

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja STAJNKO

**SPECIACIJA ARZENA V TKIVIH IZBRANIH
HRUSTANČNIC SEVERNEGA JADRANSKEGA
MORJA**

Magistrsko delo

Magistrski študij - 2.stopnja

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja STAJNKO

**SPECIACIJA ARZENA V TKIVIH IZBRANIH HRUSTANČNIC
SEVERNEGA JADRANSKEGA MORJA**

Magistrsko delo

Magistrski študij – 2. stopnja

**SPECIATION OF ARSENIC IN TISSUE OF SELECTED
CARTILAGINOUS FISH FROM THE NORTHERN ADRIATIC**

Master Study Programmes

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija molekulske biologije na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Praktično delo je bilo opravljeno na Inštitutu Jožef Štefan, na Odseku za znanosti o okolju v Podgorici in na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za klinično biokemijo, klinični vzorci pa so bili zbrani na Oddelku za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Študijska komisija Oddleka za Biologijo je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Damjano Drobne, za somentorico pa doc. dr. Zdenko Šljekovec.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biokemijo

Mentor: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biokemijo

Somentor: doc. dr. Zdenka ŠLEJKOVEC
Institut Jožef Stefan, Odsek za znanost o okolju

Recenzent: doc. dr. Ingrid FALNOGA
Institut Jožef Stefan, Odsek za znanost o okolju

Datum zagovora:

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja Stajnko

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA (KDI)

- ŠD Du2
- DK 591: 567.3(262.3)(043.3)=163.6
- KG arzen/arzenit/arzenat/bioakumulacija/hrustančnice/navadni morski golob/kljunati morski golob/navadni morski bič/vijoličasti morski bič/induktivno skloplejena plazma z masno spektrometrijo (ICP-MS)/tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC-UV-HG-AFS)/jetra/mišice/akutna promielocitna levkemija (APL)/metalotioneinske (sub)izoforme/kvantitativna reakcija z verižno polimerazo (qPCR)
- AV STAJNKO, Anja diplomirana mikrobiologinja (UN)
- SA DROBNE, Damjana (mentorica)/ ŠLEJKOVEC, Zdenka (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2013
- IN SPECIACIJA ARZENA V TKIVIH IZBRANIH HRUSTANČNIC IZ SEVERNEGA JADRANSKEGA MORJA
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. Stopnja)
- OP XI, 100 str., 14 pregl., 21 sl., 1 pril., 119 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI Pri treh vrstah hrustančnic iz Tržaškega zaliva (navadni morski golob, kljunasti morski golob in vijoličasti morski bič) smo v vzorcih mišic in jeter določali celokupni As z metodo ICP-MS ter vsebnost posameznih As spojin z metodo HPLC-UV-HG-AFS. Opazili smo, da se več As akumulira v mišicah, in sicer delno kot dimetilarsenova kislina (DMA), večinoma pa v obliki arzenobetaina (AsB). AsB se kot glavna oblika pojavi tudi v jetrih, kjer so bili prisotni še arzenolipidi, DMA, arzenit (As(III)) in arzenat (As(V)). Glede na literaturne podatke ima AsB določeno vlogo pri osmoregulaciji, saj je po strukturi podoben osmoregulatorju glicin betainu. Dokazali smo, da se AsB pri skatih akumulira s starostjo ribe.

Ker smo ljudje različnim arzenovim spojinam izpostavljeni predvsem preko morske hrane in pitne vode, smo v nalogi spremljali izločanje arzena z urinom po zaužitju rib in onesnažene vode pri petih prostovoljcih. AsB, ki je prisoten v hrani morskega izvora, se je po zaužitju iz telesa nespremenjen izločil z urinom. Po zaužitju As(III) z mineralno vodo je prišlo do presnove arzena v ljudem manj škodljive spojine (MMA in DMA), ki so se prav tako izločale z urinom.

Zaradi splošne vpletenosti metalotioneinov (MT) pri metabolizmu arzena smo preverjali možnost njihove uporabe kot biomarkerjev arzenske izpostavljenosti. Za testiranje njihovega odziva na arzen smo izbrali bolnico z akutno promielocitno levkemijo, ki so jo zdravili z visokimi odmerki As_2O_3 . V njeni krvi smo spremljali izražanje šestih (sub)izoform MT z metodo qPCR. Potrdili smo vpliv arzena na izražanje subizoform MT-1a, MT-1f in MT-2a ter ustrezno uporabo transkriptov MT v krvi kot biomarker izpostavljenosti visokim odmerkom arzena. Domnevamo, da se transkripti odzivajo tudi pri dolgotrajni izpostavljenosti nizkim koncentracijam arzena pri ljudeh in živalih.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- ND Du2
- DC 591: 567.3(262.3)(043.3)=163.6
- CX arsenic/arsenite/arsenate/bioaccumulation/cartilaginous fish/common eagle ray/common sting ray/pelagic stin gray/inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)/high-performance liquid chromatography (HPLC)/liver/muscle/acute promyelocytic leukemia (APL)/metallothioneins (sub)isoforms/quantitative polymerase chain reaction (qPCR)
- AU STAJNKO, Anja
- AA DROBNE, Damjana (supervisor)/ ŠLEJKOVEC, Zdenka (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- BP University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2013
- TI SPECIATION OF ARSENIC IN TISSUE OF SELECTED CARTILAGINOUS FISH FROM THE NORTHERN ADRIATIC
- DT Master Study Programmes
- NO XI, 100 p., 14 tab., 21 fig., 1 ann., 119 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB We researched the total As in three species of cartilaginous fish from the Trieste Bay (common eagle ray, common sting ray, pelagic stingray) from liver specimens by the ICP-MS method and the content of particular As-compounds by the HPLC-UV-HG-AFS method. We discovered that more As is accumulated in the muscles, partly also as dimethylarsinic acid (DMA), but mostly as arsenobetain (AsB). AsB appears as the main form also in the liver where we can also discover the presence of arsenolipids, DMA, arsenite (As(III)) and arsenate (As(V)). According to the literature, AsB has a particular role in the process of osmoregulation, as its structure resembles osmolyte glycin betaine. We managed to prove that AsB in rays is accumulated proportionately with the age of the fish. Since people are exposed to different arsenium compounds mainly by means of sea food and drinking water, we controlled the discharge of arsenium through urine after the consumption of fish and polluted water in five volunteers. AsB, present in the sea food, discharged from the body through urine without structural changes. After the consumption of As(III) with mineral water, arsenic was digested into less harmful compounds (MMA and DMA), which were also discharged through urine. Taking into account general involvement of metallothioneins (MT) in arsenic metabolism we researched the possibilities of their use as the biomarkers of exposure to high dosages of arsenic. In order to test their response to arsenic we chose a patient suffering from acute promyelocytic leukemia, who had been treated using high dosages of As₂O₃. We followed the presence of six (sub)isoforms MT in her blood using the qPCR method. We confirmed the influence of arsenic on the presence of subisoforms MT-1a, MT-1f and MT-2a and the appropriate use of MT transcripts in blood as. We assume that the transcripts also respond in case of a long-term exposure to low concentrations of arsenic in both people and animals.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informatika	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
Razlaga simbolov in okrajšav	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 LASTNOSTI, IZVOR IN UPORABA ARZENA	3
2.2 KROŽENJE ARZENA V OKOLJU	5
2.3 ARZENOVE SPOJINE V OKOLJU	8
2.3.1 Anorganske As spojine	8
2.3.2 Organske As spojine	10
2.4 ARZEN V MORJU	13
2.4.1 As spojine in njihova koncentracija v morskih sedimentih in vodi	13
2.4.2 As in severno Jadransko morje	14
2.4.3 Bioakumulacija As v morskih organizmih	14
2.4.4 As spojine in ribe	18
2.5 METABOLIZEM ARZENA PRI ČLOVEKU	19
2.5.1 Vloga metalotioneinov pri metabolizmu As pri ljudeh	20
2.5.2 Biološka reaktivnost As spojin (M. Hughes, 2002)	23
2.6 OPIS OBRAVNAVANEGA OBMOČJA IN RAZISKOVANIH RIB	23
2.6.1 Preiskovane vrste rib	24
3 EKSPERIMENTALNI DEL Z MATERIALI IN METODAMI	29
3.1 DOLOČANJE ARZENA V RIBAH	29
3.1.1 Vzorčevanje rib	29
3.1.2 Priprava vzorcev jeter in mišic rib	30
3.1.3 Določanje celokupnega As v liofiliziranih vzorcih jeter in mišic	30
3.1.4 Speciacija As v liofiliziranih vzorcih	32
3.1.5 Obdelava podatkov in izračun rezultatov	35
3.2 DOLOČANJE ARZENA V VZORCIH HUMANEGA URINA	35
3.2.1 Vzorčevanje	35
3.2.2 Določanje As	37

3.3	DOLOČANJE CELOKUPNEGA As V HUMANIH VZORCIH KRVI IN SERUMA	38
3.3.1	Vzorčevanje	38
3.3.2	Določanje celokupnega As	38
3.4	KVANTITATIVNO DOLOČANJE IZRAŽANJA GENOV MT V HUMANIH VZORCIH KRVI	39
3.4.1	Vzorci	39
3.4.2	Izolacija celokupne RNA	39
3.4.3	Določevanje koncentracije in čistosti izolirane RNA	40
3.4.4	Določanje kakovosti izolirane RNA	40
3.4.5	Reverzna transkripcija RNA v cDNA	41
3.4.6	Merjenje izražanja genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR)	42
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	49
4.1	ARZEN V RIBAH	49
4.1.1	Celokupni As v jetrih in mišicah skatov	49
4.1.2	Določitev posameznih oblik As v jetrih in mišicah	53
4.2	SPECIACIJA As V VZORCIH URINA LJUDI IZPOSTAVLJENIH As V HRANI, VODI IN INTRAVENSKO	60
4.2.1	Primerjava speciacije As v urinu preiskovanih oseb po zaužitju ribe (organski As) in kontaminirane vode (anorganski As)	60
4.2.2	Speciacija As v urinu bolnice z akutno promielocitno levkemijo (APL) zdravljene z As ₂ O ₃	65
4.3	CELOKUPNI As V VZORCIH KRVI PROSTOVOLJCEV IN BOLNICE Z APL ZDRAVLJENE Z As₂O₃	68
4.4	KVANTITATIVNO DOLOČANJE IZRAŽANJA GENOV METALOTIONEINOV	70
4.4.1	Koncentracija, čistost in kvaliteta izolirane RNA	71
4.4.2	Učinkovitost reakcije qPCR	72
4.4.3	Vpliv arzenovega trioksida na izražanje genov za (sub)izoforme metalotioneinov	73
5	SKLEPI	82
6	POVZETEK	83
6.1	POVZETEK	83
6.2	SUMMARY	85
7	VIRI	88

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Arzenobetain v morskih živalih (povzeto po Edmons in Francesconi, 2003) __	17
Pregl. 2: Sestava 50 µL reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo (RT). _____	41
Pregl. 3: Priprava standardov za določitev izražanja enega gena z upoštevanom 10 % izgubo pri pipetiranju _____	44
Pregl. 4: Sestava 15 µL reakcijske mešanice za qPCR _____	45
Pregl. 5: Nukleotidna zaporedja OZ (oligonukleotidni začetnik) ter TaqMan Gene expression assay za (sub)izoforne MT in referenčne gene (F- istosmerni, R- protismerni). _____	46
Pregl. 6: Program na aparatu Light Cycler 480 za qPCR z metodo TaqMan _____	47
Pregl. 7: Program na aparatu Light Cycler 480 za qPCR z metodo SYBR Green I _____	47
Pregl. 8: Osnovni biometrični podatki (velikost, teža in spol) skupaj s celokupno koncentracijo As v suhem tkivu posameznih osebkov vrst <i>P. bovinus</i> (PB), <i>M. Aquila</i> (MA) in <i>P. violacea</i> (PV) _____	50
Pregl. 9: Povprečna koncentracija As (\pm standardna deviacija, n= število vzorcev, podano na suho snov) v tkivu jeter in mišic osebkov določene vrste skata iz naše raziskave (preglednica 8) in omenjenih raziskav iz literature _____	52
Pregl. 10: Speciacija arzena v jetrih preiskovanih skatov ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže \pm sd, n=4) __	55
Pregl. 11: Speciacija arzena v mišicah preiskovanih vrst skatov ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže \pm sd, n=4) _____	56
Pregl. 12: Deleži DMA in AsB v urinu preiskovanih oseb posameznega poskusa _____	67
Pregl. 13: Koncentracija, čistost (A260/A280) in kakovost (RIN) izolirane RNA iz vzorcev krvi kontrolne skupine (K1-8, v paralelkah P1/2) in preiskovane skupine (B1-7)	72
Pregl. 14: Povprečni delež izražanja gena posamezne (sub)izoforne z SD pri vzorcih kontrolne skupine. _____	75

KAZALO SLIK

Sl. 1: Biogeokemijsko kroženje arzena v naravi (Jones, 2007)	6
Sl. 2: Osnovna metabolna shema As (SAM: S-adenozil metionin, SAHC: S-adenozil homocistein) (povzeto po Saldivar in sod., 2009)	7
Sl. 3: Obnašanje anorganskega As v okolju glede na različne kombinacije oksidacijsko-redukcijskega potenciala (ORP) in pH (Ferguson in Gavis, 1972)	8
Sl. 4: Pomembne anorganske in organske oblike As v okolju (povzeto po O'Day, 2006)	12
Sl. 5: Struktura metalotioneina s štirimi kovinskimi atomi (Zn) vezanimi v α domeni in tremi v β domeno proteina (povzeto po Ruttkay Nedecky in sod., 2013)	22
Sl. 6 : Navadni morski golob (<i>M. aquila</i>), foto: Doug Perrine	26
Sl. 7: Kljunati morski golob (<i>P. bovinus</i>), foto: Doug Perrine	27
Sl. 8: Vijoličasti morski bič (<i>P. violacea</i>), foto: Aldo Marinelli	28
Sl. 9: Lokacija ulova preiskovanih rib (Lipej in sod., 2008)	29
Sl. 10: Osnovna shema ICP-MS	31
Sl. 11: Shema specijacijskega sistema HPLC-UV-HG-AFS	33
Sl. 12: Korelacija med celokupno koncentracijo As in težo skata vrste <i>P. bovines</i>	53
Sl. 13: Korelacija med koncentracijo AsB in težo vrste <i>P. bovinus</i>	58
Sl. 14: Količina totalnega As, AsB in DMA (μg), ki so se izločile z urinom v 24 urah po zaužitju ribe pri petih preiskovanih osebah (PO1.PO5)	61
Sl. 15: Količina izločenega AsB v urinu prostovoljca po 24, 48 in 72 urah po zaužitju ribe	62
Sl. 16: Anorganski arzen in njegovi metaboliti v 24 urnem urinu pri eni osebi med in po pitju vode, kontaminirane z anorganskim As(III)	63
Sl. 17: Koncentracije AsB v urinu prostovoljca	64
Sl. 18: Delež posameznih metabolitov arzena v jutranjih urinih pacientke prvih 25 dni (A) ter 15 dni po prvi pavzi (B) terapije z As_2O_3	66
Sl. 19: Jutranje koncentracija celokupnega As (ng g^{-1}) v vzorcih serumov odvzetih pred intravensko infuzijo As_2O_3 ($0,15 \text{ mg kg}^{-1}$) pri bolnici z APL (* vzorci pri katerih je bila hkrati odvzeta tudi polna kri za analizo kvantifikacije izražanja genov MT; # vzorec 30 sredi pavze in vzorec 37 prvi dan terapije po pavzi)	69

Sl. 20: Koncentracija celokupnega As (ng g^{-1}) v vzorcu seruma in polne krvi osmih prostovoljcev (* vzorci vključeni v analizo kvantifikacije izražanja genov MT; a-koncentracija ocenjena na podlagi koncentracije iz seruma ob upoštevanju faktorja koncentracije polna kri/serum= 1,39)_____ 69

Sl. 21: Primerjava izražanja genov za (sub)izoforme MT v krvi bolnice in prostovoljcev (KO, ...) ter med posameznimi odvzemi krvi bolnice (B5-B50 oz. med 5 in 50 dnem (* statistično značilne razlike med bolnico in kontrolo, # statistično značilne razlike med prvim in zadnjim vzorcem bolnice). Enota 1 na y-osi pomeni, da je razmerje: vrednost posamezne (sub)izoforme/ geom. sredina vrednosti Actb in Rplp0 (za MT (sub)izoforme in gen Gapdh), vrednost Rplp0/vrednost Actb (za gen Rplp0) ter vrednost Actb/vrednost Rplp0 (za gen Actb) enako 1. _____ 76

KAZALO PRILOG

Ppriloga I:

- a) povprečne ne normalizirane relativne koncentracije mRNA genov MT ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) in njihove standardne deviacije
- b) rezultati normalizirani na vrednosti *Actb*
- c) rezultati normalizirani na vrednosti *Rplp0*
- d) rezultati normalizirani na geometrijsko sredino *Actb* in *Rplp0*

RAZLAGA SIMBOLOV IN OKRAJŠAV

<i>Actb</i>	beta aktin; angl.: actin beta
As	element arzen
As(III)	arzenit (tudi As ³⁺)
As(V)	arzenat (tudi As ⁵⁺)
AsB	arzenobetain
AsC	arzenoholin
APL	akutna promielocitna levkemija; angl.: acute promyelocytic leukemia
DMA	dimetilarzenova kislina
<i>Gapdh</i>	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza; angl.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti; angl.: high performance liquid chromatography
ICP-MS	masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo; angl.: inductive coupled plasma mass spectrometry
MMA	monometilarzenova kislina
mRNA	informacijska RNA; angl.: messenger RNA
MT	metalotioneini
MT-1, MT-2	izoforme MT
MT-3, MT-4,	
MT-1a, MT-2a ipd.	subizoforme MT
OZ	oligonukleotidni začetnik
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo; angl.: quantitative polymerase chain reaction
RIN	angl.: RNA integrity number
<i>Rplp0</i>	veliki ribosomski protein P0; angl.: ribosomal protein, large, P0
TMAO	trimetilarzenoksid
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija; angl.: World Health Organization

1 UVOD

Tržaški zaliv je plitev del severnega Jadranskega morja in je zaradi majhne količine vode ekološko zelo občutljiv. Zaliv je onesnažen z industrijskimi odpadki, ki so posledica izlivov onesnaženih slovenskih in italijanskih rek ter številnih obalnih in pristaniških mest (Koper, Trst). Eden glavnih onesnaževalcev zaliva je živo srebro, ki so ga preučevali v večih študijah. V okolju pa je pogost tudi strupen element arzen, za katerega v Tržaškem zalivu ni veliko podatkov. Morski organizmi ga lahko privzemajo direktno iz vode ali s hrano. V morski vodi sta prisotna predvsem arzenit in arzenat, po prehranjevalni verigi pa se arzen pretvarja v številne organoarzenove spojine, ki imajo različne lastnosti, metabolizem in strupenost.

Za poznavanje kroženja arzena v morskem okolju in vpliva na ekosistem ter s tem na ljudi je pomembno poznavanje vsebnosti elementa v morskih organizmih ter določitev koncentracij posameznih arzenovih spojin oz. speciacija. Za take raziskave so primerne vrste rib na vrhu prehranjevalne verige z dolgo življenjsko dobo. V ta namen smo v nalogi izbrali tri vrste hrustančnic iz reda skatov, pri katerih je prisotnost posameznih spojin arzena (speciacija arzena) slabo poznana. Skati so bili ulovljeni v Tržaškem zalivu, in sicer navadni morski golob (*Myliobatis aquila*), kljunasti morski golob (*Pteromylaeus bovinus*) in vijoličasti morski bič (*Dasyatis violacea*). V vzorcih jeter in mišic rib smo izmerili koncentracije celokupnega arzena in njegovih spojin.

Z manjšimi razlikami je osnovni metabolizem arzena podoben pri morskih organizmih in ljudeh. Njuna povezava pa je zanimiva tudi zato, ker morski organizmi lahko predstavljajo pomemben del prehrane pri ljudeh. V ta namen bomo spremljali koncentracijo in speciacijo arzena v urinu posameznikov po zaužitju rib onesnaženih z arzenom in uživanju vode s povišano vsebnostjo anorganskega arzena. Ker so pričakovane koncentracije strupenih arzenovih spojin v urinu nizke, bomo v študijo vključili tudi bolnico z levkemijo, zdravljeno z arzenovim trioksidom, pri kateri pa pričakujemo visoke koncentracije strupenih arzenovih spojin v urinu. Pri njej bomo spremljali tudi vpliv visokih koncentracij arzena na indukcijo metalotioneinov, ki vplivajo na biološko reaktivnost arzena in zato lahko predstavljajo biomarker za detoksifikacijo (rezistenco), pri nižanih vrednostih pa povečano občutljivost za strupenost kovin. Tako detoksifikacija kot povečana občutljivost za arzen se

pričakujeta tudi pri izpostavljenosti nizkim koncentracijam arzena, vendar pa ju v takih primerih težko zaznamo.

Hipoteze naše raziskave so, da bodo vzorci mišic rib vsebovali visoke koncentracije celokupnega arzena in da bo prevladovala biološko manj reaktivna spojina arzenobetain (AsB). Drugačno sliko pričakujemo v jetrih rib, in sicer več različnih, tudi strupenih spojin arzena. Prav tako pričakujemo vpliv velikosti, spola in teže ribe na koncentracijo As. Ljudje uživamo večinoma mišice rib, zato sklepamo, da bodo poskusne osebe izpostavljene predvsem AsB, ki se hitro izloča iz telesa, v manjši meri pa tudi strupenim arzenovim spojinam. Te naj bi prevladovale v urinu oseb, ki uživajo z arzenom konesnaženo pitno vodo ali pa so zdravljeni z arzenom. Pri slednjih bomo spremljali tudi proces ekspresije metalotioneinov kot odgovor na biološko reaktivnost arzena. Naša hipoteza je, da bo pod vplivom arzena prišlo bodisi do povečanja ali zmanjšanja izražanja genov metalotioneinov v vzorcih krvi bolnice z akutno promielocitno levkemijo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LASTNOSTI, IZVOR IN UPORABA ARZENA

Arzen (As) je element, ki se nahaja v tretji vrsti in V. skupini periodnega sistema. Gre za polkovino, ki izkazuje tako kovinske kot nekovinske lastnosti. Ima bogato organsko in anorgansko kemijo kot posledica hitre spremembe oksidacijskega stanja in sposobnosti vezave. V naravi se najpogosteje pojavlja kot anorganski As in v odvisnosti od pogojev okolja obstaja v različnih oksidacijskih stanjih (-3, 0, +3 in +5). Sposobnost vezave As na različne ligande močno vpliva na njegovo kemijsko obnašanje.

Arzen je v okolju vseprisoten, vendar neenakomerno razporejen, dvajseti najpogostejši element v zemeljski skorji, štirinajsti najpogostejši v morski vodi in dvanajsti najpogostejši v človeškem telesu (Khan. in sod., 2011).

Arzen je, zaradi strupenosti in števila izpostavljenih ljudi, označen kot globalni okoljski onesnaževalec, ki predstavlja veliko tveganje za obolenje in smrtost ljudi po svetu. Zaradi negativnega vpliva na zdravje človeka je uporaba As omejena v večini držav po svetu. Za reševanje okoljskega problema potekajo številne raziskave kemizma, mehanizma strupenosti, speciacije, akumulacije, transformacije in kroženja As.

As se v okolju pojavlja naravno, vendar je njegovo prisotnost na zemeljskem površju človek s svojo aktivnostjo močno povečal. Onesnaženost okolja z As je zato velikokrat posledica rudarjenja, odpadkov, uporabe pesticidov, herbicidov, proizvodnje arzenovih kemikalij, itd. Taka točkovna onesnaženja predstavljajo vir As, ki se potem razširi v okolje in vpliva na življenje rastlin, živali in ljudi.

Arzen nastaja kot stranski produkt pri rudarjenju mineralov za izkoriščanje kovin, kot so Cu, Ni, Co, Pb in Sn. Tako so do leta 2004 pridobili 37.500 ton arzena v obliki arzenovega trioksida, imenovanega arzenolit ali »beli arzen« (As₂O₃) (Vaughan, 2006). Glavni proizvajalci As so bili Kitajska, Čile, Peru, Maroko, Francija, Mehika, Nemčija, Namibija, Švedska in ZDA. Pridobljen arzen so v največji meri porabili za proizvodnjo različnih As kemikalij, ki so služile za:

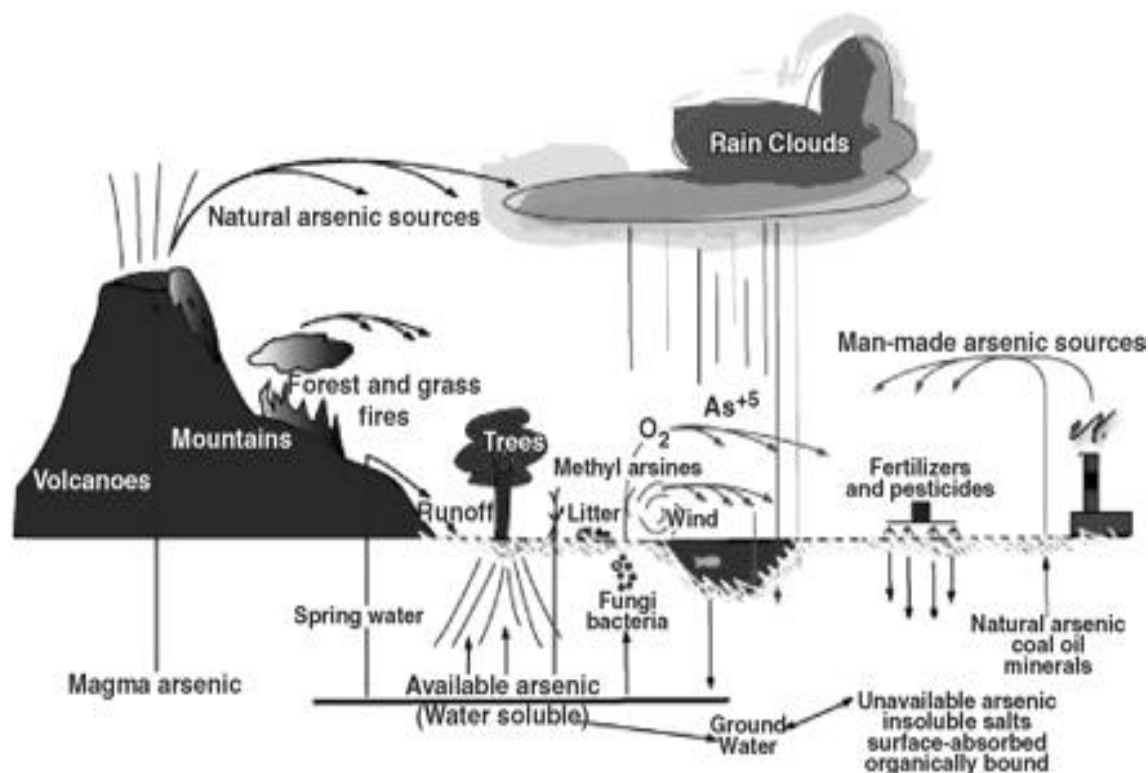
- sušilno sredstvo in lesni konzervansi, kot je ACA (angl. Ammoniacal Copper Arsenate) in CCA (angl. Chromated copper arsenate), uporaba slednjega je od leta 2004 prepovedana v ZDA in EU (Jones, 2007),
- pripravo insekticidov, pesticidov in herbicidov (danes uporaba teh zelo omejena),
- dodatke krmi za živali (piščanci, purani, prašiči) v ZDA, predvsem organska arzenova spojina 3-Nitro[®] (Roxarsone, C₆AsNH₆O₈), vendar potekajo številne raziskave varnosti uporabe s strani FDA (Food and Drug Administration) (Nachman in sod., 2012),
- proizvodnjo stekla in zlitin (predvsem Pb/As zlitine za ojačenje avtomobilskih akumulatorjev) (Grund in sod., 2008),
- proizvodnjo polprevodnikov v elektronski industriji (polprevodniške naprave, ki temeljijo na GaAs vezju so ključni element številnih brezžičnih in wi-fi elektronskih produktov in svetlečih diod oz. LED) (Flora in sod., 2012),
- proizvodnjo pigmentov za barvanje keramike, slik in uporabo v pirotehnikah,
- aplikacije v medicini (od leta 2000 je registrirano zdravilo Trisenox[®] oz. injekcijska raztopina arzenovega trioksida (As₂O₃) za zdravljenje akutne promielocitne levkemije (APL)) (Jones, 2007),
- kot kemijsko orožje v vojnah: Lewistit (C₂H₂AsCl₃) kot bojni plin v prvi svetovni vojni (Stanelle in sod. 2010), Agent blue oz. (CH₃)₂AsO kot herbicid za uničenje pridelkov v Vietnamu v vojaške namene (Stellman in sod., 2003).

Zaradi uporabe As v industriji in kmetijstvu je prišlo do obsežnejših kontaminacij zemlje in posledično pitne vode, kar je negativno vplivalo na zdravje ljudi. Danes je uporaba arzena v industriji zelo upadla, k čemur so mnogo prispevale številne študije strupenosti As že v nizkih koncentracijah. Te študije so dokazale povezavo As s številnimi boleznimi tako pri kronični kot akutni izpostavitvi. Skozi zgodovino je prišlo do večjih izbruhov zastrupitve in eden najbolj znanih je nedavno odkrita As epidemija v Bangladešu in Indiji (zahodi Bengal), kjer je As prisoten v pitni vodi. Podobni incidenti so znani tudi iz Argentine, Tajvana, Čila, Mehike, Kanade, Utaha-ZDA itd.

2.2 KROŽENJE ARZENA V OKOLJU

Arzen je po vsem svetu prisoten v zraku, tleh, površinskih in podzemnih vodah kot polkovina ali kemijska spojina v organski in anorganski obliki. V okolju je mobiliziran s kombinacijo naravnih procesov, kot so preperevanje, biološka aktivnost, vulkanske emisije in s številnimi antropogenimi aktivnostmi. Povprečna koncentracija As v zemljini skorji znaša okoli 2 mg kg^{-1} (Vukašinović - Pešić in sod., 2005) kot posledica naravnih geoloških procesov in antropogene aktivnosti. Najpogosteje se nahaja v anorganski obliki. Njegova porazdelitev po svetu je neenakomerna, tako je koncentracija As v preiskovanem okolju odvisna od njegove geološke zgodovine (vulkanska aktivnost, vrsta kamnin, zgodovina preperevanja, ...) ter prisotnosti antropogene aktivnosti.

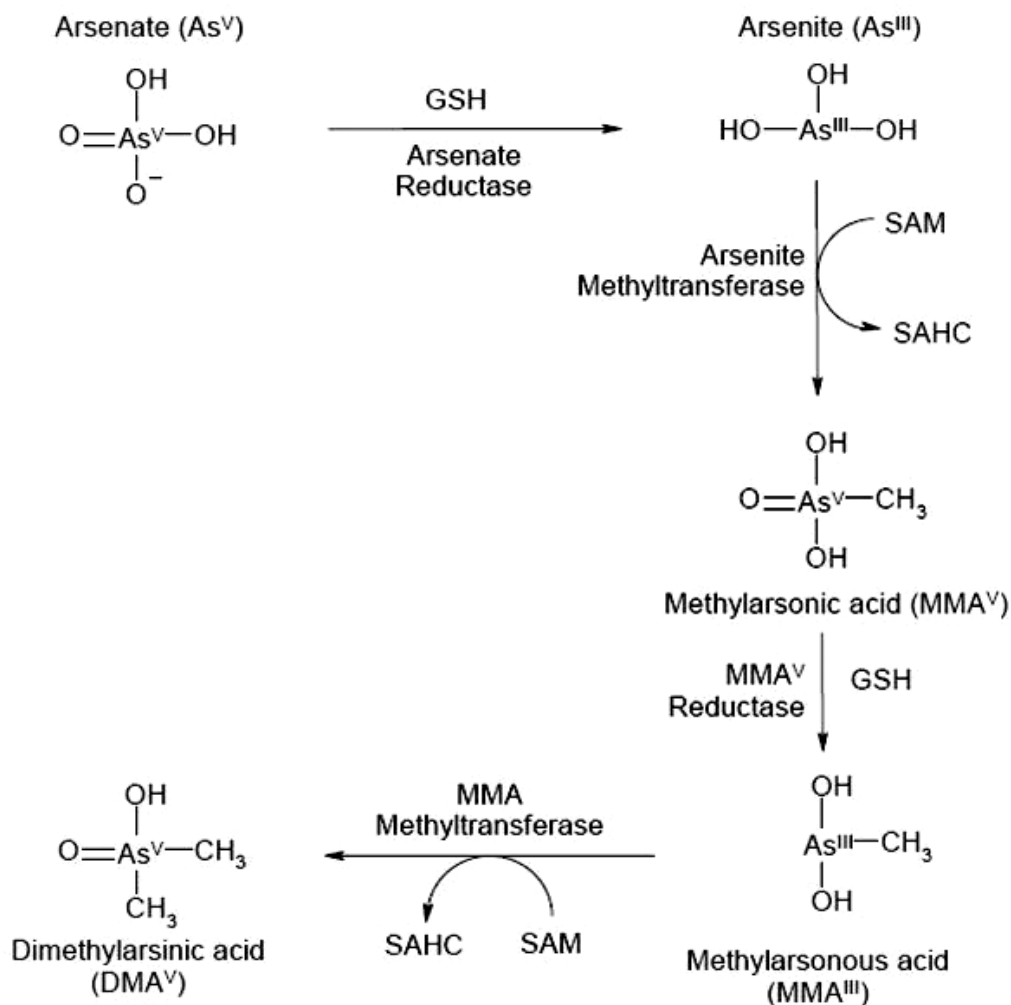
Kot je razvidno iz slike 1, As lahko preide v atmosfero kot posledica naravnih geoloških in bioloških procesov, kot so vulkanska aktivnost (v obliki oksidov, sulfidov), erozija, gozdni požari in mikrobiološka pretvorba As spojin v okolju (nastane arzin in metilirane spojine arzina). Največ pa k prisotnosti As v zraku prispevajo antropogeni viri, in sicer izgorevanje fosilnih goriv (premog), avtomobilski izpušni plini in tobačni dim. As se iz atmosfere v obliki suhega in mokrega odlaganja vrne na zemljo. V zemljo se, poleg z odlaganjem iz atmosfere, mobilizira tudi s preperevanjem matičnih kamnin, geotermalnimi vreli ter z antropogenimi aktivnostmi, kot so rudarjenje, proizvodnja različnih As spojin ter kmetijstvo preko pesticidov, insekticidov in herbicidov. Iz zemlje se As lahko akumulira v rastlinah in živalih, kar vpliva na celotno prehranjevalno verigo ali pa se transportira v površinske in podzemne vode.



