

# Povezanost intrauterine izloženosti metil-živi s razvojem djece u dobi od 18 mjeseci

---

**Milardović, Ana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2012**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:009956>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Milardović**

**POVEZANOST INTRAUTERINE IZLOŽENOSTI METIL-ŽIVI  
S RAZVOJEM DJECE U DOBI OD 18 MJESECI**

**Doktorski rad**

**Rijeka, 2012.**

Mentori rada: Prof.dr.sc. Igor Prpić, dr.med.

Doc.dr.sc. Zdravko Špirić, dipl.ing.

Doktorski rad obranjen je dana 21. lipnja 2012. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc.Anton Sasso, dr.med.
2. Doc.dr.sc.Tamara Martinac Dorčić, prof.psih.
3. Prof.dr.sc. Vladimir Mićović, dr.med.
4. Prof.dr.sc. Igor Prpić, dr.med.
5. Doc.dr.sc. Zdravko Špirić, dipl.ing.

Rad ima 110 listova.

UDK : \_\_\_\_\_

## PREDGOVOR

Istraživanje je provedeno u Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka u suradnji s OIKON – Institutom za primijenjenu ekologiju iz Zagreba, a laboratorijske su se analize na biološkim uzorcima provele u Institutu „Jožef Štefan“ u Ljubljani (Slovenija) pod vodstvom prof.dr.sc. Milene Horvat, dipl.ing.

Navedeno istraživanje dio je međunarodnog znanstveno-istraživačkog projekta *Javnozdravstveni utjecaj dugoročne izloženosti niskoj razini mješavine elemenata na podložne skupine stanovništva (PHIME)*, broj FOOD-CT-2006-016253, kojeg financira Program Europske Unije za istraživanje i tehnološki razvoj, a čiji je glavni istraživač za Republiku Hrvatsku doc.dr.sc. Zdravko Špirić, dipl.ing., te projektnog zadatka znanstvenog projekta broj 062-0000000-3395 pod nazivom *Prospektivno praćenje neurorazvoja djece prenatalno izložene metil-živi*. Istraživanje je provedeno pod mentorstvom glavnog istraživača prof.dr.sc. Igor Prpića, dr. med., a financiralo ga je Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske

Ovim bih se putem zahvalila svima koji su mi pomogli u izradi ovog rada. Najveća hvala mojem mentoru, *prof.dr.sc. Igoru Prpiću, dr. med.* na nesebičnom prenošenju znanja te ustrajnoj podršci i stručnom usmjeravanju prilikom izrade ovog rada. Hvala mojim dragim kolegicama i kolegama čiji je doprinos u izradi ovog rada bio neprocjenjiv, prije svega *Inge Vlašić-Cicvarić, prof. psih.* i njenom vrijednom timu (*Karin Kuljanić, prof.psih., Danijeli Vuković, prof.psih., Marini Njegovan, prof.psih., Danijeli Krnić, prof.psih.*), *prim.dr.sc. Robertu Krajini, dr. med.* te kolegici i prijateljici *dr.sc. Ivi Bilić Čače, dr.med.* Zahvaljujem se i medicinskom osoblju Odsjeka rađaonice i Zavoda za neonatologiju Klinike za ginekologiju i porodništvo Kliničkog

bolničkog centra, Rijeka. Veliko hvala Francesci Valent i Jasminki Juretić na svesrdnoj pomoći pri statističkoj obradi podataka.

***Doktorski rad posvećujem svojoj obitelji, mami i tati, sestri Ivi, braći Kreši i Josipu te našem malom Janu.***

## SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Uspoređivanje motoričkih, kognitivnih i jezičnih sposobnosti djece u dobi od 18 mjeseci koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive te analiziranje razlika s obzirom na spol i koncentraciju metil-žive u krvi pupkovine. Analiziranje povezanosti veličina ciljanih struktura mozga djece u novorođenačkoj dobi s definiranim neuropsihologijskim ishodom u dobi od 18 mjeseci. Utvrđivanje povezanosti prehrambenih navika trudnica, s naglaskom na namirnice morskog porijekla, i neurorazvojnog ishoda njihove djece u dobi od 18 mjeseci. Uspoređivanje antropometrijskih mjera novorođenčadi (rodna duljina i masa, opseg glave) i analiza razlika s obzirom na spol i koncentraciju metil-žive u krvi pupkovine. Utvrđivanje utjecaja profesionalne izloženosti majki na koncentraciju ukupne metil-žive u krvi pupkovine

**Ispitanici i metode:** U istraživanje je bilo uključeno 205 trudnica i njihove djece u novorođenačkoj dobi te u dobi od 18 mjeseci. Koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine izmjerena je u 198 ispitanica, a metil žive u njih 47. U analizi rezultata koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine koristila se kao pokazatelj razine izloženosti djece metil-živi. Trećeg dana poslije poroda provedena je transfontanelarna neurosonografija kojom su se mjerile ciljane strukture mozga novorođenčadi. Mjesec dana nakon poroda majke su ispunile upitnik glede sociodemografskih uvjeta, dojenja djece, prehrambenih navika tijekom trudnoće i profesionalne izloženosti pojedinim tvarima koje sadrže živu i metil živu (boje, bifenili, amalgami itd.) tijekom proteklih 5 godina. Nakon 18 mjeseci od poroda provela se Bayley III neurorazvojna procjena 168 djece kojom su se evaluirale

motoričke, kognitivne te jezične vještine svakog djeteta. Populaciju djece podijelili smo u 4 kvartilne skupine s obzirom na koncentraciju metil-žive u krvi pupkovine te uspoređivali njihove neurorazvojne karakteristike.

**Rezultati:** Medijan (prosječna vrijednost) koncentracije ukupne žive u krvi pupkovine istraživane skupine iznosila je 2,98 ng/g uz interkvartilni raspon 1,41-5,61 ng/g. Uočena je negativna korelacija između koncentracije metil-žive u krvi pupkovine i pod-ocjene fine motorike ( $\rho = -0,22$ ,  $p = 0,01$ ). Uočeno je da djeca viših kvartila koncentracije metil-žive u krvi pupkovine imaju statistički značajno sniženje pod-ocjena fine motorike u odnosu na djecu 1. kvartile (2. kvartila - 1.24,  $p = 0,03$ ; 3. kvartila - 1.28,  $p = 0,03$ ; 4. kvartila - 1.45,  $p = 0,01$ ), dok razlike između djece 2. i 3. kvartile te 3. i 4. kvartile nisu statistički značajne. Uočena je i pozitivna korelacija između duljine malog mozga i pod-ocjene fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci ( $\rho = 0,18$ ,  $p = 0,05$ ). S porastom duljine malog mozga za 1 mm prisutan je porast od 0,1 boda pod-ocjene fine motorike. Nije nađena statistički značajna razlika koncentracija metil-žive u krvi pupkovine između muške i ženske djece promatrane kohorte ( $p = 0,38$ ). Intrauterina izloženost niskoj koncentraciji metil-žive nije kod djece u dobi od 18 mjeseci dovela do novih neurorazvojnih razlika između djece muškog i ženskog spola. Nije utvrđena korelacija između prehrambenih navika trudnica, s naglaskom na namirnice morskog porijekla, i neurorazvojnog ishoda njihove djece u dobi od 18 mjeseci. Nije dobivena statistički značajna korelacija između koncentracije metil-žive u krvi pupkovine i antropometrijskih karakteristika novorođenčadi. Nema statistički značajne razlike u koncentraciji metil-žive u krvi pupkovine majki koje su profesionalno bile izložene živinim tvarima, u odnosu na one koje to nije karakteriziralo.

**Zaključci:** U našem istraživanju je dokazano da intrauterina izloženost metil-živi je povezana s promjenama u duljini malog mozga novorođenčadi koje su povezane s promjenama u finoj motorici djece u dobi od 18 mjeseci.

**Ključne riječi:** Bayley III; krv pupkovine; metil-živa; mozak; neurorazvoj; praćenje.



## SUMMARY

### **The impact of the intrauterine exposure to methyl-mercury on development of children at age of 18 month**

**Objectives:** To compare motor, cognitive and verbal characteristics in children age 18 months that were prenatally exposed to low-level methyl-mercury, and to analyze the eventual differences in these characteristics in relation to gender and cord blood methyl-mercury concentration. To determine the correlation between particular brain structures' dimensions measured during the newborn's age and neuropsychological outcome at the age of 18 months. To determine the correlation between maternal diet, particularly sea-food consumption, and the neurodevelopmental outcome at the age of 18 months. To compare anthropometrics of the newborn's (birth length and weight, head circumference), and correlate the differences regarding the gender and cord blood methyl-mercury concentration. To determine the influence of maternal occupational exposure on cord blood methyl-mercury concentration.

**Patients and methods:** 205 pregnant women and their children (evaluated in the newborn's age and at the age of 18 months) were included in the study. Cord blood total mercury concentration has been measured in 198 of examinees, whilst the cord blood methyl-mercury concentration has been measured in 47 examinees. Cord blood total mercury concentration has been used to determine the level of prenatal exposure to methyl-mercury. On the third postnatal day brain ultrasonography has been performed to all newborns and particular brain structures' dimensions have been measured. One month after the delivery, mothers are asked to complete the questionnaire regarding socioeconomic factors, breastfeeding of their infants, dietary habits during pregnancy, and the eventual professional exposure to particular

mercury and methyl-mercury containing agents (colors, biphenyls, amalgams, etc.) during the last 5 years. Bayley III neurodevelopmental assessment of motor, cognitive and verbal skills has been conducted on 168 children. Regarding the cord blood methyl-mercury concentration, children were divided in 4 quartile groups. Their neurodevelopmental characteristics have been compared.

**Results:** The cord blood methyl-mercury concentration median and inter-quartile range was 2,98 ng/g (1,41-5,61 ng/g). There was no statistically significant difference in cord blood methyl-mercury concentrations between male and female children ( $p=0,38$ ). There was a negative correlation between cord blood methyl-mercury concentration and certain fine motor skills ( $\rho= -0,22$ ,  $p=0,01$ ). It is evident that children grouped in 2., 3., and 4. quartile have statistically significant lower fine motor skills assessment related to those grouped in 1. quartile (2. kvartila - 1.24,  $p=0,03$ ; 3. kvartila - 1.28,  $p=0,03$ ; 4. kvartila - 1.45,  $p=0,01$ ). The differences in fine motor skills assessments between children in 2. and 3., and 3. and 4. quartile are not statistically significant. There was a positive correlation between the length of cerebellum and fine motor skills in children age 18 months. ( $\rho=0,18$ ,  $p=0,05$ ). With the enlargement of length of cerebellum for 1 mm, there was an 0,1 increase of fine motor skills assessment. Prenatal exposure to low-level of methyl-mercury did not result with new differences in neurodevelopmental outcomes between genders. There was no correlation between maternal dietary habits (particularly sea-food consumption) and neurodevelopmental outcome of their children at the age of 18 months. There was no statistically significant correlation between cord blood methyl-mercury concentration and anthropometrics of the newborns. There are no statistically significant differences in cord blood methyl-mercury concentrations in mother with

occupational exposure to mercury in relation to those without the occupational exposure.

**Conclusion:** Intrauterine exposure to methyl-mercury is associated with alterations in the length of cerebellum in newborns and fine motor skills at the age of 18 months.

**Key words:** Bayley III; brain; cord blood; follow-up, methyl-mercury; neurodevelopment.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA</b> .....	1
1.1. ŽIVA – OSNOVNE KARAKTERISTIKE .....	2
1.2. IZLOŽENOST ŽIVI I METIL-ŽIVI .....	3
1.2.1. Intrauterina izloženost .....	3
1.2.2. Postnatalna izloženost .....	5
1.2.3. Profesionalna izloženost .....	6
1.2.4. Trovanja živom .....	7
1.3. RAZINE IZLOŽENOSTI METIL-ŽIVI I BIOLOŠKI UZORCI .....	8
1.4. ODGOĐENA NEUROTOKSIČNOST METIL-ŽIVE .....	9
1.4.1. Intrauterini razvoj mozga i utjecaj metil-žive .....	10
1.4.2. Postnatalni razvoj mozga i utjecaj metil-žive .....	11
1.4.3. Antropometrijske mjere novorođenčadi i utjecaj metil-žive .....	12
1.5. MEHANIZMI UTJECAJA METIL-ŽIVE NA MOZAK U RAZVOJU .....	13
1.6. EKSPERIMENTALNI MODELI NEUROTOKSIČNOSTI METIL-ŽIVE .....	14
1.7. IZLOŽENOST METIL-ŽIVI I NEURORAZVOJNA ISPITIVANJA DJECE .....	16
1.8. MJERENJA NEURORAZVOJNOG ISHODA I METIL-ŽIVA .....	18

<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	21
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	24
3.1. ISPITANICI .....	25
3.2. METODE .....	26
3.2.1. Prvi kontakt s ispitanicama .....	26
3.2.2. Uzorkovanje i analiza .....	27
3.2.3. Transfontanelarna neurosonografija novorođenčadi .....	27
3.2.4. Ispunjavanje upitnika .....	28
3.2.5. Neurorazvojna procjena djece .....	28
3.3. ZAŠTITA ISPITANIKA I ETIKA ISTRAŽIVANJA .....	30
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	31
<b>4. REZULTATI</b> .....	33
<b>5. RASPRAVA</b> .....	56
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	85
<b>7. LITERATURA</b> .....	89
<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	105

**PRIVITCI:** Upitnik prehrane namijenjen majkama.

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. ŽIVA – OSNOVNE KARAKTERISTIKE

Elementarna živa je na sobnoj temperaturi srebrnobijeli, tekući metal. Kemijska oznaka joj potječe od latinske riječi „hydrargyrum“, što znači tekuće srebro. Poznata je od antičkih vremena u kulturama Kineza i Hindusa, a nađena je i u egipatskim grobnicama od 1500 godina p.n.e. U prirodi se najčešće nalazi u obliku glavne rude, cinabarita (HgS), iz koje se dobiva metal grijanjem u struji zraka ili u prisutnosti željezne pilovine ili vapna. Živa je fluidna tekućina i ima veliku površinsku napetost pa lako formira kuglaste kapi. Loše provodi toplinu i električnu struju, a stabilna je na zraku. Ne reagira s lužinama, kao ni s većinom kiselina. Pri sobnoj temperaturi isparava vrlo polagano. Živine pare su jako toksične i udisanjem mogu dovesti do trovanja. U spojevima je živa jednovalentna ili dvovalentna, a svi njeni spojevi su otrovni, posebice metil-živa (1,2). Živa utječe na središnji živčani sustav i teratogena je (1,3). U industriji služi za punjenje barometara i termometara, za dobivanje zlata i srebra, koristi se za živine lampe, kao katalizator te herbicid, pesticid, antiseptik i deficijens. Tekuća živa otapa brojne metale stvarajući legure koje se nazivaju amalgami. Amalgam srebra se prije često koristio u stomatologiji za izradu plombi, a danas gubi na značaju (1,2,3).

Prvi je put toksički učinak žive opisan krajem 19. stoljeća kada je, nakon incidenta u kemijskom laboratoriju, Edwards opisao klinički sindrom koji se nije mogao povezati niti s jednom poznatom bolešću. Klinička slika je uključivala senzorne ispade distalnih dijelova ekstremiteta, lica, ispade vida, gluhoću, ataksiju i dizatriju.

Ključni marker izloženosti i neurotoksičnosti žive (metil-žive) jest njezina koncentracija u središnjem živčanom sustavu. U krvi i drugim tkivima ona se veže sa

sulfhidrilnim skupinama, a krvnomoždanu barijeru prolazi uz pomoć nosača aminokiselina te se akumulira u mozgu (4). Sporo napušta tijelo i prosječno joj vrijeme poluraspada u organizmu iznosi 50 dana. Iz tijela se uglavnom izlučuje stolicom i mokraćom (5).

## **1.2. IZLOŽENOST ŽIVI I METIL-ŽIVI**

Živa se zbog svoje velike gustoće klasificira kao teški metal koji se javlja u tri oblika: *elementarna živa* (poznata kao metalna živa), *anorganski spojevi žive* (prvenstveno živin-klorid) i *organska živa* (metil-živa, etil-živa). Izloženost svim navedenim oblicima žive rezultira općim i/ili specifičnim toksičnim učincima u djece i odraslih. Izloženost živi ostvaruje se u okolišu te uslijed profesionalne izloženosti. Djeca su posebno osjetljiva na trovanje živom jer ono može dovesti do oštećenja središnjeg živčanog sustava tijekom njegovog razvoja, kao i do plućnih i bubrežnih oštećenja. Izloženost metil-živi, kao najraširenijem obliku žive, ostvaruje se prvenstveno putem unosa kontaminirane hrane ribljeg porijekla. Izloženost etil-živi povezuje se također s kontroverznim dječjim cjepivima i konzervansom timerosalom. Isparavanja elementarne žive događaju se tijekom profesionalnog rada i ritualnih obreda (1,6,7). Trovanja anorganskom živom zabilježena su prilikom uporaba krema za kožu na bazi žive ili dječjih pudera za rast zuba te kao posljedica uporabe zubnih amalgama (2, 8).

### **1.2.1. Intrauterina izloženost**

Riba i druge namirnice morskog porijekla značajan su dio zdrave prehrane svakog čovjeka. Konzumacija ribe posebno je važna za prehranu trudnica jer riba sadrži visoku koncentraciju omega-3-polinezasićenih masnih kiselina te željezo i



bjelančevine koji su iznimno važni za razvoj mozga fetusa (9,10,11). Osnovni nedostatak takve prehrane u trudnica jest unos metil-žive koja u visokim koncentracijama može dovesti do razvojnih promjena nerođenog djeteta (12).

Elementarna i ionizirana živa ispuštaju se u okoliš uslijed prirodnih procesa, kao što su vulkanske erupcije, te uslijed ljudskog djelovanja poput izgaranja ugljena za dobivanje energije ili otpuštanja medicinskog i drugog otpada bogatog živom (6). Ova anorganska živa deponira se u moru i kopnenim vodama gdje se organificira procesom metilacije od strane fitoplanktona i sulfat-reducirajućih bakterija u vodenom sedimentu. Putem navedenih organizama metil-živa se lako unosi u veće vodene organizme u kojima se bioakumulira i biomagnificira. Ovaj je proces to dominantniji što je pojedini organizam viši u prehrambenom lancu. Budući da ribe imaju ograničenu sposobnost odstranjivanja metil-žive iz tijela, ona se u najvišim koncentracijama akumulira upravo u mišićima velikih i dugoživućih riba poput morskog psa, sabljarke i tune (6).

U ljudi se 90 do 100% metil-žive apsorbira putem probavnog trakta jer ovdje ona ulazi u krvotok i raspoređuje se po tijelu. U trudnica metil-živa prolazi posteljicu te se nakuplja u fetalnoj krvi i mozgu te drugim tkivima nerođenog djeteta (4,5). Živa ulazi u mozak u metiliranom obliku i kao takva se akumulira, dok se u drugim tkivima (jetra, bubrezi) demetilira i akumulira u anorganskom obliku. (4,5). U stručnoj su literaturi opisani mnogobrojni slučajevi intrauterine izloženosti metil-živi, kao i posljedice iste (13,14,15).

### **1.2.2. Postnatalna izloženost**

Zadnjih desetljeća raste svijest o porastu rizika za postnatalnu izloženost djece toksičkim metalima kao što su živa, olovo, kadmij i arsen (16). Dok se u odraslih ljudi izloženost takvim elementima u većoj mjeri odražava kao blaži poremećaj zdravlja, toksikološki utjecaji ovih elemenata na djecu znatno su teži te pogađaju središnje živčevlje u razvoju i imaju utjecaj na neurorazvoj djece (17). Trovanje metil-živom tijekom postnatalnog razvoja ostvaruje se prvenstveno putem majčinog mlijeka bogatog metil-živom te unosom namirnicama morskog porijekla (18). Za razliku od intrauterine izloženosti metil-živi koja uzrokuje difuzne promjene mozga, izloženost odraslih metil-živi češće ima za posljedicu fokalne promjene vizualnog korteksa, motornog područja te malog mozga (16,19). Rana postnatalna izloženost djece dovodi pak do patoloških nalaza na mozgu koji su bliži nalazima dobivenima kod prenatalne izloženosti, dok promjene ponašanja izrazito variraju ovisno o dobi u kojoj su djeca bila izložena (16,19). Jednako tako, kliničke slike djece koja su intrauterino bila izložena visokoj koncentraciji metil-žive pokazuju ozbiljne kognitivne i motorne deficite, konvulzije i mikrocefaliju, dok one odraslih ljudi koji su bili izloženi ovom utjecaju, bilježe promjene u obliku parestezija, oštećenja vida i ataksije koje impliciraju fokalne promjene mozga. Izloženost metil-živi tijekom ranog djetinjstva dovodi do kliničkih manifestacija koje su manje izražene, ali uključuju motorne i kognitivne deficite (20). Opisan je tek manji broj slučajeva djece koja su bila postnatalno izložena metil-živi. Među navedenim studijama još je manji broj onih koji povezuju prehranu djece namirnicama morskog porijekla s izloženošću metil-živi, kao što je to bio slučaj u Japanu, u zaljevima Minamata i Niiagata. U literaturi je također opisano tek nekoliko slučajeva klinički uočenih promjena kod djece koje su bile povezane s konzumacijom žita tretiranog metil-živom (20,21,22). Zabilježen je slučaj

obitelji koja se u Novom Meksiku hranila svinjom koja je unosila sjemenje žitarica tretiranih metil-živom. Od četvero djece u obitelji, dvoje je u dobi od 8 i 13 godina imalo ozbiljna neurološka oštećenja (kognitivne ispade, koreoatetozu, konvulzije i kvadriparezu) dok drugo dvoje u dobi od 9 i 16 godina nije imalo simptome (23).

### **1.2.3. Profesionalna izloženost**

Do profesionalnog trovanja živom dolazi udisanjem živinih para i prašine sa sadržajem žive. Ovakvo je trovanje moguće u rudnicima i topionicama živine rude, energetskim i industrijskim postrojenjima, prilikom izrade mjernog i laboratorijskog pribora, pri različitim amalgamiranjima, kao i kod proizvodnje žarulja i rasvjetnih tijela. Profesionalna trovanja živom pretežno su kroničnog tijeka, a karakteriziraju ih simptomi središnjeg živčanog sustava u obliku opće slabosti i tremora koje prate i psihičke promjene (izmjene uzbuđenja i razdražljivosti, svadljivost, gubitak kontrole nad ponašanjem) (19,24). Akutno trovanje udisanjem živinih para oštećuje dišni sustav s razvojem akutne intersticijske pneumonije, bronhitisa i bronhiolitisa. Budući da se živa izlučuje i mokraćom, ona oštećuje stanice proksimalnih zavijenih tubula s popratnom proteinurijom i nefrotskim sindromom. U žena je zabilježena veća sklonost trovanju živom, a naglašavaju se i moguće posljedice za plod u trudnica (25). Danas postoje zdravstvene preporuke prema kojima je živu, gdje god je moguće, potrebno odstraniti iz proizvodnje i zamijeniti drugim, manje toksičnim ili netoksičnim supstancama. U slučajevima gdje to nije moguće, moraju se poduzimati stroge mjere higijensko-tehničke zaštite.

#### 1.2.4. Trovanja živom

Prvi opis kongenitalnog oblika trovanja metil-živom dali su 1952. godine Englesen i Herner koji su opisali slučaj švedske obitelji koja je u svojoj prehrani koristila žito tretirano metil-živom (21). Dojenče u dobi od 9 mjeseci i njegova trudna majka hranili su se kukuruznom krupicom (palentom) od zagađenog žita. Nakon poroda drugog djeteta oboje je djece razvilo mentalnu retardaciju uz teške motoričke ispade. Majka nije imala simptoma. Ovaj je slučaj ukazao na to da je središnji živčani sustav u razvoju, uključujući fetalno doba, značajnije osjetljiv na trovanje metil-živom nego onaj u odraslih ljudi. Isti je slučaj usporedno ukazao na posljedice kako intrauterine, tako i postnatalne izloženosti metil-živi (21) .

Početak prošlog stoljeća u japanskoj regiji Minamata otvorena je tvornica kemijskih spojeva, a u proizvodnji dijela kemikalija korišteni su živini spojevi. Jedan od nusprodukata bila je i metil-živa. Otpadni produkti tvornice otpuštali su se u zaljev Minamata te je ubrzo došlo do promjene ekosustava. U periodu od 1955. do 1958. godine u toj se regiji rodilo 220 novorođenčadi od kojih je 13 razvilo teške neurološke simptome koji su kasnije definirani kao Minamata bolest (12,14). S obzirom na pojavnost tegoba u djece, ali i ostalog stanovništva koje se bavilo ribarstvom i hranilo ribom, pretpostavilo se da je najvjerojatniji uzrok ovih promjena zagađenje zaljeva teškim metalom. Ovim je spoznajama dokazana toksičnost metil-žive, a opovrgnuto je dotadašnje znanstveno uvjerenje prema kojem uteroplacentarna barijera štiti fetus od utjecaja metil-žive. Daljnja su istraživanja pokazala da se neurološki ispadi u djece mogu javiti i bez značajnijih promjena u majki. U najvećem su broju slučajeva kod djece u dobi od 6 mjeseci utvrđene nestabilnosti kontrole glave, konvulzije te nemogućnost praćenja pogledom. Kasnije su uočeni i poremećaji inteligencije,

primitivni refleksi, cerebelarni simptomi, problemi s napredovanjem na težini i nutricijom, disartrija, deformiteti ekstremiteta, hiperkineza, poremećaji fine motorike, hipersalivacija, strabizam i piramidalni simptomi. Obdukcijски nalazi dvoje djece dokazali su postojanje kongenitalnog oblika Minamata bolesti. Uočena je prisutnost generalizirane atrofije i hipoplazija kore mozga, abnormalnost citoarhitektonike, hipoplazija korpus kalozuma i dizmijelinizacija piramidnog trakta. U malom mozgu prisutna je bila i hipoplazija te degeneracija slojeva granularnih stanica (14,26). U odnosu na cerebralnu paralizu uzrokovanu drugim uzrocima, ovdje su se češće javljala značajnija odstupanja u inteligenciji, cerebelarni simptomi, strabizam te mikrocefalija. Nekoliko godina kasnije i službeno je objavljena definicija Minamata bolesti kao bolesti središnjeg živčevlja koju uzrokuje dugoročna izloženost i trovanje metil-živom putem hrane zagađene ovim teškim metalom (14,26).

Nakon velikog incidenta trovanja u Iraku 1970 - 1971.godine, pedijatar Amin-Zaki proučavao je utjecaj metil-žive kod 49 izložene djece. Na temelju osnovnih neuroloških testova u različitoj dobi Amin-Zaki uočio je promjene jezičnog i motoričkog razvoja koje su javile uslijed intrauterine izloženosti metil-živi (27). Kasniji rezultati istraživanja ukazali su da samo 1/5 doze odraslih izaziva simptome u djece (28).

