

Received: 2012.01.18  
Accepted: 2013.03.21  
Published: 2013.08.06

## Trójtlenek arsenu: wpływ na procesy wzrostu i różnicowania komórek nowotworowych oraz możliwe zastosowanie w terapii choroby nowotworowej

Arsenic trioxide: impact on the growth and differentiation of cancer cells and possible use in cancer therapy

Ewelina Hoffman, Wojciech P. Mielicki

Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### Streszczenie

Trójtlenek arsenu (arszenik,  $As_2O_3$ ) został niedawno zidentyfikowany jako skuteczny lek w terapii różnych typów nowotworów. Jest on użytecznym środkiem farmakologicznym w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej (APL), zwłaszcza odpornej na konwencjonalną chemioterapię kwasem retinolowym (ATRA). Co więcej, dane laboratoryjne wskazują, że arszenik wykazuje aktywność w stosunku do komórek nowotworów litych. Mechanizm działania trójtlenku arsenu nie został w pełni poznany.  $As_2O_3$  w dużych dawkach wywołuje apoptozę, podczas gdy mniejsze stężenia inicjują częściowe różnicowanie komórek.  $As_2O_3$  angażuje mitochondria komórki prowadząc ją do apoptozy, a także moduluje aktywność kinazy JNK, glutationu, kaspaz, czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B czy białek pro- i antyapoptycznych. W pracy omówiono stan wiedzy na temat wpływu trójtlenku arsenu na komórki nowotworowe.

**Słowa kluczowe:** trójtlenek arsenu • apoptoza • glutation • kinaza JNK

### Summary

Arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) has recently been identified as an effective drug in different types of cancer therapy. It is a useful pharmacological agent in acute promyelocytic leukemia (APL) treatment, especially the form that is resistant to conventional chemotherapy with all-trans retinoic acid (ATRA). What is more, laboratory data suggest that  $As_2O_3$  is also active when it comes to several solid tumor cell lines. However, the mechanism of action is not fully understood.  $As_2O_3$  in high doses triggers apoptosis, while in lower concentrations it induces partial differentiation. The  $As_2O_3$  mechanism of action involves effects on mitochondrial transmembrane potential which lead to apoptosis. It also acts on the activity of JNK kinase, glutathione, caspases, NF- $\kappa$ B nuclear factor or pro- and antiapoptotic proteins. This publication presents the current knowledge about the influence of arsenic trioxide in cancer cells.

**Key words:** arsenic trioxide • apoptosis • glutathione • kinase JNK

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1061640>

**Word count:** 3327  
**Tables:** –  
**Figures:** 4  
**References:** 91

**Adres autorki:** mgr Ewelina Hoffman, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1; e-mail: ewelina.hoffman@gmail.com

## WSTĘP

Trójtlenek arsenu (arszenik,  $As_2O_3$ ) znany jest od tysięcy lat. Znalazł zastosowanie głównie w produkcji przemysłowej, np. do wyrobu farb i szkła, konserwacji skór czy drewna [31]. Jednocześnie jest jedną z najbardziej znanych trucizn. Arszenik wykazuje działanie karcynogenne powodując raka skóry, płuc, nerek czy pęcherza moczowego [85]. Dane epidemiologiczne wskazują na związek między obecnością arsenu w wodzie pitnej, a zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka skóry, płuc, wątroby. Wyczerpujące informacje na temat historycznego zastosowania arsenu przedstawili Wysocki i Wiśniewska [80]. Obecnie trójtlenek arsenu stosuje się w terapii ostrej białaczki promielocytowej (APL - acute promyelocytic leukemia), zarówno w jej początkowych, jak i nawracających stadiach. U 85-90% chorych z APL obserwowano remisję nowotworu po zastosowaniu leczenia z udziałem tego terapeutycznego [44]. Arszenik okazał się również skuteczny u chorych z nawrotami ostrej białaczki promielocytowej w postaci odpornej na konwencjonalną chemioterapię kwasem retinolowym (ATRA - all-trans retinoic acid) oraz antracyklinami. Tego typu wznovy obserwuje się prawie u 30% chorych [80]. Obecnie w wielu ośrodkach prowadzone są badania nad zastosowaniem arsenu w leczeniu również chorych z innymi rodzajami nowotworów.

## WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE TRÓJTLENKU ARSENU ( $As_2O_3$ )

W komórkach prawidłowych toksyczność trójtlenku arsenu jest spowodowana jego zdolnością do reagowania z grupami sulfhydrylowymi białek [70]. W wyniku tych reakcji dochodzi do zahamowania procesów utleniania, w tym procesów fosforylacji oksydacyjnej, zaburzeń w cyklu Krebsa. Najsilniej hamowanym przez związki trójwartościowego arsenu enzymem w komórce jest dehydrogenaza pirogronianowa. Arszenik zwiększa swoją toksyczność w komórce przez wytwarzanie związków z reaktywnym tlenem. Generuje powstawanie nadtlenu wodoru, hamuje reduktazę glutationową i znacznie obniża stężenie glutationu w komórce [70]. Przewlekła ekspozycja na związki arsenu prowadzi do niewydolności nerek, wątroby, układu krążenia oraz zmian patologicznych skóry. Karcynogenne właściwości arsenu trójwartościowego wynikają z jego zdolności do indukcji ekspresji genów kodujących czynniki stymulujące proliferację

komórek. Dochodzi do amplifikacji genów, powstawania pęknięć i złamań w chromatydach czy aberracji chromosomowych [30]. Biologiczne działanie trójtlenku arsenu zależy przede wszystkim od zastosowanych dawek oraz czasu ekspozycji. Światowa Organizacja Zdrowia ustaliła, że najwyższe dopuszczalne stężenie arsenu w wodzie pitnej wynosi 10  $\mu\text{g/L}$ . Dawki bezpieczne dla dorosłego człowieka mieszczą się w granicach 10-15  $\mu\text{g/dobę}$ . Natomiast dawka toksyczna to 5-50  $\text{mg/dobę}$ . Najwyższa terapeutyczna dawka stosowana w leczeniu APL wynosi 10  $\text{mg/dobę}$ . Warto podkreślić, że cała terapia wiąże się z wieloma działaniami niepożądanymi, które można łatwo złagodzić przez leczenie objawowe [5,43].

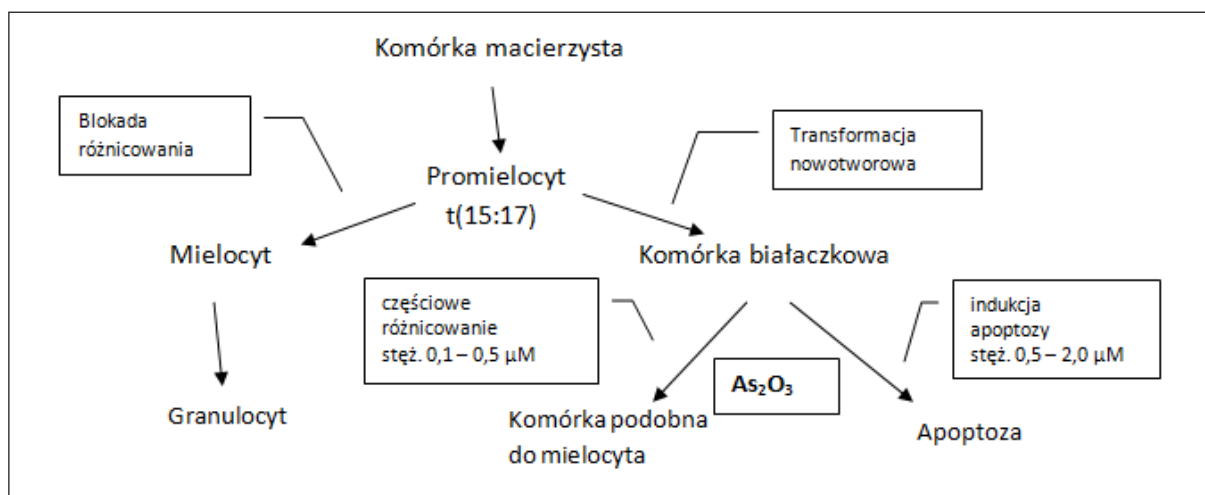
## RÓŻNICOWANIE I WZROST KOMÓREK NOWOTWOROWYCH PO EKSPOZYCJI NA TRÓJTLENK ARSENU

Trójtlenek arsenu hamuje proliferację komórek nowotworowych, po czym kieruje je do różnicowania i/lub apoptozy [31]. Wyniki badań sugerują, że komórki neoplastyczne w obecności arsenu mogą się zachowywać odmiennie w zależności od ich typu oraz od zastosowanego stężenia tego związku. Mechanizm działania  $As_2O_3$  na komórki nie został w pełni wyjaśniony. Wiadomo jednak, że związek ten ma aktywność antyproliferacyjną w stosunku do komórek nowotworowych oraz wpływa na zahamowanie ich cyklu komórkowego.