Slika 1: Biogeokemijsko kroženje arzena v naravi (Jones, 2007)

Na mobilizacijo As v okolju v veliki meri vpliva biološka aktivnost, in sicer v največji meri mikroorganizmi. Znano je, da v morski in sladki vodi mikroorganizmi lahko akumulirajo As v koncentracijah, ki so večkrat višje, kot so v okolju, ki jih obdaja. Privzem posameznih oblik anorganskega As se razlikuje, in sicer As(III) vstopa v mikrobo celico preko akva-glicerolporinov, As(V) pa predvsem preko transportnih poti za fosfat (J.R. Lloyd in Oremland, 2006).

Mikroorganizmi so razvili strategije za obrambo pred spojinami As, glive uporabljajo reakcijo metilacije, pri kateri nastanejo metil arzenove (MMA) in dimetil arzenove (DMA) spojine (slika 2). Prokarionti (bakterije in arheje) lahko As spojine odstranijo iz lokalnega okolja tudi preko njihove pretvorbe v plinaste oblike, kot sta arzin (AsH_3) in metiliran arzin (Me_3As) (J.R. Lloyd in Oremland, 2006).



Slika 2: Osnovna metabolna shema As (SAM: S-adenozil metionin, SAHC: S-adenozil homocistein)
 (povzeto po Saldivar in sod., 2009)

Nekatere bakterije in kvasovke pa uporabljajo še alternativno pot preko arzenat reduktaznega proteina (ArsC), ki je majhen protein v citoplazmi mikrobnih celic in omogoča redukcijo As(V) v As(III). Reduktivno okolje zagotavljata glutation in glutaredoksin. Biološko reaktiven As(III) je nato izločen iz celice z ATP odvisno črpalko (AsrB) ali pa je metiliran.

2.3 ARZENOVE SPOJINE V OKOLJU

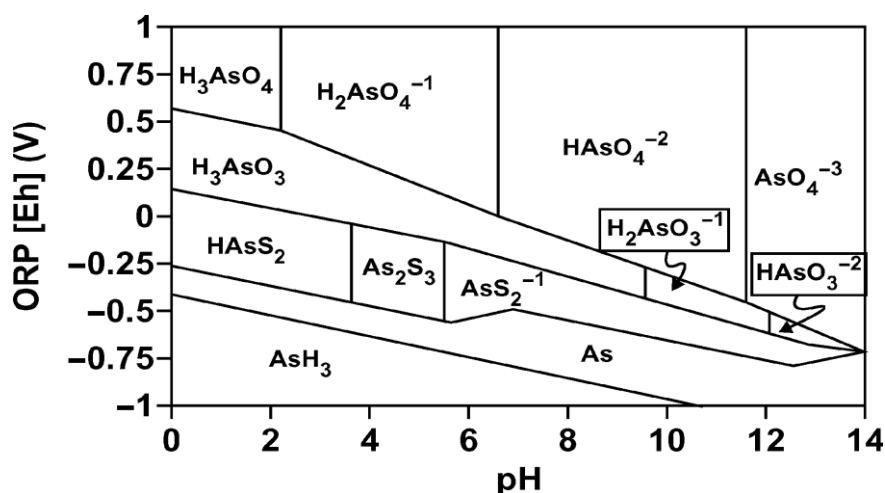
Arzen ima zelo raznoliko in bogato anorgansko in organsko kemijo, ki je posledica njegove elektronske strukture in sposobnosti vezave. Te lastnosti elementu omogočajo nastanek različnih oblik arzenovih spojin v trdnem, plinastem in tekočem stanju.

2.3.1 Anorganske As spojine

Anorganski As lahko obstaja v štirih valenčnih stanjih (-3, 0, +3 in +5) v odvisnosti od pogojev okolja (slika 3):

- oksidirano okolje: v obliki H_3AsO_4 v valenčnem stanju +5, ki ga imenujemo arzenat,
- rahlo reducirano okolje: v obliki H_3AsO_3 , v valenčnem stanju +3, ki ga imenujemo arzenit,
- zmerno reducirano okolje: veže se z Fe in S ter tvori As sulfide in FeAsS ,
- močno reducirano okolje: kot elementarni As(0) ali spojina arzin (AsH_3), v valenčnem stanju -3.

V naravi se anorganski As najpogosteje pojavi kot arzenat (As^{5+}) in arzenit (As^{3+}). Pogoji močno reduciranega okolja, kjer se pojavita elementarni As in arzin, pa so zelo redki.



Slika 3: Obnašanje anorganskega As v okolju glede na različne kombinacije oksidacijsko-redukcijskega potenciala (ORP) in pH (Ferguson in Gavis, 1972)

- Arzenat (As^{5+}) oz. As(V)

V večini naravnih vod s pH 4-10 se As z oksidacijskim številom +5 pojavi kot oksidni anion H_2AsO_4^- v kislem okolju, HAsO_4^{2-} v šibko alkalnem okolju ter AsO_4^{3-} v močno alkalnem okolju. Te spojine so stabilne v oksidiranih vodnih raztopinah (O'Day, 2006).

As(V) tvori običajni tetraeder. AsO_4^{3-} anion je v strukturi zelo podoben ortofosfatnemu anionu PO_4^{3-} , v raztopinah pa ima fosforni kislini (H_3PO_4) podobno kemijo. Oksidacijske sposobnosti so pri arzenatu večje v primerjavi s fosfatom.

Poznanih je tudi veliko arzenatnih mineralov, ki jih običajno uvrščamo v podrazred fosfatnih mineralov zaradi podobnosti v velikosti in naboju fosfatne in arzenatne anionske enote.

V kislem okolju je za As(V) značilno, da je manj biološko reaktiven, manj topen in se bolj učinkovito adsorbira v primerjavi z As^{3+} (Morin in Calas, 2006).

- Arzenit (As^{3+}) oz. As(III)

V vodnih raztopinah se As pogosto pojavi kot H_3AsO_3 spojina, stabilna v zmerno reducirajočem okolju, in sicer v območju oksidacijskih potencialov (Eh) od +300 mV pri pH 4 do -200 mV pri pH 9 (O'Day, 2006).

As(III) ima strukturo tetraedra, katerega tri ogljišča predstavljajo tri piramidne vezi in četrto prosti elektronski par. Spojina ima tri različne pKa vrednosti, in sicer 9.23 pri kateri spojina prevladuje v nevtralni obliki (H_3AsO_3) in v bolj alkalnih pogojih 12.13 ter 13.40 pri katerih se pojavi kot deprotonirana oblika (H_2AsO_3^- in HAsO_3^{2-}) (O'Day, 2006).

- Arzin (H_3As)

Arzin je najbolj reducirana in preprosta oblika As z oksidacijskim številom -3. Gre za brezbarven, ne dražeč, hitro hlapljiv plin z večjo gostoto od zraka. Je delno topen v vodi in ima lahko pri koncentracijah večjih od $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ vonj po česnu in ribah (James in sod., 2006). Pri višjih temperaturah je nestabilen in se hitro oksidira s kisikom, pri čemer tvori As_2O_3 in vodo. Predstavlja tudi najbolj strupeno As spojino, ki po

izpostavitvi (inhalacija) vstopi v rdeče krvne celice in se veže na hemoglobin, se oksidira ter tvori intermediate, ki so hemolitični.

2.3.2 Organske As spojine

V okolju lahko najdemo veliko število različnih organskih As spojin, ki so posledica različnih biometilacijskih in drugih biosintetskih poti. Zelo pogosto se pojavljajo v naravi metilirane oblike As, arzenosladorji, arzenolipidi, arzenobetain, arzenoholin, trimetilarzin itd. (slika 4). Za večino organskih As velja, da so biološko manj reaktivne od anorganskih.

Organske spojine z As(III) tvorijo geometrijo piramide, tetraedra ali trigonalne bipiramide z enim prostim elektronskim parom. Te snovi se v splošnem obnašajo kot šibke Lewisove baze, z izjemo kadar je organski ligand skupina, ki močno privlači elektrone, takrat se obnašajo kot šibke kisline (O'Day, 2006). Organske spojine z As(V) pa imajo v primeru štirih ligandov geometrijo tetraedra in v primeru petih ligandov trigonalne bipiramide.

- Enostavno metilirane oblike As

Gre za metilirane oblike As(III) in As(V), ki nastanejo z zamenjavo hidroksilne skupine (OH) z metilno skupino (CH₃). Te spojine v naravi nastanejo s procesom biometilacije, in sicer gre za metilacijo anorganskih spojin arzena s strani mikroorganizmov (bakterije, kvasovke, alge), ki proces uporabijo kot strategijo detoksifikacije za zaščito pred strupenimi oblikami As. Prav tako se pojavijo v metabolizmu As pri večini živalskih vrst in človeku. Tetrametilarzonijev ion (TMA-ion) lahko nastane tudi z razgradnjo organske spojine arzenobetain (AsB), enako velja za trimetilarzenoksid (TMAO) ali metilacijo spojin TMAO in As(CH₃)₃ s strani mikroorganizmov (Kirby in Maher, 2002). Glede na vrsto metilirane anorganske As spojine in stopnjo metilacije ločimo:

- MMA(III) in MMA(V) (monometil arzenova (III) in (V) kislina),
- DMA(III) in DMA(V) (dimetil arzenova (III) in (V) kislina),
- TMAO (trimetilarzen oksid),
- TMA-ion (tetrametil-arzonijev ion),

- metilirane oblike arzina (AsH_2CH_3 , $\text{AsH}(\text{CH}_3)_2$ in $\text{As}(\text{CH}_3)_3$).
- Arzenobetain (AsB) in arzenoholin (AsC)

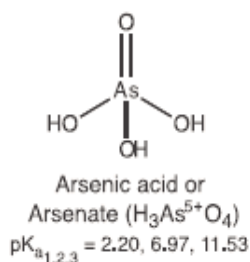
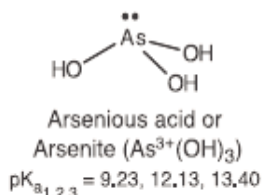
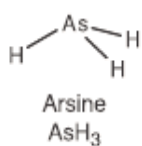
As se v naravi obnaša podobno kot elementi V skupine, predvsem dušik in fosfor. Posledično se As velikokrat vmeša v biokemijske poti teh dveh elementov, tako lahko pride do zamenjave dušika z arzenom v organskih spojinah in nastanek spojin, kot sta AsB in AsC (O'Day, 2006). Arzenobetain je najpogostejša oblika As v morskih živalih, kjer so jo prvič izolirali leta 1977 (Francesconi in Edmonds, 1998). Njegov dušikov analog glicin betain je prav tako široko prisoten v morskih živalih, kjer ima predvsem vlogo ozmolita oziroma zaščite celice pred stresom z visoko slanostjo. Podobno vlogo ima verjetno tudi AsB (Francesconi in sod., 1996). Za AsC pa je značilno, da se znotraj organizmov zelo hitro pretvori v AsB, kar onemogoči njegovo akumulacijo v tkivih morskih organizmov (Kirby in Maher, 2002).

- Arzenolipidi in arzenosladkorji

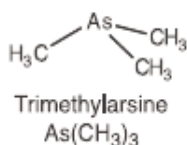
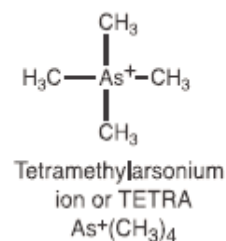
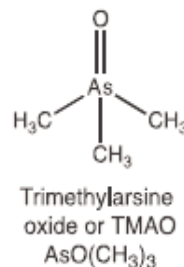
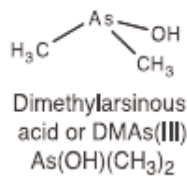
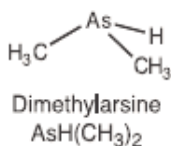
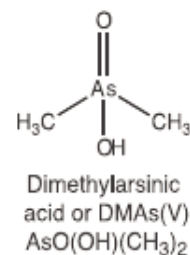
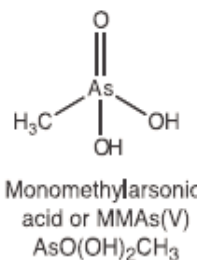
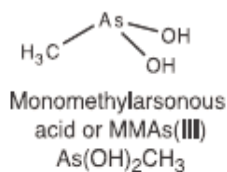
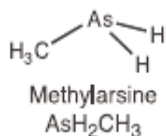
Naravni arzenolipidi so analogni nevtralnim lipidom, kot so monogliceridi, glikolipidi in tudi fosfolipidi. Izolirali so jih iz mikroorganizmov, gliv, višjih rastlin, lišajev, alg, morskih mehkužcev, drugih nevretenčarjev in ribjih tkiv. Raziskovalci predvidevajo, da so končni produkt procesa detoksifikacije arzenata (Dembitsky in Levitsky, 2004)

Arzenosladkorji so bili identificirani kot poglavitna As spojina v morskih algah. Raziskave različnih alg so pokazale obstoj 15 različnih spojin arzenosladkorjev. Imajo ključno vlogo v kroženju in biotransformaciji As v morskem sistemu. V morskih algah se pojavijo dimetilirani arzenosladkorji in v manjši meri tudi trimetilirani, ki pa so po strukturi zelo podobni AsB (Pergantis in sod., 2000).

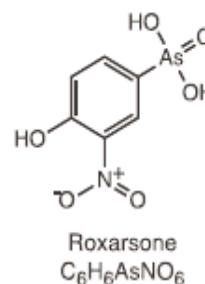
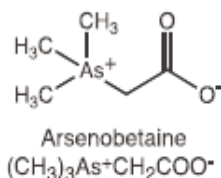
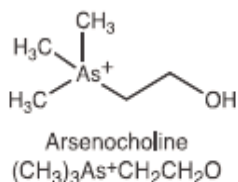
Inorganic Arsenic



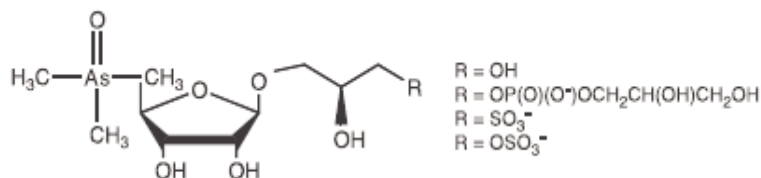
Methylated Arsenic Compounds



Organoarsenic Compounds



Organoarsenic Sugars



Slika 4: Pomembne anorganske in organske oblike As v okolju (povzeto po O'Day, 2006)

2.4 ARZEN V MORJU

Oceani so pomembna komponenta biogeokemijskega cikla As. V morsko vodo element prehaja preko onesnaženih površinskih in podzemnih rek ter s suhim ali mokrim odlaganjem iz atmosfere. V morskem okolju se lahko zadržuje preko akumulacije v morskih sedimentih in morskih organizmih, na kopno pa se vrne bodisi preko prehranjevalne verige, v kateri se akumulira, ali pa posredno preko aerosolov v atmosfero, od koder se deponira na kopno.

2.4.1 As spojine in njihova koncentracija v morskih sedimentih in vodi

V sedimentih obal, ki niso onesnažene, so normalne koncentracije As med 0.1 in 50 $\mu\text{g g}^{-1}$. Podobne koncentracije najdemo tudi v globokomorskih sedimentih. Obale, ki so predmet antropološke aktivnosti (rudniki, talilnice), imajo povišane koncentracije As, ki lahko presegajo 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Maher in Butler, 1988). V slovenskem delu Tržaškega zaliva so bile izmerjene vrednosti nižje od 20 ng g^{-1} . Pri sami vezavi As v morske sedimente ima, podobno kot pri kopenskih sedimentih, pomembno vlogo Fe. As, vezan v sedimente, je za morsko bioto nedostopen, obratno pa velja za As, ki se nahaja v intersticijski vodi sedimenta oz. vodnih porah. Študije speciacije As v teh vodnih porah so pokazale, da podobno kot v morski vodi prevladujeta As(V) in As(III), v manjših koncentracijah pa so prisotni še DMA, MMA in TMAO. Značilno je, da je celotna koncentracija raztopljenega As v porah sedimenta večja kakor v morski vodi. Ni pa dokazano ali so te spojine, z izjemo As(V), izločene kot produkt metabolizma morskih organizmov ali pa so sintetizirane s strani mikroorganizmov v sedimentih (Maher in Butler, 1988). Iz sedimentov se As v reducirajočih pogojih transportira v morsko vodo.

Normalna koncentracija As v morski vodi je okrog 1-2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Francesconi in Edmonds, 1998) in se v največjem obsegu pojavi v anorganski obliki kot As(V) ali As(III) v odvisnosti od pH in redoks pogojev morske vode (slika 3). V morski vodi (pH 8.2) bogati s kisikom prevladuje As(V), in sicer v 98 % kot HAsO_4^{2-} , v vodi brez kisika pa As(III), večinoma kot H_3AsO_3 (Maher in Butler, 1988). Na površini, kjer oceani dobijo dovolj svetlobe za podporo fotosintetskih organizmov, so prisotne tudi

manjše koncentracije MMA in DMA, verjetno kot rezultat biotransformacije As(V) s strani fitoplanktona (Edmonds in Francesconi, 2003).

2.4.2 As in severno Jadransko morje

Severno Jadransko morje s Tržaškim zalivom je plitvo morje med Italijo, Slovenijo in Hrvaško. Glavni vir onesnaženosti tega morja sta reki Pad (Italija) in Soča. Veliko študij je bilo opravljenih v povezavi z onesnaženostjo z Hg, medtem ko je zelo malo znanega o As v tem predelu. Dolina reke Pad je ena največjih kmetijskih področij v Italiji, zato močno prispeva k onesnaženosti reke s težkimi kovinami in tudi arzenom. Znane so koncentracije As nekaterih rek, ki se izlivajo v severni Jadran, in sicer reka Pad s koncentracijo $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (Pettine, 1992) in Krka (Hrvaška) s koncentracijo $0.13\text{--}1.8 \mu\text{g L}^{-1}$ (Seyler in Martin, 1991). Morski vodi v tem območju je bila izmerjena koncentracija As do $4 \mu\text{g L}^{-1}$, kljub temu pa so v morskih organizmih tega območja našli visoke koncentracije As kot posledico bioakumulacije. Povečana bioakumulacija As v severnem Jadranu je verjetno posledica zelo nizkih koncentracij biološko dostopnega fosforja (Ogrinc in Faganeli, 2005). Tako organizmi zaradi pomanjkanja fosfata, ki ga nujno potrebujejo, absorbirajo As(V) (po načelu kompeticije), ki je fosfatu v kemijskem obnašanju zelo podoben.

2.4.3 Bioakumulacija As v morskih organizmih

Na koncentracijo As spojin v morski vodi vpliva tudi biološka aktivnost morskih organizmov in kot posledica slednje prihaja do povišane koncentracije metiliranih oblik in znižane koncentracije anorganske oblike As.

Zaradi sposobnosti bioakumulacije As morske rastline in živali lahko v tkivih vsebujejo 1 do 100 mg kg^{-1} As. Za razliko od morske vode, kjer se As pojavlja večinoma v anorganski obliki, je večina As znotraj morskih organizmov v organski obliki, in sicer kot arzenobetain, arzenoholin, MMA, DMA, arzenosladorji in arzenolipidi. Tako so koncentracije As v primerjavi z morsko vodo v organizmih 1000 do 100 000 krat večje (Edmonds in Francesconi, 2003).

Bioakumulacija oz. privzem As spojin iz morske vode s strani morskih organizmov je odvisna predvsem od kemijske oblike As. Največ As bioakumulirajo kadar je ta v obliki As(V), saj ga je v vodnem stolpcu največ, nato As(III), sledita MMA in DMA. Zaradi podobnosti As(V) s fosfatom, As(V) enostavno vstopa v celico s transportnim mehanizmom za fosfat, ker celica ne loči med obema spojinama.

Morski organizmi privzeti As akumulirajo predvsem s formacijo As-C vezi. Medtem ko morske rastline (predvsem alge) akumulirajo As, ki ga privzamejo direktno iz morske vode, je za živali značilno, da ga absorbirajo bodisi iz vode (mehkužci, raki) ali preko prehranjevalne verige.

Študije predvidevajo, da so razlike v koncentraciji in kemijski obliki As med vrstami morskih organizmov povezane z vrsto prehrane teh organizmov. Prav tako so mnoge študije pokazale, da se As v organizmu preferenčno akumulira kadar vanj vstopa s prehrano in manj, ko vstopa kot raztopljen oblika iz morske vode.

- As in biomagnificacija

Biomagnificacija je proces, pri katerem se koncentracija določenega elementa v organizmih proti vrhu prehranjevalne verige večja. Glede na podatke iz literature (Maher in Butler, 1988; Kubota in sod., 2001) ta proces v primeru arzena ne velja, saj imajo morske makroalge, ki so na dnu prehranjevalne verige, večinoma večje koncentracije As kot določeni organizmi, ki so višje na prehranjevalni verigi. Velja, da so koncentracije As v glavonožcih, rakah in algah predvidoma višje kakor v ribah. Drugačno sliko pa dobimo, če gledamo samo arzenobetain, pri katerem v nekaterih primerih lahko zasledimo tudi biomagnifikacijo (Rahman in sod., 2012); predvsem če gledamo prehranjevalno verigo bentoških organizmov.

- As spojine in morski organizmi

Večina As, izoliranega iz morskih organizmov, je v organski, manj strupeni ali nestrupeni obliki, strupene anorganske oblike pa se pojavijo v zelo nizkih koncentracijah.

Med primarnimi producenti so kot akumulatorji As zelo pomembne morske alge. Zelo velike koncentracije As so izmerili predvsem pri vrstah rjavih alg. Za alge je značilno,

da s transportnim mehanizmom za fosfat iz morske vode akumulirajo As(V) spojine, ki jih nato z reakcijami detoksifikacije pretvorijo v biološko manj reaktivne organske spojine, in sicer predvsem v različne arzenosladkorje in DMA.

V tkivih morskih živali je As najbolj pogost v obliki arzenobetaina (AsB) (preglednica 1), ki se pojavi na vseh trofičnih nivojih, vendar z višjimi koncentracijami pri živalih na višjih trofičnih nivojih, kot so ribe, raki in mehkužci (preglednica 1). Raziskave predvidevajo, da je AsB končni produkt metabolizma As v morskem okolju. Prav tako je pogost tetrametil-arzonijev ion (TMA-ion), ki je lahko pri školjkah dominantna As spojina. Vir teh dveh dominantnih spojin As v morskih organizmih je nejasen, kajti spojini še nista bili detektirani v morski vodi in v sedimentih, podatki o prisotnosti AsB v algah pa so redki in vsaj v nekaterih študijah postavljeni pod vprašaj (Grotti in sod., 2008; Šlejkovec in sod., 2006). Predvideva se, da gre za primer selektivne bioakumulacije. Študije namreč dokazujejo, da sta biodostopnost in zadrževanje različnih As spojin za morske organizme odvisna od kemijske oblike spojine. Tako se AsB velikokrat hitreje akumulira v primerjavi z anorganskim As in drugimi organskimi spojinami (Francesconi in Edmonds, 1998). Pri rastlinojedih morskih organizmih se v manjših koncentracij pojavijo tudi arzenosladkorji (v pokrovačah 7.3–44.1 $\mu\text{g As g}^{-1}$, Lai in sod., 1999) kot posledica zaužitja morskih alg, kjer se lahko pojavijo v koncentracijah večjih od 50 mg As kg^{-1} suhe teže. V sledovih pa so prisotni še TMAO (ribe, mehkužci in raki), za katerega predvidevajo, da je posledica razgradnje arzenobetaina s strani mikrobne flore v črevesju živali, anorganski As (< 2 % totalnega As) in arzenoholin (< 0.1 % totalnega As).

Danes potekajo številne raziskave izvora arzenobetaina v tkivih morskih živali. Obstaja več hipotez med katerimi nekatere predlagajo, da gre za transformacijo arzenoholina, arzenosladkorjev in tudi drugih As spojin iz morske vode v arzenobetain znotraj samega organizma. Zaradi prisotnosti AsB na toliko različnih trofičnih nivojih pa se je pojavila še alternativna hipoteza biogeneze spojine izven živali, verjetno s procesom posredovanim z mikroorganizmi. Veliko podporo tej hipotezi dajejo rezultati študij, pri katerih so dokazali, da je mogoča transformacija MMA in DMA v AsB s pomočjo mikrobov v morski vodi (Francesconi in Edmonds, 1998). Metode za detekcijo As spojin se ves čas nadgrajuje in mogoče bo zelo hitro možna nižja meja

detekcije arzenovih spojin. Tako bodo lahko zaznali manjše, vendar pomembne, koncentracije AsB v morski vodi in vodnih porah sedimentov ter s tem potrdili hipotezo vira AsB.

Tako so iz morske biote izolirali v lipidih ter v vodi in metanolu topne oblike As. Pri tem so študije prehranjevalnih navad morskih organizmov pokazale, da se kemijske oblike As znotraj mesojedcev in rastlinojedcev razlikujejo. Mesojedci v splošnem vsebujejo večjo vsebnost As in tudi večjo vsebnost As topnega v vodi kot As topnega v lipidih (Maher in Butler, 1988). Na različno kemijo spojin As znotraj različnih organizmov pa poleg prehrane vplivajo tudi različne sposobnosti metabolizma organizmov.

Preglednica 1: Arzenobetain v morskih živalih (povzeto po Edmons in Francesconi, 2003)

Žival (št. vrst)	Koncentracija As** (mg kg ⁻¹ , WW*)	As prisoten kot AsB** (%)
RIBE		
Morski psi in skati (7 spp)	3.1 - 44.3	94 - >95
Kostnice (17 spp)	0.1 - 166	48 - >95
RAKI		
Jastogi (4 spp)	4.7 - 26	77 - >95
Škampi/kozice (5 spp)	5.5 - 20.8	55 - >95
Rakovice (6 spp)	3.5 - 8.6	79 - >95
MEHKUŽCI		
Školjke (4 spp)	0.7 - 2.8	44 - 88
Školjke (7 spp)	1.0 - 2.3	12 - 50
Polži (6 spp)	3.1 - 116.5	58 - >95
Glavonožci (3 spp)	49	72 - >95
IGLOKOŽCI (1 sp)	12.4	60
OŽIGALKARJI (1 sp)	7.5	15
SPUŽVE (2 spp)	3.2 - 6.8	13 - 15

*mokra teža ** vrednosti so bile izmerjene v mišičnem tkivu

2.4.4 As spojine in ribe

Ribe so pomemben vir prehrane za človeka in s tem tudi, z izjemo pitne vode, najpomembnejši način izpostavitve As spojinam. Koncentracija As v morskih ribah je veliko večja kot pri sladkovodnih ribah. Zaradi tega je zelo pomembna določitev koncentracije in njegovih zvrsti (speciacija As) v ribah določenega morskega območja.

Splošno znano je, da je akumulacija polucijskih kovin in polkovin v morskih ribah primarno odvisna od velikosti in spola ribe, njihove hrane, koncentracije kovine v vodi ter časa izpostavljenosti. Pomembno vlogo imajo tudi dejavniki okolja, kot so slanost, pH in temperatura (Bilanžić in sod., 2011).

Leta 1997/1998 so naredili raziskavo, pri kateri so določali koncentracijo As v mišicah in jetrih 25 različnih vrst rib hrustančnic iz Severnega morja. Določili so celokupno koncentracijo As (AsT) in koncentracijo strupenih oblik As (AsTox: As(III), As(V), MMA in DMA) na mokro težo ribe (WW). Pri tem so največje koncentracije As našli pri vrstah rib, kot so: morske plošče, morski psi in skati. Povprečna koncentracija AsT je bila večja od 20 mg kg^{-1} mokre teže in koncentracija AsTox $>0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ mokre teže. V primeru morskih psov so bile koncentracije AsTox v razponu $0.046\text{--}0.60 \text{ mg kg}^{-1}$ mokre teže (De Gieter in sod., 2002).

Ta študija kaže, da je akumulacija As spojin in njihova koncentracija pri ribah najpogosteje povezana z njihovo prehrano. Tako imajo vrste rib (molič, morski losos, leng, oslič, brancin, ugor in kovač), ki se primarno prehranjujejo z večjimi ribami, manjšo vsebnost As v tkivih kot ribe (morske plošče, skati in določeni morski psi), ki se prehranjujejo z bentoškimi organizmi in majhnimi ribami. Ker pa obstajajo tudi izjeme, raziskovalci menijo, da je variabilnost koncentracij As v tkivih rib tudi posledica variacij v biodostopnosti, povzročeni z geografskimi, sezonskimi in okoljskimi spremembami.

2.5 METABOLIZEM ARZENA PRI ČLOVEKU

Ljudje smo As spojinam izpostavljeni preko inhalacije, absorpcije skozi kožo in primarno z zaužitjem kontaminirane pitne vode ter morske hrane. V primeru morske hrane, ki vsebuje predvsem nestrupene oblike As, kot je AsB (Preglednica 1), je tveganje za zastrupitve majhno. Tako je glavni vzrok globalnih zastrupitev predvsem povečana koncentracija As (anorganske oblike As) v pitni vodi kot posledica naravnih geoloških in antropoloških virov.

Speciacija As spojin v različnih vzorcih okolja je pomembna predvsem zaradi nedvomne povezave med strupenostjo As in vrsto As spojine. Tako je biološka reaktivnost As pri ljudeh odvisna predvsem od tega v kakšni obliki se As nahaja. Strupenost As spojin pada v tem vrstnem redu: arzenit > arzenat > DMA > MMA >> AsB \approx AsC \approx TMAO (De Gieter in sod., 2002).

Glavne oblike As v pitni vodi so anorganski As, in sicer trivalentne (As^{+3}) in petvalentne (As^{+5}) spojine ter v morski hrani organske As spojine AsB (preglednica 1), TMA (pogost pri mehkužcih) in TMAO (pogost pri ribah vrste *Kyphosus sydneyanus*, kjer predstavlja glavno obliko As) (Francesconi in Edmonds, 1998). Organske As spojine, kot je AsB, se v ribah pogosto pojavijo v visokih koncentracijah, vendar so veliko manj strupene v primerjavi z anorganskimi oblikami As in se po zaužitju nespremenjene hitro izločijo iz telesa z urinom. Anorganske oblike As se po zaužitju hitro absorbirajo skozi gastrointestinalni trakt, nato sledijo reakcije metabolizma (slika 2), ki obsegajo redukcijo As(V) v As(III) obliko ter njihovo metilacijo do MMA in nato do DMA. Metilacija anorganskega As je encimska, vpletena sta S-adenozin metionin kot donor metilne skupine ter metiltransferaza. Te reakcije metabolizma se obravnavajo kot proces detoksifikacije anorganskih oblik As v manj biološko reaktivne in bolj topne oblike, ki se lažje izločijo iz telesa. Vendar pa se ne metilira celoten zaužit anorganski As, saj so s speciacijo As oblik v urinu zaznali poleg DMA in MMA tudi anorganske oblike As. Pri splošni populaciji so ocenili, da se preko urina izloči približno 70 % privzetega anorganskega As, in sicer od tega v povprečju 60–80 % v obliki DMA, 10–20 % v obliki MMA in 10–30 % kot anorganski As (Vahter in Concha, 2001). Te koncentracije se med posamezniki lahko razlikujejo

zaradi variacij v metilacijskih sposobnostih med posamezniki. Na obseg metilacije pri ljudeh lahko vplivajo različni faktorji, kot so: (Hopenhayn C., 2006)

- spol: ženske imajo učinkovitejšo sposobnost metilacije, saj imajo v urinu v primerjavi z moškimi večji delež metiliranih oblik As,
- kajenje: kadilci imajo zmanjšane metilacijske sposobnosti,
- etičnost: določene etične skupine imajo večjo učinkovitost metilacije od drugih,
- proteinska poraba in prisotnost določenih mikronutrientov kot sta Se in β -karoten.

Pojavila se je tudi hipoteza, da bi lahko bila tudi metilacija razlog strupenosti As, zaradi nastanka reducirane oblike MMA (MMA^{+3}) v reakciji metilacije MMA v DMA. Ta reducirana oblika MMA^{3+} je močno reaktivna in bi lahko bila odgovorna za strupenost As. Težavo v epidemioloških študijah predstavlja merjenje te spojine, ker se zelo hitro oksidira v MMA^{+5} obliko. Nekatere študije so dokazale prisotnost večjih količin trivalentnih As metabolitov v urinu (Valenzuela in sod., 2005), druge pa so njihovo prisotnost ovrgle (Šlejkovec in sod., 2008).

