



Središnja medicinska knjižnica

Stasenko, Sandra (2011) *Procjena izloženosti otrovnim metalima i njihovih učinaka na funkcije posteljice u zdravih roditelja [Assessment of exposure to toxic metals and their effects on placental functions in healthy parturients]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/995>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Sandra Stasenko

**Procjena izloženosti otrovnim metalima
i njihovih učinaka na funkcije posteljice
u zdravih roditelja**

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničke Bolnice Merkur, Zagreb i u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, u okviru znanstvenoistraživačkog projekta «Izloženost otrovnim metalima i njihovi učinci u graviditetu i postnatalnom razdoblju» (MZOŠ br. 022-0222148-2135, voditeljica Martina Piasek).

Voditeljica rada: dr. sc. Martina Piasek, dr. med., znanstvena savjetnica.

Zahvala

Posebna hvala dr. sc. Martini Piasek, dr. med., znanstvenoj savjetnici na rado pruženoj podršci, nesebično darovanom znanja te na dragocjenim i nezamjenjivim uputama i savjetima bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

Hvala svim suradnicima i tehničkim suradnicima Jedinice za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu za cjelokupnu pomoć u radu. Velika hvala predstojnici Jedinice, dr. sc. Jasni Jurasović, dipl. ing. kem., višoj znanstvenoj suradnici na pomoći u svim fazama prikupljanja uzoraka, korisnim savjetima i zahtjevnim analizama mikroelemenata.

Hvala dr. sc. Vedi M. Varnai, dr. med., višoj znanstvenoj suradnici na mnogobrojnim vrijednim sugestijama i savjetima te velikodušnoj spremnosti za pomoć.

Zahvaljujem mojoj dragoj kolegici prof. dr. sc. Vesni Kušec, dr. med., znanstvenoj savjetnici koja je omogućila ovu zajedničku suradnju, povezala me sa istraživačkom skupinom u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu i pomogla u analizama sadržanim u ovom radu.

Zahvaljujem kolegi doc. dr. sc. Željku Duiću, dr. med. na razumijevanju u svakodnevnom radu te spremnosti za pomoć kada god mi je bilo potrebno.

Najljepša hvala svom medicinskom osoblju rađaonice KB Merkur za pomoć prilikom prikupljanja osobnih podataka te uzorkovanja krvi, seruma i posteljica, posebno primalji gospođi Antoniji Martinković na ljubaznosti, entuzijazmu i darovanoj vedrini.

Hvala svim roditeljama koje su pristale sudjelovati u ovom istraživanju.

Hvala svima koji su na bilo koji način pomogli ili su imali dobru namjeru to učiniti.

Mojim roditeljima i suprugu koji mi pružaju neizmjernu podršku kako u svemu što radim, tako u mojem zahtjevnom poslu što nije uvijek bilo lako...

Sadržaj

1. Uvod i svrha rada	1
2. Cilj i hipoteza	13
3. Materijali i metode	15
4. Rezultati	25
5. Rasprava	38
6. Zaključci	56
7. Sažetak	59
8. Summary	60
9. Popis literature	61
10. Životopis	76

Popis kratica

AAS	- atomska apsorpcijska spektrometrija
ANOVA	- analiza varijance
ATP	- adenzin trifosfat
CAT	- katalaza
Cu-Zn SOD	- bakar–cink superoksid dismutaza
ER	- estrogenski receptor
ET AAS	- elektrotermička atomska apsorpcijska spektrometrija
GSHPx	- glutation peroksidaza
hCG	- humani korionski gonadotropin
hPGH	- humani placentarni hormon rasta
ICP-MS	- masena spektrometrija induktivno spregnute plazme (inductively coupled plasma mass spectrometry)
IARC	- International Agency for Research on Cancer
IL	- interleukin
KB	- klinička bolnica
LDL	- lipoprotein niske gustoće
MAPK	- proteinska kinaza aktivirana mutagenom
MZOŠ	- Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa
RIA	- radioimunološka analiza
SD	- standardna devijacija
SH	- sulfhidrilna (tiolna) skupina

*Our right to reach our highest potential,
and to fulfill our human genetic legacy,
is threatened by exposures in the womb
to many chemicals.*

Sharyle Patton, Toxic trespass. Our Planet (UNEP magazine)
"Women, Health and the Environment", 2004; 15 (2): 24-26.

1. Uvod i svrha rada

Olovo, kadmij, živa, arsen i drugi metali i metaloidi prisutni su svuda u okolišu u koji dospijevaju iz prirodnih izvora i ljudskim djelovanjima. Nalazimo ih u tlu, vodi i zraku te u prehrambenom lancu, u namirnicama biljnog i životinjskog podrijetla.¹⁻¹⁰ Poremećaji zdravlja zbog prekomjernog nakupljanja metala u tijelu mogu nastati u uvjetima prekomjerne vanjske izloženosti metalima ili, u manjoj mjeri, zbog genetski uzrokovane bioakumulacije metala u tjelesnim odjeljcima (pr. poremećaji metabolizma bakra pri Wilsonovoj i Menkesovoj bolesti ili poremećaji metabolizma željeza pri hereditarnoj hemokromatozi, talasemiji i acerulopazminemiji). Posljedice su toksični učinci u funkcijama i/ili strukturi pojedinih organa i tjelesnih sustava.^{11,12}

Opasnosti za zdravlje mogu nastati i pri deficijenciji metala i metaloida koji su esencijalni za fiziološke funkcije u tijelu, tzv. esencijalnih elemenata kao što su kalcij, željezo, cink, bakar, selenij i drugi.¹¹⁻¹⁵ Mogući štetni učinci u organizmu nastaju zbog međudjelovanja (interakcije) esencijalnih i otrovnih elemenata u smislu jačih učinaka otrovnih metala pri deficijenciji esencijalnih elemenata. Zbog kompeticije esencijalnih i otrovnih elemenata za jednaka mjesta prijenosa pri apsorpciji u želučanocrijevnom traktu, nastaje pojačana apsorpcija određenog esencijalnog elementa za kojim postoji povećana fiziološka potreba u organizmu, ali istodobno se može pojačano i nespecifično apsorbirati i određeni otrovni metal ili više njih istodobno (pr. pojačana apsorpcija kadmija pri deficijenciji željeza).¹⁶

Povoljni primjeri interakcija esencijalnih i toksičnih metala jesu učinci peroralne suplementacije esencijalnim elementima (pr. kalcijem ili selenijem). Apsorpcija i retencija otrovnog metala (olova, kadmija odnosno žive) i njihovi štetni

učinci mogu se smanjiti pri istodobnoj izloženosti otrovnom metalu i dostatnom unosu esencijalnog elementa ili pri suplementaciji esencijalnim elementom.¹⁴⁻²²

Tijekom trudnoće i laktacije odnosno tijekom perinatalnog i postnatalnog razdoblja postoje povećane fiziološke potrebe za nutrijentima pa su česti deficiti esencijalnih elemenata što utječe na povećanu crijevnu apsorpciju i tjelesnu retenciju esencijalnih, ali i otrovnih metala i metaloida. Žene u generativnoj dobi i djeca u razdoblju intenzivnog rasta i razvoja smatraju se vulnerabilnim skupinama stanovništva, u njih su česta međudjelovanja esencijalnih i otrovnih metala pa je stoga u tim skupinama povećana opasnost za štetne učinke otrovnih metala.^{15,16,23-28}

Posteljica je jedinstveni organ koji je prokrvljen s dva odvojena optoka različitih značajki krvi (majčine i fetalne) i s točno određenim i ograničenim životnim vijekom. To je čini organom koji ima mnogobrojne prednosti za istraživanja otrovnih supstancija, uključujući toksične metale i metaloide s dokazanim nepovoljnim učincima na reprodukciju i razvoj.²⁹ Posteljica je pogodna za istraživanja kao 'uzorak dvojne namjene' za procjene izloženosti i učinaka otrovnih metala i metaloida u vanjskom okolišu žene i istodobno u unutarnjem okolišu fetusa koji raste i razvija se u tijelu buduće majke.³⁰⁻³³

Normalna struktura i funkcije posteljice i njezinih izvanembrionalnih opni nužni su za preživljavanje sisavca tijekom razvoja *in utero*. Funkcije posteljice obuhvaćaju maternalo-fetalni prijenos nutrijenata, uključujući metale i metaloide koji su esencijalni za rast i razvoj fetusa, prijenos metabolita odnosno razradnih produkata od fetusa do majke, aktiviranje i deaktiviranje kemijskih tvari iz okoliša te sintezu hormona, polipeptidnih (hCG, hPGH i leptin) i steroidnih hormona (progesteron, testosteron, estradiol), koji su nužni za održavanje trudnoće i porođaj zrelog, zdravog djeteta sposobnog za samostalan život. Sve to su ujedno moguća mjesta štetnih učinaka reproduksijskih otrova na funkciju i strukturu posteljice.¹⁶⁻¹⁸

Tijekom trudnoće svi metali koji su pohranjeni u organizmu se mobiliziraju i dospijevaju u krvni optok. Ukoliko je roditeljica bila izložena određenom otrovnom metalu (ili više njih) i prije trudnoće te se on deponirao u tjelesnim odjeljcima (pr. kadmij i živa u bubrezima ili olovo u kostima i zubima), oni dospijevaju u krvni optok iz tih tjelesnih pričuva. Budući da tijekom trudnoće nastaje preraspodjela esencijalnih makroelemenata (pr. kalcija) i mikroelemenata (pr. željeza) zbog potrebe

njihova prijenosa do ploda, nastat će i preraspodjela otrovnih metala iz deponiranih tkiva i organa, pa je moguće da dospiju do posteljice i prenesu se do ploda *in utero* u većoj ili manjoj mjeri. Stoga koncentracije metala u krvnom optoku roditelje i u posteljici u vrijeme neposredno nakon porođaja odražavaju ukupnu dotadašnju izloženost roditelje određenom metalu. To znači da nalaz pokazuje i trenutnu i prethodnu izloženost metalu koji se bioakumulirao u tjelesnim odjeljcima, dospio u krvni optok te u tkivu posteljice nakupljao pretežito (kadmij) ili samo djelomice (olovo, živa). Stoga je u istraživanjima procijene izloženosti žene metalima, uz majčinu krv i krv pupkovine, korisno imati i uzorke posteljice te utvrditi koncentracije metala i metaloida u svim tim uzorcima kao pokazatelje stanja metala u majčinom organizmu i u fetusu.^{17-19,29-36} U procjeni stanja otrovnih i esencijalnih metala u roditelji, veoma je korisno uzorkovati tkivo posteljice nakon porođaja i *ex vivo* odrediti koncentracije, točnije rečeno, masene udjele metala odnosno metaloida u tom organu, koji se nalazi na mjestu razgraničenja maternalnih i fetalnih tjelesnih odjeljaka. Povrh toga, posebice je vrijedno odrediti i stanje steroidnih hormona, progesterona i estradiola, koji su nužni na održavanje trudnoće i dovršenje porođaja, za što je potrebno razviti odgovarajuće i pouzdane metode analize.

* * *

Svrha istraživanja sadržanog u ovom radu je procijeniti razine izloženosti metalima i rizike štetnih učinaka metala u žena fertile dobi te rizik za buduće dijete zbog perinatalne izloženosti metalima uporabom uzoraka ljudskog posteljičinog tkiva, majčine krvi i krvi pupkovine i vezano za to

- odrediti koncentracije steroidnih hormona progesterona i estradiola u posteljici *ex vivo* u povezanosti s koncentracijama (tkivnim masenim udjelima) toksičnih metala, ponajprije kadmija, kao pokazatelja izloženosti metalima u okolišu, istodobno sa stanjem esencijalnih elemenata u tkivu posteljice;
- odrediti koncentracije toksičnih metala kadmija, olova i žive u parovima uzoraka majčine krvi i krvi pupkovine te esencijalnih mikronutrijenata željeza, cinka, bakra i selenija u serumima krvi majki i iz pupkovine u ovisnosti o navikama pušenja i prehrani majke.

Pregled literaturnih podataka

Štetni reproduksijski učinci metala i metaloida

Metali koji izazivaju neposredne štetne učinke na reprodukciju u sisavaca, uključujući čovjeka, izravno oštećuju reproduksijske organe, odrasle spolne funkcije i funkcionalnu jedinicu majka-dijete, od oplođenog jajašca preko embrio/fetalno-placentalne jedinice do novorođenčeta. Otrovní metali kao što su olovo, kadmij i živa jesu sistemski otrovi koji pri višim dozama mogu djelovati neizravno štetno i na reproduksijske funkcije u oba spola, a pri nižim razinama izloženosti izravno na spolne organe kao ciljne organe.^{18,37} U znanstvenim istraživanjima reproduksijskih i razvojnih učinaka, koncentracije metala u majčinoj krvi, krvi pupkovine i/ili posteljiničnom tkivu predstavljaju tzv. biomarkere izloženosti. Ti pokazatelji upućuju na moguće opasnosti za reprodukciju i fetus zbog izloženosti mjerenim metalima, no oni sami ne mogu poslužiti za utvrđivanje kauzalnih povezanosti izloženosti i određenih štetnih (reproduksijskih ili razvojnih) učinaka bez određivanja tzv. biomarkera učinaka. Biomarkeri učinaka mogu biti, primjerice, izmjerene koncentracije esencijalnih nutrijenata i steroidnih hormona u tjelesnim tekućinama odnosno njihovi maseni udjeli u tkivima reproduksijskih organa te drugi pokazatelji definirani planom istraživanja u povezanosti s biomarkerima izloženosti.^{18,19,38} O tome će biti više riječi dalje u tekstu.

Kadmij

Kadmij je metal bez poznate fiziološke uloge u sisavaca, uključujući ljude, ali s dokazanim brojnim toksičnim učincima u organizmu. Proširen je u okolišu suvremenog čovjeka djelomice iz prirodnih izvora, ali najviše zbog ljudskih aktivnosti. Potonje se odnosi na industrijsku emisiju, gomilanje i spaljivanje otpada te obogaćivanje tala kanalizacijskim muljem i fosfatnim gnojivima. Izloženost kadmiju može biti profesionalna (u metalurgiji, izradi boja, plastičnih masa, tekstilnoj industriji i dr.) i iz okoliša (tzv. ambijentalna izloženost). U općem stanovništvu, najčešći izvori izloženosti kadmiju jesu onečišćena hrana (žitne pahuljice, riža, krumpir, iznutrice, ribe i plodovi mora - mekušci i školjkaši) te

duhanski dim (aktivnim i pasivnim pušenjem cigareta).^{1-4,20-22} Dokazano je da je u pušača cigareta svakodnevna izloženost kadmiju veća 2 do 3 puta nego u nepušača.¹⁷

Kadmij je kumulativan otrovni metal koji se nakuplja u unutarnjim organima, uključujući organe hipotalamo-hipofizno-gonadalne osovine i posteljicu.^{10,33-35,38-40} Budući da se u velikoj mjeri nakuplja u posteljici, kadmij se otežano prenosi kroz posteljicu i ona predstavlja nepotpunu zapreku za njegov prijenos do fetusa. Istraživanjima na pokusnim životinjama je pokazano da su učinci kadmija na plod *in utero* zbog izloženosti majke prije i/ili za vrijeme graviditeta neizravni.^{16-18,35,40,41} Nakupljanjem kadmija u posteljičinom tkivu mogu se remetiti barem dvije funkcije posteljice: 1) prijenos esencijalnih elemenata iz majčinog krvotoka do ploda *in utero* i 2) sinteza posteljičnih steroidnih hormona. Na taj način može se remetiti održavanje trudnoće, rast i razvoj fetusa i normalan porođaj zdravog djeteta.

Sve do 90.-ih godina prošlog stoljeća nije bilo sigurnih dokaza da je kadmij reproduktivni otrov u ljudi, a i podaci u pokusnih glodavaca bili su do tada oskudni.³⁷⁻⁴¹ Tijekom posljednja dva desetljeća pojavljuje se sve više dokaza u literaturi da metali, među kojima osobito kadmij, mogu imati svojstva tzv. endokrinih disruptora jer mogu ili inhibirati endogene hormone i endokrine funkcije reproduktivnih organa, ili imitirati odnosno pojačavati djelovanje endogenih hormona. Zbog potonjih svojstava često se nazivaju i ksenoestrogenima, okolišnim estrogenima ili metaloestrogenima.^{17, 18,34,35,41-47} Ti aspekti toksičnosti opisani su dalje u poglavlju Metali sa svojstvima endokrinih disruptora.

Olovo

Olovo je metal koji je prisutan u čovjekovom okolišu otkako su prepoznata njegova brojna korisna svojstva pred više tisućljeća. Smatra se da se rabio još u starom Egiptu. Često se navodi pretpostavka Gilfillana iz 1965. godine da je jedan od mogućih razloga propasti Rimskog Carstva bilo kronično otrovanje olovom bogatih slojeva društva (najviše zbog slađenja vina olovnim acetatom) što se, između ostalog, očitovalo i porastom neplodnosti i povišenim pomorom dojenčadi.⁴⁸ Olovo je opći metabolički otrov, a toksični reproduktivski učinci u sisavaca, uključujući ljude, u oba spola dobro su opisani u literaturi, posebice kao posljedica visokih razina izloženosti pri akcidentalnim otrovanjima ili, u prijašnjim razdobljima, zbog

profesionalne izloženosti.⁴⁹ U suvremeno doba, izloženost olovu u okolišu je moguća zbog oslobađanja olova iz prirodnih izvora, a još više ljudskim djelovanjima (industrijska emisija, loženje ugljenom i naftom, izgaranje čvrstog otpada, olovne boje, a sve manje iz ispušnih plinova vozila zbog uporabe olovnog benzina, što je napušteno u velikom broju država). Profesionalna izloženost u željezarama i čeličanicama, ljevaonicama mjedi i bronce, pri izradi akumulatora i drugdje danas se zakonski nadzire, no mogući su propusti, posebice u manjim radionicama s lošom zaštitom na radu. Izvori izloženosti olovu onečišćenom hranom i pitkom vodom (pogotovo ako je voda meka i provodi se kroz olovne cijevi), u slučajevima držanja hrane i pića u neprikladnim posudama (glinenim, keramičkim, kristalnim ili u starim konzervama i spremnicima lemljenim legurom koja sadrži olovo) te ilegalnom destilacijom alkoholnih pića, kozmetičkim preparatima, tradicionalnim i etničkim ljekovitim (pr. ajuverdskim) pripravcima i drugom.^{5,6,22} Olova ima također i u duhanskom dimu.^{17,50}

Još i danas nisu do kraja istraženi učinci i mehanizmi djelovanja niskih razina izloženosti olovu, pogotovo zbog perinatalne izloženosti. U suvremeno doba, opisani su štetni reprodukcijски učinci u svezi s izloženošću žena olovu kao što su poremećaji menstrualnog ciklusa, poremećaji fertiliteta, pobačaj, prerani porođaj, intrauterini zastoj rasta i snižene porođajne težine.^{5,6,18,22,37} Budući da se olovo prenosi gotovo u cijelosti kroz posteljicu (za razliku od kadmija), ono može djelovati štetno izravno na fetus *in utero*. Najopasniji su neurotoksični učinci olova u djece zbog izloženosti koja su nastala u prenatalnom i ranom postnatalnom razdoblju tijekom razvoja mozga, ireverzibilni su i ostavljaju trajne štetne posljedice.¹⁸

Živa

U današnje doba su prepoznate tri glavne moguće opasnosti vezane za izloženost ljudi živi: metilživa u prehrani (ribe i morski plodovi), živine pare iz amalgamskih zubnih ispuna i etilživa u tiomersalu (ili timerosalu) koji služi kao konzervans u cjepivima za djecu i odrasle.^{51,52} Unatoč velikog broja istraživanja i objavljenih rezultata, za sada nema konačnih i usuglašanih stavova i zaključaka o povezanostima izlaganja živi (tiomersalu) u cjepivima i poremećaja neurološkog razvoja u djece. Također nema konačnih dokaza da izloženost metilživi prehranom u trudnoći

(poglavito prehranom ribama) predstavlja opasnost za nerođeno dijete.⁵¹⁻⁵³ U profesionalnim uvjetima, moguć je dodir sa živom na radnim mjestima (u rudarstvu, kloralkalnim tvornicama, pri izradi instrumenata i fluorescentnih svjetiljki te u fizikalnim i medicinskim laboratorijima).^{9,22} Postoje dokazi o međudjelovanju žive i selenija u prehrani. Slično kao i olovo, živa može imati neurotoksične učinke koji su osobito opasni u djece. Potrebna su daljnja istraživanja o uvjetima pod kojima mogu nastati ireverzibilni neurotoksični učinci zbog perinatalne izloženosti raznim kemijskim oblicima žive.^{18,53}

Metali sa svojstvima endokrinih disruptora

Posljednjih godina istraživanja na području reproduktivne i razvojne toksikologije dala su nove i revolucionarne dokaze o djelovanju metala i metaloida kao supstancija sa svojstvima remećenja reproduktivnih funkcija i fizioloških procesa tijekom razvoja sisavaca, uključujući čovjeka.^{18,37} Takvi metalni elementi i spojevi, među kojima mnogi djeluju i kao metaloestrogeni, jesu: kadmij, olovo, živa, arsen i uran.^{35,39,42-47,54-59} Oni se svrstavaju u skupinu tzv. endokrinih disruptora ili kemijskih supstancija sa svojstvima endokrine disrupcije (eng. *endocrine disrupting chemicals*) zato jer je za njih dokazano da mogu međudjelovati s hormonskim receptorima^{60, 61} i stoga ili oponašati, ili blokirati endogene steroidne hormone u brojnih životinjskih vrsta, uključujući sisavce i čovjeka. Nadalje, takvi metali i metaloidi mogu utjecati na stanične signalne putanje i/ili mijenjati razmjer lučenja određenih enzima važnih za biosintezu steroidnih hormona.^{18,39,43}

U tom smislu i duhanski dim može djelovati kao endokrino-disruptivna mješavina visokotoksičnih elemenata i spojeva koja, uz mnogobrojne toksine i brojne kancerogene supstancije, obuhvaća oko 30 metalnih iona.^{17,50,62,63} Dugo je poznato da izlaganje duhanskom dimu može znatno ugroziti plodnost žene dok su u muškaraca štetni reproduktivni učinci duhanskog dima manje dramatični. Endokrini učinci duhanskog dima pokazani su za brojne neuroendokrine funkcije u hipotalamo-hipofizealnoj osovini kao što su funkcije štitne žlijezde, koncentracije hormona nadbubrežne žlijezde, funkcije gušterače u hormonskoj regulaciji glukoze, pražnjenje

želuca, koštana masa te gonadalne i reproduktivne funkcije žena i muškaraca.⁶⁴⁻⁶⁶ Tijekom trudnoće duhanski dim može narušiti normalno funkcioniranje maternalno–placentalno–embrio/fetalne jedinice te loše utjecati na zdravlje novorođenčeta u perinatalnom razdoblju, što može imati štetne posljedice u njegovom kasnijem životu.^{17,65,66}

Vezano za onečišćivače čovjekova okoliša koji mogu imati svojstva endokrinih disruptora i koji uključuju metale poput kadmija, olova, žive i druge, postavljaju se brojna pitanja na koja će dati odgovore buduća istraživanja. Gulliete⁶¹ definira tri skupine ključnih otvorenih pitanja vezanih za endokrinu disrupciju:

- 1) Pri kojim se razinama izloženosti u okolišu zbiva endokrina disrupcija u ljudi?
- 2) Koji mehanizmi pokreću reakcije endokrine disrupcije u ljudima?
- 3) Da li se do sada dokazane štetne reakcije endokrine disrupcije u raznim životinjskim vrstama mogu primijeniti i na ljude?

