-342, 1989.
2. Gyurasics Á, Varga F and Gregus Z, Effect of arsenicals on biliary excretion of endogenous glutathione and xenobiotics with glutathione-dependent hepatobiliary transport. *Biochem Pharmacol* **41**: 937-944, 1991.
3. Gyurasics Á, Varga F and Gregus Z, Glutathione-dependent biliary excretion of arsenic. *Biochem Pharmacol* **42**: 465-468, 1991.
4. Gyurasics Á, Koszorús L, Varga F and Gregus Z, Increased biliary excretion of glutathione is generated by glutathione-dependent hepatobiliary transport of antimony and bismuth. *Biochem Pharmacol* **44**: 1275-1281, 1992.
5. Gregus Z, Gyurasics Á and Koszorús L, Interactions between selenium and group Va metalloids (arsenic, antimony and bismuth) in the biliary excretion. *Environ Pharmacol Toxicol* **5**: 89-99, 1998.
6. Gyurasics Á, Perjési P and Gregus Z, Role of glutathione and methylation in the biliary excretion of selenium. The paradoxical effect of sulfobromophthalein. *Biochem Pharmacol*, **56**: 1381-1389, 1998.
7. Gregus Z, Gyurasics Á and Perjési P, Enhancement of selenium excretion in bile by sulfobromophthalein: elucidation of the mechanism. *Biochem Pharmacol*, **56**: 1391-1402, 1998.

## II. Az értekezéshez felhasznált irodalom

- Anundi I et al, GSH release in bile as influenced by arsenite. *FEBS Lett* **145**: 285, 1982.
- Bailly R et al, Experimental and human studies on antimony metabolism: their relevance for the biological monitoring of workers exposed to inorganic antimony. *Br J Ind Med* **48**: 93, 1991.
- Ballatori N, Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Adv Pharmacol* **27**: 271, 1994.
- Ballatori N, Clarkson TW, Biliary excretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundam Appl Toxicol* **5**: 398, 1985.
- Ballatori N, Truong AT, Relation between glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am J Physiol* **256**: G22, 1989.
- Berman JD, Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev Infect Dis* **10**: 560, 1988.
- Blecker U, Gold BD, Treatment of Helicobacter pylori infection: a review. *Pediatr Infect Dis J* **16**: 391, 1997.
- Bopp BA et al, Metabolic fate of selected selenium compounds in laboratory animals and man. *Drug Metab Rev* **13**: 271, 1982.
- Chan PC, Huff J, Arsenic carcinogenesis in animals and in humans: mechanistic, experimental and epidemiologic evidence. *Environ Carcinogen Ecotox Rev* **C15**: 83, 1997.
- Chen G-Q et al, Use of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia I. *Blood* **89**: 3345, 1997.
- Clark LC et al, Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *JAMA* **276**: 1957, 1996.
- Clark RF et al, Selenium poisoning from a nutritional supplement. *JAMA* **275**: 1087, 1996.
- Delnomdedieu M et al, Time dependence of accumulation and binding of inorganic arsenic species in rabbit erythrocytes. *Chem-Biol Interact* **98**: 69, 1995.

- Diplock AT, Metabolic aspects of selenium action and toxicity. *Crit Rev Toxicol* **4**: 271, 1976.
- Forbes GM et al, Duodenal ulcer treated with *Helicobacter pylori* eradication: seven year follow-up. *Lancet* **343**: 258, 1994.
- Frost DV, Arsenicals in biology – retrospect and prospect. *Fed Proc* **26**: 194, 1967.
- Frost DV, Arsenic and selenium in relation to the food additive law of 1958. *Nutr Rev* **18**: 129, 1960.
- Gailer J, Aposhian HV, The detection of a novel arsenic-selenium compound. *Toxicol Sci* **42**(1-S): 322, 1998.
- Ganther HE, Pathways of selenium metabolism including respiratory excretory products. *J Am Coll Toxicol* **5**: 1, 1986.
- Gasiewicz TA, Smith JC, The metabolism of selenite by intact rat erythrocytes *in vitro*. *Chem-Biol Interact* **21**:299, 1978.
- Griffith OW, Depletion of glutathione by inhibition of biosynthesis. *Methods Enzymol* **77**: 59, 1981.
- Gregus Z, Varga F, Role of glutathione and hepatic glutathione S-transferase in the biliary excretion of methylmercury, cadmium and zinc: a study with enzyme inducers and glutathione depletors. *Acta Pharmacol Toxicol* **56**: 398, 1985.
- Gregus Z et al, Correlation between hepatic transport of cholephilic organic anions and their effect on hepatic mitochondrial respiration. *Acta Med Acad Sci Hung* **36**: 197, 1979.
- Gregus Z, Klaassen CD, Disposition of metals in rats: a comparative study of fecal, urinary, and biliary excretion and tissue distribution of eighteen metals. *Toxicol Appl Pharmacol* **85**: 24, 1986.
- Hirooka T, Galambos JT, Selenium metabolism I. Respiratory excretion. *Biochim Biophys Acta* **130**: 313, 1966.
- Hoffman JL, The rate of transmethylation in mouse liver as measured by trapping S-adenosylhomocysteine. *Arch Biochem Biophys* **205**: 132, 1980.
- Ip C et al, Chemical form of selenium, critical metabolites and cancer prevention, *Cancer Res* **51**: 595, 1991.

