

Metabolizam i toksičnost arsena

Lasić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:826769>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Lucija Lasić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Metabolizam i toksičnost arsena

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2021.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

15. kolovoza 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

24. rujna 2021.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	3
2.1. Arsenove specije	3
2.2. Metabolizam arsena.....	6
2.2.1. Unos, raspodjela i izlučivanje.....	6
2.2.2. Mehanizami metabolizma arsenovih spojeva.....	8
2.2.3. Postoje li bakterije koje ugrađuju arsenat umjesto fosfata u biološke molekule?	12
2.3. Toksičnost arsena.....	15
2.3.1. Akutno trovanje.....	15
2.3.2. Kronično trovanje.....	15
2.3.3. Toksičnost As(V).....	17
2.3.4. Toksičnost As(III).....	18
2.3.5. Kancerogenost i genotoksičnost.....	19
2.3.6. Inhibicija popravka DNA.....	20
2.3.7. Promjene u metilaciji DNA.....	21
2.3.8. Oksidativni stres.....	22
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXVI

§ Sažetak

U ovom završnom radu opisani su toksičnost i metabolizam arsenovih spojeva s naglaskom na anorganske spojeve budući da su oni otrovniji. Opisani su različiti spojevi arsena koji se javljaju u prirodi te njihova svojstva, toksičnost i mogući izvori trovanja. Za razumijevanje toksičnosti arsena jako je važno shvaćanje njegova metabolizma. Iz tog su razloga prikazani načini ulaska, distribucije i izlučivanja iz stanica i tijela, te sami mehanizmi metabolizma - oksidacija, redukcija, metilacija te konjugacija s tiolima. Ukratko je opisana klinička slika akutnog i kroničnog trovanja arsenom koja uključuje bolesti, poremećaje u radu te kancerogenost za gotovo sve organske sustave; a zatim i mogući mehanizmi toksičnosti arsenovih spojeva s arsenom u oksidacijskom stanju +III i +V. Nadalje, opisani su predloženi mehanizmi kancerogenosti i genotoksičnosti arsenovih spojeva, budući da su to najopasnije posljedice trovanja arsenom. Naglasak je na mehanizmima nastajanja oksidativnog stresa, inhibicije popravka DNA i promjena u metilaciji DNA.

§ 1. UVOD

Arsen je element 15. skupine (dušikova skupina) te se u prirodi može naći u obliku raznih spojeva, ali i u elementarnom stanju. U Zemljinoj je kori 10. po zastupljenosti, a može ga se naći u vodi, zraku te u živim organizmima. Njegova zastupljenost u prirodi većinom nije posljedica antropogenih aktivnosti, ali i one postoje.¹

Arsenovi spojevi prepoznati su kao multisustavni kancerogeni te uzročnici raznih poremećaja i tegoba u ljudi i životinja kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes, poremećaji imunološkog i živčanog sustava, sustava za izlučivanje te mnogih drugih. Djeluju na oko 200 enzima u ljudskom organizmu te narušavaju rad organizma na razne načine. Opisani i predloženi su razni mehanizmi toksičnosti kao što su interferencija s metaboličkim putevima koji osiguravaju staničnu energiju i popravak DNA, oksidativni stres, genotoksičnost, ometanje putova prijenosa signala, promocija stanične proliferacije, promjena metiliriranja DNA te drugo.²

Kronična izloženost arsenu putem vode i hrane veliki je problem više od 100 milijuna ljudi širom svijeta. Pogođena područja su Čile, Mađarska, Pakistan, Kina, SAD, Meksiko, Argentina, Indija i Bangladeš. Najveće koncentracije arsena u vodi izmjerene su u Indiji, Bangladešu i Zapadnom Bengalu gdje koncentracija arsena u vodi doseže visokih 3400 µg/L.³ World Health Organization (WHO) preporučuje kako koncentracija arsena u pitkoj vodi ne bi trebala premašivati 10 µg/L, a u Hrvatskoj je propisana maksimalna koncentracija 50 µg/L. Međutim, na istoku Hrvatske je u mnogim mjestima ta koncentracija premašena. U Našicama i Osijeku koncentracija premašuje 10 µg/L, u Čepinu je čak 172 µg/L, a u Andrijaševcima 612 µg/L.⁴

Kroz povijest arsen je imao široku primjenu budući da se o njegovoj toksičnosti za ljude nije mnogo znalo. Korišten je kao pesticid, insekticid, herbicid te u peradarstvu, budući da može potaknuti aktivnost faktora rasta u peradi. To je, uz rudarenje, jedan od antropogenih putova kojim arsen može završiti u tlu, vodi, a zatim povrću i voću. Posebno poznata primjena arsenovih spojeva je u pigmentima. Najpoznatiji od njih je bakrov(II) acetoarsenit - Pariško zeleno korišteno u kozmetici, za tkanine, igračke i tapete. U 19. stoljeću mnoga nenamjerna trovanja arsenom upravo su bila posljedica korištenja arsenovih spojeva u pigmentima za tapete. Kada se zbog vlage razviju gljivice *Scopularis brevuculis*, one prevode arsenit iz tapeta

u arsin, izuzetno otrovan plin. Arsenovi spojevi također su korišteni u medicini još od Stare Grčke kada je Hipokrat koristio arsenovu pastu za liječenje čireva. Najpoznatiji lijek na bazi arsenovog spoja je *Fowler's solution*, 1%-tna otopina kalijeva arsenita korištena za liječenje širokog spektra bolesti kao što su malarija, sifilis, angina, astma i kožne bolesti kao psorijaza. Danas se arsenov(III) oksid koristi za liječenje akutne promijelocitne leukemije te se istražuje mogućnost primjene u liječenju drugih vrsta karcinoma. Arsenovi spojevi su upravo iz razloga što nemaju okus i miris, slabo su obojeni te vrlo toksični, u malim dozama korišteni kao otrovi za ubojstva i samoubojstva. Kristali arsenovih soli, arseniti i arsenati, nalikuju kristalima saharoze. Dodatna prednost arsena kao otrova bila je ta što su najizraženiji simptomi akutnog trovanja arsenom sličili simptomima zaraznih bolesti kao što je kolera.^{3,5}

Shvaćanje metabolizma arsena izuzetno je bitno za razumijevanje toksičnosti budući da se arsenovi spojevi u tijelu mogu naći u oksidacijskim stanjima +III i +V, te u različitim stupnjevima metiliranosti i konjugaciji sa tiolima, a svi oni imaju različitu toksičnost i djelovanje na organizam.⁶

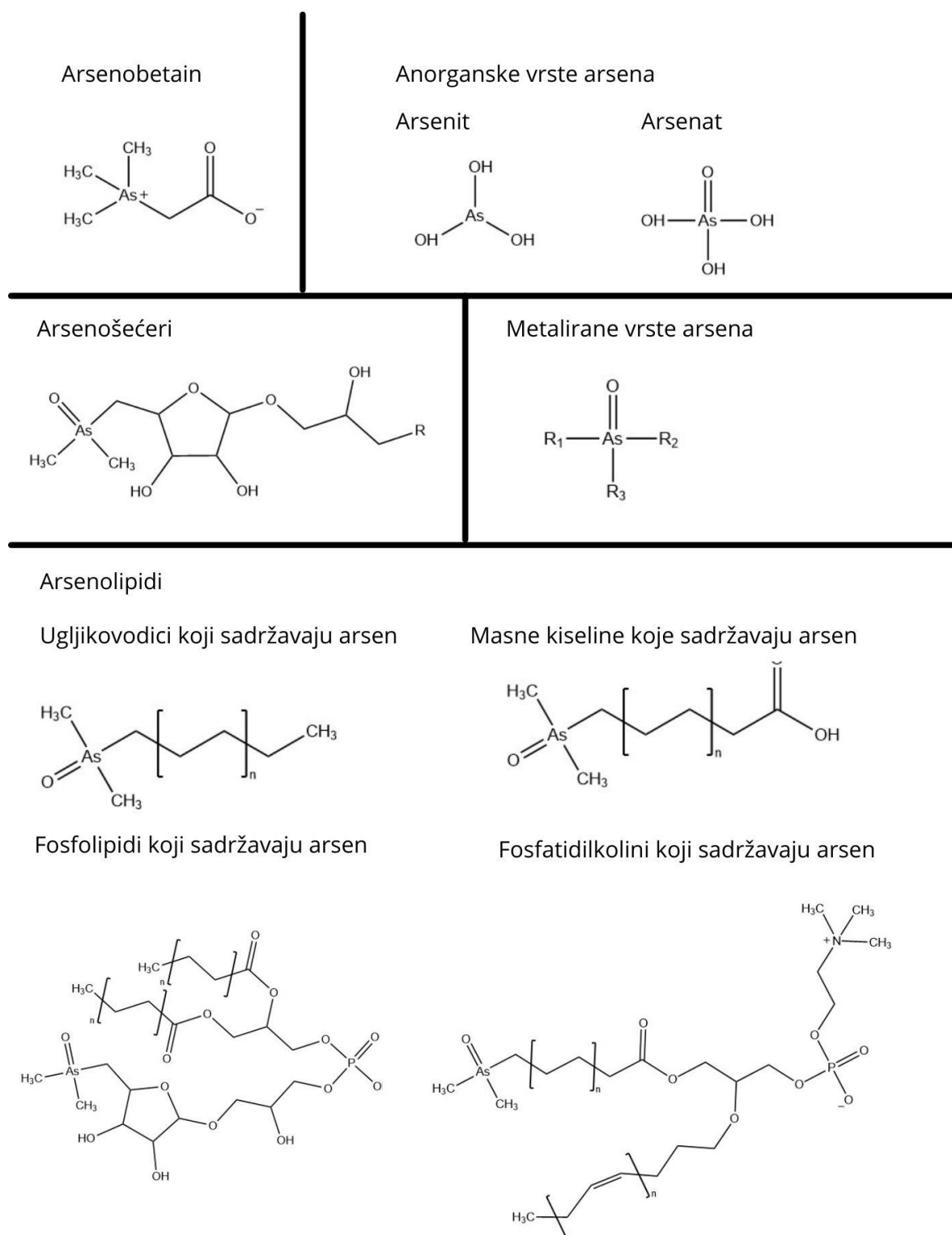
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Arsenove specije

Arsen se javlja u spojevima u oksidacijskim stanjima -III, 0, +III i +V. Najstabilniji su spojevi u kojima je oksidacijski broj arsena +III i +V. Spojevi oksidacijskog broja +III mogu imati koordinacijske brojeve 3 i 4, a u stanju +V koordinacijski brojevi su 4, 5 i 6.⁷

U prirodi se može naći u obliku organskih i anorganskih spojeva. Organski spojevi arsena mogu se naći u morskim ribama, plodovima mora i algama. Na slici 1. prikazani su spojevi arsena koji se pojavljuju u morskoj hrani gdje je većinom riječ o organskim spojevima, dok je anorganskih spojeva manje. Najzastupljeniji arsenov spoj u morskim ribama je arsenobetain koji se ne metabolizira u organizmu i potpuno je neotrovan za ljude i životinje. Arsenošećeri i arsenolipidi također se mogu naći u morskim životinjama; oni se metaboliziraju ali su manje toksični od anorganskih spojeva arsena.