Općenito govoreći, podaci o povezanostima izloženosti bilo kojem kemijskom endokrinom disruptoru i zdravlja životinja ili ljudi su oskudni. Dokaze da su ljudi skloni remećenju endokrinih funkcija odnosno endokrinom disrupciji pri izloženostima pojedinim onečišćivačima u okolišu do sada su dala istraživanja uglavnom pri veoma visokim razinama izloženosti. Potrebno je procijeniti postoje li opasnosti za takve učinke pri stvarnim, nižim razinama izloženosti pojedinim onečišćivačima kao što su otrovni metali i metaloidi kakve su prisutne u okolišu.

Posljednjih desetljeća dobivene su nove spoznaje o ulozi kadmija kao endokrinog disruptora u posteljici i o mehanizmima takvog djelovanja.^{39,45,67-69} Neizravne posljedice nakupljanja kadmija u posteljici u smislu poremećaja lučenja posteljinih hormona i transplacentalnog prijenosa esencijalnih mikronutrijenata (vitamina i mikroelemenata), mogu imati dalekosežne posljedice na trudnoću zbog mogućeg utjecaja na imunološke procese koji su sadržani u nužnom toleriranju dvaju međusobno stranih organizama – majke i fetusa tijekom trudnoće.^{17,40,70} Pritom izloženost kadmiju (kao i drugim ksenobioticima) može imati raspon učinaka od ometanja zaštitnih mehanizama koji sprečavaju majčin imunološki sustav da odbaci posteljicu i fetus, do izazivanja olakšanog izlaganja antigenima *in utero* što poslije može rezultirati alergijskim poremećajima bolestima u ranom djetinjstvu. Sami

steroidni spolni hormoni pak imaju višestruko djelovanje, između ostalog važna je i njihova imunomodulatorna uloga.^{71,72} Kadmij može međudjelovati sa steroidnim hormonima i dovesti do poremećaja koji su usko povezani s genetskim i infektivnim čimbenicima imunoloških bolesti te utjecati na njihov tijek.⁷³

U sisavaca se kadmij nakuplja u unutarnjim organima tijekom cijeloga života, uključujući organe hipotalamo-hipofizno-gonadalne osovine. Istraživanja su pokazala da je izlaganje kadmiju izazvalo promjene u endokrinima funkcijama hipofize⁷⁴⁻⁷⁷, jajnika^{41,74,78-82} i posteljice.^{17,34,42,67,82} Treba istaknuto da poremećaji u sintezi steroidnih hormona mogu nastati i pri koncentracijama kadmija koje još ne izazivaju vidljive morfološke promjene steroidnog organa (testisa, jajnika ili posteljice). Takva disrupcija steroidogeneze pokazana je u testisima štakora pri veoma niskoj dozi od 0,18 mg Cd/kg tjelesne mase.⁸³ U istraživanju Piasek i Laskeya,⁴¹ jednokratno parenteralno (supkutano) izlaganje kadmiju u dozi od 3 ili 5 mg Cd/kg tjelesne mase odraslih štakorica u reproduktivnoj dobi, bilo je povezano s niskim razinama kadmija (1,2 ili 1,6 µg/g svježe mase jajnika) i poremećajima normalne steroidogeneze u jajniku na više mjesta u lancu biosinteze steroidnih hormona, s najvećim promjenama opaženim u produkciji estradiola. Pri supkroničnoj parenteralnoj izloženosti kadmiju u štakorica tijekom skotnosti, u ukupnoj dozi od 5 mg/kg tjelesne mase, prosječna koncentracija kadmija u posteljicama je bila $1,18 \pm 0,109$ µg/g svježe mase tkiva uz istodobno smanjenu produkcija progesterona, bez vidljivih morfoloških promjena u tkivu posteljice.³⁵

U istraživanju Paksy i suradnika⁸⁰ pokazano je da najniža koncentracija kadmija koja može smanjiti produkciju progesterona u kulturi ljudskih granulosa stanica iznosi 16 µM (1,8 µg/mL), što je otprilike 3,5 puta veća koncentracija od masenog udjela kadmija izmjerene u jajniku pušačica koji iznosi do 0,5 µg/g svježe mase tkiva.

Metali u duhanskom dimu i ljudska posteljica

Osim hrane, u osoba koje nisu profesionalno izložene kadmiju, glavni izvor izloženosti je duhanski dim u kojem je kadmij najzastupljeniji metalni ion. Ovisno o vrsti cigarete, koncentracija kadmija može iznositi do 6,67 µg po cigareti,^{17,50,62} a

drugi metalni ioni s visokim koncentracijama u duhanu jesu olovo, do 1 µg te arsen, do 1,4 µg po cigareti.^{50,63} Pokazano je da se nakon inhalacije cigaretnog dima apsorbira 25 do 50% ili više kadmija, nakon peroralne izloženosti, želučanocrijevna apsorpcija iznosi 1 do 10%, a nakon kutane izloženosti apsorbira se manje od 1% doze kadmija.^{1-3,10,20-22,84} Zato je izlaganje duhanskom dimu aktivnim i pasivnim pušenjem važno kao opasan izvor izloženosti otrovnim metalima, najviše kadmiju, a u manjoj mjeri olovu, arsenu i drugim metanim ionima, koji inhalacijom u velikom omjeru dospijevaju u krvni optok i brzo se raznose do svih organa i tkiva. Uz mnogobrojne druge otrovne i kancerogene sastojke duhanskog dima, metalni ioni u znatnoj mjeri pridonose izazivanju štetnih oksidativnih reakcija u stanicama, uključujući reproduktivne organe i maternalno – embronalnu odnosno maternalo–placentalno–fetalnu funkcionalnu jedinicu.¹⁷

Dosadašnjim istraživanjima provedenim u Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu u kojima su određivane razine kadmija u općem stanovništvu u Hrvatskoj, pokazano je da je u nepušača koncentracija kadmija u krvi⁸⁵ manja od 1,5 µg/L, u kori bubrega⁸⁶ je oko 20 µg/g, a u posteljici³⁴ je oko 10 do 16 ng/g svježe mase tkiva. U pušača u odnosu na nepušače, koncentracije kadmija su do pet puta veće u krvi, a tkivni maseni udjeli kadmija u bubrežnoj kori i posteljici su dvostruko veći.^{17,20,21,34}

Metali u krvi, serumu i tkivu posteljice kao pokazatelji izloženosti i pokazatelji učinaka

U svrhu procijene izloženosti i procjene učinaka metala i metaloidima pri stvarnim razinama izloženosti tim onečišćivačima u okolišu služe biološki i biokemijski pokazatelji, tzv. biomarkeri izloženosti (eng. *biomarkers of exposure*) i biomarkeri učinaka (eng. *biomarkers of effects*). Biomarkeri izloženosti i biomarkeri učinaka utvrđuju se u postupku tzv. biološkog monitoringa (eng. *biomonitoring*). Biomarkere izloženosti predstavljaju izmjerene vrijednosti razina metala u biološkom uzorku. Kao biološki uzorci uobičajeno se rabe uzorci krvi, seruma, kose, mokraće, stolice i drugih tjelesnih izlučevina, a mogu se rabiti svi bioptički, intraoperativni, posthumni,

i pobačeni materijali. Na izmjerenu vrijednost metala u uzorku utječu trajanje izloženosti, toksikokinetika metala, vrsta medija (uzorka) i vrijeme uzorkovanja. U biomarkere učinaka spadaju izmjereni parametri bioloških reakcija povezanih sa specifičnim izloženostima (pr. razine esencijalnih elemenata ili aktivnosti specifičnih enzima u svezi s izloženošću otrovnom metalu). Tijekom posljednjih pet desetljeća puna krv se rabi kao najčešći uzorak u kojem se određuju koncentracije olova, kadmija i žive koje služe kao pokazatelji izloženosti tim toksičnim metalima u ljudima tijekom probira (*screeninga*), u dijagnostičke svrhe i tijekom humanog biološkog monitoringa metala u uvjetima dugotrajne izloženosti.^{19,87,88}

Ljudska posteljica se može smatrati najvećim ljudskim bioptičkim materijalom i vrijedan je biološki materijal pogodan u praćenju izloženosti i učinaka ksenobiotika u biološkom monitoringu, zajedno s uobičajenim uzorcima krvi i seruma. Također se može rabiti kao visokovrijedno indikacijsko tkivo izloženosti pojedinim metalima, naročito kadmiju koji se nakuplja u posteljičinom tkivu.^{17,29,33,35} Podaci o koncentracijama (masenim udjelima) metala u posteljičinom tkivu mogu veoma korisno poslužiti u procjenama specifičnih opasnosti izmjerenih biomarkera kao i za daljnje usporedbe jednakih pokazatelja po raznim geografskim regijama i u raznim vremenskim razdobljima izloženosti primjenom postupaka tzv. meta-analiza.³⁰⁻³²

Što se tiče biološkog monitoringa, posteljici kao organu za uzorkovanje tkiva za razne analize ne posvećuje se pozornost kakvu ona zaslužuje. Uzorci posteljice mogu poslužiti kao alternativa ponovljenom uzimanju uzoraka krvi i u *post hoc* procjeni rizika fetalnog distresa zbog izloženosti metalima i metaloidima *in utero*. Prije trideset pet godina Baglan i suradnici³³ su predložili uporabu posteljičnog tkiva za praćenje izloženosti majke i čeda metalima, poglavito kadmija. Od tada su u različitim krajevima svijeta brojni istraživači vrednovali izloženost metalima i njihov utjecaj na maternalno zdravlje i fetus, koristeći se analizama u uzorcima posteljičnog tkiva. U nizu opsežnih članaka Iyengar i Rapp³⁰⁻³² su prikazali prednosti uporabe ljudske posteljice kao «uzorka s dvostrukom namjenom», pomoću kojega se može pratiti prisutnost štetnih tvari vanjskom majčinom, ali i u fetalnom okolišu kojeg čini majčin organizam. Naglasak je stavljen na procjene razina izloženosti otrovnim metalima i njihove rizike za funkciju maternalno–placentalno–

fetalne jedinice sa sveobuhvatnim pregledom podataka procjena razina metala u posteljici do 2000. godine zajedno s metodama koje su rabljene prilikom analiza elemenata u raznim vremenskim razdobljima.

Osim što se trebaju služiti prikladnim i pouzdanim analitičkim tehnikama, istraživači bi prilikom utvrđivanja koncentracija metala u posteljici trebali posebno obratiti pozornost na odgovarajuću procjenu mogućih izvora izloženosti metalima u okolišu iz kojega potječe uzorak posteljičinog tkiva.²⁹ U tu svrhu treba prikupljati detaljne i što preciznije informacije o svakoj ispitanici (rodilji) u istraživanju. Također treba uzeti u obzir podatke iz povijesti bolesti. Precizna procjena pušačkih navika treba se temeljiti na iskazima ispitanica o aktivnom i pasivnom pušenju, pri čemu osobe vlastitom procjenom iskazuju podatke o osobnim pušačkim navikama te o vremenu provedenom pored druge osobe koja je aktivni pušač duhana (u obitelji, na radnom mjestu i drugdje). Budući da je posteljica organ kroz koji prolaze i dijelom se nakupljaju u njezinom tkivu razni otrovni metali i metaloidi te esencijani mikronutrijenti, posteljičino tkivo može poslužiti za procjenu stanja otrovnih i esencijalnih elemenata tijekom trudnoće zbog izloženosti koje su se dogodile za vrijeme trudnoće, ali i prije trudnoće, dakle u žene u dobi kad je sposobna za rađanje. Svi podaci o mogućim izvorima izloženosti metalima i životnim navikama ispitanice moraju se povezati s izmjerenim razinama metala i metaloida u biološkim uzorcima – posteljičinom tkivu, krvi i serumu majke te krvi i serumu pupkovine.^{17,29-33}

2. Cilj i hipoteza

Neposredni ciljevi istraživanja sadržani u ovom doktorskom radu jesu:

- 1) **Anketnim upitnikom** prikupiti relevantne podatke o ispitanicama roditeljama usredotočeno na podatke za procjenu izvora izloženosti otrovnim metalima iz okoliša (prema podacima o mjestu stanovanja i radnom mjestu) i životnim navikama (primarno o prehrani i aktivnom pušenju cigareta odnosno o pasivnoj izloženosti duhanskom dimu u okolišu);
- 2) U **posteljicama** žena s normalnom trudnoćom nakon ročnog porođaja rodničkim putem u rodilištu Kliničke bolnice, standardnim analitičkim metodama utvrditi:
 - koncentracije otrovnih metala kadmija i olova u svrhu **procjene izloženosti otrovnim metalima;**
 - koncentracije esencijalnih metala cinka, željeza i bakra u svrhu **procjene učinaka otrovnih metala na transplacentarni prijenos** esencijalnih mikronutrijenata do fetusa.
 - koncentracije steroidnih hormona progesterona i estradiola u posteljini tkivu u svrhu **procjene učinaka otrovnih metala na sintezu i produkciju posteljinih hormona** nužnih za održanje trudnoće i normalan porođaj;
- 3) U **uzorcima venske krvi majke i krvi pupkovine** u žena s normalnom trudnoćom i ročnim porođajem rodničkim putem u rodilištu Kliničke bolnice, standardnim analitičkim metodama utvrditi:
 - koncentracije otrovnih metala olova, kadmija i žive u **punoj krvi majke i u krvi pupkovine** u svrhu procjene izloženosti metalima majke i fetusa *in utero*;
 - koncentracije esencijalnih mikronutrijenata cinka, željeza, bakra i selenija u **serumu majke i serumu pupkovine** u svrhu procjene učinaka otrovnih metala na stanje esencijalnih mikronutrijenata u majci i u fetusu.
- 4) Procijeniti učinke na **opće zdravstveno stanje novorođenčeta**: porođajnu težinu i dužinu te ocjenom po Apgarovoj;

Hipoteza istraživanja

Između nekoliko tisuća štetnih kemijskih sastojaka duhanskog dima je oko 30 toksičnih metalnih iona, koji se također nalaze i u zraku, hrani i vodi za piće. Metali dospjevaju u organizam inhalacijom i ingestijom. Apsorpcija metala u dišnom sustavu je puno veća (do nekoliko desetaka puta) nego u želučanocrijevnom sustavu. Tijekom trudnoće, metalni ioni mogu prolaziti kroz posteljčinu zapreku gotovo u cijelosti (olovo, živa) ili se pretežito nakupljaju u posteljičinom tkivu (kadmij). Toksične metale i esencijalne metalne mikronutrijente moguće je analitički precizno odrediti u posteljici kao organu na crti razgraničenja majčinog i fetalnog organizma, u organizmu majke (u krvi i serumu) i u plodu (u krvi i serumu pupkovine) te tako procijeniti njihovu izloženost i međudjelovanje u žena tijekom reproduktivnog razdoblja.

Toksični metali mogu ugroziti transplacentalni prijenos esencijalnih mikronutrijenata od majke do fetusa *in utero* te sintezu i produkciju posteljičnih steroidnih hormona što može imati štetne posljedice za održanje trudnoće, preživljavanje fetusa, normalan porod i zdravlje potomka nakon rođenja. Štetne učinke metala na funkcije posteljice moguće je procijeniti utvrđivanjem stanja mikronutrijenata u posteljici i majčinim i fetalnim tkivnim odjeljcima te procjenom endokrine disrupcije u posteljičinom tkivu.

3. Materijali i metode

Za sva provedena istraživanja sadržana u disertaciji dobivene su potrebne suglasnosti nadležnih Etičkih povjerenstava ustanova u kojima su obavljani pojedini dijelovi istraživanja, resornog ministarstva (MZOŠ) koje je odobrilo znanstvenoistraživački projekt unutar kojeg se odvijalo ovo istraživanje te Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koje je dalo suglasnost za istraživanja obuhvaćena ovim radom. Za sve navedeno postoje dokazi u pisanom obliku.

Plan istraživanja

Istraživanje je provedeno u dva povezana dijela unutar trogodišnjeg istraživačkog razdoblja sa sljedećim planom istraživanja:

- A. Procjena stanja otrovnih i esencijalnih metala i steroidnih hormona progesterona i estradiola u posteljicama nakon porođaja zdravih roditelja;
- B. Procjena stanja otrovnih metala u punoj krvi majke i krvi pupkovine te esencijalnih mikroelemenata u serumima majki i pupkovine nakon porođaja zdravih roditelja.

Ispitanice

Sve ispitanice u istraživanju bile su zdrave roditelje s ročnim porođajem rodničkim putem u rodilištu Kliničke bolnice u Zagrebu. Od svake ispitanice koja je bila uključena u istraživanja, nakon detaljnog objašnjenja svrhe i važnosti istraživanja koje se namjerava provoditi, dobivena je suglasnost potpisom za sudjelovanje u istraživanju bilježenjem osobnih podataka prema anketnom upitniku, uvidom u relevantnu medicinsku dokumentaciju te uzorkovanjima posteljice odnosno majčine krvi i krvi pupkovine uz zajamčenu zaštitu privatnosti izvora podataka i uzoraka tijekom cijelog postupka istraživanja i objavljivanja rezultata. U tu svrhu svakoj ispitanici dodijeljen je redni broj i oznaka prema početnim slovima imena i

prezimana te su tako označavani svi dobiveni pojedinačni podaci i uzorci tijekom analiza u laboratorijima i konačne statističke obrade podataka.

Istraživanje je obuhvatilo ukupno 406 roditelja. Nakon porođaja od svih ispitanica skupljeni su podaci relevantni za istraživanje anketnim upitnikom u koji su bilježeni podaci prema unaprijed utvrđenim kriterijima i ciljanim pitanjima. Da bi se što je više moguće eliminirali svi drugi prisutni čimbenici (tzv. *confounding factors*) koji se ne istražuju, a mogu otežati interpretaciju nalaza, u istraživanje su bile uključene roditelje prema sljedećima kriterijima: zdrave roditelje, osobe koje nisu imale nikakvih komplikacija tijekom trudnoće, osobe koje u anamnezi nisu imale nikakve kronične bolesti ili dugotrajne poremećaje zdravlja i osobe kojima je porođaj okončan rodničkim putem i u roku u rodilištu Kliničke bolnice u Zagrebu. Razgovor s ispitanicama obavio je jedan od istraživača na projektu (uz pomoć medicinskog osoblja u rađaonici ili na rađaonskom odjelu) i podaci su upisani u obrazac upitnika koji je sastavljen na temelju dosadašnjih iskustava istraživača u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu (dalje Jedinica Instituta) u kojoj se vodi znanstvenoistraživački projekt i čiji je sastavni dio istraživanje sadržano u ovoj disertaciji.^{17,34}

Protokol istraživanja

Svi postupci tijekom istraživanja pomno su slijeđeni prema detaljnom razrađenom Protokolu istraživanja.

