



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Studies into the mechanism of arsenic-induced neurotoxicity

Vahidnia, A.

Citation

Vahidnia, A. (2008, February 14). *Studies into the mechanism of arsenic-induced neurotoxicity*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12605>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12605>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Chapter 9

Nederlandse Samenvatting

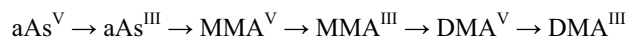
Chapter 9

Nederlandse Samenvatting

Achtergrond

Arsenicum of arseen is een scheikundig element met symbool As en atoomnummer 33. Het woord arseen is afgeleid van het Perzische woord zarnikh (زرنيخ), dat later via de Arabische taal (al-zarnikhu) door de Grieken als Arsenikon (ἀρσενικόν) geïntroduceerd werd in de westerse talen. De oude Grieken gebruikten arseen onder meer als make-up. Het element is door de eeuwen heen veelal gebruikt voor veel verschillende doeleinden. Arseen is een van de oudste giften die de mens bekend zijn. Het werd veelal gebruikt als bestanddeel van tonica in de geneeskunde, ook in de huidige traditionele Chinese en Indische geneeskunde. De therapeutische waarde van arseen in de vorm van Salvarsan (3.3'-Diamino-4.4'-dihydroxy-arsenobenzeen) bleek bij de behandeling van syfilis. Een andere toepassing is het gebruik als pesticide, dat later werd afgeschafte vanwege de schadelijke bijwerkingen voor de mens. Arseen is en wordt ook gebruikt als moordmiddel. Een recent voorbeeld hiervan is de zaak van de Indonesische mensenrechtenactivist Munir, die op weg van Jakarta naar Amsterdam op 7 september 2004 in het vliegtuig dodelijk vergiftigd werd. Misschien een van de meest bekende slachtoffers van arseen is Napoleon Bonaparte, die vermoedelijk chronisch vergiftigd werd, hetzij opzettelijk, hetzij accidenteel door arseen uit het behang van zijn verblijfsoord. Een ander bekend voorbeeld van arseenvergiftiging is het werk van de Leidse gifmengster; Maria Catharina van der Linden – Swanenburg, beter bekend als Goeie Mie. Door haar grote hulpvaardigheid, waaraan ze ook haar bijnaam "Goeie Mie" dankte, bouwde ze een grote kring aan burens, kennissen en vrienden op. Goeie Mie leefde in de 19^{de} eeuw, was getrouwd en had twaalf kinderen, maar zes daarvan stierven al op jeugdige leeftijd, zoals in die tijd vaak voorkwam. Haar wens voor een minder armoedig bestaan en om aan haar alcohol behoefte te kunnen voldoen, leidde tot het stelselmatig vergiftigen van familieleden en buurtbewoners, maar niet nadat zij een verzekering op hun leven had afgesloten met zichzelf als begunstigde. Tussen 1867 en 1884 vergiftigde zij minstens 102 van de door haar verzekerden met arseen, dat ze in de koffie, melk of erwtensoep strooide. Van de vergiftigde mensen werden er 45 ernstig ziek met neurologische restverschijnselen en 27 mensen overleden als gevolg van arseenvergiftiging, waaronder 16 familieleden.

Arseen komt voor als anorganische en organische verbindingen. Organisch As onderscheidt zich van anorganisch As door de aanwezigheid van één of meer methylgroepen aan het arseenatoom. Bij één methylgroep spreekt men van monomethyl- (MM-) en bij twee van dimethyl- (DM) arseen. Verder kennen deze arseenverbindingen verschillende oxidatietoestanden, driewaardig (arseniet; As^{III}) en vijfwaardig (arsenaat; As^V). Een algemeen geldende regel is dat een anorganische arseenverbinding meer toxisch is dan de overeenkomstige gemethyleerde arseenverbinding, en voorts dat het driewaardige arseen toxischer is dan de vijfwaardige verbinding. Bij inname van arseen door mensen ondergaat As een reeks van metabole stappen waarbij anorganisch arseen wordt omgezet in organisch arseen als volgt:



Deze arseenverbindingen komen in variabele hoeveelheden in de natuur voor. Arseen bevindt zich in de bodem, en het kan via stof en water in de lucht en op het land terecht komen.

Chapter 9

Mensen kunnen via voedsel, water en door inademing blootgesteld worden aan arseen. Expositie kan ook plaats vinden via huidcontact met besmette grond of water. Bij langdurige blootstelling kunnen verschillende aandoeningen ontstaan, zoals ontwikkeling van verschillende soorten kanker, variërend van huidkanker tot maligniteiten van de organen en natuurlijk neurologische aandoeningen.

