

Rola związków arsenu w stresie oksydacyjnym oraz w rozwoju cukrzycy

The role of arsenic compounds in oxidative stress and in the development of diabetes

Anna Bizoń^{1 (d, e)}, Aleksandra Andrzejewska^{2 (c)}, Halina Milnerowicz^{1 (a, b)}

¹ Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

² Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Kierownik katedry i zakładu: prof. dr hab. H. Milnerowicz

Rektor Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu: prof. dr hab. M. Ziętek

(a) koncepcja

(b) nadzór nad pisaniem pracy

(c) opracowanie literatury

(d) opracowanie tekstu

(e) tłumaczenie streszczenia

STRESZCZENIE

Arsen od wieków był wykorzystywany w medycynie, między innymi w leczeniu chorób skóry, malarii, cukrzycy, wrzodów żołądka i białaczki, a w XVIII i XIX wieku stanowił podstawę ówczesnej farmakologii. Obecnie, ze względu na jego toksyczne i kancerogenne działanie, większość związków tego pierwiastka została wycofana z użycia. Największym zagrożeniem dla człowieka nadal jest zanieczyszczona arsenem woda pitna oraz przemysł hutniczy.

Ekspozycja na związki arsenu skutkuje podrażnieniem żołądkowo-jelitowym, krwimoczem, wymiotami i biegunką, a także zmianami skórnymi. W skrajnych przypadkach może prowadzić do śmierci. Długotrwałe narażenie najczęściej powoduje choroby naczyń (np. choroba czarnej stopy) i rozwój nowotworów płuc, skóry, wątroby, nerek czy pęcherza moczowego.

Arsen jest metalem prozapalnym. Indukuje stres oksydacyjny, apoptozę, wpływa na proliferację komórek oraz na przebieg cyklu komórkowego. Pierwiastek ten indukuje również aterosclerogenezę i prowadzi do różnych chorób układu sercowo-naczyniowego. Ekspozycja na arsen może powodować uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego, a także obwodowe neuropatie i zmiany behawioralne. Generowanie przez arsen wolnych rodników ma związek z jego genotoksycznością i przyczynia się do rozwoju zmian nowotworowych. Według ostatnich badań, arsen stymuluje też rozwój cukrzycy typu 2. Najbardziej kancerogenne są związki arsenu na +3 stopniu utlenienia.

Arsen występuje w środowisku zwykle w obecności

innych metali ciężkich, co zwiększa ryzyko pojawienia się interakcji pomiędzy nimi. Nasila nefrotoksyczność kadmu i działa antagonistycznie w stosunku do selenu.

Badania dotyczące mechanizmu toksycznego oddziaływania arsenu na organizm człowieka są bardzo istotne i zwracają uwagę na problem dostępu do czystej wody pitnej w niektórych rejonach świata. Ludzie powinni być świadomi zagrożeń jakie wiążą się z ekspozycją na arsen, ponieważ jest on wszechobecny zarówno w środowisku naturalnym, jak i w przemyśle.

Słowa kluczowe: arsen, toksyczność, stres oksydacyjny, cukrzyca

SUMMARY

For many years arsenic compounds were used in medicine, including treatment of skin diseases, malaria, diabetes, malaria, stomach ulcers, leukemia and in the eighteenth and the nineteenth century formed the basis of contemporary pharmacology.

Due to its toxicity and carcinogenic activity, most of the compounds of this element were removed from use.

The major cause of human arsenic toxicity is attributed to contamination of potable water from natural geological sources rather than from mining, smelting and agricultural sources (pesticides or fertilizers). Tobacco smoke also contains arsenic compounds.

The characteristics of severe acute arsenic toxicity in humans include gastrointestinal discomfort, vomiting, diarrhea, skin lesions or even death. Chronic exposure

frequently causes vasoocclusive disease (such as Blackfoot disease), and the development of lung, skin, liver, kidney and bladder cancers.

Arsenic is a pro-inflammatory metal and appears to induce oxidative stress, apoptosis, affect cell proliferation and cell cycle progression. Generation of free radicals by arsenic is associated with its genotoxicity and contributes to the development of neoplastic lesions. Exposure to arsenic can also cause damage of the central nervous system, peripheral neuropathies, and behavioral changes. It was shown the association of exposure to arsenic and type 2 diabetes. Compounds with +3 oxidation state are more toxic and can induce tumor development.

Arsenic interacts with other heavy metals, e.g. enhances

the toxicity of cadmium nephropathy and acts antagonistically relative to selenium.

Studies on the mechanism of interacting the toxicity of arsenic in the human body are crucial and point to lack of access to pure potable water in some regions of the world.

People should be aware of the risks that are associated with exposure to arsenic because it is ubiquitous in the industry, as well as the environment. Arsenic is also involved in the spread of lifestyle diseases, especially cancer, and diabetes. Therefore, understanding of the mechanisms responsible for toxicity of arsenic compounds is significant.

