

Utjecaj polimorfizma metalotioneina 2A i izloženosti cigaretnomu dimu na razinu toksičnih i esencijalnih metala u rodilja te na koncentraciju steroidnih hormona u posteljici

Sekovanić, Ankica

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:957170>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

ANKICA SEKOVANIĆ

**UTJECAJ POLIMORFIZMA
METALOTIONEINA 2A I IZLOŽENOSTI
CIGARETNOMU DIMU NA RAZINU
TOKSIČNIH I ESENCIJALNIH METALA
U RODILJA TE NA KONCENTRACIJU
STEROIDNIH HORMONA U POSTELJICI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

ANKICA SEKOVANIĆ

**THE EFFECTS OF METALLOTHIONEIN
2A GENE POLYMORPHISM AND
EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE ON
LEVELS OF TOXIC AND ESSENTIAL
METALS AT CHILDBIRTH AND STEROID
HORMONES CONCENTRATIONS
IN THE PLACENTA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

ANKICA SEKOVANIĆ

**UTJECAJ POLIMORFIZMA
METALOTIONEINA 2A I IZLOŽENOSTI
CIGARETNOMU DIMU NA RAZINU
TOKSIČNIH I ESENCIJALNIH METALA
U RODILJA TE NA KONCENTRACIJU
STEROIDNIH HORMONA U POSTELJICI**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Jasna Jurasović, znan. savj. u trajnom zvanju
dr. sc. Tihana Žanić Grubišić, red. prof. u trajnom zvanju

Zagreb, 2018.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

ANKICA SEKOVANIĆ

**THE EFFECTS OF METALLOTHIONEIN
2A GENE POLYMORPHISM AND
EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE ON
LEVELS OF TOXIC AND ESSENTIAL
METALS AT CHILDBIRTH AND STEROID
HORMONES CONCENTRATIONS
IN THE PLACENTA**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Jasna Jurasović, Ph.D., Scientific Advisor
Tihana Žanić Grubišić, Ph.D., Full Professor

Zagreb, 2018

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicina i zdravstvo, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Doktorski rad izrađen je u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, a obavljena istraživanja započela su unutar znanstvenoistraživačkog projekta Ministarstva znanosti obrazovanja i športa (MZOS) „Izloženost metalima i njihovi učinci u graviditetu i postnatalnom razdoblju“ (br. 022-0222148-2135, voditelj projekta dr. sc. Martina Piasek, dr. med., znan. savj. u trajnom zvanju).

Mentorice doktorskoga rada su dr. sc. Jasna Jurasović, dipl. ing. kem., znan. savj. u trajnom zvanju iz Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu i dr. sc. Tihana Žanić Grubišić, dipl. ing. med. biokem., red. prof. u trajnom zvanju sa Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

SAŽETAK

Metalotioneini (MT) su niskomolekulski unutarstanični proteini bogati aminokiselinom cisteinom i tiolnim (–SH) skupinama koje imaju svojstvo vezanja iona metala. Fiziološka uloga MT-a u održavanju homeostaze uključuju vezanje i prijenos esencijalnih elemenata, naročito Zn i Cu. Sintezu MT-a u organima sisavaca, u najvećoj mjeri, potiču ti esencijalni elementi, oksidacijski stres, kao i toksični metali Cd, Pb i Hg koji su strani organizmu (ksenobiotici). Postoje četiri skupine izoformi MT-a s različitim biološkim ulogama i razdiobi u tkivima, a najčešća je MT2, koja se nalazi posvuda u tijelu uključujući jetru, bubrege i posteljicu. Polimorfizam gena *MT2A* rs28366003 povezuje se sa smanjenjem transkripcije i sinteze MT2 te utjecajem na duljinu života, razvoj zloćudnih bolesti i koncentracije metala u tijelu kojima je osoba svakodnevno izložena iz okoliša. Do sada nije istraživana zajednički utjecaj polimorfizma *MT2A* majke i izloženosti raznim metalima i polumetalima na zdravlje žene reproduktivne dobi i njezinog potomstva. Cilj ovoga rada bio je istražiti utjecaj polimorfizma *MT2A* rs28366003 na koncentracije glavnih toksičnih (Cd, Pb i Hg) i esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu i Se) u krvi majke i pupkovine, prijenos elemenata kroz posteljicu, čija endokrina funkcija uključuje i stvaranje hormona progesterona (P4) i estradiola (E2) tijekom trudnoće te koncentracije MT2 i slobodnih –SH skupina u serumu majke. Uzeti su u obzir najvažniji izvori izloženosti toksičnim metalima, pušenje cigareta (za Cd i Pb) i unos morske hrane/ ribe (za Hg) te su uspoređena geografska područja prebivališta ispitanica, priobalno područje s pretežitom mediteranskom prehranom bogatom ribom s područjem u kontinentalnoj Hrvatskoj. Hipoteza istraživanja bila je da polimorfizam *MT2A* rs28366003 buduće majke može utjecati na ekspresiju MT2 i posljedično na koncentracije metala u majčinom organizmu u povezanosti s navikom pušenja (Cd, Pb) i konzumiranja ribe (metil-Hg) kao glavnim izvorima izloženosti iz okoliša i tako pridonijeti mogućim štetnim učincima metala na zdravlje majke i potomka.

Metode istraživanja uključivale su analize bioloških uzoraka skupljenih nakon porođaja zdravih roditelja (srednje dobi 29 godina) s ročnim rodničkim porođajem u rodilištima iz kontinentalnog (n = 196 ispitanica) i priobalnog (n = 96 ispitanica) područja prebivanja. Određivani su sljedeći pokazatelji: koncentracije toksičnih i esencijalnih elemenata (metodom ICP-MS) u uzorcima krvi majke i pupkovine te u posteljici; koncentracija MT2 u serumu majke (imunokemijski metodom ELISA); koncentracije steroidnih hormona P4 i E2 u posteljici (imunokemijski metodom IEMA); koncentracija slobodnih –SH skupina u serumu

majke (spektrofotometrijskom metodom); te polimorfizam jednog nukleotida *MT2A* rs28366003; c.-77A>G (metodom PCR-RFLP).

Rezultati su pokazali da su u pušačica u odnosu na nepušačice bile povećane koncentracije Cd i Pb u krvi majke, krvi pupkovine i posteljici, Fe i Cu u krvi pupkovine te Zn u posteljici, smanjene koncentracije Se u krvi i slobodnih –SH skupina u uzorcima seruma majke. Također je nađeno povećanje MT2 u serumu srazmjerno intenzitetu pušenja majke. Nisu nađene promjene u koncentracijama progesterona i estradiola u posteljici s obzirom na naviku pušenja. Osobe u priobalnom području imale su veći unos hrane morskoga podrijetla, ponajprije ribe, i u svim mjerenim biološkim uzorcima nađene su povećane koncentracije Hg i Se srazmjerne učestalosti unosa ribe. U ispitanica iz priobalnog u odnosu na kontinentalno područje također su nađene veće koncentracije Fe u krvi pupkovine, Zn u posteljici te Cd i Cu u krvi majke i posteljici. U nepušačica s AG/GG u odnosu na genotip AA bile su značajno smanjene koncentracija Fe u posteljici, a nije nađen utjecaj polimorfizma *MT2A* rs28366003 na koncentracije Cd, Pb i Hg u majčinoj krvi.

Ovaj rad sadrži rezultate koji mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja utjecaja polimorfizma *MT2A* na koncentracije toksičnih i esencijalnih metala i opasnosti na zdravlje žena tijekom reproduktivnog razdoblja i njihovo potomstvo u uvjetima svakodnevne izloženosti. Za konačne zaključke bilo bi potrebno provesti daljnja istraživanja na većem broju ispitanika i reprezentativnim uzorcima opće populacije u Hrvatskoj uzimajući istodobno u obzir i glavne izvore unosa metala.

Ključne riječi: genski polimorfizam *MT2A*, metalotionein, toksični i esencijalni elementi, pušenje cigareta, unos hrane morskoga podrijetla/ ribe, prijenos elemenata kroz posteljicu, steroidni hormoni tijekom trudnoće

SUMMARY

Metallothioneins (MT) are low molecular weight intracellular proteins rich in cysteine and thiol (–SH) groups with the capacity to bind metal ions. The physiological roles of MT in maintaining homeostasis include the binding and transfer of essential elements, especially Zn and Cu. In mammalian organs, MT synthesis can be induced by these essential elements, oxidative stress, and xenobiotic toxic metals Cd, Pb and Hg. There are four groups of MT isoforms, which differ by biological role and tissue distribution, among which MT2 is the most ubiquitous and present in the liver, kidney and placenta. It was shown that the polymorphism of *MT2A* rs28366003 is associated with the decrease of transcription and synthesis of MT2, longevity, and cancer development, as well as with the levels of metals in the body to which a person has been exposed through everyday environmental exposure. No research data exist so far on the combined impact of maternal polymorphism of *MT2A* gene and everyday exposure to metals and metalloids on the health of women in reproductive age and the related health risk for their offspring. The aim of this study was to investigate the influence of *MT2A* rs28366003 gene polymorphism on the concentrations of the main toxic (Cd, Pb and Hg) and essential (Fe, Zn, Cu and Se) elements in maternal and cord blood, on the element transfer through the placenta in which progesterone and estradiol are produced during pregnancy, and on the concentrations of MT2 and free –SH groups in maternal serum. The main sources of the toxic metal exposure considered in this investigation were cigarette smoking (for Cd and Pb) and seafood/fish consumption (for Hg). We also compared the geographical areas of the study participants' residence; the coastal area with a traditional Mediterranean diet rich in fish and continental Croatia. The research hypothesis was that a polymorphism of the *MT2A* gene in an expectant mother may influence MT expression and consequently may have an effect on metal concentration in the maternal organism in connection with smoking (Cd, Pb) and fish consumption (methyl-Hg) as the main sources of environmental exposure and thus it may contribute to potential adverse effects of metals on the health of the mother and her offspring.

The methods used in this study included analyses of biological samples collected after childbirth in healthy postpartum women (mean age 29 years) with vaginal term deliveries at a maternity ward in continental (n = 196) and coastal (n = 96) residential area. The parameters determined were: concentrations of toxic and essential elements (by ICP-MS) in maternal and cord blood and placenta; concentration of MT2 in maternal serum (by ELISA); concentrations of P4 and E2 in placenta (by IEMA); concentrations of free –SH groups in maternal serum

(by spectrophotometry); single nucleotide polymorphism (SNP) *MT2A* rs28366003, c.-77A>G (by PCR-RFLP).

The results showed that smokers vs. non-smokers had higher concentrations of Cd and Pb in maternal blood, cord blood and placenta, Fe and Cu in cord blood, and Zn in placenta, lower Se in blood and concentrations of free –SH groups in serum. An increase of *MT2A* maternal serum concentrations with smoking intensity was found. No changes were found in concentrations of progesterone and estradiol in the placenta. With regard to the geographic area of residence, the subjects in the coastal area had a higher intake of seafood, primarily fish; increased Hg and Se concentrations related to frequency of fish intake were found in all of the measured biological samples. Subjects from the coastal area were found to have higher concentrations of Fe in cord blood, Zn in placenta, and Cd and Cu in maternal blood and placenta. Non-smoking persons with AG/GG vs. AA genotype had lower concentrations of Fe in placenta, whereas no impact of the gene *MT2A* rs28366003 polymorphism was found on concentrations of Cd, Pb and Hg in maternal blood.

This work contains results that may serve as a base for future studies on the impact of single nucleotide polymorphism *MT2A* on toxic and essential element concentrations and health risks of women during reproductive age and their offsprings under condition of daily exposure. For final conclusions further studies would be required to carry out wide-ranging research on a large number of subjects and representative samples of the general Croatian population considering the main sources of metals intake.

Keywords: gene polymorphism *MT2A*, methallotionein, toxic and essential elements, cigarette smoking, seafood/ fish intake, placental element transfer, steroid hormones during pregnancy

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Metalotioneini	4
1.1.1 Struktura, sinteza i uloga metalotioneina u ljudi	4
1.1.2 Polimorfizam metalotioneina 2A (<i>MT2A</i>)	9
1.2 Toksični i esencijalni elementi	13
1.2.1 Izloženost toksičnim metalima i njihovi štetni učinci na reprodukciju i potomstvo.....	13
1.2.2 Esencijalni elementi u žena reprodukcijske dobi.....	16
1.2.3 Glavni toksični metali i njihova međudjelovanja s esencijalnim elementima	19
1.2.3.1 Kadmij i esencijalni elementi	19
1.2.3.2 Olovo i esencijalni elementi	20
1.2.3.3 Živa i esencijalni elementi.....	22
1.3 Procjena izloženosti metalima u žena reprodukcijske dobi.....	23
1.3.1 Uloga posteljice i njezina važnost u procjeni stanja elemenata tijekom trudnoće.....	24
2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	27
2.1 Ciljevi istraživanja.....	27
2.2 Hipoteza istraživanja	27
3. MATERIJALI I METODE	28
3.1 Ispitanice	28
3.1.1 Prikupljanje podataka o ispitanicama	28
3.1.2 Poštivanje etičkih načela tijekom istraživanja u ljudi.....	28
3.2 Plan istraživanja	29
3.3 Prikupljanje bioloških uzoraka nakon porođaja	30
3.3.1 Uzorkovanje krvi/ seruma majke i pupkovine	30
3.3.2 Prikupljanje posteljica i uzorkovanje posteljičnog tkiva za analize elemenata i steroidnih hormona.....	30
3.4 Metode.....	32
3.4.1 Analiza esencijalnih i toksičnih metala metodom ICP-MS	32
3.4.1.1 Popis kemikalija i opreme	32
3.4.1.2 Postupak pranja laboratorijskog posuđa za analizu elemenata.....	34
3.4.1.3 Priprema bioloških uzoraka za analizu metala metodom ICP-MS.....	34
3.4.1.4 Priprema standardnih otopina.....	35
3.4.1.5 Optimiranje uvjeta rada na ICP-MS	37
3.4.1.6 Validiranje ICP-MS metode	38
3.4.2. Genotipizacija polimorfizma <i>MT2A</i> rs28366003.....	42
3.4.2.1 Popis kemikalija i opreme	42
3.4.2.2 Postupak izolacije i umnožavanja DNA.....	42

3.4.2.3 Postupak genotipizacije polimorfizma MT2A rs28366003 RFLP metodom.....	44
3.4.3 Analiza steroidnih hormona u posteljici	45
3.4.3.1 Popis kemikalija i opreme	45
3.4.3.2 Priprema uzoraka posteljica za analizu steroidnih hormona	45
3.4.3.3 Postupak analize steroidnih hormona	45
3.4.4 Analiza proteina metalotioneina 2 (MT2) u serumu	46
3.4.4.1 Popis kemikalija i opreme	46
3.4.4.2 Postupak analize metalotioneina 2 (MT2).....	46
3.4.5 Analiza ukupnih tiolnih (–SH) skupina u serumu.....	47
3.4.5.1 Popis kemikalija i opreme	47
3.4.5.2 Postupak analize ukupnih tiolnih (–SH) skupina	47
3.4.6 Statistička obrada podataka	48
4. REZULTATI.....	50
4.1 Opće značajke ispitanica i novorođenčadi s obzirom na naviku pušenja i geografsko područje prebivanja parova majka–novorođenče.....	50
4.2 Opće značajke ispitanica s obzirom na učestalost unosa hrane morskoga podrijetla i broj amalgamskih zubnih ispuna majke	53
4.3 Toksični i esencijalni elementi u majki i novorođenčadi s obzirom na naviku pušenja i geografsko područje prebivanja majke	54
4.3.1 Toksični metali Cd i Pb u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine	54
4.3.1.1 Korelacije koncentracija Cd i Pb između ispitivanih bioloških matrica.....	56
4.3.2 Esencijalni elementi Fe, Zn, Cu i Se u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine.....	59
4.3.2.1 Korelacije koncentracija esencijalnih elemenata Fe, Zn, Cu i Se između ispitivanih bioloških matrica	62
4.3.3 Omjer esencijalnih elementa i Cd u posteljici s obzirom na naviku pušenja majke	63
4.4 Hg i Se u majki i novorođenčadi s obzirom na unos hrane morskog podrijetla i amalgamske zubne ispune majke	64
4.4.1 Hg i Se u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine: utjecaj hrane morskoga podrijetla.....	64
4.4.1.1 Korelacije koncentracija Hg između ispitivanih bioloških matrica.....	67
4.4.2 Hg u serumu majke i pupkovine s obzirom na amalgamske zubne ispune u majke: koncentracija u serumu kao biljeg izloženosti Hg ⁰	68
4.4.3 Međudjelovanje Hg i Se s obzirom na dob majke i izvore izloženosti.....	69
4.5 Koncentracija MT2 i slobodnih tiolnih (–SH) skupina u serumu roditelja	71
4.6 Koncentracija steroidnih hormona (P4 i E2) u posteljici: pušačice vs. nepušačice.....	71
4.7 Polimorfizam <i>MT2A</i> rs228366003 (c.-77A>G) u ispitanica	72
4.7.1. Učestalost <i>MT2A</i> rs228366003 u ispitanica.....	72
4.7.2. <i>MT2A</i> rs228366003 (c.-77A>G) te toksični i esencijalni elementi u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine s obzirom na naviku pušenja majke.....	72
4.7.3 <i>MT2A</i> rs228366003 (c.-77A>G) i MT2 u serumu ispitanica s obzirom na naviku pušenja ..	76

4.8 Procjena utjecaja <i>MT2A</i> rs228366003 (c.-77A>G) na koncentracije metala i MT2: rezultati postupne višestruke linearne regresijske analize.....	77
4.9 Procjena utjecaja <i>MT2A</i> rs228366003 (c.-77A>G) i koncentracije metala na porođajnu masu i duljinu.....	84
5. RASPRAVA.....	85
5.1 Izloženost cigaretnom dimu: utjecaj na koncentracije toksičnih i esencijalnih elemenata i steroidnih hormona.....	86
5.2 Unos hrane morskoga podrijetla, geografsko područje prebivanja i amalgamske ispune: utjecaj na koncentracije Hg i Se.....	95
5.3 Polimorfizam <i>MT2A</i> rs28366003: utjecaj na koncentracije toksičnih i esencijalnih elemenata, MT2 i slobodne –SH skupine.....	98
5.4 Parametri novorođenčadi s obzirom na pušenje, prehrambene navike i polimorfizam <i>MT2A</i> rs28366003.....	100
6. ZAKLJUČCI.....	102
7. POPIS KRATICA.....	103
8. LITERATURA.....	105
9. ŽIVOTOPIS.....	126
10. PRILOZI.....	128
Prilog 1.....	128
Prilog 2.....	138

1. UVOD

Ljudi su svakodnevno izloženi metalima i polumetalima iz zraka, vode i hrane. Najčešći izvor izloženosti u općoj populaciji je hrana. Hranom se u ljudski organizam unose potrebni esencijalni makro- i mikroelementi kao što su kalcij (Ca), natrij (Na), magnezij (Mg), željezo (Fe), cink (Zn), bakar (Cu) i selen (Se) koji su nužni za normalno odvijanje svih fizioloških funkcija i biokemijskih procesa, ali i toksični metali i polumetali, za koje nisu dokazane biološke uloge u organizmu, a imaju brojne moguće štetne, toksične učinke (Nordberg i sur., 2015; Piasek i Mikolić, 2009). Tri najvažnija toksična metala s obzirom na njihovu visoku toksičnost, rasprostranjenost u okolišu i biorasploživost jesu kadmij (Cd), olovo (Pb) i živa (Hg) (Nordberg i sur., 2015; Zalups i Koropatnik, 2000). Biorasploživost pojedinog elementa u ljudskom organizmu ovisi o sljedećim čimbenicima: kemijski oblik i oksidacijsko stanje elementa, put izloženosti (unos na usta ili udisanjem, a zanemarivo malo i kroz kožu), međudjelovanje (interakcija) s drugim elementima, spol, dob, prehrana, posebna fiziološka stanja (trudnoća ili laktacija), razna patofiziološka stanja (bolesti) i genski čimbenici (polimorfizam gena).

Želučanocrijevna apsorpcija za svaki element je različita, za toksične metale Cd i Pb u odraslih osoba iznosi od nekoliko postotaka do najviše 10 %, a tijekom trudnoće i laktacije je za sve elemente povećana dvostruko, trostruko ili više (Nordberg i sur., 2015; EFSA, 2015, 2014, 2012a, 2012b, 2012c). Za metil-Hg želučanocrijevna apsorpcija iz hrane je vrlo visoka i iznosi 90 - 100 % (Nordberg i sur., 2015; EFSA, 2015, 2014). Za opću populaciju najvažniji izvor izloženosti Hg je hrana morskoga podrijetla (uglavnom ribe), a Cd i Pb pušenje cigareta, što se smatra i njihovim najopasnijim izvorom izloženosti, jer se udisanjem duhanskog dima u organizam unosi višestruko (10 - 20 puta više) Cd odnosno Pb u odnosu na njihovu stopu apsorpciju u crijevu (Nordberg i sur., 2015; Piasek i sur., 2011). Prema zadnje dostupnim podacima Eurostata, 19,2 % stanovništva u EU u dobi od 15 i više godina puši cigarete, dok 4,7 % puši povremeno (Eurostat, 2016). Prema tom istraživanju provedenom tijekom 2014. godine, Hrvatska spada u sam vrh s preko 25 % stanovnika koji su aktivni pušači. Duhanski dim smjesa je mnogobrojnih toksičnih i kancerogenih supstancija. Smatra se da aldehidi i male organske molekule pridonose najviše (u preko 60 % slučajeva) riziku razvoja raka, a metali manje (u oko 18 % slučajeva) (Fowles i Dybing, 2003). U duhanski dim zapaljene cigarete dopijeva više od 30 različitih iona metala, među kojima su najzastupljeniji Cd, Pb, arsen (As), nikal (Ni) i krom (Cr), a u manjim koncentracijama prisutna je i Hg kao i nekoliko radioaktivnih elemenata. Brojna istraživanja pokazala su da pušenje cigareta i udisanje

duhanskog dima pridonosi jednoj trećini ukupne opterećenosti organizma Cd i značajno povisuje koncentraciju Pb u organizmu (Nordberg i sur., 2015; ATSDR, 2012, 2007; WHO, 2010a, b). Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC) Cd je svrstan u skupinu potvrđenih kancerogena (skupina 1), a Pb u moguće kancerogene za ljude (skupina 2) (IARC, 2017; 2012, 2006).

Žene tijekom reproduktivske dobi i njihovi potomci u razdobljima fetalnog života, novorođenačke i dojenačke dobi te malog djeteta, posebno su osjetljive skupine stanovništva, koje imaju povećanu osjetljivost na štetne učinke toksičnih tvari, uključujući toksične metale. U žene su za vrijeme trudnoće i laktacije povećane potrebe i povećan unos hranjivih tvari koje se prenose u plod zbog čega se njihov želučanocrijevni sustav prilagođava za povećanu apsorpciju, čime se unosi više esencijalnih elemenata, a istodobno i istim prijenosnicima i toksičnih elemenata. U djece tijekom razdoblja pojačanog rasta i razvoja nisu sasvim razvijeni, odnosno smanjeni su mehanizmi odstranjivanja štetnih tvari iz organizma (Astbury i sur., 2015; Piasek i sur., 2011; Nishijo i sur., 2004; Vahter i sur., 2002).

Izloženost čovjeka započinje još *in utero* i nastavlja se dalje tijekom cijeloga života. Majčin organizam prvi je okoliš u kojem se njezin potomak razvija i izloženost majke toksičnim metalima može biti povezana s izravnom izloženošću njezinog potomka ili posrednim štetnim učincima takve izloženosti, ovisno u kolikoj mjeri se pojedini toksični element prenosi do ploda. Dosadašnja istraživanja pokazala su da Pb i metil-Hg u najvećoj mjeri prolaze kroz posteljicu i zato mogu štetno utjecati na razvoj fetusa već *in utero*, dok se Cd zadržava u posteljici i samo malim dijelom prolazi u fetus. Međutim, posteljično nakupljanje Cd može također štetno utjecati na rast i razvoj fetusa zbog remećenja prijenosa esencijalnih elemenata (ponajprije Zn) i sintezu hormona uključujući steroidne hormone koji su važni za normalan tijek trudnoće (Esteban-Vasallo i sur., 2012; Piasek i sur., 2011; Stasenko i sur., 2010; Ronco i sur., 2005a; Osman i sur., 2000).

Izloženost toksičnim metalima potiče sintezu metalotioneina (MT) u organizmu. Metalotionein je protein male molekulske mase bogat cisteinom, čija je glavna zadaća održavanje homeostaze i prijenos Zn i Cu u organizmu. Zbog velikog broja tiolnih (-SH) skupina MT ima veliki afinitet vezanja esencijalnih elemenata, ali također toksičnih metala kao što su Cd, Pb i Hg. Smatra se da izloženost metalima iz duhanskog dima, naročito Cd, Pb i Hg, uzrokuje upalne reakcije i protuupalni odgovor u kojemu sudjeluje MT (Milnerowicz i sur., 2015; Nordberg i sur., 2015; Piasek i sur., 2011; Pappas, 2011). Prilikom vezanja na MT toksični metali mogu istisnuti esencijalne elemente, a izloženost tim metalima će poticati povećanu sintezu MT-a s posljedičnim većim nakupljanjem esencijalnih elemenata (Zn, Cu) u

unutarnjim organima. Na taj način esencijalni elementi postaju manje dostupni za odvijanje važnih fizioloških funkcija i biokemijskih procesa u organizmu, a tijekom trudnoće i za prijenos u fetus kojemu su nužni za rast i razvoj (Coyle i sur., 2002; Waalkes i Pérez-Ollé, 2000).

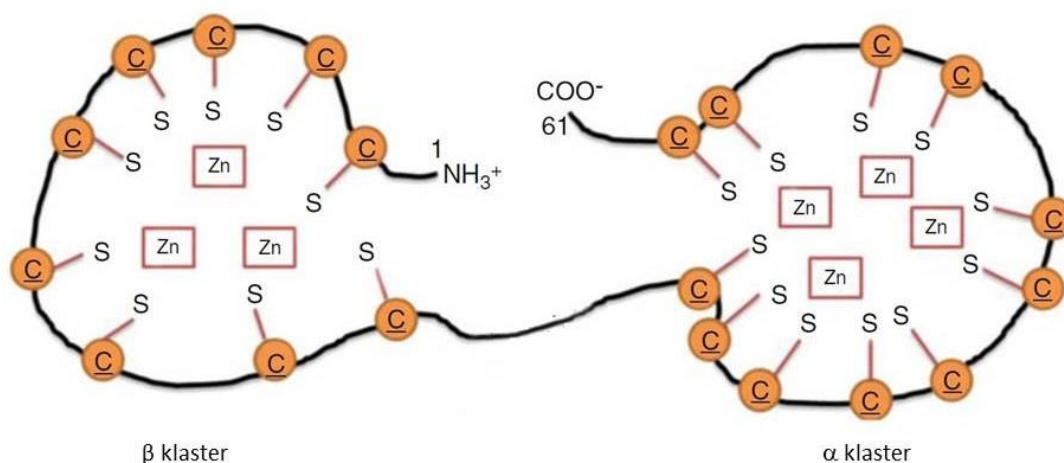
U novije vrijeme sve se više istražuju različiti genski čimbenici, kao što je polimorfizam *MT2A* koji mogu utjecati na fiziološke i patološke procese. Pretpostavlja se da bi polimorfizam gena *MT2A* rs28366003, tj. A/G supstitucija u blizini 5' netranslatirajuće regije (5'UTR), mogao smanjiti transkripciju i sintezu MT te tako utjecati na povećanu osjetljivost pojedinca na toksične učinke metala i/ili razvoj kroničnih i malignih bolesti (Hattori i sur., 2016; Raudenska i sur., 2014; Krzešlak i sur., 2013). Dosadašnja istraživanja o utjecaju polimorfizma *MT2A* rs28366003 na koncentracije toksičnih i esencijalnih elemenata u organizmu su malobrojna i dobiveni rezultati nisu jednoznačni. Nekoliko istraživanja je pokazalo da polimorfizam *MT2A* utječe na koncentracije Cd, Pb i Zn u krvi, posteljici i tkivu prostate (Krzešlak i sur., 2013; Tekin i sur., 2012a, 2012b; Kayaalti i sur., 2011). Međutim, u jednom od najnovijih istraživanju nije nađeno da polimorfizam *MT2A* rs28366003 utječe na koncentracije Cd i Zn u serumu osoba obaju spolova (Hattori i sur., 2016).

1.1 Metalotioneini

Metalotioneini su skupina niskomolekulskih proteina (6-7 kDa) bogatih aminokiselinom cisteinom koji se nalaze u stanicama bakterija, biljaka, beskrležnjaka i kralježnjaka (Ruttkey-Nedecky i sur., 2013; Waalkes i Pérez-Ollé, 2000). Prvi puta je otkriven u kori konjskog bubrega prije 60 godina kao protein koji veže Cd (Margoshes i Vallee, 1957). Od tog otkrića do danas MT je u središtu brojnih istraživanja u područjima toksikologije, molekularne biologije i kancerogeneze. S obzirom da sadrži veliki broj cisteina, MT se u organizmu ponaša kao antioksidans i sudjeluje u brojnim fiziološkim funkcijama, kao što su prijenos i homeostaza esencijalnih elemenata, stanična proliferacija i regeneracija te zaštita organizma od slobodnih radikala i štetnih učinaka tijekom akutnih otrovanja toksičnim metalima (Ruttkey-Nedecky i sur., 2013; Cai i sur., 2010; Coyle i sur., 2002).

1.1.1 Struktura, sinteza i uloga metalotioneina u ljudi

Molekula MT-a sadrži 61 do 68 aminokiselina od čega je 20 cisteina (30 %) koji tvore dvije domene klastera, α klaster s četiri i β klaster s tri vezujuća mjesta za divalentne ione. Dva klastera međusobno su povezana slijedom koji ne sadrži cistein. Na N-terminalnom dijelu molekule MT-a je domena β klastera koja sadrži aminokiseline 1 - 30, a na C-terminalnom dijelu molekule domena α klastera koja sadrži aminokiseline 31 - 68 (slika 1).



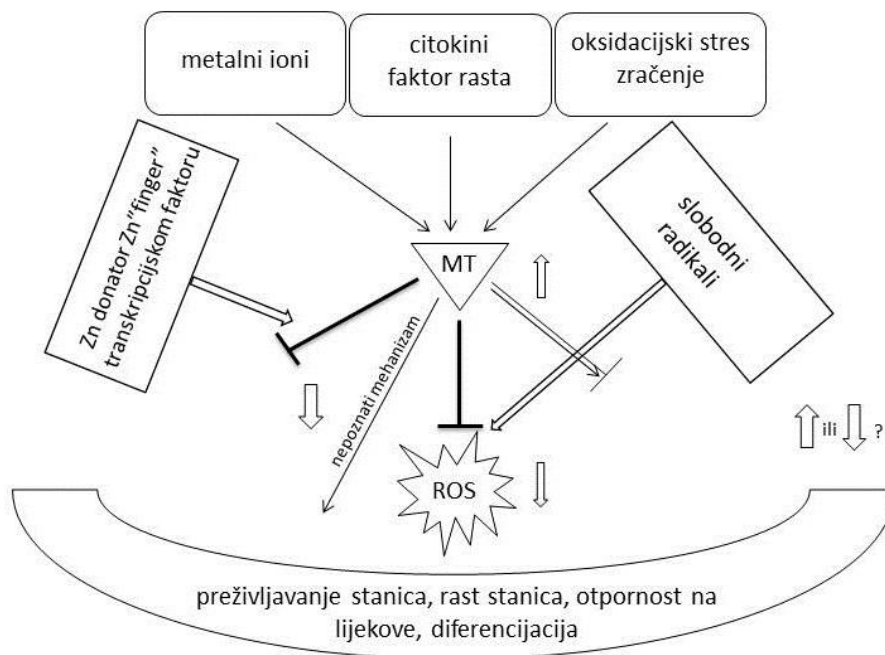
Slika 1. Shematski prikaz veznih mjesta metala u strukturi MT (preuzeto iz Dziegiel i sur., 2016).

Svaka molekula MT-a može vezati sedam molekula dvovalentnih iona, primjerice Zn, Cd, Hg ili Pb. Postoji pravilo o ulasku metala u klastere; nakon što četiri molekule metala uđu u α klaster, preostale tri metalne molekule popunjavaju β klaster. Metali vezani u β klasteru mogu se lakše otpuštati u odnosu na metale vezane u α klasteru te može doći i do premještanja odnosno preraspodjele između dvaju klastera unutar molekule ili između više molekula MT-a, pri čemu metal vezan u jednoj domeni klastera ne utječe na reaktivnost metala u drugoj domeni klastera (Dziegiel i sur., 2016; Ruttkay-Nedecky i sur., 2013; Cai i sur., 2010; Sato i Kondoh, 2002). Protein na koji nisu vezani metalni ion naziva se apo-metalotionein (apo-MT) ili tionein. Metalni ion koji se najčešće veže na apo-MT je Zn, ali i drugi, neesencijalni metali kao što su Cd, Pb, Hg, Cr ili srebro (Ag). Afinitet vezanja za apo-MT je ovim redoslijedom: Zn<Cd<Cu<Hg. S obzirom da je Cd puno jače vezan za MT, Zn se lakše otpušta s MT-a i prenosi unutar organizma (Sabolić i sur., 2010; Sato i Kondoh, 2002).

U sisavaca su poznate četiri skupine izoformi metalotioneina: MT1, MT2, MT3 i MT4. Zastupljenost izoformi MT-a različita je po tkivima: MT1 i MT2 su prisutni u svim mekim tkivima, MT3 se nalazi uglavnom u mozgu, te u manjoj mjeri u srcu, bubregu i spolnim organima, a MT4 se nalazi u stanicama pločastog epitela kože i sluznice. Sintezu MT-a u ljudi kodiraju geni koji se nalaze u skupinama na kromosomu 16 (16q13). Pokazano je da je od 17 gena koji su do sada identificirani, najmanje 11 gena funkcionalano, tj. 8 gena za MT1 izoforme (*MT1A*, *MT1B*, *MT1E*, *MT1F*, *MT1G*, *MT1H*, *MT1M*, *MT1X*) i po jedan gen za ostale izoforme (*MT2A*, *MT3* i *MT4*) (Dziegiel i sur., 2016; Ruttkay-Nedecky i sur., 2013; Cai i sur., 2010; Miles i sur., 2000, Waalkes i Pérez-Ollé, 2000).

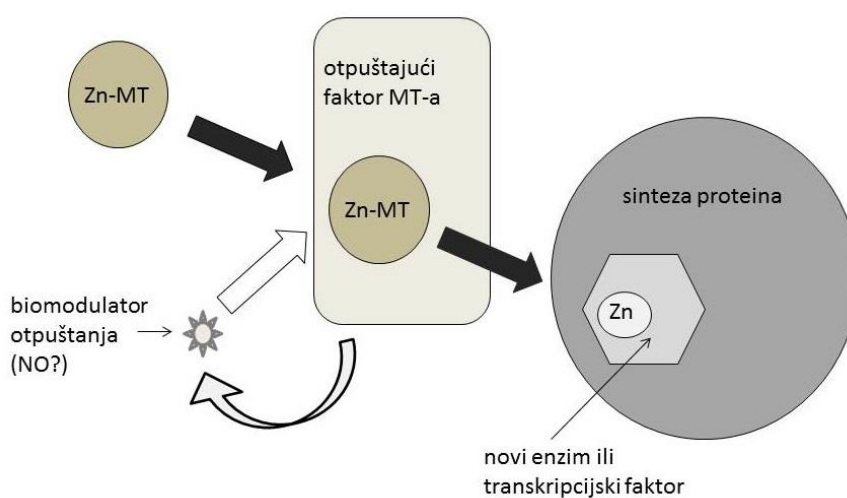
Čimbenici koji induciraju sintezu MT-a su mnogobrojni i uključuju glukokortikoide, endotoksine, zračenje, citokine, oksidacijski stres i toksične metale (slika 2). Među metalima Cd i Zn najviše induciraju sintezu MT-a, zatim Cu, Hg te organometalni spojevi kao što je cisplatina (Cai i sur., 2010; Waalkes i Pérez-Ollé, 2000).

Sinteza različitih izoformi MT-a odvija se mozgu, jetri, bubregu, gušterači, crijevima, slezeni, posteljici, srcu i mišićima. Najviše koncentracije MT-a mogu se naći u stanicama jetre tijekom perinatalnog rasta i razvoja kao i tijekom regeneracije organa jer su tada velike potrebe za Zn. Istraživanja provedena *in vitro* pokazuju reaktivaciju apo-enzima, u kojima su Zn ili Cu kofaktori (alkalna fosfataza, superoksid dismutaza i drugi), nakon što se inkubiraju s kompleksom Zn-MT ili Cu-MT. Može se pretpostaviti da na molekularnoj razini MT ima ulogu donora Zn ili Cu drugim proteinima u stanici. Mehanizam donacije metala apo-enzimima nije poznat, ali se pretpostavlja da mora doći do vezanja MT-a s drugim makromolekulama kako bi MT mogao donirati metal proteinima.



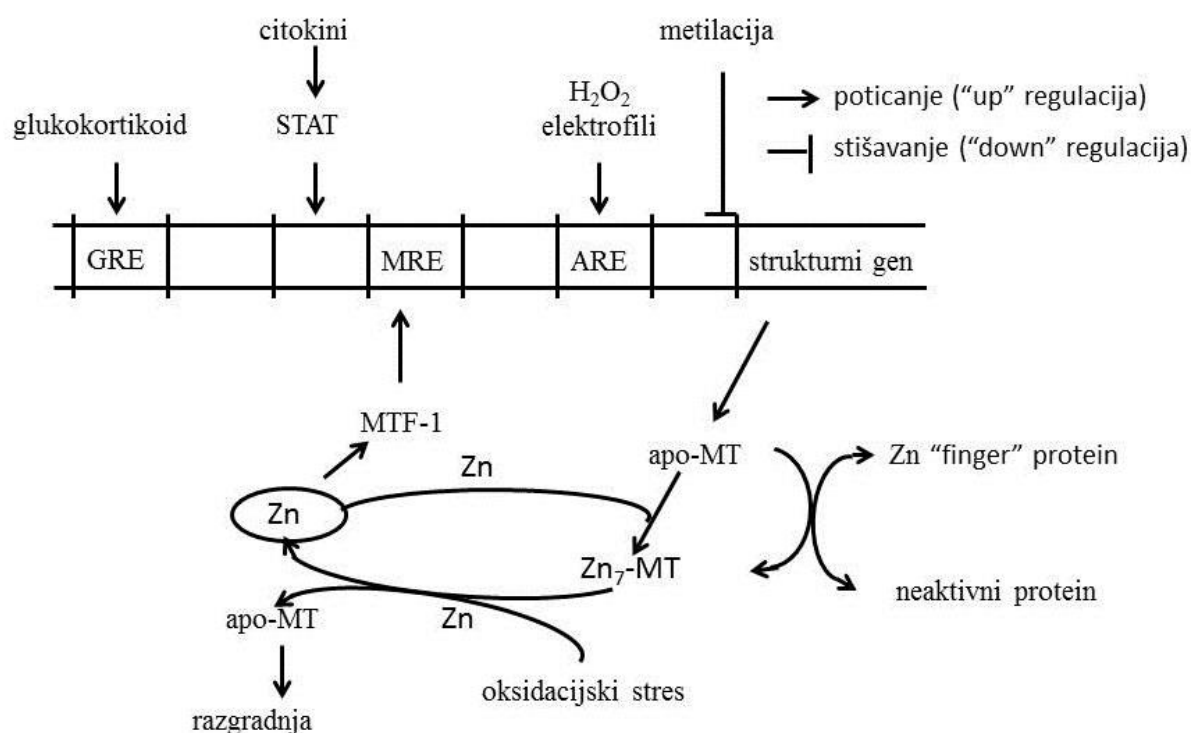
Slika 2. Shematski prikaz indukcije MT-a i utjecaja ekspresije MT-a na zbivanja u stanici (preuzeto iz Ruttkay-Nedecky i sur., 2013).

Na slici 3. prikazano je kako bi se kompleks Zn-MT mogao vezati na hipotetski otpuštajući faktor MT u blizini mjesta gdje se odvija sinteza proteina, pri čemu bi biomodulator otpuštanja dušikov (II) oksid (NO), glutation (GSH), adenzin trifosfat (ATP) i/ili pH mogao zamijeniti Zn u MT-u i učiniti ga raspoloživim enzimu ili transkripcijskom faktoru (Waalkes i Pérez-Ollé, 2000).



Slika 3. Hipotetski mehanizam kontrolirane donacije Zn od strane MT-a proteinima koji sadrže metal kao što su enzimi ili transkripcijski faktor (preuzeto iz Waalkes i Pérez-Ollé, 2000).

Promotorska regija gena MT-a sadrži elemente odgovorne za transkripciju: element odgovora na metale (MRE) koji se aktivira djelovanjem transkripcijskog faktora 1 (MTF-1), element glukokortikoidnog odgovora (GRE), prenosilac signala i aktivator transkripcije (STAT) koji se aktivira djelovanjem citokina i element antoksidacijskog odgovora (ARE) koji se aktivira kao odgovor na redukcijsko-oksidacijsko stanje. Najviše istraživani mehanizam transkripcije MT-a je putem MRE (Raudenska i sur., 2014; Ruttkay-Nedecky i sur., 2013; Cai i sur., 2010; Sato i Kondoh, 2002; Suzuki i Koizumi, 2000). Rezerve Zn u stanici rezultat su unosa Zn prehranom i služe kao izvor Zn za indukciju sinteze MT-a. Vežanje Zn na MT termodinamički je povoljan proces. Metalni ioni, naročito Zn, vežu se za MTF-1 koji se potom veže na MRE u promotorskoj regiji gena i potiče transkripciju gena MT-a (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz čimbenika koji sudjeluju u transkripciji gena MT (preuzeto iz Sato i Kondoh, 2002).

Mnogi metali mogu potaknuti sintezu MT-a, ali su mehanizmi toga poticanja drukčiji u odnosu na opisani mehanizam poticanja sinteze preko Zn. Toksični metali ne mogu aktivirati MTF-1, ali zbog velikog afiniteta vezanja za MT mogu zamijeniti Zn u molekuli MT-a i tako povećati unutarstanične rezerve Zn (Dziegiel i sur., 2016; Sabolić i sur., 2010; Sato i Kondoh, 2002). Istisnuti Zn zatim će poticati daljnu sintezu MT-a i u konačnici utjecati

na toksičnost metala. U uvjetima akutne izloženosti visokoj dozi metala (Cd ili Hg), MT može smanjiti toksičnost metala, a u uvjetima kronične izloženosti metalu, povećana sinteza MT-a dovodi do produženog zadržavanja toksičnog metala (Cd ili Hg) u organizmu i mogućih toksičnih učinaka (Waalkes i Pérez-Ollé, 2000; Nordberg i Nordberg, 2000). Međutim, istraživanja provedena *in vitro* na stanicama proksimalnih zavijenih kanalića bubrega pokusnih štakora i svinja pokazala su da je Cd vezan na MT (Cd-MT) manje toksičan od kadmijevog (II) klorida (CdCl_2). To je potvrđeno i u istraživanjima u štakora muškog spola izloženih jednakoj količini Cd^{2+} u obliku CdCl_2 i kompleksa Cd-MT. U spomenutom istraživanju životinje izložene CdCl_2 imale su veća oštećenja bubrega u odnosu na životinje izložene kompleksu Cd-MT, koje su imale lagano povećanje aktivnost gama-glutamil transpeptidaze (GGTP) u urinu što dovodi do zaključka da nefrotoksični učinak Cd izazivaju slobodni unutarstanični ioni Cd^{2+} (opisano u: Dziegiel i sur., 2016).

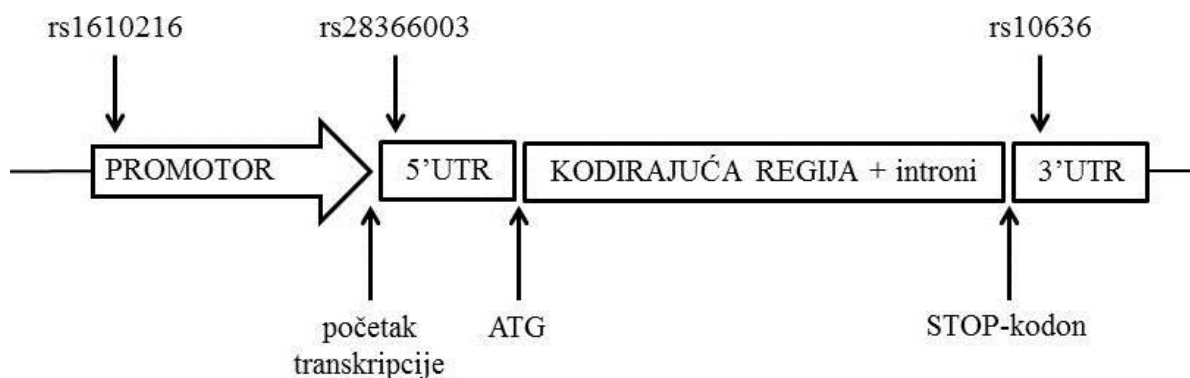
Organski otrovi mogu se metabolizirati u manje toksične supstancije, ali metali kao što je Cd to ne mogu i neizbježno se stvara njihov inertni oblik koji se nakuplja u unutarnjim organima kao što su jetra, bubreg i posteljica (Dziegiel i sur., 2016; Waalkes i Pérez-Ollé, 2000). Nakupljanjem Cd u posteljici smanjuje se prijenos Cd do fetusa, što je vidljivo iz većeg omjera Cd u posteljici i Cd u krvi pupkovine (Piasek i sur., 2016; Stasenko i sur., 2010; Kippler i sur., 2010). U uvjetima izloženosti Cd, zbog povećane sinteze MT-a u unutarnjim organima i istodobnog zadržavanja povećanih količina Zn vezanih na MT, može biti ometen prijenos Zn do fetusa što pokazuju snižene koncentracije Zn u krvi/serumu pupkovine, a posljedično ugrožen rast i razvoj fetusa *in utero* odražava se u sniženoj porođajnoj masi (Ronco i sur., 2006; Waalkes i Pérez-Ollé, 2000). Dosadašnja istraživanja u ljudi i pokusnih životinja nisu dala ujednačene rezultate o povezanostima MT-a i Zn, odnosno razina Zn i Cd u posteljici. Također je pokazano da se, pored nakupljanja najvećeg dijela Cd u posteljici, mali dio Cd ipak prenosi do fetusa. Stoga se danas smatra da su, osim preko MT-a, u međudjelovanje Cd i Zn uključeni i drugi mehanizmi, a u prijenosu Cd do fetusa najvjerojatnije sudjeluju i prijenosnici iz obitelji ZIP (Fukase i sur., 2014; Nakamura i sur., 2012a, b; Kippler i sur., 2010; Ronco i sur., 2005b; Brako i sur., 2003; Lau i sur., 1998; Goyer, 1995).

Utjecaj MT-a na toksičnost drugih metala, kao što su As, Pb, Hg, Cu i Cr, također je poznat, ali u odnosu na Cd puno manje istraživan. Dosadašnja eksperimentalna istraživanja pokazuju da MT može smanjiti toksične učinke As na bubreg (Liu i sur., 2000), jetru i pluća (Jia i sur., 2004). Također je poznato važno međudjelovanje MT-a i Cu u rijetkim nasljednim poremećajima metabolizma Cu, u Wilsonovoj i Menkesovoj bolesti (Dziegiel i sur., 2016;

Nordberg, 1998). Analizom jetre pacijenata oboljelih od Wilsonove bolesti nađeno je da su ioni Cu u jetrenim stanicama (hepatocitima) vezani za molekule MT1 i MT2 (Nartey i sur., 1987). To je potvrđeno i u istraživanjima na pokusnim štakorima u kojima je također nađeno da su tako vezani slobodni ioni Cu u lizosomima koji se s vremenom transformiraju i dovode do oksidacijskog oštećenja i nekroze hepatocita (Klein i sur., 1998). Ova saznanja dovela su do terapijske primjene Zn kojom se povećavaju rezerve MT1 i MT2 u stanicama crijeva (enterocitima) koji vežu ione Cu i zadržavaju prolaz velikih količina toksičnog slobodnog Cu u krvotok te sprječavaju posljedično nakupljanje i štetne učinke u jetri i središnjem živčanom sustavu (Hoogenraad, 2006).

1.1.2 Polimorfizam metalotioneina 2A (*MT2A*)

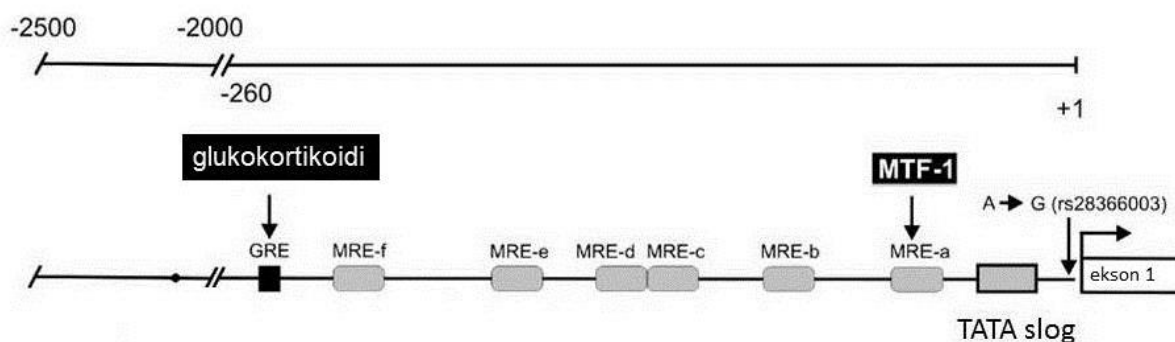
Polimorfizam je genska varijacija koja se odlikuje promjenom alela u genu i javlja se u najmanje 1 % stanovništva. Promjene koje se događaju uključuju uglavnom promjenu jednog nukleotida i takva vrsta polimorfizma naziva se polimorfizam jednog nukleotida (SNP). Prema Nacionalnom centru za biotehnoške informacije (NCBI) u ljudi su prepoznata 24 polimorfizma u genu *MT2A* od kojih samo tri imaju moguće utjecaje na fiziološke i patofiziološke procese u organizmu (Raudenska i sur., 2014). Najvažnija 3 polimorfizama *MT2A* i mjesta njihova nastanka prikazani su na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz mjesta najvažnijih polimorfizama jednog nukleotida na genu *MT2A* (preuzeto iz Raudenska i sur., 2014).

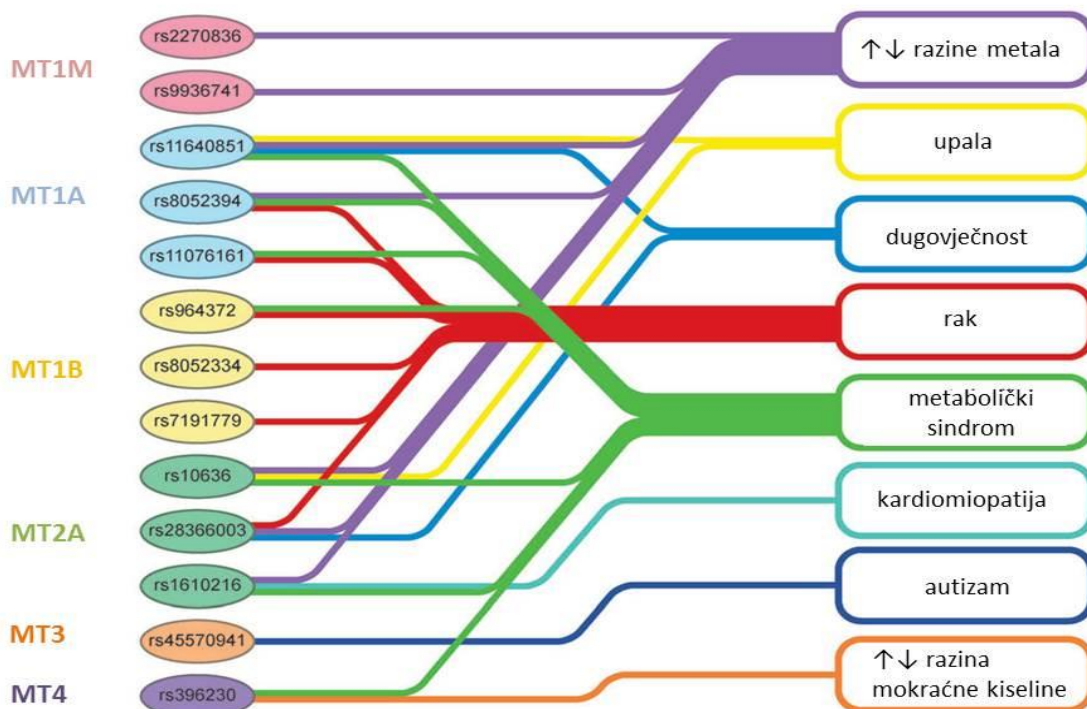
Polimorfizam *MT2A* rs1610216 može utjecati na ekspresiju MT-a. Istraživanja su pokazala da povećana ekspresija MT-a može utjecati na smanjenje hiperglikemije izazvane oksidacijskim stresom te kronične komplikacije dijabetesa kao što su kardiomiopatija i

nefropatija (Zheng i sur., 2008; Liang i sur., 2002). Polimorfizam *MT2A* rs10636 u 3' netranslatirajućoj regiji (3'UTR) povezuje se s povećanim rizikom za nastanak ateroskleroze (Raudenska i sur., 2014). Polimorfizam rs28366003 događa se u blizini 5'UTR-a *MT2A* gena u središnjem dijelu MRE slijeda TGCACCTC na mjestu koje je udaljeno 5 parova baza od mjesta gdje započinje transkripcija i radi se o A/G polimorfizmu (c.-77A>G) (slika 6). Točan utjecaj ovoga polimorfizma još uvijek nije dovoljno istražen. S obzirom da se događa u blizini 5'UTR-a, u blizini TATA sloga, može doći do smanjene vezujuće aktivnosti MTF-1 na MRE što dovodi do smanjene transkripcije MT-a zbog izloženosti toksičnom metalu i/ili oksidacijskom stresu (Raudenska i sur., 2014; Otsuka, 2001).



