

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij

Molekularne bioznanosti

Marina Vidosavljević

„POVEZANOST ARSENA I URANA U PITKOJ VODI S KARCINOMIMA BUBREGA I
MOKRAĆNOG MJEHURA“

Doktorska disertacija

Osijek, 2026 god.

Disertacija je izrađena u Zavodu za javno zdravstvo Grada Zagreba „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu, Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagreb i Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: biologija, temeljne medicinske znanosti

„POVEZANOST ARSENA I URANA U PITKOJ VODI S KARCINOMIMA BUBREGA I MOKRAĆNOG MJEHURA“

Marina Vidosavljević

Doktorski rad je izrađen u: Zavodu za javno zdravstvo Grada Zagreba „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu, Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagreb i Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor/i: Prof. prim. dr.sc. Dinko Puntarić, dr. med; izv. prof. dr.sc. Lidija Kalinić

Kratki sažetak doktorskog rada:

Istraživanje je procijenilo izloženost arsenu i uranu u istočnoj Hrvatskoj analizom vode za piće, urina, seruma i kose. Arsen je pokazao snažnu povezanost s urinarnim biomarkerima te moguću povezanost s povećanom incidencijom karcinoma mokraćnog mjehura. Uran nije pokazao značajnu povezanost s epidemiološkim pokazateljima. Urin i kosa potvrđeni su kao najpouzdaniji biomarkeri izloženosti.

Broj stranica: 131

Broj slika: 41

Broj tablica: 22

Broj literaturnih navoda: 121

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: arsen; uran; voda za piće; biomonitoring; urin; kosa; karcinom mokraćnog mjehura; istočna Hrvatska; okolišna izloženost.

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science

Scientific Fields: biology, basic medical sciences

„CORRELATION BETWEEN ARSENIC AND URANIUM IN DRINKING WATER WITH KIDNEY AND BLADDER CANCER“

Marina Vidosavljević

Thesis performed at the Institute of Public Health of the City of Zagreb "Dr Andrija Štampar" in Zagreb, the Institute for Medical Research and Occupational Health in Zagreb and the Department of Chemistry and Biochemistry of the Faculty of Medicine in Osijek.

Supervisor/s: Prof. Dinko Puntarić, MD, PhD.; full professor; Assoc. prof. Lidija Kalinić, PhD.

Short abstract: This study assessed arsenic and uranium exposure in eastern Croatia using drinking water, urine, serum, and hair analyses. Arsenic showed a strong association with urinary biomarkers and a possible link to increased bladder cancer incidence. Uranium demonstrated no significant association with epidemiological indicators. Urine and hair were identified as the most reliable biomarkers of exposure.

Number of pages: 131

Number of figures: 41

Number of tables: 22

Number of references: 121

Original in: Croatian

Key words: arsenic; uranium; drinking water; biomonitoring; urine; hair; bladder cancer; eastern Croatia; environmental exposure

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Rad je izrađen u okviru Projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske
„Istraživanje dugotrajnih posljedica ratnih zbivanja na zdravlje stanovništva“ (broj projekta: 219-
1080315-0288); voditelj : Prof.prim.dr.sc. Dinko Puntarić; dr. med.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj obitelji na ljubavi, podršci i pažnji tijekom doktorskog studija, svim dragim ljudima koji su mi pomagali prilikom izrade disertacije; mentorima na vodstvu, izv.prof.dr. Vlatki Gvozdić na prijateljstvu i pomoći tijekom svih ovih godina.

Posebnu zahvalu izražavamo prof. dr.sc. Dinku Puntariću, voditelju Projekta na kojemu smo izrasli, velikome Čovjeku i prijatelju, za sve ove godine koje nas je pratio.

Rad posvećujem Maši i Marinu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Arsen	2
1.2. Uran.....	3
1.3. Povezanost arsena i urana s rakom bubrega i mokraćnog mjehura	4
1.3.1. Rak bubrega (C64)	4
1.3.2. Rak mokraćnog mjehura (C67)	6
1.4. Istraživanje citotoksičnosti arsena na staničnoj liniji bubrežnog epitela pasa (MDCK1)	7
1.5. Djelovanje arsena na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE)	9
1.6. Regionalni kontekst istočne Hrvatske.....	10
2. HIPOTEZA	11
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	11
4. MATERIJALI I METODE	12
4.1. Ispitivano područje.....	12
4.2. Prikupljanje i analiza uzoraka vode	14
4.2. Analiza bioloških uzoraka (serum, urin i kosa)	14
4.2.1. Ispitanici	14
4.3. Prikupljanje, obrada i analiza bioloških uzoraka	15
4.4. Epidemiološki podaci.....	15
4.5. Ispitivanje citotoksičnosti arsenovog trioksida na staničnoj liniji bubrežnog epitela MDCK1	16
4.5.1. Stanična linija i uvjeti uzgoja	16
4.5.2. MTT test stanične održivosti/proliferacije	16
4.5.4. Istraživanje utjecaja As_2O_3 na aktivnost ljudske acetilkolinesteraze	17
4.6. Statistička obrada podataka.....	20
4.6.1. Klaster analiza	20
5. REZULTATI.....	22
5.1. Osnovna demografska obilježja ispitanika	22
5.2. Koncentracije arsena u vodi za piće	24
5.3. Koncentracije arsena u biološkim uzorcima	25

5.3.1. Rezultati klaster analize koncentracija arsena u biološkim uzorcima muških i ženskih ispitanika u ispitivanim naseljima	39
5.3.2. Rezultati klaster analize koncentracija arsena u biološkim uzorcima prema dobi svih ispitanika	43
5. 4. Međusobni odnos koncentracija As u vodi, biološkim uzorcima, raka bubrega (C64) i raka mokraćnog mjehura (C67) u ispitivanim naseljima.	46
5.5. Analiza glavnih komponenata na podacima koncentracija arsena u vodi, biološkim uzorcima (urinu, serumu i kosi) prema naseljima sa pojavnošću raka bubrega i mokraćnog mjehura	55
5.6. Koncentracije urana u vodi za piće	58
5.7. Koncentracije urana u biološkim uzorcima	59
5.7. Prikazi odnosa koncentracija urana u vodi, urinu, serumu i kosi i raka bubrega (C64) i mokraćnog mjehura (C67)	68
5.8. Klaster analiza koncentracija urana u vodi, urinu, serumu i kosi u ispitivanim naseljima prema spolu	75
5.8.1. Klaster analiza koncentracija urana u vodi, urinu, serumu i kosi u ispitivanim naseljima prema dobi	79
5.9. Regresijska analiza između vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana u vodi za piće i serumu, urinu i kosi ispitanika	84
5.10. Analiza glavnih komponenata na podacima koncentracija urana u vodi, biološkim uzorcima (urinu, serumu i kosi) prema naseljima sa pojavnošću raka bubrega i mokraćnog mjehura	87
5.10. Određivanje stanične nefrotoksičnosti	90
5.11. Utjecaj As_2O_3 na aktivnost ljudske acetilkolinesteraze	91
6. RASPRAVA	92
6.1. Prostorna raspodjela koncentracija arsena i urana u vodi za piće	92
6.1.1. Arsen	92
6.1.2. Uran	93
6.2. Arsen i uran u biološkim uzorcima	95
6.2.1. Arsen – rezultati biomonitoringa	95
6.2.2. Uran – rezultati biomonitoringa	97
6.3. Povezanost koncentracija arsena u vodi i biološkim uzorcima	99
6.4. Povezanost izloženosti arsenu i uranu sa pojavnošću karcinoma uropoetskog sustava	102
6.4.1. Arsen i karcinom bubrega (C64)	102

6.4.2. Arsen i karcinom mokraćnog mjehura (C67).....	103
6.4.3. Uran i karcinomi bubrega i mokraćnog mjehura	104
6.5. Ispitivanje citotoksičnosti arsena primjenom MTT testa na staničnoj liniji MDCK1	104
6.6. Učinak arsenova trioksida i acetilkolinesteraze (AChE)	106
6.7. Ograničenja istraživanja i implikacije za buduća istraživanja	108
7. ZAKLJUČCI.....	109
8. LITERATURA	111
9. SAŽETAK.....	123
10. SUMMARY	124
11. PRILOZI-UPITNIK	125
12. ŽIVOTOPIS	129

POPIS KRATICA:

AChE – acetilkolinesteraza

AKT – protein kinaza B; serin/treonin-protein kinaza AKT

BMP7 – koštani morfogenetski protein 7 (*bone morphogenetic protein 7*)

C64 – zloćudna novotvorina bubrega, osim bubrežne zdjelice, prema MKB-10 klasifikaciji

C67 – zloćudna novotvorina mokraćnog mjehura prema MKB-10 klasifikaciji

c-Myc – protoonkogen c-Myc; transkripcijski čimbenik c-Myc

DMSO- dimetil sulfoksid

FGFR3 – receptor 3 za fibroblastni čimbenik rasta (*fibroblast growth factor receptor 3*)

HER2 – receptor 2 za humani epidermalni čimbenik rasta (*human epidermal growth factor receptor 2*)

HIF – čimbenik induciran hipoksijom (*hypoxia-inducible factor*)

HIF-1 α – alfa podjedinica čimbenika induciranog hipoksijom 1 (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*)

IARC – Međunarodna agencija za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer*)

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza (*mitogen-activated protein kinase*)

MDCK1 – stanična linija Madin-Darbyjevih psećih bubrežnih stanica tipa I (*Madin-Darby Canine Kidney type I cells*)

MDK – maksimalno dopuštena koncentracija

MKB– Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema (MKB-10)

mTOR – cilj rapamicina u sisavaca / mehanistička meta rapamicina (*mechanistic target of rapamycin*)

mTORC1 – kompleks 1 mehanističke mete rapamicina (*mechanistic target of rapamycin complex 1*)

NLRP3 – NLR obiteljski pirinski domen sadržavajući protein 3 (*NLR family pyrin domain containing 3*)

PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinaza (*phosphoinositide 3-kinase*)

RB1 – gen retinoblastoma 1 / protein retinoblastoma 1

STAT3 – prijenosnik signala i aktivator transkripcije 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TP53 – tumorski protein p53 / gen TP53

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (*vascular endothelial growth factor*)

WNT4 – član obitelji WNT 4 (*Wnt family member 4*)

WT1 – Wilmsov tumor 1; gen WT1

β -katenin – beta-katenin; protein uključen u staničnu adheziju i signalni put Wnt/ β -katenin

1. UVOD

Arsen (As) i uran (U) prirodno su prisutni u okolišu te se, ovisno o geokemijskim i hidrogeološkim uvjetima, mogu pojaviti u podzemnim i površinskim vodama namijenjenima ljudskoj potrošnji. Dugotrajna izloženost putem vode za piće jedan je od najznačajnijih okolišnih putova unosa ovih elemenata u općoj populaciji.

Arsen je toksični metaloid široko rasprostranjen u okolišu, prisutan u vodi, tlu, zraku i hrani. Anorganski oblici arsena prepoznati su kao karcinogeni za ljude te su povezani s povećanim rizikom razvoja malignih bolesti, osobito raka kože, pluća i mokraćnog mjehura, ali i s nizom nekancerogenih zdravstvenih učinaka, uključujući kardiovaskularne i metaboličke poremećaje (1–3).

Uran nema poznatu biološku funkciju u ljudskom organizmu te se smatra okolišnim toksinom. Zdravstveni učinci urana prvenstveno se pripisuju njegovoj kemotoksičnosti, osobito nefrotoksičnosti, dok radiološki učinci imaju manji značaj pri okolišnim koncentracijama. Kronična izloženost, prvenstveno putem kontaminirane vode za piće, povezuje se s oštećenjem bubrežne funkcije, dok su dokazi o njegovoj karcinogenosti u okolišnim uvjetima ograničeni i predmet su znanstvene rasprave (4-6).

Arsen i uran nisu esencijalni za ljudsko zdravlje i oba se smatraju okolišnim toksinima sa značajnim toksičnim potencijalom čak i pri niskim razinama izloženosti. Zbog svoje geokemijske i hidrogeološke specifičnosti, osobit znanstveni interes imaju u kontekstu istočne Hrvatske.

Poseban interes za istočnu Hrvatsku proizlazi iz činjenice da su povišene koncentracije arsena u podzemnim vodama Panonskog bazena dobro dokumentirane. Istraživanja su obuhvatila više lokaliteta Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije, gdje su u pojedinim razdobljima zabilježene koncentracije koje višestruko premašuju preporučene granične vrijednosti za vodu za piće (7,8).

Uran je u pravilu prisutan u nižim koncentracijama, no geogeni izvori povezani s litološkim sastavom i mineralizacijama (npr. područje Papuka) mogu rezultirati mjerljivim opterećenjem pojedinih izvora vodoopskrbe (9). Zajedno, arsen i uran predstavljaju predmet znanstvenog interesa kroz tri komplementarne perspektive: okolišnu prisutnost i putove izloženosti, biomonitoring izloženosti putem bioloških uzoraka (urin, serum i kosa) te moguću povezanost s učestalošću malignih bolesti uropoetskog sustava, osobito raka bubrega (C64) i raka mokraćnog mjehura (C67) prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti (MKB) (10,11).

1.1. Arsen

Arsen (As; $Z = 33$; relativna atomska masa 74,92) metaloid je koji u okolišu postoji u organskim i anorganskim oblicima. U kontekstu izloženosti stanovništva od ključne su važnosti anorganski oblici, prvenstveno arsenit (As(III)) i arsenat (As(V)), pri čemu se As(III) većinom smatra toksičnijim zbog veće reaktivnosti i izraženije sposobnosti interakcije s tiolnim skupinama proteina. Specijacija arsena u vodi ovisi o pH-vrijednosti, redoks potencijalu, prisutnosti željeza i mangana, organskih tvari te mikrobnj aktivnosti, što objašnjava značajne prostorne i vremenske varijacije koncentracija u podzemnim vodama (12–14).

Arsen je u prirodi prisutan u tlu, vodi, zraku i stijenama te se javlja u više alotropskih oblika, uključujući sivu (metalnu), žutu i crnu modifikaciju, od kojih je sivi arsen najstabilniji. Poznat je čovječanstvu još od antike, a u renesansi je stekao zloglasnu reputaciju zbog česte uporabe kao otrova, prvenstveno zbog svoje bezbojne i bezmirisne prirode (15).

U okolišu arsen potječe iz prirodnih i antropogenih izvora. Prirodni izvori uključuju vulkansku aktivnost, eroziju stijena i mineralne izvore, dok antropogeni izvori obuhvaćaju rudarske aktivnosti, spaljivanje fosilnih goriva, uporabu pesticida i industrijsku proizvodnju. Industrijske otpadne vode i nekontrolirano odlaganje otpada dodatno pridonose kontaminaciji tla i vode arsenom. Anorganski arsen u okolišu se javlja u četiri oksidacijska stanja: $-III$, 0 , $+III$ i $+V$, pri čemu su za vodu za piće najvažniji oblici As(III) i As(V) (16).

Više od 200 minerala sadrži arsen, najčešće u obliku sulfidnih minerala poput arsenopirita ($FeAsS$), realgara (As_4S_4) i orpimenta (As_2S_3). U podzemnim vodama arsen se najčešće pojavljuje u obliku As(III) i As(V), pri pH-vrijednostima između 6 i 9, uobičajenim za većinu vodonosnika. Iako su oba oblika toksična, trovalentni anorganski arsen smatra se toksičnijim od peterovalentnog (1,15,17).

Onečišćenje pitke vode arsenom prepoznata je kao značajan globalni javnozdravstveni problem. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) preporučuje referentnu vrijednost od $10 \mu g L^{-1}$ za arsen u vodi za piće, pri čemu je ta vrijednost označena kao privremena zbog tehničkih i ekonomskih ograničenja uklanjanja arsena, osobito u malim vodoopskrbnim sustavima (18–20). Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) klasificira anorganski arsen kao karcinogen za ljude (skupina 1), s jasno dokazanom povezanošću s rakom kože, mokraćnog mjehura i pluća, dok su dokazi o pojavi raka bubrega slabiji i manje konzistentni (3).

Na području Europe, povišene koncentracije arsena posebno su zabilježene u aluvijalnim

vodonosnicima Panonskog bazena. Istraživanja provedena u istočnoj Hrvatskoj pokazala su da geogeni arsen u podzemnoj vodi predstavlja dugotrajan problem za javne sustave vodoopskrbe i privatne zdence. U radu Čavar i suradnika zabilježene su koncentracije arsena u vodi za piće u rasponu od 0,14 do 611,89 µg/L, uz povišene koncentracije arsena u kosi stanovnika izloženijih područja, što jasno ukazuje na izloženost putem vode (7,19).

1.2. Uran

Uran (U; Z = 92; relativna atomska masa 238,03) prirodni je radionuklid i kemijski element iz skupine aktinoida. U okolišu je prisutan u tragovima u tlu, stijenama i vodi, a najzastupljeniji izotop je ^{238}U . Iako je uran radioaktivan, u većini okolišnih studija najznačajniji zdravstveni rizik pripisuje se njegovoj kemotoksičnosti, osobito nefrotoksičnosti, dok radiološki učinci postaju relevantni tek u specifičnim okolnostima, poput profesionalne izloženosti ili inhalacije finih čestica (21,22).

Uran se u organizmu nakuplja ponajprije u kostima, bubrezima i jetri, a primarno se eliminira putem urina. Toksičnost urana ovisi o dozi, trajanju izloženosti kao i individualnim čimbenicima poput spola i indeksa tjelesne mase. Eksperimentalne studije na životinjskim modelima potvrdile su akutnu nefrotoksičnost urana, obilježenu smanjenjem glomer ravnoteže, što se povezuje s oštećenjem proksimalnih bubrežnih tubula (21,23). ularne filtracije, porastom koncentracije uree i kreatinina u plazmi kao i poremećajem elektrolitne

Epidemiološki podaci o kroničnoj izloženosti uranu iz okoliša i oštećenju bubrežne funkcije kod ljudi ograničeni su i neujednačeni. Studije provedene u Finskoj i drugim nordijskim zemljama, gdje su zabilježene više koncentracije prirodnog urana u vodi za piće, nisu dosljedno pokazale jasnu povezanost s klinički značajnim oštećenjem bubrežne funkcije (24–26). Pregledni radovi naglašavaju da je za razvoj toksičnih učinaka potrebna dugotrajna i relativno visoka izloženost, kako bi se uran akumulirao u ciljanim organima iznad praga toksičnosti (11).

U vodi se uran najčešće pojavljuje u obliku uranil-iona (UO_2^{2+}) i njegovih karbonatnih kompleksa. Njegova mobilnost ovisi o redoks uvjetima, pH-vrijednosti, alkalitetu te adsorpciji i desorpciji na mineralnim fazama poput oksida željeza i mangana, karbonata i glinenih minerala. U oksidirajućim uvjetima oblici U(VI) su relativno topljivi i mobilni, dok u reducirajućim uvjetima može doći do redukcije u U(IV) i precipitacije, čime se smanjuje njegova mobilnost u okolišu (27).

1.3. Povezanost arsena i urana s rakom bubrega i mokraćnog mjehura

Iako su arsen i uran kemijski i biološki različiti elementi, zajedničko im je da se nakon ingestije, osobito putem vode za piće, distribuiraju krvotokom te se u različitoj mjeri izlučuju bubrezima. Zbog toga je uroportski sustav biološki relevantna meta njihove toksičnosti. Za arsen postoji čvrsta epidemiološka povezanost s karcinogenezom mokraćnog mjehura, dok su podaci o povezanosti s rakom bubrega manje konzistentni, ali upućuju na moguću povezanost u populacijama s visokom razinom izloženosti. Uran se, s druge strane, primarno povezuje s nefrotoksičnošću, dok je njegova karcinogenost pri okolišnim razinama izloženosti predmet znanstvene rasprave i zahtijeva opreznju interpretaciju, osobito u ekološkim studijama (28,29).

1.3.1. Rak bubrega (C64)

Rak bubrega, najčešće karcinom bubrežnih stanica (engl. *Renal cell carcinoma*-RCC), ubraja se među češće solidne tumore odrasle populacije. Čini približno 2–3 % svih malignih tumora u odraslih i jedan je od deset najčešćih karcinoma u muškaraca. Češći je u muškaraca nego u žena, s omjerom incidencije oko 2 : 1, a najčešće se dijagnosticira u dobi između 60 i 70 godina. Najviša incidencija zabilježena je u razvijenim zemljama Europe, Sjeverne Amerike i Australije, dijelom zbog veće prevalencije čimbenika rizika, ali i zbog bolje dostupnosti dijagnostičkih metoda (30–32).

Poznati čimbenici rizika za razvoj raka bubrega uključuju pušenje, pretilost, arterijsku hipertenziju, kroničnu bubrežnu bolest, dugotrajnu hemodijalizu, određene nasljedne sindrome (npr. von Hippel–Lindauov sindrom) kao i profesionalnu izloženost pojedinim kemikalijama poput trikloretilena. U etiološkom smislu, interes za okolišne onečišćivače u vodi za piće proizlazi iz njihove dugotrajne, niskodozne izloženosti velikog dijela populacije (33,34).

Za arsen, izvješća IARC i dio epidemioloških studija navode bubreg kao potencijalno ciljno mjesto karcinogenog djelovanja. Smatra se da su učinci posredovani kombinacijom genotoksičnih i epigenetskih mehanizama, oksidativnog stresa i poremećaja staničnih signalnih puteva. Međutim, za razliku od raka mokraćnog mjehura, dokazi za uzročnu povezanost arsena s rakom bubrega slabiji su i manje dosljedni (3,28,35).

Na molekularnoj razini, arsen može inducirati malignu transformaciju bubrežnih stanica putem povećanja oksidativnog stresa, oštećenja DNA i epigenetskih promjena, uključujući aberantnu DNA metilaciju i disregulaciju tumorskih supresorskih gena. Eksperimentalni modeli pokazuju da

kronična izloženost arsenu može transformirati renalne matične stanice u stanice s obilježjima karcinoma, uz povećanu ekspresiju markera invazivnosti i stanične stemnosti (36,37).

U mehanizmu nastanka raka bubrega, arsen ne djeluje kao klasični izravni mutagen, već karcinogene učinke ostvaruje kombinacijom kroničnog genotoksičnog stresa, epigenetske deregulacije i poremećaja signalnih putova uključenih u diferencijaciju i regeneraciju bubrežnog epitela. Eksperimentalni modeli pokazali su da dugotrajna izloženost anorganskom arsenu može transformirati renalne matične i progenitorske stanice u stanice s obilježjima malignog fenotipa (35).

Jedan od ključnih mehanizama uključuje indukciju oksidativnog stresa, s povećanom produkcijom reaktivnih kisikovih vrsta i posljedičnim oštećenjem DNA. Arsen remeti mehanizme popravka DNA vezanjem na sulfhidrilne skupine proteina uključenih u održavanje genomske stabilnosti, što dovodi do akumulacije mutacija i kromosomske nestabilnosti (28,36).

Na epigenetskoj razini, kronična izloženost arsenu uzrokuje aberantnu metilaciju DNA i promjene u ekspresiji gena ključnih za razvoj bubrega, uključujući *WT1*, *WNT4* i *BMP7*. Ove promjene povezane su s poremećajem diferencijacije i održavanjem stanica u stanju pojačane proliferacije i staničnog stem potencijala (35,37). Također, arsen modulira signalne puteve povezane s upalom i reguliranom staničnom smrću što pokazuju istraživanja koja ukazuju na ulogu NLRP3-posredovane piroptoze u bubrežnim stanicama, pri čemu niske doze arsena inhibiraju piroptozu i potiču proliferaciju, dok visoke doze induciraju citotoksičnost i oštećenje tkiva. Ovaj učinak ovisan o dozi može doprinijeti inicijaciji i progresiji karcinoma bubrega (35).

Najčešći histološki tip raka bubrega je karcinom bubrežnih stanica, koji čini oko 85 % svih slučajeva. Potječe od epitela proksimalnih tubula i u svojoj patogenezi često uključuje poremećaje u signalnim putevima povezanim s hipoksijom, osobito akumulaciju čimbenika induciranih hipoksijom (HIF), što dovodi do pojačane angiogeneze putem vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) i stvaranja mikrookoliša pogodnog za rast tumora (38). Klinička slika raka bubrega u ranim stadijima često je nespecifična ili asimptomatska. Klasična trijada simptoma – lumbalna bol, hematurija i palpabilna masa – prisutna je u manje od 10 % bolesnika. Porast incidencije raka bubrega dijelom se pripisuje i češćoj uporabi slikovnih dijagnostičkih metoda, poput ultrazvuka, kompjutorizirane tomografije i magnetske rezonancije, koje omogućuju ranije otkrivanje tumora. Ako se bolest dijagnosticira u ranom stadiju, petogodišnje preživljenje može doseći i do 90 % (39,40).

1.3.2. Rak mokraćnog mjehura (C67)

Rak mokraćnog mjehura čini oko 3 % svih malignih bolesti i značajno je češći u muškaraca nego u žena, s omjerom incidencije približno 3 : 1. Najčešće se dijagnosticira u dobi između 60 i 70 godina, a najveća učestalost zabilježena je u zemljama Sjeverne Amerike i Europe (32,41).

Najvažniji i najčešći čimbenik rizika za razvoj raka mokraćnog mjehura je pušenje. Pušači imaju tri do četiri puta veći rizik razvoja ove bolesti u odnosu na nepušače. Pušenje uzrokuje genetske promjene u urotelu, osobito u genima *TP53*, *FGFR3* i *RB1*, koje su povezane s različitim podtipovima i stupnjevima agresivnosti tumora (42,43).

Profesionalna izloženost kemikalijama, posebice aromatskim aminima u industriji boja, gume, kože i kemikalija, također značajno povećava rizik razvoja raka mokraćnog mjehura. U pojedinim regijama svijeta, poput Egipta, visoka učestalost raka mokraćnog mjehura povezuje se s kroničnom infekcijom parazitom *Schistosoma haematobium* (44).

Prema okolišnoj izloženosti anorganski arsen u vodi za piće jedan je od rijetkih kontaminanata za koji postoji snažan znanstveni konsenzus o karcinogenosti za mokraćni mjehura kod ljudi. IARC ga svrstava u skupinu 1 karcinogena, s jasnom epidemiološkom povezanošću između razine i trajanja izloženosti te rizika razvoja raka mokraćnog mjehura (3,45,46).

Mehanizmi djelovanja arsena u karcinogenezi mokraćnog mjehura uključuju indukciju oksidativnog stresa, oštećenje DNA, epigenetske promjene te aktivaciju signalnih puteva koji potiču proliferaciju, angiogenezu i epitelno-mezenhimalnu tranziciju. Arsen također potiče metaboličko reprogramiranje tumorskih stanica i povećava njihovu invazivnost i otpornost na stanični stres (47–49). Za razliku od raka bubrega, molekularni mehanizmi djelovanja arsena u karcinogenezi mokraćnog mjehura znatno su bolje istraženi i epidemiološki potvrđeni. Arsen je klasificiran kao karcinogen skupine 1 za rak mokraćnog mjehura, s jasnom povezanosti između razine i trajanja izloženosti i rizika razvoja bolesti (3,45,46).

Na genotoksičnoj razini, arsen inducira oksidativna oštećenja DNA, uključujući povećanje oksidacijskih adukata poput 8-OHdG (engl. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine), te remeti sustave popravka DNA, što dovodi do akumulacije mutacija u urotelnim stanicama (28,36). Ujedno, arsen ne uzrokuje specifične mutacijske potpise, već djeluje kao promotor karcinogeneze kroz kronični stanični stres.

Epigenetski mehanizmi imaju središnju ulogu u arsenom induciranoj transformaciji urotela. Opisane su globalne i genski specifične promjene u metilaciji DNA, modifikacijama histona i

ekspresiji mikroRNA, koje imaju za posljedicu deregulaciju onkogenih i tumorskih supresorskih gena. Ove promjene pridonose stabilnosti malignog fenotipa i otpornosti na staničnu smrt (36,37). Na razini signalnih putova, kronična izloženost arsenu dovodi do aktivacije PI3K/AKT/mTOR, MAPK i STAT3 osi, kao i do aberantne aktivacije HER2 i β -katenin/c-Myc signalizacije. Posljedice su pojačana proliferacija, migracija i angiogeneza urotelnih stanica, uz poticanje epitelno-mezenhimalne tranzicije i povećanje invazivnosti tumora (47).

Metaboličko reprogramiranje predstavlja dodatni važan mehanizam. Arsen aktivira HIF-1 α i mTORC1 signalizaciju, čime se potiče glikoliza, povećava unos glukoze i omogućuje akumulacija onkometabolita, što pogoduje rastu tumora u hipoksičnom mikrookolišu mokraćnog mjehura (48,49).

Novija istraživanja ukazuju na ulogu endoplazmatskog stresa i aktivacije njegovog sustava kontrole kvalitete - *unfolded protein response* (UPR) koji reagira na stres u endoplazmatskom retikulumu (ER). Arsen putem modulacije UPR-a omogućuje preživljavanje stanica u uvjetima kroničnog stresa, čime dodatno potiče malignu transformaciju i progresiju raka mokraćnog mjehura (48,49).

Rani stadiji raka mokraćnog mjehura imaju relativno dobru prognozu, s petogodišnjom stopom preživljenja većom od 75 %. Posljednjih desetljeća u mnogim je zemljama zabilježen pad incidencije, što se pripisuje smanjenju prevalencije pušenja i unapređenju preventivnih i dijagnostičkih strategija (50).

1.4. Istraživanje citotoksičnosti arsena na staničnoj liniji bubrežnog epitela pasa (MDCK1)

Stanična linija MDCK1 (*Madin–Darby Canine Kidney*) potječe iz epitelnih stanica distalnog tubula bubrega psa i predstavlja jedan od najčešće korištenih *in vitro* modela za proučavanje funkcije bubrežnog epitela, transportnih mehanizama i nefrotoksičnog djelovanja različitih kemijskih spojeva. Zbog svoje stabilnosti, reproducibilnog rasta i sposobnosti formiranja polariziranog epitela, MDCK stanice omogućuju detaljnu analizu učinaka toksina, uključujući arsen, na staničnu morfologiju, metabolizam, oksidativni stres i mehanizme stanične smrti (51).

MDCK stanice karakterizira sposobnost formiranja polariziranog epitelnog monosloja s jasno definiranim apikalnim i bazolateralnim domenama. Stanice ili domene razvijaju funkcionalne čvrste međustanične spojeve (engl. *tight junctions*, lat. *zonula occludens*), uključujući proteine ZO-1 i okludine, čime se uspostavlja epitelna barijera koja u velikoj mjeri oponaša strukturu i

funkciju bubrežnog tubularnog epitela *in vivo* (51,52). Zahvaljujući tim svojstvima, MDCK stanice široko se primjenjuju u toksikološkim i farmakološkim istraživanjima, osobito u procjeni učinka nefrotoksičnih tvari na integritet epitela i ionski transport.

MDCK stanična linija predstavlja vrijedan i dobro validiran *in vitro* model za proučavanje toksičnih učinaka arsena na bubrežni epitel. Dostupni eksperimentalni podaci pokazuju da arsen inducira oksidativni stres, mitohondrijsku disfunkciju i staničnu smrt, što se očituje izraženim morfološkim i funkcionalnim oštećenjima epitela (53). Razumijevanje ovih mehanizama ključno je za procjenu okolišnih zdravstvenih rizika i razvoj preventivnih i terapijskih strategija protiv arsenom inducirane nefrotoksičnosti. Arsen povećava intracelularnu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*), što dovodi do oksidativnog oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Ovi procesi imaju za posljedicu narušavanje stanične homeostaze i funkcionalnog integriteta stanice. Arsen interferira s mitohondrijskim lancem prijenosa elektrona, smanjujući sintezu adenzin-trifosfata (ATP) i uzrokujući energetske stres, stoga dolazi do poremećaja mitohondrijskog membranskog potencijala i aktivacije signalnih puteva stanične smrti. Izloženost arsenu modulira niz signalnih puteva, uključujući MAPK, PI3K/Akt i NF- κ B, koji sudjeluju u regulaciji proliferacije, upalnih odgovora i apoptoze. Aktivacija ovih puteva ovisi o koncentraciji arsena i trajanju izloženosti. Pri nižim koncentracijama arsen pretežno inducira apoptozu, dok pri višim koncentracijama dolazi do nekroze, obilježene brzim gubitkom integriteta stanične membrane i nekontroliranim oslobađanjem intracelularnog sadržaja (54).

Rezultati *in vitro* istraživanja ukazuju da učinci arsena na MDCK stanice ovise o koncentraciji i vremenu izloženosti. Opisane promjene uključuju: smanjenje adhezije stanica, fragmentaciju citoskeleta, poremećaj ionskog transporta, povećanje permeabilnosti epitelne barijere.