### Aktywność antyproliferacyjna $As_2O_3$

Trójtlenek arsenu jest najczęściej stosowany u chorych z ostrą białaczką promielocytową. Ta rzadka postać białaczki stanowi około 10% wszystkich ostrych białaczek mieloidowych. Charakteryzuje się translokacją chromosomalną t(15,17). W jej wyniku dochodzi do fuzji genu PML mieszczącego się na chromosomie 15 z genem  $RAR\alpha$  leżącym na chromosomie 17 i powstania chimerycznego białka PML/ $RAR\alpha$  lub  $RAR\alpha$ /PML. Białko to wpływa na zahamowanie różnicowania oraz śmierć komórek [59,78,85] (ryc. 1).

Liczne badania wskazują, że skutki działania arsenu w APL zależą od jego stężenia.  $As_2O_3$  w zakresie niskich stężeń (0,1-0,5  $\mu\text{M}$ ) powoduje częściowe różnicowanie komórek białaczkowych do komórek podobnych do mie-



Ryc. 1. Powstawanie białaczki APL oraz efekt działania arseniku. Dojrzewanie i różnicowanie granulocytów odbywa się w szpiku i obejmuje kilka etapów. W wyniku translokacji chromosomowej t(15;17) dochodzi do fuzji genów kodujących białko białaczki promielocytowej PML oraz receptor kwasu retinolowego RAR $\alpha$ . Promielocyty nie różnicują się do mielocytów, a zaczynają się niekontrolowanie dzielić. Związki arsenu, w zależności od stosowanego stężenia, mogą indukować częściowe różnicowanie komórek lub ich śmierć

locytów. Natomiast wysokie stężenia  $As_2O_3$  (0,5–2,0  $\mu M$ ) kierują komórki ku apoptozie [80,85] (ryc. 1).

Komórki białaczkowe izolowane od pacjentów z APL charakteryzują się obecnością na powierzchni antygenu CD33, co świadczy o niedojrzałości komórek mieloidalnych. W wyniku działania trójtlenkiem arsenu w niewielkich stężeniach (0,1–0,5  $\mu M$ ) pojawiły się komórki z antygenem powierzchniowym CD11 typowym dla dojrzałych mielocytów [90]. Jednak komórki te były tylko podobne do mielocytów i nie odpowiadały końcowemu stadium różnicowania. Mechanizm tego zjawiska polega najprawdopodobniej na bezpośrednim działaniu arsenu na białka PML/RAR $\alpha$ . Arsenik indukuje ich transport do ciałek jądrowych, gdzie ulegają degradacji [29,59,90]. Ostatnie odkrycia przybliżają mechanizm tego procesu. Arsenik sprzyja powstawaniu reaktywnych form tlenu. Ich pojawienie powoduje tworzenie się mostków disiarczkowych, które są połączeniami między dwoma białkami PML/RAR $\alpha$ . Jednocześnie arsenik bezpośrednio przyłącza się do białek PML oraz części PML heterodimeru, co jeszcze bardziej sprzyja powstawaniu mostków disiarczkowych, które z kolei powodują zebranie PML oraz PML/RAR $\alpha$  w jednym ciele nukleotydowym. Kolejne etapy obejmują modyfikację PML/RAR $\alpha$  przez przytwierdzenie białek SUMO, a następnie poliubikwitynację, która daje początek degradacji PML/RAR $\alpha$  w proteasomach [32,42,43,61, 75] (ryc. 2).

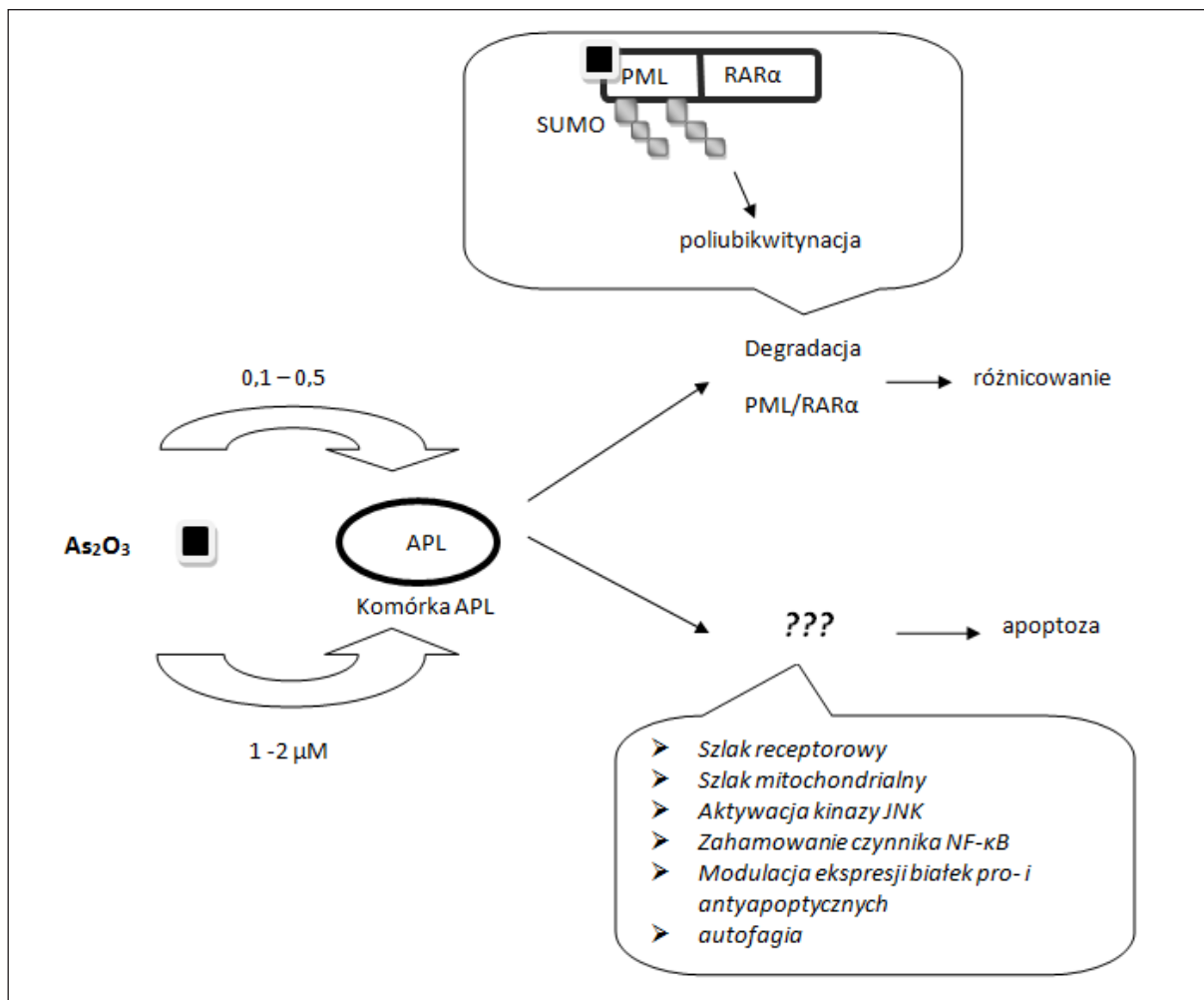
#### Zatrzymywanie cyklu komórkowego przez $As_2O_3$

Skuteczność trójtlenku arsenu w leczeniu APL skłoniła badaczy do sprawdzenia, czy związek wykazuje podobne działanie w innych typach nowotworów. Wyniki badań przedklinicznych przeprowadzonych na różnych liniach komórkowych dowodzą skutecznego działania arsenu

w dawkach bezpiecznych dla człowieka. W większości przypadków zaobserwowano redukcję wzrostu i apoptozę komórek [80]. Eksperymenty na licznych liniach komórkowych (raka płuc, piersi, jajników) dowodzą, że arsenik zatrzymuje cykl komórkowy w fazie mitozy, znacząco wzmacnia polimeryzację tubuliny i wywołuje apoptozę [48,65].