I. Prikupljanje podataka o ispitanicama

Anketni upitnik

Upitnik je sadržavao ciljane pitanja za prikupljanje općih i ciljanih anamnestičkih podataka (**tablica I**). Prikupljeni su potrebni opći osobni podaci i podaci o socijalom i ekonomskom stanju svake ispitanice. Najveći dio pitanja odnosio se na dobivanje podataka o mogućim izvorima izloženosti metalima na radnom mjestu i u općem okolišu u kojem boravi ili se kretala ispitanica prije i za vrijeme trudnoće. Posebno su detaljno ispitivane prehranbene i životne navike. Prikupljeni su ovi podaci o prehranbenim navikama: vrsta prehrane (mješovit, vegetarijanski ili veganski tip); sastav tjednih obroka s posebnim naglaskom na učestalost unosa riba i školjaka; unos alkoholnih pića, kave i mineralno-vitaminskih dodataka prehrani.

Posebna pozornost posvećena je podacima o izloženostima duhanskom dimu na način da su se ispitanice same svrstale u jednu od ponuđenih skupina: «pušačice», «nepušačice» ili «bivše pušačice». U aktivnih pušačica pitalo se o pušenju prije i za vrijeme trudnoće te o broju i vrsti cigareta, u bivših pušačica pitalo se kad su prestale pušiti cigarete, a u svih ispitanica pitalo se da li su izložene okolišnom cigaretnom dimu (pasivnom pušenju) na radnom mjestu i izvan posla (u obitelji i drugdje). S obzirom na naviku pušenja, prema podacima dobivenim samoodređenjem, svi podaci vezani za pokazatelje izloženosti i pokazatelje učinaka otrovnim metalima kadmiju i olovu koji su zastupljeni u duhanskom dimu, analizirani su i uspoređivani u dvije istraživačke skupine koje su definirane ne sljedeći način:

- u skupinu «**nepušačice**» svrstane su ispitanice koje nisu nikad pušile cigarete i one koje su prestale pušiti više od 12 mjeseci prije sadašnje trudnoće;
- u skupinu «**pušačice**» svrstane su ispitanice koje su pušile bilo kada u trudnoći i/ili prije trudnoće, unutar 12 mjeseci od sadašnje trudnoće.

Istraživane skupine bile su podudarne u prosječnoj dobi roditelja, socioekonomskom statusu, paritetu (broju prethodnih porođaja), broju spontanih pobačaja i prijevremenih porođaja.

Tablica I.

Podaci prikupljeni anketnim upitnikom o roditeljima čiji su uzorci rabljeni u procjenama izloženosti i učinaka metala (prema Piasek i sur.¹⁷)

Opći osobni podaci	Dob roditelje Mjesto rođenja
Socioekonomsko stanje i radna anamneza	Obrazovanje Zanimanje Sadašnje radno mjesto
Podaci o mogućoj nedavnoj izloženosti u okolišu	- mjesto stanovanja - mijenjanje mjesta boravka (selidba) unutar 24 mjeseca - blizina tvornice ili talionica - blizina autoputa ili autoceste, velikih raskrižja, autobusne postaje s gustim prometom
Opće zdravstveno stanje	- tjelesna visina - tjelesna masa roditelje neposredno pred termin porođaja - prosječna tjelesna masa prije trudnoće - prirast tjelesne mase tijekom trudnoće
Reproduktivna anamneza i podaci o posljednjoj trudnoći i porođaju	- paritet (broj poroda) - tjedan trudnoće u kojem je uslijedio porod* - zdravstveni poremećaji tijekom trudnoće (krvni tlak, periferni edemi, GUK i slično)* - razlozi mogućeg bolovanja za vrijeme trudnoće* - drugi zdravstveni poremećaji* - prethodni spontani pobačaji i prijevremeni porođaji - blizanačka trudnoća *kriteriji za uključanje ili isključenja iz istraživanja
Podaci o novorođenčetu	- spol novorođenčeta - porođajna težina i dužina - ocjena zdravstvenog stanja novorođenčeta u 1. i 5. minuti nakon porođaja (1-10 po Apgarovoj)
Majčine prehrambene navike	- vlastita ocjena o vrsti prehrane (miješana, vegetarijanska, vegetarijanska s jajima, vegetarijanska s mliječnim proizvodima) - učestalost jedenja ribe i školjaka (na tjedan) - konzumacija alkoholnih pića (količina i vrsta na dan, na tjedan) - konzumacija kave (količina i vrsta na dan, na tjedan)
Pušačke navike i izloženost duhanskom dimu u okolišu majke	Vlastito određenje u kategoriju prema pušenju cigareta: pušač, nepušač ili bivši pušač - Za aktivne pušačice: broj cigareta ili kutija na dan, dob početka pušenja, pušenje tijekom trudnoće (da li je pušila tijekom trudnoće ili je prestala i u kojem tjednu/mjesecu trudnoće je prestala pušiti) - Za bivše pušačice: podatak od kada točno ne puši cigarete u odnosu na početak sadašnje trudnoće - Za sve: podaci o mogućem pasivnom pušenju (na radnom mjestu, u obitelji, drugdje): podaci o aktivnim pušačima u obitelji i na poslu

II. Skupljanje, priprema uzoraka, analize elemenata i analiza posteljičnih steroidnih hormona

A. Skupljanje posteljica

Cijele posteljice prikupljene su neposredno nakon porođaja u terminu. Svaka posteljica, zajedno s pupkovinom, pohranjena je u unaprijed obilježenu plastičnu vrećicu s patentnim zatvaračem, pri čemu se pazilo da ne dođe do vanjske kontaminacije uzorka metalima iz okoliša. Sve vrećice položene su na led u prijenosnom hladnjaku te su otpremljene u zamrzivač analitičkog laboratorija, gdje su do trenutka analize držane na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Daljnji pripremni rad i analiza tkiva provedeni su u analitičkom laboratoriju Jedinice Instituta. Nakon odmrzavanja svaka je posteljica isprana u fiziološkoj otopini kuhinjske soli ($0,9\% \text{ NaCl}_2$) i osušena na filter papiru. Pupkovina i ekstraembrionalne membrane su uklonjene te je precizno izvagana i zabilježena masa svježe posteljice. Posteljice su pregledane s majčine i fetalne strane kako bi se utvrdile makroskopske kalcifikacije. Označena je odsutnost kalcifikata (kao 0) i prisutnost kalcifikata prema dojmu o količinskoj zastupljenosti (visoka kao 3, srednja kao 2, niska kao 1). S obzirom da u većini posteljica nije bilo kalcifikata ili ih je bilo malo, brojčane vrijednosti su konačno statistički analizirane kao binarne varijable s dvije oznake: 0 za odsutnost i 1 za prisutnost kalcifikata, a prevalencija vidljivih kalcifikata prikazana je kao omjer (u postotku) po istraživanoj skupini.

U svrhu analiza prisutnih elemenata i steroidnih hormona u posteljičnom tkivu, nakon što je odrezana pupkovina i obrezani ostaci membrana, svaka posteljica položena je na maternalnu stranu, prerezana duž cijele debljine organa i uzeta su po dva reprezentativna uzorka svježe mase (2 do 3 g). Prvi (središnji) uzorak uzet je iz središnjeg dijela posteljice, pri čemu se izbjegavalo mjesto insercije pupčane vrpce, a drugi (vanjski uzorak), uzet je iz dijela između sredine i vanjskog dijela, najdalje 3 cm od vanjskog ruba posteljičinog diska. Sa svakog uzorka naknadno je odrezano 2-3 mm fetalne površine (korijonske ploče). Budući da ni za jedan promatrani pokazatelj nije utvrđena razlika s obzirom na mjesto uzimanja uzorka, u radu su prikazane pojedinačne prosječne vrijednosti pokazatelja u posteljici po ispitivanoj skupini.

B. Uzorkovanje majčine krvi i krvi pupkovine

Uzorci majčine krvi i krvi pupkovine uzimani su u rađaonici prilikom ili neposredno nakon porođaja u skladnosti s protokolom istraživanja. Rodiljama je uzimana krv iz kubitalne vene i krv iz pupkovine. Uzorci venske krvi majke i krvi pupkovine vađeni su u dvije epruvete posebnog stupnja čistoće s obzirom na metale (Becton-Dickinson, SAD). Krv za analizu olova, kadmija i žive vađena je u epruvete koje su obložene antikoagulansom K_3H -EDTA (*BD Vacutainer[®] K3E*; «epruvete s ljubičastim čepom»),). Uzorci krvi iz koje je odijeljen serum za analizu željeza, cinka, bakra i selenija skupljani su u epruvete bez antikoagulansa (*BD Vacutainer[®] Trace Element Serum*, «epruvete s plavim čepom»). Svaka epruveta bila je označena identifikacijskom šifrom i brojem te oznakom «M» za majčinu krv i oznakom «P» za krv pupkovine.

Epruvete s uzorcima pune krvi za analizu olova, kadmija i žive nježno smo izmiješali okretanjem epruvete (gore-dolje oko 8 puta) i pohranili do analize u uspravnom položaju na stalku u hladnjaku na +4 °C. Uzorci krvi za odjeljivanje seruma za analizu esencijalnih mikroelemenata ostavljeni su da se spontano koaguliraju tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi, centrifugirani (na 3000 okretaja/min tijekom 20 minuta) i serum je odvojen pažljivim dekantiranjem u čistu polietilensku epruvetu. Uzorak seruma je ponovo centrifugiran (na 3000 okretaja/min u trajanju 15 minuta), dekantiran u drugu plastičnu epruvetu i tako pohranjen u zamrzivaču na -20 °C do analize.

Analize elemenata

Svi postupci analiza mikroelemenata provedeni su strogo u skladnosti s preporukama za osiguranje kakvoće prilikom uzorkovanja, pripreme uzoraka i analitičkih tehnika za analize elemenata u ljudskim uzorcima tkiva, krvi i seruma.

Za kvantitativna određivanja masenih udjela kadmija i olova u tkivu posteljice primijenjena je metoda elektrotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije (AAS), a maseni udjeli željeza, cinka i bakra u uzorcima tkiva posteljice mjereni su metodom plamene AAS (obje metode na uređajima Varian, Australija; AA300 i AA375). Pouzdanost analitičkih metoda u uzorcima tkiva provjeravana je uzastopnim dnevima analizama certificiranih standardnih referentnih materijala, uzoraka liofiliziranih tkiva goveđe jetre (SRM 1577b Bovine Liver, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland, SAD) i svinjskog bubrega (CRM 186 Pig Kidney, Bureau Communautaire de Référence, Bruxelles, Belgija). Srednje izmjerene vrijednosti su se dobro uklapale unutar preporučenih vrijednosti za standardne referentne uzorke čime je potvrđena pouzdanost metode i vjerodostojnost dobivenih vrijednosti mjerenih pokazatelja.

Za određivanje koncentracija kadmija i olova u punoj venskoj krvi majke i krvi pukovine primijenjena je elektrotermička AAS sa Zeemanovom korekcijom pozadinskih interferencija i transferzalno grijanim grafitnim atomizatorom (na uređaju AAnalyst 600, Perkin Elmer, SAD). Točnost određivanja svakodnevno je provjeravana analizom triju komercijalno dostupnih referentnih uzoraka krvi s certificiranim vrijednostima kadmija i olova u krvi (BCR 194-196, European Commission Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgija) te redovitim sudjelovanjem Jedinice Instituta u međunarodnom programu vanjske kontrole kvalitete analiza kadmija i olova u krvi (National External Quality Assessment Schemes, NEQAS, Birmingham, UK).

Koncentracije ukupne žive u uzorcima venske krvi majke i krvi pupkovine mjerene su izravno bez prethodne pripreme uzoraka metodom AAS (na uređaju Advanced Mercury Analyser 254, ALTEC Ltd., Prag, Češka Republika, Version 5.0.2). Preciznost i točnost metode su provjereni i potvrđeni određivanjem žive u

referentnim uzorcima različitih razina žive u krvi (Seronorm™ Trace Elements Whole Blood, Sero AS, Norveška, Level I & II).

Analize esencijalnih mikronutrijenata željeza, cinka, bakra i selenija u uzorcima seruma majke i seruma pupkovine provedene su metodom masene spektrometrije induktivno spregnute plazme (ICP-MS, na uređaju 7500cx, Agilent Technologies, Njemačka) s kolizijskom/reakcijskom komorom. U svrhu provjere preciznosti i točnosti metode upotrebljavani su referentni uzorci seruma i plazme (ClinChek Controls, RECIPE Chemicals, Njemačka, Level I & II i Seronorm™ Trace Elements Serum, Sero AS, Norveška).

Analize steroidnih hormona u uzorcima ljudske posteljice

Za pripravu uzoraka za analize steroidnih hormona u uzorcima tkiva posteljice rabili smo originalnu metodu koja je uvedena za tu svrhu u Jedinici Instituta.^{34,35} Uzorci tkiva su isprani fiziološkom otopinom, upijeni na filter papiru i izvagani. Stavljani su u plastične epruvete, nasjeckani i homogenizirani uz dodatak 75%-tnog etanola da se ekstrahiraju steroidi, ostavljeni stajati preko noći do drugog radnog dana i potom centrifugirani. Dobiveni supernatanti su liofilizirani (u uređaju Hetosic) i liofilizati pohranjeni u zamrzivaču na -20 °C do trenutka analize. Koncentracije steroidnih hormona bile su određivane nakon dodavanja fiziološke otopine na liofilizat da bi se uzorak rekonstituirao («otopio») u prozirnu suspenziju sličnu plazmi ili serumu. Za analizu hormona rabljena je standardna enzimsko-imunometrijska metoda u suradnom Kliničkom laboratoriju (na uređaju VitrosEci uz uporabu test otopina Ortho-Clinical Diagnostics Johnson & Johnson, Amersham, UK).

Koncentracije progesterona i estradiola izražene su u nanogramima na gram svježe mase posteljičinog tkiva tj. kao maseni udjeli. Treba naglasiti da je za analize uzoraka steroidnog tkiva, kao što je tkivo posteljice ili jajnik, u kojima se određuju steroidni hormoni, uzorke potrebno pripremiti na prikladan način. Ta priprema uključuje ekstrakciju steroida etanolom i prilagodbu analiziranog uzorka na mjerni raspon uređaja koji se upotrebljava u rutinskim kliničkim analizama za određivanje steroidnih hormona u serumu. Budući da se steroidi određuju izravno u

tkivu gdje se nalaze u veoma visokim koncentracijama (masenim udjelima), u usporedbi s apsolutnim vrijednostima steroidnih hormona u serumu ili plazmi, liofilizati supernatanta dobiveni pri ekstrakciji steroida iz uzorka moraju se prevesti u prozirnu tekuću fazu što sličniju serumu ili plazmi i ujedno razrijediti fiziološkom otopinom (u postupku kako je opisano naprijed).

Sljedeće činjenice oslikavaju metodološki problem kojeg je trebalo razriješiti prije određivanja steroida u tkivu posteljice. Koncentracije progesterona u plazmi prosječno se kreću u rasponu 50 do 200 ng/mL, što se bitno razlikuje od vrijednosti koncentracija progesterona u posteljičnom tkivu. Prema dostupnim podacima koji su u literaturi oskudni, uključujući vrijednosti dobivene u prijašnjem istraživanju Piasek i suradnika,³⁴ vrijednosti koncentracija (masenih udjela) progesterona u terminskim posteljicama su 1 do 2 reda veličine veće i iznose 1000 do oko 6500 ng/g svježe mase tkiva.⁸⁹⁻⁹⁴ To ujedno znači da smo, osim razvoja posebno prilagođene metode pripreme uzoraka posteljičnog tkiva kako bi se mogli određivati steroidni hormoni (kako je naprijed opisano), također morali sami postaviti raspone referentnih vrijednosti koncentracija (masenih udjela) steroidnih hormona u posteljičnom tkivu na temelju podataka objavljenih u literaturi kao i dobivenim u laboratoriju Jedinice Instituta. To je bilo nužno za odgovarajuću i točnu procjenu dobivenih rezultata mjerenja i usporedbe nalaza u ispitivanim skupinama.

Statistička obrada podataka

Brojčani podaci izraženi su kao aritmetička sredina uz pogrešku (standardnu devijaciju ili standardnu pogrešku) i kao medijan s rasponom vrijednosti (najmanje i najveće vrijednosti odnosno 25% do 75% interkvartilnih vrijednosti). Prikazivanje brojčanih rezultata i daljnja statistička obrada ovisila je o nalazu testiranja hipoteze normalne distribucije podataka pomoću Shapiro-Wilksovog testa i analize homogenosti varijance Leveneovim testom. Kada su dobiveni podaci bili normalno distribuirani, razlike između ispitivanih skupina («pušačice» i «nepušačice») bile su analizirane Studentovim *t*-testom. Ukoliko dobiveni podaci nisu bili normalno distribuirani, koristili smo se metodama neparametrijske statističke obrade

Wilcoxon-Mann-Whitneyevim U testom. Za varijable izražene u omjerima (postocima) koristili smo se Pearsonovim X^2 testom.

Dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) primijenjena je u usporedbama pokazatelja porođajnih težina i porođajnih dužina u ovisnosti o pušačkim navikama odnosno o spolu novorođenčeta. Podaci su analizirani jednosmjernim i dvosmjernim postupkom ANOVA, pri čemu je za svaku skupinu («pušačice» i »nepušačice») upotrebljen medijan najmanjeg kvadrata.

Korelacije posteljičnih pokazatelja i drugih parametara analizirane su korelacijom po Spearmanu. Utvrđene su korelacije između posteljičnih pokazatelja (posteljičnih metala i steroida) i drugih parametara (porođajne težine, duljine, težine posteljice) ili između otrovnih metala i esencijalnih elemenata.

Utjecaj čimbenika izvora izloženosti na koncentracije otrovnih elemenata u krvi majke i krvi pupkovine analizirani su i multiplom linearnom regresijom. S obzirom da su koncentracije tih metala u oba medija bile nenormalno distribuirane, primijenjena je metoda neparametrijske multiple regresije, tzv. medijana multipla regresija. Kao prediktori uvršteni su: dob majke, spol novorođenčeta, navika pušenja u trudnoći te tjedni unos ribe, školjaka i alkoholnih pića. U modelu s koncentracijom žive u krvi kao zavisnom varijablom, kao prediktor je uvršten i broj amalgamskih zubnih ispuna.

Razlike značajnosti bile su na razini $P < 0,05$. Metode univarijatne statističke analize provedene su pomoću programa *Statistica for Windows* (StatSoft, version 9.0), a multivarijatne analize pomoću programa *STATA/SE 10.1 for Windows* (StataCorp LP, USA).

4. Rezultati

A. Maseni udjeli kadmija, olova, esencijalnih mikroelemenata i steroidnih hormona u posteljicama

Klinički podaci o ispitanicama čije su posteljice rabljene u istraživanju prikazani su u **tablici 1**. Srednja dob ispitanica bila je 28 godina (raspon dobi 19 do 42 godine). U skupini nepušačica je bilo 109, a u skupini pušačica 99 ispitanica. Broj popušanih cigareta u skupini pušačica bio ≤ 20 , tj. do jedne kutije cigareta na dan, a ukupni pušački status je bio oko devet godina. Izuzev razlike u pušačkim navikama, između dviju ispitivanih skupina nije bilo razlika u podacima o mogućoj izloženosti metalima u radnom i općem okolišu te prehranbenim navikama (radilo se o pretežito mješovitoj prehrani te ni malo ili veoma maloj konzumaciji alkohola). Skupine se nisu razlikovale u paritetu (medijan ukupnog broja porođaja u obje skupine je bio 2, tj. radilo se o drugom porođaju), kao ni u broju pobačaja i preranih porođaja (najviše do 3) i nije bila niti jedna blizanačka trudnoća. Sva novorođenčad bila je dobra zdravlja, s APGAR vrijednostima pri porođaju u prvoj i petoj minuti uglavnom 10/10 i 9/10. Prosječne vrijednosti porođajnih težina i dužina pokazuju da se radi o zdravoj i vitalnoj novorođenčadi te nije uočena ni jedna niska porođaja težina (manja od 2500 grama).

Prilikom usporedbe prosječnih porođajnih težina i dužina novorođenčadi bez obzira na spol, nađeno je da su obje vrijednosti bile niže u pušačica u usporedbi s nepušačicama ($P < 0,05$, Studentovim t -testom). Kada smo analizu proveli ovisno o spolu, u dječaka su nađene značajne razlike porođajnih težina i dužina, a u djevojčica je razlika bila značajna samo u vrijednostima porođajne težine (**tablica 1**).