2.5.1 Vloga metalotioneinov pri metabolizmu As pri ljudeh

Pri splošni zaščiti pred povečano vsebnostjo polucijskih kovinskih in polkovinskih ionov imajo pomembno vlogo beljakovine imenovane metalotioneini (MT). Ti so prisotni v celicah vseh prokariontskih in evkariontskih organizmov. MT so s cisteinom bogati (30 %), večinoma brez aromatskih amino kislin, nizko molekularni (6-7kDa), toplotno stabilni proteini s sposobnostjo vezave kovin. Pojavljajo se ekstracelularno in intracelularno (citoplazma, lizosomi, mitohondriji in jedro), pri čemer je njihova porazdelitev med citoplazmo in jedrom celice odvisna od celičnega cikla (Li in Maret, 2008). Biološka vloga metalotioneinov v celici je vzdrževanje ravnovesja (homeostaza) esencialnih kovinskih ionov (predvsem Zn^{2+} in Cu^{+}) ter redoks stanj.

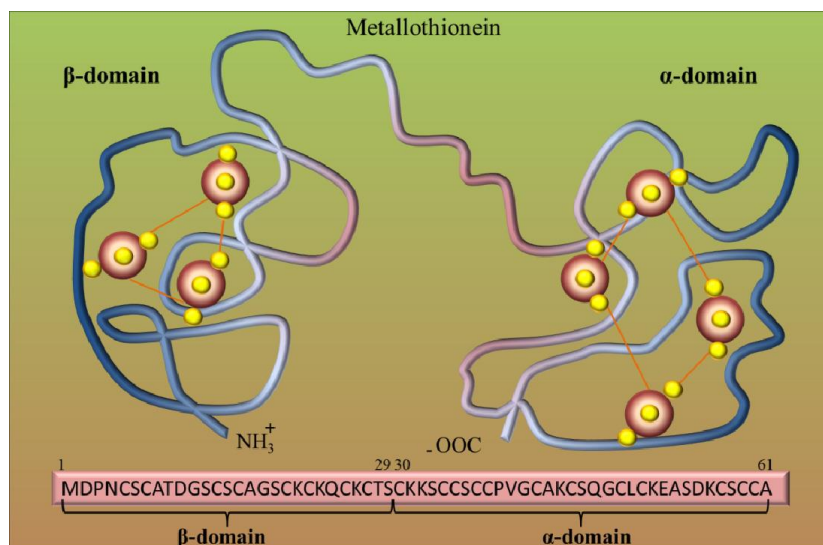
Polipeptidno verigo sesalčjih MT sestavlja od 61 do 68 aminokislin in od teh je 20 cisteinskih ostankov, ki so med živalskimi vrstami ohranjeni. Ti cisteinski ostanki omogočajo proteinu vezavo kovin. Glede na število in zaporedje ostalih aminokislin ter nabor, se MT pri sesalcih izražajo v štirih izoformah MT-1, MT-2, MT-3 in MT-4.

Te izoforme imajo še podtippe (sub-izoforme), ki jih predstavlja 17 MT genov identificiranih pri človeku na kromosomu 16, od teh je glede na raziskave 11 funkcionalnih (Li in Maret, 2008; Ruttkay Nedecky in sod., 2013) ostali pa predstavljajo psevdogene, ki so z akumulacijo mutacij izgubili funkcijo (predvsem z mutacijo kritičnih cisteinskih mest v sekvenci proteina) in se pri ljudeh ne izražajo (Moleirinho in sod., 2011). Pri primatih, ungulatih in ljudeh identificirani funkcionalni geni kodirajo več subizoform MT-1 (MT-1a, MT-1b, MT-1e, MT-1f, MT-1g, MT-1h, MT-1m in MT-1x), eno za MT-2 (MT-2a) ter izoformi MT-3 in MT-4 (Li in Maret, 2008; Ruttkay Nedecky in sod., 2013).

Različne celice izražajo različne MT izoforme z različno stopnjo ekspresije, kar je verjetno posledica različne funkcije posamezne izoforme (Miles in sod., 2000). Izoformi MT-1 in MT-2 (razlika le v enem negativnem naboju) sta široko izraženi in prisotni v vseh celicah (posamezne sub-izoforme MT-1 so lahko celično specifične (Moleirinho in sod., 2011)), medtem ko je MT-3 izoforma izražena predvsem v možganskem tkivu, v ostalih tkivih pa prisotna le v nižjih količinah (Moleirinho in sod., 2011), kot na primer v ledvicah (Garrett in sod., 2001), črevesju, trebušni slinavki (Haq in sod., 2003), žolčniku, prostati (Sens in sod., 2001) itd. Izoforma MT-4 je specifična za stratificiran ploščatocelični epitelij npr.: koža, jezik, sprednji del prebavne cevi in vagine (Quaife in sod., 1994).

MT sesalcev so sestavljeni iz dveh strukturno specifičnih podenot oz. domen, in sicer alfa (α) ter beta (β) (slika 5). Pri tem α podenota lahko veže štiri dvovalentne kovinske katione in β podenota tri. Ob vezavi kovinskih ionov se tvorijo tiolatne vezi S_{cys} -M- S_{cys} (S-žveplo na cisteinskem ostanku, M-kovinski ion).

Samo izražanje različnih izoform MT lahko inducirajo številni zunanji dejavniki, kot so kovine, hormoni, citokini, številne druge kemikalije, vnetje in stres (ROS, RNS). Zelo učinkovito pa povečajo izražanje predvsem kovine in glukokortikoidi (Miles in sod., 2000).



Slika 5: Struktura metalotioneina s štirimi kovinskimi atomi (Zn) vezanimi v α domeni in tremi v β domeno proteina (povzeto po Ruttkay Nedecky in sod., 2013)

Tudi As vpliva na izražanje MT, čeprav sami proteini predvidoma nimajo velike afinitete do As (Rossman, 2003). Pri poskusnih živalih (miši, podgane), algah in človeških celičnih linijah (Falnoga in sod., 2012) so dokazali povečano izražanje MT po izpostavljenosti As (Albores in sod., 1992, Kreppel in sod 1993, Liu in sod., 2000). MT vežejo As v valenčnem stanju +3, veže se 6 atomov As v vsako domeno po trije (Ngu in Stillman, 2006; Jiang in sod., 2003).

Na podlagi ozadja vloge MT kot zaščite organizma pred strupenostjo kovin, bi lahko proteine uporabili kot biomarkerje za ugotavljanje zaščitnega odziva organizma na kovinski stres in/ali individualne občutljivosti na strupenost kovin. Pri ljudeh lahko namreč obstajajo zelo velike individualne variacije že v bazalni ekspresiji MT v tkivih (Liu in sod., 2007).

Leta 2007 je bila opravljena študija pri kateri so rezultati pokazali, da so MT transkripti v krvi, lahko uporabljeni kot biomarkerji za stopnjo ekspresije MT v drugih tkivih (Liu in sod., 2007). V študijo so vključili skupino ljudi iz področja onesnaženega z arzenom (dnevna izpostavljenost arzenu preko pitne vode). Samo pri ljudeh z znaki kronične zastrupitve z arzenom (kožne lezije) in povišano koncentracijo As v urinu so opazili zmanjšano ekspresijo MT, kar bi lahko bil faktor predispozicije za strupenost arzena pri teh ljudeh. Na podlagi te študije so zaključili, da določitev

MT transkriptov v krvi lahko omogoči vpogled v stopnjo izražanja MT v drugih človeških tkivih ter identifikacijo za arzen dovzetne populacije.

2.5.2 Biološka reaktivnost As spojin (M. Hughes, 2002)

Za negativne učinke As pri ljudeh sta odgovorni predvsem anorganski obliki As(V) in As(III), slednji v veliko večji meri, saj se močno veže na beljakovine in slabše izloča. Pri biološki aktivnosti As(III) igrajo pomembno vlogo predvsem specifične funkcionalne skupine znotraj encimov, receptorjev in transkripcijskih faktorjev, in sicer tiolne oz. sulfhidrilne skupine in selenolne skupine. Z vezavo na te funkcionalne skupine moti številne metabolne aktivnosti znotraj celice. Mehanizem delovanja As(V) je zaradi strukturne podobnosti povezan s fosfatom. Tako fosfat nadomesti v mnogih biokemijskih reakcijah in jih s tem moti, ker aktivnost tako nastalih spojin ni enaka.

Anorganski arzen je bil s strani IARC leta 1987 (International Agency for Researc on Cancer) in EPA leta 1988 (US Environmental Protection Agency) klasificiran kot znan človeški kancerogen.

Današnje študije povezane s strupenostjo in mehanizmom delovanja As so usmerjene predvsem k variabilnemu odzivu ljudi na izpostavitve As. Tako se iščejo odgovori na vprašanje ali obstajajo specifične individualne ali populacijske lastnosti, ki povečajo tveganje za negativne vplive arzena.

2.6 OPIS OBRAVNAVANEGA OBMOČJA IN RAZISKOVANIH RIB

Tržaški zaliv je najsevernejši del Jadranskega morja. Zaliv je plitev morski ekosistem, v katerem so izražene tako značilnosti obalnega morja kakor tudi odprtih voda Jadrana. Povprečna globina zaliva je manjša od 20 m in približno 20 % zaliva je plitvejšega od 10 m. Plitvost zaliva ter številni sladkovodni pritoki imajo za posledico velika nihanja temperature in slanosti, zelo je izraženo tudi plimovanje. Velik vpliv na stanje in ohranjanje biotske raznovrstnosti tega morskega ekosistema ima tudi urbanizacija obale in zaliva. Slovenski del obsega južni del Tržaškega zaliva z obalo dolgo skupaj 46 km, ki je v pretežni meri flišnata.

2.6.1 Preiskovane vrste rib

V raziskavi smo uporabili tri vrste rib hrustančnic iz reda skatov, in sicer dve vrsti morskega goloba in eno vrsto morskega biča, ki so jih leta 2005 ulovili v Tržaškem zalivu. Pri tem smo izbrali med morskimi golobi 15 osebkov vrste kljunatega morskega goloba (*P. bovinus*) in 6 osebkov vrste navadnega morskega goloba (*M. aquila*) ter med morskimi biči 8 osebkov vijoličnega morskega biča (*P. violacea*).

2.6.1.1 Sistematska ureditev preiskovanih rib

Razred: HRUSTANČNICE (*Chondrichthyes*)

Podrazred: MORSKI PSI IN SKATI (*Elasmobranchii*)

Red: SKATI (*Hypotremata*)

Družina: MORSKI GOLOBI (*Myliobatidae*)

1. rod: Morski golobi (*Myliobatidae*) (Cuvier, 1816)

1.1 vrsta: Navadni morski golob (*Myliobatidae aquila*) (Linnaeus, 1758)

2. rod: Kljunati morski golobi (*Pteromylaeus*) (Garman, 1913)

2.1 vrsta: Kljunati morski golob (*Pteromylaeus bovinus*) (E. Geoffroy Saint Hilaire, 1817)

Družina: MORSKI BIČI (*Dasyatidae*)

1. rod: Morski biči (*Dasyatidae*)

1.1 vrsta: Vijoličasti morski bič (*Pteroplatytrygon violacea*) (Bonaparte, 1832)

2.6.1.2 Opis preiskovanih vrst rib

Skati se od drugih rib hrustančnic ločijo že po zunanjih znakih. Močno povečane prsne plavuti imajo prirasle h glavi. Škržne reže so na spodnji strani glave. Ker te ribe ležijo večinoma na dnu, kjer je mulj in razpadajoč organski material, zajemajo vodo drugače kot preostale ribe in s tem zavarujejo škrge pred umazanijo. Vodo zajamejo skozi strčnici na zgornji strani glave in ne skozi usta. Poznanih je približno 340 vrst in običajno živijo v priobalnih, plitvih vodah. Med njimi pa je nekaj tudi globokomorskih

vrst, ki se ne zadržujejo na dnu. Večina skatov ni nevarnih in se hranijo z drobnim živalstvom, nekaj vrst pa je tudi izrazitih roparjev.

- Družina morski golobi (Myliobatidae)

Morski golobi in njihovi sorodniki so razširjeni v vseh tropskih morjih. Nekaj vrst živi tudi v zmerno toplih in celo hladnih morjih. Niso ravno pogosti, čeprav se včasih posamezne vrste pojavljajo v jatah. Odvisni so od priložnostne hrane, posrkajo vse kar bi bilo lahko užitno. Tako so v njihovih želodcih našli že vse mogoče: sipe, rake, ostrige, različne vrste črvov, polže in manjše ribe. Značilno je, da imajo veliko drobilno moč, saj zdrobijo tudi najtrše školjke.

Telo imajo podobno morskim bičem, bistvena razlika pa je glava, ki je pri golobih bolj ali manj prosta in štrli iz telesne plošče. Ta je približno dvakrat toliko široka kot dolga. Zadnji rob je nekoliko konkaven, sprednji pa konveksen, zato telesna plošča spominja na krila. Rep je pri golobih tanjši, a zato daljši kot pri morskih bičih, z eno ali več nazobljenimi strupenimi bodicami.

- Navadni morski golob (*M. aquila*)

Navadni morski golob (slika 6) je razmeroma pogosta vrsta ribe, ki se pojavlja v Jadranskem, Mediteranskem in vzhodnem Atlantskem morju, od Angleškega kanala (zahodna obala Irske, Britanski otoki) vse do Južne Afrike (Jadras in sod., 2004). Je bentopelaška vrsta, ki jo najdemo do globine 300 m. Najpogostejši habitat so plitve lagune, zalivi in esturaji, kjer se zadržuje nad peskom in mehкими podlagami. Za razliko do ostalih sorodnikov jih pogosto najdemo v skupinah. Prehranjujejo se skoraj izključno z bentoškimi nevretenčarji, ki živijo na pesku in mehkiem sedimentu in sicer z mehkužci, raki in majhnimi ribami.

V dolžino lahko zraste do 2.5 m. Telesna plošča pri tej velikosti je široka okoli 1.5 m, primerek pa bi tehtal okoli 70 kg. V povprečju pa so veliko manjši, in sicer med 50 in 100 cm ter težki nekaj kg. Kar se tiče same telesne plošče je večja v širino kot dolžino. Usta so na spodnji strani glave in so iz 1-7 zob, ki so zraščeni v zobno ploščo. Rep je izredno dolg in je pri tej vrsti približno dvakrat daljši od telesne plošče. Koža je gola in gladka, na zgornji strani temno bakrene in spodaj bele barve (Turk, 2006).



Slika 6 : Navadni morski golob (*M. aquila*), foto: Doug Perrine

- Kljunati morski golob (*P. bovinus*)

Kljunati morski golob (slika 7) je tipična atlantsko-mediteranska vrsta, ki se pojavlja v vzhodnem Atlantiku, od Portugalske in Maroka do Angole vključno z Madeiro, Kanarskih otokih, od Saldanha Bay do Natala v Južni Afriki, ter tudi Južnem Mozambiku. V Mediteranu je vrsta pogosteje ujeta v vzhodnem kot zahodnem delu, ponavadi v južnih predelih, v severnem Jadranu pa se redkeje pojavlja. (Kamel in sod., 2010).

Je bentopelaška vrsta, ki jo občasno zasledimo v manjših skupinah v obalnih tropskih, toplih vodah na globini med 10 in 150 m. V glavnem se prehranjuje s školjkami, polži, ob dnu živečimi raki in občasno tudi z glavonožci ter ribami kostnicami (Dulčić in sod., 2008).

Kljunati morski golob je približno enako velik kot navadni morski golob, na hrbtne strani telesa pa ima značilne temnejše proge. Glava še bolj štrli iz telesne plošče in se končuje kot nekakšen ploščat račji kljun (Turk, 2007).



Slika 7: Kljunati morski golob (*P. bovinus*), foto: Doug Perrine

- Družina Morski biči (*Dasyatidae*)

Živijo v plitvih, toplih vodah in redko zaidejo globlje od 110 m. Najdemo jih v Atlantskem, Indijskem in Pacifiškem oceanu (www.fishbase.org). Z redkimi izjemami živijo na dnu, delno zakopani v pesku, včasih v bližini koralnih grebenov. Vsi morski biči imajo izrazito romboidno, sploščeno telo, vendar glava ne štrli iz telesa kot pri sorodnih morskih golobih. Kot že samo ime pove, imajo dolg, biču podoben, na koncu zelo tenak rep. Skoraj vedno je daljši od nizkega preostalega dela telesa. Vsi morski biči imajo na tem repu eno ali dve strupeni bodici, ki so pri velikih primerkih tudi zelo dolge in nazobčane strukture in jih uporabijo kot orožje. Tako najdemo primerke s premerom od 30 cm do 2.1 m in težo od 0.7 kg do 350 kg. V dolžino lahko zrastejo tudi do 4 m. Podobno kot morski golobi imajo zelo dobro razvite zobe za mletje tudi najtršega plena. Prehranjujejo se z vsem kar najdejo na morskem dnu npr. z raki, školjkami, ribami, ...

- Vijoličasti morski bič (*P. violacea*)

Vijoličasti morski bič (Slika 8) je široko razširjen v tropskih in subtropskih predelih Pacifiškega, Atlantskega in Indijskega oceana. V Mediteranu je običajno prisoten ob Afriških obalah, v Ligurijskem morju, v vodah Sicilije in Grčije ter Izraela (Mavrič in sod., 2004). Dolgo časa je v Jadranu in Sredozemskem morju veljal za redko vrsto, zadnje čase pa se predvsem v severnem Jadranu pogosto pojavlja (Turk, 2007). To je verjetno edina vrsta morskih bičev, ki se pojavlja v pelaških, oceanskih vodah in ga običajno najdemo od površine do globine 100 m (Mollet, 2002).

Velja za majhnega morskega biča z največjo širino diska 80 cm (Mollet, 2002) in tipično zaokroženim gobcem. Tako zgornja kot spodnja stran telesa je temna, vijolično do zeleno-modre barve. V raziskavah vsebnosti želodca te vrste iz Tržaškega zaliva so ugotovili, da se prehranjuje v glavnem s pelagičnimi organizmi, kot so ribe kostnice (98 % vse hrane), največ z evropskim sardonom in mediteransko sardelo ter občasno tudi z glavonožci (Mavrič in sod., 2004).



Slika 8: Vijoličasti morski bič (*P. violacea*), foto: Aldo Marinelli

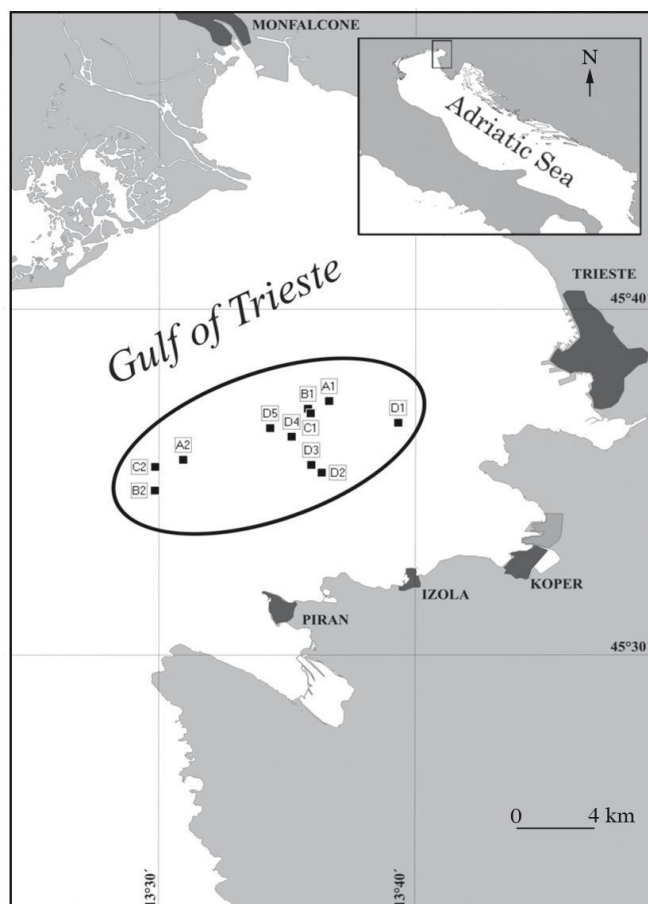
3 EKSPERIMENTALNI DEL Z MATERIALI IN METODAMI

3.1 DOLOČANJE ARZENA V RIBAH

3.1.1 Vzorčevanje rib

Osebkki vključeni v raziskavo (15 osebkov vrste kljunatega morskoga goloba *P. bovinus*, 6 osebkov vrste navadnega morskoga goloba *M. aquila* ter 8 osebkov vijoličnega morskoga biča *P. violacea*) so bili pridobljeni v obdobju od avgusta do oktobra 2005 na območju severnega Jadranskega morja, v južnem delu Tržaškega zaliva ter ob zahodni obali Istre kot del širše raziskave teh živali, in sicer speciacije Hg (Degenek, 2008).

Osebkom so bili določeni tudi biometrični podatki, kot so teža, spol, širina diska (DW), dolžina diska (DL) ter dolžina celotne ribe (TL).



Slika 9: Lokacija ulova preiskovanih rib (Lipej in sod., 2008)

3.1.2 Priprava vzorcev jeter in mišic rib

Vsakemu preiskovanemu osebkju je bil na Morski biološki postaji v Piranu odvzet vzorec jeter in mišic. Odvzeti vzorci so bili zamrznjeni in shranjeni pri temperaturi –15 do –20 °C v polietilenskih vrečkah za nadaljnjo uporabo na Inštitutu Jožef Stefan (Odsek za znanosti o okolju na Rektorskem centru Podgorici). Sledilo je počasno sušenje vzorcev s postopkom liofilizacije (Liofilizator Christ Alpha 1–4) pri temperaturi –40 °C in tlaku 0.020 mbar. S tehtanjem so nato določili suho maso posameznih tkiv. Posušeni vzorci tkiva so bili homogenizirani z mletjem (Mlin: Fritsch planetary micro mill pulverisette7). Uporabljene so bile ahatne posodice in kroglice, ki so jih pred uporabo naslednjega vzorca vedno temeljito sprali z vodo in obrisali, da ni prišlo do kontaminacije. Zmleti vzorci so bili do nadaljnje uporabe hranjeni v hladilniku.

3.1.3 Določanje celokupnega As v liofiliziranih vzorcih jeter in mišic

Pred analizo je trdne vzorce, kakršni so tudi vzorci rib, potrebno razkrojiti v mešanici kislin za razgradnjo organske komponente vzorca, pri čemer se kovine sprostijo in raztopijo v raztopini, ki jo potem analiziramo (Ghanthimathi in sod., 2012). Mešanici kislin dodamo tudi močne oksidante (običajno H₂O₂) za razgradnjo snovi, ki ni bila razgrajena s strani kisline (Ghanthimathi in sod., 2012). Obstajata odprti in zaprti (mikrovalovni) tip razklopa. Uporaba mikrovalovnega razklopa ima glede na odprti tip številne prednosti, kot so: večja hitrost razgradnje vzorca, manjša kontaminacija vzorca med procesom (Soylak in sod., 2004) ter doseganje višjih temperatur in pritiska. Kritični parameter kislinskega razklopa je temperatura, od katere je odvisna popolnost razkroja in čistost raztopine (Ghanthimathi in sod., 2012).

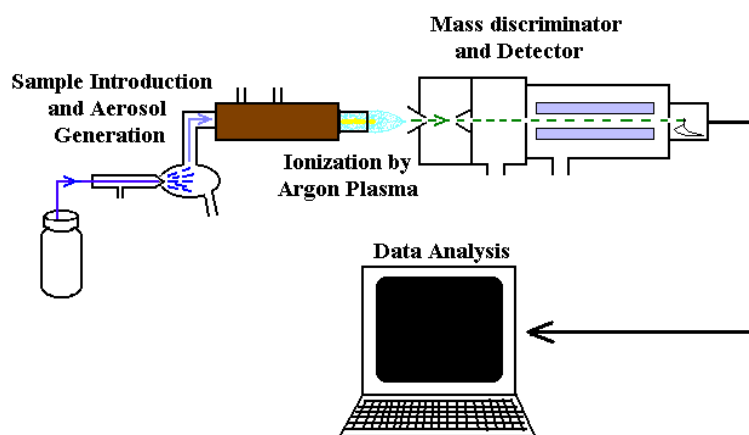
3.1.3.1 Priprava vzorca z mikrovalovnim razklopom

Približno 0.2 g liofiliziranega vzorca smo zatehtali v kvarčno epruveto, za razkroj vzorca smo dodali 4 mL 65% HNO₃ in 1 mL 30% H₂O₂. Uporabili smo zaprt mikrovalovni razklop (Microwave system ETHOS 1, MILESTONE SN 130471) pri največji moči 1500 W: 10 min postopno segrevanje do 130 °C, nato 10 min 200 °C,

zadrževanje na tej temperaturi 20 min, hlajenje 20 min. Isti postopek je bil uporabljen za slepe vzorce in referenčne materiale: NRCC DOLT 4 (Dogfish Liver) in DORM 3 (Dogfish Muscle). Po razkroju smo raztopino razredčili z Milli-Q vodo do volumna 20 mL in tako dobili vzorec pripravljen za analizo.

3.1.3.2 Analiza pripravljenega vzorca z ICP-MS

Induktivno sklopljena plazma z masno spektrometrijo ali ICP-MS je analitska tehnika za kvantitativno določanje elementarne sestave vzorcev. Gre za kombinacijo izvora visoke temperature v induktivno sklopljeni plazmi (ICP) in masnega spektrometra (MS).



Slika 10: Osnovna shema ICP-MS

Pomemben del ICP-MS sistema (slika 10) je sam vnos vzorca, kjer se tekoči vzorec pretvori v aerosole, pri čemer se manjše kapljice prenesejo v središče plazme, večje pa se odstranijo. ICP je visokotemperaturni plamen v toku inertne atmosfere argona. Vloga argona je generiranje plazme in deluje kot izolator ter nosilec vzorca. Aerosol vzorca se v plazmi pri visoki temperaturi razkroji, izpari, atomizira in ionizira. Ioni se v obliki snopa iz plazme prenesejo preko vakumskega vmesnika in sistema leč do masnega analizatorja. Tukaj poteka masna separacija, ki temelji na razmerju med maso in nabojem iona (m/z) določenega elementa. Na koncu ioni dosežejo masni detektor, ki šteje vsak ion posebej in shrani skupni signal za vsako razmerje m/z ter ojačan

signal pošlje na rekorder ali računalnik. Rezultat je masni spekter, v katerem je višina posameznega vrha sorazmerna koncentraciji elementa v vzorcu.

Metoda omogoča veliko občutljivost in meje detekcije pod 0.1 µl/L, za večino elementov periodnega sistema, z izjemo lahkih elementov, kot so C, H, N, F in žlahtnih plinov.

Meritve pripravljenih vzorcev so bile opravljene metodo induktivno sklopljene plazme z masno spektrometrijo oz. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, 7500ce Agilent) opremljene z ORS sistemom (Octapole Reaction System) in z ASX-510 Autosampler (Cetac). Merjeni so bili izotopi: ^{66}Zn , ^{75}As , ^{78}Se , ^{114}Cd .

3.1.4 Speciacija As v liofiliziranih vzorcih

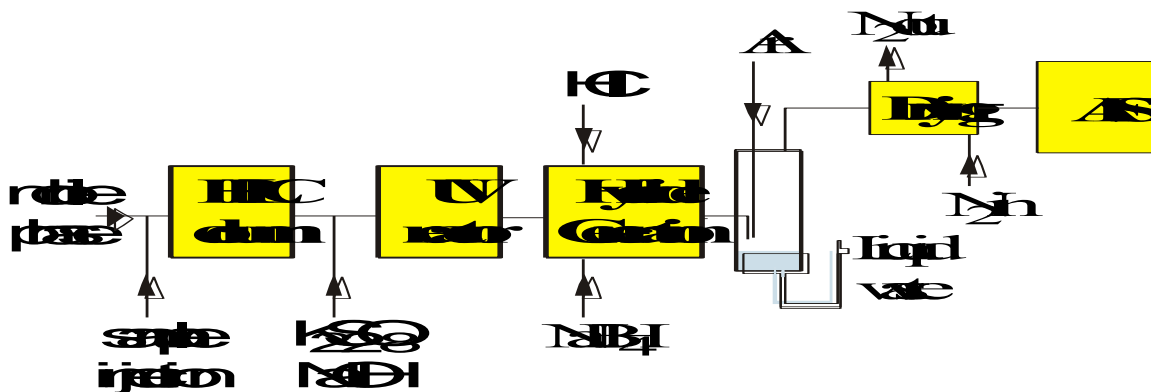
3.1.4.1 Ekstrakcija arzenovih spojin iz biološkega tkiva

V 50 mL stožčaste polipropilenske vialo (Sarstedt, Nemčija) smo zatehtali 0.15-0.25 g liofiliziranega vzorca ribjih jeter ali mišic ter jim dodali 20 mL mešanice metanola in vode v razmerju 9:1. Vzorce smo preko noči stresali v vodni kopeli pri 40 °C. V primeru vzorcev jeter pa smo zaradi aglutinacije vzorca, ki je posledica večje vsebnosti maščob, disperzijo in ekstrakcijo vzorca povečali z zvišanjem temperature prve ure stresanja na 50 °C ter nato temperaturo znižali na 40 °C do preostanka stresanja. Sledilo je centrifugiranje 10 min pri 3000 rpm. Supernatant smo previdno prelili v novo vialo. Na preostanku vzorca smo ekstrakcijo ponovili še dvakrat. V novi viali smo združili vse tri ekstrakte in nato z uporabo rotacijskega evaporatorja pri 45 °C odstranili topilo iz ekstrakta. V primeru vzorcev mišic smo posušene ostanke ekstrakta raztopili v 5 mL Mili-Q vode, vzorce jeter pa smo najprej sprali z 20-30 mL dietil etra in jih nato raztopili v 5 mL vode. Končne vodne ekstrakte smo nato filtrirali (Millipore Millex HV hidrofilični PVDF membranski filter) in jih zamrznili do analize. Dietil etrske frakcije smo na zraku posušili, nato pa sušini dodali 2 mL dietil etra, da smo raztopino lahko prenesli v vialo za obsevanje. V njih smo dietil eter ponovno posušili do suhega, nato pa vialo zaprli in jih tako pripravili za obsevanje.

3.1.4.2 Speciacija As s HPLC-UV-HG-AFS

As spojine smo ločevali z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) v povezavi z UV-fotoreaktorjem in hidridno tehniko (HG) za pretvorbo nehlapnih As spojin v ustrezne plinske hidride, ki so bili detektirani z atomskim fluorescenčnim spektrometrom (AFS) (PS Analytical, Kent, UK) (slika 11). Preko injektorja se injicira vzorec, ki gre preko in-line filtra (0.45 μm) in anionske izmenjalne HPLC kolone. S peristaltično črpalko dodamo za on-line zakisanje HCl in za mešanje NaBH_4 , ki je reducent in omogoča tvorbo H_2 . Nastali H_2 reagira z As(III), DMA, MMA in As(V) in tvori ustrezne hidride (AsH_3 , dimetilarzin in monometilarzin). Mešanica tekočine in plinov (mobilna faza, vzorec, kislina, NaBH_4 , H_2 in hidridi) se v separatorju (GLS, PS Analytical) loči na tok tekočine (odpadek) in plinov. Nosilni plin (argon) iz separatorja odnese vse pline, ki se v Perma-pure sušilcu posušijo s tokom dušika. Nastali hidridi nato pridejo v AFS, kjer H_2 zgori z majhnim difuzijskim plamenom, v katerem As hidridi razpadejo, pride do vzbujanja As in njegove fluorescence, ki jo zazna detektor. V primeru kationske izmenjave je med HPLC kolono in enoto za tvorbo hidridov dodana enota za UV razkroj vzorca. Efluentu iz kolone on-line dodamo s peristaltično črpalko raztopino kalijevega persulfata ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) in NaOH. Efluent z omenjeno raztopino teče skozi UV enoto, od tukaj pa gre razkrojeni vzorec skozi enak postopek opisan pri anionski izmenjavi.

Tako sestavljen speciacijski sistem je primeren za separacijo in kvantifikacijo 8 As spojin, in sicer As(III), As(V), MMA, DMA, AsB, AsC, TETRA in TMAO (Šlejkovec in sod., 1999).



Slika 11: Shema speciacijskega sistema HPLC-UV-HG-AFS

Ionsko izmenjevalna kromatografija je potekala pri dveh različnih pogojih glede na naboj As spojin. Tako so bile anionske As spojine (As(III), As(V), MMA in DMA) ločene na anionski izmenjevalni koloni (Hamilton PRP-X100, 250x4,1 mm) z mobilno fazo 15 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ pri pH 6.1. Tvorba hidridov je potekala v 2 mol L⁻¹ HCl (3.0 mL min⁻¹) in 1.5% NaBH₄ v 0.1% NaOH, (3 mL min⁻¹).

Kationske As spojine (AsB, AsC, TETRA in TMAO), ki ne generirajo plinskih hidridov, so bile najprej ločene na kationski koloni (Zorbax 300-SCX, 250 x 4.6 mm) s 7.5 mmol L⁻¹ piridinom pri pH 2.33 (uravnan s HCl) ter nato on-line razkrojene in oksidirane do As(V) v UV reaktorju (3.1 m dolga, 0.5 mm FEP Teflonska cevka zavita okoli 8 W Camag UV luči, 245 nm) ob dodatku 3% K₂S₂O₈ in 3% NaOH). Šele nato je sledila tvorba hidridov in njihova določitev z AFS.