W przypadku raka piersi arsenik hamuje różnicowanie komórek nowotworowych w zależności od stężenia i czasu ekspozycji. Mechanizm tego działania opiera się najprawdopodobniej na zahamowaniu cyklu komórkowego w fazie  $G_1$ , indukcji ekspresji białek p53 i p21, obniżeniu ekspresji białek Bcl-2 oraz zwiększonej aktywacji kaspazy 3, 7 i 9 [46,77]. Niewielkie stężenia arsenu, w granicach 0,5–5  $\mu M$ , wzmagają ponadto wytwarzanie reaktywnych form tlenu, co prowadzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej [68]. Inne badania identyfikują  $\beta$ -tubulinę oraz kinazę M2 jako białka, z którymi wiąże się arsenik w komórkach raka piersi. Takie połączenie powoduje zahamowanie polimeryzacji tubuliny, jednocześnie nie wpływając znacząco na kinazę M2 [86]. Działając w stężeniu 0,01  $\mu M$   $As_2O_3$  reguluje ekspresję genów receptorów glikokortykoidowego, mineralokortykoidowego, progesteronowego, androgenowego. Wykazano, że takie małe dawki hamują ekspresję receptora estrogenowego, nie będąc toksycznymi dla komórek [14]. Obiecujące są wyniki badań nad działaniem arsenu w połączeniu z inhibitorem kinazy MEK (kinaza ta po zaktywowaniu pozwala uruchomić ścieżkę przeżycia komórki) [84].

W komórkach szpiczaka wykazano zależne od p53 zahamowanie cyklu komórkowego pod wpływem trójtlenku arsenu. Cykl w komórkach z niezmutowanym p53 (typ dziki), po potraktowaniu ich  $As_2O_3$ , ulega zahamowaniu w fazie  $G_1$  przez pobudzenie inhibitorów kinaz zależ-



Ryc. 2. Wpływ trójtlenku arsenu na komórki białaczki APL. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> w zakresie niskich stężeń (0,1 – 0,5 μM) powoduje degradację heterodimeru PML/RARα, co prowadzi następnie do częściowego różnicowania komórek białaczkowych. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> w zakresie wysokich stężeń (0,5 – 2,0 μM) prowadzi komórkę do apoptozy poprzez wiele różnych mechanizmów (szczegóły działania As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na ryc. 3)

nych od cyklin, zwłaszcza p21. Natomiast w komórkach ze zmutowanym p53 cykl zostaje zatrzymany w fazie G<sub>2</sub>/M [2,18,49]. Ponadto następuje aktywacja kaspazy 8 lub 9 współdziałających z receptorem błonowym APO2/TRAIL [2,49].

W komórkach czerniaka arsenik również wywołuje zmiany w cyklu komórkowym. Następuje tu zatrzymanie cyklu w fazie S i G<sub>2</sub>, natomiast nie zaobserwowano takich zmian w komórkach opornych na jego działanie [53].

### As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hamuje procesy angiogenezy, a także wpływa na hemostazę

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hamuje tworzenie nowych naczyń krwionośnych w przypadku guzów litych, a także chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. W komórkach linii białaczkowej HEL zaobserwowano, że As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ingeruje we wzajemne oddziaływanie między komórkami śródbłonkowymi a nowotworowymi, co prowadzi do apoptozy [18]. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> może hamować rozwój guza poprzez zahamowanie for-

mowania nowych naczyń i zahamowanie ekspresji białka VEGF (vascular endothelial growth factor), co wykazano w komórkach raka żołądka [81,82].

Białaczka promielocytowa przez wiele lat była chorobą źle rokującą ze względu na współistnienie zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC – disseminated intravascular coagulation). U chorych często występują krwotoki, które mogą się dodatkowo nasilać po zastosowaniu tradycyjnej chemioterapii [41,89]. Te zagrażające życiu zaburzenia hemostazy są spowodowane zwiększoną ekspresją białek prokoagulacyjnych, takich jak: czynnik tkankowy czy prokoagulant nowotworowy [73,85]. Wymienione prokoagulanty aktywują kaskadę krzepnięcia prowadząc do wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. Dopiero zastosowanie kwasu retinolowego, który indukuje dojrzewanie promielocytów białaczkowych do dojrzałych granulocytów pozwoliło na zahamowanie DIC i częstsze uzyskiwanie remisji choroby [12,21,22,26,41]. Trójtlenek arsenu także ma działanie korzystne terapeutycznie [78]. U pacjentów

leczonych  $As_2O_3$  również obserwuje się zmniejszenie aktywności prokoagulacyjnej komórek białaczkowych w wyniku zmniejszenia ekspresji czynnika tkankowego, co w rezultacie hamuje DIC [26,85,87].

### **MOŻLIWE MECHANIZMY DZIAŁANIA TRÓJTLENKU ARSENU NA KOMÓRKĘ NOWOTWOROWĄ**

Istnieje wiele mechanizmów, którymi trójtlenek arsenu prowadzi komórkę do śmierci. Najczęściej proponowane są następujące: szlak receptorowy lub mitochondrialny, aktywacja kinazy JNK, zahamowanie czynnika NF- $\kappa$ B, akumulacja wolnych rodników, a także pośrednio – wpływ na aktywację kinaz oraz białek pro- i antyapoptotycznych [31] (ryc. 3). Dodatkowo, najnowsze badania wskazują, że w schemat działania arsenu może być zaangażowany również proces autofagii [8]. Niżej w skrócie przedstawiono te mechanizmy, omówione wyczerpująco we wcześniejszym opracowaniu Izdebskiej i wsp. [31], a także poszerzono tę wiedzę o najnowsze doniesienia naukowe.

#### **Szlak receptorowy**

Arsenik aktywuje szlak zewnętrzny programowanej śmierci komórki działając poprzez receptory błonowe. Połączenie liganda z cząsteczką receptora na powierzchni błony komórkowej (najczęściej receptory TNF- $\alpha$ ) powoduje aktywację wielu genów, co prowadzi do uaktywnienia odpowiednich białek, których działanie inicjuje degradację komórki [31,57].

Komórki nowotworowe ostrej białaczki promielocytowej narażone na działanie trójtlenku arsenu ginęły przez aktywację systemu ligand-receptor CD95L/CD95, który wpływa na aktywację kaspazy 8 i 3 [12]. Połączenie liganda z receptorem CD95 powoduje zmianę konfiguracji wewnątrzkomórkowej domeny receptora CD95, co pociąga za sobą aktywację cytoplazmatycznej kaspazy 8. Komórki po zadziałaniu arsenikiem wykazywały typowe dla apoptozy zmiany morfologiczne, takie jak kondensacja jądrowa i ciała apoptotyczne oraz zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1 [40, 91].

#### **Szlak mitochondrialny**

Pod wpływem tego procesu następuje zaburzenie potencjału błonowego mitochondrium, otwarcie kanałów i wpływ z przestrzeni międzybłonowej do cytosolu białek, takich jak cytochrom c i czynnik indukujący apoptozę Apaf-2. Wytworzony w cytoplazmie kompleks białek zwany apoptosomem aktywuje kaskadę kaspaz, które odpowiedzialne są za nieodwracalną aktywację przemian prowadzących do fazy wykonawczej apoptozy [35,88].

#### **Aktywacja kinazy JNK**

W komórkach białaczki promielocytowej trójtlenek arsenu aktywuje kinazę JNK, która inicjuje transkrypcję genów odpowiedzialnych za apoptozę. Mechanizm indukcji apoptozy na skutek aktywacji kinazy JNK jest słabo

poznany. Istnieje hipoteza, że aktywacja JNK może indukować sygnały apoptotyczne poprzez potranslacyjne modyfikacje białek rodziny Bcl-2 [35]. Fosforylacji ulegają białka antyapoptotyczne (Bcl-2 i Bcl-x), a także białka proapoptotyczne (Bax, Bak i Bid). Farmakologiczny wpływ na aktywność kinazy JNK może prowadzić do uwrażliwienia komórek nowotworowych na działanie arsenu [16,20,35,60]. Badania prowadzone na komórkach rakowych szyjki macicy wskazują, że w odpowiedzi na  $As_2O_3$  następuje aktywacja kinazy JNK, a także aktywacja białek Bax i fosforylacja Bcl-2, co prowadzi do śmierci komórek nowotworowych w sposób mitochondrialny [35].