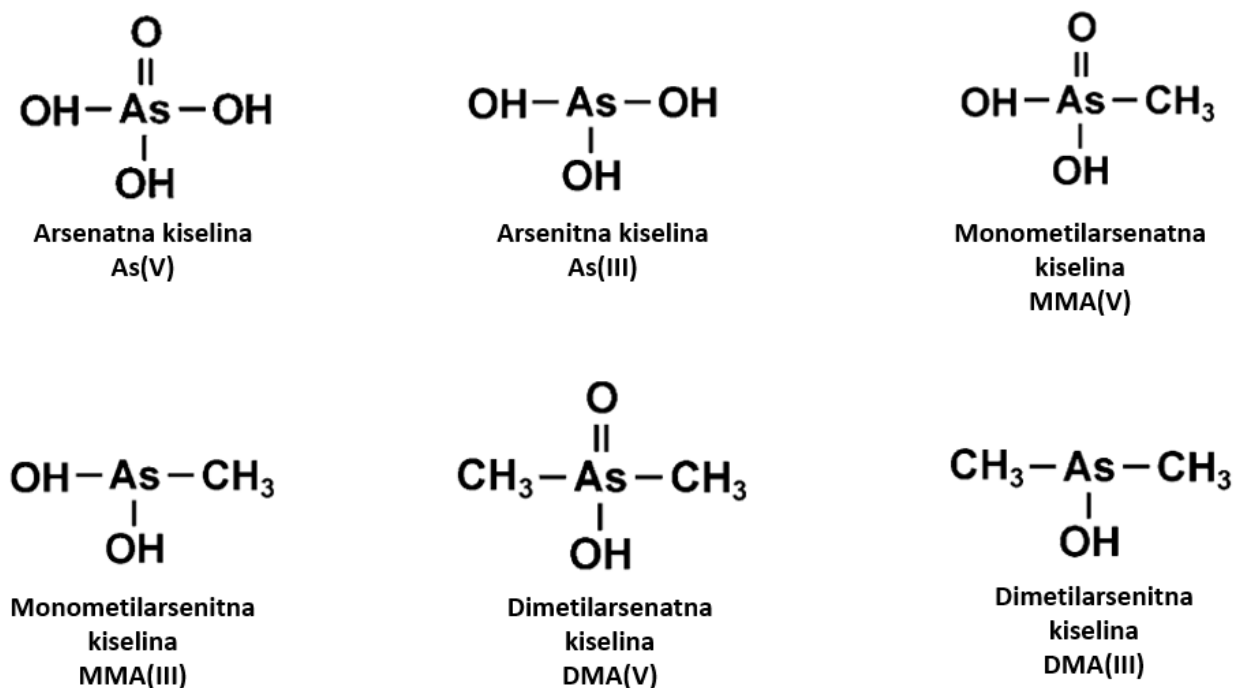
Bitna kategorija organskih spojeva arsena su metilirani arsenovi spojevi jer su oni metaboliti anorganskih te nekih organskih spojeva. U njima se arsen može nalaziti u oksidacijskom stanju +III ili +V. Najbitniji metilirani spojevi arsena su monometilarsentat (MMA(V)), dimetilarsenat (DMA(V)), monometilarsenit (MMA(III)), dimetilarsenit (DMA(III)) i trimetilarsinoksid (TMAO(V)).^{1,8}



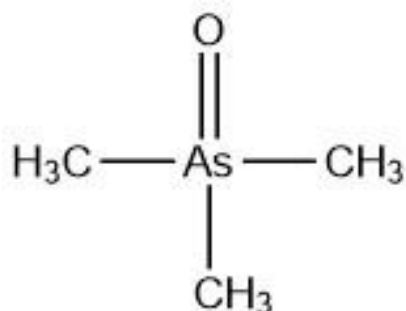
Slika 1. Vrste arsenovih spojeva koje su prisutne u morskoj hrani (izrađeno u programu *ChemDraw 19.0.*)

Najveću opasnost za ljude i životinje predstavljaju anorganski spojevi arsena koji se mogu naći u prirodi. Anorganski arsen se lakše apsorbira od organskog, anorganski spojevi u kojem je arsen u oksidacijskom stanju +V (As(V)) se izlučuje brže od anorganskih spojeva u oksidacijskom stanju +III (As(III)), a organski spojevi uneseni u organizam izlučuju se brže od anorganskih. Anorganski arsen u oksidacijskom stanju +III toksičniji je od onog +V jer se, između ostalog, lakše apsorbira u stanice. Metilirane vrste arsena +III također su toksičnije od onih +V.

Najbitniji spojevi As(III) su arseniti (soli arsenitne kiseline, H_3AsO_3), arsenov(III) oksid ili arsenik (As_2O_3) te arsin (AsH_3). As_2O_3 je jako otrovan pa se primjenjuje u sredstavima za deratizaciju, uništavanje korova, za obradu kože i drva te prepariranje životinja. U medicini se koristi kao kemoterapeutik. AsH_3 je izuzetno otrovan plin i jedan od najsnažnijih anorganskih otrova. Nema praktične primjene, ali je važan u industrijskoj toksikologiji jer pri obradi legura (koje sadrže arsen) kiselinama može nastati arsenovodik i izazvati trovanja organizma. Maksimalna koncentracija arsenovodika u zraku ne bi smjela prijeći 50 ppm. Najbitniji spojevi As(V) su arsenati (soli arsenatne kiseline H_3AsO_4). Na slici 2. prikazane su strukture važnih spojeva arsena.^{1,5,7}



Slika 2. Važni spojevi arsena i njihove strukture (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref.5)



Slika 3. Struktura trimetiarsinoksida (TMAO(V)) – metabolit arsenovih spojeva koji se u organizmu i urinu može naći u tragovima (izrađeno u programu *ChemDraw 19.0.*)

2.2. Metabolizam arsena

2.2.1. Unos, raspodjela i izlučivanje

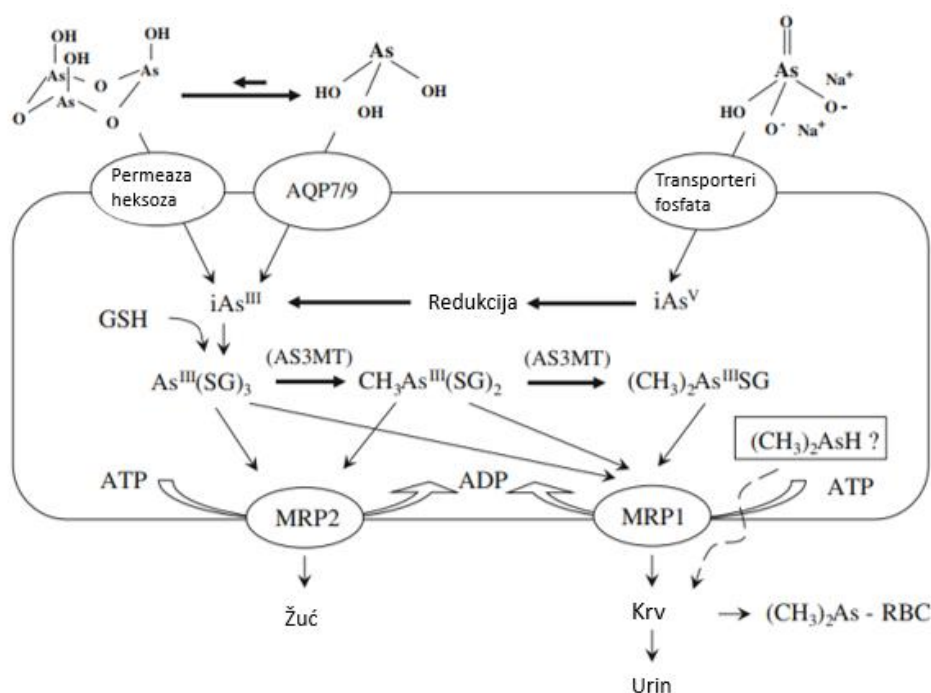
Trovanje arsenom moguće je konzumiranjem kontaminirane hrane i vode, udisanjem arsina ili apsorpcijom preko kože. U krvotok 90% posto arsenovih spojeva biva apsorbirano iz tankog crijeva. To se odvija pomoću procesa koji uključuje protonski gradijent te pomoću antiporta natrijevih kationa i anorganskih fosfata gdje As(V) ulazi iz tankog crijeva u krvotok umjesto fosfata. Arsenatni anion strukturom i svojstvima vrlo je sličan fosfatnom anionu pa ga tako u određenim procesima može vrlo lako i učinkovito zamijeniti. Spojevi arsena u kojima je on u oksidacijskom stanju +III se brže apsorbiraju od onih u kojima je u oksidacijskom stanju +V.⁹

Arsen se može vezati za hemoglobin što povećava vrijeme koje će biti prisutan u krvotoku. As(III) veže se za intercelularni GSH, a As(V) će se kretati putevima fosfata te tako smanjivati koncentraciju nastalog ATP-a i povećati koncentraciju fosfata. U stanicu arsen ulazi putem proteinskih kanala, akvagliceroporina, transportera za glukozu GLUT1 te As(V) transporterima za fosfat. Što se tiče unosa u stanicu, slijed prema brzini unosa u stanicu izgleda ovako: DMA(III) > MMA(III) > As(III) > As(V) > MMA(V) > DMA(V) > TMAO(V). Razlog zašto će As(III) lakše ulaziti u stanicu od As(V) je taj što će pri fiziološkom pH As(III) biti nenabijen, a As(V) nabijen.^{2,9,10}