Čak i niske koncentracije arsena (0,1–1 μ M) uzrokuju promjene u polarizaciji epitela, dok više koncentracije (>10 μ M) dovode do izraženog oksidativnog stresa, oštećenja mitohondrija i brzog staničnog kolapsa. Morfološke promjene uključuju zaobljavanje stanica, gubitak međustaničnih spojeva, odvajanje od podloge i smanjenje gustoće epitelne monosloja. Funkcionalno se očituju smanjena transportna sposobnost epitela, poremećaj ionske homeostaze i povećana propusnost epitelne barijere (55,56).

1.5. Djelovanje arsena na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE)

Acetilkolinesteraza (E.C. 3.1.1.7., AChE) je serinska esteraza koja hidrolizira neurotransmiter acetilkolin u kolinergičnoj sinapsi u centralnom i u perifernom živčanom sustavu i time kontrolira prijenos živčanih impulsa. Aktivnost AChE je od iznimne važnosti za očuvanje homeostaze organizma. Inhibicijom aktivnosti AChE dolazi do nakupljanja acetilkolina i poremećaja u prijenosu živčanih impulsa (desenzibilizacija receptora) što se manifestira tzv. kolinergičkom krizom. Ova kriza koja uključuje mučnine, salivaciju, paralizu dišnog sustava, kao krajnji ishod ima smrt organizma. Inhibitori AChE mogu biti različiti prirodni spojevi kao što su npr. alkaloidi (huperzin A), karbamati (fizostigmin) i peptidi (fascikulin iz otrova zelene mambe) ili sintetski spojevi, u koje se ubrajaju arsen i visokotoksični organofosforni spojevi koji se koriste kao pesticidi i živčani bojni otrovi (57). Utjecaj arsena na acetilkolinesterazu (AChE) je inhibicija aktivnosti enzima. Eksperimentalni podaci iz različitih modela (miševi, štakori, amfipodi) pokazuju da izloženost arsenitu ili arsenatima dovodi do smanjenja aktivnosti AChE u mozgu i serumu, što je povezano s neurotoksičnim efektima, poremećajem kognitivnih funkcija i motoričke koordinacije (58). Mehanizam inhibicije uključuje direktnu interakciju arsena s funkcionalnim grupama enzima, pri čemu arsen može formirati adukte s tirozinskim reziduima u aktivnom mjestu AChE (59).

U nekim slučajevima, kronična izloženost arsenu može dovesti do reverzibilnih promjena u aktivnosti AChE, ali kontinuirana izloženost rezultira trajnim neurokemijskim i bihevioralnim poremećajima (60). Osim inhibicije, zabilježeni su i slučajevi povećanja aktivnosti AChE u određenim regijama mozga kod životinja izloženih arseniku, što je povezano s neuroinflamacijom i kognitivnim deficitima (61). Međutim, dominantni učinak je smanjenje aktivnosti acetilkolinesteraze. Smanjena aktivnost AChE može se koristiti kao biomarker izloženosti arsenu i njegovih neurotoksičnih učinaka. Ovi učinci su ovisni o dozi i smatra se da je inhibicija AChE izraženija pri višim koncentracijama arsena (62,63). Kronično izlaganje arsenu kod pilića izloženih endosulfanu cikloidienskom insekticidu iz skupine organoklorina dovodi do smanjenja aktivnosti acetilkolinesteraze i u niskim koncentracijama (64), ali i inhibira aktivnost AChE u serumu (65).

1.6. Regionalni kontekst istočne Hrvatske

Istočna Hrvatska, kao dio Panonskog bazena, geološki i hidrogeološki pripada području u kojem prevladavaju aluvijalni i deltni sedimenti s reduktivnim uvjetima, što pogoduje mobilizaciji arsena u podzemnim vodama. Takvi uvjeti, u kombinaciji s prisutnošću željeznih i manganovih oksida kao i organskih tvari, stvaraju povoljan okoliš za desorpciju arsena i njegov prijelaz u vodenu fazu (66). Istraživanja provedena na području istočne Hrvatske pokazala su da su vodonosnici povezani sa slivovima Drave i Dunava skloniji povišenim koncentracijama arsena u odnosu na one povezane sa slivom Save. Ujević i suradnici opisali su važnu ulogu reduktivnih uvjeta i sedimentoloških karakteristika u procesu mobilizacije arsena u dubokim vodonosnicima istočne Hrvatske (19,67). Uz arsen, za regionalni kontekst važno je i postojanje geogenih izvora urana, osobito na području Papuka i Krndije, gdje su ranija geološka istraživanja opisala pojavu uranskih mineralizacija u metamorfnj podlozi. Iako koncentracije urana u vodi za piće uglavnom ne prelaze međunarodne referentne vrijednosti, lokalne litološke značajke mogu rezultirati mjerljivim opterećenjem pojedinih izvora vodoopskrbe (9,68). Studije biomonitoringa provedene u istočnoj Hrvatskoj ukazuju na to da su koncentracije urana u biološkim uzorcima stanovništva uglavnom niske, ali da se izloženost putem vode pri takvim koncentracijama prvenstveno odražava u urinu, dok su koncentracije u kosi i serumu slabije korelirane s unosom. Takvi nalazi naglašavaju važnost odabira odgovarajućih bioloških matrica u procjeni kronične izloženosti (10,69).

Znanstveni pristup istraživanju utjecaja arsena i urana na zdravlje stanovništva istočne Hrvatske polazi od pretpostavke da je voda za piće dominantan put unosa arsena u pogođenim područjima, dok je za uran nužno razlučiti doprinos geogenih izvora i specifičnosti njegove biokinetike. Ekološke analize odnosa između koncentracija u okolišu, biološkim uzorcima i učestalosti malignih bolesti ne dokazuju uzročnost, ali mogu poslužiti kao vrijedna osnova za daljnja analitička i kohortna istraživanja uz kontrolu poznatih *confounding* čimbenika (mješajućih ili zbunjujućih čimbenika, vanjskih varijabli koje mogu biti povezani s uzrokom i ishodom bolesti) poput pušenja, dobi, spola, profesionalne izloženosti i socioekonomskog statusa (70). Unatoč dugogodišnjim istraživanjima prisutnosti arsena u podzemnim vodama Panonskog bazena, još uvijek postoji vrlo ograničen broj integriranih koje istodobno povezuju okolišni monitoring, biomonitoring stanovništva i epidemiološke podatke o malignim bolestima uropoetskog sustava, uz eksperimentalnu procjenu toksičnosti. Ova disertacija ima za cilj upravo takav integrirani pristup.

2. HIPOTEZA

1. Stanovnici s ispitivanog područja koji su izloženi arsenu i uranu u vodi imaju veće vrijednosti arsena i urana u serumu, urinu i kosi.
2. Na području Papuka gdje je bilo zabilježeno prisustvo geogenog urana izmjerene su veće vrijednosti urana u vodi i biološkim uzorcima.
3. Stanovnici s ispitivanog područja na kojima su izmjerene povišene vrijednosti arsena u vodi i biološkim uzorcima imaju veću učestalost karcinoma bubrega i mokraćnog mjehura.
4. Stanovnici s ispitivanog područja na kojima su izmjerene povišene vrijednosti urana u vodi i biološkim uzorcima imaju veću učestalost karcinoma bubrega i mokraćnog mjehura.
5. Epitelne stanice bubrežne linije MDCK 1 će pokazati ovisnost o dozi i vremenu izlaganja arsenu te će s povećanjem koncentracije arsena u vodi doći do povećanja proliferacije stanica i smanjenja apoptoze uz porast koncentracije acetilkolinesteraze u *in vitro* uvjetima.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti vrijednosti arsena i urana u serumu, urinu i kosi ispitanika u naseljima
2. Odrediti vrijednosti arsena i urana u vodi za piće u javnoj vodoopskrbi i ostalim izvorima vode (bunari, vodotoci) u ispitivanim naseljima
3. Odrediti 19-godišnju kumulativnu incidenciju karcinoma bubrega i mokraćnog mjehura za svako ispitivano naselje
4. Usporediti izmjerene vrijednosti radi identifikacije naselja sa izmjerenim povišenim arsenom i uranom kako bi se utvrdila moguća povezanost između izmjerenih vrijednosti arsena i urana u vodi, populaciji i tumora uropoetskog sustava.
5. Utvrditi postojanje nefrotoksičnog učinka arsena *in vitro* na modelu stanica bubrežnog epitela.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitivano područje

Disertacija predstavlja dio projekta „Istraživanje dugotrajnih posljedica rata na zdravlje populacije“ Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske.

Ispitivano područje predstavljaju naselja na području Osječko-baranjske, Virovitičko-podravske i Požeško-slavonske županije koji predstavljaju dio sliva Drave i Dunava, kao i naselja koja okružuju planinu Papuk.

Istraživanja su urađena u skladu s etičkim načelima i preporukama Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku, uz potpisani obrazac informiranog pristanka za svakog od ispitanika.

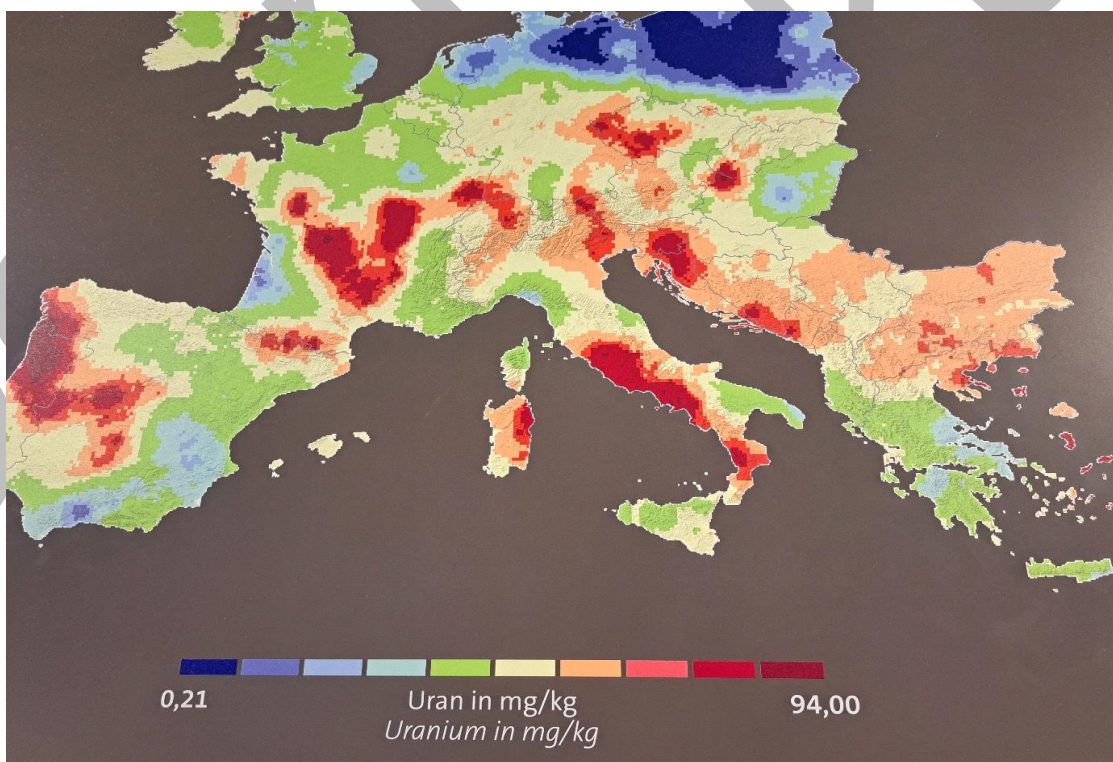
Ispitivana područja se dijele u četiri skupine:

1. Ispitivana skupina: naselja u kojima su dosadašnjim istraživanjima utvrđene povišene vrijednosti arsena u vodi: grad Osijek, općine Čepin i Vladislavci.
2. Kontrolna skupina: naselja u kojima su vrijednosti arsena u pitkoj vodi bile unutar maksimalno dozvoljenih koncentracija prema Pravilniku o kvaliteti vode za piće: grad Našice, općine Dalj, Voćin, Čačinci i Velika.
3. Ispitivana skupina: naselja koja okružuju područja bogata geogenim uranom koji je i zabilježen u prethodnim istraživanjima (područje „Radlovačke serije“, šire područje Parka prirode Papuk), Voćin, Našice, Čačinci i Velika (Slika 2).
4. Kontrolna skupina: naselja na područjima u kojima nisu zabilježene povišene koncentracije urana (Osijek, Dalj, Čepin i Vladislavci).

Prema Popisu stanovništva Državnog zavoda za statistiku Republike Hrvatske iz 2011. godine, ispitivana naselja su imala slijedeći broj stanovnika: Osijek- 108 048, Čepin- 11 571, Vladislavci- 1882, Dalj- 3937, Našice- 16 224, Voćin- 2382, Čačinci- 2802 i Velika- 5607 stanovnika (71). Ispitivano područje je prikazano na Slici 1.



Slika 1. Ispitivano područje s označenim naseljima



Slika 2. Mapa Europe sa prikazanim područjima bogatim geogenim uranom na kojoj se ističe područje Papuka iz Prirodoslovnog muzeja u Beču (izvor fotografije Marina Vidosavljević).

4.2. Prikupljanje i analiza uzoraka vode

Ukupno je prikupljen 81 uzorak vode za piće iz sustava javne vodoopskrbe i privatnih zdenaca, u skladu s unaprijed definiranim planom uzorkovanja, iz svih ispitivanih naselja. Uzorci vode pohranjeni su u polietilenske bočice volumena 250 mL, koje su prethodno dekontaminirane 24-satnim namakanjem u 10 %-tnoj dušičnoj kiselini (HNO_3) na sobnoj temperaturi. Nakon dekontaminacije bočice su ispražnjene, isprane deioniziranom vodom i pohranjene u polietilenske vrećice do uzorkovanja. Prilikom uzorkovanja, uzorci vode zakiseljeni su dodatkom 10 mL/L koncentrirane dušične kiseline (HNO_3 , 65 %) radi stabilizacije elemenata u tragovima te su zaštićeni od vanjskog onečišćenja. Uzorci su isti dan transportirani u laboratorij, gdje su pohranjeni na $-30\text{ }^\circ\text{C}$ do analize. Prije analize uzorci su odmrzavani na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata te su analizirani izravno metodom ICP-MS, bez dodatne kemijske obrade.

4.2. Analiza bioloških uzoraka (serum, urin i kosa)

4.2.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 492 odrasla i punoljetna ispitanika. Od toga je 391 ispitanik s područja Osječko-baranjske županije (Osijek, Našice, Vladislavci, Čepin i Dalj), 79 ispitanika s područja Virovitičko-podravske županije (Čačinci i Voćin) te 22 ispitanika s područja Požeško-slavonske županije (Velika). Kod ispitanika će se analizirati koncentracije arsena i urana prema spolu i dobi u različitim ispitivanim naseljima. Ispitanici su podijeljeni u tri dobne skupine: 1. dobna skupina: 18-39 godina, 2. dobna skupina: 40-59 godina i treća dobna skupina obuhvaćala je ispitanike starije od 60 godina.

Svi ispitanici ispunili su strukturirani anketni upitnik koji je obuhvaćao osnovne demografske podatke (dob, spol), podatke o životnim navikama te moguće profesionalne i okolišne izloženosti metalima i metaloidima. Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima i odobrenjem Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku (broj 2158/61-02-82/2-06) i Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu (klasa 01-18/23-02-2/1, ur.br. 100-21/23-16).

4.3. Prikupljanje, obrada i analiza bioloških uzoraka

Uzorci kose uzimani su sa zatiljne regije pomoću škara od nehrđajućeg čelika (širine približno 1 cm i duljine 3 cm) te pohranjeni u polietilenske vrećice. Uzorci su oprani destiliranom vodom, namočeni u acetonu tijekom jednog sata, deset puta isprani deioniziranom vodom i sušeni na zraku 24 sata. Na 0,1 g uzorka dodano je 1 mL 65 % HNO_3 (Ultraapur, Merck KGaA, Njemačka), nakon čega je uzorak digestiran u mikrovalnoj pećnici (Ethos D Microwave Labstation Milestone, Danska). Nakon hlađenja uzorci su razrijeđeni do volumena 12 mL i analizirani masenim spektrometrom s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS ELAN DRC-e, Perkin Elmer SCIEX, SAD). Uzorci urina prikupljeni su kao prvi jutarnji urin u polietilenske bočice. Uzorci su analizirani izravno ICP-MS metodom prema standardiziranom protokolu.

Uzorci krvi prikupljeni su venepunkcijom, nakon čega je centrifugiranjem izdvojen serum. Serum je pohranjen u krioepruvete i skladišten na $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize. Prije analize uzorci su razrijeđeni 1 % HNO_3 . Sav korišteni laboratorijski pribor prethodno je dekontaminiran namakanjem u 10 % HNO_3 i ispiran deioniziranom vodom. Instrument je redovito kalibriran vanjskim standardima uz primjenu internih standarda (Y, In, Tb i Bi). Analitičke metode validirane su primjenom certificiranih referentnih materijala i sudjelovanjem u međunarodnim interkalibracijskim ispitivanjima. Instrument je kalibriran nakon svakog 12.-tog uzorka, vanjskim standardom (71-*Element Group Multi Element Standard Solution*, Inorganic Ventures, USA), uz primjenu internih standarda s elementima Y, In, Tb i Bi. Interkalibracija (međunarodna laboratorijska provjera) provedena je u suradnji s IFA Tulin (*Department of the University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, in cooperation with the Vienna University of Technology and the University of Veterinary Medicine*). Analitičke metode bile su validirane standardnim referentnim materijalima (ICP *Multi Element Standard Solution X CertiPUR for Surface Water Testin*, Merck, Njemačka), te standardnim uzorcima (*Trace Elements Urine Blank* i *Trace Elements Urine*, SERO AS, Norveška). Poliatomske interferencije s elementima Fe, As, Cr, uklanjane su u dinamičkoj reakcijskoj komori instrumenta uz pomoć reaktivnog plina metana (CH_4).

4.4. Epidemiološki podaci

U istraživanju pojavnosti raka bubrega (C64) i mokraćnog mjehura (C67) su korišteni podatci Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Zagrebu za period 01.01.2000- 31.12.2018.

godine prema sijelu bolesti uz primjenu Desete revizije MKB (MKB 10). S obzirom da se radi o dugotrajnom razdoblju kao mjerodavan uzet je Popis stanovništva iz 2011. godine za ispitivana naselja te je izračunata ukupna incidencija na 100.000 stanovnika kroz navedeni period (71). Obzirom na mali broj oboljelih, za svako ispitivano naselje pojavnost je izračunata pomoću formule i izražena kao stopa (na 100.000 stanovnika), radi lakše komparacije sa relevantnim istraživanjima.

$$Učestalost\ karcinoma = \frac{Broj\ oboljelih\ tijekom\ 19\ godina}{Broj\ stanovnika} \times 100,000$$

4.5. Ispitivanje citotoksičnosti arsenovog trioksida na staničnoj liniji bubrežnog epitela MDCK1

4.5.1. Stanična linija i uvjeti uzgoja

Za ispitivanje citotoksičnih i antiproliferativnih učinaka arsenovog trioksida (As_2O_3) korištena je stanična linija epitelnih stanica distalnog tubula bubrega psa Madin–Darby Canine Kidney, sublinija MDCK1 (ECACC 85011435; UK aHSA, Porton Down, Salisbury, UK). Stanice su korištene u 24.–26. pasaži. Stanice su uzgajane u Dulbecco modificiranom Eagle mediju (DMEM; Gibco, EU) dopunjenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma inaktiviranog toplinom (FBS; Gibco, EU), 2 mM L-glutamina, penicilin/streptomycin (100 U/mL i 0,1 mg/mL). Kultivacija je provedena u vlažnoj atmosferi pri 37 °C i 5 % CO_2 u CO_2 inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Prije svakog pokusa broj živih stanica procijenjen je bojenjem tripan plavilom.

4.5.2. MTT test stanične održivosti/proliferacije

Stanična održivost i proliferacija procijenjene su kolorimetrijskim MTT testom koji se temelji na redukciji žutog tetrazolijevog reagensa MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) u netopljivi ljubičasti formazan u metabolički aktivnim stanicama. Nakon otapanja formazana u organskom otapalu, apsorbancija se mjeri spektrofotometrijski, pri čemu je signal proporcionalan broju metabolički aktivnih stanica. MDCK1 stanice nasađene su u ploče s 96 jažica ravnog dna (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Austrija) u gustoći 2×10^4 stanica/mL i inkubirane 24 sata radi adherencije. Arsenov trioksid (As_2O_3 , Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany)

pripremljen je otapanjem u sterilnoj destiliranoj vodi. Radne otopine pripremane su svježe na dan eksperimenta. Stanice su tretirane As_2O_3 u finalnim koncentracijama od 10, 20, 50, 100 i 200 μgL^{-1} , kroz 48, 72 i 96 sati. Po isteku inkubacije medij je uklonjen, a u svaku jažicu dodana je MTT otopina (5 mgmL^{-1}). Stanice su potom inkubirane 4 sata pri 37 °C, nakon čega su nastali formazanski kristali otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO). Apsorbancija je mjerena na čitaču mikrotitarskih pločica iMark™ (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) pri valnoj duljini 595 nm. Svi pokusi provedeni su u tri neovisna ponavljanja, pri čemu je svaki uzorak analiziran u triplicatu. Kontrolnu skupinu činile su netretirane MDCK1 stanice, a slijepa proba sadržavala je samo MTT reagens i DMSO (bez stanica). Postotak stanične proliferacije/održivosti izračunat je u odnosu na kontrolu prema standardnoj formuli:

$$\% = \frac{A_{\text{uzorka}} - A_{\text{slijepa proba}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{slijepa proba}}} \times 100$$

Ispitivanje citotoksičnosti arsenovog trioksida primjenom MTT testa provedeno je na Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskog fakulteta u Osijeku.

U slučaju značajnog inhibicijskog učinka As_2O_3 na proliferaciju MDCK1 stanica, planirana je dopunska procjena mehanizama stanične smrti određivanjem apoptoze bojenjem aneksinom V-FITC i propidijevim jodidom, uz analizu protočnom citometrijom ili fluorescentnom mikroskopijom, sukladno standardnim protokolima. Obzirom da se navedeni učinak nije postigao, nisu rađene dopunske analize (72-75).

4.5.4. Istraživanje utjecaja As_2O_3 na aktivnost ljudske acetilkolinesteraze

Acetilkolinesteraza (E.C. 3.1.1.7., AChE) je serinska esteraza koja hidrolizira neurotransmiter acetilholin u kolinergičnoj sinapsi u centralnom i u perifernom živčanom sustavu i time kontrolira prijenos živčanih impulsa. Aktivnost AChE je od iznimne važnosti za očuvanje homeostaze organizma. Inhibicijom aktivnosti AChE dolazi do nakupljanja acetilkolina i poremećaja u prijenosu živčanih impulsa (desenzibilizacija receptora) što se manifestira tzv. kolinergičkom krizom. Ova kriza koja uključuje mučnine, salivaciju, paralizu dišnog sustava, kao krajnji ishod ima smrt organizma. Inhibitori AChE mogu biti različiti prirodni spojevi kao što su npr. alkaloidi

(huperzin A), karbamati (fizostigmin) i peptidi (fascikulin iz otrova zelene mambe) ili sintetski spojevi, u koje se ubrajaju arsen i visokotoksični organofosforni spojevi koji se koriste kao pesticidi i živčani bojni otrovi. U pokusu određivanja aktivnosti AChE korišten je 0,1 mol/L natrijev fosfatni pufer pH 7,4 pripremljen titracijom 0,1 mol L⁻¹ otopina soli Na₂HPO₄ (Kemika, Hrvatska) i NaH₂PO₄ (Kemika, Hrvatska), pri 25 °C. Za određivanje pH korišten je pH-metar SevenEasy pH s InLab® 413 elektrodom (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska), koji je baždaren standardnim otopinama pufera pH 4,01 ± 0,02, pH 7,00 ± 0,02 i pH 9,21 ± 0,02 (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska). Kao supstrat AChE korišten je acetiltiokolin jodid (ATCh; Sigma-Aldrich, SAD) ishodne otopine 20 mmol mL⁻¹ pripremljene u destiliranoj vodi. Reagens 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB, Sigma-Aldrich, SAD), korišten za određivanje aktivnosti enzima Ellmanovom metodom, priređen je kao 6,0 mmol/mL otopina u fosfatnom puferu. Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće. As₂O₃ je pripremljen kao ishodna otopina od 0,25 mg mL⁻¹ u destiliranoj vodi uz lagano zagrijavanje do 30 °C sve do potpune otopljenosti. Iz ishodne otopine pripremljena je i otopina 0,125 mg mL⁻¹ razrjeđenjem 1:1 u destiliranoj vodi za potrebe mjerenja.

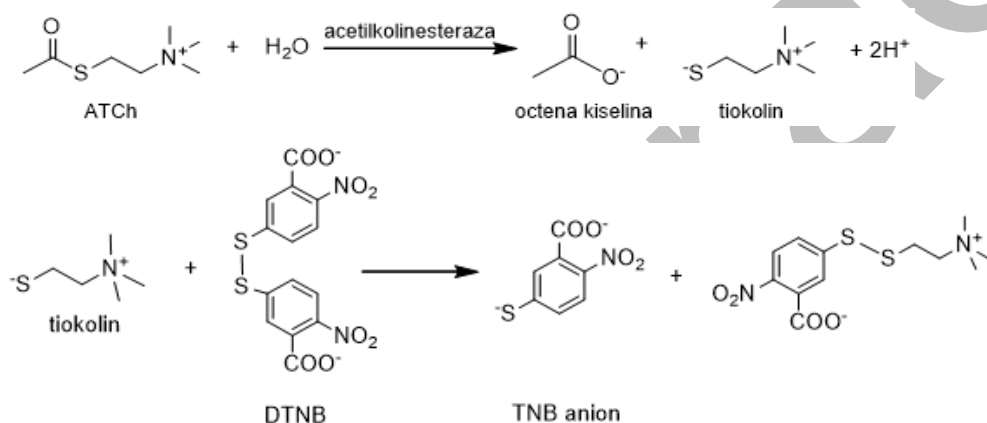
4.5.4.1. Enzimski preparat

Kao izvor ljudske AChE korišteni su eritrociti dobiveni iz uzoraka heparinizirane krvi. Eritrociti su izolirani centrifugiranjem (20 min, 2500 okretaja u minuti), nakon čega su tri puta isprani s fiziološkom otopinom kako bi se uklonila eventualno zaostala plazma. Isprani eritrociti razrijeđeni su fosfatnim puferom do volumena uzorka pune krvi. Uzorci eritrocita čuvani su do upotrebe na -20 °C. Uzorci su odmrzavani i razrjeđivani, ovisno o pokusu, u fosfatnom puferu neposredno prije pokusa. Svi uzorci heparinizirane krvi dobiveni su od zdravih dobrovoljaca u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb,

4.5.4.2. Određivanje aktivnosti kolinesteraza metodom po Ellmanu

Aktivnost AChE praćena je spektrofotometrijski metodom po Ellmanu pri 25 °C uz tiokolinski supstrat ATCh i DTNB kao tiolni reagens. Ova se metoda temelji na indirektnom mjerenju enzimske aktivnosti. Naime, enzimskom hidrolizom tiokolinskog supstrata nastaje tiokolin (TCh) koji po nastanku reagira s tiolnim reagensom DTNB-om. U reakciji nastaje anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB) koji daje žuto obojenje reakcijskoj smjesi. Porast apsorbancije (ΔA/min) koji je proporcionalan je aktivnosti enzima, praćen je u ovom slučaju pri valnoj duljini

od 436 nm a ne standardno 412 nm kako bi se smanjila početna absorbancija uzorka uzrokovana hemoglobinom. Slika 3 prikazuje reakciju Ellmanove metode između tiokolina nastalog hidrolizom ATCh i DTNB-a. Sva mjerenja Ellmanovom metodom rađena su spektrofotometrom CARY UV-VIS Multicell Peltier (Agilent, SAD) s termostatiranim kućištem pri 25 °C u kivetama s optičkim putem od 1 cm.



Slika 3. Ellmanova metoda

Reakcijska smjesa za određivanje enzimске aktivnosti sadržavala je 30 $\mu\text{mol/L}$ DTNB, fosfatni pufer, enzim (400 puta konačno razrjeđenje eritrocita). Razrjeđenje eritrocita odabrano je tako da u mjerenju promjena absorbancije u vremenu ($\Delta A/\text{min}$) iznosi oko 0,1 kod koncentracije tiokolinskog supstrata od 1,0 mmol L^{-1} (25 °C, pH 7,4). Nakon dodatka enzima u reakcijsku smjesu dodan je As_2O_3 u konačnim koncentracijama 0,025, 0,0125, 0,00625, 0,00025 i 0,0002 mg mL^{-1} . Mjerenje enzimске aktivnosti započeto je dodatkom supstrata ATCh u reakcijsku smjesu do ukupnog volumena od 1,0 ml, a trajalo je dvije minute. Kod svih uzoraka tijekom mjerenja promjena absorbancije bila je linearna s vremenom (vrijedi Lambert-Beer-ova zakonitost). Izmjerena je i reakcija As_2O_3 i supstrata kako bi se vidjelo ima li ovaj ispitivani spoj i sam utjecaj na hidrolizu supstrata. Neenzimska reakcija u ovom slučaju nije zabilježena. Istraživanje je provedeno na Zavodu za toksikologiju, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

4.6. Statistička obrada podataka

Dobiveni eksperimentalni podatci obrađeni su primjenom metoda osnovne (deskriptivne) statistike, metodom linearne regresijske analize, metodom klaster analize (engl. *Cluster Analysis-CA*) i metodom analize glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis-PCA*). Multivarijantne metode obrade podataka (klaster analiza i PCA) korištene su radi identifikacije obrazaca u podacima, procjene međusobnih odnosa varijabli i utvrđivanja sličnosti i razlika među ispitivanim uzorcima.

4.6.1. Klaster analiza

Klaster analiza predstavlja multivarijantnu metodu obrade podataka kojom se objekti (uzorci) grupiraju u klaster na temelju njihove međusobne sličnosti. Osnovno načelo klaster analize jest da su objekti unutar istog klastera međusobno sličniji nego objektima koji pripadaju drugim klasterima. U ovom radu klaster analiza korištena je kao dopuna osnovnoj statističkoj obradi podataka, s ciljem klasifikacije uzoraka, uočavanja strukturnih obrazaca te identifikacije potencijalnih odstupajućih lokacija (*outliers*).

U hijerarhijskoj klaster analizi (HCA) rezultati se prikazuju u obliku dendrograma. Ključne komponente HCA su odabir mjera (ne)sličnosti između objekata i načina povezivanja (engl. *linkage*). Od korištenih mjera udaljenosti najpoznatije su: euklidska udaljenost (engl. ***Euclidean distance***), kvadrirana euklidska udaljenost (eng. *Squared Euclidean distance*), Manhattan udaljenost i udaljenost Mahalanobisa. Za povezivanje klastera najčešće se primjenjuju metode: metoda najbližeg susjeda (engl. *single linkage*), metoda najudaljenijeg susjeda (engl. *complete linkage*), metoda prosječne povezanosti (engl. *average linkage*) i Wardova metoda.

Podatci su obrađeni korištenjem metoda: *Single linkage and Complete linkage*, dok su za mjeru udaljenosti upotrijebljene: *Euclidean distance i Squared Euclidean distance*

4.6.2. Analiza glavnih komponenata (*Principal Component Analysis-PCA*)

Primarni cilj većine metoda multivarijantne analize je redukcija podataka. Analiza glavnih komponenti (PCA) je tehnika koja se koristi za redukciju složenih podataka koji su međusobno korelirani. Metoda se temelji na identificiranju glavnih komponenti (PC) koje predstavljaju linearne kombinacije izvornih varijabli. Vrijedi općenito:

$$PC_i = l_{1i}X_1 + l_{2i}X_2 + \dots + l_{ni}X_n$$

PC_i - i-ta glavna komponenta

l_{ji} - opterećenje promatrane varijable X_j

PC su odabrane tako da prva komponenta (PC_1) objašnjava najveću količinu varijacije u podacima, druga komponenta (PC_2) objašnjava sljedeći najveći dio varijacije i tako dalje. Ako prve dvije komponente obuhvaćaju većinu varijacije u podacima, moguće je prikazati podatke u dvije dimenzije umjesto izvornih n dimenzija. Osim redukcije dimenzionalnosti, PCA se također koristi za identifikaciju klastera unutar podataka, određivanje korelacija između opterećenja i objekata, a primjenjuje se i u regresijskoj analizi. Rezultati PCA najčešće se prikazuju u formatu bi-plot prikaza (76-79).

