

Izloženost osječke studentske populacije arsenu utvrđena analizom noktiju

Uremović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:422600>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Ana Uremović

**IZLOŽENOST OSJEČKE STUDENTSKE POPULACIJE ARSENU UTVRĐENA
ANALIZOM NOKTIJU**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij: Znanost o hrani i nutricionizam

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Nastavni predmet: Prehrambena biokemija

Tema rada je prihvaćena na III. izvanrednoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini (2016./2017.) održanoj 3.srpnja 2017.

Mentor: doc. dr. sc. Bojan Šarkanj

Pomoć pri izradi: dr. sc. Tihomir Kovač

IZLOŽENOST OSJEČKE STUDENTSKE POPULACIJE ARSENU UTVRĐENA ANALIZOM NOKTIJU

Ana Uremović, 348-DI

Sažetak: Arsen je metaloid kojeg prirodno pronalazimo u vodi, tlu i zraku. Za toksični utjecaj na ljude najbitniji je unos anorganskog arsena iz vode za ljudsku potrošnju na području istočne Hrvatske. Također je bitno naglasiti i izloženost putem hrane i pića, budući da se takve vode koriste za navodnjavanje poljoprivrednih površina i pripremu hrane, pri čemu dolazi do prijelaza arsena. U ovom radu ispitivana je izloženost arsenu studenata znanosti o hrani i nutricionizma Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku akademskih godina od 2010./2011. do 2015./2016. Određena je koncentracija ukupnog arsena u uzorcima nožnih noktiju prikupljenih od 50 ispitanika te je uspoređivana izloženost arsenu studenata s obzirom na mjesto stanovanja (istočna Hrvatska i ostatak Hrvatske). Rezultati pokazuju značajnu razliku ($p < 0,01$) u izloženosti arsenu, pri čemu je izmjerena prosječna koncentracija za istočnu Hrvatsku $6,5 \mu\text{g/kg}$, a za ostale dijelove Hrvatske $1,9 \mu\text{g/kg}$.

Ključne riječi: arsen, izloženost, studentska populacija, nožni nokti

Rad sadrži: 34 stranica
14 slika
1 tablica
0 priloga
112 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. Tomislav Klapac | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Bojan Šarkanj | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. Mirna Habuda-Stanić | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. Lidija Jakobek-Barron | zamjena člana |

Datum obrane: 14. srpnja 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Biochemistry and Toxicology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Food science and nutrition

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Nutrition

Course title: Nutritional Biochemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its special session no. III (2016./2017.) held on July 3, 2017.

Mentor: *Bojan Šarkanj* assistant prof.

Technical assistance: *Tihomir Kovač, PhD*

EXPOSURE OF OSIJEK STUDENT POPULATION TO ARSENIC DETERMINED BY TOENAIL ANALYSIS

Ana Uremović, 348-DI

Summary: Arsenic is a metalloid naturally found in water, soil and air. In eastern Croatia, the most important determinant of toxicity in human population's intake of inorganic arsenic from drinkingwater. It should be stressed that exposure through foods and beverages is also possible since this water is used for irrigation of agricultural land and food preparation. This study determined exposure to arsenic in Food Science and Nutrition students of Faculty of Food Technology in Osijek from academic years 2010./2011. to 2015./2016. The concentration of total arsenic was determined in toenail samples collected from 50 subjects and compared arsenic exposure of students with regard to the place of residence (eastern Croatia vs. the rest of Croatia). The results show a significant difference ($p < 0.01$) in exposure to arsenic with an average concentration for eastern Croatia 6.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and for the rest of the Croatia 1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Key words: arsenic, exposure, student population, toenails

Thesis contains: 34 pages
14 figures
1 tables
0 supplements
112 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Tomislav Klapac</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Bojan Šarkanj</i> , assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Mirna Habuda-Stanić</i> , associate prof. | member |
| 4. <i>Lidija Jakobek-Barron</i> , associate prof. | stand-in |

Defense date: July 14, 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se svom mentoru doc. dr. sc. Bojanu Šarkanju na ukazanom povjerenju i pruženoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Također od srca se zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj potpori tijekom studija.

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	3
2.1.	ARSEN	4
2.1.1.	Apsorpcija	6
2.1.2.	Raspodjela	8
2.1.3.	Metabolizam i izlučivanje	8
2.2.	TOKSIČNOST ARSENA	9
2.2.1.	Toksičnost s obzirom na duljinuizloženosti arsenu	9
2.2.2.	Toksičnost s obzirom na zahvaćeni organ ili tkivo koje oštećuje.....	10
2.3.	BIOMARKERI IZLOŽENOSTI ARSENU	13
2.4.	ANALITIČKE METODE ZA DETEKCIJU ARSENA.....	14
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1.	ZADATAK.....	18
3.2.	MATERIJALI I METODE.....	18
4.	REZULTATI I RASPRAVA	20
5.	ZAKLJUČAK	27
6.	LITERATURA.....	28

1.UVOD

Arsen je metaloid čiji se tragovi pronalaze u stijenama, tlu, vodi i zraku, dok se veće koncentracije mogu pronaći u područjima antropogenih aktivnosti kao što su rudarstvo, taljenje, izgaranje fosilnih goriva i korištenje pesticida (WHO, 2001).

Najveći utjecaj na ljudsko zdravlje i izloženost arsenu ima voda za piće koja se uzima iz različitih izvora ovisno o području te je tako možemo podijeliti na: atmosfersku ili oborinsku vodu, površinsku vodu (rijeke, jezera, mora) i podzemnu vodu (izvori, bunari). Upravo je za područje istočne Hrvatske karakteristična podzemna voda koja dolazi u dodir s depozitima koji sadrže visoke koncentracije arsena te je stoga moguće i u vodi za piće pronaći povećane koncentracije arsena. Takve tvrdnje dokazuju i rezultati ispitivanja vode iz vodoopskrbnih sustava istočne Hrvatske koji pokazuju da pojedini analizirani uzorci vode za piće sadrže arsen iznad maksimalno dopuštenih koncentracija ($10 \mu\text{g/L}$) (Ćavari sur., 2005; 2010; Bošnjak i sur., 2008).

Također, važno je naglasiti da se takve vode prisutne u istočnoj Hrvatskoj koriste za navodnjavanje poljoprivrednih površina i pripremu hrane, stoga je prisutan i unos arsena putem hrane i pića.

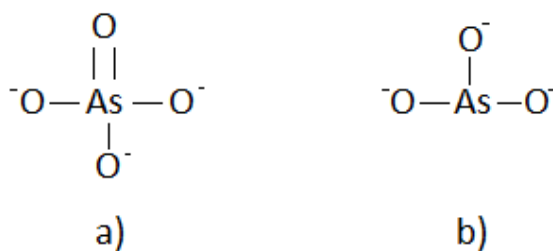
Konzumacija vode koja sadrži tako visoke koncentracije arsena može dovesti do različitih problema sa zdravljem kao što su diabetes mellitus, ishemija srca, hipertenzija, periferna vaskularna oboljenja (Ćavar i sur., 2005) i dr. te kroničnim trovanjem arsenom može doći i do nastanka karcinoma. Upravo zbog navedenih rizika ova tema je vrlo aktualna u posljednje vrijeme i izaziva zabrinutost sve većeg broja ljudi s područja istočne Hrvatske (Andrijaševci, Komletinci, Garešnica, Osijek, Čepin, Našice, i dr.). U ovom radu bit će pokazane razlike u izloženosti arsenu studenata znanosti o hrani i nutricionizma Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku s obzirom na mjesto stanovanja (istočna Hrvatska i ostatak Hrvatske) analizom ukupnog arsena iz uzoraka nožnih noktiju.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. ARSEN

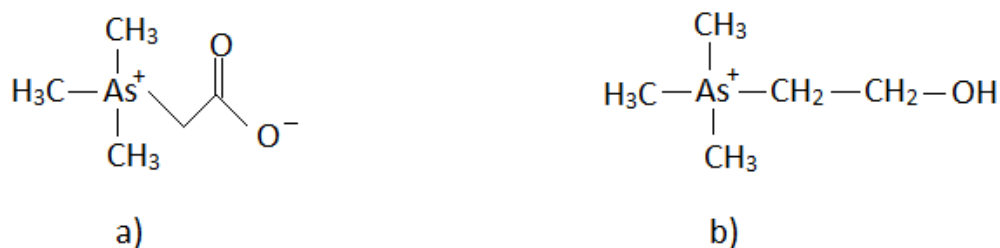
Arsen je metaloid prisutan u četiri oksidacijska stanja: As(-III) (arsin), As(0) (arsen), As(+III)(arsenit), As(V) (arsenat). Prirodno se nalazi u tlu, vodi, stijenama i zraku, a u okoliš dospijeva i kao nusproizvod poljoprivrednih i industrijskih procesa (Mandal i sur., 2002). Izaziva mnogobrojne probleme sa zdravljem te se svrstava u skupinu spojeva koji su karcinogeni za ljude (IARC, 2009). Iako se ponekad može u prirodi pronaći u elementarnom stanju, najčešće je dio kemijskih spojeva. Spojeve arsena možemo podijeliti na 2 skupine s obzirom na kemijske veze s drugim elementima:

Anorganski spojevi arsena (arsen kemijski vezan na druge elemente, osim ugljika): najčešće u obliku arsenata i arsenita (**Slika 1**). Pronalazimo ga u industriji, vodi za piće kontaminiranoj arsenom iz podzemnih depozita te biljnoj hrani zbog navodnjavanja poljoprivrednih površina takvom vodom, toksičniji je i duže se zadržava u organizmu te je često povezan s mnogim zdravstvenim problemima (Tchounwou i sur., 2012).



Slika 1. Strukturna formula a) arsenata b) arsenita

Organski spojevi arsena (arsen kemijski vezan na ugljik i druge elemente): najčešće u obliku arsenobetaina i arsenokolina (**Slika 2**). Manje su toksični i brže se izlučuju iz organizma. Pronalazimo ih u hrani kao što su riba i školjkaši (Šarkanj i sur., 2010).