Slika 6. Shematski prikaz *MT2A* gena i faktora koji sudjeluju u transkripciji MT-a (preuzeto iz Starska i sur., 2014).

Istraživanja na stanicama bubrega ljudskog embrija 293 (HEK 293) u uvjetima izloženosti toksičnim metalima pokazala su da zamjena alela A alelom G u blizini 5'UTR-a može smanjiti učinkovitost poticanja transkripcije *MT2A* (Kita i sur., 2006). Rezultat smanjene transkripcije MT-a, odnosno razlike u genima, mogu biti različite koncentracije metala i njihovi mogući učinci na zdravlje u pojedinim osoba (Nordberg i sur., 2015). Polimorfizam *MT2A* rs28366003 do sada je istraživan u populacijama Poljske, Turske, Japana i SAD-u (u bijelaca i Afroamerikanaca) u povezanosti s razinama metala, trajanjem životnoga vijeka i rizicima nastanka zloćudnih bolesti (slika 7). Literaturni pregled dosadašnjih istraživanja genskog polimorfizma *MT2A* u povezanosti s razinama metala prikazan je u tablici 2 u prilogu 1.



Slika 7. Povezanost polimorfizama MT-a s pojavom raznih bolesti i stanjima (preuzeto iz Raudenska i sur., 2014).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da nositelji alela G u odnosu na genotip AA imaju više koncentracije Cd u bubregu i krvi te višu koncentraciju Pb i nižu koncentraciju Zn u krvi (Kayaalti i sur., 2011; 2010). Istraživanja u roditelja nepušačica u Turskoj pokazala su da su nositeljice alela G u odnosu na genotip AA imale više koncentracije Cd i Pb u krvi, te smanjene koncentracije Cd u posteljici, a u koncentracijama Pb u krvi pupkovine i posteljici nisu nađene razlike (Tekin i sur., 2012a, b). Međutim, dobivene koncentracije Cd u krvi bile su neuobičajeno visoke za nepušačice s obzirom na prije objavljene vrijednosti Cd u krvi nepušačica u Turskoj (El-Agha i Gokmen, 2002), a istodobne koncentracije Cd u posteljici bile su vrlo niske i među najnižima u dosadašnjoj literaturi (Esteban-Vasallo i sur., 2012). Potonje je neočekivani nalaz budući da je poznato kako se Cd nakuplja u posteljici i ima više vrijednosti nego u krvi (Nordberg i sur., 2015) kako je nađeno i u našim dosadašnjim istraživanjima (Piasek i sur., 2016, 2014). Stoga je opisani utjecaj polimorfizma *MT2A* rs28366003 na koncentracije Cd u krvi i posteljicama roditelja nepušačica potrebno dalje istraživati.

U literaturi nedostaju podaci o procjenama polimorfizma *MT2A* i mjerenjima više metala istodobno u biološkim uzorcima kao što su majčina krv i posteljica te krv pupkovine koja odražava prijenos elemenata od majke do fetusa. U ovom radu određivane su koncentracije odabranih toksičnih (Cd, Pb i Hg) i s njima povezanih esencijalnih elemenata (Zn, Cu, Fe i Se) u uzorcima majčine krvi, posteljice i krvi pupkovine prikupljenima nakon porođaja u zdravih roditelja i procjenjivane njihovih koncentracija s obzirom na glavni izvor izloženosti toksičnom metalu i istodobno na majčin polimorfizam *MT2A* rs28366003, c.-77A>G.

1.2 Toksični i esencijalni elementi

1.2.1 Izloženost toksičnim metalima i njihovi štetni učinci na reprodukciju i potomstvo

U suvremenom svijetu sve je veća prisutnost različitih štetnih tvari u zraku, vodi i tlu kamo dopijevaju iz prirodnih izvora ili raznim ljudskim djelatnostima i ulaze u lanac prehrane. Pri tome je čovjek neizbježno i svakodnevno izložen toksičnim metalima koji ulaze u organizam hranom, udisanjem zraka i cigaretnog dima, a malim udjelom i kroz kožu. Biološko vrijeme poluživota toksičnih metala Cd, Pb i metil-Hg relativno je dugo, pa se u organizmu mogu zadržati i nekoliko desetljeća (CDC, 2005). Prema dokumentu Agencije za toksične supstancije i registar bolesti (ATSDR), tri glavna toksična metala Cd, Pb i Hg i polumetal As svrstani su među deset najtoksičnijih supstancija upće (ATSDR, 2010).

U tablici 1. prikazana je najčešća upotreba, načini dospijevanja u okoliš i vrijeme poluživota glavnih toksičnih metala Cd, Pb i Hg.

Tablica 1. Glavni toksični metali, njihova upotreba, način dospijevanja u okoliš i vrijeme poluživota u ljudskom organizmu (preuzeto iz Esteban i Castaño, 2009).

metal	upotreba	način dospijevanja u okoliš	vrijeme poluživota u organizmu (CDC, 2005)
Cd	Cd-Ni baterije boje i premazi plastične mase neželjezne slitine	sekundarni produkt olovnih talionica i rafinerija nafte	2–3 mjeseca u krvi 10–40 godina u bubregu
Pb	akumulatori metalne legure kristalno staklo keramički premaz	otpuštanje iz goriva i Pb boja	1–2 mjeseca u krvi i mekom tkivu >20 godina u kostima i zubima
Hg	prerada minerala Hg sulfida električna oprema baterije boje amalgamske zubne ispune	izgaranje fosilnih goriva spaljivanje krutog otpada	1–3 tjedna za Hg ²⁺ i Hg ⁰ i 50 dana za metil-Hg u krvi 10–30 godina u bubregu

Hranom unosimo esencijalne, ali i toksične elemente u raznim koncentracijama u pojedinim namirnicama. Hrana morskoga podrijetla (uključujući ribe) važan je izvor energije i proteina te je bogata hranjivim tvarima kao što su nezasićene omega-3 masne kiseline te Se, Ca i vitamini A i D (EFSA, 2015, 2014, 2012a). Međutim, hrana morskoga podrijetla sadrži i metil-Hg, i Cd te se smatra glavnim izvorom izloženosti opće populacije za Hg (Hellberg i sur., 2012; Jureša i Blanuša, 2003; Kljaković-Gašpić i sur., 2002). U tablici 2. prikazani su najčešći izvori izloženosti Cd, Pb i Hg te njihovi učinci na reprodukciju, fetus i novorođenče.

Tablica 2. Prikaz najčešćih izvora izloženosti glavnim toksičnim metalima i njihovih dokazanih učinaka na reprodukciju i potomstvo (nadopunjeno prema Caserta i sur., 2013).

metal	izvor izloženosti	učinci na reprodukciju	učinci na fetus	učinci na novorođenče
Cd	prehrambeni lanac (brašno, pšenica, riža, morski plodovi, krumpir, šećer) pušenje cigareta	promjene u spermi smanjenje potencije učinci na steroidogenezu u posteljici i spolnim žlijezdama	zastoj rasta ploda <i>in utero</i> (IUGR)	smanjen koeficijent inteligencije (IQ) smanjene porođajna masa i duljina smanjeni plod za gestacijsku dob sniženi APGAR
Pb	pušenje cigareta dodatak motornom benzinu onečišćenje zraka boje i lakovi	oksidacijska oštećenja impotencija promjene u spermi menstrualni poremećaji hormonalne promjene	pobačaj/mrtvorodenost IUGR snižena porođajna masa prijevremeni porođaj mentalna retardacija kongenitalne malformacije	hematološke promjene (poremećaji razvoja leukocita) slabiji indeks mentalnog razvoja smanjeni IQ poremećaji razvoja sluha i motorike teškoće u učenju poremećaj pažnje i koncentracije
Hg	hrana (ribe, morski plodovi) industrija celuloze i papira bolnički i laboratorijski pribor koji sadrži Hg ⁰ konzervansi hrane i kozmetičkih preparata fotografski laboratoriji insekticidi, pesticidi i fungicidi	smanjenje potencije promjene u spermi povećani rizik raka testisa snižen testosteron menstrualni poremećaji	pobačaj/mrtvorodenost poremećaji funkcije živčanog sustava	prirodne mane neurorazvojna mentalna retardacija poremećaj sluha teškoće u učenju autizam smanjeni IQ

Pušenje cigareta, odnosno duhanski dim, najvažniji je izvor izloženosti toksičnim metalima Cd i Pb u pušača. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) izloženost duhanskom dimu svrstana je među deset najvećih rizika za zdravlje, u prvom redu za razvoj raka te srčanih i plućnih bolesti koje često imaju smrtni ishod (WHO, 2002). Duhanski dim sadrži nekoliko tisuća kemijskih tvari uključujući oko 30 različitih iona metala od kojih su najzastupljeniji Cd, Pb, As, Ni, Cr(VI), Cu i radioaktivni elementi u tragovima. Obilje slobodnih radikala prisutnih u cigaretnom dimu može izazvati oksidacijski stres u plućnom i krvožilnom sustavu, a niže vrijednosti antioksidansa u pušača mogu biti zbog neprekidnog opterećenja organizma oksidacijskim tvarima iz cigaretnog dima čime se snizuju koncentracije antioksidansa. S druge strane, budući da su antioksidansi i mogući prooksidansi, niže vrijednosti antioksidansa mogu biti i zaštitna prilagodba na proupalni okoliš u tkivima pušača koji se može povezati s povišenjem proteina akutne faze imunog odgovora (Northrop-Clewes i Thurnham, 2007). Pušenje cigareta posebno je opasno u žena tijekom reproduktivne dobi. Ta štetna navika može uzrokovati smanjenu plodnost, nepravilan razvoj posteljice, opasnost za spontani pobačaj ili prijevremeni porođaj te zastoj rasta i razvoja ploda *in utero*, smanjenje porođajne mase i povećanu perinatalnu smrtnost ili obolijevanje novorođenčadi.

Dosadašnja istraživanja štetne učinke pušenja tijekom trudnoće povezuju s remećenjem prijenosa nutrijenata i sinteze hormona u posteljici, što može imati negativne učinke na trajanje i ishod trudnoće i normalan razvoj fetusa te nositi rizike za kronične i maligne bolesti potomka tijekom djetinjstva i poslije u životu (Ng i sur., 2013; Dechanet i sur., 2011; WHO, 2010c; Knopik, 2009). Kako je već istaknuto prije, mogući štetni učinci Cd na rast i razvoj fetusa *in utero* su neizravni jer Cd ima svojstvo nakupljanja u unutarnjim organima, jetri i bubregu, a tijekom trudnoće i u posteljici, čime se može poremetiti prijenos esencijalnih elemenata (Zn, Cu i Fe) do fetusa i sinteza posteljičnih hormona, progesterona i leptina (Piasek i sur., 2011; Henson i sur., 2010; Stasenko i sur., 2010). Istraživanja na pokusnim životinjama pokazala su da je tijekom rane trudnoće, kada još nije razvijena posteljica, prijenos Cd od majke do embrija lakši i tada mogu nastati tzv. teratogeni učinci i teže malformacije ploda (Clarkson i sur., 1985; Dencker i sur., 1983).

Izloženost majke toksičnim supstancijama iz okoliša, uključujući toksične metale, može imati razne štetne posljedice na rast i razvoj fetusa *in utero* i mogu nastati trajni neurološki poremećaji i povećani rizik za razvoj kroničnih bolesti u odrasloj dobi. Posebno je opasna izloženost visokim razinama toksičnih metala koji mogu prolaziti kroz posteljicu (Hg, Pb) i tako mogu imati štetne učinke na plod prije i nakon rođenja (Piasek i sur., 2011; Schoeters i sur., 2011; Wigle i sur., 2008; Grandjean i Landrigan, 2006). Štetni učinci

izloženosti Pb u žena reproduktivske dobi mogu biti poremećaji menstrualnog ciklusa, povećana stopa spontanih pobačaja ili prijevremenog poroda te zastoj rasta ploda *in utero* i/ili smanjena porođajna masa (Henson i sur., 2010; Apostoli i sur., 2007).

Štetnim učincima Hg fetus može biti izložen već *in utero*, a novorođenče tijekom dojenja budući da je metil-Hg najčešći oblik koji se unosi hranom, prolazi kroz posteljicu i izlučuje se u majčinom mlijeku (Henson i sur., 2010; Bose-O'Reilly i sur., 2010; Dorea i Donangelo, 2006). Dosadašnja istraživanja su pokazala da je gotovo tri puta veća koncentracija Hg u kosi novorođenčadi čije su majke konzumirale ribu dva ili više puta na tjedan u odnosu na novorođenčad čije su majke rijetko jele ribu (Díez i sur., 2009). Istraživanja tijekom niza desetljeća pokazala su da perinatalna izloženost djece metil-Hg može uzrokovati mentalnu retardaciju, poteškoće u govoru i pamćenju i druge ozbiljne neurološke poremećaje (Grandjean i Landrigan, 2006; WHO, 1990). U odnosu na odrasle ljude, mozak fetusa i male djece osjetljiviji je na štetne učinke metil-Hg, naročito tijekom zadnjeg tromjesečja trudnoće i nakon rođenja do treće godine života jer je to razdoblje razvoja i sazrijevanja središnjeg živčanog sustava (Rice i Barone, 2000). Neurotoksični učinci Hg konzumacijom hrane morskoga podrijetla još uvijek nisu sasvim istraženi. Iako se hrana morskoga podrijetla preporučuje kao zdravi način prehrane i tijekom razdoblja trudnoće, iz predostrožnosti se svim ženama reproduktivske dobi ne preporučuje konzumirati one vrste riba za koje je utvrđeno da sadrže najviše količine Hg (EFSA, 2015, 2014, 2012a).

1.2.2 Esencijalni elementi u žena reproduktivske dobi

Pod pojmom esencijalni elementi podrazumijeva se ukupno oko 20 elemenata koji su nužni za normalno odvijanje svih fizioloških funkcija i bioloških procesa te normalan sastav tjelesnih struktura. Ti se elementi nazivaju još i nutritivni elementi, sudjeluju u redukcijsko-oksidacijskim (redoks) reakcijama u organizmu i sastavni su dijelovi enzima i proteina. Prema količinama koje su potrebne za biološke uloge u tijelu i zastupljenosti u organizmu, esencijalne elemente dijelimo na makronutrijente i mikronutrijente. U makronutrijente ubrajamo Ca, fosfor (P), Mg, kalij (K), Na i klor (Cl, kao klorid), a u mikronutrijente spadaju Fe, Zn, Cu, Se i drugi. Esencijalni elementi mogu imati štetne učinke na zdravlje u slučajevima njihovog nedostatka (deficijencije) ili ako su u organizmu prisutni u previsokim koncentracijama zbog povećane izloženosti iz okoliša ili metaboličkih poremećaja (Nordberg i sur., 2015; Piasek i Mikolić, 2009).

Tijekom posebnih fiziološka stanja u žena povećavaju se potrebe za esencijalnim elementima (Ca, Fe, Zn, Cu i drugi). Tijekom trudnoće i laktacije povećana je želučanocrijevna apsorpcija i vrlo često dolazi do deficijencije esencijalnih elemenata pa je tada potrebna njihova suplementacija. Tada istodobno može doći i do veće apsorpcije toksičnih metala pa je povećana opasnost za pojavu štetnih učinaka u organizmu (ATSDR, 2012, 2007; EFSA, 2012b, 2012c; WHO, 2002).

Deficijencija Fe, odnosno različiti stupnjevi smanjenih razina Fe u organizmu sve do nastanka tzv. sideropenične anemije, najčešći je oblik deficijencije esencijalnog elementa zastupljena u razvijenim i nerazvijenim zemljama svijeta. Javlja se u svim dobnim skupinama. Nedostatak Fe u organizmu djeteta najčešće je posljedica neodgovarajućeg unosa Fe hranom nakon prestanka dojenja. Smanjenje tjelesnih rezervi Fe u organizmu žene reproduktivske dobi nastaje zbog periodičnog gubitka krvi menstruacijom i krvarenjem tijekom porođaja, pogotovo nakon višestrukih trudnoća. Kako bi se spriječio nedostatak Fe i održavale zalihe Fe potrebne za prijenos u plod, česta je suplementacija Fe tijekom trudnoće u kombinaciji s folnom kiselinom. Stanje Fe u majčinom organizmu vrlo je važan za normalno napredovanje trudnoće jer nedostatak Fe može rezultirati preranim porođajem, smanjenom porođajnom masom te anemijom novorođenčeta s posljedičnim poremećajima rasta i razvoja organa djeteta. Istraživanja su pokazala bolje biometrijske parametre fetalnog rasta u potomaka majki koje su uzimale Fe kao dodatak prehrani tijekom trudnoće u odnosu na djecu čije majke nisu uzimale Fe (Hwang i sur., 2013). Međutim, dosadašnja istraživanja pokazala su također da postoji negativna povezanost visokih koncentracija hemoglobina (Hb) i ishoda trudnoće (Scanlon i sur., 2000; Stephansson i sur., 2000; Zhou i sur., 1998). Poznato je da prekomjerna koncentracija Fe u organizmu mogu dovesti do oksidacijskih oštećenja (Puntarulo, 2005) pa se stoga suplementacija Fe tijekom trudnoće treba nadzirati i prilagoditi stanju Fe buduće majke (Hwang i sur., 2013).

Nedostatak Zn u žena može dovesti do poremećaja sinteze i lučenja folikulstimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH), nenormalnog razvoja jajnika, poremećaja menstrualnih ciklusa, preeklampsije, pobačaja i zastoja fetalnog rasta i razvoja (Chaffee i King, 2012; Wellinghausen, 2001). Istraživanja o utjecaju suplementacije Zn u trudnica s deficijencijom Zn dala su proturječne rezultate. U nekim istraživanjima pokazano je da suplementacija Zn poboljšava fetalni neurološki razvoj te smanjuje rizik prijevremenog porođaja i smanjene porođajne mase, a u drugima nisu potvrđeni takvi učinci (Wellinghausen, 2001). Stoga se i suplementacija preparatima Zn treba prilagoditi stanju Zn buduće majke. Velike doze Zn mogu dovesti do smanjenih razina Cu i slabljenja imunoloških

funkcija sa smanjenom proliferacijom limfocita i fagocitozom (Chandra, 1984). Pokazano je da monociti i T-stanice drugačije reagiraju na velike koncentracije Zn; monociti mogu podnijeti velike koncentracije Zn dok T-stanice bolje održavaju svoje funkcije pri nižim koncentracijama Zn (Wellinghausen, 2001).

Tijekom trudnoće raste potreba za unosom Cu koji je također esencijalan element važan za normalan razvoj ploda. Istraživanja su pokazala da je koncentracija Cu i ceruloplazmina u serumu dvostruko veća tijekom trudnoće što pokazuje da imaju važnu ulogu u trudnoći (Vukelić i sur., 2012; Gambling i sur., 2003). Poremećaj metabolizma Cu u organizmu sa sniženim vrijednostima Cu i ceruloplazmina u krvi postoji u osoba s vrlo rijetkom genskom Menkesovom bolešću i nastaje zbog mutacije na genu *ATP7A* koji kodira proteinski prijenosnik Cu u stanicama crijeva, jetra i drugih organa. Eksperimentalna istraživanja pokazala su da nedostatak Cu tijekom trudnoće može izazvati srčanožilne bolesti, abnormalnosti mozga i usporavanje fetalnog rasta (Gambling i sur., 2003; Keen i sur., 1998). Deficijencija Cu u majke može dovesti do abnormalnosti embrija i fetusa, ali mehanizmi tih učinaka u plodu još nisu poznati (Uriu-Adams i sur., 2010; Keen i sur., 1998). U uvjetima povišenih razina Cu u organizmu nastaju štetni prooksidacijski i toksični učinci, kao što je u rijetkoj genskoj Wilsonovoj bolesti i u slučajevima poremećenog odstranjivanja Cu iz organizma (Bremner, 1998).

Nedostatak Se u organizmu povezan je s bolestima srca i krvnih žila, zloćudnim bolestima i drugim poremećajima koji su posljedica povećanog stvaranja slobodnih radikala. Tijekom trudnoće koncentracije Se u serumu su smanjene u odnosu na stanje izvan trudnoće jer su tijekom trudnoće i dojenja povećane potrebe Se i njegov prijenos kroz posteljicu do fetusa, odnosno majčinim mlijekom u novorođenče. Istraživanja u ljudi i životinja pokazala su da nedostatak Se može izazvati poremećaje ženske reproduktivske funkcije kao što su smanjena plodnost, povećana stopa pobačaja i preeklampsija, a u krava dolazi do opasnog zadržavanja posteljice (kotiledona) tijekom telenja. U novorođenčadi je moguć smanjeni mišićni tonus (Mirone i sur., 2013; Mehdi i sur., 2013; Rayman i sur., 2011).

1.2.3 Glavni toksični metali i njihova međudjelovanja s esencijalnim elementima

1.2.3.1 Kadmij i esencijalni elementi

Kadmij je toksičan metal koji ima svojstvo nakupljanja i dugo vrijeme poluživota u organizmu. Glavni izvori izloženosti Cd u općem stanovništvu jesu hrana (prvenstveno žitarice, lisnato povrća, orašasti plodovi, meso i jestive iznutrice), voda za piće i onečišćeni zrak, a u aktivnih pušača to je pušenje cigareta (tablice 1 i 2). Najopasniji izvor izloženosti Cd je pušenje. Svaka cigareta sadrži 1–2 µg Cd. Ovisno o broju popušanih cigareta na dan, svakodnevni unos Cd može biti dvostruko i više puta veći u pušača u odnosu na nepušače, a koncentracija Cd u krvi pušača je 4 do 5 puta veća nego u nepušača. Zbog svojstva nakupljanja u organizmu, najviše u bubregu i jetri, s godinama života raste ukupna opterećenost organizma Cd, više u žena nego u muškaraca jer su one tijekom reproduktivne dobi sklone deficijenciji esencijalnih elemenata (Ca, Fe, Zn) čime im je veći i unos Cd (Nordberg i sur., 2015; ATSDR, 2012; EFSA, 2012b, 2009; Piasek i sur., 2011). Nakon unosa hranom apsorpcija Cd odvija se u enterocitima uglavnom u početnom dijelu tankog crijeva (dvanaesniku i jejunumu), no još uvijek nisu sasvim objašnjeni mehanizmi njegovog prijenosa pri tome (Thévenod, 2010). Do sada je u literaturi opisano da se apsorpcija Cd u enterocitima događa u dva koraka: prvi korak je vezanje na luminalni dio membrane i odvija se brzo, a drugi je polaganiji prijenos kroz staničnu membranu u enterocit (Diamond, 2000). Na membrani enterocita Cd stvara kompleks sa sulfhidrilnim skupinama proteina i dijelom prolazi kroz sluznicu pomoću prijenosnika za aminokiseline, mehanizmima koji još uvijek nisu poznati. Glavnina apsorpcije Cd u crijevima odvija se sličnim mehanizmom kao i apsorpcija nekolicine drugih dvovalentnih metala (Fe, Cu, Zn, mangana (Mn)) koja je posredovana prijenosnikom dvovalentnih metala 1 (DMT1) smještenim u luminalnoj membrani enterocita pa dolazi do natjecanja Cd s drugim ionima metala za ista vezna mjesta u DMT1. Nakon ulaska u stanicu, protein 1 prijenosnik metala (MTP1) i ferroportin 1 (FP1) na bazolateralnoj membrani enterocita sudjeluju u prijenosu Cd, Fe i drugih dvovalentnih metala kroz membranu u krvotok. Ekspresija ovih prijenosnika u crijevima ovisna je o stanju Fe i povećava se sa smanjenjem Fe u organizmu što može dovesti do pojačane crijevnog apsorpcije Cd (Thévenod, 2010; Bridges i Zalups, 2005; Park i sur., 2002).

S obzirom da se Cd nakuplja u posteljici, može ometati prijenos esencijalnih elemenata od majke do fetusa *in utero* uključujući Fe, što može rezultirati deficijencijom Fe u potomka nakon rođenja i imati štetne posljedice tijekom ranog postnatalnog rasta i razvoja (Piasek i sur., 2004). Prijenos Fe kroz posteljicu započinje na majčinoj strani, gdje se

kompleks Fe^{3+} s transferinom iz krvotoka veže na transferinski receptor i potom ulazi u stanice posteljice procesom endocitoze. Zbog niske pH vrijednosti u endosomu dolazi do otpuštanja Fe^{3+} s transferina i njegove redukcije u Fe^{2+} koje potom izlazi iz endosoma posredstvom DMT1 u endosomskoj membrani. Na fetalnoj strani Fe^{2+} prolazi kroz sinciotrofoblast pomoću feroportina, oksidira se u Fe^{3+} pomoću lokalnih feroksidaza te se veže na fetalni transferin (Carter, 2012; McArdle i sur., 2008).

Veće nakupljanje Cd u organima, prvenstveno u jetri, bubrezima i posteljici, može biti i zbog deficijencije Zn i Cu (EFSA, 2009). Zbog kemijske sličnosti Cd može zamijeniti Zn ili Cu u antioksidacijskim enzimima i uzrokovati oksidacijski stres u stanici (Bhattacharyya i sur., 2000). Kao što je već naprijed opisano, oba metala potiču sintezu MT-a, no Cd ima veći afinitet vezanja za MT u odnosu na Zn; stabilnost kompleksa Cd-MT je 100 - 1000 puta veća od stabilnosti Zn-MT kompleksa i pri tome Cd zauzima slobodna vezna mjesta na MT-u i sprječava vezanje i prijenos Zn (Sabolić i sur., 2010; Waalkes i Pérez-Ollé, 2000). Do danas još u potpunosti nije razjašnjen mehanizam međudjelovanja Zn i Cd u posteljici. Do sada je pokazano da izloženosti Cd utječe na povećanu sintezu MT-a i dolazi do zadržavanja Cd, a može doći i do zadržavanja Zn u posteljici pri čemu je smanjen njegov prijenos do fetusa (Ronco i sur., 2006). U istraživanjima na ljudskim posteljicama opisano je povećanje Zn u posteljici pušačica, ali do sada nije sasvim objašnjena međusobna povezanost Cd, Zn i MT-a u posteljici (Stasenko i sur., 2010; Kippler i sur., 2010; Torreblanca i sur., 1992).

Dosadašnja istraživanja na pokusnim životinjama pokazala su da suplementacija Se u uvjetima izloženosti Cd utječe na preraspodjelu Cd u organizmu. Selen je esencijalni element koji zbog velikog afiniteta vezanja za Hg, Cd i As ima moguću ulogu u detoksikaciji tih toksičnih elemenata. Mehanizme međudjelovanja Cd i Se još uvijek se istražuje i do sada se pretpostavlja da se to odvija u dva koraka: prvi je stvaranje kompleksa Cd-Se, a drugi je metabolizam tako stvorenog kompleksa koji se razlikuje od metabolizma svakog pojedinačnog metala (opisano u: Lazarus, 2010).

1.2.3.2 Olovo i esencijalni elementi

Olovo je svuda prisutan metal u okolišu kamo dopijeva prirodnih izvora i ljudskim aktivnostima (tablice 1 i 2) i tamo se nalazi u anorganskom obliku. Najvažniji izvori Pb u prošlosti bile su boje, motorni benzini i vodovodne cijevi, što je još uvijek prisutno u nerazvijenim državama i siromašnim četvrtima velikih gradova. U razvijenim zemljama zabranom upotrebe olovnih boja i olovnih benzina znatno su smanjena otpuštanja Pb u okoliš.

U današnje vrijeme Pb najčešće mogu biti izložene osobe lošijeg socioekonomskog statusa i profesionalno izloženi radnici u talionicama, pri izradi akumulatora i slično. Također su moguća i iznenadna akutna otrovanja konzumiranjem hrane držane u posudama koje nisu kontrolirane prema propisima ili u dodacima prehrani koji nisu prošli propisane mjere nadzora najviših dopuštenih koncentracija Pb (EFSA, 2012c; ATSDR, 2007; Silbergeld i Weaver, 2007).

Vrijeme eliminacije Pb iz krvi je oko mjesec dana i zato koncentracija Pb u krvi odražava nedavnu izloženost Pb (Barbosa i sur., 2005). Olovo se u tijelu nakuplja u kostima i zubima, a njegovo biološko vrijeme poluživota iznosi oko 25 do 30 godina, pa količine Pb u tvrdim tkivima odražavaju dugotrajnu izloženosti Pb (EFSA, 2012c; ATSDR, 2007). Povećane razine izloženosti mogu imati štetne učinke na sve organe i organske sustave u tijelu od kojih su najbolje istraženi učinci na krvotvorni i živčani sustav. Neurotoksični učinci u djece posebno su opasni jer ostavljaju trajne štetne posljedice (Grandjean i Landrigan, 2006).

U uvjetima izloženosti Pb, pored učinaka na krvotvorni sustav i međudjelovanja s Fe, može doći do međudjelovanja i s drugim esencijalnim mikroelementima, Zn, Cu i Se, koji se nalaze u aktivnom centru antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutation peroksidaza (GPx). Pri tome Pb zamjenjuje esencijalne elemente u enzimima i dovodi do smanjenja njihove aktivnosti i veće osjetljivosti stanice na oksidacijski stres (Flora i sur., 2008). Poznato je da Pb međudjeluje s Ca koji je esencijalni makronutrijent za izgradnju i mineralizaciju kostiju. Tijekom trudnoće i laktacije može doći do otpuštanja nakupljenog Pb iz kostiju, ukoliko je majka u prošlosti bila izložena Pb, koji potom njezinim krvotokom dolazi do posteljice i prolazi do fetusa ili se izlučuje mlijekom i unosi u dojenče ukoliko majka doji. Također se Pb može otpuštati iz kostiju tijekom osteoporoze u postmenopauzi zbog povećane razgradnja koštanog tkiva (Gulson i sur., 2016; Dorea i Donangelo, 2006). U istraživanju provedenom u trudnica nađene su niže koncentracije Pb u krvi žena koje su uzimale Ca kao mineralno-vitaminski dodatak prehrani u odnosu na one čiji je unos Ca bio smanjen (16 mg/L vs. 25 mg/L). To navodi na zaključak da je tijekom trudnoće niski unos Ca povezan s većom mobilizacijom Ca iz kostiju, radi održavanja homeostaze i prijenosa Ca u plod koji se razvija, pri čemu istodobno dolazi i do mobilizacije Pb (Gulson i sur., 2016).

1.2.3.3 Živa i esencijalni elementi

U prirodi je Hg prisutna u tri kemijska oblika: elementarna (Hg^0), anorganska u obliku iona (Hg^{2+}) i organska (metil-Hg i etil-Hg). U okoliš dopijeva prirodnim vulkanskim erupcijama, erozijom tla, isparavanjem iz površinskih voda, mora i oceana te ljudskom aktivnošću (vađenjem Hg iz živinih ruda, izgaranjem fosilnih goriva, otpuštanjem iz tvornica baterija i drugo) (Bjørklund i sur., 2017; EFSA, 2012a; Pirrone i sur., 2010). U prošlosti se Hg upotrebljavala u medicinske svrhe kao dezinficijens, antiseptik, a do početka 20. stoljeća i kao lijek protiv sifilisa unatoč niza nuspojava zbog teških otrovanja sve do smrtnih ishoda. U novije vrijeme Hg se rabi u stomatologiji za izradu amalgamskih ispuna, za izradu mjernih instrumenata (toplomjeri i tlakomjeri) te u industriji fluorescentnih žarulja, što se postupno odbacuje i zabranjuje zbog dokazanih štetnih učinaka Hg na zdravlje (ATSDR, 2009).

Najčešći izvori izloženosti opće populacije elementarnoj Hg su razbijeni toplomjeri te amalgamske ispune, pri čemu Hg u organizam dopijeva nakon udisanja apsorbacijom u plućima, nakuplja se u eritrocitima i prenosi krvlju do svih tkiva. Iz organizma se izlučuje mokraćom i stolicom, a biološko vrijeme poluživota Hg je oko 60 dana. Želučanocrijevna apsorbacija anorganske Hg je vrlo mala. Najtoksičniji organski oblik je metil-Hg, koji u organizam dopijeva konzumacijom hrane morskoga podrijetla, najviše ribom, pri čemu je apsorbacija gotovo 100 %. Brzo se raspodjeli u organizmu, a izlučuje se i u kosi u kojoj je koncentracija oko 250 puta veća nego u krvi (Clarkson, 2002). Najvažniji toksični učinci metil-Hg su nefrotoksičnost i neurotoksičnost. Potonji su posebno opasni tijekom razvoja mozga u djeteta što može ostaviti trajne štetne posljedice na živčani sustav i ponašanje (Ha i sur., 2017; Karagas i sur., 2012; Grandjean i Landrigan, 2006; WHO, 1990).

Mehanizmi međudjelovanja Hg i Se još uvijek nisu dovoljno istraženi. U istraživanjima na pokusnim životinjama pokazane su smanjene koncentracije Hg u tkivima, plazmi i mokraći u uvjetima peroralne suplementacije Se. Pretpostavlja se da Se i Hg u plazmi stvaraju kompleks koji se veže na selenoprotein P te se Hg uz prisutnost Se manje nakuplja u bubrezima (Rayman i sur., 2011; Orct i sur., 2009).

1.3 Procjena izloženosti metalima u žena reproduktivnoj dobi

Procjena izloženosti ksenobiotičkim, uključujući metale i polumetale, sastoji se od procjene podataka dobivenih anketnim upitnikom, određivanja koncentracija ksenobiotika u okolišu i njihovog mjerenja u tjelesnim tekućinama i tkivima. Biološki monitoring ljudi (HBM) omogućuje procjenu izloženosti ksenobiotičkim kao i procjenu njihovih učinaka na ljudsko zdravlje uporabom bioloških biljega izloženosti, bioloških biljega učinka i biljega specifične osobne osjetljivosti (WHO, 2001). Biološki biljezi izloženosti jesu koncentracije ksenobiotika, njegovog metabolita ili reakcijskog produkta u tjelesnim tekućinama odnosno tkivima, dok su biološki biljezi učinka mjerljive biološke reakcije u organizmu. Metode biološkog monitoringa ljudi primijenjene su prvi puta tijekom određivanja koncentracija Pb i metabolita benzena u uzorcima krvi profesionalno izloženih radnika (Angerer i sur., 2007).

U mjerama koje su planirane za zaštitu okoliša i ljudskog zdravlja preporučenih do 2004. godine, Europska komisija istaknula je potrebu provođenja biološkog monitoringa ljudi, a Institut za zdravlje i okoliš (HESI) osnovao je Tehnički odbor za biomonitoring s ciljem određivanja tako dobivenih podataka u znanstvene svrhe. Definirani su kriteriji združivanja podataka iz biološkog monitoringa ljudi tijekom procesa procjene rizika (Angerer i sur., 2006; EESC, 2004). Nakon toga uslijedili su veliki europski projekti u kojima su upotrijebljene metode biološkog monitoringa ljudi (ESBIO, COPHES, INTARESE, HEIMTSA i drugi).

Periferna venska krv rutinski je i najčešće upotrebljavani biološki uzorak u procjeni izloženosti toksičnim metalima i njihovim štetnim učincima na zdravlje, koji ima nepobitnu vrijednost budući da je krv u stalnom dodiru i ravnoteži sa svim tjelesnim tekućinama i organima. Dugotrajna izloženost toksičnim metalima kao što su Cd, Pb i Hg dovodi do njihovog nakupljanja u ciljnim organima (jetra, bubreg, kosti i zubi) iz kojih se tijekom trudnoće otpuštaju u krvotok, pa se njihove koncentracije u krvi mogu povećati. Iako je krv medij koji u pravilu odražava nedavnu izloženost toksičnim metalima, zbog mobilizacije elemenata u krvotok buduće majke, krv tijekom trudnoće odražava i prethodnu dugotrajnu izloženost žene (Piasek i sur., 2016). Za potrebe biološkog monitoringa tijekom trudnoće bila bi potrebna višekratna uzorkovanja krvi. Međutim, uzorak periferne krvi je invazivno skupljeni uzorak podložan etičkim ograničenjima, osobito ako se radi o osjetljivim skupinama stanovništva kao što su mala djeca i trudnice pa se u novije vrijeme, kada god je to moguće, u najosjetljivijih skupina stanovništva nastoje prikupiti neinvazivni uzorci. Smatra se da su tako skupljeni uzorci etički prikladniji, isplativiji i toksikološki relevantna alternativa uobičajeno invazivno skupljenim uzorcima venske krvi (Smolders i sur., 2009a, b; Esteban i Castaño,

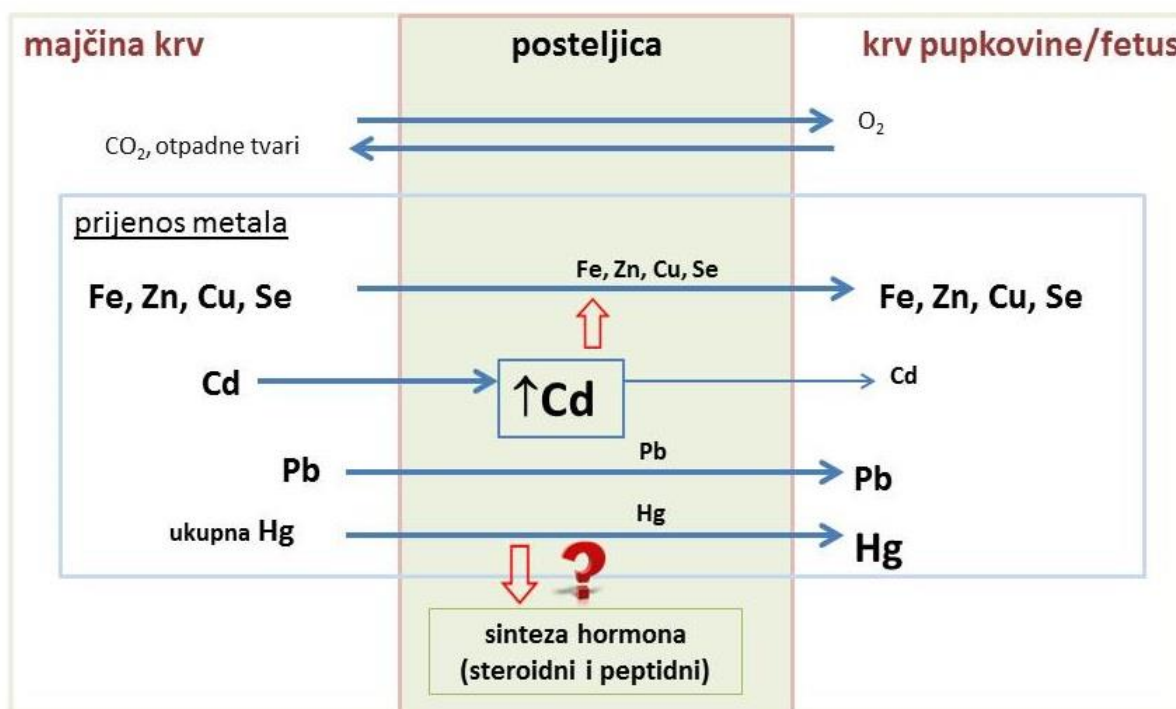
2009). Primjena neinvazivno skupljenih uzoraka u svrhu biološkog monitoringa ljudi omogućuje procjenu izloženosti u najranijim životnim razdobljima analizom uzoraka dostupnih za vrijeme dojenja i trudnoće, a to su krv pupkovine, posteljica, majčino mlijeko, mekonij te uzorci mokraće i kose majke i novorođenčeta. Podaci dobiveni analizom metala u uzorcima posteljice, krvi pupkovine i majčinom mlijeku, zajedno s podacima u krvi majke, mogu nam dati vrijedne informacije o prijenosu metala između majke i fetusa, odnosno majke i djeteta tijekom dojenja (Piasek i sur., 2016, 2014, 2011; Cernichiari i sur., 2007; Butler Walker i sur., 2006; Miller i sur., 1988). Potrebna su daljnja istraživanja za standardizaciju metoda uzorkovanja i upotrebe neinvazivnih uzoraka u procjeni izloženosti i učinaka štetnih tvari kao što su toksični metali i stanje esencijalnih elemenata u ljudi.

1.3.1 Uloga posteljice i njezina važnost u procjeni stanja elemenata tijekom trudnoće

Posteljica je jedinstveni organ koji povezuje buduću majku i plod u maternalno-placentalno-fetalnu funkcijsku jedinicu. Preko posteljice fetus se opskrbljuje kisikom i esencijalnim nutrijentima, odvođe se ugljični dioksid i metaboliti iz fetusa i u njoj se sintetizira nekoliko hormona, što je sve nužno za održavanje trudnoće i preživljavanje fetusa *in utero*. Posteljica se sastoji od fetalnog dijela, tzv. koriona, koji se razvija iz iste blastociste (nastale dijeljenjem stanica oplodene jajne stanice, tzv. zigote, dok je putovala jajovodom do maternice) koja oblikuje i plod te od majčinog dijela, tzv. decidue (*decidua basalis*), koji se razvija iz epitelnog tkiva maternice. Razvoj posteljice počinje nakon što se blastocista ugnijezdila u sluznicu (endometriju) maternice pripremljenu za njezin prihvata na početku trudnoće (decidua). Vanjski sloj blastociste stvara trofoblast, koji ima dva dijela, citotrofoblast i sinciotrofoblast. Tijekom razvoja posteljice dolazi do stvaranja vanjske embrionalne ovojnice (tzv. korionske ovojnice) iz trofoblasta i ona čini fetalnu stranu posteljice. Posteljica je u potpunosti razvijena krajem prvog tromjesečja trudnoće odnosno do 12. ili 13. tjedna trudnoće (Carlson, 2004; Gude i sur., 2004; Miller i sur., 1988).

Dosadašnja istraživanja u ljudi i pokusnih životinja pokazala su da Cd može imati toksične učinke na muške i ženske reproduktivne funkcije, a pri niskim dozama može imati metaloestrogena svojstva i ponašati se kao reproduktivni endokrini disruptor (opisano u: Henson i sur., 2010; Apostoli i sur., 2007; Chedrese i sur., 2006). Prema definiciji, kemijske tvari koje pri niskim razinama izloženosti imaju svojstvo endokrine disrupcije jesu one koje mogu inhibirati, imitirati ili stimulirati djelovanja endogeno stvorenih hormona (McLachlan, 2001).

Na slici 8. shematski je prikazan prijenos esencijalnih elemenata iz krvi buduće majke kroz posteljicu do fetusa i načini prijenosa glavnih toksičnih metala kroz posteljicu. Označeno je i da su mogući učinci toksičnih metala na sintezu hormona u posteljici, u prvome redu Cd na steroidne hormone, koji su posljednjih nekoliko desetljeća predmet istraživanja u ljudi i na pokusnim modelima *in vivo* i *in vitro*, uključujući i istraživanja u laboratoriju u kojem je izrađen ovaj rad.



Slika 8. Shematski prikaz prijenosa esencijalnih elemenata i omjera glavnih toksičnih metala kroz posteljicu uz oznake mogućih učinaka Cd u posteljici na sintezu posteljičnih hormona (slika iz arhive Jedinice za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, IMI, Zagreb).

Kroz posteljicu se prenose prehrambene tvari od majke do fetusa koje su nužne za rast i razvoj budućeg djeteta uključujući esencijalne makro- i mikroelemente, kao što su Ca, Zn, Fe, Cu, Se i drugi. Mehanizmi prijenosa esencijalnih elemenata kroz posteljicu nisu do kraja rasvijetljeni i predmet su brojnih istraživanja (Best i sur., 2016; McArdle i sur., 2008; Gambling i sur., 2003). Pored esencijalnih elemenata, kroz posteljicu se prenose i toksični elementi u različitim omjerima, a njihovi mehanizmi prijenosa do sada su slabo istraženi (Gundacker i Hengstschläger, 2012). Pretpostavlja se da Pb i Hg⁰ prolaze kroz posteljicu difuzijom, a da u prijenosu metil-Hg sudjeluju aminokiselinski nosači. Za razliku od njih, metalni ioni Hg²⁺ i Cd²⁺ ostaju u najvećem dijelu zarobljeni unutar posteljice i samo se mali dio svakoga od njih prenese do fetusa odnosno može izmjeriti u krvi pupkovine (Piasek i sur.,

2014; Clarkson i sur., 2007; Kajiwara i sur., 1996; Goyer, 1995). Budući da Pb i metil-Hg u najvećoj mjeri prolaze kroz posteljicu, oni mogu štetno djelovati na fetus već *in utero*, a Cd koji se nakuplja u posteljici može utjecati na razvoj fetusa neizravno, remeteći prijenos esencijalnih elemenata i sintezu hormona (Taylor i sur., 2013, Esteban-Vasallo i sur., 2012, Piasek i sur., 2011; Ronco i sur., 2005a; Falcón i sur., 2003; Iyengar i Rapp, 2001b, c; Osman i sur., 2000).

Zbog svoje jedinstvene uloge tijekom trudnoće, posteljica je vrijedan neinvazivni uzorak tijekom biološkog monitoringa elemenata u osjetljivoj skupini žena reproduktivske dobi u razdoblju nakon porođaja. Posteljice je lako prikupiti kao biološke uzorke, a zbog veličine organa moguće je uzimanje mnogobrojnih uzoraka za razne analize. U nekoliko preglednih radova opisana su istraživanja i dokazane vrijednosti posteljice kao dvojnog indikatora izloženosti majke i fetusa *in utero* raznim supstancijama u koje spadaju i toksični elementi, a također i za procjenu stanja esencijalnih elemenata u parovima majka–novorođenče (Gundacker i Hengstschläger, 2012; Piasek i sur., 2011; Esteban-Vasallo i sur., 2010; Iyengar i Rapp, 2001a; 2001b; 2001c). Literaturni pregled vrijednosti toksičnih i esencijalnih elemenata u biološkim uzorcima (krvi majke, posteljici i krvi pupkovine) prikazan je u tablicama 3. do 6. u prilogu 1. Iako se prenose kroz posteljicu, u posteljičnom tkivu moguće je izmjeriti koncentracije esencijalnih elemenata, a koncentracije toksičnih elemenata u posteljici ovise o tome u kolikoj se mjeri oni prenose, odnosno zadržavaju u njoj. U istraživanjima drugih autora i u našim prijašnjim istraživanjima pokazano je da su koncentracije Cd u posteljici oko 10 - 20 puta veće od koncentracije u krvi majke te oko 100 puta veća od koncentracije Cd u krvi pupkovine jer se Cd nakuplja u posteljici i ona je djelomična prepreka za prijenos Cd do fetusa (Piasek i sur., 2014; Esteban-Vasallo i sur., 2010; Goyer, 1995).

2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

2.1 Ciljevi istraživanja

Ciljevi rada bili su procijeniti:

- **izloženost buduće majke i potomka** toksičnim metalima s obzirom na pušenje i prehranu (hranu morskoga podrijetla) te s obzirom na prebivalište u kontinentalnom i priobalnom području; u tu svrhu određivana je koncentracija Cd, Pb, Hg u krvi majke i pupkovine te u posteljici;

- **utjecaj genskoga polimorfizma *MT2A* rs28366003** na koncentraciju MT2 u serumu majčine krvi te na koncentracije toksičnih (Cd, Pb, Hg) i esencijalnih metala (Fe, Zn, Cu, Se) u krvi/serumu majke i pupkovine te u posteljici, kao i međudjelovanja toksičnih i esencijalnih elemenata;

- **učinke** kombiniranih čimbenika genskoga polimorfizama, koncentracije MT2 i metala u majčinoj krvi/serumu **na prijenos esencijalnih mikroelemenata do fetusa** (određivanjem Fe, Zn, Cu, i Se u posteljici te usporedbama njihovih vrijednosti u majčinoj krvi/serumu i u krvi iz pupkovine) kao i na koncentraciju **progesterona i estradiola u posteljici**;

- **opasnosti za potomka** zbog zajedničkih učinaka genskoga polimorfizma *MT2A*, izloženosti majke toksičnim metalima i, posljedično, mogućega remećenja prijenosa esencijalnih elemenata i stvaranja steroidnih hormona za održanje trudnoće utvrđivanjem općega zdravstvenoga stanja novorođenčeta te određivanjem toksičnih i esencijalnih elemenata u krvi pupkovine.

O tome u Hrvatskoj nema podataka.

2.2 Hipoteza istraživanja

Polimorfizam gena za *MT2A* protein koji je odgovoran za vezanje i prijenos metala, može utjecati na koncentraciju metala u tijelu buduće majke zbog navike pušenja (Cd, Pb), konzumiranja morske hrane (metil-Hg) i izloženosti iz okoliša, što može pridonijeti štetnim učincima metala na majku i njezina potomka prije i nakon rođenja, uključujući mogući rizik od kronične bolesti u odrasloj dobi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanice

Tijekom prethodnih faza istraživanja na projektu („Izloženost metalima i njihovi učinci u graviditetu i postnatalnom razdoblju“ MZOŠ, br. 00222148-2135, voditelj projekta M. Piasek), unutar kojeg je izrađen ovaj doktorski rad, prikupljeni su podaci i biološki uzorci ispitanica–rodilja odnosno parova majka–novorođenče (n = 292). Kriteriji za nasumični odabir ispitanica u istraživanju bili su: zdrave rodilje koje nisu bolovale od kronične bolesti ili imale ozbiljne poremećaje tijekom trudnoće ili porođaja, jednoplodna trudnoća i porođaj rodničkim putem u roku (u 37. do 42. tjednu trudnoće) u rodilištu suradne bolnice. Ispitanice su bile iz grada Zagreba i Zagrebačke županije koje su rodile u Kliničkoj bolnici Merkur, i iz grada Zadra i Zadarske županije koje su rodile u Općoj bolnici Zadar tijekom dvaju razdoblja: krajem 2007. i tijekom 2008. (rodilje iz Zagreba – ispitanice iz kontinentalne Hrvatske) i tijekom 2010. (rodilje iz Zadra – ispitanice iz priobalne Hrvatske).

3.1.1 Prikupljanje podataka o ispitanicama

Od ispitanica su prikupljeni podaci anketnim upitnikom na obrascima koji su za takve potrebe izrađeni i rabljeni u prethodnim istraživanjima projektne skupine (Piasek i sur., 2011, 2001). Anketiranja ispitanica obavilo je stručno medicinsko osoblje pod nadzorom liječnika (specijaliste ginekologije i porodiljstva) koji je ujedno bio istraživač na projektu ili vanjski suradnik. Prikupljeni su ovi podaci: dob; pokazatelji socioekonomskog statusa (obrazovanje, zaposlenje i radno mjesto); mogući izvori izloženosti metalima (iz okoliša, na radnom mjestu); navike pušenja (samoodređenjem, aktivno/pasivno pušenje, prije i tijekom trudnoće); prehrambene navike (vrsta prehrane, učestalost konzumacije hrane morskoga podrijetla, unos alkoholnih pića, mineralno-vitaminski pripravci); broj amalgamskih zubnih ispuna; podaci o novorođenčetu (spol, porođajna masa i duljina, ocjena vitalnosti APGAR).

3.1.2 Poštivanje etičkih načela tijekom istraživanja u ljudi

Prije početka ovoga istraživanja dobivene su potrebne suglasnosti etičkih povjerenstava Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, Kliničke bolnice Merkur, Opće bolnice Zadar i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svaka moguća ispitanica bila je upoznata sa svrhom i ciljevima istraživanja usmeno i u pisanom obliku na obrascu za davanje pristanka obaviještenoga ispitanika za sudjelovanje

u istraživanjima na kojemu je vlastitim potpisom potvrdila svoj pristanak i odobrila uzimanje planiranih bioloških uzoraka (za analize elemenata, steroidnih hormona, MT2 i genskog polimorfizam *MT2A* rs28366003) i uporabu osobnih podataka i rezultata analiza isključivo u znanstvene svrhe uz zajamčenu anonimnost kodiranjem svih podataka i uzoraka.