Enak postopek analize smo uporabili na pripravljenih raztopinah anionskih in kationskih standardov, kar nam je s primerjavo retencijskih časov omogočilo identifikacijo in s primerjavo površin kromatografskih vrhov kvantifikacijo As spojin v vzorcih. Skupaj z vzorci smo analizirali tudi referenčni material DORM 2.

3.1.4.3 Določanje celokupnega As v lipidni frakciji z instrumentalno nevtronsko aktivacijsko analizo (INAA)

Posušene dietil eterske frakcije so bile skupaj s standardno raztopino As (10 µg mL⁻¹) obsevane v nuklearnem reaktorju Triga MARK II in nato hlajene 3-4 dni. Radioaktivni izotop ⁷⁶As (t_{1/2} = 26 ur) v vzorcu in standardu smo nato izmerili na HP Ge detektorju 1-3 minute pri 559 keV in tako dobili podatke za izračun celokupne koncentracije As v lipidni frakciji.

3.1.5 Obdelava podatkov in izračun rezultatov

Podatke smo iz AFS detektorja pridobili s pomočjo kromatografskega programa Genie in jih prenesli v računalniški program FAAS, kjer smo izračunali površine kromatografskih vrhov. Površine kromatografskih vrhov vzorcev smo direktno primerjali s površinami vrhov standardov, ki so bili injicirani časovno najbližje vzorcu. Ker je celodnevna stabilnost sistema problematična, smo pred in po injiciranju vsakega seta vzorcev (2 vzorca v triplikatu) injicirali tudi standarde v paralelki. Koncentracijo spojine x v vzorcu smo izračunali po naslednji enačbi (1):

$$C_x = (A_x \times C_{std} / A_{std}) \times V/m \quad (1)$$

C_x Koncentracija spojine x v vzorcu (ng/g)

A_x Površina kromatografskega vrha spojine x v vzorcu

$C_{std\ x}$ Koncentracija spojine x v standardu (ng/g)

$A_{std\ x}$ Površina kromatografskega vrha spojine x v standardu

V Masa vodnega ekstrakta (g)

m Zatehta vzorca (g)

3.2 DOLOČANJE ARZENA V VZORCIH HUMANEGA URINA

3.2.1 Vzorčevanje

- Uživanje ribe

Na ljubljanski tržnici smo kupili svežo ribo, in sicer rumenoplavuti tun (*Thunnus albacares*). Ribo smo razdelili na 5 enakih delov z maso 250 g ter jo do uporabe zamrznili. Skupino prostovoljcev je sestavljalo 5 oseb starih med 20 in 25 let, tri osebe ženskega spola in dve osebi moškega. Vsak posameznik je tako zaužil 250 g pripravljene ribe. Štirje izmed prostovoljcev so nato naslednjih 24 ur po zaužitju zbirali urin, peti prostovoljec pa 72 ur. V času poskusa prostovoljci niso zaužili nobene druge vrste rib. Količino enodnevnega izločenega urina vsakega posameznika smo stehali, dobro premešali ter odvzeli 10 mL za analizo ostalo pa zavrgli. Prav

tako smo vsakemu prostovoljcu po enem tednu (v tem času ni zaužil nobene vrste rib) odvzeli 10 mL vzorca urina, ki je služil kot kontrolni vzorec. Vzorce urina smo do analize dobro zaprli in jih hranili na hladnem.

- Uživanje vode

Na vrtini v Rogaški Slatini smo odvzeli 10 L vode. Ta voda je neprečiščena in običajno vsebuje visoko koncentracijo As(III). Vodo smo v laboratoriju takoj analizirali in ugotovili, da vsebuje $258 \pm 16 \mu\text{g L}^{-1}$ arzena. Vodo smo temeljito premešali in jo razdelili v porcije po 0.5 L, ki smo jih hranili v hladilniku do začetka raziskovanja.

Prostovoljec (moškega spola, star 18 let) je osem dni zaporedoma vsak dan zaužil 0.5 L kontaminirane vode z arzenom. Med raziskavo je prostovoljec natančno beležil tudi vrsto prehrane, ki bi lahko imela vpliv na vnos As, predvsem uživanje hrane morskega izvora. Prostovoljcu smo prvi vzorec urina odvzeli 24 ur pred začetkom uživanja vode, nato pa je prostovoljec še 11 dni zbiral 24 urne vzorce urina. Vsak urin izločen v 24 urah smo premešali, stehali in ga 40 mL shranili na hladno, ostalo pa zavrgli. Prostovoljec je urin po osemdnevem pitju vode zbiral še tri dni, da bi preverili ali se je arzen dokončno izločil iz telesa.

- Bolnica z akutno promielocitno levkemijo (APL)

Preiskovana oseba ženskega spola, s starostjo 45 let in telesno težo 131 kg, je bila v procesu terapije akutne promielocitne levkemije zdravljenja z As_2O_3 . Terapija naj bi trajala dvakrat po 25 dni z vmesno 7 dnevno pavzo, dejansko pa je prišlo v drugem delu do dodatne prekinitve zaradi okužbe. Dnevno je v obliki intravenske infuzije prejela po $0.15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ As}_2\text{O}_3$ prvih 25 dni, sledila je 11 dnevna prekinitvev nato namesto 25 le 15 dnevni odmerki arzena, ki jim je sledila 25 dnevna prekinitvev in dodatnih sedem odmerkov arzena. Skupaj je zdravljenje trajalo 80 dni. Bolnici je bil vsak dan pred infuzijo odvzet vzorec urina in nekatere dneve tudi vzorec seruma oziroma krvi. Vzorce so bili do analize shranjeni na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2 Določanje As

Pri speciaciji As v vzorcih urina smo uporabili enako metodo kot v primeru speciacije v vzorcu rib, in sicer sistem HPLC-UV-HG-AFS (opisan v poglavju 3.1.4.2), razlika je le v tem, da v primeru urina ni potrebna predhodna priprava vzorca. Tako smo vzorec urina direktno injicirali v injektor omenjenega sistema, v nekaterih primerih je bilo potrebno urin razredčiti z Milli-Q vodo v razmerju od 1:1 do 1:10. Koncentracijo posameznih spojin v vzorcu urina smo izračunali po naslednji formuli (2):

$$C_x = (A_x \times C_{std} / A_{std}) \quad (2)$$

Količino posameznih spojin As, v celotnem volumnu izločenega urina pa (3):

$$C_x = (A_x \times C_{std} / A_{std}) \times V \quad (3)$$

C_x Koncentracija spojine x v vzorcu (ng/ml)

A_x Površina kromatografskega vrha spojine x v vzorcu

$C_{std\ x}$ Koncentracija spojine x v standardu (ng/ml)

$A_{std\ x}$ Površina kromatografskega vrha spojine x v standardu

V količina izločenega urina (ml)

3.3 DOLOČANJE CELOKUPNEGA As V HUMANIH VZORCIH KRVI IN SERUMA

3.3.1 Vzorčevanje

Za potrebe raziskave so bili na Zavodu za varstvo pri delu d.d (ZVD) sedmim prostovoljcem (glej spodaj, poglavje 3.4.1) in na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani (UKC) APL bolnici (glej zgoraj poglavje 3.2.1) odvzeti vzorci seruma ter v primeru prostovoljcev tudi vzorci polne krvi. Šlo je za odvzem 2 x 3 mL seruma in krvi (pri prostovoljcih). V primeru APL bolnice je šlo za odvzem 13 vzorcev seruma pred infuzijo As₂O₃ v določenih dnevih terapije (1-5 dan ter 8, 15, 22, 30, 37, 38, 43, in 50 dan terapije). Odvzemi seruma in polne krvi prostovoljcev pa so bili enkratni. Vzorce smo do analize hranili pri temperaturi -20 °C.

3.3.2 Določanje celokupnega As

V 10 mL plastične epruvete smo odtehtali približno 0.3 g (natančne mase smo zabeležili) vzorca krvi oz. seruma. Vzorec smo nato v razmerju 1:10 redčili z raztopino, ki je vsebovala 5 g L⁻¹ amonijaka, 0.5 g L⁻¹ Triton-a X-100 in 0.5 g L⁻¹ EDTA. Vsak vzorec je bil pripravljen v dveh paralelkah. Na enak način smo pripravili tudi slepi vzorec (brez krvi/seruma). V alikvotu vzorca smo koncentracijo As določili z metodo ICP-MS 7500ce Agilent, opremljene z ORS sistemom in z ASX-510 (poglavje 3.1.3.2). Koncentracije Arzena smo določili z metodo standardnega dodatka (100 µL) v matrico krvi oz. seruma. Pravilnost delovanja metode smo preverjali z uporabo referenčnih materialov (RM) Seronorm Whole Blood L-1 (Sero As, Norway) in Seronorm Serum L-1 (Sero As, Norway).

3.4 KVANTITATIVNO DOLOČANJE IZRAŽANJA GENOV MT V HUMANIH VZORCIH KRVI

3.4.1 Vzorci

Kontrolno skupino (K1-K8) je predstavljalo 8 prostovoljcev (4 moški in 4 ženske), starih med 39 in 54 let, ki so jim odvzeli kri na Zavodu za varstvo pri delu d.d (ZVD, 7 prostovoljcem) ter na Fakulteti za farmacijo (1 prostovoljec). Vzorec (2 krat po 3 mL) polne venske krvi so odvzeli v epruvete VACCUETE[®] Tempus[™] Blood RNA Tube, (Applied Biosystems, ZDA), ki vsebujejo reagent za stabilizacijo RNA.

Na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani (UKC) so v enake epruvete odvzeli polno vensko kri bolnice z akutno promielocitno levkemijo (APL), ki jo zdravijo z arzenovim trioksidom (As_2O_3). Med potekom terapije so bolnici v sedmih različnih časovnih intervalih odvzeli po 3 mL krvi v enake epruvete kot kontrolni skupini. Odvzemi so potekali 5., 8., 15., 30., 37., 43. in 50. dan terapije oziroma teh 7 odvzemov je v naši raziskavi predstavljalo preiskovane vzorce.

Tako kontrolne kot preiskovane vzorce smo nato do nadaljnje uporabe hranili pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.2 Izolacija celokupne RNA

Postopek izolacije je potekal v komori za izolaciji RNA z najvišjo stopnjo zaščite pred snovmi in procesi, ki bi povzročile razgradnjo RNA. Sterilnost komore, pribora za delo in materiala smo zagotovili z reagentom RNaseZap[®] (Ambion[®], Life Technologies, ZDA), površinsko dekontaminacijsko raztopino, ki uniči RNaze, ter z obsevanjem z UV lučjo (30 min).

Celokupno RNA smo izolirali po protokolu proizvajalca reagenčnega kompleta Ambion[®] Tempus[™] Spin RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, ZDA), ki zagotavlja visoko čistost in integriteto izolirane RNA. Izolacija vključuje tri stopnje procesiranja stabilizirane polne krvi. Najprej redčenje s fosfatnim pufrom (PBS angl. phosphate- buffered saline) in 30-minutno centrifugiranje pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter relativni centrifugalni sili (rcf, angl. relative centrifugal force) 3000. Sledi odstranitev

supernatanta, pri čemer dobimo minimalno količino (nevidno s prostim očesom) RNA pelete, ki jo resuspendiramo v raztopini za čiščenje. Zadnja stopnja vključuje čiščenje resuspendirane RNA na koloni. Očiščeno RNA smo s kolone sprali z dodatkom 100 μL elucijske raztopine in inkubirali za 2 minuti na 70 °C. Vzorce izolirane celokupne RNA smo shranili na -80 °C.

3.4.3 Določevanje koncentracije in čistosti izolirane RNA

Izolirani RNA smo določili čistost in koncentracijo z uporabo spektrofotometra Nanodrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, ZDA). Ta na podlagi izmerjene absorbance in predpostavke, da ima RNA s koncentracijo 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ absorbanco pri 260 nm 1 izračuna koncentracijo RNA. Poda nam tudi razmerje absorbanc pri 260 nm in 280 nm, s čimer lahko ocenimo kontaminacijo vzorca s proteini in organskimi topili, ki lahko zaostanejo med postopkom izolacije RNA. RNA v vzorcu je ustrezne kvalitete za nadaljnje delo v kolikor je razmerje absorbanc v območju od 1.8 do 2 (Farell 1998, Friderich in sod., 1999).

3.4.4 Določanje kakovosti izolirane RNA

Za določevanje kvalitete izolirane RNA smo uporabili aparaturo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Nemčija) in mikročip Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Nemčija). Aparatura ločuje fragmente RNA po velikosti s kapilarno elektroforezo na čipu (RNA Nano LabChip[®]) in na osnovi tega oceni fragmentiranost izolirane RNA. Izmeri intenziteto fluorescence in poda rezultate v obliki elektroferograma celotne RNA ter številčno oceno RIN (RNA Integrity Number). Na elektroferogramu vidimo vrha 18S in 28S ribosomske RNA (rRNA) in za dobro kvaliteto RNA je pomembno, da je višina vrha, ki pripada 28S rRNA vsaj dvakrat večja od višine vrha 18S rRNA (razmerje 28S/18S rRNA je vsaj 2) (http://biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html).

RIN je rezultat programskega algoritma, ki omogoča klasifikacijo celokupne RNA s številčnim sistemom od 1 do 10, pri čemer RIN 1 pomeni najbolj fragmentirano RNA in RIN 10 najbolj intaktno RNA.

3.4.5 Reverzna transkripcija RNA v cDNA

Za prepis RNA v komplementarno cDNA smo uporabili reagenčni komplet High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix Kit (Applied Biosystems, ZDA). Vzorce smo odtalili in jih z ultračisto vodo brez RNaz redčili na koncentracijo $70 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, tako da je bil skupni volumen $25 \text{ } \mu\text{L}$. Razredčeno RNA smo nato dodali v reakcijsko zmes za reverzno transkripcijo (preglednica 2) katere končni volumen je bil $50 \text{ } \mu\text{L}$. Končna koncentracija RNA v reakcijski zmesi je bila $35 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. RNA v reakcijski zmesi smo prepisali v cikličnem termostatu Thermocycler PeqStar 384 HPL (PEQLAB, Nemčija). Vzorce cDNA smo do uporabe hranili na $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Preglednica 2: Sestava $50 \text{ } \mu\text{L}$ reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo (RT).

reakcijska zmes za RT	V (μL)
puffer 10x	5
dNTPa 25x	2
oligonukleotidni začetniki 10x	5
encim reverzna transkriptaza	2,5
inhibitor RNaz	2,5
ultra čista H ₂ O	8
RNA*	25
skupaj	50

* koncentracija $35 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$; a dNTP – deoksiribonukleozid-5'-trifosfat

3.4.6 Merjenje izražanja genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR)

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR) v realnem času je nadgradnja standardne PCR tehnike in se uporablja za pomnoževanje in kvantifikacijo tarčne sekvence (amplikona) DNA in RNA (po prepisu v cDNA) v vzorcih. Specifičnost reakcije je zagotovljena z uporabo para oligonukleotidnih začetnikov (OZ oz. primerjev), ki se nalegata na specifična mesta DNA ali cDNA. Reakcijo qPCR sestavljajo tri glavne stopnje:

- denaturacija DNA pri 95 °C,
- naleganje OZ (temperatura je odvisna od izračunane talilne temperature OZ, T_m angl. melting temperature),
- podaljševanje verige z encimom Taq polimerazo pri 72 °C (optimalno delovanje polimeraze).

Za razliko od tradicionalne tehnike PCR, kjer se detekcija in kvantifikacija amplikonov izvaja na koncu reakcije s pomočjo tehnike gelske elektroforeze, nam qPCR v realnem času meri koncentracijo PCR produktov med samim potekom reakcije. Količina DNA se izmeri v vsakem ciklu reakcije s pomočjo fluorescentnih označevalcev, ki generirajo fluorescentni signal, premo sorazmeren številu nastalih PCR produktov. Obstaja več fluorescentnih detekcijskih sistemov, ki zahtevajo specifične pogoje reakcije. Najpogosteje se uporabljata:

- metoda z interkelirajočim barvilom npr. SYBR Green I. Barvilo se interkelira samo v dvoverižne odseke DNA (dsDNA, angl. double stranded DNA) in pri tem se mu zviša intenziteta fluorescence. Intenziteta fluorescentnega signala je odvisna od količine produkta, ki nastane med reakcijo PCR. Čeprav je metoda enostavna, ima pomanjkljivost v specifičnosti, ker se barvilo lahko vgradi v vse dsDNA nastale med reakcijo (dimeri OZ, dvovijačni produkti nespecifičnega pomnoževanja) in ne samo v amplikon, ki ga želimo izmeriti. Stopnjo specifičnosti pa lahko potrdimo po končani PCR reakciji z uporabo analize disociacijske krivulje pomnoženega produkta. Ta analiza identificira prisotnost zelenega PCR produkta s specifično dolžino in temu ustrezno talilno

temperaturo ter dimerov OZ, saj denaturirajo pri nižji temperaturi taljenja v primerjavi z zelenimi amplikoni.

- metoda s hidrolizirajočimi sondami npr. TaqMan[®] sonde. Te imajo na svojem 5' koncu vezano fluorescentno barvilo (reporter) in na 3' koncu zaviralec signala (angl. quencher). V kolikor sta reporter in zaviralec dovolj blizu lahko zaviralec zaduši fluorescenco, ki jo oddaja reporter. Sonda je sintetizirana tako, da se veže na sekvenco cDNA, ki jo pomnožujeta specifična OZ. Ko med prepisovanjem DNA polimeraza naleti na to sekvenco, s svojo 5' eksonukleazno aktivnostjo razgradi vezano sondo. Pri tem se reporter loči od zaviralca, ki sedaj zaradi prevelike razdalje med njima ne more več dušiti fluorescence, in nastane fluorescentni signal, ki ga izmerimo tekom qPCR.

Laboratorijsko tehniko qPCR v realnem času smo v raziskavi uporabili za merjenje izražanja genov na podlagi določitve relativne količine mRNA posameznega gena. Merilo za relativno količino mRNA je količina tarčne cDNA. Relativna koncentracija cDNA posameznega vzorca je bila določena na podlagi primerjave s standardno krivuljo. Glavni parameter kvantifikacije je C_q (kvantifikacijski cikel, angl. quantification cycle), zaporedna številka cikla podvajanja pri katerem jakost fluorescence preseže bazni prag detekcije (angl. treshold). Odvisno od instrumenta na katerem delamo qPCR, se C_q lahko imenuje C_t (pražni cikel, angl. treshold cycle) ali C_p (angl. crossing point). Vrednost C_q je obratno sorazmerna začetni količini cDNA v vzorcu in je zato uporabna za njen izračun.

Reakcije qPCR smo izvajali v cikličnem termostatu LightCycler[®] 480 II (Roche Applied Science, ZDA), potek reakcije pa spremljali s programom LightCycler[®] 480 Software 1.5. Uporabljali smo ploščice s 384 vdolbinicami (LightCycler[®] 480 Multiwell Plate 384, Roche Applied Science, ZDA), ki smo jih po nanosu reakcijske mešanice prekrili z lepljivo folijo (LightCycler[®] 480 Sealing Foil, Roche Applied Science, ZDA). Za normalizacijo izražanja genov smo uporabili naslednje referenčne gene: *Gapdh*, *Actb*, in *Rplp0*. Za preverjanje kontaminacije reakcijske zmesi smo za vsak gen naredili še negativno kontrolo, pri kateri smo namesto cDNA dodali enak volumen ultračiste vode (dH₂O). Pri optimizaciji qPCR reakcije smo preverili prisotnost genomske DNA za vsak gen tako, da smo naredili enako PCR reakcijo za

par vzorcev celokupne RNA in reakcijske zmesi za reverzno transkripcijo v cDNA brez encima reverzne transkriptaze (-RT). V nobenem od teh vzorcev ni nastal PCR produkt, ki bi bil enak tarčnemu ampliconu naših preiskovanih genov

3.4.6.1 Priprava standardne krivulje

Standardno krivuljo smo pripravili s serijskim redčenjem cDNA, ki predstavlja mešanico vseh vzorcev z izhodiščno koncentracijo $35 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (preglednica 3).

Preglednica 3: Priprava standardov za določitev izražanja enega gena z upoštevanom 10 % izgubo pri pipetiranju

standard	V cDNA (μL)	V dH ₂ O (μL)	V _k * (μL)	Prenos v naslednje redčenje (μL)
st1 ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$)	17,2	42,8	60	30
st2 ($5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$)	30	30	60	30
st3 ($2.5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$)	30	30	60	30
st4 ($1.25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$)	30	30	60	30
st5 ($0.625 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$)	30	30	60	30
st6 ($0.3125 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$)	30	30	60	30
*V _k , končni volumen				

3.4.6.2 Priprava vzorcev cDNA

Preiskovane in kontrolne vzorce smo redčili z dH₂O na enako koncentracijo, kot jo ima standard 3 ($2.5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$).

3.4.6.3 Priprava reakcijske mešanice za qPCR

Kot fluorescentni detekcijski sistem smo uporabili dve metodi, in sicer za določene gene interkelirajoče barvilo SYBR Green I, za nekatere pa hidrolizirajoče sonde TaqMan[®]. Sestava $15 \mu\text{L}$ reakcijske mešanice se v obeh primerih nekoliko razlikuje in je prikazana v preglednici 4.

Za pripravo reakcijske mešanice z interkelirajočim barvilom SYBR Green I smo uporabili komplet 5x HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (Solis BioDyne,

Estonija). Gre za optimizirano raztopino, ki vsebuje vse komponente potrebne za izvedbo qPCR, uporabnik doda samo oba OZ, tarčno DNA in dH₂O.

Za pripravo reakcijske mešanice s hidrolizirajočimi sondami TaqMan Gene expression assay (Applied Biosystems, ZDA) pa smo uporabili komplet 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonija) kateremu smo dodali dH₂O, tarčno DNA ter reakcijsko mešanico TaqMan Gene expression assay, ki vsebuje hidrolizirajoče sonde in OZ, specifične za preiskovane gene, ki so zaradi patentne zaščite, neznane uporabnikom.

V preglednici 5 so prikazana nukleotidna zaporedja OZ, ki so bili sintetizirani v okviru že obstoječe študije vpliva As₂O₃ na izražanje genov izoform MT (Falnoga in sod., 2012). Izražanje genov, kjer je bila kvantifikacija z uporabo interkelirajočega barvila SYBR Green I težavna zaradi kvantifikacije nespecifičnih produktov, smo preverili z metodo TaqMan (podčrtani geni v preglednici 5). Izražanje gena MT2a smo spremljali na oba načina. Pripravili smo ustrezen volumen reakcijske mešanice za posamezen gen, ki je zadoščala za vsak vzorec v petih paralelkah, vsak standard v triplikatu, slepe reakcijske mešanice v petih ponovitvah in 10 % prebitek zaradi izgub pri pipetiranju

Preglednica 4: Sestava 15 µL reakcijske mešanice za qPCR

SYBR Green I reakcijska mešanica	1x (µL)	TaqMan reakcijska mešanica	1x (µL)
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonija)	3	5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonija)	3
istosmerni OZ 500 nM	0.75	20X TaqMan Gene expression assay (Applied Biosystems)	0.75
protismerni OZ 500 nM	0.75	dH ₂ O	6.25
dH ₂ O	5,5	cDNA	5
cDNA	5		
SKUPAJ	15		15

Preglednica 5: Nukleotidna zaporedja OZ (oligonukleotidni začetnik) ter TaqMan Gene expression assay za (sub)jizoforme MT in referenčne gene (F- istosmerni, R- protismerni).

Simbol gena	Nukleotidno zaporedje OZ	Uporaba TaqMan Gene expression assay
MT1a	F: 5'-CTCGAAATGGACCCCAACT-3' R: 5'-ATATCTTCGAGCAGGGCTGTC-3'	
MT1x	F: 5'-TCTCCTTGCCTCGAAATGG-3' R: 5'-CACAGCTGTCCTGGCATCA-3'	
MT1f	F: 5'-AGTCTCTCCTCGGCTTGC-3' R: 5'-ACATCTGGGAGAAAGGTTGTC-3'	
MT1e	F: 5'-GCCCGACCTCCGTCTATAAAT-3' R: 5'-CACTCACTCTTCTTGCAGGA-3'	
MT2a	F: 5'-TGCAACCTGTCCCGACTCTA-3' R: 5'-GGAAGTCGCGTTCTTTACATCT-3'	Hs01591333_g1
<u>MT3</u>	F: 5'-TTCTGGTGGCTCCTGCAC-3' R: 5'-ACCTGGCACTATCTCCACG-3'	Hs00359394_g1
MT1g	F: 5'-CTTCTCGCTTGGGAACTCTA-3' R: 5'-TACAATCTTGACCCCTTTGCT-3'	Hs02578922_gH
MT1h	F: 5'-CACCTCGGCTTGCAATGG-3' R: 5'-CTACAACCTCCGACTCATTGTC-3'	Hs00823168_g1
MT1b	F: 5'-GCTTGTCTTGGCTCCAAATGG-3' R: 5'-CCTGACCGGTTTGCTACATTC-3'	Hs00952592_g1
MT4	F: 5'-TGTGTCTGCATGTCTGGAGGAAT-3' R: 5'-GAAAGCCATCCATCGTGCC-3'	Hs04189568_m1
<u>Gapdh</u>	F: 5'-CTCTGATTTGGTCGGTATTGGGC-3' R: 5'-ACTCCACGACGTACTIONCAGC-3'	Hs02758991_g1
<u>Actb</u>	F: 5'-GCGAGAAAGATGACCCAGATC-3' R: 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'	Hs99999903_m1
<u>Rplp0</u>	F: 5'-TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT-3' R: 5'-CAATCTGCAGACAGACACTGG-3'	

3.4.6.4 Pogoji qPCR reakcije

V preglednici 6 so prikazani pogoji qPCR reakcije za kvantifikacijo cDNA z metodo hidrolizirajočih sond TaqMan Gene expression assay in v preglednici 7 z metodo interkelirajočega barvila SYBR Green I.

Preglednica 6: Program na aparatu Light Cycler 480 za qPCR z metodo TaqMan

korak	temperatura (°C)	čas (s)	št. ciklov
začetna denaturacija	95	900	1
denaturacija	95	30	40
naleganje OZ + podaljševanje	60	60	
ohlajanje	4	30	1

Preglednica 7: Program na aparatu Light Cycler 480 za qPCR z metodo SYBR Green I

korak	temperatura (°C)	čas (s)	št. ciklov
začetna denaturacija	95	900	1
denaturacija	95	15	45
naleganje OZ	61	20	
podaljševanje	72	20	
disociacijska krivulja	95	5	1
	65	60	
	97	∞ (5°C/s)	
ohlajanje	4	30	1

3.4.6.5 Analiza rezultatov reakcije qPCR

Podatke reakcij qPCR smo analizirali s programom LightCycler[®] 480 Software 1.5 (Roche Applied Science, ZDA). Iz naklona standardne krivulje (Cp v odvisnosti od logaritmskih vrednosti koncentracije standardov) smo preverili učinkovitost reakcije. Učinkovitost reakcije je 100 %, kadar je naklon krivulje -3.32 , kar pomeni, da se v eksponentni fazi PCR reakcije tarčno zaporedje v vsakem ciklu podvoji. Reakcija bi naj imela učinkovitost med 90 in 110 %, kar sovпада z naklonom standardne krivulje v območju -3.60 in -3.10 (<http://www.genetargetsolutions.com>).

V primeru analize genov z interkelirajočim barvilom SybrGreen I smo najprej izključili paralelke v seriji petih paralelk, ki so glede na disociacijsko krivuljo predstavljale nespecifične rezultate. Z metodo maksimuma drugega odvoda (angl. 2nd derivative maximum, Roche Applied Science, ZDA) smo določili Cp vsakega vzorca in s primerjavo s standardno krivuljo izračunali njegovo koncentracijo (relativna kvantifikacija). Preverili smo natančnost v skupini petih paralelk vzorca in pri vzorcih, kjer je bila standardna deviacija (sd) med paralelkami višja od 0.5, izločili tiste paralelke, ki so najbolj odstopale.

3.4.6.6 Statistična analiza podatkov

Statistično analizo normaliziranih (na vrednosti ref. genov *Rplp0* in *Actb*) podatkov smo izvedli v programu Excel, s Studentovim t-testom, ki nam poda p vrednost. Kot statistično značilne razlike smo označili tiste, ki so imele vrednost $p < 0.05$. Razpršenost podatkov okoli osrednje vrednosti smo prikazali z uporabo standardne deviacije (SD).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 ARZEN V RIBAH

4.1.1 Celokupni As v jetrih in mišicah skatov

Z metodo ICP-MS smo v vzorcih mišic in jeter preiskovanih osebkov vrst iz reda skatov določili koncentracijo celokupnega As. Koncentracije celokupnega As so skupaj z izmerjenimi biometričnimi podatki preiskovanih osebkov prikazane v preglednici 8.

Preglednica 8: Osnovni biometrični podatki (velikost, teža in spol) skupaj s celokupno koncentracijo As v suhem tkivu posameznih osebkov vrst *P. bovinus* (PB), *M. Aquila* (MA) in *P. violacea* (PV)

vrsta/ Max. DW*	oznaka vzorca	DW* (cm)	DL** (cm)	TL# (cm)	W## (kg)	spol	As (jetra, $\mu\text{g g}^{-1}$)	As (mišice, $\mu\text{g g}^{-1}$)
<i>P. bovinus</i> (max. 222 cm)	029PB	52.8	30.2	87.5	1.50	m	9.1	36.3
	034PB	73.5	43.5	121.0	5.28	m	13.2	65.9
	052PB	113.5	71.5	194.0	21	m	18.7	92.3
	053PB	163.0	108.0	196.0	74	ž	30.2	205
	054PB	188.5	118.0	224.0	110	ž	34.6	222
	055PB	156.9	108.2	169.0	68	ž	44.8	225
	056PB	154.0	108.0	250.0	57	ž	35.3	148
	057PB	191.0	132.0	294.0	116	ž	53.4	362
	058PB	222.0	115.5	267.0	88	ž	30.6	222
	060PB	53.5	12.4	87.9	1.88	m	12.2	107
	062PB	57.1	33.5	86.0	2.52	m	11.3	58.7
	063PB	75.0	39.5	126.1	5.28	ž	9.4	59.2
	064PB	77.5	41.1	125.6	6.20	m	10.5	
	066PB	171.0	112.5	263.0	84	ž	28.7	180
	067PB	159.0	110.0	266.0	68	ž	63.5	233
MIN		52.8	12.4	86.0	1.5		9.1	36.2
MAX		222.0	132.0	294.0	116		63.5	362
<i>M. aquila</i> (cca. 150 cm)	023MA							51.4
	025MA	38.0	22.5	67.0	0.98	ž	19.9	69.8
	028MA	34.5	21.2	64.0	0.62	m	21.3	
	035MA	27.7	16.0	52.5	0.30	m		32.4
	044MA	27.3	14.5	49.5	0.26	m		47.1
	061MA	27.5	14.2	52.5	0.32	m		36.5
MIN		27.3	14.2	52.5	0.26		19.9	32.4
MAX		38.0	22.5	67.0	0.98		21.3	69.8
<i>P. violacea</i> (cca. 60 cm)	006PV	60.0	54.9	139.2	7.56	ž	26.3	90.4
	007PV	56.2	42.0	137.5	5.44	ž	34.8	48.3
	010PV	55.0	42.5	129.0	5.22	ž	40.7	82.4
	038PV	54.1	39.3	128.1	5.48	ž	17.3	141
	039PV	44.5	34.0	107.0	2.64	m	23.8	37.4
	049PV	52.1	40.0	77.6	3.74	m	35.4	64.7
	050PV	58.8	45.0	126.2	6.12	ž	34.4	97.3
	051PV	43.7	35.4	101.0	2.40	m	40.4	44.0
	MIN		44.5	34.0	77.6	2.40		17.3
MAX		60.0	54.9	139.2	7.56		40.4	141

*DW širina diska **DL dolžina diska #TL celotna dolžina ##W teža; mla - mladiči

Iz preglednice 8 je razvidno, da so celokupne koncentracije As v primeru tkiva jeter v območju od 9.1 do 63.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže in v primeru mišic v območju od 32.4 do 362 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže. V preglednici 9 so podane tudi povprečne vrednosti celokupne koncentracije arzena v tkivu jeter in mišic za posamezno vrsto skata.

Ob primerjavi koncentracij arzena v tkivu mišic in jeter znotraj iste vrste opazimo, da tkiva mišic pri vseh treh vrstah skatov vsebujejo večjo koncentracijo As kakor tkiva jeter. Razlika je najbolj očitna pri vrsti *P. bovinus*, kjer je koncentracija As v mišicah za faktor 5.75 ± 1.43 večja kakor v jetrih. V primeru drugih dveh vrst pa je razmerje koncentracij mišice/jetra manjše (preglednica 9).

Razvidno je tudi to, da odrasli osebki bentoške vrste *P. bovinus* vsebujejo veliko večje koncentracije As v mišicah kot pelaška vrsta *P. violacea*, v primeru koncentracij As v jetrih pa med pelaškimi in bentoškimi odraslimi osebki med vrstami ni večjih razlik.