5. REZULTATI

5.1. Osnovna demografska obilježja ispitanika

Istraživanjem je obuhvaćeno 492 ispitanika (Tablica 1), od čega je 264 muškarca i 228 žena u ukupno 8 ispitivanih naselja: Vladislavci, Dalj, Čepin, Našice, Osijek, Voćin, Čačinci i Velika.

Tablica 1. Osnovna demografska obilježja ispitanika

Ispitivano naselje	N	muški	ženski	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD
Vladislavci	88	38	50	52,74	54,5	22	83	14,82
Dalj	106	43	63	52,34	53,0	18	87	15,33
Čepin	51	40	11	43,80	45	21	79	13,08
Našice	81	31	50	42,49	45	18	77	17,77
Osijek	65	51	14	47,69	47	23	76	11,07
Voćin	31	16	15	62,25	51	25	85	13,34
Čačinci	48	28	20	54,70	54	31	81	12,46
Velika	22	17	5	62,54	63,5	35	81	12,97
Ukupno	492	264	228	52,31	51,62	24,12	81,12	13,85

N- broj ispitanika, $\bar{x}$ - aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Srednja dob sudionika iznosila je 52 godine, a dobni raspon kretao se od 18 do 87 godina, što ukazuje na širok spektar životnih dobi među sudionicima istraživanja. U Tablici 2 prikazani su dostupni izvori vode za piće u ispitivanim naseljima.

Tablica 2. Izvori vodoopskrbe i vode za piće koju su ispitanici pili u ispitivanim naseljima

Naselje	Dostupni izvori vode	% konzumacije vode za piće iz pojedinog dostupnog izvora
Vladislavci	privatni bunari	80% bunarska voda 20% kupovna voda
Dalj	lokalni vodovod i privatni bunari	80% vodovod 12% bunar 8% kupovna voda
Čepin	Vodovod	88% vodovod, 12% kupovna voda
Našice	lokalni vodovod	100% lokalni vodovod
Osijek	Vodovod	98,7% vodovod
Voćin	privatni bunari i lokalni vodovod	69% vodovod, 12% kupovna voda 18% bunar
Čačici	privatni bunari i lokalni vodovod	40,9% vodovod, 40,9% bunar, 18,2% kupovna voda
Velika	lokalni vodovod	100% vodovod

5.2. Koncentracije arsena u vodi za piće

Tablica 3 prikazuje koncentracije arsena u vodi za piće u osam ispitivanih mjesta na području istočne Hrvatske. Iz rezultata je vidljivo da su srednje i maksimalne vrijednosti najveće u Čepinu i Osijeku. Unatoč visokoj maksimalnoj vrijednosti od 160,16 μgL^{-1} niska vrijednosti medijana (1,33 μgL^{-1}) i visoka vrijednost standardnog odstupanja ($\text{SD}=40,6$) u naselju Vladislavci ukazuju na pretežito niske koncentracije arsena u vodi.

Tablica 3. Izmjerene koncentracije arsena (μgL^{-1}) u vodi u dostupnim izvorima vodoopskrbe u ispitivanim naseljima

Koncentracija As u vodi (μgL^{-1})						
Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD
Vladislavci	16	16,32	1,33	0,33	160,16	40,06
Dalj	19	1,43	0,52	0,14	8,85	2,21
Čepin	12	184,34	191,75	30,60	250,40	53,82
Našice	8	0,13	0,07	0,04	0,59	0,18
Osijek	12	23,60	24,17	12,30	37,61	7,83
Voćin	4	2,35	2,08	0,59	4,60	1,91
Čačinci	6	0,96	0,33	0,30	1,09	0,29
Velika	4	0,56	0,52	0,30	0,90	0,25

N- broj ispitanika, $\bar{x}$ - aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Visoka vrijednost od 160 μgL^{-1} zabilježena samo na jednom mjestu u naselju Vladislavci utjecala je znatnije na srednju vrijednost (16,32 μgL^{-1}) koja je to naselje zajedno s Čepinom i Osijekom svrstala među mjesta u kojima je koncentracija arsena u vodi za piće prema Pravilniku o kvaliteti vode za piće iznad MDK (10).

5.3. Koncentracije arsena u biološkim uzorcima

U Tablici 4 prikazane su vrijednosti arsena u kosi iz kojih je vidljivo da su srednja vrijednost, vrijednosti medijana i maksimuma u naseljima Vladislavci, Osijek, Čepin i Dalj veće u odnosu na one u Našicama, Voćinu, Čačincima i Velikoj. Najviše srednje vrijednosti zabilježene su u naseljima Vladislavci ($\bar{x} = 32,34 \mu\text{g g}^{-1}$; $\text{SD} = 95,95$) i Čepin ($\bar{x} = 28,70 \mu\text{g g}^{-1}$; $\text{SD} = 106,29$), dok su najniže srednje vrijednosti utvrđene u Voćinu ($\bar{x} = 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$; $\text{SD} = 0,028$), Čačincima ($\bar{x} = 0,047 \mu\text{g g}^{-1}$; $\text{SD} = 0,043$) i Našicama ($\bar{x} = 0,074 \mu\text{g g}^{-1}$; $\text{SD} = 0,129$).

Tablica 4. Prikaz izmjerenih koncentracija arsena ($\mu\text{g g}^{-1}$) u kosi svih ispitanika u ispitivanim naseljima

Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	88	32,34	0,373	0,061	647,35	95,94	0,221	2,25
Dalj	106	3,50	0,829	0,004	38,21	6,95	0,194	2,58
Čepin	51	28,69	0,991	0,018	526,78	106,28	0,584	1,64
Našice	81	0,074	0,050	0,004	0,706	0,129	0,023	0,090
Osijek	65	0,629	0,312	0,030	8,50	1,18	0,157	0,458
Voćin	32	0,030	0,021	0,006	0,118	0,028	0,009	0,045
Čačinci	48	0,047	0,042	0,007	0,281	0,043	0,015	0,062
Velika	18	0,097	0,048	0,0148	0,718	0,163	0,025	0,071

N- broj ispitanika, $\bar{x}$ - aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

U većini naselja uočena je izražena razlika između srednje vrijednosti i medijana, što upućuje na asimetričnu distribuciju podataka. To je posebno izraženo u Vladislavcima ($\text{Med} = 0,373 \mu\text{g g}^{-1}$) i Čepinu ($\text{Med} = 0,991 \mu\text{g g}^{-1}$), gdje su zabilježene i izrazito visoke maksimalne vrijednosti ($647,35$ odnosno $526,78 \mu\text{g g}^{-1}$). Navedeni rezultati ukazuju na prisutnost ekstremnih vrijednosti koje značajno utječu na aritmetičku sredinu. Naselja Voćin, Čačinci i Našice odlikuju

se niskim vrijednostima koncentracija arsena i relativno niskom raspršenosti podataka. Na tim su lokacijama vrijednosti medijana bliske su srednjim vrijednostima, što upućuje na ujednačeniju raspodjelu, bez izraženijih ekstremnih vrijednosti.

Tablica 5. Prikaz izmjerenih koncentracija arsena ($\mu\text{g L}^{-1}$) u urinu svih ispitanika u ispitivanim naseljima

Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	88	35,69	24,16	0,285	294,50	46,86	10,17	39,54
Dalj	106	27,96	29,52	0,098	85,57	18,76	9,97	39,69
Čepin	51	113,70	73,45	0,595	351,51	115,38	11,90	204,16
Našice	81	23,30	19,29	0,924	150,80	21,08	10,79	28,66
Osijek	65	37,62	32,38	1,558	135,27	24,97	22,61	49,76
Voćin	31	7,56	3,34	0,185	52,84	11,55	0,49	9,45
Čačinci	48	0,82	0,453	0,103	12,35	1,75	0,24	0,77
Velika	22	0,35	0,237	0,103	0,96	0,27	0,16	0,41

N- broj ispitanika, $\bar{x}$ - aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Najviše srednje koncentracije arsena u urinu (Tablica 5) zabilježene su u Čepinu ($\bar{x} = 113,70 \mu\text{g L}^{-1}$; SD = 115,38), pri čemu je raspon vrijednosti bio izrazito širok (min = $0,595 \mu\text{g L}^{-1}$; max = $351,51 \mu\text{g L}^{-1}$). Vrijednost medijana u ovom naselju iznosio je $73,45 \mu\text{g L}^{-1}$, uz interkvartilni raspon od 11,90 do $204,16 \mu\text{g L}^{-1}$, što upućuje na izrazitu varijabilnost koncentracija među ispitanicima. Povišene srednje vrijednosti također su utvrđene u Osijeku ($\bar{x} = 37,62 \mu\text{g L}^{-1}$; SD = 24,97), Vladislavcima ($\bar{x} = 35,69 \mu\text{g L}^{-1}$; SD = 46,86) i Dalju ($\bar{x} = 27,96 \mu\text{g L}^{-1}$; SD = 18,76). U navedenim naseljima uočena je umjerena do izražena asimetrija raspodjele podataka, s razlikama između srednje vrijednosti i medijana te prisutnošću visokih maksimalnih vrijednosti. U Našicama je zabilježena srednja koncentracija arsena od $23,30 \mu\text{g L}^{-1}$ (SD = 21,08), uz maksimum od $150,80 \mu\text{g L}^{-1}$, dok su niže koncentracije utvrđene u Voćinu ($\bar{x} = 7,56 \mu\text{g L}^{-1}$; SD = 11,55). Najniže koncentracije As u urinu zabilježene su u naseljima Čačinci ($\bar{x} = 0,82 \mu\text{g L}^{-1}$; SD = 1,75) i Velika

($\bar{x} = 0,35 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{SD} = 0,27$), pri čemu su vrijednosti bile niske i relativno ujednačene, što potvrđuju uski interkvartilni rasponi i niske vrijednosti maksimalnih koncentracija. Ukupno gledano, rezultati ukazuju na značajne razlike u koncentracijama arsena u urinu među ispitanicima različitih naselja, uz osobito izražene povišene vrijednosti i veliku varijabilnost u pojedinim sredinama.

Tablica 6. Prikaz izmjerenih koncentracija arsena ($\mu\text{g L}^{-1}$) u serumu svih ispitanika u ispitivanim naseljima

Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	88	9,02	6,06	0,93	44,26	8,78	4,05	10,54
Dalj	106	19,76	4,81	0,06	335,90	55,19	2,83	14,69
Čepin	51	10,21	6,38	0,83	48,02	11,00	4,84	8,29
Našice	81	9,01	6,30	1,17	28,02	6,05	4,07	15,37
Osijek	65	6,46	5,02	0,76	48,15	7,14	3,59	6,61
Voćin	31	0,124	0,10	0,10	0,44	0,068	0,20	0,42
Čačinci	48	0,112	0,10	0,10	0,19	0,018	0,20	0,20
Velika	22	0,121	0,10	0,10	0,26	0,040	0,20	0,20

N- broj uzoraka, $\bar{x}$ -aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Najveće srednje koncentracije arsena u serumu zabilježene su u Dalju ($\bar{x} = 19,76 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{SD} = 55,19$), dok su ostala naselja imala znatno niže vrijednosti. (Tablica 6). U Vladislavcima je zabilježena srednja vrijednost koncentracija od $9,02 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\text{SD} = 8,78$), dok su u Čepinu koncentracije bile nešto niže ($\bar{x} = 10,21 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{SD} = 11,00$). Grad Našice imalo je srednju vrijednost od $9,01 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\text{SD} = 6,05$), uz sličnu raspodjelu koncentracija kao u gradu Osijeku, ali uz nešto niže koncentracije u Osijeku i nešto manju raspršenost podataka. ($\bar{x} = 6,46 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{SD} = 7,14$). U naseljima Voćin, Čačinci i Velika, koncentracije arsena u serumu bile su izrazito niske, s minimalnim vrijednostima koje su bile gotovo identične: Voćin: $\bar{x} = 0,124 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{SD} = 0,068$,

Čačinci: $\bar{x} = 0,112 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{SD} = 0,018$, Velika: $\bar{x} = 0,121 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{SD} = 0,040$). Svi ispitanici u ovim naseljima imali su koncentracije arsena u serumu u rasponu od 0,1 do $0,44 \mu\text{g L}^{-1}$, što ukazuje na vrlo stabilne i niske vrijednosti. U svim naseljima, osim u području Papuka- Voćinu, Čačincima i Velikoj, vrijednosti su pokazivale značajnu varijabilnost, uz prisutnost ekstremnih vrijednosti koje su povisile i vrijednosti standardnog odstupanja, osobito u naselju Dalj, gdje je zabilježen maksimum od $335,90 \mu\text{g L}^{-1}$, što je najviša zabilježena vrijednost u ovoj analizi (Tablica 6).

Tablica 7. Prikaz izmjerenih koncentracija arsena ($\mu\text{g L}^{-1}$) u serumu muških ispitanika u ispitivanim naseljima

Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	38	7,53	5,06	1,91	31,92	6,11	3,46	9,95
Dalj	43	13,86	6,67	0,06	52,86	14,84	3,82	24,96
Čepin	40	10,52	6,44	0,84	48,02	11,22	4,86	8,45
Našice	31	9,65	9,42	1,43	18,96	5,84	4,31	15,46
Osijek	51	6,91	5,34	0,76	48,15	7,95	3,56	6,76
Voćin	16	0,320	0,200	0,200	1,47	0,330	0,200	0,200
Čačinci	28	0,250	0,200	0,200	0,83	0,14	0,200	0,200
Velika	17	0,200	0,200	0,200	0,20	0,00	0,200	0,200

N- broj uzoraka, $\bar{x}$ -aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Iz rezultata prikazanih u Tablici 7 vidljivo je da su srednja vrijednost, vrijednosti medijana i maksimuma u naseljima Vladislavci, Osijek, Čepin, Našice i Dalj veće u odnosu na one u Voćinu, Čačincima i Velikoj. Uočene su razlike u raspodjeli vrijednosti arsena među ispitivanim naseljima. Najviše srednje vrijednosti arsena zabilježene su u Dalju ($13,86 \mu\text{g L}^{-1}$), Čepinu ($10,52 \mu\text{g L}^{-1}$) i Našicama ($9,65 \mu\text{g L}^{-1}$), dok su najniže srednje vrijednosti izmjerene u Voćinu ($0,320 \mu\text{g L}^{-1}$), Čačincima ($0,250 \mu\text{g L}^{-1}$) i Velikoj ($0,200 \mu\text{g L}^{-1}$). U naseljima s višim srednjim vrijednostima zabilježena je i veća varijabilnost koncentracija, što je vidljivo iz viših vrijednosti standardnih

odstupanja, osobito u Dalju (SD = 14,84) i Čepinu (SD = 11,22). Raspon izmjerenih vrijednosti bio je najširi u Dalju (0,06–52,86 $\mu\text{g L}^{-1}$) i Osijeku (0,76–48,15 $\mu\text{g L}^{-1}$), dok su u Voćinu, Čačincima i Velikoj koncentracije As pokazao uzak raspon vrijednosti s minimalnim i maksimalnim vrijednostima koje su bile bliske donjoj granici mjerenja. Vrijednosti medijana koncentracija arsena bile su niže od aritmetičkih sredina u većini naselja (Vladislavci, Dalj, Čepin, Osijek), što upućuje na asimetričnu raspodjelu uz prisutnost viših ekstremnih vrijednosti. Suprotno tome, u Našicama je medijan (9,42 $\mu\text{g L}^{-1}$) bio vrlo blizak srednjoj vrijednosti, što ukazuje na relativno ujednačenu raspodjelu rezultata. Vrijednosti 25. i 75. percentila dodatno potvrđuju izraženu heterogenost koncentracija arsena među naseljima, pri čemu su interkvartilni rasponi znatno širi u naseljima s višim srednjim vrijednostima u odnosu na naselja s niskim koncentracijama.

Rezultati osnovne statistike prikazani u Tablici 8 pokazuju razlike u koncentracijama arsena među ispitivanim naseljima, kao i razlike u varijabilnosti unutar pojedinih skupina. Najviše srednje vrijednosti koncentracija arsena zabilježene su u Vladislavcima (10,16 $\mu\text{g L}^{-1}$), Našicama (8,66 $\mu\text{g L}^{-1}$) i Dalju (8,51 $\mu\text{g L}^{-1}$), dok su najniže srednje vrijednosti izmjerene u Velikoj (0,280 $\mu\text{g L}^{-1}$), Voćinu (0,450 $\mu\text{g L}^{-1}$) i Čačincima (0,520 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Tablica 8. Prikaz izmjerenih koncentracija arsena ($\mu\text{g L}^{-1}$) u serumu ženskih ispitanika u ispitivanim naseljima

Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD	Prcentili 25.00000	Prcentili 75.00000
Vladislavci	50	10,16	6,53	0,930	44,26	10,28	4,34	11,78
Dalj	39	8,51	3,86	0,390	30,94	9,81	2,38	13,17
Čepin	6	4,88	5,69	1,45	6,80	1,98	3,59	6,04
Našice	36	8,66	5,56	2,05	28,20	6,36	3,70	15,35
Osijek	14	4,82	4,70	1,15	7,80	2,08	3,59	6,38
Voćin	15	0,450	0,200	0,200	2,11	0,500	0,200	0,570
Čačinci	20	0,520	0,200	0,200	2,21	0,640	0,200	0,410
Velika	5	0,280	0,200	0,200	0,61	0,180	0,200	0,200

N- broj uzoraka, $\bar{x}$ -aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Lokacije s višim srednjim vrijednostima pokazivale su i veću varijabilnost rezultata, što potvrđuju povišene vrijednosti standardnog odstupanja u Vladislavcima ($SD = 10,28$) i Dalju ($SD = 9,81$). Raspon izmjerenih koncentracija bio je najširi u Vladislavcima ($0,930\text{--}44,26 \mu\text{g L}^{-1}$) i Dalju ($0,390\text{--}30,94 \mu\text{g L}^{-1}$), dok su u naseljima s najnižim vrijednostima arsena koncentracije bile bliske donjoj granici mjerenja. U Velikoj su minimalne i maksimalne vrijednosti bile istog reda veličine ($0,20\text{--}0,61 \mu\text{g L}^{-1}$), uz vrlo nisku varijabilnost ($SD = 0,18$). U većini naselja medijani su bili niži od aritmetičkih sredina (Vladislavci, Dalj, Našice), što i u ovom slučaju upućuje na asimetričnu raspodjelu i prisutnost viših ekstremnih vrijednosti. Vrijednosti 25. i 75. percentila potvrđuju heterogenost koncentracija arsena među naseljima, pri čemu su interkvartilni rasponi bili znatno širi u naseljima s višim koncentracijama arsena u usporedbi s naseljima s niskim koncentracijama. Usporedna analiza koncentracija arsena u serumu pokazala je razlike između muškaraca i žena unutar pojedinih naselja, kao i u obrascima raspodjele vrijednosti. U naseljima s višim koncentracijama arsena kod muškaraca (Dalj, Čepin i Našice), žene su uglavnom imale niže ili usporedive vrijednosti srednjih vrijednosti. U Dalju su muškarci imali znatno višu srednju vrijednost As ($13,86 \mu\text{g L}^{-1}$) u odnosu na žene ($8,51 \mu\text{g L}^{-1}$), uz izraženiju varijabilnost kod muškaraca ($SD = 14,84$ prema $9,81$). Sličan obrazac uočen je u Čepinu, gdje su muškarci imali višu srednju vrijednost ($10,52 \mu\text{g L}^{-1}$) nego žene ($4,88 \mu\text{g L}^{-1}$), dok je u Našicama srednja vrijednost bila blago povišena kod muškaraca ($9,65 \mu\text{g L}^{-1}$) u usporedbi sa ženama ($8,66 \mu\text{g L}^{-1}$).

U Vladislavcima su žene imale višu srednju koncentraciju arsena ($10,16 \mu\text{g L}^{-1}$) u odnosu na muškarce ($7,53 \mu\text{g L}^{-1}$), dok je varijabilnost bila usporediva između spolova. U Osijeku su muškarci imali nešto višu srednju vrijednost arsena ($6,91 \mu\text{g L}^{-1}$) nego žene ($4,82 \mu\text{g L}^{-1}$), dok su medijani u obje skupine bili slični, što upućuje na relativno ujednačenu raspodjelu rezultata. U naseljima s niskim koncentracijama arsena (Voćin, Čačinci i Velika) razlike između spolova bile su minimalne, pri čemu su srednje vrijednosti kod oba spola bile bliske donjoj granici mjerenja. U tim naseljima varijabilnost je bila vrlo niska, osobito kod muškaraca u Velikoj, gdje nije zabilježena varijabilnost vrijednosti. Raspodjela rezultata u većini naselja pokazivala je asimetriju prema višim vrijednostima kod oba spola, što je izraženije kod muškaraca, osobito u Dalju i Osijeku, gdje su zabilježene visoke maksimalne vrijednosti. Kod žena je asimetrija također prisutna, ali s nešto užim rasponima koncentracija. Općenito, muškarci su u većini naselja imali više srednje i maksimalne koncentracije arsena u serumu u usporedbi sa ženama, uz veću

varijabilnost rezultata. Iznimku čine Vladislavci, gdje su žene imale više srednje vrijednosti, dok su u naseljima s niskim izloženostima razlike između spolova bile zanemarive.

Rezultati osnovne statistike u Tablici 9 ukazuju na izražene razlike među naseljima, kako u koncentracijama arsena, tako i u varijabilnosti izmjerenih vrijednosti.

Tablica 9. Prikaz izmjerenih koncentracija arsena ($\mu\text{g L}^{-1}$) u urinu muškaraca u ispitivanim naseljima

Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD	Prcentili 25.00000	Prcentili 75.00000
Vladislavci	38	41,20	24,61	0,960	294,50	53,12	11,87	43,38
Dalj	43	28,90	32,00	0,090	70,40	17,09	12,67	41,88
Čepin	40	117,82	74,16	0,590	351,50	120,2	13,97	202,72
Našice	31	22,97	20,62	0,920	72,90	16,18	9,99	30,27
Osijek	51	36,50	30,71	1,55	135,25	25,53	20,06	49,76
Voćin	16	10,67	7,35	0,200	52,80	15,12	0,410	12,92
Čačinci	28	1,053	0,482	0,100	12,36	2,27	0,340	0,850
Velika	17	0,322	0,222	0,100	0,961	0,252	0,160	0,331

N- broj uzoraka, $\bar{x}$ -aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Najviše srednje koncentracije arsena u urinu zabilježene su u Čepinu ($117,82 \mu\text{g L}^{-1}$), uz izrazito visoku varijabilnost ($\text{SD} = 120,20$) i vrlo širok raspon vrijednosti ($0,590\text{--}351,50 \mu\text{g L}^{-1}$). Povišene srednje vrijednosti zabilježene su i u Vladislavcima ($41,20 \mu\text{g L}^{-1}$), Osijeku ($36,50 \mu\text{g L}^{-1}$), dok su nešto niže, ali još uvijek umjerene koncentracije zabilježene u Dalju ($28,90 \mu\text{g L}^{-1}$) i Našicama ($22,97 \mu\text{g L}^{-1}$). Najniže koncentracije arsena u urinu zabilježene su u Velikoj ($0,32 \mu\text{g L}^{-1}$) i Čačincima ($1,05 \mu\text{g L}^{-1}$), pri čemu su vrijednosti bile koncentrirane blizu donje granice mjerenja, uz nisku varijabilnost. U Voćinu su zabilježene nešto više srednje vrijednosti ($10,67 \mu\text{g L}^{-1}$), ali uz izraženu heterogenost rezultata, što se očituje u relativno visokoj standardnoj devijaciji ($\text{SD} = 12,92$) u odnosu na srednju vrijednost. U većini naselja medijan je bio niži od ili usporediv sa srednjom vrijednošću, što upućuje na asimetričnu distribuciju koncentracija arsena uz prisutnost

visokih ekstremnih vrijednosti. Ovaj obrazac bio je posebno izražen u Čepinu i Vladislavcima, gdje su maksimalne vrijednosti višestruko premašivale vrijednosti 75. percentila. Interkvartilni rasponi dodatno potvrđuju znatnu heterogenost koncentracija arsena među naseljima. Naselja s višim srednjim vrijednostima imala su šire interkvartilne raspone, dok su u naseljima s niskim koncentracijama (Velika i Čačinci) vrijednosti bile usko raspodijeljene oko donje granice mjerenja.

Iz dobivenih rezultata u Tablici 10 vidljivo je da su srednja vrijednost, vrijednosti medijana i maksimuma koncentracija arsena u urinu žena u naseljima Vladislavci, Osijek, Čepin, Našice i Dalj veće u odnosu na vrijednosti zabilježene u naseljima Voćin, Čačinci i Velika.

Tablica 10. Prikaz izmjerenih koncentracija arsena ($\mu\text{g L}^{-1}$) u urinu žena u ispitivanim naseljima

Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD	Prcentili 25.00000	Prcentili 75.00000
Vladislavci	50	31,65	23,83	0,28	264,30	41,58	8,45	37,14
Dalj	39	28,24	24,72	2,25	85,57	21,93	9,46	40,05
Čepin	6	92,10	77,37	9,69	213,19	70,33	52,98	122,01
Našice	36	25,89	19,23	2,56	150,80	25,46	13,25	27,30
Osijek	14	41,52	35,75	11,15	101,33	23,24	24,38	56,27
Voćin	15	4,24	3,20	0,183	17,13	4,240	1,42	5,82
Čačinci	20	0,492	0,413	0,144	1,21	0,340	0,23	0,68
Velika	5	0,471	0,244	0,181	0,920	0,350	0,22	0,784

N- broj uzoraka, $\bar{x}$ -aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Slično muškim, najviše srednje vrijednosti kao i vrijednosti medijana koncentracija arsena u urinu kod ženskih ispitanika (Tablica 10) zabilježene su u naselju Čepin, a najniže u Našicama.

Rezultati ukazuju na izražene razlike među naseljima, kako u srednjim vrijednostima koncentracija arsena, tako i u rasponima i varijabilnosti izmjerenih vrijednosti. Najviše srednje koncentracije arsena u urinu zabilježene su u Čepinu ($92,10 \mu\text{g L}^{-1}$), uz visoku varijabilnost rezultata ($\text{SD} =$

70,33) i širok raspon vrijednosti (9,69–213,19 $\mu\text{g L}^{-1}$). Povišene srednje vrijednosti zabilježene su i u Osijeku (41,52 $\mu\text{g L}^{-1}$) i Vladislavcima (31,65 $\mu\text{g L}^{-1}$), dok su nešto niže koncentracije zabilježene u Dalju (28,24 $\mu\text{g L}^{-1}$) i Našicama (25,89 $\mu\text{g L}^{-1}$). Najniže srednje vrijednosti koncentracija arsena u urinu izmjerene su u Čačincima (0,492 $\mu\text{g L}^{-1}$) i Velikoj (0,471 $\mu\text{g L}^{-1}$), gdje su vrijednosti bile koncentrirane blizu donje granice mjerenja, uz vrlo nisku varijabilnost. U Voćinu su zabilježene nešto više srednje vrijednosti (4,24 $\mu\text{g L}^{-1}$), ali i dalje znatno niže u usporedbi s ostalim naseljima, uz umjerenu varijabilnost ($\text{SD} = 5,82$). U većini naselja medijan je imao niže vrijednosti u odnosu na srednje vrijednosti, što upućuje na asimetričnu raspodjelu koncentracija i prisutnost viših ekstremnih vrijednosti. Ovaj obrazac bio je osobito izražen u Vladislavcima i Našicama, gdje su maksimalne vrijednosti značajno premašivale 75. percentil. Interkvartilni rasponi dodatno potvrđuju heterogenost koncentracija arsena među naseljima. Naselja s višim srednjim vrijednostima (Čepin, Osijek) imala su šire interkvartilne raspone, dok su u naseljima s niskim koncentracijama (Čačinci i Velika) vrijednosti bile usko raspodijeljene oko donje granice mjerenja. Usporedna analiza koncentracija arsena u urinu pokazala je postojanje razlika između muškaraca i žena unutar pojedinih naselja, kao i razlika u obrascima raspodjele i varijabilnosti izmjerenih vrijednosti. U naseljima s povišenim koncentracijama arsena kod muškaraca (Čepin, Vladislavci i Osijek), žene su također imale povišene vrijednosti, ali su srednje koncentracije u pravilu bile niže nego kod muškaraca. Najizraženija razlika uočena je u Čepinu, gdje su muškarci imali znatno višu srednju vrijednost As u urinu (117,82 $\mu\text{g L}^{-1}$) u usporedbi sa ženama (92,10 $\mu\text{g L}^{-1}$), uz veću varijabilnost kod muškaraca ($\text{SD} = 120,2$ naspram 70,33 kod žena). Sličan obrazac zabilježen je i u Vladislavcima, gdje su muškarci imali višu srednju vrijednost (41,20 $\mu\text{g L}^{-1}$) u odnosu na ženske ispitanike (31,65 $\mu\text{g L}^{-1}$). U Dalju i Našicama srednje vrijednosti arsena u urinu bile su usporedive između spolova, pri čemu su muškarci imali neznatno više vrijednosti u Dalju (28,90 naspram 28,24 $\mu\text{g L}^{-1}$), dok su žene imale blago povišene srednje vrijednosti u Našicama (25,89 naspram 22,97 $\mu\text{g L}^{-1}$). U Osijeku su žene imale višu srednju koncentraciju arsena u urinu (41,52 $\mu\text{g L}^{-1}$) u odnosu na muškarce (36,50 $\mu\text{g L}^{-1}$), iako su maksimalne vrijednosti bile više kod muškaraca. U naseljima s niskim koncentracijama arsena u urinu (Voćin, Čačinci i Velika), vrijednosti su kod oba spola bile niske i koncentrirane oko donje granice mjerenja. Međutim, u Voćinu su muškarci imali više srednje vrijednosti (10,67 $\mu\text{g L}^{-1}$) u odnosu na žene (4,24 $\mu\text{g L}^{-1}$), dok su u Čačincima i Velikoj razlike između spolova bile neznatne. Raspodjela koncentracija arsena u uzorcima urina pokazivala je asimetriju prema višim

vrijednostima kod oba spola, s izraženijim ekstremnim vrijednostima kod muškaraca, osobito u Čepinu i Vladislavcima. Žene su, iako sa sličnim obrascima raspodjele, imale nešto uže raspone koncentracija u većini naselja. Općenito, muškarci su u većini naselja imali više srednje i maksimalne koncentracije arsena u urinu u usporedbi sa ženama, uz veću varijabilnost rezultata. Iznimke su uočene u Osijeku i djelomično u Našicama, gdje su žene imale jednake ili više srednje vrijednosti. U naseljima s niskom izloženošću razlike između spolova bile su zanemarive.

Tablica 11. Prikaz izmjerenih koncentracija arsena ($\mu\text{g L}^{-1}$) u kosi muškaraca u ispitivanim naseljima

Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD	Prcentili 25.00000	Prcentili 75.00000
Vladislavci	38	35,86	0,653	0,092	396,81	90,89	0,216	9,332
Dalj	43	4,29	1,36	0,000	27,07	7,23	0,219	3,182
Čepin	40	25,22	1,15	0,040	526,78	105,03	0,664	1,695
Našice	31	0,090	0,042	0,005	0,583	0,142	0,016	0,082
Osijek	51	0,684	0,31	0,030	8,50	1,31	0,179	0,668
Voćin	16	0,043	0,031	0,020	0,112	0,020	0,028	0,061
Čačinci	28	0,062	0,060	0,020	0,283	0,04	0,044	0,075
Velika	17	0,121	0,052	0,010	0,712	0,182	0,044	0,096

N- broj uzoraka, $\bar{x}$ -aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Iz dobivenih rezultata u Tablici 11, vidljivo je da su srednja vrijednost, vrijednosti medijana i maksimuma u naseljima Vladislavci, Osijek, Čepin, Našice i Dalj veće u odnosu na naselja Voćin, Čačinci i Velika. Slično kao kod urina i seruma i ovdje su vidljive veće koncentracije arsena u kosi ispitanika u naselju Vladislavci koje se nalazi u neposrednoj blizini naselja Čepin, a u kojemu su zabilježene najviše koncentracije arsena u vodi. Najviše srednje vrijednosti arsena u kosi zabilježene su u Vladislavcima ($35,86 \mu\text{g g}^{-1}$) i Čepinu ($25,22 \mu\text{g g}^{-1}$), uz izrazito visoku varijabilnost rezultata ($\text{SD} = 90,89$ i $\text{SD} = 105,03$). U oba naselja zabilježeni su izuzetno visoki maksimalni iznosi ($396,81 \mu\text{g g}^{-1}$ u Vladislavcima i $526,78 \mu\text{g g}^{-1}$ u Čepinu), što značajno utječe

na vrijednosti aritmetičkih sredina. Suprotno tome, medijani su u tim naseljima bili vrlo niski ($0,653$ i $1,15 \mu\text{g g}^{-1}$), što upućuje na izrazito asimetričnu raspodjelu s rijetkim, ali vrlo visokim ekstremnim vrijednostima. U Dalju je srednja vrijednost arsena u kosi iznosila $4,29 \mu\text{g g}^{-1}$, uz umjerenu varijabilnost ($SD = 7,23$), dok su u Osijeku zabilježene niže srednje vrijednosti ($0,684 \mu\text{g g}^{-1}$) i uži raspon koncentracija ($0,030$ – $8,50 \mu\text{g g}^{-1}$). U Našicama, Voćinu, Čačincima i Velikoj izmjerene su vrlo niske koncentracije arsena u kosi, s prosječnim vrijednostima od $0,043$ do $0,121 \mu\text{g g}^{-1}$ i minimalnom varijabilnošću. Raspodjela koncentracija u većini naselja bila je izrazito asimetrična, osobito u Vladislavcima i Čepinu, gdje su vrijednosti 75. percentila bile višestruko niže od maksimalnih izmjerenih koncentracija. Interkvartilni rasponi u naseljima s niskim srednjim vrijednostima bili su uski, što ukazuje na homogenu raspodjelu niskih koncentracija arsena.