Key words: arsenic, toxicity, oxidative stress, diabetes

WSTĘP

Arsen (As) jest jednym z najbardziej toksycznych pierwiastków występujących naturalnie w skorupie ziemskiej [1]. Również nieustanny rozwój przemysłu i postęp cywilizacyjny sprawiły, że pierwiastek ten jest coraz bardziej rozpowszechniony na świecie [2]. Właściwości chemiczne As mają wpływ na jego biotransformację, która z kolei decyduje o toksyczności tego pierwiastka [3]. As działa za pośrednictwem wielu różnych, częściowo jeszcze niezbadanych, mechanizmów, które z jednej strony stanowią o jego toksyczności, a z drugiej strony – pozwalają na jego wykorzystanie w medycynie, m.in. w terapii białaczki. As najczęściej występuje na +5 lub na +3 stopniu utlenienia [1]. Może występować zarówno w formie nieorganicznej, jak i organicznej [4]. Do jego najważniejszych form organicznych zalicza się: kwas metyloarsenowy (MMA^{5+}), kwas metyloarsenowy (MMA^{3+}), kwas dimetyloarsenowy (DMA^{5+}), kwas dimetyloarsenowy (DMA^{3+}), metyloarseny, sole tetrametyloarsoniowe, arsenocholinę, arsenobetainę oraz tlenek trimetyloarsyny [5]. W wielu rejonach świata dużym problemem jest jego obecność w wodach gruntowych [6].

W naturalnych warunkach As występujący w glebie i minerałach może być uwalniany do wody (znanych jest około 200 minerałów zawierających ten pierwiastek). Jednak największe ilości As są uwalniane do środowiska w wyniku działalności antropogenicznej, w której przeważają górnictwo, hutnictwo, stosowanie pestycydów [1]. Utrudniony dostęp do czystej wody pitnej stał się problemem dotyczącym wielu osób w różnych miejscach na świecie. Niepokojąco wysoki poziom As zanotowano m.in. w: Bangladeszu, Indiach, Wietnamie, Tajlandii i Tajwanie [6]. Zgodnie ze standardami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) stężenie As

w wodzie pitnej nie powinno przekraczać 10 $\mu\text{g/l}$, jednak w niektórych regionach świata jest ono znacznie większe [6]. Przebadana woda pitna na terenie Zachodniej Bengalii zawierała As w stężeniu nawet do 1000 $\mu\text{g/l}$, natomiast najwyższe stężenie odnotowano w wiosce Ramnagar i wynosiło 3700 $\mu\text{g/l}$ [5].

ZASTOSOWANIE As W LECZNICTWIE

Arsen ma długą historię wykorzystania zarówno jako trucizna, jak i lek [7]. Już w starożytności do leczenia chorób płuc i skóry stosowano mieszaniny siarczków arsenu – realgar i aurypigment [8] a w XVIII i XIX w. As niemalże stanowił podstawę ówczesnej farmakologii. Wykorzystywano także właściwości przeciwgorączkowe, antyseptyczne, rozkurczowe, żółciopędne, uspokajające i tonizujące związków As [9]. Na początku XX w. zaczęto stosować związki organiczne As na większą skalę, traktując je jako mniej toksyczne niż formy nieorganiczne. Jednak w drugiej połowie XX w. wycofano praktycznie wszystkie leki arsenowe, głównie z powodu ich właściwości kancerogennych oraz ze względu na rozwój radioterapii i chemioterapii. W latach 70. w Chinach ponownie zastosowano As_2O_3 w leczeniu różnych rozrostowych chorób układu krwiotwórczego, a przede wszystkim w ostrej białaczce promielocytowej [9]. Obecnie bardzo ograniczone zastosowanie ma m.in. acetarsol (kwas 3-acetyloamino-4-hydroksyfenyloarsenowy) o właściwościach krętkobójczych i czerwobójczych oraz melarsoprol, stosowany w leczeniu trypanosomiozy [8]. Do lat 90. XX wieku sądzono, że metylowane formy As prowadzą do detoksykacji tego pierwiastka [1]. Natomiast Yamamoto i wsp. w 1995 roku wykazali, że metylowane formy As są bardziej zaangażowane w procesy toksyczne aniżeli w detoksykacyjne [10].

LOSY ZWIĄZKÓW As W ORGANIZMIE

Przemiany, jakim ulegają związki As w organizmie człowieka, przypominają te, którym podlegają inne ksenobiotyki [1]. Absorpcja związków As w przewodzie pokarmowym zależy głównie od ich rozpuszczalności. Nieorganiczne związki As^{+3} dobrze rozpuszczają się w wodzie i wchłaniają się z przewodu pokarmowego w 45–95%, z kolei organiczne arseniany ulegają wchłonięciu w 75–85%. Arseniany (+3), które są niezjonizowane w fizjologicznym pH, przenikają przez błonę komórkową szybciej niż arseniany (+5), które są naładowane ujemnie. Wykazano jednak, że w obu przypadkach mamy do czynienia z transportem aktywnym. Arseniany (+3) są transportowane za pomocą specjalnych białek – akwagliceroporyn (AQP7 i AQP9), które transportują również wodę i glicerol, natomiast arseniany (+5) dostają się do wnętrza komórek przy udziale transporterów fosforanowych [4, 11]. Jednak molekularne mechanizmy transportu organicznych form As nie zostały do końca poznane.

Oprócz drogi pokarmowej pierwiastek ten może się również wchłaniać przez drogi oddechowe, a proces ten zależy od właściwości chemicznych oraz od postaci i rozmiaru cząstek As występujących w powietrzu.