3.2 Plan istraživanja

Za istraživanja u ovom radu definirane su sljedeće ispitivane skupine:

1) *Skupine pušačica i nepušačice u procjeni izloženosti Cd i Pb i njihovih učinaka.*

Svaka ispitanica sama se odredila prema navikama pušenja kao nepušačica, pušačica ili bivša pušačica, a u potonjem slučaju navela kada je prestala pušiti cigarete s obzirom na trudnoću iz koje su uzeti podaci i uzorci. Sadašnje i bivše pušačice navele su koliko cigareta na dan su pušile prije odnosno tijekom trudnoće. Određene su 2 skupine: u **pušačice** svrstane su osobe koje su pušile tijekom bilo kojeg razdoblja trudnoće i/ ili prije nje do najdalje 12 mjeseci prije te trudnoće; u **nepušačice** svrstane su ispitanice koje nisu nikada pušile ili bivše pušačice koje su prestale pušiti više od 12 mjeseci prije te trudnoće.

2) *Skupine ispitanica u procjeni izloženosti Hg i njezinih učinaka.*

a) Određene su 4 ispitivane skupine s obzirom na učestalost unosa hrane morskoga podrijetla (uključujući ribe): osobe koje **ne konzumiraju** morsku hranu; konzumiraju morsku hranu **najviše jedan puta na tjedan**; konzumiraju morsku hranu **više od jednom do dva puta na tjedan**; konzumiraju morsku hranu **više od dva puta na tjedan**.

b) Određene su 4 ispitivane skupine s obzirom na zastupljenost broja amalgamskih zubnih ispuna: osobe koje **nemaju amalgamskih zubnih ispuna**; osobe koje imaju **1-2 amalgamske zubne ispune**; osobe koje imaju **3-4 amalgamske zubne ispune**; osobe koje imaju **≥5 amalgamskih zubnih ispuna**.

3) *Ispitanice s obzirom na geografsko područje prebivanja u Hrvatskoj.*

U procjenama utjecaja pušenja cigareta i unosa morske hrane na koncentracije elemenata uspoređivane su 2 skupine ispitanica: **iz kontinentalnog i priobalnog područja**.

4) *Ispitivane skupine prema polimorfizmu MT2A.*

U procjenama utjecaja genskog polimorfizma *MT2A* rs28366003 na koncentracije toksičnih metala i esencijalnih elemenata u krvi/ serumu majki i pupkovine te posteljici ispitanice su svrstane u 2 skupine prema utvrđenom specifičnom genotipu: osobe s homozigotnim divljim tipom (**AA genotip**) i osobe s heterozigotnim AG ili rijetkim homozigotnim GG genotipom (**AG/GG genotip**).

3.3 Prikupljanje bioloških uzoraka nakon porođaja

Medicinsko osoblje u rodilištu uzorkovalo je prema projektnim protokolima biološke uzorke predviđene projektom: vensku krv majke te uzorke krvi pupkovine i cijele posteljice neposredno nakon porođaja. Svi prikupljeni uzorci krvi i posteljica dopremani su u prijenosnom hladnjaku u Jedinicu za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. U tako prikupljenim biološkim uzorcima provedene su predviđene analize.

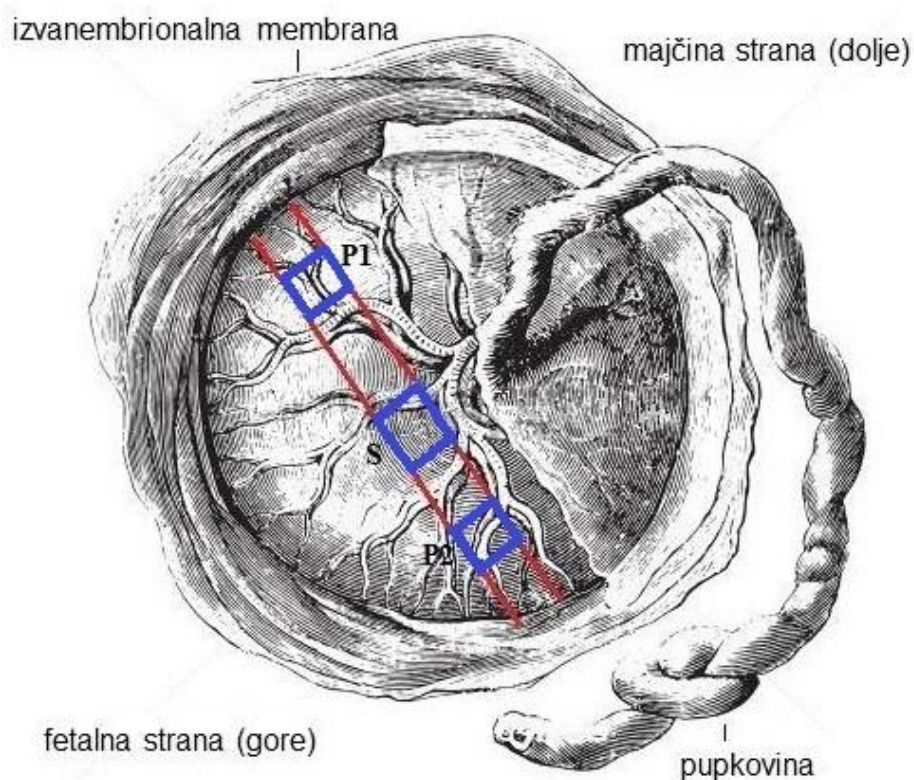
3.3.1 Uzorkovanje krvi/ seruma majke i pupkovine

Uzorci krvi majke i pupkovine prikupljeni su u dvije epruvete posebnog stupnja čistoće s obzirom na metale. Za analize toksičnih (Cd, Pb i Hg) i esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu i Se) uzorci pune krvi prikupljeni su u epruvete s K₂-EDTA (4 ml) i u epruvete (6 ml) bez antikoagulansa (*BD Vacutainer® Trace Element*, Becton Dickinson, SAD) iz kojih se mogu odvojiti serumi. Krvni serumi odvojeni su u matičnom laboratoriju u skladu s preporukama za sakupljanje bioloških uzoraka za analizu elemenata u tragovima (Cornelis i sur., 1995). Nakon spontanog koaguliranja tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi centrifugiranjem 20 minuta na 3000 okretaja/min (centrifuga s hlađenjem Hettich Rotanta/R, tip 3501, Hettich-Zentrifugen, Njemačka) i pažljivim dekantiranjem odvojeni su serumi u čiste polietilenske epruvete (*CryoPure Tube*, Sarstedt, Njemačka). Uzorci pune krvi i seruma pohranjeni su potom u zamrzivaču na temperaturi -20 °C do predviđenih analiza.

3.3.2 Prikupljanje posteljica i uzorkovanje posteljičnog tkiva za analize elemenata i steroidnih hormona

Cijele posteljice s ostacima pupčane vrpce i plodovih ovoja stavljene su neposredno nakon porođaja u označene plastične vrećice sa zatvaračem i nakon dostavljanja u laboratorij pohranjene su u zamrzivaču na temperaturi -20 °C do uzorkovanja posteljice za analize elemenata i steroidnih hormona. Prije uzorkovanja svaka posteljica je odmrznuta i tri puta isprana u fiziološkoj otopini (0,9 % otopini natrijeva klorida pripremljenoj iz kristaličnog NaCl, min. 99,5 %, p.a., Kemika, Hrvatska). Posteljica je položena hrapavom, majčinom stranom na upijajuću podlogu i upijen je suvišak tekućine iz cijeloga organa. Odrezani su ostaci pupčane vrpce i izvanembrionalnih membrana te je zabilježena masa svježe posteljice. Svaka posteljica zatim je prerezana keramičkim nožem duž organa i uzorkovana na tri mjesta (slika 9). Jedan uzorak izrezan je iz središnjeg dijela posteljice izbjegavajući mjesto spajanja

pupkovine (središnji uzorak, S) a dva uzorka na mjestima između središnjeg i vanjskog dijela unutar najmanje 3 cm od vanjskog ruba posteljice (periferni uzorci, P1 i P2). Svakom uzorku (1 - 3 g) potom su odrezani površni dijelovi debljine 1 - 2 mm, s fetalne strane uključujući korionsku ovojnicu i s maternalne strane, tako da je uzorak za analizu u najvećem dijelu sadržavao tkivo trofoblasta. Uzorci su potom isprani u demineraliziranoj vodi i analizirani su elementi u sva tri uzorka, a za analizu steroidnih hormona dva periferna uzorka su združena u jedan periferni uzorku. Za statističku obradu su uzete srednje vrijednosti za pojedini element, odnosno steroidni hormon po svakoj posteljici.



Slika 9. Mjesta uzorkovanja posteljice iz središnjeg (S) i perifernih dijelova organa (P1 i P2) nakon što su odstranjeni ostaci izvanembrionalnih membrana i pupčane vrpce.

3.4 Metode

3.4.1 Analiza esencijalnih i toksičnih metala metodom ICP-MS

3.4.1.1 Popis kemikalija i opreme

Uređaji i oprema

- masena spektrometrija induktivno spregnute plazme (ICP-MS) Agilent 7500cx, Agilent Technologies, Njemačka
- visokotlačni mikrovalni uređaj za razaranje UltraCLAVE IV, Milestone, Italija
- teflonske (PTFE) epruvete s čepovima (za razaranje uzoraka), 12 mL Milestone, Italija
- kvarcni sustav za pročišćavanje HNO₃ SubPUR, Milestone, Italija
- GenPure, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Njemačka
- teflonske bočice (FEP) za čuvanje konc. HNO₃, Nalgene, SAD
- polietilenske epruvete, 2 mL, *CryoPure Tube*, Sarstedt, Njemačka
- polipropilenske epruvete, 5 mL, Sarstedt, Njemačka

Standardi elemenata za optimiranje uvjeta rada uređaja ICP-MS

- otopina litija (Li), $\rho = 1001 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina magnezija (Mg), $\rho = 1001 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina kobalta (Co), $\rho = 1004 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina itrija (Y), $\rho = 1004 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina cerija (Ce), $\rho = 1002 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina talija (Tl), $\rho = 1004 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina selena (Se), $\rho = 1026 \text{ mg/L}$, Merck, Njemačka

Standardi pojedinačnih elemenata za pripremu otopine unutarnjeg standarda

- otopina skandija (Sc), $\rho = 100,5 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina germanija (Ge), $\rho = 999 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina rodija (Rh), $\rho = 1005 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina lutecija (Lu), $\rho = 995 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina iridija (Ir), $\rho = 999 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina terbija (Tb), $\rho = 100,7 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada

Standardi pojedinačnih elemenata za pripremu otopina radnih standarda

- otopina željeza (Fe), $g = 1005 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina cinka (Zn), $g = 1003 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina bakra (Cu), $g = 1007 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina selena (Se), $g = 1026 \text{ mg/L}$, Merck, Njemačka
- otopina kadmija (Cd), $g = 1004 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina olova (Pb), $g = 999 \text{ mg/L}$, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina žive (Hg), $g = 1000 \text{ mg/L}$, Merck, Njemačka

Referentni materijali

- Whole blood lyophilized Level I, II, III, Recipe ClinChek®, Njemačka
- Seronorm™ Trace element Whole Blood Level I, II, Sero AS, Norveška
- Serum Control lyophilised Level I, II, Recipe ClinChek®, Njemačka
- Seronorm™ Trace Elements Serum Level I, II, Sero AS, Norveška
- Plasma Control lyophilised Level I, II, Recipe ClinChek®, Njemačka
- CRM-278R Mussel Tissue, IRMM, JRC, Belgija
- BCR-185R Bovine Liver, IRMM, JRC, Belgija
- BCR-186R Trace elements in lyophilised Pig Kidney, IRMM, JRC, Belgija
- SRM1577b Bovine Liver, NIST, SAD

Kemikalije

- pročišćena konc. HNO_3 – dobivena iz HNO_3 , 65 % (p.a.), Merck, Njemačka
- konc. HCl , 30 % (s.p.), Merck, Njemačka
- NH_3 , 35 %, BDH Chemicals Ltd., UK
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), 97 %, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Triton X-100 (polietilenglikol oktil fenol eter), BDH Chemicals Ltd., UK
- Kemex A, Kemika, Hrvatska
- ultračista H_2O , specifične vodljivosti: $0,055 \mu\text{S/cm}$ (pri 25°C ; $18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$)

Plinovi

- Ar, plazma plin, čistoće $>99.999 \%$, UTP d.o.o., Zagreb, Hrvatska - SOL Group, Italija
- He, kolizijski plin, čistoće $>99.9999 \%$, UTP d.o.o., Zagreb, Hrvatska - SOL Group, Italija
- H_2 , kolizijski plin, čistoće $>99.999 \%$, UTP d.o.o., Zagreb, Hrvatska - SOL Group, Italija

3.4.1.2 Postupak pranja laboratorijskog posuđa za analizu elemenata

Kako bi se spriječila vanjska kontaminacija uzoraka metalima prije upotrebe laboratorijsko posuđe korišteno u analizi elemenata namakano je nekoliko sati u detergentu. Potom je isprano vodovodnom vodom, a zatim destiliranom vodom. Tako oprano posuđe uronjeno je u 10 % HNO_3 na 24 sata. Na kraju postupka pranja slijedi ispiranje posuđa ultračistom vodom. Teflonske epruvete korištene u postupcima razaranja uzoraka uz prethodno navedeni postupak pranja prošle su još i postupak pranja s 50 % HNO_3 na visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE.

3.4.1.3 Priprema bioloških uzoraka za analizu metala metodom ICP-MS

Priprema uzoraka majčinih seruma i seruma krvi pupkovine

Neposredno prije analize esencijalnih i toksičnih elemenata ICP-MS uzorci majčinih seruma i seruma krvi pupkovina razrijeđeni su alkalnom otopinom (0,7 mM amonijaka, 0,01 mM EDTA i 0,07 % (v/v) Tritona X-100) 20 puta (150 μL uzorka i 2,85 mL alkalne otopine). U sve uzorke seruma dodan je unutarnji standard u koncentraciji od 2 $\mu\text{g/L}$.

Priprema uzoraka venske krvi majke i krvi pupkovine

Uzorci venske krvi majki i pupkovina za analizu elemenata pripremljeni su na dva načina: metodom razrjeđenja i razaranja. Uzorci krvi pripremljeni metodom razrjeđenja razrijeđeni su alkalnom otopinom (0,7 mM amonijaka, 0,01 mM EDTA i 0,07 % (v/v) Tritona X-100) 80 puta (50 μL uzorka i 4 mL alkalne otopine) neposredno prije analize elemenata. Uzorci pripremljeni metodom razaranja pripremljeni su na način da je uzeto 500 μL uzorka i stavljeno u čiste teflonske epruvete, zatim je dodano 2 mL koncentrirane dušične kiseline te je sve skupa ostavljeno da reagira 10 do 15 minuta, potom je dodano 2 mL ultračiste vode. Tako pripremljene epruvete zatvorene su odgovarajućim teflonskim čepom i postavljene na stalak te su uzorci stavljani u visokotlačni mikrovalni uređaju UltraCLAVE IV na razaranja prema programu prikazanom u tablici 3. Nakon razaranja i hlađenja uzorci su nadopunjeni s ultračistom vodom na ukupni volumen od 5 mL i pohranjeni na sobnoj temperaturi do analize esencijalnih i toksičnih elemenata. Neposredno prije same ICP-MS analize razoreni uzorci krvi razrijeđeni su s 1 % (v/v) dušičnom kiselinom 7,5 puta (400 μL uzorka i 2,6 mL 1 % HNO_3). U sve uzorke krvi, razrijeđene i razorene, dodan je unutarnji standard u koncentraciji od 2 $\mu\text{g/L}$.

Tablica 3. Temperaturni program za razaranje bioloških uzoraka (krvi i posteljice) u visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE IV (Milestone, Italija).

	T (min:s)	E (W)	T (°C)	P (bar)
1.	5	1000	80	100
2.	10	500	130	100
3.	4:30	1000	180	120
4.	6:30	1000	220	130
5.	20	1000	220	130

Također smo za obje metode pripreme uzoraka krvi odredili granicu detekcije i točnost metoda (prikazano dalje u tekstu; poglavlje 3.4.1.6). Međutim zbog niže granice detekcije i mogućnosti kontaminacije uzoraka prilikom dugotrajne pripreme te zbog jednostavnosti pripreme uzoraka razrjeđenjem, u ovome doktorskome radu za daljnju obradu rezultata uzeti su rezultati za venske krvi majke i pupkovina dobiveni analizom uzoraka pripremljenih metodom razrjeđenja.

Priprema uzoraka posteljice

Uzorci posteljice razoreni su u visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE IV prema programu prikazanom u tablici 3. Svaki izrezani uzorak stavljen je u čistu teflonsku epruvetu, dodano je 4 mL koncentrirane dušične kiseline, ostavljeno je reagirati 10 do 15 minuta i potom dodano 2 mL ultračiste vode te su epruvete zatvorene teflonskim čepom. Nakon razaranja u UltraCLAVE IV i hlađenja uzorci su nadopunjeni ultračistom vodom na ukupni volumen od 8 mL i pohranjeni su na sobnoj temperaturi do analize esencijalnih i toksičnih elemenata. Neposredno prije ICP-MS analize razoreni uzorci razrijeđeni su 1 % (v/v) dušičnom kiselinom 20 puta (150 μ L uzorka i 2,85 mL 1 % HNO_3). U svaki uzorak dodan je unutarnji standard u koncentraciji od 2 μ g/L.

3.4.1.4 Priprema standardnih otopina

Priprema standardne otopine za ugađanje uvjeta mjerenja

Otopine za ugađanje uvjeta mjerenja koncentracije 1 μ g/L pripremljene su iz monoelementnih standardnih otopina Li, Mg, Co, Y, Ce, Tl i Se spektralne čistoće za ICP izvore u 5 % (v/v) dušičnoj kiselini i u smjesi 5 % (v/v) dušične kiseline i 0,1 % (v/v) klorovodične kiseline.

Priprema otopine unutarnjeg standarda

Otopina unutarnjeg standarda pripremljena je iz monoelementnih standardnih otopina Sc, Ge, Rh, Lu, Ir i Tb. Koncentracija svakog elementa u pripremljenoj otopini unutarnjeg standarda iznosila je 100 µg/L. Pripremljena otopina unutarnjeg standarda dodavana je u sve uzorke i standarde za kalibraciju tako da je koncentracija svakog unutarnjeg standarda u mjernoj otopini iznosila 2 µg/L.

Priprema standardnih otopina esencijalnih i toksičnih metala

Iz monoelementnih standardnih otopina spektralne čistoće pripremljena je smjesa esencijalnih (Fe, Zn, Cu, Se) i toksičnih (Cd, Pb) elemenata u 5 % (v/v) dušičnoj kiselini. Smjesa esencijalnih i toksičnih elemenata služila je za pripremu radnih standarda korištenih za izradu kalibracijskih krivulja. Svaki dan, neposredno prije analize pripremljena je standardna otopina Hg u koncentraciji od 20 µg/L u smjesi 5 % dušične kiseline i 1 % klorovodične kiseline te su iz nje dalje pripremani radni standardi. Radni standardi pripremljeni su u 1 % (v/v) dušičnoj kiselini. U tablici 4 prikazano je kalibracijsko koncentracijsko područje za svaki određivani element analiziran ICP-MS u biološkim uzorcima krvi (razrijeđenoj i razorenoj), seruma i posteljica.

Tablica 4. Kalibracijsko koncentracijsko područje radnih standarda za određivanje esencijalnih i toksičnih elemenata u razrijeđenoj i razorenoj krvi, serumu i posteljici.

	Fe (mg/L)	Zn (µg/L)	Cu (µg/L)	Se (µg/L)	Cd (µg/L)	Pb (µg/L)	Hg (µg/L)
kalibracijski pravac (8 standarda), $r^2 > 0,9995$							
razrijeđena krv							
koncentracijsko područje	0,5 - 15	5 - 300	5 - 500	0,1 - 15	0,02 - 2	0,3 - 30	0,3 - 4
razorena krv							
koncentracijsko područje	0,5 - 15	10 - 500	10 - 500	0,1 - 15	0,02 - 2	0,3 - 35	0,2 - 3
serum							
koncentracijsko područje	0,5 - 10	20 - 500	20 - 500	0,2 - 20	0,02 - 2	0,3 - 30	0,3 - 4
posteljica							
koncentracijsko područje	0,5 - 15	10 - 500	10 - 500	0,1 - 15	0,02 - 2	0,3 - 35	0,3 - 4

3.4.1.5 Optimiranje uvjeta rada na ICP-MS

Mjerni parametri i osjetljivost instrumenta podešavaju se prije svake ICP-MS analize. Osjetljivost instrumenta podešava se pomoću otopine koja sadrži 1 µg/L elemenata litija (Li), Mg, kobalta (Co), itrija (Y), cerija (Ce), talija (Tl) i Se. Kako bi se podesila odgovarajuća osjetljivost prati se odziv detektora na masama 7 (Li), 89 (Y) i 205 (Tl), koje pokrivaju mjerno područje detektora u području niskih, srednjih i visokih masa te istovremeno i omjeri dvostruko nabijenih iona ($^{140}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^{+}$) i oksida elemenata ($^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^{+}/^{140}\text{Ce}^{+}$) u odnosu na jednostruko nabijene ione. Optimalni uvjeti su kada se postigne zadovoljavajuća osjetljivost (variranjem napona na lećama, dubine unosa uzorka, protoka plina nosioca) uz minimalno nastajanje dvostruko nabijenih iona (<2,2 %) i iona oksida (<1,4 %) Tipični optimirani uvjeti za analizu elemenata ICP-MS metodom prikazani su u tablici 5. Osim navedenog, podešava se i tzv. P/A faktor pomoću otopina standarda analita sa širokim rasponom koncentracija. Ovisno o broju iona koji dolaze na njega, detektor ICP-MS uređaja ih bilježi kao analogne (manja osjetljivost) ili pulsne signale (veća osjetljivost). Zato u pulsnom načinu rada detektor mjeri niske koncentracije elemenata, a visoke u analognom. Za dobivanje linearne kalibracijske krivulje u širokom koncentracijskom području analiza potrebno je odrediti P/A faktor čiju vrijednost potom programski paket koristi za korekciju koncentracija mjerenih u ta dva načina detekcije signala.

Tablica 5. Uvjeti rada ICP-MS uređaja Agilent 7500cx.

parametar			
RF Snaga	1550 W		
RF faktor	1,72 V		
udaljenost plamenika i konusa	8,3 mm		
horizontalna os plamenika	0,9 mm		
vertikalna os plamenika	-0,1 mm		
brzina peristaltičke pumpe	0,08 rps		
protok plazma plina	15 L/min		
protok plina za razrjeđenje	0,13 L/min		
protok plina nosioca	1,05 L/min		
raspršivač	MicroMist (kvarc)		
komora za raspršenje	Scott (kvarc), hlađena na 2°C		
konusi od Ni, promjer otvora	1 mm <i>Sampling cone</i> ; 0,4 mm <i>Skimmer cone</i>		
dvostruko nabijeni ioni i oksidi	$^{140}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^{+}<2,2\%$; $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^{+}/^{140}\text{Ce}^{+}<1,4\%$		
kolizijski/reakcijski plin	bez plina	He	H₂
protok kolizijskog/reakcijskog plina	/	4 mL/min	3,6 mL/min
napon na leći 1	0 V	2,8 V	1,5 V
napon na leći 2	-129 V	-147 V	-129 V
mjereni izotopi analita	^{202}Hg	^{63}Cu , ^{68}Zn , ^{114}Cd , ^{208}Pb	^{54}Fe , ^{78}Se

3.4.1.6 Validiranje ICP-MS metode

Određivanje granica detekcije i kvantifikacije

Osim o osjetljivosti mjernog uređaja i mogućim spektralnim interferencijama detekcijska granica u najvećoj mjeri ovisi o čistoći otopina i laboratorijskog posuđa koje se rabi u postupcima uzorkovanja i pripremi. Granica detekcije (LoD) i granica kvantifikacije (LoQ) izračunate su kao srednja vrijednost slijepa probe (u pripremi uzoraka razrjeđenjem i/ili razaranjem) uvećana za tri standardne devijacije (3σ) za granicu detekcije, odnosno deset standardnih devijacija (10σ) za granicu kvantifikacije. U tablici 6 prikazane su granice detekcije i kvantifikacije za svaki određivani element u biološkim uzorcima krvi (razrijeđenoj i razorenoj), seruma i posteljica.

Tablica 6. Granica detekcije (LoD) i granica kvantifikacije (LoQ) za svaki određivani element u razrijeđenoj i razorenoj krvi, serumu i posteljici

	Fe (mg/L)	Zn (μ g/L)	Cu (μ g/L)	Se (μ g/L)	Cd (μ g/L)	Pb (μ g/L)	Hg (μ g/L)
razrijeđena krv							
LoD	0,001	0,4	0,01	0,004	0,0001	0,0006	0,0009
LoQ	0,004	1,7	0,06	0,01	0,0006	0,003	0,004
razorena krv							
LoD	0,0002	0,8	0,02	0,004	0,0002	0,0007	0,001
LoQ	0,0009	5,0	0,1	0,01	0,0006	0,003	0,004
serum							
LoD	0,002	0,4	0,01	0,002			
LoQ	0,004	1,7	0,05	0,01			
posteljica							
LoD	0,0003	0,9	0,03	0,004	0,0002	0,0009	0,001
LoQ	0,001	6,2	0,1	0,01	0,0008	0,004	0,005

Ispitivanje točnosti i preciznosti

Za ispitivanje točnosti i preciznosti ICP-MS metode rabljeni su komercijalno dostupni referentni materijali krvi (*Whole blood lyophilized Level I, II, III*, i *SeronormTM Trace element Whole Blood Level I, II*) i seruma/ plazme (*Serum Control lyophilised Level I, II*, *Plasma Control lyophilised Level I, II* i *SeronormTM Trace Elements Serum Level I, II*), te različitih tkiva (*CRM-278R Mussel Tissue*, *BCR-185R Bovine Liver* i *BCR-186R Trace elements in lyophilised Pig Kidney* i *SRM1577b Bovine Liver*). Svi referentni materijali su rekonstituirani dodatkom ultračiste vode prema propisanom protokolu i korišteni su za potvrdu točnosti i

preciznosti metode. Uzorci referentnih materijala za krv, serum i tkivo pripremljeni su na isti način kao i biološki uzorci ispitanica (razrjeđenjem i razaranjem). Tijekom analiza elemenata u biološkim uzorcima provedenim u ovome istraživanju, pripremljeno je po sedam uzoraka svakog referentnog materijala. U tablici 7. prikazane su njihove izmjerene i referentne koncentracije dobivene pripremom uzoraka metodom razrjeđenja, dok tablica 7 u prilogu 1 prikazuje izmjerene koncentracije dobivene pripremom uzoraka metodom razaranja.

Preciznost ispitivanih metoda analize elemenata za različite načine pripreve krvi (razrjeđenjem i razaranjem krvi mikrovalovima), serum te posteljicu ispitana je upotrebom komercijalno dostupnih referentnih materijala tako da je za preciznost unutar dana pripremljeno sedam pripravaka od svakog referentnog materijala, a preciznost između dana određena je mjerenjem istih referentnih materijala tri dana za redom. Preciznost metode izražena je kao relativno standardno odstupanje (RSD) te je unutar dana bila <3 %, a između dana <6 %. Također, pouzdanost i točnost ICP-MS metode provjeravana je i redovitim mjesečnim sudjelovanjem u međunarodnim programima kontrole kvalitete analize elemenata u tragovima u serumu i krvi (*UK External Quality Assessment Scheme, University of Surrey, UK* i *Occupational and Environmental Laboratory Medicine, Société Française de Biologie Clinique, Francuska*) tijekom cijelog razdoblja istraživanja prikazanih u ovom doktorskom radu.

Tablica 7. Usporedba dobivenih i certificiranih vrijednosti analiziranih elemenata u upotrebljenim referentnim materijalima (1/2 nastavka).

ClinChek® Whole blood Control							
element	razina I		razina II		razina III		
	certificirana vrijednost (raspon)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrijednost (raspon)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrijednost (raspon)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	
Cd (µg/L)	1,3 (1,04 - 1,56)	1,3 ± 0,02	3,04 (2,43 - 3,65)	2,79 ± 0,06	6,57 (5,26 - 7,88)	6,11 ± 0,08	
Cu (mg/L)	0,670 (0,536 - 0,804)	0,671 ± 0,003	1,08 (0,918 - 1,24)	1,08 ± 0,01	1,64 (1,39 - 1,89)	1,70 ± 0,02	
Fe (mg/L)	/	/	/	/	/	/	
Hg (µg/L)	1,2 (0,840 - 1,56)	1,1 ± 0,02	3,04 (2,28 - 3,80)	3,33 ± 0,07	6,23 (4,98 - 7,48)	6,70 ± 0,04	
Pb (µg/L)	57,8 (46,2 - 69,4)	58,4 ± 0,7	231 (185 - 277)	237 ± 6,0	441 (375 - 507)	450 ± 18	
Se (µg/L)	72,1 (57,7 - 86,5)	66,4 ± 2,3	111 (88,8 - 133)	100 ± 5,0	134 (107 - 161)	118 ± 1,0	
Zn (mg/L)	4,59 (3,90 - 5,28)	4,35 ± 0,46	6,25 (5,31 - 7,19)	6,59 ± 0,20	7,95 (6,76 - 9,14)	8,48 ± 0,10	

ClinChek® Serum Control				ClinChek® Plasma Control				
element	razina I		razina II		razina I		razina I	
	certificirana vrij. (raspon)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrij. (raspon)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrij. (raspon)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrij. (raspon)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)
Cd (µg/L)	0,233 (0,163 - 0,303)	0,235 ± 0,003	4,42 (3,32 - 5,53)	4,39 ± 0,07	2,38 (1,90 - 2,86)	2,20 ± 0,06	11,1 (8,88 - 13,3)	12,3 ± 0,2
Cu (mg/L)	0,817 (0,654 - 0,980)	0,744 ± 0,004	1,625 (1,30 - 1,95)	1,60 ± 0,04	0,848 (0,673 - 1,018)	0,806 ± 0,02	1,401 (1,121 - 1,681)	1,358 ± 0,01
Fe (mg/L)	0,866 (0,779 - 0,953)	1,0 ± 0,004	1,698 (1,528 - 1,868)	1,90 ± 0,01	0,806 (0,645 - 0,967)	0,888 ± 0,02	1,165 (0,932 - 1,398)	1,239 ± 0,01
Hg (µg/L)	1,98 (1,39 - 2,57)	1,92 ± 0,04	11,0 (8,8 - 13,2)	10,6 ± 0,2	2,41 (1,81 - 3,01)	2,19 ± 0,06	9,99 (7,99 - 12,0)	9,25 ± 0,2
Pb (µg/L)	/	/	/	/	/	/	/	/
Se (µg/L)	83,3 (62,5 - 104)	76,3 ± 1,4	129 (103 - 155)	123 ± 9	81,0 (64,8 - 97,2)	80,9 ± 0,7	118 (94,4 - 142)	121 ± 4
Zn (mg/L)	0,943 (0,754 - 1,132)	0,948 ± 0,02	1,884 (1,601 - 2,167)	1,9 ± 0,02	1,417 (1,134 - 1,70)	1,410 ± 0,02	1,826 (1,552 - 2,10)	1,858 ± 0,04

Seronorm™ Trace Elements Whole Blood				Seronorm™ Trace Elements Serum				
element	razina I		razina II		razina I		razina I	
	certificirana vrij. (95% interval pouzdanosti)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrij. (95% interval pouzdanosti)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrij. (95% interval pouzdanosti)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrij. (95% interval pouzdanosti)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)
Cd (µg/L)	0,36 (0,32 - 0,40)	0,34 ± 0,01	5,8 (5,4 - 6,2)	5,9 ± 0,1	0,126	0,129 ± 0,01	0,130	0,136 ± 0,004
Cu (mg/L)	0,68 (0,41 - 0,95)	0,66 ± 0,01	1,33 (0,79 - 1,87)	1,41 ± 0,01	1,691 (1,523 - 1,859)	1,58 ± 0,02	2,887 (2,689 - 3,085)	2,965 ± 0,02
Fe (mg/L)	339	353 ± 9,0	319	322 ± 6,0	1,39 (1,23 - 1,55)	1,32 ± 0,01	2,03 (1,77 - 2,29)	1,93 ± 0,07
Hg (µg/L)	1,5 (0,90 - 2,10)	1,6 ± 0,03	16,0 (9,6 - 22,4)	15,5 ± 0,3	0,62 (0,52 - 0,7)	0,78 ± 0,06	1,87 (1,57 - 2,17)	1,90 ± 0,03
Pb (µg/L)	10,2 (6,0 - 14,4)	10,9 ± 0,4	310 (186 - 434)	329 ± 10	1,02	1,0 ± 0,08	1,11	1,12 ± 0,02
Se (µg/L)	59 (35 - 83)	55 ± 1,0	112 (66 - 158)	108 ± 2,0	107 (93 - 121)	97 ± 0,7	163 (143 - 183)	150 ± 0,2
Zn (mg/L)	4,4 (4,0 - 4,8)	4,8 ± 0,03	6,5 (5,8 - 7,2)	6,5 ± 0,08	1,738 (1,596 - 1,880)	1,749 ± 0,03	2,520 (2,108 - 2,932)	2,555 ± 0,06

Certificirane vrijednosti su prikazane s rasponom ili 95% intervalom pouzdanosti, dok su dobivene vrijednosti prikazane kao srednja vrijednost ± SD.

Tablica 7. Usporedba dobivenih i certificiranih vrijednosti analiziranih elemenata u upotrebljenim referentnim materijalima (2/2 nastavka).

element	Bovine liver BCR® 185R		Pig kidney BCR® 186R		Mussel tissue BCR® 278R		Bovine liver NIST SRM 1577b	
	certificirana vrij. (mj. nesigurnost)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrij. (mj. nesigurnost)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrij. (mj. nesigurnost)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrij. (mj. nesigurnost)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)
Cd (mg/kg)	0,544 (0,017)	0,538 ± 0,004	2,71 (0,15)	2,6 ± 0,2	0,348 (0,007)	0,350 ± 0,003	0,50 (0,03)	0,51 ± 0,03
Cu (mg/kg)	277 (5)	277 ± 9	31,9 (0,4)	31,2 ± 0,1	9,45 (0,13)	10,1 ± 0,3	160 (8)	162 ± 14
Fe (mg/kg)	/	/	299 (10)	296 ± 7	/	/	184 (15)	188 ± 14
Hg (mg/kg)	(0,004 - 0,007)	0,0049 ± 0,0001	1,97 (0,04)	1,97 ± 0,07	0,196 (0,009)	0,196 ± 0,005	/	/
Pb (mg/kg)	0,172 (0,009)	0,186 ± 0,002	0,306 (0,011)	0,311 ± 0,03	2,0 (0,04)	1,9 ± 0,05	0,129 (0,004)	0,124 ± 0,01
Se (mg/kg)	1,68 (0,14)	1,73 ± 0,017	10,3 (0,5)	10,4 ± 0,1	1,84 (0,10)	1,81 ± 0,04	0,73 (0,06)	0,78 ± 0,004
Zn (mg/kg)	138,6 (2,1)	144,8 ± 1,4	128 (3)	131 ± 4	83,1 (1,7)	90,4 ± 1,4	127 (16)	134 ± 2

Certificirane vrijednosti su prikazane s rasponom i mjernom nesigurnosti, dok su dobivene vrijednosti prikazane kao srednja vrijednost ± SD.

3.4.2. Genotipizacija polimorfizma *MT2A* rs28366003

3.4.2.1 Popis kemikalija i opreme

Uređaji i oprema

- PCR sustav (*polymerase chain reaction*) GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems, Kanada
- UV-VIS spektrofotometar BioSpec NANO, Shimadzu, Japan
- PowerPac 1000 (*Power-supply*), Bio-Rad, Kanada
- ThermoMixer F1.5, Eppendorf, Njemačka
- kada za elektroforezu model E0763, Sigma-Aldrich, Njemačka

Kemikalije

- set reagencija za izolaciju DNA, QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Njemačka
- FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack, Roche, Švicarska
- PCR pufer 10×, s MgCl₂, Roche, Švicarska
- početnica F (*forward-prednja*) i R (*reverse-zadnja*), TIB Molbiol, Njemačka
- agarozna (*high resolution*), Sigma-Aldrich, Njemačka
- etidijev bromid (EtBr), Sigma-Aldrich, Njemačka
- bromfenol-plavo, pH 3,0 – 4,6, Sigma-Aldrich, Njemačka
- restriksijski enzim BsgI, 250 jedinica, New England BioLabs, UK
- CutSmart pufer 10×, New England BioLabs, UK
- S-adenozilmetionin (SAM), 32 mM, New England BioLabs, UK
- tris[hidroksimetil]aminometan (Tris), Trizma baze®, Sigma-Aldrich, Njemačka
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), 97 %, Sigma-Aldrich, Njemačka
- ledena octena kiselina, CH₃COOH, Kemika, Hrvatska
- destilirana H₂O (*aqua purificata*), Yasenka, Hrvatska
- sterilna H₂O (*aqua pro injectione*), Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska

3.4.2.2 Postupak izolacije i umnožavanja DNA

Iz uzoraka pune krvi majke izolirana je DNA na mini spin kolonama prema uputama proizvođača (QIAamp DNA Blood Mini Kit). Odmah nakon izolacije, u uzorcima je izmjerena koncentracija stanične DNA mjerenjem apsorbancije na 260 nm na spektrofotometru BioSpec-nano. Osim koncentracije, određen je stupanj čistoće izolirane DNA iz omjera apsorbancija izmjerenih na 260 nm i 280 nm i smatran je zadovoljavajući za

vrijednosti $A_{260}/A_{280} > 1,8$ (manje vrijednosti omjera upućuju na veći sadržaj proteina u uzorcima). Uzorci izolirane DNA pospremljeni su u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do sljedećeg koraka, umnožavanja DNA.

Genomska DNA je umnožena metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) na uređaju GeneAmp PCR System kako bi se pojačao signal od 241 parova baza. Umnožavanje genomske DNA provedeno je u $25\text{ }\mu\text{L}$ reakcijskoj smjesi koja je sadržavala $0,5\text{ }\mu\text{L}$ dNTP, $2,5\text{ }\mu\text{L}$ PCR pufera, $0,5\text{ }\mu\text{L}$ početnica F (*forward* – prednja) i R (*reverse* – zadnja), $0,15\text{ }\mu\text{L}$ FastStart Taq DNA Polimeraze, $5\text{ }\mu\text{L}$ GC Rich PCR smjese, $1,5\text{ }\mu\text{L}$ genomske DNA i $14,35\text{ }\mu\text{L}$ sterilne H_2O . Uvjeti PCR za umnožavanje DNA prikazani su u tablici 8. Postupak umnožavanja DNA sastoji se od nekoliko stupnjeva: prvi stupanj je denaturacija DNA pri temperaturi 94 do $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri čemu nastaju jednostruki lanci DNA. Drugi stupanj umnožavanja DNA je vezanje početnica pri temperaturi 50 do $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zadnji stupanj umnožavanja je sinteza novog lanca DNA uz pomoć termostabilne polimeraze pri temperature $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzastopnim ponavljanjem tih stupnjeva sintetizira se milijun kopija određenog ulomka DNA. Za umnožavanje ulomaka DNA rabljene su sljedeće početnice:

MT2A F: 5' - CGC CTG GAG CCG CAA GTG AC

MT2A R: 5' - TGG GCA TCC CCA GCC TCT TA

Tako umnoženi ulomci DNA čuvani su u hladnjaku na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje analize.

Tablica 8. Uvjeti za umnožavanje genomske DNA pomoću lančane reakcije polimeraze, PCR.

	broj ciklusa	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	vrijeme (min)
početna denaturacija	1	95	5
denaturacija	35	94	1
vezanje ishodnica		60	1
sinteza novog lanca		72	1
završna sinteza	1	72	10
hlađenje		4	∞

Kvaliteta umnožene genomske DNA ispitana je elektroforezom na 2% agaroznom gelu s etidijevim bromidom u kadi za elektroforezu modela E0763 uz pomoć uređaja PowerPac 1000. Agarozni gel pripremljen je otapanjem $1,5\text{ g}$ agaroze u $73,5\text{ mL}$ H_2O , zagrijavanjem do vrenja i dodavanjem $2\text{ }\mu\text{L}$ etidij bromida i $150\text{ }\mu\text{L}$ $50\times$ TAE pufera. TAE puffer ($50\times$) pripremljen je otapanjem 242 g Trizma baze u 600 mL destilirane H_2O ,

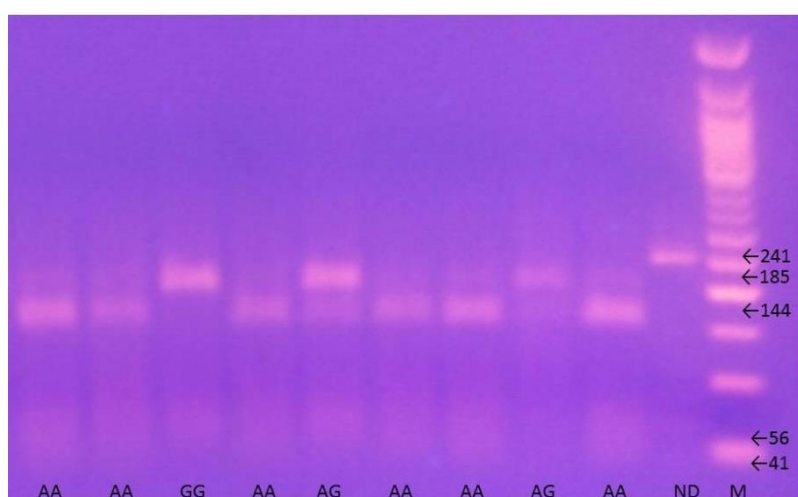
dodavanjem 57,1 mL ledene octene kiseline i 100 mL 0,5 M EDTA te nadopunjavanjem destiliranom H₂O do ukupnog volumena od 1 L.

3.4.2.3 Postupak genotipizacije polimorfizma *MT2A* rs28366003 RFLP metodom

Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata DNA (RFLP) temelji se na utvrđivanju mjesta mutacije PCR fragmenta kidanjem pomoću restrikcijskih endonukleaza. Fragmenti karakteristični za prisutnost alela A su 144, 56 i 41 parova baza, dok prisutnost alela G karakterizira 185 i 56 parova baza (slika 10).

Nakon umnožavanja DNA, 8 µL PCR produkta dodano je u restrikcijsku smjesu za digestiju, koja je pripravljena od 5 µL CutSmart pufera, 0,8 µL S-adenozilmetionina (SAM) i 1 µL enzima BsgI. Razgradnja se provodi 1 sat i 45 minuta na temperaturi 37 °C u ThermoMixer-u F1.5 prema proceduri preuzetoj prema Kayaalti i sur. (2011). Nakon razgradnje produkti se oboje bromfenol plavilom i uzorci odvajaju elektroforezom na 2 % agaroznom gelu s etidijevim bromidom te vizualiziraju pod UV lampom.

Metoda je provjerena ponavljanjem postupka genotipizacije u 30 nasumično odabranih uzoraka.



Slika 10. Prikaz karakterističnih parova baza alela A i G dobivenih elektroforezom na 2 % agaroznom gelu (ND – nedigestirani uzorak, M – marker).

Umnažanje DNA i genotipizacija *MT2A* provedena je u suradnji sa Zavodom za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.4.3 Analiza steroidnih hormona u posteljici

3.4.3.1 Popis kemikalija i opreme

Uređaji i oprema

- VITROS ECI Immunodiagnostic System, Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, UK
- uređaj za liofilizaciju Hetosic, HETO Ltd., Njemačka
- ručni homogenizator Homogenizer Power Gen 125, Fisher Scientific UK Ltd., UK
- centrifuga s hlađenjem Hettich Rotanta/R, tip 3501, Hettich-Zentrifugen, Njemačka

Kemikalije

- set reagensija Ortho Clinical Diagnostics reagents, Johnson & Johnson, UK
- natrijev klorid, NaCl, za pripremu fiziološke otopine, Kemika, Hrvatska
- etanol, C₂H₅OH, 96%, Kemika, Hrvatska

3.4.3.2 Priprema uzoraka posteljica za analizu steroidnih hormona

Uzorci posteljice za analizu steroidnih hormona pripremljeni su prema metodi opisanoj u radu Piasek i suradnici (2001). Uzorci su isprani u fiziološkoj otopini i suvišak tekućine upijen filter papirom, izvagani i nasjeckani škaricama nakon čega je u svaki dodano po 5 mL 75 % etanola u svrhu ekstrahiranja steroidnih hormona. Uzorci su ostavljeni u hladnjaku na +4 °C preko noći i sljedećeg jutra homogenizirani na ledu ručnim homogenizatorom. Homogenat svakog uzorka podijeljen je u dva alikvota od 500 µL u koji je dodano 3 mL 75 % etanola, dobro izmiješano i razdijeljeno u dvije epruvete. Nakon toga uzorci su centrifugirani (15 min na 15000 g), supernatanti odvojeni u polietilenske epruvete s poklopcem, zamrznuti na -20 °C, liofilizirani i liofilizati pohranjeni u zamrzivaču na -20 °C do analize hormona progesterona i estradiola.

3.4.3.3 Postupak analize steroidnih hormona

Za određivanja steroidnih hormona liofilizati supernatanta nakon gore opisane pripreme uzoraka posteljice rekonstituirani su dodavanjem 1 mL fiziološke otopine. U tim uzorcima analizirani su hormoni progesteron (P4) i estradiol (E2) imunokemijski metodom IEMA s luminiscentnim supstratom na analizatoru VITROS ECI uporabom seta reagensija. Iz dobivenih vrijednosti, uzimajući u obzir masu uzorka svježe posteljice izračunate su

koncentracije progesterona i estradiola u posteljici. Analiza hormona provedena je u suradnom laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Rebro, Zagreb.

3.4.4 Analiza proteina metalotioneina 2 (MT2) u serumu

3.4.4.1 Popis kemikalija i opreme

Uređaji i oprema

- čitač mikrotitarskih pločica TECAN Infinite F50, TECAN Group Ltd, Švicarska
- uređaj za inkubaciju Grant-bio PHMP-4, Grant Instruments, UK
- uređaj za ispiranje mikropločica ELx50 Washer, BioTek Instruments, SAD

Kemikalije

- set reagencija SEB868Hu (*ELISA Kit for Metallothionein 2 (MT2)*), Cloud-Clone Corp, USCN Life Science Kit Inc, SAD

3.4.4.2 Postupak analize metalotioneina 2 (MT2)

Koncentracija MT2 u serumu majki određena je imunokemijski metodom ELISA uporabom seta reagencija SEB868Hu. Prema uputama proizvođača pripremljene su reagencije koje su potom korištene u daljnjoj analizi. Po 100 μ L uzoraka i standarda dodano je u jažice koje su obložene antitijelom konjugiranim biotinom specifičnim za MT2. Mikropločica sa standardima i uzorcima potom je inkubirana 2 sata na 37 °C. Inkubacija je provedena pomoću uređaja Grant-bio PHMP-4. Nakon inkubacije je ostatak tekućine uklonjen iz jažica pomoću uređaja ELx50 Washer, potom je dodano 100 μ L detekcijskog reagensa A i mikropločica s reagensijama inkubirana 1 sat na 37 °C. Ostatak tekućine je zatim uklonjen iz jažica i jažice su isprane s 350 μ L otopine za pranje. Postupak uklanjanja i pranja ponovljen je 3 puta. U jažice je potom dodano 100 μ L detekcijskog reagensa B i inkubacija na 37 °C nastavljena 30 min. Slijedi ponovljen korak uklanjanja tekućine i ispiranja 5 puta. U jažice je zatim dodano 90 μ L otopine TMB supstrata nakon čega se za 15 - 25 min na 37 °C razvija plava boja, a dodavanjem 50 μ L STOP otopine događa se promjena boje iz plave u žutu. Na valnoj duljini od 450 nm spektrofotometrijski je određena apsorbancija. Mjerenje apsorbancije provedeno je na uređaju TECAN Infinite F50. Koncentracija MT2 izračunata je iz standardnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije svakog standarda poznate koncentracije.

3.4.5 Analiza ukupnih tiolnih (–SH) skupina u serumu

3.4.5.1 Popis kemikalija i opreme

Uređaji i oprema

- UV-VIS spektrofotometar Cary 50, Varian, Australija

Kemikalije

- Ellmanov reagens, 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojevom) kiselina (DTNB), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Tris-EDTA pufer, pH 8,0, Sigma-Aldrich, Njemačka
- apsolutni metanol, CH₃OH, Merck, Njemačka
- destilirana H₂O, (*Aqua purificata*), Yasenka, Hrvatska

3.4.5.2 Postupak analize ukupnih tiolnih (–SH) skupina

Koncentracija ukupnih tiolnih skupina u serumu majki određena je spektrofotometrijski s Ellmanovim reagensom metodom modificiranoj prema Hu (1994). Detalji pripreme uzoraka prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Priprema uzoraka seruma, slijepe probe seruma i slijepe probe reagensa (preuzeto iz Starčić, 2014).

	uzorak	slijepe proba uzorka	slijepe proba reagensa
Tris-EDTA pufer, pH 8,0	150 µL	150 µL	150 µL
destilirana voda	/	10 µL	50 µL
apsolutni metanol	790 µL	790 µL	790 µL
uzorak seruma	50 µL	50 µL	/
DTNB	10 µL	/	10 µL

Pripremljeni uzorci seruma i slijepih proba su inkubirani 20 min na sobnoj temperaturi, centrifugirani 10 min na 3000 g i u supernatantu nakon centrifugiranja izmjerena je apsorbancija na 412 nm na uređaju Cary 50.

Koncentracija tiolnih skupina u pojedinom uzorku izračunata je pomoću jednadžbe:

$$c = \frac{A_{uz} - A_{spuz} - A_{spr}}{\epsilon b}$$

A_{uz} – apsorbancija uzorka

A_{spuz} – apsorbancija slijepe probe uzorka

A_{spr} – apsorbancija slijepe probe reagensa

ϵ – apsorbancijski koeficijent TNB-a, $13,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

b – duljina puta svjetlosti kroz uzorak, cm

3.4.6 Statistička obrada podataka

Za svaki analizirani parametar provedeno je testiranje normalnosti distribucije pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i SD za varijable koje slijede normalnu distribuciju, a kao medijan i interkvartilni raspon (25 - 75 %) za asimetrične varijable. Za vrijednosti koncentracija elemenata u biološkim uzorcima koje su bile ispod granice detekcije (LOD) uzeto je LOD/2 kao vrijednost za daljnju statističku obradu. Razlike između općih karakteristika ispitanica iz kontinentalne i priobalne Hrvatske testirane su Studentovim t-testom ili Mann–Whitneyovim U -testom.

Razlike između više grupa testirane su dvofaktorskom analizom varijance (*two way ANOVA*) i *post hoc* Tukeyovim testom za nejednak broj uzoraka (učinak pušenja i područja prebivališta) te jednofaktorskom analizom varijance (*one way ANOVA*) te *post hoc* Bonferronievim testom (učinak unosa hrane morskoga podrijetla), nakon što su podaci u varijablama s asimetričnom raspodjelom logaritmiranjem transformirani (\ln) tako da slijede normalnu raspodjelu. Zbog relativno maloga broja ispitanika s AG/GG genotipom razlike između AA i AG/GG genotipova testirane su Mann–Whitneyovim U -testom.

Korelacije između toksičnih i esencijalnih elemenata u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine, dobi majke, broja popušanih cigareta, učestalosti unosa hrane morskoga podrijetla, broja amalgamskih zubnih ispuna, polimorfizma *MT2A* te porođajne mase i duljine analizirane su Spearmanovom korelacijom s obzirom na nenormalnu distribuciju većine varijabli. Pearsonovom linearnom korelacijom (nakon logaritamske transformacije asimetričnih varijabli) testirane su povezanosti koncentracija elemenata između različitih matrica: krvi majke, posteljici i krvi pupkovine. Prilikom tumačenja vrijednosti Pearsonovih i Spearmanovih koeficijenta korelacije u obzir su uzete Coltonove (1974) empirijske preporuke za biološke sustave: vrijednosti r od 0 do 0,25 (ili od 0 do -0,25) upućuju kako je povezanost

vrlo slaba ili je nema, vrijednosti r od 0,25 do 0,50 (ili od -0,25 do -0,50) upućuju na slabu povezanost među varijablama, vrijednosti r od 0,50 do 0,75 (ili od -0,50 do -0,75) upućuju na umjerenu do dobru povezanost, te vrijednosti r od 0,75 do 1 (ili od -0,75 do -1) upućuju na vrlo dobru do izvrsnu povezanost među varijablama (Dawson i Trapp, 2004).