Dvosmjernom analizom varijance (ANOVA) potvrđeni su rezultati Studentovog t -testa. Pokazan je značajan sveukupan učinak pušenja na porođaju težinu ($P_{model} = 0,004$, $P_{pušenje} < 0,001$) kao i na porođajnu dužinu ($P_{model} = 0,015$, $P_{pušenje} = 0,006$); nije bilo utjecaja spola ($P_{spol} = 0,481$ za porođajnu težinu; $P_{spol} = 0,116$ za duljinu novorođenčeta) te nije nađeno međudjelovanje pušačkih navika i spola novorođenčadi.

Vrijednost posteljičnog omjera (omjer porođajna težina prema svježoj masi posteljice) bila je statistički značajno niža ($P < 0,05$) u skupini pušačica. Također je nađeno da je prevalencija makroskopski vidljivih kalcifikacija u posteljičnom tkivu bila statistički značajno viša ($P < 0,05$) u pušačica nego u nepušačica (**tablica 1**).

Koncentracije (maseni udjeli) kadmija, olova i esencijalnih mikroelemenata u posteljičnom tkivu obaju ispitivanih skupina prikazane su u **tablici 2**. Koncentracija kadmija u posteljici pušačica bila je dvostruko veća, a koncentracija olova značajno veća nego u nepušačica. Koncentracija cinka bila je značajno veća u posteljičnom tkivu pušačica, dok nisu utvrđene razlike u koncentracijama željeza i bakra u posteljičnom tkivu s obzirom na pušačke navike roditelja.

Tablica 3. prikazuje koncentracije (masene udjele) progesterona i estradiola u teminskim posteljicama u ispitivanim skupinama kao i objavljene literaturne podatke o koncentracijama steroida u ljudskoj terminskoj posteljici. U ovom istraživanju nismo utvrdili značajne razlike u vrijednostima obaju analiziranih steroidnih hormona u posteljici u odnosu na pušačke navike ispitanica. Izmjerene vrijednosti progesterona i estrogena bile su unutar vrijednosti objavljenih u literaturi za terminske posteljice.^{34,89-95}

Neparametrijskom statističkom obradom podataka (Spearmanovom analizom) našli smo značajne korelacije između ovih pokazatelja:

- negativna korelacija između porođajne težine novorođenčeta i kadmija u posteljici (Spearmanov $\rho = -0,176$; $P = 0,0112$);
- negativna korelaciju između porođajne dužine i kadmija u posteljici (Spearmanov $\rho = -0,184$; $P = 0,018$);
- negativna korelaciju između porođajne težine i olova u posteljici (Spearmanov $\rho = -0,164$; $P = -0,018$).
- pozitivna korelacija između svih izmjerenih vrijednosti masenih udjela progesterona i estrogena u posteljici (Spearmanov $\rho = 0,236$; $P = 0,0007$);

B. Koncentracije otrovnih i esencijalnih mikroelemenata u majčinoj krvi i krvi pupkovine

U **tablici 4.** prikazani su klinički podaci o roditeljama kojima je nakon porođaja uzorkovana venska krv i krvi iz pupkovine. Srednja dob ispitanica u skupini nepušačica bila je 29 a u skupini pušačica 28 (raspon dobi svih ispitanica je bio 18 do 42 godine). U skupini pušačica, 10 ispitanica je izjavilo da su prestale pušiti cigarete kad su saznale da su trudne. U skupini nepušačica, 71 od 121 ispitanice (59%), a u skupini pušačica 58 od 77 ispitanica (75%) izjavilo je da su bile izložene dimu cigareta u svojoj okolini (pasivnom pušenju), u domu, na radnom mjestu ili drugdje. Skupine se nisu razlikovale u paritetu (medijan ukupnog broja porođaja u obje skupine je bio 2, raspon 0 do 3, tj. radilo se uglavnom o drugom porođaju). Nije bilo razlika ni u broju spontanih pobačaja i preranih porođaja (najviše do 5), te nije zabilježena ni jedna blizanačka trudnoća.

U ovih ispitanica prosječne vrijednosti porođajnih težina i dužina sve novorođenčadi, kao ni razdijeljene po spolu djeteta, nisu se statistički značajno razlikovale s obzirom na naviku pušenja majki. U nepušačica, izloženost dimu cigarete u okolišu (pasivno pušenje) također nije utjecala na vrijednosti porođajnih težina i dužina. Sva novorođenčad bila je dobrog zdravlja, s najvišim vrijednostima ocjena po Apgarovoj u prvoj i petoj minuti, pretežito 10/10.

U **tablici 5.** prikazane su vrijednosti koncentracija kadmija i olova u punoj venskoj krvi majke i krvi pupkovine. Koncentracija kadmija u majčinoj krvi bila je značajno (dvostruko) veća u skupini pušačica nego u krvi i nepušačica. Vrijednosti koncentracije kadmija u krvi pupkovine bile su jednake u obje ispitivane skupine i do deset puta niže nego u majčinoj krvi. Nije bilo razlika u koncentracijama olova u majčinoj krvi i u krvi pupkovinu u ovisnosti o pušačkim navikama majke.

Koncentracije esencijalnih mikroelemenata u serumima majki i serumima pupkovine prikazane su u **tablici 6**. S obzirom na pušačke navike majki, nije bilo razlika u vrijednostima koncentracija željeza, cinka, bakra i selenija ni u serumima majki, ni u serumima pupkovine. Neovisno o navici pušenja, u serumu majke prema serumu pupkovine, srednje vrijednosti cinka bile su 1,5 puta niže, a srednje vrijednosti selenija 1,5 puta više u svih ispitanica. Srednje vrijednosti bakra u serumima majki bile oko 7 puta više od onih u serumima pupkovine. Budući da su serumu pupkovine bili hemolizirani (došlo je do razaranja eritrocita), u njima nisu određivane koncentracije željeza jer bi dobivene vrijednosti bile nepouzdana.

Rezultati analiza žive u uzorcima pune venske krvi majke i krvi pupkovine i selenija u serumima majke i serumima pupkovine u ovisnosti o majčinim prehrambenim navikama prosječnog tjednog unosa ribe prikazani su u **tablici 7**. Ukupan broj ispitanica za koje su skupljeni podaci i uzorci krvi (N=196) podijeljen je u četiri kategorije ovisno o zastupljenosti ribe u prehrani tijekom tjedna: 0 – ne jede ribu; 1 – jede ribu manje od 1 puta tjedno; 2 – jede ribu jedan puta tjedno; 3 – jede ribu više od 1 puta tjedno. Nalazi su prikazani kao medijan i raspon 25% do 75% interkvartilnih vrijednosti. Vidljivo je da su se s porastom unosa ribe povećavale srednje vrijednosti koncentracija žive u krvi majke i u krvi pupkovine kao i vrijednosti koncentracija selenija u serumu majke i u serumu pupkovine. Analizom korelacija (neparametrijskim testom po Spearmanu) nađena je statistički značajna linearna korelacija prosječnih tjednih (nekategoriziranih) vrijednosti unosa ribe s koncentracijama žive u krvi odnosno s koncentracijama selenija u uzorcima seruma majke i u uzorcima seruma pupkovine.

Korelacije vrijednosti kadmija odnosno žive u punoj venskoj krvi majke multiplom medijanom regresijom prikazane su u **tablici 8**. Nađena je statistički značajna korelacija između kadmija u krvi majke i pušenja u trudnoći. Također su nađene statistički značajne korelacije koncentracije žive u krvi majke i unosa ribe kao i koncentracije žive u krvi majke i unosa školjaka.

Analizama multiple medijane regresije dobiveni su sljedeći (negativni) nalazi koji nisu prikazani na tablicama:

- porođaj po redu nije utjecao na vrijednosti koncentracija kadmija, olova i žive u majčinoj krvi, niti u krvi pupkovine;
- u nepušačica, na koncentracije kadmija i olova u venskoj krvi majke nije utjecalo pasivno pušenje, odnosno unos ribe i školjaka;
- u pušačica, vrijednosti koncentracija kadmija i olova u venskoj krvi majke nisu korelirale s brojem cigareta na dan.

U 57% uzoraka krvi pupkovine izmjerena je koncentracija kadmija ispod granice detekcije za metodu određivanja. Stoga je bio premaleni broj brojčanih vrijednosti izmjerenih sa sigurnošću da bi se provela analiza multiple medijane regresije s vrijednostima pokazatelja kadmija u krvi pupkovine.

Tablica 1.

Klinički podaci o roditeljima kojima su uzorkovane posteljice nakon ročnog porođaja rodničkim putem.

	Nepušačice N=109	Pušačice N=99
<i>Osobine roditelja</i>		
Dob (godine)	28 (19-40)	28 (19-42)
Paritet (broj poroda)	2 (0-9)	2 (1-4)
Spontani pobačaji i prijevremeni porođaji (broj)	0 (0-2)	0 (0-3)
<i>Osobine novorođenčadi</i>		
<i>Dječaci</i>		
	N=58	N=52
Porođajna težina dječaka (kg)	3,60±0,535	3,36±0,401*
Porođajna dužina dječaka (cm)	50.9±2.16	50.1±1.70*
<i>Djevojčice</i>		
	N=51	N=47
Porođajna težina djevojčica (kg)	3,54±0.361	3,33±0,483*
Porođajna dužina djevojčica (cm)	50,4±1.46	49,8±2.00
<i>Sva novorođena djeca</i>		
	N=109	N=99
Prosječna porođajna težina (kg)	3,57±0.461	3,34±0,440*
Prosječna porođajna dužina (cm)	50,7±1.87	49,9±1,85*
<i>Podaci o posteljicama</i>		
Težina posteljice bez plodovih ovoja i pupkovine (kg)	0,358±0,070	0,353±0,060
Posteljični omjer (porođajna težina/svježa masa posteljice)	10,3±1,79	9,66±1,60*
Prevalencija vidljivih kalcifikata (%)	10	38**

Rezultati su prikazani kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi (za podatke o roditeljima), kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (za podatke o novorođenčadi i posteljicama) te kao postotci (za kalcifikate u posteljici). Statistički značajne razlike između pušačica i nepušačica ($P < 0,05$) testirane su: *Studentovim t -testom i **Pearsonovim X^2 testom.

Tablica 2.

Koncentracije mikroelemenata u tkivu terminske posteljice (maseni udjel ng/g i $\mu\text{g/g}$ mase svježeg tkiva).

	Nepušačice <i>N</i> =109	Pušačice <i>N</i> =99
Otrovni metali (ng/g)		
Kadmij	10,3 ± 4,26 9,70 (7,30 – 12,5)	22,1 ± 6,79 21,4 (17,2 – 26,5)*
Olovo	20,0 ± 17,7 13,8 (7,60 – 27,1)	26,3 ± 22,5 17,9 (10,3 – 34,2)*
Esencijalni mikronutrijenti ($\mu\text{g/g}$)		
Željezo	123 ± 53,5 109 (97,5 – 131)	126 ± 57,0 112 (92 – 131)
Cink	12,9 ± 1,84 12,6 (11,9 – 13,5)	13,8 ± 3,13 13,1 (12,2 – 14,3)*
Bakar	0,782 ± 0,158	0,788 ± 0,172

Za nenormalno distribuirane podatke prikazana je aritmetička sredina ± standardna devijacija i medijan s rasponom 25% – 75% interkvartilnih vrijednosti u zagradi.

Statistički značajne razlike između pušačica i nepušačica ($P < 0,05$) utvrđene su *Wilcoxon-Mann-Whitneyim U testom.

Za normalno distribuirane podatke (za bakar u posteljici) rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Tablica 3.

Koncentracije progesterona i estradiola u tkivu termenske posteljice (maseni udjeli ng/g mase svježeg tkiva)

Steroidni hormon	Nepušačice N=108	Pušačice N=98	Literaturni podaci o steroidnim hormonima u termenskoj posteljici	
			Citirana vrijednost*	Referencija
Progesteron	2050 ± 1487 2079 (1176 – 2784)	2015 ± 1046 2093 (1401 – 2761)	1262 ± 95,7	Piasek i sur. ³⁴
			1070 ± 151 (bazalna ploča)	Kalenga i sur. ⁹²
			1501 ± 193 (korionske resice)	Kalenga i sur. ⁹²
			1700 ± 200	Wilson i sur. ⁹³
			3097 ± 935	Ferré i sur. ⁸⁹
			5060 ± 1435	Runnebaum i sur. ⁹⁴
Estradiol	46,4 ± 33,6 36,1 (27,5 – 50,1)	48,4 ± 28,8 39,2 (27,4 – 61,5)	36,1 ± 5,8	Wilson i sur. ⁹³
			8 – 35	Jakowicki i sur. ⁹⁵

Vlastiti rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija i medijan s rasponom 25% – 75% interkvartilnih vrijednosti u zagradi budući da podaci nisu bili normalno distribuirani.

Nije bilo statistički značajnih razlika između pušačica i nepušačica.

*Rezultati drugih autora preuzeti su i prikazani kako je navedeno u izvorniku (aritmetička sredina ± standardna pogreška).

Tablica 4.

Klinički podaci o roditeljima kojima je nakon porođaja uzorkovana venska krv i krv iz pupkovine.

	Nepušačice N=121	Pušačice N=77
<i>Osobine roditelja</i>		
Dob (godine)	29 (19-42)	28 (18-41)
Paritet (broj poroda)	2 (0 – 3)	2 (0 – 3)
Spontani pobačaji/prijevremeni porođaji	0 (0 – 1)	0 (0 – 5)
Pušenje prije trudnoće* (broj cigareta/dan)	0	N=72 10 (1 – 30)
Pušenje tijekom trudnoće (broj cigareta/dan)	0	N=67 5 (1 – 20)
Pasivno pušenje**	71/121 (59%)	58/77 (75%)
<i>Osobine novorođenčadi</i>		
<i>Dječaci</i>		
	N=65	N=39
Porođajna težina dječaka (kg)	3,61 ± 0,446	3,57 ± 0,443
Porođajna dužina dječaka (cm)	52,2 ± 2,24	51,7 ± 2,15
<i>Djevojčice</i>		
	N=56	N=38
Porođajna težina djevojčica (kg)	3,46 ± 0,375	3,39 ± 0,447
Porođajna dužina djevojčica (cm)	50,9 ± 1,64	50,5 ± 1,97
<i>Sva novorođena djeca</i>		
	N=121	N=77
Prosječna porođajna težina (kg)	3,54 ± 0,420	3,48 ± 0,452
Prosječna porođajna dužina (cm)	51,6 ± 2,07	51,1 ± 2,14

*Aktivno pušenje cigareta unutar 12 mjeseci prije sadašnje trudnoće.

**Izloženost dimu cigarete druge osobe (na radnom mjestu, u obitelji i drugdje).

Rezultati su prikazani kao medijan s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi (za podatke o roditeljima) i kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (za podatke o novorođenčadi).

Tablica 5.Koncentracija otrovnih metala u punoj venskoj krvi majke i krvi pupkovine ($\mu\text{g/L}$)

	Nepušačice <i>N</i> =121	Pušačice <i>N</i> =77
Kadmij		
Krv majke	0,473 (0,284 – 0, 581)	1,06 (0,657 – 2,34)*
Krv pupkovine	0,100 (0,100 – 0,161)	0,100 (0,100 – 0,187)
Olovo		
Krv majke	12,1 (9,80 – 17,6)	13,7 (10,4 – 18,1)
Krv pupkovine	9,27 (5,98 – 13,4)	10,2 (6,61 – 12,9)

Rezultati su prikazani kao medijan s rasponom 25% – 75% interkvartilnih vrijednosti u zagradi.

*Statistički značajna razlika između pušačica i nepušačica (na razini značajnosti $P < 0.05$) utvrđena je Wilcoxon-Mann-Whitneyim U testom.

Tablica 6.Koncentracija esencijalnih mikroelemenata u serumu majke i serumu pupkovine ($\mu\text{g/L}$)

	Nepušačice <i>N</i> =121	Pušačice <i>N</i> =77
Željezo		
Serum majke	1219 (813 – 1607)	1205 (896 – 1880)
Cink		
Serum majke	546 (480 – 615)	591 (483 – 649)
Serum pupkovine	857 (786 – 956)	867 (792 – 947)
Bakar		
Serum majke	2259 (1943 – 2552)	2259 (2028 – 2568)
Serum pupkovine	340 (281 – 417)	385 (292 – 464)
Selenij		
Serum majke	53,3 (45,6 – 60,8)	55,8 (48,3 – 62,4)
Serum pupkovine	39,5 (35,9 – 43,9)	38,7 (35,0 – 43,6)

Rezultati su prikazani kao medijan s rasponom 25% – 75% interkvartilnih vrijednosti u zagradi.

Tablica 7.

Koncentracije žive u punoj krvi i selenija u serumima u uzorcima venske krvi majke i krvi pupkovine ($\mu\text{g/L}$) s obzirom na navike unosa ribe prehranom.

	^a Zastupljenost ribe o tjednim obrocima prema kategorijama			^b Linearni trend u odnosu na unos ribe		
	0	1	2	3	N	P
	$N=24$	$N=86$	$N=73$	$N=13$		
Živa						
Krv majke	0,279 (0,240 – 0,490)	0,612 (0,407 – 1,08)	0,716 (0,515 – 1,43)	2,21 (1,25 – 2,34)	$N=196$	0,408 <0,001
Krv pupkovine	0,436 (0,273 – 0,695)	0,764 (0,513 – 1,28)	1,04 (0,656 – 1,84)	3,70 (1,98 – 4,50)	$N=196$	0,435 <0,001
Selenij						
Serum majke	48,8 (45,9 – 55,6)	54,2 (45,9 – 62,1)	56,1 (46,5 – 62,1)	59,8 (54,2 – 65,9)	$N=193$	0,172 0,017
Serum pupkovine	37,7 (34,4 – 41,2)	39,1 (35,4 – 44,5)	40,8 (36,4 – 43,9)	40,1 (36,6 – 44,9)	$N=194$	0,145 0,044

Rezultati su prikazani kao medijan s rasponom 25% – 75% interkvartilnih vrijednosti u zagradi.

^aOznake zastupljenosti ribe u prehrani razvrstane u kategorije prosječnog tjednog unosa prema samoodređenju ispitanica: 0 = ne jede ribu; jede ribu: 1 = <1 puta na tjedan; 2 = 1 puta na tjedan; 3 = >1 puta tjedno

^bLinearni trend testiran je testom po Spearmanu uzimajući u obzir nekategorizirane prosječne vrijednosti unosa ribe u hrani.

Tablica 8.

Nalazi korelacija multiplom medijanom regresijom za kadmij i živu u punoj venskoj krvi majke.

	<i>N</i>	Koeficijent	(95%-tni interval pouzdanosti)	<i>P</i>
<u>Kadmij u krvi majke</u>				
Pušenje u trudnoći	192	0,725	(0,602 – 0,848)	<0,001
<u>Živa u krvi majke</u>				
Unos ribe	193	0,120	(0,070 – 0,170)	<0,001
Unos školjaka	193	0,565	(0,239 – 0,892)	<0,001

5. Rasprava

Ljudi su svakodnevno i neminovno izloženi otrovnim metalima i polumetalima ili metaloidima u svojem općem i radnom okolišu. Uzimajući u obzir tri postavljena kriterija za esencijalnost kemijskog elementa za ljude, otrovnim ili toksičnim elementom (metalom ili metaloidom) može se smatrati onaj element zbog čijeg nedostatka u organizmu neće doći do jedne ili više ovih posljedica: 1) poremećaja fiziološke funkcije, 2) poremećaja biokemijske reakcije i/ili 3) poremećaja tjelesne građe.^{10,15,96,97} Dakle, prema definiciji, otrovni metal ili metaloid je element za koji u ljudskom organizmu nema dokaza da je njegova prisutnost nužna za odvijanje fizioloških funkcija organizma i integritet organizma. Na toksičnost metala ili metaloida utječu kemijska svojstva elementa i svojstva organizma (domaćina) s kojim metal dolazi u dodir. Kemijska svojstva metala određuje kemijski oblik i kemijska veza, vezivanje za biološke ligande u organizmu, oksidacijsko stanje elementa i drugo.