ZATRUCIA As

As jest silnie toksycznym pierwiastkiem [1]. Zatrucie może prowadzić do śmierci na skutek allosterycznej inhibicji enzymów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Początkowo inhibicji ulegają enzymy, które wymagają kwasu liponowego jako kofaktora takie jak: dehydrogenaza pirogronianowa i α -ketoglutaryna. Zablokowanie tych enzymów prowadzi do akumulacji odpowiednich substratów, takich jak: pirogronian i mleczan, co z kolei ma bezpośredni wpływ na pracę mózgu, powodując poważne zaburzenia neurologiczne, a nawet śmierć [2].

W literaturze pojawiły się informacje dotyczące prozapalnego oddziaływania As. Pierwiastek ten może działać za pomocą niespecyficznych mechanizmów, takich jak zapalenie, stres oksydacyjny czy apoptoza [2], które mogą leżeć u podstaw wielu różnych chorób związanych z ekspozycją na As, np. cukrzycy i nowotworów. Podstawowym mechanizmem, który może doprowadzić do rozwoju zapalenia, jest indukcja stresu oksydacyjnego przez As [12]. Z kolei wpływ As na ekspresję genów zaangażowanych w przebieg apoptozy i cyklu komórkowego

znalazł zastosowanie w terapii niektórych nowotworów.

WPŁYW STRESU OKSYDACYJNEGO NA GENOTOKSYCZNOŚĆ As

Stres oksydacyjny polega na spadku możliwości redukcyjnych komórki [13]. Efekty tych zaburzeń zależą od zasięgu tego stresu. Działania toksyczne związane są z produkcją nadrodników i wolnych rodników, które powodują oksydacyjne uszkodzenia poszczególnych składników komórki, zwłaszcza białek, lipidów i DNA. Umiarkowana oksydacja może indukować apoptozę, natomiast nasilona może prowadzić do nekrozy [14, 15]. Nasilony stres oksydacyjny zmniejsza pulę ATP, co z kolei uniemożliwia apoptozę komórki, powodując jej martwicę. Badania dowiodły, że związki As indukują produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) zarówno w komórkach nowotworowych, jak i zdrowych, a stres oksydacyjny jest jednym z mediatorów apoptozy [14, 15].

Uszkodzenie DNA u osób narażonych na związki As może być konsekwencją produkcji wolnych rodników podczas metabolizmu komórkowego. Wewnątrzkomórkowa biotransformacja arsenianów (III) do organicznych pochodnych (DMA^{III}) może być połączona z produkcją reaktywnych anionów ponadtlenkowych ($O_2^{\bullet-}$) i rodników hydroksylowych ($OH^{\bullet-}$). Zasugerowany przez Liu [15] przebieg reakcji prowadzących do efektów genotoksycznych to:



Apoptoza, w przeciwieństwie do nekrozy, to fizjologiczna, samobójcza śmierć określonej komórki, zaprogramowana genetycznie, przebiegająca z udziałem metabolizmu komórkowego i aktywnie regulowana przez indukcję odpowiednich genów oraz syntezę specyficznych białek [16]. Indukcja apoptozy jest jednym z podstawowych mechanizmów działania As [8]. Pierwiastek ten jest silnie genotoksyczny i prowadzi do bardzo poważnych zmian w strukturze DNA. Uszkodzenia te są najpierw wykrywane przez specjalne systemy białkowe (ATM/ATR), a następnie dochodzi do przesyłania sygnałów do poszczególnych komórek efektorowych, żeby zapobiec tranzycji cyklu komórkowego czyli zatrzymania fazy G1 i G2. Efektem końcowym jest zapoczątkowanie szlaku apoptozy i naprawy DNA [1].

As może indukować zaprogramowaną śmierć komórki już przez bezpośrednie działanie na mitochondrialny potencjał międzybłonowy. Mitochondrium odgrywa kluczową rolę w przebiegu wewnątrz-

nego szlaku apoptozy, do aktywacji którego dochodzi m.in. w wyniku podwyższenia poziomu RFT w komórce, pod wpływem stresu oksydacyjnego, zaburzeń transportu elektrolitów czy poważnych uszkodzeń DNA [17]. W odpowiedzi komórki na te czynniki bierze udział białko p53 zwane także TP53 (*transcription protein 53*) – jedno z ważniejszych czynników transkrypcyjnych genów zaangażowanych w przebieg mitochondrialnego szlaku apoptozy. W przypadku stresogennych warunków, białko p53 może przemieścić się do mitochondrium i wywołać permeabilizację błony zewnętrznej. Efektem jest utworzenie kompleksu z białkami Bcl-XL oraz Bcl-2, a następnie uwolnienie do cytoplazmy cytochromu c, który współdziałając z czynnikiem Apaf-1 oraz prokaspazą 9, w obecności ATP, uruchamia kaskadę kaspaz wykonawczych, która prowadzi do apoptozy komórki [18]. Poza cytochromem c uwalniane są również czynniki, takie jak: endonukleaza G, AIF (czynnik indukujący apoptozę), IAP (białka hamowania apoptozy) i inne czynniki proapoptotyczne. Funkcje regulatorowe spełniają natomiast białka umiejscowione w cytoplazmie, m.in. proteiny z rodziny Bcl-2 regulujące przepuszczalność błony mitochondrialnej oraz białka szoku cieplnego (Hsp) wpływające na aktywność kaspaz i działające protekcyjnie na strukturę cytoskieletu. Istotną rolę odgrywa białko Hsp27, które może wiązać się z cytochromem c i w ten sposób zapobiegać przyłączaniu przez niego prokaspazy 9. As może także hamować aktywność prokaspazy 3, a podwyższony poziom tego czynnika (podobnie jak innych białek szoku cieplnego) obserwuje się w przebiegu różnych chorób nowotworowych, m.in. raka piersi, nerki i pęcherza moczowego [17].