Glavnina metabolizma spojeva arsena odvija se u jetri gdje se anorganski arsen oksidira, reducira i metilira, o čemu će biti više riječi u daljnjem tekstu. Atomskom spektroskopijom pokazano je da se pri kroničnoj izloženosti arsenovim spojevima najviše arsena nakuplja u jetri, bubrezima i mokraćnom mjehuru, zatim srcu i plućima, a nešto manje i u mišićima, slezeni, probavnom i živčanom sustavu. Arsen se također distribuira u tkiva bogata proteinima kao što su koža, kosa i nokti, te tamo zaostaje već 2 tjedna nakon unošenja u organizam. Dok iz drugih

navedenih organa nakon nekog vremena postupno nestaje, u kosi, koži i noktima zaostaje trajno.³

Arsen unesen u organizam biti će izlučen urinom za 2 do 14 dana te je to glavni način izbacivanja njegovih metabolita iz tijela. Glavni metabolit arsenovih spojeva je DMA(V) te u urinu taj spoj čini 60-70% ukupnog izbačenog arsena, a uz njega se izlučuju i As(III), As(V) i MMA(V). Arsenovi spojevi iz stanice mogu izlaziti u obliku metiliranih spojeva te konjugata s glutationom (GSH). Za njihov transport iz stanice koriste se dvije podobitelji ABC prenositelja (ATP-binding cassette transporters) kao što je uz shemu metabolizma prikazano na slici 3. Dio dimetilarsenata iz jetre će putovati krvlju tako da ga apsorbiraju crvene krvne stanice u kojima se veže za cisteine hemoglobina tvoreći dimetilarsin-tio komplekse. To je posebno izraženo u štakora koji imaju veći udio cisteina u hemoglobinu od drugih vrsta životinja.^{9,10}

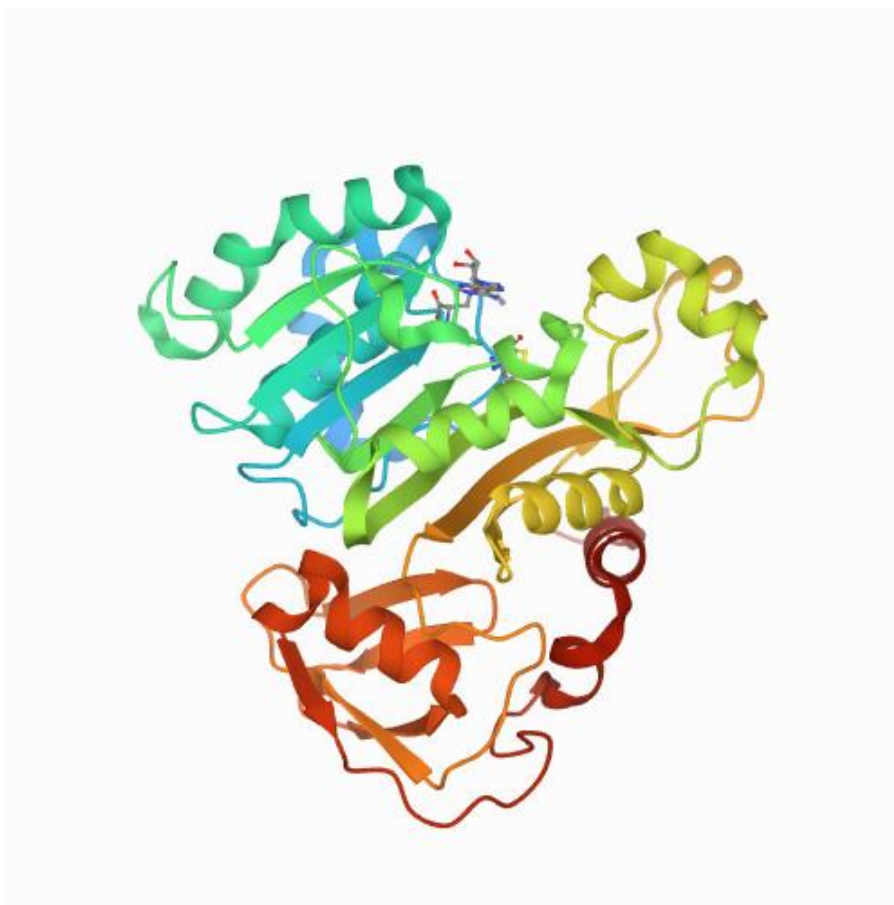


Slika 4. Apsorpcija, metabolizam i izlučivanje arsenovih spojeva iz hepatocita. Arsenit ili As(III) ulazi u stanicu pomoću permeaza heksoza i akvagliceroporina, a arsenat ili As(V) pomoću transportera za fosfate. As(V) reducira se u As(III) koji se metilira pomoću arsenit metiltransferaze (AS3MT) i stvara konjugate s glutationom (GSH). MRP2 i MRP1 (*multidrug resistance proteins*) su vrste ABC prenositelja koji omogućavaju izlučivanje arsenovih metabolita iz stanice (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref.9)

2.2.2. Mehanizmi metabolizma arsenovih spojeva

Metabolizam arsena izuzetno je važan za razumijevanje toksičnosti. Toksikologija arsena komplicirana je zbog sposobnosti njegovih spojeva da prelaze iz oksidacijskog stanja +III u stanje +V (i obrnuto) te da prelaze u organske metilirane forme, kao i u konjugate sa tiolima. Ti procesi uzrokuju različite afinitete tih spojeva da se vežu za određena tkiva te zahtijevaju različite mehanizme intoksifikacije i detoksifikacije. Najbitnije su reakcije oksidacije, redukcije i metilacije.^{6,11}

Mnogi, ali ne svi, organizmi metiliraju anorganski arsen. Neke vrste koje ga ne metiliraju su čimpanze i neke druge vrste majmuna te zamorci, a metiliraju ga, između ostalog; ljudi, štakori, hrčci, i zečevi. Ti organizmi imaju enzim arsenit metiltransferazu (AS3MT) koja prevodi As(III) u MMA(V) i DMA(V). Iako čimpanze i zamorci nemaju AS3MT, istraživanja su pokazala da su ti organizmi jednako osjetljivi na akutno trovanje arsenom što ukazuje da metilacija arsenovih anorganskih spojeva nije samo mehanizam detoksifikacije.⁹

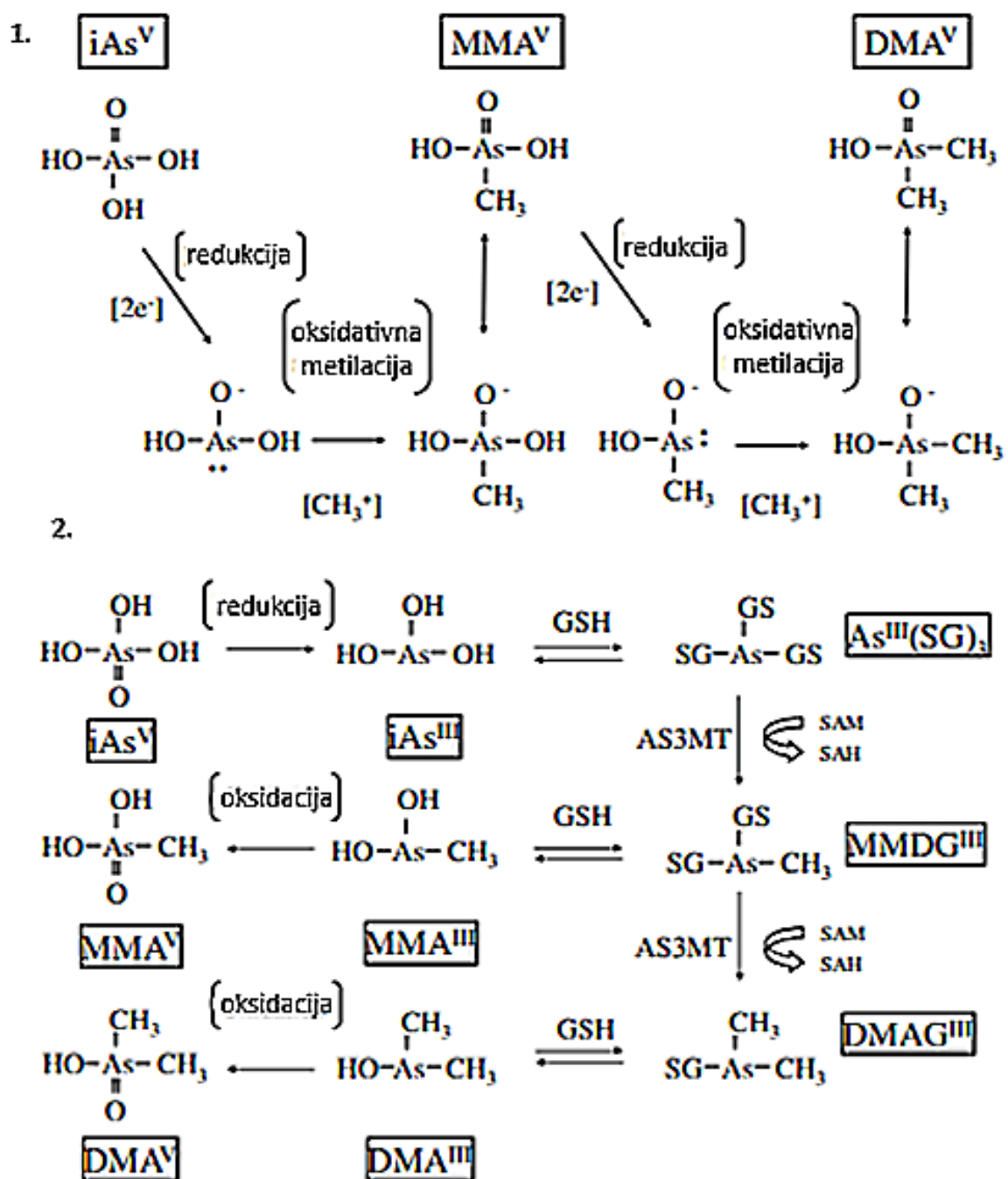


Slika 5. Trodimenzionalna struktura enzima arsenit metiltransferaze s *S*-adenozil-metioninom iz jednostanične crvene alge *Cyanidioschyzon sp*¹²