Večina raziskav akumulacije arzena pri hrustančnicah je bila narejena na morskih psih, za skate obstaja malo podatkov, za primerke naših vrst pa podatkov v literaturi nismo našli. Zasedili smo tri raziskave podobne naši (podatki so vključeni v preglednico 9): Gutierrez-Mejia in sod. (2009) so obravnavali 35 osebkov skata vrste *Rhinoptera steindachneri* iz Kalifornije (Upper Gulf of California), De Gieter in sod. (2002) so študirali vrsto skata *Raja clavata* iz Anglije (English and Bristol Channel) ter Essumang (2009) vrsto *Manta birostris* iz Gane. Gre za dve bentoški in eno pelaško vrsto.

Preglednica 9: Povprečna koncentracija As (\pm standardna deviacija, n= število vzorcev, podano na suho snov) v tkivu jeter in mišic osebkov določene vrste skata iz naše raziskave (preglednica 8) in omenjenih raziskav iz literature

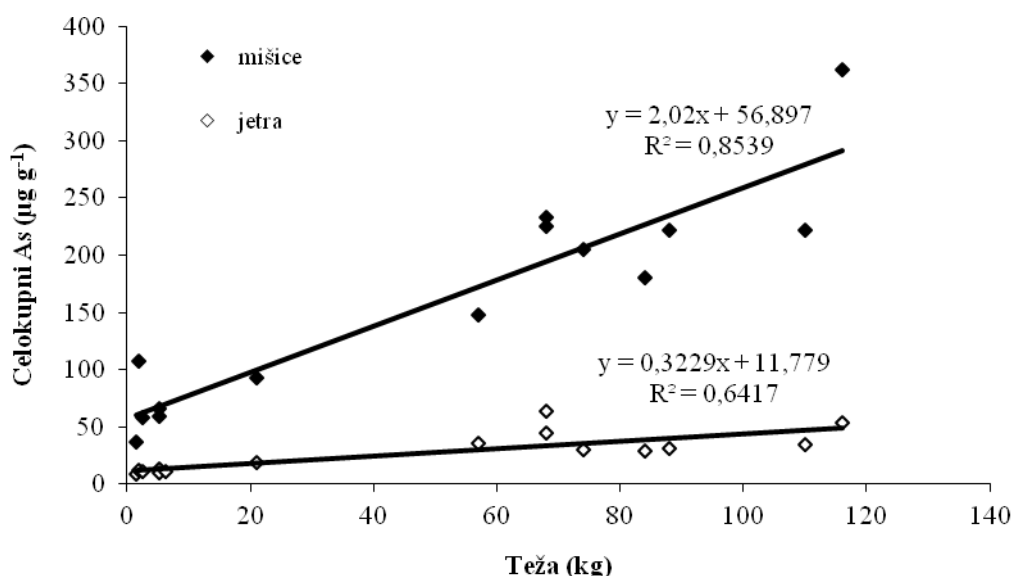
vrsta		Lokacija in tip ribe	jetra As ($\mu\text{g g}^{-1}$)	mišice As ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Razmerje mišice/jetra
<i>P. bovines</i>	naša študija	Tržaški zaliv bentoška	28.0 \pm 17.1 n=15	158 \pm 93 n=14	5.64 \pm 1.43 n=14
<i>M. aquila</i>	naša študija	Tržaški zaliv bentoška	20.6 n=2	47.4 \pm 14.7 n=5	3.50 n=1
<i>P. violacea</i>	naša študija	Tržaški zaliv pelaška	31.7 \pm 8.3 n=8	75.7 \pm 34.5 n=8	2.02 \pm 0.83 n=7*
<i>R. steindachneri</i>	Gutierrez-Mejia in sod., 2009	Zgornji zaliv Kalifornije bentoška	21.0-54.2 mladiči 27.2-101.8 odrasli	5.0-33.0 mladiči 15.1-99.2 odrasli	
<i>R. clavata</i>	De Gieter in sod., 2002	Angleško-bristolski kanal bentoška	cca 10-19** n=10	cca 27-157** n=10	
<i>M. birostris</i>	Essumang 2009	Gana pelaška	= cca 0.4-0.5**	cca 0.7-2.6 **	

*En osebek izključen, pri njem razmerje mišice/jetra=8.15, ** koncentracije preračunane na suho težo z uporabo lastnih podatkov o vsebnosti vode v tkivih, ki lahko variira

Če primerjamo njihove rezultate z rezultati naše raziskave, so podatki za vrsti *M. aquila* in *P. violacea* primerljivi s podatki raziskave De Gieter in sod. (2002) za vrsto *R. clavata*, tako v njihovi kot v naši študiji mišice vsebujejo bistveno več As kot jetra. Za bentoške skate *R. steindachneri* takih razlik niso našli (Gutierrez-Mejia in sod., 2009), pelaška vrsta *M. birostris* (Essumang, 2009) pa vsebuje neprimerljivo nižje koncentracije As. *P. bovines* iz naše raziskave doseže zelo visoke koncentracije celokupnega As, ki so mnogo višje od ostalih študij. Sklepamo lahko, da bi to bila možna posledica nizke koncentracije fosfata v morski vodi (Degobbis in sod., 2005), ki bi lahko imela za posledico boljšo absorpcijo arzenata (kemijsko obnašanje podobno fosfatu) skozi prehranjevalno verigo, kar se posledično kaže v visoki celokupni koncentraciji As v morskih organizmih na vrhu prehranjevalne verige.

S pomočjo programa Microsoft Excel smo ocenili korelacijo med biometričnimi podatki rib, ki lahko predstavljajo njihovo starost (podani v preglednici 8), in celokupno koncentracijo As v jetrih in mišicah. Najboljša je bila korelacija (najvišja R^2 vrednost) s težo ribe pri vrsti *P. bovines*, in sicer je za mišice vrednost $R^2 = 0.8539$ in za jetra $R^2 = 0.6417$ (slika 12), kar kaže na akumulacijo arzena v obeh tkivih te vrste, preiskovana skupina vrste *P. bovines* je bila številna in po velikosti oz. starosti

zelo raznolika.. V primeru vrste *P. violacea* je bila korelacija med celotno koncentracijo As in biometričnimi podatki slabša, razlog je manjše število osebkov preiskovane skupine ter premajhna razlika v velikosti in teži posameznih osebkov vrste.



Slika 12: Korelacija med celokupno koncentracijo As in težo skata vrste *P.bovinus*

4.1.2 Določitev posameznih oblik As v jetrih in mišicah

Pred samo specijacijo As v vzorcih jeter in mišic je bila potrebna ekstrakcija As spojin. Iz trdnih tkiv je ekstrakcija analita pogosto zelo težavna, zato je proceduro potrebno optimizirati glede na vrsto vzorca. Večina As v bioloških tkivih je topnega v vodi in je v splošnem lahko ekstrahiran s samo vodo ali pogosteje mešanico metanola in vode (tkivo mišic). Pri tkivih z visoko vsebnostjo maščob (tkivo jeter) je ob metanolno/vodni ekstrakciji arzena potrebno odstraniti maščobe (in v njih topen delež As) s topili, kot sta eter ali aceton. Učinkovitost ekstrakcije je odvisna od tkiva, iz

katerega hočemo analit ekstrahirati in jo lahko povečamo z uporabo tehnik, kot so segrevanje, stresanje in sonifikacija. Za tkiva rib je značilno, da je učinkovitost ekstrakcije v splošnem 90–100 % (McSheehy in sod., 2003). V primeru tkiva jeter smo, zaradi aglutinacije homogeniziranega tkiva, povečali učinkovitost ekstrakcije s povišanjem začetne temperature stresanja na 50 °C. Pri tem smo na podlagi prejšnjih raziskav (Van Elteren in sod., 1997) in podatkov o termični stabilnosti As spojin (Goessler in sod., 2003) predvidevali, da povišana temperatura ne bo povzročila degradacije As spojin.

Rezultati speciacije As v ekstraktih mišic in jeter z uporabo metode HPLC-UV-HGAFS so prikazani v preglednici 10 (tkivo jeter) in preglednici 11 (tkivo mišic).

Preglednica 10: Speciacija arzena v jetrih preiskovanih skatov ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže \pm sd, n=4)

vrsta ribe	oznaka vzorca	As _{total} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	vsota vseh oblik As (%)	As(III) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	As(V) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	AsB ($\mu\text{g g}^{-1}$)	DMA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ekstrakcija z etrom* ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
<i>P. bovinus</i>	029PB	9.1	40.6	0.01 \pm 0.01		1.57 \pm 0.28	0.67 \pm 0.08	1.44	
	034PB	13.2	42.0	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.04	1.30 \pm 0.17	1.47 \pm 0.14	2.73	
	052PB	18.7	73.3	0.02 \pm 0.00		6.75 \pm 1.48	1.30 \pm 0.13	5.64	
	053PB	30.2	50.2	0.02 \pm 0.00	0.06 \pm 0.03	9.94 \pm 0.76	1.79 \pm 0.20	3.35	
	054PB	34.6	64.6	0.04 \pm 0.01		15.2 \pm 2.8	1.33 \pm 0.16	5.77	
	055PB	44.8	52.2	0.05 \pm 0.01		12.0 \pm 2.7	1.60 \pm 0.16	9.76	
	056PB	35.3	60.5	0.04 \pm 0.01	0.16 \pm 0.08	17.2 \pm 2.0	1.35 \pm 0.15	2.60	
	057PB	53.4	69.2	0.04 \pm 0.00		25.8 \pm 0.3	2.22 \pm 0.25	8.91	
	058PB	30.6	63.7	0.03 \pm 0.01		11.0 \pm 1.4	2.03 \pm 0.34	6.44	
	060PB	12.2	44.4	0.01 \pm 0.01		2.13 \pm 0.14	0.89 \pm 0.22	2.39	
	062PB	11.3	48.1	0.01 \pm 0.01		1.58 \pm 0.34	0.76 \pm 0.02	3.09	
	063PB	9.4	45.5	0.02 \pm 0.01		1.41 \pm 0.20	0.84 \pm 0.16	2.01	
	064PB	10.5	47.1	0.03 \pm 0.01		1.83 \pm 0.16	1.27 \pm 0.09	1.82	
	066PB	28.7	69.0	0.03 \pm 0.02	0.45 \pm 0.40	12.4 \pm 2.0	2.60 \pm 0.22	4.33	
067PB	63.5	70.9	0.05 \pm 0.01		31.5 \pm 3.3	2.06 \pm 0.23	11.4		
	MIN	9.1	40.6	0.01		1.30	0.67	1.44	
	MAX	63.5	70.9	0.05		31.5	2.60	11.4	
<i>M. aquila</i>	023MA								
	025MA	19.9	46.9			3.13 \pm 1.05	0.87 \pm 0.11	5.33	
	028MA	21.3	43.7			4.36 \pm 0.37	1.35 \pm 0.07	3.60	
	035MA								
	044MA								
	061MA								
<i>P. violacea</i>	006PV	26.3	65.4			9.91 \pm 1.84	1.52 \pm 0.19	5.78	
	007PV	34.8	61.2			9.06 \pm 0.39	3.09 \pm 0.13	9.15	
	010PV	40.7	69.4	0.01 \pm 0.01		17.5 \pm 1.9	2.64 \pm 0.26	8.09	
	038PV	17.3	79.1			6.10 \pm 0.55	1.20 \pm 0.17	6.38	
	039PV	23.8	67.5			3.79 \pm 0.96	1.75 \pm 0.18	10.5	
	049PV	35.4	77.1	0.01 \pm 0.01		14.8 \pm 0.6	2.02 \pm 0.19	10.5	
	050PV	34.4	69.8	0.01 \pm 0.02		13.6 \pm 1.1	2.55 \pm 0.38	7.84	
	051PV	40.4	47.6			10.4 \pm 1.0	1.97 \pm 0.1	6.86	
		MIN	17.3	47.6			3.79	1.2	5.78
		MAX	40.7	79.1			17.5	3.09	10.5

* Lipidna frakcija, nedoločeni arzenolipidi

Preglednica 11: Speciacija arzena v mišicah preiskovanih vrst skatov ($\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže \pm sd, n=4)

vrsta ribe	Oznaka vzorca	As _{total} ($\mu\text{g/g}$)	Vsota vseh oblik As(%)	As(III) ($\mu\text{g/g}$)	AsB ($\mu\text{g/g}$)
<i>P. bovinus</i>	029PB	36.3	84.5		30.7 \pm 3.7
	034PB	65.9	83.2		54.8 \pm 2.7
	052PB	92.3	81.1		74.9 \pm 9.8
	053PB	205	74.3	0.02	152 \pm 9.5
	054PB	222	85.5	0.02	190 \pm 40
	055PB	225	51.0	0.02	115 \pm 5
	056PB	148	75.0	0.02	111 \pm 2.0
	057PB	362	58.6	0.01	212 \pm 28
	058PB	222	73.7	0.02	164 \pm 17
	060PB	107	77.6		82.6 \pm 2.6
	062PB	57.8	72.4		41.9 \pm 5.8
	063PB	59.2	89.5		53.0 \pm 2.0
	064PB				
	066PB	180	67.5	0.02	122 \pm 6
	067PB	233	79.4	0.01	185 \pm 23
MIN	36.3	51.0	0.00	30.7	
MAX	362	89.5	0.02	212	
<i>M. aquila</i>	023MA	51.4	64.7		33.2 \pm 3.8
	025MA	69.8	49.6	0.02	34.6 \pm 3.4
	028MA				
	035MA	32.4	78.2		25.3 \pm 2.0
	044MA	47.1	59.0	0.01	27.8 \pm 0.7
	061MA	36.5	80.4		29.4 \pm 8.6
	MIN	32.4	49.6	0.00	25.3
MAX	69.8	80.4	0.02	34.6	
<i>P. violacea</i>	006PV	90.4	89.2	0.03	80.6 \pm 10.4
	007PV	48.3	64.0		30.9 \pm 0.3
	010PV	82.4	91.4		75.3 \pm 9.8
	038PV	141	77.3	0.03	109 \pm 10
	039PV	37.4	80.5	0.01	30.1 \pm 2.7
	049PV	64.7	60.4	0.01	39.1 \pm 3.9
	050PV	97.3	43.5	0.01	42.3 \pm 3.7
	051PV	44.0	75.9		33.4 \pm 1.2
	MIN	37.4	43.5	0.00	30.1
MAX	141	91.4	0.03	109	

S primerjavo vsote koncentracij vseh ekstrahiranih spojin in koncentracije celokupnega As (As_{total}) dobimo podatke o izkoristku oz. učinkovitosti ekstrakcije (vsota vseh oblik v %). Vsota koncentracij vseh ekstrahiranih As spojin je v povprečju predstavljala 62 \pm 13 % izmerjene celokupne koncentracije As v primeru jeter ter 81 \pm 14 % v primeru mišic. Manjša učinkovitost ekstrakcije As spojin iz tkiva jeter je bila

lahko posledica postopka ekstrakcije (prilagoditve ekstrakcije zaradi visoke vsebnosti maščob v tkivu) ali pa to nakazuje na prisotnost še ne identificirane As spojine/spojin, ki jih ni mogoče ekstrahirati z uporabljenimi metodami.

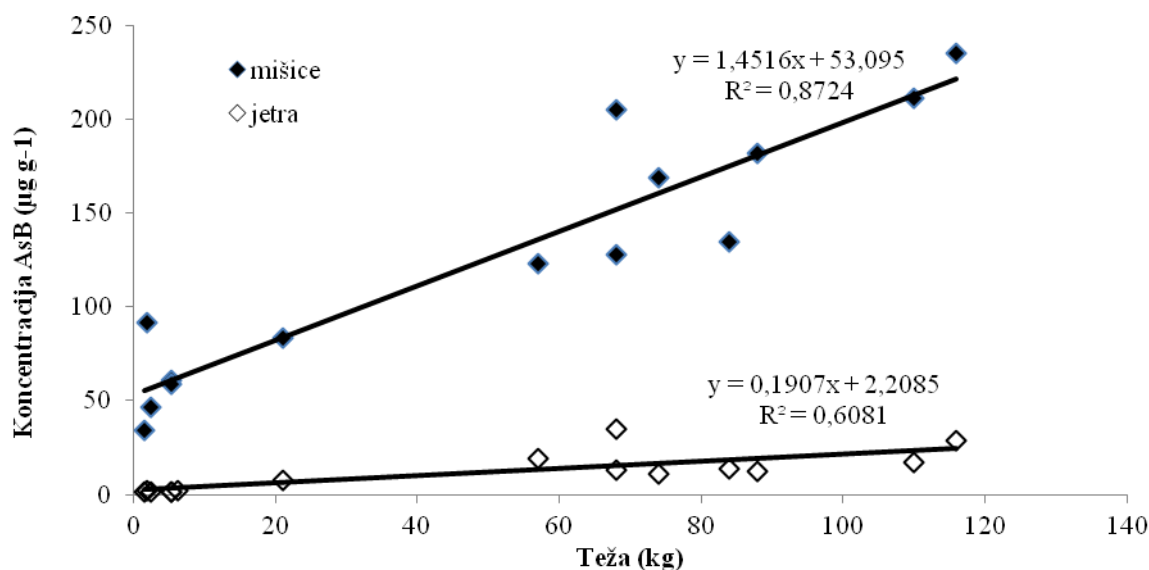
Speciacija As v ekstraktu jeter (preglednica 10) je pokazala, da jetra vsebujejo predvsem AsB, ki v povprečju predstavlja 59 % celotnega ekstrahiranega As. Sledila sta mu lipidna frakcija, produkt eterske ekstrakcije (posamezne spojine niso določene), ki je predstavljal v povprečju 32 % in DMA 9 % celotnega ekstrahiranega As. Anorganski arzen v obliki As(III) je predstavljal le 0.03 % celotnega ekstrahiranega As, oblika As(V) pa je bila zaznana v vzorcu jeter samo pri 4 osebkih (0.2–1.6 %). V literaturi nismo našli podatkov o speciaciji arzena v jetrih skatov, vendar pa obstajajo podobne študije za sorodne morske organizme v katerih so rezultati podobni našim. Referenčni material NRCC DOLT 3 tkiva jeter morskega psa vsebuje večinoma AsB (Hinojosa Reyes in sod., 2009), medtem ko so v študiji Hanaoka in sod. (2001) našli arzenolipide v jetrih in drugih tkivih morskega psa (*M. manazo*).

Rezultati speciacije As v ekstraktu mišic (preglednica 11) pa so pokazali drugačna razmerja spojin, in sicer AsB je v povprečju predstavljal skoraj 100 % celokupnega ekstrahiranega As, druga detektirana spojina je bil anorganski As(III), ki se je pojavil s povprečno koncentracijo $0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ (0.01 %). Podobni podatki obstajajo tudi za druge predatorske morske ribe npr. tuno (Le in sod., 1998). V študiji Storelli in sod., (2000) so v skatih vrste *Raja spp.* iz južnega Jadrana našli večinoma organske As spojine in zelo nizke koncentracije anorganskega As (0.5–3.5 %).

Rezultati potrjujejo našo hipotezo o prisotnosti AsB kot skoraj edini obliki arzena v mišicah ter prisotnost več različnih oblik arzena v jetrih. Jetra namreč predstavljajo osrednji organ metabolizma oz. detoksifikacije kovin ter drugih organizmu tujih snovi. Povezave med številom različnih As spojin v ribah z njihovim načinom prehranjevanja (Edmonds in Francesconi, 1987; Maher in sod., 1999; Kirby in Maher, 2002) nismo potrdili. Omenjene študije so namreč prišle do ugotovitve, da organizmi, ki se prehranjujejo z organizmi višje na prehranjevalni verigi (ribe kostnice) vsebujejo As večinoma v obliki AsB in malo DMA, organizmi, ki pa se prehranjujejo s hrano, kot so organski drobir v sedimentih in morska trava pa vsebujejo poleg AsB (ta je običajno prisoten še vedno v največji meri) tudi druge oblike As (areznit, arzenat,

TMAO, DMA in arzenosladkorje) (Kirby in Maher, 2002). Ugotovili pa smo, da vsebujeta bentoški vrsti *P. bovinus* in *Myliobatis aquila* v povprečju kar 18 krat več AsB v mišicah kot v jetrih (17.96 ± 12.34), pelaška vrsta pa le 6 krat več (6.33 ± 5.14)

Koncentracije AsB v mišicah in jetrih vseh treh vrst skatov smo primerjali s težo ribe in našli visoko korelacijo za mišice ($R^2=0.8475$), precej nižjo pa za jetra. Za posamezno vrsto *P. bovinus* (slika 13) sta bili korelaciji v obeh tkivih precej visoki (mišice $R^2= 0.8724$ in jetra $R^2= 0.6081$). Rezultati sovpadajo s tistimi s slike 12, saj AsB predstavlja največji delež celokupnega As tako v obeh tkivih. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da se AsB pri skatih bioakumulira s starostjo ribe. Enako so v študiji Gutierrez-Mejia in sod. (2009) ugotovili za vrsto skata *R. steindachneri*. Podobne raziskave pa so potekale tudi za druge organizme, in sicer Kubota in sod. (2001) na morskih sesalcih niso dokazali povezave med akumulacijo As in starostjo preiskovanih organizmov, obratno pa velja za študije organizmov, kot so kozice (Kennedy, 1976) in ribe (Bohn in McElroy 1976; Edmonds in Francesconi, 1981; Ashraf in Jaffar, 1988). Tako v študiji Kubota in sod. (2001) sklepajo, da je mogoče akumulacija As s starostjo organizma vrstno specifična.



Slika 13: Korelacija med koncentracijo AsB in težo vrste *P. bovinus*

Kot že omenjeno, pričakujemo v okoljih revnih s fosfatom, npr. severno Jadransko morje, zaradi kemijskih podobnosti večji privzem arzenata. Zaradi tega so lahko koncentracije celokupnega As po celotni prehranjevalni verigi povečane. Arzenat iz morske vode privzamejo alge, ki ga metabolizirajo v arzenosladorje, ki se nato prenesejo po prehranjevalni verigi in se pretvarjajo v druge oblike As (tudi AsB) (Francesconi in Edmonds, 1996). Izvor arzenobetaina, kot glavne oblike arzena v večini morskih živali (z izjemo večine alg), je v morskem okolju slabo poznan.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je glavna oblika As v vseh vzorcih AsB in da je njegova koncentracija največja v mišicah preiskovanih rib, kjer se akumulira po absorpciji iz hrane.

Akumulacija AsB je verjetno posledica strukturne podobnosti spojine z glicin betainom, glavnim ozmolitom pri morskih živalih. Rezultati raziskav Gailer in sod. (1995) in Fujihara in sod. (2003) so pokazali negativno korelacijo med koncentracijami AsB in glicin betaina v tkivih morskih živali. Povišane koncentracije glicin betaina kot primarnega osmolita v morski vodi namreč vodijo v zmanjšan privzem AsB. Pomemben dejavnik, ki vpliva na koncentracijo ozmolitov v morskih organizmih, je slanost, ki narašča z globino morja. Z večanjem slanosti morske vode se veča tudi koncentracija glicin betaina (Pierce in sod., 1992). Enako so za spojino AsB dokazali v študiji Larsen in Francesconi (2003), kjer se je koncentracija AsB v tkivih rib iz Severnega morja in Baltika povečevala s slanostjo. V naši raziskavi je delež AsB v tkivih mišic bentoških vrst večji kakor pri pelaških vrstah preiskovanih skatov (razmerje med mišicami in jetri 17.96 ± 12.34 za bentoške in 6.33 ± 5.14 za pelaške skate). Za bentoške vrste je namreč značilno, da živijo in se prehranjujejo z organizmi na dnu, ki vsebujejo več glicin betaina in AsB, pelaške vrste pa se zadržujejo bolj na površini in se prehranjujejo s prosto plavajočimi manjšimi ribami, ki vsebujejo manj glicin betaina in AsB. To sovpada tudi z ugotovitvijo razlike v celokupni koncentraciji As med morskimi organizmi s pelaškim in bentoškim načinom prehranjevanja (Penrose in sod., 1977). Na podlagi teh ugotovitev lahko sklepamo, da je akumulacija AsB v tkivih morskih organizmov povezana s funkcijo osmoregulacije in načinom prehranjevanja.

4.2 SPECIACIJA As V VZORCIH URINA LJUDI IZPOSTAVLJENIH As V HRANI, VODI IN INTRAVENSKO

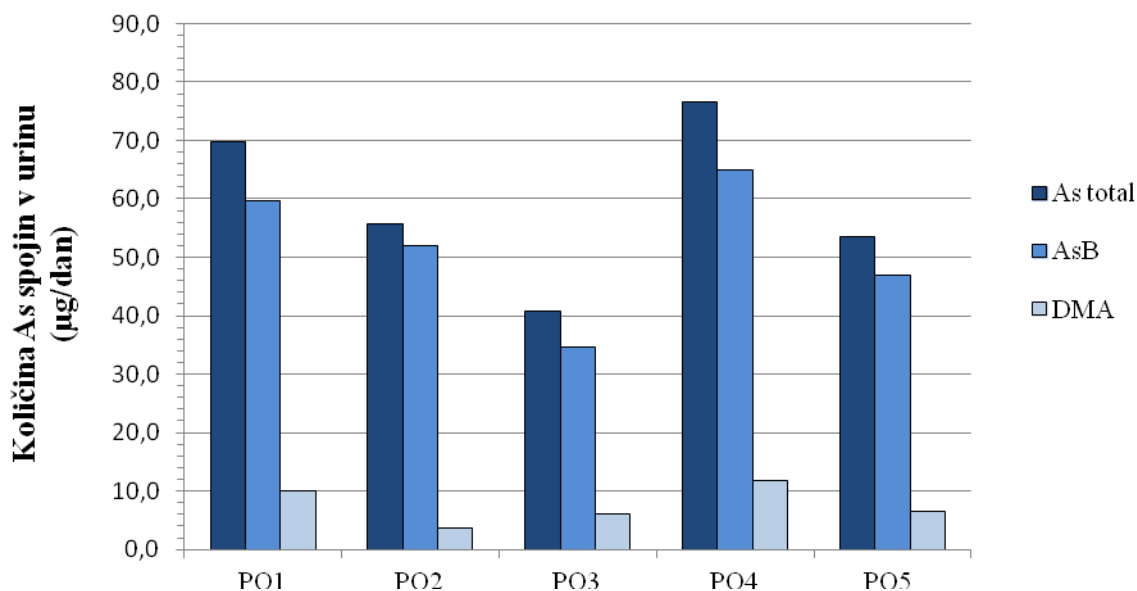
Ljudje smo As spojinam zelo pogosto izpostavljeni preko oralne poti. Glavna pot eliminacije zaužitega As iz človeka je preko urina, zato je analiza celokupnega As v urinu pomemben biomarker za ugotavljanje izpostavljenosti As, obstaja namreč zelo velika korelacija med koncentracijo As v urinu s tisto iz pitne vode (Hughes, 2006). V nalogi nas je zanimal metabolizem in izločanje As spojin z urinom pri človeku po oralnem zaužitju z As kontaminirane hrane in vode. Z metodo HPLC-UV-HG-AFS smo v urinu preiskovanih oseb spremljali izločanje posameznih As spojin po zaužitju ribe rumenoplavuti tun (*Tunnus albacares*) ter z As kontaminirane vode iz vrtine v Rogaški Slatini (koncentracija As $250 \mu\text{g L}^{-1}$). V obeh primerih gre za uporabo okoljskih vzorcev, v katerih je koncentracija As razmeroma nizka. Ker so bile (pričakovano) koncentracije nizke, smo enako analizo opravili še pri bolnici z akutno promielocitno levkemijo (APL), ki je As prejemale intravenozno v zelo visokih koncentracijah ($0.15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dan}^{-1}$).

4.2.1 Primerjava speciacije As v urinu preiskovanih oseb po zaužitju ribe (organski As) in kontaminirane vode (anorganski As)

- Speciacija As po zaužitju ribe rumenoplavuti tun

Pet prostovoljcev je pojedlo enako količino pripravljene ribe (250 g), pri čemer smo se prepričali, da osebe vsaj en teden pred poskusom niso zaužile nobenih rib. V vzorcu kupljene ribe (Ljubljanska tržnica) smo izmerili koncentracijo celokupnega As, ki pa je bila nizka (območje $\mu\text{g g}^{-1}$). Šele naknadno (ko nismo imeli več vzorca) smo ugotovili, da je bila izmerjena koncentracija napačna zaradi napake v on-line razkroju vzorca. Kljub temu smo pravilno predvideli, da bo ob zaužitju večje količine ribe v urinu preiskovanih oseb mogoča speciacija As. Glede na neobjavljene podatke iz našega laboratorija (Šlejkovec in Ruelas, 2009) so koncentracije As v prosto živečih tunah v območju nekaj $\mu\text{g g}^{-1}$, podoben je tudi referenčni material Tunafish BCR[®]-627, 4.8 mg kg^{-1} suhe teže (IRMM angl. Institute for Reference Materials and Measurements, 2007) Na sliki 14 so prikazani rezultati identifikacije As spojin, ki so

se v 24 urah po zaužitju ribe izločile z urinom. Edini spojini, ki smo ju zaznali, sta bili AsB in DMA.



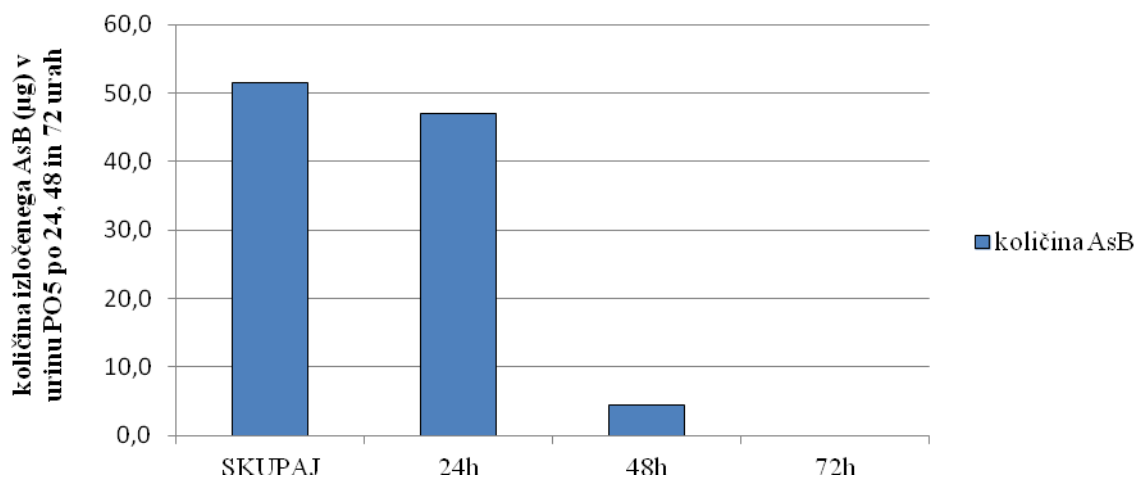
Slika 14: Količina totalnega As, AsB in DMA (μg), ki so se izločile z urinom v 24 urah po zaužitju ribe pri petih preiskovanih osebah (PO1.PO5)

Prejšnje raziskave speciacije As v mišicah rib (Maher in sod., 1999; Kirby in sod., 2002; Šlejkovec in Ruelas, 2009) dokazujejo, da je As v mišicah skoraj v celoti prisoten v obliki AsB in nizkih koncentracijah DMA, anorganskega As pa v mišicah rib v večini primerov niso našli. Tudi rezultati naše raziskave (poglavje 4.1.2) potrjujejo, da je AsB glavna spojina v mišicah rib.

Študije metabolizma in izločanja različnih As spojin pri ljudeh pa so pokazale, da se skoraj celoten zaužit AsB v kemijsko nespremenjeni obliki izloči iz telesa z urinom (Francesconi, 2010), enako velja za DMA (Mandal in sod., 2002). V študiji Lehmann in sod. (2001) so dokazali tudi prisotnost AsB v krvi preiskovancev po zaužitju rib, vendar v veliko nižjih koncentracijah kot v urinu. V naši raziskavi zaradi zelo nizkih koncentracij As v vzorcu ribe nismo določali koncentracije AsB v krvi preiskovancev.

Glede na to, da so preiskovane osebe zaužile mišice ribe in s tem AsB v prevladujoči obliki, naši rezultati sovpadajo z ugotovitvami omenjene študije, saj smo v vzorcih urina zaznali v največji koncentraciji spojino AsB ter v nižji koncentraciji tudi DMA, medtem ko anorganskega As nismo identificirali.

Pri enem izmed prostovoljcev smo izločanje arzena z urinom spremljali 72 ur. Za spojino AsB je značilno, da se ga 70 % izloči že v 2–3 dneh. Pri prostovoljki smo ugotovili, da se v prvih 24 urah izloči 91 % od vsega izločenega AsB, ostalo pa drugi dan, v vzorcu urina po 72 urah pa AsB nismo zaznali (slika 15). Tako hitro izločanje arzena v obliki AsB je normalno, delno pa je verjetno tudi posledica zelo nizke koncentracije As v ribi, ki jo je prostovoljka zaužila (AsB je prisoten v koncentracijah nižjih od meje detekcije).