Metodom postupne višestruke regresije određeni su prediktori koji doprinose koncentraciji Cd, Pb i Hg u krvi majke i posteljici te prediktori koji doprinose koncentraciji esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu i Se) u posteljici i krvi pupkovine. U analizirani model uključene su sljedeće nezavisne varijable: područje prebivališta, dob majke, obrazovanje majke, broj porođaja, prirast tjelesne mase u trudnoći, broj popušanih cigareta na dan, unos hrane morskoga podrijetla na tjedan, uzimanje vitaminskih/mineralnih dodataka prehrani i polimorfizam *MT2A*. U analizi prediktora esencijalnih elemenata u posteljici i krvi pupkovine u model su pored gore navedenih varijabli bile uključene koncentracije Cd, Pb i Hg te analiziranog elementa u krvi majke i/ ili posteljici, a spol djeteta i masa posteljice, pored svega navedenog, dodani su kao nezavisne varijable u analizu prediktora porođajne mase i duljine.

Razina statističke značajnosti postavljena je na 5 % ($p < 0,05$). Za statističku obradu rezultata korišten je program Dell Statistica ver. 13 (Dell Inc., SAD). Za grafičke prikaze korišten je GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc).

4. REZULTATI

4.1 Opće značajke ispitanica i novorođenčadi s obzirom na naviku pušenja i geografsko područje prebivanja parova majka–novorođenče

Opće karakteristike ispitanica–rodilja nepušačica i pušačica koje prebivaju u dva različita geografska područja, kontinentalnoj i priobalnoj Hrvatskoj, prikazane su u tablici 10.

U kontinentalnom području, u skupini nepušačica bile su 123 ispitanice, a u skupini pušačica 73 ispitanice. Srednja dob nepušačica bila je 30 (raspon 21 - 42), a pušačica 28 (raspon 18 - 41). Među nepušačicama srednju stručnu spremu imalo je 59 %, višu stručnu spremu 11 %, visoku stručnu spremu 27 % ispitanica, a samo mali postotak ispitanica (3 %) imalo je stupanj obrazovanja niži od srednje škole. U pušačica odnos stručnih sprema bio je drugačiji, 75 % ispitanica imalo je srednju, 1 % višu i 14 % ispitanica visoku stručnu spremu, a stupanj obrazovanja niži od srednje stručne spreme bio je u 10 % ispitanica.

U priobalnom području, u skupini nepušačica bilo je 49 ispitanica, a u skupini pušačica 47 ispitanica. Srednja dob nepušačica bila je 31 (raspon 21 - 39), a pušačica 28 (raspon 19 - 38). Među nepušačicama stupanj obrazovanja niži od srednje škole imalo je 8 %, srednju stručnu spremu 61 % i visoku stručnu spremu 31 % ispitanica. Među pušačicama najveći postotak od 72 % ispitanica imalo je srednju, 9 % višu i 15 % visoku stručnu spremu, a stupanj obrazovanja niži od srednje škole imalo je 4 % ispitanica.

Prema osobnoj procjeni (samoodređenjem), pasivnom pušenju bilo je izloženo 56 % nepušačica i 77 % pušačica iz kontinentalnoga područja te 65 % nepušačica i 79 % pušačica iz priobalnoga područja. Pušačice iz kontinentalnoga područja imale su veći prirast tjelesne mase tijekom trudnoće, pušile su 7,3 (1,5 - 25) cigareta na dan i više su bile izložene pasivnom pušenju na poslu ili u kući u odnosu na nepušačice ($p < 0,05$). Pušačice iz priobalnoga područja pušile su 7,6 (1,2 - 25) cigareta na dan. Pušačice iz kontinentalnog područja su tijekom trudnoće pušile veći broj cigareta u odnosu na pušačice iz priobalnog područja ($p < 0,05$). Broj porođaja i masa posteljice nisu se razlikovale između ispitivanih skupina niti s obzirom na naviku pušenja, niti na geografsko područje prebivanja.

U kontinentalnoj Hrvatskoj, 18 % nepušačica i 23 % pušačica konzumiralo je tijekom trudnoće povremeno alkohol, dok takve podatke o konzumaciji alkohola nemamo za ispitanice iz priobalne Hrvatske. Veliki postotak ispitanica (>60 %) uzimao je vitaminske i/ ili mineralne pripravke, a manji dio ispitanica (<15 %) tijekom trudnoće uzimao je neki dodatak prehrani s Fe.

Tablica 10. Opće značajke ispitanica i broj nepušačica i pušačica u ispitivanim geografskim područjima njihovog prebivanja.

parametar	kontinentalna HR		priobalna HR	
	nepušačice n = 123	pušačice n = 73	nepušačice n = 49	pušačice n = 47
dob (god)	30 (21 - 42)	28 (18 - 41)	31 (21 - 39)	28 (19 - 38)
obrazovanje				
bez obrazovanja (NKV)	4 (3 %)	7 (10 %)	4 (8 %)	2 (4 %)
srednja stručna sprema (SSS)	73 (59 %)	55 (75 %)	30 (61 %)	34 (72 %)
viša stručna sprema (VŠS)	13 (11 %)	1 (1 %)	0 (0 %)	4 (9 %)
visoka stručna sprema (VSS)	33 (27 %)	10 (14 %)	15 (31 %)	7 (15 %)
visina (cm)	168 ± 5,98	167 ± 6,35	168 ± 6,35	170 ± 4,92
prirast tjelesne mase (kg)	14,3 ± 4,55	16,9 ± 4,88*	14,1 ± 4,40	15,6 ± 4,98
broj porođaja	2 (1 - 5)	2 (1 - 5)	2 (1 - 3)	2 (1 - 5)
broj spontanih pobačaja	0 (0 - 1)	0 (0 - 5)	0 (0 - 3)	0 (0 - 3)
masa posteljice (g)	296 ± 61,3	290 ± 53,4	285 ± 56,8	297 ± 59,0
aktivno i pasivno pušenje				
broj cigareta na dan	0	7,3 (1,5 - 25)	0	7,6 (1,5 - 25)
broj cigareta na dan tijekom trudnoće		4 (0 - 20)		1,7 (0 - 20) ⁺
pušačke godine (<i>pack-year</i>) ¹	0	3,5 (0,10 - 23)	0	2,7 (0,44 - 26,2)
pasivno pušenje	69 (56 %)	56 (77 %)*	32 (65 %)	37 (79 %)
konzumiranje alkoholnih pića	22 (18 %)	17 (23 %)	N/P	N/P
mineralno-vitaminski dodaci	106 (86 %)	56 (77 %)	39 (80 %)	29 (62 %)
uzimanje Fe tijekom trudnoće	17 (14 %)	7 (10 %)	2 (4 %)	4 (9 %)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD ili medijan (raspon) ili broj (postotak).

N/P - nema podataka.

¹Pušačke godine (*pack-year*) = broj cigareta na dan/20 × godine pušenja.

Statistička razlika ($p < 0,05$) testirana je Studentovim *t*-testom, a za pušački indeks Mann-Whitney *U*-testom:

* značajna razlika između pušačica vs. nepušačica unutar područja prebivališta;

⁺ značajna razlika u pušačica ili nepušačica između priobalnog i kontinentalnog područja prebivališta.

Podaci o općim karakteristikama novorođenčadi majki nepušačica i pušačica iz kontinentalne i priobalne Hrvatske prikazani su u tablici 11. Omjer broja novorođenih dječaka prema djevojčicama statistički značajno se razlikovao ($p < 0,03$) između kontinentalnog (1,13) i priobalnog područja (0,68) u ispitivanoj skupini. Prosječna porođajna masa i duljina bile su općenito veće ($p < 0,0003$) u dječaka (3590 ± 437 g i $51,9 \pm 2,13$ cm; $n = 143$) nego u djevojčica (3407 ± 412 g i $50,7 \pm 1,81$ cm; $n = 149$). Sva novorođenčad bila je dobrog zdravlja, s najvišim vrijednostima APGAR ocjena u prvoj i petoj minuti, pretežito 10/10. Niti jedan od mjerenih parametara (porođajna masa i duljina, APGAR) u sve novorođenčadi, kao ni razdijeljene po spolu djeteta, nije se značajno razlikovao s obzirom na naviku pušenja majki te područje prebivališta.

Tablica 11. Opće značajke novorođenčadi majki nepušačica i pušačica iz kontinentalne i priobalne Hrvatske.

	kontinentalna HR				priobalna HR			
	n	nepušačice	n	pušačice	n	nepušačice	n	pušačice
prosječni parametri novorođenčadi								
porođajna masa (g)	123	3537 ± 428	73	3489 ± 444	49	3408 ± 443	47	3497 ± 422
porođajna duljina (cm)	123	51,5 ± 2,16	73	51,2 ± 2,03	49	50,9 ± 1,97	47	51,2 ± 1,85
APGAR u 1. min	115	10 (7 - 10)	63	10 (7 - 10)	49	10 (8 - 10)	46	10 (9 - 10)
APGAR u 5. min	115	10 (8 - 10)	63	10 (9 - 10)	49	10 (8 - 10)	46	10 (9 - 10)
dječaci								
porođajna masa (g)	67	3606 ± 446	37	3579 ± 437	18	3509 ± 419	21	3628 ± 449
porođajna duljina (cm)	67	52,1 ± 2,32	37	51,8 ± 1,96	18	51,4 ± 2,12	21	51,8 ± 1,84
APGAR u 1. min	63	10 (7 - 10)	32	10 (7 - 10)	18	10 (8 - 10)	21	10 (9 - 10)
APGAR u 5. min	63	10 (8 - 10)	32	10 (9 - 10)	18	10 (8 - 10)	21	10 (9 - 10)
djevojčice								
porođajna masa (g)	56	3454 ± 394	36	3397 ± 437	31	3349 ± 353	26	3390 ± 374
porođajna duljina (cm)	56	50,9 ± 1,76	36	50,5 ± 1,90	31	50,6 ± 1,86	26	50,8 ± 1,78
APGAR u 1. min	52	10 (8 - 10)	31	9 (9 - 10)	31	10 (8 - 10)	25	10 (10)
APGAR u 5. min	52	10 (9 - 10)	31	10 (9 - 10)	31	10 (8 - 10)	25	10 (10)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD ili medijan (raspon).

4.2 Opće značajke ispitanica s obzirom na učestalost unosa hrane morskoga podrijetla i broj amalgamskih zubnih ispuna majke

Podaci o podijeli ispitanica s obzirom na unos hrane morskoga podrijetla na tjedan prikazani su u tablici 12. Razvidno je da ispitanice iz priobalnog područja konzumiraju više hrane morskoga podrijetla u odnosu na ispitanice iz kontinentalnog području. Od ukupno 196 ispitanica iz kontinentalnoga područja, 11 % ispitanica iskazalo je da uopće ne konzumira hranu morskoga podrijetla, 55 % ispitanica najviše jedan put na tjedan, 25 % ispitanica više od jednom do dva puta na tjedan, a samo 9 % ispitanica konzumiralo je hranu morskoga podrijetla više od dva puta na tjedan. Za razliku od njih, od ukupno 96 ispitanica iz priobalnog područja, 24 % ispitanica navelo je da konzumira morsku hranu više od dva puta na tjedan, 32 % ispitanica više od jednom put do dva puta na tjedan, 40 % ispitanica najviše jedan put na tjedan, a samo 4 % ispitanica nije uopće konzumiralo hranu morskoga podrijetla.

Tablica 12. Broj i postotak ispitanica s obzirom na učestalost unosa hrane morskog podrijetla.

učestalost unosa hrane morskoga podrijetla na tjedan	kontinentalna HR (n = 196)	priobalna HR (n = 96)
0 (ne konzumira)	21 (11 %)	4 (4 %)
konzumira najviše jedan put	108 (55 %)	38 (40 %)
konzumira više od jednom do dva puta	50 (25 %)	31 (32 %)
konzumira više od dva puta	17 (9 %)	23 (24 %)

Rezultati su prikazani kao broj (postotak).

Od ukupno 215 ispitanica koje su u anketnom upitniku navele broj amalgamskim zubnim ispuna, 18 % ispitanica iskazalo je da nema niti jednu amalgamsku ispunu, 31 % ispitanica imalo je 1 - 2 ispune, 21 % imalo je 3 - 4 ispune, dok je 30 % ispitanica imalo ≥ 5 amalgamskih zubnih ispuna (tablica 13).

Tablica 13. Broj i postotak ispitanica s obzirom na broj iskazanih amalgamskih zubnih ispuna.

ukupan broj amalgamskih zubnih ispuna (prema vlastitom iskazu)	sve ispitanice (n = 215)
0 ispuna	39 (18 %)
1-2 ispuna	66 (31 %)
3-4 ispuna	46 (21 %)
≥ 5 ispuna	64 (30 %)

4.3 Toksični i esencijalni elementi u majki i novorođenčadi s obzirom na naviku pušenja i geografsko područje prebivanja majke

4.3.1 Toksični metali Cd i Pb u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine

Koncentracije toksičnih metala Cd i Pb u krvi majke (KM), posteljici (PL) i krvi pupkovine (KP) u nepušačica i pušačica iz kontinentalne i priobalne Hrvatske prikazane su u tablici 14. Rezultati pokazuju da postoje učinci pušenja i područja prebivanja na koncentracije Cd u krvi majke i u posteljici. Razlike između pušačica i nepušačica u istraživanim područjima razlog su postojanja statističke interakcije za te parametre (testirano dvofaktorskom ANOVA-om). Interakcije u krvi su posljedica većih razina Cd u krvi pušačica u kontinentalnom području zbog većeg intenziteta pušenja (broj cigareta na dan) tijekom trudnoće u tih ispitanica ($p < 0,05$), a interakcije u posteljici radi značajnih razlika razina Cd u posteljici između nepušačica iz kontinentalnog i priobalnog područja. Rezultati provedenog *post hoc* testa (Tukey HSD za nejednak broj uzoraka) pokazuju da je Cd u krvi majke veći kod pušačica u odnosu na nepušačice u oba istraživana područja (1 to 3 puta u kontinentalnom, a 2 puta u priobalnom području). Koncentracije Cd u posteljici pušačica iz oba područja također su veće u odnosu na nepušačice (1,2 - 1,6 puta), ali je statistički značajna razlika nađena samo u ispitanica iz kontinentalnog područja. Nađeno je da nepušačice iz priobalnoga područja imaju značajno veće (oko 1,5 put) koncentracije Cd u posteljici u odnosu na nepušačice iz kontinentalnoga područja. Izmjerene koncentracije Cd u krvi pupkovine u pušačica i nepušačica su općenito vrlo niske ($< 0,1 \mu\text{g/L}$). Usprkos tome, rezultati pokazuju učinak pušenja i na koncentracije Cd u pupkovini.

Majčina navika pušenja cigareta utjecala je osim na Cd također na koncentracije Pb u svim mjerenim biološkim uzorcima (krvi majke, posteljici i krvi pupkovine), a geografsko područje prebivališta nije imalo utjecaj na koncentraciju Pb u biološkim uzorcima.

Tablica 14. Koncentracija Cd i Pb u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine u nepušačica i pušačica iz kontinentalne i priobalne Hrvatske.

	kontinentalna HR				priobalna HR				glavni učinak
	n	nepušačice	n	pušačice	n	nepušačice	n	pušačice	
Cd-KM (µg/L)	116	0,385 (0,300 - 0,490)	69	1,23 (0,69 - 2,31)*	49	0,448 (0,294 - 0,609)	47	0,758 (0,471 - 1,50)*, †	a, b, c
Cd-PL (µg/kg svježeg tkiva)	123	6,68 (5,15 - 9,57)	73	10,8 (8,8 - 14,8)*	48	9,99 (7,19 - 12,3)†	44	12,1 (8,36 - 14,4)	a, b, c
Cd-KP (µg/L)	115	0,056 (0,031 - 0,082)	69	0,077 (0,050 - 0,092)	49	0,047 (0,036 - 0,059)	47	0,061 (0,049 - 0,080)	a
Pb-KM (µg/L)	116	11,4 (9,0 - 15,1)	69	13,3 (11,5 - 17,3)	49	11,0 (9,4 - 13,8)	47	12,9 (9,68 - 16,5)	a
Pb-PL (µg/kg svježeg tkiva)	123	5,45 (3,64 - 8,09)	73	6,69 (4,25 - 9,37)	48	5,00 (3,75 - 6,32)	44	6,09 (4,76 - 8,90)	a
Pb-KP (µg/L)	115	6,76 (4,27 - 9,03)	69	8,55 (5,59 - 11,5)	49	5,63 (3,88 - 7,88)	47	6,84 (4,98 - 9,98)	a

Rezultati su prikazani kao medijan (25 - 75 % interkvartilni raspon).

KM: krv majke; KP: krv pupkovine; PL: posteljica (placenta).

Razlike između skupina ($p < 0,05$) testirane su dvofaktorskom ANOVA-om nakon transformacije varijabli logaritmiranjem i *post hoc* Tukeyovim testom HSD za nejednak broj uzoraka.

* Statistički značajna razlika između pušačica i nepušačica unutar geografskoga područja;

† Statistički značajna razlika između nepušačica ili pušačica iz kontinentalne i priobalne HR;

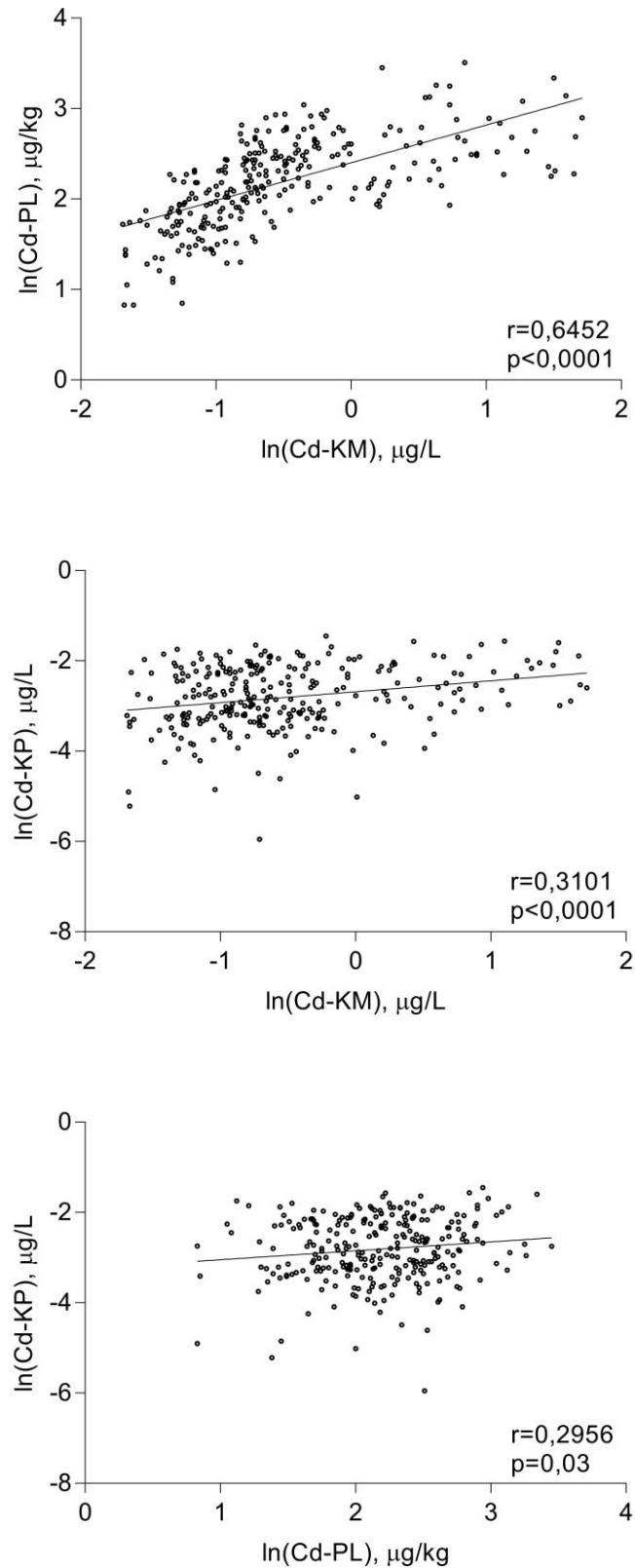
^a Statistički značajan glavni učinak pušenja;

^b Statistički značajan glavni učinak područja prebivališta;

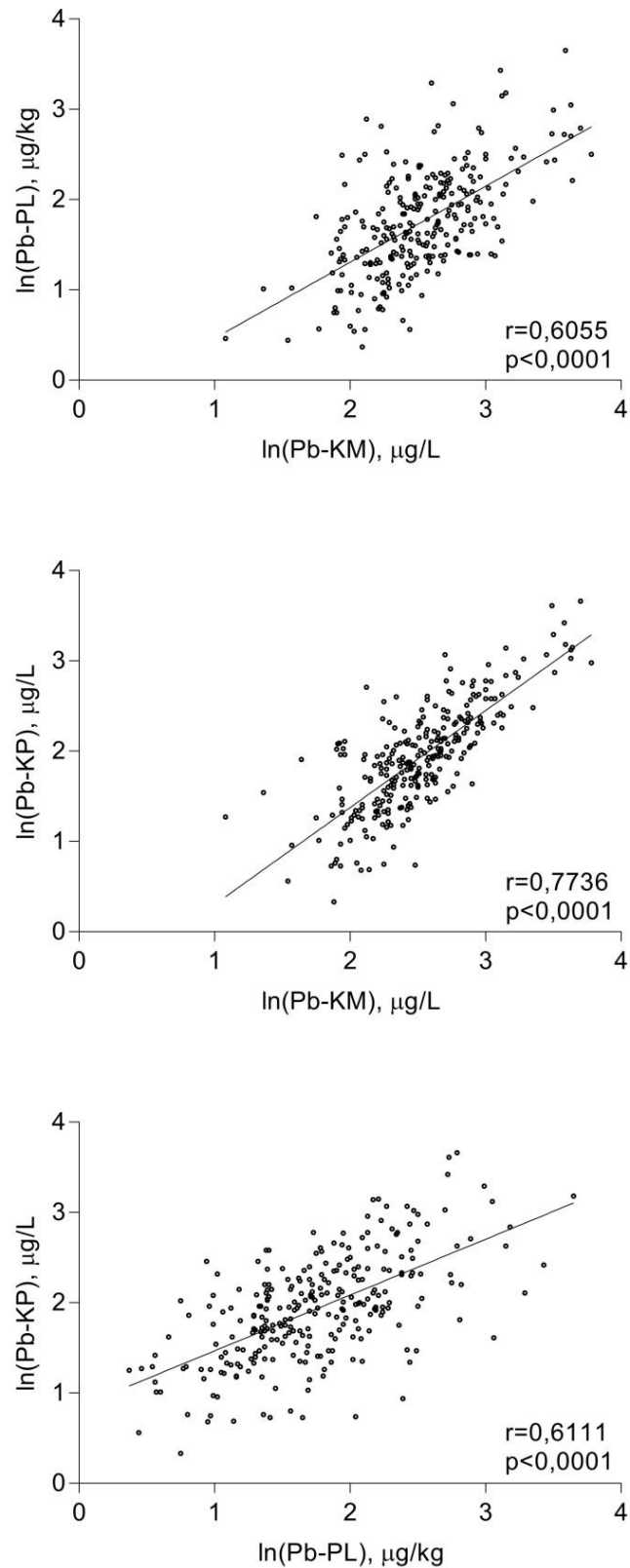
^c Statistički značajna interakcija između učinaka pušenja i područja prebivališta.

4.3.1.1 Korelacije koncentracija Cd i Pb između ispitivanih bioloških matrica

Na slikama 11 i 12 prikazane su korelacije između koncentracija ispitivanih toksičnih metala Cd i Pb u različitim biološkim uzorcima: krvi majke, posteljici i krvi pupkovine. Koncentracija Cd u krvi majke je dobro korelirana s Cd u posteljici ($r = 0,64$; $p < 0,0001$), dok je između Cd u krvi majke i krvi pupkovine te Cd u posteljici i krvi pupkovine nađena slaba korelacija ($r \approx 0,3$; $p < 0,05$). Također je nađena dobra korelacija između koncentracije Pb u krvi majke i Pb u posteljici ($r = 0,60$; $p < 0,0001$) te Pb u posteljici i Pb u krvi pupkovine ($r = 0,61$; $p < 0,0001$), a vrlo dobra između Pb u krvi majke i Pb u krvi pupkovine ($r = 0,77$; $p < 0,0001$).



Slika 11. Korelacije između koncentracije Cd u krvi majke (KM) [$\mu\text{g/L}$], posteljici (PL) [$\mu\text{g/kg}$ svježeg tkiva] i krvi pupkovine (KP) [$\mu\text{g/L}$] dobivene Pearsonovim linearnim korelacijskim testom (nakon transformacije varijabli logaritmiranjem radi postizanja normalne distribucije).



Slika 12. Korelacije između koncentracije Pb u krvi majke (KM) [$\mu\text{g/L}$], posteljici (PL) [$\mu\text{g/kg}$ svježeg tkiva] i krvi pupkovine (KP) [$\mu\text{g/L}$] dobivene Pearsonovim linearnim korelacijskim testom (nakon transformacije varijabli logaritmiranjem radi postizanja normalne distribucije).

U tablici 15 prikazani su koeficijenti Spearmanove korelacije između broja popušanih cigareta na dan i biljega izloženosti Cd i Pb u roditelja i novorođenčadi. Broj popušanih cigareta na dan pozitivno korelira s koncentracijom Cd u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine. Također, međusobno su pozitivno povezane koncentracije Cd u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine, kao i koncentracije Pb u sva tri navedena biološka uzorka.

Tablica 15. Spearmanov koeficijent korelacije (r_s) između broja popušanih cigareta, biomarkera izloženosti Cd i Pb u zdravih roditelja i novorođenčadi ($n = 292$).

parametar	Cd-KM	Cd-PL	Cd-KP	Pb-KM	Pb-PL	Pb-KP
broj cigareta	0,669	0,427	0,268	0,158	0,155	0,167
Cd-KM	-	0,719	0,294	0,333	0,180	0,263
Cd-PL		-	0,273	0,272	0,225	0,296
Cd-KP			-	0,137	0,177	0,197
Pb-KM				-	0,571	0,755
Pb-PL					-	0,594

Statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) kojima je $r_s \geq 0,25$ su podebljane.

KM: krv majke; KP: krv pupkovine; PL: posteljica (placenta).

4.3.2 Esencijalni elementi Fe, Zn, Cu i Se u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine

U tablici 16 prikazane su koncentracije esencijalnih elemenata Fe, Zn, Cu i Se u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine u nepušačica i pušačica iz kontinentalne i priobalne Hrvatske. Prikazani rezultati pokazuju da postoji učinak pušenja na koncentraciju Fe i Cu u krvi pupkovine, Zn u posteljici (veće vrijednosti u pušačica) i Se u krvi majke (niže vrijednosti u pušačica). Provedenim *post hoc* testom (Tukey HSD za nejednak broj uzoraka) nađeno je da pušačice imaju značajno veće koncentracije Cu u krvi pupkovine u odnosu na nepušačice u obadva istraživana područja.

Učinak područja prebivanja nađeno je na koncentracije Fe i Se u krvi pupkovine, Zn, Cu i Se u posteljici te Cu i Se u krvi majke. Nepušačice i pušačice iz priobalnoga područja u odnosu na kontinentalno područje imaju statistički značajno veće koncentracije Fe i Se u krvi pupkovine te Zn u posteljici, dok je koncentracija Se u krvi majke i posteljici značajno veća samo u nepušačica.

U ovome radu također su prema planu istraživanja analizirani esencijalni elementi u serumu. Nađene su značajne korelacije između pune krvi i seruma za sve elemente osim za Fe u krvi i serumu majke te Fe i Zn u krvi i serumu pupkovine (slika 13). S obzirom da smo primijetili veliki postotak hemolize u uzorcima seruma pupkovine, za daljnji prikaz i obradu rezultata korišteni su rezultati dobiveni analizom pune krvi majke i pupkovine.

Tablica 16. Koncentracija Fe, Zn, Cu i Se u krvi majke, posteljici te krvi pupkovine u nepušačica i pušačica iz kontinentalne i priobalne Hrvatske.

	kontinentalna HR		priobalna HR		n	nepušačice	n	pušačice	n	pušačice	glavni učinak
	n	nepušačice	n	pušačice							
Fe-KM (mg/L)	116	419 ± 52	69	412 ± 58	49	432 ± 65	47	427 ± 72			–
Fe-PL (mg/kg svježeg tkiva)	123	80,0 (67,1 - 96,3)	73	87,4 (67,5 - 103)	48	77,5 (63,4 - 94,6)	44	78,3 (66,2 - 90,2)			–
Fe-KP (mg/L)	115	530 ± 55	69	547 ± 50	49	569 ± 67†	47	588 ± 57†			a, b
Zn-KM (mg/L)	116	5,52 ± 0,99	69	5,73 ± 0,94	49	5,58 ± 0,76	47	5,48 ± 0,79			–
Zn-PL (mg/kg svježeg tkiva)	123	12,1 (10,7 - 14,1)	73	12,9 (11,4 - 14,3)	48	14,4 (13,9 - 15,5)†	44	15,8 (14,6 - 16,9)†			a, b
Zn-KP (mg/L)	115	2,77 ± 0,47	69	2,88 ± 0,49	49	2,67 ± 0,42	47	2,79 ± 0,44			–
Cu-KM (mg/L)	116	1,50 ± 0,32	69	1,50 ± 0,29	49	1,56 ± 0,27	47	1,61 ± 0,23			b
Cu-PL (mg/kg svježeg tkiva)	123	0,737 (0,652 - 0,870)	73	0,765 (0,678 - 0,862)	48	0,787 (0,711 - 0,873)	44	0,821 (0,769 - 0,873)			b
Cu-KP (mg/L)	115	0,564 ± 0,084	69	0,606 ± 0,094*	49	0,578 ± 0,080	47	0,631 ± 0,090*			a
Se-KM (µg/L)	116	75,4 ± 16,0	69	74,6 ± 13,6	49	89,5 ± 18,1†	47	81,9 ± 15,6			a, b
Se-PL (µg/kg svježeg tkiva)	123	167 (145 - 187)	73	166 (144 - 198)	48	196 (181 - 212)†	44	186 (177 - 204)			b
Se-KP (µg/L)	115	73,6 ± 12,2	69	73,3 ± 14,6	49	86,7 ± 13,4†	47	83,3 ± 12,8†			b

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD ili medijan (25 - 75 % interkvartilni raspon).

KM: krv majke; KP: krv pupkovine; PL: posteljica (placenta).

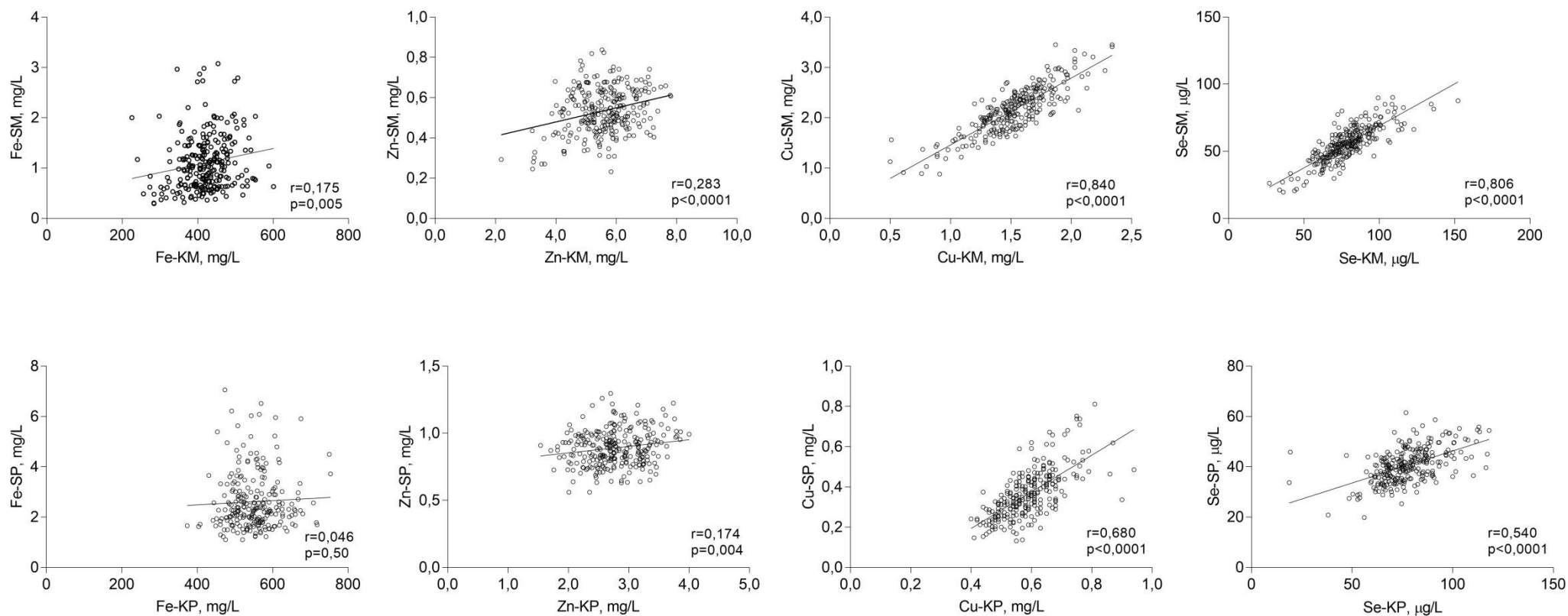
Razlike između skupina ($p < 0,05$) testirane su dvofaktorskom ANOVA-om nakon transformacije varijabli logaritmiranjem i *post-hoc* Tukeyovim testom HSD za nejednak broj uzoraka.

* Statistički značajna razlika između pušačica i nepušačica unutar geografskoga područja;

† Statistički značajna razlika između nepušačica ili pušačica iz kontinentalne i priobalne HR;

^a Statistički značajan glavni učinak pušenja;

^b Statistički značajan glavni učinak područja prebivališta;



Slika 13. Korelacije između koncentracija esencijalnih elemenata u krvi i serumu dobivene Pearsonovim linearnim korelacijskim testom.
SM: serum majke; SP: serum pupkovine; KM: krv majke; KP: krv pupkovine.

4.3.2.1 Korelacije koncentracija esencijalnih elemenata Fe, Zn, Cu i Se između ispitivanih bioloških matrica

U tablici 17 prikazani su koeficijenti Spearmanove korelacije između broja popušanih cigareta na dan i koncentracija esencijalnih elemenata u roditelja i novorođenčadi. Iz rezultata je vidljivo da broj popušanih cigareta na dan pozitivno korelira s koncentracijom Cu u krvi pupkovine. U krvi majke, Fe pozitivno korelira sa Zn i Se, Zn sa Se, Cu sa Se; u posteljici Fe korelira s Cu, Zn s Cu i Se; a u krvi pupkovine nađena je pozitivna korelacija između Fe i Cu te Fe i Se. Također, međusobno su pozitivno povezane koncentracije Zn u krvi majke i pupkovine, Cu u krvi majke i posteljici, a koncentracije Se su korelirale između sva tri biološka uzorka.

Tablica 17. Spearmanov koeficijent korelacije (r_s) između broja popušanih cigareta, biomarkera statusa esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu i Se) u zdravih roditelja i novorođenčadi ($n = 292$).

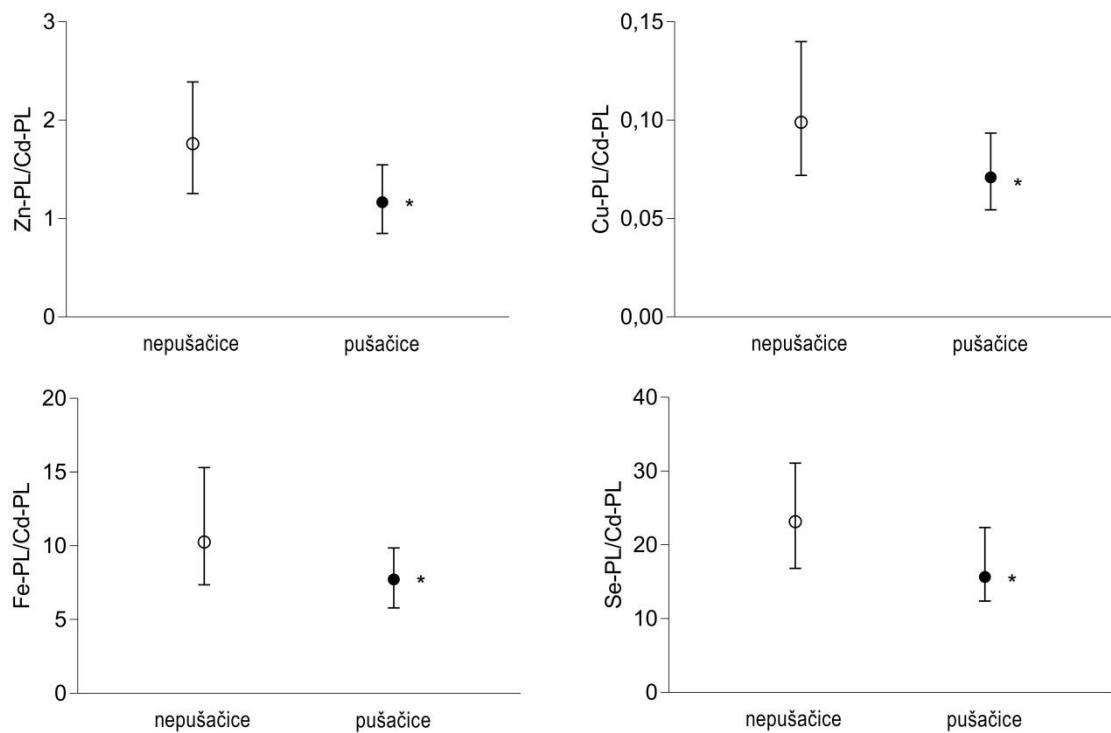
parametar	Fe-KM	Fe-PL	Fe-KP	Zn-KM	Zn-PL	Zn-KP	Cu-KM	Cu-PL	Cu-KP	Se-KM	Se-PL	Se-KP
broj cigareta	-0,008	0,081	0,200	0,056	0,173	0,100	0,061	0,093	0,268	-0,050	0,071	0,029
Fe-KM	-	0,077	0,100	0,423	-0,012	0,051	0,029	-0,138	0,029	0,341	-0,020	-0,091
Fe-PL		-	0,106	0,139	0,083	0,170	-0,035	0,292	0,180	0,012	-0,071	0,021
Fe-KP			-	-0,004	0,196	0,110	0,018	0,139	0,600	0,071	0,131	0,269
Zn-KM				-	0,214	0,341	0,187	0,199	0,108	0,307	0,011	-0,051
Zn-PL					-	0,142	0,071	0,468	0,127	0,132	0,416	0,193
Zn-KP						-	0,034	0,186	0,214	0,029	-0,051	0,016
Cu-KM							-	0,391	0,145	0,275	0,062	-0,040
Cu-PL								-	0,239	0,064	0,169	0,105
Cu-KP									-	0,021	0,052	0,123
Se-KM										-	0,266	0,523
Se-PL											-	0,364

Statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) kojima je $r_s \geq 0,25$ su podebljane.

KM: krv majke; KP: krv pupkovine; PL: posteljica (placenta).

4.3.3 Omjer esencijalnih elementa i Cd u posteljici s obzirom na naviku pušenja majke

Na slici 14 prikazani su omjeri medijana Fe/Cd, Zn/Cd, Cu/Cd i Se/Cd u posteljici. Rezultati pokazuju da osim povišene koncentracije Cd, pušačice u odnosu na nepušačice imaju snižene omjere esencijalnih metala i Cd u posteljici.



Slika 14. Omjer Fe/Cd, Zn/Cd, Cu/Cd i Se/Cd u posteljici (PL) nepušačica (○) i pušačica (●). Rezultati su prikazani kao medijan i 25 - 75 % interkvartilnim rasponom. Cd i Se su prikazani u $\mu\text{g}/\text{kg}$, a Fe, Zn i Cu u mg/kg . Razlika između pušačica ($n = 117$) i nepušačica ($n = 171$) testirana je Mann–Whitneyovim U -testom ($p < 0,05$) i označena je zvjezdicom (*).

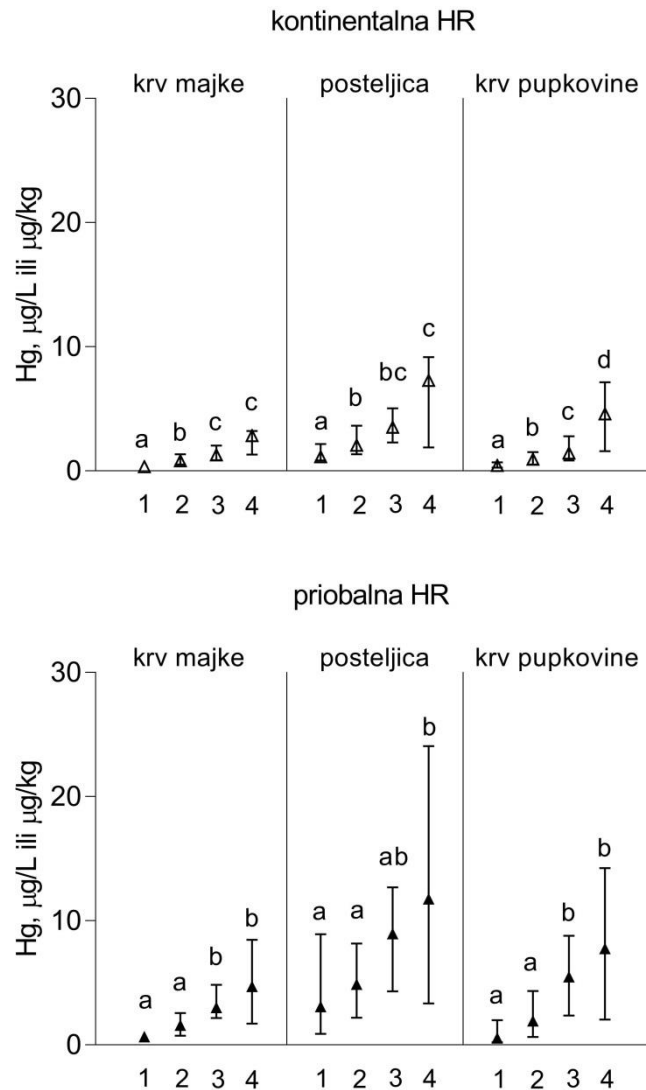
4.4 Hg i Se u majki i novorođenčadi s obzirom na unos hrane morskog podrijetla i amalgamske zubne ispune majke

4.4.1 Hg i Se u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine: utjecaj hrane morskoga podrijetla

Koncentracija Hg u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine s obzirom na učestalost unosa hrane morskoga podrijetla (uglavnom ribe) u kontinentalnoj i priobalnoj Hrvatskoj prikazana je na slici 15. Značajne razlike između podskupina označene su različitim slovima.

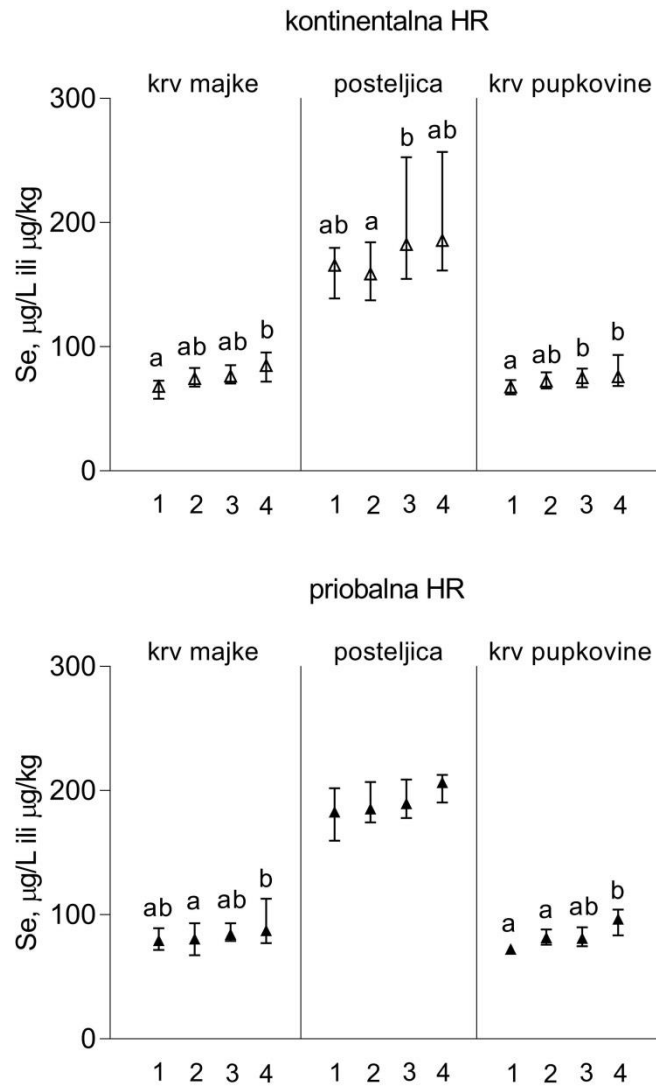
U svim mjerenim biološkim uzorcima s učestalom konzumacijom hrane morskoga podrijetla rasla je koncentracija Hg. Također, koncentracija Hg u krvi pupkovine veća je u odnosu na Hg u krvi majke. Ispitanice koje konzumiraju hranu morskoga podrijetla barem jedan puta na tjedan imaju koncentracija Hg u krvi majke 2 puta, u posteljici 1,5 puta i u krvi pupkovine 3 puta veću u odnosu na majke koje ne konzumiraju hranu morskoga podrijetla. Kod ispitanica koje konzumiraju hranu morskoga podrijetla više od dva puta na tjedan taj omjer je puno veći i kreće se u krvi majke oko 7 puta, u posteljici oko 3 puta i u krvi pupkovine više od 10 puta u odnosu na majke koje ne konzumiraju hranu morskoga podrijetla ($p < 0,0001$).

Na slici 16 prikazane su koncentracije Se u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine s obzirom na učestalost unosa hrane morskoga podrijetla roditelja iz kontinentalne i priobalne Hrvatske. Iz rezultata je vidljiv porast koncentracije Se s unosom hrane morskoga podrijetla. Ispitanice koje konzumiraju hranu morskoga podrijetla više od dva puta na tjedan u odnosu na ispitanice koje ne konzumiraju ili konzumiraju jedan puta na tjedan hranu morskoga podrijetla imaju 1,1 do 1,3 puta veće koncentracije Se u krvi majke i pupkovine ($p < 0,05$). Također ispitanice iz priobalnog područja imaju nešto veću koncentraciju Se u svim mjerenim biološkim uzorcima u odnosu na ispitanice iz kontinentalnog područja.



Slika 15. Koncentracije Hg u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine s obzirom na učestalost unosa hrane morskoga podrijetla u kontinentalnoj (Δ) i priobalnoj (\blacktriangle) HR. Rezultati su prikazani kao medijan i 25 - 75 % interkvartilni raspon. Razlike između skupina ($p < 0,05$) nakon transformacije varijabli logaritmiranjem testirane su jednofaktorskom ANOVA-om i *post hoc* Bonferronievim testom (broj uzoraka u svakoj podskupini naveden je u tablici 12).

- 1 – ne konzumira hranu morskoga podrijetla;
- 2 – konzumira hranu morskoga podrijetla najviše jedan puta na tjedan;
- 3 – konzumira hranu morskoga podrijetla više od jednom do dva puta na tjedan;
- 4 – konzumira hranu morskoga podrijetla više od dva puta na tjedan.

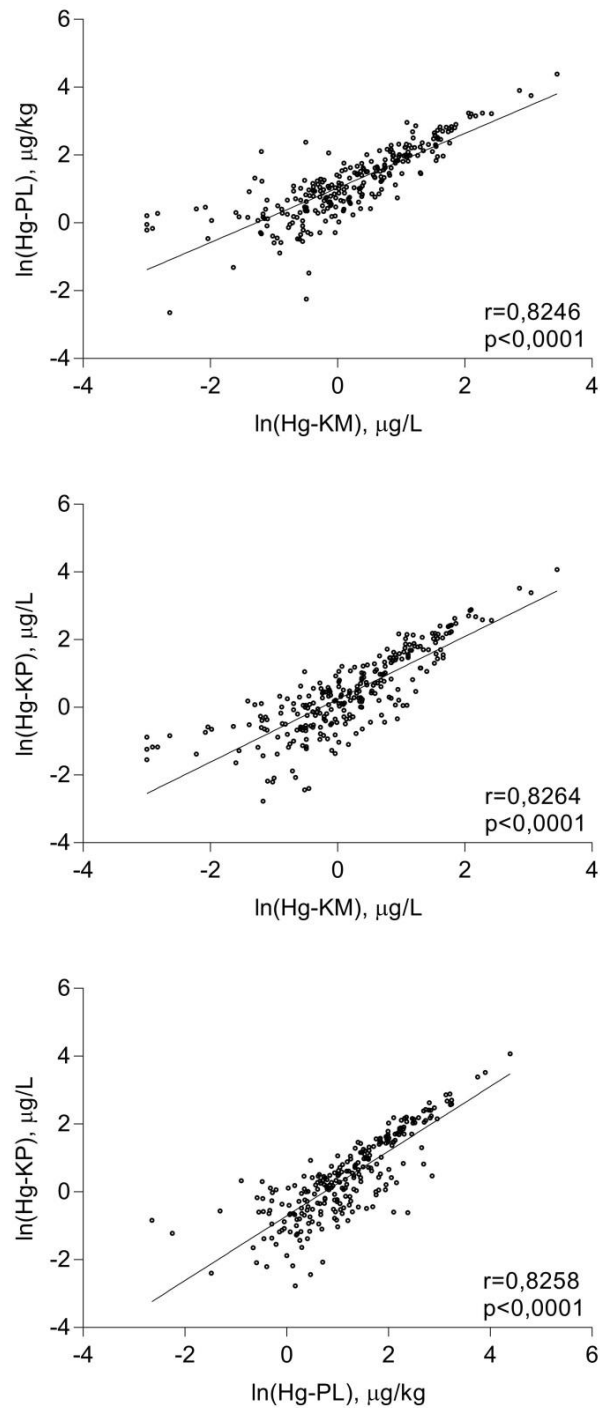


Slika 16. Koncentracije Se u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine s obzirom na učestalost unosa hrane morskoga podrijetla u kontinentalnoj (Δ) i priobalnoj (\blacktriangle) HR. Rezultati su prikazani kao medijan i 25 - 75 % interkvartilni raspon. Razlike između skupina ($p < 0,05$) nakon transformacije varijabli logaritmiranjem testirane su jednofaktorskom ANOVA-om i *post hoc* Bonferronievim testom (broj uzoraka u svakoj podskupini prikazan je u tablici 12).

- 1 – ne konzumira hranu morskoga podrijetla;
- 2 – konzumira hranu morskoga podrijetla najviše jedan puta na tjedan;
- 3 – konzumira hranu morskoga podrijetla više od jednom do dva puta na tjedan;
- 4 – konzumira hranu morskoga podrijetla više od dva puta na tjedan.

4.4.1.1 Korelacije koncentracija Hg između ispitivanih bioloških matrica

Korelacije između koncentracije Hg u krvi majke, krvi pupkovine i posteljici prikazane su na slici 17. Pearsonovi koeficijenti korelacije ($r > 0,80$; $p < 0,0001$) između sva tri mjerena biološka uzorka veći su od koeficijenata za ostale ispitivane metale.



Slika 17. Korelacije između koncentracije Hg u krvi majke (KM) [$\mu\text{g/L}$], posteljici (PL) [$\mu\text{g/kg}$] i krvi pupkovine (KP) [$\mu\text{g/L}$] dobivene Pearsonovim linearnim korelacijskim testom nakon transformacije varijabli logaritmiranjem radi postizanja normalne distribucije.

4.4.2 Hg u serumu majke i pupkovine s obzirom na amalgamske zubne ispune u majke: koncentracija u serumu kao biljeg izloženosti Hg⁰

U tablici 18 prikazane su koncentracije Hg u serumu majke, posteljici i serumu pupkovine u ispitanica s i bez amalgamskih zubnih ispuna. Ispitanice s amalgamskim ispunama imaju statistički veću koncentraciju Hg u serumu majke i pupkovine u odnosu na ispitanice bez amalgamskih ispuna, dok nije nađena razlika za koncentraciju Hg u posteljici.