### **1.3. RAZINE IZLOŽENOSTI METIL-ŽIVI I BIOLOŠKI UZORCI**

U epidemiološkim studijama koje su se bavile izloženošću metil-živi i njezinim utjecajima na razvoj djece najčešće se koristila koncentracija metil-žive u kosi majke zbog jednostavnosti uzorkovanja te mogućnosti procjene vremena izlaganja. Međutim, koncentracija žive i metil-žive u krvi pupkovine u pravilu doseže i dvostruko veću koncentraciju od one koja je prisutna u majčinoj krvi (29,30). Razlozi za to

pronađeni su u višem afinitetu fetalnog hemoglobina i fetalnih albumina za metil-živu, nižoj razini nosača aminokiselina na fetalnoj strani posteljice zbog čega se metil-živa akumulira u fetusu, visokoj propusnosti fetoplacentarne barijere za metil-živu i sl. (4, 31). Upravo iz tog razloga, posljednja istraživanja iz ovog područja ukazuju na to da se prilikom procjene mogućih učinaka žive i metil-žive na mozak u razvoju treba koristiti koncentracija metil-žive u krvi pupkovine koja je najsnažniji pokazatelj intrauterine izloženosti (32). Pretpostavlja se također da je odabir biološkog uzorka izuzetno važan u donošenju zaključaka vezanih uz odgođenu neurotoksičnost žive.

Ne postoji usuglašena definicija oko toga koja bi koncentracija ukupne žive i metil-žive u biološkim uzorcima trebala predstavljati jasnu razdjelnu crtu između koncentracije niske i visoke izloženosti. Prema zadnjim podacima iz dostupne literature, referentna doza metil-žive koja se smatra neškodljivom iznosi 1,6 µg po kilogramu tjelesne težine na dan. Ova doza odgovara koncentraciji metil-žive u kosi nešto većoj od 1 µg/g, odnosno unosu sadržaja jedne do dvije limenke tune tjedno. Na temelju dosadašnjih istraživanja i usporedbi rezultata iz više studija (meta-analiza) pretpostavlja se da količine metil-žive u krvi pupkovine manje od 0,75 µg/l (0,71 ng/g) ne izazivaju neurorazvojna odstupanja (29).

#### **1.4. ODGOĐENA NEUROTOKSIČNOST METIL-ŽIVE**

Jedna od najznačajnijih karakteristika metil-žive je odgođena neurotoksičnost. U povijesti se nerijetko dešavalo da se, unatoč karakterističnim simptomima trovanja, teško postavljala dijagnoza zbog vremena latencije u trajanju od nekoliko tjedana pa i godina prije javljanja prvih tegoba uzrokovanih izlaganjem metil-živi (33). Na animalnim i humanim modelima opisano je odgođeno neurotoksično djelovanje metil-

žive (15). Ono podrazumijeva sposobnost pojedinog čimbenika da ostvari neurotoksičnost godinama nakon prestanka same izloženosti. To se objašnjava prije svega činjenicom da se razvoj pojedine funkcije mozga događa odgođeno i/ili da postoji određena neuronska plastičnost središnjeg živčevlja koja kroz neko vrijeme kompenzira manifestacije patoloških promjena mozga (34). Odgođena neurotoksičnost metil-žive, koja ishodište ima u intrauterinoj izloženosti fetusa, odnosno prehrani, može se manifestirati poremećajima neurorazvoja novorođenčadi i djece (3,9,11,13,14,18,20). Važna spoznaja o odgođenoj neurotoksičnosti žive dobila se 1972. godine kada se na eksperimentalnim životinjama (štakorima) uočilo da su nakon izlaganja živi u ranom razvoju, odstupanja u ponašanju pokazivali puno kasnije (35). Eksperimentalni rezultati pokazali su tada po prvi puta da je mozak u razvoju osjetljiviji na izloženost metil-živi, nego što je to mozak odrasle jedinke.

#### **1.4.1. Intrauterini razvoj mozga i utjecaj metil-žive**

Neuroni se stvaraju od trenutka koncepcije do kraja druge godine života djeteta (36). Metil-živa tijekom trudnoće prelazi posteljličnu barijeru i akumulira se u tkivima fetusa. Tijekom intrauterinog i postnatalnog razvoja živčani sustav se mijenja te time biva osjetljiviji na utjecaje vanjskih faktora poput metil-žive (35). Intrauterini razvoj mozga sastoji se od nekoliko procesa: proliferacije, migracije, diferencijacije i sinaptogeneze. Tijekom procesa *proliferacije* razni antimitotski agensi mogu dovesti do njenih poremećaja kao što je to slučaj i s metil-živom (37,38). *Migracija* neurona događa se iz ventrikularne zone i germinativnih centara radijalno u neurokorteks, a tangencijalno u ostalim područjima mozga (39). Karakteristike samih stanica i vanstanični matriks te proces migracije definiraju konačni izgled diferenciranih struktura mozga. Poremećaj proliferacije utječe na proces migracije kao što i

promjene migracije modificiraju proliferaciju. Za metil-živu je u humanim i animalnim modelima dokazano da nepovoljno utječe i na migraciju i na proliferaciju (40). *Diferencijacija* nezrelih neurona predstavlja proces definiranja konačnog vanjskog izgleda stanica i njihovih budućih funkcija. Te se stanice pripremaju za migraciju u kortikalne zone te je potom moguće razlikovanje neurona od glija stanica (34). Poremećaji proliferacije i migracije mijenjaju i diferencijaciju neurona. *Sinaptogeneza* je daljnji proces u sazrijevanju živčanih struktura i sastoji se od morfoloških i kemijskih promjena membrana stanica koje sudjeluju u stvaranju same sinapse. Fiziološko-kemijska kompatibilnost pre- i post-sinaptičkih elemenata, odgovarajući vremenski faktor te isključivanje neadekvatnih veza između stanica ključni su za sazrijevanje sinaptičke veze. Metil-živa i neke druge tvari pogađaju jedan ili više navedenih faktora te time nepovoljno utječu na sinaptogenezu što je pokazalo istraživanje na novorođenčadi štakora. (34,41,42). Proces *apoptoze*, odnosno programiranje staničnih smrti važno je za kvalitetan razvoj središnjeg živčevlja jer utječe na ukupni broj stanica i njihovu povezanost. Metil-živa može modificirati i taj proces (43).

#### **1.4.2. Postnatalni razvoj mozga i utjecaj metil-žive**

Značajni porast mase mozga i opsega glave poslije poroda povezan je s anatomskim i fiziološkim promjenama koje se događaju kontinuirano od poroda do adolescencije, ali i kasnije (41,44). Svi neuroni korteksa razvijaju se iz germinativnog matriksa uz ventrikule prije poroda i potom migriraju na njihove konačne lokuse u cerebralnom korteksu prije razvijanja međusobnih veza. Neuroni cerebeluma razvijaju se poslije poroda. U vrijeme poroda dio kortikalnih neurona još uvijek migrira i mnogi još ne započinju sa sazrijevanjem ili diferencijacijom. Oni koji su dosegli svoju konačnu



poziciju još uvijek razvijaju i šire aksone i dendrite te formiraju sinapse. Daljnje sazrijevanje mozga jest kontinuiran postnatalni proces koji traje godinama nakon poroda i manifestira se razvojem nebrojenih neuronskih veza. Sinapse se počinju stvarati u trećem trimestru i razvijaju se aktivno tijekom prve dvije godine života. Maksimalan broj sinapsi postiže se u dobi od 2 godine i postepeno se reducira (do adolescencije gotovo 40%). Mijelinizacija je minimalna na porodu i nastavlja se do odrasle dobi. Brojni neurotransmiteri prezentiraju se različitim razvojem u mozgu i nekima se taj proces nastavlja poslije poroda (41). Krvnomoždana barijera poprima konačan oblik tek po porodu (16). Značajan se broj kortikalnih neurona prezentira apoptozom po porodu, ali faktori koji određuju koji će neuroni umrijeti i koje će sinapse biti zadržane su još nepoznati. Neurotoksini, uključujući metil-živu, značajno utječu na sve ove procese (45).

#### **1.4.3. Antropometrijske mjere novorođenčadi i utjecaj metil-žive**

Prehrana ribom tijekom trudnoće ima svojih negativnih i pozitivnih učinaka na novorođenče. Naime, riba sadrži veće količine polinezasićenih masnih kiselina koje su esencijalne za fetalni fizički i neurološki razvoj. Uz pogodovanje transplacentalnom protoku te samom porodu, polinezasićene masne kiseline su povezane i s fetalnim rastom te pogoduju produljenju gestacije (46). U literaturi je opisana pozitivna i negativna povezanost između prehrane namirnicama ribljeg porijekla i rodne duljine djece (47,48). U studiji Ramóna i suradnika iz 2009. godine zabilježeno je da je povišena koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine povezana sa sniženom rodnom masom te kod nešto nižih vrijednosti, i sa sniženom rodnom duljinom. Jednako tako, povećan unos tune iz limenki se povezao s većom rodnom masom i sniženim rizikom rađanja djece niske rodne mase za dob (49). U Danskoj je

skupina istraživača dokazala da prehrana trudnica bogata velikom, masnom ribom poput sabljarke i tune može dovesti do povećanog rizika rađanja djece rodne mase ispod 10. centile za dob te snižene rodne duljine (50,51). U studiji s Farskih otoka povišena koncentracija žive u krvi pupkovine povezana je s povećanjem rodne mase (52). Ipak, takvi se rezultati objašnjavaju prisutstvom većih količina različitih onečišćivača u masnom tkivu riba, a ne koncentracijama žive (50).

### **1.5. MEHANIZMI UTJECAJA METIL-ŽIVE NA MOZAK U RAZVOJU**

Pretpostavlja se da postoji nekolicina mehanizama kojima metil-živa utječe na mozak u razvoju. Ona pokreće *promjene u mikrotubulima*, uzrokuje *oksidativna oštećenja* neurona, *mijenja neuronsku i glijalnu homeostazu kalcija* i *potiče glutamatergičku neurotransmisiju* (53). Učinci promijenjenih mikrotubula na mitozu, migraciju i kortikalnu organizaciju neurona posebno su značajni intrauterino, ali se posljedice produbljuju i postnatalno (45,54,55,56). Jednim se od mogućih mehanizama toksičnosti metil-žive smatra oksidativni stres. Apoptoza i nekroza su dva osnovna oblika stanične smrti koja su opisana u živčanom sustavu. Oksidativni stres može uzrokovati oba oblika ovisno o intenzitetu i trajanju nepovoljnih zbivanja. U literaturi su opisani unutarstanični putevi aktivirani oksidativnim stresom u diferenciranih neurona kao što su cerebelarne granularne stanice i stanice moždanog debla. Intrauterina izloženost metil-živi izaziva povećanu osjetljivost neurona na utjecaje oksidativnog stresa (57). Kritična mjesta oksidativnog stresa su mitohondriji. Aktivnost kompleksa II (sukcinat-koenzim Q reduktaza) koji sudjeluje u ciklusu limunske kiseline, u mitohondrijima malog mozga značajno opada po izloženosti metil-živi dok otpuštanje citokroma C (kompleks IV) raste. Takvi rezultati sugeriraju da metil-živa uzrokuje mitohondrijsku disfunkciju neurona (58). Jednako tako se

javlja i aktiviranje raznih kinaza, stres proteina i drugih genski posredovanih staničnih oštećenja. Ova zbivanja karakteriziraju ranu fazu intoksikacije metil-živom (59).

Kemijski gledano, metil-živa ima visok afinitet za sulfhidrilnu skupinu na proteinima i glutationu. Kad se stvori kompleks s navedenim tvarima, razvijaju se anabolički procesi te se mijenja sinteza proteina (60,61,62). Inaktivacijom sulfhidrilnih enzima metil-živa može interferirati sa staničnim metabolizmom i funkcijama. Ona također katalizira stvaranje viška reaktivnih kisikovih radikala, a regionalna raspodjela njihove aktivnosti dovodi do poznatih neuropatoloških promjena (60). Uočeni su također nepovoljni učinci metil-žive na sintezu fetalnog DNA astrocita, kao i na rast neurona (63). Svi navedeni patološki procesi započinju intrauterino, ali se nastavljaju i postnatalno. Ipak, veliki broj razvojnih promjena mozga koje su bile uočene kod prenatalne izloženosti metil-živi, nisu uočene kod postanalne ili infantilne izloženosti. To uključuje prisutstvo tijela živčanih stanica u srži mozga, stupičasto grupiranje živčanih stanica u kori mozga, abnormalnu citoarhitekturu živčanih stanica u kori velikog i malog mozga, kao i displaziju neurona s oslabljenom mijelinizacijom (64).

## **1.6. EKSPERIMENTALNI MODELI NEUROTOKSIČNOSTI METIL-ŽIVE**

Prva fatalna trovanja čovjeka metil-živom potaknula su eksperimentalna istraživanja utjecaja metil-žive na životinje (štakori, psi, mačke, zečevi, majmuni). Takve studije mogu ponuditi nužnu kontrolu uvjeta, definirati mehanizme djelovanja neurotoksikanta i okarakterizirati funkcionalne posljedice izloženosti niskim dozama pojedine tvari. Osnovna prednost tih studija jest ta što se u njima kontroliraju faktori toksičnosti, uključujući prehranu i druge faktore izloženosti eksperimentalne životinje, kao i doza izloženosti, trajanje i vremenski period izloženosti.

U eksperimentima na životinjama o toksičnom utjecaju metil-žive pokazali su se simptomi jednaki onima u ljudi, kao što su progredirajuća paraliza pridružena problemima kretanja, tremor, sljepoća, poremećaji sluha (65,66). 1954. godine Hunter i Russel dokazali su također postojanje lezija mozga koje su odgovarale kliničkim manifestacijama. Toksikološka istraživanja zadnjih desetljeća bavila su se identificiranjem toksičkih mehanizama i pojedinih perioda povećane osjetljivosti mozga u razvoju (67). Provedeno je više istraživanja na mačkama i miševima u kojima se dokazalo oštećenje mozga fetusa peroralnim unosom metil-žive (68,69). Tim istraživanjima evaluirali su se i utjecaji prenatalne izloženosti niskim koncentracijama elementarne žive i metil-žive na neurobiheviornu funkciju miševa. Iz eksperimenata se dalo zaključiti da izloženost metil-živi ima značajniji utjecaj na neurobiheviornu funkciju od izloženosti elementarnoj živi (70). U jednom se istraživanju na štakorima pokušalo definirati može li oponašanje prehrane namirnicama ribljeg porijekla rezultirati primjetnim nuspojavama te mogu li povoljni nutritijenti iz ribe napraviti protutežu štetnim utjecajima metil-žive. Nakon 2 mjeseca unosa namirnica ribljeg porijekla uočili su se učinci kao što su smanjen tjelesni rast, promijenjene biheviornale karakteristike te povišena razina anksioznosti i sniženje koncentracije dopamina u hipotalamusu i striatumu (45).

Na staničnom je nivou uočeno da se tijekom produljene izloženosti niskoj koncentraciji metil-žive reduciraju natrijevi i kalcijevi ioni u membranskim kanalima kulture stanica što dovodi do poremećaja ligandima posredovanih ionskih kanala (71).

Predmet istraživanja bio je i osnovni mehanizam neurotoksičnosti živinih spojeva na različite stupnjeve razvoja miša. Rezultati otkrivaju neurobiheviornale ispade

(smanjenu lokomotornu aktivnost, oštećenje ravnoteže, slušne disfunkcije) koji koreliraju s povećanjem živine akumulacije. Smatra se da promjena lipidne peroksidacije, aktivnosti Na-K ATP-aze i nitro-oksida u moždanom tkivu doprinosi primjetnim neurobiheviornalnim disfunkcijama i slušnim oštećenjima. Ovi su nalazi dali dokaze za to da su fetusi puno osjetljiviji na utjecaje živinih spojeva, nego što je to karakteristično za odrasle jedinice (72). Jednako tako, na eksperimentalnim se modelima uspjelo radioautografijom dokazati transplacentalni prijenos metil-žive, a 1969. godine su Deshimaru i sur. dokazali i mogućnost oštećenja mozga putem prehrane majčinim mlijekom.

Morfološka proučavanja potvrdila su ozbiljna oštećenja neurona s naglaskom na degenerativne promjene granularnih i purkinjevih stanica, dok su promjene astrocita bile još izraženije u smislu da ih je bilo izrazito malo, pogotovo oko stijenki krvnih žila. Krvne žile malog mozga pokazale su nezrelu morfologiju, slabiju diferencijaciju i oslabljenu endotelijalnu funkciju te visoku permeabilnost za neke tvari. Ti nalazi potvrđuju hipotezu da bi oštećenja neurona, koja se javljaju kao posljedica izloženosti metil-živi, mogla biti sekundarna u odnosu na astrocitne promjene povezane sa smanjenom diferencijacijom i oslabljenom funkcijom krvno-moždane barijere (73,74).

## **1.7. IZLOŽENOST METIL-ŽIVI I NEURORAZVOJNA ISPITIVANJA DJECE**

Tijekom zadnjih desetljeća na desetke objavljenih radova bavilo se proučavanjem povezanosti izloženosti metil-živi putem prehrane namirnicama ribljeg porijekla i neurorazvoja djece. Ta su istraživanja bila dodatno potaknuta sumnjom da postoji ovisnost o dozi, odnosno da viša koncentracija metil-žive može dovesti do ozbiljnijih znakova bolesti.

Najveći značaj imaju radovi i istraživanja provedena na Sejšelskim i Farskim otocima na kojima prehrambene navike bogate hranom ribljeg porijekla pogoduju izloženosti trudnica i fetusa. Studija provedena na uzorku od 1022 djece s Farskih otoka zaključila je da izloženost niskim koncentracijama metil-žive tijekom intrauterinog razvoja dovodi do ispada nekoliko funkcija mozga u školske djece (smanjenje pažnje, jezika, verbalne memorije, motoričke brzine i vizualno-spacijalne funkcije) (75,76). Nasuprot tome, velika studija u Sejšelimima nije pokazala takve rezultate (77). Naime, koncentracije žive u kosi majki izmjerene 6 mjeseci nakon porodu pokazale su negativnu korelaciju s kognitivnim, percipivnim, jezičnim i auditivnim ocjenama djece u dobi od 5,5 godina. Iako je statistička analiza ukazala na to da su dvije studije bile u djelomičnom neslaganju zbog širokog raspona pouzdanosti, posljedično su se razvile značajne debate (78). Bez obzira na prividno neslaganje rezultata dviju najvećih studija, sve tri najveće studije (Farski otoci, Novi Zeland, Sejšeli) suglasne su oko toga da postoji „o dozi ovisan učinak metil-žive“ na razvoj mozga djece.

Kasnija longitudinalna istraživanja u Japanu, Poljskoj i SAD-u poduprijela su djelomično zaključke studije na Farskim otocima (79,80,81,82). U Kanadi je provedena studija na uzorku od 234 djece koja je ukazala na javljanje abnormalnih tetivnih refleksa u djece onih majki kod kojih je zabilježena povišena koncentracija žive u kosi tijekom trudnoće (83). Ovi su nalazi sugerirali da i najmanje povećanje izloženosti metil-živi u okolišu, odnosno putem prehrane namirnicama ribljeg porijekla može imati nepovoljne učinke na središnje živčevlje u razvoju. Kohortna studija provedena na Novom Zelandu potvrdila je usporen motorički i mentalni razvoj djece čije su majke imale koncentraciju žive u kosi iznad 6 µg/g (84). Studija provedena u Brazilu nije pak potvrdila vezu između odstupanja u neurorazvoju djece i njihove izloženosti metil-živi (85).

## **1.8. MJERENJA NEURORAZVOJNOG ISHODA I METIL-ŽIVA**

Dijete je nezreli organizam koji raste i razvija se, a njegove se razvojne promjene odražavaju u anatomskim, histološkim, fiziološkim, bikemijskim i psihičkim karakteristikama koje su međusobno ovisne i isprepliću se. Procjena sazrijevanja djeteta sastoji se od vrednovanja kako njegovih fizičkih osobina, tako i dinamičkog promatranja psihičkog statusa. Sazrijevanje se proučava s obzirom na vrijeme koje je potrebno da se određena karakteristika i/ili aktivnost djeteta pojavi. Unatoč individualnim razlikama koje postoje u vremenu javljanja pojedinih aktivnosti u različitim jedinki, dokazano je da postoji tendencija grupiranja oko jedne vremenske točke. Ta je točka time postala normom, odnosno ona se uzima kao relativna mjera određene grupe i ne mora odgovarati mjeri neke druge skupine (86).

Što je dijete mlađe, to je je njegov odgovor na podražaj nespecifičniji, a bez fiziološke zrelosti nema preduvjeta za pojavu bilo kojeg oblika ponašanja djeteta. Ipak, već se u ranoj dobi može procjenjivati razvoj motorike, okulomotorike, govora, društvenosti, senzomotorne inteligencije te razvoj gledanja, dok se emocionalni razvoj utvrđuje indirektno putem razvoja društvenosti. Stupanj razvoja djeteta podrazumijeva nastajanje novog obrasca ponašanja karakterističnog za određenu dob. On je manje vezan uz kronološku dob, a vrlo usko uz slijed pojedinih funkcija. Svi stupnjevi razvoja se spajaju na taj način da karakteristike jedne dobi obavezno u sebi sadrže i začetke dobi koja slijedi iza nje. Nijedan razvojni stupanj ne nastupa naglo i u svakom razlikujemo proces nastajanja i uravnoteženja (87).

U dosadašnjim se istraživanjima o intrauterinoj izloženosti metil-živi i njenom utjecaju na razvoj djece mjerenje neurorazvojnog ishoda provodilo različitim testovima. U prospektivnoj studiji provedenoj na Sejšelimima se kod djece u dobi od 6 godina

provodio „Denver Developmental Screening Test-Revised“ kojim su se mjerile osobno-socijalne karakteristike, fina motorika i adaptivne jezične karakteristike. Naknadno su rezultati testiranja dovedeni u pitanje zbog sumnje da izvođenje samog testa nije bilo standardizirano (88,89). Nekoliko godina kasnije na istoj su populaciji provedeni „Boston naming test“ i „Beery-Buktenica Developmental Test of Visual Motor Integration“ kojima su se provjeravale jezične sposobnosti i vizualno–motorički deficiti koji mogu utjecati na učenje te ponašanje djeteta. Primjenom „Bayley Scales of Infant Development „ (BSID-II) na Sejšelima je kod djece u dobi od 39 mjeseci proučavan kognitivni, motorički te jezični razvoj (89).

Prospektivna studija na Farskim otocima istraživala je 917 djece u dobi od 7 godina koja su intrauterino bila izložena metil-živi. Korišteni su „Wechsler Intelligence Scale for children“ (WISC-R) kojim se primarno vrednuje kognitivna sposobnost djeteta, „Bender Visual Motor Gestalt test“ (BVMGT) za vizualno-motoričku zrelost i „Boston Naming Test“ (BNT) za utvrđivanje jezičnih sposobnosti. Testovima su utvrđena neurorazvojna odstupanja u jeziku, pažnji i memoriji (52,75,90).

Studija pak provedena na Novom Zelandu koristila je „Denver Developmental Screening Test“ (DM) kojim se procjenjivala gruba motorika, fina motorika, jezične vještine te osobno-socijalne i vizualne karakteristike. Kontradiktorni rezultati dobiveni testiranjem naknadno su se tumačili razlikama u dobi djece te različitom etničkom pripadnošću sudionika. U dobi od 6 godina testiranja su ponovljena te su se pratili uspjesi u školi, razvoj jezika, fina i gruba motorička koordinacija, inteligencija i socijalna prilagodba (91).



U Poljskoj se pak provelo istraživanje na dojenčadi putem „Bayley Scales of Infant Development „ (BSID-II). Istraživanje je pokazalo povezanost između viših koncentracija metil-žive i nižih ocjena neuro razvoja u domeni kognicije, motorike i jezika (92).

Kod kohorte djece u SAD-u u dobi od 6 mjeseci, ocjene na „Visual Recognition Memory scores“ pokazale su pozitivnu korelaciju s unosom namirnica ribljeg porijekla u majki. No uvrštavanjem koncentracije žive u analizu, pronađena je negativna povezanost. Ponavljanjem testiranja („Peabody Picture Vocabulary test“ i „Wide Range Assessment of Visual Motor Abilities“) u dobi od 3 godine potvrđen je nepovoljan utjecaj metil-žive na jezične karakteristike djece (93). U Brazilu pak nisu nađene poveznice između izloženosti metil-živi i odstupanja u razvoju 100 djece u dobi od 6 mjeseci. Korišten je „Gesell Developmental Schedules“ (85).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Većina istraživanja opisanih u literaturi opisuje biološki utjecaj visokih/ toksičnih koncentracija žive i metil-žive koje se javljaju kao posljedice ekoloških incidenata. Istraživanja vezana uz utjecaj niskih koncentracija žive i metil-žive su rijetka, a njihovi rezultati oprečni (5,15).

Na Sejšelima, na kojima stanovništvo konzumira hranu morskog porijekla gotovo dva puta na dan, provedeno je veliko istraživanje na majkama i njihovoj djeci (15). Različitim neurorazvojnim testiranjima djece nisu dokazana neurorazvojna odstupanja kao posljedice prenatalne izloženosti niskim koncentracijama živi i metil-živi putem hrane ribljeg porijekla (15).

Rezultati oprečni prethodnima dobiveni su istraživanjima na Farskom otočju i Novom Zelandu. Ti rezultati jasno ukazuju na funkcionalna odstupanja u djece prenatalno izložene živi i metil-živi putem majčine ishrane bogate namirnicama morskog porijekla (52,75,78,90,91,94). Zbog razlika rezultata navedenih istraživanja nameće se potreba daljnjih istraživanja povezanosti intrauterine izloženosti niskim koncentracijama žive i metil-žive s postnatalnim razvojem djece, kako bi se definirali stvarni rizici neurorazvoja djece onih trudnica, čija je prehrana bila bogata namirnicama morskog porijekla, kao što je to slučaj kod majki u Jadranskom priobalju.

U dostupnoj literaturi nema podataka o povezanosti morfoloških promjena mozga detektiranih neurosonografijom s neurorazvojem djece u dobi od 18 mjeseci. Naši prethodni rezultati govore u prilog smanjenja duljine malog mozga kod koncentracije ukupne žive u kosi majki iznad 1  $\mu\text{g/g}$  i sugeriraju daljnju potrebu istraživanja

povezanosti veličina ciljanih struktura mozga u novorođenčadi i njihovih neurorazvojnih odjeka u daljnjem tijeku života (95).