Slika 2. Molekulska formula a) arsenobetaina, b) arsenokolina

S obzirom da najveći doprinos unosu anorganskog arsena u istočnoj Slavoniji daje kontaminirana voda za piće (Ćavar i sur., 2005), a zatim slijede žitarice koje su karakteristične za prehranu ovog područja, populacija je izložena visokim koncentracijama arsena (Šarkanj i sur., 2010). Stoga je važno spomenuti neke od metoda prehrane i pripreme hrane koje mogu doprinijeti redukciji izloženosti arsenu:

- Unos selena u preporučenim dozama zbog interakcije s arsenom te zbog njegovog antioksidativnog djelovanja (u većini radova dokazano zaštitno djelovanje, iako nekoliko studija nije utvrdilo učinkovitost selena ili čak opisuju pojačavanje štetnog djelovanja kod visoke izloženosti arsenu) (Klapec i sur., 1998; 2004),
- Prehrana visokovrijednim bjelančevinama bogatim aminokiselinama sa sumporom koje su prekursori u sintezi glutaciona, endogenog antioksidansa koji ubrzava izlučivanje arsena (Maiti i Chatterjee, 2001; Nandi i sur., 2005),
- Adekvatan unos folata, lecitina, metionina, vitamina B12 i dr. zbog pospješivanja metabolizma arsena (Nandi i sur., 2005; Bošnjak i sur., 2008),
- Uklanjanje vanjske ovojnice žitarica te njihovo rafiniranje (EFSA, 2009),
- Namakanje žitarica, kuhanje s vodom u suvišku te bacanje vode (redukcija arsena za oko 60%) (EFSA, 2009),
- Pranje i guljenje voća i povrća (EFSA, 2009).

Također, obrada voda je vrlo važan skup procesa koji doprinosi smanjenju ili uklanjanju arsena i nekoliko je najvažnijih:

- Koagulacija i flokulacija koje se temelje na neutralizaciji i aglomeraciji čestica, što omogućuje njihovo uklanjanje iz vode taloženjem ili filtracijom,
- Membranske tehnike (osobito reverzna osmoza), pri čemu se selektivna membrana primjenjuje za odjeljivanje čestica do kojeg dolazi uslijed razlike u veličini, obliku ili kemijskoj strukturi,
- Korištenje adsorbensa (zeoliti, aktivni ugljen, željezov oksid, nanočestice adsorbensa...),
- Ionsko-izmjenjivačke metode podrazumijevaju proces izmjene iona (vezanje iona) iz otopine na kruti ionski izmjenjivač koji otpušta stehiometrijski ekvivalentnu količinu iona istovrsnog naboja,

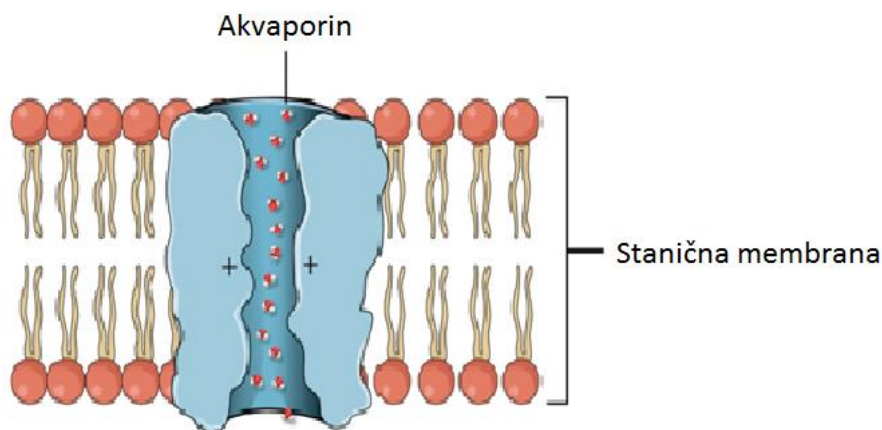
- Adsorpcija na otpadne materijale (trop grožđa, ljuska kokosa, fungalna biomasa, riža, mikroorganizmi...),
- Oksidacijske metode pretvorbe As(III) u As(IV) koje se provode primjenom ozona, vodikovog peroksida, klora, sunčevog svjetla uz feri ione...) (Habuda-Stanić, 2016; Klapac, 2016).

2.1.1. Apsorpcija

Apsorpcija arsena moguća je putem probavnog sustava, kože i respiratornog sustava, iako se zbog izloženosti arsenu putem okoliša, glavnim putem apsorpcije smatra gastrointestinalni trakt (Zheng i sur., 2002).

Jednom kada dođe do ingestije topljivih oblika arsena, apsorpcija je brza te se stopa apsorpcije kreće u rasponu od 40-100% (Saha i sur., 2010).

Moguća je i apsorpcija nekih oblika arsena (kao što je arsenitna kiselina, $\text{As}(\text{OH})_3$) molekularnom mimikrijom koji zbog sličnosti u građi s endogenim molekulama kao što je glicerol koristi akvaporine (**Slika 3**) tj. kanale koji omogućuju vodi transport olakšanom difuzijom preko staničnih membrana (Klapac, 2016). Apsorbirani arsen potom se krvlju transportira do različitih organa.



Slika 3. Prikaz akvaporina (prilagođeno iz VOER, 2017)

Apsorpcija putem gastro-intestinalnog trakta

Arsen u GIT može dospjeti iz mnogih izvora kao što su hrana, piće, voda, lijekovi te kao posljedica inhalacije i gutanja mukocilijarnog sadržaja (Squibb i Fowler, 1983; WHO, 2001). Također sama apsorpcija ovisi upravo o matrici u kojoj se arsen nalazi (hrana, voda i sl.), topljivosti arsenovih spojeva, prisutnosti drugih sastojaka hrane i hranjivih tvari u GIT-u (WHO, 2001).

Arsen topljiv u vodi lako se apsorbira putem GIT-a (Jarup, 2003) te ima toksičnije djelovanje od netopljivih arsenovih spojeva iz hrane (Squibb i Fowler, 1983).

Apsorpcija putem pluća

Do apsorpcije putem pluća dolazi udisanjem čestica arsena prisutnih u zraku kao posljedica industrijske aktivnosti kao što su taljenje ruda, rad u elektranama na ugljen i sl. te kao posljedica udisanja duhanskog dima kod pušača i osoba koje su izložene duhanskom dimu (WHO, 2001).

Inhalirane čestice arsena se zatim talože u dišnim putevima ili plućima te se apsorbiraju ovisno o kemijskom obliku arsena u kojem se nalazi (Zheng i sur., 2002) i veličini čestica (Jarup, 2003). Tako je studija koju su proveli (Yager i sur., 1997) dokazala ovu tvrdnju budući da su izlučene koncentracije arsena u urinu kod radnika na održavanju kotlova u elektrani na ugljen (lebdeći pepeo u obliku kalcijevog arsenata) bile manje nego kod radnika u talionici bakra (As_2O_3) pri istoj izloženosti arsenu (WHO, 2001).

Apsorpcija putem kože

Prema studijama koje je proveo (Smith, 2002) na djeci i odraslima koji su bili izloženi arsenu kupanjem u vodi koja sadrži visoke razine arsena utvrđeno je da dolazi do niskog stupnja apsorpcije putem kože te se smatra da količina arsena koja se unosi putem kože nije zabrinjavajuća po zdravlje ljudi (Post, 2003).

Transport preko placente

Lugo i sur. (1969) te Bollinger i sur. (1992) dokazali su da arsenit lako prolazi kroz placentu te da izaziva povećanu smrtnost dojenčadi kod majki koje su bile izložene toksičnim dozama. Također, primijećene su visoke razine arsenita u fetalnim organima i tkivima, te ekvivalentna razina arsena u krvi majke i krvi pupkovine što predstavlja još jedan dokaz da arsenit lako prolazi placentu (Kagey i sur., 1977).

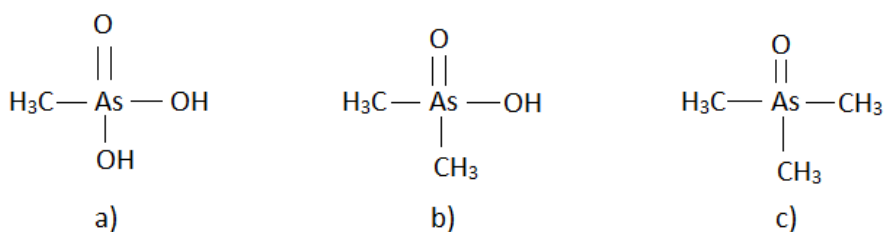
2.1.2. Raspodjela

Arsen se u tijelu uglavnom pronalazi vezan za tiolne skupine, stoga je pokusima na životinjama dokazano da je arsen vezan na proteine velike molekulske mase u različitim tkivima, iako dolazi do kontinuiranog oslobađanja arsena iz različitih veznih mjesta (Marafante i sur., 1981; Vahter i sur., 1982). Daljnjim istraživanjima provedenim na sisavcima najveća retencija anorganskog arsena primijećena je u tkivima i organima poput kože, kose, noktiju, epitela gornjeg gastrointestinalnog trakta (usta, jezik, jednjak, želudac), štitnjače, kostiju i leće oka (Lindgren i sur., 1982; Vahter i sur., 1982). Kod ljudi koji su bili izloženi normalnim koncentracijama arsena iz okoliša primijećene su najviše koncentracije u kosi i noktima te visoke koncentracije u koži i plućima (Liebscher i Smith, 1968; Cross i sur., 1979; Das i sur., 1995, Karagas i sur., 2000). Stoga se smatra da se arsen koncentrira u tkivima s visokim sadržajem proteina koji sadrže cistein (IARC, 2012).