Iz rezultata u Tablici 12 je vidljivo da su srednja vrijednost, vrijednosti medijana i maksimuma u naseljima Vladislavci, Osijek, Čepin i Dalj veće u odnosu na naselja Našice, Voćin, Čačinci i Velika. Koncentracije arsena u kosi niže su kod žena u odnosu na muškarce, ali su za obje skupine veće u ruralnim dijelovima (Vladislavci, Čepin) u odnosu na gradove (Našice, Osijek). Rezultati ukazuju na razlike među naseljima, kako u srednjim vrijednostima koncentracija arsena, tako i u rasponu i varijabilnosti izmjerenih vrijednosti.

Tablica 12. Prikaz izmjerenih koncentracija arsena ($\mu\text{g g}^{-1}$) u kosi žena u ispitivanim naseljima

Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	50	29,66	0,320	0,061	647,35	10,44	0,225	0,804
Dalj	39	346	0,754	0,042	38,21	7,60	0,197	1,893
Čepin	6	0,680	0,644	0,300	1,15	0,311	0,387	0,863
Našice	36	0,100	0,050	0,005	0,701	0,132	0,030	0,103
Osijek	14	0,371	0,23	0,090	1,89	0,463	0,127	0,443
Voćin	15	0,011	0,009	0,006	0,052	0,010	0,007	0,012
Čačinci	20	0,020	0,010	0,007	0,083	0,020	0,012	0,025
Velika	5	0,030	0,020	0,020	0,063	0,010	0,020	0,032

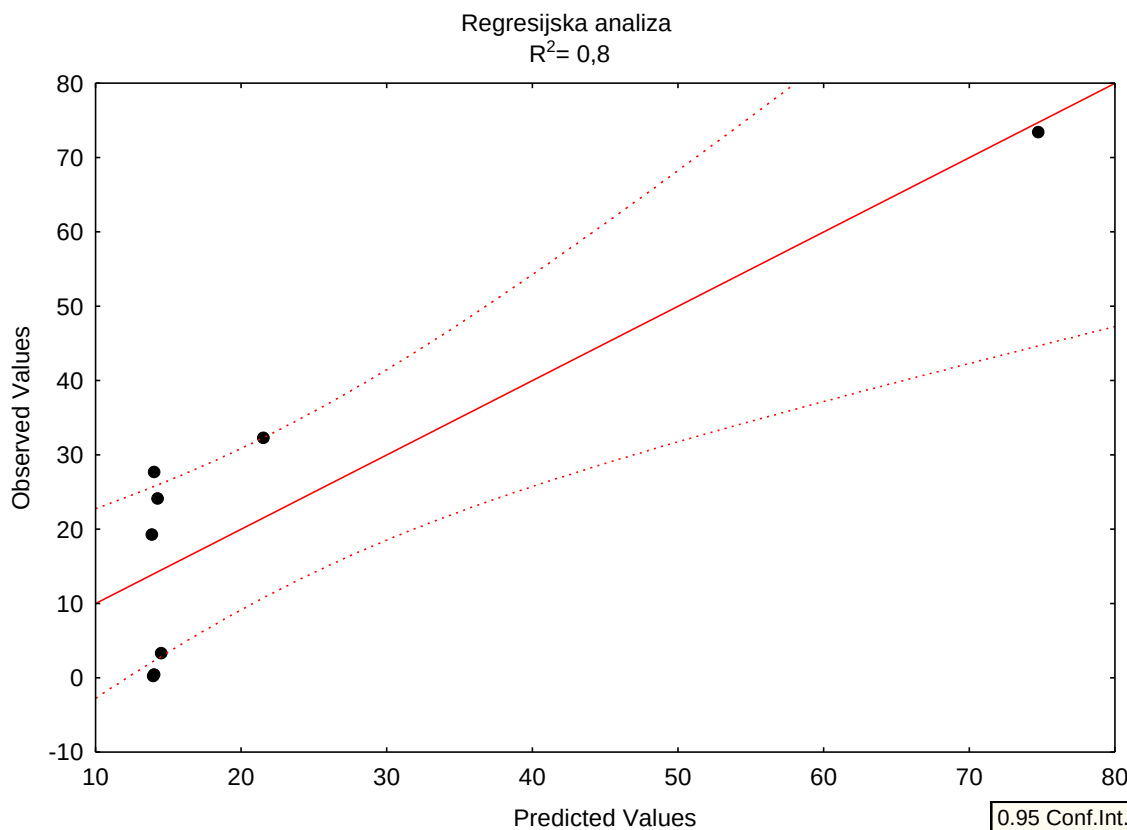
N- broj uzoraka, $\bar{x}$ -aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Najviše srednje vrijednosti arsena u kosi zabilježene su u Vladislavcima ($29,66 \mu\text{g g}^{-1}$), uz izrazito

visoku varijabilnost rezultata ($SD = 10,44$) i visoku vrijednost maksimalne koncentracije ($647,35 \mu\text{g g}^{-1}$), što je znatno utjecalo na aritmetičku sredinu. Povišene vrijednosti zabilježene su i u Dalju ($3,46$), dok su medijani u tim naseljima znatno niži od srednjih vrijednosti ($0,320 \mu\text{g g}^{-1}$ u Vladislavcima i $0,754 \mu\text{g g}^{-1}$ u Dalju), što upućuje na asimetričnu raspodjelu uz visoke maksimalne vrijednosti.

U Čepinu, Našicama, Osijeku, Voćinu, Čačincima i Velikoj koncentracije arsena u kosi bile su niske, uz minimalnu varijabilnost. Srednje vrijednosti kretale su se između $0,011$ i $0,680 \mu\text{g g}^{-1}$, a interkvartilni rasponi bili su uski, što ukazuje na homogenu raspodjelu niskih koncentracija arsena. U ovim naseljima maksimalne vrijednosti bile su relativno bliske vrijednostima medijana, što ukazuje na odsutnost ekstremnih i vrijednosti koje se nalaze iznad prosjeka. Raspodjela rezultata pokazuje da su naselja s visokim srednjim koncentracijama (Vladislavci i Dalj), karakterizirana izrazito asimetrijom podataka, dok su ostala naselja pokazala homogeniju raspodjelu niskih koncentracija. Ovaj obrazac upućuje na prisutnost rijetkih, ali vrlo visokih vrijednosti arsena u kosi populacije izložene višim koncentracijama arsena. Usporedna analiza koncentracija arsena u kosi pokazuje izražene razlike između muškaraca i žena u većini naselja, kako u srednjim vrijednostima, tako i u rasponima i varijabilnosti. U naseljima s povišenim koncentracijama arsena, poput Vladislavaca i Čepina, muškarci su imali nešto više srednje vrijednosti u kosi ($35,86 \mu\text{g g}^{-1}$ u Vladislavcima i $25,22 \mu\text{g g}^{-1}$ u Čepinu) u usporedbi sa ženama ($29,66 \mu\text{g g}^{-1}$ u Vladislavcima i $0,680 \mu\text{g g}^{-1}$ u Čepinu). Razlike su posebno izražene u Čepinu, gdje je raspodjela kod muškaraca bila vrlo heterogena s ekstremno visokim vrijednostima (maksimalno $526,78 \mu\text{g g}^{-1}$), dok su žene u istom naselju imale znatno nižu srednju vrijednost i manju varijabilnost (maksimalno $1,15 \mu\text{g g}^{-1}$). U Vladislavcima su žene također imale povišene vrijednosti, ali vrijednost medijana ($0,320 \mu\text{g g}^{-1}$) bila je znatno niža od srednje vrijednosti, što ukazuje na prisutnost nekoliko ekstremnih vrijednosti. U Dalju su muškarci imali višu srednju koncentraciju ($4,29 \mu\text{g g}^{-1}$) u usporedbi sa ženama ($3,46 \mu\text{g g}^{-1}$), dok su medijani kod oba spola bili nisko postavljeni ($1,36 \mu\text{g g}^{-1}$ kod muškaraca, $0,754 \mu\text{g g}^{-1}$ kod žena), što upućuje na asimetričnu raspodjelu s rijetkim visokim vrijednostima koncentracija arsena. U naseljima s niskim koncentracijama arsena u kosi (Našice, Osijek, Voćin, Čačinci, Velika) razlike među spolovima bile su minimalne. Srednje vrijednosti kod muškaraca i žena su bile vrlo niske ($<0,7$), medijani su bili slični, a varijabilnost niska, što upućuje na homogenost niskih koncentracija u populacijama s malom izloženošću. Raspodjela koncentracija u većini naselja bila je asimetrična, s ekstremnim vrijednostima prisutnim

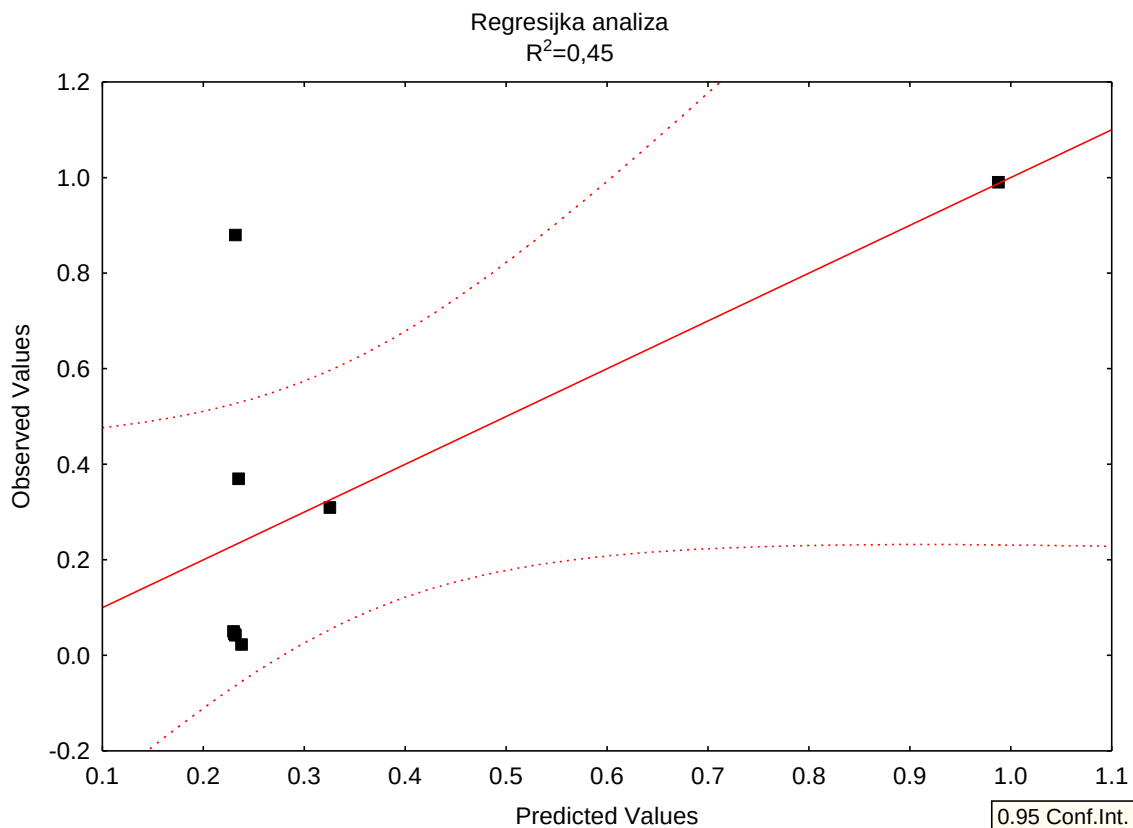
prvenstveno kod muškaraca. Žene su, iako sličnog obrasca raspodjele, imale općenito užu raspon koncentracija i niže maksimalne vrijednosti, osim u Vladislavcima i Dalju, gdje su rijetke ekstremne vrijednosti povećale aritmetičku sredinu. Ukupno gledano, muškarci su u naseljima s visokim izloženostima imali više koncentracije arsena u kosi i veću heterogenost rezultata u odnosu na žene. U naseljima s niskom izloženosti razlike između spolova bile su zanemarive, a koncentracije su bile su niske i homogene.



Slika 4. Rezultat linearne regresijske analize vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija arsena u vodi i urinu svih ispitanika na osam ispitivanih naselja

Vrijednost regresijskog koeficijenta $R^2=0,8$ ukazuje na vrlo visoku povezanost između koncentracija arsena u vodi za piće i arsena u urinu ispitanika, što upućuje na to da je voda za piće najznačajniji izvor izloženosti arsenu u ispitivanoj populaciji.

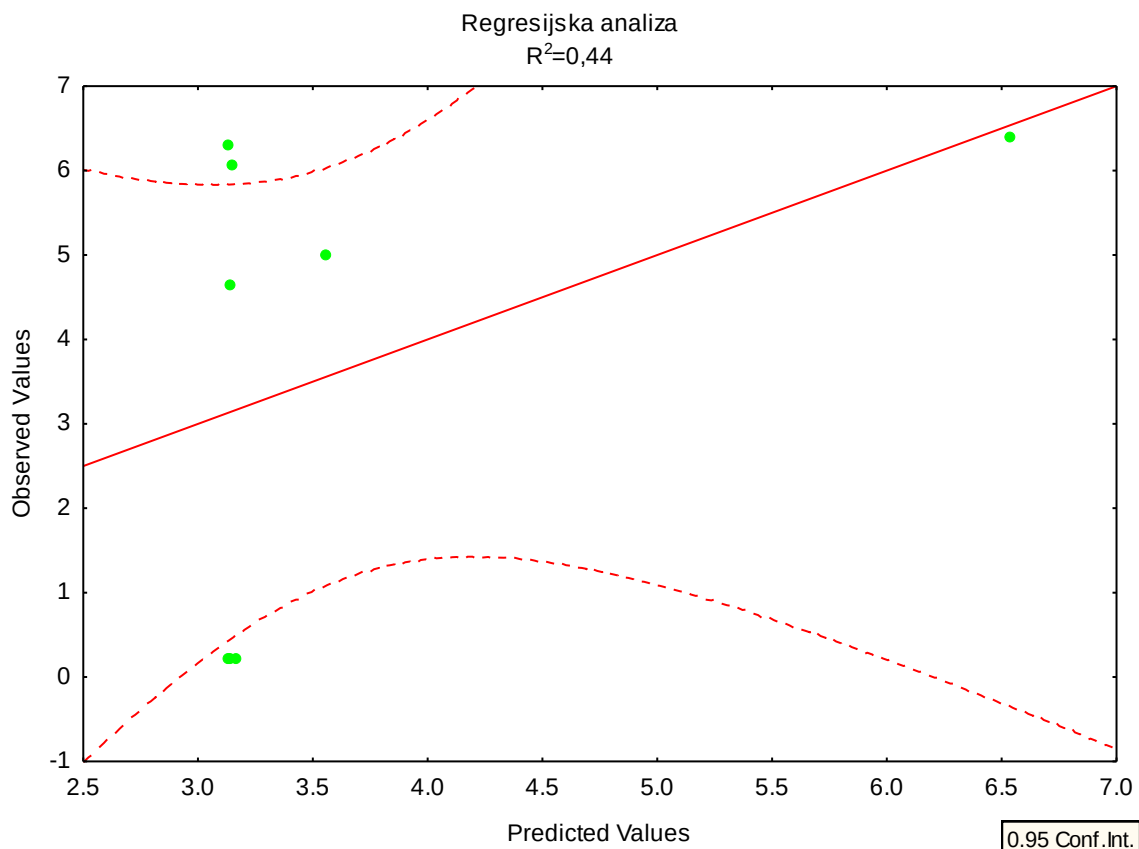
Slika 5 prikazuje rezultate linearne regresijske analize vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija arsena u vodi i kosi ispitanika u ispitivanim naseljima.



Slika 5. Rezultat regresijske analiza izmjerenih vrijednosti koncentracija arsena u vodi naselja i kosi svih ispitanika

Vrijednost koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,45$) ukazuje na slabu do umjerenu povezanost između koncentracija arsena u vodi za piće i koncentracija arsena u kosi ispitanika, što upućuje na to da kosa odražava dugotrajniju izloženost arsenu, ali uz moguć utjecaj, kako drugih izvora, tako i individualnih čimbenika.

Slika 6 prikazuje rezultate linearne regresijske analize vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija arsena u vodi i serumu ispitanika u ispitivanim naseljima.



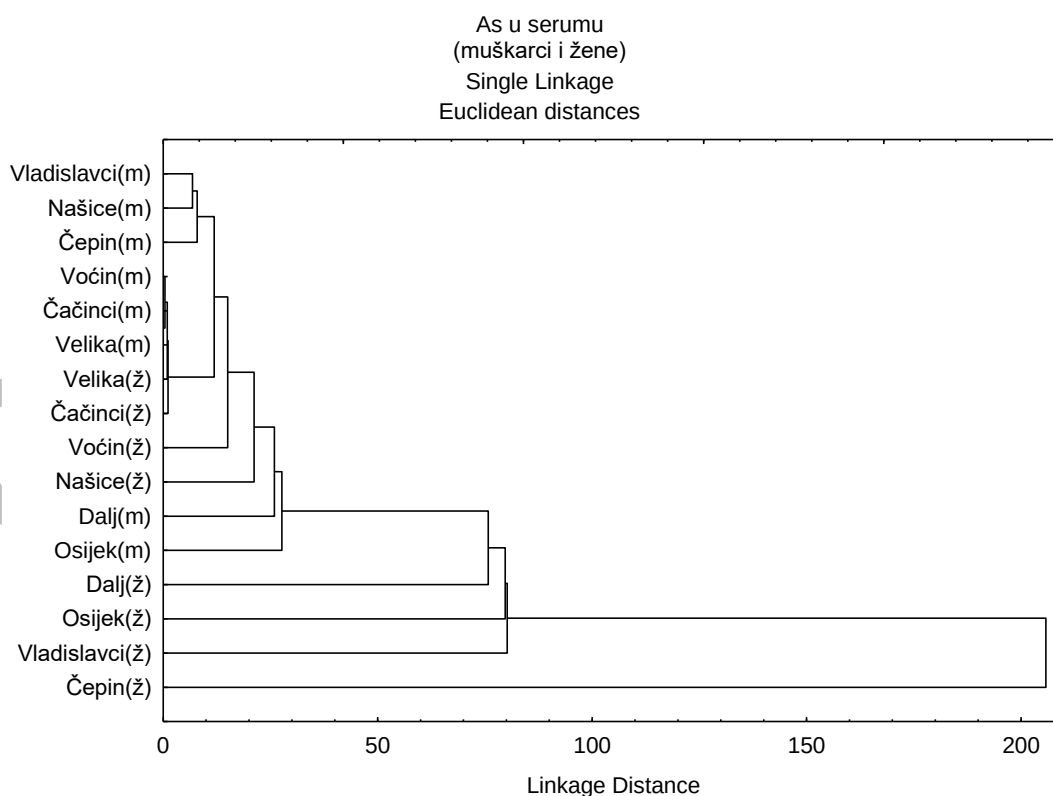
Slika 6. Rezultati regresijske analize izmjerenih vrijednosti koncentracija arsena u vodi naselja i serumu svih ispitanika

Vrijednost koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,44$) ukazuje na slabu do umjerenu povezanost između koncentracija arsena u vodi za piće i koncentracija arsena u serumu ispitanika, što može biti posljedica kratkotrajnog zadržavanja arsena u serumu i njegove brze eliminacije iz organizma. Usporedbom slika 4-6. vidljivo je da najveći utjecaj povišene koncentracije arsena u vodi ima na urin, tj. uropoetski sustav, dok se slabije akumulira u kosi, a u manjoj mjeri i u serumu ispitanika.

5.3.1. Rezultati klaster analize koncentracija arsena u biološkim uzorcima muških i ženskih ispitanika u ispitivanim naseljima

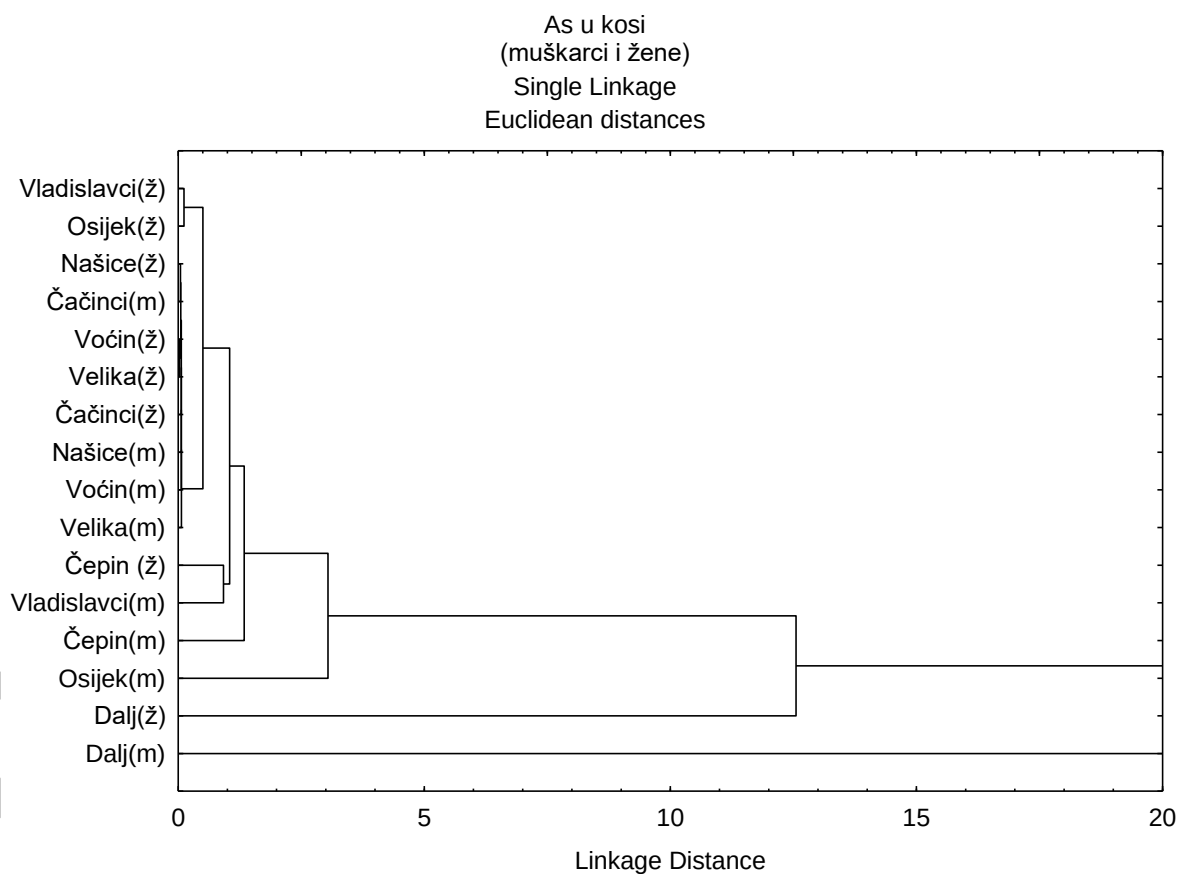
Spol i dob mogu utjecati na metabolizam, raspodjelu i izlučivanje arsena, npr. hormonske razlike između muškaraca i žena ili promjene u metabolizmu povezane s dobi. Klaster analiza omogućava da se ispita postoje li podskupine ispitanika koje pokazuju slične profile izloženosti, temeljem čega može pružiti dodatne podatke u interpretaciji rezultata. Na Slikama 7-9 prikazani su rezultati

hijerarhijske klusterske analize koncentracija arsena u biološkim uzorcima muških i ženskih ispitanika. Analiza je provedena metodom najbližih susjeda (engl. *Single linkage*), uz korištenje Euklidske udaljenosti s ciljem grupiranja ispitanika prema sličnosti. Hijerarhijska klusterska analiza koncentracija arsena u serumu muških i ženskih ispitanika pokazala je grupiranje, pri čemu su se u većini slučajeva, neovisno o lokaciji, zasebno grupirali muški i ispitanici, uz ženske ispitanike koji se grupiraju pri većim udaljenostima (Čepin, Vladislavci, Osijek) (Slika 7). Takva raspodjela ukazuje na značajnu varijabilnost koncentracija arsena u serumu ispitanika na lokacijama smještenim u blizini grada Osijeka, u odnosu na ispitanike na lokacijama smještenim zapadnije (Našice, Čačinci, Voćin, Velika). Unatoč (u određenoj mjeri) prisutnom grupiranju po spolu, jasnije je izraženo grupiranje prema istraživanim lokacijama.



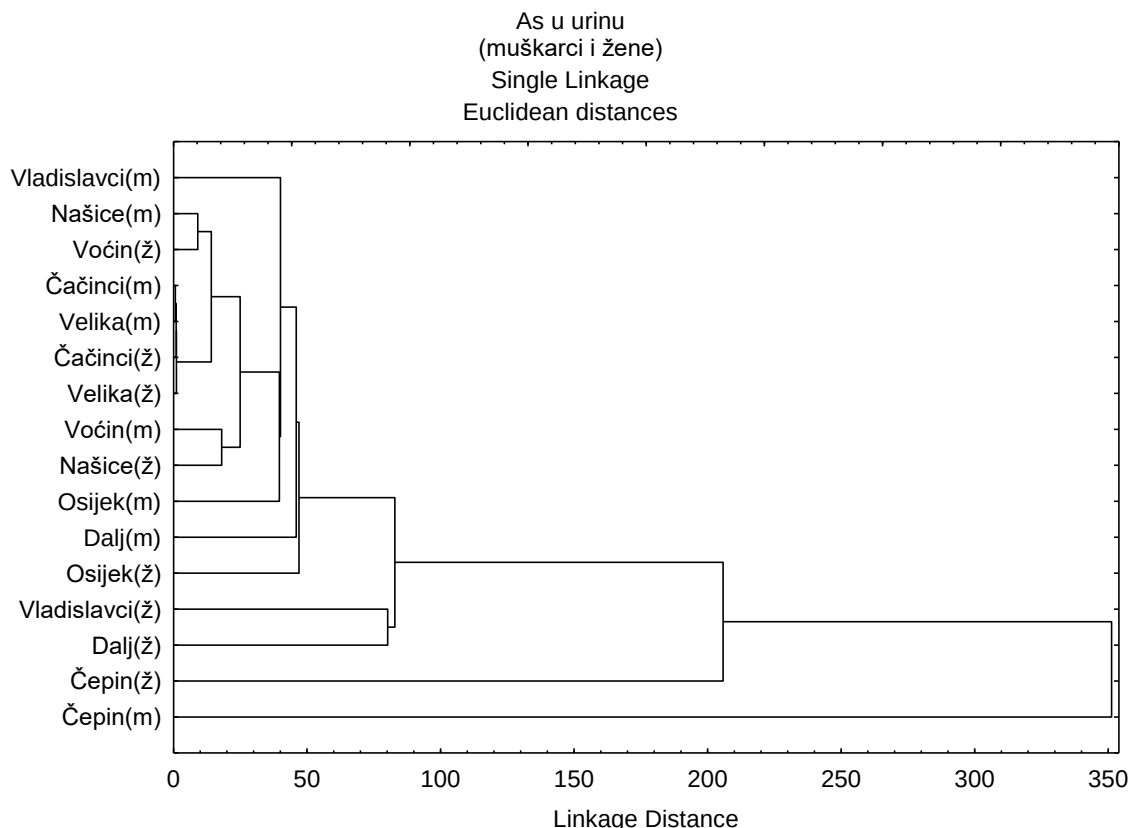
Slika 7. Klaster analiza koncentracija arsena u serumu muških (m) i ženskih (ž) ispitanika u ispitivanim naseljima

Rezultat klaster analize u kosi (Slika 8) ukazao je na postojanje jasno definiranog jednočlanog klastera (Dalj-muškarci) i kompleksnog klastera koji se sastoji od jednočlanog klastera (Dalj-žene) i preostalih lokacija grupiranih pri manjim međusobnim udaljenostima. Unatoč određenom grupiranju ispitanika prema spolu, ovaj obrazac nije vidljiv na svim lokacijama, a klasteri su smješteni na relativno malim udaljenostima. Takav raspored ukazuje na određenu homogenost koncentracija arsena u kosi u dijelu populacije s lokacija smještenih zapadnije (okolina Papuka), uz izraženije grupiranje muških i ženskih ispitanika s lokacija smještenih u blizini grada Osijeka.



Slika 8. Klaster analiza koncentracija arsena u muških (m) i ženskih (ž) ispitanika u ispitivanim naseljima

Dendrogram prikazan na Slici 9 pokazuje jasno izraženo grupiranje ispitanika jednočlanih klastera Čepin (muškarci) i Čepin (žene), pri čemu su međusobno grupirani pri relativno malim udaljenostima, što ukazuje na visoku unutar grupnu sličnost koncentracija arsena u urinu (Slika 9).

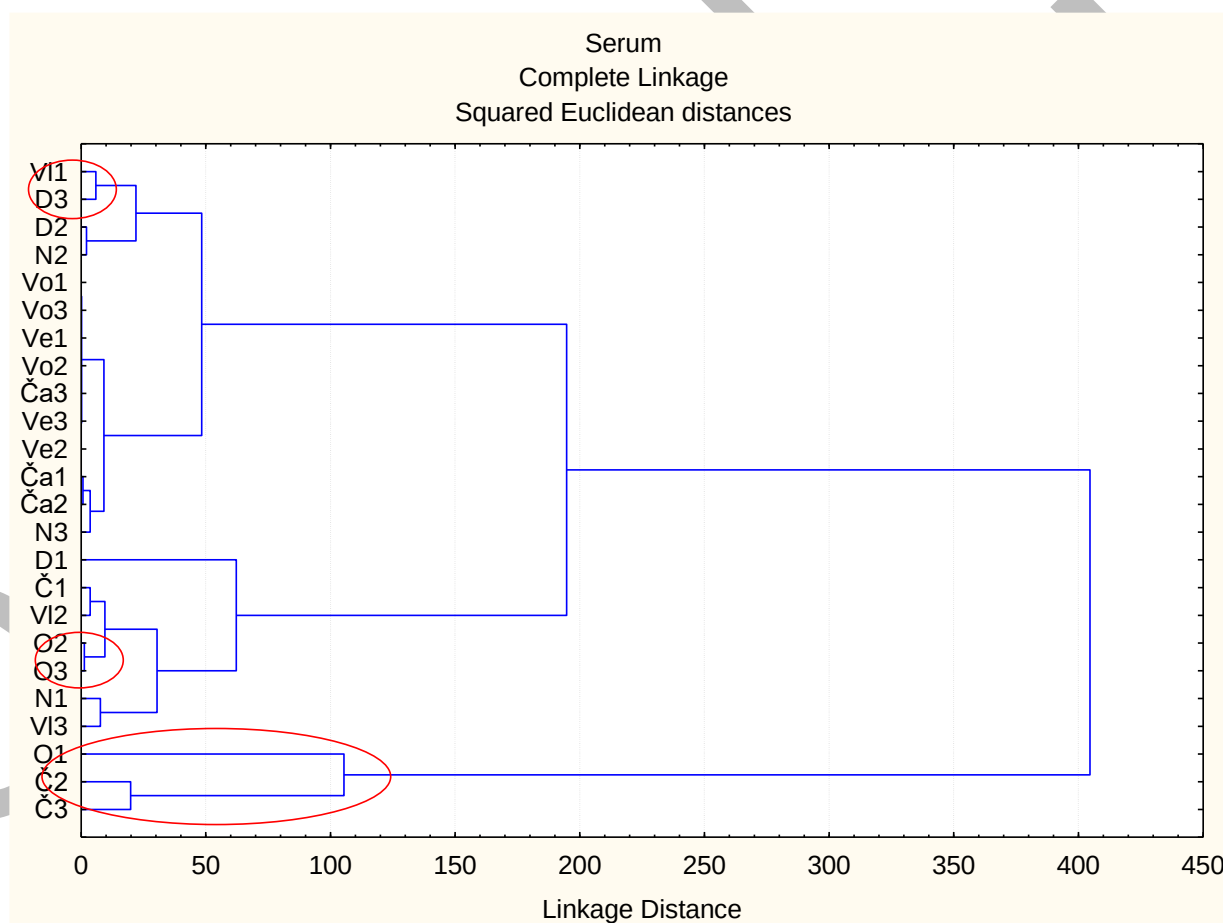


Slika 9. Klaster analiza koncentracija arsena u urinu muških (m) i ženskih (ž) ispitanika u ispitivanim naseljima

Iako su klasteri pokazivali određeni stupanj razvrstavanja s obzirom na spol, izraženija razdvojenost uočena je prema lokacijama, pri čemu su se, kao i u analizama seruma i kose (Slika 7 i 8), izdvojile ponovo lokacije smještene u blizini Osijeka u odnosu na one smještene zapadnije (okolina Papuka). Sa Slike 9 je moguće uočiti i izdvojene mješovite (muško/ženske) klastere koji se spajaju pri manjim udaljenostima (Našice, Velika, Čačinci, Voćin), što je posljedica nižih koncentracija arsena u urinu ispitanika uzorkovanih na zapadnijim lokacijama. U odnosu na rezultate klaster analize kose (Slika 9), struktura grupiranja kod urina je izraženija (Slika 10), u određenoj mjeri sličnija serumu i konzistentnija, što je u skladu s činjenicom da urin predstavlja najosjetljiviji biomarker recentne izloženosti arsenu. Ovakav raspored podupire rezultate regresijske analize, prema kojima je utvrđena vrlo jaka povezanost između koncentracija As u vodi za piće i arsena u urinu ispitanika.