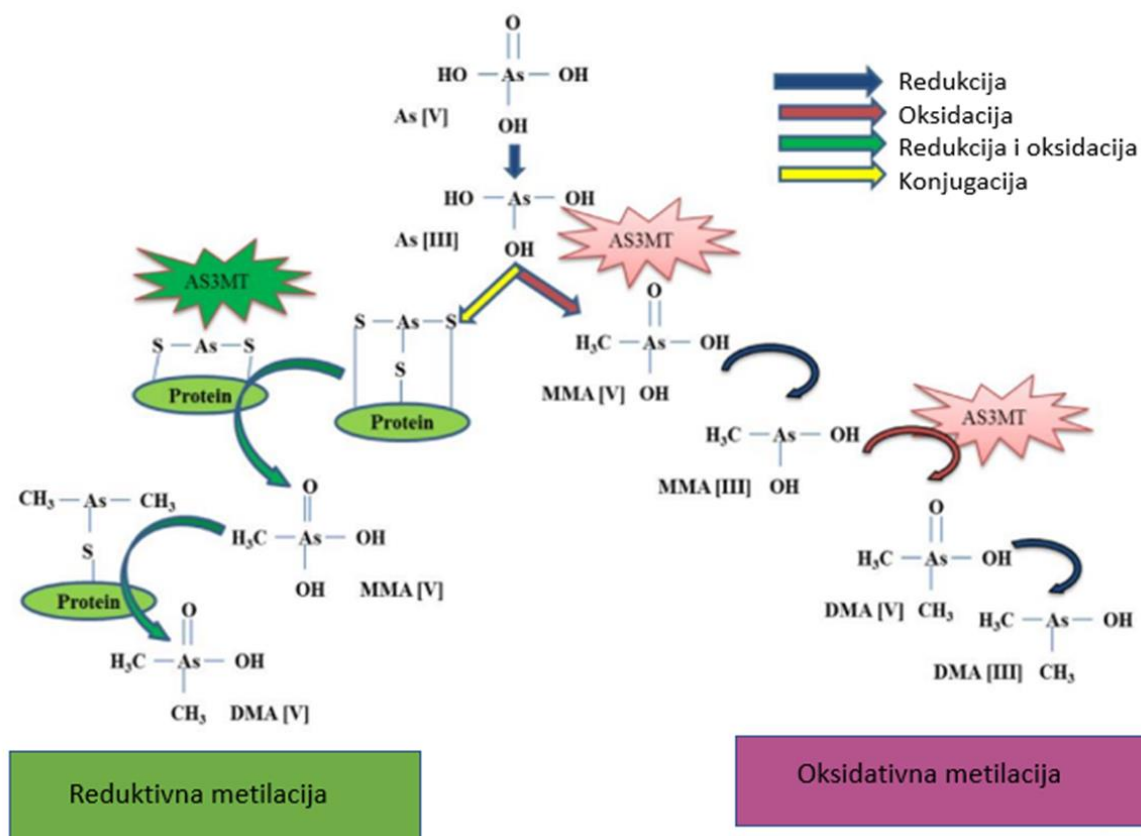
AS3MT ima katalitički aktivne cisteine (Cys157 i Cys207) te postoje dva moguća mehanizma kojim prevodi As(III) u MMA(V) i DMA(V). U oba mehanizma smatra se da je donor metilne skupine *S*-adenozil-metionin (SAM). Glavnina ovog enzima nalazi se u jetri, budući da se tamo uglavnom događa metabolizam arsenovih spojeva.^{2,9}

Prvi mehanizam naziva se klasičnim mehanizmom te uključuje oksidativnu metilaciju; njega je još 1945. predložio F. Challenger. Kod njega dolazi do koordinacije metil-karbokationa, čiji je donor SAM, na nepodijeljenim parom elektrona na As(III). Oksidirajući agens je ovdje SAM, a kod ovog mehanizma smatralo se da su za redukciju As(V) zaslužni tioli (organski spojevi sa jednom ili više tiolnih -SH skupina) te da su konjugati arsenovih spojeva s tiolima intermedijeri ovog puta.^{9,11}

Drugi mehanizam uključuje konjugaciju sa glutationom (GSH) koju slijedi reduktivna metilacija, njega je prvi predstavio S. Hayakawa 2005. godine. U ovom pristupu smatra se da su supstrati AS3MT konjugati arsena s glutationom. U daljnjim istraživanjima pokazano je da je za aktivnost AS3MT neophodna prisutnost tiola kao što su GSH, cistein, merkaptoetanol te ditiotreitol. Međutim, smatra se da je supstrat AS3MT konjugat As(III) s glutationom budući da je velik udio jetrenih metabolita konjugirano upravo s GSH. Na slici 5. prikazana su oba mehanizma.⁹



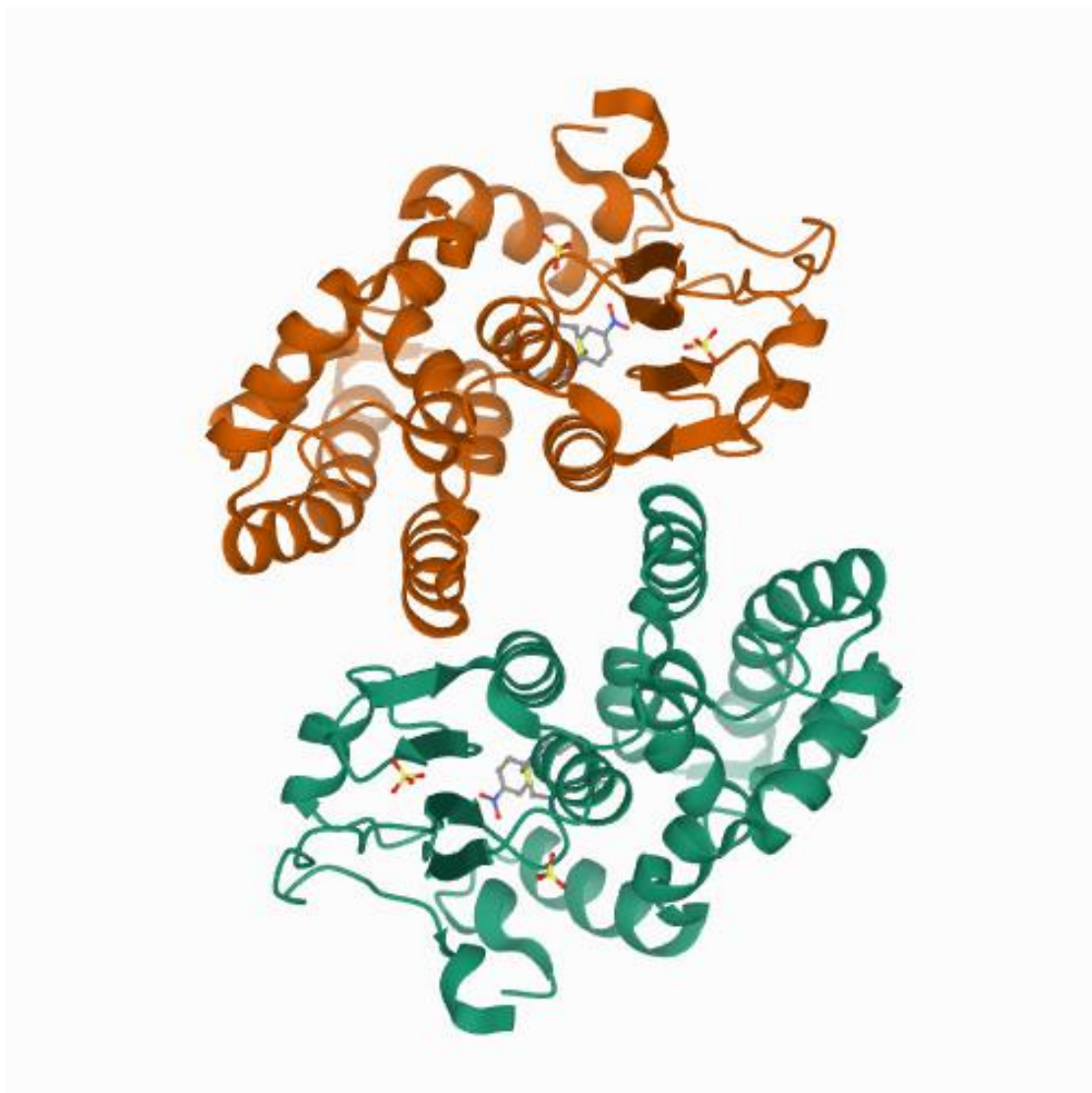
Slika 6. Prikaz klasičnog mehanizma nastanka MMA(V) i DMA(V) iz arsenita (označeno s 1.) te mehanizma koji uključuje konjugaciju s glutationom (označeno s 2.) (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref.9)



Slika 7. Pojednostavljena shema koja prikazuje dva moguća mehanizma nastanka MMA(V) i DMA(V) iz arsenita (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref.2)

Međutim, kod genetski modificiranih miševa koji nemaju gen za AS3MT i dalje se u jetri i u urinu mogu pronaći MMA(V) i DMA(V), ali u manjoj koncentraciji. To upućuje da postoje još neki enzimi sa metiltransferaznom aktivnošću ili da probavna flora ima ulogu u tom metaboličkom putu. As(III) također se može prevesti u MMA(V) i DMA(V) u prisutnosti GSH te vitamina B12 (metil-kobalamina).