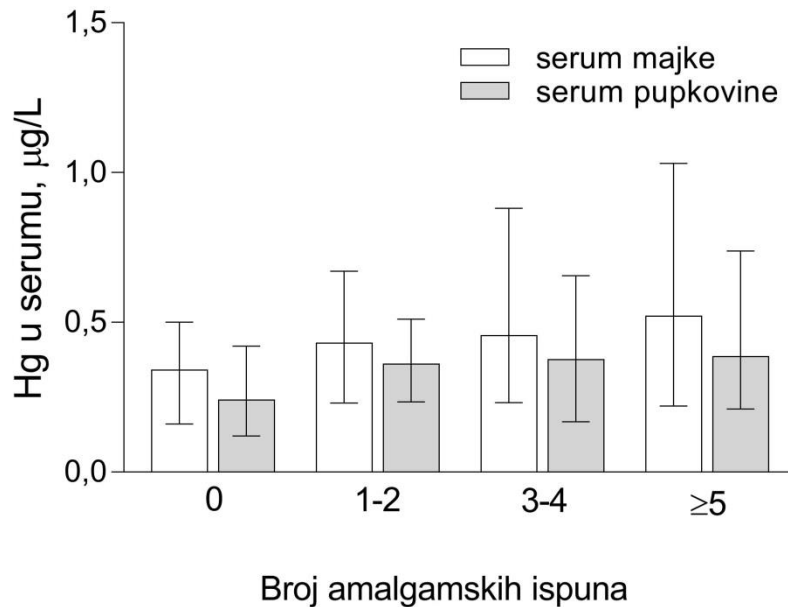
Na slici 18 prikazana je koncentracija Hg u serumu majke i pupkovine s obzirom na broj amalgamskih zubnih ispuna. S povećanjem broja amalgamskih zubnih ispuna majke postupno raste i koncentracija Hg u serumu majke i pupkovine, bez obzira na činjenicu da rezultati nisu korigirani na unos hrane morskog podrijetla.

Tablica 18. Koncentracija Hg u serumu majke, posteljici i serumu pupkovine s obzirom na amalgamske zubne ispune.

	ispitanice bez amalgamskih ispuna (n = 39)	ispitanice s amalgamskim ispunama (n = 176)
serum majke ($\mu\text{g/L}$)	0,34 (0,16-0,50)	0,44* (0,23-0,77)
posteljica ($\mu\text{g/kg}$ svježeg tkiva)	3,28 (2,03-7,22)	3,85 (1,94-8,03)
serum pupkovine ($\mu\text{g/L}$)	0,24 (0,12-0,42)	0,36* (0,20-0,62)

Rezultati su prikazani kao medijan (25 - 75 % interkvartilni raspon).

Razlike između skupina ($p < 0,05$) testirane su Mann–Whitneyovim U -testom ($p < 0,05$) i označene zvjezdicom (*).



Slika 18. Koncentracija Hg u serumu majke i pupkovine s obzirom na broj amalgamskih zubnih ispuna. Rezultati su prikazani kao medijan i 25 - 75 % interkvartilni raspon (broj uzoraka u svakoj skupini naveden je u tablici 12).

4.4.3 Međudjelovanje Hg i Se s obzirom na dob majke i izvore izloženosti

Spearmanovi koeficijenti korelacije (r_s) između dobi majke, učestalosti unosa hrane morskoga podrijetla, broja amalgamskih ispuna i bioloških biljega izloženosti Hg i stanja Se prikazani su u tablici 19. Pozitivna korelacija nađena je između unosa hrane morskoga podrijetla i koncentracije Hg u svim mjerenim biološkim uzorcima te Se u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine; između Hg i Se u krvi i serumu majke i pupkovine (osim vrlo slabe korelacije Hg u serumu pupkovine i Se u serumu majke); između Hg u posteljici i Se svim mjerenim biološkim uzorcima te Se u posteljici i Hg u krvi majke i pupkovine. Također, nađene su vrlo dobre do izvrsne međusobne povezanosti između koncentracija Hg u svim mjerenim biološkim uzorcima (serum i krv majke, posteljica te serum i krv pupkovine), dok su nađene međusobne povezanosti između koncentracija Se u mjerenim uzorcima bile vrlo slabe ($r_s \approx 0,2$) ili slabe, osim vrlo dobre ($r_s \approx 0,8$) povezanosti Se u krvi i serumu majke.

Tablica 19. Spearmanov koeficijent korelacije (r_s) između dobi majke, učestalosti unosa morske hrane, broja amalgamskih zubnih ispuna, biomarkera izloženosti Hg i esencijalnog elementa Se ($n = 292$).

	morska hrana	broj ispuna	Hg-KM	Hg-SM	Hg-PL	Hg-KP	Hg-SP	Se-KM	Se-SM	Se-PL	Se-KP	Se-SP
dob majke	0,169	0,036	0,202	0,151	0,136	0,179	0,189	0,134	0,130	0,064	0,073	0,087
morska hrana	-	-0,087	0,501	0,322	0,430	0,527	0,388	0,276	0,139	0,277	0,291	0,173
broj ispuna		-	0,041	0,159	0,025	-0,037	0,164	-0,018	0,001	-0,038	-0,052	0,033
Hg-KM			-	0,822	0,856	0,844	0,783	0,485	0,292	0,277	0,423	0,289
Hg-SM				-	0,777	0,679	0,777	0,453	0,316	0,194	0,385	0,294
Hg-PL					-	0,832	0,774	0,431	0,270	0,264	0,454	0,275
Hg-KP						-	0,774	0,490	0,300	0,257	0,518	0,364
Hg-SP							-	0,410	0,230	0,214	0,419	0,348
Se-KM								-	0,796	0,266	0,523	0,264
Se-SM									-	0,188	0,306	0,205
Se-PL										-	0,364	0,208
Se-KP											-	0,550

Statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) kojima je $r_s \geq 0,25$ su podebljane.

KM: krv majke; SM: serum majke; KP: krv pupkovine; SP: serum pupkovine; PL: posteljica (placenta)

4.5 Koncentracija MT2 i slobodnih tiolnih (-SH) skupina u serumu roditelja

U tablici 20 prikazani su rezultati koncentracija MT2 u podskupini ispitanica za koje su postojali neodmrzavani i pravilno pohranjeni uzorci seruma.

Iako je koncentracija MT2 u serumu pušačica nešto veća u odnosu na nepušačice, nije pronađena razlika između pušačica i nepušačica ($p > 0,05$). S druge strane, rezultati koncentracija slobodnih tiolnih (-SH) skupina u serumu roditelja nepušačica i pušačica pokazuju nižu koncentraciju slobodnih tiolnih skupina u serumu pušačica u odnosu na nepušačice ($p < 0,05$).

Tablica 20. Koncentracija MT2 i slobodnih tiolnih skupina (-SH) u serumu zdravih roditelja, nepušačica i pušačica.

	nepušačice		pušačice	
MT2 (ng/mL)	49	0,88±0,45	47	1,02±0,61
-SH (mmol/L)	43	0,524±0,150	45	0,421±0,186*

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.

Razlike između skupina ($p < 0,05$) testirane su Studentovim *t*-testom i označene zvjezdicom (*).

4.6 Koncentracija steroidnih hormona (P4 i E2) u posteljici: pušačice vs. nepušačice

Rezultati analize steroidnih hormona progesterona (P4) i estradiola (E2) u posteljici prikazani su u tablici 21. U ovome istraživanju nisu nađene razlike u koncentracijama progesterona i estradiola u posteljici između pušačica i nepušačica.

Tablica 21. Koncentracija steroidnih hormona progesterona i estradiola u posteljici zdravih roditelja, nepušačica i pušačica.

	nepušačice n = 169	pušačice n = 117
progesteron (P4) (ng/g)	1060 (764-1492)	1068 (773-1402)
estradiol (E2) (ng/g)	44,5 (23,0-74,4)	53,1 (32,6-80,2)

Rezultati su prikazani kao medijan (25 - 75 % interkvartilni raspon).

4.7 Polimorfizam *MT2A* rs228366003 (c.-77A>G) u ispitanica

4.7.1. Učestalost *MT2A* rs228366003 u ispitanica

U ovome doktorskome radu analiza polimorfizma *MT2A* provedena je na ukupno 268 ispitanica. Genotipizacija ispitanica pokazala je da je 94,4 % ispitanica homozigotnoga divljega tipa, odnosno AA genotipa. Heterozigotni divlji tip (AG) bio je prisutan u 5,2 % ispitanica, dok je homozigotni rijetki tip (GG) bio prisutan kod samo 1 ispitanice. S obzirom na malu pojavnost alela G, ispitanice su za daljnju statističku obradu i tumačenje rezultata svrstane u dvije skupine: osobe bez alela G (AA genotip) i nositeljice alela G (AG/GG genotip). Ukupan broj i postotak ispitanica s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs228366003 prikazana je u tablici 22.

Tablica 22. Podjela ispitanica s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs228366003.

tip polimorfizma	n	%
homozigotni divlji tip (AA genotip)	253	94,4
heterozigotni tip (AG genotip)	14	5,2
homozigotni rijetki tip (genotip GG)	1	0,4

Rezultati su prikazani kao broj i postotak.

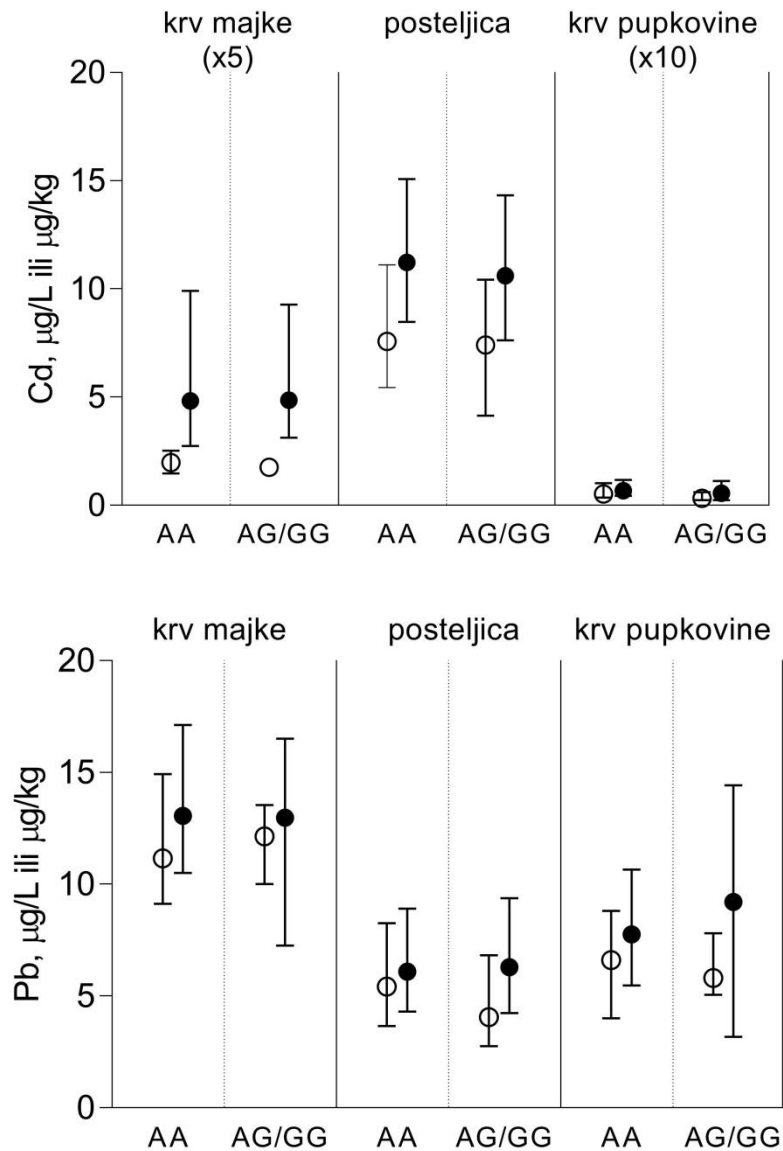
4.7.2. *MT2A* rs228366003 (c.-77A>G) te toksični i esencijalni elementi u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine s obzirom na naviku pušenja majke

Slika 19 prikazuje koncentracije toksičnih metala (Cd, Pb) u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine u nepušačica i pušačica s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs228366003. Statistička značajna razlika između nositeljica alela G (AG/GG genotip) i ispitanica bez alela G (AA genotip) nije pronađena za Cd i Pb ni u jednom analiziranom biološkom uzorku.

Na slici 20 prikazana je koncentracija Hg u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine u nepušačica i pušačica s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs228366003. Budući da su rezultati pokazali da pušenje majke ne utječe na koncentracije Hg niti u jednom od bioloških uzoraka, prikazani su također i rezultati bez razdjeljivanja ispitanica s obzirom na pušačke navike majke. Utjecaj polimorfizma na koncentraciju Hg nije nađen.

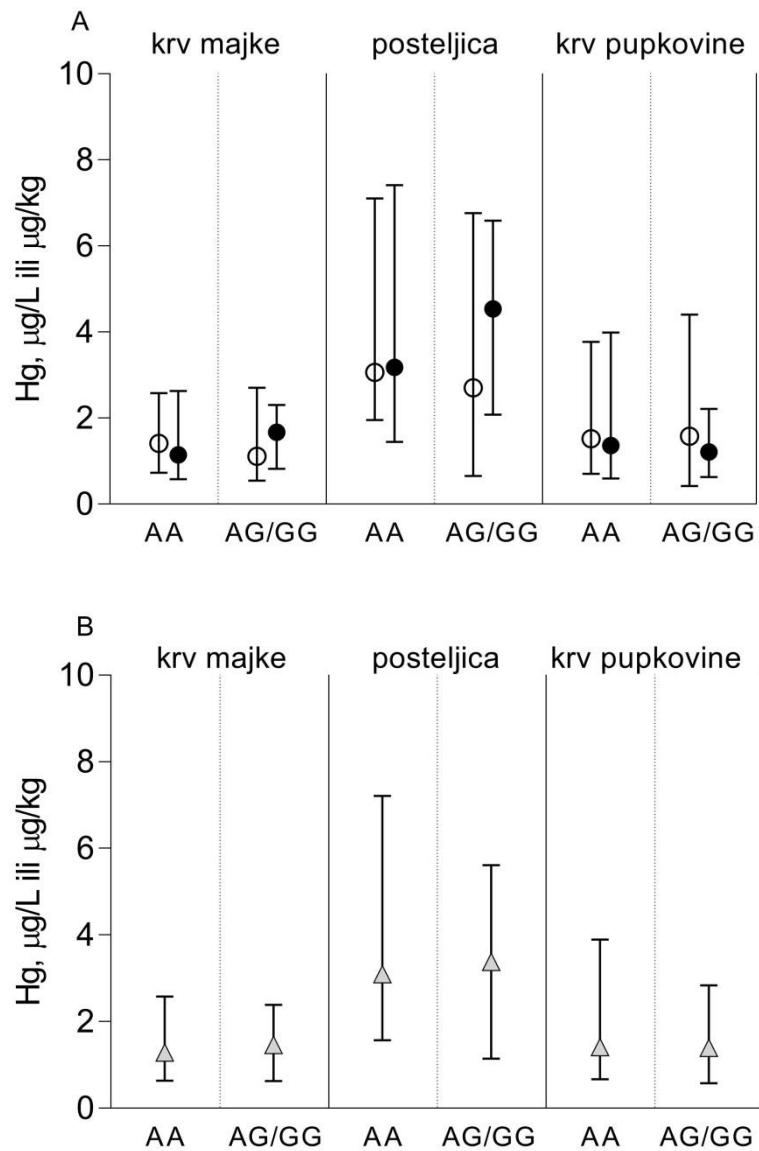
Koncentracije esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu, i Se) u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine u nepušačica i pušačica s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs228366003 prikazane su na slici 21. Statistički značajna razlika između nositeljica alela G (AG/GG genotip) vs. ispitanica bez alela G (AA genotip) nije nađena za Zn, Cu, i Se u svim mjerenim biološkim

uzorcima. U ovom istraživanju nađeno je samo sniženo Fe u posteljici nepušačica nositeljica alela G (AG/GG genotip) u odnosu na AA genotip ($p < 0,05$).



Slika 19. Koncentracija Cd i Pb u zdravih roditelja, nepušačica (○) i pušačica (●) s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs228366003. Rezultati su prikazani kao medijan i 25 - 75 % interkvartilni raspon. (AA nepušačice n = 147; AA pušačice n = 106; AG/GG nepušačice n = 9; AG/GG pušačice n = 6).

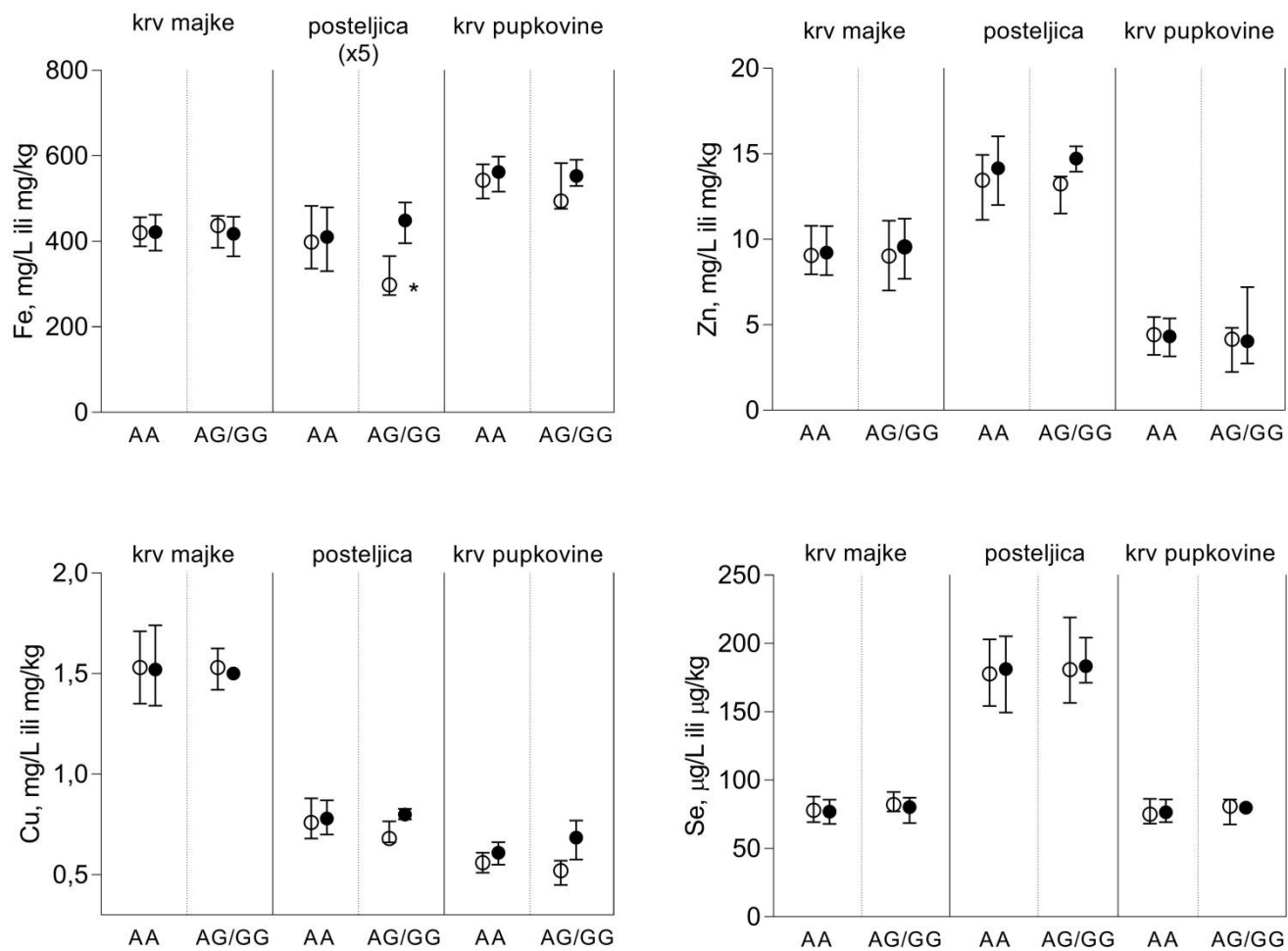
Vrijednosti koncentracija Cd u krvi majke povećane su 5, a u krvi pupkovine 10 puta radi preglednijeg usporednog prikaza u tri mjerene matrice.



Slika 20. Koncentracija Hg u zdravih roditelja s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs228366003

A) nepušačica (○) i pušačica (●) (AA nepušačice n = 147; AA pušačice n = 106; AG/GG nepušačice n = 9; AG/GG pušačice n = 6);
 B) bez obzira na pušačke navike majki (Δ) (AA n = 253; AG/GG n = 15).

Rezultati su prikazani kao medijan i 25 - 75 % interkvartilni raspon.

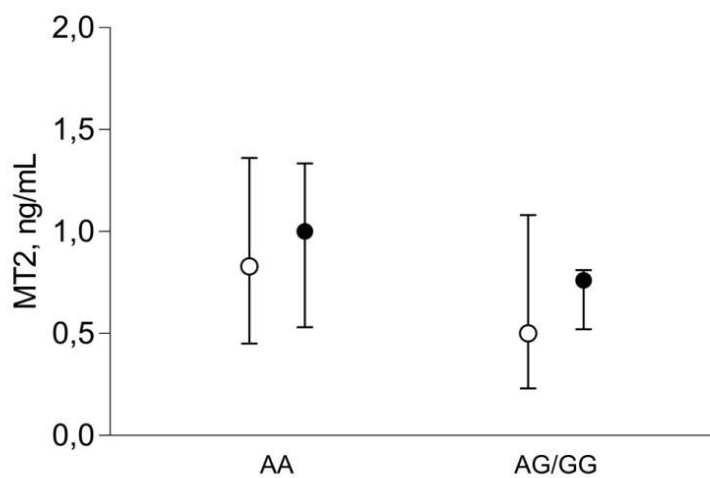


Slika 21. Koncentracija Fe, Zn, Cu i Se u zdravih roditelja, nepušačica (○) i pušačica (●) s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs228366003. Rezultati su prikazani kao medijan i 25 - 75 % interkvartilni raspon (AA nepušačice n = 147; AA pušačice n = 106; AG/GG nepušačice n = 9; AG/GG pušačice n = 6). Razlika između skupina ($p < 0,05$) testirana je Man-Whitneyevim *U*-testom i označena zvjezdicom (*).

Vrijednosti koncentracija Fe u posteljici povećane su 5 puta radi preglednijeg usporednog prikaza u tri mjerene matrice.

4.7.3 *MT2A* rs228366003 (c.-77A>G) i *MT2* u serumu ispitanica s obzirom na naviku pušenja

Na slici 22 prikazana je koncentracija *MT2* u serumu roditelja nepušačica i pušačica s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs228366003. Koncentracija *MT2* u serumu ispitanica bila je $0,94 \pm 0,54$ ng/mL. Iako je koncentracija *MT2* u serumu pušačica bila veća ($1,01 \pm 0,61$ ng/mL, $n = 47$) u odnosu na nepušačice ($0,88 \pm 0,45$ ng/mL, $n = 49$) ova razlika nije statistički značajna.



Slika 22. Koncentracija *MT2* u serumu roditelja, nepušačica (○) i pušačica (●) s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs228366003.

Rezultati su prikazani kao medijan i 25 - 75 % interkvartilni raspon (AA nepušačice $n = 45$; AA pušačice $n = 43$; AG/GG nepušačice $n = 4$; AG/GG pušačice $n = 4$).

4.8 Procjena utjecaja *MT2A* rs228366003 (c.-77A>G) na koncentracije metala i *MT2*: rezultati postupne višestruke linearne regresijske analize

S obzirom na kompleksnu međusobnu povezanost ispitivanih parametara i doprinose izloženosti ispitanica razinama toksičnih i esencijalnih elemenata, primjenom metode postupne višestruke regresije ispitani su međusobni odnosi uz kontrolu svih parametara koji mogu utjecati na te odnose.

Toksični metali Pb, Cd i Hg

Analizom postupne višestruke regresije procijenjeni su potencijalni prediktori za koncentracije Cd i Pb u krvi majke i posteljici, a model je uključivao sljedeće nezavisne varijable: područje prebivališta (priobalje vs. kontinent), dob majke, obrazovanje majke, broj porođaja, prirast tjelesne mase u trudnoći, broj popušenih cigareta na dan, uzimanje vitaminsko/ mineralnih dodataka prehrani, učestalost unosa hrane morskog podrijetla i polimorfizam *MT2A* (AG/GG vs. AA genotip) (tablica 23). Iz dobivenog modela vidljivo je da broj popušenih cigareta na dan značajno doprinosi porastu koncentracije Cd u krvi majke i posteljici dok je obrazovanje majke negativno povezano s koncentracijom Cd u krvi majke odnosno majke (rodilje) s većim stupnjem obrazovanja imaju niže vrijednosti Cd u krvi. Osim broja popušenih cigareta na dan prebivalište u priobalnom području, majčine godine i prirast tjelesne mase u trudnoći također su pozitivno povezani s koncentracijom Cd u posteljici. Negativna povezanost nađena je između koncentracije Pb u krvi majke i posteljici te uzimanja vitaminsko/ mineralnih dodataka prehrani i stupnja obrazovanja majke, dok je dob majke pozitivno povezana s Pb u krvi majke, a prirasta tjelesne mase s Pb u posteljici.

U tablici 24 prikazani su regresijski koeficijenti potencijalnih prediktora za koncentraciju Hg u krvi i serumu majke i pupkovine te posteljici dobiveni postupnom višestrukom regresijskom analizom, a u model su uključene sljedeće nezavisne varijable: područje prebivališta (priobalje vs. kontinent), dob majke, obrazovanje majke, broj porođaja, prirast tjelesne mase u trudnoći, uzimanje vitaminsko/ mineralnih dodataka prehrani, učestalost unosa hrane morskog podrijetla, broj amalgamskih zubnih ispuna i polimorfizam *MT2A* (AG/GG vs. AA genotip). Rezultati pokazuju da je unos hrane morskoga podrijetla i prebivanje u priobalnom području pozitivno povezano s koncentracijom Hg u krvi majke i pupkovine te posteljici. Međutim, broj amalgamskih zubnih ispuna pozitivno je povezan samo s Hg u krvi majke i posteljici. Za razliku od Hg u krvi, Hg u serumu majke i pupkovine statistički je pozitivno povezana s brojem amalgamskih ispuna, uz unos hrane morskoga podrijetla i prebivanje u priobalnom području kao također značajnih prediktora.

Tablica 23. Regresijski koeficijenti potencijalnih prediktora dobiveni postupnom višestrukom regresijskom analizom za koncentraciju Cd i Pb u krvi majke i posteljici*.

zavisna varijabla	standardizirani koeficijent $\beta \pm SE$	nestandardizirani koeficijent $B \pm SE$	t	p	
model: n=260; R²=0,50; F(4,253)=64,4; p<0,0001					
ln(Cd-KM)	<i>odsječak</i>		9,2 ± 7,2	1,28	0,202
	broj cigareta na dan	0,70 ± 0,04	0,100 ± 0,006	15,8	<0,0001
	obrazovanje	-0,12 ± 0,04	-0,10 ± 0,04	-2,55	0,01
	područje prebivališta: priobalje	-0,06 ± 0,04	-0,10 ± 0,07	-1,42	0,16
	dob majke	0,06 ± 0,04	0,010 ± 0,007	1,36	0,17
model: n=260; R²=0,27; F(6,253)=3,32; p=0,0036					
ln(Pb-KM)	<i>odsječak</i>		9,79 ± 5,43	1,80	0,07
	uzimanje dodataka prehrani	-0,15 ± 0,06	-0,15 ± 0,06	-2,48	0,01
	obrazovanje	-0,16 ± 0,06	-0,08 ± 0,03	-2,58	0,01
	dob majke	0,15 ± 0,06	0,014 ± 0,006	2,47	0,01
	područje prebivališta: priobalje	-0,08 ± 0,06	-0,07 ± 0,05	-1,32	0,19
	broj cigareta na dan	0,08 ± 0,06	0,006 ± 0,004	1,31	0,19
polimorfizam <i>MT2A</i> : AG/GG	-0,07 ± 0,06	-0,12 ± 0,11	-1,09	0,27	
model: n=250; R²=0,28; F(8,247)=12,10; p<0,0001					
ln(Cd-PL)	<i>odsječak</i>		-18,9 ± 5,58	-3,38	0,0008
	broj cigareta na dan	0,37 ± 0,06	0,034 ± 0,005	6,70	<0,0001
	područje prebivališta: priobalje	0,20 ± 0,06	0,20 ± 0,05	3,71	0,0003
	dob majke	0,20 ± 0,06	0,021 ± 0,006	3,25	0,001
	prirast tjelesne mase	0,15 ± 0,06	0,014 ± 0,006	2,63	0,01
	polimorfizam <i>MT2A</i> : AG/GG	-0,08 ± 0,05	-0,18 ± 0,11	-1,58	0,12
	obrazovanje	-0,09 ± 0,05	-0,05 ± 0,03	-1,54	0,12
	uzimanje dodataka prehrani	-0,08 ± 0,06	-0,09 ± 0,06	-1,43	0,16
	broj porođaja	-0,07 ± 0,06	-0,04 ± 0,03	-1,13	0,26
model: n=250; R²=0,09; F(5,250)=5,08; p=0,0002					
ln(Pb-PL)	<i>odsječak</i>		2,36 ± 0,28	8,45	<0,0001
	prirast tjelesne mase	0,17 ± 0,06	0,020 ± 0,007	2,73	0,007
	obrazovanje	-0,15 ± 0,06	-0,11 ± 0,04	-2,56	0,01
	uzimanje dodataka prehrani	-0,16 ± 0,06	-0,22 ± 0,08	-2,57	0,01
	polimorfizam <i>MT2A</i> : AG/GG	-0,09 ± 0,06	-0,24 ± 0,15	-1,53	0,13
broj porođaja	-0,09 ± 0,06	-0,06 ± 0,04	-1,46	0,14	

*Model je uključivao sljedeće nezavisne varijable: područje prebivališta (1 = kontinent, 2 = priobalje), broj cigareta na dan, dob majke, obrazovanje (1 = NKV, 2 = SSS, 3 = VŠS, 4 = VSS), broj porođaja, prirast tjelesne mase tijekom trudnoće, uzimanje vitaminsko/ mineralnih dodataka prehrani (1 = ne, 2 = da), učestalost unosa hrane morskog podrijetla i polimorfizam *MT2A* (1 = AA genotip, 2 = AG/GG genotip).

KM: krv majke; PL: posteljica (placenta).

Statistički značajni ($p < 0,05$) koeficijenti su podebljani.

Tablica 24. Regresijski koeficijenti potencijalnih prediktora dobiveni postupnom višestrukom regresijskom analizom za koncentraciju Hg u krvi i serumu majke i pupkovine te posteljici.*

zavisna varijabla	standardizirani koeficijent $\beta \pm SE$	nestandardizirani koeficijent $\beta \pm SE$	t	p	
model: n=196; R²=0,40; F(7,187)=15,9; p<0,0001					
ln(Hg-KM)	odsječak		-88,2 ± 13,1	-6,99	<0,0001
	konzumacija morske hrane	0,38 ± 0,06	0,43 ± 0,06	6,52	<0,0001
	područje prebivališta; priobalje	0,43 ± 0,06	0,86 ± 0,12	6,95	<0,0001
	amalgamski ispuni				
	1 - 2 vs. 0	0,20 ± 0,08	0,44 ± 0,17	2,53	0,01
	3 - 4 vs. 0	0,23 ± 0,08	0,54 ± 0,18	2,98	0,003
	≥5 vs. 0	0,35 ± 0,08	0,76 ± 0,18	4,98	<0,0001
	obrazovanje majke	0,10 ± 0,06	0,11 ± 0,06	1,77	0,08
polimorfizam MT2A: AG/GG	-0,07 ± 0,06	-0,37 ± 0,27	-1,34	0,18	
model: n=196; R²=0,41; F(6,186)=19,0; p<0,0001					
ln(Hg-KP)	odsječak		-79,6 ± 14,2	-5,58	<0,0001
	konzumacija morske hrane	0,44 ± 0,06	0,59 ± 0,08	7,49	<0,0001
	područje prebivališta; priobalje	0,33 ± 0,06	0,78 ± 0,14	5,58	<0,0001
	polimorfizam MT2A: AG/GG	-0,10 ± 0,06	-0,62 ± 0,34	-1,82	0,07
	obrazovanje majke	0,10 ± 0,06	0,13 ± 0,08	1,71	0,09
	broj porođaja	-0,09 ± 0,06	-0,15 ± 0,09	-1,64	0,10
	prirast tjelesne mase	0,09 ± 0,06	0,02 ± 0,01	1,53	0,13
model: n=196; R²=0,30; F(7,188)=11,5; p<0,0001					
ln(Hg-SM)	odsječak		-83,0 ± 12,2	-6,79	<0,0001
	područje prebivališta; priobalje	0,44 ± 0,07	0,80 ± 0,12	6,68	<0,0001
	amalgamski ispuni				
	1 - 2 vs. 0	0,22 ± 0,08	0,42 ± 0,17	2,52	0,01
	3 - 4 vs. 0	0,27 ± 0,08	0,59 ± 0,18	3,31	0,001
	≥5 vs. 0	0,42 ± 0,09	0,83 ± 0,18	4,71	<0,0001
	konzumacija morske hrane	0,20 ± 0,06	0,20 ± 0,06	3,11	0,002
	obrazovanje majke	0,13 ± 0,06	0,13 ± 0,06	2,12	0,03
polimorfizam MT2A: AG/GG	-0,10 ± 0,06	-0,42 ± 0,27	-1,56	0,12	
model: n=196; R²=0,31; F(7,184)=7,43; p<0,0001					
ln(Hg-SP)	odsječak		-38,9 ± 11,1	-3,51	0,0006
	konzumacija morske hrane	0,39 ± 0,06	0,35 ± 0,06	6,08	<0,0001
	amalgamski ispuni				
	1 - 2 vs. 0	0,28 ± 0,09	0,48 ± 0,15	3,14	0,002
	3 - 4 vs. 0	0,29 ± 0,08	0,55 ± 0,16	3,33	0,001
	≥5 vs. 0	0,39 ± 0,09	0,69 ± 0,16	4,26	<0,0001
	područje prebivališta; priobalje	0,23 ± 0,06	0,36 ± 0,11	3,33	0,001
	broj porođaja	-0,10 ± 0,06	-0,10 ± 0,07	-1,52	0,13
polimorfizam MT2A: AG/GG	-0,09 ± 0,06	-0,35 ± 0,24	-1,46	0,14	
model: n=196; R²=0,35; F(8,183)=11,2; p<0,0001					
ln(Hg-PL)	odsječak		-81,6 ± 13,7	-5,96	<0,0001
	konzumacija morske hrane	0,33 ± 0,06	0,38 ± 0,07	5,28	<0,0001
	područje prebivališta; priobalje	0,39 ± 0,06	0,81 ± 0,13	6,04	<0,0001
	prirast tjelesne mase	0,12 ± 0,06	0,03 ± 0,01	2,05	0,04
	amalgamski ispuni				
	1 - 2 vs. 0	0,14 ± 0,08	0,31 ± 0,19	1,61	0,11
	3 - 4 vs. 0	0,17 ± 0,08	0,43 ± 0,21	2,09	0,04
	≥5 vs. 0	0,19 ± 0,09	0,43 ± 0,20	2,15	0,03
obrazovanje majke	0,12 ± 0,06	0,14 ± 0,07	1,96	0,05	
polimorfizam MT2A: AG/GG	-0,11 ± 0,06	-0,38 ± 0,30	-1,45	0,15	

*Model je uključivao sljedeće nezavisne varijable: područje prebivališta (1 = kontinent, 2 = priobalje), broj cigareta na dan, dob majke, obrazovanje (1 = NKV, 2 = SSS, 3 = VŠS, 4 = VSS), broj porođaja, prirast tjelesne mase tijekom trudnoće, uzimanje vitaminsko/ mineralnih dodataka prehrani (1 = ne, 2 = da), učestalost unosa hrane morskog podrijetla, broj amalgamskih zubnih ispuna (1 = 0, 2 = 1 - 2 vs. 0, 3 = 3 - 4 vs. 0, 4 = ≥5 vs. 0) i polimorfizam MT2A (1=AA genotip, 2=AG/GG genotip).

KM: krv majke; KP: krv pupkovine; SM: serum majke; SP: serum pupkovine; PL: posteljica (placenta).

Statistički značajni ($p < 0,05$) koeficijenti su podebljani.

Esencijalni elementi Fe, Zn, Cu i Se

U tablici 25 prikazani su regresijski koeficijenti potencijalnih prediktora za koncentracije esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu, Se) u posteljici dobiveni analizom postupne višestruke regresije. Model je uključivao sljedeće nezavisne varijable: $\ln(\text{Cd-KM})$, $\ln(\text{Pb-KM})$, $\ln(\text{Hg-KM})$, područje prebivališta (priobalje *vs.* kontinent), broj cigareta na dan, dob majke, obrazovanje majke, broj porođaja, prirast tjelesne mase, uzimanje vitaminsko/mineralnih dodataka prehrani, učestalost unosa hrane morskog podrijetla, polimorfizam *MT2A* (AG/GG *vs.* AA genotip) i koncentraciju testiranog esencijalnog elementa u krvi majke. Rezultati pokazuju da je koncentracija Fe u posteljici negativno povezana s brojem porođaja. Koncentracija Zn u posteljici pozitivno je povezana s prebivalištem u priobalnom području, Zn u krvi majke i prirastom tjelesne mase u trudnoći, a negativno s dobi majke. Koncentracija Cu u posteljici pozitivno je povezana s Cu u krvi majke i prirastom tjelesne mase u trudnoći, a negativno s brojem porođaja. Koncentracija Se u posteljici pozitivno je povezana s učestalosti unosa hrane morskog podrijetla, Se u krvi majke i prebivalištem u priobalnom području.

Analizom postupne višestruke regresije također su procijenjeni potencijalni prediktori za koncentracije esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu, Se) u krvi pupkovine, a model je uključivao sljedeće nezavisne varijable: $\ln(\text{Cd-KM})$, $\ln(\text{Cd-PL})$, $\ln(\text{Pb-KM})$, $\ln(\text{Pb-PL})$, $\ln(\text{Hg-KM})$, $\ln(\text{Hg-PL})$, područje prebivališta (priobalje *vs.* kontinent), broj cigareta na dan, dob majke, obrazovanje majke, broj porođaja, prirast tjelesne mase, uzimanje vitaminsko/mineralnih dodataka prehrani, učestalost unosa hrane morskog podrijetla, polimorfizam *MT2A* (AG/GG *vs.* AA genotip) i koncentraciju testiranog esencijalnog elementa u krvi majke i posteljici (tablica 26). Rezultati pokazuju da je Fe u krvi pupkovine pozitivno povezano s prebivalištem u priobalnom području, prirastom tjelesne mase te brojem cigareta, a negativno s brojem porođaja. Koncentracija Zn u krvi pupkovine pozitivno je povezan sa Zn u krvi majke i prirastom tjelesne mase, a negativno s koncentracijom Cd u posteljici. Koncentracija Cu u krvi pupkovine pozitivno je povezana s brojem popušanih cigareta na dan, prirastom tjelesne mase i Cu u krvi majke, a negativno s brojem porođaja. Koncentracija Se u krvi pupkovine pozitivno je povezana sa Se u krvi majke i posteljici te prebivalištem u priobalnom području.

Tablica 25. Regresijski koeficijenti potencijalnih prediktora dobiveni postupnom višestrukom regresijskom analizom za koncentracije esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu, Se) u posteljici*.

zavisna varijabla	standardizirani koeficijent $\beta \pm SE$	nestandardizirani koeficijent $B \pm SE$	t	p	
model: n=250; R²=0,07; F(4,240)=3,50; p=0,004					
ln(Fe-PL)	<i>odsječak</i>		11,4 ± 3,52	3,25	0,001
	broj porođaja	-0,18 ± 0,06	-0,05 ± 0,02	-2,81	0,005
	Fe-KM	0,11 ± 0,06	0,0005 ± 0,0003	1,76	0,08
	polimorfizam <i>MT2A</i> : AG/GG	-0,09 ± 0,06	-0,11 ± 0,07	-1,50	0,13
	broj cigareta	0,06 ± 0,06	0,003 ± 0,003	1,02	0,31
model: n=250; R²=0,57; F(8,247)=24,3; p<0,0001					
ln(Zn-PL)	<i>odsječak</i>		-17,6 ± 2,46	-7,14	<0,0001
	područje prebivališta: priobalje	0,45 ± 0,05	0,20 ± 0,02	8,19	<0,0001
	Zn-KM	0,22 ± 0,05	0,05 ± 0,01	4,30	<0,0001
	dob majke	-0,19 ± 0,05	-0,009 ± 0,002	-3,57	0,0004
	prirast tjelesne mase	0,14 ± 0,05	0,006 ± 0,002	2,63	0,009
	konzumacija morske hrane	0,08 ± 0,05	0,02 ± 0,01	1,49	0,14
	uzimanje dodataka prehrani	-0,07 ± 0,05	-0,03 ± 0,03	-1,27	0,20
model: n=250; R²=0,18; F(6,246)=9,10; p<0,0001					
ln(Cu-PL)	<i>odsječak</i>		-4,81 ± 2,90	-1,66	0,10
	Cu-KM	0,30 ± 0,06	0,25 ± 0,05	5,15	<0,0001
	broj porođaja	-0,14 ± 0,06	-0,04 ± 0,02	-2,22	0,03
	prirast tjelesne mase	0,13 ± 0,06	0,005 ± 0,003	2,20	0,03
	uzimanje dodataka prehrani	-0,10 ± 0,06	-0,06 ± 0,03	-1,80	0,07
	područje prebivališta: priobalje	0,09 ± 0,06	0,04 ± 0,03	1,51	0,13
	dob majke	-0,09 ± 0,06	-0,004 ± 0,003	-1,47	0,14
model: n=250; R²=0,14; F(4,247)=8,04; p<0,0001					
ln(Se-PL)	<i>odsječak</i>		-3,87 ± 3,21	-1,21	0,229
	konzumacija morske hrane	0,20 ± 0,06	0,05 ± 0,02	3,13	0,002
	Se-KM	0,16 ± 0,06	0,0023 ± 0,0009	2,42	0,02
	područje prebivališta: priobalje	0,13 ± 0,06	0,07 ± 0,03	2,07	0,04
	dob majke	0,07 ± 0,06	0,004 ± 0,003	1,15	0,25

*Model je uključivao sljedeće nezavisne varijable: ln(Cd-KM), ln(Pb-KM), ln(Hg-KM), područje prebivališta (1 = kontinent, 2 = priobalje), broj cigareta na dan, dob majke, obrazovanje (1 = NKV, 2 = SSS, 3 = VŠS, 4 = VSS), broj porođaja, prirast tjelesne mase tijekom trudnoće, uzimanje vitaminsko/ mineralnih dodataka prehrani (1 = ne, 2 = da), učestalost unosa hrane morskog podrijetla i polimorfizam *MT2A* (1 = AA genotip, 2 = AG/GG genotip) te koncentracija testiranog elementa u krvi majke. PL: posteljica (placenta).

Statistički značajni ($p < 0,05$) koeficijenti su podebljani.

Tablica 26. Regresijski koeficijenti potencijalnih prediktora dobiveni postupnom višestrukom regresijskom analizom za koncentracije esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu, Se) u krvi pupkovine*.

zavisna varijabla		standardizirani koeficijent $\beta \pm SE$	nestandardizirani koeficijent $B \pm SE$	t	p
model: n=250; R²=0,23; F(8,233)=7,78; p<0,0001					
Fe-KP	<i>odsječak</i>		-4775 ± 854	-5,59	<0,0001
	područje prebivališta: priobalje	0,41 ± 0,07	51,2 ± 8,32	6,15	<0,0001
	prirast tjelesne mase	0,17 ± 0,06	2,23 ± 0,78	2,88	0,004
	broj cigareta	0,14 ± 0,06	1,62 ± 0,67	2,42	0,02
	broj porođaja	-0,14 ± 0,06	-10,2 ± 4,49	-2,27	0,02
	dob majke	0,12 ± 0,06	1,63 ± 0,81	2,00	0,05
	ln(Fe-PL)	0,09 ± 0,06	19,9 ± 13,8	1,45	0,15
	polimorfizam MT2A: AG/GG	-0,06 ± 0,06	-16,4 ± 15,1	-1,08	0,28
ln(Pb-PL)	0,06 ± 0,06	6,64 ± 6,27	1,06	0,29	
model: n=250; R²=0,16; F(7,241)=6,74; p<0,0001					
Zn-KP	<i>odsječak</i>		2,07 ± 0,26	7,86	<0,0001
	Zn-KM	0,30 ± 0,06	0,15 ± 0,03	5,01	<0,0001
	ln(Cd-PL)	-0,18 ± 0,07	-0,18 ± 0,07	-2,67	0,008
	prirast tjelesne mase	0,15 ± 0,06	0,01 ± 0,006	2,47	0,01
	polimorfizam MT2A: AG/GG	-0,11 ± 0,06	-0,22 ± 0,12	-1,82	0,07
	broj cigareta	0,12 ± 0,07	0,011 ± 0,006	1,80	0,07
	ln(Pb-PL)	0,10 ± 0,06	0,08 ± 0,05	1,66	0,10
	konzumacija morske hrane	0,09 ± 0,06	0,05 ± 0,03	1,53	0,13
model: n=250; R²=0,22; F(7,238)=7,62; p<0,0001					
Cu-KP	<i>odsječak</i>		-2,13 ± 1,27	-1,68	0,09
	broj cigareta	0,23 ± 0,06	0,004 ± 0,001	3,83	0,0002
	prirast tjelesne mase	0,19 ± 0,06	0,004 ± 0,001	3,13	0,002
	Cu-KP	0,14 ± 0,06	0,04 ± 0,02	2,30	0,02
	broj porođaja	-0,13 ± 0,06	-0,013 ± 0,006	-2,11	0,04
	obrazovanje majke	0,10 ± 0,06	0,011 ± 0,006	1,73	0,09
	ln(Hg-KM)	-0,10 ± 0,07	-0,009 ± 0,006	-1,54	0,12
	područje prebivališta: priobalje	0,12 ± 0,07	0,02 ± 0,01	1,64	0,10
	CuB-M	0,10 ± 0,07	0,03 ± 0,02	1,44	0,15
ln(Cu-PL)	0,09 ± 0,06	0,03 ± 0,02	1,38	0,17	
model: n=250; R²=0,45; F(5,242)=24,5; p<0,0001					
Se-KP	<i>odsječak</i>		-426 ± 170	-2,51	0,01
	Se-KM	0,39 ± 0,06	0,34 ± 0,05	6,64	<0,0001
	ln(Se-PL)	0,17 ± 0,05	10,4 ± 3,2	3,23	0,001
	područje prebivališta: priobalje	0,14 ± 0,06	4,22 ± 1,70	2,48	0,01
	obrazovanje majke	0,08 ± 0,05	1,45 ± 0,85	1,70	0,09
	konzumacija morske hrane	0,08 ± 0,05	1,37 ± 0,89	1,54	0,13

*Model je uključivao sljedeće nezavisne varijable: ln(Cd-KM), ln(Cd-PL), ln(Pb-KM), ln(Pb-PL), ln(Hg-KM), ln(Hg-PL), područje prebivališta (1 = kontinent, 2 = priobalje), broj cigareta na dan, dob majke, obrazovanje (1 = NKV, 2 = SSS, 3 = VŠS, 4 = VSS), broj porođaja, prirast tjelesne mase tijekom trudnoće, uzimanje vitaminsko/ mineralnih dodataka prehrani (1 = ne, 2 = da), učestalost unosa hrane morskog podrijetla i polimorfizam MT2A (1 = AA genotip, 2 = AG/GG genotip) te koncentracija testiranog elementa u krvi majke i posteljici. KP: krv pupkovine. Statistički značajni ($p < 0,05$) koeficijenti su podebljani.

Metalotionein 2 u serumu

U tablici 27 prikazani su regresijski koeficijenti potencijalnih prediktora za koncentraciju MT2 u serumu majke dobiveni postupnom višestrukom regresijskom analizom, a u model su bile uključene sljedeće nezavisne varijable: broj popušanih cigareta na dan, dob majke, obrazovanje, broj porođaja, prirast tjelesne mase u trudnoći, uzimanje vitaminsko/ mineralnih dodataka prehrani, učestalost unosa hrane morskog podrijetla i polimorfizam *MT2A* (AG/GG vs. AA genotip). Rezultati pokazuju značajnu pozitivnu povezanost između broja popušanih cigareta i koncentracije MT2 u serumu majke.

Tablica 27 Regresijski koeficijenti potencijalnih prediktora dobiveni postupnom višestrukom regresijskom analizom za koncentraciju MT2 u serumu majke.*

zavisna varijabla	standardizirani	nestandardizirani	t	p	
	koeficijent $\beta \pm SE$	koeficijent B $\pm SE$			
model: n=91; R²=0,13; F(4,85)=2,62; p=0,03					
MT2	<i>odsječak</i>		1,12 \pm 0,31	3,58	0,0006
	broj cigareta	0,23 \pm 0,10	0,02 \pm 0,01	2,22	0,03
	broj porođaja	0,20 \pm 0,10	0,14 \pm 0,07	1,94	0,06
	polimorfizam <i>MT2A</i> : AG/GG	-0,14 \pm 0,10	-0,28 \pm 0,21	-1,32	0,20
	konzumacija morske hrane	-0,11 \pm 0,10	-0,06 \pm 0,05	-1,05	0,29

*Model je uključivao sljedeće nezavisne varijable: broj popušanih cigareta na dan, dob majke, obrazovanje (1 = NKV, 2 = SSS, 3 = VŠS, 4 = VSS), broj porođaja, prirast tjelesne mase tijekom trudnoće, uzimanje vitaminsko/ mineralnih dodataka prehrani (1 = ne, 2 = da), učestalost unosa hrane morskog podrijetla i polimorfizam *MT2A* (1 = AA genotip, 2 = AG/GG genotip).

Statistički značajni ($p < 0,05$) koeficijenti su podebljani.

4.9 Procjena utjecaja *MT2A* rs228366003 (c.-77A>G) i koncentracije metala na porođajnu masu i duljinu

U tablici 28 prikazani su regresijski koeficijenti potencijalnih prediktora porođajne mase i duljine. Iz prikazanog modela vidljivo je da su porođajna masa i duljina pozitivno povezane s masom posteljice i spolom djeteta, odnosno da novorođenčad muškoga spola ima veću porođajnu masu i duljinu u odnosu na novorođenčad ženskoga spola, a negativno s prebivalištem u priobalnom području. Također je nađena pozitivna povezanost između Zn u posteljici i porođajne mase i duljine, a negativna povezanost između Cu u posteljici i porođajne mase.

Tablica 28. Regresijski koeficijenti potencijalnih prediktora dobiveni postupnom višestrukom regresijskom analizom za porođajnu masu i duljinu*.

zavisna varijabla	standardizirani	nestandardizirani	t	p	
	koeficijent $\beta \pm SE$	koeficijent $B \pm SE$			
model: n=180; R²=0,78; F(13,165)=18,8; p<0,0001					
porođajna masa	<i>odsječak</i>		-6389 ± 7924	-0,81	0,42
	masa posteljice	0,61 ± 0,05	4,89 ± 0,43	11,2	<0,0001
	spol djeteta: muški	0,20 ± 0,05	183 ± 46	4,00	<0,0001
	ln(Zn-PL)	0,37 ± 0,07	812 ± 148	5,50	<0,0001
	ln(Cu-PL)	-0,26 ± 0,06	-584 ± 128	-4,57	<0,0001
	područje prebivališta:priobalje	-0,14 ± 0,06	-130 ± 60	-2,17	0,03
	Se-KP	0,14 ± 0,07	4,63 ± 2,35	1,94	0,05
	dob majke	0,09 ± 0,05	9,76 ± 5,5	1,77	0,08
	konzumacija morske hrane	-0,09 ± 0,05	-48,1 ± 27,9	-1,72	0,09
	ln(Cd-KM)	-0,09 ± 0,05	-53,8 ± 32,3	-1,67	0,10
	uzimanje dodatak prehrani	0,08 ± 0,05	90,0 ± 56,1	1,60	0,11
	obrazovanje majke	0,07 ± 0,05	38,9 ± 29,5	1,32	0,19
	prirast tjelesne mase	0,06 ± 0,05	6,21 ± 5,09	2,22	0,22
	Se-KM	-0,07 ± 0,07	-2,06 ± 2,00	-1,03	0,30
model: n=180; R²=0,67; F(10,169)=14,0; p<0,0001					
porođajna duljina	<i>odsječak</i>		1,56 ± 43,4	0,04	0,97
	masa posteljice	0,49 ± 0,06	0,019 ± 0,002	8,46	<0,0001
	spol djeteta: muški	0,28 ± 0,06	1,19 ± 0,25	4,77	<0,0001
	ln(Zn-PL)	0,34 ± 0,08	3,46 ± 0,81	4,30	<0,0001
	područje prebivališta:priobalje	-0,20 ± 0,07	-0,85 ± 0,30	-2,79	0,006
	dob majke	0,12 ± 0,06	0,06 ± 0,03	2,02	0,05
	uzimanje dodataka prehrani	0,12 ± 0,06	0,57 ± 0,31	1,94	0,05
	ln(Cu-PL)	-0,13 ± 0,07	-1,36 ± 0,71	-1,91	0,06
	obrazovanje majke	0,09 ± 0,06	0,22 ± 0,16	1,40	0,16
	ln(Fe-PL)	-0,08 ± 0,06	-0,72 ± 0,52	-1,38	0,17
ln(Cd-KM)	-0,08 ± 0,06	-0,23 ± 0,17	-1,32	0,19	

*Model je uključivao sljedeće nezavisne varijable: ln(Cd-KM), ln(Cd-PL), ln(Cd-KP), ln(Pb-KM), ln(Pb-PL), ln(Pb-KP), ln(Hg-KM), ln(Hg-PL), ln(Hg-KP), Fe-KM, ln(Fe-PL), Fe-KP, Zn-KM, ln(Zn-PL), Zn-KP, Cu-KM, ln(Cu-PL), Cu-KP, Se-KM, ln(Se-PL), Se-KP, područje prebivališta (1=kontinent, 2=priobalje), broj cigareta na dan, dob majke, obrazovanje (1=NKV, 2=SSS, 3=VŠS, 4=VSS), broj porođaja, prirast tjelesne mase tijekom trudnoće, masu posteljice, spol djeteta, uzimanje vitaminsko/mineralnih dodataka prehrani (1=ne, 2=da), učestalost unosa hrane morskog podrijetla, broj amalgamskih zubnih ispuna (1=0, 2=1-2 vs. 0, 3=3-4 vs. 0, 4= \geq 5 vs. 0) i polimorfizam *MT2A* (1=AA genotip, 2=AG/GG genotip). KM: krv majke; KP: krv pupkovine; PL: posteljica (placenta). Statistički značajni ($p<0,05$) koeficijenti su podebljani.