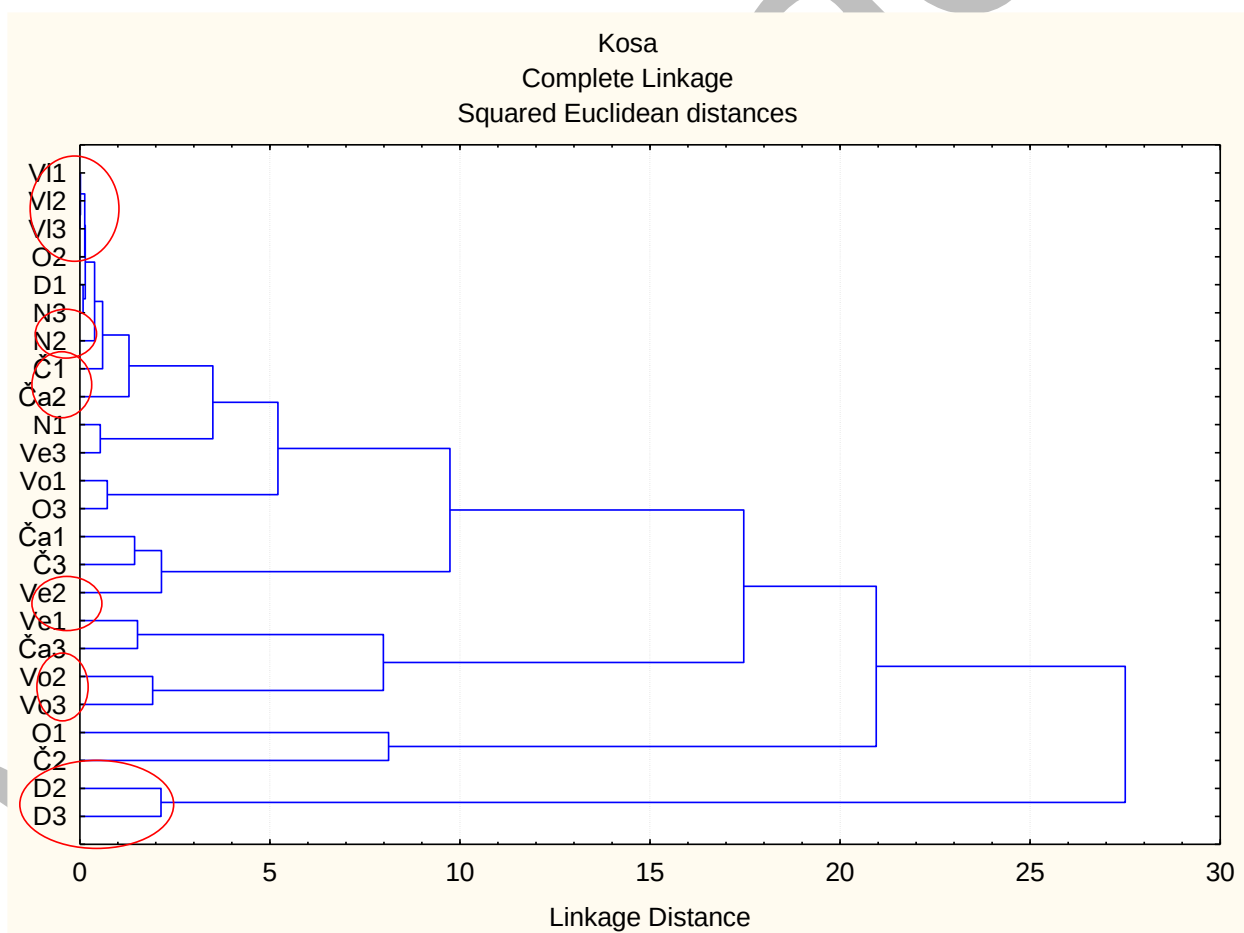
5.3.2. Rezultati klaster analize koncentracija arsena u biološkim uzorcima prema dobi svih ispitanika

Slike 10-12 prikazuju rezultate hijerarhijske klasterne analize koncentracija arsena u biološkim uzorcima ispitanika prema dobnim skupinama. Analiza je provedena metodom najdaljih susjeda (engl. *Complete linkage*), uz korištenje kvadrirane Euklidske udaljenosti, s ciljem grupiranja ispitanika prema sličnosti/različitosti. Na Slici 10 prikazan je dendrogram za uzorke seruma. Rezultat klaster analize ukazao je na djelomična grupiranja (Čepin) dvije dobne skupine odvojene u zaseban dvočlani klaster i mješoviti kompleksan klaster smješten pri manjim udaljenostima i sastavljen od različitih dobnih skupina.



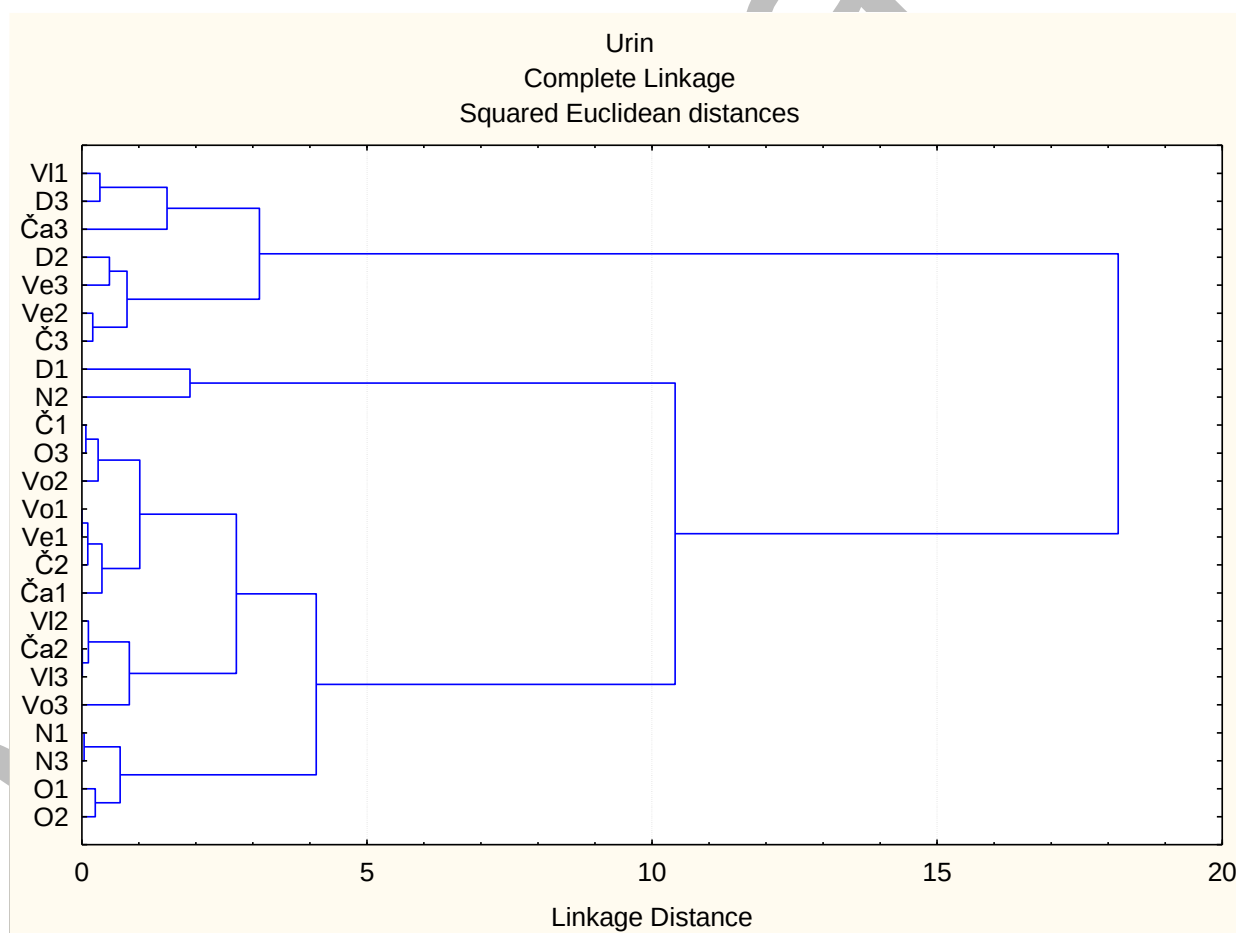
Slika 10. Rezultat klaster analize na koncentracijama arsena u serumu svih ispitanika razvrstanih prema dobnim skupinama. 1- dobna skupina 18-39 godina, 2- dobna skupina 40-59 godina, 3- dobna skupina 60 godina nadalje

Rezultat klaster analize za podatke koncentracija arsena u kosi prikazan na Slici 11 pokazuje da su ispitanici većinom grupirani u klastere koji obuhvaćaju dvije dobne skupine, srednju i stariju (npr. Dalj, Voćin, Velika, Našice), dok se samo jedan klaster sastojao od predstavnika svih triju dobnih skupina (Vladislavci). Lokacije smještene zapadnije (Voćin, Čačinci i Velika) raspoređene su u mješovit klaster prema dobnim skupinama, ali bez veće pravilnosti, što upućuje na to da iako dob nije bila presudna za potpuno razdvajanje, postojanje sličnosti prema lokaciji uzorkovanja, bilo je presudno za stvaranje niza klastera smještenih na manjim udaljenostima.



Slika 11. Rezultat klaster analize na koncentracijama arsena u kosi svih ispitanika razvrstanih prema dobnim skupinama. 1- dobna skupina 18-39 godina, 2- dobna skupina 40-59 godina, 3- dobna skupina 60 godina nadalje

Na Slici 12 prikazan je dendrogram za uzorke urina. Rezultati klaster analize pokazali su da dobne skupine nisu pokazivale jasan obrazac razvrstavanja u odnosu na koncentracije arsena u uzorcima urina. Većina klastera obuhvaćala je ispitanike dviju dobnih skupina, dok su se tri lokacije (Velika, Voćin i Čačinci) svrstale u dobno mješovit klaster, bez uočljive pravilnosti. Nasuprot tome, djelomično razdvajanje klastera prema ispitivanim lokacijama u Osijeku i Našicama, ukazuje na to da su prostorne razlike imale značajniju ulogu u formiranju klastera.

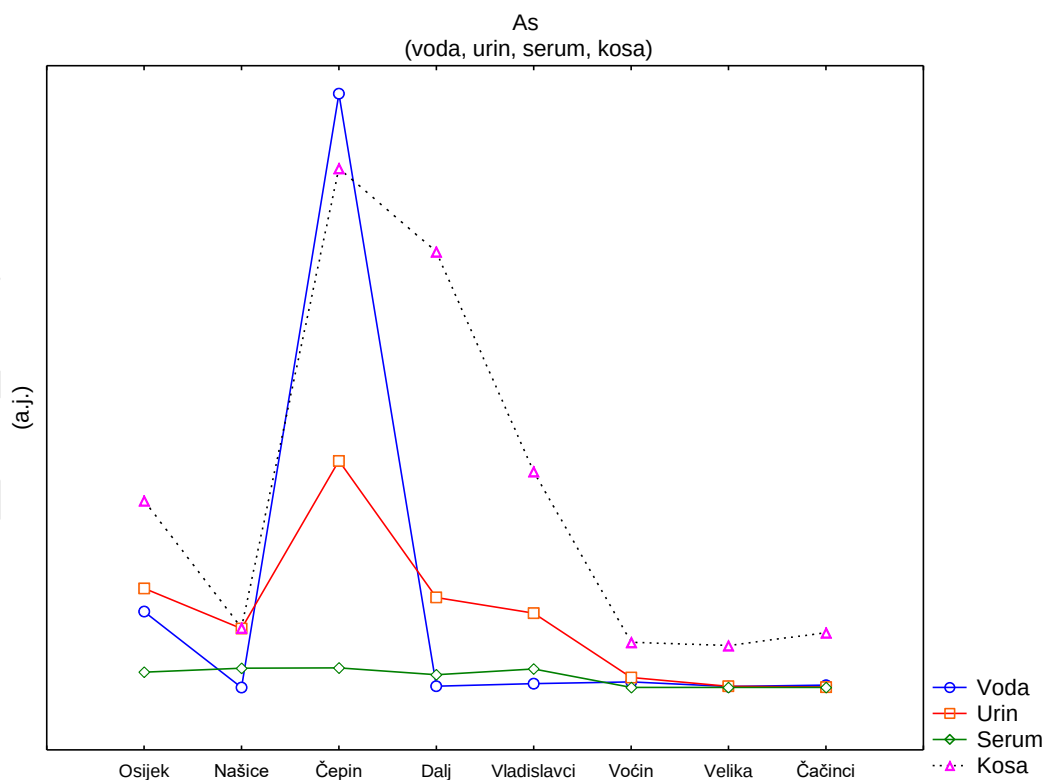


Slika 12. Rezultat klaster analize na koncentracijama arsena u urinu svih ispitanika razvrstanim prema dobnim skupinama 1-dobna skupina 18-39 godina, 2- dobna skupina 40-59 godina, 3- dobna skupina 60 godina nadalje

5. 4. Međusobni odnos koncentracija As u vodi, biološkim uzorcima, raka bubrega (C64) i raka mokraćnog mjehura (C67) u ispitivanim naseljima.

Na Slikama 13–19 prikazani su usporedni grafički prikazi koncentracija arsena u vodi za piće, biološkim uzorcima ispitanika (urin, serum i kosa), karcinomima (C64) i (C67) po pojedinim lokacijama.

Prikaz omogućuje vizualnu procjenu međuodnosa koncentracija arsena u vodi i odgovarajućih biomarkera izloženosti (urin, serum, kosa). Vidljivo je da promjene koncentracija arsena u vodi prate promjene koncentracija u urinu, osobito u naseljima s povišenim koncentracijama arsena u vodi (npr. Čepin). Ovakav obrazac potvrđuje da urin najvjernije odražava nedavnu izloženost arsenu putem vode za piće, što je u skladu s rezultatima linearne regresijske analize (visoka vrijednost R^2).



Slika 13. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija arsena u vodi i biološkim uzorcima svih ispitanika u ispitivanim naseljima

Za razliku od urina, koncentracije arsena u kosi pokazuju djelomično praćenje trendova koncentracija u vodi, ali uz izraženija odstupanja, što upućuje na moguć utjecaj dodatnih čimbenika i kumulativni karakter. Koncentracije arsena u serumu su relativno stabilne kroz sva naselja, i ne pokazuju sustavno praćenje koncentracija arsena u vodi, što potvrđuje njegovu ograničenu primjenjivost za procjenu kronične izloženosti arsenu.

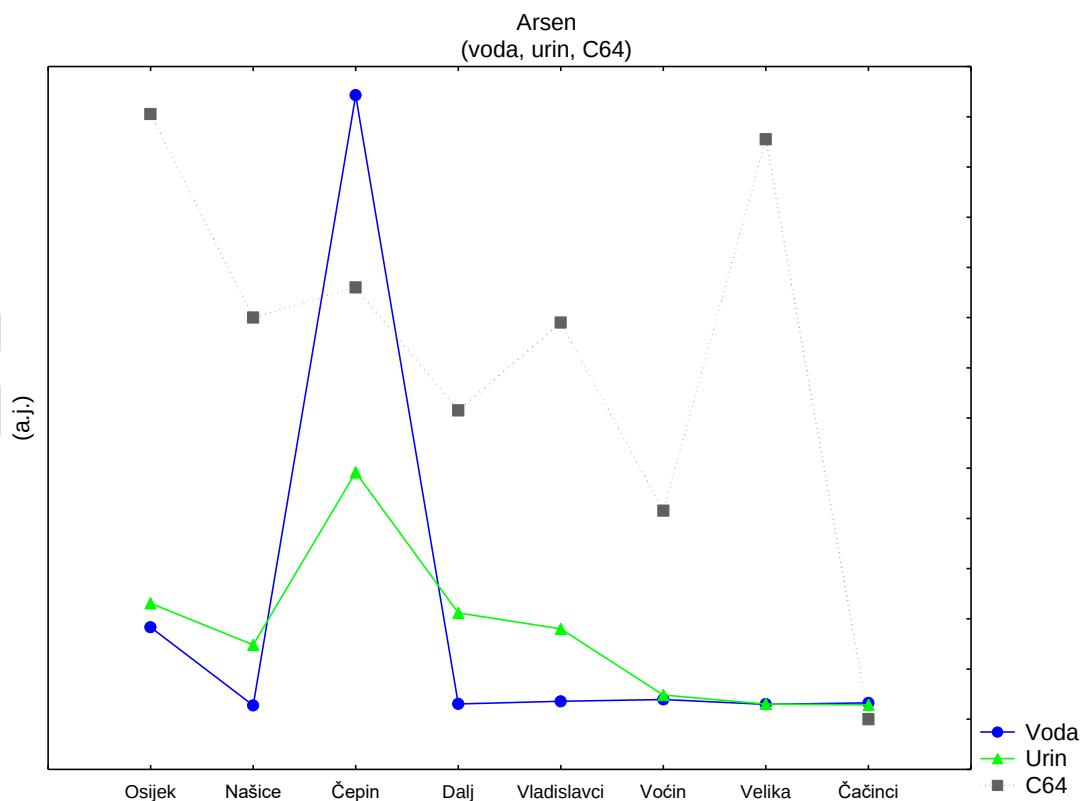
Tablica 13. Prikaz izmjerenih srednjih vrijednosti arsena u vodi za piće i biološkim uzorcima svih ispitanika (urin, serum i kosa) s kumulativnom 19-godišnjom učestalošću karcinoma uropoetskog sustava (C64 – karcinom bubrega i C67 – karcinom mokraćnog mjehura, prema MKB) izraženom na 100.000 stanovnika za pojedina naselja

Naselje	Voda	Urin	serum	Kosa	C64 učestalost	C67 učestalost
Osijek	24,17	32,3	5	0,31	241	438
Našice	0,07	19,29	6,3	0,05	160	277
Čepin	191,75	73,45	6,38	0,99	172	370
Dalj	0,52	27,68	4,64	0,88	123	328
Vladislavci	1,33	24,16	6,06	0,37	158	371
Voćin	2,08	3,34	0,20	0,023	83	335,85
Velika	0,33	0,23	0,20	0,045	231	214,02
Čačinci	0,52	0,45	0,20	0,042	0	285,51

C64 - karcinom bubrega, C67 - karcinom mokraćnog mjehura, MKB- maksimalno

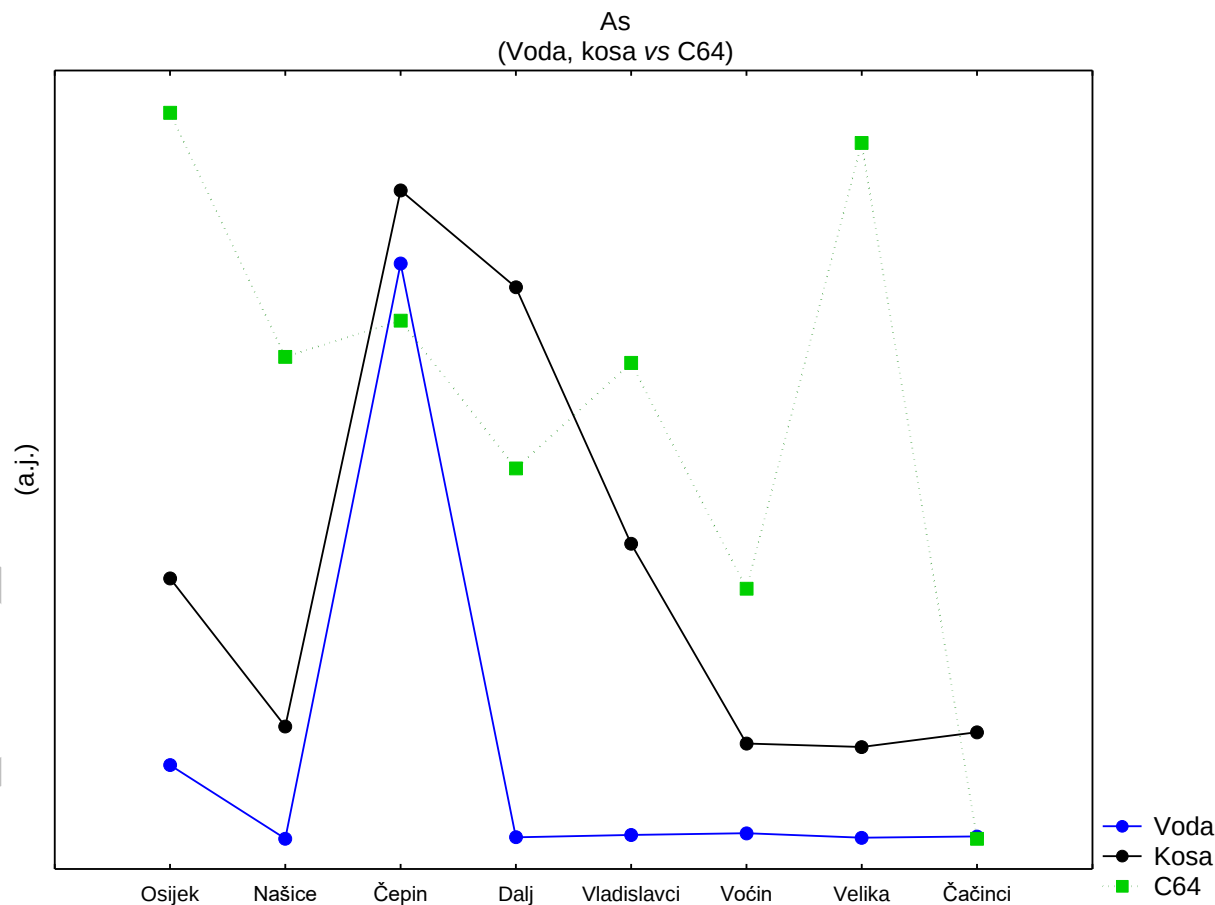
Iz prikazanih podataka u Tablici 13 vidljivo je da su najviše koncentracije arsena u vodi i urinu pronađene u naselju Čepin, što upućuje na povišenu kroničnu izloženost stanovništva arsenu putem vode za piće. Dodatno, u Čepinu je zabilježena i relativno visoka učestalost karcinoma mokraćnog mjehura (C67), što je u skladu s poznatim epidemiološkim podacima o povezanosti dugotrajne izloženosti arsenu i malignih bolesti uropoetskog sustava. Grad Osijek, iako s umjerenim koncentracijama arsena u vodi, pokazuje najviše vrijednosti incidencije oba promatrana karcinoma

(C64 i C67), što upućuje na to da, osim arsena, na pojavnost ovih bolesti mogu značajno utjecati i drugi okolišni, životni i demografski čimbenici (npr. pušenje, industrijsko onečišćenje, starosna struktura stanovništva). U naseljima s vrlo niskim koncentracijama As u vodi i biološkim uzorcima (npr. Voćin, Velika, Čačinci) zabilježene su niže ili umjerene vrijednosti incidencije karcinoma, iako bez dosljednog obrasca koji bi ukazivao na izravnu linearnu povezanost. To potvrđuje da je riječ o multifaktorijskim bolestima, kod kojih arsen predstavlja *confounding* faktor, jedan od mogućih, ali ne i jedini rizični čimbenik. Usporedbom izmjerenih vrijednosti arsena u vodi i urinu (kao najznačajnijem biomarkeru izloženosti) sa brojem stanovnika i brojem oboljelih od raka bubrega može se uočiti da je broj oboljelih na 100.000 stanovnika veći u područjima sa izmjerenim većim koncentracijama arsena, točnije, naseljima Osijek, Čepin, Vladislavci, Dalj ali i Našice u odnosu na Voćin, Veliku i Čačince. Kod slučajeva oboljelih od raka mokraćnog mjehura najveći broj oboljelih je na područjima Osijeka, Čepina i Vladislavaca.



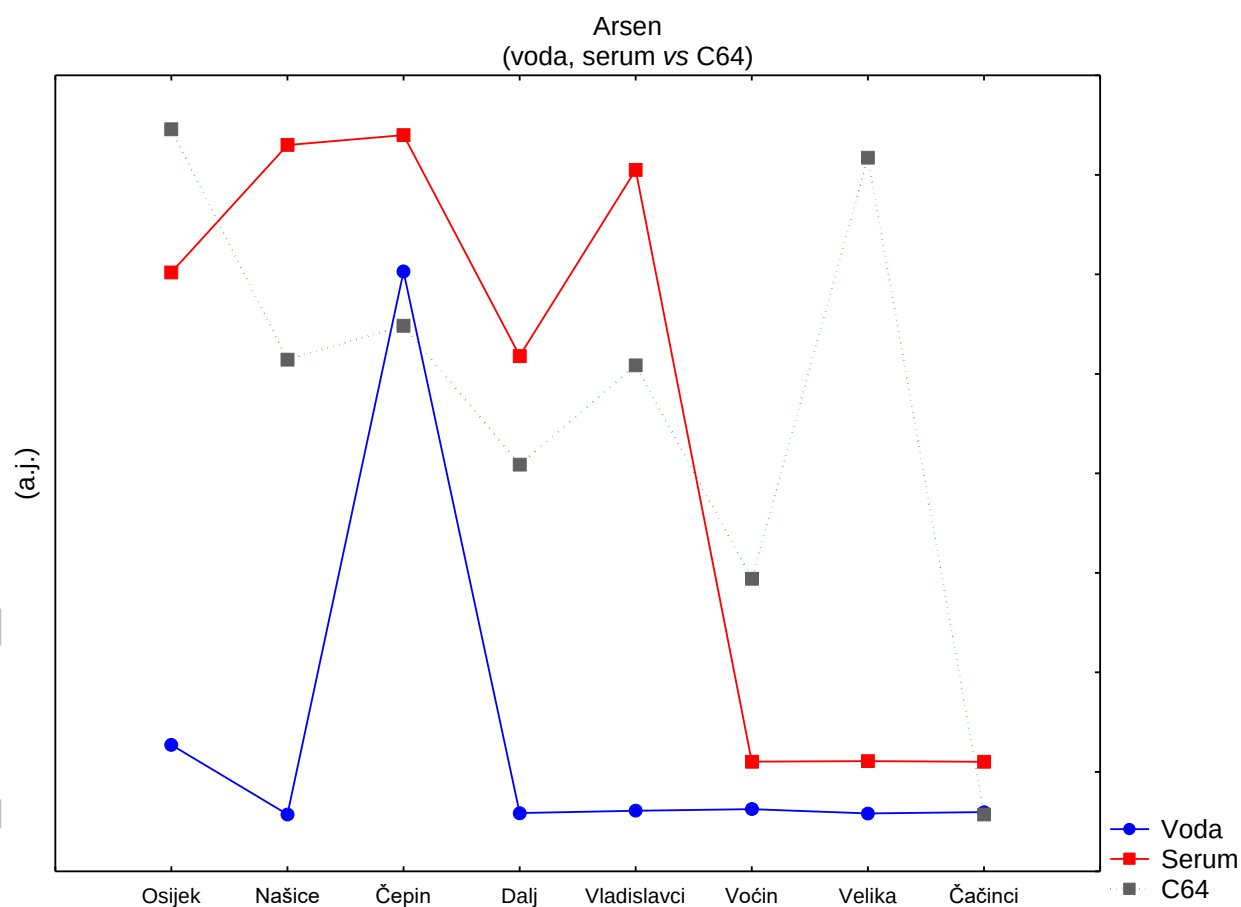
Slika 14. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija arsena (As) u vodi za piće i urinu svih ispitanika s brojem slučajeva raka bubrega (C64 prema MKB) u ispitivanim naseljima

Iz grafikona prikazanog na Slici 14 vidljivo je da naselje Čepin, iako pokazuje najveći trend rasta koncentracija arsena u vodi i urinu, ne pokazuje proporcionalno najveći trend povećanja broja slučajeva raka bubrega u usporedbi s ostalim naseljima. Najviši broj slučajeva C64 zabilježen je u Osijeku, iako su koncentracije As u vodi i urinu u tom naselju znatno niže nego u Čepinu. Ovakav nalaz upućuje na to da ne postoji jednostavna linearna povezanost između koncentracija As u vodi i urinu s brojem slučajeva raka bubrega (C64) na razini promatranih naselja. U naseljima s vrlo niskim koncentracijama As u vodi i urinu (npr. Voćin, Velika i Čačinci) zabilježen je zabilježen je trend rasta broja karcinoma bubrega (obrazac sličan onome u Osijeku), što dodatno potvrđuje multifaktorijalnu etiologiju raka bubrega.