#### **Wpływ na równowagę białek pro- i antyapoptycznych**

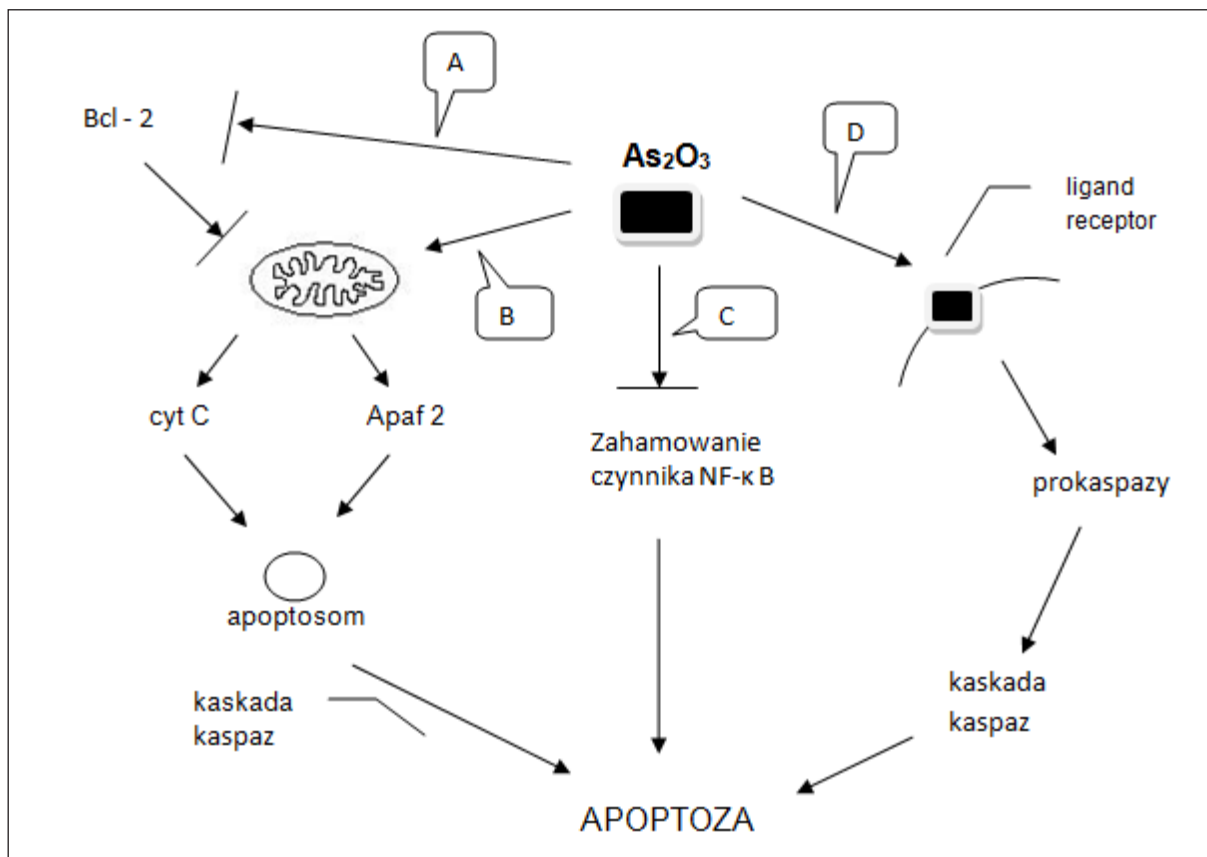
Programowana śmierć podlega regulacji przez białka z rodziny Bcl-2, które mogą działać zarówno pro- jak i antyapoptycznie [31]. Po zastosowaniu arsenu obserwowano obniżenie transkrypcji genu Bcl-2, a tym samym zmniejszenie ilości tego antyapoptotycznego białka w komórkach linii białaczek ludzkich HL-60 oraz NB4 [1].

#### **Zablokowanie uwalniania czynnika NF- $\kappa$ B**

Proapoptotyczny wpływ trójtlenku arsenu polega również na zablokowaniu uwolnienia czynnika NF- $\kappa$ B, co w rezultacie uniemożliwia mu przemieszczenie się do jądra komórkowego. Czynniki NF- $\kappa$ B w jądrze komórkowym aktywuje geny kodujące białka, których zadaniem jest zapewnienie przeżycia komórek (p53, białko Bcl-2, inhibitory apoptozy). Natomiast brak czynnika NF- $\kappa$ B w jądrze komórkowym indukuje apoptozę, w której bierze udział głównie szlak zewnętrzny, a także aktywuje kaspazy 3 i 8 [31,37,52]. Najnowsze badania wskazują, że aktywność NF- $\kappa$ B wpływa także na ilość wewnątrzkomórkowego glutationu. Meng i wsp. [54] wykazali, że farmakologiczne zahamowanie aktywności tego czynnika powoduje znaczący spadek stężenia glutationu w komórkach białaczki oraz raka prostaty. Komórki te stały się bardziej wrażliwe na działanie środków wywołujących stres oksydacyjny i tym samym śmierć komórki [54]. Komórki nowotworowe z zablokowanym uwalnianiem czynnika NF- $\kappa$ B są bardziej podatne także na działanie arsenu [83]. Obecnie prowadzi się badania, których celem jest wzmocnienie działania  $As_2O_3$  na komórki nowotworowe przez zastosowanie inhibitorów czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Obiecujące rezultaty wykazuje genisteina w połączeniu z trójtlenkiem arsenu w terapii raka wątroby [51]. Innym efektem zahamowania uwalniania czynnika NF- $\kappa$ B jest obniżenie ekspresji przeciwzapalnych cytokin (tj. TNF- $\alpha$ , IL-12, -17, -18, -23). Jednocześnie w tym samym badaniu, zaobserwowano znaczny spadek zawartości prokaspazy 3 i aktywację kaspazy 3, co świadczy o uaktywnieniu procesu apoptozy [71].

#### **Uszkodzenie antyoksydacyjnego systemu ochronnego**

Istnieje mechanizm działania  $As_2O_3$  oparty na zmianach w komórkowym stężeniu glutationu [56]. Glutation, peroksydaza i katalaza to trzy główne elementy,



Ryc. 3. Schemat działania trójtlenku arsenu; wybrane drogi działania trójtlenku arsenu: A – wpływ  $As_2O_3$  na białka regulatorowe apoptozy Bcl-2; B – mitochondrialna droga apoptozy; C – wpływ  $As_2O_3$  na czynnik NF-κB; D – zewnętrzna droga apoptozy poprzez receptory błonowe

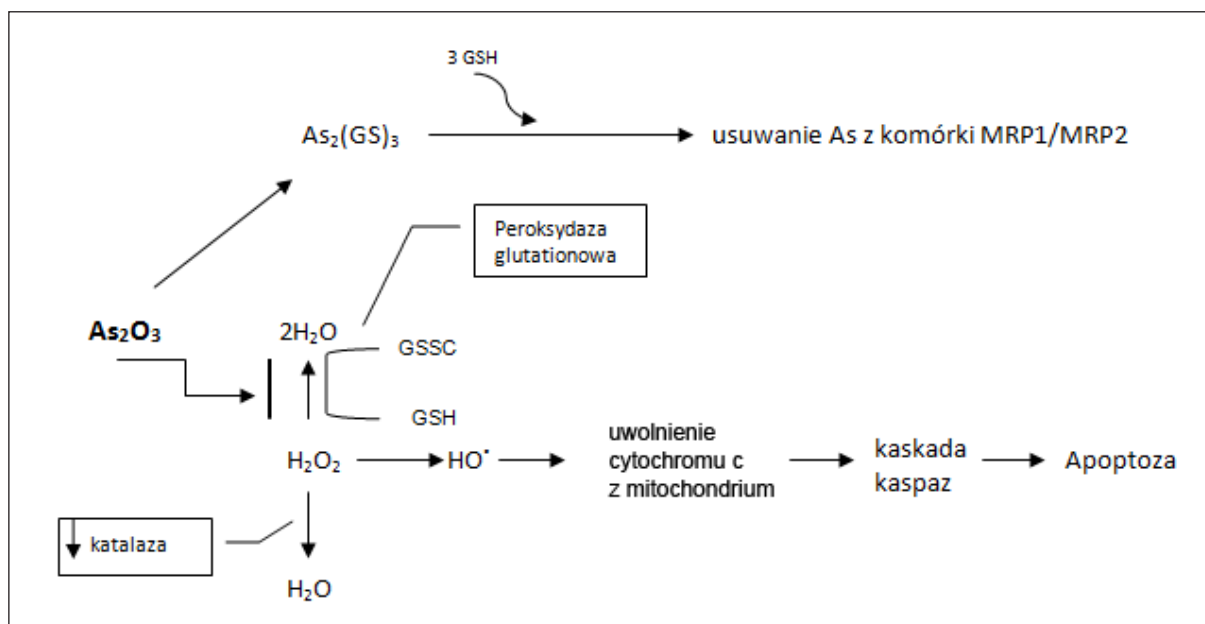
które regulują poziom reaktywnych form tlenu i tym samym chronią komórkę przed ich szkodliwym działaniem [31, 79,80].