Na specifična svojstva organizma, odnosno na osjetljivost organizma pri dodiru s otrovnim metalom utječu sljedeći čimbenici: dob, spol, posebno fiziološko ili patofiziološko stanje organizma, stanje uhranjenosti te genetsko i epigenetsko nasljeđe. Svojstva metala i svojstva organizma zajedno utječu na sudbinu metala u organizmu, tzv. toksikokinetiku metala, koja obuhvaća sljedeće faze: dodir s metalom tijekom izloženosti, unos metala u organizam (inhalacijom, ingestijom ili kutano), apsorpcija metala (u želučanocrijevnom sustavu, dišnom sustavu ili kroz kožu), distribucija u organizmu, metabolizam metala u pojedinim organima i eliminacija elementa iz organizma (stolicom, mokraćom ili kožnom perspiracijom).^{12,15,22-28}

U radu su proučavana tri najvažnija otrovna metala, olovo, kadmij i živa, koji se često, zajedno s otrovnim metaloidom arsenom, zbog svojih fizikalnih svojstava, svrstavaju i u tzv. *teške metale*.¹⁰ Potonje određenje se ne smatra egzaktnim pa stoga termin «teški metali» nije rabljen u ovom radu. Procjenjivane su razine izloženosti tim trima otrovnim metalima u uzorcima posteljice, krvi i seruma majki te krvi i seruma pupkovine u zdravih roditelja kao skupine stanovništva u kojoj je, zbog

posebnog fiziološkog stanja s povećanim potrebama i povećanom apsorpcijom mikronutrijenata, povećana apsorpcija otrovnih metala.^{17,23-28} Zbog povećanog nakupljanja otrovnih metala (kadmija) u posteljici kao ciljnom organu odnosno zbog prolaženja metala (olova i organske žive) kroz posteljicu iz majčine cirkulacije do fetusa, mogu nastati štetni učinci ne samo na zdravlje roditelje – buduće majke i ishod trudnoće, nego i na razvoj i rast fetusa *in utero* odnosno njegovo zdravstveno stanje nakon rođenja. Potonje činjenice predmetom su mnogobrojnih opsežnih istraživanja u tijeku čija je zajednička hipoteza da se određena bolesna stanja i kronične bolesti koje se očituju u odrasloj dobi (kognitivni i bihevioralni poremećaji, krvožilne bolesti, hipertenzija, poremećaji tolerancija glukoze i drugo) mogu povezati s međudjelovanjima esencijalnih nutrijenata i otrovnih metala tijekom perinatalnog razdoblja.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Najčešći izvor izloženosti u općem stanovništvu za sva tri otrovna metala, olovo, kadmij i živu je prehrana, a za kadmij i, u nešto manjoj mjeri i za olovo, to je i cigaretni dim. U odraslih ljudi postotak želučanocrijevne apsorpcije za sva tri metala iznosi svega nekoliko postotaka do najviše 10-15%, dok je postotak apsorpcije metala nakon inhalacije znatno viši (10 i više puta) i za kadmij može iznositi i do 60%. Stoga je unos kadmija inhalacijom duhanskog dima znatno veći nego hranom i pićem.^{1-10,17, 18,20-22}

U istraživanju sadržanom u ovom radu usredotočili smo se na povezivanje dobivenih pokazatelja izloženosti kadmiju, olovu odnosno živi i dvaju najčešćih izvora izloženosti metalima u općem stanovništvu, prehranom i aktivnim pušenjem odnosno zbog izloženosti duhanskom dimu u okolišu pasivnim pušenjem.

O nalazima otrovnih metala kadmija i olova u posteljici vezano za izloženost duhanskom dimu

Kao što je već opisano u Rezultatima, osim po razlici u navici pušenja cigareta i izloženosti duhanskom dimu, istraživane skupine bile su ujednačene po podacima o drugim mogućim izvorima izloženosti otrovnim metalima. Prethodna istraživanja u zdravih roditelja u gradu Zagrebu i Zagrebačkoj županiji koja su provedena u Jedinici Instituta,^{34,35} pokazala su značajno veće masene udjele kadmija i olova u posteljičinom tkivu u skupini pušačica u odnosu na nepušačice. Skupine su bile definirane na jednaki način kao i u ovom istraživanju. Naši sadašnji nalazi su u sukladnosti s tim prethodnim rezultatima kao i s nalazima sličnih istraživanja koja su proveli drugi autori. Već više od tri desetljeća nalaz kadmija u ljudskoj posteljici smatra se odgovarajućim tkivnim pokazateljem izloženosti kadmiju.^{30-33,101}

Vrijednosti masenih udjela metalâ u posteljici utvrđene u ovom istraživanju kreću se unutar raspona kakav je zabilježen u drugim urbanim područjima kontinentalnih dijelova Europe.¹⁰²⁻¹⁰⁸ Od dva otrovna metala koje smo određivali u posteljičinom tkivu vezano za izloženost duhanskom dimu, kadmij se u najvećem dijelu nakuplja u posteljičinom tkivu pa posteljica postaje virtualna prepreka za njegov prijenos u fetus, dok olovo praktički u cijelosti prolazi kroz posteljicu do fetusa. U uvjetima povećane izloženosti buduće majke olovu, povećana razina olova može se izmjeriti u krvi pupkovine odnosno u drugim dijelovima tijela fetusa, kako je pokazano istraživanjima pobačenih plodova te u pokusima na životinjama.^{5,6,18} U tom smislu, iako se dio olova zadržava u posteljici, osim što kroz nju prolazi, smatra se da nalaz olova u tkivu posteljice nije optimalan pokazatelj izloženosti olovu žena reproduktivne dobi¹⁰¹ i treba ga nadopuniti nalazima koncentracije olova u punoj krvi majke i, po mogućnosti, nalazom olova u krvi pupkovine. Stoga smo u našem drugom dijelu istraživanja određivali koncentracije olova (uz kadmij i živu) usporedno u uzorcima krvi majke i krvi pupkovine. Nalaz povećane razine kadmija u posteljicama u skupini pušačica dokazuje da je izloženost duhanskom dimu glavni izvor kadmija u općoj populaciji, koja s njim ne dolazi u dodir u svojem zanimanju. Osim toga, povećani kadmij u posteljičinom tkivu pokazuje izloženost duhanskom dimu i u nedostatku izravnih mjerenja nikotina ili njegovog metabolita kotinina koji

služe kao egzaktni biomarkeri pri kvantitativnom određivanju izloženosti duhanskom dimu. Potonje nismo proveli u ovom istraživanju. U idealnim uvjetima sličnih istraživanja, kad god je to moguće, poželjno je odrediti kotinin (u krvi, slini ili mokraći) tijekom trudnoće ili nikotin (u mokraći ili kosi) u vrijeme porođaja, kako bi se dobili objektivni i pouzdani podaci o razinama aktivne i pasivne izloženosti duhanskom dimu.^{17,109} Određivanje nikotina odnosno njegovog metabolita kotinina u vlasi kose dobar je pokazatelj za dugo praćenje izloženosti duhanskom dimu iz okoliša u rodilja budući da se nikotin nakuplja u kosi te stoga najbolje odražava majčine pušačke navike ili izloženost pasivnom pušenju tijekom trudnoće.¹⁰⁹ U ovom istraživanju nalazi razina kadmija u posteljici objektivno su potkrijepili podatke ispitanica prikupljene anketnim upitnicima o izloženostima duhanskom dimu aktivnim i pasivnim pušenjem. Izdvojene učinke pasivnog pušenja na bilo koji od promatranih pokazatelja nismo mogli utvrditi. Ispitanice – aktivne pušačice najčešće su bile istodobno izložene i pasivnom pušenju. Među dijagnostičkim metodama koje mogu poslužiti za utvrđivanje prenatalne izloženosti duhanskom dimu, smatramo da su vrijednosti masenih udjela kadmija u posteljici korisni alternativni pokazatelj pasivne fetalne izloženosti duhanskom dimu, što je u skladnosti sa stavovima drugih autora.^{17,47,110}

Naši rezultati istraživanja su potvrdili da pušenje cigareta budućih majki utječe na smanjenje porođajne težine i dužine, kao što pokazuju podaci iz velikog broja istraživanja drugih autora o štetnim učincima duhanskog dima na porod.^{17,64-66} Međutim, apsolutne vrijednosti porođajnih težina i dužina upućivale su na to da nije došlo do ozbiljnih ugrožavanja vitalnosti ploda tijekom trudnoće i porođaja jer nisu nađene niske porođajne težine (<2500 g). Vrijednosti ocjena vitalnosti bile su također izvrsne i iznosile pretežito 10 u 1. i 5. minuti po Apgarovoj.

Što se tiče procjene štetnih učinaka kadmija na ishod trudnoće i porod, novija istraživanja su pokazala da se izloženost kadmiju tijekom trudnoće, osim sa smanjenom porođajnom težinom, može povezati s povećanim brojem preuranjenih porođaja te otežanim razvojem kognitivnih sposobnosti i inteligencije u poslije porođajnom razdoblju.^{103,108,111-113} Nedavno objavljeni rad prikazao je važne nalaze o povezanostima smanjenih porođajnih težina i koncentracija kadmija, arsena i olova u

posteljici.¹¹² Treba imati na umu da se u stvarnim uvjetima izloženosti štetni učinci kadmija veoma teško mogu razlučiti od štetnih učinaka drugih onečišćivača sa svojstvima reproduktivnih otrova kojima je žena istodobno izložena u oblaku prašine (u smjesi) teških metala. Pri tome se ne misli samo na uvjete profesionalne izloženosti mješavinama dima i prašina u kojima se nalazi kadmij, a što se u pravilu događa u teškoj industriji (gdje su zaposlenici pretežito muškog spola), već se to odnosi i na inhalaciju duhanskog dima, za koji je i prije u radu istaknuto da je smjesa mnogobrojnih otrovnih sastojaka. Između tridesetak metalnih iona zastupljenih u duhanskom dimu, za pet otrovnih metala i metaloida, uključujući kadmij, dokazani su kancerogeni učinci za ljudi i svrstani su u skupinu I međunarodne klasifikacije po IARC-u. Stoga izloženost smjesi s udjelom kadmija može uvijek biti opasna, jer je kadmij ne samo reproduksijski otrov, već i supstancija s dokazanim genotoksičnim i kancerogenim svojstvima.^{17,62,63,107,114}

Dugo je poznato da visoke razine izloženosti olovu mogu ugroziti zdravlje fetusa *in utero*.^{48,49} Nalazi povećane razine olova u posteljici povezuju se s pojavom oksidacijskog stresa, preuranjenim pucanjem plodovih ovoja i prijevremenim porođajem. U novije vrijeme je pokazano da i niska razina izloženost olovu može ugroziti rast i preživljavanje fetusa.^{103, 115-117}

Posteljičina kalcifikacija uobičajen je patološki nalaz, koji odražava dozrijevanje posteljice tijekom trudnoće. Uočili smo više kalcifikata (nalaza kalcificiranog tkiva) u posteljicama pušačica nego u nepušačica, što je u skladnosti s podacima u literaturi gdje se ubrzana kalcifikacija posteljičinog tkiva povezuje s majčinom izloženošću duhanskom dimu, a time i s izlaganjem kadmiju.^{114,118} Međutim, Szymanowski i suradnici¹¹⁹ nedavno su upozorili da nije samo pušenje cigareta povezano s povećanjem kalcifikacija u posteljici. Mada su mehanizmi stvaranja kalcifikata općenito nedovoljno poznati, budući da se prisutnost antioksidansa u prehrani može povezati sa smanjenjem kalcifikacija u resicama posteljice,¹²⁰ to bi govorilo u prilog pretpostavci da na povećanje broja kalcifikata uistinu utječu štetni oksidativni učinci ksenobiotika, među kojima je i kadmij u duhanskom dimu.

O nalazima esencijalnih mikroelemenata u posteljici vezano za izloženost duhanskom dimu

Maseni udjeli esencijalnih mikroelemenata u posteljici mogu poslužiti kao biomarkeri učinaka kadmija u perinatalnom razdoblju. Kadmij i cink, odnosno kadmij i bakar su u organizmu usko povezani s metalotionenom, proteinom bogatim aminokiselinama cisteinom, na koje se preko sulfhidrilnih (-SH) skupina u fiziološkim uvjetima vežu cink i bakar, a u uvjetima izloženosti otrovnim metalima, za metalotionein se mogu vezati kadmij odnosno živa. Metalotionein je prijenosni protein za esencijalne mikronutrijente, poglavito cink i bakar, stvara se u jetri, bubregu i posteljici te se u tim organima razina metalotioneina može kvantitativno odrediti.^{11,39,40,121} U stanicama ljudskog trofoblasta je pokazano da izloženost kadmija inducira povećano stvaranje metalotioneina koji onda veže više cinka i zadržava ga u stanicama trofoblasta, pa je cink slabije dostupan za prijenos u fetus kojemu je nuždan za rast i razvoj *in utero*.¹²² Te pojave mogu objasniti naš nalaz povećanog masenog udjela cinka u posteljicama pušačica, u kojih je istodobno bilo dvostruko veće nakupljanje kadmija u posteljičinom tkivu i smanjene porođajne težine i dužine nego u nepušačica.

U prethodnom istraživanju provedenom u Jedinici Instituta^{34,35} nije nađen učinak pušenja na maseni udjel cinka u posteljici, ali je prosječna vrijednost željeza u posteljici pušačica bila smanjena što je također nepovoljno za razvoj ploda. Međudjelovanje kadmija i željeza pokazano je i u eksperimentalnim uvjetima parenteralne izloženosti kadmiju u pokusnih štakorica tijekom graviditeta.¹⁶ Ni u prethodnim epidemiološkim istraživanjima, kao ni sada, nisu nađene razlike u razinama bakra u posteljici s obzirom na naviku pušenja roditelja.

O nalazima steroidnih hormona progesterona i estradiola u posteljici vezano za izloženost duhanskom dimu

Posteljični sinciciotrofoblast je glavni biosintetički izvor progesterona tijekom trudnoće. Počevši od lutealno-placentalnog pomaka između sedmog i devetog tjedna trudnoće do porođaja, razina progesterona u serumu buduće majke poraste šest do osam puta. U tom razdoblju posteljica je glavni steroidogeni organ, pa je maseni udjel progesterona u posteljičnom tkivu pravi pokazatelj biosinteze progesterona nakon prvog tromjesečja. Osim toga, posteljični hormoni mogu poslužiti kao biomarkeri endokrine disrupcije zbog izloženosti određenim ksenoestrogenima, uključujući kadmij, za koji ima sve više dokaza da je endokrini disruptor reprodukcije u žena te da može djelovati i kao metaloestrogen.^{18,39,42-47,54-57,123-132}

Iako u ovom istraživanju nismo našli statistički značajne promjene u masenim udjelima posteljičnog progesterona u trudnica izloženih duhanskom dimu, u dosadašnjim suradnim istraživanjima, na koja se nastavljaju ova istraživanja unutar tekućeg znanstvenoistraživačkog projekta, dokazano je da izloženost kadmiju, kao glavnom sastojku duhanskog dima, može ugroziti produkciju steroidnih hormona u posteljici.^{16-18,34,35,39} U posteljicama roditelja u gradu Zagrebu i Zagrebačkoj županiji, uz dvostruko veće koncentracije kadmija u pušačica nađene su upola manje koncentracije steroidnog hormona progesterona negoli u nepušačica.^{34,133} Na temelju dostupnih rezultata koji pokazuju da kadmij kao sastojak cigaretnog dima remeti sintezu steroidnih hormona u jajnicima i posteljici, u radu Piasek i suradnika objavljenom 2002. godine,³⁵ među prvima te vrste u literaturi, zaključeno je da je kadmij kemikalija s mogućim djelovanjem endokrinog disruptora u sisavcima, uključujući ljude. Ti rezultati bili su u suglasju s nalazima smanjene produkcije progesterona u posteljicama skotnih štakorica koje su tijekom graviditeta bile akutno (jednokratno) ili supkronično izložene kadmiju (1. do 19. dana skotnosti od ukupno 22-23 dana koliko traje skotnost štakorice) i istodobno hranjene smanjenim količinama željeza u krmivu.^{16,35}

Do danas su u velikoj mjeri objašnjeni i mehanizmi učinaka kadmija kao supstancije sa svojstvima endokrinog disruptora i metaloestrogena istraživanjima drugih autora, uključujući vanjske suradnike na projektu u tijeku s kojima postoji

dugogodišnja zajednička znanstvenoistraživačka suradnja i publikacije na tom području.^{18,39,46,47} U mehanističkim istraživanjima u kulturama ljudskih posteljičnih stanica *in vitro* nađena su mjesta u lancu biosinteze progesterona na koja kadmij djeluje izravno štetno tako što inhibira lučenje progesterona djelovanjem na receptor lipoproteina niske gustoće (LDL-R) na membrani ljudske steroidogene stanice (na trofoblastu).^{42,43,123-125} Pokazano je da kadmij može ometati sintezu progesterona i djelovanjem na enzim citokrom P-450 (P450_{scc}) koji odcjepljuje bočni lanac u kolesterolu koji je početni supstrat biosinteze steroida. Moguće je da kadmij ometa i aktivnost 3β-hidroksisteroidne dehidrogenaze koja pretvara pregnenolon u progesteron.^{34,42} Ti se nalazi podudaraju s jednakim štetnim učincima kadmija u drugim steroidogenim stanicama, pa su tako dokazani štetni učinci kadmija na sintezu testosterona u testisu⁸³ i na sintezu estradiola u jajniku.^{126,127} U nedavnim istraživanjima nismo dokazali učinke na estradiol u posteljicama pušačica, ali su naši suradnici opazili učinke kadmija na smanjenje peptidnog posteljičinog hormona leptina pri izlaganju terminskih ljudskih posteljica *in vitro*.⁴⁷

Prosječne vrijednosti masenih udjela progesterona u posteljicama iz ročnih porođaja kreću se između 1000 i 6500 ng/g mase svježeg tkiva i objavljene su u svega nekoliko radova, uključujući prijašnje vlastite rezultate (sve referencije su navedene u **tablici 3**). Autori tih radova su se za mjerenja posteljičnih steroidnih hormona koristili različitim analitičkim metodama. Treba napomenuti da su u ovom istraživanju bile izmjerene apsolutne vrijednosti masenih udjela progesteronu u tkivu ljudske posteljice koje su bile veće (neovisno o navici pušenja) nego vrijednosti koje su bile izmjerene u prethodnom istraživanju.³⁴ Možda je potonja činjenica i razlogom da se nisu zamijetile fine razlike u razinama posteljičinog progesterona između ispitivanih skupina s obzirom na izloženost kadmiju duhanskim dimom. Naime, osim u razlikama dobivenim za vrijednosti razina steroida u sadašnjem istraživanju u odnosu na prethodna, postojala je razlika i u primijenjenim analitičkim metodama. U prijašnjim istraživanjima rabili smo metode specifičnih radioimunoloških analiza (specifični RIA), a u ovom istraživanju primijenili smo suvremene enzimsko-imunometrijske metode analize steroidnih hormona. Budući da su te metode u svakodnevnoj kliničkoj praksi namijenjene analizi plazme ili seruma, moguće je da

su polučile različite nalaze u liofilizatima ljudske posteljice koje smo morali prilagoditi, dovesti do faze «prozirnog tekućeg uzorka» te naknadnim preračunima odrediti maseni udjel pojedinog steroidnog hormona u steroidogenom tkivu posteljice *ex vivo*.

U ovom istraživanju, osim posteljičinog progesterona, mjerili smo i posteljični estradiol izravno u tkivu. Nismo našli značajne promjene koje bi se mogle pripisati izloženosti duhanskom dimu ili njegovom otrovnom sastojku kadmiju. Budući da bi posteljični estrogen mogao poslužiti kao pokazatelj štetnog učinka kadmija pri izloženosti duhanskom dimu, mehanizam ili mehanizme metaloestrogenog učinka kadmija u posteljici valjalo bi dalje istraživati. Epidemiološka istraživanja u posljednja dva desetljeća pokazala su smanjenje endogenog estrogena u žena i trudnica koje su pušile cigarete.¹⁷ Nadalje, čini se da estrogen i kadmij imaju stanovitih fizioloških sličnosti koje mogu biti važne i za endokrinu funkciju posteljice.¹²⁸ Dokazano je da se kadmij može vezati za estrogenski receptor (ER) i ometati njegovu transkripciju te proizvesti slične učinke kao endogeni estrogen tako što aktivira gen progesteronskog receptora u ljudskim stanicama raka dojke MCF-7.^{44,45,129} Djelovanje slično estrogenskom na stanice raka dojke T47D koje su ovisne o estrogenu, može uslijediti već i pri veoma malim dozama (10 pM) kadmija.¹³⁰ Pokazano je da kadmij ima visoki afinitet za mjesto na receptoru ER α i sprječava vezivanje prirodnog liganda, hormona estradiola-17 β .¹²⁹ Na sličan način niske doze kadmija utječu obrnuto proporcionalno na procese ovisne o estrogenu u glodavaca pri čemu je kadmijско djelovanje snažnije od djelovanja fitoestrogena, većine ksenoestrogena i selektivnih ER-modulatora.⁴⁴ U štakorica, davanje kadmija izaziva preuranjeni pubertet, povećanja težine maternice i pojačani razvoj mliječnih žlijezda.¹³¹ Stoga se kadmij može smatrati kancerogenim metaloestrogenom koji oponaša učinke estrogenâ. Takve učinke i njihove mehanizme u sisavaca, uključujući ljude tek treba istražiti za kadmij, ali i za druge metale, među kojima su olovo, arsen, uran i drugi.

Noviji podaci pokazuju da kadmij koči ekspresiju gena posteljičnih laktogena i smanjuje broj trofoblastnih stanica u posteljici štakora djelovanjem sličnim estrogenskom, što ima važne štetne učinke na rast i fiziološku funkciju

posteljice.⁸² Valbonesi i suradnici¹³² izvijestili su da kadmij izaziva različite stresne reakcije u trofoblastima ljudske posteljice, među ostalima i one koje ovise o proteinskoj kinazi aktiviranoj mitogenom (MAPK) i koje imaju ključnu ulogu tijekom trudnoće. Autori su zaključili da takva nefiziološka aktivacija izazvana kadmijem remeti normalne funkcije trofoblastnih stanica.