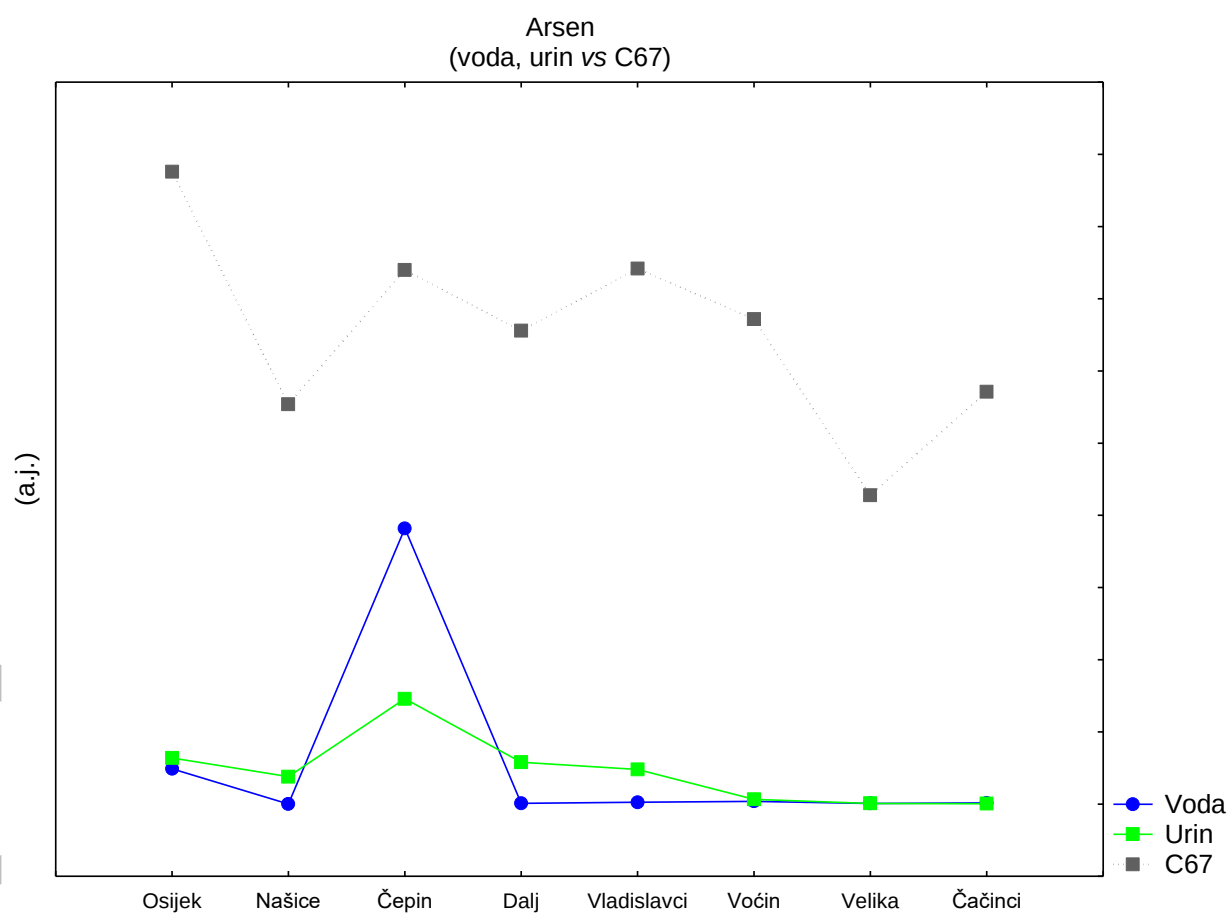
Slika 15. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija arsena (As) u vodi i kosi svih ispitanika s brojem slučajeva raka bubrega (C64 prema MKB) u ispitivanim naseljima

Iz Slike 15 je vidljivo da naselje Čepin pokazuje najveći trend rasta koncentracije As u vodi i kosi, dok broj slučajeva raka bubrega u tom naselju ne slijedi taj trend. Najveći broj slučajeva C64 zabilježen je u Osijeku i Velikoj, iako su koncentracije As u vodi u tim naseljima niske ili umjerene. Ovakav raspored upućuje na to da ne postoji jasna, dosljedna povezanost između trenda koncentracija As u vodi i kosi sa pojavnosti raka bubrega u promatranim naseljima. Trend koncentracija arsena u kosi pokazuje blaže varijacije u odnosu na vodu, što odražava kumulativni karakter, no ni one ne prate trend pojavnosti raka bubrega. To dodatno potvrđuje da je rak bubrega multifaktorijalna bolest, na čiju pojavu, uz okolišne čimbenike, značajno utječu i genetski, životni i demografski čimbenici.



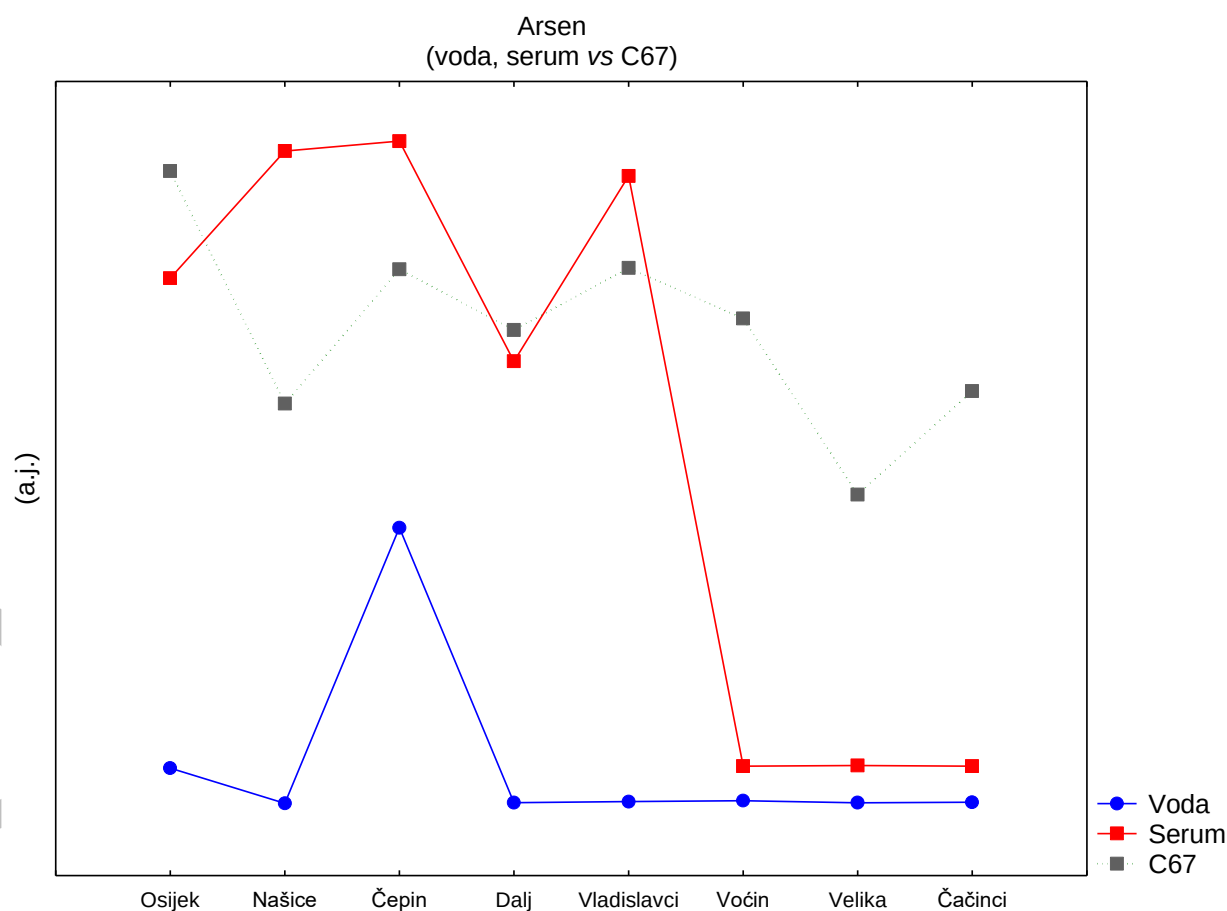
Slika 16. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija arsena u vodi i serumu svih ispitanika s brojem slučajeva raka bubrega (C64 prema MKB) u ispitivanim naseljima

Iz Slike 16 je vidljivo da su varijacije koncentracija arsena u serumu u svim naseljima niske i relativno ujednačene, bez izraženih varijacija koje bi pratile promjene koncentracija arsena u vodi. Naselje Čepin pokazuje trend rasta arsena u vodi i serumu, što nije slučaj na ostalim lokacijama. Izostanak sličnog trenda dodatno potvrđuje da serum ne odražava kroničnu izloženost arsenu putem vode s pouzdanošću. Usporedba ta dva trenda s brojem slučajeva raka bubrega (C64) ne pokazuje dosljedan obrazac povezanosti. Porast trenda broja slučajeva C64 zabilježen je u Osijeku i Velikoj, iako su koncentracije arsena u vodi i serumu u tim naseljima bile niske ili umjerene. Ovakav nalaz upućuje na to da na razini promatranih naselja ne postoji jasna povezanost između koncentracija arsena u vodi i serumu sa pojavom raka bubrega.



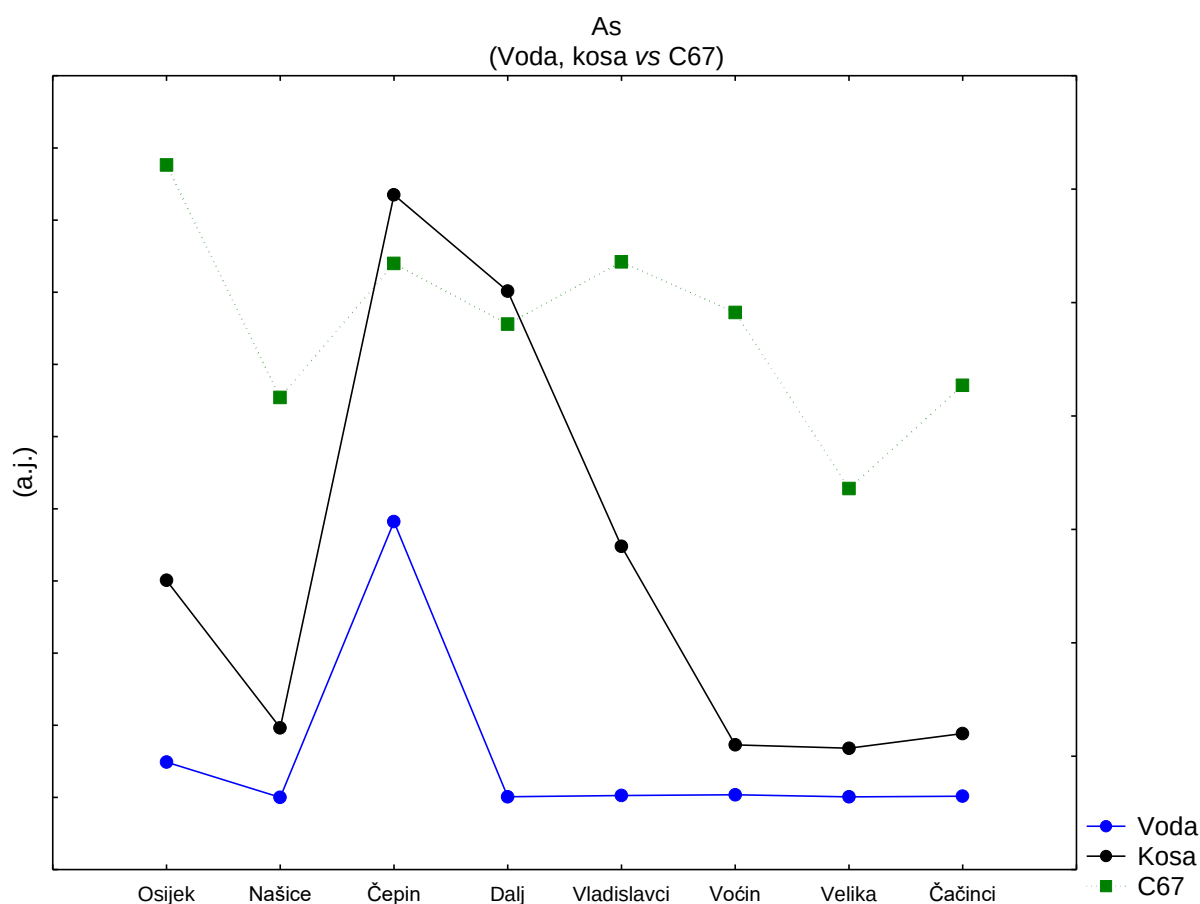
Slika 17. Prikaz odnosa aritmetičkih sredina koncentracija arsena u vodi za piće i u urinu svih ispitanika s brojem slučajeva raka mokraćnog mjehura (C67 prema MKB) u ispitivanim naseljima

Iz Slike 17 je vidljivo da naselje Čepin ima povišen trend rasta koncentracija arsena u vodi i urinu, pri čemu je istodobno zabilježen i trend rasta broja slučajeva raka mokraćnog mjehura. Ovakav obrazac ukazuje na paralelno povećanje izloženosti arsenu i učestalosti C67, što je u skladu s poznatim epidemiološkim nalazima o povezanosti dugotrajne izloženosti arsenu i raka mokraćnog mjehura. U ostalim naseljima, iako su koncentracije arsena u vodi i urinu znatno niže, broj slučajeva C67 pokazuje određene varijacije, pri čemu Osijek bilježi najveći apsolutni broj slučajeva. To upućuje na važan utjecaj demografskih i okolišnih čimbenika, uključujući veličinu populacije, urbani karakter naselja ili prisutnost dodatnih rizičnih čimbenika, poput pušenja.



Slika 18. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina arsena u vodi i serumu svih ispitanika s brojem slučajeva raka mokraćnog mjehura (C67 prema MKB) u ispitivanim naseljima

Iz Slike 18 vidljivo je da trend koncentracija arsena u serumu u svim promatranim naseljima ne prati jasno trend promjena koncentracija As u vodi. Usporedba ta dva trenda s brojem slučajeva raka mokraćnog mjehura (C67) ne pokazuje dosljedan obrazac povezanosti. Ovakav nalaz upućuje na značajan utjecaj demografskih i okolišnih čimbenika, kao i drugih poznatih rizičnih čimbenika za rak mokraćnog mjehura, poput npr. pušenja. Serum je biomarker kratkotrajne, trenutačne izloženosti, s brзом eliminacijom arsena iz cirkulacije, a dobiveni rezultati ne upućuju na izravnu povezanost između koncentracija arsena u serumu i pojave raka mokraćnog mjehura na razini promatranih naselja.



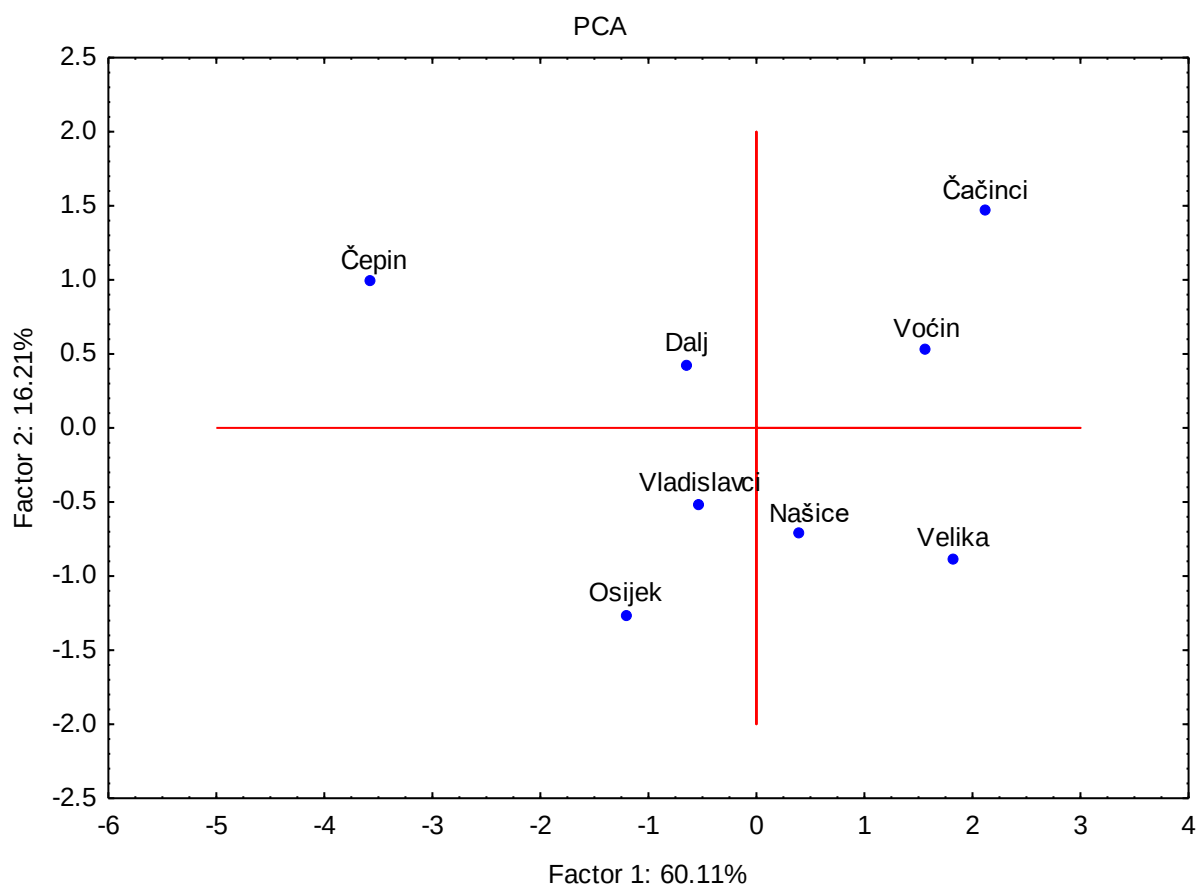
Slika 19. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija arsena u vodi i kosi svih ispitanika s brojem slučajeva raka mokraćnog mjehura (C67 prema MKB) u ispitivanim naseljima

Iz Slike 19 je vidljivo da naselje Čepin pokazuje trend rasta koncentracija arsena u vodi i kosi, pri čemu je zabilježen i povišen broj slučajeva raka mokraćnog mjehura u odnosu na većinu ostalih

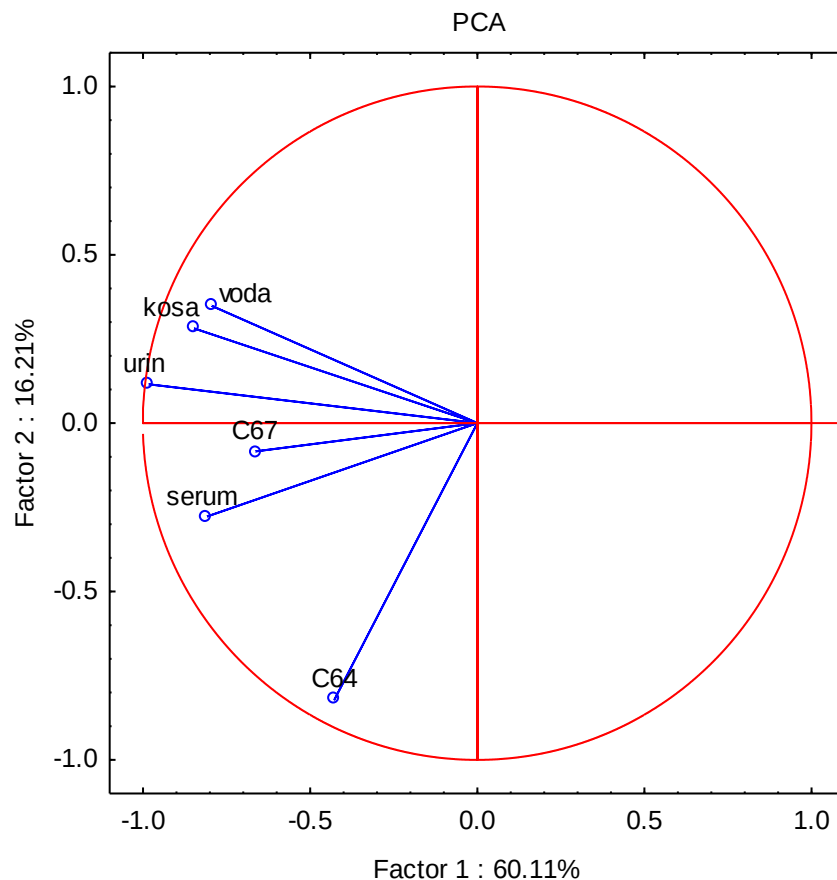
naselja. Ovakav sličan trend upućuje na moguću povezanost dugotrajne izloženosti arsenu i pojavnosti raka mokraćnog mjehura, budući da kosa predstavlja biomarker kumulativne izloženosti. U ostalim naseljima ne uočava se dosljedno praćenje trendova koncentracija arsena u vodi i kosi s brojem slučajeva C67. Ovakav nalaz ukazuje na značajan utjecaj dodatnih rizičnih čimbenika, uključujući veličinu populacije, prevalenciju pušenja i urbane okolišne utjecaje. Prikazani broj slučajeva C67 odnosi se na kumulativnu incidenciju tijekom dugog vremenskog razdoblja, što ograničava izravnu usporedbu s trenutnim mjerenjima arsena. Dobiveni rezultati upućuju na indicijsku, ali ne i jednoznačnu povezanost između viših koncentracija As u vodi i kosi te pojavnosti raka mokraćnog mjehura.

5.5. Analiza glavnih komponenata na podacima koncentracija arsena u vodi, biološkim uzorcima (urinu, serumu i kosi) prema naseljima sa pojavnošću raka bubrega i mokraćnog mjehura

Analiza glavnih komponenata (*Principal Component Analysis-PCA*) predstavlja jednu od najčešće korištenih multivarijantnih metoda za smanjenje dimenzionalnosti podataka, a istovremeno zadržava što je moguće više varijabilnosti u podatkovnoj matrici. Jedna od glavnih prednosti PCA je mogućnost pojednostavljenja kompleksnih i višedimenzionalnih podataka u nekoliko glavnih komponenti (najčešće dvije), što olakšava vizualizaciju i daljnju interpretaciju rezultata. PCA također pomaže u identificiranju ključnih varijabli koje najviše doprinose razlikama među uzorcima.



Slika 20. Rezultat analize glavnih komponenata (PCA) izmjerenih vrijednosti arsena u vodi i biološkim uzorcima svih ispitanika s brojem slučajeva raka bubrega i mokraćnog mjehura (C 64 i C 67 po MKB) u ispitivanim naseljima



Slika 21. Rezultat analize glavnih komponenata (PCA) izmjerenih vrijednosti arsena u vodi i biološkim uzorcima sa brojem slučajeva raka bubrega i mokraćnog mjehura (C 64 i C 67 po MKB). Na slici su prikazane varijable

Slike 20 i 21 prikazuju rezultate analize glavnih komponenata (PCA) izmjerenih koncentracija arsena u vodi za piće i biološkim uzorcima (urin, kosa i serum), zajedno s brojem slučajeva raka bubrega (C64) i raka mokraćnog mjehura (C67). Analiza glavnih komponenti omogućuje istodobnu procjenu međusobnih odnosa varijabli te pozicioniranje pojedinih naselja u odnosu na dominantne obrasce varijabilnosti podataka. Prve dvije glavne komponente objašnjavaju 76,38 % ukupne varijance (Faktor 1: 60,11 %, Faktor 2: 16,27 %), što ukazuje na dobru reprezentativnost PCA modela. (Slike 20 i 21).

Na dijagramu projekcije varijabli (Slika 20) vidljivo je da su koncentracije arsena u vodi, urinu i kosi grupirane u istom kvadrantu i usmjerene u sličnom smjeru, što potvrđuje njihovu međusobnu

povezanost i zajednički okolišni izvor izloženosti. Jasno su odvojena tri klastera, prvi - smješten pretežito u gornjem i donjem desnom kvadrantu koji se sastoji od mjesta: Velika i Čačinci, Voćin; i drugi, - smješten u centralnom dijelu prikaza predstavljenog mjestima Osijek, Našice, Vladislavci i Dalj i treći, jednočlani klaster kojeg čini naselje Čepin. Posebno je izražena blizina vektora *voda* i *urin*, čime se dodatno potvrđuje da urin predstavlja važan biomarker izloženosti arsenu putem vode, što je u skladu s rezultatima regresijske analize. Vektor C67 (rak mokraćnog mjehura) nalazi se u relativnoj blizini skupine varijabli povezanih s izloženošću arsenu, što upućuje na pozitivnu povezanost između dugotrajne izloženosti arsenu i pojavnosti raka mokraćnog mjehura. Suprotno tome, vektor C64 (rak bubrega) je prostorno udaljen i orijentiran u drugačijem smjeru, što ukazuje na slabiju ili neizravnu povezanost s koncentracijama arsena u vodi i biološkim uzorcima. Na dijagramima projekcija lokacija i varijabli uočava se da se naselje Čepin jasno izdvaja u smjeru varijabli povezanih s povišenim koncentracijama arsena u vodi i biološkim uzorcima, što potvrđuje njegovu specifičnu izloženost visokim koncentracijama arsena. Naselja poput Osijeka, Dalja i Vladislavaca smještena su u suprotnom dijelu faktorske ravnine, bliže su varijablama koje nisu izravno povezane s izloženošću arsenu. Grad Našice i naselja Voćin, Velika i Čačinci na području Papuka, grupirana su u području nižih vrijednosti koncentracija arsena i umjerenih vrijednosti C67, što upućuje na nižu razinu izloženosti arsenu. PCA analiza dodatno naglašava da se rak mokraćnog mjehura prostorno i statistički približava varijablama izloženosti arsenu, dok rak bubrega pokazuje drugačiji obrazac, što je u skladu s poznatim biološkim mehanizmima izlučivanja arsena putem mokraćnog sustava. Analiza glavnih komponentni pruža kompletan uvid u međusobne odnose varijabli te potvrđuje da je dugotrajna izloženost arsenu putem vode za piće snažnije povezana s pojavnosti raka mokraćnog mjehura (C67) nego raka bubrega (C64). Dobiveni rezultati dodatno podupiru zaključak da je urin najpouzdaniji biomarker izloženosti arsenu u ispitivanoj populaciji. PCA analiza arsena pokazala je jasnu povezanost između koncentracija arsena u vodi i koncentracija arsena u urinu, pri čemu su se ove varijable projicirale u sličnom smjeru faktorske ravnine. Ovakav raspored ukazuje na to da je voda za piće dominantan izvor izloženosti arsenu, što je dodatno potvrđeno regresijskom analizom s visokom vrijednošću koeficijenta determinacije ($R^2 \approx 0,8$). Biološki uzorci (urin, djelomično kosa) pokazali su povezanost s koncentracijama arsena u vodi, dok su epidemiološki pokazatelji (osobito C64 i C67) prostorno bliži arsenovim varijablama. Iako PCA ne dokazuje uzročnost, ovakav raspored varijabli upućuje na potencijalnu epidemiološku relevantnost povišenih koncentracija arsena, osobito u kontekstu kronične

izloženosti putem vode za piće.

5.6. Koncentracije urana u vodi za piće

Tablica 14 prikazuje osnovne statističke pokazatelje izmjerenih koncentracija urana u vodi za piće iz dostupnih izvora vodoopskrbe u ispitivanim naseljima. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da se koncentracije urana u vodi značajno razlikuju među pojedinim lokacijama, što upućuje na utjecaj lokalnih hidrogeoloških i geokemijskih čimbenika.

Tablica 14. Izmjerene srednje vrijednosti urana u dostupnim izvorima vodoopskrbe u ispitivanim naseljima izražene u $\mu\text{g L}^{-1}$

Uran u vodi ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
Naselje	N	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	SD
Vladislavci	16	3,14	2,67	0,004	9,01	2,72
Dalj	19	4,25	3,32	0,02	13,32	3,44
Čepin	12	0,001	0,001	0,001	0,01	0,003
Našice	8	0,19	0,18	0,13	0,29	0,05
Osijek	12	0,002	0,04	0,004	0,01	0,004
Voćin	4	0,53	0,55	0,26	0,75	0,22
Čačinci	6	0,69	0,61	0,30	1,09	0,29
Velika	4	0,76	0,58	0,30	1,60	0,60

N- broj uzoraka, $\bar{x}$ -aritmetička sredina, SD- standardna devijacija

Najviše srednje koncentracije urana zabilježene su u naseljima Dalj ($4,25 \mu\text{g L}^{-1}$) i Vladislavci ($3,14 \mu\text{g L}^{-1}$), uz relativno širok raspon vrijednosti i visoke vrijednosti standardnog odstupanja, što ukazuje na izraženu varijabilnost koncentracija urana unutar istih vodoopskrbnih sustava. Maksimalne vrijednosti u tim naseljima dosežu $13,32 \mu\text{g L}^{-1}$ (Dalj) i $9,01 \mu\text{g L}^{-1}$ (Vladislavci), što upućuje na mjestimično povišene koncentracije. Umjerene koncentracije urana zabilježene su u naseljima Velika ($\bar{x}=0,76 \mu\text{g L}^{-1}$), Čačinci ($\bar{x}=0,69 \mu\text{g L}^{-1}$) i Voćin ($\bar{x}=0,53 \mu\text{g L}^{-1}$), pri čemu je u Velikoj uočen i veći raspon vrijednosti (maksimum $1,60 \mu\text{g L}^{-1}$), što također ukazuje na prostornu heterogenost izvora vode. Najniže koncentracije urana zabilježene su u Čepinu, Osijeku i Našicama, gdje su srednje vrijednosti ispod $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, a u Čepinu i Osijeku koncentracije su blizu

granice detekcije metode. Ovakvi rezultati upućuju na minimalnu izloženost uranu putem vode za piće u tim naseljima. Sve izmjerene koncentracije urana u vodi za piće na svim ispitivanim lokacijama bile su značajno ispod smjernica Svjetske zdravstvene organizacije i propisanih maksimalno dopuštenih vrijednosti za uran u vodi za piće ($30 \mu\text{g L}^{-1}$).

5.7. Koncentracije urana u biološkim uzorcima

Vrijednosti medijana koncentracija urana u kosi u naseljima s područja Papuka zabilježene su kod ispitanika iz naselja Čačinci ($0,011 \mu\text{g g}^{-1}$), Voćin ($0,011 \mu\text{g g}^{-1}$) i Velika ($0,010 \mu\text{g g}^{-1}$). U tim naseljima uočene su više vrijednosti 75. percentila (Velika $0,028 \mu\text{g g}^{-1}$), što upućuje na nešto izraženiju varijabilnost unutar istraživane populacije (Tablica 15).

Tablica 15. Izmjerene koncentracije urana ($\mu\text{g g}^{-1}$) u kosi svih ispitanika prema u ispitivanim naseljima

Naselje	N	Medijan	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	85	0,010	0,004	0,018
Dalj	104	0,002	0,001	0,004
Čepin	51	0,001	0,001	0,008
Našice	79	0,004	0,001	0,008
Osijek	64	0,003	0,001	0,011
Voćin	31	0,011	0,008	0,018
Čačinci	47	0,011	0,004	0,019
Velika	22	0,010	0,008	0,028

N- broj uzoraka

Raspon između 25. i 75. percentila pokazuje da je varijabilnost koncentracija urana u kosi općenito umjerena, uz ponegdje izraženije vrijednosti gornjih kvartila, što može biti posljedica individualnih čimbenika ili okolišnih uvjeta. Izmjerene vrijednosti su niske u svim lokacijama pri čemu su lokacije s najvišim medijanom koncentracije urana one na području Papuka (Čačinci, Voćin i Velika), uz nešto veće vrijednosti u Vladislavcima koje se ne mogu objasniti geogenim podrijetlom urana. Ove vrijednosti su oko nekoliko puta veće od koncentracija u Osijeku,

Našicama, Čepinu i Dalju.

Rezultati analize koncentracija urana u kosi ispitanika po različitim lokacijama (Tablica 15) ukazuju na prostorne varijacije, koje se mogu povezati s geološkim karakteristikama područja. Veće koncentracije zabilježene su u naseljima Voćin, Čačinci i Velika, smještenima u području južnih padina Papuka, gdje dominiraju magmatske i metamorfne stijene te paleozojske formacije poznate po povišenim prirodnim sadržajima urana i drugih primarnih radionuklida. Ovaj geološki kontekst vjerojatan je izvor nešto viših vrijednosti urana u biološkim uzorcima stanovništva, što je u skladu s prethodnim radovima koji ukazuju na prirodno povišenu geokemijsku pozadinu na području Papuka. Suprotno tome, najniže koncentracije urana pronađene su u ravničarskim područjima Panonskog bazena (Čepin, Dalj, Osijek, Našice), gdje prevladavaju aluvijalni i kvartarni sedimenti s niskim udjelima prirodnih radionuklida. Ovi rezultati potvrđuju hipotezu o geološkoj uvjetovanosti razlika u izloženosti uranu te ukazuju na stabilno i nisko opterećenje okoliša uranom u panonskom dijelu regije. Unatoč prostornim razlikama, važno je naglasiti da se pronađene koncentracije na svim lokacijama nalaze unutar raspona koji se u literaturi navodi kao tipičan za opću populaciju, odnosno unutar vrijednosti koje se smatraju pokazateljem prirodne izloženosti niskim koncentracijama urana u okolišu. Usporedbom s relevantnim međunarodnim smjernicama (WHO, ATSDR, ICRP) vidljivo je da koncentracije urana u kosi ispitanika ne ukazuju na povećani zdravstveni rizik, niti prelaze koncentracije koje bi mogle upućivati na toksične učinke i značajno opterećenje organizma uranom.

Iz prikazanih rezultata (Tablica 16) vidljivo je da su koncentracije urana u urinu vrlo niske i izrazito homogeno raspoređene unutar većine ispitivanih naselja. U naseljima Vladislavci, Dalj, Čepin, Našice i Osijek vrijednosti medijana, kao i 25. i 75. percentili, iznose $0,010 \mu\text{g L}^{-1}$, što upućuje na vrijednosti bliske granici detekcije analitičke metode i zanemarivu varijabilnost među ispitanicima. Koncentracije urana u urinu potvrđuju rezultate dobivene analizom seruma i kose. U većem dijelu istraživanog područja izloženost uranu je minimalna i homogena, dok se u području Papuka (Voćin, Čačinci, Velika) pojavljuju nešto više vrijednosti u sve tri biološke matrice. U naseljima sa nešto višim koncentracijama na području Papuka (Voćin, Čačinci, Velika) vrijednosti medijana koncentracija urana u urinu iznosile su $0,050 \mu\text{g L}^{-1}$, što je nekoliko puta više u odnosu na preostala ispitivana naselja (Tablica 16).