2.1.3. Metabolizam i izlučivanje

Metabolizam arsena i njegovih spojeva mogu se opisati kroz dvije glavne reakcije:

1. redukcija peterovalentnog arsena u trovalentni arsen,
2. oksidativna metilacija pri čemu dolazi do metilacije trovalentnog arsena i tvorbe mono-, di- ili trimetiliranih produkata (**Slika 4**) uz S-adenozin metionin (SAM) kao donor metila i glutation (GSH) kao esencijalni kofaktor (Stybło i sur., 1995; Vahter, 1999).



Slika 4. Prikaz metilacije trovalentnog arsena a) MMA b) DMA c) TMA

Od navedenih reakcija najvažnija je upravo oksidativna metilacija anorganskog arsena koja pospješuje njegovo izlučivanje te se krajnji produkti MMA i DMA izlučuju u urin. Također važno je napomenuti da postoje razlike u metilaciji između vrsta. Pojedine vrste, poput čimpanzi, zamoraca itd., pokazuju minimalnu ili nikakvu metilaciju, dok je kod ljudi prisutna izražena metilacija (Vahter i sur., 1984; Marafante, 1987; Yamauchi i sur., 1989). Kod ljudi su nadalje prisutne razlike u metilaciji s obzirom na genetske predispozicije

(Schlebusch i sur., 2015), spol, dob, dozu arsena kojoj su izloženi te razlike kod pušača i nepušača. Tako su npr. djeca zbog smanjene metilacije podložnija trovanju arsenu, dok je i moguća inhibicija same metilacije kod izloženosti visokim dozama (Concha i sur., 1998a;1998b; Chung i sur., 2002).

Na metabolizam anorganskog arsena utječe i valentno stanje te je istraživanjima na životinjama dokazana viša početna razina trovalentnog anorganskog arsena u većini tkiva u obliku As_2O_3 i arsenita nego što je u slučaju peterovalentnog anorganskog arsena. Bitno je i naglasiti da je trovalentni anorganski arsen intenzivnije metilirao što dovodi do dugoročno slične ekskrecije (WHO, 2001).

Organski oblici arsena kao MMA, DMA i arsenobetain slabije se metaboliziraju i brže izlučuju urinom od anorganskog arsena i kod ljudi i kod životinja te se stoga smatraju manje toksičnim (WHO, 2001;Drobna i sur., 2009).

2.2. TOKSIČNOST ARSENA

Toksičnost arsena može se podijeliti u dvije glavne kategorije tj. toksičnost s obzirom na duljinu izloženosti toksikantu i toksičnost s obzirom na tkiva ili organe koje oštećuje. Kod toksičnosti s obzirom na duljinu izloženosti toksikantu razlikuje se akutna toksičnost, odnosno ona toksičnost koja nastupa odmah ili u kratkom vremenskom periodu od izloženosti toksikantu i kronična toksičnost, koja nastupa kada je osoba izložena toksikantu kroz duži vremenski period. Toksičnost s obzirom na tkiva ili organe koje oštećuje dijeli se na respiratornu toksičnost, kardiovaskularnu toksičnost, gastrointestinalnu toksičnost, hepatotoksičnost, neurotoksičnost, i sl., od kojih će neke biti opisane kasnije (2.2.2.).

2.2.1. Toksičnost s obzirom na duljinu izloženosti arsenu

Akutna toksičnost

Akutno trovanje arsenom primjećuje se već kroz 30 min i karakterizirano je metalnim okusom i mirisom daha po češnjaku, suhim ustima i disfagijom. Kasnije se javlja mučnina, povraćanje, bolovi u abdomenu te bolne dijareje. Također, trovanje se očituje srčanim smetnjama koje dovode do kardijalnog šoka, neurološkim problemima poput glavobolja, konvulzija, vrtoglavica, nerijetko i same kome, oštećenja bubrega, te opadanja kose i

stvaranja karakterističnih Meesovih pruga (**Slika 5**) na noktima (2-3 tjedna nakon ingestije) (Gorby, 1988; Hughes, 2002).



Slika 5. Prikaz Meesovih pruga na noktima

(Enchun i sur., 2015)

Kronična toksičnost

Kronična toksičnost javlja se kod duže izloženosti arsenu te dovodi do kožnih oboljenja poput hiperkeratoze, hiperpigmentacije, melanoze, Bowelove bolesti, neuroloških simptoma tremora, degeneracije aksona, encefalopatije, mučnine, povraćanja, dijareje te konačno do gubitka tjelesne mase i anoreksije, oštećenja jetre i bubrega i hematoloških simptoma poput anemije, leukopenije, trombocitopenije i ometanja metabolizma folata (Gorby, 1988; Hughes, 2002).

2.2.2. Toksičnost s obzirom na zahvaćeni organ ili tkivo koje oštećuje

Respiratorna toksičnost

Izloženost arsenu putem inhalacije dovodi do iritacije sluznice što može uzrokovati rinitis, laringitis, bronhitis i traheobronhitis, začepljen nos, kronični kašalj, promuklost i upalu grla (Dekundt i sur., 1986, Oreščanin i sur., 2011). Prema Gerhardssonu (1988) inhalacija arsenovog trioksida uzrokuje traheobronhalnu mukoznu i submukoznu hemoragiju, alveolarnu hemoragiju i plućni edem te je također primijećeno da su astma i kronični astmatični bronhitis češći kod trovanja arsenom iz podzemnih voda (Saha, 1995, 2010).

Kardiovaskularna toksičnost

Mnoge epidemiološke studije (Axelson i sur., 1978; Wall, 1980; Lee-Feldstein, 1983) pokazale su da kronično izlaganje arsenu može povećati rizik smrti od kardiovaskularnih bolesti te je već i istraživanje koje je proveo Zaldivar (1974) zabilježeno nekoliko slučajeva infarkta miokarda i zadebljanja arterija kod djece koja su bila izložena arsenu putem vode.

Također dolazi do oštećenja vaskularnog sustava kao što je bolest crnih stopala koja je karakteristična za krajeve s visokim razinama arsena (Tseng, 1977; Oreščanin, 2013). Studije koje su proveli Ćavar i sur.(2005; 2010) te Bošnjak i sur.(2008) pokazale su povezanost između izloženosti visokim razinama arsena i razvoja kardiovaskularnih bolesti budući da su praćene razine antioksidativnih enzima poput glutation peroksidaze i katalaze, pogotovo kod osoba s genetskim polimorfizmima te biomarkeri povezani s kardiovaskularnim bolestima.

Gastrointestinalna toksičnost

Gastrointestinalni problemi uglavnom su vezani za simptome akutne toksičnosti te se kod visokih doza razvijaju mučnina, povraćanje, dijareja, otežano gutanje i sl. (Morton i Caron, 1989; Cambell i sur., 1989; Goebel i sur., 1990; Saha, 2010). Učinak same apsorpcije arsena u probavnom traktu ovisi o njegovoj topljivosti te se smatra da je toksičnost uzrokovana prvenstveno iritacijom sluznice, što dovodi do oštećenja epitelnih stanica (Tay i Seah, 1975).

Hemotoksičnost

Učinci na ovaj sustav primijećeni su i kod kratkoročne i dugoročne izloženosti arsenu (Glanzener i sur., 1968; Armstrong i sur., 1978) kao što su leukopenija, anemija te su povezani s citotoksičnim i hemolitičkim djelovanjem na krvne stanice i supresijom eritropoeze (Kyle i Pearse, 1965; Lerman, 1980). Bitno je uzeti u obzir i razlučiti je li anemija nastala uslijed arsenikoze ili je ona odgovor na malnutriciju s obzirom na neuhranjenost osoba koje žive na područjima s visokim koncentracijama arsena kao što su Indija i Bangladeš.

Hepatotoksičnost

Toksični učinci arsena na jetru javljaju se uslijed sposobnosti jetre da akumulira arsen kod ponovljenih izloženosti. Natečenost, nadraženost i visoke razine jetrenih enzima samo su neki od simptoma opisanih kod pacijenata koji su dulje vrijeme uzimali lijekove koji sadrže arsen. (Beckman i sur., 1977; Chakrabarty i Saha, 1987; Mazumdar i sur., 1988; Clarkson, 1991).

Nefrotoksičnost

Bubrezi također imaju svojstvo akumulacije arsena tijekom ponavljane izloženosti te su glavno mjesto pretvorbe peterovalentnog u trovalentni arsen koji je toksičniji i slabije topljiv. Stoga oštećenja mogu nastati na kapilarama, glomerulu i tubulima bubrega (Schoolmeester i

White, 1980; Squibb i Fowler, 1983; Winship, 1984). Također, brojne studije su pokazale povezanost između konzumacije vode koja sadrži visoke razine arsena i raka mokraćnog mjehura i bubrega (Chen i sur., 1985, 1988a; Wu i sur., 1989; Chen i Wang, 1990; Tsai i sur., 1999).

Dermotoksičnost

Poremećaji na koži opisani su u mnogim epidemiološkim studijama u područjima gdje ljudi konzumiraju vodu s visokim koncentracijama arsena. Neki od simptoma koji se javljaju su hiperkeratoza, bradavice i izbočine na dlanovima, stopalima te hiperpigmentacija lica, vrata i leđa (Tseng, 1977; Saha 2010; Oreščanin i sur., 2011).

Mutagenost

Arsen može inducirati oštećenje DNA i dovesti do različitih genetskih promjena (Bošnjak i sur., 2008). Ovakve promjene se ujedno mogu prenositi genetski na drugu generaciju ili uzrokovati zdravstvene probleme u izloženoj generaciji (Hoffman, 1991). Usporedbom izazvanih aberacija na kromosomima, trovalentni arsen se pokazao genotoksičniji od peterovalentnog arsena (Chisholm, 1970; Nakamuro i Sayato, 1981; Nordenson, 1981; Barrett i sur., 1989).