As wpływa również na aktywność innych enzymów oraz ekspresję czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w przebieg apoptozy. Jednym z mechanizmów, za pośrednictwem których As oddziałuje na komórkę, jest hamowanie aktywności enzymu PARP (polimerazy poli-ADP-rybozy) [1]. Badania na komórkach HeLa wykazały, że inhibicja PARP-1 następuje już przy stężeniach As w granicach 10 nM.

Wpływ As na przebieg apoptozy i cyklu komórkowego nie tylko stanowi o toksyczności tego pierwiastka, ale może być też wykorzystywany w terapii nowotworów. Badania dowiodły, że As_2O_3 hamuje proliferację komórek nowotworów zlokalizowanych w głowie i szyi poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, co z kolei jest związane z indukcją białka p21, którego poziom w komórce regulowany jest na drodze zależnej i niezależnej od białka p53, oraz z redukcją aktywności kinazy CDC2,

która jest niezbędna do przeprowadzenia fazy G1/S i G2/M [19]. Takich badań w ostatnich latach przeprowadzono znacznie więcej, choć dla wielu osób stosowanie związków As w terapii jest nadal bardzo kontrowersyjnym i ryzykownym rozwiązaniem.

EKSPOZYCJA NA As A CUKRZYCA

Przeprowadzono szereg badań *in vivo* i *in vitro*, mających na celu potwierdzenie wpływu As na rozwój cukrzycy u ludzi [20]. Analizowano *in vitro* zależność pomiędzy związkami As i metabolizmem glukozy, jednak żadne z tych badań nie przeprowadzono na ludzkich liniach komórkowych. Potwierdzono wpływ As na ekspresję genów i transdukcję sygnałową insuliny. Część doświadczeń wykonano w transfekowanych mysich komórkach β trzustki, gdzie ekspozycja na wysokie stężenia As była porównywalna do wysokiego stężenia glukozy we krwi. Zaobserwowano stymulujący wpływ As na czynnik IUF-1 (ang. *insulin upstream factor 1*) [21] oraz na proces translokacji tego czynnika z cytoplazmy do jądra [22]. Czynnik IUF-1, zwany inaczej PDX1 (ang. *pancreatic and duodenal homeobox 1*), jest czynnikiem transkrypcyjnym, który łączy się z promotorem ludzkiego genu insuliny i powoduje wzrost poziomu mRNA w odpowiedzi na glukozę [20]. Udowodniono, że As zaburza pracę czynników transkrypcyjnych biorących udział w związanej z insuliną ekspresji genów. W kolejnych doświadczeniach zbadano wpływ As na różnicowanie adipocytów i ekspresję receptora PPAR γ (ang. *peroxisome proliferative-activated receptor γ*). Uzyskane efekty zależały od czasu ekspozycji na As i jego stężenia. Inkubacja preadipocytów przez 3 dni arsenianem o stężeniu 0,25 i 0,5 μ M powodowała indukcję ekspresji PPAR γ , z kolei w przypadku stężenia 6 μ M i 2-miesięcznej inkubacji obserwowano zmniejszenie różnicowania adipocytów przez inhibicję PPAR γ [23].

Badano wpływ As na wychwyt glukozy, stosując bardzo wysokie stężenia As [20, 24]. Uzyskano niejednoznaczne wyniki w zależności od tego, czy komórki poddano działaniu jedynie As, czy też As i insuliny jednocześnie. W pierwszym przypadku obserwowano zwykle nasilony wychwyt glukozy, natomiast w drugim przypadku – zmniejszony wychwyt glukozy w komórkach wrażliwych na insulinę [20, 24]. Wyniki badań nie wyjaśniły jednoznacznie roli As w powstawaniu cukrzycy u człowieka.

Doświadczenia *in vivo* przeprowadzone na zwierzętach nie dały również jednoznacznych wyników.

Ma to związek z faktem, że w badaniach eksperymentalnych stosowano bardzo duże stężenia związków As, znacznie przekraczające wartości występujące w środowisku naturalnym. Rekomendowane przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska stężenie As w wodzie pitnej wynosi 10 ppb, natomiast najniższe stężenie As użyte w badaniach na hodowlach komórkowych wynosiło 750 ppb, a w badaniach prowadzonych na zwierzętach – 5,550 ppb [20].