Ciljevi predloženog doktorskog rada bili su:

1. Usporediti motoričke, kognitivne i jezične karakteristike djece u dobi od 18 mjeseci, prenatalno izloženih niskim koncentracijama ukupne žive i metil-žive te analizirati razlike s obzirom na spol i koncentraciju ukupne žive i metil-žive u krvi pupkovine
2. Analizirati povezanost veličina ciljanih struktura mozga novorođenčadi, intrauterino izloženih živi i metil-živi, s definiranim neuropsihologijskim ishodom
3. Utvrditi povezanost prehrambenih navika trudnica, s naglaskom na namirnice morskog porijekla, i neuropsihologijskog ishoda njihove djece u dobi od 18 mjeseci
4. Usporediti antropometrijske mjere novorođenčadi (rodna duljina i masa, opseg glave), intrauterino izloženih niskim koncentracijama ukupne žive i metil-žive, te analizirati razlike navedenih karakteristika s obzirom na koncentraciju ukupne žive i metil-žive u krvi pupkovine
5. Utvrditi utjecaj profesionalne izloženosti majki na koncentraciju ukupne žive i metil-žive u krvi pupkovine

Temeljna je pretpostavka (hipoteza) ovog doktorskog rada da prenatalna izloženost metil-živi koja dovodi do morfoloških promjena određenih struktura mozga, može utjecati i na motoričke, kognitivne i jezične vještine djece u dobi od 18 mjeseci.

### **3. ISPITANICI I METODE**

### 3.1. ISPITANICI

U istraživanje koje se provodilo od ožujka 2007. do srpnja 2010. bilo je uključeno 205 trudnica i njihova djeca u novorođenačkoj dobi te u dobi od 18 mjeseci. Proces odabira i uključivanja provodio se u Klinici za ginekologiju i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Kriteriji isključenja za trudnice u istraživanju bila su stanja i bolesti za koje se smatra da mogu nepovoljno utjecati na razvoj fetusa (kronične bolesti majke poput šećerne bolesti, hipo- i hipertireoze i sl., komplikacije u trudnoći, zlouporaba droga u trudnoći, višepodna trudnoća), obitavanje u Jadranskom priobalju kraće od dvije godine te nepoznavanje hrvatskog jezika.

Na temelju dobivenih koncentracija ukupne žive iz uzoraka krvi pupkovine (izražene u ng/g), oblikovale su se dvije promatrane skupine djece s obzirom na graničnu vrijednost od 0,71 ng/g (29). Novorođenčad i djeca u kojih je koncentracija metil-žive u pupkovini iznosila 0,71 ng/g i manje od te vrijednosti bili su uvršteni u *neizloženu skupinu*, a oni s višom koncentracijom u *izloženu skupinu*. Osim navedenog, našu smo kohortu djece podijelili i u 4 različite skupine s obzirom na koncentraciju metil-žive u krvi pupkovine. Prvu skupinu činila su djeca s koncentracijom metil-žive koja je bila manja ili jednaka vrijednosti od 1,41 ng/g, što odgovara koncentraciji metil-žive do 25. centile, uključujući i navedenu vrijednost (*1. kvartila*). Drugu skupinu činila su djeca *2. kvartile* s koncentracijama metil-žive u krvi pupkovine od 1,41 ng/g do 2,97 ng/g, zaključno s tom vrijednošću, što odgovara koncentraciji od 26. do 50. centile,. Treću skupinu činila su djeca *treće kvartile* s koncentracijama metil-žive u krvi pupkovine od 2,97 ng/g do 5,61 ng/g, zaključno s tom vrijednošću, što odgovara koncentraciji od 51. do 75. centile, uključujući i navedenu vrijednost. U posljednjoj grupi, *4. kvartili*, bila su djeca s koncentracijom metil-žive iznad 5,61 ng/g što

odgovara koncentraciji metil-žive u krvi pupkovine većoj od 75. centile naše populacije djece.

Brojčani odnos djece pripadnika svake od navedenih četiri grupa moguće je vidjeti u tablici 1.

**Tablica 1. Raspodjela brojnosti uzoraka kvartilnih grupa koncentracije metil-žive u krvi pupkovine.**

Koncentracija metil-žive u krvi pupkovine (ng/g)	Ukupno	1. kvartila ( $\leq 1,41$ )	2. kvartila ( $>1,41-2,97\leq$ )	3. kvartila ( $>2,97- 5,61\leq$ )	4. kvartila ( $> 5,61$ )
Broj uzoraka	198	48	51	50	49

Iz tablice 1. razvidan je podjednak broj uzoraka kvartilnih grupa koncentracije metil-žive u krvi pupkovine.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Prvi kontakt s ispitanicama

Prvi susret s trudnicama odvijao se u razdoblju između 27. i 32. tjedna trudnoće pri redovitom opstetričkom pregledu. Tada im se prikazala svrha, metode i ciljevi istraživanja te predočio *Informirani pristanak* i *Suglasnost za sudjelovanje* koje su one potpisale.

### **3.2.2. Uzorkovanje i analiza**

Po završetku poroda uzeti su uzorci krvi pupkovine. Uzorkovao se 1ml miješane krvi pupkovine (arterijska i venska krv). Uzorci su se prikupljali u staklenu epruvetu s crvenim čepom, volumena 5 ml (Becton Dickinson, SAD). U kliničko-biokemijskom laboratoriju KBC Rijeka uzorci su se centrifugirali, alikvotirali i pohranjivali na temperaturi od -20°C. Uzorci su se koristili za određivanje koncentracije ukupne žive i metil-žive, analizirali su se u Institutu "Jožef Štefan" u Ljubljani. Koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine određivala se metodom izgaranja, amalgamacijom i atomskom apsorpcijskom spektrometrijom uporabom analizatora za direktno određivanje žive - *Direct Mercury Analyser* (DMA-80) (EPA Method 7473, detaljan opis u Horvat M. i sur. 1998). Metil-živa u krvi pupkovine određivala se otapanjem u kiselini, ekstrakcijom pomoću otapala, etilacijom tekuće faze, izotermalnom GC i atomskom fluorescentnom spektroskopijom metodom hladne pare (*cold vapour atomic fluorescence detection* - CVAFS ).

Koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine izmjerena je u 198 ispitanica, a metil žive u njih 47. Naša prethodna istraživanja pokazala su da je koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine istovjetna koncentraciji metil-žive u krvi pupkovine naše ispitivane skupine te se u daljnjoj analizi rezultata koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine koristila kao pokazatelj razine izloženosti djece metil-živi (95).

### **3.2.3. Transfontanelarna neurosonografija novorođenčadi**

Trećeg dana poslije poroda provedena je transfontanelarna neurosonografija, a obavljao ju je isti ispitivač aparatom „ALOKA SSD 4000 SV“. U središtu našeg interesa bilo je mjerenje fossae interhemisphericae (širina fissure longitudinalis



cerebri) u frontalnom presjeku na razini foramina Monroi, duljine sulcusa lateralis lijevo u istom presjeku, širine gyrusa frontalis superiora i gyrusa cinguli u razini columnae fornicis u sagitalnom medijanom presjeku. U istom presjeku, lateralno, izmjerena je širina i duljina lijevog cortexa insulae, kao i najveća širina i visina malog mozga počevši od krova četvrte komore u sagitalnom medijanom presjeku.

#### **3.2.4. Ispunjavanje upitnika**

Mjesec i pol dana nakon poroda majke su ispunile upitnik koji je sadržavao pitanja o sociodemografskim uvjetima, dojenju djece, prehrambenim navikama tijekom trudnoće, s naglaskom na namirnice morskog porijekla, o profesionalnoj izloženosti pojedinim tvarima koje sadrže živu i metil živu (boje, bifenili, amalgami itd.) tijekom proteklih 5 godina.

#### **3.2.5. Neurorazvojna procjena djece**

Nakon 18 mjeseci od poroda provela se neurorazvojna procjena 168 djece koju su provodili kvalificirani klinički psiholozi s licencom za provedbu standardizirane razvojne skale Bayley III (96). Evaluirale su se motoričke, kognitivne te jezične vještine svakog djeteta. Za njih 145 dobili su se svi potrebni podaci za daljnju statističku obradu.

*Bayley Scales of Infant and Toddler Development* autorice Nancy Bayley danas predstavlja optimum u procjeni ranog psihomotoričkog razvoja djece u dobi 1- 42 mjeseci. Obuhvaća ispitivanje motoričkih, kognitivnih i jezičnih funkcija djece, a mjerenja sadrže serije razvojnih igara u kojima se stupanj odrađenih stavki igre pretvara u ljestvicu rezultata. Oni se uspoređuju s postavljenim normama koje

predstavljaju rezultat djeteta iste dobi urednog neuropsihološkog razvoja. Zbrajanjem pojedinačnih ocjena svake odrađene čestice testa dobiva se ukupna kognitivna, jezična i motorička ocjena kao i pod-ocjena receptivne i ekspresivne komunikacije te fine i grube motorike. Osnovni smisao primjene ovog testa je prepoznavanje djece s razvojnim odstupanjima te pružanje informacije za intervencijski plan svakog djeteta ponaosob. Treće izdanje (Bayley III) skale je revidirani oblik dotadašnje skale kojom se nastojalo poboljšati kvalitetu testa te ubrzati primjenjivost korištenih instrumenata.

### *Kognitivna skala*

Igra u ranom djetinjstvu potiče kognitivni razvoj te razvija sposobnost djeteta da razumije i simbolizira. U predškolske se djece apstraktna igra smatra pokazateljem kognitivnih sposobnosti. Jednako je tako utvrđeno da preferiranje novosti, habituacija, komparacija parova, memorija, anticipacija uzoraka i vrijeme reakcije koreliraju s kasnijim kognitivnim funkcijama. U trećem izdanju Bayley testa jezična se skala izdvojila iz kognitivne. Njome se testira pažnja za nepoznato, habituacija, memorija i svladavanje problema.

### *Jezična skala*

Receptivna i ekspresivna jezična funkcija podrazumijevaju različite sposobnosti i mogu se razvijati neovisno jedna od druge. Dijete najčešće ima jednu sposobnost razvijeniju u odnosu na drugu. Odvojena procjena jedne funkcije u odnosu na drugu korisna je za definiranje etiologije poremećaja. Bayley III test *receptivne komunikacije* procjenjuje auditivnu oštrinu zajedno sa sposobnošću odgovora na glas ispitivača te diskriminaciju i lokaliziranje zvuka. Test *ekspresivne* komunikacije podrazumijeva točke u kojima se procjenjuje sposobnost djeteta da vokalizira. Ova se sposobnost prvenstveno manifestira oponašanjem zvukova i riječi iz okoline te gestama poput

mahanja rukama na pozdrav i mljackanja usnama kao pokazatelja gladi. Stavke ekspresivne komunikacije u Bayley III testu podrazumijevaju mjerenja sposobnosti djeteta da kombinira riječi i geste.

#### *Motorička skala*

Test fine i grube motorike sadži mjerenja kvalitete pokreta, senzorne integracije, perceptivno-motoričke integracije i osnove opažanja i kretanja. Stavke *fine motorike* testa procjenjuju koordinaciju ruku i nogu te kontrolu očnih jabučica. Testom *grube motorike* dobiva se uvid u motorički razvoj na temelju procjene motoričkih vještina poput sjedenja i hodanja.

### **3.3. ZAŠTITA ISPITANIKA I ETIKA ISTRAŽIVANJA**

Prikazano istraživanje dio je znanstvenog projekta pod imenom „Prospektivno praćenje neurorazvoja djece prenatalno izložene metil-živi“, glavnog istraživača: prof. dr. sc. Igor Prpić, dr. med, pod brojem 062-0000000-3395. Istraživanje je financiralo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske. Ono je provedeno i u sklopu programa EU 6th Frame Programme – "Assessment of the health impact of metals – Sources, benefits and toxicity", projekta "Public health impact of long-term, low-level mixed element exposure in susceptible population strata – PHIME"; radnog zadatka: „Child neurodevelopment among residents in the Mediterranean coastal regions of Italy, Slovenia, Croatia and Greece: the role of environmental exposure to heavy metals". Prilikom prijave istog, zatraženo je i odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci te Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Rijeka koji su to odobrenje dali. Metodologija istraživanja ovog doktorskog rada niti u jednom segmentu nije odudarala od metodologije rada navedenog znanstvenog projekta.

Istraživanje se na ispitanicama - dobrovoljcima provelo u skladu sa svim primjenjivim smjernicama, čiji je cilj bio osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje su sudjelovale u ovom znanstvenom projektu, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 150/08 i 71/10) i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04). Identitet ispitanica je ostao anonimn, a sve su ispitanice potpisale informirani pristanak o suglasnosti sudjelovanja u studiji.

### **3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Jedan dio prikupljenih podataka upisan je u relacijsku tablicu oblikovanu pomoću računalnog programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation, SAD), a drugi dio u program za statističku obradu podataka EpiData (EpiData Software, Danska) kojim su, po završetku prikupljanja, podaci bili obrađeni. Svi su podaci pokazali odstupanje od normalne raspodjele (Kolmogorov-Smirnov test) te su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom (koncentracije ukupne žive u krvi pupkovine) te medijanom i minimumom/maksimumom (ocjene i pod-ocjene neurorazvojnog ishoda djece u dobi od 18 mjeseci). Za njihovu usporedbu i ispitivanje povezanosti upotrebljeni su neparametrijski statistički testovi.

Usporedba razlika koncentracije metil-žive u krvi pupkovine te ocjena i pod-ocjena neurorazvojnog ishoda između muške i ženske djece u dobi od 18 mjeseci dobivena je Wilcoxonovim testom. Usporedba ocjena i pod-ocjena neurorazvojnih karakteristika četiri komparativne skupine djece, definirane kvartilama koncentracije ukupne žive u krvi pupkovine, provela se Kruskal-Wallis testom.

Povezanost koncentracije metil-žive u krvi pupkovine i definiranog neurorazvojnog ishoda djece u dobi od 18 mjeseci, povezanost veličina ciljanih struktura mozga

novorođenčadi i neurorazvojnog ishoda djece u dobi od 18 mjeseci, povezanost prehrambenih navika trudnica, s naglaskom na namirnice morskog porijekla, i neurorazvojnog ishoda njihove djece u dobi od 18 mjeseci, povezanost između koncentracije metil-žive u krvi pupkovine i antropometrijskih karakteristika novorođenčadi te povezanost profesionalne izloženosti majki i koncentracije metil-žive u krvi pupkovine učinjene su pomoću Spearmanove korelacije.

Multiplom regresijskom analizom utvrđen je doprinos koncentracije metil-žive u krvi pupkovine, karakteristika majki i očeva (dob i edukacija majke, masa majke prije trudnoće, prirast na masi majke u trudnoći, visina majke i oca, paritet, pušenje i unos alkohola majke u trudnoći) socioekonomskih uvjeta (status zaposlenosti majke, stanovanje u ruralnoj sredini), prehrambenih navika (ribe, rakovi, mekušci) te spola na antropometrijske karakteristike novorođenčadi.

Istom analizom utvrđeni su doprinosi većeg broja faktora (koncentracija metil-žive u krvi pupkovine, duljina malog mozga, prehrana namirnicama morskog porijekla, dojenje djece u prvih 6 tjedana života, dob i edukacija majke, edukacija oca, pušenje i unos alkohola u trudnoći, status zaposlenosti majke i oca te ruralna sredina i paritet) na razvoj fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci.

Regresijske analize korištene su u svrhu definiranja razlika u finoj motorici između 4. skupine djece te uočavanja povezanosti duljine malog mozga i pod-ocjena fine motorike.

Statistički značajnima smatrali su se svi zaključci uz razinu  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 205 trudnica i njihove djece. Koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine izmjerena je u 198 ispitanica. U njih 47 izmjerena je i koncentracija metil-žive. S obzirom na ranije objavljene rezultate kojima je dokazano da je koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine istovjetna koncentraciji metil-žive istog uzorka, u statističkoj obradi rezultata korištena je koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine kao pokazatelj izloženosti metil-živi (95).

**Tablica 2. Koncentracija metil-žive u krvi pupkovine istraživane populacije iskazana medijanom i interkvartilnim (IK) rasponom.**

<b>Varijabla</b>	<b>Broj uzoraka</b>	<b>Medijan</b>	<b>IK raspon (25.-75. centila)</b>
<b>Koncentracija ukupne žive i metil-žive u krvi pupkovine (ng/g)</b>	198	2,98	1,41-5,61

U tablici 2. prikazana je izmjerena koncentracija metil-žive u krvi pupkovine istraživane populacije.

Usporedili smo razliku koncentracija metil-žive u krvi pupkovine s obzirom na spol te su dobiveni sljedeći rezultati (Wilcoxonov test).

**Tablica 3. Razlike koncentracija metil-žive u krvi pupkovine između dječaka i djevojčica iskazane medijanom i interkvartilnim (IK) rasponom.**

Spol	Broj uzoraka	Medijan	IK raspon (25.-75. centila)
Ženski	98	2,94	1,28 – 5,66
Muški	100	3,18	1,64 – 5,87

$p = 0,38$

Iz tablice 3. razabire se da ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama metil-žive u krvi pupkovine s obzirom na spol djece.

Neurorazvojnoum procjenom djece u dobi od 18 mjeseci dobiveni su sljedeći rezultati.

**Tablica 4. Prikaz rezultata ukupnih ocjena i pod-ocjena neurorazvojnih karakteristika djece istraživane populacije u dobi od 18 mjeseci.**

Broj ispitanika N=145	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Medijan	Minimum	Maksimum
Ukupna ocjena kognitivnih sposobnosti	107,62	13,50	105,00	60,00	145,00
Ukupna ocjena jezičnih sposobnosti	107,26	15,21	109,00	50,00	141,00
Pod-ocjena receptivne komunikacije	12,12	2,81	13,00	1,00	19,00
Pod-ocjena ekspresivne komunikacije	10,30	3,08	10,00	2,00	18,00
Ukupna ocjena motoričkih vještina	107,97	10,54	107,00	58,00	139,00
Pod-ocjena fine motorike	11,90	2,26	12,00	4,00	19,00
Pod-ocjena grube motorike	10,66	2,16	10,00	2,00	18,00



Uspoređene su neurorazvojne karakteristike (motoričke, kognitivne i jezične) između muške i ženske djece te su dobiveni sljedeći rezultati (Wilcoxonov test).

**Tablica 5. Usporedbe razlika neurorazvojnih karakteristika djece u dobi od 18 mjeseci s obzirom na spol.**

Spol	Varijabla Broj ispitanika N=145	Aritmetička Sredina	Standardna devijacija	1. kvartila	Medijan	3. kvartila
Muški	Ukupna ocjena kognitivnih sposobnosti	106,31	14,38	95,00	105,00	115,00
	Pod-ocjena receptivne komunikacije	11,82	2,93	10,00	12,00	14,00
	Pod-ocjena ekspresivne komunikacije	9,55	2,92	7,00	9,00	11,00
	Ukupna ocjena jezičnih sposobnosti	104,21	15,62	94,00	103,00	113,50
	Pod-ocjena fine motorike	11,50	2,27	10,00	11,00	13,00
	Pod-ocjena grube motorike	10,64	2,43	9,00	10,00	12,00
	Ukupna ocjena motoričkih vještina	106,65	11,26	100,00	107,00	112,00
Ženski	Ukupna ocjena kognitivnih sposobnosti	108,54	12,29	100,00	105,00	115,00
	Pod-ocjena receptivne komunikacije	12,33	2,72	10,00	13,00	14,00
	Pod-ocjena ekspresivne komunikacije	11,14	2,94	9,00	11,00	13,00
	Ukupna ocjena jezičnih sposobnosti	110,38	13,88	100,00	110,50	121,00
	Pod-ocjena fine motorike	12,29	2,26	11,00	12,00	14,00
	Pod-ocjena grube motorike	10,75	1,89	9,00	10,00	12,00
	Ukupna ocjena motoričkih vještina	109,46	9,93	103,00	108,50	112,00

5a.

Ukupna ocjena kognitivnih sposobnosti		
Spol	Medijan	Interkvartilni raspon
Muški	105	95-115
Ženski	105	100-115

$p = 0,30$

5b.

Ukupna ocjena jezičnih sposobnosti		
Spol	Medijan	Interkvartilni raspon
Muški	103	94-112
Ženski	112	100-119

$p = 0,03$

5c.

Pod-ocjena receptivne komunikacije		
Spol	Medijan	Interkvartilni raspon
Muški	12	10-14
Ženski	13	11-14

$p = 0,24$

5d.

Pod-ocjena ekspresivne komunikacije		
Spol	Medijan	Interkvartilni raspon
Muški	9	7-11
Ženski	11	9-13

$p = 0,004$

5e.

Ukupna ocjena motoričkih sposobnosti		
Spol	Medijan	Interkvartilni raspon
Muški	107	100-112
Ženski	108,50	103-113,50

$p = 0,15$

5f.

Pod-ocjena fine motorike		
Spol	Medijan	Interkvartilni raspon
Muški	11	10-13
Ženski	12	11-13

$p = 0,07$

5g.

Pod-ocjena grube motorike		
Spol	Medijan	Interkvartilni raspon
Muški	10	9-12
Ženski	10	9-12

$p = 0,56$

Usporedbom navedenih neurorazvojnih karakteristika i pripadajućih ocjena, dobivena je statistički značajna razlika između muške i ženske djece u dobi od 18 mjeseci s obzirom na sposobnosti ekspresivne komunikacije i ukupnih jezičnih sposobnosti (tablica 5b i 5d).

Daljnjom analizom povezanosti koncentracija metil-žive u krvi pupkovine i neurorazvojnog ishoda djece u dobi od 18 mjeseci dobiva se negativna korelacija između koncentracije metil-žive i pod-ocjena fine motorike (Spearmanova korelacija).

**Tablica 6. Povezanost koncentracije metil-žive u krvi pupkovine i neurorazvojnog ishoda djece u dobi od 18 mjeseci.**

		Ukupne ocjene kognitivnih sposobnosti	Ukupne ocjene jezičnih sposobnosti	Pod-ocjene receptivnih jezičnih vještina	Pod-ocjene ekspresivnih jezičnih vještina	Ukupne ocjene motorike	Pod-ocjene fine motorike	Pod-ocjene grube motorike
<b>Konc. metil-žive u krvi pupk. (ng/g)</b>	rho	-0.13	0.02	-0.04	0.08	-0.11	-0.22	0.09
	p	0.12	0.81	0.64	0.35	0.18	<b>0.01</b>	0.30
	N	135	135	135	135	135	135	135

**rho: Spearmanov koeficijent korelacije, p: statistička značajnost, N: broj ispitanika**

Iz tablice 6. razvidno je da porastom koncentracije metil-žive u krvi pupkovine dolazi do statistički značajnog pada pod-ocjena fine motorike u djece (koeficijent korelacije rho= - 0,22, p=0,01). Statistički značajna povezanost koncentracije metil-žive u krvi pupkovine s ocjenama i pod-ocjenama ostalih promatranih neurorazvojnih

karakteristika (ukupne kognitivne, jezične i motoričke vještine, pod-ocjene receptivnih i ekspresivnih jezičnih vještina te grube motorike) djece u dobi od 18 mjeseci nije dokazana.

Populaciju djece na kojoj je provedeno istraživanje podijelili smo u dvije grupe definirane prema ranije predstavljenom kriteriju (vidjeti poglavlje 3.1. *Ispitanici i metode*). Usporedbom rezultata uočili smo nesrazmjer broja članova dviju skupina (neizložena skupina No=9, izložena skupina No=189) te u cilju izvođenja kvalitetnih zaključaka *navedena statistička obrada nije učinjena*.

Iz navedenog smo razloga skupinu djece podijelili u daljnje 4 usporedive grupe na temelju koncentracija metil-žive u krvi pupkovine (vidjeti poglavlje 3.1. *Ispitanici i metode*). Usporedbom ocjena motoričkih, kognitivnih i jezičnih karakteristika četiri skupine djece dobivene su sljedeće razlike (Kruskal-Wallis test).

**Tablica 7. Usporedba neurorazvojnih razlika djece u dobi od 18 mjeseci, pripadnika kvartila koncentracije metil-žive u krvi pupkovine.**

**7a. Ukupna ocjena kognitivnih sposobnosti**

Kvartile koncentracija metil-žive u krvi pupkovine (centile) izražene u ng/g	Broj ispitanika	Medijan	Interkvartilni raspon
1. ( do 25.)	29	105	100-115
2. (26.-50.)	36	105	100-115
3. (51.-75.)	31	105	100-120
4. (iznad 75.)	39	100	95-115

$p = 0,44$

**7b. Ukupna ocjena jezičnih sposobnosti**

<b>Kvartile koncentracija metil-žive u krvi pupkovine (centile) izražene u ng/g</b>	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Medijan</b>	<b>Interkvartilni raspon</b>
1. ( do 25.)	29	103	100-118
2. (26.-50.)	36	103	94-115
3. (51.-75.)	31	109	97-118
4. (iznad 75.)	39	109	97-118

$p = 0,65$

**7c. Pod-ocjena receptivne komunikacije**

<b>Kvartile koncentracija metil-žive u krvi pupkovine (centile) izražene u ng/g</b>	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Medijan</b>	<b>Interkvartilni raspon</b>
1. ( do 25.)	29	13	11-14
2. (26.-50.)	36	12	10-13
3. (51.-75.)	31	13	10-15
4. (iznad 75.)	39	12	10-14

$p = 0,43$

**7d. Pod-ocjena ekspresivne komunikacije**

<b>Kvartile koncentracija metil-žive u krvi pupkovine (centile) izražene u ng/g</b>	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Medijan</b>	<b>Interkvartilni raspon</b>
1. ( do 25.)	29	10	8-12
2. (26.-50.)	36	10	8-12
3. (51.-75.)	31	9	8-13
4. (iznad 75.)	39	11	8-13

$p = 0,59$

7e. **Ukupna ocjena motoričkih vještina**

<b>Kvartile koncentracija metil-žive u krvi pupkovine (centile) izražene u ng/g</b>	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Medijan</b>	<b>Interkvartilni raspon</b>
1. ( do 25.)	29	110	107-115
2. (26.-50.)	36	103	100-112
3. (51.-75.)	31	107	100-115
4. (iznad 75.)	39	107	100-112

p = 0,26

7f. **Pod-ocjena fine motorike**

<b>Kvartile koncentracija metil-žive u krvi pupkovine (centile) izražene u ng/g</b>	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Medijan</b>	<b>Interkvartilni raspon</b>
1. ( do 25.)	29	13	12-14
2. (26.-50.)	36	11	10,5-13
3. (51.-75.)	31	11	11-13
4. (iznad 75.)	39	11	10-13

p = 0,04

7g. **Pod-ocjena grube motorike**

<b>Kvartile koncentracija metil-žive u krvi pupkovine (centile) izražene u ng/g</b>	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Medijan</b>	<b>Interkvartilni raspon</b>
1. ( do 25.)	29	10	9-12
2. (26.-50.)	36	10	9-11
3. (51.-75.)	31	10	9-11
4. (iznad 75.)	39	10	9-12

p = 0,65

Iz tablice 7f. razvidna je statistički značajna razlika između djece različitih kvartila koncentracije metil-žive u krvi pupkovine s obzirom na pod-ocjene fine motorike.

Post-hoc analizom navedenih razlika u finoj motorici između djece 2., 3. i 4. kvartile u usporedbi s djecom 1. kvartile, dobiva se rezultat po kojem je razvidno da pripadnici viših kvartila (2., 3. i 4.) imaju statistički značajno sniženje pod-ocjena fine motorike u odnosu na 1. kvartil (svaka kvartila u odnosu na najnižu ima prosječno sniženje pod-ocjene fine motorike za više od 1 bod - 1.24, 1.28, 1.45), kao što je prikazano u tablici 8a (linearna regresija).