Karcinogenost

Karcinom se javlja kao najteža posljedica kroničnog izlaganja anorganskom arsenu. Prema nekim epidemiološkim studijama smatra se da postoji evidentna veza između profesionalne, okolišne ili medicinske izloženosti arsenu i pojavnosti karcinoma kože i pluća (Fowler i Weissburg, 1974; NAS, 1977; IARC, 2012; Leonard i sur., 1980; Lerman i sur., 1980; Pershagen, 1981). Na temelju dugogodišnjih studija, IARC je zaključio da su arsen i anorganski spojevi karcinogeni za ljude (grupa 1), DMA i MMA mogući karcinogeni za ljude (grupa 2B), dok se arsenobetain i drugi organski spojevi arsena ne klasificiraju kao karcinogeni za ljude (grupa 3) (IARC, 2012).

2.3. BIOMARKERI IZLOŽENOSTI ARSENU

Postoji nekoliko definicija koje na sličan način opisuju biomarkere, a smatraju se širokom potkategorijom medicinskih znakova odnosno pokazatelja medicinskog stanja izvan pacijenta ili indikatorima biološkog stanja organizma. Jedna od najuvrježenijih definicija je ona Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) kojom su biomarkeri opisani kao „svaka tvar, struktura ili proces koji se može mjeriti u tijelu ili njegovim proizvodima i utjecati ili predvidjeti pojavu ishoda ili bolesti " (Stimbu i Tavel, 2010).

Krv, urin, nokti i kosa su biomarkeri koji se koriste za dokazivanje izloženosti arsenu, a ovisno o odabranom biomarkeru opisuju akutnu ili kroničnu izloženost (IARC, 2012).

Krv i urin se ubrajaju u indikatore akutne izloženosti zbog kratkog zadržavanja arsena u ovom matriksu te su pokazatelji nedavne ili relativno visoke izloženosti. Arsen u krvi predstavlja pogodan biomarker za intoksikaciju, no može se koristiti u samo nekoliko dana od trovanja dok se arsen u urinu može promatrati kao ukupni arsen, anorganski arsen i suma metabolita (anorganski + MMA + DMA), te također kao indikator akutne izloženosti (Marchiset-Ferlay i sur., 2012).

S obzirom da se arsen akumulira u kosi i nokte ugradnjom u keratin, zbog visokog afiniteta za tiolnim skupinama, limitirana mu je mobilnost te je izoliran je od ostalih metaboličkih aktivnosti. Zbog toga se kosa i nokti smatraju vrlo dobrim biološkim indikatorima koji dokazuju kroničnu izloženost arsenu i pri niskim koncentracijama (Takagi i sur., 1988; Karagas i sur., 2000). Također, kosa i nožni nokti spadaju u neinvazivne biomarkere, lako se prikupljaju i daju ponovljive rezultate analize (Hinwood i sur., 2013).

Prosječan rast dlake kose iznosi 1 cm mjesečno što omogućava vremensko praćenje izloženosti arsenu te razlikovanje akutnog i kroničnog trovanja (Koons i Peters, 1994). Preporuka je uzimanje uzoraka kose okcipitalnog područja ili zatiljka, bliže koži glave zbog manje okolišne kontaminacije. Također je važno voditi računa o vrsti kose ispitanika, učestalosti pranja kose i korištenim sredstvima za pranje kose zbog mogućeg utjecaja na rezultate analize (de Peyster i Silvers, 1995).

Najboljim markerom dugoročne izloženosti arsenu smatraju se nožni nokti (**Slika 6**) koji su i korišteni kao biomarkeri u ovom radu, zbog manje mogućnosti eksterne kontaminacije iz zraka, vode, sapuna ili šampona za razliku od kose i noktiju ruku koji s navedenim kontaminantima češće dolaze u dodir (Takagi i sur., 1988; Hunter, 1990; Garald i sur., 1993;

Karagas i sur., 1996). Svaki odrezak nokta predstavlja nekoliko tjedana rasta te, uključujući varijacije, smatra se da predstavljaju izloženost kroz 2-12 mjeseci (Hunter, 1990).



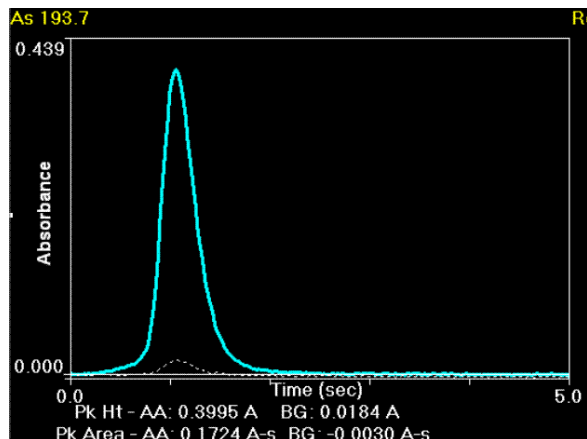
Slika 6. Prikaz prikupljanja uzoraka noktiju
(Hagan, 2011)

2.4. ANALITIČKE METODE ZA DETEKCIJU ARSENA

Povijesno gledano u determinaciji arsena korištene su gravimetrijske i kolorimetrijske metode koje su se pokazale neosjetljivima i pogodnim samo za djelomičnu kvantitativnu analizu. Danas se koriste različite metode poput atomske apsorpcijske spektrometrije (AAS), induktivno spregnute plazme u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (ICP-MS) i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) ili micelarnom tekućinskom kromatografijom (MLC), voltametrijske metode, radiokemijske metode, rendgenska spektroskopija. U novije vrijeme glavna korištena metoda je ICP-MS zbog svoje selektivnosti i osjetljivosti u analizi metala i nemetala (WHO, 2001).

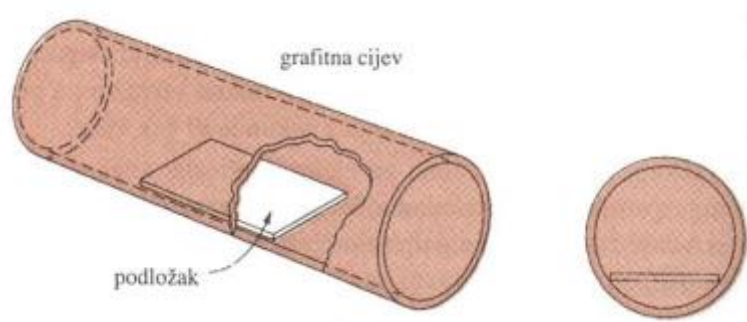
Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS) je analitička metoda kojom se kvalitativno i kvantitativno određuju elementi tako što se uzorci rastavljaju na atome procesom atomizacije. Atomizacija se provodi tako da se otopina uzorka rasprši, nebulizira u finu maglicu, miješa s gorivom i oksidansom te se unosi u plamen gdje otapalo ispari, a iz čestica nastaju atomi i ioni. Nakon atomizacije propušta se zraka svjetlosti točno iste valne duljine kao što je valna duljina koja odgovara rezonantnoj liniji arsena (**Slika 7**), dolazi do pobude u atomskim spektrima te se mjeri intenzitet zrake svjetlosti prije i poslije prolaska kroz apsorbirajuće nepobuđene atome arsena te je količina apsorbirane energije proporcionalna broju nepobuđenih atoma. Dijelovi AAS su monokromator koji odabire specifične valne

duljine svjetlosti koju apsorbira uzorak te isključuje druge valne duljine. Svjetlost koju odabere monokromator usmjerava se na detektor koji je uglavnom fotomultiplikatorna cijev, čija je funkcija pretvaranje svjetlosnog signala u električni signal proporcionalan intenzitetu svjetlosti (Jakobek-Barron, 2016; Garcia i Baez, 2012).



Slika 7. Prikaz mjerenja apsorbancije arsena pri 193,7 nm

U ovom radu korištena je grafitna tehnika kod koje se atomizacija provodi u grafitnoj cijevi (**Slika8**). Cijev je otvorena na oba kraja te sadrži šupljinu za unošenje uzorka. Uzorak se zagrijava u koracima do 3000°C, pri čemu dolazi do sušenja stoga se grafitna tehnika smatra boljom metodom od plamene AAS. Važno je napomenuti da se ovom metodom može odrediti samo ukupni arsen. Sama metoda ima mnogo prednosti: moguće je analizirati otopine, suspenzije ili krute uzorke, učinkovitija je atomizacija te smanjena mogućnost oksidacije uzorka direktnim unosom u grafitnu cijev (Garcia i Baez, 2012).



Slika 8. Prikaz grafitne cijevi (Jakobek-Barron, 2016)

Prije samog određivanja ukupnog arsena na AAS-u nužno je izvršiti digestiju uzoraka (Wilhem i sur., 1991). Priprema uzorka podrazumijeva primjenu temperature ili energije

zračenja (mikrovalno, UV) i tehnike suhe ili mokre digestije. Kao metode pripreme uzoraka za određivanje arsena mogu se koristiti mokra digestija uz primjenu HNO_3 uz konvencionalno ili mikrovalno zagrijavanje. Termalna mokra digestija pod tlakom omogućuje digestiju organskih i neorganskih materijala te omogućuje potpuno razaranje matriksa uzorka, pri čemu se reduciraju ili uklanjaju neke interferencije. Ova metoda nije pogodna za uzorke koji sadrže elemente u tragovima. U ovom radu korištena je mikrovalna mokra digestije pod tlakom čije su prednosti u odnosu na termalnu efikasnost i brzina, dolazi do direktnog zagrijavanja unutar uzorka te je moguće dobivanje visokih temperatura pri relativno niskim tlakovima (Maletić, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada je ispitati izloženost arsenu na populaciji studenata znanosti o hrani i nutricionizma Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku, akademskih godina od 2010./2011. do 2015./2016., određivanjem koncentracije ukupnog arsena u uzorcima nožnih noktiju s ciljem usporedbe izloženosti arsenu studenata s obzirom na mjesto stanovanja (istočna Hrvatska i ostatak Hrvatske te neki dijelovi BIH).