- Jolliffe DM, A history of the use of arsenicals in man. *J Royal Soc Med* **86**: 287, 1993.
- Kaplowitz N et al, The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **25**: 715, 1985.
- Kaplowitz N et al, GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **377**: 267, 1996.
- König A et al, Comparative activity of melarsoprol and arsenic trioxide in chronic B-cell leukemia lines. *Blood* **90**: 562, 1997.
- Lerman S, Clarkson TW, The metabolism of arsenite and arsenate by the rat. *Fundam Appl Toxicol* **3**: 309, 1983.
- Levander OA, Baumann CA, Selenium metabolism VI. Effect on arsenic of the excretion of selenium in the bile. *Toxicol Appl Pharmacol* **9**: 106, 1966.
- Levander OA, A global view of human selenium nutrition. *Annu rev Nutr* **7**: 227 1987.
- Lu X et al, Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium. *Biochem Pharmacol* **50**: 213, 1995.
- Magee RJ, James BD, Selenium. In: *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*, p551. Eds Seiler H, Sigel A, Sigel H, Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, Hong Kong, 1996.
- McConnell KP, Roth DM, Respiratory excretion of selenium. *Proc Soc Exp Biol Med* **123**: 919, 1966.
- Moxon AL, The effect of arsenic on the toxicity of seleniferous grains. *Science* **88**: 81, 1938.
- Moxon AL et al, The influence of germanium, thallium, antimony and some organic arsenicals on the toxicity of selenium. *Proc S D Acad Sci* **26**: 21, 1946.
- Ostádalová I et al, Ontogenic changes in selenite metabolism in rats. *Arch Toxicol* **49**: 247, 1982.
- Plummer JL et al, Chemical depletion of glutathione *in vivo*. *Methods Enzymol* **77**: 50, 1981.
- Powis G et al, Selenium and the thioredoxin redox system: effects on cell growth and death. *Oncology Res* **9**: 303, 1997.

- Rayman MP, Dietary selenium: time to act. *Br Med J* **314**: 387, 1997.
- Rotruck JT et al, Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science* **179**: 588, 1973.
- Scott N et al, Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem Res Toxicol* **6**: 102, 1993.
- Sedlak J, Lindsay RH, Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* **25**: 192, 1968.
- Squibb KA, Fowler BA, The toxicity of arsenic and its compounds. In: *Biological and Environmental Effects of Arsenic*, p233. Ed Fowler, BA, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1983.
- Spallholz JE, On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Rad Biol Med* **17**: 45, 1994.
- Svardal AM et al, Differential metabolic response of rat liver, kidney and spleen to ethionine exposure. *S-Adenosylamino acids, homocysteine and reduced glutathione in tissues. Carcinogenesis* **9**: 227, 1988.
- Tandon S et al, The stimulation and inhibition of the exhalation of volatile selenium. *Biochem Pharmacol* **35**: 2763, 1986.
- Tietze F, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* **27**: 502, 1969.
- Yoon YB et al, Effect of side-chain shortening on the physiologic properties of bile acids: hepatic transport and effect on biliary secretion of 23-norursodeoxycholate in rodents. *Gastroenterology* **90**: 837, 1986.
- Vahter M, Envall J, *In vivo* reduction of arsenate in mice and rabbits. *Environ Res* **32**: 14, 1983.
- Whelan G et al, A direct assessment of the importance of conjugation for biliary transport of sulfobromophthalein sodium. *J Lab Clin Med* **75**: 542, 1970.
- Winship KA, Toxicity of bismuth salts. *Adv Drug React Ac Pois Rev* **2**: 103, 1983.
- Winship KA, Toxicity of antimony and its compounds. *Adv Drug React Ac Pois Rev* **2**: 67, 1987.
- Zhu J et al, Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 3978, 1997.