**Tablica 8a. Post-hoc analiza razlika djece 2., 3. i 4. kvartile koncentracije metil-žive u krvi pupkovine u odnosu na djecu 1. kvartile s obzirom na pod-ocjene fine motorike.**

<b>Kvartile koncentracije ukupne žive u krvi pupkovine (centile)</b>	<b>B koeficijent</b>	<b>p</b>
<b>2. (26.-50.)</b>	-1.24	<b>0.03</b>
<b>3. (51.-75.)</b>	-1.28	<b>0.03</b>
<b>4. (&gt; 75.)</b>	-1.45	<b>0.01</b>

Statistički značajne razlike u pod-ocjenama fine motorike između 2. i 3. te 3. i 4. kvartile nisu nađene (tablica 8b.).

Tablica 8b. Post-hoc analiza razlika između djece 1. i 2., 2. i 3. te 3. i 4. kvartile koncentracije metil-žive u krvi pupkovine s obzirom na pod-ocjene fine motorike.

Kvartile koncentracije ukupne žive u krvi pupkovine (centile)	b koeficijent	p
2. (26.-50.)	-1.24	<b>0.03</b>
3. (51.-75.)	-0,04	0.93
4. (> 75.)	-0,16	0.76

U analizu su također bili uključeni faktori ometanja (eng. „confounder”) poznati iz dostupne literature (12,29,49,79,93) kako bi se utvrdili njihovi mogući doprinosi na pod-ocjenu fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci, intrauterino izložene niskim koncentracijama metil-žive, te su dobiveni sljedeći neurorazvojni rezultati (multipla regresijska analiza).



Tablica 9. Analiza doprinosa ciljanih faktora pod-ocjenama fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci

Varijabla	b koeficijent	p
Koncentracija metil-žive u krvi pupkovini	0,06	0,28
Duljina malog mozga	0,12	0,06
RIBA: kuhana, "na gradele", pečena	-0,06	0,85
RAKOVI: kuhani, "na gradele", pečeni	1,08	0,40
MEKUŠCI: kuhani, „na žaru”, pečeni	0,14	0,85
RIBA pržena	0,20	0,65
RAKOVI prženi	-2,98	0,06
MEKUŠCI prženi	-0,07	0,95
TUNA, SKUŠA, SARDINE U ULJU	-0,71	<b>0,05</b>
Dojenje u 1.tjednu	-0,60	0,50
Dojenje u 2.tjednu	1,77	0,08
Dojenje u 3.tjednu	-1,05	0,37
Dojenje u 4.tjednu	1,37	0,22
Dojenje u 5.tjednu	-1,76	0,10
Dojenje u 6.tjednu	0,20	0,81
Dob majke	0,06	0,40
Edukacija majke	-0,10	0,75
Edukacija oca	-0,21	0,51
Pušenje u trudnoći	-0,96	0,25
Tjedni unos alkohola u trudnoći	-0,08	0,47
Status zaposlenosti majke	-3,04	<b>0,02</b>
Status zaposlenosti oca	-0,06	0,94
Ruralna sredina	0,69	0,35
Paritet	-0,10	0,85

$R^2 = 0,27$     Korigirani  $R^2 = 0,01$      $p = 0,43$

Iz tablice je 9. razvidno da zaposlenost majke (b koeficijent -3,04,  $p=0,02$ ) te unos skuše, sardine i tune u ulju (b koeficijent -0,71 ,  $p=0,05$ ) ima negativan doprinos na pod-ocjene fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci intrauterino izložene metil-živi. Pozitivan doprinos duljine malog mozga na pod-ocjenu fine motorike pokazuje graničnu statističku značajnost (b koeficijent 0,12 ,  $p=0,058$ ) i potvrđuje već ranije naznačenu vezu između ova dva parametra. Utjecaj koncentracije metil-žive u krvi pupkovine kao kontinuirane varijable u ovoj analizi ne pokazuje statističku značajnost.

Analizom povezanosti veličina ciljanih struktura mozga novorođenčadi, koja su intrauterino bila izložena metil-živi, i definiranog neurorazvojnog ishoda, dobili su se sljedeći rezultati (Spearmanova korelacija).

Tablica 10. Korelacije veličina ciljanih struktura mozga novorođenčadi s definiranim neurorazvojnim ishodom (ukupne ocjene kognitivnih sposobnosti, pod-ocjene receptivnih i ekspresivnih jezičnih vještina te ukupne ocjene jezičnih sposobnosti, pod-ocjene fine i grube motorike te ukupna ocjena motorike).

Izmjerena dimenzija mozga / mm		Ukupne ocjene kognitivnih sposobnosti	Ukupne ocjene jezičnih sposobnosti	Pod-ocjene receptivnih jezičnih vještina	Pod-ocjene ekspresivnih jezičnih vještina	Ukupne ocjene motorike	Pod-ocjene fine motorike	Pod-ocjene grube motorike
Širina fosse interhemispherice	rho							
	p	0,17	0,18	0,19	0,14	0,19	0,16	0,13
	N	0,07	<b>0,05</b>	<b>0,04</b>	0,13	<b>0,04</b>	0,08	0,17
Duljina sulcus lateralis sin.	rho							
	p	-0,15	-0,15	-0,12	-0,13	-0,10	-0,08	-0,05
	N	0,11	0,11	0,18	0,16	0,27	0,40	0,58
Širina gyrus frontalis superior	rho							
	p	-0,14	-0,08	-0,08	-0,05	-0,19	-0,21	-0,04
	N	0,14	0,38	0,37	0,55	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	0,63
Širina gyrus cinguli	rho							
	p	0,19	0,12	0,11	0,08	0,01	0,11	-0,14
	N	<b>0,04</b>	0,19	0,23	0,38	0,93	0,21	0,14
Širina cortex insulae	rho							
	p	-0,02	-0,07	-0,06	-0,06	-0,11	-0,032	-0,15
	N	0,82	0,46	0,49	0,53	0,22	0,78	0,11
Duljina cortex insulae	rho							
	p	0,08	-0,05	0,02	-0,12	-0,10	0,03	-0,17
	N	0,40	0,56	0,83	0,19	0,27	0,76	0,06
Širina malog mozga	rho							
	p	-0,02	-0,10	-0,03	-0,13	-0,08	-0,01	-0,14
	N	0,86	0,29	0,74	0,16	0,37	0,89	0,14
Duljina malog mozga	rho							
	p	-0,01	0,02	0,004	0,01	0,08	0,18	-0,11
	N	0,92	0,87	0,96	0,89	0,37	<b>0,05</b>	0,25

rho: Spearmanov koeficijent korelacije, p: statistička značajnost, N: broj ispitanika

Iz tablice 10. razvidno je da postoji pozitivna korelacija između duljine malog mozga i pod-ocjena fine motorike ( $\rho=0,18$ ,  $p=0,05$ ) djece u dobi od 18 mjeseci, kao i između širine gyrusa cinguli i ukupne ocjene kognitivnih sposobnosti ( $\rho=0,19$ ,  $p=0,04$ ). Jednako tako, utvrđena je negativna korelacija između širine gyrus frontalis superior i pod-ocjena fine motorike ( $\rho= - 0,31$ ,  $p=0,02$ ) kao i ukupnih ocjena motorike ( $\rho= -0,19$ ,  $p=0,03$ ). Također, rezultati ukazuju na pozitivnu korelaciju između širine fosse interhemispherice i pod-ocjena receptivnih jezičnih vještina ( $\rho=0,19$ ,  $p=0,04$ ), kao i ukupnih jezičnih sposobnosti ( $\rho=0,18$ ,  $p=0,05$ ) te ukupnih ocjena motorike ( $\rho=0,19$ ,  $p=0,04$ ).

S obzirom na ranije objavljene rezultate našeg istraživanja kojima je dokazano postojanje statistički značajnog smanjenja duljine malog mozga između intrauterino *neizložene* skupine djece (novorođenčad majki s koncentracijama metil-žive u kosi < 1000 ng/g) i *izložene* (novorođenčad majki s koncentracijama metil-žive u kosi  $\geq$  1000 ng/g) skupine djece, učinili smo daljnju regresijsku analizu povezanosti duljine malog mozga kao kontinuirane, nezavisne varijable s pod-ocjenama fine motorike (95). Dobiven je rezultat koji ukazuje na mogućnost da za svaki mm uvećanja duljine malog mozga novorođenčadi može biti prisutan porast od 0,11 bodova pod-ocjene fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci (tablica 11.).

**Tablica 11. Povezanost duljine malog mozga i pod-ocjena fine motorike.**

	beta koeficijent	Standardna pogreška	t
Duljina malog mozga/mm	0,11	0,05	2,04

**p = 0,04**

Tablica 11. pokazuje da kod djece koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive, za svaki mm duljine malog mozga dolazi do porasta pod-  
ocjene fine motorike od 0,11 boda (beta koeficijent 0,11,  $p=0,04$ ).

Povezanost prehrambenih navika trudnica, s naglaskom na namirnice morskog porijekla, i neurorazvojnog ishoda njihove djece u dobi od 18 mjeseci prikazani su u tablici 12 (Spearmanova korelacija).

**Tablica 12. Povezanost prehrambenih navika trudnica i neurorazvojnog ishoda njihove djece.**

Pojedinačni obroci računati od 150 g		Ukupne ocjene kognitivnih sposobnosti	Ukupne ocjene jezičnih sposobnosti	Pod-ocjene receptivnih jezičnih vještina	Pod-ocjene ekspresivnih jezičnih vještina	Ukupne ocjene motorike	Pod-ocjene fine motorike	Pod-ocjene grube motorike
<b>RIBA: kuhana, "na gradele", pečena</b>	rho	0,03	0,14	0,14	0,13	-0,01	-0,04	0,05
	p	0,72	0,10	0,12	0,12	0,93	0,66	0,57
	N	136	136	136	136	136	136	136
<b>RAKOVI: kuhani, "na gradele", pečeni</b>	rho	0,089	0,004	-0,02	0,038	0,03	0,02	0,05
	p	0,31	0,96	0,86	0,67	0,75	0,78	0,58
	N	133	133	133	133	133	133	133
<b>MEKUŠCI: kuhani, „na žaru”, pečeni</b>	rho	0,10	0,13	0,09	0,15	0,001	-0,11	0,09
	p	0,27	0,12	0,32	0,09	0,99	0,19	0,33
	N	135	135	135	135	135	135	135
<b>RIBA pržena</b>	rho	0,06	0,07	0,02	0,10	-0,009	0,001	0,03
	p	0,51	0,44	0,78	0,23	0,91	0,99	0,71
	N	135	135	135	135	135	135	135
<b>RAKOVI prženi</b>	rho	-0,05	-0,01	-0,03	0,03	0,05	0,05	-0,01
	p	0,54	0,88	0,78	0,73	0,58	0,54	0,90
	N	129	129	129	129	129	129	129
<b>MEKUŠCI prženi</b>	rho	0,05	0,07	0,07	0,07	0,05	0,08	0,003
	p	0,54	0,42	0,42	0,42	0,59	0,35	0,97
	N	131	131	131	131	131	131	131
<b>TUNA, SKUŠA, SARDINE U ULJU</b>	rho	0,07	0,07	0,03	0,10	-0,11	-0,06	-0,05
	p	0,44	0,40	0,73	0,24	0,21	0,47	0,57
	N	131	131	131	131	131	131	131

**rho: Spearmanov koeficijent korelacije, p: statistička značajnost, N: broj ispitanika**

Iz tablice 12. razvidno je da ne postoji statistički značajna korelacija između prehrambenih navika trudnica, s naglaskom na namirnice morskog porijekla, i neurorazvojnog ishoda njihove djece u dobi od 18 mjeseci.

Uspoređivanjem antropometrijskih mjera (rodna duljina i masa, opseg glave) novorođenčadi, koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive, te analizom razlika navedenih karakteristika s obzirom na koncentraciju metil-žive u krvi pupkovine, uočeno je da nema statistički značajne korelacije između koncentracije metil-žive u krvi pupkovine i antropometrijskih karakteristika novorođenčadi što je moguće vidjeti u tablici 13 (Spearmanova korelacija).

**Tablica 13. Povezanost antropometrijskih karakteristika (rodne mase, rodne duljine i opsega glave) s koncentracijom metil-žive u krvi pupkovine.**

Antropometrijska karakteristika	Koncentracija metil-žive u krvi pupkovine	
Rodna masa	Rho	-0,03
	p	0,71
	N	188
Rodna duljina	Rho	-0,009
	p	0,90
	N	189
Opseg glave	Rho	-0,10
	p	0,16
	N	192

**rho: Spearmanov koeficijent korelacije, p: statistička značajnost, N: broj ispitanika**

Upotrebom multiple regresijske analize i utvrđivanjem doprinosa većeg broja faktora na antropometrijske karakteristike dobiveni su sljedeći rezultati (tablica 14., 15. i 16.).

Tablica 14. Doprinos koncentracije metil-žive u krvi pupkovine, karakteristika majki, očeva, socioekonomskih obilježja i spola na rodnu masu novorođenčadi.

RODNA MASA	b koeficijent	p
Koncentracija metil-žive u krvi pupkovine	-10,38	0,28
Dob majke	32,77	<b>0,002</b>
Edukacija majke	-28,80	0,52
Masa majke prije trudnoće	6,80	<b>0,03</b>
Prirast na masi majke u trudnoći	22,38	<b>0,001</b>
Paritet	-4,61	0,95
Status zaposlenosti majke	9,43	0,95
Visina majke	13,63	0,07
Visina oca	6,69	0,23
Stanovanje u ruralnoj sredini	109,87	0,29
Pušenje u trudnoći	58,43	0,63
Alkohol u trudnoći	6,40	0,70
RIBA: kuhana, "na gradele", pečena	-44,76	0,40
RAKOVI: kuhani, "na gradele", pečeni	158,41	0,41
MEKUŠCI: kuhani, „na žaru”, pečeni	67,14	0,61
RIBA pržena	54,65	0,37
RAKOVI prženi	-98,25	0,68
MEKUŠCI prženi	-146,18	0,38
TUNA, SKUŠA, SARDINE U ULJU	66,00	0,28
Ženski spol	-202,13	<b>0,01</b>

$R^2 = 0,31$     Korigirani  $R^2 = 0,17$      $p = 0,004$

Iz tablice 14. razvidno je da postoji pozitivan doprinos dobi majke (b koeficijent 32,77,  $p=0,002$ ), mase majke prije trudnoće (b koeficijent 6,80,  $p=0,03$  kao i prirasta na



masi majke u trudnoći (b koeficijent 22,38,  $p=0,001$ ) na rodnu masu novorođenčadi, kao i negativan doprinos ženskog spola novorođenčadi (b koeficijent -202,13,  $p=0,01$ ).

Tablica 15. Doprinos koncentracije metil-žive u krvi pupkovine, karakteristika majki, očeva, socioekonomskih obilježja i spola na rodnu duljinu novorođenčadi.

RODNA DULJINA	b koeficijent	p
Koncentracija metil-žive u krvi pupkovine	-0,04	0,46
Dob majke	0,12	<b>0,03</b>
Edukacija majke	0,02	0,94
Masa majke prije trudnoće	0,03	<b>0,04</b>
Prirast na masi majke u trudnoći	0,07	0,06
Paritet	0,29	0,51
Status zaposlenosti majke	-0,35	0,63
Visina majke	0,11	<b>0,01</b>
Visina oca	0,05	0,09
Stanovanje u ruralnoj sredini	0,95	0,09
Pušenje u trudnoći	-0,54	0,41
Alkohol u trudnoći	-0,06	0,51
RIBA: kuhana, „na gradele”, pečena	0,12	0,67
RAKOVI: kuhani, „na gradele”, pečeni	0,89	0,38
MEKUŠCI: kuhani, „na žaru”, pečeni	0,22	0,73
RIBA pržena	0,05	0,87
RAKOVI prženi	-0,60	0,62
MEKUŠCI prženi	-0,89	0,31
TUNA, SKUŠA, SARDINE U ULJU	0,40	0,21
Ženski spol	-0,97	<b>0,02</b>

$R^2 = 0,28$     Korigirani  $R^2 = 0,13$      $p = 0,02$

Iz tablice 15. razvidno je da postoji pozitivan doprinos dobi (b koeficijent 0,12,  $p=0,03$ ), visine majke (b koeficijent 0,11,  $p=0,01$ ) te mase majke prije trudnoće (b

koeficijent 0,03, p=0,04) na rodnu duljinu novorođenčadi, kao i negativan doprinos ženskog spola novorođenčadi (b koeficijent -0,97, p=0,02).

**Tablica 16. Doprinos koncentracije metil-žive u krvi pupkovine, karakteristika majki, očeva, sociodemografskih obilježja i spola na opseg glave novorođenčadi.**

<b>OPSEG GLAVE</b>	<b>b koeficijent</b>	<b>p</b>
Koncentracija metil-žive u krvi pupkovine	-0,54	0,06
Dob majke	0,05	0,07
Edukacija majke	0,02	0,85
Masa majke prije trudnoće	0,02	<b>0,01</b>
Prirast na masi majke u trudnoći	0,04	<b>0,03</b>
Paritet	0,12	0,62
Status zaposlenosti majke	0,44	0,27
Visina majke	0,02	0,30
Visina oca	-0,002	0,90
Stanovanje u ruralnoj sredini	0,21	0,48
Pušenje u trudnoći	0,16	0,65
Alkohol u trudnoći	0,07	0,13
RIBA: kuhana, "na gradele", pečena	-0,06	0,71
RAKOVI: kuhani, "na gradele", pečeni	0,23	0,68
MEKUŠCI: kuhani, „na žaru”, pečeni	-0,34	0,32
RIBA pržena	0,05	0,78
RAKOVI prženi	-0,38	0,57
MEKUŠCI prženi	0,41	0,39
TUNA, SKUŠA, SARDINE U ULJU	-0,08	0,67
Ženski spol	-0,58	<b>0,01</b>

$R^2 = 0,28$     Korigirani  $R^2 = 0,13$      $p = 0,007$

Iz tablice 16. razvidan je pozitivan doprinos mase majke prije trudnoće (b koeficijent 0,02,  $p=0,01$ ) i prirasta na masi majke tijekom trudnoće (b koeficijent 0,04,  $p=0,03$ ) na opseg glave novorođenčadi, kao i negativni doprinos ženskog spola novorođenčeta (b koeficijent -0,58,  $p=0,01$ ) na istu karakteristiku. Koncentracija metil-žive negativno doprinosi opsegu glave novorođenčadi s graničnom statističkom značajnosti (b koeficijent -0,54,  $p=0,06$ ).

Utvrđivanjem povezanosti profesionalne izloženosti majki i koncentracije ukupne žive u krvi pupkovine nisu dobiveni rezultati koji bi pokazali statistički značajne razlike u koncentraciji ukupne žive između majki čiji su odgovori u upitniku upućivali na profesionalnu izloženost živi i živinim tvarima u usporedbi s onim majkama koje to nije karakteriziralo.

## 5. RASPRAVA

Prehrana namirnicama morskog porijekla i posljedična izloženost metil-živi uobičajena je širom svijeta. FAO (The Food and Agriculture Organization of the United Nations) procjenjuje da milijarda ljudi na Zemlji ovisi o svakodnevnoj prehrani namirnicama ribljeg porijekla (97). S gledišta javnog zdravstva važno je znati dovodi li i ako da, u kojoj mjeri, intrauterina izloženost metil-živi putem namirnica ribljeg porijekla do neurorazvojnih posljedica koje se mogu manifestirati u djece. Usprkos niskoj razini žive u Jadranskom priobalju, prehrambene navike ljudi, bogate namirnicama morskog porijekla, predisponiraju izloženost trudnica i djece te time navedeno područje čine zanimljivim za proučavanje neurorazvojnih ishoda djece nakon intrauterine izloženosti metil-živi.

Različita istraživanja provedena proteklih desetljeća rezultirala su mnogobrojnim spoznajama o utjecaju metil-žive na živi svijet. Od 1980. godine do danas objavljeno je oko 1500 publikacija na ovu temu, čime je metil-živa postala jedan od zagađivača kojeg prati najbogatija toksikološka dokumentacija. Razlozi velikog zanimanja znanstvenika za živu leže prije svega u tome što živa nije široko rasprostranjen element, već je na područjima gdje se javlja u pravilu prisutna u višim koncentracijama, čime se stvaraju preduvjeti za ostvarivanje njenog nepovoljnog djelovanja (98). Prva opažanja o trovanju metil-živom dogodila su se unazad 150 godina i to uslijed neopreznog rukovanja živom u eksperimentalnoj praksi. Činjenica je ipak da su mnoga trovanja radnika, tijekom procesa proizvodnje u raznim tvornicama, i dugo nakon tog vremena ostala neprepoznata (99). Sve navedeno doprinijelo je kasnom spoznavanju karakterističnih simptoma trovanja metil-živom u odraslih. Prvi su toksični učinci metil-žive na razvoj djece opisani 1952. godine i naknadno potvrđeni na nalazima iz zaljeva Minamata, u kojem su djeca bila

intrauterino izložena metil-živi putem majčine prehrane namirnicama morskog porijekla (14,100). Djeca su zbog središnjeg živčanog sustava u razvoju pokazivala drugačije simptome i doprinijela tome da se još dugo razmišlja o „sve ili ništa“ fenomenu, a ne o „dozi ovisnom učinku“ ovog toksina. Prvi eksperimenti na životinjama objavljeni su 1972. godine, a prve prospektivne studije o intrauterinoj toksičnosti putem kontaminirane hrane morskog porijekla, provedene na djeci, objavljene su 1986. godine (35,101). Ipak, prve međunarodne preporuke glede intrauterine izloženosti metil-živi predstavljene su tek nedavne 2003. godine, što dodatno ukazuje na složenost navedene problematike. Jednako je tako i prepoznavanje kontaminacije unutar prehrambenog lanca i definicija okolišne bioakumulacije metil-žive predstavljena tek unazad nekoliko godina (103,104,105).

Istraživanja provedena zadnjih 30 godina pokazala su oprečne rezultate o učincima intrauterine izloženosti metil-žive na razvoj djece. Neke su studije potvrdile nepovoljni utjecaj, dok su druge to negirale. Značajne razlike u dizajnu studija i biološkim uzorcima pogodovala su odudaranju, kao i prisutstvo drugih toksikanata u konzumiranoj ribi (npr. poliklorirani bifenili). Regulatorne agencije definirale su granične unose žive i metil-žive na temelju rezultata studija provedenih na Sejšelimima, Farskim otocima i Novom Zelandu. Više je razloga bilo da upravo Sejšeli budu odabrani za provođenje velike prospektivne studije intrauterinog utjecaja metil-žive na neurorazvoj djece. Naime, preko 80% žena na Sejšelimima svakodnevno jede ribu te na tom području nema veće industrije koja bi pogodovala zagađenju morskih organizama. Tijekom 10 godina istraživanja nisu zabilježeni klinički značajni utjecaji intrauterine niti postnatalne izloženosti metil-živi na neurorazvoj djece. Smatra se da bi ti rezultati mogli biti odraz nutritivne vrijednosti dnevnog unosa ribe kao i

neadekvatne statističke prilagodbe faktorima ometanja prisutnih u ribi. Na Farskim otocima su u kohortnom istraživanju, provedenom na uzorku od preko 1000 djece, dobiveni rezultati koji su ukazali na to da majčina prehrana, bogata ribom tijekom trudnoće, pogoduje promjenama mozga koje se mogu odraziti kao neurorazvojni deficiti. Na Novom Zelandu su se potvrdili rezultati s Farskih otoka. Naknadno je potvrđeno da ribe na Farskim otocima i Novom Zelandu sadrže značajno više koncentracije metil-žive (1,6 µg/g i 2,2 µg/g naspram 0,3 µg/g) nego ribe na Sejšelimima. Osim toga, raspravlja se i o mogućnosti konkomitantne izloženosti drugim neurotoksikantima kao uzroku navedenih neslaganja. Važnu razliku između istraživanja činio je i odabir tkiva za analizu intrauterine izloženosti metil-živi. Naime, na Sejšelimima i Novom Zelandu korištena je kosa majke kao biološki uzorak, dok su na Farskim otocima istraživači odabrali krv pupkovine. Razlike su postojale također u odabiru i izvršenju testova kojima se mjeri neurorazvojni ishod, izboru krajnjih točaka (eng. „end point“) i dobi testiranja djece, što je moglo pogodovati neslaganju rezultata (102).

Medijan koncentracije metil-žive u krvi pupkovine naše populacije iznosi *2,98 ng/g uz interkvartilni raspon 1,41 - 5,61 ng/g* (tablica 2). Usporedbe radi, u istraživanju na Farskim otocima medijan koncentracije metil-žive u krvi pupkovine iznosio je 22,9 µg/l (jednako 21,68 ng/g) uz interkvartilni raspon 13,4 – 41,3 µg/l (jednako 12,69 – 40,0 ng/g). Po dosad prikupljenim analizama koncentracija ukupne žive i metil-žive u biološkim uzorcima trudnica Jadranskog priobalja te na temelju usporedbe s rezultatima koncentracija istovjetnih uzoraka iz nekoliko najvećih istraživanja o utjecaju metil-žive na neurorazvoj djece, može se zaključiti da *Jadransko priobalje spada u područja niske razine izloženosti*. Nismo utvrdili razlike koncentracija metil-



žive u krvi pupkovine između novorođenčadi muškog i ženskog spola (medijan koncentracije u dječaka iznosio je 3,18 ng/g uz interkvartilni raspon 1,64 – 5,78 ng/g, a kod djevojčica 2,94 ng/g uz interkvartilni raspon 1,28 – 5,66 ng/g uz  $p=0,38$ ) te možemo zaključiti da se *intrauterina izloženost metil-živi ne mijenja u ovisnosti o spolu djeteta* (tablica 3). Usporedbom neurorazvojnih karakteristika (kognitivnih, jezičnih i motoričkih vještina) i pripadajućih ocjena s obzirom na spol, u našem je istraživanju dobivena statistički značajna razlika između muške i ženske djece u dobi od 18 mjeseci, s obzirom na sposobnosti ekspresivne komunikacije i ukupnih jezičnih vještina. Navedeni podaci dio su već široko poznatih činjenica o razlikama između dječaka i djevojčica te dobi. Po našem istraživanju *intrauterina izloženost niskoj koncentraciji metil-žive ne dovodi do novih razlika* (tablica 5).

*U našem istraživanju korištena je koncentracija ukupne žive u krvi pupkovine kao pokazatelj intrauterine izloženosti fetusa metil-živi.* U prospektivnim su studijama za analizu koncentracija metil-žive, kao indikatora intrauterine izloženosti fetusa, korišteni biološki uzorci: kosa majke, krv pupkovine, krv majke i tkivo pupkovine. Kosa majke je najučestalije korišten uzorak zbog jednostavnosti uzorkovanja te mogućnosti praćenja dinamike izlaganja (106). Negativnu stranu ovog uzorka predstavlja činjenica da se koncentracija metil-žive može mijenjati s obzirom na kvalitetu kose, boju kose te tretiranjem kose vanjskim kontaminantima poput boja za kosu (102,107). Koncentracija metil-žive u krvi majke dugo se smatrala primjerenim indikatorom apsorbirane doze, ali se pokazalo da je i ona podložna promjenama (108). Suho tkivo pupkovine pokazalo se pak preciznijim markerom nego ono mokro, ali danas se smatra da je krv pupkovine najbolji raspoloživi indikator intrauterine izloženosti metil-živi.