Tablica 16. Rezultati osnovne statistike koncentracija urana ($\mu\text{g L}^{-1}$) u urinu svih ispitanika u ispitivanim naseljima

Naselje	N	Medijan	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	85	0,010	0,010	0,010
Dalj	104	0,010	0,010	0,010
Čepin	51	0,010	0,010	0,010
Našice	79	0,010	0,010	0,010
Osijek	64	0,010	0,010	0,010
Voćin	31	0,050	0,050	0,052
Čačinci	48	0,050	0,050	0,050
Velika	22	0,050	0,050	0,050

N- broj uzoraka

Percentilni raspon je vrlo uzak, što znači da su slične koncentracije prisutne kod gotovo svih ispitanika. Urin kao marker recentne izloženosti pokazuje da stanovnici ovih triju naselja imaju stalnu, ali i dalje nisku razinu unosa urana.

Ovaj obrazac je u skladu s geološkim karakteristikama Papuka te ukazuje na kontinuiranu, ali zdravstveno neopterećujuću izloženost stanovništva prirodnim izvorima urana. U Vladislavcima i Dalju prisutno je određeno odstupanje između koncentracija urana u vodi i biološkim indikatorima. Sve izmjerene vrijednosti urana u biomarkerima nalaze se unutar referentnog raspona opću populaciju i ne prelaze pragove koncentracija koji bi upućivali na toksične učinke.

Rezultati pokazuju da su koncentracije urana u serumu muških ispitanika u većini ispitivanih naselja vrlo niske i slabo varijabilne (Tablica 17). U naseljima Vladislavci, Dalj, Čepin, Našice i Osijek vrijednosti medijana iznose $0,020 \mu\text{g L}^{-1}$, pri čemu su interkvartilni rasponi uski i u većini slučajeva bliski granici detekcije analitičke metode.

Tablica 17. Koncentracija urana ($\mu\text{g L}^{-1}$) u serumu muških ispitanika u ispitivanim naseljima

Naselje	N (muški)	Medijan	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	37	0,02	0,020	0,020
Dalj	43	0,02	0,020	0,020
Čepin	40	0,020	0,020	0,038
Našice	29	0,020	0,020	0,024
Osijek	50	0,020	0,020	0,063
Voćin	16	0,103	0,100	0,120
Čačinci	28	0,109	0,102	0,127
Velika	17	0,103	0,100	0,108

N- broj uzoraka

Iako se u pojedinim naseljima (npr. Čepin i Osijek) uočavaju blago povišene vrijednosti gornjih kvartila, apsolutne koncentracije ostaju niske. Nasuprot tome, u naseljima područja Papuka: Voćin, Čačinci i Velika zabilježene su nešto više vrijednosti medijana koncentracije urana u serumu (cca. $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$), uz relativno uzak interkvartilni raspon. Ovakav obrazac ukazuje na to unatoč sustavnom povišenju, koncentracije urana u serumu muških ispitanika tih naselja imaju i dalje niske apsolutne vrijednosti.

U većini promatranih lokacija (Vladislavci, Dalj, Čepin, Našice i Osijek) medijan koncentracija iznosi $0,020 \mu\text{g L}^{-1}$, a 25. percentil je u svim tim sredinama jednak toj vrijednosti (Tablica 18). To upućuje na činjenicu da se većina izmjerenih vrijednosti nalazi na granici, ili neposredno iznad donje granice detekcije analitičke metode. U Čepinu i Osijeku zabilje žene su nešto više vrijednosti 75. percentila ($0,042 \mu\text{g L}^{-1}$), dok su u Našicama povišenja minimalna ($0,022 \mu\text{g L}^{-1}$). Unatoč tome, medijani ostaju nepromijenjeni, što upućuje na to da se povišene vrijednosti odnose na manji broj ispitanika.

Tablica 18. Koncentracija urana u($\mu\text{g L}^{-1}$) serumu ženskih ispitanika u ispitivanim naseljima

Naselje	N (žene)	Medijan	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	48	0,020	0,020	0,020
Dalj	61	0,020	0,020	0,020
Čepin	11	0,020	0,020	0,042
Našice	50	0,020	0,020	0,022
Osijek	14	0,020	0,020	0,042
Voćin	15	0,106	0,102	0,130
Čačinci	20	0,102	0,100	0,104
Velika	5	0,100	0,100	0,102

N- broj uzoraka

Za razliku od navedenih lokacija, u naseljima Voćin, Čačinci i Velika zabilježene su nešto više koncentracije urana u serumu. Medijani se kreću između 0,100 i 0,107 $\mu\text{g L}^{-1}$, a interkvartilni rasponi su jasno pomaknuti prema višim vrijednostima u odnosu na ostale lokacije. Ovakav obrazac upućuje na razlike u prirodnoj geokemijskoj prisutnosti urana u sredinama u kojima žive ispitanice, pri čemu se izmjerene vrijednosti nalaze unutar referentnih granica. Ovakav obrazac upućuje na razlike u prirodnoj geokemijskoj prisutnosti urana u sredinama u kojima žive ispitanice, pri čemu se izmjerene vrijednosti nalaze unutar referentnih granica.

U većini naselja (Vladislavci, Dalj, Čepin, Našice i Osijek) medijani koncentracija urana izmjerenih u urinu muških ispitanika (Tablica 19) iznose 0,010 $\mu\text{g L}^{-1}$, pri čemu su i 25. percentil, ali u gotovo svim slučajevima i vrijednosti 75. percentila jednaki toj vrijednosti. Ovakav rezultat ukazuje na to da se većina izmjerenih koncentracija nalazi na granici ili vrlo blizu donje granice detekcije metode.

Tablica 19. Koncentracija urana ($\mu\text{g L}^{-1}$) u urinu muških ispitanika

Naselje	N (muški)	Medijan	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	37	0,010	0,010	0,010
Dalj	43	0,010	0,010	0,010
Čepin	40	0,010	0,010	0,010
Našice	29	0,010	0,010	0,020
Osijek	50	0,010	0,010	0,010
Voćin	16	0,050	0,050	0,052
Čačinci	28	0,050	0,050	0,050
Velika	17	0,051	0,050	0,050

N- broj uzoraka

U Našicama je zabilježen blagi porast 75. percentila (0,020 $\mu\text{g L}^{-1}$), što upućuje na postojanje manjeg broja ispitanika s povišenim vrijednostima, ali bez pomaka vrijednosti medijana. Za razliku od navedenih lokacija, u naseljima Voćin, Čačinci i Velika uočene su nešto više koncentracije urana u urinu. Vrijednosti medijana u tim sredinama kreću se oko 0,050–0,051 $\mu\text{g L}^{-1}$, a interkvartilni rasponi su uski, s 25. i 75. percentilom gotovo jednakih vrijednosti. Rezultat ukazuje na razlike u izmjerenim koncentracijama urana u mokraći muških ispitanika u tim područjima, uz vrijednosti koje se nalaze unutar referentnog raspona (Tablica 19).

Tablica 20. Koncentracija urana($\mu\text{g L}^{-1}$) u urinu ženskih ispitanika u ispitivanim naseljima

Naselje	N (žene)	Medijan	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	48	0.010	0.010	0.010
Dalj	61	0.010	0.010	0.010
Čepin	11	0.010	0.010	0.010
Našice	50	0.010	0.010	0.010
Osijek	14	0.010	0.010	0.010
Voćin	15	0.053	0.050	0.055
Čačinci	20	0.051	0.050	0.058
Velika	5	0.051	0.050	0.051

N- broj uzoraka

Rezultati mjerenja koncentracije urana u urinu ženskih ispitanika pokazuju da su koncentracije urana u urinu žena u većini ispitivanih naselja vrlo niske i ujednačene (Tablica 20). U naseljima Vladislavci, Dalj, Čepin, Našice i Osijek vrijednosti medijana, kao i vrijednosti 25. i 75. percentila, iznose $0,010 \mu\text{g L}^{-1}$, što upućuje na vrijednosti bliske granici detekcije analitičke metode i zanemarivu individualnu varijabilnost. U naseljima Voćin, Čačinci i Velika zabilježene su nešto više, ali i dalje niske koncentracije urana u urinu, s vrijednostima medijana od približno $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$. Interkvartilni raspon u tim naseljima je vrlo uzak, što ukazuje na nešto više ali stabilne vrijednosti unutar populacije ženskih ispitanika. Rezultati analize koncentracija urana u urinu ženskih ispitanika potvrđuju nisku razinu izloženosti uranu, bez uočljivih spolno specifičnih razlika i bez pokazatelja da voda za piće predstavlja značajan izvor unosa urana. Ovi rezultati su u potpunosti u skladu s rezultatima za muške ispitanike i ukupnu populaciju i dodatno potvrđuju da uran ne predstavlja relevantan zdravstveni rizik u promatranim naseljima.

Rezultati mjerenja pokazuju da su koncentracije urana u kosi muških ispitanika niske u svim ispitivanim naseljima, uz umjerene razlike među lokacijama (Tablica 21). Najviše vrijednosti medijana zabilježene su u naseljima Čačinci ($0,015 \mu\text{g g}^{-1}$), Velika ($0,010 \mu\text{g g}^{-1}$) i Voćin ($0,010 \mu\text{g g}^{-1}$), pri čemu su u tim naseljima zabilježeni i viši 75. percentili, osobito u Velikoj ($0,036 \mu\text{g g}^{-1}$), što upućuje na nešto izraženiju individualnu varijabilnost koncentracija urana u kosi.

Tablica 21. Koncentracija urana ($\mu\text{g g}^{-1}$) u kosi muških ispitanika u ispitivanim naseljima

Naselje	N (muški)	Medijan	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	37	0,009	0,004	0,017
Dalj	43	0,002	0,001	0,004
Čepin	40	0,001	0,001	0,005
Našice	29	0,004	0,001	0,008
Osijek	50	0,003	0,001	0,011
Voćin	16	0,010	0,003	0,017
Čačinci	28	0,015	0,008	0,019
Velika	17	0,010	0,010	0,036

N- broj uzoraka

Srednje vrijednosti medijana zabilježene su u Vladislavcima ($0,009 \mu\text{g g}^{-1}$), dok su najniže koncentracije utvrđene u Čepinu ($0,001 \mu\text{g g}^{-1}$) i Dalju ($0,002 \mu\text{g g}^{-1}$), što ukazuje na minimalnu kroničnu izloženost uranu u tim naseljima. Interkvartilni rasponi u većini naselja su relativno uski, no u pojedinim slučajevima (npr. Velika i Čačinci) širi raspon gornjih kvartila ukazuje na utjecaj individualnih čimbenika, poput okolišnih.

Rezultati pokazuju da su koncentracije urana u kosi ženskih ispitanika niske u svim ispitivanim područjima, uz umjerene razlike među pojedinim naseljima (Tablica 22). Najviše vrijednosti medijana zabilježene su u naselju Voćin ($0,016 \mu\text{g g}^{-1}$), uz relativno širok interkvartilni raspon, što upućuje na izraženiju individualnu varijabilnost koncentracija urana u kosi.

Tablica 22. Koncentracija urana ($\mu\text{g g}^{-1}$) u kosi ženskih ispitanika u ispitivanim naseljima

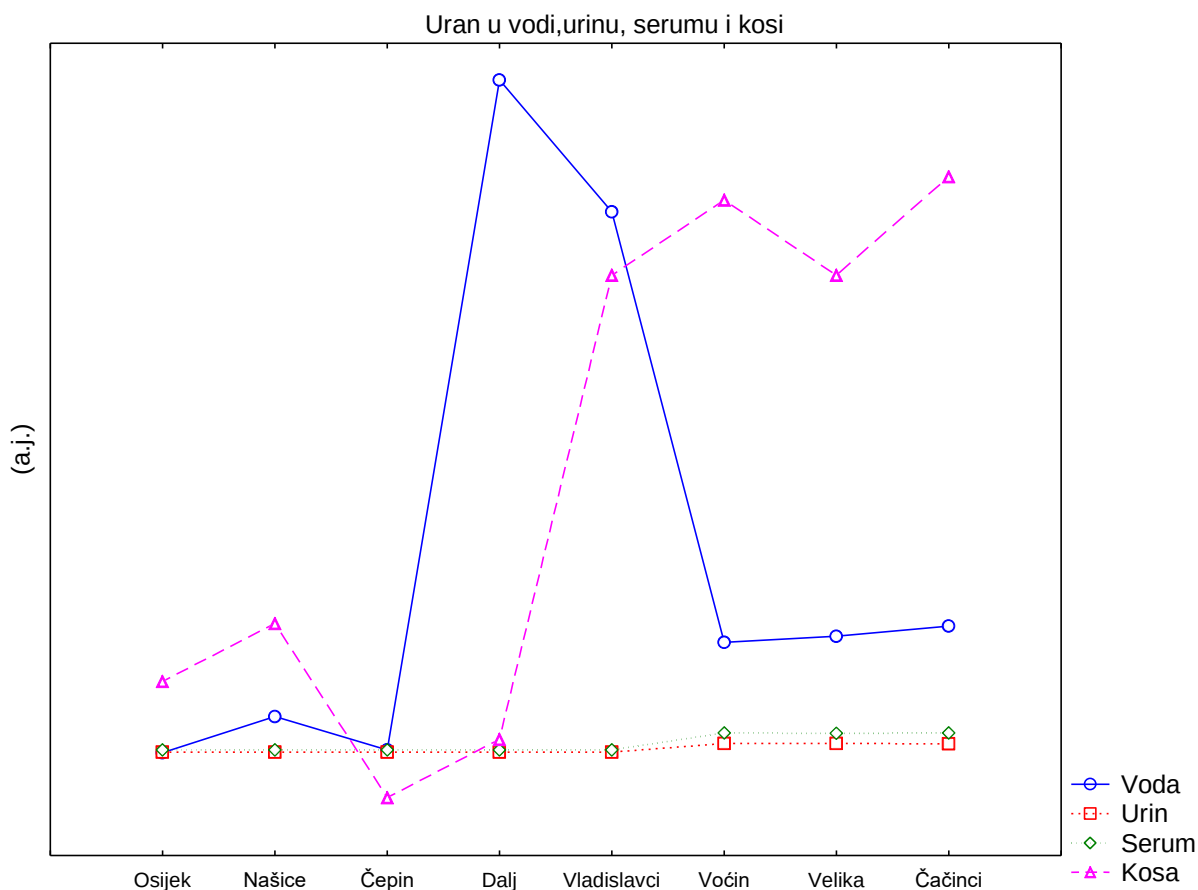
Naselje	N (žene)	Medijan	Percentili 25.00000	Percentili 75.00000
Vladislavci	48	0,010	0,006	0,019
Dalj	61	0,002	0,001	0,004
Čepin	11	0,004	0,001	0,014
Našice	50	0,003	0,001	0,008
Osijek	14	0,005	0,001	0,012
Voćin	15	0,016	0,009	0,024
Čačinci	20	0,006	0,003	0,013
Velika	5	0,007	0,004	0,009

N- broj uzoraka

Nešto više, ali i dalje niske vrijednosti zabilježene su i u Vladislavcima ($0,010\mu\text{g g}^{-1}$). Srednje vrijednosti medijana utvrđene su u Velikoj ($0,007\mu\text{g g}^{-1}$) i Čačincima ($0,006\mu\text{g g}^{-1}$), dok su najniže koncentracije urana u kosi ženskih ispitanika zabilježene u Dalju ($0,002\mu\text{g g}^{-1}$), Našicama ($0,003\mu\text{g g}^{-1}$) i Osijeku ($0,005 \mu\text{g g}^{-1}$). U naselju Čepin zabilježena je niska vrijednost medijana ($0,004 \mu\text{g g}^{-1}$), uz nešto širi raspon vrijednosti, što može upućivati na individualne razlike unutar male skupine ispitanica. Interkvartilni rasponi u većini naselja su umjereni, a u pojedinim slučajevima (Voćin, Vladislavci) viši 75. percentili ukazuju na mogući utjecaj nekih drugih čimbenika, poput npr. prehrambenih navika, okolišnog kontakta ili razlika u metabolizmu.

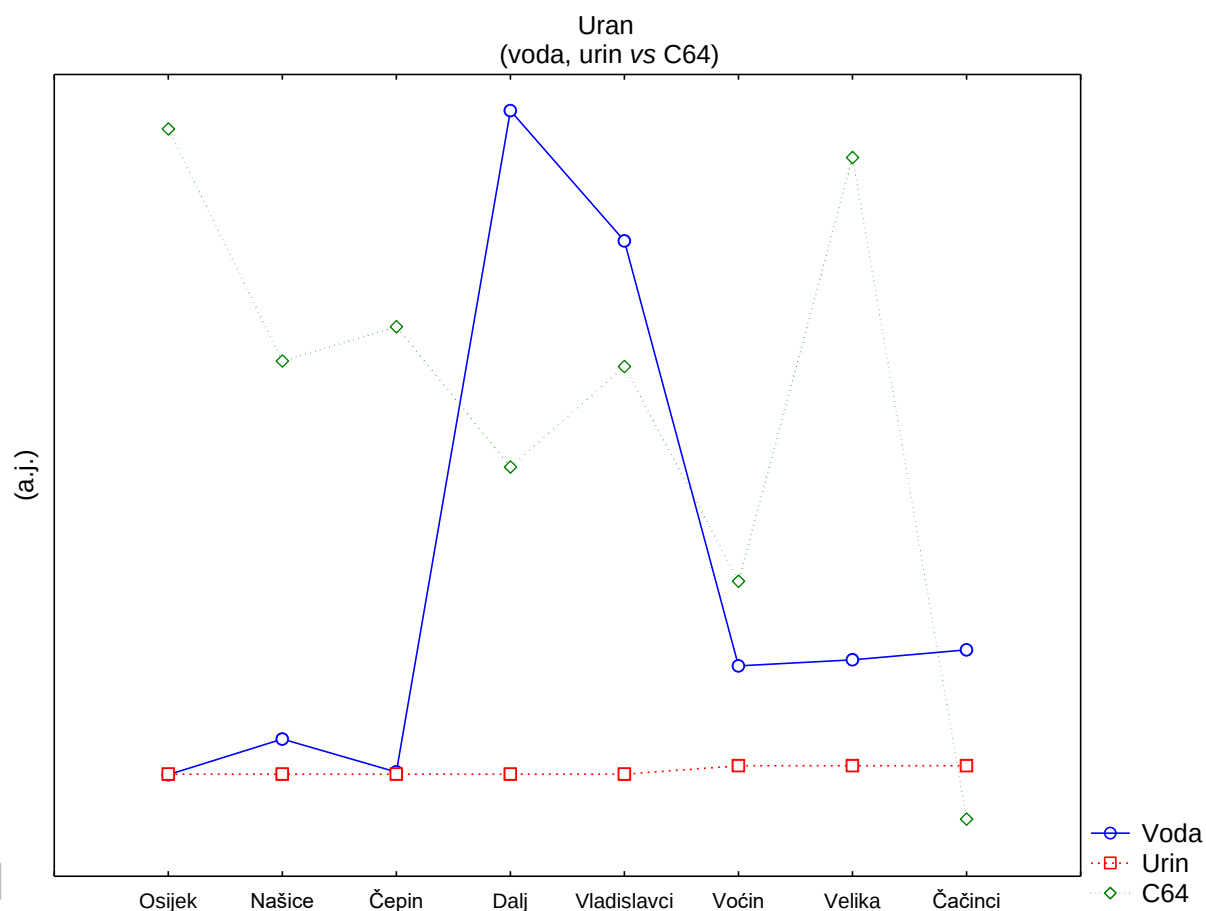
5.7. Prikazi odnosa koncentracija urana u vodi, urinu, serumu i kosi i raka bubrega (C64) i mokraćnog mjehura (C67)

Prikaz omogućuje istodobnu vizualnu usporedbu okolišnog izvora i različitih biomarkera izloženosti. Iz grafikona je vidljivo da ne postoji sličan trend između koncentracija urana u vodi i koncentracija urana u biološkim uzorcima (Slika 22). Najizraženiji porast koncentracija urana u vodi zabilježen je u Dalju i Vladislavcima, no taj porast nije praćen odgovarajućim povećanjem trenda koncentracija urana u urinu, serumu ili kosi. Naprotiv, biološki uzorci u tim naseljima pokazuju niske i stabilne vrijednosti. Urin i serum u svim naseljima pokazuju vrlo niske i gotovo konstantne koncentracije urana, s minimalnom varijabilnošću, što upućuje na odsutnost značajne skorašnje i sistemske izloženosti uranu.



Slika 22. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana $\mu\text{g L}^{-1}$ u vodi za piće i vrijednosti u biološkim uzorcima ispitanika (urin, serum i kosa) u ispitivanim naseljima

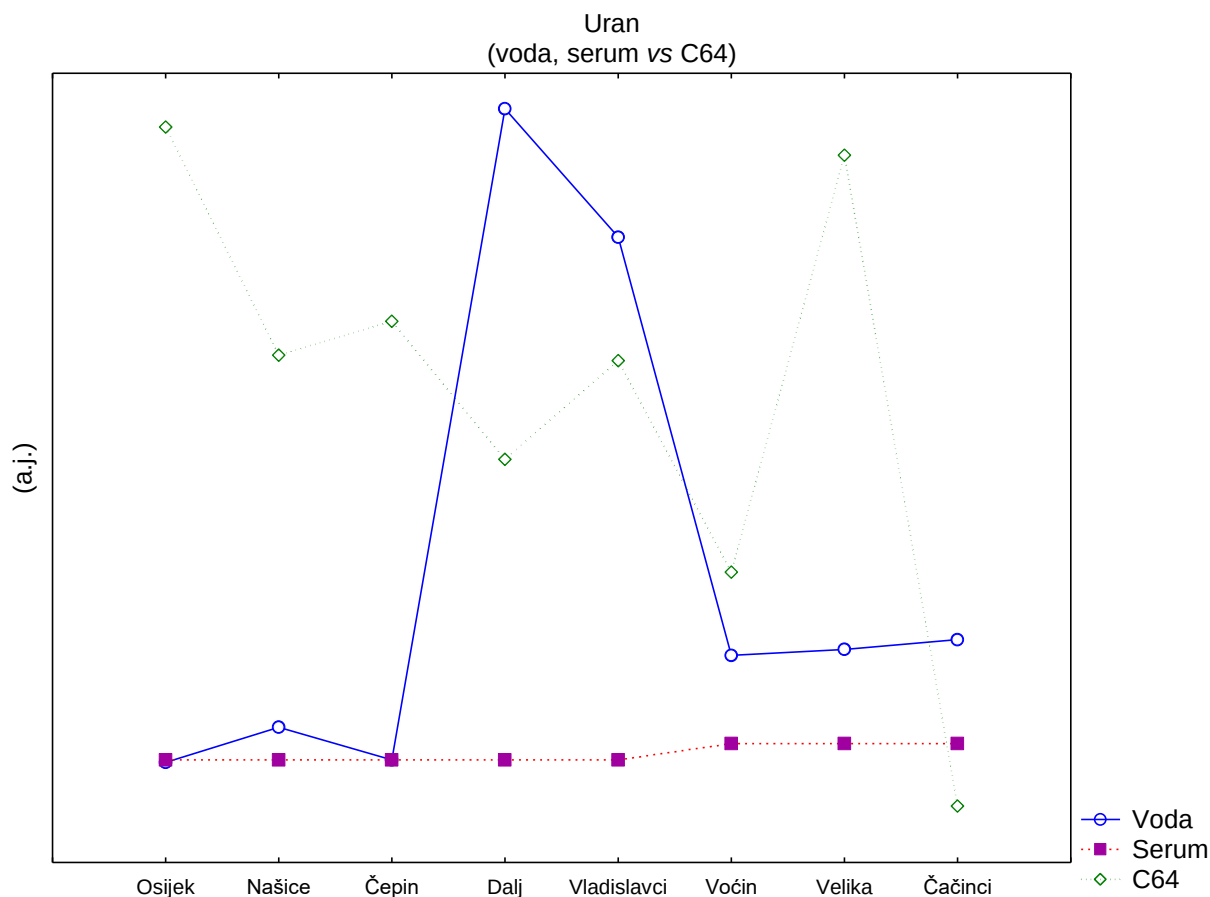
Ovakav obrazac ujedno potvrđuje ograničenu vrijednost urina i seruma kao pokazatelja kronične izloženosti uranu u uvjetima njegovih niskih koncentracija. Kosa, serum i urin pokazuju nešto veću varijabilnost koncentracija urana, u naseljima Voćin, Čačinci i Velika, međutim, ni u tom slučaju nije uočena povezanost s koncentracijama urana u vodi. To upućuje na činjenicu da koncentracije urana u kosi ispitanika ne odražavaju utjecaj putem unosa vode za piće.



Slika 23. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana $\mu\text{g L}^{-1}$ u vodi za piće i urinu ispitanika sa učestalošću raka bubrega (C 64 po MKB) u ispitivanim naseljima

Iz grafikona (Slika 23) je vidljivo da ne postoji dosljedan niti sličan trend između koncentracija urana u vodi za piće i koncentracija urana u urinu. Naselja s nešto višim koncentracijama urana u vodi (Dalj i Vladislavci) ne pokazuju odgovarajuće povišene koncentracije urana u urinu, što potvrđuje da uran iz vode za piće ne dovodi do mjerljivog povećanja biološke izloženosti u ispitivanoj populaciji. Usporedba krivulja koncentracija urana u vodi i urinu s učestalošću raka bubrega (C64) pokazuje da ne postoji jasan obrazac povezanosti. Primjerice, naselja s višom

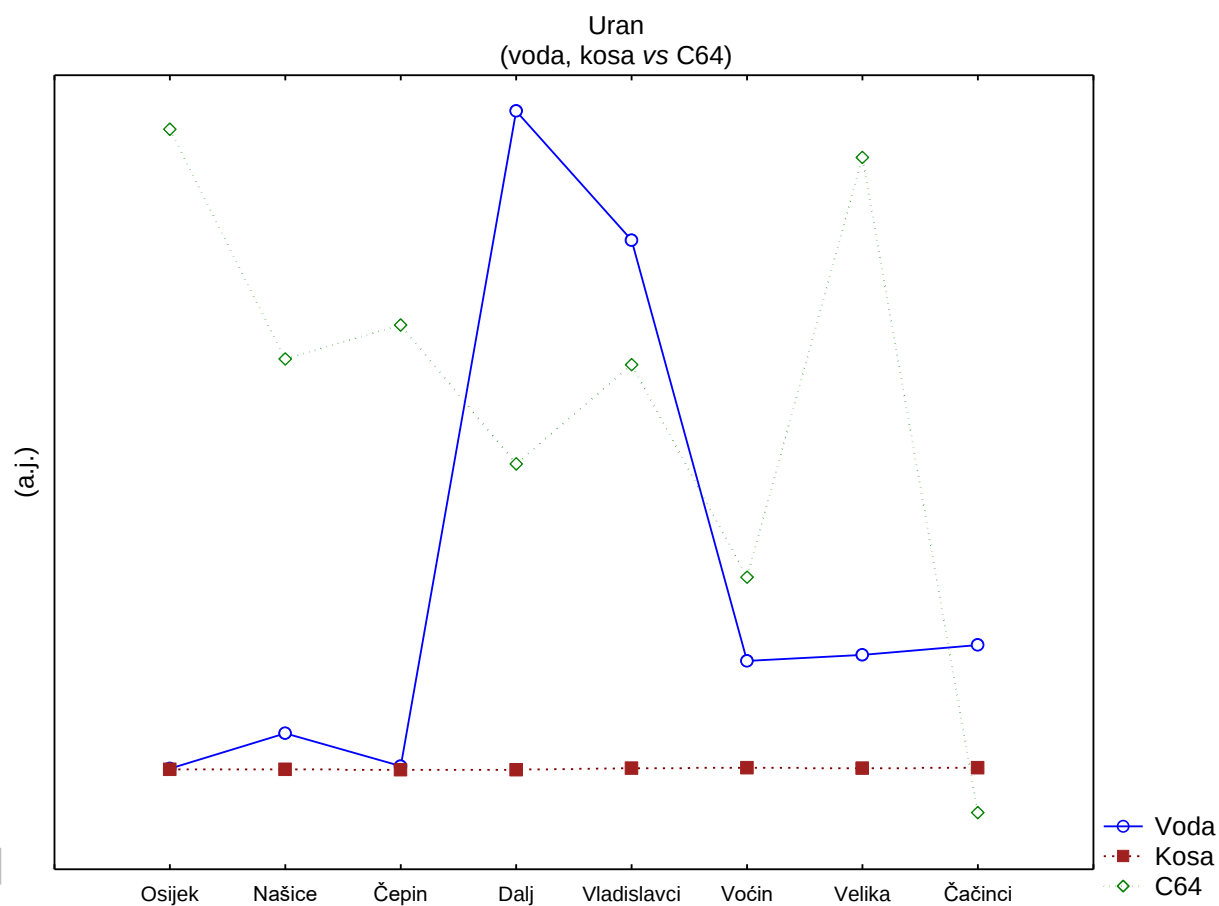
učestalosti raka bubrega ne pokazuju istodobno porast povećanja koncentracija urana u vodi ili urinu, dok naselja s povišenim koncentracijama urana u vodi ne bilježe povećanu učestalost raka bubrega. Ovakav nalaz upućuje na odsutnost povezanosti između izloženosti uranu i pojavnosti raka bubrega na razini promatranih naselja.



Slika 24. Grafički prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana ($\mu\text{g L}^{-1}$) u vodi za piće i serumu ispitanika sa učestalošću raka bubrega (C64 po MKB) u ispitivanim naseljima

Iz grafikona na slici 24 je vidljivo da koncentracije urana u serumu u svim naseljima ostaju slabo varijabilne, bez obzira na izraženije razlike u koncentracijama urana u vodi. Naselja s višim koncentracijama urana u vodi (osobito Dalj i Vladislavci) ne pokazuju odgovarajuće povišenje koncentracija urana u serumu, što potvrđuje da serum nije pokazatelj kronične izloženosti uranu putem vode za piće. Usporedba koncentracija urana u vodi i serumu s učestalošću raka bubrega

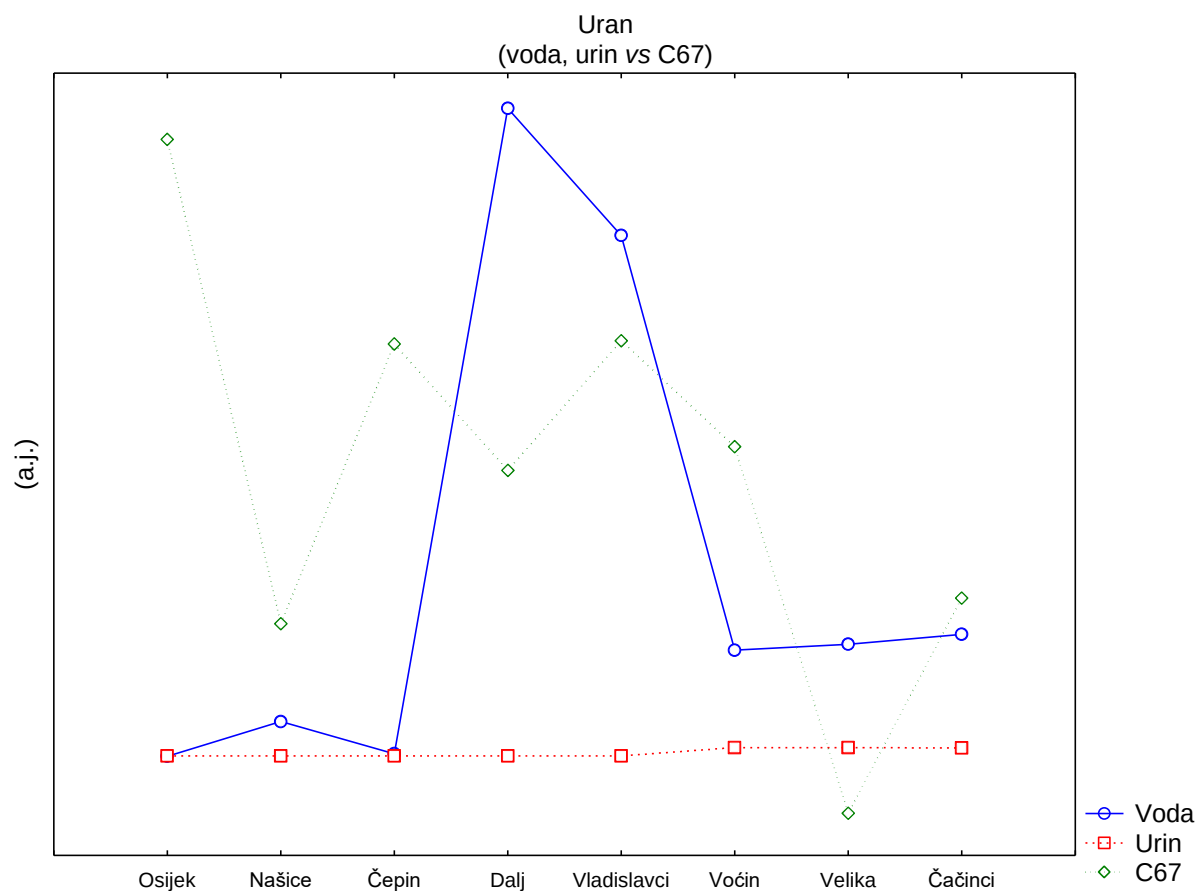
(C64) ne pokazuje dosljedan, niti paralelan obrazac povezanosti. Naselja s višom učestalošću C64 ne pokazuju istodobno povišene koncentracije urana u serumu, dok naselja s višim koncentracijama urana u vodi ne pokazuju povećanu učestalost raka bubrega. Ovakav nalaz upućuje na odsutnost povezanosti između izloženosti uranu i pojavnosti raka bubrega na razini promatranih lokacija.