O međudjelovanju otrovnih i esencijalnih mikroelemenata u krvi/serumu majke i u krvi/serumu pupkovine u uvjetima izloženosti duhanskom dimu

Da bi se procijenili nepovoljni učinci nakupljanja kadmija u posteljici odnosno prolaska otrovnih metala olova i žive (točnije metilžive, koja se nalazi u ribama) na rast i razvoj ploda zbog međudjelovanja otrovnih metala i mikronutrijenata željeza, cinka, bakra i drugih esencijalnih elemenata, treba izmjeriti koncentracije esencijalnih elemenata u fetusima odnosno u novorođenčadi. U *in vivo* pokusima, to je moguće učiniti u tkivima fetusa i novorođenih mladunaca pokusnih životinja, kako je pokazano u dosadašnjim istraživanjima provedenima u Jedinici Instituta.^{16,35,38,41,49} Međudjelovanja otrovnih i esencijalnih metala i njihov prijenos kroz posteljicu, osim u uzorcima posteljica, u ovom istraživanju procjenjivali smo i na temelju usporednih analiza otrovnih metala kadmija, olova i žive u punoj venskoj krvi majke i u krvi pupkovine te esencijalnih mikronutrijenata u serumu majčine krvi i serumu krvi pupkovine.

Olovo u krvi

Iako je u pušačica maseni udjel olova u posteljičinom tkivu bio statistički značajno povećan, u uzorcima pune venske krvi majke i krvi pupkovine nisu nađene razlike u koncentracijama olova s obzirom na naviku pušenja. Vrijednosti olova u krvi majke bile su 10 do 18, a u krvi pupkovine 6 do 13 µg/L. Podjednake vrijednosti odražavaju svojstvo olova da se slabo zadržava u posteljici i praktički u cijelosti prenosi iz majčine cirkulacije u fetus. Nadalje, te vrijednosti olova u krvi bile su niže od izmjerenih u općem stanovništvu koncem prošloga stoljeća što pokazuje da se u okolišu smanjio glavni izvor izloženosti olovu. To su bili ispušni plinovi motornih

vozila na pogon benzinom kojemu je dodavano olovo i što je u našoj državi napušteno početkom 21. stoljeća. Za usporedbu, u radu Pizent i suradnici,¹³⁴ vrijednosti koncentracija olova izmjerene u žena nepušačica u dvije regije u Hrvatskoj kasnih osamdesetih godina prošloga stoljeća bile su otprilike 5 do 10 puta veće nego u naših ispitanica; medijani (raspon vrijednosti) su iznosili u Istri 74 (29-251) i u Podravini 59 (21-263) µg/L.

Zanimljivo je da se visoke vrijednosti olova u krvi majke i u krvi pupkovine mogu i u današnje vrijeme naći u nekim udaljenim dijelovima svijeta što se povezuje s visokim razinama izloženosti olova u okolišu zajedno s lošim socioekonomskim uvjetima majke i obitelji. Tako je u Kini 2010. objavljeno da su vrijednosti olova u krvi u trudnica, ali i u krvi pupkovine bile oko 70 µg/L što se još uvijek povezuje s izloženošću olovu iz benzinskih ispušnih plinova motornih vozila.¹³⁵ Slično je i u Južnoj Africi 2010. objavljeno da su srednje vrijednosti olova u krvi pupkovine bile oko 60 µg/L. U oba slučaja navodi se da na povećanu izloženost olovu utječu loši socioekonomski uvjeti i manjkava prehrana budućih majki.¹³⁶

Duhanski dim i kadmij u krvi

U našem istraživanju, nalazi povišene koncentracija kadmija u punoj venskoj krvi majke kao i korelacija kadmija u krvi majke i pušenja u trudnoći bili su sukladni nalazu povećanog prosječnog masenog udjela kadmija u posteljici pušačica. Vrijednosti kadmija u pušačica prema nepušačicama, slično kao u tkivu posteljice, bile su dvostruko veće i u punoj venskoj krvi majke. Brojna istraživanja u literaturi također su pokazala pozitivnu povezanost povećanja koncentracija kadmija u krvi majke i djece s izloženošću duhanskom dimu u okolišu, bilo da se radi o aktivnom pušenju buduće majke ili izloženosti pasivnim pušenju.^{17,18,37,133,137-139} Pri procjeni izloženosti kadmiju kao sastojku duhanskom dima, imali smo na umu činjenicu da na koncentracije kadmija u krvi majke utječu svi čimbenici koji određuju njezinu specifičnu osobnu osjetljivost (kako je naprijed opisano), uključujući stanje uhranjenosti i socioekonomsko stanje. U prilog tome govore najnovija istraživanja u kojima su pokazani i utjecaji etničke i rasne pripadnosti te specifičnog kulturološkog

okruženja združenih s ostalim prije spomenutim čimbenicima koji određuju specifičnu osjetljivost na izloženost, tjelesnu retenciju (bioakumulaciju) i moguće štetne učinke otrovnih metala u vulnerabilnim skupinama stanovništva – budućim majkama i njihovom potomstvu. Tako su rezultati istraživanja koja su uključivala humani biomonitoring otrovnih metala objavljeni 2010. godine pokazali povećane razine olova, kadmija odnosno žive u posteljici, krvi majke i krvi pupkovine u žena u Saudijskoj Arabiji,¹³⁸ a u istraživanju u SAD-u je pokazano da su razine kadmija u krvi varirale ovisno o pripadnosti rasi i etničkoj skupini.¹³⁹

Esencijalni mikronutrijenti i duhanski dim

Prema definiciji, supstancija s antioksidativnim djelovanjem je ona koja svojom prisutnošću u niskoj koncentraciji istodobno sa supstratom koji se može oksidirati (pr. protein, lipid, ugljikohidrat ili nukleinska kiselina) može odgoditi ili onemogućiti oksidaciju tog supstrata. Važnu ulogu u tjelesnom enzimskom antioksidativnom obrambenom sustavu imaju mikronutrijenti, među kojima se ističu selenij, cink, bakar, željezo i brojni vitamini, kao što su A, C, E i B vitamini. Podaci o učincima duhanskog dima na esencijalne mikroelemente općenito su malobrojni, nešto je više podataka o seleniju i bakru, a manje o cinku i željezu.¹⁰⁰

Za normalno funkcioniranje organizma, mikroelementi cink, bakar i željezo prisutni su u tragovima (što znači da tjelesne potrebe su između 1 mg do najviše nekoliko desetaka miligrama na dan), a selenij je prisutan u ultra tragovima (potreban je za odvijanje tjelesnih funkcija u količini <1 mg na dan). Između ostalih fizioloških uloga u organizmu čovjeka, ti mikronutrijenti su sastavni dio antioksidativnih enzima i aktivno su uključeni u zaštitu organizma od oksidativnog stresa. Enzim bakar-cink superoksid dismutaza (Cu-Zn SOD) sadrži oba elementa kao kofaktore. Selenij je važan kao kofaktor glutation peroksidaze (GSHPx), važnog antioksidativnog enzima za uklanjanje lipidnog hidroksiperoksida i vodikov peroksida. Enzim katalaza (CAT) sadrži željezo. Bakar je važan sastojak ceruloplazmina u plazmi.^{12-15,100}

U uvjetima izloženosti duhanskom dimu može se izazvati oksidativni stres koji povećeva rizik za nastanak velikog broja kroničnih bolesti koje skraćuju život ili znatno utječu na kvalitetu života. U odraslih pušača promjena aktivnosti u sustavu

obrambenih antioksidativnih enzima može biti posljedica oksidativnog stresa izazvanog pušenjem i teško je utvrditi da li takve promjene pokazuju oksidativno oštećenje ili su odraz antioksidativne protupalne reakcije. Među prehranbenim mikronutrijentima ima nekoliko antioksidansa koji imaju važno mjesto u zaštiti organizma od endogenog oksidativnog stresa, uključujući i oksidativni stres izazvan pušenjem. Radi se o složenom međudjelovanju pušenja i stanja mikronutijenata u krvnom optoku, pri čemu većina antioksidansa može različitim načinima djelovanja zaštititi stanicu od oksidativnog oštećenja izazvanog pušenjem.^{100,140} U zanimljivom *in vitro* istraživanju na ljudskim monocitima izloženim duhanskom dimu ili samo kadmiju nađena su sniženja staničnog glutaciona i ATP-a koji su pokazatelji štetnih učinka na reduktivno-oksidativni sustav stanice. Te je učinke bilo moguće spriječiti dodavanjem *N*-acetil-L-cisteina, prekursora glutaciona, ali i davanjem kelirajućeg agensa za kadmij (Chelex-100). Budući da je toksičnost duhanskog dima bilo moguće spriječiti specifičnim kelatorom za kadmij, zaključeno je da kadmij ima glavnu ulogu u toksičnosti izazvanoj duhanskim dimom.¹⁴¹

Selenij

Odnos pušenja i selenija opisan je u svega nekoliko radova koji su pokazali smanjene koncentracije selenija u plazmi i tkivima, uglavnom pri istodobnom smanjenom unosu selenija u prehrani. S druge strane, pokazano je da se prestankom pušenja povećavaju koncentracije selenija u serumu neovisno u njegovom unosu prehranom.¹⁰⁰ Smanjena aktivnost eritrocitne GSPHx u pušača može biti posljedica manje koncentracije selenija u plazmi, na što mogu utjecati razni čimbenici, među kojima i kadmij kao otrovni metal katranske faze duhanskog dimu, koji smanjuje biodostupnost selenija iz hrane.¹⁴² Na koncentraciju selenija u plazmi također može utjecati porast ekspresije upalnih medijatora kao što su interleukini IL 1, IL 2, IL 6 i IL 8 koji nastaju kao odgovor na pušenje. Na temelju rezultata nekoliko radova može se zaključiti da koncentracije selenija u serumu kao i aktivnost eritrocitne GSPHx imaju tendenciju smanjenih vrijednosti u pušača, a postoje i dokazi da su manje koncentracije selenija u serumu povezane s upalom.^{100,143}

U naših ispitanica nije bilo nikakvih promjena u koncentracijama selenija ni u serumu majki, ni u serumu pupkovine, što upućuje na to da se radilo o ispitanicama koje nisu bile teški pušači cigareta i kojima je istodobno unos selenija prehranom bio dostatan.

Bakar

U uvjetima oksidativnog stresa, bakar u plazmi ili serumu se povećava pretežito u obliku enzima feroksidaze I i sudjeluje u uklanjanju nevezanog željeza iz plazme. Nekoliko autora istraživalo je prooksidativnu aktivnost bakra u ceruloplazminu pušača. U istraživanju koje su proveli Lapenna i suradnici,¹⁴⁴ u pušača je pokazana veća koncentracija bakra u plazmi i veća lipidna peroksidacija te korelacija bakra u plazmi i lipidne peroksidacije, što nije nađeno u nepušača.

Neki autori drže da radikali duhanskog dima s prooksidativnim djelovanjem mogu inducirati štetno peroksidativno djelovanje bakra na lipide, pa čak i na proteine s kojima je bakar labilno vezan, kao što su ceruloplazmin, albumin i metalotionen. Međutim, nalaz povećanog ceruloplazmina *per se* odraz je antioksidacijskog i protuupalnog djelovanja bakra u uvjetima oksidacijskog stresa odnosno upale.¹⁰⁰

U našem istraživanju, u punoj venskoj krvi majke u obje ispitivane skupine našli smo jednako povećane razine bakra u odnosu na vrijednosti koje se mogu izmjeriti izvan trudnoće (referentne vrijednosti za bakar u serumu u Jedinici Instituta jesu 700 do 1500 µg/L) što upućuje na to da je došlo do reakcija oksidativnog stresa tijekom porođaja.

Cink

Antioksidativno djelovanje cinka očituje se u njegovoj sposobnosti stabiliziranja lipidno-proteinske membrane stanica. Za određivanje stanja cinka u organizmu, serumski cink je najčešće rabljeni pokazatelj. Međutim, cink se veoma brzo smanjuje u prisutnosti upale. Štoviše, sniženje cinka u serumu nastaje i kao sistemska reakcija.

U istraživanjima na miševima pokazano je da interleukin IL-6 inducira povećani prijenos cinka iz krvnog optoka u hepatocite. Smatra se da razlike u

koncentracijam cinka u serumu između pušača i nepušača odražavaju dužinu i razinu izloženosti duhanskom dimu.¹⁰⁰ U našem istraživanju vrijednosti cinka u serumima majki bile su niže nego u serumima pupkovine, a nije bilo razlika u serumskim koncentracijama cinka s obzirom na izloženost duhanskom dimu.

Željezo

Žena reproduktivne dobi ima oko 40 mg željeza/kg tjelesne mase, dok je ta vrijednost u odraslog muškarca nešto viša i iznosi u prosjeku oko 50 mg željeza/kg tjelesne mase. Glavni pokazatelji (biomarkeri) stanja željeza u tijelu jesu vrijednosti hemoglobina, serumske koncentracije feritina i transferinskog receptora.

Vrijednost ukupnog željeza u serumu također može poslužiti za određivanje stanja željeza u tijelu, ali ono, kao i cink, može biti jako potisnuto upalom. Budući da željezo može potpomagati stvaranje slobodnih radikala, postoji znanstveni interes o mogućoj etiološkoj ulozi visokih koncentracija željeza u nastanku srčanožilnih bolesti i različitih karcinoma. Takva uloga nije još potvrđena, ali na staničnoj razini postoje određeni dokazi da je viša koncentracija biomarkera željeza povezana s oksidativnim oštećenjima.¹⁰⁰ Pušenje može utjecati na biomarkere željeza preko upalnog učinka pušenja na metabolizam željeza ili stoga što kontinuirana izloženost ugljičnom monoksidu iz duhanskog dima može izazvati određeni stupanj hipoksije koja kompenzatorno dovodi do povećane koncentracije hemoglobina kao reakcija prilagodbe na hipoksiju.¹⁰⁰

Analitički problem pri određivanju željeza u serumu (ili plazmi) može predstavljati hemoliza uzorka krvi. Ukoliko je došlo do hemolize, u uzorku seruma (ili plazme) trebalo bi kvantitativno odrediti hemoglobin i korigirati dobivene vrijednosti mjenog elementa, u ovom slučaju željeza ili, primjerice, prilikom određivanje olova u plazmi koje je u visokom postotku vezano za eritrocite.⁸⁸ U našem istraživanju, upravo zbog hemolize uzoraka krvi pupkovine, nismo bili u mogućnosti odrediti koncentracije željeza u serumima pupkovine. Kvantitativno određivanje hemoglobina u serumu nije rutinska metoda i za sada nije uvedena u Jedinici Instituta, pa to nismo mogli provesti.

U Hrvatskoj, u razdoblju 1999. do 2003. provedeno je veliko istraživanje na zdravim trudnicama koje je obuhvatilo 1435 pušačica i 4772 nepušačica.¹⁴⁵ Obje skupine ispitanica bile su izjednačene po antropometrijskim i kliničkim značajkama, trajanju trudnoće i načinu porođaja. Razlika je postojala u majčinih koncentracijama hemoglobina i u porođajnim težinama koje su bile manje u pušačica, dok su vrijednosti fetalnog hemoglobina bile statistički značajno veće u djece majki pušačica. Zaključeno je da pušenje utječe na homeostazu željeza najvjerojatnije tako što izaziva dodatne promjene u koncentracijama hemoglobina u krvi. U našem istraživanju nismo našli razlike u vrijednostima željeza u venskoj krvi majke s obzirom na naviku pušenja.

Čini se da na koncentracije serumskog željeza, transferinskog receptora i feritina pušenje ne utječe, izuzev u trudnoći. Tijekom trudnoće dolazi do porasta eritropoeze izazvane niskom saturacijom željeza u transferinu plazme te fiziološkog smanjivanja zaliha željeza jer se povećava ukupan volumen krvi. Budući da je povećanje volumena plazme blizu 50%, u usporedbi s povećanjem mase eritrocita, koje iznosi oko 25%, dolazi do relativnog smanjenja koncentracije hemoglobina i nastaje tzv. fiziološka anemija u trudnoći.¹⁴⁶

O međudjelovanju žive i selenija u ovisnosti o prehrambenim navikama

Živa je izrazito otrovan element. U prirodi se otpušta u elementarnom obliku (Hg^0) isparavanjem u atmosferu u koju dospijeva erupcijama vulkana i ljudskim djelovanjima te se transformira u anorganske oblike (kao soli Hg^+ i Hg^{2+} ; potonji tzv. merkuri oblik je najzastupljeniji u okolišu). Iz atmosfere živa oborinama dospijeva u površinske vode, potoke, rijeke, mora i oceane, gdje se djelovanjem bakterija u sedimentu i vodenim/morskim organizmima metilira u organsku živu, metilživu, pa u tom obliku dospijeva u morske plodove (mekušce, školjkaše) i ribe koji su dio ljudskog hranidbenog lanca.⁹ Ljudi su neminovno izloženi živi u svim kemijskim oblicima iz okoliša, amalgamskim zubnim ispunama, vakcinacijom (preko konzervansa tiomersala koji sadrži etilživu) i hranom. Na štetne učinke na zdravlje utječe kemijski oblik i spoj (tzv. specijes) žive. Opće stanovništvo izloženo je onečišćenom pitkom vodom i hranom metilživi, koje ima najviše u velikim ribama mesojedima (tuna, sabljarka, losos i morski pas) te ulješurama (kitovima) u dijelovima svijeta gdje kitovo meso i mast imaju dominantnu ulogu u prehrani stanovništva (pr. u Europi je tako na Farojskim otocima).

Nakon ingestije, metilživa se apsorbira u želučanocrijevnom sustavu, ulazi u krvni optok, raznosi se po tijelu i može se nakupljati u unutarnjim organima. Živa može imati štetne učinke na srčanožilni sustav, želučanocrijevni sustav, hepatobilijarni sustav te bubreg, no najozbiljnije štetne posljedice izloženosti živi jesu neurotoksični učinci, pogotovo u fetusu i malom djetetu koji se razvija i raste.^{51-53,147,148} Najosjetljivije razdoblje za nastanak štetnih učinaka žive kao i drugih neurotoksičnih ksenobiotika (tzv. prozor za izloženost) je vrijeme u kojem se odvija sazrijevanje mozga koje počinje u posljednjem tromjesečju trudnoće i traje do treće godine života.¹⁴⁹

Poznato je da se metilživa u najvećem dijelu prenosi kroz posteljicu, a mogući prijenosni sustavi živinih iona u posteljici jesu aminokiseline (cistein kao dio metalotienina) i organski anion.¹⁵⁰ U našem istraživanju izmjerene vrijednosti žive u punoj venskoj krvi majke i u krvi pupkovine odražavale su ukupnu izloženost

ispitanica svim kemijskim oblicima žive, ali ponajprije metilživi kakva je prisutna u prehrani, poglavito ribama i plodovima mora. Dokazali smo da su se povećanjem unosa ribe koncentracije žive u krvi majke i krvi pupkovine povećavale linearno te da su se istodobno jednako linearno povećavale koncentracije esencijalnog mikronutrijenta selenija u serumu majke i u serumu pupkovine. Oba mikroelementa nalaze se u istim namirnicama ljudskog hranidbenog lanca i poznato je da međudjeluju u organizmu sisavaca, uključujući ljude.

Selenij je esencijalan metaloid koji, osim potvrđenih antioksidacijskih, protupalnih i antikancerogenih svojstava,^{100,143} ima i zaštitna svojstva smanjivanja toksičnosti metala, žive¹⁵¹⁻¹⁵³ ili kadmija,^{142,154-158} koja su manje istražena. Otrovnost metala živa, kadmij, olovo i metaloid arsen,¹⁵⁹ zajedno sa selenijem i drugim nutrijentima, mogu se naći u ribama, plodovima mora i školjkama u visokim koncentracijama.