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych na liniach komórkowych wykazują, że małe stężenie glutationu (GSH) w komórkach nowotworowych koreluje ze wzrostem ich wrażliwości na apoptotyczne działanie  $As_2O_3$  [83] (ryc. 4). Natomiast zwiększona ekspresja S-transferazy glutationowej oraz GSH została zaobserwowana w liniach komórkowych opornych na arsenik [13]. Komórki białaczki promielocytowej mają bardzo niski poziom GSH i jednocześnie są bardzo wrażliwe na związki arsenu [13,83]. Zespół Yanga i wsp. [83] przebadali siedemnaście linii komórek nowotworowych i okazało się, że najbardziej wrażliwe na arsen są komórki rakowe żołądka i jelit, pęcherza oraz białaczki APL. W przypadku komórek nowotworowych wątroby i płuc wykazano najwyższą zawartość GSH i tym samym największą tolerancję na arsenik [13]. Inne wyniki przedstawili Han i wsp. [27], zmiany w stężeniu reaktywnych form tlenu i GSH w komórkach nowotworowych po ekspozycji na  $As_2O_3$ , nie są silnie skorelowane z zahamowaniem ich wzrostu i apoptozą. Zmiany te są zależne od zastosowanej dawki arsenu i rodzaju komórek [27]. Najnowsze doniesienia sugerują, że uszkodzenie antyoksydacyjnego systemu

ochronnego i akumulacja reaktywnych form tlenu nie mają większego znaczenia w procesie apoptozy indukowanej przez arsenik [58].

### Inicjacja procesu autofagii

Z przeglądu prac z ostatnich lat wynika, że arsenik inicjuje proces autofagii w komórkach białaczkowych. Autofagia określana jest jako jeden z typów programowanej śmierci komórki. W wyniku tego procesu białka i organelle komórkowe kierowane są do lizosomów, gdzie ulegają degradacji. Proces ten aktywowany jest w odpowiedzi na niedobór czynników odżywczych, uszkodzenia komórki wywołane toksynami, czy na działanie czynników wywołujących rozwój i różnicowanie [72]. Wyniki badań nad komórkami białaczki promielocytowej, w patogenezie której powstaje chimericzne białko PML/RARα wskazują, że arsenik może powodować degradację tego białka właśnie w wyniku autofagii [7]. Arsenik najprawdopodobniej aktywuje ekspresję genów lizosomalnych i tym samym zwiększa aktywność proteazy lizosomalnej – katepsyny D [8]. Właściwa regulacja autofagii może wzmocnić efekty terapii przeciwnowotworowej. Takie wnioski przedstawił zespół Rena i wsp. [66] po przeprowadzeniu eksperymentów na linii komórek białaczkowych NB4. Farmakologiczny wpływ na aktywację lub zahamowanie pro-



Ryc. 4. Arsenik indukuje apoptozę przez zwiększenie ilości  $H_2O_2$  w komórkach. Rodniki ponadtlenkowe są produktem ubocznym tlenowego metabolizmu komórki. Następnie przekształcane są w nadtlenek wodoru, który rozkładany jest do wody pod wpływem katalazy i peroksydazy glutationowej. Jony arsenu hamują aktywność peroksydazy glutationowej, co prowadzi do nagromadzenia  $H_2O_2$  w komórce. Jednocześnie aktywność katalazy w komórkach APL jest obniżona. Nadtlenek wodoru jest przekształcany w rodniki hydroksylowe, które wpływają na obniżenie potencjału błon mitochondrium i zwiększenie ich przepuszczalności. Uwolnienie cytochromu c i uruchomienie kolejnych mechanizmów apoptozy prowadzi do śmierci komórki. Arsenik wykazuje skuteczne działanie już przy niskich stężeniach, gdyż białka oporności MRP słabo usuwają ten związek. Substratem dla tych białek może być tylko koniugat arsenu z glutationem. Natomiast reakcja połączenia arsenu z glutationem jest katalizowana przez transferazę S-glutationową, której aktywność jest zmniejszona w komórce białaczki promielocytowej

cesu autofagii wzmacnia efekty leczenia z zastosowaniem  $As_2O_3$  [66]. Ponadto wykazano, że reaktywne formy tlenu mogą aktywować autofagię [4].

#### TRÓJTLENEK ARSENU – ZASTOSOWANIE KLINICZNE W TERAPII CHOROBY NOWOTWOROWEJ

Trisenox wprowadzono do lecznictwa w 2002 r. Lek zawiera 1 mg arsenu w 1 ml preparatu. Jest stosowany u pacjentów z ostrą białaczką promielocytową. Pacjenci z APL leczeni są głównie kwasem retinolowym i antracyklinami, jednak nie zawsze udaje się osiągnąć oczekiwany skutek terapeutyczny.  $As_2O_3$  z preparatu Trisenox wykazuje dużą skuteczność u chorych na ostrą białaczkę promielocytową oporną na ATRA. Trisenox podaje się pacjentom we wlewie dożylnym w dawce 0,15 mg/kg m.c./dobę. Działania niepożądane leku nie są długotrwałe, ani uciążliwe i nie powodują konieczności przerwania terapii [31]. Wyniki badań klinicznych opublikowanych w 2010 r. potwierdzają wysoką skuteczność  $As_2O_3$  stosowanego w skojarzeniu u pacjentów z nowo zdiagnozowanym APL [64]. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że taki schemat terapii (arsenik plus ATRA plus chemioterapia) zostanie zastosowany w najbliższych latach u wszystkich pacjentów cierpiących na APL [73].

Wyniki prób klinicznych wskazują, że arsen jest także dobrze tolerowany u dzieci. Badania prowadzono wśród dzieci w wieku 2–19 lat i zaobserwowano porównywalną do dorosłych skuteczność działania wspomnianego leku [23].

Arsenik dodatkowo ma słabe powinowactwo do takich transporterów jak P-glikoproteina i MRP, które często są przyczyną oporności na stosowane leki [48]. Rola wymienionych transporterów jest dokładnie omówiona w literaturze, lecz wciąż nie jest wyjaśnione, jakie mają one znaczenie w oporności na trójtlenek arsenu [10,17,63]. Sertel i wsp. [69] opublikowali wyniki badań, które nie potwierdzają, aby P-glikoproteina i MRP były zaangażowane w oporność na arsenik. Oznacza to, że klinicznie odporne guzy ze wzmoczoną ekspresją wymienionych transporterów nadal mogą odpowiadać na leczenie arsenikiem [69]. Dlatego też Trisenox jest tak dobrze oceniany w leczeniu chorych na białaczkę oporną na ATRA. Związek ten może być stosowany również w leczeniu guzów litych. Na przykład arsenik wywołuje podobny efekt jak paklitaksel [48], przy czym mechanizm działania tych dwóch związków jest inny [3]. Związki arsenu nie wykazują krzyżowej oporności z tym terapeutycznym i dlatego z powodzeniem mogą być stosowane w leczeniu chorych z guzami, zwłaszcza opornymi na paklitaksel [48]. Skuteczne jest także skojarzone leczenie trójtlenkiem arsenu oraz radioterapią [28].

Badania kliniczne przeprowadzone na grupie pacjentów chorych na czerniaka wykazały, że arsenik stosowany jako samodzielny środek jest dobrze tolerowany, jednak nie wykazuje znaczącego efektu terapeutycznego. Stan pacjentów był stabilny bez wyraźnej poprawy [39,74]. Arsenik nie wykazał oczekiwanej aktywności, jednocześnie wystąpiły działania niepożądane, takie jak

zmęczenie, mdłości, anemia, zaparcia [39]. Natomiast stosowanie arseniku z chemioterapeutykami przyniosło satysfakcjonujące rezultaty. Świadczą o tym wyniki badań klinicznych nie tylko w przypadku czerniaka, ale także szpiczaka mnogiego czy raka płuc. Badania kliniczne nad działaniem  $As_2O_3$  na komórki szpiczaka mnogiego w terapii łączonej z kwasem askorbinowym oraz bortezomibem (inhibitor proteasomów) dały zadowalające rezultaty, a schemat ten jest dobrze tolerowany przez organizm pacjentów. Arsenik stosowany w połączeniu z sulindakiem (pochodna kwasu metyleno-indenoctowego) wykazuje cytotoksyczne działanie na komórki raka płuc. Mechanizm tego działania opiera się na aktywacji kaskady kaspaz, zmianie potencjału błonowego mitochondrium i uwolnieniu cytochromu c [38] oraz wytworzeniu reaktywnych form tlenu [33]. Ponadto skojarzone leczenie sulindakiem i arsenem redukuje ekspresję surwiwiny [34], białka należącego do rodziny białek anty-apoptycznych. Przeciwdziała ono apoptozie przez zahamowanie aktywności kaspaz, wiąże się z mikrotubulami wrzeciona mitotycznego, hamując apoptozę zależną od mitochondriów [36]. Połączenie arsen/sulindak aktywuje także ekspresję białka p53, które również negatywnie reguluje ekspresję surwiwiny [34,65].