Naši rezultati idu u prilog *negativnoj korelaciji između koncentracije metil-žive u krvi pupkovine i pod-ocjena fine motorike* ( $\rho = -0,22$ ,  $p = 0,01$ ), odnosno ukazuju na to da povećanjem koncentracije metil-žive u krvi pupkovine dolazi do statistički značajnog smanjenja pod-ocjene fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive (tablica 6). Ukupne ocjene kognitivnih sposobnosti ( $\rho = -0,13$ ,  $p = 0,12$ ), kao i pod-ocjene receptivnih jezičnih vještina ( $\rho = -0,04$ ,  $p = 0,64$ ) pokazuju također negativnu korelaciju, ali ne i statistički značajnu (tablica 6). Ukupne ocjene jezičnih sposobnosti ( $\rho = 0,02$ ,  $p = 0,81$ ), pod-ocjene ekspresivnih jezičnih vještina ( $\rho = 0,08$ ,  $p = 0,35$ ) kao i pod-ocjene grube motorike ( $\rho = 0,09$ ,  $p = 0,30$ ) u pozitivnoj su korelaciji s koncentracijom metil-žive u krvi pupkovine, ali isto tako ne statistički značajnoj (tablica 6).

Iako nije sporno da izloženost višim koncentracijama metil-žive dovodi do neurorazvojnih deficita, prag metil-žive koji će do njih dovesti nije jasno definiran. Jednom se velikom meta-analizom pokušalo sustavno definirati najniže koncentracije metil-žive u biološkim uzorcima koja su dovele do neurorazvojnih rizika fetusa, a bile unijete putem prehrane majki namirnicama morskog porijekla. U navedenu studiju bila su uključena sva istraživanja u kojima se razmatra odnos između neurorazvojnog ishoda djece i izloženosti metil-živi putem prehrane trudnica. U navedenim su istraživanjima morale postojati komparacijske skupine, a isključni kriteriji su bili: neprikazivanje koncentracija žive, izostanak intrauterine izloženosti, nedefiniranje konzumacije namirnica morskog porijekla kao dominantnog načina izlaganja živi te nedostupnost podataka i jezična barijera (članci pisani na ne-engleskom jeziku). 48 studija je zadovoljilo kriterije, a od toga je 30 bilo longitudinalnih, a 18 presječnih. Rezultati su, između ostalog, ukazali na najniže vrijednosti koncentracija ukupne žive

kod kojih su uočene nuspojave u djece: 0,3 µg/g u majčinoj kosi, 0,75 µg/l u krvi pupkovine te 3,8 µg/l u krvi majke (29).

„Cut off“ naših dviju usporedivih grupa iznosio je 0,75 µg/l, što je jednako vrijednosti od 0,71 ng/g metil-žive u krvi pupkovine (vidjeti u poglavlju 3.1. *Ispitanici i metode*). S obzirom na već spomenute vrijednosti koncentracija metil-žive u krvi pupkovine naše populacije, ova se vrijednost nije pokazala primjerenom jer je broj ispitanika dviju grupa bio nesrazmjern (neizložena skupina No=9, izložena skupina No=189). Iskoristili smo kvartilne raspodjele koncentracije ukupne žive u krvi pupkovine kao razdjelne vrijednosti te smo uspoređivali neurorazvojne karakteristike među ispitanicima 4 navedene grupe (tablica 1).

Usporedbom 2., 3. i 4. kvartile koncentracije metil-žive u krvi pupkovine s 1. kvartilom dobiva se rezultat po kojem je razvidno da *pripadnici viših kvartila (2., 3. i 4.) imaju statistički značajno sniženje pod-ocjena fine motorike u odnosu na 1. kvartilu* (tablica 7f). Svaka kvartila koncentracije metil-žive u krvi pupkovine ima u odnosu na 1. kvartilu prosječno sniženje pod-ocjene fine motorike za više od 1 boda (2. kvartila - b koeficijent - 1.24, p=0,03; 3.kvartila - b koeficijent 1.28, p=0,03; 4.kvartila – b koeficijent 1.45, p=0,01) što je moguće vidjeti u tablici 8a. Statistički značajne razlike u pod-ocjenama fine motorike između 2. i 3. te 3. i 4. kvartile nisu nađene te je moguće govoriti o prisutstvu izvjesnog „plato“ efekta na prijelazu iz 1. u 2. kvartilu (tablica 8b). To se eventualno može obrazložiti performansama fine motorike već ranije spomenutih devetoro djece svrstane u 1. kvartilu čije su koncentracije metil-žive u krvi pupkovine bile niže ili jednake vrijednosti od 0,71 ng/g. Naime, ta se koncentracija metil-žive iz poznate literature izdvaja kao ona vrijednost

ispod koje nisu zamijećena neurorazvojna odstupanja djece i može se pretpostaviti da su upravo ta djeca postigla najbolje rezultate u navedenoj domeni fine motorike i stvorila statistički značajnu razliku koja se ne pojavljuje kod uspoređivanja djece 2. i 3. te 3. i 4. kvartile. Ovakav rezultat svakako traži dodatna istraživanja i drugih potencijalnih faktora koji bi mogli pogodovati navedenim razlikama. *Statistički značajne razlike između djece različitih kvartila u domeni ostalih neurorazvojnih sposobnosti (kognitivne, jezične – ekspresivne i receptivne, motoričke – gruba motorika) nisu nađene.*

Raniji rezultati naših istraživanja ukazuju na postojanje statistički značajne razlike u duljini malog mozga između *neizložene* skupine djece (novorođenčad majki s koncentracijama metil-žive u kosi < 1000 ng/g) i *izložene* skupine djece (novorođenčad majki s koncentracijama metil-žive u kosi  $\geq$  1000 ng/g). *Osnovna hipoteza ovog istraživanja sastoji se u tome da prenatalna izloženost živi i metil-živi, koja dovodi do morfoloških promjena određenih struktura mozga, može utjecati i na motoričke, kognitivne i jezične vještine djece u dobi od 18 mjeseci (95).* S obzirom na sve navedeno te na već ranije spomenute rezultate ovog istraživanja (tablica 6, tablica 7f), posebna pažnja istraživanja je usmjerena upravo na spoznavanje veze navedenih promjena malog mozga i razvoja fine motorike u djece koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive.

Našim je istraživanjem utvrđena *pozitivna korelacija između duljine malog mozga i pod-ocjena fine motorike ( $\rho=0,18$ ,  $p=0,05$ ) djece u dobi od 18 mjeseci*, kao i između širine gyrusa cinguli i ukupne ocjene kognitivnih sposobnosti ( $\rho=0,19$ ,

p=0,04). Jednako tako, utvrđena je negativna korelacija između širine gyrus frontalis superior i pod-ocjena fine motorike ( $\rho = -0,19$ ,  $p=0,03$ ) te ukupnih ocjena motorike ( $\rho = -0,21$ ,  $p=0,02$ ). Također, rezultati ukazuju na pozitivnu korelaciju između širine fosse interhemispherice i pod-ocjena receptivnih jezičnih vještina ( $\rho=0,19$ ,  $p=0,04$ ) kao i ukupnih jezičnih sposobnosti ( $\rho=0,18$ ,  $p=0,05$ ) te ukupnih ocjena motorike ( $\rho=0,19$ ,  $p=0,04$ ). Navedeno je moguće vidjeti u tablici 10.

U okviru našeg istraživanja proveli smo daljnju analizu odnosa duljine malog mozga, kao kontinuirane, nezavisne varijable, i pod-ocjena fine motorike. Došli smo do rezultata koji potvrđuju direktnu vezu dviju veličina i to na način da je *prosječan porast od 0,11 bodova pod-ocjene fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci prisutan za svaki milimetar uvećanja duljine malog mozga novorođenčadi koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive* (tablica 10). Zaključno je moguće reći da intrauterina izloženost metil-živi negativno doprinosi razvoju fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci koja je u izravnoj vezi s egzaktnim smanjenjem duljine malog mozga novorođenčadi, što predstavlja *značajan znanstveni doprinos*. Nameće se dakako potreba daljnjih istraživanja kako navedene veze tako i povezanosti ostalih ciljanih struktura mozga s odgovarajućim neurorazvojnim ishodom i nikako se ne može zaključiti da će djeca s manjom vrijednosti duljine malog mozga u novorođenačkoj dobi nužno imati slabije performance fine motorike u dobi od 18 mjeseci. Naime, potvrđivanje uočenih promjena svakako može imati kliničku primjenu u smislu definiranja transfontanelarne neurosonografije kao eventualnog probira novorođenčadi kojom bi se uočene promjene veličina ciljanih struktura mozga definirale kao pokazatelji neurorazvojnog rizika djece. Time bi se samo nametnula potreba sustavnijeg neurorazvojnog praćenja navedene djece.

Upotrebom multivarijantne regresije pokušali smo u analizu utjecaja intrauterine izloženosti metil-živi na finu motoriku djece u dobi od 18 mjeseci, uvažiti iz literature poznate faktore ometanja navedenog odnosa (tablica 9). Uvrštene su *prehrambene navike* trudnica, *socioekonomski uvjeti* (dob majke, edukacija majke i oca, status zaposlenosti majke i oca, stanovanje u ruralnoj sredini te paritet), *dojenje u prvih 6 tjedana života djeteta*, *pušenje i unos alkohola majke tijekom trudnoće* kao i nama posebno zanimljiva *duljina malog mozga*. *Zaposlenost majke* ( $b$  koeficijent  $-3,04$ ,  $p=0,02$ ) te *unos skuše, sardine i tune u ulju* ( $b$  koeficijent  $-0,71$ ,  $p=0,05$ ) imaju negativan doprinos na pod-ocjene fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci intrauterino izložene metil-živi. Za pretpostaviti je da majka koja nije zaposlena provodi veći dio vremena uz dijete te igrom i drugim poticajima unaprijeđuje razvoj fine motorike djeteta. Utvrđen je i *pozitivan doprinos duljine malog mozga na pod-ocjenu fine motorike uz graničnu statističku značajnost* ( $b$  koeficijent  $0,12$ ,  $p=0,058$ ) čime se potvrđuje već ranije naznačena vezu između ova dva parametra. Razlozi povezanosti granične statističke značajnosti mogli bi se potražiti u međusobnom učinku okolnih varijabli koje eventualno mi nismo mjerili. Sve navedeno nameće potrebu daljnjih istraživanja, kako upotrebom magnetne rezonance u verificiranju finijih promjena malog mozga, tako i raščlanjivanje svih mogućih faktora koji pogoduju i ometaju razvoj fine motorike u djece koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive, kako bi se dosegli konačni zaključci o povezanosti intrauterine izloženosti metil-živi s razvojem djece.

Uspoređivanjem antropometrijskih mjera novorođenčadi (rodna duljina i masa, opseg glave), koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive, te analizom razlika navedenih karakteristika s obzirom na koncentraciju metil-žive u krvi

pupkovine, uočeno je da nema statistički značajne korelacije između koncentracije metil-žive u krvi pupkovine i antropometrijskih karakteristika novorođenčadi (tablica 13). Razlike s obzirom na spol, dobivene u našem istraživanju, u skladu su s poznatim činjenicama o razlikama rodne mase, rodne duljine i opsega glave te idu prilog muške novorođenčadi. *Može se zaključiti da intrauterina izloženost niskim koncentracijama metil-žive nije dovela do novih razlika u antropometrijskim karakteristikama muške i ženske novorođenčadi.*

Daljnjom upotrebom multiple regresijske analize i utvrđivanjem doprinosa *karakteristika majki* (dob, masa prije trudnoće, prirast na masi u trudnoći, visina, pušenje u trudnoći, unos alkohola u trudnoći), *karakteristika oca* (visina), *socioekonomskih uvjeta* (stanovanje u ruralnoj sredini, edukacija majke, status zaposlenosti majke i oca, paritet, ), *prehrambenih navika s naglaskom na namirnice morskog porijekla* ( ribe, rakovi, mekušci) te *spola* na antropometrijske karakteristike novorođenčadi intrauterino izložene metil-živi, dobivaju se rezultati iz kojih je razvidno da *postoji pozitivan doprinos dobi majke (b koeficijent 32,77, p=0,002), mase majke prije trudnoće (b koeficijent 6,80, p=0,03), kao i prirasta na masi majke u trudnoći (b koeficijent 22,38, p=0,001) na rodnu masu novorođenčadi, kao i negativan doprinos ženskog spola novorođenčadi (b koeficijent -202,13, p=0,01) -* tablica 14. Jednako tako, potvrđen je *pozitivan doprinos dobi majke (b koeficijent 0,12, p=0,03), visine majke (b koeficijent 0,11, p=0,01) te mase majke prije trudnoće (b koeficijent 0,03, p=0,04) na rodnu duljinu novorođenčadi, kao i negativan doprinos ženskog spola novorođenčeta (b koeficijent 0,97, p=0,02) -* tablica 15. *Opsegu glave novorođenčeta pozitivno doprinosi masa majke prije trudnoće (b koeficijent 0,02, p=0,01) i prirast na masi majke tijekom trudnoće (b koeficijent 0,04, p=0,03), dok mu*

*negativno doprinosi ženski spol (b koeficijent -0,58, p=0,01) - tablica 16.* Naime, realno je za očekivati da trudnice starije dobi tijekom trudnoće više miruju, vjerojatno prekomjernije unose hranjive tvari i time vjerojatno pogoduju porastu svoje mase, ali indirektno i rađanju „veće“ novorođenčadi (rodna masa, rodna duljina, opseg glave). Jasno je i da genska osnova mase i visine majke jednako tako u većoj mjeri predisponira slične karakteristike u njihove novorođenčadi, što znači da će majke veće visine i težine češće rađati veću djecu. Ženska novorođenčad je u pravilu manje rodne mase i manje rodne duljine u odnosu na mušku.

*Istraživanjem nije utvrđena statistički značajna povezanost profesionalne izloženosti tvarima koje sadrže živu kod majki naše kohorte i koncentracije ukupne žive i metil-žive u krvi pupkovine njihove novorođenčadi.* Razloge bi valjalo tražiti u tome da se današnja profesionalna regulativa o izloženosti pojedinim tvarima, pa i živi, sve strože provodi, kao i u tome da se živine tvari, upravo zbog svoje iznimne toksičnosti, polako gube iz proizvodnje. Isto tako, uzorkovanje krvi pupkovine naše kohorte provedeno je po porodu, a za pretpostaviti je da su majke već neko vrijeme prije poroda izbivale sa svojeg radnog mjesta te omogućile izlučivanje dijela žive i živinih tvari iz svojeg tijela. Nadalje, već ranije je u ovom doktorskom radu spomenuto da je gotovo cjelokupna živa koja je prisutna u krvi pupkovine organska, a profesionalna izloženost se u pravilu odvija putem anorganske žive i ne bi trebala značajnije mijenjati koncentraciju ukupne žive u krvi pupkovine.

Mali mozak odgovoran je za ravnotežu, koordinaciju i finu motoriku. Od nedavno je prepoznata i njegova uloga u visokoorganiziranim funkcijama kao što su kognicija, jezik i ponašanje. Poznate studije su nedavno opisale funkcionalnu topografiju zrelog cerebeluma uz pomoć mediolateralne osovine te su mali mozak podjelile na 7



mediolateralnih zona, tri u svakoj hemisferi uz jednu vermisa. Sasvim je malo istraživanja proučavalo vezu između dijelova cerebelarnog volumena, mjerenih magnetnom rezonancijom, i razvojnih oštećenja. Primjerice, u djece s cerebelarnim malformacijama sniženje ukupnog cerebelarnog volumena je bilo povezano s oštećenjima ukupnog razvoja, ekspresivne komunikacije, kognicije, kao i fine te grube motorike. Jednako tako promjene pojedinih dijelova malog mozga povezane su s točno određenim oštećenjima navedenih funkcija. Ovi rezultati ukazuju na važnost strukturalne topografije i volumena malog mozga za funkcionalni ishod u djece što potvrđuje i naše istraživanje (109). U budućnosti bi te karakteristike mogle imati utjecaja na prognozu kao i na ranu razvojnu intervenciju.

Središnji živčani sustav u razvoju podložan je utjecaju metil-žive, i to ponajviše mali mozak koji se čini najosjetljivijim (110,111). U studiji u Japanu reevaluiralo se 30 patoloških i biokemijskih nalaza autopsije mozga povezanih s Minamata bolesti. U najtežih oblika promijenjenog mozga uočene su multiple vakuole različitih veličina dominantno zastupljene u cerebelarnom korteksu (112). Proučavala se također regionalna prokrvljenost različitih dijelova mozga u pacijenata. Uočena je značajna razlika u regionalnoj prokrvljenosti različitih dijelova cerebeluma, ali ne i ostatka mozga. Protok krvi kroz inferiorne dijelove malog mozga bio je dodatno niži u odnosu na ostale, čak i kod pacijenata bez cerebelarne atrofije (113). Metil-živa izaziva značajnu cerebelarnu dizmorfogenezu tijekom razvoja jedinke. Patološke promjene karakterizira potpuna arhitektonska disrupcija neurona (114). Dugoročna perinatalna izloženost niskim dozama metil-žive povezana je s neurološkim i motornim ispadima koje se javljaju kao posljedice cerebelarne disfunkcije. Neuropatološke studije sugeriraju da su ti ispadi u štakora povezani s oštećenjem migracije granularnih

stanica malog mozga (eng. „cerebellar granule cell – CGC“). *In vivo* i *in vitro* neuronske migracije pokazale su oštećenja tijekom akutne i/ili visoko dozne izloženosti metil-živi, dok mikromolarne i submikromolarne promjene još nisu razjašnjene. CGC stanice su u eksperimentu rane postnatalne izloženosti pokazale neuspješnu inicijaciju migracije iz vanjskog germinativnog sloja stanica i to već na početku same migracije. Ovi učinci su se dogodili bez promjena kortikalne strukture malog mozga te bez gubitka vijabilnosti granularnih stanica (115). Studije s faktorima rasta impliciraju da promjene njihovih koncentracija mogu trajno poremetiti stanični broj i u konačnici utjecati na veličinu organa. Jednako tako, toksikant iz okoliša može poremetiti razvoj mozga na razini sinteze DNA, kao i na razini staničnih lanaca neuronskih prekursora. Proučavani su hipokampus i cerebellum novorođenčeta štakora, dvije regije s postnatalnom neurogenezom, i uočene promjene (116).

Dugo se smatralo da će se potpuni uvid u razvoj ljudskog mozga dobiti kad se strukturne promjene mozga povežu s razvojem motoričkih, perceptivnih i kognitivnih sposobnosti (117). Zbog posebnosti dječje populacije veći dio spoznaja o navedenim funkcijama njihovog mozga proizlazi iz opažajnih istraživanja (86,87). Do mnogih se spoznaja još nije došlo, ali se značajni napredak u istraživanjima dogodio kad se shvatilo da dijete može biti aktivni sudionik samog procesa istraživanja kao što se to događa u neurorazvojnim testiranjima. Kao pokazatelj diferencijacije neuroanatomskog razvoja koristi se vrijeme u kojem se očekuje da će pojedino područje mozga, posebice kore mozga, postati funkcionalno. Prisutstvo nove aktivnosti pripisuje se sazrijevanju pojedinih moždanih regija. Ovo shvaćanje ipak ne uspijeva objasniti sve aspekte ljudskog funkcioniranja. Neki dokazi ukazuju na to da se pojedine regije mozga intrauterino razvijaju najsporije po *neuroanatomskom*

*principu*, ali u isto vrijeme postaju aktivne ubrzo nakon rođenja. Funkcionalnom magnetskom rezonancom uočeno je da tijekom pojedine prijelazne faze u razvoju ponašanja djeteta veći broj kortikalnih i subkortikalnih područja mozga mijenja svoju aktivnost. To se događa puno češće nego što pojedino područje mozga iz inaktivnog stanja prelazi u aktivno pa se iz toga može zaključiti da je za razvoj mozga dominantno odgovorno sazrijevanje *unutarregionalnih veza* (118,119). Alternativni pogled sugerira da je za postnatalni funkcionalni razvoj mozga odgovorna *međuregionalna interakcija*, odnosno da sazrijevanje pojedine funkcije ovisi o obrascima same regije, ali i o povezanosti s drugim regijama (116). Tijekom razvoja interakcije između dijelova mozga poboljšavaju funkcije pojedinih regija mozga tako da ograničavaju djelovanje druge regije. Tako će početak novog djelovanja pojedine regije tijekom djetinjstva biti povezan s promjenama aktivnosti nekoliko drugih regija, a ne samo jedne. Ovime se definira razlika ovoga pristupa u odnosu na češće zastupanu teoriju *maturacije*, pri čemu se naglašava da tijekom djetinjstva obrasci kortikalne aktivacije mogu biti opsežniji nego oni u odraslih. Iz toga se da zaključiti da uspješnu aktivnost nad istim zadatkom u djece i odraslih mogu podržati različiti uzorci kortikalne aktivacije. Nedavni dokazi ukazuju da isto ponašanje u odraslih i djece mogu podržati različite strukture i putevi te da postoje dinamičke promjene kortikalne obrade podražaja tijekom razvoja. Potvrđeno je također da međuregionalna interakcija pomaže oblikovanje unutarregionalnih povezivanja, tako da nekoliko regija podržava razvoj pojedinih kognitivnih i perceptivnih funkcija. Do danas još nije poznato kako metil-živa utječe na unutarregionalno i međuregionalno povezivanje dijelova mozga u postnatalnom razvoju, ali se zna da ona modificira više neuronskih puteva koji sudjeluju u tom međudjelovanju (120).

U našem istraživanju smo koristili „Bayley Scales of Infant and Toddler Development“ za procjenu neurorazvojnih karakteristika djece u dobi od 18 mjeseci koja su bila intrauterino izložena niskim koncentracijama metil-žive. Bayley skala procjene obuhvaća serije razvojnih igara u kojima se stupanj odrađenih stavki igre pretvara u ljestvicu rezultata. Oni se uspoređuju s postavljenim normama funkcija djece iste dobi urednog neurorazvoja. Zbrajanjem pojedinačnih ocjena dobiva se ukupna kognitivna, jezična i motorička ocjena kao i pod-ocjena receptivne i ekspresivne komunikacije te fine i grube motorike. Osnovne mane ovog testa su subjektivnost, razlike u rezultatima djece u ovisnosti o dijelu godine i dana kada se provodi, jezična barijera te trajanje testiranja (oko 1h).

Alati korišteni za mjerenje ishoda svakog istraživanja morali bi biti osjetljivi, specifični i neovisni o načinu provođenja i okruženju u kojem se istraživanje provodi. Većina je istraživanja o utjecajima izloženosti metil-živi koristila neurorazvojne testove od kojih su neki osjetljiviji na posljedice neurotoksičnosti žive, dok su drugi kvalitetnijih psihometrijskih svojstava. Kako bi se u što ranijoj razvojnoj dobi detektirale neurotoksične promjene, primjena neurorazvojnih testova mora biti standardiziranog izvođenja i samim time imati veću ovisnost o samom ispituvaču. To ponekad znači da rezultati mogu ovisiti o promjenama situacije tijekom ispitivanja, kao i o ulozi interpretatora te eventualno i kulturi u kojoj se ispitivanje provodi izvan izvornog okruženja gdje je test nastao. Tradicionalno su istraživanja o utjecajima metil-žive koristila standardne testove inteligencije (npr. WISC-Wechsler Intelligence Scale for Children). Oni nisu bili najpogodniji za istraživanje neurotoksičnosti metil-žive zbog važnosti uloge interpretora u nekim dijelovima testiranja. Primjena neurobiheviornalne procjene (Farski otoci) odražava funkcionalne promjene (pažnju, motoričku brzinu,

verbalnu memoriju) i najvjerojatnije ukazuje na posljedice izloženosti metil-živi središnjeg živčanog sustava u razvoju (102). The Bayley Scales of Infant and Toddler Development danas predstavlja standard u procjeni ranog neurorazvoja djece u dobi 1- 42 mjeseci i smatra se ponajboljim alatom za navedenu procjenu. Od najznačajnijih prospektivnih studija, Bayley test je korišten u istraživanju na Sejšelima te u Poljskoj. U našem istraživanju je korišten Bayley test III izdanje.

Prvi pokušaji znanstvenog pristupa u procjeni neurorazvojnih karakteristika djece pojavili su se krajem 19. stoljeća putem dječjih biografija. Pisali su ih najčešće školovani roditelji koji su bilježili longitudinalna promatranja razvoja svoje djece kroz nekoliko mjeseci ili godina. Bila su detaljna i po unaprijed definiranom planu, ali su se zaključci izvodili na temelju promatranja samo jednog djeteta te su bili izuzetno subjektivni. Krajem 19. stoljeća Hall je u proučavanju razvoja djece uveo metodu upitnika kojeg su ispunjavali roditelji, što je omogućilo dobivanje velikog broja podataka u relativno kratko vrijeme. Osnovna mana ovog pristupa bila je također subjektivnost. Početkom 20. stoljeća Simon i Binet su uočili da samo djeca određene dobi mogu riješiti neke od postavljenih zadataka te su na osnovi rezultata postavili standarde za sve uzraste školske dobi. Prva slična ispitivanja dojenčadi i male djece započeo je Kuhlman u drugom desetljeću 20. stoljeća, no njegovi rezultati nisu bili prihvaćeni jer su se zasnivali na usporedbama djece urednog razvoja s onom koja su imali razvojne poteškoće. Unaprijeđen oblik navedenog ispitivanja iznio je Gesell koji je nastojao upoznati razvoj ponašanja zdrave male djece te je na temelju toga odredio normative razvoja. Ponašanje zdrave dojenčadi i male djece je razvrstao u četiri skupine: motoriku, govor, okulomotoriku i društvenost. Na toj je osnovi *Bayley* sredinom istog stoljeća izradila ljestvicu za ispitivanje razvoja psihomotorike u male

djece, a Griffiths test za ispitivanje vještina dojenčadi. 30-ih godina prošlog stoljeća u Europi su Bühler i Hetzer objavili bečki „Kleinkindertest“ koji služi za ispitivanje razvoja djece u dobi od 1 do 72 mjeseca i koji se razlikuje od Gesselovog po tome što osim originalnih zadataka uvodi i kvantitativnu analizu rezultata i to definiranjem kvocijenta psihičkog razvoja ispitivane djece.