5. RASPRAVA

U radu su procijenjene izloženosti parova majka–novorođenče trima najvažnijim toksičnim metalima (Cd, Pb i Hg) s obzirom na pušenje cigareta (za izloženosti Cd i Pb) i konzumacijom hrane morskog podrijetla (za izloženost Hg). U tu svrhu određene su koncentracije Cd, Pb, Hg i esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu i Se) u uzorcima krvi majke i pupkovine te posteljice. Također su određivane koncentracije MT2 i slobodnih –SH skupina u serumu majke.

Na toksičnost metala u organizmu može utjecati gensko naslijeđe, što je do sada slabo istraženo, pa je zato u ovom radu provedena i analiza te genotipizacija metalotioneina 2A (*MT2A*) te je procijenjen doprinos genskog polimorfizma *MT2A* na koncentracije toksičnih i esencijalnih metala u krvi majke i pupkovine te posteljici. Pored toga, u radu smo procijenili i utjecaj pušenja na koncentracije steroidnih hormona progesterona i estradiola u posteljičnom tkivu o čemu su podaci u literaturi nedostatni i kontradiktorni.

Kako je već prije istaknuto, periferna venska krv najčešće je upotrebljavani uzorak u istraživanjima kojima se procjenjuje izloženost metalima. Budući da se radi o invazivno skupljenom uzorku, ponavljano uzorkovanje u ranjivoj skupini trudnica odnosno roditelja, nastoji se zamijeniti neinvazivno skupljenim uzorcima. U ovom radu to su bili krv pupkovine i posteljica nakon ročnog rodničkog porođaja. Unatoč tome što se vrijednosti esencijalnih elemenata u serumu smatraju optimalnim biološkim pokazateljima njihovog stanja u organizmu, za daljnje tumačenje i usporedbu rezultata esencijalnih elemenata odlučili smo uzeti rezultate esencijalnih elemenata u uzorcima pune krvi kao pouzdanije matrice za analizu esencijalnih elemenata. Razlog tome je uočen relativno velik postotak hemolize (>20 %) u uzorcima seruma pupkovine u odnosu na serum majke (<2 %). Prema literaturnim podacima očekuje se da taj udio bude oko 3 % (Lippi i sur., 2008). Hemoliza uzoraka krvi pupkovine u literaturi je prepoznata kao čimbenik koji može utjecati na metabolički profil novorođenčadi (Denihan i sur., 2015), ali do sada nije opisano da može utjecati i na rezultate analize esencijalnih elemenata kao što su lažno povećane vrijednosti tih elemenata u serumu pupkovine.

5.1 Izloženost cigaretnom dimu: utjecaj na koncentracije toksičnih i esencijalnih elemenata i steroidnih hormona

Koncentracije Cd i Pb u parovima majka-dijete i pušenje

Rezultati ovog rada potvrđuju da pušenje cigareta majke utječe na povišene koncentracije Cd i Pb u parovima majka–dijete koje su izmjerene u svim biološkim uzorcima. Nađeno je da su u roditelja pušačica u odnosu na nepušačice koncentracije Cd u krvi više 2 do 3 puta i 1,5 put u posteljici, dok su koncentracije Pb bile oko 1,2 puta više u sve tri mjerene matrice: krvi majke, posteljici i krvi pupkovine. Rezultati višestruke regresije također su potvrdili da je broj popušanih cigareta bio pozitivno povezan s koncentracijama Cd u krvi majke i posteljici. Izmjerene vrijednosti za Cd u krvi nepušačica (iz kontinentalnog i priobalnog područja) nisu premašile referentnu vrijednost za neizložene nepušače od 1 µg/L (Nordberg i sur., 2015) nasuprot vrijednostima u krvi pušačica, gdje je 48 % osoba imalo vrijednost Cd iznad te granice. Također, sve izmjerene vrijednosti Pb u krvi nisu prešle granicu od 50 µg/L za djecu koju je postavio Centra za kontrolu bolesti u SAD-u (CDC, 2012).

Dobivene vrijednosti za Cd i Pb u krvi majke slažu se s do sada objavljenim rezultatima (Stajniko i sur., 2017; Fagerstedt i sur., 2015; Ashley-Martin i sur., 2015; García-Esquinas i sur., 2013) i pokazuju nižu okolišnu izloženost žena u oba geografska područja Hrvatske (medijani: 0,49 µg Cd/L i 12,1 µg Pb/L). U nedavno objavljenom velikom istraživanju gdje su određivane koncentracije Cd i Pb u krvi žena iz više različitih država (Pawlas i sur., 2013) pokazano je da su žene iz kontinentalne Hrvatske (n = 59; iz Koprivnice) imale koncentracije Cd i Pb u rasponima od 0,15 - 4,4 µg Cd/L i 8,5 - 48 µg Pb/L što se slaže s rezultatima u ovome radu dobivenim za oba metala (0,18 - 5,55 µg Cd/L i 2,9 - 43,6 µg Pb /L). Treba istaknuti da su dobivene vrijednosti za Pb [medijan 12,1 (2,9 - 43,6 µg/L)] u ovome radu bile 5 do 6 puta niže u odnosu na prije objavljene vrijednosti u nepušačica iz ruralnih područja Hrvatske (Pizent i sur., 2001) i 2,5 puta niže u odnosu na koncentracije Pb izmjerene u muškaraca tijekom 2008. i 2009. godine (Kljaković-Gašpić i sur., 2016), što je oboje određivano u našem laboratoriju. Znatno niže vrijednosti Pb izmjerene u krvi ispitanica u našem istraživanju mogu se tumačiti postupnim smanjivanjem do konačne potpune zabrane uporabe olovnih benzina 2006. godine.

Rezultati višestruke regresije su pokazali pozitivnu povezanost između dobi majke te koncentracije Cd i Pb u krvi i posteljici kako je nađeno i u istraživanjima drugih autora (Taylor i sur., 2013; Al-Saleh i sur., 2011; Batariova i sur., 2006). Povezanost između metala i

dobi odražava svojstvo tih metala da se s vremenom nakupljaju u organima i kostima, imaju dugi biološki poluživot i sklonost otpuštanja u krvotok tijekom trudnoće kada nastaje cjelokupna redistribucija svih elemenata u organizmu trudnice.

Nađeno je da je koncentracija Cd u posteljici bila 10 - 20 puta veća u odnosu na koncentraciju Cd u krvi majke što je u suglasju s našim prije objavljenim rezultatima (Piasek i sur., 2016, 2014). Dobivene koncentracije Pb u posteljici iznosile su 40 - 50 % vrijednosti Pb izmjerenih u krvi majke što potvrđuje činjenicu da Pb, za razliku od Cd koji se nakuplja u posteljici, prolazi kroz nju i dolazi do fetusa. Tako se u krvi pupkovine mogu izmjeriti povećane koncentracije Pb kako je nađeno i u prijašnjim istraživanjima suradnika laboratorija u kojemu je izrađen doktorski rad (Stasenکو i sur., 2010). Koncentracija Pb u krvi pupkovine u ovome istraživanju iznosila je 51 - 64 % vrijednosti Pb u krvi majke što se slaže s rezultatima istraživanja provedenog u Austriji (Gundacker i sur., 2010). Visoka koncentracija Pb u krvi pupkovine pokazuje da Pb dolazi do fetusa gdje može imati izravne štetne učinke već *in utero* (ATSDR, 2007; Dorea i Donangelo, 2006; Grandjean i Landrigan, 2006).

Rezultati višestruke regresije su pokazali da je uzimanje mineralno-vitaminskih dodataka prehrani tijekom trudnoće bio značajan prediktor sniženja koncentracije Pb u krvi majke i posteljici. Negativna povezanost između koncentracije Pb u krvi majke i uzimanja mineralno-vitaminskih dodataka (točnije Ca) pokazana je i u istraživanjima drugih autora (Gulson i sur., 2016; Arbuckle i sur., 2016; Taylor i sur., 2013). Istraživanje u trudnica koje su uzimale Ca kao mineralno-vitaminskih- dodatak pokazalo je porast koncentracije Pb u krvi oko trećeg tromjesečja u odnosu na žene s niskim unosom Ca u kojih je taj porast bio oko drugog tromjesečja zbog istodobne fiziološke mobilizacije Ca iz kostiju i mobilizacije nagomilanog Pb (Gulson i sur., 2016). Autori su procijenili da je tijekom trudnoće 33 % ukupnog Pb u krvi podrijetlom iz kostiju i da se 79 % tog mobiliziranoga Pb prenosi krvlju do fetusa (Gulson i sur., 2003). Rezultati višestruke regresije također su pokazali da je stupanj obrazovanja majke negativno utjecao na koncentracije Cd i Pb u krvi majke te Pb u posteljici. Negativne povezanosti stupnja obrazovanja i koncentracija toksičnih metala su očekivane i prije su ih opisali i drugi autori (Llop i sur., 2011; Al-Saleh i sur., 2011).

Treba istaknuti zanimljive nalaze usporednih vrijednosti koncentracija Cd i Pb u posteljicama roditelja u ovom radu koje su bile niže u odnosu na vrijednosti tih metala u posteljicama koje su izmjerene u našem laboratoriju tijekom prijašnjih istraživanja. Koncentracije Cd i Pb u ispitivanoj skupini roditelja iz kontinentalnog područja ranih devedesetih godina bile su $15,9 \pm 1,4 \mu\text{g Cd/kg}$ i $41,7 \pm 6,9 \mu\text{g Pb/kg}$ u nepušačica te $28,5 \pm 2,1 \mu\text{g Cd/kg}$ i $49,5 \pm 7,5 \mu\text{g Pb/kg}$ u pušačica (Piasek i sur., 2001), a u skupinama

rodilja krajem devedesetih godina te vrijednosti su iznosile $10,3 \pm 4,3 \mu\text{g Cd/kg}$ i $20,0 \pm 17,7 \mu\text{g Pb/kg}$ u nepušačica te $22,1 \pm 6,8 \mu\text{g Cd/kg}$ i $26,3 \pm 22,5 \mu\text{g Pb/kg}$ u pušačica (Stasenko i sur., 2010). Niže vrijednosti dobivene u ovom radu za Pb također se mogu tumačiti smanjivanjem i konačnom zabranom uporabe olovnih benzina i posljedičnim smanjivanjem razina Pb u okolišu. Niže vrijednosti Cd mogu se povezati s donošenjem Zakona o ograničavanju uporabe duhanskih proizvoda 2008. godine (NN 125/2008), provođenjem javnih kampanja i upozorenja o štetnostima pušenja za zdravlje te zabranom pušenja na javnim mjestima, što je pridonijelo smanjenju ili prestanku pušenja.

Dobivene vrijednosti za Cd i Pb u posteljici slažu se s objavljenim rezultatima analiza posteljičnog tkiva za oba metala u ovome stoljeću (Fagerstedt i sur., 2015; Leino i sur., 2013; Sakamoto i sur., 2013; Esteban-Vasallo i sur., 2012; Klapac i sur., 2008). Vrijednosti Cd u posteljici objavljene u radu Kippler i suradnika (2010) bile su dvostruko veće u odnosu na naše rezultate za nepušačice i pušačice, čemu je razlog viša razina izloženosti Cd (zbog konzumacije riže kao glavne namirnice) uz nedovoljan unos Fe u žena iz Bangladeša, što oboje povećava apsorpciju Cd u crijevima.

Dobivene vrijednosti Cd u krvi pupkovine u pušačica ili nepušačica bile su niže od $0,1 \mu\text{g/L}$ čime je potvrđeno da vrlo malo Cd prolazi kroz posteljicu i da se većina Cd zadržava u posteljičnom tkivu (Piasek i sur., 2016, 2014; Kippler i sur., 2010; Osman i sur., 2000). Treba istaknuti da naši rezultati pokazuju da su unatoč jako niskim koncentracijama Cd u krvi pupkovine one ipak bile više u pušačica nego u nepušačice, čime je pokazano da izloženost majke Cd iz cigaretnog dima rezultira većim prolaskom i tog malog dijela Cd u krv pupkovine odnosno u fetus. U literaturi općenito nema mnogo podataka o prolasku Cd kroz ljudsku posteljicu u fetus zbog izloženosti majke. Dosadašnja istraživanja provedena u ljudi i na životinjama i upućuju na zaključak da glavnu ulogu u zadržavanju Cd u posteljici ima MT, ali još uvijek nije poznato kako to da se u fetus istodobno prenose Zn i Cu iako se sva tri elementa vežu na MT (Fukase i sur., 2014; Ronco i sur., 2006, 2005b; Kippler i sur., 2010; Brako i sur., 2003; Goyer, 1995). Rezultati istraživanja u eksperimentalnim uvjetima *in vivo* i *in vitro* upućuju na to da MT ipak u potpunosti ne zaustavlja Cd u posteljici, već se dio Cd prenosi drugim prijenosnim mehanizmima, najvjerojatnije prijenosnicima metala DMT1 i ZIP14 (Nakamura i sur., 2012a, b).

Nađene su značajne pozitivne korelacije između koncentracija Cd i Pb izmjerene u krvi majke, posteljice i krvi pupkovine što je u suglasju s do sada objavljenim rezultatima za oba metala u istraživanjima drugih autora (Barbieri i sur., 2016; Kim i sur., 2015; Chen i sur.,

2014; Needham i sur., 2011; Kippler i sur., 2010; Osman i sur., 2000). Također su nađene međusobne pozitivne korelacije između koncentracija Cd u krvi majke, posteljice i krvi pupkovine. Rezultati našeg dodatnog istraživanja u podskupini ovih ispitanica iz kontinentalnog područja u kojemu je određivan nikotin u kosi radi kvantifikacije podataka o navici pušenja samodređenjem i koncentracije Cd u sve tri matrice pokazali su značajne međusobne korelacije ($r > 0,25$) između koncentracija nikotina u kosi, Cd u posteljici i Cd krvi majke (Piasek i sur., 2016).

Rezultati ovog rada potvrđuju da je glavni put izloženosti Cd u pušača udisanje duhanskoga dima, a u nepušača to je prehrana, naročito namirnicama koje sadrže visoke koncentracije Cd (Piasek i sur., 2014; EFSA, 2012b). Pokazano je da su nepušačice iz priobalnoga područja imale više koncentracije Cd u uzorcima krvi majke i posteljici u odnosu na nepušačice iz kontinentalnoga područja. Nalaz se može objasniti podacima iz geokemijskog atlasa Hrvatske u kojemu je prikazano da su veće koncentracije Cd u tlu (1,2 mg/kg) priobalnog dijela u odnosu na kontinentalni dio Hrvatske (0,35 mg/kg). Tlo u priobalnoj Hrvatskoj uglavnom je tipa crvenica/ crljenica (tal. *terra rossa*) ili tzv. teško tlo s visokim sadržajem Cd, Fe, Cu, Mn, Ni, As i Hg (Halamić i sur., 2012; Halamić i Miko, 2009). Zbog prisutnosti većeg sadržaja Cd u tlu i njegov unos u organizam prehranom, koja uključuje morsku hranu, lisnato povrće i rajčice, može biti razlog zašto u ispitanica iz priobalnoga područja nismo dobili statističku značajnu razliku između pušačica i nepušačica za Cd u posteljici, dok je u ispitanica iz kontinentalnoga područja ta razlika utvrđena. Pozitivna povezanost između koncentracije Cd u posteljici i geografskog područja prebivališta nađena je i u modelu višestruke regresije. Za razliku od toga, geografsko područje prebivališta ispitanica nije utjecalo na koncentracije Pb u mjerenim biološkim uzorcima.

Koncentracija esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu i Se) u parovima majka-dijete i pušenje

U ovom doktorskom radu izmjerene su koncentracije esencijalnih elemenata Fe, Zn, Cu i Se u krvi majke, krvi pupkovine i posteljici i dobivene vrijednosti svih esencijalnih elemenata u sva tri mjerena uzorka slažu se s literaturnim podacima u općoj populaciji (Rodushkin i sur., 1999; Iyengar, 1998), kao i s rezultatima istraživanja u roditeljima odnosno parova majka–novorođenče (Jagodić i sur., 2017; Sakamoto i sur., 2013; Stasenکو i sur., 2010; Kippler i sur., 2010; Rudge i sur., 2009; Piasek i sur., 2001; Raghunath i sur., 2000; Osman i sur., 2000). Naši rezultati pokazuju da su koncentracije Cu u krvi majke (u pušačica i nepušačica) bile 10 % više od gornje referentne granice u žena (1 - 1,4 mg/L) objavljene u

radu Iyengara i suradnika (1998). Poznato je da koncentracije Cu u serumu rastu kako napreduje trudnoća i dosežu najviše vrijednosti između 38. i 40. tjedna trudnoće, dakle u vrijeme roka porođaja, nakon čega počinju opadati i u razdoblju od pet tjedana nakon porođaja spuštaju se na vrijednosti Cu izmjerene u općoj populaciji (Vukelić i sur., 2012; Martín-Lagos i sur., 1998). Porast koncentracije Cu u trudnoći mogao bi biti povezan i s porastom estrogena, koji inducira sintezu ceruloplazmina u jetri što potom dovodi do porasta razina Cu u serumu (Lopes i sur., 2004).

Northrop-Clewes i Thurnham (2007) u opsežnom preglednom radu prikazali su istraživanja o utjecaju pušenja na mikronutrijente. Na temelju literaturnih podataka autori su zaključili kako ima dokaza da pušenje može utjecati na biološke pokazatelje stanja Fe, a to su feritin, Hb i Fe u serumu, ali da su podaci o tome kontradiktorni izuzev tijekom trudnoće. Tada dolazi do povećane eritropoeze izazvane niskom saturacijom Fe u transferinu plazme i fiziološkog smanjivanja zaliha Fe zbog povećanja ukupnog volumena krvi tijekom trudnoće kada se volumen plazme poveća 30 - 50 %, a masa eritrocita 20 - 30 % u odnosu na žene koje nisu trudnice. Tako dolazi do razrjeđivanja i smanjenja koncentracije Hb (s 13,3 na 12,1 g/dL) i tzv. anemije razrjeđenja ili fiziološke anemije u trudnoći (Brown, 2017; Scholl, 2011). Dosadašnja istraživanja su pokazala da koncentracije Fe u posteljici pušačica mogu biti smanjene u odnosu na nepušačice ukoliko je istodobno prisutan i smanjeni unos Fe hranom odnosno snižene koncentracije Fe u organizmu (Ronco i sur., 2005a; Piasek i sur., 2001). U ovom istraživanju nismo našli utjecaj pušenja na Fe u krvi majke i posteljici, ali smo našli da pušačice u odnosu na nepušačice imaju veće koncentracije Fe u krvi pupkovine. Taj nalaz mogao bi biti povezan s porastom crvenih krvnih stanica u krvi pupkovine zbog porasta eritropoetina uslijed hipoksije povezane s majčinim pušenjem (Sazak i sur., 2012; Jazayeri i sur., 1998). Rezultat je također u suglasju s nalazom prijašnjih istraživanja provedenih u Hrvatskoj u kojima je nađen porasta Hb u novorođenčadi majki pušačica (Strinić i sur., 2005).

Smatra se da je odgovarajući unos Cu tijekom trudnoće i laktacije kritičan za normalan razvoj ploda. U odnosu na anemiju uzrokovanu deficijencijom Fe, nedostatak Cu u trudnoći nije tako čest, ali najnovija istraživanja pokazuju da nije rijedak kako se smatralo u prošlosti te je objavljeno da su takva stanja od 2000-ih zapravo u porastu (Uriu-Adams i sur., 2010; Keen i sur., 1998). Slično kao i za Fe, u ovome istraživanju nismo našli razlike u koncentracijama Cu u krvi majke i posteljici, ali smo našli da je pušenje bilo povezano s povišenom koncentracijom Cu u krvi pupkovine. Međudjelovanje Fe i Cu je dobro poznato i opisano u literaturi (Sharp, 2004). Mi smo našli i pozitivnu korelaciju između pušenja i koncentracije Fe i Cu u krvi pupkovine što se pokazalo i u modelu višestruke regresije. Veće koncentracije Cu

u krvi pupkovine u pušačica, ali ne i statistički značajne (0,79 µg/mL u nepušačica vs. 0,93 µg/mL u pušačica) objavljene su u radu Aydogan i suradnika (2013). Pokazano je da pušenje utječe na biološke pokazatelje stanja Cu kao što su koncentracija ceruloplazmina (Cu-ovisna feroksidaza) i aktivnost CuZn-superoksid dismutaze (CuZn-SOD) (Northrop-Clewes i Thurnham, 2007).

U ovome istraživanju nije nađen utjecaj pušenja na koncentraciju Zn u krvi majke. Kocyigit i suradnici (2001) također nisu našli razliku između koncentracija Zn u plazmi u muškaraca koji su pušili više od 10 cigareta na dan i onih koji nisu nikada pušili. Naš nalaz da pušačice imaju veće koncentracije Zn u posteljici u odnosu na nepušačice je u suglasju s prijašnjim rezultatima istraživanja u kojima su izmjerene koncentracije elemenata u ljudskoj posteljici koje su objavili drugi autori (Ronco i sur., 2005a) i koji su dobiveni i u našem laboratoriju (Stasenko i sur., 2010;). Mogući razlog povećanih koncentracija Zn u posteljici pušačica je posljedica nakupljanja Cd u posteljici koji potiče povećanu sintezu MT-a i tako veže i zadržava Zn u organu (Torreblanca i sur., 1992). Istraživanje provedeno na uzorcima ljudske posteljice pušačica i nepušačica pokazalo je da Cd iz cigaretnog dima povećava sintezu izoforme MT2 u pušačica, dok je izoforma MT1 u posteljici ostala nepromijenjena u obje ispitivane skupine. Također je nađeno da su koncentracije Zn koji je bio vezan na MT1 bile podjednake u obje skupine, dok je koncentracija Zn vezanog na MT2 bila veća u pušačica na temelju čega je zaključeno da MT sudjeluje u zadržavanju Zn u posteljici čime je taj esencijalni element manje dostupan za fetus (Ronco i sur., 2006). To može imati negativne posljedice za plod, jer je Zn nužan za normalan fetalni rast i razvoj organa te se odražavati u smanjenim razinama Zn u krvi pupkovine i smanjenoj porođajnoj masi (Kippler i sur., 2010). I naši rezultati postupne višestruke regresije pokazali su negativnu povezanost između Cd u posteljici i Zn u krvi pupkovine. Nismo našli utjecaj pušenja na koncentraciju Zn u krvi pupkovine što se slaže s nalazima istraživanja provedenog u Švedskoj (Osman i sur., 2000). Kippler i suradnici (2010) su u istraživanjima u žena iz Bangladeša našli da je koncentracija Zn u krvi pupkovine (u frakciji eritrocita) bila manja kako su se povećavale koncentracije Cd u posteljici ispitanica u kojih je glavni izvor izloženosti Cd bila konzumacija onečišćene riže praćena nedovoljnim unosom Zn prehranom.

Do sada je proveden mali broj istraživanja o utjecaju pušenja na stanje Se. Pokazano je da pušači u odnosu na nepušače mogu imati smanjene koncentracije Se u plazmi (Telišman i sur., 2007; Jurasović i sur., 2004; Goodman i sur., 2001; Kocyigit i sur., 2001) i smanjenu aktivnost GPx (Kocyigit i sur., 2001). Potonji nalaz može se tumačiti učinkom Cd iz cigaretnog dima na bioraspoloživost Se iz prehrane koji je važan za normalnu aktivnost GPx u

plazmi ili eritrocitima. Naši rezultati također su pokazali da su pušačice u odnosu na nepušačice imale niže koncentracije Se u krvi, ali nije bilo promjena u koncentracijama Se u posteljici i krvi pupkovine.

Našli smo da je odnos esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu i Se) i Cd u posteljici bio niži u pušačica u odnosu na nepušačice, ali nije nađena korelacija s porođajnom masom i duljinom. Potonje je u suglasju s prije objavljenim rezultatima istraživanja drugih autora (Ronco i sur., 2005a). Nadalje, pokazali smo da su ispitanice iz priobalnog u odnosu na kontinentalno područje imale više koncentracije Zn, Cu i Se u posteljici, Cu i Se u krvi majke te Fe i Se u krvi pupkovine što se može povezati s različitom prehranom (bogatim lisnatim povrćem i ribom) u tom području te različitim mineralnim sadržajem tla iz geografskih područja prebivanja naših ispitanica s obzirom na količine Fe, Zn, Cu, Ni, As, Cd, Hg i drugih elemenata u tlu (Halamić i sur., 2012; Halamić i Miko, 2009). Utjecaj geografskog područja prebivanja na koncentraciju Fe i Se u krvi pupkovine dokazan je i u modelu višestruke regresije.

Koncentracija steroidnih hormona, progesterona i estradiola u posteljici i pušenje

Jedna od vrlo važnih uloga posteljice je njezina endokrina funkcija. U posteljici se sintetizira nekoliko važnih peptidnih hormona: humani korionski gonadotropin (hCG), humani placentarni laktogen (hPL) ili korionski somatotropin i leptin. Također se stvaraju steroidni hormoni progesteron i estrogeni koji su nužni su za održanje trudnoće do porođaja i normalno razvijenog, zrelog novorođenčeta (Miller i Auchus, 2011; Henson i sur., 2010). Tijekom trudnoće ljudska posteljica jedini je steroidogeni organ i od jajnika (žutog tijela) preuzima sintezu progesterona između 7. i 9. tjedna trudnoće sve do porođaja pri čemu koncentracije progesterona porastu 7 do 8 puta. Glavni prekursori za sintezu progesterona jesu lipoproteini niske gustoće (LDL) koji se nalaze u krvi majke i vežu za LDL receptor na membrani steroidogenih stanica sinciotrofoblasta u koje ulaze te se oslobađa slobodni kolesterol. Odcjepljenjem bočnog lanca kolesterola pomoću enzima CYP11A nastaje pregnenolon koji prelazi u progesteron pomoću enzima 3 β -hidroksisteroidne dehidrogenaze (3 β HSD). Steroidogeneza tijekom trudnoće odvija se u cijeloj maternalno-placentarno-fetalnoj funkcijskoj jedinici na sljedeći način. Pored sinteze progesterona u posteljici, u nadbubrežnoj žlijezdi fetusa dolazi do 17 α -hidroksilacije pregnenolona u 17 α -hidroksipregnenolon pomoću enzima CYP17 i isti ga enzim dalje pretvara u dehidroepiandrosteron (DHEA). U posteljici DHEA je prekursor androstendiona u koji se pretvara pomoću enzima 3 β HSD i iz njega u

estron pomoću enzima CYP19, a preko testosterona u estradiol. U fetalnoj nadbubrežnoj žlijezdi stvaraju se velike količine DHEA, odnosno DHEA-sulfata (DHEAS, pomoću sulfotransferaze) koji se prenosi u fetalnu jetru, a nakon 16 α -hidroksilacije u posteljici metabolizira u estriol, vrstu estrogena karakterističnu za trudnoću (Miller i Auchus, 2011; Sanderson, 2009; Zakar, 2007; Pasqualini, 2005; Tuckey, 2005).

Eksperimentalna istraživanja *in vivo* i *in vitro* pokazala su da pri niskim razinama izloženosti Cd može imati metaloestrogena svojstva i svojstva kemijske tvari koja izazva reprodukciju endokrinu disrupciju, a pri srednjim i visokim dozama toksične učinke na muške i ženske spolne organe i funkcije (Piasek i sur., 2011; Henson i sur., 2010; Tsutsumi i sur., 2009; Apostoli i sur., 2007; Henson i Chedrese, 2004; Piasek i Laskey, 1999). U laboratoriju u kojem je izrađen ovaj rad, krajem 1990-ih provedena su preliminarna istraživanja učinaka Cd na steroidogenezu u posteljici pušačica u odnosu na nepušačice i prvi puta u literaturi objavljene su vrijednosti koncentracija progesterona u terminskoj posteljici povezane s aktivnim pušenjem cigareta, koje su određene specifičnom radioimunološkom analizom (RIA). U pušačica u odnosu na nepušačice u posteljicama je nađen značajno niži progesteron pored gotovo dvostruko viših razina Cd (Piasek i sur., 2001). Istodobno su bili objavljeni i rezultati istraživanja na ljudskim posteljicama u SAD-u u kojima su nakon porođaja carskim rezom posteljice bile izložene Cd *in vitro* i koji su također pokazali snižene koncentracije progesterona u posteljičnom tkivu (sinciciotrofoblastu) u kojemu se istodobno nakupljao Cd (Kawai i sur., 2002; Jolibois i sur., 1999). U tim istraživanjima dokazana su specifična mjesta učinaka Cd tijekom sinteze progesterona, na LDL receptor na membrani steroidogene stanice (sinciciotrofoblasta) i na enzim CYP11A (koji odcjepljuje bočni lanac u početnom supstratu kolesterolu) te je kao moguće mjesto učinka Cd istraživana i aktivnost enzima 3 β HSD (koji pretvara pregnenolon u progesteron). Zaključeno je da je učinak Cd na produkciju steroidnih hormona u ljudskoj posteljici moguć na više mjesta u lancu biosinteze steroidnih hormona. Snižene koncentracije progesterona u posteljici nađene su i u istraživanjima na pokusnim skotnim štakoricama nakon izlaganja Cd parenteralno (iz potkožno implantiranih osmotskih pumpica) tijekom gotovo cijele skotnosti i taj je učinak bio izraženiji ako su štakorice istodobno bile hranjene krmivom s niskom količinom Fe (Piasek i sur., 2002). Dosadašnja istraživanja u ljudskoj posteljici *in vitro* pokazala su da nakupljeni Cd može sniziti i koncentracije leptina (u: Stasenko i sur., 2010).

U ovom radu nismo našli razlike u koncentracijama progesterona i estradiola u posteljicama s obzirom na naviku pušenja ispitanica što se slaže s rezultatima novijih istraživanja u laboratoriju u kojem je rad izrađen i koji su dobiveni jednakom metodom

određivanja hormona progesterona i estradiola u uzorcima posteljice, tj. imunokemijski metodom IEMA (Stasenko i sur., 2010). Koncentracije progesterona u posteljici u našem istraživanju u odnosu na prethodno provedena bile su oko 50 % niže, ali i dalje unutar raspona vrijednosti objavljenih za ljudsku posteljicu do sada u literaturi (Feinshtein i sur., 2010; Piasek i sur., 2001; Kalenga i sur., 1991). Razlozi da u našem radu, kao i u prije objavljenom radu Stasenko i suradnika (2010), nije nađen učinak aktivnog pušenja na koncentracije progesterona u posteljici za razliku od preliminarnih rezultata Piasek i suradnika (2001) najvjerojatnije su različite metode analize progesterona. Imunokemijska metoda IEMA se u novije vrijeme upotrebljava za analizu progesterona, a prije je upotrebljena metoda RIA. Ne postoji standardna metoda određivanja steroidnih hormona u posteljici, pa se određivanjem progesterona odnosno estradiola rutinskim kliničkim metodama mjerenja steroidnih hormona u jako razrijeđenim uzorcima rekonstituiranih liofilizata supernatanata homogenata posteljičnog tkiva (kako bi bili što sličniji serumu, odnosno plazmi) uvodi analitička pogreška i teško je zamijetiti fine razlike. Potrebna su daljnja istraživanja i nalaženje optimalnih metoda pripreme uzoraka i određivanja steroidnih hormona u ljudskoj posteljici.

Koncentracije estradiola u ovom radu bile su slične do sada objavljenim vrijednostima u ljudskoj posteljici nakon spontanog ročnog rodničkog porođaja (Stasenko i sur., 2010; Wilson i sur., 1984; Lahav i sur., 1980). Dosadašnja istraživanja pokazuju da pušenje može utjecati na koncentracije estrogena u žena tijekom kao i izvan trudnoće (opisano u: Piasek i sur., 2011). Istraživanjima u ljudskim stanicama raka dojke pokazano je da zbog velikog afiniteta vezanja na specifične receptore steroidnih hormona Cd može blokirati vezanje 17β -estradiola i inhibirati njegovu transkripciju čime može oponašati djelovanje endogeno stvorenih estrogena u organizmu (djelovati ksenoestrogeno, odnosno metaloestrogeno), a može se aktivirati i gen progesteronskog receptora (Safe, 2003). U štakorica izlaganih Cd dolazi do preuranjenog puberteta i pojačanog razvoja mliječnih žlijezda (Johnson i sur., 2003). Stoga se Cd može smatrati kancerogenim metaloestrogenom čije mehanizme djelovanja treba tek istražiti, kako za Cd, tako i za druge metale s metaloestrogenim svojstvima kao što su Pb, As, U i drugi.

5.2 Unos hrane morskoga podrijetla, geografsko područje prebivanja i amalgamske ispune: utjecaj na koncentracije Hg i Se

Najvažniji izvori izloženosti Hg u općoj populaciji jesu izlaganje metil-Hg konzumacijom hrane morskoga podrijetla te živinim parama (Hg^0) iz amalgamskih zubnih ispuna i etil-Hg prilikom cijepljenja (starim) cjepivima koji su sadržavali tiomersal kao konzervans (Ha i sur., 2017; Bjørklund i sur., 2017; Clarkson i sur., 2003).

Hrana morskog podrijetla i geografsko područje prebivanja

Izloženost Hg morskom hranom podrazumijeva dugotrajnu izloženost malim dozama Hg i ovisi o vrsti morske hrane koja se konzumira te o učestalosti (broju) obroka u određenom razdoblju. Konzumacijom morske hrane/ ribe istodobno se unose i druge vrijedne hranjive tvari (nutrijenti) kao što su Se i nezasićene omega-3 masne kiseline. Pretpostavlja se da Se iz ribe sprječava toksične učinke Hg, a omega-3 masne kiseline imaju nezamjenjivu ulogu u razvoju mozga i važne za su krvožilni sustav (Ralston i Raymond, 2010; Choi i sur., 2008).

Istraživanja provedena u Švedskoj, koja su uključivala žene reproduktivne dobi te trudnice i njihovu novorođenčad, pokazala su da postoji povezanost između učestalosti konzumacije morske hrane/ ribe i koncentracije Hg u krvi i kosi te Se u serumu (Björnberg i sur. 2005, 2003). Rezultati ovoga istraživanja pokazuju povezanost učestalosti unosa hrane morskoga podrijetla i porasta koncentracije Hg i Se u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine, što je nađeno i u modelu višestruke regresije. Majke koje konzumiraju hranu morskoga podrijetla (ribe) više od dva puta na tjedan imale su koncentraciju Hg u krvi sedam i više puta višu u odnosu na osobe koje ne konzumiraju takvu hranu. Ispitanice iz priobalnog područja imale su veći unos hrane morskoga podrijetla, ponajprije ribe, u odnosu na ispitanice iz kontinentalnog područja, a time i više koncentracije Hg i Se u svim mjerenim biološkim uzorcima. Utjecaj prebivališta na koncentraciju Hg nađen je i u modelu višestruke regresije. Dobivene vrijednosti Hg u krvi ispitanica iz priobalnoga područja [$2,39 \mu\text{g/L}$ ($1,06 - 4,71$)] slažu se s prije objavljenim vrijednostima za Hrvatsku i Italiju (Miklavčič i sur., 2013), a 1,5 i 2,3 puta su niže u odnosu na vrijednosti objavljene za Grčku i Španjolsku (Llop i sur., 2014). Vrijednosti Hg u krvi majke [$0,96 \mu\text{g/L}$ ($0,56 - 1,64$)] i pupkovine [$1,06 \mu\text{g/L}$ ($0,55 - 1,89$)] ispitanica iz kontinentalnoga područja slažu se s objavljenim vrijednostima u Austriji (krv majke: $0,7 \mu\text{g/L}$; krv pupkovine: $1,1 \mu\text{g/L}$) i Slovačkoj (krv majke: $0,63 \mu\text{g/L}$; krv pupkovine: $0,8 \mu\text{g/L}$) (Gundacker i sur., 2010; Palkovicova i sur., 2008). Nedavno objavljeno istraživanje provedeno na parovima majka–dijete s područja Hrvatske (točnije Rijeke) i Slovenije

pokazalo je da su koncentracije Hg u kosi majke i krvi pupkovine dva puta veće u hrvatskoj populaciji, što odgovara većem unosu ribe i ribljih proizvoda u odnosu na Sloveniju (Snoj Tratnik i sur., 2017). S obzirom da je u morskoj hrani metil-Hg, taj oblik Hg lako prolazi kroz posteljicu, a vrijednosti Hg u krvi pupkovine mogu biti čak 20 - 65 % veće u odnosu na vrijednosti u krvi majke (Dorea i Donangelo, 2006). Pretpostavlja se da se metil-Hg prenosi kroz posteljicu pomoću nosača za neutralne aminokiseline kojima je krv pupkovine bogatija u odnosu na krv odrasle osobe, odnosno da se odvija prijenos metil-Hg u jednom smjeru do fetusa gdje se Hg nakuplja (Kajiwara i sur., 1996). Naši rezultati pokazuju da su izmjerene vrijednosti Hg u krvi pupkovine u roditelja koje su konzumirale hranu morskoga podrijetla više od dva puta na tjedan veće za 1,5 puta u odnosu na vrijednosti Hg u krvi majke, što se slaže s prije objavljenim rezultatima (Miklavčić i sur., 2013; Vahter i sur., 2000). Također smo našli značajne korelacije između Hg u sva tri mjerena biološka uzorka te između konzumacije morske hrane i koncentracija Hg i Se u svim biološkim uzorcima što se slaže s do sada objavljenim rezultatima za populaciju u Hrvatskoj (Miklavčić i sur., 2013).

Referentna vrijednost metil-Hg u krvi prema američkoj Agenciji za zaštitu okoliša (US EPA) iznosi 5,8 µg/L što odgovara vrijednosti od 6,4 µg/L ukupne Hg u krvi jer poznato je da metil-Hg čini ≥ 90 % ukupne vrijednosti Hg u krvi (Mahaffey, 2005). U našem istraživanju u priobalnoj Hrvatskoj je 10 % žena i 31 % novorođenčadi imalo koncentracije Hg u krvi $> 6,4$ µg/L, dok je < 1 % žena i 3 % novorođenčadi prelazilo tu referentnu vrijednost u kontinentalnoj Hrvatskoj. Radi usporedbe, u Španjolskoj čak > 60 % novorođenčadi ima koncentracije Hg u krvi veće od referentne vrijednosti (Ramon i sur., 2011). Međutim, u Španjolskoj 90 % trudnica konzumira morsku hranu tri i više puta na tjedan što dovodi do izloženosti fetusa *in utero* i novorođenčeta višim dozama Hg i metil-Hg (Ramon i sur., 2011; Díez i sur., 2009), dok je u ovom istraživanju samo 7 % ispitanica konzumiralo morsku hranu više od tri puta na tjedan.

Izloženost Hg iz amalgamskih ispuna

Izloženost ljudi Hg iz amalgamskih zubnih ispuna, iz kojih se otpuštaju male količine elementarne Hg u obliku živinih para (Hg^0), najviše se događa tijekom njihovog postavljanja ili vađenja. U organizmu se, nakon udisanja, Hg^0 nakuplja najviše u mozgu i bubrezima i ima dokazane neurotoksične i nefrotoksične učinke (Bjørklund i sur., 2017; Clarkson i sur., 2003). Općenito prihvaćeni pokazatelj za procjenu izloženosti Hg^0 (profesionalne ili iz amalgamskih ispuna) je koncentracija ukupne Hg u urinu. Koncentracije ukupne Hg u krvi i kosi pokazatelji

su izloženosti metil-Hg s obzirom da najveći doprinos ($\approx 90\%$) ukupnoj koncentraciji Hg u krvi/ kosi ima metil-Hg iz morske hrane (Mahaffey, 2005), što potvrđuju i naši rezultati višestruke regresije. Također je poznato da se u krvi metil-Hg uglavnom veže na eritrocite, dok se anorganski oblik Hg raspodjeljuje između krvnih stanica i plazme (WHO, 1990). Iako se u dosadašnjim istraživanjima koncentracije Hg u plazmi/serumu u pravilu ne rabe za procjenu izloženosti, novija saznanja upućuju na prednosti upravo te matrice u procjeni kronične izloženosti pojedinca (Carneiro i sur., 2014).

U ovome istraživanju ispitali smo povezanost koncentracije ukupne Hg u serumu s obzirom na broj amalgamskih zubnih ispuna. Dosadašnja istraživanja pokazala su da koncentracije anorganske Hg u krvi majke i pupkovine rastu s brojem amalgamskih zubnih ispuna (Björnberg i sur., 2005, 2003). Naši rezultati pokazuju veću koncentraciju ukupne Hg u serumu majke i pupkovine u ispitanica koje imaju amalgamske zubne ispune u odnosu na osobe koje nemaju amalgamskih ispuna, dok za koncentraciju Hg u posteljici nije bilo razlika. Takvi rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja provedenog u rodilja iz Turske (Bedir Findik i sur., 2016). Pretpostavlja se da Hg^0 prolazi kroz posteljicu prije oksidacije katalazom u Hg^{2+} , dolazi do fetusa i može se početi nakupljati u bubregu još prije rođenja (Lutz i sur., 1996).

Također smo našli da su koncentracije Hg u serumu majke i pupkovine rasle s porastom broja majčinih amalgamskih ispuna. Iako nisu dobivene statistički značajne razlike između ispitivanih skupina, u modelu višestruke regresije nađena je povezanost između broja amalgamskih zubnih ispuna i koncentracije Hg u serumu majke i pupkovine. Poznato je da četkanje zubi, vrući napici i određena hrana povećavaju otpuštanje Hg iz amalgamskih ispuna (Rathore i sur., 2012; Uçar i Brantley, 2011). Eksperimentalna istraživanja pokazala su da stavljanje i micanje amalgamskih ispuna može imati štetne posljedice za fetus (Soussa i sur., 2013). Izloženost stomatologa i tehničara Hg u zubnoj ordinaciji može imati negativne učinke na reprodukciju, no nikada nisu određene dozvoljene razine tih izloženosti (Schuurs, 1999). U novije vrijeme napušta se njihova ugradnja i s vremenom će takve vrste profesionalne izloženosti nestati.

Dobiveni rezultati upućuju da je koncentracija ukupne Hg u serumu potencijalni novi biološki biljeg izloženosti elementarnoj živi, o čemu do sada u literaturi nema dovoljno podataka.

5.3 Polimorfizam *MT2A* rs28366003: utjecaj na koncentracije toksičnih i esencijalnih elemenata, MT2 i slobodne –SH skupine

Koncentracija toksičnih i esencijalnih elemenata u parovima majka-dijete

U literaturi je objavljen mali broj radova o utjecaju polimorfizma *MT2A* rs28366003 na razdiobu metala i još uvijek se ne zna dovoljno o njegovom utjecaju na pohranu, homeostazu i detoksikaciju metala u organizmu. Prva istraživanja te vrste provedena su u stanovnika Turske, Poljske i Japana (Hattori i sur., 2016; Starska i sur., 2015, 2014; Tekin i sur., 2012a, b; Kayaalti i sur., 2010, 2011; Kita i sur., 2006; Koizumi i sur., 1999). Utjecaj polimorfizma *MT2A* rs28366003 u hrvatskoj populaciji do sada nije proučavan i ovo je prvi takav rad. Prema literaturnim podacima (tablica 1 u prilogu 1), učestalost osoba s AA genotipom je preko 85 %, osoba nositelja alela G u rasponu od 6 - 18 %, s tim da je stopa pojavnosti alela G najviša u Japanu, a najniža u američkoj populaciji (Starska i sur., 2015; 2014; Raudenska i sur., 2014; Wang i sur., 2012; Kayaalti i sur., 2010).

Dosadašnja istraživanja provedena u roditelja nepušačica u Turskoj pokazala su da su nositeljice alela G (AG genotip) u odnosu na genotip AA imale veću koncentraciju Cd u krvi i nižu koncentraciju Cd u posteljici (Tekin i sur., 2012a). Također je nađena veća koncentracija Pb u krvi, dok je koncentracija Pb u posteljici bila nepromijenjena (Tekin i sur., 2012b). Istraživanje u kojem su bili uključeni zdravi dragovoljci, nepušači obaju spolova, pokazalo je da su nositelji alela G imali veće koncentracije Cd i Pb u krvi i nižu koncentraciju Zn u serumu, dok je koncentracija Cu bila nepromijenjena u odnosu na genotip AA (Kayaalti i sur., 2011). Na temelju opisanih rezultata autori su zaključili da polimorfizam *MT2A* rs28366003 može biti povezan s povećanom osjetljivošću pojedinca na štetni utjecaj toksičnih metala. Međutim, koncentracije Cd u krvi objavljene u radu Tekina i suradnika (2012a) i Kayaaltija i suradnika (2011) neočekivano su visoke ($>1,6 \mu\text{g Cd/L}$) u odnosu na prije objavljene koncentracije Cd u krvi nepušača u Turskoj (El-Agha i Gokmen, 2002) koje se slažu s referentnom vrijednošću ($<1 \mu\text{g Cd/L}$) u nepušača (Nordberg i sur., 2015). Također, objavljena vrijednost koncentracije Cd u posteljici (Tekin i sur., 2012a) neuobičajeno je niska u odnosu na objavljene vrijednosti Cd u krvi; štoviše, prema nedavno objavljenom preglednom radu koji objedinjuje vrijednosti Cd u posteljici objavljene od 1976. do 2011. godine te se vrijednosti nalaze među najnižim vrijednostima te vrste u dosadašnjoj literaturi (Esteban-Vasallo i sur., 2012). Stoga, iz gore navedenih činjenica možemo zaključiti kako se čini da je u tim istraživanjima vjerojatno postojao neki neutvrđeni izvor izloženosti Cd i/ ili (pre)analitička pogreška i sve navedeno je moglo utjecati na dobivene rezultate istraživanja i

krajnjeg zaključka autora o utjecajima polimorfizma *MT2A* rs28366003 na nakupljanje metala u analiziranim biološkim uzorcima. Nadalje, zaključci o utjecaju majčinog polimorfizma *MT2A* na Cd, ali i na druge elemente analizirane u biološkim uzorcima uzetih nakon porođaja, trebaju se donositi vrlo pažljivo imajući na umu različite čimbenike koji mogu utjecati na koncentracije Cd u organizmu kao što je pušenje cigareta i drugi, a sam učinak pušenja kao važan prediktor izloženosti Cd može prekriti učinak specifičnog genskog polimorfizma.

U ovome radu nije nađena razlika u koncentraciji Cd i Pb u krvi s obzirom na polimorfizam *MT2A*, što se slaže s rezultatima Cd u serumu 2774 ispitanika u Japanu (Hattori i sur., 2016). Što se tiče utjecaja na koncentracije Hg u analiziranim biološkim uzorcima, naši rezultati su pokazali da nije bilo utjecaja polimorfizma *MT2A*, o čemu do sada u literaturi nema nikakvih podataka već su istraživani drugi polimorfizmi jednog nukleotida *MT2A* (Wang i sur., 2012).

U istraživanju provedenom na uzorcima tkiva prostate nađene su veće koncentracije Cd, Zn i Cu u osoba koji su nositelji alela G (AG/GG genotip) u odnosu na AA genotip (Kržešlak i sur., 2013). Razlike u koncentracijama Zn s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs28366003 nisu nađene u opsežnom istraživanju ispitanika obaju spolova (Hattori i sur., 2016) kao ni u uzorcima krvi majke i pupkovine te posteljici (Tekin i sur., 2012a). Novi nalaz ovoga rada je statistički značajno smanjenje Fe u posteljici u nositeljica alela G u odnosu na osobe s AA genotipom. Ti se rezultati mogu barem djelomično objasniti činjenicom da se i Fe, a ne samo Zn, Cu i Cd, može vezati na MT u određenim uvjetima (kiselom mediju *in vitro*) i tako poticati sintezu MT-a (Bresgen i Eckl, 2015). Također je poznato da MT može zaštititi stanicu od oksidacijskog stresa izazvanog prekomjernom količinom Fe s posljedičnom destabilizacijom lizosoma (Baird i sur., 2006). Tekin i suradnici (2012a) nisu našli razlike između genotipova u koncentraciji Fe u posteljici, ali su našli veće koncentracije Fe u krvi pupkovine nepušačica nositeljica alela G u odnosu na genotip AA. Kako je već prije istaknuto, brojni čimbenici mogu utjecati na esencijalne i toksične elemente u organizmu te ih je prilikom istraživanja, kao i tumačenja rezultata utjecaja polimorfizma *MT2A* na koncentracije elemenata u raznim tjelesnim odjeljcima i fiziološkim stanjima, potrebno sve uzeti u obzir. Za konačne zaključke o međusobnim utjecajima polimorfizma *MT2A* i pušenja, kako na koncentraciju Fe tako i na koncentracije drugih esencijalnih te toksičnih elemenata, potreba su daljnja istraživanja koja će uključivati veći broj ispitanika, u ovome slučaju pušača i nepušača, kao i skupina određene dobi, odnosno razdvojenih po spolu.

Koncentracija MT2 i slobodnih –SH skupina u serumu majke

Cigaretni dim sadrži brojne organske i anorganske tvari, uključujući ione metala, koje mogu izazvati oksidacijski stres (Taito i sur., 2016). Veća ekspresija MT-a u pušača rezultat je detoksikacijskog mehanizma na učinke toksičnih metala iz cigaretnog dima, među kojima je najzastupljeniji Cd s najvećim afinitetom vezanja za MT (Ruttkay-Nedecky i sur., 2013; Coyle i sur., 2002). U žena tijekom trudnoće na ekspresiju MT-a također u velikoj mjeri utječu promjene u koncentracijama progesterona i prijenos esencijalnih elemenata, osobito Cu i Zn, potrebnih za fetalni rast i razvoj te njegovu zaštitu od štetnih učinaka koji mogu nastati u uvjetima izloženosti toksičnim metalima kao što je Cd (Coyle i sur., 2002). Pokazano je da trudnice imaju oko 65 % veće koncentracije MT-a u plazmi nego žene koje nisu trudne dok su u pušačica koncentracije MT-a u plazmi veće oko 20 % nego u nepušačica (Kowalska i sur., 2015). Rezultati višestruke regresije u ovom radu pokazali su utjecaj pušenja cigareta na povećanje koncentracije MT2 u majčinom serumu.

Sastojci duhanskog dima također reagiraju sa slobodnim –SH skupinama trošeći njihove zalihe u organizmu (Stauffer, 1974). Koncentracije slobodnih –SH skupina izmjerene u ovom istraživanju slažu se s vrijednostima objavljenima u literaturi kao i nalaz da pušačice imaju značajno manje koncentracije slobodnih –SH skupina u serumu nego nepušačice (Costa i sur., 2006; Mircea i sur., 2003).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je ekspresija *MT2A* manja u ispitanika nositelja *G* alela (*AG* genotip) u odnosu na *AA* genotip (Starska i sur., 2015; 2014; Krześlak i sur., 2013). U istraživanju novijeg datuma provedenom u velikom broju (>2500) ispitanika obaju spolova nisu nađene razlike u ekspresiji MT-a (*MT1+MT2*) između tih genotipova (Hattori i sur., 2016). U ovome istraživanju također nije nađen utjecaj polimorfizma *MT2A* rs28366003 ni na ekspresiju MT2, ni na koncentraciju slobodnih –SH skupina.