Najnowsze badania wykazują, że komórki nowotworowe są bardziej podatne na stres oksydacyjny niż zdrowe, otaczające je komórki. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak katalaza, dysmutaza czy peroksydaza glutationowa jest prawie o 10% mniejsza w porównaniu ze zdrowymi komórkami. Także stężenie GSH jest w komórkach nowotworowych niższe. Różnica między zdrowymi komórkami, a nowotworowymi ma duże kliniczne znaczenie, zwłaszcza przy stosowaniu takich środków jak arsenik [76]. Skuteczną metodą działania w przypadku oporności na arsen byłoby obniżenie stężenia GSH w komórkach nowotworowych i jednocześnie zwiększenie stężenia tego związku w komórkach zdrowych. Prowadzone są badania z wykorzystaniem środków farmakologicznych, które mogłyby wpływać na stężenie GSH w komórce. Dotąd wyselekcjonowano eksperymentalnie kilka związków o takich właściwościach. Wykorzystując różnice w metabolizmie komórek zdrowych i nowotworowych, opracowano metodę z zastosowaniem butioninosulfoksiminy (BSO) inhibitora syntetazy glutamylcysteinowej, enzymu szlaku biosyntezy GSH. BSO obniża stężenie glutationu i tym samym zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na działanie leków i chemioterapię [11,15]. Podobne działanie obserwowano dla izotiocyanatów, które również obniżają poziom glutationu w komórce, a z arsenikiem znacząco zwiększają stężenie reaktywnych form tlenu [19]. N-acetylocysteina natomiast „zmiata” wolne reaktywne formy tlenu i tym samym chroni komórki nowotworowe przed apoptozą wywołaną przez arsenik [1,19]. Sulfoksiminy wzmacniają aktywność trójtlenku arsenu przez podniesienie stężenia reaktywnych form tlenu, które zwiększają przepuszczalność błony mitochondrium, co prowadzi komórkę do mitochondrialnej apoptozy [15,31]. Także kwas askorbinowy wspomaga

apoptyczne działanie arsenu, obniżając stężenie glutationu w komórce [13,15,83].

Naukowcy powiązali wrażliwość na trójtlenek arsenu także z poziomem akwagliceroporynu w komórce nowotworowej. Komórki białaczki promielocytarnej o zwiększonej ekspresji akwagliceroporyny 9 (AQP 9) charakteryzują się większym tempem asymilacji trójtlenku arsenu oraz innych trójwartościowych metali, a w związku z tym nadwrażliwością na lek Trisenox [6,50]. Kolejne badania przeprowadzone przez Leung i wsp. [45] na komórkach białaczkowych HL-60 wskazują na ATRA jako czynnik zwiększający ekspresję AQP 9, co prowadzi dalej do znacznie zwiększonego „popytu” na arsenik w tych komórkach [45]. Mechanizm ten może tłumaczyć większą cytotoksyczność arsenu w skojarzeniu z ATRA, niż w monoterapii [45].

Prowadzone są badania mające na celu sprawdzenie sugerowanego związku między stężeniem i rodzajem mikroRNA (miRNA), a mechanizmem działania  $As_2O_3$ . MikroRNA są krótkimi, jednoniciowymi, niekodującymi cząsteczkami RNA, których rolą jest obniżanie ekspresji genów na etapie translacji informacji genetycznej. Biorą one udział w regulacji wielu istotnych procesów biologicznych [47,62,67]. Wyniki licznych eksperymentów wskazują, że różne cząsteczki mikroRNA odgrywają rolę w kontroli proliferacji komórki, różnicowania czy apoptozy. miRNA mogą działać onkogenicznie, jeśli obiektem ich regulacji są protoonkogeny. Jednocześnie wzrost ekspresji genu miRNA regulującego ekspresję genu supresorowego może także prowadzić do nowotworzenia [62,67]. Komórki nowotworowe po zastosowaniu arsenu wykazywały zaburzenia w ekspresji różnych miRNA. W komórkach białaczkowych *in vitro* wykryto synergizm w działaniu  $As_2O_3$  i miRNA-15a/16-1, co skutkowało zahamowaniem wzrostu komórek i apoptozą [24]. W komórkach raka wątroby wykryto zwiększoną ekspresję miRNA-29a po zastosowaniu  $As_2O_3$  [55]. Ponadto miRNA-29a i  $As_2O_3$  wykazywały synergizm w działaniu. Podobne wyniki otrzymano dla miRNA-19a i  $As_2O_3$  w raku pęcherza moczowego [9]. Sugeruje się, że różne cząsteczki miRNA, w zależności od typu nowotworu, są zaangażowane w mechanizm działania arsenu. Kliniczne zastosowanie odpowiednich mikroRNA w połączeniu z arsenikiem mogłoby zwiększyć skuteczność terapii przeciwnowotworowych, z jednoczesnym zniwelowaniem działań niepożądanych arsenu [25].

## PODSUMOWANIE

Doświadczenia laboratoryjne przeprowadzane na liniach komórkowych oraz na zwierzętach ujawniają proapoptyczne działanie trójtlenku arsenu na komórki wielu typów nowotworów. Nie do końca zdefiniowano sposób oddziaływania arsenu na komórkę neoplastyczną. Istnieje wiele teorii, które jednak wymagają weryfikacji z danymi doświadczalnymi. Wyniki dotychczasowych prac eksperymentalnych wskazują, że trójtlenek arsenu skutecznie działa zarówno w monoterapii, jak i terapii skojarzonej.