Još nije poznato dolazi li do konjugacije s GSH *in vivo* enzimatski ili ne, ali poznato je da se pri dovoljno visokom koncentracijom GSH ona događa spontano. Jedan od enzima u ljudi koji ima važnu ulogu u redukciji As(V) u As(III) te konjugaciji s GSH koja potom slijedi je hGSTO1-1, koja je podklasa enzima glutation S-transferaze omega (GSTO). Međutim, u nedostatku tog enzima kod genetski modificiranih miševa konjugacija se i dalje odvija ako je koncentracija GSH dovoljno velika.⁹



Slika 8. Trodimenzionalna struktura ljudskog enzima glutation S-transferaze omega (hGSTO1-1)¹³

2.2.3. Postoje li bakterije koje ugrađuju arsenat umjesto fosfata u biološke molekule?

Za postojanje živih bića, njihov rast i razvoj, bilo eukariota ili prokariota, neophodno je da imaju izvor biogenih elemenata; pogotovo ugljika, kisika, vodika, sumpora i fosfora budući da oni sačinjavaju biološke makromolekule koje ih grade. Kod mnogih biogenih mikroelemenata te elemenata koji se pojavljuju u tragovima postoje mogućnost i primjeri njihove zamjene nekim drugim elementom. To su većinom metali i metaloidi koji su neophodni za stanične funkcije kao kofaktori ili dijelovi kofaktora enzima i slično. Postoje primjeri zamjene molibdena volframom, cinka kadmijem te čak i željeza bakrom u proteinima zaslužnim za prijenos kisika. Temelj tih zamjena su slična kemijska svojstva.¹⁴

U časopisu Science 2011. godine objavljen je znanstveni rad „*A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus*“ koji je izazvao veliki interes znanstvene zajednice jer je opisivao mogućnost zamjene fosfora arsenom, odnosno fosfata arsenatom. Arsen se u periodnom sustavu nalazi odmah ispod fosfora; imaju sličan atomski radijus te elektronegativnost, a fosfat i arsenat imaju razne strukturne i kemijske sličnosti pri fiziološkim uvjetima. Znanstvenici su taj fenomen promatrali u bakterije GFAJ-1, podvrste porodice halofilnih bakterija *Halomonadaceae* koje su izolirali iz jezera Mono u istočnoj Kaliforniji. Riječ je o slanom jezeru, u kojem su voda i obližnje tlo alkalni te imaju visoku koncentraciju otopljenog arsenata (u prosjeku oko 200 $\mu\text{mol/L}$). Kao izvor bakterija korišteni su riječni sedimenti kojima su dodani glukoza, vitamini, biogeni metali koji se u organizmu pojavljuju u tragovima, ali ne i dodatni fosfat (bilo ga je svega 3,2 $\mu\text{mol/L}$). Koncentracija arsena u uzorcima varirala je između 100 $\mu\text{mol/L}$ do 5 mmol/L . Osim u uvjetima u kojima je dodan arsenat, a fosfat nije (As+/P-); dio bakterija izloženo je i uvjetima gdje je dodan fosfat, a arsenat nije (As-/P+) te konačno dio bakterija izložili su uvjetima bez dodanog fosfata ni arsenata (As-/P-).^{14,15}

Ključno opažanje ovog rada je da u uvjetima As+/P- bakterije GFAJ-1 mogu rasti iako je vrijeme potrebno za udvostručenje populacije gotovo 10 dana. Nastale stanice imaju puno manju intracelularnu koncentraciju fosfora od onih koje su rasle u As-/P+ uvjetima, te 50% veći volumen od njih. U uvjetima As-/P- nije uočen nikakav rast. Transmisijском elektronskom mikroskopijom uočene su velike regije nalik vakuolama u bakterijama koje su rasle u As+/P- uvjetima, koje su vjerojatno uzrok te razlike u volumenu. Korištene su rendgenske analize i radioaktivno obilježen arsenat kako bi pokazali da postoji sličnost u distribuciji arsenata i fosfata u stanici bakterije. Autori rada smatraju da su bakterije podvrste GFAJ-1 sposobne zamijeniti fosfat arsenatom u različitim biomolekulama; da arsenat može sačinjavati okosnicu DNA, ali i da mogu nastati analozi nikotinamid adenin dinukleotida (NADH), adenzin trifosfata (ATP), proteina, fosforiliranih šećera i acetil-koenzim A (acetyl-CoA) sa arsenatom na mjestima gdje bi inače bio fosfat.¹⁴

Već godinu dana kasnije u *Science* objavljen je prvi od mnogo radova u kojima se potvrđuju eksperimentalni rezultati rada „*A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus*“, ali se pobija interpretacija rezultata u tom radu uz provođenje dodatnih analiza. U tom radu su uočili da kada se u uvjetima As+/P- koncentracija fosfata dodatno smanji arsenat ne omogućuje rast stanica bakterije GFAJ-1. Također su u daljnjim analizama stanica koje su nastale u uvjetima As+/P- kao u originalnom radu primijetili izostanak spontane

hidrolize arsenatnih esterskih veza koje bi u hipotetskoj DNA u kojoj je fosfat zamijenjen arsenatom postojale. Zbog dulje veze između arsena i kisika, nego kod fosfora i kisika, takva veza je mnogo podložnija spontanoj hidrolizi. Nadalje, masenom spektrometrijom pokazano je da DNA takvih bakterija sadržava samo tragove arsenata koji nije vezan, te potpuni izostanak kovalentno vezanog arsenata.¹⁶

Nedugo kasnije drugi su znanstvenici nastavili istraživanja na bakterijama GFAJ-1, ali i na vrsti *Escherichia coli* (*E. coli*) te interpretirali podatke i povezali opažanja sa nekim već dobro poznatim pojavama.

Prva od njih je nekontrolirani raspad ribosoma kao posljedica izloženosti arsenatu; koji su izvor velike količine fosfata potrebnog za rast stanice. Iako ovaj proces nije prethodno bio direktno povezan sa izloženosti arsenatom i drugim arsenovim spojevima, dramatično poticanje raspada ribosoma zbog izloženosti arsenu nije nešto što je znanstvenike iznenadilo. Obzirom na ometanje metabolizma i stvaranja stanične energije, bilo je i za pretpostaviti da će arsen narušavati sintezu proteina. Narušena sinteza proteina već je prethodno povezana sa raspadom ribosoma. To je dodatno pokazano time što u izvornom radu nakon izloženosti As⁺/P⁻ uvjetima dvije najintenzivnije pruge na gelu s izoliranim nukleinskim kiselinama iz bakterija gotovo nestanu. Nadalje, dugo vrijeme potrebno za udvostručenje kolonija u As⁺/P⁻ uvjetima također se može objasniti smanjenjem broja ribosoma, odnosno njihovim nekontroliranim raspadom. Kod *E. coli* se smanjenjem broja ribosoma deset puta, povećava vrijeme potrebno za udvostručenje kolonija za 100 minuta.^{14,17}

Druga pojava koja je dobro poznata, a pobija interpretaciju eksperimentalnih podataka rada iz 2011., je postupni razvitak otpornosti na arsenat u bakterija. Iako nije jasno jesu li geni koji su zaslužni za arsenatnu otpornost u GFAJ-1 zapisani u bakterijskom kromosomu ili plazmidima, širok spektar znanstvenih radova opisuje upravo taj fenomen i postoje mnogi mehanizmi kojima se ona može ostvariti. Pojava otpornosti na arsen objašnjava veliku prazninu koja prethodi inicijaciji rasta u GFAJ-1 opažene u izvornom radu, a i u drugima kasnije. Tako je pretpostavka da je bakterija GFAJ-1 sposobna ugrađivati arsen umjesto fosfata u razne biomolekule pobijena, te je njen rast u As⁺/P⁻ uvjetima objašnjen već poznatim pojavama i fenomenima.¹⁷

Toksičnost arsena

2.2.4. Akutno trovanje

Do akutnog trovanja najčešće dolazi slučajnom konzumacijom insekticida ili pesticida, te rijede pokušajem ubojstva. Pri ingestiji mase arsena manje od 5 mg uglavnom dolazi samo do povraćanja i proljeva te nakon 12 sati dolazi do smirenja simptoma. Smrtonosna doza je između 1-3 mg(As)/kg te smrt nastupa za jedan do četiri dana. Akutna toksičnost spojeva u kojima je arsen u oksidacijskom stanju +III (bilo organski ili anorganski) veća je od onih u kojima je u stanju +V. Nakon unosa u organizam dolazi do metabolizma te će najveća koncentracija metabolita u urinu biti unutar 24 sata.^{5,6}

Kliničke značajke trovanja manifestiraju se u gotovo svim organskim sustavima. Najistaknutiji prvi simptomi su proljev, mučnina, povraćanje i prekomjerna salivacija koji dovode do gubitka vode iz organizma. Nakon toga javljaju se i akutne psihoze, difuzni osipi na koži, toksična kardiomiopatija i napadaji. Konačno nakon dovoljno vremena dolazi do raznih hematoloških abnormalnosti kao što su hemoglobinurija, depresija koštane srži i intervaskularna koagulacija; zatajenje bubrega i dišnog sustava zbog plućnih edema; neurološki se manifestiraju periferna neuropatija i encefalopatija. Može doći do komatoznih stanja te smrti ukoliko je doza arsena dovoljno velika.³

Smatralo se da su sve metilirane organske vrste arsena manje akutno toksične od anorganskih, međutim istraživanja su pokazala da iako je metabolit DMA(V) manje toksičan od arsenita i arsenata, za MMA(III) i DMA(V) to nije tako. Navedene vrste su za većinu tkiva toksične barem kao arsenit ako ne i više.⁶

2.2.5. Kronično trovanje

Kronično trovanje arsenom veliki je problem kojim je pogođeno više od 100 milijuna ljudi širom svijeta, uzrok je većinom pitka voda koja je kontaminirana arsenovim spojevima. Kronično trovanje arsenom vodi do multisustavne bolesti i karcinoma te malignih promjena u gotovo svim organskim sustavima. Tijekom izloženosti dolazi do nakupljanja arsena primarno u jetri, bubrezima, plućima i srcu, a manje u mišićima te u živčanom i probavnom sustavu. U tkivima bogatim proteinima kao što su kosa, nokti i koža arsen zaostaje duge vremenske periode čak i nakon prestanka izloženosti arsenu.^{3,6}

Pri kroničnom trovanju manifestiraju se neki simptomi kao i kod akutnog trovanja, to su povraćanje, proljev te abdominalna bol. Dolazi do raznih promjena na koži te se inicijalna

dijagnoza često svodi na detekciju hiperpigmentacije, solarnih keratoza (prekancerogene lezije) te konačno i karcinoma kože; dok se na noktima pojavljuju *Mee's lines*. U kardiovaskularnom sustavu nastaju oštećenja srčanog mišićnog tkiva, aritmija i kardiomiopatija. Za Tajvan je karakteristična i bolest crnog stopala - periferna vaskularna bolest koja uzrokuje gangrenu stopala kao posljedicu kroničnog trovanja arsenom. Općenito je kronično trovanje arsenom povezano s gangrenom ekstremiteta.^{3,18}