3.2. MATERIJALI I METODE

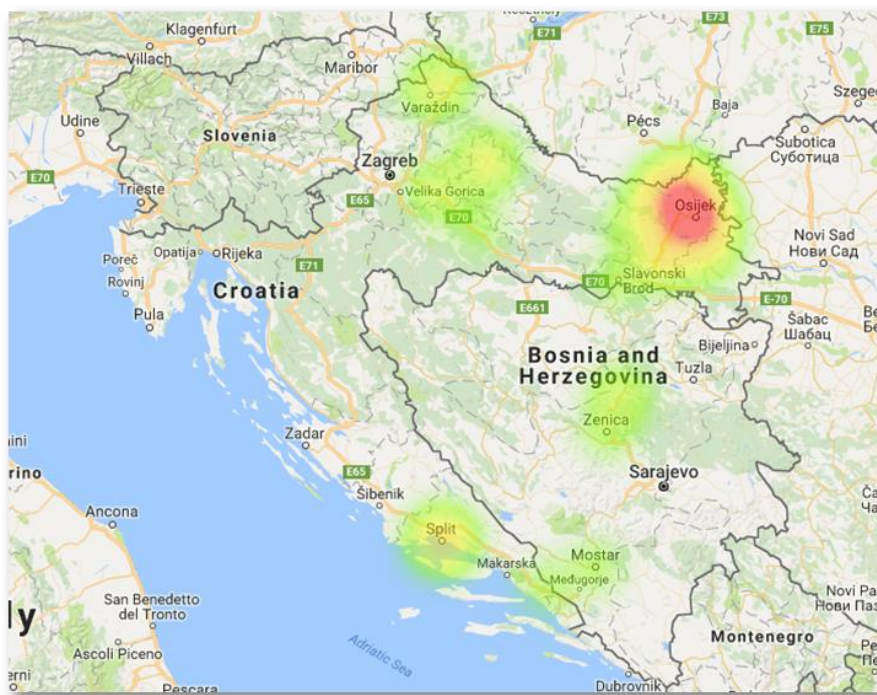
U ispitivanju je sudjelovalo 50 ispitanika u omjeru (Ž:M=47:3) koji su podijeljeni u dvije grupe s obzirom na mjesto prebivališta (istočna Hrvatska: ostatak Hrvatske i Bosna i Hercegovina). Prema tim kriterijima 31 student ima prebivalište u istočnoj Hrvatskoj, dok njih 19 pripada grupi ostatak Hrvatske i neki dijelovi BIH. Raspon BMI vrijednosti kretao se od 17 do 28, te su sva 3 muška ispitanika iz istočne Hrvatske. Studenti su prikupljali nožne nokte tijekom 4 mjeseca (od listopada do veljače) kroz pet akademskih godina (2010./2011.-2015./2016.) te su nokti pripremljeni prema uputama Wilhema i suradnika (1991). Uz svaki kodirani uzorak naveden je spol studenta, visina, masa, godina rođenja, mjesto stanovanja i konačna izvagana masa noktiju koja je bila u rasponu od 0,03 do 0,35 g. Nokti su isprani prvo s 2 % Triton-X 100 (Merck) u ultrazvučnoj kupelji kroz 20 min, zatim je slijedilo ispiranje s demineraliziranom vodom (Simplicity 185, Millipore), acetonom (99,5 % p.a., T.T.T.) i opet demineraliziranom vodom, nekoliko puta uz mućkanje. Nakon sušenja preko noći uzorci su digestirani u mikrovalnoj pećnici (MDS 2000, CEM) s 5 mL HNO_3 (suprapur, 65 %, Merck) kroz 30 min prema uputama za uporabu uređaja. Nakon digestije kivete su isprane demineraliziranom vodom u čiste tikvice od 25 mL. Ukupni arsen je određen grafitnom tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije (Analyst 600/Zeeman, Perkin-Elmer) s Pd i $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ te je mjerena apsorpcija pri 193,7 nm. Točnost metode je potvrđena korištenjem ljudske kose kao referentnog materijala (GBW 07601, Institut za geofizička i geokemijska istraživanja, Langfang, Kina). Sve analize su provedene u dvije paralele, a sva korištena oprema je oprana i ostavljena preko noći u 10% nitratnoj kiselini te ponovno isprana ultračistom vodom. Dobiveni rezultati su preračunati kao μg ukupnog arsena na masu noktiju u g. Također treba napomenuti da su svi studenti u trenutku prikupljanja uzoraka živjeli u Osijeku i okolici, ali s obzirom na nisku stopu rasta nožnih noktiju (prosječno 0,03-

0,05 mm/dan) uzorci su predstavljali izloženost preko ljeta, kada su studenti bili na mjestu prebivališta. S obzirom na spori rast noktiju, procijenjuje se da uzorci predstavljaju vjerojatnu izloženost tijekom 3-9 mjeseci prije izrezivanja uzoraka noktiju (Slotnick i Nriagu, 2006; Yaemsiri i sur., 2010).

Statistička analiza je provedena u programu Statistica 12.0 (StatSoft), Excel 2016 (Microsoft) i Google tablicama. Normalnost distribucije podataka ispitana je Shapiro-Wilk W testom. Razlike za normalno distribuirane podatke za istočnu Hrvatsku i ostatak Hrvatske (uključujući Bosnu i Hercegovinu) ispitane su Studentovim T-testom, dok je kod nenormalne distribucije korišten Mann-Whitneyev U test.

4. REZULTATI I RASPRAVA

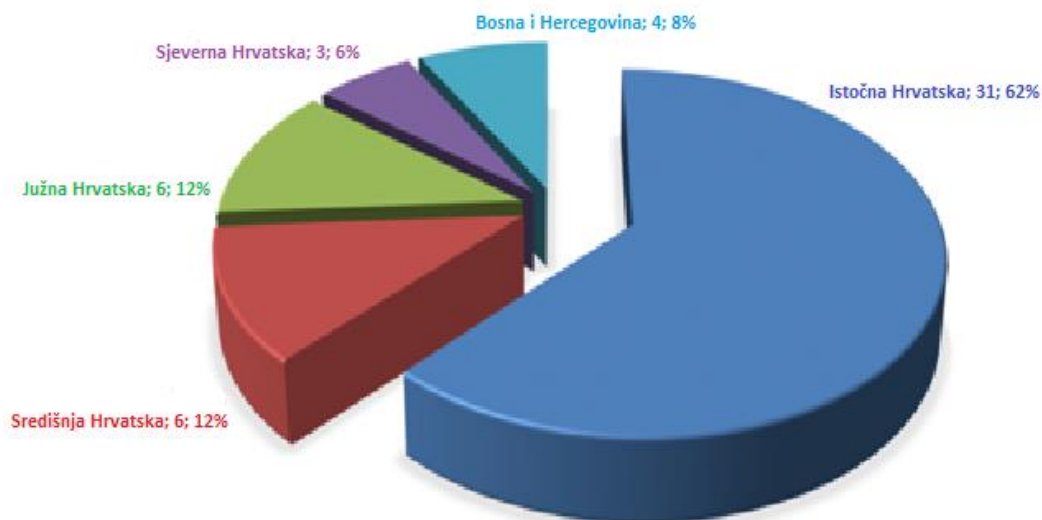
Na **Slici 9** je karta koja prikazuje područje s najvišim koncentracijama arsena u noktima označeno crvenom bojom koje obuhvaća istočnu Hrvatsku s gradom Osijekom kao središtem. Geografski smještaj kojim istočna Hrvatska predstavlja južni rub Panonskog bazena zajedno sa susjednim zemljama Mađarskom i Srbijom, čini je područjem gdje su zamijećene visoke razine arsena u vodi za piće zbog prirodno prisutnog arsena u tlu (Romić i sur., 2011). Niže koncentracije arsena u noktima prikazane su zelenom bojom i obuhvaćaju sjevernu, središnju i južnu Hrvatsku te područja oko gradova Mostara i Zenice u Bosni i Hercegovini. Nisu sva područja Republike Hrvatske pokrivena, a razlog je ograničen broj sudionika s obzirom da se radi samo o populaciji studenata znanosti o hrani i nutricionizma na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku.



Slika 9 . Karta koncentracija arsena u noktima studenata s obzirom na geografski položaj njihovog mjesta prebivališta

Navedene točke na karti označavaju mjesta prebivališta studenata, a mogu se izdvojiti 4 različite regije u Hrvatskoj: sjeverna Hrvatska (područje Međimurske, Varaždinske, Koprivničko-križevačke i Krapinsko-zagorske županije), južna Hrvatska (područje Šibensko-kninske, Splitsko-dalmatinske i Dubrovačko-neretvanske županije), središnja Hrvatska (područje grada Zagreba, Karlovačke, Sisačko-moslavačke i Bjelovarsko-bilogorske županije),

istočna Hrvatska (područje Osječko-baranjske, Vukovarsko-srijemske, Brodsko-posavske i Požeško-slavonske županije) te Bosna i Hercegovina (područje oko grada Mostara i Zenice) kako je prikazano na (**Slika 10**).