### III. Kongresszusi előadások és poszterbemutatók az értekezéshez kapcsolódó eredményekről

#### Előadások

1. Gyurasics Á, Gregus Z, Effect of arsenicals on biliary excretion of endogenous non-protein thiols, some mercurials and sulfobromophthalein. EUROTOX XXIX. Congress, Munich, Germany, 1988.
2. Gyurasics Á, Gregus Z, Kapcsolat a glutation és az arzén, antimon valamint a bizmut epével való kiválasztása között. XXI. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 1991.
3. Gyurasics Á, Koszorús L, Gregus Z, A glutation szerepe az arzén, antimon és bizmut hepatobiliáris transzportjában. Magyar Élettani Társaság LVII. Vándorgyűlése, Pécs, 1992.
4. Gyurasics Á, Gregus Z, Hasonlóságok és eltérések az arzén és a szelén biliáris exkréciójában. Magyar Toxikológusok Egyesülete TOX'96 Konferencia, Balatonfüred, 1996.
5. Gregus Z, Gyurasics Á, Perjési P, Miért fokozza a szelén biliáris exkrécióját a brómszulfalein? Magyar Toxikológusok Egyesülete TOX'96 Konferencia, Balatonfüred, 1996.
6. Gyurasics Á, Perjési P, Gregus Z, Role of glutathione and methylation in the biliary excretion of selenium. The paradoxical effect of sulfobromophthalein. Third International Conference of the Hungarian Biochemical Society, Pécs, 1997.
7. Gyurasics Á, Perjési P és Gregus Z, A glutation és a metiláció szerepe a szelén biliáris exkréciójában – a brómszulfalein paradox hatása. Farmakokinetika és Gyógyszermetabolizmus Konferencia. Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság, Mátraháza, 1998.
8. Gregus Z, Gyurasics Á és Perjési P, Kolefil BSP–Se metabolitok képződése felelős a brómszulfalein szelénkiválasztást fokozó hatásáért. Farmakokinetika és Gyógyszermetabolizmus Konferencia. Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság, Mátraháza, 1998.

9. Gyurasics Á, Koszorús L and Gregus Z, Interactions between selenium and group Va metalloids (arsenic, antimony and bismuth) in the biliary excretion. 6th Joint Meeting of the Italian, Polish and Hungarian Pharmacological Societies, Pisa, Italy, 1998.
10. Gyurasics Á, Gregus Z, Szervetlen és szerves arzénvegyületek kiválasztása az epébe. Magyar Toxikológusok Egyesülete TOX'98 Konferencia, Dobogókő, 1998.
11. Gregus Z, Gyurasics Á, Trimelarsan és melarsoprol metabolitok az epében - részleges GSH-függő biliáris exkréciójuk háttere. Magyar Toxikológusok Egyesülete TOX'98 Konferencia, Dobogókő, 1998.

#### Posztterek

1. Gyurasics Á, Gregus Z, Effects of arsenicals on biliary excretion of endogenous non-protein thiols and xenobiotics undergoing conjugation with glutathione. VIII. International Symposium on Drug Toxicity, Berlin, Germany, 1988.
2. Gyurasics Á, Gregus Z, Arzénvegyületek hatása a glutation és fémek kiválasztására. Magyar Élettani Társaság LIV. Vándorgyűlése, Debrecen, 1989.
3. Gyurasics Á, Gregus Z, Biliary excretion of arsenic, antimony and bismuth: the role of glutathione. 3rd Joint Meeting of Hungarian, Italian and Polish Pharmacological Societies, Modena, Italy, 1992.
4. Gyurasics Á, Perjési P, Gregus Z, Role of glutathione and methylation on the biliary excretion of selenium. The paradoxical effect of sulfobromophthalein. 35th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Seattle, WA, 1998.
5. Perjési P, Gyurasics Á, Gregus Z, Why does sulfobromophthalein (BSP) enhance the biliary excretion of selenium? 35th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Seattle, WA, 1998.
6. Gregus Z, Gyurasics Á and Perjési P, Selenite metabolites react in vivo with sulfobromophthalein (BSP) to form cholephilic BSP-Se metabolites. VIII. International Congress of Toxicology, Paris, 1998.

7. Gyurasics Á, Perjési P and Gregus Z, Glutathione-dependent biliary excretion of selenium is enhanced paradoxically by sulfobromophthalein. VIII. International Congress of Toxicology, Paris, 1998.