Kako bi oslikali važnost međudjelovanja žive i selenija u stanici, Raymond i Ralston¹⁵¹ ističu da u procjeni toksičnih učinaka žive na zdravlje nije dostatan pristup kojim se jednostavno određuje samo koliko se žive unosi u ljudski organizam, već bi točniji pristup istraživanju bio utvrditi koliko je slobodnog selenija preostalo u stanici, odnosno da li je previše selenija izgubljeno detoksikacijskim vezanjem za živu. Selenij i živa se u stanici vežu u netopljiv spoj živin selenid, čime se toksičnost žive neutralizira, no preostaje opasnost da je zbog tog vezanja selenij izgubljen za sintezu važnih antioksidacijskih selenoenzima.¹⁵² Rezultati nedavnog istraživanja upućuju na moguću aktivnu ulogu selenija i u majčinom obrambenom sustavu od toksičnih onečišćivača u okolišu, uključujući otrovne sastojke cigaretnog dima.¹⁶⁰

6. Zaključci

Na temelju provedenih istraživanja u kojima su procjenjivane razine izloženosti otrovnim metalima kadmiju, olovu i živi te rizici njihovih štetnih učinaka u žena fertile dobi i rizik za buduće dijete zbog perinatalne izloženosti, uporabom uzoraka ljudskog posteljičinog tkiva te parova uzoraka majčine krvi i krvi pupkovine, povezano s navikom pušenja cigareta i prehranbenim navikama majke, dobiveni su sljedeći rezultati:

- ❖ U posteljicama pušačica u odnosu na nepušačice
 - o **kadmij** je bio dvostruko veći, olovo je bilo znatno veće, **porođajne težine i duljine** te posteljičini omjeri (porođajna masa/masa posteljice) smanjeni uz nalaz da su porođajne težine negativno korelirale s posteljičnim kadmijem odnosno posteljičnim olovom;
 - o **cink** je istodobno bio veći, čime je manji udjel cinka bio dostupan fetusu, a u koncentracijama željeza i bakra nije bilo promjena;
 - o **razine steroidnih hormona progesterona i estradiola u tkivu posteljice** su korelirale, ali nisu utvrđene statistički značajne razlike (iako je prije nađen smanjeni progesteron u posteljicama pušačica odnosno u skotnih štakorica izloženih kadmiju).
- ❖ U uzorcima venske krvi majke i krvi pupkovine u pušačica u odnosu na nepušačice
 - o **kadmij u majčinoj krvi** bio je dvostruko veći i korelirao je s pušenjem u trudnoći, dok je kadmij u krvi pupkovine bio deseterostruko manji i nije se razlikovao u pušačica i nepušačica;
 - o **olovo u krvi majke i u krvi pukovine je bilo podjednako** u obje ispitivane skupine, **bakar u serumu svih roditelja bio je povišen**, a nije bilo razlika u koncentracijama željeza, cinka i selenija u serumima majke i pupkovine u ovisnosti o navici pušenja.

- ❖ U uzorcima venske krvi majke i krvi pupkovine u odnosu na prehrambene navike
 - o **koncentracije ukupne žive** u krvi majke i u krvi pupkovine su se linearno povećavale s učestalošću tjednog unosa ribe te je živa u krvi majke korelirala s unosom ribe i s unosom školjaka;
 - o **koncentracije esencijalnog mikronutrijenta selenija** u serumu majke i u serumu pupkovine su se linearno povećavale s učestalošću tjednog unosa ribe.

Tijekom biološkog praćenja u ljudi (humanog biološkog monitoringa) metalâ, uz krv i serum, kao uobičajene uzorke koji se pritom rabe, naši rezultati potvrđuju da je ljudska posteljica veoma koristan uzorak tkiva, koji može poslužiti kao jedinstveni organ u procjeni izloženosti i učinaka metala istodobno u vanjskom okolišu majke i unutar majčinog organizma koji je prirodan okoliš za razvoj nerođenog djeteta. Posteljica je osobito korisna u procjeni izloženosti kadmiju koji se najvećim dijelom nakuplja u posteljičinom tkivu kao ciljnom organu tijekom trudnoće. To se zbiva najviše u uvjetima izloženosti duhanskom dimu zbog visoke stope apsorpcije kadmija inhalacijom, čime se može remetiti prijenos esencijalnih mikronutrijenata (željeza, cinka, bakra, selenija i drugih) od majke do fetusa. Osim toga, tkivo ljudske posteljice može poslužiti u procjeni nastanka i mehaniz(a)ma disrupcije sinteze i produkcije posteljičnih steroidnih hormona u uvjetima izloženosti otrovnim metalima, naročito kadmiju. Poremećene razine steroidnih hormona u posteljici mogle bi poslužiti kao *post hoc* pokazatelj fetalnog distresa *in utero*. U tom smislu u budućim istraživanjima štetnih učinaka kadmija i drugih otrovnih metala na reprodukciju u žena, trebalo bi procijeniti da li i na koji način kadmij kao sastojak duhanskog dima može remetiti steroidne hormone, progesteron i estradiol, ali i polipeptidne hormone, leptin i posteljični hormon rasta.

Pri procjeni perinatalne izloženosti živi (najviše metilživi, ingestijom ribama i školjkama), osim činjenice da je metilživa osobito toksična za središnji živčani sustav u razdoblju njegova sazrijevanja, treba imati na umu da se u istim namirnicama nalazi selenij koji sa živom oblikuje soli selenide i tako neutralizira toksičnost žive. Našim istraživanjem pokazali smo međudjelovanje žive i selenija u ovisnosti o unosu ribe.

U zaključku, naši rezultati pokazuju dvije zaokružene cjeline nalaza dobivenih u kontinuiranom višegodišnjem istraživanju procjene izloženosti za tri najvažnija otrovna metala i njihovih međudjelovanja s esencijalnim mikronutrijentima u žena fertile dobi. Originalan doprinos ovog rada jesu određivanja posteljinih steroidnih hormona izravno u posteljičnom tkivu *ex vivo*, zajedno s procjenom razina otrovnih metala i stanja esencijalnih mikronutrijenata u posteljici kao organu razgraničenja majčinog organizma i fetusa te analizama mikroelemenata u parovima uzoraka majčine krvi i krvi pupkovine u zdravih roditelja na području grada Zagreba i Zagrebačke županije. Našli smo da su razine izloženosti otrovnim metalima u žena u dobi kad su sposobne za rađanje slične onima u drugim područjima velikih gradova kontinentalnih dijelova Europe i da ta prosječna izloženost otrovnim metalima ne predstavlja ozbiljnu opasnost za budućeg potomka. Pokazali smo da izloženost duhanskom dimu, zbog nakupljanja kadmija, može imati nepovoljne učinke na funkcije posteljice u prijenosu esencijalnih mikronutrijenata (kako je nađeno za cink), s posljedičnim smanjenim vrijednostima porođajne težine i porođajne dužine.

7. Sažetak

Disertacija

2011.

PROCJENA IZLOŽENOSTI OTROVNIM METALIMA I NJIHOVIH UČINAKA NA FUNKCIJE POSTELJICE U ZDRAVIH RODILJA

Sandra Stasenko

Svrha istraživanja bila je procijeniti razine izloženosti kadmiju, olovu i živi te moguće opasnosti za žene fertile dobi i buduće potomke zbog perinatalne izloženosti. Istraživanje je provedeno na ukupno 406 zdravih žena s ročnim porođajem rodničkim putem u Kliničkoj bolnici u Zagrebu. Koncentracije otrovnih metala i esencijalnih mikronutrijenata željeza, cinka, bakra i selenija određivane su u uzorcima posteljičinog tkiva te uzorcima venske krvi majke i krvi pupkovine standardnim analitičkim metodama (AAS i ICP-MS) u odnosu na naviku pušenja cigareta i prehranu.

U posteljicama pušačica u usporedbi s nepušačicama, kadmij je bio dvostruko veći, olovo je bilo povećano, porođajne težine, duljine i posteljičini omjeri smanjeni i oba metala negativno su korelirala s porođajnim težinama. Cink je bio povećan, a željezo i bakar nisu bili promijenjeni. U krvi majki pušačica u odnosu na nepušačice, kadmij je bio dvostruko veći i korelirao je s pušenjem u trudnoći. Kadmij u krvi pupkovine je bilo oko deset puta manji, neovisno o izloženosti duhanskom dimu. Nije bilo razlika u koncentracijama olova u krvi majki i pupkovine, kao ni željeza, cinka, bakra i selenija u serumu majke i pupkovine. Koncentracije žive u krvi majke i pupkovine te koncentracije selenija u serumu majke i pupkovine linearno su se povećavale s unosom ribe u prehrani. Razine progesterona i estradiola izmjerene u posteljičinom tkivu *ex vivo* (uporabom enzimske-imunometrijske metode) bile su u međusobnoj korelaciji, ali nije bilo promjena u odnosu na izloženost duhanskom dimu.

Potvrdili smo da ljudska posteljica predstavlja koristan i jedinstven uzorak tkiva u humanom biološkom monitoringu vanjskog majčinog i unutarnjeg okoliša za razvoj fetusa. Nađene razine izloženosti otrovnim metalima u žena na području grada Zagreba i Zagrebačke županije slične su onima u velikim gradovima kontinentalnih dijelova Europe i ne predstavljaju ozbiljnu opasnost za nerođene dijete. Izloženost duhanskom dimu, zbog nakupljanja kadmija, može imati nepovoljne učinke na funkcije posteljice u prijenosu esencijalnih mikronutrijenata – kako smo pokazali za cink – s posljedičnim smanjenim vrijednostima porođajne težine i porođajne duljine.

Ključne riječi: biološki monitoring, fetus, esencijalni mikronutrijenti, kadmij, olovo, perinatalna izloženost, posteljičini steroidni hormoni, trudnoća, živa

8. Summary

Ph. D. Thesis

2011

ASSESSMENT OF EXPOSURE TO TOXIC METALS AND THEIR EFFECTS ON PLACENTAL FUNCTIONS IN HEALTHY PARTURIENTS

Sandra Stasenکو

The investigation aimed at assessing levels of exposure to cadmium, lead and mercury, and the related imminent risks for women of reproductive age and upcoming children due to perinatal exposure. Study was conducted on in total 406 healthy women who gave birth at term by vaginal delivery in a clinical hospital in Zagreb. We measured the concentrations of toxic metals and essential micronutrients iron, zinc, copper, and selenium in placental tissue, maternal venous blood, and umbilical cord blood using standard analytical techniques (AAS and ICP-MS) in relation to cigarette smoking and dietary habit.

In placentas of smokers *vs.* non-smokers, cadmium doubled; lead increased, birth weight, length and placental ratio decreased, and both metals negatively correlated with birth weights. Zinc increased, and iron and copper did not change. In maternal blood of smokers, cadmium was twice as high as in non-smokers and correlated with smoking in pregnancy. Cadmium in cord blood was about ten times lower regardless of exposure to tobacco smoke. There were no differences between smoking and non-smoking in lead concentrations in maternal and cord blood, as well as in iron, zinc, copper and selenium in maternal and cord serum. Mercury in maternal and cord blood and selenium in maternal and cord serum increased linearly with dietary intake of fish. Levels of progesterone and estradiol were assayed in placental tissue *ex vivo* (using enzyme-immunometric method), correlated, and no differences were found in relation to tobacco smoke exposure.

We confirmed that human placenta presents a useful and unique tissue sample in human biological monitoring of external maternal and internal environment for foetal development. Exposure levels to toxic metals in women of Zagreb metropolitan area and Zagreb County are similar to those in other big cities in continental parts of Europe, and do not pose a serious threat for unborn child. Tobacco smoke exposure, due to cadmium accumulation, may have adverse effects on placental function in essential micronutrient transport – as we showed for zinc – with consequent decreases in birth weight and birth length.

Key words: biological monitoring, cadmium, essential micronutrients, foetus, lead, mercury, perinatal exposure, placental steroid hormones, pregnancy

9. Popis literature

1. Nordberg GF. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;1:283:192-200.
2. ATSDR Document. Cadmium. Toxicological profile. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA: U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2008.
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.html#bookmark13>
3. WHO/EHC Publication 134. Cadmium. World Health Organization, Environmental Health Criteria series. Geneva: WHO Regional Office for Europe; 1992.
4. WHO/EHC Publication 135. Cadmium - environmental aspects. *Ibidem*; 1992.
5. ATSDR Document. Lead. Toxicological profile. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Ibidem*; 2007.
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.html>
6. WHO/EHC Publication 165. Inorganic lead. *Ibidem*; 1995.
7. ATSDR Document. Arsenic. Toxicological Profile. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Ibidem*; 2007.
<http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts2.html>
8. WHO/EHC Publications 224. Arsenic and arsenic compounds, 2nd Edition. *Ibidem*; 2001.
9. ATSDR. Toxicological profile for mercury. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Ibidem*; 2007.
10. Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 2003; 68:167-82.
11. Zalups RK, Koropatnick J. *Molecular Biology and Toxicology of Metals*. London - New York: Taylor & Francis; 2000, 596 str.
12. Nordberg G, Sandström B, Becking G, Goyer RA. Essentiality and toxicity of trace elements: Principles and methods for assessment of risk from human exposure to essential trace elements. *J Trace Elem Exp Med* 2001; 14: 261-73.

13. Goyer, RA. Toxic and essential metal interactions. *Ann Rev Nutr* 1997; 7: 37-50.
14. WHO/EHC Publication 228. Principles and Methods for the Assessment of Risk from Essential Trace Elements. World Health Organization, Environmental Health Criteria series. Geneva: WHO Regional Office for Europe; 2002.
15. Piasek M, Mikolić A. Minerals and physiology from essentiality to toxicity: A review of important minerals and their major impact on the human body's physiology. U: Gašperlin L, Žlender B, ur. "Role of Minerals in Food Technology and Nutrition", 26th Food Technology Days dedicated to Prof. F. Bitenc, Ljubljana; 2009, str. 9-19.
16. Piasek M, Blanuša M, Kostial K, Laskey JW. Low iron diet and parenteral cadmium exposure in pregnant rats: the effects on trace elements and fetal viability. *Biometals* 2004; 17:1-14.
17. Piasek M, Blanuša M, Kostial K, Henson MC. Assessment of steroid disruption and metal concentrations in human placenta: effects of cigarette smoking. Chapter VI. U: Fong CB, ur. *Smoking and Health Research Frontiers*. Hauppague, NY: Nova Science Publishers Inc.; 2007, str. 119-61.
18. Henson MC, Piasek M, Chedrese PJ, Castracane VD. Metal toxicity in mammalian reproduction. U: Eldridge JC, Stevens JT, ur. *Endocrine Toxicology*. Third Edition. Target Organ Toxicology Series, New York-London: Informa Healthcare; 2010, str. 256-78.
19. WHO/EHC Publication 155. Biomarkers and risk assessment: Concepts and principles. *Ibidem*; 1993.
20. Kostial K. Cadmium. U: Mertz W, ur. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition – Fifth Edition*. Volume 2. Orlando, FL: Academic Press, Inc.; 1986, str. 319-45.
21. Nordberg GF, Nogawa K, Nordberg M, Friberg LT. Cadmium. U: Fowler BA, Nordberg M, Friberg L, Nordberg G, ur. *Handbook on the Toxicology of Metals*, Third Edition. New York: Academic Press; 2007, str. 445-86.

22. Varnai VM, Blanuša M, Piasek M, Kostial K. New therapeutic and experimental aspects of chelators as antidotes of metal toxicity. U: Atta-ur-Rahman, Reitz AB, ur. *Frontiers in Medicinal Chemistry, Volume 4*. Karachi, Pakistan: Bentham Publishers; 2009, str. 130-82.
23. Nishijo M, Satarug S, Honda R, Tsuritani I, Aoshima K. The gender differences in health effects of environmental cadmium exposure and potential mechanisms. *Mol Cell Biochem* 2004;255:87-92.
24. Åkesson A, Berglund M, Schütz A, Bjellerup P, Bremme K, Vahter M. Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. *Am J Pub Health* 2002; 92: 284-7.
25. Vahter M, Berglund M, Åkesson A, Liden C. Metal and women's health. *Environ Res Section A* 2002;88:145-55.
26. Leazer TM, Liu Y, Klaassen CD. Cadmium absorption and its relationship to divalent metal transporter-1 in the pregnant rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 85: 18-24.
27. Kostial K, Blanuša M, Kargačin B, Piasek M, Maljković T, Kello D. Sex-related differences in genetic susceptibility to toxic metals. U: Grandjean EC, ur. *Ecogenetics: Genetic predisposition to the toxic effects of chemicals*. Copenhagen, Denmark: World Health Organization, Regional Office for Europe. London: Chapman & Hall; 1991, str. 111-22.
28. Kostial K, Blanuša M, Maljković T, Kargačin T, Piasek M, Momčilović B, Kello D. Age and sex influence the metabolism and toxicity of metals. U: Momčilović B, ur. *Trace Elements in Man and Animals-7*. Zagreb, Croatia: Institute for Medical Research and Occupational Health, University of Zagreb; 1991, str. 11/1-11/6.
29. Miller RK, Mattison DR, Plowchalk D. Biological monitoring of the human placenta. U: Clarkson TW, Nordberg GF, Sager PR ur. *Biological Monitoring of Toxic Metals*, New York: Plenum Press; 1988, str. 567-602.
30. Iyengar GV, Rapp A. Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements: Part 1: Physiology, function and sampling of placenta for elemental characterization. *Sci Total Environ* 2001;280:195-206.

31. Iyengar GV, Rapp A. Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements: Part 2: Essential minor, trace and other (non-essential) elements in human placenta. *Sci Total Environ* 2001;280:207-19.
32. Iyengar GV, Rapp A. Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements: Toxic trace elements in placenta and placenta as a biomarker for these elements. *Sci Total Environ* 2001; 280:221-38.
33. Baglan RJ, Brill AB, Schulert A, Wilson D, Larsen K, Dyer N, Schaffner W, Hoffman L, Davies J. Utility of placental tissue as an indicator of trace element exposure to adult and fetus. *Environ Res* 1974;8:64-70.
34. Piasek M, Blanuša M, Kostial K, Laskey JW. Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. *Reprod Toxicol* 2001;15:673-81.
35. Piasek M, Laskey JW, Kostial K, Blanuša M. Assessment of steroid disruption using cultures of whole ovary and/or placenta in rat in human placental tissue. *Int Arch Occup Environ Health* 2002;75Suppl: S36-S44.
36. Vinković Vrček I, Jurasović J, Žužul S, Stasenko S, Piasek M. Essential element concentration in maternal blood serum and umbilical cord blood serum in relation to tobacco smoking. European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2009, Graz, Austrija. Book of Abstracts str. 125. URL: <http://lamp3.tugraz.at/~pwc09/Download/BookOfAbstracts.pdf>
37. Apostoli P, Telišman S, Sager PR. Reproductive and developmental toxicity of metals. U: Fowler BA, Nordberg M, Friberg L, Nordberg GF, ur. *Handbook on the Toxicology of Metals, Third Edition*. New York: Academic Press; 2007, str. 213-49.
38. Piasek M, Schönwald N, Blanuša K, Kostial K, Laskey JW. Biomarkers of heavy metal reproductive effects and interaction with essential elements in experimental studies on female rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 1996; 47:245-59.
39. Chedrese PJ, Piasek M., Henson MC. Cadmium as an endocrine disruptor in the reproductive system. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 2006;6: 27-35.

40. Goyer RA. Transplacental transfer of lead and cadmium. U: Goyer RA, Cherian MG, ur. Toxicology of metals: Biochemical aspects. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 1995, str. 1-17.
41. Piasek M, Laskey JW. Acute cadmium exposure and ovarian steroidogenesis in cycling and pregnant rats. *Reprod Toxicol* 1994; 8: 495-507.
42. Kawai M, Swan, KF, Green AE, Edwards DE, Anderson MB, Henson MC. Placental endocrine disruption induced by cadmium: effects on P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in cultured human trophoblasts. *Biol Reprod* 2002; 67: 178-83.
43. Henson MC, Chedrese PJ. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med* 2004; 229: 383-92.
44. Safe S. Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nat Med* 2003; 9:1000-1.
45. Götz, R. Cadmium is a metalloestrogen. *Pharm Unserer Zeit* 2004; 33: 83.
46. Piasek M, Henson MC, Stasenko S, Kušec V. The potential for cadmium to act as a placental steroid disruptor in humans: ex vivo and in vitro data. 14th International Federation of Placenta Associations - IFPA Conference / 12th European Placenta Group Meeting - EPG Meeting; Dvorac Seggau, Austrija 2008. *Placenta* 2008;29:A.60.
47. Stasenko S, Bradford EM, Piasek M, Henson MC, Jurasović J, Kušec V. Metals in human placenta: Focus on the effects of cadmium on steroid hormones and leptin. *J Appl Toxicol* 2010; 30:242-53.
48. Piasek M. Učinci olova na reprodukciju: pregled podataka dobivenih ispitivanjima u ljudi i iz pokusa na životinjama. *Arh Hig Rada Toksikol* 1987;38: 177-204.
49. Piasek M. Učinak olova na reprodukciju u štakora. [Magistarski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Poslijediplomski studij prirodnih znanosti; 1986, 128 str.
50. Ivičić N, Tomić L, Simeon V. Cadmium and lead in cigarettes and in smoke condensate. *Arh Hig Rada Toksikol* 1985; 36:157-64.