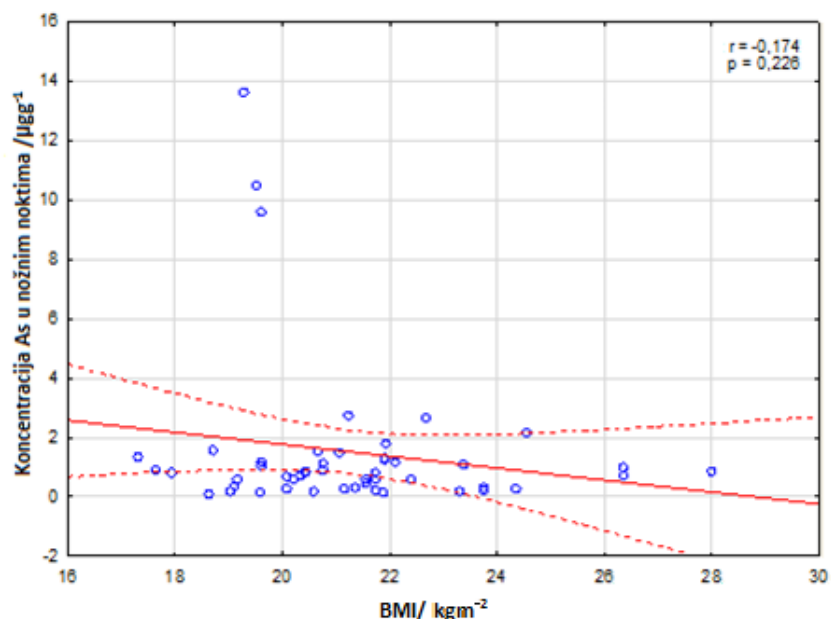


Slika 10. Distribucija uzoraka noktiju prema mjestu prebivališta studenata

Većina studenata (62%) je iz istočne Hrvatske te su oni, prema prethodnim istraživanjima, izloženi visokim koncentracijama arsena iz vode za piće. Primjer su gradovi Osijek ($37,88 \mu\text{g/L}$ As), Našice ($0,14 \mu\text{g/L}$ As) te sela Andrijaševci ($611,9 \mu\text{g/L}$ As) i Čepin ($171,6 \mu\text{g/L}$ As) (Ćavar i sur., 2005; Habuda-Stanić i sur., 2007). Druge regije Hrvatske nemaju zabilježene visoke koncentracije arsena u podzemnim vodama i vodi za piće.

Prema dobivenim rezultatima nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,90$) između dviju grupa (istočna Hrvatska i ostatak Hrvatske) prema praćenim parametarima, uključujući indeks tjelesne mase (BMI) (**Slika 12**).

Važno je napomenuti da ne postoji statistički značajna korelacija ($p=0,226$) između BMI vrijednosti i koncentracije arsena u uzorcima nožnih noktiju (**Slika 11**), a trend ukazuje na smanjenje koncentracije arsena s povećanjem BMI vrijednosti ispitanika. Također, inverzna korelacija između BMI vrijednosti i koncentracije arsena u nožnim noktima primijećena je i u studijama koje su proveli Grashow i sur. (2014) te Yu i sur. (2014).

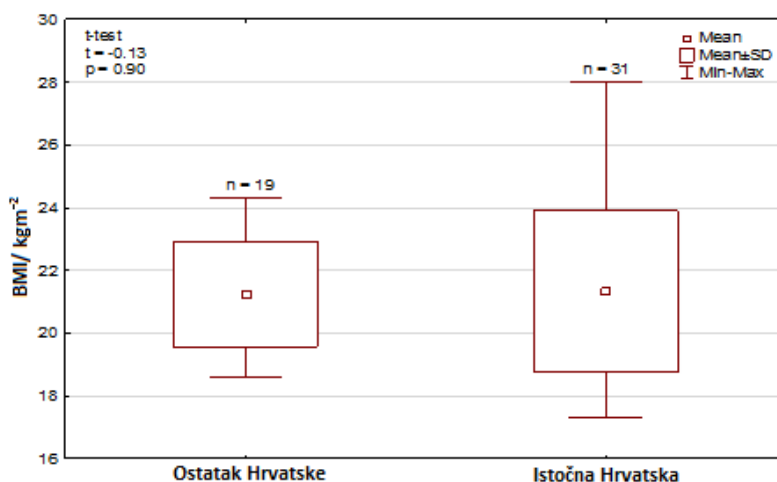


Slika 11. Korelacija između BMI vrijednosti ispitanika i koncentracije arsena u uzorcima nožnih noktiju studenata

Raspon koncentracija arsena u nožnim noktima ispitanika iznosi (0,122-13,614 $\mu\text{g/g}$) od čega 15 ispitanika zadovoljava raspon normalnih razina arsena u noktima (0,02-0,5 $\mu\text{g/g}$) prema zaključku Takagia i sur. (1975) te Narange i sur. (1987). Prema Gruber i sur. (2012), prikazane su koncentracije arsena u noktima s obzirom na izloženost različitim koncentracijama arsena u vodi (**Tablica 1**) koje potvrđuju korelaciju između normalnih razina arsena u noktima i dozvoljenih razina arsena u vodi (10 $\mu\text{g/L}$). Vrijednosti koje prelaze maksimalno dopuštenih 10 $\mu\text{g/L}$ arsena u vodi povećavaju rizik od nastanka različitih zdravstvenih problema te nakupljanjem arsena u organizmu dolazi do kroničnog trovanja (EFSA, 2009).

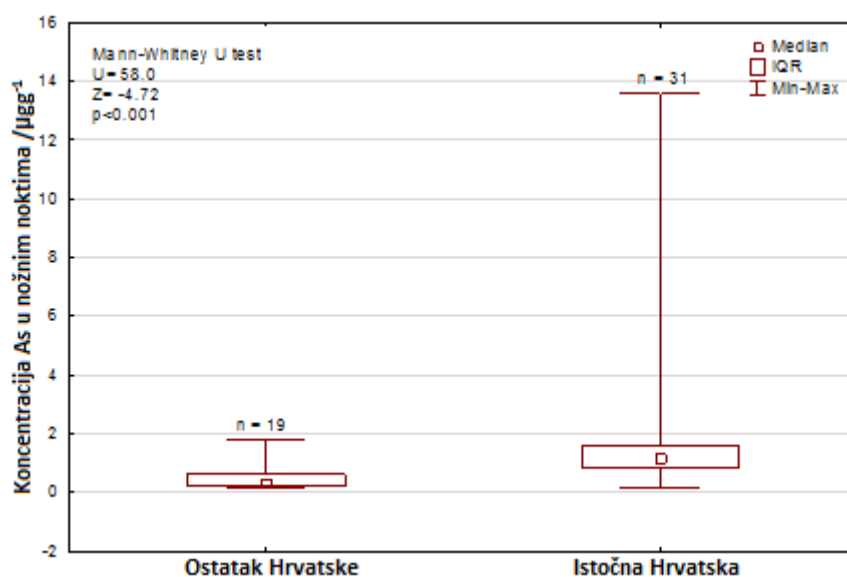
Tablica 1. Prikaz usporedbe koncentracija arsena u vodi i arsena u noktima (EFSA, 2009)

Koncentracija arsena u vodi [$\mu\text{g/L}$]	Koncentracija arsena u noktima [$\mu\text{g/g}$]
<1	0,102 $\pm$ 0,096
10	0,149 $\pm$ 0,154
>10	0,292 $\pm$ 0,297



Slika 12. Usporedba distribucije BMI vrijednosti dvije podskupine studenata

Pri usporedbi podataka za količinu ukupnog arsena u noktima utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$), što dokazuje veću izloženost arsenu studenata istočne Hrvatska u odnosu na ostatak Hrvatske i Bosnu i Hercegovinu (**Slika 13**).



Slika 13. Usporedba distribucije koncentracija arsena u nožnim noktima dvije podskupine studenata

Budući da su primijećene vrlo visoke koncentracije arsena u nožnim noktima troje studenata, statistička obrada je provedena i uz isključivanje outliera tj. vrijednosti koje su višestruko odstupale od srednje vrijednosti skupine (**Slika 14**), ali je analiza i dalje pokazivala statistički značajnu razliku ($p < 0,001$) između dvije podskupine studenata.



Slika 14. Usporedba distribucije koncentracija arsena u nožnim noktima dvije podskupine studenata (bez outliera)

U skladu s EFSA-inim izvješćem, 0,5 µg/g arsena iz nožnih noktiju odgovara kroničnoj konzumaciji vode s oko 10 µg/L arsena (EFSA, 2009). Ako se obje skupine usporede na osnovi tog kriterija, 90% studenata istočne Hrvatske i 37% drugih je izloženo koncentraciji arsena od 10 µg/L ili višoj. Obzirom na čimbenike rizika, ovim radom se nastojalo pokazati kako mjesto prebivališta znatno utječe na izloženost arsenu putem vode za piće, zbog prirodno prisutnih depozita arsena s kojima podzemne vode dolaze u dodir. Visoke razine arsena predstavljaju problem mnogim zemljama kao što su Indija i Bangladeš gdje se u više od 38% uzoraka podzemnih voda mogu pronaći koncentracije arsena >50µg/L (EFSA, 2009). Bitno je napomenuti da bi uzorci trebali biti podjednako zastupljeni po spolu, što ovdje nije slučaj budući da je populacija studenata nutricionizma tijekom ovog istraživanja imala 3 muška ispitanika i 47 ženskih ispitanika. Takva zastupljenost onemogućava razlikovanje u izloženosti arsenu s obzirom na spol unutar podskupine (istočna Hrvatska) primjenom statističkih testova.

Rezultati ukazuju da je potrebno provesti veće istraživanje kako bi se isključila mogućnost različite izloženosti s obzirom na privremenu promjenu mjesta stanovanja, budući da spori rast noktiju (prosječno 1,62 mm/mjesec) omogućuje procjenu vjerojatne izloženosti arsenu tijekom 3-9 mjeseci prije izrezivanja uzoraka noktiju ako je veličina noktiju 5 – 15 mm (Yaemsiri i sur., 2010). Također, bilo bi poželjno imati homogenu zastupljenost spolova kako bi se mogle utvrditi eventualne razlike između podskupina te razlike između muškaraca i

žena unutar svake podskupine, no to zbog specifičnosti studentske populacije Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku nije bilo moguće.