## PIŚMIENNICTWO

- [1] Akao Y., Yamada H., Nakagawa Y.: Arsenic-induced apoptosis in malignant cells in vitro. *Leuk. Lymphoma*, 2000; 37: 53-63
- [2] Akay C., Gazitt Y.: Arsenic trioxide selectively induces early and extensive apoptosis via the APO2/caspase-8 pathway engaging the mitochondrial pathway in myeloma cells with mutant p53. *Cell Cycle*, 2003; 2: 358-368
- [3] Akay C., Thomas C.3rd, Gazitt Y.: Arsenic trioxide and paclitaxel induce apoptosis by different mechanisms. *Cell Cycle*, 2004; 3: 324-334
- [4] Azad M.B., Chen Y., Gibson S.B.: Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2009; 11: 777-790
- [5] Bernstam L., Nriagu J.: Molecular aspects of arsenic stress. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.*, 2000; 3: 293-322
- [6] Bhattacharjee H., Carbrey J., Rosen B.P., Mukhopadhyay R.: Drug uptake and pharmacological modulation of drug sensitivity in leukemia by AQP9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 322: 836-841
- [7] Boe S.O., Simonsen A.: Autophagic degradation of an oncoprotein. *Autophagy*, 2010; 6: 964-965
- [8] Bolt A.M., Douglas R.M., Klimecki W.T.: Arsenite exposure in human lymphoblastoid cell lines induces autophagy and coordinated induction of lysosomal genes. *Toxicol. Lett.*, 2010; 199: 153-159
- [9] Cao Y., Yu S.L., Wang Y., Guo G.Y., Ding Q., An R.H.: MicroRNA-dependent regulation of PTEN after arsenic trioxide treatment in bladder cancer cell line T24. *Tumour Biol.*, 2011; 32: 179-188
- [10] Chen X., Zhang M., Liu L.X.: The overexpression of multidrug resistance-associated proteins and gankyrin contribute to arsenic trioxide resistance in liver and gastric cancer cells. *Oncol. Rep.*, 2009; 22: 73-80
- [11] Cheng B., Yang X., An L., Gao B., Liu X.: Arsenic trioxide-induced apoptosis of Hep-2 cell line through modulating intracellular glutathione (GSH) level. *Auris. Nasus. Larynx.*, 2010; 37: 89-94
- [12] Curtin J.C., Dragnev K.H., Sekula D., Christie A.J., Dmitrovsky E., Spinella M.J.: Retinoic acid activates p53 in human embryonal carcinoma through retinoid receptor-dependent stimulation of p53 transactivation function. *Oncogene*, 2001; 20: 2559-2569
- [13] Dai J., Weinberg R.S., Waxman S., Jing Y.: Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood*, 1999; 93: 268-277
- [14] Davey J.C., Bodwell J.E., Gosse J.A., Hamilton J.W.: Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicol. Sci.*, 2007; 98: 75-86
- [15] Davison K., Mann K.K., Miller W.H.Jr.: Arsenic trioxide: mechanisms of action. *Semin. Hematol.*, 2002; 39: 3-7
- [16] Davison K., Mann K.K., Waxman S., Miller W.H.Jr.: JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*, 2004; 103: 3496-3502
- [17] Diaz Z., Mann K.K., Marcoux S., Kourelis M., Colombo M., Komarnitsky P.B., Miller W.H.Jr.: A novel arsenical has antitumor activity toward As2O3-resistant and MRP1/ABCC1-overexpressing cell lines. *Leukemia*, 2008; 22: 1853-1863
- [18] Dmoszowska A., Górska M.: Arsenic trioxide, an old drug - a new face. *Acta Haematologica Polonica*, 2004; 35: 5-14
- [19] Doudican N.A., Bowling B., Orlow S.J.: Enhancement of arsenic trioxide cytotoxicity by dietary isothiocyanates in human leukemic cells via a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Leuk. Res.*, 2010; 34: 229-234
- [20] Eguchi R., Fujimori Y., Takeda H., Tabata C., Ohta T., Kuribayashi K., Fukuoka K., Nakano T.: Arsenic trioxide induces apoptosis through JNK and ERK in human mesothelioma cells. *J. Cell Physiol.*, 2011; 226: 762-768
- [21] El-Metwally T.H., Pour P.M.: The retinoid induced pancreatic cancer redifferentiation-apoptosis sequence and the mitochondria: a suggested obligatory sequence of events. *JOP*, 2007; 8: 268-278
- [22] Falanga A., Marchetti M., Vignoli A., Balducci D.: Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, 2003; 1: 673-678
- [23] Fox E., Razzouk B.I., Widemann B.C., Xiao S., O'Brien M., Goodspeed W., Reaman G.H., Blaney S.M., Murgu A.J., Balis F.M., Adamson P.C.: Phase 1 trial and pharmacokinetic study of arsenic trioxide in children and adolescents with refractory or relapsed acute leukemia, including acute promyelocytic leukemia or lymphoma. *Blood*, 2008; 111: 566-573
- [24] Gao S.M., Chen C., Wu J., Tan Y., Yu K., Xing C.Y., Ye A., Yin L., Jiang L.: Synergistic apoptosis induction in leukemic cells by miR-15a/16-1 and arsenic trioxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 403: 203-208
- [25] Ghaffari S.H., Bashash D., Dizaji M.Z., Ghavamzadeh A., Alimoghaddam K.: Alteration in miRNA gene expression pattern in acute promyelocytic leukemia cell induced by arsenic trioxide: a possible mechanism to explain arsenic multi-target action. *Tumour Biol.*, 2012; 33: 157-172
- [26] Guo W., Wang H., Zhao W., Zhu J., Ju B., Wang X.: Effect of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide on tissue factor expression in acute promyelocytic leukemia cells. *Chin. Med. J.*, 2001; 114: 30-34
- [27] Han Y.H., Moon H.J., You B.R., Kim S.Z., Kim S.H., Park W.H.: Effects of arsenic trioxide on cell death, reactive oxygen species and glutathione levels in different cell types. *Int. J. Mol. Med.*, 2010; 25: 121-128
- [28] Ho S.Y., Chen W.C., Chiu H.W., Lai C.S., Guo H.R., Wang Y.J.: Combination treatment with arsenic trioxide and irradiation enhances apoptotic effects in U937 cells through increased mitotic arrest and ROS generation. *Chem. Biol. Interact.*, 2009; 179: 304-313
- [29] Hong S.H., Yang Z., Privalsky M.L.: Arsenic trioxide is a potent inhibitor of the interaction of SMRT corepressor with its transcription factor partners, including the PML-retinoic acid receptor alpha oncoprotein found in human acute promyelocytic leukemia. *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 7172-7182
- [30] Huang C., Ke Q., Costa M., Shi X.: Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. *Mol. Cell Biochem.*, 2004; 255: 57-66
- [31] Izdebska M., Grzanka A., Szczepanski M.A., Litwiniec A.: Wybrane mechanizmy terapeutycznego oddziaływania trójtlenku arsenu w leczeniu nowotworów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 463-467
- [32] Jeanne M., Lallemand-Breitenbach V., Ferhi O., Koken M., Le Bras M., Duffort S., Peres L., Berthier C., Soilihi H., Raught B., de Thé H.: PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As2O3. *Cancer Cell*, 2010; 18: 88-98
- [33] Jin H.O., Seo S.K., Woo S.H., Lee H.C., Kim E.S., Yoo D.H., Lee S.J., An S., Choe T.B., Kim J.I., Hong S.I., Rhee C.H., Park I.C.: A combination of sulindac and arsenic trioxide synergistically induces apoptosis in human lung cancer H1299 cells via c-Jun NH2-terminal kinase-dependent Bcl-xL phosphorylation. *Lung Cancer*, 2008; 61: 317-327
- [34] Jin H.O., Yoon S.I., Seo S.K., Lee H.C., Woo S.H., Yoo D.H., Lee S.J., Choe T.B., An S., Kwon T.J., Kim J.I., Park M.J., Hong S.I., Park I.C., Rhee C.H.: Synergistic induction of apoptosis by sulindac and arsenic trioxide in human lung cancer A549 cells via reactive oxygen species-dependent down-regulation of survivin. *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 72: 1228-1236