Pod *razvojem motorike* u djece se podrazumijeva sve veća sposobnost svrhovitog i skladnog korištenja vlastitog tijela za kretanje te korištenje predmeta. Razvoj motorike se može pratiti kroz više faza koje su vidljive u usavršavanju držanja tijela (posturalne kontrole), kretanja (lokomocije) i baratanja predmetima (manipulacije). U dojenčeta se uočavaju refleksni i stereotipni pokreti. Refleksi su automatske reakcije na određene podražaje (npr. žmirkanje, sisanje, zijevanje i sl.), a stereotipni pokreti nisu reakcija na vanjski podražaj, niti imaju jasnu svrhu (npr. mahanje, ljuljanje i sl.). Oko četvrtog mjeseca navedene pokrete zamijenjuju sve više slični, ali voljni pokreti. Motorički razvoj događa se određenim slijedom u skladu s razvojnim načelima. Upravljanje voljnim pokretima prvotno započinje kontrolom pokreta glave i vrata pa postupno preko voljnih pokreta rukama napreduje do voljnih pokreta nogama (cefalokaudalno načelo). Drugi smjer razvoja kontrole voljnih pokreta je od sredine trupa prema ekstremitetima, odnosno dijete najprije kontrolira i upravlja pokretima ruku iz ramena, kasnije pokretima iz lakta i konačno pokretima šake i prstiju (proksimodistalno načelo). Prema Kroghu u prvoj i drugoj godini razvijaju se rudimentarna ponašanja koja uključuju osnovne voljne aktivnosti: pokretanje glave i gornjeg dijela trupa, prevrtanje, sjedenje, puzanje, stajanje i hodanje. Te motoričke vještine pojavljuju se u sve zdrave djece upravo tim redoslijedom i u predvidivoj dobi. Razlog je tome slijed i tempo razvoja živčanog i mišićno-koštanog sustava. U tom

ranom periodu života na razvoj motorike prvenstveno utječe neurološko sazrijevanje te proces učenja neće imati učinka prije nego je dijete sazrelo, a razvoj motorike i razvoj spoznaje će se uzajamno podržavati. Navedene rane motoričke aktivnosti čine temelj za razvoj osnovnih pokreta i prirodnih oblika kretanja koji se javljaju između druge i sedme godine života, a Vasta i suradnici ih dijele u tri skupine: kretanje (npr. hodanje, trčanje, skakanje i sl.), održavanje ravnoteže (npr. dizanje glave, savijanje, kotrljanje i sl.) te baratanje predmetima (npr. bacanje, hvatanje, udaranje i sl.). Osnovni pokreti temelj su motoričkih vještina i pojavljuju se po pravilu u sve djece, a njihovo daljnje usavršavanje nastavlja se u školskoj dobi kad postaju temelj za sportske vještine. *Dijete do dobi 18 mjeseci sjedi i stoji te hoda samostalno, penje se stepenicama uz pomoć, spušta se iz stojećeg u sjedeći položaj, prikladno drži olovku, šara po papiru, gradi toranj od kocaka (121).*

*Kognitivni razvoj* odnosi se na mentalne procese pomoću kojih dijete pokušava razumjeti i sebi prilagoditi svijet koji ga okružuje. Glavni procesi pri tome jesu postupno razvijanje unutarnjih zamjena (upotreba simbola, reprezentacija) za osobe i predmete i postupno razvijanje misaonih procesa (usporedba, analiza, sinteza, apstrahiranje i sl.). Jednostavne zamjene za predmete i pojave u okolini (motoričke i slikovne sheme) dijete stječe od šestog mjeseca nadalje, a od kraja druge do šeste godine najviše se služi zamjenama riječ-slika. Misaone operacije kao što su usporedba, analiza i apstrahiranje dijete stječe oko šeste godine, a to će mu omogućiti postupni razvoj najsavršenijih zamjena za stvarnost: pojmova (riječ-pojam). Pojam je zamjena za predmet ili pojavu koja nije slika tog predmeta i nije mu slična. On sadrži u sebi sve predmete koje imaju bitno zajedničko svojstvo. Spoznajni razvoj događa se postupnim ovladavanjem sve složenijim zamjenama za stvarnost

(shemama i pojmovima) i misaonim operacijama. Taj se razvoj zbiva uz nužnu djetetovu aktivnu interakciju s okolinom posredovanu djetetovim iskustvom i osiguranjem uvjeta za razvoj pažnje i misaonih strategija. *Dijete u dobi od 18 mjesec istražuje predmete, traži skriveni predmet, započinje sa zapamćenim ponašanjem, oponaša ponašanje iz okoline i sl. (121).*

Govor je viša psihička aktivnost čovjeka koja mu omogućuje da pomoću sustava znakova i simbola priopćava svoja znanja, osjećaje, potrebe i mišljenje drugim ljudima. Osnovni simboli u ljudskom govoru su riječi, a njegova osnovna najvažnija funkcija je komunikacija. Govor se razvija sustavno i predvidivim redoslijedom, a realizira se u interakciji djeteta i njegova socijalnog okruženja. Prema Lennenbergu kritični period u kojem djeca započinju govoriti nalazi se u rasponu 18-24 mjeseci poslije rođenja, a period od druge godine do puberteta smatra se osjetljivim razdobljem za razvoj govora kad ja najvažnije da dijete ima adekvatnu socijalnu stimulaciju. Govorni razvoj se može pratiti preko dva osnovna razdoblja: *preverbalno* koje je prisutno od rođenja do prve smislene riječi/rečenice te *verbalno* kojeg karakterizira vremenski period od prve smislene riječi/rečenice do automatizacije govora. U prva dva mjeseca života dojenče se glasa krikom, plačem i nekim fiziološkim zvukovima. Prvo glasanje je spontano, refleksno i odraz je fiziološkog stanja djeteta. Ono u sebi nema komunikacijske usmjerenosti, ali ga okolina počinje brzo shvaćati. Tijekom drugog mjeseca dijete počinje spontano proizvoditi jednostavne vokalne zvukove, artikulacijski neodređene, ali artikuliranije od prethodnih. Time iz *faze kričanja* dojenče prelazi u fazu *gukanja*. U dobi od šest mjeseci započinje *faza slogovanja* u kojoj je produkcija glasova sve više voljna i njome dojenče sve više oponaša glasove iz svoje okoline i sve se više okreće prema



njoj. U dobi od devet i deset mjeseci dojenče sve više ponavlja glasove materinskog jezika, a s približavanjem dobi od jedne godine započinje slaganje glasova koji nalikuju artikuliranim riječima. Prve riječi nastaju između dvanaestog i osamnaestog mjeseca i time počinje *verbalno razdoblje*. Prve riječi su obično dvosložne, a po vrsti riječi su imenice te po sadržaju mogu činiti cijele iskaze uz mijenjanje značenja u ovisnosti o situaciji u kojoj su upotrijebljene. Potkraj druge godine dijete oblikuje svoju prvu rečenicu, najčešće složenu od dvije riječi. Od pojave prve rečenice počinje savladavanje gramatike i naglo napredovanje u razvoju govora. Već s oko tri i pol godine dijete u govoru koristi sve vrste riječi, rečenica se sastoji od tri i više riječi, dobro vlada osnovnim govornim disanjem i primijenjuje glavninu gramatičkih pravila te je moguće reći da je svladalo osnovu materinskog jezika. *Dijete od 18 mjeseci izgovara prve riječi-imenice, oponaša intonaciju iz okoline, pojednostavljuje zvukovne kombinacije radi boljeg izgovora, započinje prihvaćati gramatička pravila, zadržava se kraće vrijeme na zadanoj temi i sl. (121).*

U *opažajnim istraživanjima* (u kojima nema znanstvene intervencije), kao što je slučaj kod našeg istraživanja, prisutnost faktora ometanja (eng. „confounding factor“) može iskriviti pravu vezu između izloženosti i toksičnih učinaka pojedine tvari (12). Faktor ometanja se može odražavati i na izloženost i na ishod i ne predstavlja međustupanj uzročne veze između ove dvije varijable. Najčešće se događa da toksikant i faktor ometanja djeluju u istom smjeru (eng. „positive confounding“), no u slučaju metil-žive i prehrane namirnicama morskog porijekla, povezanost između dobrobiti i rizika je klasičan oblik negativne sprege (eng. „negative confounding“). Naime, prehrana namirnicama morskog porijekla bogata je blagotvornim nutritijentima koji mogu maskirati toksičnost metil-žive. Osnovna mana velikog broja prospektivnih studija o

utjecajima izloženosti metil-živi sastoji se upravo u zanemarivanju potencijalnih faktora ometanja, kao što je prehrana namirnicama morskog porijekla, odnosno polinezasićene masne kiseline, selen, željezo, jod i vitamin E u njoj. Ovo može djelomično objasniti i neslaganje rezultata dviju najvećih studija provedenih na Sejšelskim i Farskim otocima koje su proučavale utjecaje metil-žive na djecu i odrasle. Pri dizajniranju studije i statističkoj analizi valja prije svega voditi računa o tome da se uvaži prisutnost poznatih „confoundera“ odnosno da se anticipira postojanje i, koliko je to moguće, ograniči njihov utjecaj na rezultate. Naime, u modeliranju ishoda izuzetno je važno uključiti *faktor prehrane*, a ne samo izloženost živi, kao što je to učinjeno u samo 3 svjetske studije te u našem istraživanju (93,102, 122). Ipak, izravno uključivanje faktora koncentracije spomenutih elemenata (selen, željezo, jod) te vitamina E i polinezasićenih masnih kiselina kao sastavnog dijela prehrane namirnicama morskog porijekla, koje se u našem istraživanju posredno uvažavaju putem prehrambenih navika, morat će se uključiti u nekom daljnjem istraživanju kad navedeni podaci budu dostupni.

Osim navedenih faktora ometanja iz prehrane, važno je voditi računa i o *socioekonomskim* te *kulturološkim* obilježjima ispitanika, budući da se ne može sa sigurnošću tvrditi da između pojedinih grupa ne postoji različita vulnerabilnost prema pojedinim toksikantima. Isključni kriterij naše studije bio je boravak na području Jadranskog priobalja kraći od 2 godine te nepoznavanje hrvatskog jezika jer jezična barijera, jednako tako, može modificirati rezultate testiranja djece. U analize su bili uključeni socioekonomski faktori (*dob majke, edukacija majke, edukacija oca, status zaposlenosti majke i oca, stanovanje u ruralnoj sredini, paritet* i dr.). Uz sve navedeno otvara se i pitanje odnosa pozitivnog utjecaja dojenja u odnosu na

negativnu izloženost kontaminantima prisutnim u mlijeku, što nije pitanje koje se dotiče samo ekspozicije metil-živi, nego i drugih polutanata poput dioksina i bifenila (102,123,124,125,126). Iz svega navedenog nameće se potreba uporabe standardne multiple regresije u statističkoj obradi koja bi sve navedene faktore ometanja uklopila u analizu i iznijela najprecizniju moguću procjenu učinaka metil-žive na razvoj djece. Zaključno rečeno, uvažavajući faktor negativnog ometanja više različitih tvari u namirnicama morskog porijekla, kao što su polinezasićene masne kiseline, lako se da zaključiti da je izolirani toksički učinak metil-žive kudikamo veći, nego što se uspeva detektirati zbog prisutstva navedenih tvari. Stoga bi pojedine regulatorne agencije trebale preispitati dio svojih preporuka vezanih za izlaganje metil-živi putem prehrane (102).

Samo su 2 longitudinalne i 3 transverzalne (eng. „cross sectional“) epidemiološke studije koje su istraživale utjecaje metil-žive na neurorazvoj djece, uključile faktor postnatalne izloženosti metil-živi. Kao pokazatelj postnatalne izloženosti korištena je koncentracija ukupne žive u kosi te krvi djece, a istraživanje na Farskim otocima povezalo je 12 mjeseci dojenja s ranim razvojnim promjenama. Jednako je tako uočena veza između koncentracije ukupne žive u kosi i neurorazvojnog ishoda u dobi od 7 godina (75). Ipak, uvažavajući u analizi prenatalnu izloženost putem koncentracije žive u krvi pupkovine, gubila se statistička značajnost navedenih veza. 2006. godine Debes i suradnici zaključili su da postnatalna izloženost metil-živi nema vidljivih efekata pa su produbili upite o eventualnom pozitivnom utjecaju ostalih nutritijenata u prehrani bogatoj namirnicama morskog porijekla. Predmetom istraživanja bili su i kritični vremenski periodi utjecaja metil-žive na cerebelum tijekom vremena sisanja novorođenčadi štakora. Dokazano je da postnatalna izloženost

metil-živi uzrokuje hiperlokomotornu aktivnost miševa. Upravo je razdoblje ranog postnatalnog razvoja definirano kao kritično razdoblje u kojem je mali mozak miša izuzetno osjetljiv na neurotoksično i prooksidativno djelovanje metil-žive (127).

S obzirom na navedene kontroverze, u našem istraživanju utjecaja metil-žive na neurorazvoj djece, kao postnatalni izvor izloženosti metil-živi uvažen je *faktor dojenja* djece kroz prvih 6 tjedana života, ali ne i faktor prehrane djece namirnicama morskog porijekla kasnije tijekom razvoja. Razlozi su tome prije svega bile preporuke i uvriježene navike uvođenja namirnica ribljeg porijekla (bijela riba) u dohranu djeteta tek po navršenom 8. mjesecu života djece, i to postepeno i u malim količinama. Plavu ribu pak nije uputno uvoditi u prehranu do kraja prve godine i tih se smjernica roditelji u pravilu pridržavaju. S obzirom na navedeno, mišljenja sam da navedeni unos namirnica morskog porijekla ne može značajnije utjecati na postnatalnu izloženost djece metil-živi do dobi od 18 mjeseci, dok bi se u eventualnom daljnjem istraživanju starije djece navedeni faktor morao znanstveno evaluirati.

U svijetu ne postoji studija kojom se pokušala *povezati intrauterina izloženost metil-živi s neuroanatomskim promjenama mozga u novorođenčadi i neurorazvojnim ishodom djece u dobi od 18 mjeseci* kao što je to slučaj u izradi ovog doktorskog rada. Upravo iz navedenog razloga ovaj rad predstavlja značajan metodološki i znanstveni doprinos te daje moguće smjernice istraživanjima koja će tek uslijediti. Naime, rast ljudskog mozga najbrži je od početka trećeg tromjesečja gestacije do dobi djeteta od 18 mjeseci. Produženo vrijeme strukturnog razvoja mozga pojedine vrste predisponira veći relativni volumen struktura, posebno frontalnog korteksa, kao što je to slučaj u ljudi u odnosu na neke druge vrste. Tijek tog sporijeg procesa

omogućava i produženi postnatalni period u kojem interakcija s okolinom može doprinijeti finom podešavanju (eng. „fine tuning“) i oblikovanju neuronskih krugova, ali i povećanoj osjetljivosti različitih struktura središnjeg živčevlja na oštećenja (128). Puno je načina za proučavanje postporodnog neuroanatomskog razvoja (transfontanelarna neurosonografija, magnetska rezonanca, pozitronska emisijska tomografija, postmortem analize), ali se kod djece, s obzirom na središnje živčevlje u razvoju, nameću određena ograničenja (127). Transfontanelarna neurosonografija je najbolji izbor vizualne detekcije mozga u novorođenačkoj dobi zbog neškodljivosti, dostupnosti, jednostavnosti izvođenja, niske cijene i mogućnosti prijenosa aparata. Nedostaci ove metode su ovisnost o educiranosti, iskustvu i manualnoj vještini ispitivača te subjektivnost. Navedene smo nepovoljnosti u našoj studiji pokušali smanjiti na minimalnu moguću mjeru tako da je mjerenja veličina ciljanih struktura mozga provodio jedan ispitivač uvijek istim aparatom te u podjednakim uvjetima rada. Odabir ciljanih struktura bazirao se na nalazima promjena mozga verificiranih „post mortem“ analizama mozгова djece oboljele od Minamata bolesti te s obzirom na strukture koje je u novorođenačkoj dobi moguće detektirati transfontanelarnom neurosonografijom (14).

Upitnik o majčinoj prehrani u trudnoći korišten je kao pokazatelj frekvencije unosa namirnica morskog porijekla. Ako ne postoji dostatna razina detalja u upitniku, grube prehrambene varijable mogu ograničiti snagu identificiranja unosa ribe kao važnog faktora ometanja u istraživanjima o utjecaju izloženosti metil-živi na razvoj djece. Različite skupine morskih organizama sadrže različite koncentracije metil-žive te različiti načini pripreme hrane mogu utjecati na unos različitih tvari. Stoga prilikom sastavljanja upitnika o tome valja voditi računa. Naš prehrambeni upitnik je sadžavao

pitanja kojima se unos namirnica morskog porijekla verificirao unosom 150g namirnice te podijelio na unos *ribe*, *rakova* – jastog, rakovica, škampi, *mekušaca* - lignja, sipa, školjke te *tune*, *skuše* i *sardine u ulju*. Navedene su namirnice bile dodatno razvrstane s obzirom na način pripreme („kuhani“, „pečeni, „na žaru“ i „gradelama“ te pripremljeni u ulju). Poznato je da način pripreme ne mijenja unos metil-žive, ali svakako može mijenjati unos drugih tvari poput polinezasićenih masnih kiselina koje mogu predstavljati pozitivni ili negativni „*confoundera*“ istraživanja. Naši rezultati ukazuju na to da *ne postoji izravna korelacija između prehrambenih navika trudnica*, s naglaskom na namirnice morskog porijekla, i neurorazvojnog ishoda njihove djece u dobi od 18 mjeseci (tablica 12). Ipak, u multivarijantnoj analizi doprinosa više faktora na pod-ocjenu fine motorike dobiveni su rezultati koji ukazuju na to da unos *tune*, *skuše* i *sardine u ulju* negativno doprinosi pod-ocjenama fine motorike (b koeficijent  $-0,71$ ,  $p= 0,02$ ). Navedeni rezultati stoga sugeriraju potrebu daljnjih složenih analiza koncentracija različitih tvari u samoj ribi s ciljem razabiranja njihovih pojedinačnih utjecaja na neurorazvoj djece koji predstavljenom analizom možda ostaju skriveni.

Osnovna prednost ovog istraživanja sastoji se u tome da se pojavnost intrauterine izloženosti metil-živi istraživala na području kojeg karakteriziraju prehrambene navike trudnica bogate namirnicama morskog porijekla. Ove navike pogoduju izloženosti fetusa navedenoj tvari. Nadalje, uzorak promatrane populacije je pomno biran putem razrađenih *uključnih* i *isključnih* kriterija te je broj proučavane djece impresivan za navedeno područje, budući da se radi o gotovo 5% ukupne populacije novorođenčadi jedne kalendarske godine. Ovime zaključci dobivaju na dodatnom znanstvenom kredibilitetu. Proučavala su se djeca u dobi od 18 mjeseci koje se smatra krajem

najintenzivnijeg razvoja mozga. Promjene funkcije mozga do ovog se razdoblja mogu najjasnije uočiti. U procjeni morfološkog i neurorazvojnog ishoda korištene su metode (transfontanelarna neurosonografija, Bayley test III) koje su dostupne, neškodljive i pogodne za kontrolu izvođenja kako bi se mjerne pogreške svele na najmanju moguću mjeru. U navedenom je istraživanju po prvi puta proučavana veza između intrauterine izloženosti djece metil-živi s morfološkim promjenama mozga te posljedičnim neurorazvojnim ishodom.

S druge strane, izloženost je naše populacije metil-živi vjerojatno suviše niska da bi pokazala širu povezanost same izloženosti s morfološkim promjenama mozga novorođenčadi i neurorazvojnim karakteristikama djece u dobi od 18 mjeseci. Navedeni rezultati predstavljaju tek početak istraživanja navedene poveznice, pogotovo u krajevima više izloženosti metil-živi. Postnatalna izloženost putem drugih varijabli (osim majčinog mlijeka) morala bi biti predmetom daljnjih istraživanja kao nastavak na predstavljeno. Pri tome valja voditi računa da standardne statističke analize nerijetko nude kontradiktorne rezultate, kao što i pretpostavljaju da su markeri izloženosti izmjereni bez greške, što nije moguće. Statistički gledano, bilo koja nasumična greška može uzrokovati podcjenjivanje ili precjenjivanje pravog učinka. Uostalom, i ukupna nepreciznost analiza krvi pupkovine je veća nego što to kontrole kvalitete laboratorija priznaju. Jednako tako korištenje upitnika u znanstvenoj metodologiji također ima svojih mana, budući da su ljudi skloni davanju socijalno poželjnih odgovora i vrijeme potrebno za ispunjavanje upitnika je često obrnuto proporcionalno preciznosti odgovora. Upitno ostaje i do koje mjere varijabilnosti neurorazvojnih karakteristika, dobivenih u istraživanju, zaista imaju biološku i kliničku važnost.

*U našem je istraživanju u velikoj mjeri dokazana osnovna hipoteza rada po kojoj intrauterina izloženost metil-živi dovodi do promjena u duljini malog mozga novorođenčadi, a time i do sasvim egzaktnih i objašnjivih promjena u finoj motorici djece u dobi od 18 mjeseci.* Kod naše je skupine intrauterino izložene djece svaki porast duljine malog mozga od 1 milimetra dovodio do povećanja pod-ocjena fine motorike od 0,11 boda. U znanstvenom smislu bilo bi neispravno zaključiti da je na osnovi duljine malog mozga novorođenčadi moguće izvoditi zaključke o daljnjem razvoju fine motorike u djece, ali bi svakako transfontanelarno verificirano smanjenje duljine malog mozga nametnulo daljnje praćenje djece. Isto tako, s obzirom na velik broj ometajućih faktora kod izlaganja metil-živi, od kojih su vjerojatno samo neki poznati, nemoguće je tvrditi da je navedena pojava nedvojbeno odraz samo utjecaja metil-žive kao sastavnog dijela prehrane trudnica namirnicama morskog porijekla. Navedeni rezultati otvaraju ipak neka potpuno nova znanstveno-klinička pitanja i traže daljnja istraživanja povezanosti intrauterine izloženosti metil-živi i neurorazvoja djece.

Zaključno rečeno, živa je u gotovo svim svojim oblicima toksična za fetuse i djecu te bi društvo u cjelini trebalo uložiti napore kako bi smanjilo izloženost djece i trudnica, ali i opće populacije utjecaju ove tvari (6). Pedijatri i liječnici trebali bi naglašavati potrebu smanjenog korištenja raznih mjernih instrumenata sa živom kako u medicini, tako i u kućanstvima. Veliku pažnju valja usmjeriti i na edukaciju majki, posebice trudnica, o nedostacima prehrane namirnicama morskog porijekla, budući da je ona najznačajniji izvor organske žive koja, čini se, izaziva promjene mozga koje su povezane s promjenama neurorazvojnog ishoda djece.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Medijan (prosječna vrijednost) koncentracije ukupne žive u krvi pupkovine istraživane skupine iznosi 2,98 ng/g uz interkvartilni raspon 1,41-5,61 ng/g.
2. Nisu nađene spolne razlike koncentracija metil-žive u krvi pupkovine između muške i ženske djece promatrane kohorte, odnosno može se zaključiti da spol djeteta ne utječe na intrauterinu izloženost metil-živi.
3. Intrauterina izloženost niskoj koncentraciji metil-žive ne dovodi do novih neurorazvojnih razlika između djece muškog i ženskog spola u dobi od 18 mjeseci. Ženska djeca pokazuju višu razinu sposobnosti u domeni ekspresivne komunikacije te ukupnog jezika. Navedeni podaci dio su već široko poznatih činjenica o razlikama dječaka i djevojčica spomenute dobi.
4. Porastom koncentracije metil-žive u krvi pupkovine dolazi do pada pod-ocjena fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive. Statistički značajna povezanost koncentracije metil-žive u krvi pupkovine s ostalim promatranim neurorazvojnim karakteristikama djece nije dokazana.
5. Djeca viših kvartila (2., 3. i 4.) koncentracije metil-žive u krvi pupkovine imaju statistički značajno sniženje pod-ocjena fine motorike u odnosu na djecu 1. kvartile. Prosječno sniženje pod-ocjene fine motorike po jedinici porasta koncentracije metil-žive iznosi: 2. kvartila - 1.24,  $p=0,03$ , 3. kvartila - 1.28,  $p=0,03$ , 4. kvartila - 1.45,  $p=0,01$ . Razlike u finoj motorici između djece 2. i 3. te 3. i 4. kvartile nisu statistički značajne. Nisu uočene statistički značajne razlike ostalih neurorazvojnih sposobnosti (kognitivne, jezične) između djece različitih kvartila koncentracije metil-žive u krvi pupkovine.
6. Zaposlenost majke te unos skuše, sardine i tune u ulju ima negativan doprinos na pod-ocjene fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci koja su

- intrauterino bila izložena metil-živi. Pozitivan doprinos duljine malog mozga na pod-ocjenu fine motorike pokazuje graničnu statističku značajnost ( $p=0,058$ ).
7. Postoji pozitivna korelacija između duljine malog mozga i pod-ocjena fine motorike djece u dobi od 18 mjeseci koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive.
  8. S porastom duljine malog mozga za 1 mm prisutan je porast od 0,11 boda pod-ocjena fine motorike kod djece u dobi od 18 mjeseci koja su intrauterino bila izložena niskim koncentracijama metil-žive.
  9. Potrebno je daljnje istraživanje veze između širine gyrusa cinguli i ukupne ocjene kognitivnih sposobnosti, širine gyrus frontalis superior i pod-ocjena fine motorike kao i ukupnih ocjena motorike te širine fosse interhemispherice i pod-ocjena receptivnih jezičnih vještina, ukupnih jezičnih sposobnosti te ukupnih ocjena motorike.
  10. Nije utvrđena korelacija između prehrambenih navika trudnica, s naglaskom na namirnice morskog porijekla, i neurorazvojnog ishoda njihove djece u dobi od 18 mjeseci.
  11. Nema statistički značajne korelacije između koncentracije metil-žive u krvi pupkovine i antropometrijskih karakteristika novorođenčadi.
  12. Potvrđen je pozitivan doprinos dobi majke, mase majke prije trudnoće, kao i prirasta na masi majke u trudnoći na vrijednost rodne mase novorođenčadi izložene niskoj koncentraciji metil-žive. Jednako tako, dob majke, masa majke prije trudnoće te visina majke pogoduju višoj vrijednosti rodne duljine novorođenčadi. Vrijednosti opsega glave novorođenčeta doprinosi masa majke prije trudnoće i prirast na masi majke tijekom trudnoće. Ženski spol negativno doprinosi svim trima antropometrijskim karakteristikama u

novorođenčadi koja su intrauterino bila izložena niskim vrijednostima metil-žive.

13. Dobiveni rezultati ne pokazuju statistički značajne razlike u koncentraciji metil-žive u krvi pupkovine majki koje su profesionalno bile izložene živinim tvarima u odnosu na one koje to nije karakteriziralo.
14. Potrebno je daljnje prospektivno praćenje djece kako bi se u kasnijoj dječjoj dobi uočile moguće nove neurorazvojne razlike među djecom koja su intrauterino bila izložena metil-živi. Zbog višestrukog ometanja (eng. „confounding“) procesa izlaganja metil-živi, potrebna su i mjerenja koncentracija drugih elemenata u biološkim uzorcima kako bi se i ti faktori uključili u daljnje analize utjecaja metil-žive na neurorazvoj djece koja su intrauterino bila izložena navedenoj tvari.
15. Poželjno je učiniti genotipizaciju iz krvi pupkovine kako bi se procjenilo prisustvo delecija pojedinih gena odgovornih za enzimski sustav povezan s metabolizmom metil-žive. Poželjno bi bilo također utvrditi utječe li koncentracija navedenih proteina na koncentraciju metil-žive trudnica i djece, te samim time i na njihovu izloženost navedenoj tvari.