Przeprowadzono badania wśród populacji zawodowo narażonych na As, w miejscach o szczególnym zanieczyszczeniu tym pierwiastkiem (Tajwan i Bangladesz). Stopień ekspozycji na As zależał od zajmowanego stanowiska i rodzaju wykonywanej pracy. Mierzono całkowite stężenie As w osoczu i moczu. Wyniki badań były jednak bardzo różne i nie potwierdziły jednoznacznie zależności pomiędzy ekspozycją na As a rozwojem cukrzycy typu 2 [20]. Analogiczne wyniki uzyskano w przypadku populacji spoza obszarów o szczególnie wysokim stężeniu As w wodzie pitnej [20]. Natomiast badania wykonywane w Tajwanie i Bangladeszu wskazały na zależność między przewlekłym narażeniem na As w wodzie pitnej a zwiększonym ryzykiem zachorowania na cukrzycę typu 2. Względne ryzyko wystąpienia tej jednostki chorobowej wahało się między 1,46 a 10,1. Jednak interpretacja uzyskanych wyników nie jest jednoznaczna, głównie ze względu na trudności z oszacowaniem ilości wypitej wody zawierającej związku As [20]. Możliwe również, że wyniki badań przeprowadzonych na populacjach zamieszkujących obszary Tajwanu i Bangladeszu nie mogą być przypisywane innym populacjom, także narażonym na kontakt ze związkami As w wodzie pitnej. Przyczyną mogą być różnice w polimorfizmie genów biorących udział w metabolizmie As oraz w indukowaniu odpowiedzi na zatrucie tym pierwiastkiem [25]. Dodatkowo różnice w diecie oraz niedobory poszczególnych składników mogą istotnie wpływać na przyswajanie As. Poziom cynku i selenu (Se) w Tajwanie i Bangladeszu należy do najniższych na świecie. Dieta uboga w Se okazała się być jednym z ważniejszych czynników sprzyjających rozwojowi nowotworów oraz zatruciu As, zwłaszcza w Bangladeszu i Zachodnim Bengalu w Indiach. W badaniach na świnkach morskich udowodniono, że Se i As mają antagonistyczny wpływ na metabolizm glukozy i że ekspozycja na wysokie stężenia As połączona z niskim poziomem Se w diecie może odgrywać dużą rolę w rozwoju cukrzycy [20].

Zatrucie As i jego wpływ na metabolizm glukozy są związane głównie z reaktywnością tego pierwiast-

ka wobec grup tiolowych (SH) [20]. Arseniany (+5) mogą zastępować fosforany w reakcjach energetycznych i zaburzać proces oksydatywnej fosforylacji. Natomiast arseniany (+3) są inhibitorami dehydrogenazy pirogronianowej i α -ketoglutarynowej [11], enzymów niezbędnych w procesach glukoneogenezy oraz glikolizy. Te wszystkie efekty toksyczne są związane głównie z ostrym zatruciem As, natomiast prawdopodobieństwo ich wystąpienia w wyniku przewlekłej ekspozycji na odpowiednio niższe dawki tego pierwiastka jest znacznie mniejsze [12].

Bezpośrednio związany z rozwojem cukrzycy może być wpływ As na ekspresję czynników transkrypcyjnych, mimo że wyniki badań nie były jednoznaczne, zwłaszcza w przypadku oddziaływania As z czynnikiem I κ B-1 oraz PPAR γ . Konieczne jest wykonanie większej ilości badań oraz wzięcie pod uwagę innych możliwych czynników, za pomocą których As mógłby indukować rozwój cukrzycy typu 2. Do takich mechanizmów należy m.in. oddziaływanie As z receptorem glukokortykoidowym. Proces ten jest zależny od dawki i udowodniono, że As w małych stężeniach (16–120 ppb) działa stymulująco na transkrypcję genów związanych z tym receptorem, natomiast w większych stężeniach (powyżej 120 ppb) ma działanie przeciwne. Receptor glukokortykoidowy bierze udział w regulowaniu glukoneogenezy. Wyniki badań wykazały, że zmniejszenie jego ekspresji w komórkach wątroby i w tkance tłuszczowej nasilają hiperglikemię u gryzoni z potwierdzoną cukrzycą [12, 26].

Badania eksperymentalne dotyczące wychwytu glukozy pokazały, że arseniany (+3) nasilają ten proces niezależnie od wcześniejszych etapów syntezy insuliny, natomiast w obecności insuliny zaobserwowano efekt przeciwny (badania wykonano na 3T3-L1 adipocytach). O niejednoznaczności otrzymanych wyników świadczył m.in. fakt, że badane komórki poddawano wpływowi wysokich stężeń As przez kilka godzin, podczas gdy rzeczywiste narażenie na kontakt z tym pierwiastkiem trwa od kilku do nawet kilkudziesięciu lat, a stężenia As występującego w środowisku naturalnym są nieporównywalnie niższe od tych, które zostały użyte w doświadczeniach [12, 20].

As może wpływać na rozwój cukrzycy również za pomocą innych, niespecyficznych mechanizmów, takich jak: stres oksydacyjny, apoptoza i zapalenie. Ekspozycja na As nasila produkcję RFT i może zaburzać aktywność kluczowych enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: reduktaza glutationu, glutationo-S-transferaza, peroksydaza glutationowa oraz dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa [15]. As

może również indukować peroksydację lipidów [27], zwiększać wydzielanie IL-6 i innych cytokin zapalnych [2], a także indukować uwalnianie TNF- α z jednojądrowych komórek [28]. Pierwiastek ten indukuje też apoptozę w licznych liniach komórkowych [29]. Wszystkie powyższe mechanizmy powinny zostać dokładniej zbadane pod kątem ich wpływu na rozwój cukrzycy typu 2 u osób narażonych na kontakt z As.