Važno je napomenuti da ovim radom nije određivan unos arsena putem hrane te da nisu bilježene prehrambene navike niti su ispitanici imali prehrambena ograničenja kroz 4 mjeseca prikupljanja uzoraka. Stoga se ne mogu dokazati utjecaji navodnjavanja poljoprivrednih kultura vodom koja sadrži visoke razine arsena i konzumacije od strane stanovnika istočne Hrvatske.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovi rezultata istraživanja dobivenih ovim diplomskim radom mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Postoji statistički značajna razlika ($p < 0,001$) u izloženosti arsenu između dviju ispitivanih skupina studenata, onih s prebivalištem na području istočne Hrvatske i onih iz ostatka Hrvatske te Bosne i Hercegovine;
2. Prema dobivenim rezultatima 90% studenata s prebivalištem u istočnoj Hrvatskoj i 37% drugih je izloženo koncentraciji arsena od 10 $\mu\text{g/L}$ ili višoj;
3. Rezultati upućuju na povećan unos arsena iz vode kao glavni razlog zbog kojeg osobe iz istočne Hrvatske imaju više razine arsena u noktima u odnosu na ostatak Hrvatske i dijelove BIH.

6. LITERATURA

- Armstrong JM, Dusting GJ, Moncada S, Vane JR: Cardiovascular action of PGI₂ a metabolite of arachidonic acid which is synthesised by blood vessels. *Circulation Research* 43: 114-119, 1978.
- Axelsson OI, Dahlgren E, Jansson CD, Rehnlund SO: Arsenic exposure and mortality. A case reference study from a Swedish copper smelter. *British Journal of Industrial Medicine* 35: 8-15, 1978.
- Barrett JC, Lamb PW, Wang TC, Lee TC: Mechanisms of arsenic induced cell transformation. *Biological Trace Element Research* 21: 421-429, 1989.
- Beckman G, Beckman L, Nordenson I: Chromosomal aberration in workers exposed to arsenic. *Environmental Health Perspectives* 19: 145-146, 1977.
- Bolliger CT, van Zijl P, Louw JA: Multiple organ failure with the adult respiratory distress syndrome in homicidal arsenic poisoning. *Respiration* 59: 57-61, 1992.
- Bošnjak Z, Čavar S, Klapac T, Milić M, Klapac-Basar M, Toman M: Selected markers of cardiovascular disease in a population exposed to arsenic from drinking water. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 26: 181-186, 2008.
- Campbell JP, Alvarez JA: Acute arsenic intoxication. *American Family Physician* 40: 93- 97, 1989.
- Chakraborty AK, Saha KC: Arsenical dermatosis from tube-well water in West Bengal. *Indian Journal of Medical Research* 85: 326-334, 1987.
- Chen CJ, Chuang YC, Lin TM, Wu HY: Malignant neoplasma among residents of a black foot disease-endemic area in Taiwan: high arsenic artesia well water and cancers. *Cancer Research* 45: 5895-5899, 1985.
- Chen CJ, Kuo TL, Wu MM: Arsenic and cancers. *Lancet* 331: 414-415, 1988.
- Chen CJ, Wang CJ: Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasm. *Cancer Research* 50: 5470-5474, 1990.
- Chisholm JJ: Arsenic poisoning from rodenticides. *Pediatric Clinics of North America* 17: 591, 1970.
- Chung J, Kalman D, Moore L, Kosnett MJ, Arroyo AP, Beeris M, Mazumder DN, Hernandez AL, Smith AH: Family correlations of arsenic methylation patterns in children and parents exposed to high concentrations of arsenic in drinking water. *Environmental Health Perspectives* 110: 729-733, 2002.
- Clarkson TW: Handbook of pesticide Toxicology. Academic press, San Diego, 1991.
- Concha G, Nermell B, Vahter M: Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. *Environmental Health Perspectives* 106: 355-359, 1998a
- Concha G, Vogler G, Lezcano D, Nermell B, Vahter M: Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicological Sciences* 44: 185-190, 1998b.
- Cross JD, Dale IM, Leslie ACD, Smith H: Industrial exposure to arsenic. *Journal of Radioanalytical Chemistry* 48: 197-208, 1979.
- Čavar S, Bošnjak Z, Klapac T, Barišić K, Čapelak I, Jurasović J, Milić M: Blood selenium, glutathione peroxidase activity and antioxidant supplementation of subjects exposed to arsenic via drinking water. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29: 138-143, 2010.
- Čavar S, Klapac T, Jurišić-Grubešić R, Valek M: High exposure to arsenic from drinking water at several localities in eastern Croatia. *Science of the Total Environment* 339: 277-282, 2005.

- Das D, Chatterjee A, Mandal BK, Samanta G, Chakraborti D, Chanda B: Arsenic in groundwater in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. Part 2. Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine, skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst* 120: 917-924, 1995.
- de Peyster A, Silvers JA: Arsenic levels in hair of workers in a semiconductor fabrication facility. *American Industrial Hygiene Association Journal* 56: 377-383, 1995.
- Dekundt G, Leonard A, Arany J: In vivo studies in male mice on the mutagenesis effects of inorganic arsenic. *Mutagenesis* 1: 33-34, 1986.
- Drobna Z, Styblo M, Thomas DJ: An overview of arsenic metabolism and toxicity. *Current Protocols in Toxicology*, 4.31.1-4.31.6. John Wiley and Sons, Chapel Hill, NC, 2009.
- EFSA, European Food Safety Authority: Scientific opinion on arsenic in food. *EFSA Journal* 7:1351, 2009.
- Enchun ML, Ritwisch R, Gilbert Grand M: Optic nerve atrophy and hair loss in a young man. *JAMA Ophthalmology* 133: 1469-1470, 2015.
- Flora SJS: *Handbook of arsenic toxicology*. Academic Press, London, 2014.
- Fowler BA, Weissburg JB: Arsine poisoning. *The New England Journal of Medicine* 291: 1171-1174, 1974.
- Franklin M, Bean W, Harden RC: Fowler's solution as an ecological agent in cirrhosis. *American Journal of the Medical Sciences* 219: 589-596, 1950.
- Garcia R, Baez AP: (2012.) *Atomic absorption spectrometry (AAS)*. Intech, 2012, <https://www.intechopen.com/books/atomic-absorption-spectroscopy/atomic-absorption-spectrometry-aas-> [27.6.2017.]
- Garland M, Morris JS, Rosner BA, Stampfer MJ: Toenail trace element levels as biomarkers: reproducibility over a 6 year period. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2: 493-497, 1993.
- Gerhardsson L: Fatal arsenic poisoning-a case report. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health* 14: 130-133, 1988.
- Glazener FS, Ellis JG, Johnson PK: Electrocardiographic findings with arsenic poisoning. *California Medicine* 109: 158-162, 1968.
- Goebel HH, Schmidt PF, Bohl J, Tettenborn B, Kramer G, Gutmann L: Polyneuropathy due to arsenic intoxication: Biopsy studies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 49: 137-149, 1990.
- Gorby MS: Arsenic poisoning. *The Western Journal of Medicine* 149: 308-315, 1988.
- Grashow R, Zhang J, Fang SC, Weisskopf MG, Christiani DC, Kile ML, Cavallari JM: Inverse association between toenail arsenic and body mass index in a population of welders. *Environmental Research* 131: 131-133, 2014.
- Gruber JF, Karagas MR, Gilbert-Diamond D, Bagley PJ, Zens MS, Sayarath V, Punshon T, Moriss JS, Cottingham KL: Associations between toenail arsenic concentration and dietary factors in a New Hampshire population. *Nutrition Journal* 11: 1-10, 2012.
- Habuda-Stanić M, Kuleš M, Kalajdžić B, Romić Ž: Quality of groundwater in eastern Croatia. The problem of arsenic pollution. *Desalination* 210: 157-162, 2007.
- Habuda-Stanić M, Kuleš M: Arsen u vodi za piće. *Kemija u industriji* 51: 7-8, 2002.
- Habuda-Stanić M: *Tehnologija vode i obrada otpadnih voda*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.
- Hagan P: *How your toe nail clippings can predict whether you will get lung cancer years before it strikes*. Mail Online, 2011, http://i.dailymail.co.uk/i/pix/2011/03/07/article-1363863-009E0F2200000259-377_468x286.jpg [29.6.2017.]

- Hinwood A, Sim MR, Jolley D, de Klerk N, Bastone EB, Gerostamoulos J, Drummer OH: Hair and toenail arsenic concentrations of residents living in areas with high environmental arsenic concentrations. *Environmental Health Perspectives* 111: 187-193, 2013.
- Hoffman GR: Genetic toxicology. U *Toxicology*, str. 201-225. Pergamon, New York, 1991.
http://www.cecra.dh.pmf.uns.ac.rs/pdf/drugiseminar/priprema_Maletic.pdf
[29.6.2017.]
- Hughes MF: Arsenic Toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters* 133: 1-16, 2002.
- Hunter DJ: Biochemical indicators of dietary intake. U *Nutritional Epidemiology*, str.143-216- Oxford University Press, New York, 1990.
- IARC, International Agency for Research on Cancer: *A review of human carcinogens. Part C: Arsenic, metals, fibres and dust*. WHO, Lyon, 2012.
- IARC, International Agency for Research on Cancer: *Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans some metals and metallic compounds*. WHO, Lyon, 1980.
- Jakobek-Barron L: *Instrumentalne metode analize 2*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.
- Jarup L: Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68: 167-182, 2003.
- Kagey BT, Bumgarner JE, Creason JP: Arsenic levels in maternal-fetal tissues sets. U *Trace Substances in Environmental Health XI: A Symposium*, str. 252-256. University of Missouri, Columbia, 1977.
- Karagas MR, Morris JS, Weiss JE, Spate V, Baskett C, Greenberg ER: Toenail samples as an indicator of drinking water arsenic exposure. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 5: 849–852, 1996.
- Karagas MR, Tosteson TD, Blum J, Klaue B, Weiss JE, Stannard V, Spate V, Morris JS: Measurement of low levels of arsenic exposure: a comparison of water and toenail concentrations. *American Journal of Epidemiology* 152: 84-90, 2000.
- Klapec T: Daily dietary intake of selenium in eastern Croatia. *Science of the total Environment* 217: 127-136, 1998.
- Klapec T: *Osnove toksikologije s toksikologijom hrane*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.
- Klapec T: Selenium in selected foods grown or purchased in eastern Croatia. *Food Chemistry* 85: 445-452, 2004.
- Koons RD, Peters CA: Axial distribution of arsenic in individual human hairs by solid sampling graphite furnace AAS. *Journal of Analytical Toxicology* 18: 36-40, 1994.
- Kyle RA, Pearce GL: Haematological aspects of arsenic intoxication. *The New English Journal of Medicine* 273: 18-23, 1965.
- Lee-Feldstein A: Arsenic and respiratory cancer in man: Follow-up of an occupational study. Arsenic: Industrial, Biomedical and Environmental perspectives, str. 245-265. Van Nostrand-Reinhold, New York, 1983.
- Leonard A, Lauwerys RR: Carcinogenicity, teratogenicity, and mutagenicity of arsenic. *Mutation Research* 75: 49-62, 1980.
- Lerman BB, Ali N, Green D: Megaloblastic dyserythropoietic anaemia following arsenic ingestion. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 10: 515-517, 1980.