## 7. LITERATURA

1. **Bose-O'Reilly S**, McCarty KM, Steckling N, Lettmeier B. Mercury exposure and children's health. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2010;40:186-215.
2. **Risher JF**, Amler SN. Mercury exposure: evaluation and intervention the inappropriate use of chelating agents in the diagnosis and treatment of putative mercury poisoning. *Neurotoxicology* 2005;26(4):691-9.
3. **Counter SA**, Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;198(2):209-30.
4. **Stern AH**, Smith AE. An Assessment of the Cord Blood: Maternal Blood Ratio: Implications for Risk assessment. *Environ Health Perspect* 2003; 111(12):1465-1470.
5. **Nakamura I**, Hosokawa K, Tamura H, Miura T. Reduced mercury excretion with feces in germfree mice after oral administration of methyl mercury chloride. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1977;17(5):528-33.
6. **Goldman LR**, Shannon MW; American Academy of Pediatrics: Committee on Environmental Health. Technical report: mercury in the environment: implications for pediatricians. *Pediatrics.* 2001;108(1):197-205.
7. **American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases and Committee on Environmental Health.** Thimerosal in vaccines-an interim report to clinicians. *Pediatrics.*1999;104:570-74.
8. **Al-Saleh I**, Al-Sedairi AA, Elkhatib R. Effect of mercury (Hg) dental amalgam fillings on renal and oxidative stress biomarkers in children. *Sci Total Environ.* 2012;431C:188-196.

9. **Daniels JL**, Longnecker MP, Rowland AS, Golding J. Fish intake during pregnancy and early cognitive development of offspring. *Epidemiology*. 2004;15(4):394-402.
10. **Mozaffarian D**, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA*. 2006;296(15):1885-99.
11. **Koren G**, Bend JR. Fish consumption in pregnancy and fetal risks of methylmercury toxicity. *Can Fam Physician*. 2010;56(10):1001-2.
12. **Chang LW**, Reuhl KR, Lee GW. Degenerative changes in the developing nervous system as a result of in utero exposure to methylmercury. *Environ Res*. 1977;14(3):414-23.
13. **Davidson PW**, Myers GJ, Cox C, et al. Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish ingestion: outcomes at 19 and 29 months. *Neurotoxicology* 1995;16:677-688.
14. **Harada M**. Congenital Minamata disease: intrauterine methylmercury poisoning. *Teratology*. 1978;18:285-288.
15. **Murata K**, Weihe P, Araki S et al. Evoked potentials in Faroese children prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1999; 21:471-472.
16. **Rodier PM**. Environmental causes of central nervous system maldevelopment. *Pediatrics*. 2004;113:1076-83.
17. **Mahaffey KR**. Methylmercury: a new look at the risks. *Public Health Rep*. 1999; 114(5): 396-9, 402-13.

18. **Marques RC**, Dórea JG, Bernardi JV, Bastos WR, Malm O. Prenatal and postnatal mercury exposure, breastfeeding and neurodevelopment during the first 5 years. *Cogn Behav Neurol*. 2009;22(2):134-41.
19. **Clarkson TW**. Mercury: major issues in environmental health. *Environ Health Perspect*. 1993;100:31-38.
20. **Clarkson TW**, Amin-Zaki L, Al-Tikriti SK. An outbreak of methylmercury poisoning due to consumption of contaminated grain. *Fed Proc*. 1976;35(12):2395-9.
21. **Rothenberg SE**, Feng X, Li P. Low-level maternal methylmercury exposure through rice ingestion and potential implications for offspring health. *Environ Pollut*. 2011 Apr;159(4):1017-22. Epub 2011 Jan 26.
22. **Li P**, Feng X, Qiu G. Methylmercury exposure and health effects from rice and fish consumption: a review. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(6):2666-91.
23. **Davis LE**, Kornfeld M, Mooney HS i sur. Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. *Ann Neurol*. 1994;35(6):680-8.
24. **Wranová K**, Cejchanová M, Speváková V, Korunová V, Vobecký M, Speváček V. Mercury and methylmercury in hair of selected groups of Czech population. *Cent Eur J Public Health*. 2009 Mar;17(1):36-40.
25. **National Academy of Science, Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury**. *Toxicological Effects of Methylmercury*, Washington, DC. National Academy Press;2000.
26. **Kondo K**. Congenital Minamata disease: warnings from Japan's experience. *J Child Neurol*. 2000 Jul;15(7):458-64.



27. **Amin-Zaki L**, Majeed MA, Clarkson TW, Greenwood MR. Methylmercury poisoning in Iraqi children: clinical observations over two years. *Br Med J*. 1978;11;1(6113):613-6.
28. **Marsh DO**, Clarkson TW, Cox C, Myers GJ, Amin-Zaki L, Al-Tikriti S. Fetal methylmercury poisoning. Relationship between concentration in single strands of maternal hair and child effects. *Arch Neurol*. 1987;44(10):1017-22.
29. **Schoeman K**, Bend JR, Hill J, Nash K, Koren G. Defining a lowest observable adverse effect hair concentrations of mercury for neurodevelopmental effects of prenatal methylmercury exposure through maternal fish consumption: a systematic review. *Ther Drug Monit* 2009; 31(6):670-82.
30. **Murata K**, Dakeishi M, Shimada M, Satoh H. Usefulness of umbilical cord mercury concentrations as biomarkers of fetal exposure to methylmercury. *Jpn J Hig* 2007; 62:949-59.
31. **Grandjean P**, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Weihe P. Umbilical cord mercury concentration as biomarker of prenatal exposure to methylmercury. *Environ Health Perspect*. 2005;113(7):905-8.
32. **Fok TF**, Lam HS, Ng PC i sur. Fetal methylmercury exposure as measured by cord blood mercury concentrations in a mother-infant cohort in HongKong. *Environ Int* 2007;33:84-92.
33. **Franke E**, Lundgren KD. Industrial hygiene in production of alkyl-mercury compounds. *Arch Gewerbehyg*. 1956;15:186-202.

34. **Rice D**, Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing Nervous System: Evidence from Humans and Animals Models. *Environ Health Perspect* 2000; 108:511-33.
35. **Spyker JM**, Sparber SB, Goldberg AM. Subtle consequences of methylmercury exposure: behavioral deviations in offspring of treated mothers. *Science*. 1972;177:621-3.
36. **Kostović I**, Judas M. The development of the subplate and thalamocortical connections in the human foetal brain. *Acta Paediatr*. 2010;99(8):1119-27.
37. **Franco JL**, Posser T, Missau F i sur. Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. *Environ Toxicol Pharmacol*.2010 Nov 1;30(3):272-278.
38. **Ponce RA**, Kavanagh TJ, Mottet NK, Whittaker SG, Faustman EM. Effects of methylmercury on the cell cycle of primary rat CNS cells in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;127:83-90.
39. **O'Rourke NA**, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK. Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 1992; 258(5080):299-302
40. **Choi BH**. Methylmercury poisoning of the developing nervous system: Pattern of neuronal migration in the cerebral cortex. *Neurotoxicology* 1986;7(2):591-600).
41. **Newland MC**, Paletz EM, Reed MN. Methylmercury and nutrition: adult effects of fetal exposure in experimental models. *Neurotoxicology*. 2008;29(5):783-801.
42. **Zanoli P**, Truzzi C, Veneri C, Braghiroli D, Baraldi M. Methylmercury during late gestation affects temporarily the development of cortical muscarinic receptors in rat offspring. *Pharmacol Toxicol* 1994;75(5):261-64.

43. **Nagashima K.** A review of experimental methylmercury toxicity in rats: neuropathology and evidence for apoptosis. *Toxicol Pathol* 1997;25(6):624-31.
44. **Volpe JJ.** *Neurology of the newborn.* 4th ed. Philadelphia. Saunders WB, 2001. Str 331-354.
45. **Kimmel CA,** Makris SL. Recent developments in regulatory requirements for developmental toxicology. *Toxicol Lett.* 2001;120:73–82.
46. **Olsen SF,** Secher NJ. Low consumption of seafood in early pregnancy as a risk factor for preterm delivery: prospective cohort study. *BMJ* . 2002;342:1-5.
47. **Rogers I,** Emmett P, Ness A, Golding J. Maternal fish intake in late pregnancy and the frequency of low birth weight and intrauterine growth retardation in a cohort of British infants. *J Epidemiol Community Health.* 2004;58:486-92.
48. **Oken E,** Kleinman KP, Berland WE i sur. Decline in fish consumption among pregnant women after a national mercury advisory. *Obstet Gynecol* 2003;102:346-351.
49. **Ramón R,** Ballester F, Aguinagalde X i sur. Fish consumption during pregnancy, prenatal mercury exposure, and anthropometric measures at birth in a prospective mother-infant cohort study in Spain. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:1047-55.
50. **Halldorsson TI,** Meltzer HM, Thorsdottir I, Knudsen V, Olsen SF. Is high consumption of fatty fish during pregnancy a risk factor for fetal growth retardation? A study of 44,824 Danish pregnant women. *Am J Epidemiol.* 2007;166:687-96.
51. **Halldorsson TI,** Thorsdottir I, Meltzer HM, Nielsen F, Olsen SF. Linking exposure to polychlorinated biphenyls with fatty fish consumption and reduced fetal growth among Danish pregnant women: a cause for concern? *Am J Epidemiol.* 2008;168:958-965.

52. **Grandjean P**, Weihe P. Neurobehavioral effects of intrauterine mercury exposure: potential sources of bias. *Environ Res.* 1993;61:176-183.
53. **Castoldi A**, Coccini T, Ceccatelli S i sur. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull.* 2001;55:2197-2203.
54. **Vogel DG**, Margolis RL, Mottet NK. The effects of methyl mercury binding to microtubules. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985;80(3):473-86.
55. **Clarkson TW**, Magos I, Myers G. The toxicology of mercury - current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med.* 2003;349:1731-1737.
56. **Choi BH**, Lapham LW, Amin-Zaki L i sur. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1978;37:719-33.
57. **Ceccatelli S**, Tamm C, Zhang Q, Chen M. Mechanisms and modulation of neural cell damage induced by oxidative stress. *Physiol Behav.* 2007;10;92(1-2):87-92.
58. **Mori N**, Yasutake A, Marumoto M, Hirayama K. Methylmercury inhibits electron transport chain activity and induces cytochrome c release in cerebellum mitochondria. *J Toxicol Sci.* 2011 Jun;36(3):253-9.
59. **Aschner M**, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(3):285-91.
60. **Bondy SC**, McKee M. Disruption of the potential across the synaptosomal plasma membrane and mitochondria by neurotoxic agents. *Toxicol Lett.* 1991;58:13-21.

61. **Slikker W Jr.** Principles of developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology*. 1994;15:11-6.
62. **Syversen TL.** Changes in protein and RNA synthesis in rat brain neurons after a single dose of methylmercury. *Toxicol Lett*. 1982;10:31-4.
63. **Marsh D.** Organic mercury: clinical and neuro-toxicological aspects. *Handbook of Clinical Neurology, Interactions of the Nervous system*. 1994;20:413-429.
64. **Choi B.** The effects of methylmercury on the developing brain. *Progr Neurobiol*.1989;32:447-470.
65. **Aschner M.** Effects of systemic methyl mercury-adulterated water consumption on fast axonal transport in the rat visual system. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1986;59(5):349-55.
66. **Hunter D, Russell DS.** Focal cerebellar and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1954;17:235-41.
67. **Clarkson TW, Magos I.** The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol*. 2006;36:609-662.
68. **Grotto D, de Castro MM, Barcelos GR, Garcia SC, Barbosa F Jr.** Low level and sub-chronic exposure to methylmercury induces hypertension in rats: nitric oxide depletion and oxidative damage as possible mechanisms. *Arch Toxicol*. 2009 Jul;83(7):653-62. Epub 2009 May 26.
69. **Moriyama H.** A study on congenital Minamata disease. 1. Effects of organic mercury administration on pregnant animals, with reference to the mercury content in the maternal and fetal organs. *Kumamoto Igakkai Zasshi*. 1967;41:506-28.

70. **Yoshida M**, Suzuki M, Satoh M, Yasutake A, Watanabe C. Neurobehavioral effects of combined prenatal exposure to low-level mercury vapor and methylmercury. *J Toxicol Sci.* 2011;36(1):73-80.
71. **Shafer LL**, McNulty JA, Young MR. Brain activation of monocyte-lineage cells: involvement of interleukin-6. *Neuroimmunomodulation.* 2002-2003;10(5):295-304.
72. **Huang CF**, Liu SH, Hsu CJ, Lin-Shiau SY. Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. *Toxicol Lett.* 2011;25;201(3):196-204.
73. **Sherwani SI**, Pabon S, Patel RB i sur. Eicosanoid Signaling and Vascular Dysfunction: Methylmercury-Induced Phospholipase D Activation in Vascular Endothelial Cells. *Cell Biochem Biophys.* 2011.
74. **Bertossi M**, Girolamo F, Errede M, Virgintino D, Elia G, Ambrosi L, Roncali L. Effects of methylmercury on the microvasculature of the developing brain. *Neurotoxicology.* 2004;25(5):849-57.
75. **Grandjean P**, Weihe P, White RF i sur. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol.*1997;19:417-428.
76. **Debes F**, Budtz-Jorgensen E, Weihe P i sur. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicol Teratol.* 2006;28:536-547.
77. **Myers GJ**, Davidson PW, Cox C i sur. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles Child Development Study. *Lancet*,2003;361:1686-1692.

78. **Grandjean P**, White RF, Sullivan K i sur. Impact of contrast sensitivity performance of visually presented neurobehavioral tests in mercury-exposed children. *Neurotoxicol Teratol.* 2001;23:141-146.
79. **Jedrychowski W**, Perera F, Jankowski J i sur. Fish consumption in pregnancy, cord blood mercury level and cognitive and psychomotor development of infants followed over the first three years of life:Krakow epidemiologic study. *Environ Int.* 2007;33:1057-1062.
80. **Lederman SA**, Jones RL, Caldwell KL i sur. Relation between cord blod mercury levelos and early child development in a World Trade Center cohort. *Environ Health Perspect.* 2008;116:1085-1091.
81. **Murata K**, Weihe P, Budtz-Jorgensen E i sur. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *J Pediatr.* 2004;144:177-183.
82. **Oken E**, Radesky JS, Wright RO i sur. Maternal fish intake during pregnancy, blood mercury levels, and child cognition at age 3 years in a US kohort. *Am J Epidemiol.* 2008;167:1171-1181.
83. **McKeown-Eyssen GE**, Ruedy J, Neims A. Methyl mercury exposure in northern Quebec. II. Neurologic findings in children. *Am J Epidemiol.*1983;118:470-479.
84. **Kjellstrom T**, Kennedy S, Wallis S i sur. Physical and Mental Development of Children With Prenatal Exposure to Mercury From Fish. Stage 2. Interviews and Psychological Tests at Age 6. Solna, Sweden: National Swedish Environmental Protection Board Report 3042. 1989.

85. **Marques RC**, Garoffe Dorea J, Rodrugues Bastos W i sur. Maternal mercury exposure and neuro-motor development in breastfed infants from Porto Velho (Amazon), Brazil. *Int J Hyg Environ Health*. 2007;210:51-60).
86. **Galić S**. Neuropsihologijska procjena. Testovi i tehnike. 2.izdanje. Požega: Naklada Slap; 2009.str. 21-61.
87. **Čuturić N**. Psihomotorni razvoj djeteta u prve dvije godine života s normama razvoja. Ljubljana: Zavod SR Slovenije za produktivnost dela;1978.str.29-85.
88. **Bonham MP**, Duffy EM, Robson PJ i sur. Contribution of fish intakes of micronutrients important for fetal development: a dietary survey of pregnant women in the Republic of Seychelles. *Public Health Nutr*.2008;6:1-9.
89. **Myers GJ**, Davidson PW, Cox C i sur. Neurodevelopmental outcomes of Seychellois children sixty-six month after in utero exposure to methylmercury from a maternal fish diet: pilot study. *Neurotoxicology* 1995;16:639-652.
90. **Budtz-Jørgensen E**, Debes F, Weihe P, Grandjean P. Structural equation models for meta-analysis in environmental risk assessment. *Environmetrics*. 2010;21(5):510-527.
91. **Mitchell JW**, Kjellstrom TE, Reeves RL. Mercury in takeaway fish in New Zealand. *N Z Med J*. 1982;95:112-114.
92. **Jedrychowski W**, Jankowski J,Flak E i sur. Effects of prenatal exposure to mercury on cognitive and psychomotor function in one year old infants: epidemiologic cohort study in Poland. *Ann Epidemiol*.2006,16:439-447.
93. **Oken E**, Wright RO, Kleinman KP i sur. Maternal fish consumption, hair mercury, and infant cognition in US cohort. *Environ Health Perspect*.2005;113:1376-1380.



94. **Bambrick HJ**, Kjellström TE. Good for your heart but bad for your baby? Revised guidelines for fish consumption in pregnancy. *Med J Aust.* 2004;181(2):61-2.
95. **Cace IB**, Milardovic A, Prpic I i sur. Relationship between the prenatal exposure to low-level of mercury and the size of a newborn's cerebellum. *Med Hypotheses* 2010 Dec. doi:10.1016/j.mehy.2010.12.005.
96. **Bayley N**. Bayley Scales of Infant Development. Manual 3rd ed. San Antonio, TX: Psychological Corp; 2006
97. **World Health Organ Tech Rep Ser**. Evaluation of certain food additives and contaminants. 2000;896:1-128.
98. **Fujimura Y**. Studies on the toxicity of mercury (Hg Series No. 7). II. The present status of mercury contamination in the environment and foodstuffs. *Japanese journal of hygiene* 1964;18:402–411.
99. **Grandjean P**, Satoh H, Murata K, Eto K. Adverse Effects of Methylmercury: Environmental Health Research Implications. *Environmental Health Perspectives* 2010;118(8):1137-1143.
100. **Harada M**. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 1995;25:1-24.
101. **Kjellström T**, Kennedy S, Wallis S i sur. Physical and Mental Development of Children With Prenatal Exposure to Mercury From Fish. Stage I. Preliminary Tests at Age 4. Solna, Sweden National Swedish Environmental Protection Board Report 3080;1986.
102. **Choi A.L**, Cordier S, Weihe P, Grandjean P. Negative Confounding in the Evaluation of Toxicity: The Case of Methylmercury in Fish and Seafood. *Crit Rev Toxicol.* 2008; 38(10): 877–893.

103. **Maz-Courrau A**, López-Vera C, Galván-Magaña F, Escobar-Sánchez O, Rosiles-Martínez R, Sanjuán-Muñoz A. Bioaccumulation and biomagnification of total mercury in four exploited shark species in the Baja California Peninsula, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2012;88(2):129-34.
104. **Liu B**, Yan H, Wang C, Li Q, Guédron S, Spangenberg JE, Feng X, Dominik J. Insights into low fish mercury bioaccumulation in a mercury-contaminated reservoir, Guizhou, China. *Environ Pollut*. 2012;160(1):109-17.
105. **Ordiano-Flores A**, Galván-Magaña F, Rosiles-Martínez R. Bioaccumulation of mercury in muscle tissue of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, of the eastern Pacific Ocean. *Biol Trace Elem Res*. 2011;144(1-3):606-20.
106. **Brodzka R**, Trzcinka-Ochocka M. Mercury in hair – an indicator of environmental exposure. *Med Pr* 2009;60:303-14.
107. **Yamamoto M**, Charoenraks T, Pan-Hou H, Nakano A, Apilux A, Tabata M. Electrochemical behaviors of sulfhydryl compounds in the presence of elemental mercury. *Chemosphere*. 2007;69(4):534-9.
108. **Yaginuma-Sakurai K**, Murata K, Iwai-Shimada M, Nakai K, Kurokawa N, Tatsuta N, Satoh H. Hair-to-blood ratio and biological half-life of mercury: experimental study of methylmercury exposure through fish consumption in humans. *J Toxicol Sci*. 2012 Feb;37(1):123-30.
109. **Bolduc ME**, du Plessis AJ, Sullivan N i sur. Regional Cerebellar Volumes Predict Functional Outcome in Children with Cerebellar Malformations. *Cerebellum*. 2011.
110. **Grandjean P**, Weihe P, Nielsen JB. Methylmercury : significance of intrauterine and postnatal exposures. *Clin Chem*. 1994;1395-1400.

111. **Roda E**, Coccini T, Acerbi D, Castoldi A, Bernocchi G, Manzo L. Cerebellum cholinergic muscarinic receptor (subtype-2 and -3) and cytoarchitecture after developmental exposure to methylmercury: an immunohistochemical study in rat. *J Chem Neuroanat.* 2008;35(3):285-94.
112. **Eto K**, Takahashi H, Kakita A i sur. Pathological and biochemical studies of 30 Niigata autopsy cases related to Minamata disease. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 2007;62(1):70-88.
113. **Itoh K**, Korogi Y, Tomiguchi S, Takahashi M, Okajima T, Sato H. Cerebellar blood flow in methylmercury poisoning (Minamata disease). *Neuroradiology.* 2001;43(4):279-84.
114. **Philbert MA**, Billingsley ML, Reuhl KR. Mechanisms of injury in the central nervous system. *Toxicol Pathol.* 2000;28(1):43-53.
115. **Mancini JD**, Autio DM, Atchison WD. Continuous exposure to low concentrations of methylmercury impairs cerebellar granule cell migration in organotypic slice culture. *Neurotoxicology.* 2009;30(2):203-8.
116. **Burke K**, Cheng Y, Li B i sur. Methylmercury elicits rapid inhibition of cell proliferation in the developing brain and decreases cell cycle regulator, cyclin E. *Neurotoxicology.* 2006;27(6):970-81.
117. **Johnson MH**. Development of human brain function. *Biol Psychiatry* 2003;54:1312-1316.
118. **Johansson C**, Castoldi AF, Onishehenko N i sur. Neurobehavioral and molecular changes induced by methylmercury exposure during development. *Neurotox Res.* 2007;11:241-260.

119. **Luna B**, Thulborn KR, Munoz DP i sur. Maturation of widely distributed brain function subserves cognitive development. *Neuroimage*. 2001;13(5):786-93.
120. **Atchison WD**. Is chemical neurotransmission *Pharmacol Sci* 2005;26:549-557.
121. **Starc B**, Čudina Obradović M, Pleša A, Profaca B, Letica M. Osobine i psihološki uvjeti razvoja djeteta predškolske dobi. Zagreb: Golden marketing – Tehnička knjiga; 2004, str 11-61.
122. **Strain JJ**, Davidson PW, Bonham MP i sur. Associations of maternal long-chain polyunsaturated fatty acids, methylmercury, and infant development in the Seychelles Chil Development Nutrition Study. *Neurotoxicology*.2008;29:767-775.
123. **Goudarzi MA**, Parsaei P, Nayeypour F, Rahimi E. Determination of mercury, cadmium and lead in human milk in Iran. *Toxicol Ind Health*. 2012.
124. **Dahmardeh Behrooz R**, Esmaili-Sari A, Peer FE, Amini M. Mercury concentration in the breast milk of Iranian women. *Biol Trace Elem Res*. 2012;147(1-3):36-43.
125. **Lanting CI**, Patandin S, Weisglas-Kuperus N, Touwen BC, Boersma ER. Breastfeeding and neurological outcome at 42 months. *Acta Paediatr*. 1998;87:1224-9.
126. **Miklavčič A**, Cuderman P, Mazej D, Snoj Tratnik J, Krsnik M, Planinšek P, Osredkar J, Horvat M. Biomarkers of low-level mercury exposure through fish consumption in pregnant and lactating Slovenian women. *Environ Res*. 2011 Nov;111(8):1201-7. Epub 2011 Aug 10.
127. **Stringari J**, Meotti FC, Souza DO, Santos AR, Farina M. Postnatal methylmercury exposure induces hyperlocomotor activity and cerebellar oxidative

stress in mice: dependence on the neurodevelopmental period. *Neurochem Res.* 2006;31(4):563-9.

128. **Clarkson TW.** Metal toxicity in the central nervous system. Environ Health altered specifically during methyl-mercury-induced cerebellar dysfunction? *Trends Perspect* 1987;75:59–64.

## ŽIVOTOPIS

**Ana Milardović, dr.med.**

### **Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci**

Katedra za pedijatriju

Braće Branchetta 20

Tel: 051/651-111

### **Klinički bolnički centar Rijeka**

Klinika za ginekologiju i porodništvo

Krešimirova 42, 51000 Rijeka

Tel: 051/658-111

**Datum i mjesto rođenja:** 24.listopada 1977., Rijeka

### **Obrazovanje:**

**1992.- 1996.** Gimnazija Andrije Mohorovičića u Rijeci

**1996.- 2004.** Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, studij medicine

**2004.-** Poslijediplomski znanstveni studij „Biomedicina“

**2009.** Poslijediplomski stručni studij „Biomedicina razvojne dobi“

### **Akademski naslov:**

**2004.** Doktor medicine

### **Radno iskustvo:**

**2004.- 2005.** Pripravnički staž u KBC Rijeka, liječnik

**2006.- 2008.** Solvay Pharma, stručni suradnik na terenu

**2008.-** Znanstveni novak/asistent na projektu „Prospektivno praćenje neurorazvoja djece prenatalno izložene metil živi“ glavnog istraživača: prof. dr. sc. Igor Prpić, dr. med, pod brojem 062-0000000-3395 i financirano od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske

**2009.-** Liječnik na specijalizaciji iz pedijatrije, u Klinici za ginekologiju i porodništvo

#### **Članstvo u strukovnim udruženjima:**

Hrvatsko pedijatrijsko društvo

Hrvatska liječnička komora

#### **Sudjelovanje na tečajevima:**

1. „EKG učilica – od početnika do profesionalca“. Tečaj trajne izobrazbe. Hrvatski liječnički zbor Podružnica Rijeka. Rijeka, svibanj 2011.
2. „Statistička obradba podataka u biomedicinskim istraživanjima“. Poslijediplomski tečaj I. Kategorije. Medinski fakultet Sveučilišta u Rijeci. Rijeka, travanj 2011.
3. „Ultrazvuk u dijagnostici ranog oštećenja mozga“. Poslijediplomski tečaj I. Kategorije. Klinika za dječje bolesti Zagreb. Zagreb, veljača 2011.
4. „Odabrana poglavlja iz pedijatrijske dermatologije“. Znanstveni simpozij. KB „Sestre milosrdnice“, Klinika za kožne i spolne bolesti, Hrvatsko dermatovenerološko društvo HLZ. Zagreb, prosinac 2010.
5. „Neonatal and Infant Mechanical Ventilation: From basic understanding to bedside application of Conventional Ventilation and High Frequency Oscillation“. Zagreb, svibanj 2009.