- [35] Kang Y.H., Lee S.J.: The role of p38 MAPK and JNK in Arsenic trioxide-induced mitochondrial cell death in human cervical cancer cells. *J. Cell Physiol.*, 2008; 217: 23-33
- [36] Karczmarek-Borowska B., Zmorzyński S., Filip A.: Biologiczna rola surwiwiny. *Współczesna Onkologia*, 2008; 12: 437-440
- [37] Kerbauy D.M., Lesnikow V., Abbasi N., Seal S., Scott B., Deeg H.J.: NF- $\kappa$ B and FLIP in arsenic trioxide (ATO)-induced apoptosis in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*, 2005; 106: 3917-3925
- [38] Kim H.R., Kim E.J., Yang S.H., Jeong E.T., Park C., Kim S.J., Youn M.J., So H.S., Park R.: Combination treatment with arsenic trioxide and sulindac augments their apoptotic potential in lung cancer cells through activation of caspase cascade and mitochondrial dysfunction. *Int. J. Oncol.*, 2006; 28: 1401-1408
- [39] Kim K.B., Bedikian A.Y., Camacho L.H., Papadopoulos N.E., McCullough C.: A phase II trial of arsenic trioxide in patients with metastatic melanoma. *Cancer*, 2005; 104: 1687-1692
- [40] Kitamura K., Minami Y., Yamamoto K., Akao Y., Kiyoi H., Saito H., Naoe T.: Involvement of CD95-independent caspase 8 activation in arsenic trioxide-induced apoptosis. *Leukemia*, 2000; 14: 1743-1750
- [41] Kwaan H.C., Wang J., Boggio L.N.: Abnormalities in hemostasis in acute promyelocytic leukemia. *Hematol. Oncol.*, 2002; 20: 33-41
- [42] Lallemand-Breitenbach V., Jeanne M., Benhenda S., Nasr R., Lei M., Peres L., Zhou J., Zhu J., Raught B., de The H.: Arsenic degrades PML or PML-RAR $\alpha$  through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat. Cell Biol.*, 2008; 10: 547-555
- [43] Lallemand-Breitenbach V., Zhu J., Chen Z., de The H.: Curing APL through PML/RAR $\alpha$  degradation by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Trends Mol. Med.*, 2012; 18: 36-42
- [44] Leu L., Mohassel L.: Arsenic trioxide as first-line treatment for acute promyelocytic leukemia. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 2009; 66: 1913-1918
- [45] Leung J., Pang A., Yuen W.H., Kwong Y.L., Tse E.W.: Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood*, 2007; 109: 740-746
- [46] Li X., Ding X., Adrian T.E.: Arsenic trioxide causes redistribution of cell cycle, caspase activation, and GADD expression in human colonic, breast, and pancreatic cancer cells. *Cancer Invest.*, 2004; 22: 389-400
- [47] Li Y., Zhu X., Gu J., Dong D., Yao J., Lin C., Huang K., Fei J.: Anti-miR-21 oligonucleotide sensitizes leukemic K562 cells to arsenic trioxide by inducing apoptosis. *Cancer Sci.*, 2010; 101: 948-954
- [48] Ling Y.H., Jiang J.D., Holland J.F., Perez-Soler R.: Arsenic trioxide produces polymerization of microtubules and mitotic arrest before apoptosis in human tumor cell lines. *Mol. Pharmacol.*, 2002; 62: 529-538
- [49] Liu Q., Hilsenbeck S., Gazitt Y.: Arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloma cells: p53-dependent G1 or G2/M cell cycle arrest, activation of caspase-8 or caspase-9, and synergy with APO2/TRAIL. *Blood*, 2003; 101: 4078-4087
- [50] Liu Z., Shen J., Carbrey J.M., Mukhopadhyay R., Agre P., Rosen B.P.: Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 6053-6058
- [51] Ma Y., Wang J., Liu L., Zhu H., Chen X., Pan S., Sun X., Jiang H.: Genistein potentiates the effect of arsenic trioxide against human hepatocellular carcinoma: role of Akt and nuclear factor- $\kappa$ B. *Cancer Lett.*, 2011; 301: 75-84
- [52] Mathas S., Lietz A., Janz M., Hinz M., Jundt F., Scheidereit C., Bommert K., Dorken B.: Inhibition of NF- $\kappa$ B essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood*, 2003; 102: 1028-1034
- [53] McNeely S.C., Belshoff A.C., Taylor B.F., Fan T.W., McCabe M.J.Jr., Pinhas A.R., States J.C.: Sensitivity to sodium arsenite in human melanoma cells depends upon susceptibility to arsenite-induced mitotic arrest. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008; 229: 252-261
- [54] Meng Q., Peng Z., Chen L., Si J., Dong Z., Xia Y.: Nuclear factor- $\kappa$ B modulates cellular glutathione and prevents oxidative stress in cancer cells. *Cancer Lett.*, 2010; 299: 45-53
- [55] Meng X.Z., Zheng T.S., Chen X., Wang J.B., Zhang W.H., Pan S.H., Jiang H.C., Liu L.X.: microRNA expression alteration after arsenic trioxide treatment in HepG-2 cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2011; 26: 186-193
- [56] Miller W.H.Jr.: Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. *Oncologist*, 2002; 7, Suppl 1: 14-19
- [57] Miller W.H.Jr., Schipper H.M., Lee J.S., Singer J., Waxman S.: Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.*, 2002; 62: 3893-3903
- [58] Morales A.A., Gutman D., Cejas P.J., Lee K.P., Boise L.H.: Reactive oxygen species are not required for an arsenic trioxide-induced antioxidant response or apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 12886-12895
- [59] Muller S., Miller W.H.Jr., Dejean A.: Trivalent antimonials induce degradation of the PML-RAR $\alpha$  oncoprotein and reorganization of the promyelocytic leukemia nuclear bodies in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Blood*, 1998; 92: 4308-4316
- [60] Muscarella D.E., Bloom S.E.: Differential activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway in arsenite-induced apoptosis and sensitization of chemically resistant compared to susceptible B-lymphoma cell lines. *Toxicol. Sci.*, 2002; 68: 82-92
- [61] Nasr R., de The H.: Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells by PML/RAR $\alpha$ -targeting. *Int. J. Hematol.*, 2010; 91: 742-747
- [62] Osaki M., Takeshita F., Ochiya T.: MicroRNAs as biomarkers and therapeutic drugs in human cancer. *Biomarkers*, 2008; 13: 658-670
- [63] Perkins C., Kim C.N., Fang G., Bhalla K.N.: Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L). *Blood*, 2000; 95: 1014-1022
- [64] Powell B.L., Moser B., Stock W., Gallagher R.E., Willman C.L., Stone R.M., Rowe J.M., Coutre S., Feusner J.H., Gregory J., Couban S., Appelbaum F.R., Tallman M.S., Larson R.A.: Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia: North American Leukemia Intergroup Study C9710. *Blood*, 2010; 116: 3751-3757
- [65] Qu G.P., Xiu Q.Y., Li B., Liu Y.A., Zhang L.Z.: Arsenic trioxide inhibits the growth of human lung cancer cell lines via cell cycle arrest and induction of apoptosis at both normoxia and hypoxia. *Toxicol. Ind. Health*, 2009; 25: 505-515
- [66] Ren Y., Xie Y., Chai L., Wang S., Cheng M.: Autophagy modification augmented the treatment effects initiated by arsenic trioxide in NB4 cells. *Med. Oncol.*, 2011; 28: 231-236
- [67] Ruan K., Fang X., Ouyang G.: MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett.*, 2009; 285: 116-126
- [68] Ruiz-Ramos R., Lopez-Carrillo L., Rios-Perez A.D., De Vizcaya-Ruiz A., Cebrían M.E.: Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF- $\kappa$ B activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Mutat. Res.*, 2009; 674: 109-115
- [69] Sertel S., Tome M., Briehl M.M., Bauer J., Hock K., Plinkert P.K., Efferth T.: Factors determining sensitivity and resistance of tumor cells to arsenic trioxide. *PLoS One*, 2012; 7: e35584
- [70] Shi H., Shi X., Liu K.J.: Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem.*, 2004; 255: 67-78
- [71] Singer M., Trugnan G., Chelbi-Alix M.K.: Arsenic trioxide reduces 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced murine colitis via nuclear factor- $\kappa$ B down-regulation and caspase-3 activation. *Innate Immun.*, 2010; 17: 365-374

- [72] Stepien A., Izdebska M., Grzanka A.: The types of cell death. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 420-428
- [73] Tallman M.S., Altman J.K.: How I treat acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 2009; 114: 5126-5135
- [74] Tarhini A.A., Kirkwood J.M., Tawbi H., Gooding W.E., Islam M.F., Agarwala S.S.: Safety and efficacy of arsenic trioxide for patients with advanced metastatic melanoma. *Cancer*, 2008; 112: 1131-1138
- [75] Tatham M.H., Geoffroy M.C., Shen L., Plechanovova A., Hattersley N., Jaffray E.G., Palvimo J.J., Hay R.T.: RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat. Cell Biol.*, 2008; 10: 538-546
- [76] Verrax J., Pedrosa R.C., Beck R., Dejeans N., Taper H., Calderon P.B.: In situ modulation of oxidative stress: a novel and efficient strategy to kill cancer cells. *Curr. Med. Chem.*, 2009; 16: 1821-1830
- [77] Wang X., Gao P., Long M., Lin F., Wei J.X., Ren J.H., Yan L., He T., Han Y., Zhang H.Z.: Essential role of cell cycle regulatory genes p21 and p27 expression in inhibition of breast cancer cells by arsenic trioxide. *Med. Oncol.*, 2010; 28: 1225-1254
- [78] Wang Z.Y., Chen Z.: Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*, 2008; 111: 2505-2515
- [79] Wojtczak L., Zablocki K.: Mitochondria in cell life, death and disease. *Postępy Biochem.*, 2008; 54: 129-141
- [80] Wysocki R., Wisniewska E.: Molekularne podstawy działania arseniku w komórkach białaczki promielocytowej. *Postępy Biochem.*, 2002; 48: 121-130
- [81] Xiao Y.F., Liu S.X., Wu D.D., Chen X., Ren L.F.: Inhibitory effect of arsenic trioxide on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.*, 2006; 12: 5780-5786
- [82] Xiao Y.F., Wu D.D., Liu S.X., Chen X., Ren L.F.: Effect of arsenic trioxide on vascular endothelial cell proliferation and expression of vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and KDR in gastric cancer in nude mice. *World J. Gastroenterol.*, 2007; 13: 6498-6505
- [83] Yang C.H., Kuo M.L., Chen J.C., Chen Y.C.: Arsenic trioxide sensitivity is associated with low level of glutathione in cancer cells. *Br. J. Cancer*, 1999; 81: 796-799
- [84] Ye J., Li A., Liu Q., Wang X., Zhou J.: Inhibition of mitogen-activated protein kinase enhances apoptosis induced by arsenic trioxide in human breast cancer MCF-7 cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2005; 32: 1042-1048
- [85] Zhang T.D., Chen G.Q., Wang Z.G., Wang Z.Y., Chen S.J., Chen Z.: Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene*, 2001; 20: 7146-7153
- [86] Zhang X., Yang F., Shim J.Y., Kirk K.L., Anderson D.E., Chen X.: Identification of arsenic-binding proteins in human breast cancer cells. *Cancer Lett.*, 2007; 255: 95-106
- [87] Zhao W., Wang H., Wang X., Wu F., Guo W., Qu B., Shen Z., Wang Z.: Effects of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide on the hemostatic disturbance associated with acute promyelocytic leukemia. *Thromb. Res.*, 2001; 102: 197-204
- [88] Zhao W.L., Chen S.J., Shen Y., Xu L., Cai X., Chen G.Q., Shen Z.X., Chen Z., Wang Z.Y.: Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: clinical and basic studies. *Leuk. Lymphoma*, 2001; 42: 1265-1273
- [89] Zhou J., Shi J., Hou J., Cao F., Zhang Y., Rasmussen J.T., Heegard C.W., Gilbert G.E.: Phosphatidylserine exposure and procoagulant activity in acute promyelocytic leukemia. *J. Thromb. Haemost.*, 2010; 8: 773-782
- [90] Zhu J., Koken M.H., Quignon F., Chelbi-Alix M.K., Degos L., Wang Z.Y., Chen Z., de Thé H.: Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 3978-3983
- [91] Zhu J., Okumura H., Ohtake S., Nakamura S., Nakao S.: Arsenic trioxide induces apoptosis in leukemia/lymphoma cell lines via the CD95/CD95L system. *Oncol. Rep.*, 2003; 10: 705-709
- 

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.