WSPÓŁDZIAŁANIE As Z INNYMI METALAMI CIĘŻKIMI

Metale ciężkie, takie jak: ołów (Pb), kadm (Cd) czy As wykazują bardzo podobne działanie toksyczne, co z kolei prowadzi do nasilenia objawów zatrucia przy jednoczesnej ekspozycji na więcej niż jeden metal [30]. Ponieważ Pb, Cd i As są wydalane głównie z moczem, działają nefrotoksycznie. Szczególnie wrażliwe są kanaliki proksymalne, co ma bezpośredni związek z ich aktywnością reabsorpcyjną [31]. Toksyczne efekty działania Pb, Cd i As zależą m.in. od ich formy chemicznej, dawki, a także od rodzaju ekspozycji. Badania dowodzą, że mechanizmy patologiczne, za pomocą których działają powyższe metale, mogą być modyfikowane w zależności od interakcji zachodzących pomiędzy nimi w obrębie nerek [32]. Na przebieg reakcji metal-metal ma również wpływ komórkowy poziom białek wiążących metale oraz ciałek wtrętowych.

Powszechnie wiadomo, że dużą rolę w odpowiedzi na zatrucie metalem ciężkim pełni metalotioneina (MT), niskocząsteczkowe białko (6–10 kDa) z wysoką zawartością reszt cysteinowych [33]. Białko to charakteryzuje się zdolnością wiązania metali niezbędnych, takich jak cynk (Zn) czy miedź (Cu), oraz toksycznych, m.in. Cd czy Hg [34]. Metale te są również induktorami syntezy MT, a ona sama jest najczulszym markerem narażenia na Cd i mimo że jej fizjologiczna rola nie została do końca wyjaśniona, to z pewnością bierze udział w mechanizmach adaptacyjnych organizmu spowodowanych stresem oraz pełni rolę antyoksydanta [35]. W przypadku As jej rola nie jest jednoznaczna. Przeprowadzono badania na myszach doświadczalnych, którym podawano CdCl₂ (100 ppm Cd) lub NaAsO₂ (22,5 ppm As), a także oba związki równocześnie [37]. Badania dotyczyły zarówno myszy z wyłączoną ekspresją genów kodujących MT (*MT-null*), jak i typu dzikiego (*WT*). Wyniki wykazały, że Cd jest bardziej nefrotoksyczny niż As, a oba te pierwiastki w połączeniu dawały silniejszy efekt toksyczny niż każdy pierwiastek oddzielnie. U myszy otrzymują-

cych zarówno As, jak i Cd, degeneracja i atrofia kanalików proksymalnych, zaburzenia czynności kłębuszków nerkowych oraz zwłóknienie śródmiąższowe były bardziej nasilone niż te wywołane przez pojedynczy metal. Ponadto myszy z delecją genów kodujących MT były bardziej podatne na toksyczne działanie obu metali. W przypadku zastosowania połączenia As z Cd obserwowano u nich zmniejszenie masy ciała, enzymurię, glukozurię, proteinurię oraz nefropatię [37]. Dlatego przyjmuje się, że As może nasilać nefrotoksyczność Cd, a wewnątrzkomórkowy poziom MT wpływa na osłabienie działania nefrotoksycznego, zarówno w przypadku ekspozycji na Cd, jak i As.

Przeprowadzono badania dotyczące współdziałania As i Cd na funkcjonowanie nerek. W badaniach prowadzonych w prowincji Guizhou w Chinach analizowano obecność w moczu biomarkerów narażenia na oba pierwiastki takich jak: β -2-mikroglobulina (β -2MG), N-acetyloglukozaminidaza (NAG) oraz albuminy (ALB) [31]. Wykazano wzrost stężenia β -2MG, NAG i ALB w moczu osób narażonych na Cd i As oraz potwierdzono, że jednoczesna ekspozycja na Cd i nieorganiczny As powoduje większe uszkodzenia nerek niż narażenie na jeden z tych pierwiastków [31].

Zaobserwowano, że w przypadku jednoczesnej ekspozycji na As, Cd, Pb i chrom (Cr) ich efekty toksyczne mogą się sumować, a czasem nawet – znosić wzajemnie. Zależy to od rodzaju reagujących ze sobą pierwiastków, a także od narządu bądź układu, w którym do takiej interakcji dochodzi [37]. W wyniku współdziałania ze sobą poszczególnych pierwiastków ich toksyczność może ulec zwiększeniu, może pozostać taka sama lub też może się zmniejszyć [37].

ANTAGONISTYCZNE I SYNERGISTYCZNE DZIAŁANIE As I Se

Od wielu lat prowadzi się badania dotyczące interakcji pomiędzy As a Se – jednym z niezbędnych ultraelementów, który musi być dostarczany do organizmu wraz z pożywieniem. Wykazano, że Se może zmniejszać toksyczność niektórych metali, w tym As. W badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach eksponowanych na NaAsO₂ oraz Na₂SeO₃ wykazano, że Se działał protekcyjnie przeciwko genotoksycznemu działaniu As [38]. Wynikało to głównie z faktu, że Se jest bardzo skutecznym antyoksydantem, ponadto hamuje podział komórek rakowych i powstrzymuje ich przerzuty do innych tkanek. Pierwsze badania dotyczące inte-

rakcji pomiędzy As i Se wykazały, że pierwiastki te przeciwdziałają wzajemnie swojej toksyczności. Pobranie i wchłonięcie jednego z nich powoduje uwolnienie, redystrybucję bądź też eliminację drugiego, zarówno poprzez drogi moczowe, żółciowe, jak i oddechowe [39]. Jednak precyzyjne mechanizmy tych interakcji na poziomie molekularnym nie zostały do końca poznane.