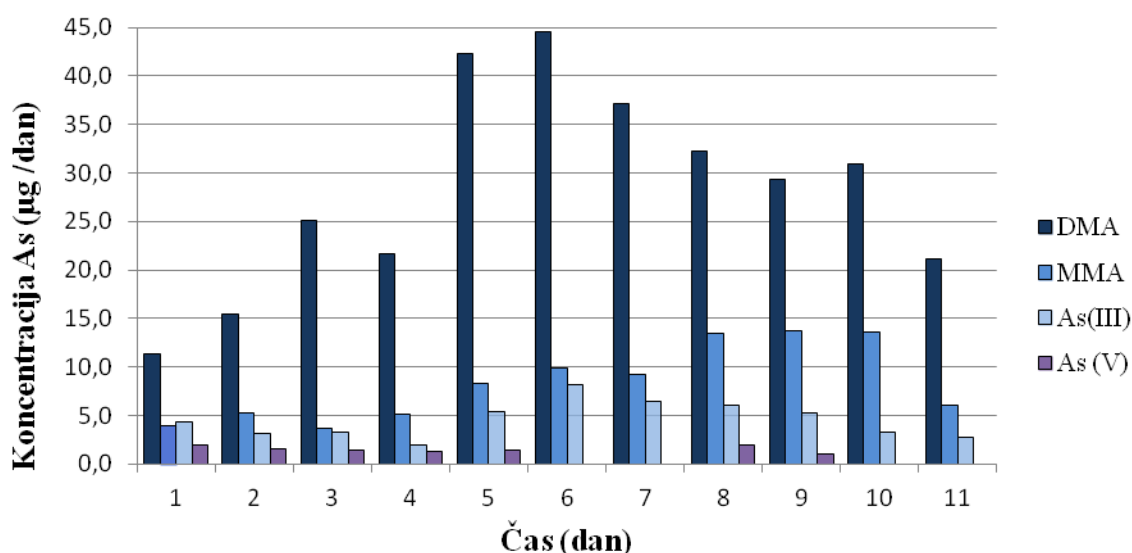
Slika 15: Količina izločenega AsB v urinu prostovoljca po 24, 48 in 72 urah po zaužitju ribe

Na podlagi ugotovitev o nestrupenosti AsB in njegovem hitrem izločanju v kemijsko nespremenjeni obliki z urinom lahko sklepamo, da uživanje rib na vrhu prehranjevalne verige ne predstavlja nevarnosti za zdravje ljudi.

- Speciacija As po zaužitju kontaminirane vode

V nasprotju z morskno hrano (ribe), kjer je As večinoma v organski obliki (AsB, arzenosladkorji, DMA), smo v primeru kontaminirane vode izpostavljeni predvsem anorganskim oblikam As (As(III) in As(V)). Za anorganske oblike As je v nasprotju z AsB značilno, da so po zaužitju v človeku podvrženi metabolizmu.

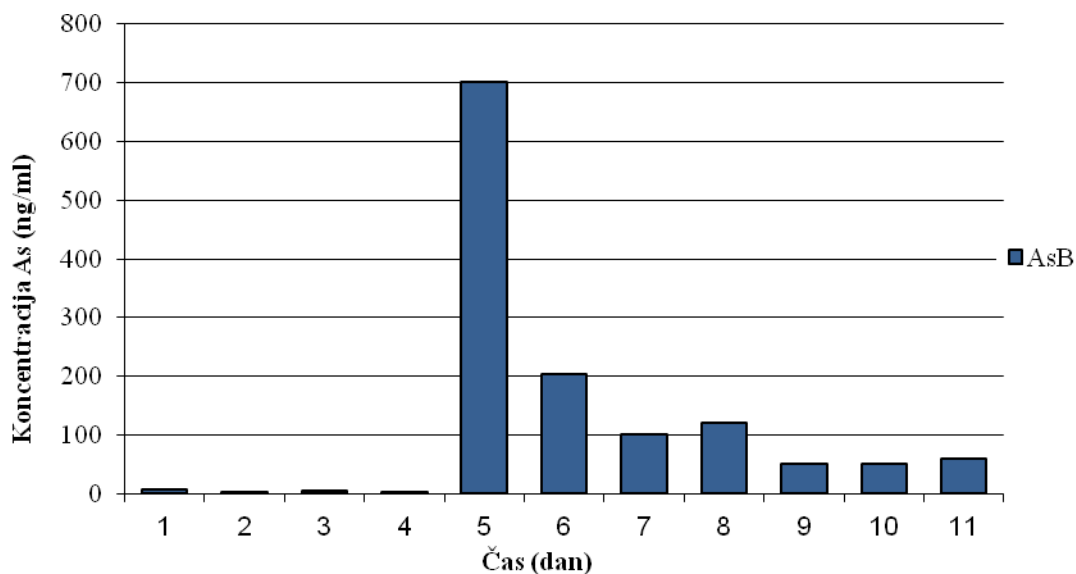
Prostovoljec je 8 dni zapored zaužil 0.5 L neprečiščene vode iz vrtine Rogaška Slatina, v kateri smo izmerili koncentracijo As $258 \pm 16 \mu\text{g L}^{-1}$. Več kot 90 % As je bilo v obliki As(III), ostalo pa v obliki As(V). Prostovoljec je torej vsak dan zaužil $129 \pm 4 \mu\text{g}$ arzena. Izločanje As metabolitov v urinu smo spremljali 11 dni, torej še 3 dni po zadnjem zaužitju vode. Rezultati speciacije As v urinu za vsak posamezen dan so prikazani na sliki 16.



Slika 16: Anorganski arzen in njegovi metaboliti v 24 urnem urinu pri eni osebi med in po pitju vode, kontaminirane z anorganskim As(III)

Iz naših rezultatov je razvidno, da so se vsak dan v urinu pojavili štiri As metaboliti, in sicer v prvih štirih dneh glede na koncentracije (povprečje prvih 4 dni): $\text{DMA} \gg \text{anorganski As (As(III))} > \text{As(V)} > \text{MMA}$, po petem dnevu pa je koncentracija MMA večja od vsote anorganskega As in prav tako se močno poveča koncentracija DMA. Z dodatnimi analizami smo ugotovili, da je vzrok za povečanje koncentracije DMA (in

celokupnega As) v urinu odgovorna morska hrana (sardele), ki jo je prostovoljec zaužil peti in šesti dan poskusa. V morski hrani je arzens prisoten v obliki AsB, ki se nespremenjen izloča z urinom, prisotnih pa je lahko tudi nekaj drugih arzenovih spojin. Tako smo od petega dne naprej v urinu našli tudi visoke koncentracije AsB, kar je prikazano na sliki 17.



Slika 17: Koncentracije AsB v urinu prostovoljca

Metabolizem anorganskega As (slika 2) je pri ljudeh najboljše razviden iz rezultatov speciacije As v urinu prostovoljca od prvega do četrtega dneva, ko se koncentracija DMA počasi viša (slika 16), pa tudi od 8 do 11 dneva, ko prostovoljec ni več užival vira anorganskega As (vode). Tako se koncentracija izločenega As(III) vsak dan zmanjšuje, počasi pa se zmanjša tudi koncentracija ostalih metabolitov As.

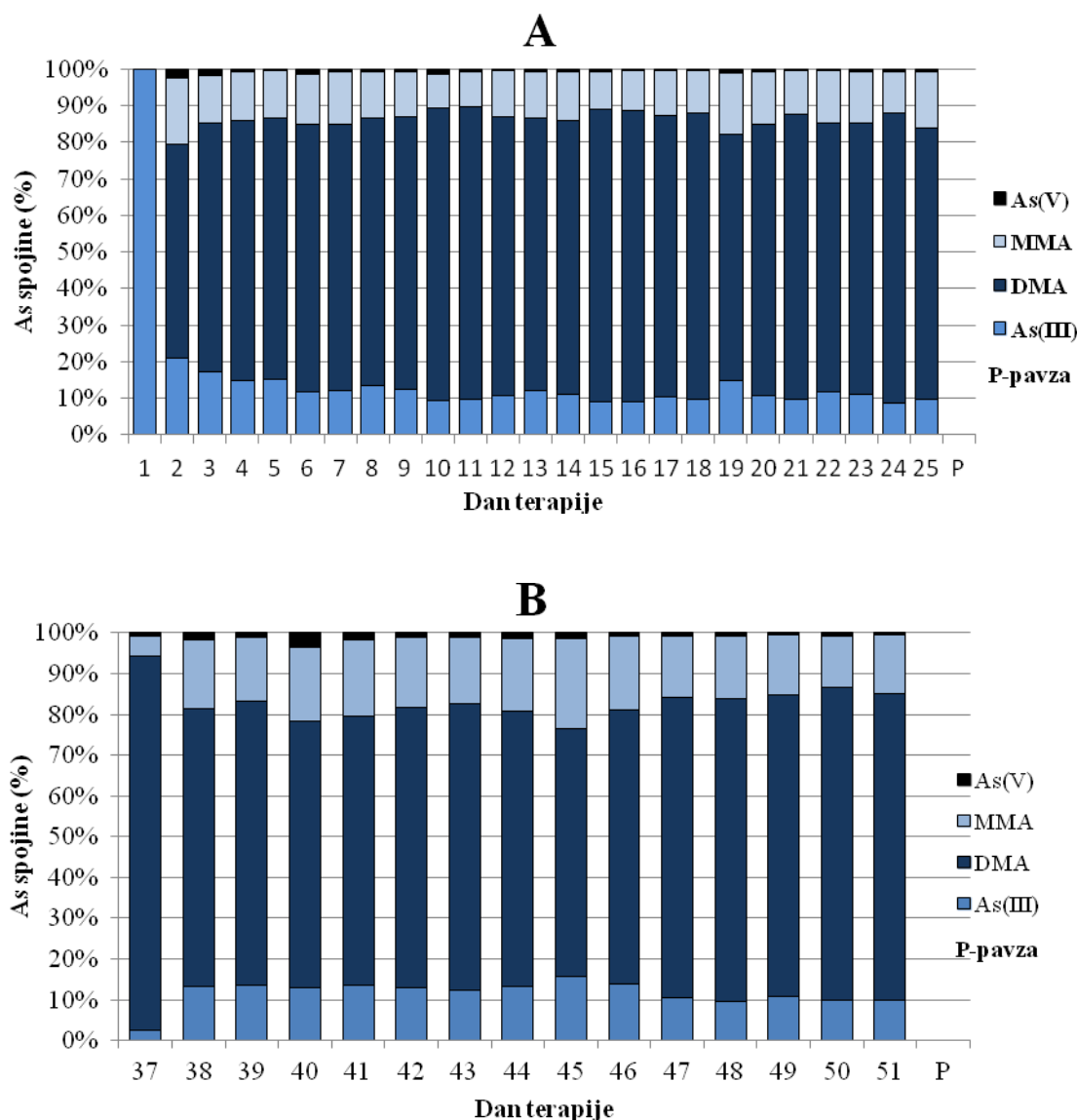
Glede na raziskave povprečen človeški urin po kontaminaciji z As iz pitne vode vsebuje 10–20 % MMA, 10–30 % anorganskega As in 60–80 % DMA (Vahter in Concha, 2001). Če upoštevamo koncentracije metabolitov v urinu preiskovanca prvih 4 dni poskusa, ko še ni bilo vpliva As iz morske hrane na koncentracije organskih metabolitov v urinu, potrdimo ugotovitve omenjene študije, in sicer so bili deleži metabolitov v urinu sledeči: MMA 11.4–18.5 %, anorganski As 10.7–29.2 % ter DMA 52.3–74.2 %.

Izločanje As metabolitov se uravnovesi okrog 5 dneva, po 8 dnevih pa zaradi prenehanja pitja vode koncentracije padajo. Če bi bila oseba še dalje izpostavljena enakim koncentracijam anorganskega As, bi se uravnovešeno stanje verjetno nadaljevalo in podobna slika bi bila verjetno tudi ob kronični izpostavitvi anorganskemu As.

Podobne analize urina po izpostavljenosti z anorganskim As kontaminirane vode so izvedli tudi pri prebivalcih Bangladeša (Gamble in sod., 2005; Hata in sod., 2012; Nizam in sod., 2013), kjer so koncentracije As v pitni vodi veliko večje od dovoljenih $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 2001), in sicer vse do $860 \mu\text{g L}^{-1}$ (van Geen in sod., 2002). V študiji Hata in sod. (2012) so opravili speciacijo As v urinu preiskovanih oseb na območju Bangladeša, kjer so prebivalci dnevno izpostavljeni koncentracijam arzena $0.5\text{--}332 \mu\text{g L}^{-1}$ (povprečje $55 \mu\text{g L}^{-1}$) preko pitne vode. Speciacija As v urinu je pokazala prisotnost enakih metabolitov kot v naši študiji. Prav tako so izpostavili, da je kot biomarker za izpostavljenost anorganskemu As v pitni vodi najbolje uporabiti količino anorganskega As in MMA v urinu, saj je prisotnost DMA v urinu lahko tudi posledica zaužitja morske hrane.

4.2.2 Speciacija As v urinu bolnice z akutno promielocitno levkemijo (APL) zdravljene z As_2O_3

Bolnica z akutno promielocitno levkemijo (APL) je 50 dni z dvema premoroma intravenozno prejela dnevni odmerek arzena, $0.15 \text{ mg kg}^{-1} \text{As}_2\text{O}_3$. Prvih 25 dni smo vzorčili jutranji urin pred vsakodnevno infuzijo arzena. V vzorcih urina smo z metodo HPLC-HG-AFS določali količino in vrsto arzenovih metabolitov. Rezultati speciacije urina odvzetega pred vsakodnevno infuzijo tekom prvih petindvajsetih dni (A) ter 15 dni po prvi pavzi (B) so prikazani na sliki 18. Podani so procenti metabolitov glede na celokupno vrednost arzena, ki je bila med 1.5 in $4628.5 \text{ ng mL}^{-1}$ oz. med 0.2 in 520.1 ng mM^{-1} na kreatin



Slika 18: Delež posameznih metabolitov arzena v jutranjih urinah pacientke prvih 25 dni (A) ter 15 dni po prvi pavzi (B) terapije z As_2O_3

V urinu bolnice smo identificirali vse metabolite, značilne za izpostavitve anorganskemu As, kar sovpada z rezultati preiskovane osebe izpostavljenega kontaminirani vodi. Prav tako z rezultati omenjene preiskovane osebe sovpada tudi delež posameznih metabolitov v jutranjem urinu, in sicer je bil pri bolnici delež anorganskega As 9.4–23 %, MMA 9.2–18.3 % ter DMA 58.4–80 %, pri kontaminirani vodi izpostavljeni osebi pa MMA 11.4–18.5 %, anorganski As 10.7–29.2 % ter DMA 52.3–74.2 %.

Deleži posameznih spojin se pri pacientki okoli 4 dneva uravnesijo podobno kot pri preiskovani osebi po pitju vode.

Številne študije potrjujejo možne razlike v metabolizmu As med populacijami in tudi posamezniki (Engström-Schläwicke in sod., 2007; Concha in sod., 2002; Vahter, 2002, ...). Obstajajo namreč številni dejavniki, ki vplivajo na sposobnost indukcije encimov vpletenih v metabolizem anorganskega As (genski polimorfizem encima, starost, bolezenska stanja, itd.). Pri bolnici je bil proces metilacije As(III) presenetljivo dober, saj so pri APL bolnikih zdravljenih z As_2O_3 deleži DMA kot končnega metabolita običajno nižji ($57.3 \pm 4.7 \%$) (Šlejkovec in sod., 2008).

Zanimiva je tudi prisotnost metabolita As(V), saj je pacientka prejela As izključno v obliki As(III). Sklepamo, da je prišlo v manjšem obsegu tudi do oksidacije As(III) v As(V), kar lahko predstavlja mehanizem detoksifikacije, saj je As(V) manj strupen. Podobne rezultate so dobili tudi v raziskavi Lowell in Farmr (1985), kjer so pri speciaciji urina po akutni zastrupitvi z As_2O_3 prav tako zaznali prisotnost As(V). Koncentracija omenjenega metabolita se je po drugem dnevu terapije zmanjšala, saj se je inducirala encimska metilacija. Glede na naše rezultate in rezultate omenjene študije sklepamo, da je pojav reakcije oksidacije As(III) verjetno začetni obrambni mehanizem pri izpostavitve veliki dozi As(III). Visoki deleži končnega metabolita DMA pri obeh osebah izpostavljenih anorganskemu arzenu, preko vode oziroma terapevtsko, ter visok delež AsB pri petih osebah po enem obroku ribe, kaže na njihovo dobro izločanje arzena. Primerjalno so deleži podani v preglednici 12.

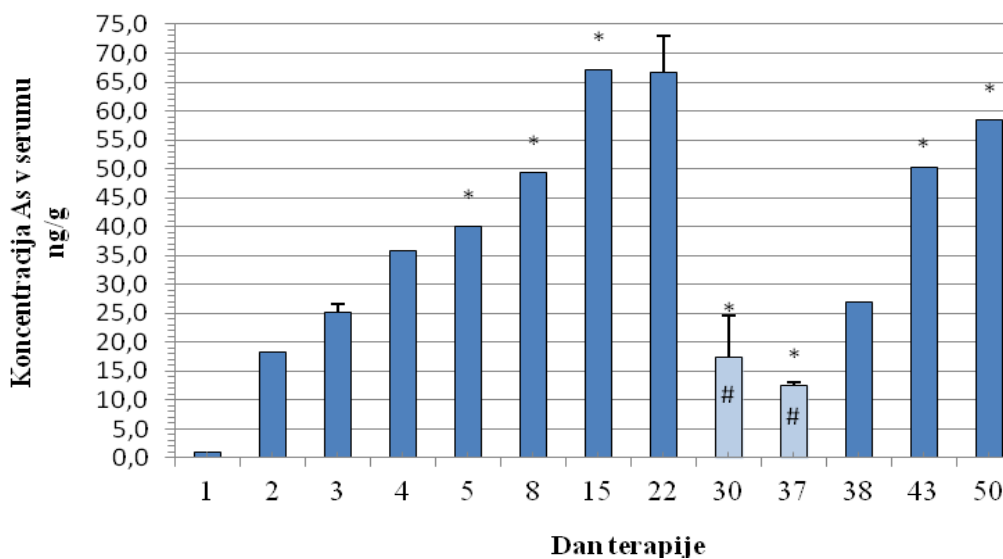
Preglednica 12: Deleži DMA in AsB v urinu preiskovanih oseb posameznega poskusa

vrsta poskusa (odmerek As)	osebe (n)	čas (dan)	DMA %	ASB%
en obrok tune (250 g)	5	1	6.4 – 15.3	93.6 - 84.7
voda z As(III) – vsak dan in obrok sardel (5. in 6. dan poskusa) ($258 \pm 16 \mu\text{g L}^{-1}$)	1	8	1-4 dan 39.7-68.1 5-6 dan 5.0-12.3 7-11 dan 20.7-34.9	1-4 dan 8.3-24.1 5-6 dan 82.7-93.2 7-11 dan 64.0-70.5
terapija z As_2O_3 (intravenozno) ($0.15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dan}^{-1}$)	1	25	1 dan 0 2 dan 58.34 3-25 dan 75.06	0

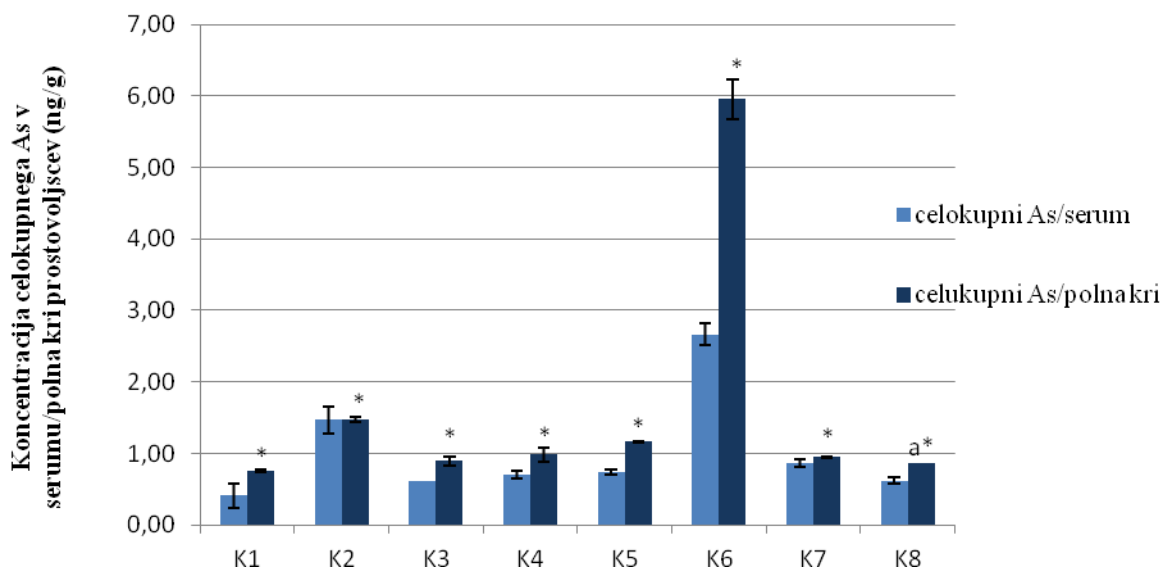
4.3 CELOKUPNI As V VZORCIH KRVI PROSTOVOLJCEV IN BOLNICE Z APL ZDRAVLJENE Z As₂O₃

V poglavju 4.2 smo potrdili uporabo koncentracije As v vzorcu urina kot primeren biomarker izpostavljenosti As. Drugačna pa je slika v primeru spremljanja koncentracije As v krvi, saj je korelacija med koncentracijo As v pitni vodi in krvi (WHO, 2001) zelo slaba. Tako so v primeru izpostavljenosti pitni vodi s koncentracijo As v območju 2-31 $\mu\text{g L}^{-1}$, v krvi preiskovanca izmerili koncentracije As $< 2 \mu\text{g L}^{-1}$, v urinu pa 13-45 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Hughes, 2006). Razlog je, da se As iz krvi izloči že v par urah po zaužitju in je zato analiza krvi za As uporabna samo v primeru trenutne izpostavljenosti velikim odmerkom As (NRC, 1999).

V raziskovalni nalogi je bila z metodo ICP-MS izmerjena celokupna koncentracija As v serumu bolnice z APL (poglavje 4.2.2), zdravljene z As₂O₃, ki je bila dnevno izpostavljena visoki dozi anorganskega As(III) (0.15 mg kg^{-1}). Za primerjavo smo izmerili koncentracije As v serumu in polni krvi osmih zdravih prostovoljcev (K1–K8). Rezultati koncentracij As v serumu bolnice (pred infuzijo) so prikazani v na sliki 19 ter prostovoljcev na sliki 20. Pri zadnjih so dodane še vrednosti arzena v polni krvi. Z zvezdico so označeni vzorci, pri katerih smo v polni krvi določili ekspresijo genov MT, ki jo lahko arzen vzpodbudi ali zmanjša.



Slika 19: Jutranje koncentracija celokupnega As (ng g⁻¹) v vzorcih serumov odvzetih pred intravensko infuzijo As₂O₃ (0,15 mg kg⁻¹) pri bolnici z APL (* vzorci pri katerih je bila hkrati odvzeta tudi polna kri za analizo kvantifikacije izražanja genov MT; # vzorec 30 sredi pavze in vzorec 37 prvi dan terapije po pavzi)



Slika 20: Koncentracija celokupnega As (ng g⁻¹) v vzorcu seruma in polne krvi osmih prostovoljcev (* vzorci vključeni v analizo kvantifikacije izražanja genov MT; a- koncentracija ocenjena na podlagi koncentracije iz seruma ob upoštevanju faktorja koncentracije polna kri/serum= 1,39)

Iz primerjave koncentracij As v serumu bolnice APL in zdravih prostovoljcev (z izjemo K6) (sliki 19 in 20) opazimo, da je imela bolnica pred terapijo dokaj primerljivo koncentracijo As (1.04 ng g^{-1}) kot v povprečju prostovoljci ($0.77 \pm 0.08 \text{ ng g}^{-1}$). Iz slike 20 vidimo, da je koncentracija As v polni krvi prostovoljcev nekoliko višja kakor v serumu. Razlog je verjetno, da v primeru vzorca polne krvi izmerimo tudi As prisoten v krvnih celicah. V povprečju so koncentracije v polni krvi višje za faktor 1.39 (ob neupoštevanju K6). Po podatkih študije Iyengar (1998) je povprečna koncentracija v krvi zdravih ljudi $< 1\text{-}5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Med terapijo se je koncentracija arzena pri bolnici povečala za en red velikosti (tudi do 70 krat). Pri bolnici opazimo linearno povečevanje koncentracije As skozi terapijo, ker se pri tako veliki dozi v 24 urah iz krvi ne izloči ves As in se zato med terapijo akumulira. Na počasnejše izločanje As iz krvi bolnice pa vpliva tudi prenos As v druga tkiva in zakasnjeno izločanje iz teh tkiv. Padeč koncentracije je viden tudi med prekinitvijo terapije v vzorcih 30. in 37. dne terapije, ki predstavljata peti in enajsti dan prekinitve; zadnji je hkrati tudi začetek novega ciklusa infuzij. Iz Slike 19 je razvidno, da se nato z nadaljevanjem terapije koncentracija As v serumu spet povečuje.

4.4 KVANTITATIVNO DOLOČANJE IZRAŽANJA GENOV METALOTIONEINOV

Zaradi vpletenosti metalotioneinov v metabolizem oz. detoksifikacijo As, nas je v raziskovalni nalogi zanimal tudi vpliv As_2O_3 na izražanje genov (sub)izoform MT v krvi. V svoji študiji so Liu in sod. (2007) ugotovili, da so povišani transkripti MT v krvi uporaben biomarker za detoksifikacijo (rezistenco), znižani pa za povečano občutljivost posameznikov na strupenost kovin.

Za ugotavljanje vpliva As_2O_3 na izražanje (sub)izoform MT smo primerjali izražanje genov (sub)izoform proteina v sedmih vzorcih polne krvi bolnice APL, z izražanjem genov v vzorcih polne krvi osmih prostovoljcev (K1*–K8*). V vzorcih polne krvi bolnice APL ni bila določena celokupna koncentracija As, predvidevamo pa, da je bila

(kot pri prostovoljcih) višja od tiste določene v serumu. To dokazujejo tudi rezultati predhodne študije (Šlejkovec in sod., 2008), kjer so v eritrocitih APL bolnikov zdravljenih z As_2O_3 določili precej višje koncentracije arzena kot v serumu.

4.4.1 Koncentracija, čistost in kvaliteta izolirane RNA

Izolaciji RNA iz krvi vzorcev kontrolne skupine (8 vzorcev v dveh paralelkah) in APL bolnice (7 posameznih vzorcev tekom zdravljenja bolnice levkemije) je sledilo UV-spektrofotometrično določanje koncentracije in čistosti izolirane RNA. Absorbanca je bila izmerjena pri 260 nm (A_{260}) in 280 nm (A_{280}). Koncentracije RNA v vzorcih so bile izračunane iz A_{260} v skladu z Beer-Lambertovim zakonom ob upoštevanju, da je vrednost $A_{260}=1$ ekvivalentna okoli $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ RNA. Rezultati koncentracij izolirane RNA (preglednica 13) se med posameznimi vzorci zelo razlikujejo, razlike so vidne celo med paralelkami istega vzorca. Razlog za te razlike so verjetno variacije med izolacijo RNA posameznih vzorcev (učinkovitost izolacije, sprostitvev RNA iz jedra, odstranitev vodne faze, kjer se nahaja RNA itd.) in manjše razlike v količini začetnega biološkega materiala (polna kri).

Pokazatelj čistosti RNA je razmerje A_{260}/A_{280} , in sicer v splošnem velja RNA za čisto, če je to razmerje v območju 1.8–2 (Farell, 1998; Frederick in sod., 1999). Po novejših podatkih v literaturi smo ugotovili, da je razmerje odvisno tudi od načina izvedbe meritve in za naš primer velja, da je RNA čista, ko je razmerje okoli 2.1 (http://biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html). Manjše razmerje pomeni prisotnost nečistoč, kot so DNA, proteini in fenoli. V primeru naših vzorcev (P preglednica 13) smo potrdili čistost RNA, saj so bila razmerja A_{260}/A_{280} od 2.05 do 2.19.

Za učinkovitost reverzne transkripcije RNA in s tem metode qPCR je pomembna tudi kakovost izolirane RNA. Reverzna transkripcija je učinkovita, v kolikor je RIN (poglavje 3.2.4) RNA večji od 7. Vrednosti faktorja RIN za naše vzorce so bile med 7.1 in 9.1 kar pomeni, da je bila kakovost izolirane RNA dobra, saj med njeno izolacijo ni prišlo do večjega razpada.

Vzorci z znanimi koncentracijami RNA smo pripravili tako, da smo v vseh prepisali enako količino RNA (1.8 µg). Za prepis smo v primeru kontrolne skupine vzeli vzorec paralelke z višjo koncentracijo izolirane RNA.

Preglednica 13: Koncentracija, čistost (A260/A280) in kakovost (RIN) izolirane RNA iz vzorcev krvi kontrolne skupine (K1-8, v paralelkah P1/2) in preiskovane skupine (B1-7)

oznaka vzorca	skupina	konc. RNA (ng µl ⁻¹)	A260/A280	RIN
K1	kontrolna skupina P1	79.2	2.16	8.2
	kontrolna skupina P2	156.3	2.11	8.6
K2	kontrolna skupina P1	65.2	2.08	8.3
	kontrolna skupina P2	98.8	2.1	8
K3	kontrolna skupina P1	106.6	2.16	8.7
	kontrolna skupina P2	71	2.13	9.1
K4	kontrolna skupina P1	55.4	2.08	7.8
	kontrolna skupina P2	107.6	2.13	7.8
K5	kontrolna skupina P1	84	2.12	7.5
	kontrolna skupina P2	103	2.13	8.4
K6	kontrolna skupina P1	73.7	2.19	8,2
	kontrolna skupina P2	114.7	2.16	9
K7	kontrolna skupina P1	78.5	2.14	8.4
	kontrolna skupina P2	42.2	2.14	8.5
K8	kontrolna skupina P1	75.3	2,18	8.1
	kontrolna skupina P2	67.3	2.15	8
B5	Tretirana z As 5. dan	337.2	2.06	7.7
B8	Tretirana z As 8. dan	561.6	2.12	7.2
B15	Tretirana z As 15. dan	849.7	2.11	7.2
B30	30. dan*	441.9	2.05	7.1
B37	37. dan*	311.4	2.1	7.4
B43	Tretirana z As 43. dan	94.5	2.08	6.1
B50	Tretirana z As 50. dan	357	2.08	7.2

* Dneva med prekinitvijo infuzij po 25 odmerkih arzena.

4.4.2 Učinkovitost reakcije qPCR

Kot že omenjeno, je učinkovitost reakcije vidna iz rezultatov standardne krivulje. Za 90–100 % učinkovito reakcijo qPCR mora biti naklon standardne krivulje v območju od –3.85 do –3.10. V naši raziskavi so bili nakloni precej variabilni, in sicer v območju od –2,294 do 4,052 zato lahko sklepamo, da je bila učinkovitost reakcije pri določenih genih slabša (MT-1a, MT-1x, MT-2a s sondo).

4.4.3 Vpliv arzenovega trioksida na izražanje genov za (sub)izoforne metalotioneinov

Glede na ugotovitve prejšnjih študij, da človeška kri vsebuje transkripte 11 MT (sub)izoforn (Li in Maret, 2008), da težke kovine vplivajo na ekspresijo genov MT pri ljudeh (Yamada in Koizumi, 1991), da se As^{+3} veže na izoformo MT-1a (Duncan in sod., 2006; Ngu in sod., 2006) in MT-2 (Toyama in sod., 2002) pri ljudeh, da As povzroči indukcijo izražanja genov MT v jetrih miši in podgan (X. He in Q. Ma, 2009; Kreppel in sod., 1993; Albores in sod., 1992;), v krvi ljudi in v glioblastomskih celicah ljudi (Falnoga in sod., 2012), nas je zanimalo, katere (sub)izoforne MT se izražajo v krvi naših prostovoljcev (kontrolna skupina) in bolnice ter kako As_2O_3 vpliva na njihovo izražanje.

- Identifikacija (sub)izoforn

V vseh vzorcih krvi smo identificirali šest (sub)izoforn MT (MT-1a, MT-1e, MT-1f, MT-1x, MT-2a in MT-3 (z izjemo vzorca B1 in B4 za MT3)). Rezultati kvantifikacije s qPCR za izoforne MT-1b, MT-1g, MT-1h, MT-1m in MT-4 pa so bili negativni. Tako smo potrdili rezultate prejšnje študije (Falnoga in sod., 2012), kjer so spremljali izražanje (sub)izoforn MT v humani glioblastomski celični liniji U87 MG tretirani z As_2O_3 . V obeh primerih je šlo namreč za uporabo enakih oligonukleotidnih začetnikov (OZ) in podobnih pogojev qPCR. Na podlagi identifikacije enakih (sub)izoforn v krvi in možganskem tkivu, lahko potrdimo ugotovitev študije Liu in sod. (2007), da so transkripti MT v krvi ustrezen biomarker za količino MT v drugih tkivih. Kot so podali v tej študiji, so razlogi za negativno identifikacijo posameznih (sub)izoforn lahko neprimerni OZ ali pa prenizke koncentracije sub(izoforn) v vzorcih. Zaradi velike bližine genov *MTI-g* in *MTI-h* v nukleotidnem zaporedju na kromosomu 16 (Moleirinho in sod., 2011), smo v naši raziskavi poskušali identificirati ti subizoforni z bolj specifično metodo, s TaqMan sondami, vendar neuspešno. Težavo pri identifikaciji teh dveh subizoforn ter tudi MT-1m je predstavljala neustreznost sond, saj so pomnoževale tudi genomsko DNA, kar proizvajalec tudi omenja. Presenetila pa nas je negativna identifikacija MT-1b, saj je glede na podatke študije Moleirinho in sod. (2011) ta subizoforna omejena na krvno in vezivno tkivo. Sklepamo, da je bil

MT-1b v naših vzorcih prisoten v koncentraciji pod mejo detekcije. Na podlagi ugotovitev študije Liu in Maret (2008) je MT-1b znotraj tkiva krvi omejen na prekursorje rdečih krvnih celic oz. retikulocite, ki jih je v primerjavi z ostalimi krvnimi celicami v krvi zelo malo.