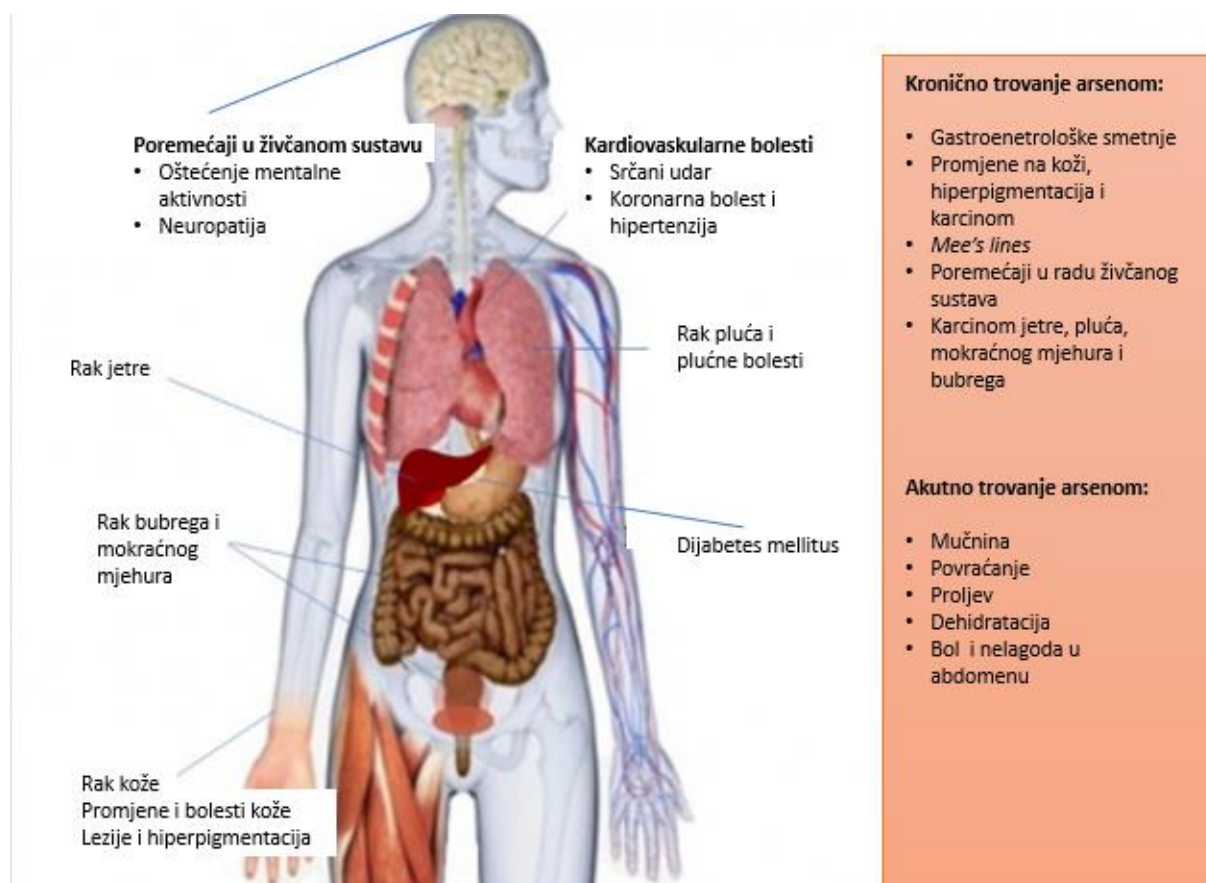


Slika 9. Keratoze na koži dlanova pacijenta koji je dugi vremenski period bio izložen arsenu u vodi iz kontaminiranog izvora¹⁸

Efekti na živčani sustav mnogi su i raznoliki, a najčešća je periferna neuropatija nalik Gullian-Barreovom sindromu. Javljuju se promjene u ponašanju; zbunjenost i gubitak pamćenja te se povećava rizik za cerebrovaskularne bolesti (moždani udar). Uz to javljaju se i bolesti i poremećaji u respiratornom sustavu, jetri i imunološkom sustavu; povećava se i rizik za razvoj dijabetesa tipa II, budući da dolazi do narušavanja mnogih metaboličkih puteva.³

Kronično trovanje arsenom povezano je primarno sa karcinomom jetre, pluća, kože, bubrega i mokraćnog mjehura, ali i sa karcinomima drugih organa. Iako arsen nije direktni mutagen, postoje razni mehanizmi kojima potiče nastanak raka. Pri trudnoći i dojenju postaje rizik prijenosa arsena s majke na dijete, a također se sluti na povezanost kroničnog trovanja

arsenovim spojevima i trudnoća s neželjenim ishodom (spontani pobačaji te malformacije i oštećenje ploda). Ne postoji specifični lijek ili način liječenja kroničnog trovanja osim korištenje antioksidansa čija djelotvornost nije potvrđena.^{3,19}



Slika 10. Kliničke manifestacije kroničnog i akutnog trovanja arsenom u čovjeka (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref.20)

2.2.6. Toksičnost $As(V)$

Zbog sličnosti u strukturi i svojstvima arsenatnog i fosfatnog aniona, arsenatni anion može zamijeniti fosfat u nekoliko metaboličkih puteva. To će uzrokovati interreagirane s raznim metabolitima s kojima inače reagira fosfat, narušavati homeostazu glukoze i narušavati nastanak adenzin trifosfata (ATP) koji je glavna valuta stanične energije.²

Metabolizam glukoze jedan je od puteva u kojima $As(V)$ može zamijeniti fosfat te reagirati s glukozom i drugim metabolitima. Na primjer, reagirati će s glukozom i tvoriti glukozu-6-arsenat umjesto glukozu-6-fosfata. Glukoza-6-arsenat supstrat je enzimu glukozu-6-fosfat dehidrogenaze te će kao i glukozu-6-fosfat biti inhibitor heksokinaze.^{2,6}

Može rasprediti nastanak ATP-a mehanizmom arsenolize. Pri nastanku ATP-a na razini supstrata arsenoliza se može desiti tokom glikolize. Zamjenom fosfata s As(V) u reakciji koju katalizira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza će umjesto 1,3-bisfosfoglicerata nastati 1-arsenato-3-fosfoglicerat. Nastali spoj je nestabilan te ubrzo hidrolizira čime nastaju arsenat i gliceraldehid-3-fosfat; to je tako jer je veza između arsena i kisika 10% duža od one fosfora i kisika. U idućem koraku glikolize bi u reakciji kataliziranoj fosfoglicerat kinazom nastao ATP, ali zbog arsenolize do toga neće doći.⁵

Pri procesu oksidativne fosforilacije na unutarnjoj membrani mitohondrija arsenoliza također može uzrokovati raspredanje nastanka ATP-a. U prisutnosti sukcinata će iz arsenata i adenozin difosfata (ADP) nastajati ADP-arsenat. ADP-arsenat je mnogo nestabilniji od ADP-fosfata, odnosno ATP-a koji treba nastati, te će brzo hidrolizirati.⁶

2.2.7. Toksičnost As(III)

Arsenitni anion ne nalikuje fosfatu ni strukturom ni svojstvima, te ga ne može zamjenjivati u enzimski kataliziranim reakcijama. Arsen u oksidacijskom stanju +III ima veliki afinitet za vezanje na atome sumpora, odnosno stvara stabilne konjugate sa tiolima. Dakle, As(III), MMA(III) i DMA(III) mogu se vezati za potencijalno funkcionalne tiolne skupine enzima, receptora i koenzima. Takvim vezanjem može inhibirati ili potpuno spriječiti djelovanje tih enzima te potencijalno narušavati cijele metaboličke puteve. Reagirati će sa bočnim ograncima cisteina u proteinima te sa glutationom što je i dio samog metabolizma arsena. Arsenit ima veći afinitet prema vezanju na ditiole nego tiole. Međutim, vezanje za neesencijalne dijelove proteina može potencijalno imati ulogu mehanizma detoksifikacije.^{2,6}

Jedan od najbitnijih enzima koje inhibira na taj način je kompleks piruvat dehidrogenaze (PDH); enzim koji katalizira pretvorbu piruvata u acetil-CoA. Uz flavoprotein (FAD) i tiamin pirofosfat (TPP), prostetička skupina PDH je i lipoamid - ditiol koji je ključan za aktivnost tog enzimskog kompleksa. Vezanjem za tiolne skupine lipoamida As(III) inhibira djelovanje PDH i onemogućuje pretvorbu piruvata u acetil-CoA, prekursor ciklusa limunske kiseline (CLK). MMA(III) ima čak i jači afinitet za vezanje na lipoamid te jače inhibira PDH. Inhibicijom nastanka acetil-CoA limitira se nastanak reduciranih kofaktora u CLK, a time se direktno limitira nastanak ATP-a oksidativnom fosforilacijom. Također, nimalo manje bitna posljedica inhibicije PDH je i onemogućavanje nastanka prekursora glukoneogeneze koji nastaju u CLK, čime se narušava homeostaza glukoze u organizmu i mogu nastati metabolički poremećaji. Acetil-CoA je također prekursor za biosintezu masnih kiselina.^{2,5,6}

Metilirani spojevi arsena u oksidacijskom stanju +III, kao što je MMA(III), snažno inhibiraju enzim glutation-reduktazu i tioredoksin-reduktazu. Smatra se da je razlog inhibicije ovih enzima također vezanje za katalitički ključne tiolne skupine. Inhibicija ovih enzima vodi do narušavanja redoks statusa stanice i tako može voditi citotoksičnosti.⁶

2.2.8. Kancerogenost i genotoksičnost

Pri kroničnoj inhalaciji spojeva arsena primarno dolazi do razvoja karcinoma pluća, što je jedan od najranije proučavanih karcinoma koji nastaje kao posljedica trovanja arsenom. S konzumacijom arsenovih spojeva iz vode i hrane prvo je povezan karcinom kože, a kasnije je otkriveno da kroničnim trovanjem dolazi do karcinoma jetre, bubrega i mokraćnog mjehura, ali i drugih organa. Arsen i njegovi spojevi su dokazano kancerogeni, ali točan, detaljan mehanizam kancerogenosti nije potvrđen. Neki od predloženih mehanizama kancerogenosti arsenovih spojeva; od kojih su neki bolje objašnjeni i dokazani, a neki slabije; su genotoksičnost, promocija proliferacije stanica, ko-kancerogenost, promjene popravka i metilacije DNA, oksidativni stres te promocija rasta tumora. Bitnu ulogu u kancerogenosti arsenovih spojeva ima sposobnost ometanja putova prijenosa signala u stanici čime može doći do promjene ekspresije gena te aktivacije i deaktivacije raznih proteina i enzima.^{6,19,21}