Chronische blootstelling aan arseen is een wereldwijd probleem. Miljoenen mensen in Aziatische landen als Bangladesh, India en Taiwan en zelfs in moderne industriële landen zoals Amerika en Duitsland hebben gezondheidsproblemen door blootstelling aan arseen. De herkomst van arseen kan herleid worden tot het drinkwater in vele derde-wereldlanden, waarbij hun drinkwater dat afkomstig is van natuurlijke geologische bronnen is verontreinigd met arseen. In het jaar 2000 sloeg de Wereld Gezondheid Organisatie (WHO) groot alarm: de helft van de bevolking van Bangladesh werd met ziekte bedreigd door arseenblootstelling. Oorzaak van de massavergiftiging waren de miljoenen waterputten die in het kader van een WHO-project daar in de afgelopen jaren waren geslagen, bedoeld als verbetering van de drinkwatervoorziening. Een concentratie kleiner dan 10 delen per miljard (parts per billion, ppb) is volgens de WHO een toelaatbare hoeveelheid arseen in grondwater dat gebruikt wordt als drinkwater; helaas komen in vele delen van Bangladesh concentraties hoger dan 50 ppb voor.

Arseen en Neurotoxiciteit

Blootstelling aan arseen beïnvloedt zowel het centrale als het perifere zenuwstelsel. Effecten op het zenuwstelsel manifesteren zich ondermeer als trillingen, stuiptrekkingen, hoofdpijn en gevoelloosheid, spierzwakte en uiteindelijk coma. De meest voorkomende neurologische manifestatie van arseenvergiftiging is op het perifere zenuwstelsel. Deze symptomen kunnen jarenlang aanhouden, als het niet levenslang is. Deze kenmerken zich vooral door effecten in de lagere extremiteiten. Klinische studies in met arseen vergiftigde populaties hebben aangetoond dat arseen leidt tot een verlate manifestatie in zenuwen die weken tot maanden later waarneembaar is. Bij deze patiënten is de geleidingssnelheid in de zenuwbanen aanzienlijk afgenomen in vergelijking tot gezonde mensen. Hoewel deze symptomen bij arseenvergiftiging goed beschreven zijn, is het mechanisme van arseen-neurotoxiciteit op moleculair niveau niet goed begrepen en onderzocht. Daarom wordt in dit proefschrift getracht de mogelijke mechanismen die hieraan ten grondslag liggen te vinden en verklaren.

De opzet van de studies die beschreven staan in dit proefschrift is tweeledig. Enerzijds hebben zij plaats gevonden in ratten (*in vivo*) als model voor het aantonen van effecten van anorganisch arseniet (aAs^{III}) op zenuwen op eiwitniveau (hoofdstuk 3 & 4). Anderzijds zijn studies uitgevoerd in neuronale en niet-neuronale cellen (*in vitro*) voor nader onderzoek van effecten van verschillende arseenverbindingen op moleculair niveau (Hoofdstukken 5, 6 & 7).

De studies in ratten waren ontworpen ter verduidelijking van acute en subchronische effecten van arseen op de axonen van het perifere zenuwstelsel. Veranderde axonale integriteit kan een mogelijke verklaring en benadering zijn ter verduidelijking van het mechanisme van arseen in de zenuwen. Axonen bevatten structuren die zijn samengesteld uit een aantal eiwitgroepen, deze zorgen voor de integriteit en het transport in de zenuwen. Dit zogenaamde cytoskelet is opgebouwd uit neurofilamenten, microtubuli en actine-filamenten (microfilamenten). Neurofilamenten zijn specifiek voor neuronen en ze zijn in grote hoeveelheden aanwezig in de neuronen. Er bestaan drie soorten neurofilament-eiwitten die samen een netwerk van heteropolymeren maken; neurofilament-laag (NF-L; 68 kDa), neurofilament-medium (NF-M;

150 kDa) en neurofilament-hoog (NF-H; 200 kDa). Bij een intact neuron controleert dit netwerk van neuronfilament-eiwitten het elektrische signaal en het axonale transport. Microtubuli bestaan uit tubuline-eiwitten. De stabiliteit van deze microtubuli wordt gereguleerd door interacties met microtubulus-geassocieerde eiwitten (MAPs), met MAP-tau als neuron-specifieke vorm.

In hoofdstukken 3 & 4 worden de resultaten weergegeven van onderzoek naar de effecten van arseen op deze eiwitten in ratten. Hoofdstuk 3 beschrijft het acute effect van aAs^{III} na intraveneuze toediening die leidt tot verandering van eiwitsamenstelling in de heupzenuw (*N. ischiadicus*). De hoogste doseringen van 15 en 20 mg/kg leiden tot afname van de NF-M- en NF-L-eiwitexpressie. Verlaging van NF-L is ook beschreven in hoofdstuk 4, waarbij ratten een lagere chronische dosering van 3 en 10 mg/kg oraal toegediend hebben gekregen. Verlaging van NF-L speelt mogelijk een belangrijke rol in de neurotoxiciteit van arseen, aangezien NF-H en NF-M beide een NF-L eiwit nodig hebben tot vorming van een heteropolymeer en het behouden van de integriteit van het cytoskelet. Verder onderzoek zoals in hoofdstuk 4 beschreven heeft ook laten blijken dat MAP-tau en NF-L beide sterker gefosforyleerd worden onder invloed van arseen in vergelijking tot de controlemonsters. Fosforylering van eiwitten kan leiden tot conformatieveranderingen, waarbij ze in mindere mate toegankelijk zijn voor interacties met andere eiwitten en dus bijdragen aan het destabiliseren van de zenuwintegriteit.