V študiji Chang in sod. (2006), kjer so spremljali izražanje (sub)izoform MT-1 v perifernih krvnih limfocitih človeka pri izpostavljenosti kadmiju, so prav tako dobili negativne rezultate v primeru subizoforme MT1b, uspelo pa jim je identificirati MT1g in MT1h, verjetno predvsem zato, ker so uporabili drugačen pristop. Subizoforme so identificirali z uporabo elektroforeze PCR produktov ter specifične mRNA fragmente kvantificirali z denzitometrično analizo, poleg tega pa so uporabili drugačne OZ.

- Izbira referenčnega gena

S programom LightCycler® 480 Software 1.5 smo določili relativne koncentracije mRNA za posamezne (sub)izoforme v vzorcih. Dobljene podatke smo normalizirali glede na vrednosti referenčnih genov, da smo se znebili virov nespecifičnih variabilnosti med vzorci (variacije v količini in kakovosti RNA zaradi razlik v učinkovitosti izolacije RNA in količine izhodiščnega materiala, učinkovitost reverzne transkripcije in reakcije qPCR). Za ref. gene je značilno, da se izražajo v vseh celicah z neko konstantno koncentracijo in da preiskovani dejavnik (vpliv As) na njihovo izražanje ne vpliva. V naši raziskavi smo uporabili naslednje ref. gene: *Gapdh* (gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza), *Actb* (beta aktin), in *Rplp0* (veliki ribosomski protein P0). Na odločitev uporabe le-teh so vplivali podatki o že obstoječi uporabi genov *Gapdh* in *Actb* v raziskavah z arzenom (Garett in sod., 2001; Liu in sod., 2007) ter genu *Rplp0* kot genu zelo stabilno izraženemu v tkivu krvi. Izražanje gena *Gapdh* pa je pod vplivom ROS (Ferguson in sod. 2010), na produkcijo katerih vpliva tudi As (Emadi in Gore, 2010), zato je uporaba tega ref. gena pri eksperimentih z As težavna (Falnoga in sod., 2012). Vpliv As na izražanje gena smo potrdili tudi v naši raziskavi. Glede na ugotovitve študije Vandesompele in sod. (2002) naj bi bila za natančno merjenje stopnje ekspresije potrebna normalizacija z izračunanim normalizacijskim faktorjem, ki je geometrijsko povprečje stabilnih referenčnih genov. Naše podatke smo zato normalizirali na vrednosti geometrijske sredine ref. genov *Actb* in *Rplp0*

(vrednosti gena *Gapdh* zaradi nestabilnosti nismo upoštevali) ter za primerjavo tudi na vrednosti posameznega gena *Actb* in *Rplp0*. V prilogi I so prikazani rezultati ne normaliziranih vrednosti (a) ter rezultati normaliziranih vrednosti na *Actb* (b), *Rplp0* (c) in geometrijsko sredino *Actb* in *Rplp0* (d).

- Nivo izražanja (sub)izoform MT pri kontrolni skupini

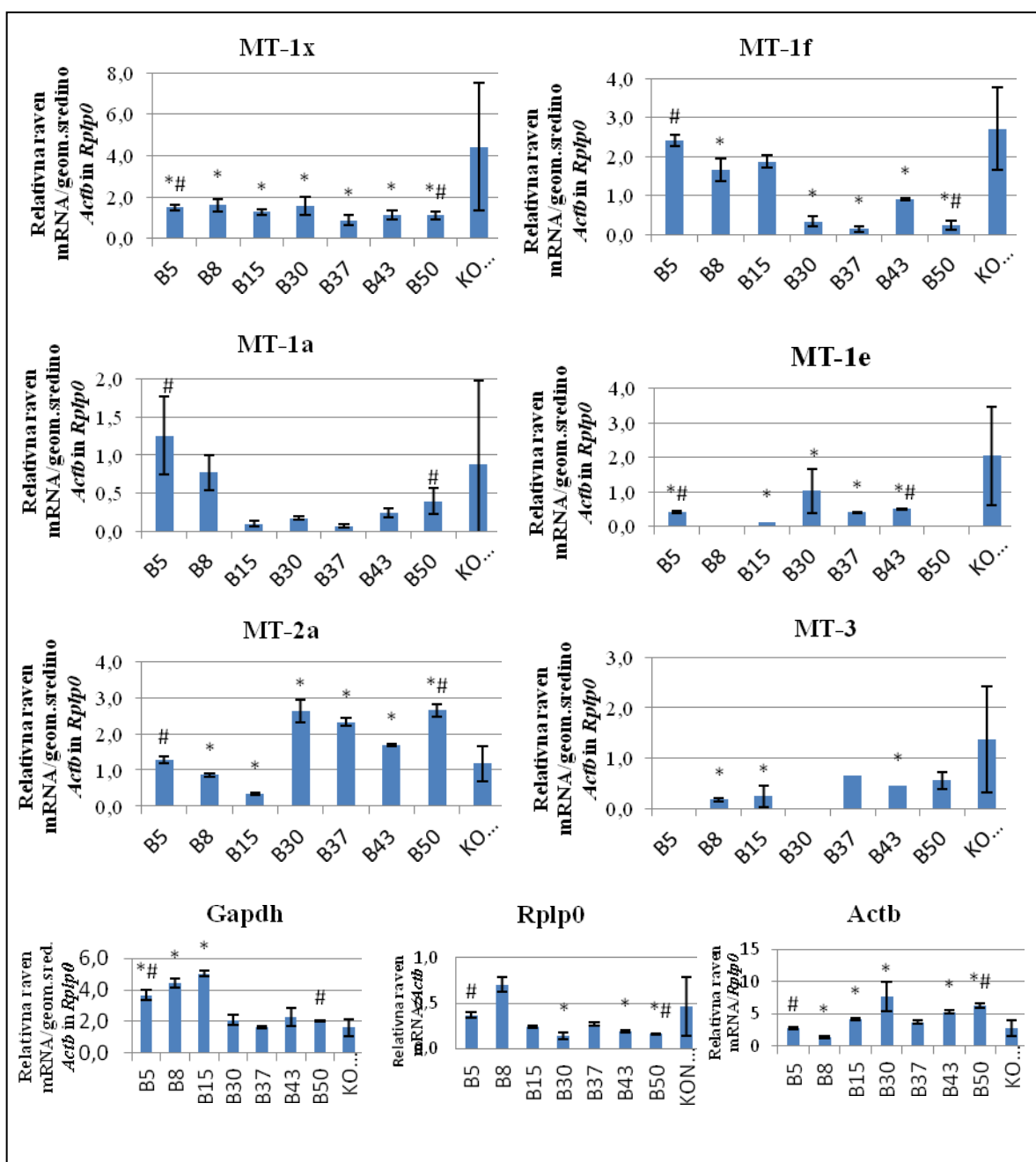
Iz rezultatov normaliziranih vrednosti izražanja genov MT v kontrolnih vzorcih krvi lahko vidimo, da imajo različne (sub)izoforme različno stopnjo izražanja, kar je verjetno posledica njihovih različnih funkcij. Stopnja izražanja posameznih (sub)izoform v kontrolnih vzorcih je padala po naslednjem vrstnem redu: MT-1x >> MT-1e > MT-1f >> MT-2a > MT-3 > MT-1a. Podatki o povprečnem deležu izražanja posamezne (sub)izoforme v vzorcih kontrolne skupine so podani v preglednici 14.

Preglednica 14: Povprečni delež izražanja gena posamezne (sub)izoforme z SD pri vzorcih kontrolne skupine.

gen	delež izražanja (%) (povprečje, SD in območje K1-K8)
MT-1x	27.5±12.0 (13.50-41.24)
MT-1e	19.1±11.6 (7.13-42.06)
MT-1f	18.8±4.6 (14.09-27.62)
MT-2a	11.7±4.0 (7.43-17.04)
MT-3	8.2±4.7 (2.11-15.78)
MT-1a	6.4±6.7 (1.94-21.50)

- Časovno izražanje (sub)izoform MT pri bolnici zdravljeni z arzenom v primerjavi s kontrolno skupino

Izražanje posameznih genov (sub)izoform MT, *Gapdh* (normalizirani na geometrijsko sredino ref. genov *Actb* in *Rplp0*) ter *Rplp0* (normaliziran na *Actb*) in *Actb* (normaliziran na *Rplp0*) v vzorcu krvi bolnice glede na čas odvzema (preglednica 12) in s tem koncentracijo As_2O_3 (slika 19) je prikazano na sliki 21.



Slika 21: Primerjava izražanja genov za (sub)izoforme MT v krvi bolnice in prostovoljcev (KO, ...) ter med posameznimi odvzemi krvi bolnice (B5-B50 oz. med 5 in 50 dnev) (* statistično značilne razlike med bolnico in kontrolo, # statistično značilne razlike med prvim in zadnjim vzorcem bolnice). Enota 1 na y-osi pomeni, da je razmerje: vrednost posamezne (sub)izoforme/ geom. sredina vrednosti *Actb* in *Rplp0* (za MT (sub)izoforme in gen *Gapdh*), vrednost *Rplp0*/vrednost *Actb* (za gen *Rplp0*) ter vrednost *Actb*/vrednost *Rplp0* (za gen *Actb*) enako 1.

Statistično analizo smo naredili v Excelu s Studentovim t-estom, kjer smo za statistično značilne razlike označili tiste z vrednostjo $p < 0,05$. Statistično analizo smo naredili za vse tri omenjene načine normalizacije in ugotovili, da so rezultati analize podobni, v primeru normalizacije po *Rplp0* pa pride do večjih odstopanj (priloga I) ob primerjavi izražanja pri bolnici in kontrolni skupini predvsem pri genih (sub)izoform MT-1e in MT-1x, kjer dobimo po normalizaciji z *Rplp0* manj statistično značilnih razlik kakor pri drugih dveh načinih normalizacije, ter pri genu *Gapdh*, kjer dobimo več statistično značilnih razlik. Prav tako so bila vidna odstopanja ob primerjavi izražanja pri bolnici med začetkom in koncem terapije, kjer nismo dobili statističnih razlik v primeru subizoform MT-1a, MT-1x ter gena *Gapdh*, ob normalizaciji na preostala dva načina pa so bile razlike statistično značilne.

S primerjavo vzorcev bolnice in kontrole smo ugotovili, da je časovno izražanje petih (sub)izoform MT-1e, MT-1f, MT-1x, MT-2a in MT-3 pri skoraj vseh odvzemih različno od izražanja pri kontrolni skupini. Le pri subizoformi MT-1a nismo dobili statistično značilne razlike pri nobenem odvzemu (slika 21 oznaka *), razlog je verjetno zelo variabilno izražanje (velika standardna deviacija) med posamezniki kontrolne skupine.

Če izpostavimo samo začetno stanje (B5, peti dan terapije), vidimo, da je bilo glede na kontrolo izražanje treh genov znižano MT-1x, MT-1e in MT-3, izražanje ostalih treh pa v območju kontrolnih vrednosti (MT-1f, MT-1a, MT-2a). Ob koncu terapije (B50, dan 50) sta bila MT-1x in MT-1e še vedno znižana, dodatno se je znižal MT-1f, zvišala pa sta se MT-2a in MT-3 – prvi nad kontrolno vrednost in drugi do kontrolne vrednosti. Ker nismo imeli začetnega vzorca bolnice, ne moremo oceniti v kakšni meri so bile te opažene razlike (predvsem na začetku) posledica osnovne bolezni bolnice.

O samem vplivu arzena verjetno več pove primerjava izražanja genov med začetnim (B5- dan 5) in končnim (B50- dan 50) vzorcem bolnice (slika 21 oznaka #), kjer smo dobili statistično značilne razlike pri vseh (sub)izoformah in iz tega sklepamo, da terapija z As_2O_3 nedvomno vpliva na izražanje MT (sub)izoform. Pri tej primerjavi smo opazili zvišanje za MT-2a in MT-3 nekoliko šibkejše za MT-1e in močno znižanje za MT-1f in MT-1a ter šibkejše za MT-1x.

Na koncu smo ocenili, da so z vidika učinkovanja arzena (zaradi manjkajočega prvega vzorca) najbolj prepričljive izoforme, ki so bile na začetku terapije (dan 5) v območju kontrolnih vrednosti. Sklepamo, da je arzen nedvomno induktivno vplival na MT-2a in inhibitorno na MT-1a in MT-1f. Med terapijo pa so vrednosti nihale, na kar so lahko vplivale tudi spremenljivke koncentracije celokupnega arzena oziroma njegovih metabolitov.

Znižanje ekspresije genov MT-1 pri osebah kronično obremenjenih z As (iz pitne vode) in s prisotnimi bolezenskimi znaki so ugotovili tudi v študiji Liu in sod. (2007). Na podlagi rezultatov so v študiji zaključili, da je znižanje izražanja genov MT-1 pri obolelih lahko posledica bodisi polimorfizma v genih MT (Albores in sod., 1992; Liu in sod., 2000), kar pri teh osebah predstavlja predispozicijo za večjo občutljivost na As in s tem na zastrupitev ali pa je znižanje izražanja posledica delovanja As, kar se zaradi podatkov iz literature o indukciji MT z As (Albores in sod., 1992; Liu in sod., 2000, Falnoga in sod., 2012) zdi bolj presenetljivo, vendar zaradi dolgotrajne vsakodnevne okoljske obremenitve teh ljudi z As(III) v vodi, verjetno vseeno vredno premisleka. Na podlagi naših rezultatov o odvisnosti izražanja genov subizoform MT-1 od koncentracije As se tudi nagibamo k drugi omenjeni možnosti za znižanje izražanja genov pod vplivom As. Za še natančnejšo potrditev pa bi bilo potrebno spremljati še izražanje genov subizoform v vzorcu prvega odvzema krvi (slika 19, vzorec 5. dan) pred terapijo, ko je bila koncentracija As v krvi bolnice primerljiva s tisto pri kontrolnih vzorcih, s čimer bi lahko z gotovostjo izključili polimorfizem v genih MT kot vzrok za znižanje izražanja genov.

Drugačno sliko pa vidimo v primeru izražanja subizoforme MT-2a, kjer opazimo statistično značilno povečanje izražanja gena v primerjavi z izražanjem v kontrolnih vzorcih in znotraj vzorcev bolnice (med 5 in 50 dnem terapije). Indukcija izoforme MT-2a sovpada z njeno funkcijo in distribucijo, saj gen za to izoformo predstavlja gospodinjsko vlogo za homeostazo kovin v vseh celicah (Moleirinho in sod., 2011). S trajanjem terapije z As (B30-B50) pa se enako kot pri izoformah MT-1 izražanje zmanjšuje. Glede na dobljene podatke bi mogoče lahko tudi sklepali, da začetna izpostavljenost As inducira izražanje genov MT kot posledica obrambnega mehanizma celic, daljša pa lahko zaradi biološke reaktivnosti na izražanje deluje zaviralno. Za

boljšo razlago dogajanja med terapijo bi morali spremljati izražanje genov v krvi bolnice vse od začetka zdravljenja, ko so bile koncentracije As v krvi še nižje. Pri tem je odziv posamezne (sub)izoforne MT na As specifično odvisen od koncentracije As in časa izpostavljenosti.

Podatki starejših študij (Quaife in sod., 1994; Haq in sod., 2003; Zhou in sod., 2006 itd.) nakazujejo, da se izoforma MT-3 ne odziva na indukcijo s kovinami. V naši raziskavi pa smo našli statistično značilen vpliv As na izražanje MT-3, in sicer je šlo za zvišanje izražanja znotraj vzorcev same bolnice. Pojav je podoben kot pri arzensko tretiranih humanih glioblastomskih celicah (Falnoga in sod., 2012). V obeh primerih gre verjetno za znižanje izražanja MT-3 izoforne v rakasto spremenjenih celicah, As pa to supresijo očitno blokira in omogoča normalizacijo izražanja.

V primeru naše bolnice gre za vrsto rakastega tkiva (bele krvne celice), zato so pomembne tudi ugotovitve študije Jacob in sod. (2002), da je znižanje izražanja (sub)izoforn MT značilno za različne tumorje. Potrebno pa je poudariti, da je znižanje izražanja MT odvisno od vrste tumorja in tkiva, v katerem se le-ta nahaja (Cherian in sod., 2003; Jin in sod., 2004; Thirumoorthy in sod., 2011) in ni splošno značilno za vse tumorje, pri nekaterih se izražanje namreč inducira. S tem lahko pojasnimo razlike med rezultati naše študije s predhodno že omenjeno študijo Falnoga in sod., (2012), kjer so pri tretiranju možganskih tumorskih celic (glioblastomi) z višanjem koncentracije As_2O_3 ugotovili statistično značilno indukcijo izražanja (sub)izoforn ne samo izoforn MT-2a (in MT-3) kot mi, ampak tudi MT-1f in MT-1x, ki sta se pri nas znižali.

Znižanje izražanja MT v tumorskem tkivu je verjetno posledica neposredne hipermetilacije promotorja MT genov ali mutacij v drugih genih, npr. tumor supersorskem genu p35 (Cherian in sod., 2003; Ruttkay-Nedecky in sod., 2013). V študiji Yan in sod. (2012) so kot potencialni vzrok za zmanjšanje ekspresije MT-1f v tumorju debelega črevesja podali izgubo heterozigotnosti.

Rezultati izražanja posameznih genov (sub)izoforn MT v vzorcih polne krvi prostovoljcev (kontrola) imajo zelo visoko standardno deviacijo, kar nakazuje na zelo veliko razpršenost rezultatov okoli osrednje vrednosti (slika 21). Ti rezultati tako

potrjujejo ugotovitve več študij (Allan in sod., 2000; Wu in sod., 2000) o razlikah v stopnji izražanja posameznih subizoforn MT med zdravimi posamezniki. V naši raziskavi so bile največje variacije v izražanju subizoforne MT-1a, ki je odgovorna za hoemostazo esencialnih kovin (Cu, Zn).

Na podlagi rezultatov kvantifikacije izražanja ter statistične analize smo pri referenčnih genih *Gapdh*, *Actb* in *Rplp0* v vseh treh primerih ugotovili prisotnost statistično značilnih razlik v primerjavi s kontrolo ter znotraj vzorcev bolnice (slika 21). Takšen rezultat smo za *Gapdh* pričakovali, ne pa tudi za ostala dva gena. Sklepamo, da tudi gena *Actb* in *Rplp0* v primeru naše raziskave, kjer je bila izpostavljenost visokim koncentracijam As, nista najbolj primerna za normalizacijo podatkov iz qPCR saj As_2O_3 vpliva na njuno izražanje.

Za bolj jasno sliko vpliva As(III) na izražanje genov MT, bi bilo potrebno našo raziskavo razširiti in izboljšati. Poleg uporabe metode qPCR bi za primerjavo izražanja genov MT v zdravem in As izpostavljenem tkivu (kri) lahko uporabili tudi metodo DNA mikromrež, kjer lahko enako kot pri qPCR spremljamo izražanje več genov hkrati. Gre za zelo hitro, enostavno in zanesljivo metodo. Z uporabo ustrežnejših in bolj specifičnih sond ali OZ bi lahko identificirali tudi druge subizoforne MT-1 (MT-1m, MT-1g in MT-1h). Prav tako bi morali poiskati ustrežnejše referenčne gene, na izražanje katerih As tudi pri večjih koncentracijah ne bi imel vpliva, tako bi dobili zanesljivejše rezultate. Primernejša bi bila tudi statistična primerjava vzorcev krvi bolnice pred terapijo (kot kontrola) z vzorci iz terapije, s čimer bi se izognili velikim variacijam v izražanju genov MT med različnimi ljudmi (primer MT-1a pri naši raziskavi). Prav tako bi morali izražanje genov posameznih (sub)izoforn spremljati v vzorcih krvi skozi celotno terapijo, s čimer bi dobili celovitejšo in zaradi večjega števila vzorcev tudi zanesljivejšo sliko vpliva As.

Sklepno ocenjujemo, da predstavlja izražanje MT izoforn s qPCR pomemben biomarker izpostavljenosti arzenu. Predvsem kot individualni časovni biomarker, ker se v takem primeru izognemo razlikam v izražanju med posameznimi osebkami. V nalogi smo na podlagi individualnih rezultatov bolnice skozi daljši čas terapije z gotovostjo potrdili vpliv As_2O_3 na izražanje (sub)izoforn, in sicer indukcijo MT-2a in MT-3 ter inhibicijo MT-1a in MT-1f, ter iz rezultatov izražanja MT-2a sklepali, da je izražanje

(sub)izoform odvisno tudi od časovne izpostavljenosti As. Za znižanje izražanja MT smo v nalogi izpostavili več vzrokov (polimorfizem genov MT, specifičnost tumorskega tkiva, vpliv As) in bi za dokončno potrditev bile potrebne dodatne študije.

5 SKLEPI

Na podlagi rezultatov določanja celokupnega As in speciacije As v mišicah in jetrih skatov sklepamo naslednje:

- mišice pri vseh treh vrstah skatov vsebujejo večjo celokupno koncentracijo As kakor jetra (jetra 9.1–63.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe teže in mišice 32.4–362 $\mu\text{g g}^{-1}$),
- AsB se v mišicah pojavi kot skoraj edina oblika As (99.9 %), v jetrih pa predstavlja prevladujočo spojino (59 %) poleg lipidne frakcije (32 %), DMA (9 %), As(III) (0.03 %) in As(V) (le pri 4 osebkih 0.2–1.6 %),
- AsB pri skatih se bioakumulira s starostjo ribe,
- delež AsB v mišicah bentoških vrst je večji kakor pri pelaških vrstah preiskovanih skatov,
- da je akumulacija AsB verjetno posledica strukturne podobnosti spojine z glicin betainom in da je glede na to njegova vloga pri ribah osmoregulacija.

Iz rezultatov speciacije As vzorcev urina ljudi po zaužitju morske hrane in z As kontaminirane vode ter po intravenozni infuziji sklepamo:

- uživanje mišic rib, ki so na vrhu prehranjevalne verige, ne predstavlja nevarnosti za zdravje ljudi, saj se spojini AsB in DMA iz rib nespremenjeni zelo hitro izločita iz telesa,
- po izpostavitvi anorganskemu As (pitje vode, intravenozna infuzija As) se As v telesu metilira in postopoma izloča iz telesa z urinom v obliki štirih As metabolitov in sicer glede na koncentracije DMA >> anorganski As (As(III) >> As(V)) > MMA.

Pri kvantitativnem spremljanju izražanja genov (sub)izoforn MT v krvi bolnice APL in kontrolnih vzorcev smo dobili rezultate iz katerih sklepamo:

- da so transkripti MT v krvi ustrezen biomarker za količino MT v drugih tkivih,
- da so z vidika učinkovanja arzena (zaradi manjkajočega prvega vzorca) najbolj prepričljive izoforme, ki so bile na začetku terapije (dan 5) v območju kontrolnih vrednosti in da je arzen nedvomno induktivno vplival na MT-2a in inhibitorno na MT-1a in MT-1f subizoforno, terapevtsko pa je verjetno pomemben tudi induktiven vpliv na izoforno MT3.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Tržaški zaliv je zaradi majhne količine vode ekološko zelo občutljiv in zato onesnažen zaradi industrijskih odplak slovenskih in italjanskih rek ter pristaniških mest. Med onesnaževalci zaliva je tudi arzen, ki se v morski vodi pojavi predvsem v anorganski obliki. Zaradi bioakumulacije v morskih organizmih se po prehranjevalni verigi prenaša in pretvarja v različne organoarzenove spojine, ki imajo različne fizikalno-kemijske lastnosti, metabolizem in strupenost. As spojine se v morju prenašajo vse do vrha prehranjevalne verige (ribe), kjer vstopajo tudi v prehrano ljudi. Iz tega razloga je pomembno poznavanje koncentracij in oblik arzena v morskih organizmih. V raziskovalni nalogi smo določali koncentracijo celokupnega As ter posameznih oblik As v mišicah in jetrih treh vrst dolgoživečih hrustančnic iz reda skatov (*M. aquila*, *P. bovinus* in *D. violacea*), ki so bile ulovljene v Tržaškem zalivu.

Po zaužitju je As pri ljudeh podvržen reakcijam metabolizma, ki so odvisne od oblike zaužitega As. V nalogi smo zato spremljali metabolizem As pri prostovoljcih po zaužitju z As onesnaženih rib in mineralne vode ter pri pacientki z akutno promielocitno levkemijo (APL) med intravenozno terapijo z As_2O_3 . Določali smo koncentracijo As metabolitov v vzorcih urina. Pri metabolizmu As so vpleteni tudi metalotioneini, celične beljakovine, ki nase vežejo kovine, zato smo pri bolnici z APL v vzorcih polne krvi, spremljali še vpliv As na izražanje posameznih (sub)izoform metalotioneinov.

Celokupno koncentracijo As v liofiliziranih jetrih in mišicah rib smo po predhodni pripravi vzorca s kislinskim mikrovalovnim razklopom določali z metodo ICP-MS. Enako metodo, ob drugačni predpripravi vzorca, smo uporabili tudi za določitev celokupnega As v vzorcu krvi in seruma bolnice z APL ter kontrolnih oseb. Identifikacija in kvantifikacija posameznih oblik As po ekstrakciji As iz liofiliziranih vzorcev pa je potekala z metodo HPLC-(UV)-HG-AFS. UV razkroj smo uporabili le za razkroj spojin, ki sicer ne tvorijo hlapnih hidridov (AsB, AsC, TETRA ter TMAO). Enako metodo smo uporabili za določitev spojin As v urinu prostovoljcev po zaužitju z As onesnažene vode in rib ter bolnice z APL. Izražanje genov (sub)izoform

metalotioneinov pod vplivom As v krvi bolnice z APL (in kontrolnih oseb) smo spremljali s kvantitativno metodo qPCR.

Rezultati določanja celokupnega As in njegove speciacije v mišicah in jetrih skatov so pokazali, da se As v večji meri bioakumulira v mišicah ($32.4\text{--}362\ \mu\text{g g}^{-1}$) kakor v jetrih ($9.1\text{--}63.5\ \mu\text{g g}^{-1}$) ter da se As v mišicah pojavi v 99.9 % kot AsB, v jetrih pa je zaradi reakcij detoksifikacije kovin raznolikost spojin večja in se poleg AsB (59 %) pojavijo še DMA (9 %), As(III) (0.03 %) in le redko tudi As(V). Ugotovili smo tudi, da je delež AsB v mišicah bentoških vrst večji kakor pri pelaških vrstah preiskovanih skatov ter da se akumulira s starostjo ribe. Akumulacija AsB pri skatih je verjetno posledica strukturne podobnosti spojine z glicin betainom in glede na to je njegova vloga pri ribah verjetno osmoregulacija.

Speciacija As v urinu preiskovancev po zaužitju z As onesnažene ribe je pokazala, da uživanje mišic rib na vrhu prehranjevalne verige, ne predstavlja nevarnosti za zdravje ljudi, saj se spojini AsB in DMA nespremenjeni zelo hitro izločita iz telesa. Po izpostavitvi anorganskemu As (pitje vode, intravenozna infuzija As) pa se As v telesu metilira in postopoma izloča iz telesa z urinom v obliki štirih As metabolitov in sicer glede na koncentracije $\text{DMA} \gg \text{anorganski As (As(III)} \gg \text{As(V))} \gg \text{MMA}$.

S spremljanjem kvantitativnega izražanja genov (sub)izoform metalotioneinov v krvi smo ugotovili, da je določanje transkriptov MT v krvi lahko ustrezen biomarker za količino MT v drugih tkivih. S pomočjo statistične analize (Studentov t-test) smo potrdili vpliv As_2O_3 na izražanje (sub)izoform MT, in sicer gre za indukcijo MT-2a in MT-3 ter inhibicijo MT-1a in MT-1f. Iz rezultatov izražanja (sub)izoforme MT-2a pa sklepamo, da je izražanje (sub)izoform odvisno tudi od časovne izpostavljenosti As. Vsekakor bi za jasnejšo sliko vpliva As na izražanje MT bilo potrebno raziskavo razširiti in izboljšati: uporaba alternativnih metod za spremljanje izražanja genov, bolj specifičnih sond in oligonukleotidnih začetnikov, boljša izbira kontrolnih vzorcev za zmanjšanje variacij v izražanju MT med posamezniki.

6.2 SUMMARY

The Trieste Bay contains a relatively small amount of water, which makes it extremely ecologically sensitive and therefore also polluted by the industrial discharge from both Slovene and Italian rivers and port towns. One of the pollutants is also arsenic, which is mostly present in sea water in the unorganic form. Following the bioaccumulation in sea organisms it is transmitted through food chain and transformed into different organoarsenic compounds with different physical and chemical characteristics, metabolism and toxicity. As-compounds are transmitted in the sea to the top of the food chain (fish), where they also enter the food of people. That is the reason why the knowledge of concentrations and forms of arsenic is important. We researched the concentration of total As and particular forms As in muscles and liver in three species of long living cartilaginous fish from the ray order (*M. aquila*, *P. bovinus* in *D. violacea*), which were caught in the Trieste Bay.

After the consumption As is the subject to metabolism reactions in people, which depend on the form of As consumed. Therefore, we followed the metabolism of As in volunteers after the consumption of As-polluted fish and mineral water and in a patient suffering from acute promyelocytic leukemia (APL) during the intravenous therapy with As_2O_3 . We researched the concentration of As-metabolites in urine specimens. The As-metabolism also includes metallothioneins, cell proteins, which bond metals. Following this principle we also observed the influence of As on the presence of particular metallothioneins (sub)isoforms.

We determined the total concentration of As in lyophilized liver and muscles of fish after the preparation of the specimen with acidic microwave digestion through the ICP-MS. The same method following different specimen preparation was used in order to determine the total As in the blood specimens of a patient suffering from APL and the control group. The identification and quantification of particular As-forms after the extraction of As from lyophilized specimens was carried out using the HPLC-(UV)-HG-AFS method. UV digestion was only used in order to disintegrate the compounds which do not form volatile hydrides (AsB , AsC , TETRA and TMAO). The same method was used in order to determine As-compounds in the urine of volunteers

after the consumption of As-polluted water and fish and the patient suffering from APL. The expression of (sub)isoforms metallothioneins genes under the influence of As in the APL patient's (and control group members) was researched using the quantitative qPCR method.

The results of measuring the total As and its speciacije in muscles and liver have shown that As in mainly bioaccumulated in muscles (32.4-362 $\mu\text{g g}^{-1}$) and less in liver (9.1-63.5 $\mu\text{g g}^{-1}$) as well as that As in muscles in 99.9 % is present as AsB, while in liver the diveristy of compounds is greater because of metal detoxification reactions, so besides AsB (59%) we can also find DMA (9%), As(III) (0.03%) and rarely also As(V). We have discovered that the share of AsB in muscles is higher in benthic species than in pelagic species of the rays researched and it is accumulated proportionately with the age of the fish. The accumulation of AsB in rays is probably the consequence of structural similarities of the compound with glycin betaine and considering that its role in fish is probably osmoregulation.

The speciation of As in the urine of research subjects after the consumption of As-polluted fish has shown that the consumption of muscles of the fish on the top of the food chain does not present any danger for people's health because both compounds, AsB and DMA, are soon discharged from the body unchanged. After the exposure to inorganic As (drinking water, intravenous infusion of As), it metilates in the body and is gradually discharged from the body in the form of four As-metabolites, namely depending on the concentrations of DMA>> inorganic As (As(III)>>As(V))>MMA.

By researching the quantitative presence of (sub)isoforms metallothioneins genes in the blood we discovered that the determination of MT-transcripts in blood can be an appropriate biomarker for the amount of MT in other tissues. Using the statical analysis (Student's t-test) we confirmed the influence of As₂O₃ on the presence of MT (sub)isoforms, namely it is about the induction of MT-2a in MT-3 and inhibition of MT-1a in MT-1f. We assume from the results of the presence of (sub)isoform MT-2a that the presence of (sub)isoforms also depends on the period of exposure to As. In order to clarify the picture of the influence of As on the presence of MT the research should be broadened and improved: the use of alternative methods to follow the presence of genes, the use of more specific sonds and oligonucleotide primers and the

better choice of control specimens in order to decrease the variations of expressing MT-presence in individuals.