Genotoksični efekti arsena počeli su se istraživati 1970-ih te su većinom ukazivali da iako arsenovi spojevi uzrokuju oštećenja DNA, ne interagiraju s DNA direktno te tako uzrokuju mutacije i oštećenja. Međutim, iako arsen nije nužno direktno mutagen, genotoksičan je; potiče mutacije kao što je delecija, oksidativna oštećenja DNA, puknuća lanaca DNA, zamjene u sestrinskim kromatidama, kromosomske aberacije i aneuploidija. Daljnja istraživanja pokazala su da izlaganja anorganskom arsenu uzrokuju kromosomske aberacije - lomove, fragmentaciju i oštećenja kromatina te puknuća kromosoma; pri čemu jače djelovanje ima As(III) od As(V). 2001. godine pokazano je da su metilirani spojevi u kojima je arsen u oksidacijskom stanju +III direktno genotoksični te uzrokuju puknuća i oštećenje DNA.^{5,6}

Anorganski spojevi arsena, kao što je arsenat, arsenit i As_2O_3 , imaju ko-mutageno djelovanje s drugim kemijskim mutagenima i elektromagnetskim zračenjima koja imaju kancerogeno djelovanje, npr. rendgensko ili ultravioletno zračenje (UV zračenje). Jedno od prvih takvih istraživanja bilo je 1977. godine na bakterijama *Escherichia coli* koje su se izlagale UV zračenju te su bile nasadene na podloge sa ili bez arsenita. Utvrđena je veća smrtnost kod onih izloženih arsenitu jer je on inhibirao popravak DNA potreban nakon mutacijskog djelovanja UV zračenja.^{5,6}

Ornitiin-dekarboksilaza često se koristi kao „biomarker“ za staničnu proliferaciju; njezina povećana aktivnost signalizira povećanu staničnu proliferaciju. Povećana proliferacija stanica uslijed kronične izloženosti arsenu opažena je u koži i mokraćnom mjehuru. Povećanom proliferacijom stanica može doći do narušavanja staničnog ciklusa te replikacije DNA koja još nije prošla popravak pogrešaka, a tako i do mutacija. Također, moguća je i promocija rasta broja malignih stanica (tumora) povećanom proliferacijom.¹⁹

2.2.9. Inhibicija popravka DNA

Popravak DNA je niz procesa kojim stanica identificira i popravlja oštećenja na molekulama DNA koja je nositeljica genetskih informacija. Vanjski čimbenici, mutagene tvari, ali i normalne metaboličke aktivnosti te pogreške pri sintezi DNA mogu biti uzrok nastanka oštećenja i pogrešaka. Takve pogreške i oštećenja mogu onemogućiti prepisivanje gena koji zahvaćena DNA kodira.²²

Jedan od važnih mehanizama genotoksičnosti je inhibicija popravka DNA. U stanicama izloženim arsenovim spojevima može doći do inhibicije popravka DNA, pogotovo kad je riječ o ko-kancerogenom djelovanju arsena uz neki drugi kemijski mutagen ili mutageno zračenje kao što je već ranije opisano.⁶

Kod nuklearnih ekstrakata *Chinese hamster ovary cell line* (CHO) pronađeno je da arsenit inhibira djelovanje DNA-ligaze pri popravku oštećenja uzrokovanih *N*-nitrozo-*N*-metilurejom (kemijski mutagen). Međutim, bilo je diskutabilno dolazi li do direktnog vezanja arsenita za ligazu ili je inhibicija posljedica stvaranja reaktivnih kisikovih specija (ROS) te promjena u signalnim putovima u stanici koji su poremetili ekspresiju gena; te kako to ovisi o dozi arsena kojom je organizam otrovan. Kasnije je u ljudi pokazano da i kod manjih koncentracija arsenita dolazi do inhibicije što inicira da inhibicija nije direktna, već indirektna preko alteracije redoks stanja stanice (nastankom ROS-ova), ometanjem putova prijenosa signala i fosforilacijom proteina zaslužnih za aktivnost DNA-ligaze.⁵

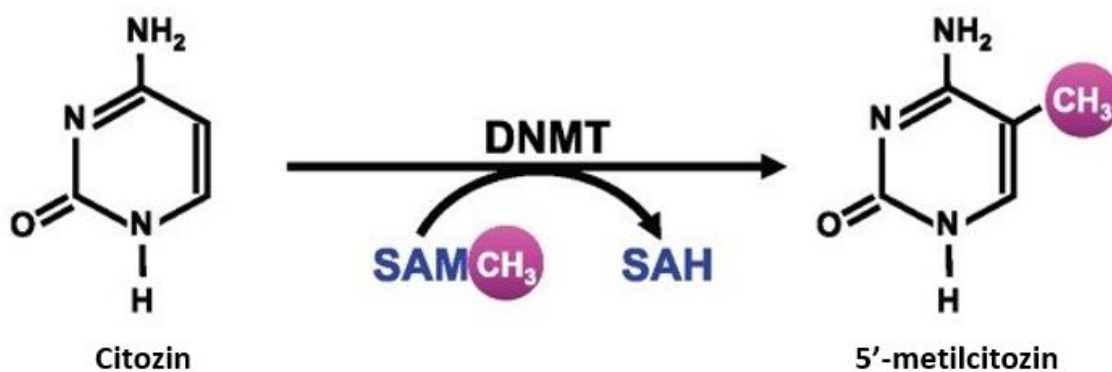
Jedan od enzima koji u eukariota ima ulogu u popravku DNA je poli(ADP-riboza) polimeraza. U T-limfocitima čovjeka uočeno je značajno smanjenje aktivnosti ovisno o dozi arsenita. Pri dozi od 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ arsenita dolazi do 50%-tne inhibicije aktivnosti ovog enzima. Enzim ima dvije katalitički neophodne tiolne skupine te se pretpostavlja da dolazi do vezanja arsenita na jednu ili obje.^{6,19}

Arsen također ima utjecaj i na enzime uključene u popravak DNA izrezivanjem nukleotida (NER) i izrezivanjem baze (BER). Spojevi s arsenom u oksidacijskom stanju +III interagiraju s motivom cinkovih prstiju koji su dio enzima za izrezivanje baze i nukleotida. Katalitička aktivnost enzima koji sadržavaju motiv cinkovih prstiju ovisi o vezanju cinka za cisteinske ogranke. Arsen može narušiti aktivnost enzima vezanjem na cink i udaljavanjem ga iz njegovog veznog mjesta ili inaktivacijom tiolnih skupina cisteina oksidacijom.

Istraživanja pokazuju da vodeću ulogu u kancerogenim efektima arsena ima inhibicija enzima koji sudjeluju u popravku DNA pri uvjetima oksidativnog stresa, upale i proliferativne signalizacije. Takvi uvjeti mogu dovesti do stanja gdje se mitozna odvijanja bez očuvanja cjelovitosti DNA i narušavanja staničnog ciklusa.⁵

2.2.10. Promjene u metilaciji DNA

Metilacija DNA proces je neophodan za normalan rast i razvoj organizma te njegovo pravilno funkcioniranje; povezano je s mnoštvom procesa kao što su inaktivacija X-kromosoma, genomsko utiskivanje, starenje i razvoj karcinoma. Do metilacije dolazi enzimatski na petom ugljikovom atomu citozina pomoću enzima DNA-metiltransferaza. Jedan od faktora koji regulira transkripciju upravo je metilacija DNA.²³



Slika 11. Metilacija DNA odvija se enzimatski DNA-metiltransferazom (DNMT) na petom ugljikovom atomu citozina, donor metilne skupine je S-adenozil-metionin²⁴

Kasnih 1990ih dva nezavisna laboratorija povezali su promjene u metilaciji DNA i trovanje arsenom te su promatrali i hipermetilaciju i hipometilaciju. U jednom laboratoriju su stanice jetre izložili arsenitu 18 tjedana te uočili hipometilaciju cjelokupne DNA, ekspresiju neprirodnih gena i maligne promjene na stanici. U drugom laboratoriju promatrali su metilaciju operatorske regije DNA za protein p53 u stanicama ljudskih pluća tretiranih arsenitom te je

uočena hipermetilacija. Protein p53 je supresor tumora te ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. Hipometilacija njegove promotorske regije kao posljedicu može imati razvoj karcinoma. Daljnja istraživanja pokazala su da je hipometilacija ili hipermetilacija određenih regija DNA važnija nego promjena u metilaciji na razini cijele molekule DNA.⁶

Kod pojedinaca kronično izloženih arsenu također je uočena hipermetilacija ovisna o dozama arsena kojima su bili izloženi, ali i hipometilacija operatorske regije p53. Mehanizam kojim arsen djeluje i mijenja metilaciju DNA nije objašnjen; pretpostavlja se da hipometilaciju može uzrokovati inhibicija DNA-metiltransferaze. SAM je donor metilne skupine za DNA-metiltransferazu i AS3MT, te je koncentracija SAM-a u stanicama izloženim arsenu snižena pa je moguće da i to potiče hipometilaciju.⁵

2.2.11. Oksidativni stres

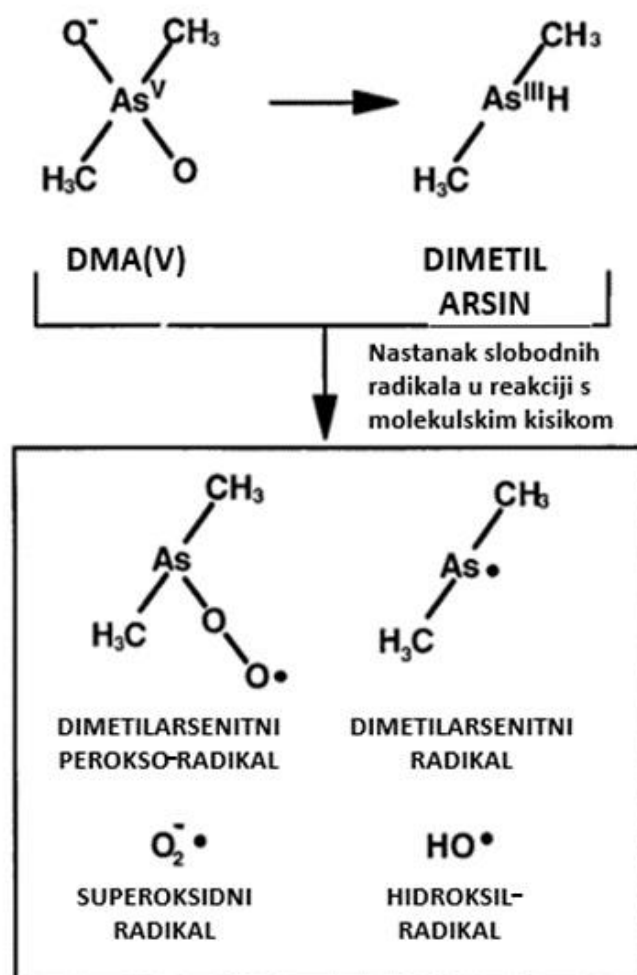
Jedan od najproučavanijih mehanizama toksičnosti i kancerogenosti arsena je poticanje nastanka oksidativnog stresa. Oksidativni stres uzrokovan je neravnotežom između slobodnih radikala i antioksidansa. Slobodni radikali su molekule s nesparenim elektronom što im omogućava da lako reagiraju sa drugim molekulama; mogu uzrokovati lančane reakcije koje mogu potaknuti oštećenje stanica i tkiva, a tako i upale, starenje, karcinom, dijabetes, bolesti živčanog i kardiovaskularnog sustava. Reaktivne kisikove vrste (ROS) koje nastaju kao posljedica trovanja arsenom sudjeluju u raznim mehanizmima toksičnosti kao što su genotoksičnost, inhibicija popravka DNA, induciranje proliferacije stanica i narušavanje puteva prijenosa signala.^{5,25}