51. Clarkson TW. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect* 2002;110Suppl 1:11-23.
52. Parker SK, Schwartz B, Todd J, Pickering LK. Thiomerosal-containing vaccines and autistic spectrum disorder: A critical review of published original data. *Pediatrics* 2004; 114:793-804.
53. Spurgeon A. Prenatal methylmercury exposure and developmental outcomes: review of the evidence and discussion of future directions. *Environ Health Perspect* 2006;114:307-1.
54. Colborn T, Saal FSV, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993;101: 378-84.
55. Choe SY, Kim SJ, Kim HG, Lee JH, Choi Y, Lee H, Kim Y. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Sci Total Environ* 2003;312:15-21.
56. Takiguchi M, Yoshihara S. New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environ Sci* 2006;13:107-16.
57. Dyer CA. Heavy metals as endocrine-disrupting chemicals. In *Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice*, Gore AC ur. Totowa, NY: Humana Press Inc.; 2007, str. 111-33.
58. Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Depleted uranium--the growing concern. *J Appl Toxicol* 2002;22:149-52.
59. Davey JC, Nomikos AP, Wungjiranirun M i sur. Arsenic as an endocrine disruptor: Arsenic disrupts retinoic acid receptor- and thyroid hormone receptor-mediated gene regulation and thyroid hormone-mediated amphibian tail metamorphosis. *Environ Health Perspect* 2008;116:165-72.
60. McLachlan JA. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 2001;22:319-41.
61. Guillette LJ Jr. Endocrine disrupting contaminants – Beyond the dogma. *Environ Health Perspect* 2006;114Suppl 1: 9-12.
62. Smith CJ, Livingston SD, Doolittle DJ. An international literature survey of “IARC Group I carcinogens” reported in mainstream cigarette smoke. *Food Chem Toxicol* 1997; 35:1107-30.

63. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Tobacco Smoking. Volume 38. Lyon, France: IARC; 1986.
64. Tziomalos K, Charsoulis F. Endocrine effects of tobacco smoking. *Clin Endocrinol* 2004; 61: 664-74.
65. Rogers JM. Tobacco and pregnancy. *Reprod Toxicol* 2009;28:152-60.
66. Lindbohm M-L, Sallmen M, Taskinen H. Effects of exposure to environmental tobacco smoke on reproductive health. *Scand J Work Environ Health* 2002;28Suppl 2:84-96.
67. Bush PG, Mayhew TM, Abramovich DR, Aggett PJ, Burke MD, Page KR. A quantitative study on the effects of maternal smoking on placental morphology and cadmium concentration. *Placenta* 2000; 21:247-56.
68. Myllynen P, Pasanen M, Pelkonen O. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta* 2005; 26:361-71.
69. Yang K, Julan L, Rubio F, Sharma A, Guan H. Cadmium reduces 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and expression in human placental trophoblast cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290:135-42.
70. Thompson J, Bannigan J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod Toxicol* 2008;25:304-15.
71. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1037-48.
72. Pillet S, D'Elia M, Bernier J, Bouquegneau J-M, Fournier M, Cyr DG. Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats. *Toxicol Sci* 2006;92: 423-32.
73. Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol* 2001;1: 983-93.
74. Paksy K, Varga B, Horvath E, Tatrai E, Ungvary G. Acute effects of cadmium on preovulatory serum FSH, LH, and prolactin levels and on ovulation and ovarian hormone secretion in estrous rats. *Reprod Toxicol* 1989;3:241-7.

75. Varga B, Paksy K. Toxic effects of cadmium on LHRH-induced LH release and ovulation in rats. *Reprod Toxicol* 1991;5:199-203.
76. Lafuente A, Cano P, Esquifino AI. Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH level, dose-dependent? *Biometals* 2003;16:243-50.
77. Tsutsumi R, Hiroi H, Momoeda M i sur. Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke. *Fertil Steril* 2009; 91Suppl 4:1614-17.
78. Paksy K, Varga B, Lázár P. Cadmium interferes with steroid biosynthesis in rat granulosa and luteal cells *in vitro*. *Biometals* 1992;5:245-50.
79. Paksy K, Varga B, Lázár P. Effect of cadmium on female fertility, pregnancy and postnatal development in the rat. *Acta Physiol Hung* 1996;4:119-30.
80. Paksy K, Rajczy K, Forgács Z i sur. Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. *J Appl Toxicol* 1997;17:321-7.
81. Piasek M, Laskey JW. Effects of *in vitro* cadmium exposure on ovarian steroidogenesis in rats. *J Appl Toxicol* 1999;19:211-7.
82. Lee CK, Lee JT, Yu SJ i sur. Effects of cadmium on the expression of placental lactogens and Pit-1 genes in the rat placental trophoblast cells. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 298: 11-8.
83. Laskey JW, Phelps PV. Effect of cadmium and other metal cations on *in vitro* Leydig cell testosterone production. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;108: 296-306.
84. Bhattacharyya MH, Wilson AK, Rajan SS, Jonah M. Biochemical pathways in cadmium toxicity. U: Zalups RK, Koropatnick J, ur. *Molecular biology and toxicology of metals*. London - New York: Taylor & Francis; 2000, str. 34-74.
85. Jurasović J, Cvitković P, Pizent A, Čolak B, Telišman S. Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects. *Biometals* 2004;17:735-43.

86. Blanuša M, Kralj Z, Bunarević A. Interaction of cadmium, zinc and copper in relation to smoking habit, age and histopathological findings in human kidney cortex. *Arch Toxicol* 1985;58:115-7.
87. Bolt HM, Thier R. Biological monitoring and biological limit values (BLVs): The Strategy of the European Union. The MAK-Collection. Part II: BAT Value Documentations; DFG. 2005;4:1-10.
88. Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: Advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect* 2005;133:1669-74.
89. Ferré F, Janssens Y, Tanguy G, Breuiller M, De Pariante D, Cedard L. Steroid concentrations in human myometrial and placental tissues at week 39 of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1978;131:500-2.
90. Ferré F, Uzan M, Jolivet A i sur. Influence of the oral administration of micronized progesterone on plasma and tissue levels of steroids in human pregnancy. *Acta Physiol Hung* 1985;65:443-51.
91. Pasqualini JR, Kincl FA. Hormones and the fetus. Volume I: Production, concentration and metabolism during pregnancy. Pergamon Press: Oxford, UK; 1985.
92. Kalenga MK, de Hertogh R, Whitebread S, Vankrieken L, Thomas K, de Gasparo M. Distribution of the concentrations of angiotensin II (A II), A II receptors, hPL, prolactin, and steroids in human fetal membranes [in French]. *Rev Fr Gynecol Obstet* 1991;86:585-91.
93. Wilson EA, Jaward MJ, Powell DE. Effects of estradiol and progesterone on human chorionic gonadotropin secretion *in vitro*. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 149:143-8.
94. Runnebaum B, Runnebaum H, Stöber I, Zander J. 1975. Progesterone 20 α -dihydroprogesterone and 20 β -dihydroprogesterone levels in different compartments from the human foeto-placental unit. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1975; 80:558-68.
95. Jakowicki J, Ervast H-S, Adlercreutz H. Gas chromatographic determination and mass spectrometric identification of oestrogens in normal placental tissue at term. *J Steroid Biochem* 1973;4:181-91.

96. Nielsen FH. Possibly essential trace elements. U: Bogden JD, Klevay LM ur. Clinical Nutrition of the Essential Trace Elements and Minerals. The Guide for health Professionals. Totowa, NJ Humana Press Inc.; 2000, str. 11-36.
97. Nordberg GF, Sandsrom B, Becking G, Goyer RA. Essentiality and Toxicity of metals. U: Sarkar B ur. Heavy Metals in the Environment. New York, NY : Marcel Dekker, Inc.; 2002, str. 1-14.
98. Gambling L, Danzeisten R, Fosser C i sur. Iron and copper interaction in development and the effect on pregnancy outcome. J Nutr. 2003;133: Suppl:1554-6.
99. Grandjean P. Late insights into early origins of disease. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008;102:94-9.
100. Northrop-Clewes CA, Thurnham DI. Monitoring micronutrients in cigarette smokers. Clin ChimActa 2007;377:14-38.
101. Lagerkvist BJ, Sandberg S, Frech W, Jin T, Nordberg GF. Is placenta a good indicator of cadmium and lead exposure? Arch Environ Health 1996;51:389-94.
102. Reichrtová E, Dorociak F, Palkovicova L. Sites of lead and nickel accumulation in the placental tissue. Hum Exp Toxicol 1998;17:176-81.
103. Osman K, Åkesson A, Berglund M i sur. Toxic and essential elements in placentas of Swedish women. Clin Biochem 2000;33:131-8.
104. Zadorozhnaja TD, Little RE, Miller RK i sur. Concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, mercury, and zinc in human placentas from two cities in Ukraine. J Toxicol Environ Health A 2000;61:255-63.
105. Falcon M, Vinas P, Osuna E, Luna A. Environmental exposures to lead and cadmium measured in human placenta. Arch Environ Health 2002; 57: 598-602.
106. Odland JO, Nieboer E, Romanova N, Hofoss D, Thomassen Y. Intercommunity and temporal variation of eleven essential and five toxic elements in human placentas from deliveries in thirteen arctic and sub-arctic areas of Russia and Norway. J Environ Monit 2003;5:166-74.
107. Ronco AM, Arguello G, Muñoz L, Gras N, Llanos M. Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. Biometals 2005;18: 233-41.

108. Sorkun HC, Bir F, Akbulut M i sur. The effects of air pollution and smoking on placental cadmium, zinc concentration and metallothionein expression. *Toxicology* 2007;238:15-22.
109. Florescu A, Ferrence R, Einarson R, Selby P i sur. Reference values for hair cotinine as a biomarker of active and passive smoking in women o reproductive age, pregnant women, children, and neonates: Systematic review and meta-analysis. *Ther Drug Monit* 2007; 29:437-46.
110. Gourlain H, Galliot-Guilley M. [What diagnostic tools can be used to assess antenatal exposure to smoking? Toxicologist experience; na francuskom]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2005; 34(Spec No 1): 3S255-64.
111. Nishijo M, Nakagawa H, Honda R, Tanebe K, Saito S, Teranishi H, Tawara K. Effects of maternal exposure to cadmium on pregnancy outcome and breast milk. *Occup Environ Med* 2002; 59:394-7.
112. Llanos MN, Ronco AM. Fetal growth restriction is related to placental levels of cadmium, lead and arsenic but not with antioxidant activities. *Reprod Toxicol* 2009; 27: 88-92.
113. Tian LL, Zhao YC, Wang XC i sur. Effects of gestational cadmium exposure on pregnancy outcome and development in the offspring at age 4.5 years. *Biol Trace Elem Res* in press. 2009;132:51-9.
114. Fréry N, Nessmann C, Girard F i sur. Environmental exposure to cadmium and human birthweight. *Toxicology* 1993;79:109-18.
115. Falcon, M., Vinas P, Luna A. Placental lead and outcome of pregnancy. *Toxicology* 2003; 185:59-66.
116. Ahamed M, Kumar Mehrotra P, Kumar P, Siddiqui MKJ. Placental lead-induced oxidative stress and preterm delivery. *Environ Toxicol Pharmacol* 2009; 27: 70-4.
117. Lafond J, Hamel A, Takser L, Vaillancourt C, Mergler D. Low environmental contamination by lead in pregnant women: Effect on calcium transfer in human placental syncytiotrophoblasts. *J Toxicol Environ Health A* 2004; 67:1069-79.

118. Brown HL, Miller JM Jr, Khawli O, Gabert HA. Premature placental calcification in maternal cigarette smokers. *Obstet Gynecol* 1988; 71(6 Pt 1): 914-7.
119. Szymanowski K, Chmaj-Wierzchowska K, Florek E, Opala T. 2007. [Do calcification of placenta reveal only maternal cigarette smoking?; na poljskom]. *Przegl Lek* 64(10): 879-881.
120. Klesges LM, Murray DM, Brown JE, Cliver SP, Goldenberg RL. Relations of cigarette smoking and dietary antioxidants with placental calcification. *Am J Epidemiol* 1998;147: 127-35.
121. Cai L, Liu Q, Cherian MG. Metallothionein and intracellular sequestration of metals. *Comprehensive Toxicology* 2010;4: 501-17.
122. Torreblanca A, Del Ramo J, Sarkar B. Cadmium effect on zinc metabolism in human trophoblast cells: involvement of cadmium-induced metallothionein. *Toxicology* 1992; 72: 167-74.
123. Henson MC, Anderson MB. The effects of cadmium on placental endocrine function. U: Pandalai SG, ur. *Recent Research Developments in Endocrinology*. Vol. 1. India: Transworld Research Network; 2000, str. 37-47.
124. Jolibois LS, Shi W, George WJ, Henson MC, Anderson MB. Cadmium accumulation and effects on progesterone release by cultured human trophoblast cells. *Reprod Toxicol* 1999; 13:215-21.
125. Jolibois LS, Swan KF, Anderson MB, Henson MC. Effects of cadmium on trophoblastic development and expression of low density lipoprotein receptor transcripts in cultured human trophoblast cells. *Reprod Toxicol* 1999;13:473-80.
126. Nagata, C, Nagao Y, Shibuya C, Kashiki Y, Shimizu H. Urinary cadmium and serum levels of estrogens and androgens in postmenopausal Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 2005;14:705-8.
127. Pillai A, Gupta S. Effect of gestational and lactational exposure to lead and/or cadmium on reproductive performance and hepatic oestradiol metabolizing enzymes. *Toxicol Lett* 2005;155:179-86.

128. Byrne C, Divekar SD, Storchan GB, Parodi DA, Martin MB. Cadmium- A metallohormone? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 238:266-71.
129. Martin BM, Reiter R, Pham T i sur. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 2003;144:2425-36.
130. Zang Y, Odwin-DaCosta S, Yager JD. Effects of cadmium on estrogen receptor mediated signalling and estrogen induced DNA synthesis in T47D human breast cancer cells. *Toxicol Lett* 2009;184:134-8.
131. Johnson MD, Kenney N, Stoica A i sur. Cadmium mimics the *in vivo* effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* 2003;9:1081-4.
132. Valbonesi P, Ricci L, Franzellitti S, Biondi C, Fabbri E. Effects of cadmium on MAPK signalling pathways and HSP70 expression in a human trophoblast cell line. *Placenta* 2008;29: 725-33.
133. Piasek M, Gomzi M. Pasivno pušenje i djeca: procjena izloženosti i zdravstvene posljedice. *Liječ vjesn* 2004; 126:325-30.
134. Pizent A, Jurasović J, Telišman S. Blood pressure in relation to dietary calcium intake, alcohol consumption, blood lead, and blood cadmium in female nonsmokers. *J Trace Elem Med Biol* 2001;15:123-30.
135. Wang C, Huang L, Zhou Xin, Xu G, Shi Q. Blood lead levels of both mothers and their newborn infants in the middle part of China. *Int J Hyg Environ Health* 2004; 207: 431-6.
136. Naicker N, Norris SA, Mathee A, Schirnding Y, Richer L. Prenatal and adolescent blood lead levels in South Africa: Child, maternal and household risk factors in the birth to twenty cohort. *Environ Res* 2010; 110: 355-62.
137. Szyszko M, Czamowski W. Smoking influence on cadmium, lead, selenium and zink level in placenta, cord blood and maternal blood of women at delivery from Gdansk region. *Przegl Lek* 2006; 63 :993-7.
138. Al Saleh I, Shinwari N, Mashhour A, Gamal El Din M, Rabah A. Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. *Int J Hyg Environ Health* 2011; 214: 79-101.
139. Mijal RS, Holzman CB. Blood cadmium levels in women of childbearing age vary by race/ethnicity. 2010; 110: 505-12.

140. Rossner P Jr, Milcova A, Libalova H i sur. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. *Mutat Res* 2009; 669: 20-6.
141. Bachelet M, Pinot F, Polla RI i sur. Toxicity of cadmium in tobacco smoke: protection by antioxidants and chelating resins. *Free Radic Res* 2002; 36: 99-106.
142. Lazarus M. Međudjelovanje kadmija i selenija u sisavaca. *Arh Hig Rada Toksikol* 2010; 61: 357-69.
143. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; 356: 233-41.
144. Lapenna D, Mezzetti A, de Gioia S, Pierdomenico SD, Daniele F, Cuccurullo F. Plasma copper and lipid peroxidation in cigarette smokers. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 849-52.
145. Strinić T, Buković D, Sumilin L, Radic A, Hauptman D, Klobučar A Socio-demographic characteristics and lifestyle habits of pregnant women smokers. *Coll Antropol* 2005; 29: 611-4.
146. Physiology of pregnancy. U: *The Merck Manual for Healthcare Professionals*. The Merck Manuals Online Medical Library 2007, <http://www.merck.com/mmpe/sec18/ch260/ch260b.html>.
147. Davidson PW, Strain JJ, Myers GJ i sur. Neurodevelopmental effects of maternal nutritional status and exposure to methylmercury from eating fish during pregnancy. *Neurotoxicology* 2008; 29:767-75.
148. Cernichiari E, Myers GJ, Ballatori N, Zareba G, Vyas J, Clarkson T. The biological monitoring of prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology* 2007; 28:1015-22.
149. Rice D, Barone SJr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*. 2000; 108 Suppl3: 511-33.
150. Bridges CC, Zalups RK. Transport of inorganic and methylmercury in target tissues and organs. *J Toxicol Environ Health B*. 2010;13: 385-410.

151. Raymond LJ, Ralston NVC. Mercury: selenium interactions and health implications. *Seychelles Medical and Dental Journal* 2004; 7(Special Issue 1), 72-7.
152. Chen C, Yu H, Zhao J i sur. The roles of serum selenium and selenoproteins on mercury toxicity in environmental and occupational exposure. *Environ Health Perspect* 2006;144:297-301
153. Fredriksson A, Gardlund AT, Bergman K, Oskarsson A, Ohlin B, Danielsson B, Archer T. Effects of maternal dietary supplementation with selenite on the postnatal development of rat offspring exposed to methyl mercury *in utero*. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72: 377-82.
154. Wahba ZZ, Coogan TP, Rhodes SW, Waalkes MP. Protective effects of selenium on cadmium toxicity in rats: role of altered toxicokinetics and metallothionein. *J Toxicol Environ Health* 1993; 38: 171-82.
155. Jamba L, Nehru B, Bansal MP. Effect of selenium supplementation on the influence of cadmium on glutathione and glutathione peroxidase system in mouse liver. *J Trace Elem Exp Med* 2000; 13: 299-304.
156. Chen RW, Whanger PD, Weswig PH. Selenium – induced redistribution of cadmium binding to tissue proteins: a possible mechanism of protection against cadmium toxicity. *Bioinorg Chem* 1975; 4: 125-33.
157. Rana SVS, Verma S. Protective effects of GSH, vitamin E, and selenium on lipid peroxidation in cadmium-fed rats. *Biol Trace Elem Res* 1996; 51: 161-8.
158. Gambhir J, Nath R. Effect of cadmium on tissue glutathione and glutathione peroxidase in rats: influence of selenium supplementation. *Indian J Exp Biol* 1992; 30; 597-601.
159. Jureša D, Blanuša M. Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic Sea. *Food Addit Contam* 2003; 20: 241-6.
160. Kantola M, Purkunen R, Kröger P i sur. Selenium in pregnancy: is selenium an active defective ion against environmental chemical stress? *Environ Res* 2004; 96: 51-61.

10. Životopis

Rođena sam 1962. godine u Splitu. Godine 1981. završila sam Matematičko-informatički obrazovni centar u Zagrebu. Iste godine upisala sam se na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem sam diplomirala 1987. godine.

Tijekom 1987./88. obavljala sam pripravnički staž u Domu zdravlja Medveščak u Zagrebu. Godine 1988. položila sam državni ispit i zaposlila se kao znanstveni novak na projektu prof. dr. sc. Zvonimira Singera u Odsjeku za citologija i kliničku genetiku, Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu. Uključila sam se u prospektivnu studiju započetu 1981. godine, iz koje su nastali radovi o uzrocima i učestalosti habitualnih pobačaja i njihovoj povezanosti s poremećajima u gametogenezi. Postdiplomski studij iz kliničke citologije upisala sam 1990. i započela specijalizaciju iz ginekologije i porodiljstva. Specijalistički ispit sam položila 1994.

Magistarski rad pod naslovom «Usporedba citologije, kolposkopije i točkaste hibridizacije u dijagnozi infekcije vrata maternice humanim papiloma virusom» obranila sam na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 1997. U razdoblju 2001.-2006. bila sam istraživač na projektu «Istraživanje uzroka, prevencija i liječenje infertiliteta» (br. u MZT/MZOŠ 0044008, voditelj Srećko Ciglar). Pohađala sam više stručnih tečajeva. Subspecijalizaciju iz fetalne medicine i opstetricije položila sam 2008. godine.

Od 2007. istraživač sam na dva nacionalna znanstvenoistraživačka projekta, «Rana neinvazivna dijagnostika nasljednih bolesti i fetalnih nakaznosti» (br. u MZOŠ 044-0000000-0395, voditelj Mario Podobnik) te «Izloženost metalima i njihovi učinci u graviditetu i postnatalnom razdoblju» (br. u MZOŠ 022-0222148-2135, voditeljica Martina Piasek). U okviru potonjeg projekta izrađena je ova disertacija. Prvi sam autor znanstvenog rada indeksiranog u *Current Contents* i suautor više sažetaka kongresnih priopćenja na domaćim i međunarodnim stručnim i znanstvenim kongresima.

Sandra Stasenko