Antagonizm obu pierwiastków może mieć również związek z ich podobnymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Jony Se^{4+} i As^{3+} mają taką samą strukturę elektronową, co powoduje, że absorpcja selenianów (IV) jest silnie hamowana przez arseniany (III) w tkankach [39]. Nie bez znaczenia jest również wpływ obu pierwiastków na funkcje palców cynkowych, które biorą udział w wiązaniu cząsteczki kwasu nukleinowego przez białko. Wiele czynników transkrypcyjnych, białek regulatorowych, a także innych białek wiążących DNA zawiera tego typu domeny. Do zachowania ich stabilności niezbędne są właśnie jony Zn. W badaniach z użyciem m.in. selenocystaminy stwierdzono, że już w małych stężeniach może ona uwalniać jony Zn z MT poprzez oksydację grup tiolowych. Ten sposób wiązania Zn w MT przypomina jego połączenie w jednym z najważniejszych czynników transkrypcyjnych oraz w innych palcach cynkowych, które są również celem działania As. Wykazano, że wszystkie związki As^{III} mogą uwalniać z nich Zn (na przykładzie białka typu A skóry pergaminowej – XPA). Ponadto MMA^{III} i DMA^{III} reagują nawet silniej od nieorganicznych arsenianów (III) [39]. Wyniki tych badań wykazują, że Se i As nie zawsze działają wyłącznie antagonistycznie. Pierwiastki te mogą również działać synergistycznie, co jest bardzo istotne ze względu na fakt, że palce cynkowe biorą udział w niemal wszystkich reakcjach komórkowych odpowiedzialnych za utrzymanie stabilności genomu. W związku z tym, ich unieaktywowanie może prowadzić do zwiększonej niestabilności genomu.

Antagonizm pomiędzy Se i As jest także widoczny na poziomie różnych wewnątrzkomórkowych dróg sygnalizacyjnych. Arsen aktywuje m.in. kinazę MAPK, czynnik NF- κ B oraz procesy naprawy DNA związane z generowaniem reaktywnych rodników tlenowych. Aktywuje kompleks białkowy AP-1, podczas gdy Se działa zupełnie przeciwnie – tłumi aktywację i NF- κ B, i AP-1. Istotny jest również fakt, że jony Se^{4+} powodują inhibicję As^{3+} , a także indukowanej As^{5+} sygnalizację JNK/AP-1 [39].

Przeprowadzono badania na komórkach białaczki promielocytowej HL-60 z użyciem Na_2SeO_3 , NaAsO_2 oraz Na_2HAsO_4 . Wykazano, że apoptoza

zachodzi już przy następujących stężeniach jonów: Se^{4+} (3 μM) > As^{3+} (50 μM) > As^{5+} (500 μM). Wyższe stężenia powodowały nekrozę. Zauważono także, że to nekrotyczne działanie Se, wywoływane przez wysokie stężenia Se^{4+} , jest hamowane przez jony $\text{As}^{3+}/\text{As}^{5+}$ [39]. Wyniki tych badań sugerują zatem, że Se może funkcjonować jako endogenne sygnał hamujący dla indukowanej As komórkowej sygnalizacji kancerogennej.

PODSUMOWANIE

Narażenie na związki arsenu może skutkować rozwojem chorób nowotworowych. Z drugiej strony związki arsenu znalazły zastosowanie w terapii niektórych nowotworów, głównie ze względu na ich wpływ na ekspresję genów zaangażowanych w przebieg apoptozy i cykl komórkowy.

As może działać antagonistycznie lub synergistycznie z innymi pierwiastkami. Se i As mają antagonistyczny wpływ na metabolizm glukozy, a ekspozycja na wysokie stężenia As połączona z niskim poziomem Se w diecie może odgrywać istotną rolę w rozwoju cukrzycy. Jednak bezpośredni związek z ekspozycją na As a rozwojem cukrzycy jest niejednoznaczny i wymaga dalszych badań.

Z kolei Cd z As działają synergistycznie. Chociaż Cd jest bardziej nefrotoksyczny niż As, to oba te pierwiastki w połączeniu są bardziej toksyczne niż każdy pierwiastek oddzielnie.

WYKAZ PIŚMIENNICTWA

1. Ghosh P., Banerjee M., Giri A.K., et al.: Toxicogenomics of arsenic: Classical ideas and recent advances. *Mutat. Res.* 2008; 659: 293-301.
2. Wu M.M., Chiou H.Y., Ho I.C., et al.: Gene expression of inflammatory molecules in circulating lymphocytes from arsenic-exposed human subjects. *Environ. Health Perspect.* 2003; 109: 1011-1017.
3. Styblo M., Del Razo L.M., Vega L., et al.: Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol.* 2000; 74: 289-99.
4. Rossman T.G.: Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat. Res.* 2003; 533: 37-65.
5. Niedzielski P., Siepak M., Siepak J.: Występowanie i zawartości arsenu, antymonu i selenu w wodach i innych elementach środowiska. *Roczn. Ochr. Środ.* 2000; 2: 317-341.
6. Nordstrom DK. Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science.* 2002; 296: 2143-5.
7. Hosiner D., Lempiäinen H., Reiter W., et al.: Arsenic toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* is a consequence of inhibition of the TORC1 kinase combined with a chronic stress response. *Mol Biol Cell.* 2009; 20: 1048-57.