Do nastanka ROS-ova dolazi *in vivo* i *in vitro* u prisustvu arsenovih spojeva; to su superoksidni radikal, hidroksil-radikal, vodikov peroksid, reaktivne dušikove vrste (RNS), dimetilarsenitni radikal te dimetilarsenitni perokso-radikal. Detekcija tih vrsta moguća je promatranjem oksidativnih oštećenja DNA, peroksidacije lipida, ekspresija gena koji odgovaraju na stres, gubitak zaliha antioksidansa (na primjer glutaciona), sinteza proteina toplinskog šoka te korištenjem metoda elektronske spinske rezonancije (ESR) i fluorescentne spektroskopije. Više istraživanja pokazalo je da se korištenjem antioksidansa mogu smanjiti nastanak ROS-ova induciran arsenom i toksični efekti koji su posljedica oksidativnog stresa.

Točan mehanizam nastanka reaktivnih kisikovih vrsta kao posljedica trovanja arsenom nije opisan, ali postoji mnogo mogućih. Moguće je da reaktivne kisikove vrste nastaju direktno zbog metabolizma arsena - pri oksidaciji arsenita u arsenat ili zbog nastanka arsina tokom njega,

a moguća je i neizravna stimulacija NADH- ili NADPH-oksidade te inhibicija enzima s reduktaznim djelovanjem kao što su glutation- te tioredoksin-reduktaza i drugo.⁵

Jedan od načina na koje se objašnjava oksidativni stres nastao kao posljedica trovanja arsenom je sljedeći. Redukcijom DMA(III) *in vivo* nastaje dimetilarsin, čija reakcija sa molekulskim kisikom rezultira nastankom dimetilarsenitnog radikala ((CH₃)₂As·), a potom iz njega u reakciji s drugom molekulom kisika i dimetilarsenitnog perokso-radikala ((CH₃)₂AsOO·). Izlaganjem ovim radikalima može doći do oštećenja DNA kao što su jednolančane lezije.¹⁹



Slika 12. Nastanak dimetilarsina redukcijom dimetilarsenatne kiseline (DMA), koji potom reagira s molekulskim kisikom tvoreći dimetil arsenitni perokso-radikal te dimetilarsenitni radikal koji mogu u daljnjim reakcijama uzrokovati nastanak superoksidnog i hidrosil-radikala (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref.19)

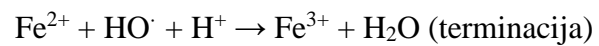
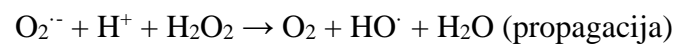
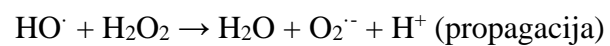
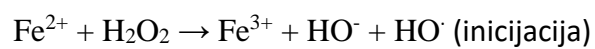
Prednost ovog mehanizma oksidativnog stresa je što može djelomično obrazložiti kancerogenost upravo za one organe za koje je najizraženija te zašto se u njima najviše javljaju karcinomi, a to su pluća, mokraćni mjehur i koža. Pretpostavlja se da su pluća toliko osjetljiva na arsenovu kancerogenost jer je u njima visok parcijalni tlak kisika te se dimetilarsin, koji je plin, izbacuje iz tijela kroz pluća. U mokraćnom mjehuru su visoke koncentracije DMA(V) i MMA(V) stoga redukcijskim procesima potencijalno može nastati dimetilarsin. Koža pohranjuje i skladišti arsen zbog toga što je bogata keratinom za koji se arsenovi spojevi mogu vezati, te se tako objašnjava velika kancerogenost arsena za kožu. Odmah nakon kože, pluća i mjehura, po osjetljivosti na kancerogene efekte arsena ističu se jetra i bubrezi. Objašnjenje njihove osjetljivosti leži u tome što DMA(V) nastaje u jetri oksidativnom metilacijom, a u bubrezima se iz krvi DMA(V) filtrira u urin.¹⁹

Oksidativni stres povećava se kada nastale reaktivne radikalne vrste mogu reagirati sa staničnim konstituentima kao što su tioli i lipidi. Tako može doći do deplecije GSH zbog reagiranja s radikalima koji imaju oksidativno djelovanje. To uzrokuje promjenu u redoks statusu stanice što je toksično i može dovesti do stanične smrti. U hibridomu stanica čovjeka i hrčka se već nakon 5 minuta izloženosti arsenitu mogu detektirati ROS-ovi. Dodatak antioksidansa kao što su vitamin E, benzilni alkohol i metilamin te enzimi koji metaboliziraju oksidanse - katalaza i superoksid-dismutaza, mogu smanjiti toksične učinke arsenita na stanicu.^{6,19}

Smatra se da trovalentni arsenovi spojevi inhibiraju GSH- i tioredoksin-reduktazu, a inhibicija tih enzima može smanjiti sposobnost stanice da se brani od oksidirajućih agensa. Inhibicija tioredoksin-reduktaze ima utjecaj i na ekspresiju gena, budući da taj enzim ima ulogu u regulaciji vezanja transkripcijskih faktora na DNA pri nastanku predinicijskog kompleksa prije transkripcije.¹⁹

DMA(V) i DMA(III), a arsenit i arsenat slabije, povećavaju otpuštanje željeza iz feritina - globularnog proteina zaslužnog za unutarstaničnu pohranu željeza. U prisustvu askorbinske kiseline (vitamina C) s DMA(III) dolazi do sinergističkog efekta i jako velikog otpuštanja željeza iz feritina, ali i sinergističkog povećanja oštećenja DNA. Otpuštanjem željeza iz feritina može doći do generacije hidroksil-radikala Haber-Weiss lančanom reakcijom. Među svim ROS-ovima, za hidroksil-radikal smatra se da je posebno opasna reaktivna vrsta koja DNA napada direktno.

Haber -Weeis lančana reakcija sastoji se od 4 koraka:^{19,26}



§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. M. Sedak, B. Čalopek, M. Đokić, N. Bilandžić, *Veterinarska stanica* **49** (2018) 343-353.
2. A. Sattar, S. Xie, M. A. Hafeez, X. Wang, I. Hussain, Z. Iqbal, Y. Pan, M. Iqbal, M. A. Shabbir, Z. Yuan, *Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals*
<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.etap.2016.10.020>
3. R. N. Ratnaike, *Postgrad. Med. J.* **79** (2003) 391-396.
4. S. Čavar, T. Klapac, R. Jurišić Gruberšić, M. Valek, *Sci. Total Environ.* **339** (2005) 277-282.
5. M. F. Hughes, B. D. Beck, Y. Chen, A. S. Lewis, D. J. Thomas, *Toxicol. Sci.* **123** (2011) 305-332
6. M. F. Hughes, *Toxicol. Lett.* **133** (2002) 1-16
7. <http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/as/spojevi.html#SPOJEVI> (datum pristupa 19. srpnja 2021.)
8. V. Taylor, B. Goodale, A. Raab, T. Schwerdtle, K. Reimer, S. Cohnklin, M. R. Karagas, K. A. Francesconi, *Sci. Total Environ.* **580** (2017) 266-282.
9. T. Watanabe, S. Hirano, *Arch. Toxicol.* **87** (2013) 969-979.
10. C. Sosa, N. Guillen, S. Lucea, V. Sorribas, *Toxicol. Lett.* **333** (2020) 4-12.
11. D. J. Thompson, *Chem.- Biol. Interactions* **88** (1993) 89-114.
12. <https://www.rcsb.org/structure/4FR0> (datum pristupa 22. srpnja 2021.)
13. <https://www.rcsb.org/3d-view/5V3Q> (datum pristupa 22. srpnja 2021.)
14. F. Wolfe-Simon, J. Switzer Blum, T. R. Kulp, G. W. Gordon, S. E. Hoefft, J. Pett-Ridge, J. F. Stolz, S. M. Webb, P. K. Weber, P. C. W. Davies, A. D. Anbar, R. S. Oremland, *Science* **332** (2011) 1163-1166.
15. E. Pennisi, *Science* **330** (2010) 1302.
16. M. L. Reaves, S. Sinha, J. D. Rabinowitz, L. Kruglyak, R. J. Redfield, *Science* **337** (2012) 470-473.
17. G. N. Basturea, T. K. Harris, M. P. Deutscher, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 28816-28819
18. https://www.atsdr.cdc.gov/csem/arsenic/physiologic_effects.html (datum pristupa 24. srpnja 2021.)
19. K. T. Kitchin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172** (2001) 249-261.

20. M. Shahid, C. Dumatm N. K. Niazi, S. Khalid, *Global scale arsenic pollution: increase in scientific knowledge to reduce human exposure* <https://doi.org/10.4000/vertigo.21331>
21. S. J. S. Flora, *Handbook of arsenic toxicology*, Academic Press, Cambridge, 2015, str. 494-498.
22. N. Chatterjee, G. C. Walker, *Environ. Mol. Mutagen.* **58** (2017) 235-263.
23. L. D. Moore, T. Le, G. Fan, *Neuropsychopharmacology* **38** (2013) 23-38.
24. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-DNA-methylation-which-converts-cytosine-to-5methyl-cytosine_fig1_259209496 (datum pristupa 5. kolovoza 2021.)
25. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/324863> (datum pristupa 5. kolovoza 2021.)
26. W. H. Koppenol, J. Butler, J.W. Leeuwen, *Photochemistry and Photobiology* **28** (1978) 655-660.