5.4 Parametri novorođenčadi s obzirom na pušenje, prehrambene navike i polimorfizam *MT2A* rs28366003

Pušenje cigareta tijekom trudnoće može utjecati na rast i razvoj djeteta i uzrokovati povećanu sklonost razvoja brojnih kroničnih uključujući zloćudne bolesti potomka poslije u životu. Poznato je da cigaretni dim sadrži mnogobrojne toksične i kancerogene tvari kao što su nikotin, ugljikov monoksid i više desetaka stabilnih i radioaktivnih iona, od kojih mnogi imaju genotoksična i kancerogena svojstva, pa su štetni učinci pušenja na dijete kombinacija učinaka svih tih štetnih supstancija (Pappas, 2011; Piasek i sur., 2011).

U mnogim dosadašnjim istraživanjima opisani su štetni učinci pušenja na smanjenu porođajnu masu i/ ili duljinu (Aydogan i sur., 2013; Stasenکو i sur., 2010; Knopik, 2009; Strinić i sur., 2005; Ronco i sur., 2005a) iako takvi učinci nisu nađeni u svim istraživanjima (Grzunov Letinić i sur., 2016; Thomas i sur., 2015; Piasek i sur., 2001). U ovome istraživanju također nismo našli utjecaj pušenja na porođajnu masu i duljinu te ocjenu vitalnosti novorođenčeta APGAR.

Kako je već istaknuto, organizmi u rastu i razvoju izrazito su osjetljivi na štetne učinke svih oblika Hg, posebno metil-Hg koji mogu imati štetne učinke na neurološki razvoj djeteta uzrokujući mentalnu retardaciju, kašnjenje u razvoju, poteškoće u govoru i gubitak pamćenja (Ha i sur., 2017; Karagas i sur., 2012; WHO, 1990). Opsežna istraživanja u stanovnika koji pretežno konzumiraju morsku hranu (Farojski otoci, Sejšelsko otočje, Kanada, Novi Zeland i Peru) nisu potvrdila da je prenatalna izloženost Hg zbog majčine konzumacije morske hrane povezana s neurološkim poremećajima ili smetnjama ponašanja u potomaka te su potrebna daljnja istraživanja uzroka takvih poremećaja (Myers i Davidson, 2000). U ovom istraživanju također nisu nađene povezanosti između unosa hrane morskoga podrijetla ili broja amalgamskih zubnih ispuna i vrijednosti porođajne mase i duljine te ocjene APGAR. Također nije nađen utjecaj polimorfizma *MT2A* rs28366003 na te parametre, što je u skladu s nalazima drugih autora (Tekin i sur., 2012a, b).

U cjelini, ovaj rad sadrži rezultate koji mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja utjecaja polimorfizma *MT2A* rs28366003 (c.-77A>G) na koncentracije toksičnih i esencijalnih metala i procjene njihovih učinke na zdravlje žena reprodukcijске dobi i njihovih potomaka u uvjetima svakodnevne izloženosti onečišćivačima iz okoliša. Za bolje razumijevanje i konačne zaključke o utjecaju polimorfizma *MT2A* rs28366003 majke na koncentracije toksičnih i esencijalnih elemenata u majčinom organizmu, njihov prijenos do fetusa kao i nakupljanje elemenata u posteljici bilo bi potrebno provesti daljnja istraživanja na velikom broj ispitanika i u reprezentativnim skupinama stanovništva uz istodobno pažljivo praćenje glavnih izvora izloženosti metalima kao što su prehrana i pušenje cigareta.

6. ZAKLJUČCI

U zdravih roditelja nakon ročnog rodničkog porođaja u kontinentalnom i priobalnom području Hrvatske procijenjen je utjecaj glavnih izvora izloženosti toksičnim metalima u općoj populaciji (Cd i Pb pušenjem cigareta i Hg konzumacijom morske hrane) i polimorfizma *MT2A* rs28366003 na koncentracije najvažnijih toksičnih metala i s njima povezanih esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu, Se) u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine; na koncentracije steroidnih hormona u posteljici te koncentracije MT2 i slobodnih –SH skupina u serumu majki. Rezultati ovog istraživanja upućuju na sljedeće zaključke:

- ispitanice pušačice u odnosu na nepušačice
 - imaju povećane koncentracije Cd u krvi (2 - 3 puta) i posteljici (oko 1,5 puta) koje međusobno dobro koreliraju, a u krvi pupkovine Cd je podjednako nizak (<0,1 µg/L);
 - imaju značajno veće koncentracije Pb u krvi majke, krvi pupkovine i posteljici, Fe i Cu u krvi pupkovine, Zn u posteljici te smanjene koncentracije Se u krvi i slobodnih –SH skupina u serumu majke, a MT2 u serumu majke povećava se s intenzitetom pušenja;
 - nisu se razlikovale u koncentracijama progesterona i estradiola u posteljici i vrijednostima parametara općeg stanja novorođenčadi (porođajnoj masi, porođajnoj dužini i ocjeni vitalnosti ploda APGAR);
- ispitanice iz priobalnog u odnosu na kontinentalno geografsko područje prebivanja
 - konzumiraju više hrane morskoga podrijetla (ribe) i imaju više koncentracije Hg i Se u svim mjerenim biološkim uzorcima srazmjerne s učestalošću unosa ribe;
 - također su imale više koncentracija Cd i Cu u krvi, Zn i Cu u posteljici te Fe u krvi pupkovine, a nije bilo razlika u koncentracijama Pb u svim mjerenim uzorcima;
- ispitanice koje imaju amalgamske zubne ispune
 - imaju veće koncentracije Hg u serumu kao i serumu pupkovine koje su srazmjerne broju amalgama (bez obzira na unos hrane morskoga podrijetla);
- utjecaj polimorfizma jednog nukleotida u genu *MT2A* (c.-77A>G)
 - nađen je u smanjenju koncentracija Fe u posteljicama nepušačica nositeljica alela G (AG/GG genotip) u odnosu na genotip AA;
 - nije nađen na koncentracije toksičnih metala (Cd, Pb i Hg) i ostalih esencijalnih elemenata (Zn, Cu i Se) u svim mjerenim uzorcima, na koncentracije Fe u krvi majke i pupkovine, na koncentracije MT2 u serumu majke kao ni na parametre općeg stanja novorođenčadi.

7. POPIS KRATICA

APGAR	ocjena vitalnosti ploda nakon rođenja prema dr. V. Apgar (engl. <i>APGAR Score: Appearance, Pulse, Grimace, Activity, and Respiration</i>)
ARE	element antioksidacijskog odgovora (engl. <i>antioxidant response element</i>)
ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i>)
ATSDR	Agencija za toksične supstancije i registar bolesti (engl. <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>)
COPHES	EU projekt <i>Consortium to Perform Human Biomonitoring on a European Scale</i>
DHEA	dehidroepiandrosteron (engl. <i>dehydroepiandrosterone</i>)
DMT1	prijenosnik dvovalentnih metala (engl. <i>divalent metal transporter 1</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	imunokemijska metoda ELISA (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ESBIO	EU projekt <i>Expert team to Support BIOmonitoring in Europe</i>
FP1	prijenosnik željeza, feroportin 1 (engl. <i>ferroportin 1</i>)
FSH	folikulstimulirajući hormon (engl. <i>follicle-stimulating hormone</i>)
GGTP	gama-glutamil transpeptidaza (engl. <i>gamma-glutamyl transpeptidase</i>)
GPx	glutation peroksidaza (engl. <i>glutation-peroxidase</i>)
GRE	element odgovara na glukokortikoide (engl. <i>glucocorticoid response element</i>)
GSH	glutation (engl. <i>glutathione</i>)
Hb	hemoglobin
HBM	biološki monitoring ljudi (engl. <i>human biological monitoring</i>)
hCG	humani korionski gonadotropin (engl. <i>human chorionic gonadotropin</i>)
HEK293	stanice bubrega ljudskog embrija 293 (engl. <i>human embryonic kidney cells 293</i>)
HESI	Institut za zdravlje i okoliš (engl. <i>The Health and Environmental Science Institute</i>)
HEIMTSA	EU projekt <i>Health and Environment Integrated Methodology and Toolbox for Scenario Assessment</i>
hPL	humani placentarni laktogen
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
ICP-MS	masena spektrometrija induktivno spregnute plazme (engl. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
IEMA	imunokemijska metoda IEMA (engl. <i>immunoenzymometric assay</i>)
INTARESE	EU projekt <i>Integrated Assessment of Health Risks of Environmental Stressors in Europe</i>
IQ	koeficijent inteligencije (engl. <i>intelligence quotient</i>)
IUGR	zastoj rasta ploda <i>in utero</i> (engl. <i>intrauterine growth restriction</i>)
KM	krv majke (rodilje)
KP	krv pupkovine
LDL	lipoprotein niske gustoće (engl. <i>low-density lipoprotein</i>)

LH	luteinizirajući hormon (engl. <i>luteinizing hormone</i>)
LoD	granica detekcije (engl. <i>limit of detection</i>)
LoQ	granica kvantifikacije (engl. <i>limit of quantitation</i>)
MRE	element odgovora na metale (engl. <i>metal response element</i>)
MT	metalotionein (engl. <i>metallothionein</i>)
MTF-1	transkripcijski faktor 1 (engl. <i>MRE-binding transcription factor-1</i>)
MTP1	protein 1 prijenosnik metala (engl. <i>metal transporter protein 1</i>)
MZOŠ	Ministarstvo znanosti obrazovanja i športa
NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. <i>National Center for</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PL	posteljica (lat. i engl. <i>placenta</i>)
RFLP	polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RIA	radioimunološka analiza (engl. <i>radio immuno assay</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RSD	relativno standardno odstupanje (engl. <i>relative standard deviation</i>)
SD	standardno odstupanje (engl. <i>standard deviation</i>)
SM	serum majke (rodilje)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single-nucleotide polymorphism</i>)
SOD	superoksid dismutaza (engl. <i>superoxide dismutases</i>)
SP	serum pupkovine
STAT	prenosilac signala i aktivator transkripcije (engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TfR1	transferinski receptor 1 (engl. <i>transferrin receptor protein 1</i>)
US EPA	Američka Agencija za zaštitu okoliša (eng. <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
UTR	netranslatirajuća regija (engl. <i>untranslated region</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>)
3βHSD	3β-hidroksisteroidna dehidrogenaza

8. LITERATURA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2012) Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Human Services, SAD.
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2010) CERCLA Priority List of Hazardous Substances for 2007. Centers for Disease Control, SAD.
<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/previous/07list.html>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2009) Children's Exposure to Elemental Mercury: A National Review of Exposure Events. Department of Health and Human Services, SAD.
<https://www.atsdr.cdc.gov/mercury/docs/mercuryrtcfinal2013345.pdf>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2007) Toxicological Profile for Lead. Department of Health and Human Services, SAD.
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>
- Al-Saleh I, Shinwari N, Mashhour A, Mohamed Gel D, Rabah A (2011) Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. *Int J Hyg Environ Health* **214**: 79-101
- Angerer J, Bird MG, Burke TA, Doerrner NG, Needham L, Robison SH, Sheldon L, Zenick H (2006) Meeting Report: strategic biomonitoring initiatives: moving the science forward. *Toxicol Sci* **93**: 3-10
- Angerer J, Ewers U, Wilhelm M (2007) Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health* **210**: 201-228
- Apostoli P, Telišman S, Sager PR (2007) Reproductive and developmental toxicity of metals. U: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Third Edition. Fowler BA, Nordberg M, Friberg L, Nordberg G (ur). Academic Press, New York, 213-249
- Arbuckle TE, Liang CL, Morisset AS, Fisher M, Weiler H, Cirtiu CM, Legrand M, Davis K2, Ettinger AS, Fraser WD, the MIREC Study Group (2016) Maternal and fetal exposure to cadmium, lead, manganese and mercury: The MIREC study. *Chemosphere* **163**: 270-282
- Ashley-Martin J, Dodds L, Arbuckle TE, Ettinger AS, Shapiro GD, Fisher M, Taback S, Bouchard MF, Monnier P, Dallaire R, Fraser WD (2015) Maternal blood metal levels and fetal markers of metabolic function. *Environ Res* **136**: 27-34
- Astbury S, Mostyn A, Symonds ME, Bell RC (2015) Nutrient availability, the microbiome, and intestinal transport during pregnancy. *Appl Physiol Nutr Metab* **40**: 1100-1106

- Aydogan U, Durmaz E, Ercan CM, Eken A, Ulutas OK, Kavuk S, Gursel O, Alanbay I, Akay C, Kurekci AE, Aydin A, Sayal A, Saglam K, Cok I (2013) Effects of smoking during pregnancy on DNA damage and ROS level consequences in maternal and newborns' blood. *Arh Hig Rada Toksikol* **64**: 35-46
- Baird SK, Kurz T, Brunk UT (2006) Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem J* **394**: 275-283
- Barbieri FL, Gardon J, Ruiz-Castell M, Paco V P, Muckelbauer R, Casiot C, Freydier R, Duprey JL, Chen CM, Müller-Nordhorn J, Keil T (2016) Toxic trace elements in maternal and cord blood and social determinants in a Bolivian mining city. *Int J Environ Health Res* **26**: 158-174
- Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ (2005) A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect* **113**: 1669-1674
- Batariova A, Spevackova V, Benes B, Cejchanova M, Smid J, Cerna M (2006) Blood and urine levels of Pb, Cd and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed reference values. *Int J Hyg Environ Health* **209**: 359-366
- Bedir Findik R, Celik HT, Ersoy AO, Tasci Y, Moraloglu O, Karakaya J (2016) Mercury concentration in maternal serum, cord blood, and placenta in patients with amalgam dental fillings: effects on fetal biometric measurements. *J Matern Fetal Neonatal Med* **29**: 3665-3669
- Best CM, Pressman EK, Cao C, Cooper E, Guillet R, Yost OL, Galati J, Kent TR, O'Brien KO (2016) Maternal iron status during pregnancy compared with neonatal iron status better predicts placental iron transporter expression in humans. *FASEB J* **30**: 3541-3550
- Bhattacharyya MH, Wilson AK, Rajan SS, Jonah M (2000) Biochemical pathways in cadmium toxicity. U: *Molecular Biology and Toxicology of Metals*, Zalups RK, Koropatnick J (ur). Taylor & Francis, London-New York, 34-74
- Bjørklund G, Dadar M, Mutter J, Aaseth J (2017) The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. *Environ Res* **159**: 545-554
- Björnberg KA, Vahter M, Grawé KP, Berglund M (2005) Methyl mercury exposure in Swedish women with high fish consumption. *Sci Total Environ* **341**: 45-52
- Björnberg KA, Vahter M, Petersson-Grawé K, Glynn A, Cnattingius S, Darnerud PO, Atuma S, Aune M, Becker W, Berglund M (2003) Methyl mercury and inorganic mercury in Swedish pregnant women and in cord blood: influence of fish consumption. *Environ Health Perspect* **111**: 637-641

- Bose-O'Reilly S, McCarty KM, Steckling N, Lettmeier B (2010) Mercury exposure and children's health. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **40**: 186-215
- Brako EE, Wilson AK, Jonah MN, Blum CA, Cerny EA, Williams KL, Bhattacharyya MH (2003) Cadmium pathways during gestation and lactation in control versus metallothionein 1,2-knockout mice. *Toxicol Sci* **71**: 154-163
- Brown HL (2017) Physiology of Pregnancy. U: *MSD Manual Professional*, Merck Sharp & Dohme Corp. <https://www.msmanuals.com/professional/gynecology-and-obstetrics/approach-to-the-pregnant-woman-and-prenatal-care/physiology-of-pregnancy>
- Bremner I (1998) Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr* **67**: 1069-1073
- Bresgen N, Eckl PM (2015) Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism. *Biomolecules* **5**: 808-847
- Bridges CC, Zalups RK (2005) Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**: 274-308
- Butler Walker J, Houseman J, Seddon L, McMullen E, Tofflemire K, Mills C, Corriveau A, Weber JP, LeBlanc A, Walker M, Donaldson SG, Van Oostdam J (2006) Maternal and umbilical cord blood levels of mercury, lead, cadmium, and essential trace elements in Arctic Canada. *Environ Res* **100**: 295-318
- Cai L, Liu MG, Cherian GM (2010) Metallothionein and Intracellular Sequestration of Metals. U: Volume 4: *Biotransformation, Comprehensive Toxicology*, Second Edition. Guengerich FP (ur) Elsevier Ltd, Kidlington, UK, 501-517
- Carlson BM, (ur) (2004) *Human Embryology and Developmental Biology*, Third Edition. Mosby, Inc: Philadelphia
- Carneiro MF, Grotto D, Barbosa F Jr (2014) Inorganic and methylmercury levels in plasma are differentially associated with age, gender, and oxidative stress markers in a population exposed to mercury through fish consumption. *J Toxicol Environ Health A* **77**: 69-79
- Carter AM (2012) Evolution on placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. *Physiol Rev* **92**: 1543-1576
- Caserta D, Graziano A, Lo Monte G, Bordi G, Moscarini M (2013) Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **17**: 2198-2206
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2012). CDC response to Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention recommendations in Low Level

- Lead Exposure Harms Children: A Renewed Call for Primary Prevention. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, SAD
https://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/final_document_030712.pdf
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2005) Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. National Center for Environmental Health, Division of Laboratory Sciences, SAD
https://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/final_document_030712.pdf
- Cernichiari E, Myers GJ, Ballatori N, Zareba G, Vyas J, Clarkson T (2007) The biological monitoring of prenatal exposure to methylmercury. *NeuroToxicol* **28**: 1015–1102
- Chaffee BW, King JC (2012) Effect of zinc supplementation on pregnancy and infant outcomes: a systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol* **1**: 118-137
- Chandra K (1984) Excessive intake of zinc impairs immune response. *JAMA* **252**: 1443-1446
- Chedrese PJ, Piasek M., Henson MC (2006) Cadmium as an endocrine disruptor in the reproductive system. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* **6**: 27-35
- Chen Z, Myers R, Wei T, Bind E, Kassim P, Wang G, Ji Y, Hong X, Caruso D, Bartell T, Gong Y, Strickland P, Navas-Acien A, Guallar E, Wang X (2014) Placental transfer and concentrations of cadmium, mercury, lead, and selenium in mothers, newborns, and young children. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **24**: 537-544
- Choi AL, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Steuerwald U, Debes F, Weihe P, Grandjean P (2008) Selenium as a potential protective factor against mercury developmental neurotoxicity. *Environ Res* **107**: 45-52
- Clarkson TW (2002) The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect* **110**: 11-23
- Clarkson TW, Magos L, Myers GJ (2003) The toxicology of mercury - current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med* **349**: 1731-1737
- Clarkson TW, Nordberg GF, Sager PR (1985) Reproductive and developmental toxicity of metals. *Scand J Work Environ Health* **11**: 145-154
- Clarkson T, Vyas J, Ballatori N (2007) Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med* **50**: 757–764
- Colton T (ur) (1974) Statistics in Medicine. Little Brown & Company (Inc.): Boston
- Cornelis R, Heinzow B, Herber RFM, Christensen JM, Poulsen OM, Sabbioni E, Templeton DM, Thomassen Y, Vahter M, Vesterberg O (1995). Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine (Technical Report). *Pure Appl Chem* **67**: 1575-1608
- Costa CM, dos Santos RCC, Lima ES (2006) A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J Bras Patol Med Lab* **42**: 345-350

- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* **59**: 627-647
- Dawson B, Trapp RG (ur) (2004) Basic and Clinical Biostatistics, Fourth Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill: New York
- Dechanet C, Anahory T, Mathieu Daude JC, Quantin X, Reyftmann L, Hamamah S, Hedon B, Dechaud H (2011) Effects of cigarette smoking on reproduction. *Hum Reprod Update* **17**: 76-95
- Dencker L, Danielsson B, Khayat A, Lindgren A (1983) Disposition of metals in embryo and fetus. U: *Reproductive and Developmental Toxicity of Metals*, Clarkson TW, Nordberg GF, Sager PR (ur). Plenum Press, New York - London, 607-632
- Denihan NM, Walsh BH, Reinke SN, Sykes BD, Mandal R, Wishart DS, Broadhurst DI, Boylan GB, Murray DM (2015) The effect of haemolysis on the metabolomic profile of umbilical cord blood. *Clin Biochem* **48**: 534-537
- Diamond GL (2000) Transport of metals in the gastrointestinal system and kidneys. U: *Molecular Biology and Toxicology of Metals*. Zalups RK, Koropatnick DJ (ur). Taylor & Francis, London-New York, 300-345
- Díez S, Delgado S, Aguilera I, Astray J, Pérez-Gómez B, Torrent M, Sunyer J, Bayona JM (2009). Prenatal and early childhood exposure to mercury and methylmercury in Spain, a high-fish-consumer country. *Arch Environ Contam Toxicol* **56**: 615-622
- Dorea JG, Donangelo CM (2006) Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. *Clin Nutr* **25**: 369-376
- Dziegiel P, Pula B, Kobierzycki C, Stasiolek M, Podhorska-Okolow M (2016) Metallothioneins: structure and functions. U: *Metallothioneins in Normal and Cancer Cells. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, Vol 218, Springer
- El-Agha O, Gokmen GI (2002) Smoking habits and cadmium intake in Turkey. *Biol Trace Element Res* **88**: 31-43
- Esteban M, Castaño A (2009) Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Environ Int* **35**: 438-449
- Esteban-Vasallo MD, Aragonés N, Pollan M, López-Abente G, Perez-Gomez B (2012) Mercury, cadmium, and lead levels in human placenta: a systematic review. *Environ Health Perspect* **120**: 1369-1377
- European Food Safety Authority (EFSA) (2015) Statement on the Benefits of Fish/Seafood Consumption Compared to the Risks of Methylmercury in Fish/Seafood. *EFSA Journal* **13**: 3982 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2015.3982/epdf>

- European Food Safety Authority (EFSA) (2014) Scientific Opinion on Health Benefits of Seafood (fish and shellfish) Consumption in Relation to Health Risks Associated with Exposure to Methylmercury. *EFSA Journal* **12**: 3761
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2014.3761/epdf>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012a) Scientific Opinion on the Risk for Public Health Related to the Presence of Mercury and Methylmercury in Food. *EFSA Journal* **10**: 2985 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2985/epdf>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012b) Cadmium Dietary Exposure in the European Population. *EFSA Journal* **10**: 2551
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2551/epdf>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012c) Lead Dietary Exposure in the European Population. *EFSA Journal* **10**: 2831
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2831/epdf>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2009) Scientific Opinion. Cadmium in Food. *EFSA Journal* **980**: 1-139
http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/980.pdf
- European Economic and Social Committee (EESC) (2004) The European Environment & Health Action Plan 2004-2010. Brussels, 9.6.2004. COM (2004) 416 final Volume I. Brussels, Belgium; 2004:8 http://ec.europa.eu/smart-regulation/impact/ia_carrier_out/docs/ia_2004/com_2004_0416_2_en_pdf
- Eurostat (2016) Tobacco consumption: 1 in every 4 persons aged 15 or over in the European Union is a smoker... and 1 in 5 confronted by passive smoking. *Eurostat news release* 245/2016, 7 Dec 2016, <http://ec.europa.eu/eurostat/documents/2995521/7762296/3-07122016-APEN.pdf/e6cf7fd2-06a5-45ba-8385-991bccef54fd>
- Fagerstedt S, Kippler M, Scheynius A, Gutzeit C, Mie A, Alm J, Vahter M (2015) Anthroposophic lifestyle influences the concentration of metals in placenta and cord blood. *Environ Res* **136**: 88-96
- Falcón M, Viñas P, Luna A (2003) Placental lead and outcome of pregnancy. *Toxicology* **185**: 59-66
- Feinshtein V, Ben-Zvi Z, Sheiner E, Amash A, Sheizaf B, Holcberg G (2010) Progesterone levels in cesarean and normal delivered term placentas. *Arch Gynecol Obstet* **281**: 387-392

- Flora SJ, Mittal M, Mehta A (2008) Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* **128**:501-523
- Fowles J, Dybing E (2003) Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. *Toxicol Appl Pharmacol* **256**: 1-7
- Fukase Y, Tsugami H, Nakamura Y, Ohba K, Ohta H (2014) The role of metallothionein and metal transporter on cadmium transport from mother to fetus. *Yakugaku Zasshi* **134**: 801-804
- Gambling L, Danzeisen R, Fosset C, Andersen HS, Dunford S, Srail SK, McArdle HJ (2003) Iron and copper interactions in development and the effect on pregnancy outcome. *J Nutr* **133**: 1554-1556
- García-Esquinas E, Pérez-Gómez B, Fernández-Navarro P, Fernández MA, de Paz C, Pérez-Meixeira AM, Gil E, Iriso A, Sanz JC, Astray J, Cisneros M, de Santos A, Asensio A, García-Sagredo JM, García JF, Vioque J, López-Abente G, Pollán M, González MJ, Martínez M, Aragonés N (2013) Lead, mercury and cadmium in umbilical cord blood and its association with parental epidemiological variables and birth factors. *BMC Public Health* **13**: 841 doi: 10.1186/1471-2458-13-841
- Goodman GE, Schaffer S, Bankson DD, Hughes MP, Omenn GS; Carotene and Retinol Efficacy Trial Co-Investigators (2001) Predictors of serum selenium in cigarette smokers and the lack of association with lung and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**: 1069-1076
- Goyer RA (1995) Transplacental transfer of lead and cadmium. U: *Toxicology of Metals, Biochemical Aspects, Handbook of Experimental Pharmacology*, Volume 115. Goyer RA, Cherian MG (ur). Springer-Verlag, Berlin-Hedelberg; 1-17
- Grandjean P, Landrigan PJ (2006) Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* **368**: 2167-2178
- Grzunov Letinić J, Matek Sarić M, Piasek M, Jurasović J, Varnai VM, Sulimanec Grgec A, Orct T (2016) Use of human milk in the assessment of toxic metal exposure and essential element status in breastfeeding women and their infants in coastal Croatia. *J Trace Elem Med Biol* **38**: 117-125
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* **114**: 397-407
- Gulson B, Mizon K, Korsch M, Taylor A (2016) Revisiting mobilisation of skeletal lead during pregnancy based on monthly sampling and cord/maternal blood lead relationships confirm placental transfer of lead. *Arch Toxicol* **90**: 805-816

- Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Palmer JM, Donnelly JB (2003) Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation-a summary of long-term research. *Sci Total Environ* **303**: 79-104
- Gundacker C, Fröhlich S, Graf-Rohrmeister K, Eibenberger B, Jessenig V, Gicic D, Prinz S, Wittmann KJ, Zeisler H, Vallant B, Pollak A, Husslein P (2010) Perinatal lead and mercury exposure in Austria. *Sci Total Environ* **408**: 5744-5749
- Gundacker C, Hengstschläger M (2012) The role of the placenta in fetal exposure to heavy metals. *Wien Med Wochenschr* **162**: 201-206
- Ha E, Basu N, Bose-O'Reilly S, Dórea JG, McSorley E, Sakamoto M, Chan HM (2017) Current progress on understanding the impact of mercury on human health. *Environ Res* **52**: 419-433
- Halamić J, Miko S (2009) Geokemijski atlas Republike Hrvatske. Halamić J, Miko S (ur) Zagreb, Croatian Geological Survey.
- Halamić J, Peh Z, Miko S, Galović L, Šorša A (2012) Geochemical Atlas of Croatia: Environmental implications and geodynamical thread. *J Geochem Explor* **115**: 36-46
- Hattori Y, Naito M, Satoh M, Nakatochi M, Naito H, Kato M, Takagi S, Matsunaga T, Seiki T, Sasakabe T, Suma S, Kawai S, Okada R, Hishida A, Hamajima N, Wakai K (2016) Metallothionein *MT2A* A-5G polymorphism as a risk factor for chronic kidney disease and diabetes: cross-sectional and cohort studies. *Toxicol Sci* **152**: 181-193
- Hellberg RS, DeWitt CAM, Morrissey MT (2012) Risk-benefit analysis of seafood consumption: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **11**: 490-517
- Henson MC, Chedrese PJ (2004) Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med* **229**: 383-392
- Henson MC, Piasek M, Chedrese PJ, Castracane VD (2010) Metal toxicity in mammalian reproduction. U: *Endocrine Toxicology*, Third Edition. Eldridge JC, Stevens JT (ur). Informa Healthcare, New York, 256-279
- Hoogenraad TU (2006) Paradigm shift in treatment of Wilson's disease: zinc therapy now treatment of choice. *Brain Dev* **28**: 141-146
- Hu ML (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* **233**: 380-385
- Hwang JY, Lee JY, Kim KN, Kim H, Ha EH, Park H, Ha M, Kim Y, Hong YC, Chang N (2013) Maternal iron intake at mid-pregnancy is associated with reduced fetal growth: results from Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) study. *Nutr J* **12**: 38 doi: 10.1186/1475-2891-12-38

- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2017) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. List of Classifications, Volumes 1-119. http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs, Cadmium and Cadmium Compounds, Volume 100
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-8.pdf>
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2006) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs, Inorganic and Organic Lead Compounds, Volume 87
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol87/mono87.pdf>
- Iyengar GV (1998) Reevaluation of the trace element content in reference man. *Radiat Phys Chem* **51**: 545-560
- Iyengar GV, Rapp A (2001a) 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* **280**: 195-206
- Iyengar GV, Rapp A (2001b) 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* **280**: 207-219
- Iyengar GV, Rapp A (2001c) Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements: Part 3: Toxic trace elements in placenta and placenta as a biomarker for these elements. *Sci Total Environ* **280**: 221-238
- Jagodič M, Snoj Tratnik J, Mazej D, Stajniko A, Pavlin M, Krsnik M, Kobal AB, Kononenko LJ, Odland JØ, Horvat M (2017) Birth weight in relation to maternal blood levels of selected elements in Slovenian populations: a cross-sectional study. *J Health Sci* **5**: 95-106
- Jazayeri A, Tsibris JC, Spellacy WN (1998) Umbilical cord plasma erythropoietin levels in pregnancies complicated by maternal smoking. *Am J Obstet Gynecol* **178**: 433-435
- Jia G, Gu YQ, Chen KT, Lu YY, Yan L, Wang JL, Su YP, Wu JC (2004) Protective role of metallothionein (I/II) against pathological damage and apoptosis induced by dimethylarsinic acid. *World J Gastroenterol* **10**: 91-95.

- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB (2003) Cadmium mimics the *in vivo* effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* **9**: 1081-1084
- Jolibois LS Jr, Burow ME, Swan KF, George WJ, Anderson MB, Henson MC (1999) Effects of cadmium cell viability, trophoblastic development, and expression of low density lipoprotein receptor transcripts in cultured human placental cells. *Reprod Toxicol* **13**: 473-480
- Jurasović J, Cvitković P, Pizent A, Čolak B, Telišman S (2004) Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects. *Biometals* **17**: 735-743
- Jureša D, Blanuša M (2003) Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic Sea. *Food Addit Contam* **20**: 241-246
- Kajiwara Y, Yasutake A, Adachi T, Hirayama K (1996) Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. *Arch Toxicol* **70**: 310-314
- Kalenga MK, de Hertogh R, Whitebread S, Vankrieken L, Thomas K, de Gasparo M (1991) Distribution of the concentrations of angiotensin II, angiotensin II receptors, hPL, prolactin and steroids in human placenta, amnion and chorion. *Rev Fr Gyneco Obstet* **86**: 585-591
- Karagas MR, Choi AL, Oken E, Horvat M, Schoeny R, Kamai E, Cowell W, Grandjean P, Korrick S (2012) Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure. *Environ Health Perspect* **120**: 799-806
- Kawai M, Swan KF, Green AE, Edwards DE, Anderson MB, Henson MC (2002) Placental endocrine disruption induced by cadmium: effects on P450 cholesterol side-chain cleavage and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in cultured human trophoblasts. *Biol Reprod* **67**: 178-83
- Kayaalti Z, Aliyev V, Söylemezoğlu T (2011) The potential effect of metallothionein 2A - 5A/G single nucleotide polymorphism on blood cadmium, lead, zinc and copper levels. *Toxicol Appl Pharmacol* **256**: 1-7
- Kayaalti Z, Mergen G, Söylemezoğlu T (2010) Effect of metallothionein core promoter region polymorphism on cadmium, zinc and copper levels in autopsy kidney tissues from a Turkish population. *Toxicol Appl Pharmacol* **245**: 252-255
- Keen CL, Uriu-Hare JY, Hawk SN, Jankowski MA, Daston GP, Kwik-Urbe CL, Rucker RB (1998) Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* **67**: 1003-1011

- Kim YM, Chung JY, An HS, Park SY, Kim BG, Bae JW, Han M, Cho YJ, Hong YS (2015) Biomonitoring of lead, cadmium, total mercury, and methylmercury levels in maternal blood and in umbilical cord blood at birth in South Korea. *Int J Environ Res Public Health* **12**: 13482-13493
- Kippler M, Hoque AM, Raqib R, Ohrvik H, Ekström EC, Vahter M (2010) Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicol Lett* **192**: 162-168
- Kita K, Miura N, Yoshida M, Yamazaki K, Ohkubo T, Imai Y, Naganuma A (2006) Potential effect on cellular response to cadmium of a single-nucleotide A→G polymorphism in the promoter of the human gene for metallothionein IIA. *Hum Genet* **120**: 553-560
- Klapec T, Čavar S, Kasac Z, Rucević S, Popinjac A (2008) Selenium in placenta predicts birth weight in normal but not intrauterine growth restriction pregnancy. *J Trace Elem Med Biol* **22**: 54-58
- Klein D, Lichtmanegger J, Heinzmann U, Müller-Höcker J, Michaelsen S, Summer KH (1998) Association of copper to metallothionein in hepatic lysosomes of Long-Evans cinnamon (LEC) rats during the development of hepatitis [see comments]. *Eur J Clin Invest* **28**: 302-310
- Kljaković-Gašpić Z, Pizent A, Jurasović J (2016) Influence of abatement of lead exposure in Croatia on blood lead and ALAD activity. *Environ Sci Pollut Res Int* **23**: 898-907.
- Kljaković-Gašpić Z, Zvonarić T, Vrgoč N, Odžak N, Barić A (2002) Cadmium and lead in selected tissues of two commercially important fish species from the Adriatic Sea. *Wat Res* **36**: 5023-5028
- Knopik VS (2009) Maternal smoking during pregnancy and child outcomes: real or spurious effect? *Dev Neuropsychol* **34**: 1-36
- Kocyigit A, Erel O, Gur S (2001) Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities. *Clin Biochem* **34**: 629-633
- Koizumi S, Suzuki K, Ogra Y, Yamada H, Otsuka F (1999) Transcriptional activity and regulatory protein binding of metal-responsive elements of the human metallothionein-IIA gene. *Eur J Biochem* **259**: 635-642
- Kowalska K, Bizoń A, Zalewska M, Milnerowicz H (2015) The influence of biological and environmental factors on metallothionein concentration in the blood. *J Trace Elem Med Biol* **29**: 99-103

- Krześlak A, Forma E, Chwatko G, Józwiak P, Szymczyk A, Wilkosz J, Róžański W, Bryś M (2013) Effect of metallothionein 2A gene polymorphism on allele-specific gene expression and metal content in prostate cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **268**: 278-285
- Lahav M, Sofer N, Brandes JM, Paldi E, Barzilai D (1980) Placental concentrations of progesterone, estradiol-17 beta, and cyclic AMP at delivery. *Obstet Gynecol* **56**: 616-620
- Lau JC, Joseph MG, Cherian MG (1998) Role of placental metallothionein in maternal to fetal transfer of cadmium in genetically altered mice. *Toxicology* **127**: 167-178
- Lazarus M (2010) Međudjelovanje kadmija i selenija u sisavaca. *Arh Hig Rada Toksikol* **61**: 357-369
- Leino O, Kiviranta H, Karjalainen AK, Kronberg-Kippilä C, Sinkko H, Larsen EH, Virtanen S, Tuomisto JT (2013) Pollutant concentrations in placenta. *Food Chem Toxicol* **54**: 59-69
- Liang Q, Carlson EC, Donthi RV, Kralik PM, Shen X, Epstein PN (2002) Overexpression of metallothionein reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **51**: 174-181
- Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, Green S, Kitchen S, Palicka V, Vassault AJ, Plebani M (2008) Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* **46**: 764-772
- Liu J, Liu Y, Goyer RA, Achanzar W, Waalkes MP (2000) Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* **55**: 460-467
- Llop S, Aguinagalde X, Vioque J, Ibarluzea J, Guxens M, Casas M, Murcia M, Ruiz M, Amurrio A, Rebagliato M, Marina LS, Fernandez-Somoano A, Tardon A, Ballester F (2011) Prenatal exposure to lead in Spain: cord blood levels and associated factors. *Sci Total Environ* **409**: 2298-305
- Llop S, Engström K, Ballester F, Franforte E, Alhamdow A, Pisa F, Snoj Tratnik J, Mazej D, Murcia M, Rebagliato M, Bustamante M, Sunyer J, Sofianou-Katsoulis A, Prasouli A, Antonopoulou E, Antoniadou I, Nakou S, Barbone F, Horvat M, Broberg K (2014) Polymorphisms in ABC Transporter genes and concentrations of mercury in newborns—evidence from two Mediterranean birth cohorts. *PLoS One* **9**: e97172, doi: 10.1371/journal.pone.0097172
- Lopes PA, Santos MC, Vicente L, Rodrigues MO, Pavão ML, Nève J, Viegas-Crespo AM (2004) Trace element status (Se, Cu, Zn) in healthy Portuguese subjects of Lisbon population: a reference study. *Biol Trace Elem Res* **101**: 1-17.

- Lutz E, Lind B, Herin P, Krakau I, Bui TH, Vahter M (1996) Concentrations of mercury, cadmium and lead in brain and kidney of second trimester fetuses and infants. *J Trace Elem Med Biol* **10**: 61-67
- Mahaffey KR (2005) Mercury exposure: medical and public health issues. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **116**: 127-153
- Margoshes M, Vallee BL (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* **79**: 4813-4814
- Martín-Lagos F, Navarro-Alarcón M, Terrés-Martos C, López-García de la Serrana H, Pérez-Valero V, López-Martínez MC (1998) Zinc and copper concentrations in serum from Spanish women during pregnancy. *Biol Trace Elem Res* **61**: 61-70
- Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I (2013) Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules* **18**: 3292-3311
- McArdle HJ, Andersen HS, Jones H, Gambling L (2008) Copper and iron transport across the placenta: regulation and interactions. *J Neuroendocrinol* **20**: 427-431
- McLachlan JA (2001) Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* **22**: 319-341
- Miklavčič A, Casetta A, Snoj Tratnik J, Mazej D, Krsnik M, Mariuz M, Sofianou K, Spirić Z, Barbone F, Horvat M (2013) Mercury, arsenic and selenium exposure levels in relation to fish consumption in the Mediterranean area. *Environ Res* **120**: 7-17
- Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V (2000) Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **35**: 37-70
- Miller WL, Auchus RJ (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* **32**: 81-151
- Miller RK, Mattison DR, Plowchalk D (1988) Biological monitoring of the human placenta. U: *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Clarkson TW, Friberg L, Nordberg GF, Sager PR (ur). Springer US 567-602
- Milnerowicz H, Ściskalska M, Dul M (2015) Pro-inflammatory effects of metals in persons and animals exposed to tobacco smoke. *J Trace Elem Med Biol* **29**: 1-10
- Mircea C , Agoroaei L , Butnaru E , Ilicenko D , Proca M (2003) Malondialdehyde and free thiol groups from smokers' plasma. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* **107**:184-187
- Mirone M, Giannetta E, Isidori AM (2013) Selenium and reproductive function. A systematic review. *J Endocrinol Invest* **36**: 28-36

- Myers GJ, Davidson PW (2000) Does methylmercury have a role in causing developmental disabilities in children? *Environ Health Perspect* **108**: 413-420
- Nakamura Y, Ohba K, Ohta H (2012a) Participation of metal transporters in cadmium transport from mother rat to fetus. *J Toxicol Sci* **37**: 1035-1044
- Nakamura Y, Ohba K, Suzuki K, Ohta H (2012b) Health effects of low-level cadmium intake and the role of metallothionein on cadmium transport from mother rats to fetus. *J Toxicol Sci* **37**: 149-156
- Nartey NO, Frei JV, Cherian MG (1987) Hepatic copper and metallothionein distribution in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Lab Invest* **57**: 397-401
- Needham LL, Grandjean P, Heinzow B, Jørgensen PJ, Nielsen F, Patterson Jr DG, Sjödin A, Turner WE, Weihe P (2011) Partition of Environmental Chemicals between Maternal and Fetal Blood and Tissues. *Environ Sci Technol* **45**: 1121-1126
- Ng SP, Silverstone AE, Lai ZW, Zelikoff JT (2013) Prenatal exposure to cigarette smoke alters later-life antitumor cytotoxic T-lymphocyte (CTL) activity via possible changes in T-regulatory cells. *J Toxicol Environ Health A* **76**: 1096-1110
- Nishijo M, Satarug S, Honda R, Tsuritani I, Aoshima K (2004) The gender differences in health effects of environmental cadmium exposure and potential mechanisms. *Mol Cell Biochem* **255**: 87-92
- Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M (ur.) (2015) Handbook on the Toxicology of Metals, Fourth Edition. Academic Press: New York
- Nordberg M, Nordberg GF (2000) Toxicological aspects of metallothionein. *Cell Mol Biol* **46**: 451-463
- Nordberg M (1998) Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* **46**: 243-254
- Northrop-Clewes CA, Thurnham DI (2007) Monitoring micronutrients in cigarette smokers. *Clin Chim Acta* **377**: 14-38
- Orct T, Lazarus M, Jurasović J, Blanuša M, Piasek M, Kostial K (2009) Influence of selenium dose on mercury distribution and retention in suckling rats. *J Appl Toxicol* **29**: 585-589
- Osman K, Åkesson A, Berglund M, Bremme K, Schütz A, Ask K, Vahter M (2000) Toxic and essential elements in placentas of Swedish women. *Clin Biochem* **33**: 131-138
- Otsuka F (2001) Molecular mechanism of the metallothionein gene expression mediated by Metal-Responsive Transcription Factor 1. *J Health Sci* **47**: 513-519

- Palkovicova L, Ursinyova M, Masanova V, Yu Z, Hertz-Picciotto I (2008) Maternal amalgam dental fillings as the source of mercury exposure in developing fetus and newborn. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **18**: 326-331
- Pappas RS (2011) Toxic elements in tobacco and in cigarette smoke: inflammation and sensitization. *Metallomics* **3**: 1181-1198
- Park JD, Cherrington NJ, Klaassen CD (2002) Intestinal absorption of cadmium is associated with Divalent Metal Transporter 1 in rats. *Toxicol Sci* **68**: 288-294
- Pasqualini JR (2005) Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol* **97**: 401-415
- Pawlas N, Strömberg U, Carlberg B, Cerna M, Harari F, Harari R, Horvat M, Hrubá F, Koppova K, Krskova A, Krsnik M, Li YF, Löfmark L, Lundh T, Lundström NG, Lyoussi B, Markiewicz-Górka I, Mazej D, Osredkar J, Pawlas K, Rentschler G, Spevackova V, Spiric Z, Sundkvist A, Tratnik JS, Vadla D, Zizi S, Skerfving S, Bergdahl IA (2013). Cadmium, mercury and lead in the blood of urban women in Croatia, the Czech Republic, Poland, Slovakia, Slovenia, Sweden, China, Ecuador and Morocco. *Int J Occup Med Environ Health* **26**: 58-72
- Piasek M, Laskey JW (1999) Effects of in vitro cadmium exposure on ovarian steroidogenesis in rats. *J Appl Toxicol* **19**: 211-217
- Piasek M, Mikolić A (2009) Minerals and physiology – from essentiality to toxicity: a review of important minerals and their major impact on the human body's physiology. U: *Role of Minerals in Food Technology and Nutrition*, Gašperlin L, Žlender B (ur). 26th Food Technology Days dedicated to Prof. F. Bitenc. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živalstvo and Slovensko prehransko društvo, 9-19
- Piasek M, Blanuša M, Kostial K, Laskey JW (2001) Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. *Reprod Toxicol* **15**: 673-681
- Piasek M, Laskey JW, Kostial K, Blanuša M (2002) Assessment of steroid disruption using cultures of whole ovary and/or placenta in rat and in human placental tissue. *Int Arch Occup Environ Health* **75**(suppl): S36-S44
- Piasek M, Blanuša M, Kostial K, Laskey JW (2004) Low iron diet and parenteral calcium exposure in pregnant rats: the effects on trace elements and fetal viability. *Biometals* **17**: 1-4
- Piasek M, Henson MC, Blanuša M, Kostial K (2011) Assessment of steroid disruption and metal concentrations in human placenta: effects of cigarette smoking. U: *Public Health in*

- the 21st Century. Handbook of Smoking and Health*. Koskinen CJ (ur). Nova Science Inc: New York, 325-365
- Piasek M, Mikolić A, Sekovanić A, Sulimanec Grgec A, Jurasović J (2014) Cadmium in placenta – a valuable biomarker of exposure during pregnancy in biomedical research. *J Toxicol Environ Health A* **77**: 1071-1074
- Piasek M, Jurasović J, Sekovanić A, Brajenović N, Brčić Karačonji I, Mikolić A, Grgec AS, Stasenko S (2016) Placental cadmium as an additional noninvasive bioindicator of active maternal tobacco smoking. *J Toxicol Environ Health A* **79**: 443-446
- Pirrone N, Cinnirella S, Feng X, Finkelman RB, Friedli HR, Leaner J, Mason R, Mukherjee AB, Stracher GB, Streets DG, Telmer K (2010) Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. *Atmos Chem Phys* **10**: 5951-5964
- Pizent A, Jurasović J, Telišman S (2001) Blood pressure in relation to dietary calcium intake, alcohol consumption, blood lead, and blood cadmium in female nonsmokers. *J Trace Elem Med Biol* **15**: 123-130
- Puntarulo S (2005) Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med* **26**: 299-312
- Raghunath R, Tripathi RM, Sastry VN, Krishnamoorthy TM (2000) Heavy metals in maternal and cord blood. *Sci Total Environ* **250**: 135-141
- Ralston NV, Raymond LJ (2010) Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. *Toxicology* **278**: 112-123
- Ramon R, Murcia M, Aguinagalde X, Amurrio A, Llop S, Ibarluzea J, Lertxundi A, Alvarez Pedrerol M, Casas M, Vioque J, Sunyer J, Tardon A, Martinez-Arguelles B, Ballester F (2011) Prenatal mercury exposure in a multicenter cohort study in Spain. *Environ Int* **37**: 597-604
- Rathore M, Singh A, Pant VA (2012) The dental amalgam toxicity fear: a myth or actuality. *Toxicol Int* **19**: 81–88.
- Raudenska M, Gumulec J, Podlaha O, Sztalmachova M, Babula P, Eckschlager T, Adam V, Kizek R, Masarik M (2014) Metallothionein polymorphisms in pathological processes. *Metallomics* **6**: 55-68
- Rayman MP, Wijnen H, Vader H, Kooistra L, Pop V (2011) Maternal selenium status during early gestation and risk for preterm birth. *CMAJ* **183**: 549-555
- Rice D, Barone S Jr (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* **108**: 511-533

- Rodushkin I, Ödman F, Branth S (1999) Multielement analysis of whole blood by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* **364**: 338–346
- Ronco AM, Arguello G, Muñoz L, Gras N, Llanos M (2005a) Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. *Biometals* **18**: 233-241
- Ronco AM, Arguello G, Suazo M, Llanos MN (2005b) Increased levels of metallothionein in placenta of smokers. *Toxicology* **208**: 133-139
- Ronco AM, Garrido F, Llanos MN (2006) Smoking specifically induces metallothionein-2 isoform in human placenta at term. *Toxicology* **223**: 46-53
- Rudge CV, Röllin HB, Nogueira CM, Thomassen Y, Rudge MC, Odland JØ (2009) The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. *J Environ Monit* **11**: 1322-1330
- Ruttikay-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R (2013) The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci* **14**: 6044-6066
- Sabolić I, Breljak D, Škarica M, Herak-Kramberger CM (2010) Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals* **23**: 897-926
- Safe S (2003) Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nat Med* 2003 **9**: 1000-1001
- Sakamoto M, Yasutake A, Domingo JL, Chan HM, Kubota M, Murata K (2013) Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: potential use as indicators for prenatal exposure. *Environ Int* 60:106-111
- Sanderson JT (2009) Placental and Fetal Steroidogenesis. Chapter 7. U: *Human Embryogenesis: Methods and Protocols*, Vol. 550, Lafond J, Vaillancourt C (ur). Humana Press/Springer, 127-136
- Sato M, Kondoh M (2002) Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med* **196**: 9-22
- Sazak S, Kayıran SM, Paksoy Y (2012) Umbilical Cord Serum Erythropoietin Levels and Maternal Smoking in Pregnancy. *Sci World J* **2012**: 3 pages, doi:10.1100/2012/420763
- Scanlon KS, Yip R, Schieve LA, Cogswell ME (2000) High and low hemoglobin levels during pregnancy: differential risks for preterm birth and small for gestational age. *Obstet Gynecol* **96**: 741-748

- Schoeters GER, Den Hond E, Koppen G, Smolders R, Bloemen K, De Boever P, Govarts E (2011) Biomonitoring and biomarkers to unravel the risks for prenatal environmental exposures for later health outcomes. *Am J Clin Nutr* doi: 10.3945/ajcn.110.001545
- Scholl TO (2011) Maternal iron status: relation to fetal growth, length of gestation, and iron endowment of the neonate. *Nutr Rev* **69** (suppl 1): S23-S29
- Schuurs AH (1999) Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. *J Dent* **27**: 249–256.
- Sharp P (2004) The molecular basis of copper and iron interactions. *Proc Nutr Soc* **63**: 563-569
- Silbergeld EK, Weaver VM (2007) Exposure to metals: are we protecting the workers? *Occup Environ Med* **64**: 141-142
- Smolders R, Schramm KW, Nickmilder M, Schoeters G (2009a) Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring. *Environ Health* **8**: 8
- Smolders R, Schramm KW, Stenius U, Grellier J, Kahn A, Trnovec T, Sram R, Schoeters G (2009b) A review on the practical application of human biomonitoring in integrated environmental health impact assessment. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **12**: 107-123
- Snoj Tratnik J, Falnoga I, Trdin A, Mazej D, Fajon V, Miklavčič A, Kobal AB, Osredkar J, Sešek Briški A, Krsnik M, Neubauer D, Kodrič J, Stropnik S, Gosar D, Lešnik Musek P, Marc J, Jurkovič Mlakar S, Petrović O, Vlašić-Cicvarić I, Prpić I, Milardović A, Radić Nišević J, Vuković D, Fišić E, Špirić Z, Horvat M (2017) Prenatal mercury exposure, neurodevelopment and apolipoprotein E genetic polymorphism. *Environ Res* **152**: 375-385
- Soussa E, Shalaby Y, Maria AM, Maria OM (2013) Evaluation of oral tissue response and blood levels of mercury released from dental amalgam in rats. *Arch Oral Biol* **58**: 981-988
- Stajanko A, Falnoga I, Tratnik JS, Mazej D, Jagodic M, Krsnik M, Kobal AB, Prezelj M, Kononenko L, Horvat M (2017) Low cadmium exposure in males and lactating females-estimation of biomarkers. *Environ Res* **152**: 109-119
- Starčić J (2014) Preciznost metode za određivanje koncentracije tiolnih skupina u serumu [Diplomski rad]. Farmaceutsko – biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Starska K, Bryś M, Forma E, Olszewski J, Pietkiewicz P, Lewy-Trenda I, Danilewicz M, Krześlak A (2015) The effect of metallothionein 2A core promoter region single-

- nucleotide polymorphism on accumulation of toxic metals in sinonasal inverted papilloma tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* **285**: 187-197
- Starska K, Krześlak A, Forma E, Olszewski J, Morawiec-Sztandera A, Aleksandrowicz P, Lewy-Trenda I, Bryś M (2014) The -5A/G singlenucleotide polymorphism in the core promoter region of *MT2A* and its effect on allele-specific gene expression and Cd, Zn and Cu levels in laryngeal cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **280**: 256-263
- Stasenکو S, Bradford EM, Piasek M, Henson MC, Jurasović J, Kušec V (2010) Metals in human placenta: focus on the effects of cadmium on steroid hormones and leptin. *J Appl Toxicol* **30**: 242-253
- Stauffer HP (1974) The interaction of cigarette smoke with thiol groups, a model study. *Sozial- und Präventivmedizin* **19**: 55-58
- Stephansson O, Dickman PW, Johansson A, Cnattingius S (2000) Maternal hemoglobin concentration during pregnancy and risk of stillbirth. *JAMA* **284**: 2611-2617
- Strinić T, Buković D, Sumilin L, Radić A, Hauptman D, Klobucar A (2005) Socio-demographic characteristics and lifestyle habits of pregnant women smokers. *Coll Antropol* **29**: 611-614
- Suzuki K, Koizumi S (2000) Individual metal responsive elements of the human metallothionein-IIA gene independently mediate responses to various heavy metal signals. *Ind Health* **38**: 87-90
- Taito S, Hamada H, Sekikawa K, Takahashi M, Kamikawa N, Kimura T (2016) Oxidative stress induced by smoking and exercise. *Int J Med Biol Front* **22**: 203-213
- Taylor CM, Golding J, Hibbeln J, Emond AM (2013) Environmental factors predicting blood lead levels in pregnant women in the UK: The ALSPAC Study. *PLoS One* **8**: e72371, doi: 10.1371/journal.pone.0072371
- Tekin D, Kayaaltı Z, Aliyev V, Söylemezoğlu T (2012a) The effects of metallothionein 2A polymorphism on placental cadmium accumulation: Is metallothionein a modifying factor in transfer of micronutrients to the fetus? *J Appl Toxicol* **32**: 270-275
- Tekin D, Kayaaltı Z, Söylemezoğlu T (2012b) The effects of metallothionein 2A polymorphism on lead metabolism: are pregnant women with a heterozygote genotype for metallothionein 2A polymorphism and their newborns at risk of having higher blood lead levels? *Int Arch Occup Environ Health* **85**: 631-637
- Telišman S, Čolak B, Pizent A, Jurasović J, Cvitković P (2007) Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environ Res* **105**: 256-266

- Thévenod F (2010) Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *Biometals* **23**: 857-875
- Thomas S, Arbuckle TE, Fisher M, Fraser WD, Ettinger A, King W (2015) Metals exposure and risk of small-for-gestational age birth in a Canadian birth cohort: The MIREC study. *Environ Res* **140**: 430-439.
- Torreblanca A, Del Ramo J, Sarkar B (1992) Cadmium effect on zinc metabolism in human trophoblast cells: involvement of cadmium-induced metallothionein. *Toxicology* **72**: 167-174
- Tsutsumi R, Hiroi H, Momoeda M, Hosokawa Y, Nakazawa F, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y (2009) Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke. *Fertil Steril* **91**: 1614-1617
- Tuckey RC (2005) Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* **26**: 273-281
- Uriu-Adams JY, Scherr RE, Lanoue L, Keen CL (2010) Influence of copper on early development: prenatal and postnatal considerations. *Biofactors* **36**: 136-152
- Uçar Y i Brantley WA (2011) Biocompatibility of dental amalgams. *Int J Dent* 2011:981595. doi: 10.1155/2011/981595
- Vahter M, Akesson A, Lind B, Björs U, Schütz A, Berglund M (2000) Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating women, as well as in umbilical cord blood. *Environ Res* **84**: 186-194
- Vahter M, Berglund M, Åkesson A, Lidén C (2002) Metal and women's health. *Environ Res Section A* **88**: 145-155
- Vukelić J, Kapamadžija A, Petrović Dj, Grujić Z, Novakov-Mikić A, Kopitović V, Bjelica A (2012) Variations of serum copper values in pregnancy. *Srp Arh Celok Lek* **140**: 42-46
- Waalkes MP, Pérez-Ollé R (2000) Role of metallothionein in the metabolism, transport and toxicity of metals. U: *Molecular Biology and Toxicology of Metals*. Zalups RK, Koropatnick J (ur). Taylor & Francis: London-NY, 1-33
- Wang Y, Goodrich JM, Gillespie B, Werner R, Basu N, Franzblau A (2012) An investigation of modifying effects of metallothionein single-nucleotide polymorphisms on the association between mercury exposure and biomarker levels. *Environ Health Perspect* **120**: 530-534.
- Wellinghausen N (2001) Immunobiology of gestational zinc deficiency. *Br J Nutr* **85**: 81-86
- Wigle DT, Arbuckle TE, Turner MC, Bérubé A, Yang Q, Liu S, Krewski D (2008) Epidemiology evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *J Toxicol Environ Health B* **11**: 373-517

- Wilson EA, Jaward MJ, Powell DE (1984) Effects of estradiol and progesterone on human chorionic gonadotropin secretion in vitro. *Am J Obstet Gynecol* **149**: 143–148
- World Health Organization (WHO) (2010a) Exposure to Cadmium: a Major Public Health Concern. Public Health and Environment, Geneva, Švicarska
<http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf>
- World Health Organization (WHO) (2010b) Exposure to Lead: a Major Public Health Concern. Public Health and Environment, Geneva, Švicarska
<http://www.who.int/ipcs/features/lead..pdf>
- World Health Organization (WHO) (2010c) Gender, Women, and the Tobacco Epidemic. Regional Office for Europe, Geneva, Švicarska
http://www.who.int/tobacco/publications/gender/women_tob_epidemic/en/
- World Health Organization (WHO) (2002) The World Health Report 2002-Reducing Risk, Promoting Healthy Life. Geneva, Švicarska
http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf?ua=1
- World Health Organisation (WHO) (2001) Biomarkers in risk assessment: Validity and validation. Environmental Health Criteria 222. Geneva, Švicarska.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>
- World Health Organization (WHO) (1990) Environmental Health Criteria 101. Methylmercury. Geneva, Švicarska
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm>
- Zakar T, Hertelendy F (2007) Progesterone withdrawal: key to parturition. *Am J Obstet Gynecol* **196**: 289-296
- Zalups RK, Koropatnik J (ur.) (2000) Molecular Biology and Toxicology of Metals. Taylor & Francis: London
- Zheng SR, Carlson EC, Yang L, Kralik PM, Huang Y, Epstein PN (2008) Podocyte-specific overexpression of the antioxidant metallothionein reduces diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **19**: 2077-2085
- Zhou LM, Yang WW, Hua JZ, Deng CQ, Tao X, Stoltzfus RJ (1998) Relation of hemoglobin measured at different times in pregnancy to preterm birth and low birth weight in Shanghai, China. *Am J Epidemiol* **148**: 998-1006

9. ŽIVOTOPIS

Ankica Sekovanić rođena je 8. travnja 1985. godine u Gospiću gdje je završila osnovnu školu 2000. i opću gimnaziju 2004. godine. Godine 2004. upisala je studij kemijskog inženjerstva i tehnologije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu na kojem je diplomirala u ožujku 2009. godine. Od listopada 2009. godine zaposlena je u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada kao asistent – znanstveni novak na znanstvenoistraživački projekt Ministarstva znanosti obrazovanja i športa (MZOŠ) „Izloženost metalima i njihovi učinci u graviditetu i postnatalnom razdoblju“ (br. 022-0222148-2135, voditelj Martina Piasek). Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta upisala je 2010. godine.