6. UNICEF Hrvatska: „Kako roditelju reći neželjenu vijest?“. Opatija, studeni 2009.
7. „Kako napisati znanstveno djelo?“. Poslijediplomski tečaj I. kategorije. Zagreb,2009.

**Znanstveni radovi objavljeni u časopisima citiranim u tercijarnim publikacijama:**

1. Banac S, Lah Tomulić K, Ahel V, Rožmanić V, Šimundić N, Zubović S, **Milardović A**, Topić J. Prevalence of asthma and allergic diseases in Croatian children is increasing: survey study. CMJ 2004;45;721-726.Index CC.
2. Bilic Cace I, **Milardovic A**, Prpic I i sur. Relationship between the prenatal exposure to low-level of mercury and the size of a newborn's cerebellum. Med Hypotheses 76 (2011) 514–516 . Index CC

**Kongresna priopćenja objavljena u časopisu koji je indeksiran u CC:**

1. Prpić, **Milardović A**, Bilić I i sur. Prenatal exposure to mercury and the size of newborn's cerebellum. Programme and Abstracts of EPNS 2009. Eur J Paediatr Neurol 2009;13(Suppl1):128-129.
2. Prpic I, Vukelic P, Radic J, Bilic I, **Milardovic A**. Neonatal outcome in relation to mother's antiepileptic drug treatment. European Journal of Paediatric Neurology 2009;13(Suppl1): p26.



### **Sudjelovanje na međunarodnim skupovima:**

1. Radic J, Prpic I, Vukelic P, Bilic I, **Milardovic A**, Krajina R. Amplitude-integrated electroencephalography (aEEG) in newborns – our own experience. 11<sup>th</sup> International Child Neurology Congress, May 2-7 2010, Cairo
2. Vukelic P, Prpic I, Radic J, Bilic I, **Milardovic A**, Mahulja Stamenkovic V. Ethics in neonatology role of child neurologist. 11<sup>th</sup> International Child Neurology Congress, May 2-7 2010, Cairo.
3. Prpic I, Vukelic P, Radic J, Prodan M, Petrovic O, Bilic I, **Milardovic A**. Quality of perinatal care and neonatal intensive care change the prevalence of cerebral palsy. 11<sup>th</sup> International Child Neurology Congress, May 2-7 2010, Cairo.
4. Prpic I, Radic J, Vukelic P, Bilic I, **Milardovic A**, Petrovic O. Neonatal outcome of children born to women with active epilepsy on mono-therapy versus poly-therapy . 14<sup>th</sup> Mediterranean Meeting of Child neurology, Marsala, Italy, 28-30. 2009. Book of abstracts.
5. Radic J, Prpic I, Vukelic P, Modrusan-Mozetic Z, Bilic I, **Milardovic A**. Perinatal features in late preterm infants with cerebral palsy. 14<sup>th</sup> Mediterranean Meeting of Child neurology, Marsala, Italy, 28-30. 2009. Book of abstracts.
6. Vukelic P, Prpic I, Radic J, Modrusan-Mozetic Z, Bilic I, **Milardovic A**. Differences in perinatal factors in late preterm and term infant with cerebral palsy. 14<sup>th</sup> Mediterranean Meeting of Child neurology, Marsala, Italy, 28-30. 2009. Book of abstracts.
7. **Milardović A**, Prpić I, Bilić I, Petrović O, Špirić Z, Horvat M, Tratnik J, Mazej D. Relationship between prenatal exposure to mercury and the size of newborn's cerebellum. The 14<sup>th</sup> Mediterranean Meeting of Child Neurology , Marsala, Italy, May 28-30.2009.

8. Spiric Z, Prpic I, **Milardovic A**, Bilic I, Krajina R, Petrovic O, Horvat M, Tratnik J, Mazej D: Size of a newborn's cerebellum in relation with prenatal exposure to mercury, PPTOX II - International conference on Role of Environmental Stressors in the Developmental Origins of Disease, Book of abstracts VI pp. 145-146; Miami Beach, Florida, USA, 7-10 December 2009.

#### **Sudjelovanje na domaćim skupovima:**

1. Vukelic P, Prpic I, Radic J, Bilic I, **Milardovic A**. Reproduktivne sposobnosti i ishod novorođenčadi u žena sa aktivnom epilepsijom – predavač. IX. hrvatski simpozij o epilepsiji, 7-10 studeni 2010, Split.
2. Radic J, Prpic I, Vukelic P, Bilic I, **Milardovic A**. Primjena monoterapije/politerapije u trudnica s epilepsijom-ishod novorođenčadi. IX. hrvatski simpozij o epilepsiji, 7-10 studeni 2010, Split.
3. Banac S, Lah Tomulić K, Rožmanić V, Šimundić N, Zubović S, **Milardović A**, Topić J. Međunarodna studija astme i alergijskih bolesti u djece (ISAAC) primorsko-goranske županije; Zbornik radova; Prvi kongres hrvatskih alergologa i kliničkih imunologa s međunarodnim sudjelovanjem; Zagreb : Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju, 2009. 20-20
4. Prpić I, **Milardović A**. Liječenje novorođenačkih konvulzija. Tečaj stalnog medicinskog usavršavanja iz obnove znanja Farmakoterapija epilepsija u djece. Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb , 05.prosinca 2008.
5. Mance V, **Milardović A**, Lulić-Drenjak J, Luketić K. Mogu i ja- povezanost tjelesne aktivnosti i zdravlja. 8. Konferencija o sportu Alpe-Jadran; Opatija, lipanj 2009.

6. **Milardović A**,Krajina R,Bilić I,Radić J,Vukelić P,Karavida I,Prpić I.Prenatalna izloženost živi i veličina malog mozga novorođenčeta; 38.Simpozij Hrvatskog društva za dječju neurologiju s međunarodnim sudjelovanjem, Split, studeni 2009.
7. Prpić I,Radić J,Vukelić P,Bilić I,**Milardović A**,Krajina R,Peter B.Amplitudno integrirana elektroencefalografija (aEEG) u novorođečeta – naša iskustva; 38.Simpozij Hrvatskog društva za dječju neurologiju s međunarodnim sudjelovanjem, Split, studeni 2009.
8. Vukelić P,Bilić I,Radić J,**Milardović A**,Mahulja-Stamenković V,Prpić I. Primarno oživljavanje novorođenčadi: etičke dileme i pojavnost cerebralne paralize; 38.Simpozij Hrvatskog društva za dječju neurologiju s međunarodnim sudjelovanjem, Split, studeni 2009.

**Registrirano sudjelovanje u radu na domaćem ili međunarodnom znanstvenom projektu/programu**

1. „**Public health impact of long-term, low-level mixed element exposure in susceptible population strata- PHIME**“ - 6th Frame programme, subcontract u WP 1:3 „Child neurodevelopment among residents in the Mediterranean coastal regions of Italy, Slovenia, Croatia and Greece - the role of environmental exposure to heavy metals,“- istraživač (suradnik) na projektu
2. «**Prospektivno praćenje neurorazvoja djece prenatalno izložene metil živi**» (062-0000000-3395) voditelja znanstvenog projekta prof.dr.sc.Igora Prpića; Projekt Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta - istraživač (suradnik) na projektu

**PRIVITCI**

**PROSPEKTIVNO PRAĆENJE NEURORAZVOJA DJECE  
PRENATALNO IZLOŽENE METIL-ŽIVI**

*Povezanost intrauterine izloženosti metil-živi s razvojem djece u dobi od 18 mjeseci*

UPITNIK NAMIJENJEN MAJKAMA

## NAPUTCI ZA POPUNJAVANJE

Cilj je ovog upitnika prikupiti podatke o prehrambenim navikama trudnica.

Prvi dio upitnika sastoji se od niza općenitih pitanja, a nakon toga slijedi niz pitanja koja se odnose na učestalost kojom uzimate obroke hrane. Molimo Vas da ove dijelove upitnika popunite što je jasnije i potpunije moguće, dajući, kada se to od Vas izrijeckom traži, kratke odgovore i ostavljajući prazna polja na mjestima označenim zvjezdicom (\*). Svi podaci bit će uporabljeni isključivo u znanstvene svrhe, sukladno zakonskim propisima o tajnosti i zaštiti podataka (Decreto legislativo [D.Lgs] broj. 196. od 30. lipnja 2003.).

Da biste odgovorili na pitanje, morate zaokružiti broj pod kojim se nalazi navod koji opisuje Vaše navike. Pri tome, po mogućnosti, koristite isključivo crvenu, zelenu ili plavu tintu. S izuzetkom nekoliko pitanja (jasno naznačenih u upitniku), očekuje se da u svakom retku zaokružite samo jedan odgovor.

Molimo Vas da odgovorite na sva postavljena pitanja, uključujući i ona koja se odnose na prehrambene proizvode koje nikada ne konzumirate. U takvom slučaju molimo Vas da zaokružite broj u kućici označenoj sa 'nikada'. Prije nego započnete s popunjavanjem upitnika, molimo Vas da pažljivo pročitate o kojim je kategorijama prehrambenih namirnica riječ te da povedete računa o vremenu koje Vam je bilo potrebno za popunjavanje upitnika.

Općenita pitanja: Svoj odgovor na svako od postavljenih pitanja naznačite oznakom 'X' ili zaokruživanjem odgovarajućeg broja.

Upitnik koji se odnosi na prehranu: U NAČELU, učestalost unosa hrane treba iskazati kao prosjek, pri čemu valja uzeti u obzir veličinu porcije.

## **KBC Rijeka - Klinika za ginekologiju i porodništvo**

### **EPIDEMIOLOŠKA STUDIJA ZDRAVLJA MAJKE I DJETETA**

Identifikacijski broj /\_/\_/\_/\_/\_/\_/\*

POČETNI DATUM dan \_/\_/ mjesec /\_/\_/ godina /\_/\_/\_/\_/

#### **OPĆENITI PODACI - MAJKA**

Prezime i ime \_\_\_\_\_  
Kućna adresa: Ulica \_\_\_\_\_ broj \_\_\_\_\_  
Grad \_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/\_/\*  
Pokrajina \_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/\_/\*  
Poštanski broj /\_/\_/\_/\_/\_/  
Telefonski broj \_\_\_\_\_  
Datum rođenja: dan \_/\_/ mjesec /\_/\_/ godina /\_/\_/\_/\_/  
Mjesto rođenja:  
Grad \_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/\_/\*  
Pokrajina \_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/\_/\*  
Poštanski broj /\_/\_/\_/\_/\_/\*  
Zemlja rođenja \_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/\*

#### **Bračno stanje:**

1. udata/živi s partnerom nevjenčano
2. udovica
3. rastavljena/razvedena
4. nikad se nije udavala

#### **VISINA I TEŽINA**

Visina (iskazana u cm) /\_/\_/\_/

Težina (iskazana u kg) prije trudnoće /\_/\_/\_/ pri porodu /\_/\_/\_/

#### **AKADEMSKI STUPNJEVI**

1. neobrazovana
2. osnovnoškolska izobrazba
3. srednjoškolska izobrazba
4. visokoškolska izobrazba
5. fakultetski obrazovana

#### **ZANIMANJE**

##### **Trenutno ste:**

1. zaposleni, ali na porodijskom dopustu/bolovanju
2. zaposleni
3. kućanica
4. u potrazi za poslom
5. studentica
6. dali otkaz
7. okolnosti su drugačije (navedite pobliže)

\_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/  
Ukoliko ste u ovoj trudnoći radili, molimo navedite svoje zanimanje,  
\_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/\*  
i gospodarski sektor u kom ste zaposleni  
\_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/\*

**Kojoj od ovih kategorija zaposlenika pripadate?**

1. menadžer/poduzetnik
2. samostalni profesionalac/specijalist
3. tehničar/suradnik
4. službenik
5. serviser ili prodavač u dućanu, odnosno na tržnici
6. majstor/šegrt ili kalfa
7. pogonski ili strojarski operateri ili montažeri
8. osnovna zanimanja
9. oružane snage
10. poljoprivrednik/stočar
11. ribar

**Do kojeg ste mjeseca trudnoće radili? mjesec /\_/\_/**

**SUPRUG/NEVJENČANI SUPRUG**

Zemlja rođenja \_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/\*

**Najviši postignuti stupanj izobrazbe**

1. neobrazovan
2. osnovnoškolska izobrazba
3. srednjoškolska izobrazba
4. visokoškolska izobrazba
5. fakultetski obrazovan

**On je trenutno:**

1. zaposlen, ali na porodiljskom dopustu/bolovanju
2. zaposlen
3. kod kuće, brine se o domaćinstvu
4. u potrazi za poslom
5. student
6. dao otkaz
7. okolnosti su drugačije (navedite  
pobliže) \_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/

Ukoliko radi ili je radio, molimo navedite njegovo zanimanje  
\_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/\*  
i gospodarski sektor u kom je zaposlen  
\_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_/\*



**Kojoj od sljedećih zaposleničkih kategorija pripada?**

1. menadžer/poduzetnik
2. samostalni profesionalac/specijalist
3. tehničar/suradnik
4. službenik
5. serviser ili prodavač u dućanu, odnosno na tržnici
6. majstor/šegrt ili kalfa
7. pogonski ili strojarski operateri ili montažeri
8. osnovna zanimanja
9. oružane snage
10. poljoprivrednik/stočar
11. ribar

Visina (iskazana u cm) /\_/\_/\_/

Težina (iskazana u kg) /\_/\_/\_/

**UVJETI ŽIVLJENJA**

**Kuća u kojoj stanujete je:**

1. u Vašem vlasništvu
2. unajmljena
3. gostinska
4. živite sa svojim/njegovim roditeljima

**Koliko spavaćih soba ima Vaš dom? /\_/\_/**

**Kolike je kvadrature Vaš dom?**

1. manje od 50 m<sup>2</sup>
2. 50-100 m<sup>2</sup>
3. više od 100 m<sup>2</sup>

**Koliko osoba stanuje u Vašem domu (uključujući i Vas i Vaše novorođenče)?**

Odraslih (punoljetnih) /\_/\_/\_/

Djece (maloljetnika) /\_/\_/\_/

**Koliko automobila ukupno posjeduju članovi Vaše obitelji?**

(ukoliko nijedan, napišite 0) /\_/\_/

**PODACI O VAŠEM DJETETU**

Prezime i ime \_\_\_\_\_

Datum rođenja: dan /\_/\_/\_/ mjesec /\_/\_/\_/ godina /\_/\_/\_/\_/

Gestacijska dob pri porođaju (iskazana u tjednima): /\_/\_/\_/

**Spol**

1. Muški
2. Ženski

Težina pri porodu g /\_/\_/\_/\_/

Duljina pri porodu cm /\_/\_/

**Porođaj je bio:**

1. Spontani vaginalni
2. Provociran medikamentozno
3. Unaprijed planirani carski rez
4. Hitno učinjen carski rez
5. Vakuum-ekstrakcija
6. Rotacija položaja zatkom
7. Forcepsom (porodničkim kliještima)

**Nakon porođaja, je li se u Vašeg novorođenčeta razvilo ijedno od ovih stanja?**

Žutica 1 2

Infekcija 1 2

Otežano disanje 1 2

Jaki grčevi (konvulzije) 1 2

**Od porođaja naovamo, je li iznova zapriman/a u bolnicu?**

1. Da
2. Ne

**S izuzetkom eventualnog bolničkog liječenja, je li Vašem novorođenčetu ikada bila potrebna liječnička pomoć?**

1. Da
2. Ne

**ZDRAVSTVENO STANJE I ANAMNEZA**

**Je li Vam ova trudnoća bila prva?**

1. Da
2. Ne

**Ukoliko nije, koja Vam je to trudnoća po redu? /\_/\_/**

**Prije nego li ste u ovom navratu zatrudnjeli, jeste li bolovali/patili od:**

Šećerne bolesti

Astme

Alergije

Epilepsije

Hipertenzije (visokog krvnog tlaka)

Povraćanja

Hipotireoidizma

Hipertireoidizma

Lupusa

Reumatološke bolesti

Infekcija mokraćnog sustava

Infekcija

Vrućice  
Konvulzija/Napadaja  
Slabokrvnosti  
Srčano-žilne bolesti  
Neurološke bolesti  
Genetički uvjetovane bolesti  
Tumora

**Jeste li u trudnoći uzimali kakvih lijekova?**

1. Da
2. Ne

**Ako da, koje?**

**Prije porođaja, koliko puta ste bili na liječničkoj kontroli? /\_/\_/**

**Koliko puta Vam je tijekom trudnoće učinjena pretraga ultrazvukom? /\_/\_/**

**Tijekom trudnoće, jeste li posjećivali stomatologa?**

1. Da
2. Ne

**Ukoliko jeste, da li su Vam stavljeni kakvi zubni ispuni (plombe)?**

1. Da
2. Ne

**Koliko Vam je takvih ispuna stavljeno?**

1. manje od 3
2. od 3 do 5
3. od 5 do 9
4. 10 ili više
5. ne znam

## ***PUŠENJE***

**Jeste li pušač?**

1. Ne, nikada nisam pušila
2. Da, pušim
3. Bivši pušač: Pušila sam, ali sam prestala pušiti prije zadnje trudnoće
4. Bivši pušač: Pušila sam, ali sam prestala pušiti tijekom zadnje trudnoće, i to u /\_/\_/ mjesecu
5. Bivši pušač: Pušila sam, ali sam nakon zadnje trudnoće prestala pušiti

**Ukoliko pušite ili ste pušili, koliko ste bili stari kad ste propušili? /\_/\_/**

**Koliko prosječno dnevno popušite/ste imali običaj popušiti?**

**Cigareta /\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/**

**Cigara /\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/**

**Lula /\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/\_/**

**Ukoliko ste bivši pušač, u kojoj životnoj dobi ste prestali pušiti? /\_/\_/**

## DOJENJE

Jeste li do sada dojili svoje dijete svakog mjeseca?

### PREHRANA MLIJEKOM DJETETA

OBLIK PREHRANE MLIJEKOM	1.tjedan	2.tjedan	3.tjedan	4.tjedan	5.tjedan	6.tjedan
<b>DIJETE SE HRANI ISKLJUČIVO DOJENJEM (1)</b>						
Majčino mlijeko isisano ili ručno istisnuto iz dojke, kapi ljekovitih sirupa (vitamina, minerala i lijekova), i ništa drugo	1	1	1	1	1	1
<b>DIJETE SE POGlavITO HRANI DOJENJEM (2)</b>						
Majčino mlijeko isisano ili ručno istisnuto iz dojke, kapi ljekovitih sirupa (vitamina, minerala i lijekova), uz dodatak nehranjivih tekućina (obične ili zaslađene vode, napitaka baziranih na vodi kakvi su čaj, kamilica, infuzije ljekovitih trava, otopine za oralnu rehidraciju)	2	2	2	2	2	2
<b>DIJETE SE DJELOMIČNO HRANI DOJENJEM (3)</b>						
Majčino mlijeko isisano ili ručno istisnuto iz dojke, kapi ljekovitih sirupa (vitamina, minerala i lijekova), uz dodatak hranjivih tekućina (tekućeg mlijeka ili mlijeka u prahu)	3	3	3	3	3	3
<b>DIJETE SE HRANI UMJETNO (4)</b>						
Prehrana u kojoj nije zastupljeno majčino mlijeko	4	4	4	4	4	4

## **PREHRAMBENE NAVIKE**

**Jeste li se tijekom trudnoće kojim slučajem hranili na način na koji to nikada prije niste činili?**

1. Da
2. Ne

**Ukoliko jeste, iz kog razloga (mimo trudnoće) ?**

1. Mijenjala sam poslove
2. Pridržavala sam se točno određene dijete (molimo navedite razlog zbog kojeg ste to činili)..... )
3. Bila sam bolesna
4. Iz drugog razloga, molimo navedite  
pobliže.....  
.....

**Ukoliko jeste, iz kojih razloga (povezanih s trudnoćom) ?**

1. zbog mučnine
  2. zbog povraćanja
  3. zbog boli u trbuhu/refluksa-povrata želučanog sadržaja/žgaravice
  4. iz drugih razloga (molimo, navedite pobliže)
- .....  
.....

**Jeste li tijekom trudnoće uzimali kakvih vitamina, minerala ili drugih nadomjesnih tvari (uključujući tu i proizvode na bazi ljekovitog bilja)?**

1. Da
2. Ne

**U zadnja 3 mjeseca koja su prethodila trudnoći, jeste li uzimali folnu kiselinu (folate)?**

1. Da
2. Ne

## PREHRAMBENE NAVIKE NAMIRNICAMA MORSKOG PORIJEKLA

Glavno jelo (150g)	Nikad	Manje od 1 mjesečno	1-3 puta mjesečno	1 tjedno	2-4 puta tjedno	5-6 puta tjedno	1 puta dnevno	2-3 puta dnevno	Više od 3 puta dnevno	Domaće proizvodnje ili kupovno?
<b>Riba:</b> kuhana, „na gradele“, pečena	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Da
<b>Rakovi</b> (jastog, rakovica, škamp, itd.): kuhani, „na gradele“	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Da
<b>Mekušci</b> (lignja, sipa, jestiva morska školjka, itd.): kuhani, „na žaru“, pečeni	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Da
<b>Pržena riba</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Da
<b>Prženi rakovi</b> (jastog, rakovica, škamp, itd.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Da
<b>Prženi mekušci</b> (lignja, sipa, jestiva morska školjka, itd.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Da
<b>Tuna, skuša, sardine u ulju</b> (1 mala konzerva, jedna porcija)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Da

## ALKOHOLNA PIĆA

	Nika da	Manje od jednom mjeseč no	1-3 puta mjeseč no	Jedno m tjedno	2-4 puta tjedn o	5-6 puta tjedn o	Jedno m dnevn o	2-3 puta dnev no	4-5 puta dnev no	Više od 5 puta dnev no	Spravlje no kod kuće?
<b>Bijelo vino, pjenušac, šampanjac</b> (1 čaša)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	da
<b>Crno vino</b> (1 čaša)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	da
<b>Pivo</b> (1 limenka)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	da
<b>Alkoholni aperitivi:</b> npr. vermut, kampari, marsala (1 čaša)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	da
<b>Digestivi, slatki likeri</b> (1 mala čašica)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	da
<b>Žestoka pića</b> (1 mala čašica) (Viski, konjak, grappa itd.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	da

## **PODACI O OBITAVALIŠTU U ZADNJE 2 GODINE**

**Koliko dugo živite u Vašem sadašnjem domu?**

od: mj./\_/\_/ god. /\_/\_/

**U kom dijelu grada živite?**

1. U gradskom središtu
2. Na gradskoj periferiji
3. U seoskom području

**Vaš dom je udaljen manje od 1 km od:  
Industrijskih postrojenja**

1. Da. Molimo navedite imena pogona

---

2. Ne

**Autoputa**

1. Da
2. Ne

**Državne ceste**

1. Da
2. Ne

**Provincijske ceste**

1. Da
2. Ne

**Drugih visokofrekventnih prometnica**

1. Da
2. Ne

**Željezničke stanice**

1. Da
2. Ne

**Zračne luke**

1. Da
2. Ne



## **RADNA ANAMNEZA – PODACI ZA ZADNJIH 5 GODINA**

**Jeste li u zadnjih 5 godina barem jednom bili zaposleni?**

1. Da
2. Ne

Ukoliko je odgovor potvrđan, molimo opišite profesionalne dužnosti koje ste obnašali u zadnjih najmanje 5 godina:

### **ZADNJE ZAPOSLENJE**

**Koliko dugo radite (ili ste radili) za tu tvrtku, u tom uredu, itd.?**

od: mj./\_/\_/ god. /\_/\_/ do: mj./\_/\_/ god. /\_/\_/

**Koje su (bile) Vaše glavne profesionalne aktivnosti?**

---

/\_/\_/\_/\_/\_\*

Što je bila glavna djelatnost tvrtke, ureda, itd.?

Djelatnost: .....

Naziv:

.....

.....

/\_/\_/\_/\_/\_\*

Općina:

.....

.....

/\_/\_/\_/\_/\_\*

Pokrajina/Država:

.....

/\_/\_/\_/\_/\_\*

**Imate li drugi posao?**

1. Da. Koji: \_\_\_\_\_ /\_/\_/\_/\_/\_\*
2. Ne

### **RANIJE ZAPOSLENJE**

**Koliko dugo radite (ili ste radili) za tu tvrtku, u tom uredu, itd.?**

od: mj./\_/\_/ god. /\_/\_/ do: mj./\_/\_/ god. /\_/\_/

**Koje su (bile) Vaše glavne profesionalne aktivnosti?**

---

/\_/\_/\_/\_/\_\*

Što je bila glavna djelatnost tvrtke, ureda, itd.?

Djelatnost: .....

Naziv:

.....

.....

/\_/\_/\_/\_/\_/\*  
Općina:

.....

.....

/\_/\_/\_/\_/\_/\*  
Pokrajina/Država:

.....

/\_/\_/\_/\_/\_/\*

## **PROFESIONALNA IZLOŽENOST**

**Predstavlja li nešto od niže navedenog Vaše zanimanje, odnosno jeste li ikada bili zaposleni u nekom od navedenih gospodarskih sektora?**

Stomatolog ili stomatološki tehničar

Draguljarski zanati

Razvijanje fotografija

Zaposlenik kemijskogpostrojenja za proizvodnju klor-alkalnih proizvoda

Proizvodnja ili uporaba boja na bazi metala

Rudarstvo (metalne rudače)

Proizvodnja ili uporaba električnih i/ili elektromedicinskih uređaja (npr. toplomjera, sfingomanometara, ili drugih uređaja koji u sebi sadrže živu)

Industrija papira

Farmaceutska industrija

Tiskarska industrija

Zaposlenje koje podrazumijeva doticaj s prometom (npr. prometna policija, radnici u servisima motornih vozila)

Poljoprivreda

**U Vaše radno ili slobodno vrijeme 1 , jeste li ikada rabili ili došli u doticaj s:**

Olovom i olovnim proizvodima

Živom

Kromiranom živom

Zlatom (uporabljenim u industrijske ili umjetničke svrhe)

Metalima

Kromom i kromovim proizvodima

Otapalima

Bojama, pigmentima, bojama baziranim na metalima

PCB-ima (polikloriranim bifenilima)

Starim transformatorima i kondenzatorima

Izvorima zračenja ili radioaktivnim izotopima

Dimom iz talionica olova

Amalgamima za zubne ispune

**Jeste li ikada došli u doticaj s živom uslijed puknuća toplomjera ili nekog drugog medicinskog proizvoda?**

1. Da

2. Ne

3. Ne znam

**Ovime ste popunili upitnik!!**

**Datum popunjavanja: dan /\_/\_/ mjesec /\_/\_/ godina /\_/\_/\_/\_/**

**Molimo ocijenite koliko Vam je vremena zapravo bilo potrebno da ispunite ovaj upitnik, i iskažite ga u minutama:**

**minuta /\_/\_/\_/\_/**

**UISTINU SMO VAM ZAHVALNI NA VAŠOJ DRAGOCJENOJ SURADNJI I VREMENU KOJE STE POSVETILI OVOM ISTRAŽIVANJU.**