8. Mead M.N.: Arsenic: In search of an antidote to a global poison. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113: 379-386.
9. Dmoszyńska A., Górka M.: Trójtlenek arsenu, stary lek-nowe oblicze. *Acta Haematologica Polonica* 2004; 35: 5-14.
10. Yamamoto S., Konishi Y., Matsuda T., et al.: Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Res.* 1995; 55: 1271-6.
11. Hughes M.F.: Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 2002; 133: 1-16.
12. Tseng C.H.: The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004; 197: 67-83.
13. Lantz R.C., Hals A.M. Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity. *Drug Metab. Rev.* 2006; 38: 791-804.
14. Buttke T.M., Sandstrom P.A.: Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 1994; 15: 7-10.
15. Liu S.X., Athar M., Lippai I., et al.: Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 98: 1643-1648.
16. Reed J.C.: Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 2000, 157, 1415-1430.
17. Łabędzka K., Grzanka A., Izdebska M.: Mitochondrium a śmierć komórki. *Postepy Hig. Med. Dosw. (online)* 2006; 60: 439-446.
18. Marchenko N.D., Zaika A., Petrenko O., et al.: p53 has a direct apoptogenic role at mitochondria. *Mol. Cell* 2003; 11: 577-590.
19. Seol J.G., Park W.H., Kim E.S., et al.: Effect of arsenic trioxide on cell cycle arrest in head and neck cancer cell line PCI-1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999; 265: 400-404.
20. Navas-Acien A., Silbergeld E.K., Streeter R.A., et al.: Arsenic exposure and type 2 diabetes: a systematic review of the experimental and epidemiologic evidence. *Environ. Health Perspect.* 2006; 114: 641-648.
21. Macfarlane W.M., Smith S.B., James R.F., et al.: The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 20936-20944.
22. Elrick L.J., Docherty K.: Phosphorylation-dependant nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* 2001; 50: 2244-2252.
23. Wauson E.M., Langan A.S., Vorce R.L.: Sodium arsenite inhibits and reverse expression of adipogenic and fat cell-specific genes during in vitro adipogenesis. *Toxicol. Sci.* 2002; 65: 211-219.
24. Bazuine M., Ouwens D.M., Gomes de Mesquita D.S., et al.: Arsenite stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes involves both Glut4 translocation and p38 MAPK activity. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270: 3891-3903.
25. Chen C.J., Hsueh Y.M., Lai M.S., et al.: Increased prevalence of hypertension and long-term arsenic exposure. *Hypertension.* 1995; 25: 53-60.
26. Bodwell J.E., Kingsley L.A., Hamilton J.W.: Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR)-mediated gene activation but not GR-mediated gene repression: complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding domain. *Chem. Res. Toxicol.* 2004; 17: 1064-1074.
27. Lin T.H., Huang Y.L., Tseng W.C.: Arsenic and lipid peroxidation in patients with blackfoot disease. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1995; 54: 488-493.
28. Ye B., Maret W., Vallee B.L.: Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001; 98: 2317-22.
29. Woo S.H., Park I.C., Park M.J., et al.: Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells. *Int. J. Oncol.* 2002; 21: 57-63.
30. Wang G., Fowler B.A.: Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008; 233: 92-99.
31. Nordberg G.F., Jin T., Hong F., et al.: Biomarkers of cadmium and arsenic interactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 206: 191-197.
32. Madden E.F., Fowler B.A.: Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: a review. *Drug Chem. Toxicol.* 2000; 23: 1-12.
33. Vasák M., Hasler D.W.: Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000; 4: 177-183.
34. Sato M., Kondoh M.: Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J. Exp. Med.* 2002; 196: 9-22.
35. Milnerowicz H., Nowak P., Wochoński Z., et al.: Wpływ kadmu i węgla na wybrane markery w tkankach szczura: metalotioneina. *Nowa Medycyna nr 12/2000 – Medycyna w sporcie IV.* Online: http://www.czytelniamedyczna.pl/nm_sp43.php (20 lutego 2009).
36. Liu J., Liu Y., Habeebu S.M., et al.: Chronic combined exposure to cadmium and arsenic exacerbates nephrotoxicity, particularly in metallothionein-I/II null mice. *Toxicology* 2000; 147: 157-166.
37. Argonne National Laboratory, EVS: Mixtures of arsenic, cadmium, chromium, and lead. Human Health Fact Sheet, August 2005. Online: <http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/> (22 lutego 2009).
38. Beckman L., Nordenson I.: Interaction between some common genotoxic agents. *Int. J. Hum. Med. Genet.* 1986; 36: 6-7.
39. Zeng H., Uthus E., Combs Jr G.: Mechanistic aspects of the interaction between selenium and arsenic. *J. Inorg. Biochem.* 2005; 99: 1269-1274.

Adres do korespondencji:

Anna Bizoń

*Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu*

ul. Borowska 211

50-556 Wrocław

tel. 71 784 01 75, fax: 71 784 01 72

e-mail: a_bizon@op.pl