En mogelijke verklaring kan zijn de activatie van het enzym calpaine, dat een calcium-afhankelijk protease is. Verschillende studies door anderen hebben aangetoond dat arseen de interne calciumconcentratie in de cellen verhoogt, waardoor calpaine wordt geactiveerd, leidende tot NF-L afbraak en MAP-tau en NF-L hyperfosforylatie. Aan de hand van deze resultaten kan worden gesuggereerd dat NF-L afname een posttranslationele activiteit op eiwit niveau is en niet op dat van DNA/RNA. Deze conclusie wordt verder bevestigd door de verhoogde calpaine-expressie onder invloed van chronische aAs^{III} toediening, zoals is aangetoond in hoofdstuk 4. De afname van NF-L is een gevolg van verhoogde afbraak door calpaine, en niet door verlaagde NF-L expressie op RNA-niveau, zoals is aangetoond in hoofdstuk 5.

In hoofdstuk 6 wordt de mogelijke verklaring beschreven van hyperfosforylering van MAP-tau en NF-L onder invloed van arseen. Cycline-afhankelijke kinasen (Cyclin-dependent kinases; CDK) zijn verantwoordelijk voor de fosforylering van vele eiwitten op hun serine- en threonine-plaatsen. Een voorbeeld van een dergelijk kinase is CDK5 met zijn genactivator p35. In hoofdstuk 6 is beschreven dat onder invloed van verschillende arsenietmetabolieten, de p35 activator/regulator van CDK5 toeneemt in expressie. Een verhoogde expressie kan leiden tot verhoogde fosforylering van cytoskeleteiwitten, in het bijzonder MAP-tau en NF-L. Hieruit blijkt dat de verhoogde expressie *alleen* door driewaardig en *niet* door vijfwaardig arseen veroorzaakt wordt. Bovendien wordt p35 door calpaine gesplitst in p25 en p10. P25 is ook na splitsing in staat om complex te vormen met CDK5 dat leidt tot hyperactivatie en hyperfosforylering van cytoskeleteiwitten.

In hoofdstuk 7 wordt een zijstap gemaakt van de hoofdlijn arseen en neurotoxiciteit, en wordt er gefocust op de cytotoxiciteit van arseenmetabolieten in relatie tot DNA-herstelmechanisme. Allerlei studies hebben gesuggereerd dat arseen indirect DNA-schade veroorzaakt, door het DNA-herstelmechanisme te verstoren. Helaas zijn er in dit verband geen volledige studies te vinden, waarbij alle arseenmetabolieten getest worden. In deze oriënterende studie hebben we gebruik gemaakt van een drietal celtypen afkomstig van Chinese-hamsterovaria, AA8 (wild type), UV20 (*ERCC1* deficiënt) en UV5 (*ERCC2* deficiënt) in combinatie met de zes arseenmetabolieten in een concentratiereeks van 0 tot 100 µM. Arsenaatmetabolieten laten zien dat ze bij de maximale concentratie van 100 µM niet cytotoxisch zijn.

Chapter 9

Arsenietmetabolieten laten daarentegen een bijzonder beeld zien met deze drie type cellijnen. Bij AA8 en UV20 komen de groeiinhibitiecurven overeen voor de drie arsenietmetabolieten i.t.t. UV5 cellijn, waarbij een tegengesteld beeld te zien is. De gemethyleerde arseenmetabolieten zijn minder toxisch dan anorganisch arseen in de UV5 cellijn. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat in de UV5 cellijn minder waterstofperoxide wordt gegeneerd door de gemethyleerde arsenietverbindingen dan door de anorganisch arseniet. Dit is tegengesteld aan de productie van waterstofperoxide in de beide andere cellijnen onder invloed van arseniet..

Samenvattend kan gesteld worden dat ons onderzoek een bijdrage heeft geleverd tot het begrijpen en verklaren van het mechanisme van arseenneurotoxiciteit, oftewel; het *wat* en het *hoe*. Door eerst het effect op eiwitniveau in de zenuwen te bevestigen werd het *wat* gedeelte van de vraag behandeld, vervolgens werd het *hoe* verklaard door de afbraak en fosforylering van de zenuweiwitten. Hopelijk kunnen deze studies een bijdrage leveren aan het verdere onderzoek naar de mogelijke behandeling van arseenneurotoxiciteit.