7 VIRI

- Albores A., Koropatnick J, Cherian M. G., Zelazowski A. J., 1992. Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production in vivo. *Chemico-Biological Interactions*, 85: 3127–140
- Allan A. K., Hawksworth G. M., Woodhouse L. R., Sutherland B., King J. C., Beattie J.H. 2000. Lymphocyte metallothionein mRNA responds to marginal zinc intake in human volunteers. *British Journal of Nutrition*, 84: 747-756
- Ashraf M., Jaffar M. 1988. Weight dependence of arsenic concentration in the Arabian Sea tuna fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 40: 219-225
- Ayubi M. 2007. Biomedical genomics,
URL:
http://biomedicalgenomics.org/How_does_intact_total_RNA_looks_like.html
(12. maj 2013)
URL: http://biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html (12. maj 2013)
- Bilandžić N., Dokić M., Sedak M., 2011. Metal content determination in four fish species from the Adriatic Sea. *Food Chemistry*, 124: 1005-1010
- Bohn A., McElroy R. O. 1976. Trace Metals (As, Cd, Cu, Fe, and Zn) in Arctic cod, *Boreogadus saida*, and Selected Zooplankton from Strathcona Sound, Northern Baffin Island. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33, 12: 2836-2840
- Chang XL., Jin TY., Zhou YF. 2006. Metallothionein 1 Isoform Gene Expression Induced by Cadmium in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Biomedical and Environmental Sciences*, 19: 104-109
- Cherian M.G., Jayasurya A., Bay B.H. 2003. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research*, 533: 201-220

- Concha G., Vogler G., Nermell B., Vahter M. 2002. Intra-individual variation in the metabolism of inorganic arsenic. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 75: 576-580
- Degenek N., Mercury in cartilaginous fish from the northern Adriatic (in Slovene), Graduation thesis, University of Ljubljana, 2008.
- De Gieter M., Leermakers M., Van Ryssen R., Noyen j., Goeyens L., Baeyens W. 2002. Total and Toxic Arsenic Levels in North Sea Fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43: 406-417
- Degobbis D., Precali R., Ferrari C.R., Djakovac T., Rinaldi A., Ivancic I., Gismondi M., Smodlaka N., 2005. Changes in nutrient concentrations and ratios during mucilage events in the period 1999-2002. *Science of the Total Environment*, 353: 103-114
- Dembitsky V.M., Levitsky D.O. 2004. Arsenolipids. *Progress in Lipid Research*, 43, 5: 403-448
- Dulčić J., Lipej L., Orlando Bonaca M., Jenko R., Grbec B., Guelorget O., C.Capape, 2008. The bull ray, *Pteromylaeus bovinus* (Myliobatidae), in the northern Adriatic Sea. *Cybium* 32, 2: 119-123
- Duncan K. E. R., Ngu T. T., Chan J., Salgado M. T., Merrifield M. E., Stillman J. 2006. Peptide Folding, Metal-Binding Mechanisms, and Binding Site Structures in Metallothioneins. *Experimental Biology and Medicine*, 231: 1488-1499
- Edmonds J.S, Francesconi K.A. 1981. The origin and chemical form of arsenic in the school whiting. *Marine Pollution Bulletin*, 12: 392-396
- Edmonds J. S., Francesconi K. A. 1987. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia*, 43: 553-557

- Edmonds J. S., Francesconi K. A. 2003. Organoarsenic Compounds in the Marine Environment, V: Organometallic Compounds in the Environment. Craig P.J . 2nd ed., New York, John Wiley & Sons: 195-222 str.
- Emadi A., Gore S. D. 2010. Arsenic trioxide- An old drug discovered. Blood Reviews, 24: 191-199
- Engström-Schläwicke K., Broberg K., Concha G., B.Nermell, Warholm M., Vahter M. 2007. Genetic Polymorphisms Influencing Arsenic Metabolism: Evidence from Argentina. Environ Health Perspect, 115, 4: 599-605
- Essumang D.K., 2009. Analysis and human health risk assessment of arsenic, cadmium and mercury in Manta birostris (Manta ray) caught along the Ghanian coastline. Human Ecological Risk Assess, 15, 5: 985-998
- European Comission 2007. Institute for Reference Materials and Measurements, Certified reference material BCR[®]- 627, 2 str.
- Falnoga I., Zelenik Pevec A., Šlejkovec Z., Tušek Žnidarič M., Zajc I., Jurković Mlakar S., Marc J. 2012. Arsenic Trioxide (ATO) Influences the Gene Expression of Metallothioneins in Human Glioblastoma Cells. Biological Trace Element Research 149: 331-339
- Farell E. R. 1998. RNA methodologies. 2nd ed. New York, Academic Press : 37-53
- Ferguson B.S., Nam H., Hopkins R.G., Morrison R.F. 2010. Impact of Reference Gene Selection for Target Gene Normalization on Experimental Outcome Using Real-Time qRT-PCR in Adipocytes. PLOS ONE, 5: 1-10
- Fishbase. World Fish Center; 2005. URL : <http://www.fishbase.org> (24. november 2013)
- Flora S.J.S., Dwivedi N. 2012. A Toxicological Review of Gallium Arsenide. Defence Science Journal, 62, 2: 95-104
- Francesconi K.A., Edmonds J.S. 1996. Arsenic and Marine Organism. Advances in Inorganic Chemistry, 44: 147-189

Francesconi K.A., Edmonds J.S. 1998. Arsenic species in Marine Samples. *Croatica Chemica Acta*, 71, 2: 343-359

Francesconi K.A., 2010. Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure and Applied Chemistry*, 82, 2: 373-381

Frederick M. A., Roger B., Robert E. K., David D. M. 1999. *Current protocols in molecular biology*. 4th ed. New York, John WILEY & Sons: 4-10

Fujihara J., Kunito T., Kubota R., Tanabe S. 2003. Arsenic accumulation in livers of pinnipeds, seabirds and sea turtles: subcellular distribution and interaction between arsenobetaine and glycine betaine. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 136: 287-296

Gailer J., Irgolic K.J., Francesconi K.A., Edmonds J.S. 1995. Metabolism of arsenic compounds by the blue mussel *Mytilus edulis* after accumulation from seawater spiked with arsenic compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, 9: 341-355

Gamble M. V., Liu X., Ahsan H., R.Pilsner J., Ilievski V., Slavkovich V., Parvez F., Levy D., Factor-Litvak P., Graziano J.H. 2005. Folate, Homocysteine, and Arsenic Metabolism in Arsenic-Exposed Individuals in Bangladesh. *Environmental Health Perspectives*, 113, 12: 1683-1688

Garrett S. H., Belcastro M., Sens M. A, Somji S., Sens D. A. 2001. Acute exposure to arsenite induces metallothionein isoform-specific gene expression in human proximal tubule cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 64, 4: 343-355

Gene Target Solutions 2013.

URL: <http://www.genetargetsolutions.com/pages/Real%252dTime-PCR-FAQS-.html>
(10. april 2013)

Ghanthimathi S., Aminah A., Salmijah S., Ujanjg T., Izzah A. 2012. Comparison of Microwave Assisted Acid Digestion Methods for ICP-MS Determination of Total Arsenic in Fish Tissue. *Sains Malaysiana*, 42, 12: 1557-1564

- Goessler W., Pavkov M. 2003. Accurate quantification and transformation of arsenic compounds during wet ashing with nitric acid and microwave assisted heating. *Analyst* 128: 796-802
- Grotti M., Soggia F., Lagomarsino C., Goessler W., Francesconi K. A. 2008. Arsenobetaine is a significant arsenical constituent of the red Antarctic alga *Phyllophora antarctica*. *Environmental Chemistry* 5, 3: 171-175
- Grund S.C., Hanusch K., Wolf H. U. 2008. Arsenic and Arsenic compounds. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*
- Gutierrez-Mejia E.G, Lares M. L., Sosa-Nishizaki O., 2009. Mercury and Arsenic in Muscle and Liver of the Golden Cownose Ray, *Rhinoptera steindachneri*, Evermann and Jenkins, 1891, from the Upper Gulf of California, Mexico. *Bull Environmental Contamination and Toxicology*, 83: 230-234
- Hanaoka K., Tanaka Y., Nagata Y., Yoshida K., Kaise T. 2001. Water-soluble arsenic residues from several arsenolipids occurring in the tissues of the starspotted shark *Musterus manazo*. *Applied Organometallic Chemistry*, 15: 299-305
- Haq F., Mahoney M., Koropatnick J., 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533: 211–226
- Hata A., Yamanaka K., Habib M. A., Endo Y., Fujitani N., Endo G. 2012. Arsenic speciation analysis of urine samples from individuals living in an arsenic-contaminated area in Bangladesh. *Environ Health Prev Med*, 17: 235-245
- He X., Ma Q. 2009. Induction of Metallothionein I by Arsenic via Metal-activated Transcription Factor 1: CRITICAL ROLE OF C-TERMINAL CYSTEINE RESIDUES IN ARSENIC SENSING. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 12609-12621

- Hinojosa Reyes L., Guzmán Mar J.L., Mizanur Rahman G.M., Seybert B., Fahrenholz T., Skip Kingston H.M. 2009. Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 78: 983-990
- Hopenhayn C. 2006. Arsenic in Drinking Water: Impact on Human Health. *Elements*, 2: 103-107
- Hughes M.F. 2002. Arsenic toxicity and potencial mechanism of action. *Toxicology Letters*, 133: 1-16
- Hughes M. F. 2006. Biomarkers of Exposure: A Case Study with Inorganic Arsenic. *Environ Health Perspect*, 114, 11: 1790-1796
- Iyengar G.V. 1998. Reevaluation of the trace element content in Reference Man. *Radiation Physics and Chemistry*, 51: 6545-6560
- Jacob S.T., Majumder S., Ghoshal K. 2002. Suppression of Metallothionein-I/II Expression and Its Probable Molecular Mechanisms. *Environ Health Perspect*, 110:827-830
- Jadras I., Šantić M., Pallaoro A. 2004. Diet composition of the eagle ray, *Myliobatis aquila* (Chondrichthyes: Myliobatidae), in the Eastern Adriatic Sea. *Cybium* 28, 4: 372-374
- Jiang G., Gong Z., Li X. F., Cullen W. R., Le X. C., 2003. Interaction of trivalent arsenicals with metallothionein. *Chemical Research in Toxicology*, 16, 7: 873-880
- Jin R., Huang J., Tan P., Bay B-H. 2004. Clinicopathological significance of metallothioneins in breast cancer. *Pathology & Oncology Research*, 10: 74-79
- Jones F.T. 2007. A Broad View of Arsenic. *Poultry Science* 86: 2-14

- Kamel O. E., Mnasri N., Boumaiza M., Ben Amor M. M., Reynaud C., Capape C. 2010. Additional records of the bull ray *Pteromylaeus bovinus* (Chondrichthyes: Myliobatidae), in the Lagoon of Bizerte (Northern Tunisia, Central Mediterranean). *Annales, Series Historia Naturalis* 20, 2: 169-174
- Kennedy V. S. 1976. Arsenic Concentrations in Some Coexisting Marine Organisms from Newfoundland and Labrador. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33, 6: 1388-1393
- Khan M.A., Ho Y.S. 2011. Arsenic in Drinking Water: A Review on Toxicological Effects, Mechanism of Accumulation and Remediation. *Asian Journal of Chemistry*, 23, 5: 1889-1901
- Kirby J., Maher W., 2002. Tissue accumulation and distribution of arsenic compounds in tree marine fish species: relationship to trophic position. *Applied Organometallic Chemistry*, 16: 108-115
- Kreppel H., Bauman J. W., Liu J., McKim J.M. Jr., Klaassen C.D. 1993. Induction of metallothionein by arsenicals in mice. *Toxicological Sciences* 20, 2: 184-189
- Kubota R., Kunito T., Tanabe S. 2001. Arsenic accumulation in the liver tissue of marine mammals. *Environmental Pollution* 115: 303-312
- Lai V. W.M., Cullen W.R., Ray S. 1999. Arsenic speciation in scallops. *Marine Chemistry*, 66: 81-89
- Larsen H., Francesconi K.A. 2003. Arsenic concentrations correlate with salinity for fish taken from the North Sea and Baltic waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83: 283-284
- Lehmann B, Ebeling E, Alsen-Hinrichs C. 2001. Kinetics of arsenic in human blood after a fish meal. *Gesundheitswesen*, 63, 1: 42-48

- Le X.C., Li X.F., Lai V., Ma M., Yalcin S., 1998. Feldmann J., Simultaneous speciation of selenium and arsenic using elevated temperature liquid chromatography separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection Spectrochim. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 53: 899-909
- Lloyd J.R., Oremland R.S. 2006. Microbial Transformations of Arsenic in the Environment: From Soda Lakes to Aquifers. Elements, 2, 2: 85-90
- Liu J., Leng M.L., Yang Q., Shan K., Shen J., Zhou Y., Zhang X., Dill A. L., Waalkes M. P. 2007. Blood Metallothionein Transcript as a Biomarker for Metal Sensitivity: Low Blood Metallothionein Transcripts in Arsenicosis Patients from Guizhou China. Environ Health Perspect, 115, 7: 1101-1106
- Liu J., Liu Y., Goyer R.A., Achanzar W., Waalkes M.P., 2000. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. Toxicological Science, 55, 2: 460-467
- Liu Y., Maret W. 2008. Human metallothionein metallomics. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 23: 1055-1062
- Lovell MA, Farmer JG. 1985. Arsenic speciation in urine from humans intoxicated by inorganic arsenic compounds. Human Toxicology, 4, 2: 203-14
- Maher W., Butler E. 1988. Arsenic in marine environment. Applied Organometallic Chemistry, 2: 191-214
- Maher W., Goessler W., Kirby J., Raber G. 1999. Arsenic concentrations and speciation in the tissues and blood of Sea Mullet (*Mugil Cephalus*) from lake Macquaire, NSW, Australia. Marine Chemistry, 68: 169-183
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T. 2002. Arsenic round the world: A review. Talanta, 58: 201-235

- Mavrič B., Jenko R., Makovec T., Lipej L. 2004. On the occurrence of the pelagic stingray, *Dasyatis violacea* (Bonaparte, 1832), in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic), *Annales. Series historia naturalis*, 14, 2: 181-186
- McSheehy S., Morabito R., Szpunar J., Quevauviller P. 2003. The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22, 4: 191-209
- Miles A. T., Hawksworth G. M., Beattie J. H., Rodilla V., 2000. Induction, Regulation, Degradation, and Biological Significance of Mammalian Metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 1: 35–70
- Moleirinho A., Carneiro J., Matthiesen R., Silva R. M., Amorin A., Azevedo L., 2011. Gain, Losses and Changes of Function after Gene Duplication: Study of the Metallothionein Family. *PloS ONE*, 6, 4: e18487
- Mollet H. F. 2002. Distribution of the pelagic stingray *Dasyatis violacea* (Bonaparte, 1832) off California, central America, and worldwide. *Marine. Freshwater Res.* 53: 525–530
- Morin G, Calas G. 2006. Arsenic in Soils, Mine Tailings, and Former Industrial Sites. *Elements*, 2, 2: 97-101
- Nachman K.E., Raber G., Francesconi K.A., Navas-Acien A., Love D.C. 2012. Arsenic species in poultry feather meal. *Science of the Total Environment*, 417-418, 183-188
- Ngu T. T., Stillman M. J. 2006. Arsenic binding to human metallothionein. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 38: 12473-12483
- Nizam S., Kato M., Yatsuya H., Khalequzzaman Md., Ohnuma S., Naito H., Nakajima T. 2013. Differences in Urinary Arsenic Metabolites between Diabetic and Non-Diabetic Subjects in Bangladesh. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10: 1006-1019

- NRC. 1999. Arsenic in Drinking Water. Washington, DC: National Research Council.
- O'Day P.A. 2006. Chemistry and Mineralogy of Arsenic, *Elements*, 2, 2: 77-83
- Ogrinc N., Faganeli J. 2005, Phosphorous regeneration and burial in costal marine sediments (the Gulf of Trieste, N Adriatic). *Materials in Geoenvironment*, 2, 1: 103-105
- Penrose W.R., Conacher H.B., Black R., Méranter J.C., Miles W., Cunningham H.M., Squires WR. 1977. Implications of inorganic/organic interconversion on fluxes of arsenic in marine food webs. *Environmental Health Perspectives*, 19: 53–59
- Pergantis S.A., Wangkarn S., Francesconi K. A., Oates J. E. T. 2000. Identification of Arsenosugars at the Picogram Level Using Nano electrospray Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72, 2: 357-366
- Pettine M., Camusso M., Martinotti W. 1992, Dissolved and particulate transport of arsenic and chromium in the Po River (Italy), *Science of The Total Environment*, 119: 253–280
- Pierce S.K., Rowland-Faux L.M., O'Brien S.M. 1992. Different salinity tolerance mechanisms in Atlantic and Chesapeake Bay conspecific oysters: glycine betaine and amino acid pool variations. *Marine Biology*, 113: 107-115
- Pullen-James S., Woods S. E. 2006. Occupational Arsine Gas Exposure. *Journal of the National Medical Association*, 98, 12: 1998-2001
- Quaife C., Findley S. D., Erickson J. C., Froelick G. J., Kelly E. J., Zambrowicz B. P., Palmiter R. D. 1994. Induction of a new metal-lothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33: 7250-7259
- Rahman M. A., Hasegawa H., Lim R.P. 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environmental Research*, 116: 118–135

- Rossmann, T.G. 2003. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research*, 533: 37–65
- Ruttkay-Nedecky B., Nejdli L., Gumulec J., Zitka O., Masarik M., Eckschlager T., Stiborova M., Adam V., Kizek R. 2013. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Science*, 14: 6044-6066
- Sens M. A., Somji S., Garrett S.H., Beal C.L., Sens D. A., 2001. Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancer having a poor prognosis. *The American Journal of Pathology* 159: 21-26
- Seyler P., Martin J.M. 1991. Arsenic and selenium in a pristine river-estuarine system: the Krka (Yugoslavia). *Marine Chemistry*, 34: 137–151
- Soylak, M., Tuzen, M., Narin, I., Sari, H. 2004. Comparison of microwave, dry and wet digestion procedures for the determination of trace metal contents of spice samples produced in Turkey. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12: 254–258
- Stanelle R. D., McShane W.J., Dodova E. N., Pappas R. S., Kobelski R. J. 2010. Rapid Analysis of Lewisite Metabolites in Urine by high-Performance Liquid Chromatography – inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 34, 3: 122-128
- Stellman J.M., Stellman S.D., Christian R., Weber T., Tomasallo C. 2003. The extent and patterns of usage of Agent Orange and other herbicides in Vietnam. *Nature*, 422, 6933: 681-687
- Storelli M.M., Marcotrigiano G.O. 2000. Organic and inorganic arsenic and lead in fish from South Adriatic Sea, Italy. *Food Additives and Contaminants*, 17: 763-768
- Šlejkovec Z., Falnoga I., Goessler W., Elteren J.T., Raml R., Podgornik H., Černelc P. 2008. Analytical artefacts in the speciation of arsenic in clinical samples. *Analytica Chimica Acta*, 607: 83-91

- Šlejkovec Z., Kápolna E., Ipolyi I., Elteren J. T. 2006. Arsenosugars and other arsenic compounds in littoral zone algae from the Adriatic Sea. *Chemosphere*, 63, 7: 1098-1105
- Šlejkovec Z., Van Elteren J.T., Byrne A.R., 1999. Determination of arsenic compounds in reference materials by HPLC-(UV)-HG-AFS. *Talanta* 49: 619-627
- Thirumoorthy N., Sunder A. S., Kumar KT., Kumar M S., Ganesh GNK, Chatterjee M. 2011. A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology. *World Journal of Surgical Oncology*, 9:54
- Toyama M, Yamashita M, Hirayama N, Murooka Y., 2002. Interactions of arsenic with human metallothionein-2. *The Journal of Biochemistry*, 132: 217–221
- Turk T. 2007. *Pod gladino mediterana*, 1. izd. Ljubljana, Založba Modrijan: 592 str.
- Vahter M., Concha G. 2001. Role of Metabolism in Arsenic Toxicity. *Pharmacology & Toxicology*, 89: 1–5
- Vahter M., 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181-182: 211-217
- Valenzuela O.L., Borja-Aburto V. H., Garcia-Vargas G. G., Cruz-Gonzalez M.B., Garcia-Montalvo E. A., Calderon-Aranda E. S., Del Razo L. M. 2005. Urinary Trivalent Methylated Arsenic Species in a Population Chronically Exposed to Inorganic Arsenic. *Environ Health Perspect*, 113, 3: 250-254
- Van Geen A., Ahsan H., Horneman A. H., Dhar R. K., Zheng Y., Hussain I., Ahmed K. M., Gelman A., Stute M., Simpson H. J., Wallace S., Small C., Parvez F., Slavkovich V., LoIacono N.J., Becker M., Cheng Z., Momotaj H., Shahnewaz M., Seddiq A.A., Graziano J. H. 2002. Promotion of well-switching to mitigate the current arsenic crisis in Bangladesh. *Bulletin of the World Health Organization* , 80: 732-737

- Van Elteren J.T., Šlejkovec Z. 1997. Ion-exchange separation of eight arsenic compounds with HPLC-UV-HG-AFS and stability testing of the compounds related to food treatment procedures. *Journal of Chromatography A*, 789: 339-348
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: research 0034.1–0034.11
- Vaughan D. J. 2006. Arsenic. *Elements*, 2, 2: 71-75
- Vukašinović-Pešić V., Dikanović M., Blagojević N.Z., Rajaković L.V. 2005. The source characteristics and distribution of arsenic in the environment. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 11, 1: 44-48
- WHO (2001) Arsenic in drinking water: fact Sheet 210.
URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en/print.html> (19. januar 2013)
- Wu M.T, Demple B., Bennett R.A., Christiani D.C., Fan R., Hu H., 2000. Individual variability in the zinc inducibility of metallothionein-IIA mRNA in human lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 61, 7: 553-67
- Yamada H., Koizumi S., 1991. Metallothionein induction in human peripheral blood lymphocytes by heavy metals, *Chemico-Biological Interactions*, 78: 3347–3354
- Yan D.W., Fan J.W., Yu Z.H., Li M.X., Wen Y.G., Li D.W., Zhou C.Z., Wang X.L., Wang Q., Tang H.M., Peng Z.H. 2012. Downregulation of metallothionein 1F, a putative oncosuppressor, by loss of heterozygosity in colon cancer tissue. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 6: 918-926
- Zhou Y. D., Sens M. A., Garrett S. H., Somji S., Park S., Gurel V., Sens D. A. 2006. Enhanced Expression of Metallothionein Isoform 3 Protein in Tumor Heterotransplants Derived from As³⁺ - and Cd²⁺ -Transformed Human Urothelial Cells. *Toxicological sciences*, 93, 2: 322-330

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Damjani Drobne za uporabne kritike in koristne nasvete pri pisanju magistrske naloge. Hvala somentorci doc. dr. Zdenki Šlejkovec ter recenzentki doc. dr. Ingrid Falnoga, ki sta mi omogočili izjemno zanimivo raziskovanje iz katerega sem se naučila veliko novega in uporabnega, zahvaljujem se tudi za izjemno potrpežljivost, prijaznost, prilagodljivost, razumevanje ter skrbno in motivacijsko usmerjanje pri pisanju raziskovalne naloge.

Zahvaljujem se asist. dr. Janji Zupan, Manji Cedilnik dipl. inž. lab. biomed. iz Fakultete za farmacijo (Katedra za klinično biokemijo) ter dr. Darji Mazej iz Inštituta Jožef Štefan (Odsek za znanost o okolju) za izjemno pomoč pri delu v laboratoriju, njihovo prijaznost, razumevanje ter potrpežljivost. Hvala tudi osebjem in pacientki na Oddelku za hematologijo (UKC) za zbrane vzorce.

Posebna zahvala velja tudi vodji Odseka za znanosti o okolju, IJS, prof. dr. Mileni Horvat in vodji Katedre za klinično biokemijo UL FF, prof. dr. Janji Marc, ki sta mi omogočili delo v laboratorijih obeh institucij.

Hvala prijateljem Nini, Domnu, Mateju ter Martini za njihovo prostovoljnost pri raziskovalnem delu. Prav tako se zahvaljujem Tjaši Verdev za lektoriranje magistrske naloge ter Sašu Pergarju za prevod povzetka.

Za izjemno podporo in vzpodbudne besede skozi vsa študentska leta pa se posebno zahvaljujem svoji družini ter vsem prijateljem.

Priloga I: a) povprečne ne normalizirane relativne koncentracije mRNA genov MT (ng μL^{-1}) in njihove standardne deviacije

gen	MT1a		MT1e		MT1f		MT1x		MT2a		MT2a _{pr}		MT3		GAPDH		ACTB		RPLP0	
	vzorec	konc	SD	konc	SD	konc	SD	konc	SD	konc	SD	konc	SD	konc	SD	konc	SD	konc	SD	konc
K1	0,311	0,14	2,257	0,432	2,126	0,179	4,504	0,559	1,505	0,029	1,88	0,042	1,768	0,439	2,551	0,03	2,541	0,264	1,125	0,01
K2	0,760	0,21	2,639	0,478	2,065	0,457	2,217	0,06	1,336	0,057	1,728	0,052	0,231	0,03	2,499	0,097	1,582	0,103	0,555	0,014
K3	2,270	0,259	28,846	13,445	21,160	0,252	21,126	1,012	7,556	8,344	17,495	/	18,440	1,061	12,879	0,651	12,341	0,493	14,414	0,900
K4	4,134	1,54	17,19	8,272	5,757	0,871	5,519	0,82	2,558	0,083	3,036	0,059	2,674	0,798	1,96	0,056	2,196	0,11	1,018	0,027
K5	0,867	0,29	2,384	0,255	6,648	1,026	11,6	3,013	1,909	0,264	2,312	0,098	3,576	0,739	2,128	0,113	2,506	0,069	1,05	0,017
K6	0,349	0,10	1,441	0,221	4,074	0,215	6,024	1,531	0,952	0,015	1,233	0,05	0,677	0,117	1,68	0,117	1,973	0,115	0,745	0,009
K7	1,409	0,46	8,641	1,21	6,118	0,747	17,06	2,584	2,465	0,096	3,596	0,099	2,072	0,613	3,056	0,055	3,505	0,103	0,842	0,055
B1	1,783	0,746	0,31	0	5,65	0,372	8,56	0,537	1,97	0,11	2,54	0,023	0	0	2,84	0,109	1,29	0,083	0,47	0,049
B2	1,40	0,48	2,89	3,237	2,96	0,389	2,80	0,483	1,53	0,044	1,85	0,037	0,31	0,062	7,95	0,245	2,14	0,011	1,50	0,185
B3	0,24	0,104	0,31	0	4,92	0,49	3,37	0,37	0,87	0,10	0,99	0,05	0,62	0,51	13,22	0,39	5,38	0,23	1,28	0,03
B4	0,09	0,013	0,47	0,216	0,18	0,08	0,80	0,13	1,37	0,11	1,61	0,03	0	0	1,08	0,06	1,42	0,15	0,20	0,05
B5	0,05	0,02	0,31	0,00	0,11	0,06	0,68	0,19	1,81	0,04	2,00	0,10	0,50	0,00	1,28	0,06	1,51	0,06	0,41	0,03
B6	0,15	0,04	0,31	0	0,57	0	0,71	0,12	1,07	0,01	1,31	0,07	0,28	0,00	1,45	0,32	1,47	0,04	0,28	0,01
B7	0,23	0,105	6,71	9,042	0,14	0,063	0,66	0,122	1,57	0,105	1,79	0,022	0,33	0,095	1,20	0,02	1,49	0,019	0,24	0,01

b) rezultati normalizirani na vrednosti *Actb*

gen vzorec	MT1a	MT1e	MT1f	MT1x	MT2a	MT2a_pr	MT3	GAPDH	RPLP0	ACTB
K1	0,12239	0,88836	0,83694	1,77270	0,59254	0,73996	0,69575	1,00395	0,44271	1
K2	0,48036	1,66813	1,30564	1,40137	0,84425	1,09233	0,14632	1,57972	0,35103	1
K3	0,18392	2,33740	1,71456	1,71180	0,61226	1,41764	1,49419	1,04361	1,16798	1
K4 ^a	1,88213	7,82519	2,62115	2,51259	1,16468	1,38234	1,21768	0,89228	0,46355	1
K5	0,34594	0,95126	2,65233	4,62687	0,76147	0,92238	1,42691	0,84924	0,41910	1
K6	0,17675	0,73036	2,06517	3,05370	0,48280	0,62485	0,34329	0,85165	0,37768	1
K7	0,40201	2,46549	1,74550	4,86640	0,70320	1,02592	0,59116	0,87189	0,24022	1
POV(K1-K7) brez K4	0,46503	1,36474	1,66996	2,64759	0,70369	1,00666	0,74301	1,00570	0,45978	1
B1	0,75404	0,24388*	1,45416	0,90607*	0,76434	0,90669	0,00000	2,21319*	0,36465	1
B2	0,65232	1,35100 ^a	1,38748	1,31253*	0,71728	0,86315	0,14373*	3,72314*	0,70300	1
B3	0,04491	0,05859*	0,91224*	0,62643*	0,16212*	0,18384*	0,11955*	2,45849*	0,23769	1
B4	0,06764	0,34618*	0,12581*	0,56019*	0,96780*	1,13642	0,00000	0,76289	0,13993*	1
B5	0,03493	0,20419*	0,07486*	0,44995*	1,20054*	1,32443*	0,32632*	0,84685	0,26922	1
B6	0,10055	0,21202*	0,38712*	0,48594*	0,73216	0,89381	0,19507*	0,99450	0,18827	1
B7	0,15540	4,59133 ^a	0,09431*	0,44208*	1,05477*	1,20126	0,22261*	0,80297	0,15861*	1

a vrednosti, ki jih nismo vključili v statistično analizo zaradi prevelike variabilnosti podatkov (SD), * statistično značilna razlika ($p < 0,05$) glede na kontrolo (brez upoštevanja vrednosti vzorca K4)

c) rezultati normalizirani na vrednosti *Rplp0*

gen vzorec	MT1a	MT1e	MT1f	MT1x	MT2a	MT2a_pr	MT3	GAPDH	ACTB	RPLP0
K1	0,27644	2,00662	1,89047	4,00419	1,33843	1,67141	1,57156	2,26773	2,25880	1
K2	1,36846	4,75217	3,71950	3,99221	2,40510	3,11182	0,41685	4,50031	2,84880	1
K3	0,48438	0,96290	1,17647	1,33001	0,80156	0,18554	1,89390	1,22910	1,32336	1
K4 ^a	4,06022	16,88087	5,65447	5,42029	2,51251	2,98205	2,62685	1,92486	2,15725	1
K5	0,82543	2,26974	6,32856	11,03991	1,81689	2,20084	3,40467	2,02633	2,38604	1
K6	0,46798	1,93381	5,46805	8,08545	1,27832	1,65446	0,90895	2,25495	2,64775	1
K7	1,67356	10,26368	7,26640	20,25849	2,92739	4,27083	2,46097	3,62963	4,16293	1
K8	7,02536	2,33071	6,23227	5,00698	4,22903	5,56794	2,29083	3,82182	4,55056	1
POV(K1-K7) brez K4	1,73166	3,50281	4,58310	7,67389	2,11382	2,66612	1,84968	2,81855	2,54071	1
B1	2,09960	0,67241*	4,00568	2,47420	2,10575	2,49837	0,00000	6,16621*	2,75736	1
B2	0,90959	1,90526 ^a	2,00895*	1,96664*	1,03117*	1,21513	0,21759*	5,35424*	1,43854*	1
B3	0,18581	0,24339*	3,85227	2,64095	0,68283*	0,77389*	0,49128*	10,35028*	4,2146*	1
B4	0,47851	3,09903	0,90873*	4,39669	7,26866*	8,61734*	0,00000	5,77259*	7,65320*	1
B5	0,13345	0,77257	0,27451*	1,66055*	4,47048*	4,93557*	1,30526	3,14999	3,72476*	1
B6	0,54519	1,14411	2,10588*	2,57898	3,89141*	4,75633*	1,04135*	5,28689*	5,40720*	1
B7	0,99402	27,87090 ^a	0,59986*	2,77674	6,66166*	7,58544*	1,41967	5,06881*	6,31562*	1

^a vrednosti, ki jih nismo vključili v statistično analizo zaradi prevelike variabilnosti podatkov (SD), * statistično značilna razlika ($p < 0,05$) glede na kontrolo (brez upoštevanja vrednosti vzorca K4)

d) rezultati normalizirani na geometrijsko sredino Actb in Rplp0

gen vzorec	MT1a	MT1e	MT1f	MT1x	MT2a	MT2a_pr	MT3	GAPDH
K1	0,18394	1,33514	1,25786	2,66425	0,89055	1,11210	1,04566	1,50887
K2	0,81078	2,81554	2,20370	2,36528	1,42496	1,84367	0,24697	2,66631
K3	0,17018	2,16279	1,58648	1,58393	0,56653	1,31174	3,31174	0,96565
K4 ^a	2,76439	11,49330	3,84984	3,69039	1,71064	2,03032	1,78848	1,31054
K5	0,53437	1,46939	4,09700	7,14704	1,17622	1,42479	2,20412	1,31181
K6	0,28760	1,18843	3,36042	4,96896	0,78560	1,01676	0,55860	1,38579
K7	0,82024	5,03041	3,56139	9,92904	1,43476	2,09321	1,20617	1,77895
K8	3,29334	1,09259	2,92155	2,34716	1,98248	2,61013	1,07389	1,79159
POV(K1- K7) brez K4	0,87149	2,33362	2,71263	4,42938	1,18016	1,63034	1,37817	1,62985
B1	1,25744	0,40469*	2,41181	1,49620*	1,29319	1,52704	0,00000	3,72483*
B2	0,76899	1,60260 ^a	1,66742	1,50059*	0,83153	1,01796*	0,17669*	4,34833*
B3	0,09169	0,11941*	1,87416*	1,25709*	0,33989*	0,37157*	0,24235*	5,04855*
B4	0,17222	1,02345*	0,33574*	1,60453*	2,73834*	3,15989*	0,00000	1,64664
B5	0,06558	0,39702*	0,14331*	0,70599*	2,30473*	2,50408*	0,65263	1,63227
B6	0,23412	0,49249*	0,90286*	1,19877*	1,70002*	2,07082	0,45071*	2,45076
B7	0,39298	11,31191 ^a	0,23780*	1,13652*	2,69676*	3,06019*	0,56205	2,01383

^a vrednosti, ki jih nismo vključili v statistično analizo zaradi prevelike variabilnosti podatkov (SD), * statistično značilna razlika ($p < 0,05$) glede na kontrolo (brez upoštevanja vrednosti vzorca K4)