Autor je ili koautor u 12 izvornih znanstvenih radova od kojih je 10 objavljeno u časopisima zastupljenim u bazi *Current Contents (CC)* te 2 u časopisima zastupljenim u bazi *Science Citation Index Expanded (SCIE)*. Sudjelovala je na brojnim domaćim i međunarodnim tečajevima i znanstvenim skupovima na kojima je prezentirala rezultate svoga rada. Koautor je 24 kongresna priopćenja od kojih je 6 zastupljeno u *CC*, a 7 u *SCIE*.

Član je Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa i Hrvatskog toksikološkog društva.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u *CC*:

1. Lazarus M, **Sekovanić A**, Orct T, Reljić S, Kusak J, Jurasović J, Huber Đ (2018) Sexual maturity and life stage influences toxic metal accumulation in Croatian brown bears. *Arch Environ Contam Toxicol* doi: 10.1007/s00244-017-0487-5
2. **Sekovanić A**, Jurasović J, Piasek M, Pašalić D, Orct T, Sulimanec Grgec A, Stasenko S, Branović Čakanić K, Jazbec A (2018) Metallothionein 2A gene polymorphism and trace elements in mother-newborn pairs in the Croatian population. *J Trace Elem Med Biol* **45**: 163-170
3. Lazarus M, **Sekovanić A**, Orct T, Reljić S, Kusak J, Jurasović J, Huber Đ (2017) Apex predatory mammals as bioindicator species in environmental monitoring of elements in Dinaric Alps (Croatia). *Environ Sci Pollut Res* **24**: 23977-23991
4. Piasek M, Jurasović J, **Sekovanić A**, Brajenović N, Brčić Karačonji I, Mikolić A, Sulimanec Grgec A, Stasenko S (2016) Placental cadmium as an additional noninvasive bioindicator of active maternal tobacco smoking. *J Toxicol Environ Health A* **79**: 443-446

5. Zeneli L, **Sekovanić A**, Ajvazi M, Kurti L, Daci N (2016) Alterations in antioxidant defense system of workers chronically exposed to arsenic, cadmium and mercury from coal flying ash. *Environ Geochem Health* **38**: 65-72
6. Breljak D, Brzica H, Vrhovac I, Micek V, Karaica D, Ljubojević M, **Sekovanić A**, Jurasović J, Rašić D, Peraica M, Lovrić M, Schnedler N, Henjakovic M, Wegner W, Burckhardt G, Burckhardt BC, Sabolić I (2015) In female rats, ethylene glycol treatment elevates protein expression of hepatic and renal oxalate transporter sat-1 (Slc26a1) without inducing hyperoxaluria. *Croat Med J* **56**: 447-459
7. Orct T, Lazarus M, Ljubojević M, **Sekovanić A**, Sabolić I, Blanuša M (2015) Metallothionein, essential elements and lipid peroxidation in mercury-exposed suckling rats pretreated with selenium. *Biometals* **28**: 701-712
8. Zeneli L, **Sekovanić A**, Daci N (2015) Chronic exposure to aluminum, nickel, thallium and uranium and their relationship with essential elements in human whole blood and blood serum. *J Environ Sci Health Part A* **50**: 540-546
9. Lazarus M, **Sekovanić A**, Reljić S, Kusak J, Kovačić J, Orct T, Jurasović J, Huber Đ (2014) Selenium in brown bears (*Ursus arctos*) from Croatia: Relation to cadmium and mercury. *J Environ Sci Health Part A* **49**: 1392-1401
10. Piasek M, Mikolić A, **Sekovanić A**, Sulimanec Grgec A, Jurasović J (2014) Cadmium in placenta – a valuable biomarker of exposure during pregnancy in biomedical research. *J Toxicol Environ Health Part A* **77**: 1071-1074

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u SCIE:

1. Vihnanek Lazarus M, **Sekovanić A**, Kljaković-Gašpić Z, Orct T, Jurasović J, Kusak J, Reljić S, Huber Đ (2013) Cadmium and lead in grey wolf liver samples: Optimisation of a microwave-assisted digestion method. *Arh Hig Rada Toksikol* **64**: 395-403
2. Blanuša M, Orct T, Vihnanek Lazarus M, **Sekovanić A**, Piasek M (2012) Mercury disposition in suckling rats: Comparative assessment following parenteral exposure to thiomersal and mercuric chloride. *J Biomed Biotechnol* ID 256965, 7 pages, <http://www.hindawi.com/journals/jbb/2012/256965/cta/>

10. PRILOZI

Prilog 1

Dodatni materijali vezani uz poglavlja UVOD i MATERIJALI i METODE

Tablica 1. Pregled literaturnih podataka o frekvencijama pojavnosti polimorfizma *MT2A* rs28366003 u raznim populacijama.

literatura	država	n	populacija	pojavnost genotipa (%)		
				AA	AG	GG
Hattori i sur., 2016	Japan	2774	muškarci i žene	81,8	17,4	0,8
Starska i sur., 2015	Poljska	132	muškarci i žene	87,9	12,1	0,0
Starska i sur., 2014	Poljska	116	muškarci i žene	84,5	14,6	0,9
Krześlak i sur., 2013	Poljska	67	muškarci	88,0	12,0	0,0
Tekin i sur., 2012a	Turska	95	parovi majka-dijete	87,4	12,6	0,0
Tekin i sur., 2012b	Turska	91	parovi majka-dijete	86,8	13,2	0,0
Kayaalti i sur., 2011	Turska	616	muškarci i žene	86,6	12,8	0,6
Kayaalti i sur., 2010	Turska	114	muškarci i žene	87,7	11,4	0,9

Tablica 2. Pregled literaturnih podataka (2000. - 2017.) o razinama metala s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs28366003 (1/3 nastavka).

literatura	država	n	uzorak	genotip		
Cd						
Starska i sur., 2015	Poljska	132	tkivo sinusne sluznice bez karcinoma	AA	62,2 ± 41,2 µg/kg s.t.	
				AG	96,2 ± 57,1 µg/kg s.t.	
		117	tkivo sinusne sluznice s karcinomom	AA	116,4 ± 79,2 µg/kg s.t.	
				AG	376,4 ± 126,1 µg/kg s.t.	
Starska i sur., 2014	Poljska	116	tkivo grkljana bez carcinoma	GG	393 µg/kg s.t.	
				AA	87,2 ± 32,2 µg/kg s.t.	
				AG	113,5 ± 26,1 µg/kg s.t.	
		323	tkivo grkljana s karcinomom	GG	116,8 µg/kg s.t.	
				AA	197,8 ± 87,0 µg/kg s.t.	
				AG	368,9 ± 127,5 µg/kg s.t.	
Kržešlak i sur., 2013	Poljska	67	tkivo prostate bez karcinoma	GG	509,3 µg/kg s.t.	
				AA	0,36 ± 0,12 mg/kg s.t.	
		412	tkivo prostate s karcinomom	AG	0,66 ± 0,14 mg/kg s.t.	
				AA	0,72 ± 0,33 mg/kg s.t.	
Tekin i sur., 2012a	Turska	95	krv majke nepušačice	AG	0,97 ± 0,46 mg/kg s.t.	
				AA	1,09 ± 0,22 mg/kg s.t.	
		95	posteljica	AA	1,60 ± 0,94 µg/L	
				AG	2,54 ± 2,72 µg/L	
		95	krv pupkovine	AA	20,83 ± 19,7 µg/kg s.t.	
				AG	8,65 ± 6,70 µg/kg s.t.	
Kayaalti i sur., 2011	Turska	616	krv	AA	0,95 ± 0,32 µg/L	
				AG	0,98 ± 0,28 µg/L	
				GG	1,60 ± 1,44 µg/L	
Kayaalti i sur., 2010	Turska	114	tkivo bubrega	AG	2,09 ± 1,85 µg/L	
				AA	5,98 ± 4,38 µg/L	
				GG	87,7 ± 62,9 µg/g s.t.	
Pb	Kržešlak i sur., 2013	67	tkivo prostate bez karcinoma	AA	151,2 ± 60,2 µg/g s.t.	
				AG	153,1 µg/g s.t.	
		412	tkivo prostate s karcinomom	AA	1,67 ± 0,61 mg/kg s.t.	
				AG	1,72 ± 0,67 mg/kg s.t.	
	Tekin i sur., 2012b	Turska	91	krv majke nepušačice	AA	3,11 ± 1,27 mg/kg s.t.
					AG	4,66 ± 1,82 mg/kg s.t.
			91	posteljica	AA	5,11 ± 2,52 mg/kg s.t.
					AG	35,3 ± 14,3 µg/L
91			krv pupkovine	AA	51,3 ± 27,9 µg/L	
				AG	7,79 ± 2,55 µg/kg s.t.	
Kayaalti i sur., 2011	Turska	616	krv	AG	9,75 ± 4,14 µg/kg s.t.	
				AA	24,2 ± 10,0 µg/L	
				AG	29,4 ± 14,9 µg/L	
				AA	30,1 ± 13,9 µg/L	
				AG	32,9 ± 14,9 µg/L	
GG	50,4 ± 11,5 µg/L					
AG	15,3 ± 10,6 µg/g s.t.					
GG	31,9 µg/g s.t.					

s.t. – suho tkivo

Tablica 2. Pregled literaturnih podataka (2000. - 2017.) o razinama metala s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs28366003 (2/3 nastavka).

literatura	država	n	uzorak	genotip	
Fe					
Tekin i sur., 2012a	Turska	95	krv majke nepušačice	AA	343,2 ± 89,5 mg/L
				AG	373,4 ± 102,9 mg/L
		95	posteljica	AA	526,8 ± 194,3 mg/kg s.t.
				AG	623,5 ± 161,9 mg/kg s.t.
		95	krv pupkovine	AA	270,9 ± 129,8 mg/L
				AG	455,9 ± 214,2 mg/L
Zn					
Starska i sur., 2015	Poljska	132	tkivo sinusne sluznice bez karcinoma	AA	198,6 ± 43,6 mg/kg s.t.
				AG	203,9 ± 52,1 mg/kg s.t.
		117	tkivo sinusne sluznice s karcinomom	AA	52,2 ± 41,2 mg/kg s.t.
				AG	127,3 ± 75,5 mg/kg s.t.
Starska i sur., 2014	Poljska	116	tkivo grkljana bez karcinoma	GG	136 mg/kg s.t.
				AA	97,6 ± 30,0 mg/kg s.t.
				AG	132,8 ± 27,4 mg/kg s.t.
		323	tkivo grkljana s karcinomom	GG	128,7 mg/kg s.t.
				AA	86,4 ± 38,1 mg/kg s.t.
				AG	183,9 ± 56,9 mg/kg s.t.
Krześlak i sur., 2013	Poljska	67	tkivo prostate bez karcinoma	GG	193,9 mg/kg s.t.
				AA	484,6 ± 119,3 mg/kg s.t.
		412	tkivo prostate s karcinomom	AG	927,3 ± 317,4 mg/kg s.t.
				GG	243,7 ± 64,4 mg/kg s.t.
Tekin i sur., 2012a	Turska	95	krv majke nepušačice	AA	134,9 ± 48,2 mg/kg s.t.
				AG	239,4 ± 80,3 mg/kg s.t.
		95	posteljica	AA	4,33 ± 1,13 mg/L
				AG	4,82 ± 1,44 mg/L
		95	krv pupkovine	AA	50,46 ± 10,08 mg/kg s.t.
				AG	46,13 ± 7,08 mg/kg s.t.
Kayaalti i sur., 2011	Turska	616	serum	AA	1,32 ± 0,55 mg/L
				AG	1,48 ± 0,53 mg/L
				GG	0,39 ± 0,33 mg/L
Kayaalti i sur., 2010	Turska	114	tkivo bubrega	AA	180,2 ± 84,6 µg/g s.t.
				AG	192,0 ± 114,7 µg/g s.t.
				GG	142,0 µg/g s.t.

s.t. – suho tkivo

Tablica 2. Pregled literaturnih podataka (2000. - 2017.) o razinama metala s obzirom na polimorfizam *MT2A* rs28366003 (3/3 nastavka).

literatura	država	n	uzorak	genotip	
Cu					
Starska i sur., 2015	Poljska	132	tkivo sinusne sluznice bez karcinoma	AA	11,03 ± 2,98 mg/kg s.t.
				AG	17,2 ± 5,17 mg/kg s.t.
		117	tkivo sinusne sluznice s karcinomom	AA	24,2 ± 13,6 mg/kg s. t.
				AG/GG	27,1 ± 11,6 mg/kg s.t.
				GG	26,1 mg/kg s.t.
				AA	9,85 ± 4,10 mg/kg s.t.
Starska i sur., 2014	Poljska	116	tkivo grkljana bez carcinoma	AG	12,7 ± 3,56 mg/kg s.t.
				GG	11,5 mg/kg s.t.
				AA	14,4 ± 7,83 mg/kg s.t.
		323	tkivo grkljana s karcinomom	AG	26,6 ± 12,5 mg/kg s.t.
				GG	29,7 mg/kg s.t.
				AA	2,98 ± 1,27 mg/kg s.t.
Kržešlak i sur., 2013	Poljska	67	tkivo prostate bez karcinoma	AG	7,63 ± 2,88 mg/kg s.t.
				AA	10,3 ± 4,24 mg/kg s.t.
		412	tkivo prostate s karcinomom	AG	21,1 ± 9,61 mg/kg s.t.
				GG	25,6 ± 5,81 mg/kg s.t.
				AA	1,67 ± 0,34 mg/L
				AG	1,84 ± 0,50 mg/L
Tekin i sur., 2012a	Turska	95	krv majke nepušačice	AA	5,90 ± 2,59 mg/kg s.t.
				AG	6,63 ± 1,73 mg/kg s.t.
		95	posteljica	AA	0,69 ± 0,25 mg/L
				AG	0,69 ± 0,28 mg/L
				AA	1,04 ± 0,44 mg/L
				AG	1,02 ± 0,52 mg/L
Kayaalti i sur., 2011	Turska	616	serum	GG	0,91 ± 0,37 mg/L
				AA	17,2 ± 16,9 µg/g s.t.
				AG	15,3 ± 10,6 µg/g s.t.
Kayaalti i sur., 2010	Turska	114	tkivo bubrega	GG	31,9 µg/g s.t.

s.t. – suho tkivo

Tablica 3. Pregled literaturnih vrijednosti (2000. - 2017.) za koncentracije kadmija (Cd) u majčinoj krvi (trudnice, roditelje i dojilje), posteljici i krvi pupkovine.

literatura	država	n		krv majke ($\mu\text{g/L}$)	posteljica ($\mu\text{g/kg m.t.}$)	krv pupkovine ($\mu\text{g/L}$)
Cd						
Stajniko i sur., 2017	Slovenija	533	dojilje	0,33 (0,25 - 0,49)	/	/
Jagodic i sur., 2017	Slovenija	494	roditelje	0,35 (0,20 - 3,08)	/	/
Piasek i sur., 2016	Hrvatska	54	nepušačice	0,45 (0,19 - 0,99)	7,63 (3,34 - 18,8)	0,09 (0,02 - 0,19)
		32	pušačice	1,57 (0,50 - 5,23)	10,4 (5,42 - 33,6)	0,11 (0,02 - 0,21)
		56	nepušačice	0,34 (0,20 - 0,44)		
Grzunov Letinić i sur., 2016	Hrvatska	18	prestale pušiti u trudnoći	0,48 (0,32 - 0,76)	/	/
		28	nastavile pušiti u trudnoći	0,99 (0,62 - 1,5)		
Arbuckle i sur., 2016	Kanada	2001	6-13 tj. trudnoće	0,20 (ND - 5,62)	/	ND (ND - 4,05)
			32-34 tj. trudnoće	0,20 (ND - 4,27)		
Kim i sur., 2015	Južna Koreja	79/104 [#]		0,61 (0,24 - 2,80)	/	0,01 (0,0 - 0,22)
Fagerstedt i sur., 2015	Švedska	80/69		0,37 (0,14 - 0,90) [†]	3,95 (1,84 - 10,8)	0,03 (0,02 - 0,06) [†]
Ashley-Martin i sur., 2015	Kanada	1260		0,32 \pm 2,13	/	/
Piasek i sur., 2014	Hrvatska	119	kontinent nepušačice	0,33 (0,24 - 0,44)	6,5 (5,1 - 8,6)	0,03 (0,02 - 0,04)
		77	kontinent pušačice	0,93 (0,55 - 2,1)	10,5 (8,5 - 14,1)	0,04 (0,03 - 0,05)
		48	priobalje nepušačice	0,46 (0,31 - 0,56)	10,4 (7,6 - 12,9)	0,03 (0,02 - 0,04)
		48	priobalje pušačice	0,75 (0,48 - 1,6)	12,3 (8,4 - 15,5)	0,03 (0,02 - 0,05)
Chen i sur., 2014	SAD (Afroamerikanci)	50	eritrociti	0,86 (0,70 - 1,07)	/	0,06 (0,05 - 0,09)
			plazma	0,06 (0,04 - 0,09)	/	0,04 (0,03 - 0,05)
García-Esquinas i sur., 2013	Španjolska	140/114 [#]		0,53 (0,45 - 0,61)	/	0,27 (0,23 - 0,31)
Leino i sur 2013	Finska	130		/	3,70 (1,86 - 7,13)	/
Sakamoto i sur., 2013	Japan	48		1,9 (1,5 - 2,2) [†]	12,0 (9,5 - 16,1)*	0,20 (0,14 - 0,27) [†]
Needham i sur., 2011	Farski otoci	15		/	0,61*	0,33
Al-Saleh i sur., 2011	Saudijska Arabija	1578		0,99 \pm 0,31	7,89 \pm 20,4*	0,78 \pm 0,62
Stasenko i sur., 2010	Hrvatska	109	nepušačice	/	9,7 (7,3 - 12,5)	/
		99	pušačice	/	21,4 (17,2 - 26,5)	/
Kippler i sur., 2010	Bangladeš	44		/	19,3 (7,0 - 86,3)*	0,16 (0,07 - 0,32) [†]
Rudge i sur., 2009	Južna Afrika	62		0,15 (0,04 - 0,89)	/	0,02 (0 - 0,32)
Klapec i sur., 2008	Hrvatska	36		/	8,03 (2,10 - 19,2)	/
Butler Walker i sur., 2006	Kanada	385		1,72 (ND - 8,5)	/	0,2 (ND - 7,5)
Ronco i sur., 2005a	Čile	20	nepušačice	/	3,5 \pm 1,7*	/
		20	pušačice	/	10,5 \pm 3,5*	/
Ronco i sur., 2005b	Čile	6	nepušačice	/	4,2 \pm 10,5*	/
		6	pušačice	/	13,2 \pm 4,2*	/
Piasek i sur., 2001	Hrvatska	27	nepušačice	/	15,9 \pm 1,4	/
		25	pušačice	/	28,5 \pm 2,0	/
Osman i sur., 2000	Švedska	106		0,16 (0,01 - 2,05)	5,2 (1,14 - 19,4)	0,02 (0 - 0,08)
Raghunath i sur., 2000	Indija	148		0,7 \pm 30,2	/	0,6 \pm 30

[#]n (krv majke) / n (krv pupkovine)[†]rezultati su izraženi po kg eritrocita*rezultati su preračunati na masu mokrog tkiva s faktorom $\frac{m_{ST}}{m_{MT}} = 5,7$ (Kippler i sur., 2010)

ND – nije detektirano

Tablica 4. Pregled literaturnih vrijednosti (2000. - 2017.) za koncentracije olova (Pb) u majčinoj krvi (trudnice, roditelje i dojilje), posteljici i krvi pupkovine.

literatura	država	n		krv majke ($\mu\text{g/L}$)	posteljica ($\mu\text{g/kg m.t.}$)	krv pupkovine ($\mu\text{g/L}$)
Pb						
Stajanko i sur., 2017	Slovenija	533	dojilje	15,9 (12,3 - 21,1)	/	/
Jagodic i sur., 2017	Slovenija	494		16,8 (4,2 - 71,9)	/	/
Barbieri i sur., 2016	Bolivija	419/240 [#]		26,5 \pm 48,7	/	22,6 \pm 57,4
Grzunov Letinić i sur., 2016	Hrvatska	56	nepušačice	7,0 (5,2 - 9,5)	/	/
		18	prestale pušiti u trudnoći	7,4 (5,6 - 13)	/	/
		28	nastavile pušiti u trudnoći	6,9 (6,0 - 11)	/	/
Arbuckle i sur., 2016	Kanada	2001	6-13 tj. trudnoće	6,0 (1,55 - 51,8)	/	7,67 (ND - 51,8)
			32-34 tj. trudnoće	5,6 (ND - 41,4)	/	/
Kim i sur., 2015	Južna Koreja	79/104		1,03 (0,51 - 1,82)	/	0,71 (0,47 - 1,58)
Fagerstedt i sur., 2015	Švedska	80/69		15,8 (6,33 - 55,4) [†]	2,87 (1,04 - 36,8)	7,85 (2,41 - 22,0) [†]
Ashley-Martin i sur., 2015	Kanada	1260		8,8 \pm 16,1	/	/
Chen i sur., 2014	SAD (Afroamerikanci)	50	eritrociti	39,3 (33,3 - 46,6)	/	24,1 (20,0 - 29,0)
			plazma	1,3 (0,9 - 1,8)	/	1,6 (1,2 - 2,2)
García-Esquinas i sur., 2013	Španjolska	140/114 [#]		19,8 (14,1 - 27,2)	/	14,1 (10,6 - 19,1)
Leino i sur., 2013	Finska	130		/	13,1 (9,20 - 56,9)	/
Sakamoto i sur., 2013	Japan	48		23,4 (19,6 - 30,7) [†]	9,9 (7,3 - 13,2)*	12,5 (10,5 - 15,7) [†]
Llop i sur., 2011	Španjolska	1466		/	/	11,1 \pm 6,7
Needham i sur., 2011	Farski otoci	15		/	9,3*	6,0
Al-Saleh i sur., 2011	Saudijska Arabija	1578		28,9 \pm 18,5	101 \pm 382*	25,5 \pm 25,9
Gundacker i sur., 2010	Austrija	53		24,9 (17,8 - 34,7)	4,53 (3,68 - 6,46)*	13,4 (8,1 - 24,1)
Stasenko i sur., 2010	Hrvatska	109	nepušačice	/	13,8 (7,6 - 27,1)	/
		99	pušačice	/	17,9 (10,3 - 34,2)	/
Rudge i sur., 2009	Južna Afrika	62		23 (6 - 161)	/	15,4 (1,4 - 95,1)
Klapec i sur., 2008	Hrvatska	36		/	45,2 (15,5 - 93,5)	/
Palkovicova i sur., 2008	Slovačka	99		0,63 (0,14 - 2,9)	/	0,8 (0,15 - 2,54)
Butler Walker i sur., 2006	Kanada	385		33,6 (2,07 - 178)	/	28 (2,1 - 155)
Falcón i sur., 2003	Španjolska	71	ročni porodaj	/	18,1 \pm 8,7*	/
		18	prijevremeni porodaj	/	27 \pm 12,6*	/
Piasek i sur., 2001	Hrvatska	27	nepušačice	/	49,5 \pm 7,5	/
		25	pušačice	/	41,7 \pm 6,9	/
Osman i sur., 2000	Švedska	106		11,4 (2,1 - 48)	5,4 (0 - 131)	11,2 (0,89 - 123)
Raghunath i sur., 2000	Indija	148		64 \pm 16,9	/	51 \pm 19,6

[#]n (krv majke) / n (krv pupkovine)[†]rezultati su izraženi po kg eritrocita*rezultati su preračunati na masu mokrog tkiva s faktorom $\frac{m_{ST}}{m_{MT}} = 5,7$ (Kippler i sur., 2010)

ND – nije detektirano

Tablica 5. Pregled literaturnih vrijednosti (2000. - 2017.) za koncentracije žive (Hg) u majčinoj krvi (trudnice, roditelje i dojilje), posteljici i krvi pupkovine.

literatura	država	n		krv majke (µg/L)	posteljica (µg/kg m.t.)	krv pupkovine (µg/L)
Hg						
Stajanko i sur., 2017	Slovenija	533	dojilje	1,06 (0,66 - 1,82)	/	/
Snoj Tratnik i sur., 2017	Slovenija/ Hrvatska	139		2,36 (0,55 - 20,5)	/	3,43 (0,46 - 32,3)
Jagodic i sur., 2017	Slovenija	494		1,11 (0,20 - 10,2)	/	/
Grzunov Letinić i sur., 2016	Hrvatska	9	<1 put na tjedan ^a	0,73 (0,26 - 2,7)	/	/
		27	1-2 put na tjedan ^a	1,3 (0,62 - 2,6)		
		41	2-4 put na tjedan ^a	1,2 (0,77 - 3,2)		
		24	>4 put na tjedan ^a	3,0 (1,3 - 5,2)		
Arbuckle i sur., 2016	Kanada	2001	6-13 tjedan trudnoće	0,70 (ND - 10,0)	/	0,80 (ND - 14,2)
			32-34 tjedan trudnoće	0,56 (ND - 12,4)		
Kim i sur., 2015	Južna Koreja	79/104 [#]	T-Hg	2,66 (1,36 - 8,50)	/	4,44 (2,61 - 12,1)
			Me-Hg	2,16 (1,02 - 6,82)		3,67 (2,25 - 11,2)
Ashley-Martin i sur., 2015	Kanada	1260		0,86 ± 2,84	/	/
Llop i sur., 2014	Italija	5		/	/	3,8 (3,6 - 4,1)
	Grčka	40		/	/	5,4 (4,9 - 5,8)
	Španjolska	205		/	/	8,2 (7,7 - 8,7)
Chen i sur., 2014	SAD (Afroamerikanci)	50	eritrociti	2,35 (1,82 - 3,03)	/	3,58 (2,76 - 4,65)
			plazma	0,32 (0,24 - 0,42)	/	0,21 (0,16 - 0,29)
García-Esquinas i sur., 2013	Španjolska	140/114 [#]		3,9 (2,4 - 6,8)	/	6,7 (4,9 - 11,0)
		871/614 [#]		2,4 (0,05 - 40) [†]	/	3,9 (0,1 - 33) [†]
Miklavčič i sur., 2013	Slovenija	446	T-Hg	/	/	1,5 (0,2 - 14) [†]
	Hrvatska	255/210 [#]		2,0 (0,6 - 21) [†]	/	2,9 (0,3 - 32) [†]
	Grčka	391		/	/	5,8 (0,2 - 33) [†]
Leino i sur., 2013	Finska	130		/	2,31 (0,76 - 5,69)	/
Sakamoto i sur., 2013	Japan	48	T-Hg	9,1 (6,9 - 10,8) [†]	9,0 (7,2 - 9,8)*	14,0 (10,3 - 18,0) [†]
			I-Hg	/	1,3 (1,1 - 1,4)*	/
			Me-Hg	/	7,7 (6,1 - 8,4)*	/
Ramon i sur., 2011	Španjolska	1883	T-Hg	/	/	11,0 (5,0 - 14)
Needham i sur., 2011	Farski otoci	15		/	15,3*	12,1
Gundacker i sur., 2010	Austrija	53		0,7 (0,3 - 1,2)	0,33 (0,12 - 0,65)*	1,1 (0,4 - 1,9)
Rudge i sur., 2009	Južna Afrika	62		0,65 (0,1 - 8,8)	/	1,2 (0,1 - 9,7)
Choi i sur., 2008	Farski otoci	163		/	/	20,9 (12,5 - 40,0)
Butler Walker i sur., 2006	Kanada	385	I-Hg	0,78 (ND - 4,6)	/	0,83 (ND - 5,6)
			Me-Hg	2,20 (0,0 - 29,3)	/	4,9 (0,0 - 70,2)
			T-Hg	2,96 (ND - 33,9)	/	5,8 (ND - 75,8)
Björnberg i sur., 2005	Švedska	127	MeHg	1,7 (0,3 - 14)	/	/
			I-Hg	0,24 (0,01 - 1,6)	/	/
Björnberg i sur., 2003	Švedska	130	MeHg	/	/	1,3 (0,10 - 5,7)
Vahter i sur., 2000	Švedska	112/98 [#]	I-Hg	0,32 (0,04 - 1,2)	/	0,34 (0,10 - 0,75)
			Me-Hg	0,73 (0,20 - 2,0)	/	1,4 (0,3 - 3,8)

^a učestalost konzumacije morske hrane na tjedan[#] n (krv majke) / n (krv pupkovine)[†] rezultati su izraženi po kg eritrocita* rezultati su preračunati na masu mokrog tkiva s faktorom $\frac{m_{ST}}{m_{MT}} = 5,7$ (Kippler i sur., 2010)

ND – nije detektirano

T-Hg – ukupna Hg; I-Hg – anorganska Hg; Me-Hg – metil-Hg

Tablica 6. Pregled literaturnih vrijednosti (2000. - 2017.) za koncentracije esencijalni elemenata (Fe, Zn, Cu i Se) u majčinoj krvi (trudnice, roditelje i dojilje), posteljici i krvi pupkovine (1/2 nastavka).

literatura	država	n		krv majke (mg/L)	posteljica (mg/kg m.t.)	krv pupkovine (mg/L)
Fe						
Stasenko i sur., 2010	Hrvatska	109	nepušačice	/	109 (97,5 - 131)	/
		99	pušačice	/	112 (92,0 - 131)	/
Ronco i sur., 2005a	Čile	20	nepušačice	/	106 ± 26*	/
		20	pušačice	/	96 ± 18*	/
Piasek i sur., 2001	Hrvatska	27	nepušačice	/	154 ± 6,91	/
		25	pušačice	/	129 ± 6,32	/
Raghunath i sur., 2000	Indija	148		354 ± 14	/	540 ± 13
Zn						
Jagodic i sur., 2017	Slovenija	494		6,73 (3,0 - 11,7)	/	/
Aydogan i sur., 2013	Turska	22	nepušačice	7,95 ± 1,11	/	5,30 ± 0,79
		28	pušačice	7,42 ± 1,03	/	4,98 ± 0,66
Sakamoto i sur., 2013	Japan	48		1,19 (1,15 - 1,26) [†]	8,4 (7,7 - 8,8)*	2,26 (1,87 - 2,61) [†]
Stasenko i sur., 2010	Hrvatska	109	nepušačice	/	12,6 (11,9 - 13,5)	/
		99	pušačice	/	13,1 (12,2 - 14,3)	/
Kippler i sur., 2010	Bangladeš	44		/	11,6 (8,9 - 13,8)*	3,0 (1,8 - 5,1) [†]
Rudge i sur., 2009	Južna Afrika	62		6,3 (3,0 - 11,4)	/	2,55 (1,56 - 4,74)
Butler Walker i sur., 2006	Kanada	385	serum	0,58 (0,18 - 5,21)	/	1,10 (0,28 - 5,49)
Ronco i sur., 2005a	Čile	20	nepušačice	/	9,30 ± 1,6*	/
		20	pušačice	/	10,9 ± 1,4*	/
Ronco i sur., 2005b	Čile	6	nepušačice	/	8,9 ± 2,5*	/
		6	pušačice	/	10,2 ± 2,8*	/
Piasek i sur., 2001	Hrvatska	27	nepušačice	/	15,1 ± 0,38	/
		25	pušačice	/	14,6 ± 0,53	/
Osman i sur., 2000	Švedska	106	serum	0,59 (0,44 - 1,02)	10,9 (8,2 - 19,0)	0,95 (0,68 - 2,52)
Raghunath i sur., 2000	Indija	148		6,34 ± 0,01	/	2,53 ± 0,01
Cu						
Jagodic i sur., 2017	Slovenija	494		1,08 (0,66 - 2,0)	/	/
Aydogan i sur., 2013	Turska	22	nepušačice	1,38 ± 0,19	/	0,79 ± 0,20
		28	pušačice	1,52 ± 0,27	/	0,93 ± 0,26
Sakamoto i sur., 2013	Japan	48		0,56 (0,52 - 0,60) [†]	0,68 (0,59 - 0,75)*	0,62 (0,58 - 0,65) [†]
Stasenko i sur., 2010	Hrvatska	109	nepušačice	/	0,78 ± 0,16	/
		99	pušačice	/	0,79 ± 0,17	/
Kippler i sur., 2010	Bangladeš	44		/	0,93 (0,68 - 1,2)*	0,66 (0,54 - 0,84) [†]
Rudge i sur., 2009	Južna Afrika	62		1,73 (1,20 - 2,42)	/	0,66 (0,38 - 1,41)
Butler Walker i sur., 2006	Kanada	385	serum	2,16 (0,17 - 3,60)	/	0,41 (0,089 - 2,45)
Ronco i sur., 2005a	Čile	20	nepušačice	/	1,0 ± 0,16*	/
		20	pušačice	/	0,95 ± 0,20*	/
Piasek i sur., 2001	Hrvatska	27	nepušačice	/	1,02 ± 0,05	/
		25	pušačice	/	0,93 ± 0,03	/
Osman i sur., 2000	Švedska	106	serum	/	0,94 (0,63 - 1,3)	/
Raghunath i sur., 2000	Indija	148		1,1 ± 0,01	/	0,51 ± 0,01

Tablica 6. Pregled literaturnih vrijednosti (2000. - 2017.) za koncentracije esencijalni elemenata (Fe, Zn, Cu i Se) u majčinoj krvi (trudnice, roditelje i dojilje), posteljici i krvi pupkovine (2/2 nastavka).

literatura	država	n		krv majke ($\mu\text{g/L}$)	posteljica ($\mu\text{g/kg m.t.}$)	krv pupkovine ($\mu\text{g/L}$)
Se						
Stajanko i sur., 2017	Slovenija	533	dojilje	90,0 (79,5 - 102)	/	/
Jagodac i sur., 2017	Slovenija	494		94,7 (53,9 - 176)	/	/
Chen i sur., 2014	SAD (Afroamerikanci)	50	eritrociti	278 (260 - 298)	/	304 (282 - 328)
			plazma	92,4 (84,3 - 101)	/	57,4 (48,6 - 67,8)
Miklavčič i sur., 2013	Italija	870/619 [#]		117 (63 - 229) [†]	/	113 (49 - 279) [†]
	Slovenija	426		/	/	76 (38 - 194) [†]
	Hrvatska	219/209 [#]		90 (41 - 182) [†]	/	96 (55 - 163) [†]
	Grčka	375		/	/	104 (32 - 229) [†]
Leino i sur., 2013	Finska	130		/	212 (180 - 260)	/
Sakamoto i sur., 2013	Japan	48		197 (182 - 212) [†]	182 (171 - 210)*	221 (204 - 248) [†]
Kippler i sur., 2010	Bangladeš	44		/	246 (193 - 404)*	0,19 (0,14 - 0,43) [†]
Needham i sur., 2011	Farski otoci	15		/	142*	105
Rudge i sur., 2009	Južna Afrika	62		104 (63 - 203)	/	111 (50 - 202)
Klapec i sur., 2008	Hrvatska	36		/	0,15 (0,10 - 0,24)	/
Choi i sur., 2008	Farski otoci	163		/	/	102 (93 - 112)
Butler Walker i sur., 2006	Kanada	385	serum	121 (67 - 184)	/	79 (43 - 142)
Björnberg i sur., 2005	Švedska	127	serum	70 (46 - 154)	/	/
Björnberg i sur., 2003	Švedska	130	serum	/	/	86 (43 - 233)
Osman i sur., 2000	Švedska	106	serum	70,9 (49,1 - 109)	187 (156 - 257)	52,3 (22,6 - 74,1)

*rezultati su preračunati na masu mokrog tkiva s faktorom $\frac{m_{ST}}{m_{MT}} = 5,7$ (Kippler i sur., 2010)

[†]rezultat je izražen po kg eritrocita

[#]n (krv majke) / n (krv pupkovine)

Tablica 7. Usporedba dobivenih i certificiranih vrijednosti analiziranih elemenata u upotrebljenim referentnim materijalima pripremljenim metodom razaranja.

ClinChek® Whole blood Control

element	razina I		razina II		razina III	
	certificirana vrijednost (raspon)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrijednost (raspon)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrijednost (raspon)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)
Cd (µg/L)	1,3 (1,04 - 1,56)	1,4 ± 0,01	3,04 (2,43 - 3,65)	3,01 ± 0,06	6,57 (5,26 - 7,88)	6,35 ± 0,08
Cu (mg/L)	0,670 (0,536 - 0,804)	0,595 ± 0,008	1,08 (0,918 - 1,24)	0,992 ± 0,004	1,64 (1,39 - 1,89)	1,52 ± 0,006
Fe (mg/L)	/	/	/	/	/	/
Hg (µg/L)	1,2 (0,840 - 1,56)	1,3 ± 0,01	3,04 (2,28 - 3,80)	3,37 ± 0,01	6,23 (4,98 - 7,48)	6,39 ± 0,04
Pb (µg/L)	57,8 (46,2 - 69,4)	56,7 ± 1,0	231 (185 - 277)	226 ± 4,4	441 (375 - 507)	474 ± 6,0
Se (µg/L)	72,1 (57,7 - 86,5)	77,0 ± 1,0	111 (88,8 - 133)	116 ± 1,3	134 (107 - 161)	141 ± 1,0
Zn (mg/L)	4,59 (3,90 - 5,28)	4,56 ± 0,6	6,25 (5,31-7,19)	6,44 ± 0,32	7,95 (6,76 - 9,14)	8,10 ± 0,05

Seronorm™ Trace Elements Whole Blood

element	razina I		razina II	
	certificirana vrijednost (95% interval pouzdanosti)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)	certificirana vrijednost (95% interval pouzdanosti)	dobivena vrijednost (sred. vrij. ± SD)
Cd (µg/L)	0,36 (0,32 - 0,40)	0,35 ± 0,005	5,8 (5,4 - 6,2)	6,1 ± 0,1
Cu (mg/L)	0,68 (0,41 - 0,95)	0,55 ± 0,002	1,33 (0,79 - 1,87)	1,24 ± 0,02
Fe (mg/L)	339	376 ± 3	319	376 ± 2
Hg (µg/L)	1,5 (0,90 - 2,10)	1,4 ± 0,02	16,0 (9,6 - 22,4)	17,4 ± 0,1
Pb (µg/L)	10,2 (6,0 - 14,4)	12,0 ± 0,2	310 (186 - 434)	361 ± 4
Se (µg/L)	59 (35 - 83)	57 ± 0,5	112 (66 - 158)	120 ± 0,7
Zn (mg/L)	4,4 (4,0 - 4,8)	4,3 ± 0,02	6,5 (5,8 - 7,2)	7,3 ± 0,01

Certificirane vrijednosti su prikazane s rasponom ili 95% intervalom pouzdanosti, dok su dobivene vrijednosti prikazane kao srednja vrijednost ± SD.

Prilog 2

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima zastupljenim u bazi *Current Contents* koji obrađuju tematiku sadržanu u ovom doktorskom radu:

Sekovanić A, Jurasović J, Piasek M, Pašalić D, Orct T, Sulimanec Grgec A, Stasenko S, Branović Čakanić K, Jazbec A (2018) Metallothionein 2A gene polymorphism and trace elements in mother-newborn pairs in the Croatian population. *J Trace Elem Med Biol* **45**: 163-170

Piasek M, Jurasović J, **Sekovanić A**, Brajenović N, Brčić Karačonji I, Mikolić A, Sulimanec Grgec A, Stasenko S (2016) Placental cadmium as an additional noninvasive bioindicator of active maternal tobacco smoking. *J Toxicol Environ Health A* **79**: 443-446

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

UTJECAJ POLIMORFIZMA METALOTIONEINA 2A I IZLOŽENOSTI CIGARETNOMU DIMU NA RAZINU TOKSIČNIH I ESENCIJALNIH METALA U RODILJA TE NA KONCENTRACIJU STEROIDNIH HORMONA U POSTELJICI

Ankica Sekovanić

SAŽETAK

U zdravih roditelja nakon ročnog rodničkog porođaja procijenjen je utjecaj glavnih izvora izloženosti toksičnim metalima u općoj populaciji, pušenjem cigareta (Cd i Pb) i konzumacijom morske hrane (Hg), te polimorfizma *MT2A* rs28366003 na koncentracije toksičnih metala (Cd, Pb i Hg) i s njima povezanih esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu i Se) u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine, steroidne hormone u posteljici kao i koncentracije *MT2* i slobodnih –SH skupina u serumu majki. Uspoređene su ispitanice iz geografskog područja prebivališta u priobalju s mediteranskom prehranom bogatom ribom (n = 96) s ispitanicama u kontinentalnoj Hrvatskoj (n = 196). Sve analize provedene su najsvremenijim metodama, dobivene vrijednosti povezane su s podacima o ispitanicama iz anketnog upitnika i rezultati statistički obrađeni. Pušačice u odnosu na nepušačice imale su povećane koncentracije Cd i Pb u krvi majke, posteljici i krvi pupkovine, Fe i Cu u krvi pupkovine i Zn u posteljici te smanjene koncentracije Se u krvi i slobodnih –SH skupina u serumu majke dok je povećanje *MT2* u serumu majke bilo je srazmjerno intenzitetu pušenja. Nije bilo promjena koncentracijama hormona progesterona i estradiola u posteljici. U svim biološkim uzorcima koncentracije Hg i Se su pozitivno korelirale s učestalošću konzumacije ribe. Ispitanice iz priobalnog područja imale su veći unos morske hrane (>55 % ispitanica u priobalju konzumiralo je ribu barem 1 puta na tjedan, a u kontinentalnom području rjeđe ili nikada). Ispitanice u priobalju imale su veće koncentracije Fe u krvi pupkovine i Zn u posteljici te Cd i Cu u krvi majke i posteljici. Nije nađen utjecaj polimorfizma jednog nukleotida u genu *MT2A* c.-77A>G (rs28366003) na koncentracije Cd, Pb ili Hg u krvi majke niti na porođajne mase i duljine. Nepušačice s genotipom AG/GG u odnosu na genotip AA imale su smanjeno Fe u posteljici. Izvoran doprinos rada jesu rezultati koji mogu poslužiti kao temelj za istraživanja utjecaja polimorfizma *MT2A* na koncentracije toksičnih i esencijalnih elemenata i njihove moguće učinke na zdravlje u žena tijekom reproduktivnog razdoblja i njihovih potomaka u uvjetima svakodnevne izloženosti iz okoliša. Daljnja istraživanja u osjetljivim skupinama opće populacije u Hrvatskoj, kao što su parovi majke–dijete, trebala bi uključiti veliki broj ispitanika uzimajući u obzir glavne izvore unosa metala.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 138 stranica, 22 slike, 28 tablica i 251 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: genski polimorfizam *MT2A*, metalotionein, toksični i esencijalni elementi, pušenje cigareta, unos hrane morskoga podrijetla/ribe, prijenos elemenata kroz posteljicu, steroidni hormoni tijekom trudnoće

Mentori: **dr. sc. Jasna Jurasović**, *znan. savj. u trajnom zvanju, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb*

dr. sc. Tihana Žanić Grubišić, *red. prof. u trajnom zvanju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

Ocjenjivači: **dr. sc. Lada Rumora**, *red. prof., Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

dr. sc. Ivan Sabolić, *znan. savj. u trajnom zvanju, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb*

dr. sc. Sandra Stasenکو, *znan. sur., Klinička bolnica Merkur, Zagreb*

Zamjena: **dr. sc. József Petrik**, *red. prof., Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

Rad prihvaćen: 24. siječnja 2018.

BASIC DOCUMENTARY CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dissertation

THE EFFECTS OF METALOTHIONEIN 2A GENE POLYMORPHISM AND EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE ON LEVELS OF TOXIC AND ESSENTIAL METALS AT CHILDBIRTH AND STEROID HORMONES CONCENTRATIONS IN THE PLACENTA

Ankica Sekovanić

SUMMARY

In healthy postpartum women after term vaginal delivery, the combined effects of the main sources of exposure to toxic metals in general population were evaluated, i.e. cigarette smoking (for Cd and Pb) and seafood/fish consumption (for Hg), and maternal gene polymorphism *MT2A* rs2836600 on the concentrations of the main toxic metals (Cd, Pb and Hg) and essential elements (Fe, Zn, Cu and Se) in maternal blood, placenta and cord blood, on the concentrations of steroid hormones in the placenta, and on concentrations of MT2 and free –SH groups in maternal serum. Study participants from coastal Croatia with a traditional Mediterranean diet rich in fish (n = 96) were compared with subjects from continental Croatia (n = 196). All samples were analysed by state-of-the-art methods, the analytical findings connected with the data on subjects from the questionnaire and all of the results were statistically evaluated. Smokers vs. non-smokers had higher Cd and Pb in maternal blood, cord blood and placenta, Fe and Cu in cord blood and Zn in placenta and lower concentrations of Se in maternal blood and free –SH groups in maternal serum whereas an increase of maternal serum MT2 was related to smoking intensity. No changes were found in hormones progesterone and estradiol in the placenta. In all of the biological samples, the levels of Hg and Se positively correlated with the frequency of fish consumption. Subjects from the coastal area had higher seafood intake (>55 % participants from the coast consumed fish at least once a week, and continental participants less than this or never). They also had higher concentrations of Fe in cord blood, Zn in placenta and Cd and Cu in maternal blood and placenta. No impact of single nucleotide polymorphism *MT2A*, c.-77A>G (rs28366003) was found on concentrations of Cd, Pb or Hg in maternal blood or birth weight and length. Non-smokers with AG/GG vs. AA genotype had lower concentrations of Fe in placenta. The original contribution of this work are the results that may lay the foundation for studies on the impact of the single nucleotide polymorphism *MT2A* on toxic and essential element levels and their health effects under conditions of everyday environmental exposure in women during the reproductive period and their offspring. Further studies in vulnerable population groups such as mother–child pairs and in the general Croatian population should include larger numbers of subjects and representative population groups considering main sources of metal intake.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis includes: 138 pages, 22 figures, 28 tables and 251 references. Original is in Croatian language.

Keywords: gene polymorphism *MT2A*, metallothionein, toxic and essential elements, cigarette smoking, seafood/fish intake, placental element transfer, steroid hormones during pregnancy

Mentors: **Jasna Jurasović, Ph.D.**, *Permanent Scientific Advisor, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb*
Tihana Žanić Grubišić, Ph.D., *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*

Reviewers: **Lada Rumora, Ph.D.**, *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*
Ivan Sabolić, Ph.D., *Permanent Scientific Advisor, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb*
Sandra Stasenکو, Ph.D., *Research Associate, Merkur University Hospital, Zagreb*

Substitute reviewer: **József Petrik, Ph.D.**, *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*

The thesis accepted: 24th January 2018