- Liebscher K, Smith H: Essential and nonessential trace elements. A method of determining whether an element is essential or nonessential in human tissue. *Archives of Environmental Health* 17: 881-890, 1968.
- Lindgren A, Danielsson BR, Dencker L, Vahter M. Embryotoxicity of arsenite and arsenate: Distribution in pregnant mice and monkeys and effects on embryonic cells in vitro. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 54: 311-320, 1984.
- Lindgren A, Vahter M, Dencker L: Autoradiographic studies on the distribution of arsenic in mice and hamster administered ⁷⁴Asarsenite or -arsenate. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 51: 253-365, 1982.
- Lugo G, Cassady G, Palmissano P: Acute maternal arsenic intoxication with neonatal death. *American Journal of Diseases of Children* 117: 328-330, 1969.
- Maiti S, Chatterjee AK: Effects of levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. *Archives of Toxicology* 75: 531-537, 2001.
- Maletić S: *Tehnike priprema uzoraka za analizu metala*. Centar izvrsnosti za hemiju okoline i procenu rizika, 2017,
- Mandal BK, Suzuki KT: Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58: 201-235, 2002.
- Marafante E, Rade J, Sabbioni E, Bertolero F, Foa V: Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite in the rabbit. *Clinical Toxicology* 18: 1335-1341, 1981.
- Marafante E, Vahter M: Solubility, retention and metabolism of intratracheally and orally administered inorganic arsenic compounds in the hamster. *Environmental Research* 42:72-82, 1987.
- Marchiset-Ferlay N, Savanovitch C, Sauvart-Rochat MP: What is the best biomarker to assess arsenic exposure via drinking water? *Environment International* 39: 150-171, 2012.
- Mazumdar DNG, Chakraborty AK, Ghosh A, Gupta JD, Chakraborty DP, Dey SB, Chattopadhyay N: Chronic arsenic toxicity from drinking tubewell water in rural West Bengal. *Bulletin of the World Health Organization* 66: 499-506, 1988.
- Morton WE, Caron GA: Encephalopathy: An uncommon manifestation of workplace arsenic poisoning. *American Journal of Industrial Medicine* 15: 1-5, 1989.
- Nakamuro K, Sayato T: Comparative studies of chromosomal aberration induced by trivalent and pentavalent arsenic. *Mutation Research* 88: 73-80, 1981.
- Nandi D, Patra RC, Swarup D: Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology* 211: 26-35, 2005.
- Narang APS, Chawls LS, Khurana SB: Levels of arsenic in Indian opium eaters. *Drug and Alcohol Dependence* 20:149-53, 1987.
- NAS, National Academic of Science: Medical and biological effects of environmental pollutants: Arsenic. National Academic of Science, Washington, D. C., 1977.
- Nordenson I, Sweins A, Beckman L: Chromosome abberations in cultured human lymphocytes exposed to trivalent and pentavalent arsenic. *Scandinavian Journal of work Environment and Health* 7: 277-281, 1981.
- Oreščanin V, Kollar R, Nađ K, Lovrenčić-Mikelić I: Characterization and treatment of water used for human consumption from six sources located in the Cameron/ Tuba City abandoned uranium mining area. *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic Hazardous Substances and Environmental Engineering* 46: 627-635, 2011.
- Oreščanin V: Arsenic in water- Origin, toxic effects and methods of elimination. *Hrvatske vode* 83: 279-282, 2013.

- Pershagen G: The carcinogenicity of arsenic. *Environmental Health Perspectives* 40: 93-100, 1981.
- Post G: *Dermal Absorption of Inorganic Arsenic from Water*. Department of Environmental Protection Division of Science, Research and Technology, New Jersey, 2003.
- Romić Ž, Habuda-Stanić M, Kalajdžić B, Kuleš M: Arsenic distribution, concentration and speciation in groundwater of the Osijek area, eastern Croatia. *Applied Chemistry* 26:37-44, 2011.
- Saha JC, Dikshit AK, Bandyopadhyay M, Saha KC: A review of Arsenic poisoning and its effects on human health. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 29: 281-313, 2010.
- Saha KC: Chronic arsenical dermatoses from tube-well water in West Bengal during 1983-87. *Indian Journal of Dermatology* 40: 1-12, 1995.
- Schlebusch CM, Gattepaille LM, Engström K, Vahter M, Jakobsson M, Broberg K: Human Adaptation to Arsenic-Rich Environments. *Molecular Biology and Evolution* 32: 1544-1555, 2015.
- Schoolmeester WL, White DR: Arsenic poisoning. *Southern Medical Journal* 73: 198-208, 1980.
- Slotnick MJ, Nriagu JO: Validity of human nails as biomarkers of arsenic and selenium exposure: A review. *Environmental Research* 102: 125-139, 2006.
- Smith AE: "Everything but the kitchen sink": Exposure to arsenic from bathing and other indirect pathways. *U Arsenic in New England: A Multidisciplinary Scientific Conference*, str. 29-31., Manchester, NH, 2002.
- Squibb KS, Fowler BA: The toxicity of arsenic and its compounds. *UBiological and Environmental Effects of Arsenic*, 233-269. Elsevier, New York, 1983.
- Strimbu K, Tavel JA: What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*. 5: 463, 2010.
- Stybło M, Delnomdedieu M, Thomas DJ: Biological mechanisms and toxicology consequences of the methylation of arsenic. *U toxicology of metals-biochemical aspects*, str. 407-433, Springer, Berlin, 1995.
- Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klapac T: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu, Osijek, 2010.
- Takagi Y, Matsuda S, Imai S, Ohmori Y, Masuda T, Vinson JA, Mehra MC, Puri BK, Kaniewski A: Survey of trace elements in human nails: an international comparison. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 41: 690-695, 1988.
- Tay CH, Seah CS: Arsenic poisoning from anti-asthmatic herbal preparations. *Medical Journal of Australia* 2: 424-428, 1975.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ: Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* 101:133-164, 2012.
- Tseng WP: Effect of dose-response relationships of skin cancer and Blackfoot disease with arsenic. *Environmental Health Perspectives* 19: 109-119, 1977.
- Tsoui SM, Wang TN, Ko YC: Mortality for certain diseases in areas with high levels of arsenic in drinking water. *Archives of Environmental Health* 54: 186-193, 1999.
- Vahter M, Marafante E, Dencker L: Tissue distribution and retention of ⁷⁴As-dimethylarsinic acid in mice and rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13: 259-264, 1984.
- Vahter M, Marafante E, Lindgren A, Dencker L: Tissue distribution and subcellular binding of arsenic in marmoset monkeys after injection of ⁷⁴As-arsenite. *Archives of Toxicology* 51:65-77,1982.

- Vahter M: Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Science Progress* 82: 69-88, 1999.
- VOER: Vietnam Open Educational Resources, <http://voer.edu.vn/file/53887> [27.6.2017.]
- Wall S: Survival and mortality pattern among Swedish smelter workers. *International Journal of Epidemiology* 9: 73-87, 1980.
- WHO, World Health Organization: *Environmental Health Criteria for Arsenic and arsenic compounds*. World Health Organization, Geneva, 2001.
- Wilhelm M, Hafner D, Lombeck I, Ohnesorge FK: Monitoring of cadmium, copper, lead and zinc status in young children using toenail: comparison with scalp hair. *Science of Total Environment* 103: 199-207, 1991.
- Winship KA: Toxicity of inorganic arsenic salts. *Adverse Drug Reactions and Toxicological reviews* 3: 129-160, 1984.
- Wu MM, Kuo TL, Hwang YH, Chen CJ: Dose-response relation between arsenic concentration in well water and mortality from cancer and vascular disease. *American Journal of Epidemiology* 130: 1123-1132, 1989.
- Yaemsiri S, Hou N, Slining MM, He K: Growth rate of human fingernails and toenails in healthy American young adults. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 24:420-423, 2010.
- Yager JW, Hicks JB, Fabianova E: Airborne arsenic and urinary excretion of arsenic metabolites during boiler cleaning operations in a Slovak coal-fired power plant. *Environmental Health Perspectives* 105: 836-842, 1997.
- Yamauchi H, Takahashi K, Yamamura Y: Metabolism and excretion of orally and intraperitoneally administered trimethylarsine oxide in the hamster. *Toxicological and Environmental Chemistry* 22: 69-76, 1989.
- Yu ZM, Dummer TJB, Adams A, Murimbah JD, Parker L: Relationship between drinking water and toenail arsenic concentrations among a cohort of Nova Scotians. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 24: 135-144, 2014.
- Zaldivar R: Arsenic contamination of drinking water and foodstuffs causing endemic chronic arsenic poisoning. *Beitrag zur Pathologie* 151: 384-400, 1974.
- Zheng Y, Wu J, Ng JC, Wang G, Lian W: The absorption and excretion of fluoride and arsenic in humans. *Toxicology Letters* 133: 77-82, 2002.