Slika 25. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana u vodi za piće i kosi ispitanika sa učestalošću raka bubrega (C64 po MKB) u ispitivanim naseljima

Iz grafikona (Slika 25) je vidljivo da iako postoje izražene razlike u koncentracijama urana u vodi između pojedinih naselja (Dalj i Vladislavci), te razlike nisu praćene odgovarajućim promjenama koncentracija urana u kosi. Koncentracije urana u kosi u svim naseljima imaju umjerenu individualnu varijabilnost, ali bez povezanosti s koncentracijama u vodi. Usporedba koncentracija urana u vodi i kosi s učestalošću raka bubrega (C64) pokazuje da ne postoji dosljedan obrazac povezanosti. Naselja s povišenim koncentracijama urana u vodi i/ili kosi ne bilježe povećanu

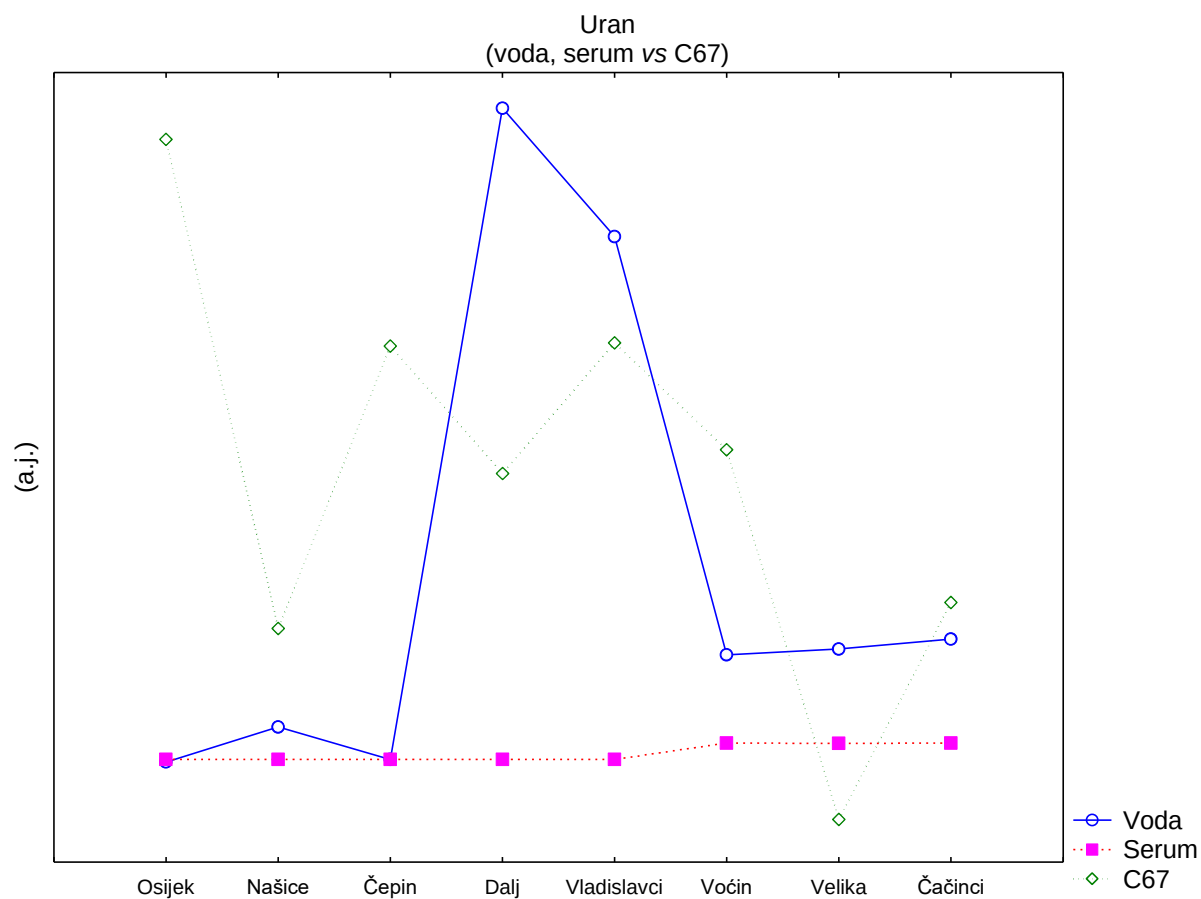
učestalost raka bubrega, dok se viša učestalost C64 u pojedinim naseljima ne može dovesti u vezu s povišenim koncentracijama urana u promatranim biološkim uzorcima. Ovakav nalaz upućuje na odsutnost povezanosti između kronične izloženosti uranu i pojavnosti raka bubrega na razini analiziranih populacija.



Slika 26. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana ($\mu\text{g L}^{-1}$) u vodi za piće i urinu ispitanika sa učestalošću raka mokraćnog mjehura (C67 prema MKB) u ispitivanim naseljima

Iz Slike 26 je vidljivo da ne postoji konzistentan obrazac koji bi ukazao na istodobno smanjenje povećanje koncentracija urana u vodi za piće i povećanje, odnosno smanjenje koncentracija urana u urinu. Naselja s nešto višim koncentracijama urana u vodi (Dalj i Vladislavci) ne pokazuju odgovarajuće povišene koncentracije urana u urinu, što potvrđuje da uran iz vode za piće nije povezan sa izloženosti, barem na razini urina kao biomarkera nedavne izloženosti. Usporedba koncentracija urana u vodi i urinu s učestalošću raka mokraćnog mjehura (C67) pokazuje da ne

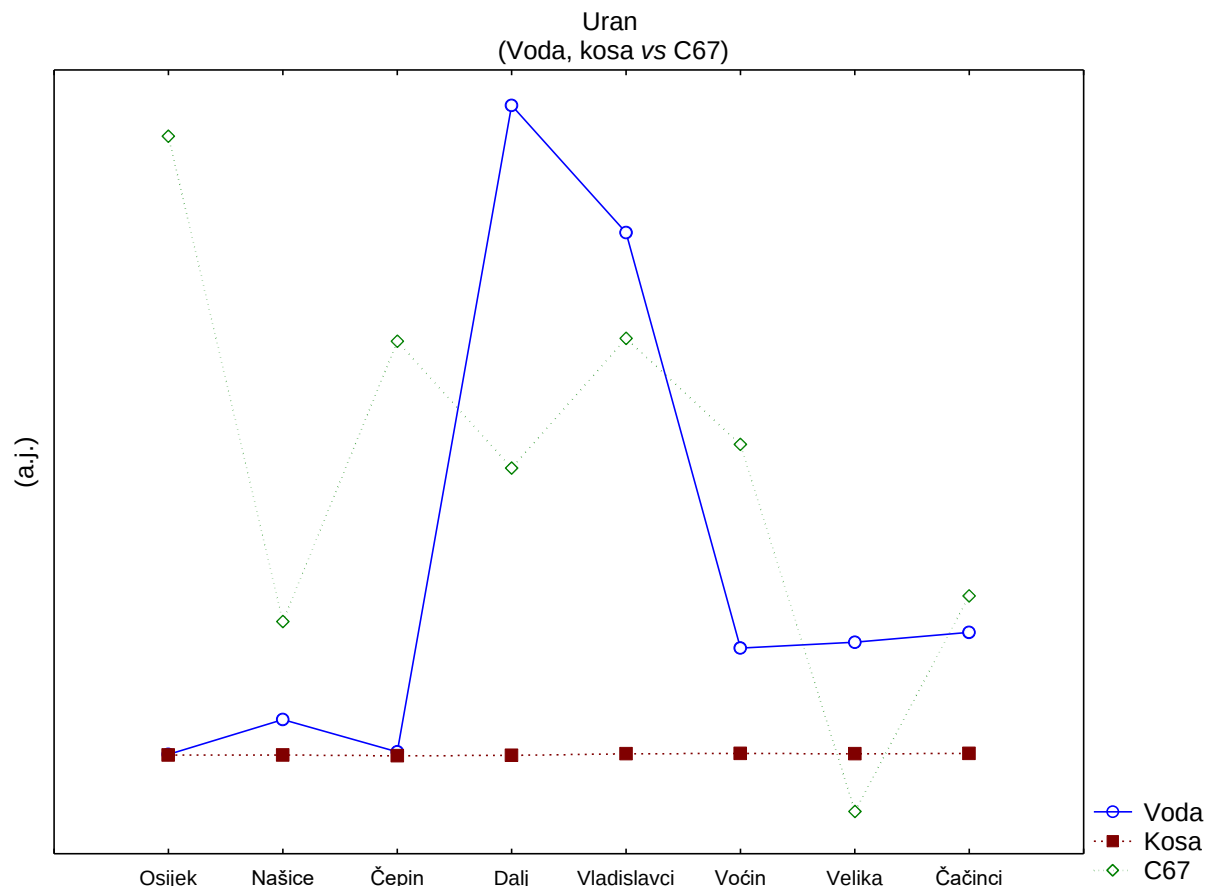
postoji zamjetan obrazac povezanosti. Naselja s višom učestalošću C67 ne pokazuju istodobno povišene koncentracije urana u vodi ili urinu, dok naselja s nešto višim koncentracijama urana u vodi ne pokazuju povećanu učestalost raka mokraćnog mjehura. Ovakav nalaz upućuje na odsutnost povezanosti između izloženosti uranu i pojavnosti C67 na razini promatranih lokacija.



Slika 27. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana ($\mu\text{g L}^{-1}$) u vodi za piće i serumu ispitanika sa učestalošću raka mokraćnog mjehura (C67 prema MKB) u ispitivanim naseljima

Iz Slike 27 je vidljivo da su koncentracije urana u serumu u svim naseljima slabo varijabilne, bez obzira na izraženije razlike u koncentracijama urana u vodi. Naselja s nešto višim koncentracijama urana u vodi (Dalj i Vladislavci) ne pokazuju odgovarajuće povišene koncentracije urana u serumu, što potvrđuje da serum ne odražava kroničnu izloženost uranu putem vode za piće. Usporedba koncentracija urana u vodi i serumu s učestalošću raka mokraćnog mjehura (C67) ne pokazuje sličan obrazac. Naselja s višom učestalošću C67 ne pokazuju istodobno povišene koncentracije

urana u serumu, dok naselja s povišenim koncentracijama urana u vodi ne pokazuju povećanu učestalost raka mokraćnog mjehura. Ovakav nalaz jasno upućuje na odsutnost povezanosti između izloženosti uranu i pojavnosti C67 na razini promatranih populacija.



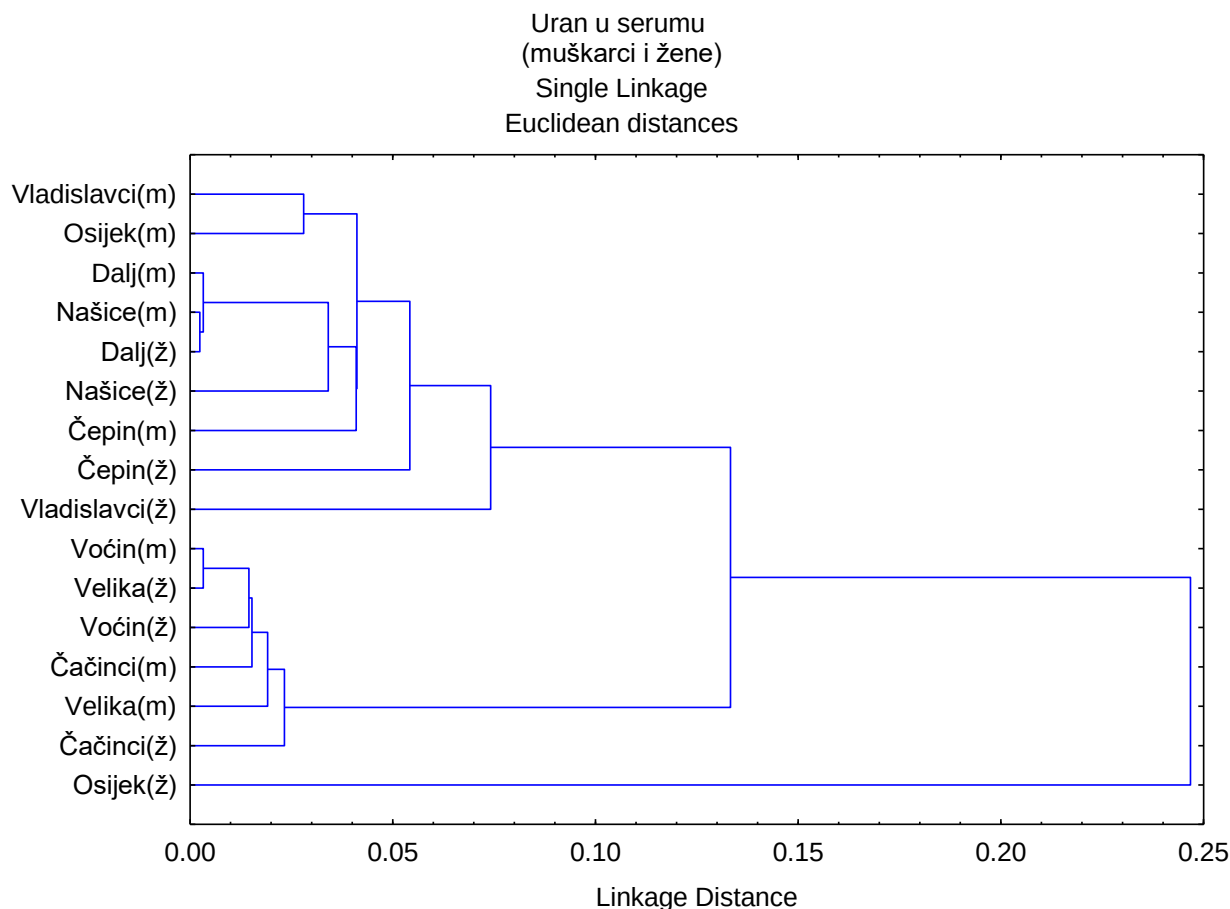
Slika 28. Prikaz odnosa vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana u vodi za piće i kosi ispitanika sa učestalošću raka mokraćnog mjehura (C67 prema MKB)) u ispitivanim naseljima

Iako postoje izražene razlike u koncentracijama urana u vodi između naselja (Dalj i Vladislavci), te razlike nisu praćene odgovarajućim promjenama koncentracija urana u kosi (Slika 28). Koncentracije urana u kosi u svim naseljima imaju umjerenu varijabilnost, ali bez jasne sličnosti s koncentracijama urana u vodi. Usporedba koncentracija urana u vodi i kosi s učestalošću raka mokraćnog mjehura (C67) pokazuje da ne postoji dosljedan obrazac povezanosti. Naselja s višom učestalošću C67 ne pokazuju povišene koncentracije urana u kosi, dok naselja s povišenim koncentracijama urana u vodi ne pokazuju povećanu učestalost raka mokraćnog mjehura. Ovakav

nalaz upućuje na odsutnost povezanosti između kronične izloženosti uranu i pojavnosti raka mokraćnog mjehura na razini analiziranih lokacija.

5.8. Klaster analiza koncentracija urana u vodi, urinu, serumu i kosi u ispitivanim naseljima prema spolu

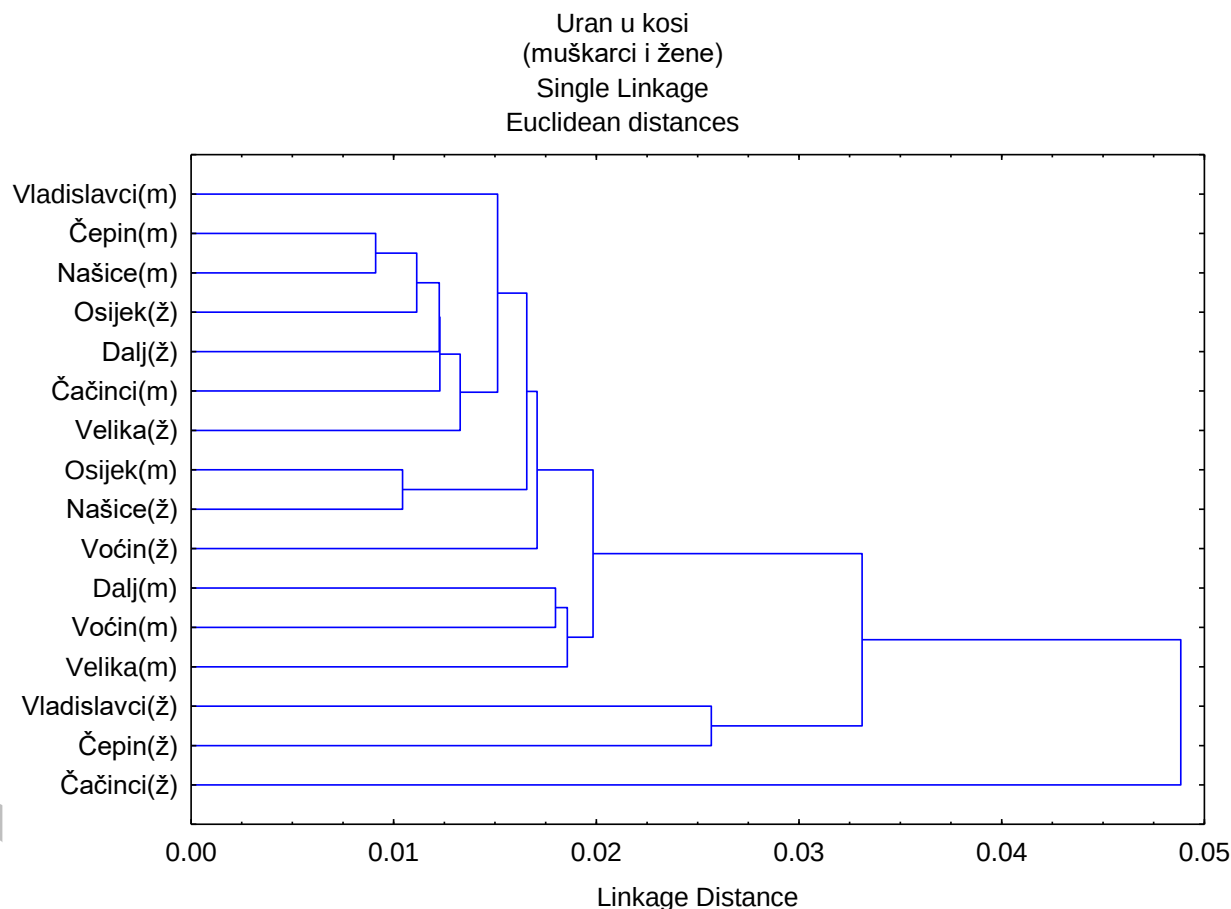
Cilj klaster analize (slika 29) bio je ispitati postoje li obrasci grupiranja uzoraka s obzirom na lokaciju i spol ispitanika. Dendrogram koncentracija urana u serumu prikazan na slici 30. prikazuje postojanje dva osnovna klastera, jednog jednočlanog (Osijek) i drugog kompleksnog mješovitog petnaestočlanog klastera koji se sastoji od dva manja klastera sastavljena od muških i ženskih ispitanika različitih lokacija. Prvi šestočlani klaster smješten unutar tog kompleksnog klastera čine muški i ženski ispitanici sa područja oko Papuka (Voćin, Velika , Čačinci), dok je drugi (devetočlani) klaster uglavnom sačinjen od muških i ženskih ispitanika s područja oko grada Osijeka.



Slika 29. Rezultat hijerarhijske klaster analize koncentracija urana (U) u serumu muških i ženskih ispitanika u ispitivanim naseljima, primjenom metode *single linkage* i euklidskih udaljenosti

Iz dendrograma prikazanog na Slici 29 je vidljivo da se uzorci prvenstveno grupiraju prema razini koncentracija urana, a ne prema spolu ispitanika. Muški i ženski ispitanici iz istih ili sličnih naselja često se nalaze u istim ili vrlo bliskim klasterima, što jasno ukazuje na odsutnost spolno specifičnog razlikovanja u koncentracijama urana u serumu. Uočljivo je formiranje jednog većeg kompleksnog klastera koji obuhvaća većinu uzoraka iz naselja s vrlo niskim koncentracijama urana u serumu (Vladislavci, Dalj, Našice, Čepin i Osijek), pri čemu se muški i ženski ispitanici unutar tih naselja međusobno preklapaju. Ovaj klaster odražava homogenu i nisku razinu izloženosti uranu. Drugi klaster obuhvaća uzorke iz naselja Voćin, Velika i Čačinci, gdje su zabilježene nešto više, ali i dalje niske koncentracije urana u serumu. I u ovom klasteru ne dolazi do razdvajanja prema spolu, što dodatno potvrđuje da spol nema značajan utjecaj na koncentracije

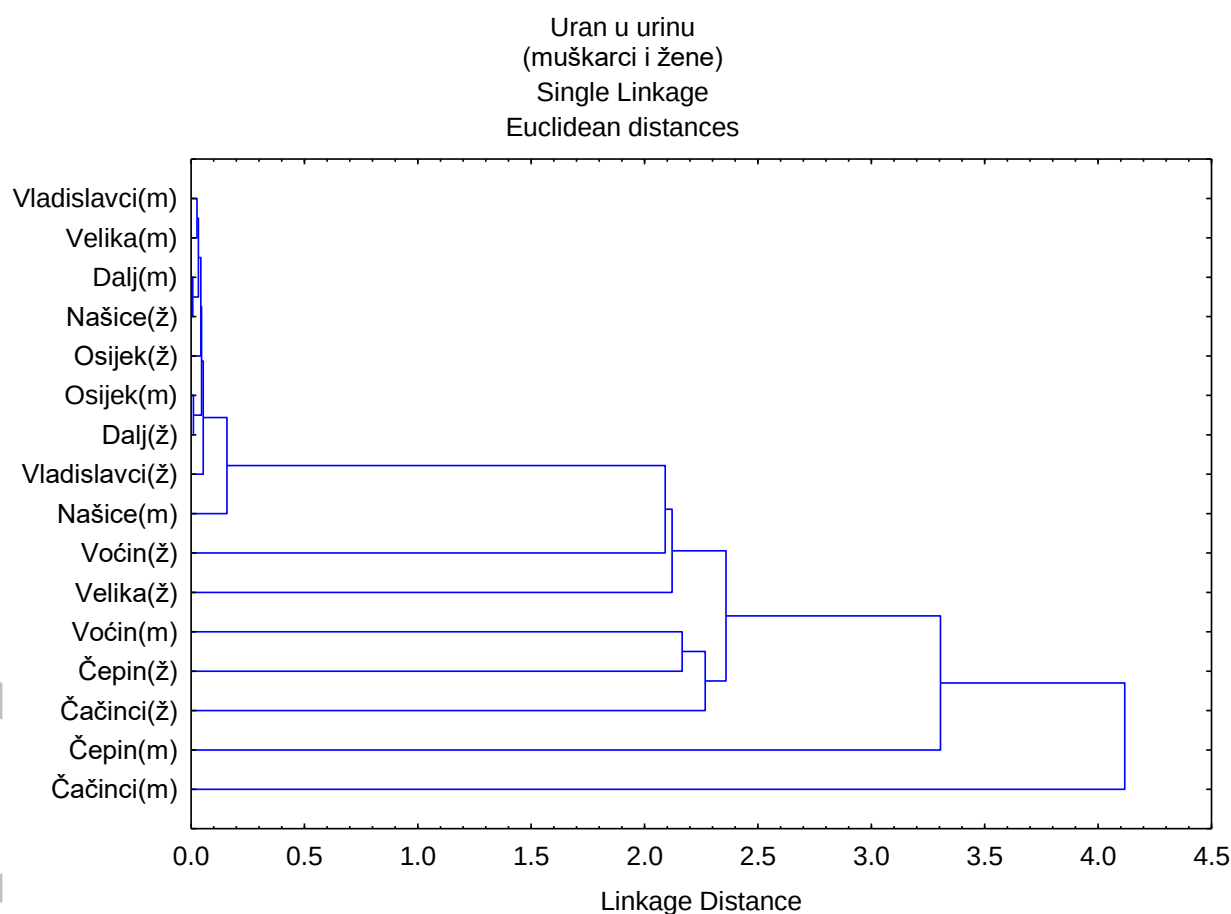
urana u serumu. Rezultati klaster analize u potpunosti su u skladu sa spolnom razdiobom, prema kojima su koncentracije urana u serumu niske, homogeno raspoređene i neovisne o spolu ispitanika. Grupiranje prema lokacijama, a ne prema spolu, upućuje na to da su lokalni okolišni čimbenici značajnija odrednica za razinu urana u serumu od spolnih razlika između muškaraca i žena. Ovi nalazi dodatno podupiru zaključak da uran ne predstavlja relevantan okolišni niti zdravstveni rizik u promatranim naseljima.



Slika 30. Rezultat hijerarhijske klaster analize koncentracija urana u kosi muških i ženskih ispitanika u ispitivanim naseljima, primjenom metode *single linkage* i euklidskih udaljenosti

Cilj klaster analize (Slika 30) bio je utvrditi obrasce grupiranja uzoraka s obzirom na lokaciju i spol, odnosno procijeniti postoji li spolno uvjetovana razdioba u koncentracijama urana u kosi. Iz dendrograma je vidljivo da se uzorci ne razdvajaju primarno prema spolu, već se grupiranje odvija prema koncentracijama urana i pripadnosti pojedinim lokacijama. Muški i ženski ispitanici iz istih ili sličnih lokacija često se nalaze u istim ili vrlo bliskim klasterima, što jasno ukazuje na odsutnost

sustavnih spolnih razlika u koncentracijama urana u kosi. Prisutan je veći klaster koji obuhvaća uzorke iz većine naselja s niskim koncentracijama urana u kosi (npr. Vladislavci, Čepin, Našice, Osijek i Dalj), pri čemu se uzorci muškaraca i žena ponovo međusobno preklapaju. Manji, odvojeni klasteri povezani su s naseljima s područja Papuka: Voćin, Velika i Čačinci, gdje su pronađene nešto više, ali i dalje niske koncentracije urana u kosi. I u tim klasterima ne dolazi do jasne spolne raspodjele, već se razlike očituju na razini lokacije. Dendrogram koncentracija urana u kosi prikazan na Slici 30 pokazuje niz mješovitih blisko udaljenih klastera od kojih se na vrlo maloj udaljenosti izdvaja jednočlani klaster koji čini lokacija Čačinci (žene).



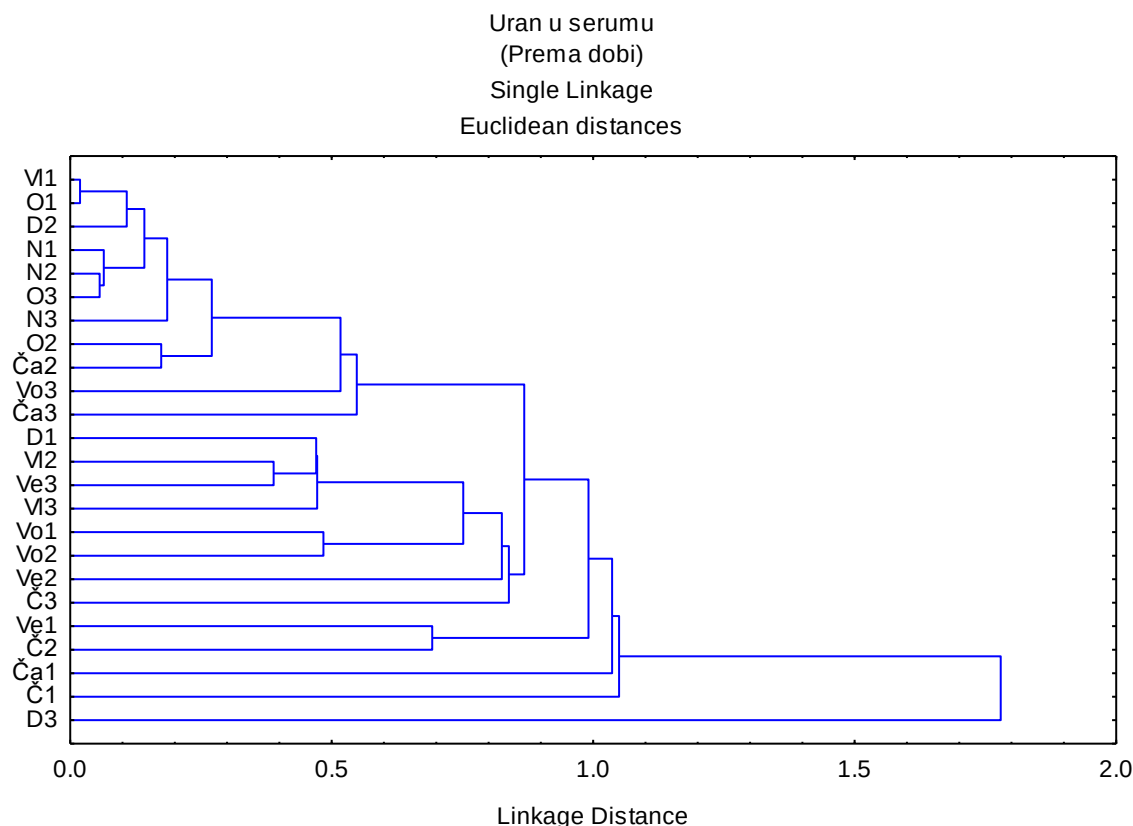
Slika 31. Rezultat hijerarhijske klaster analize koncentracija urana u urinu muških i ženskih ispitanika u ispitivanim naseljima primjenom metode *single linkage* i euklidskih udaljenosti

Cilj klaster analize bio je ispitati moguće obrasce grupiranja uzoraka s obzirom na spol i lokaciju, odnosno utvrditi postoji li spolno uvjetovana razlika u koncentracijama urana u urinu ispitanika.

Iz dendrograma je vidljivo da se uzorci ne grupiraju primarno prema spolu, već se grupiranje odvija prema koncentracijama urana i pripadnosti pojedinim naseljima. Muški i ženski ispitanici iz istih naselja često se nalaze u istim ili vrlo bliskim klasterima, što jasno ukazuje na odsutnost spolno specifične razdiobe u koncentracijama urana u urinu. Na slici je vidljivo formiranje jednog većeg klastera koji obuhvaća uzorke iz naselja s vrlo niskim koncentracijama urana u urinu (Vladislavci, Dalj, Našice i Osijek), pri čemu se uzorci muškaraca i žena gotovo u potpunosti preklapaju. Ovaj klaster odražava minimalnu izloženost uranu u tim naseljima. Drugi klaster obuhvaća uzorke iz naselja Voćin, Velika i Čačinci, gdje su zabilježene nešto više, ali i nadalje niske koncentracije urana u urinu. I u ovom klasteru ne dolazi do jasnog razdvajanja prema spolu, već su uzorci grupirani prema razini koncentracija, što upućuje na utjecaj lokalnih okolišnih čimbenika, a ne spolnih razlika.

5.8.1. Klaster analiza koncentracija urana u vodi, urinu, serumu i kosi u ispitivanim naseljima prema dobi

Iz dendrograma (Slika 32) je vidljivo da se uzorci ne grupiraju jasno prema dobnim skupinama, već se klasteri formiraju prvenstveno prema razinama koncentracija urana, uz djelomičan utjecaj pripadnosti pojedinim naseljima.

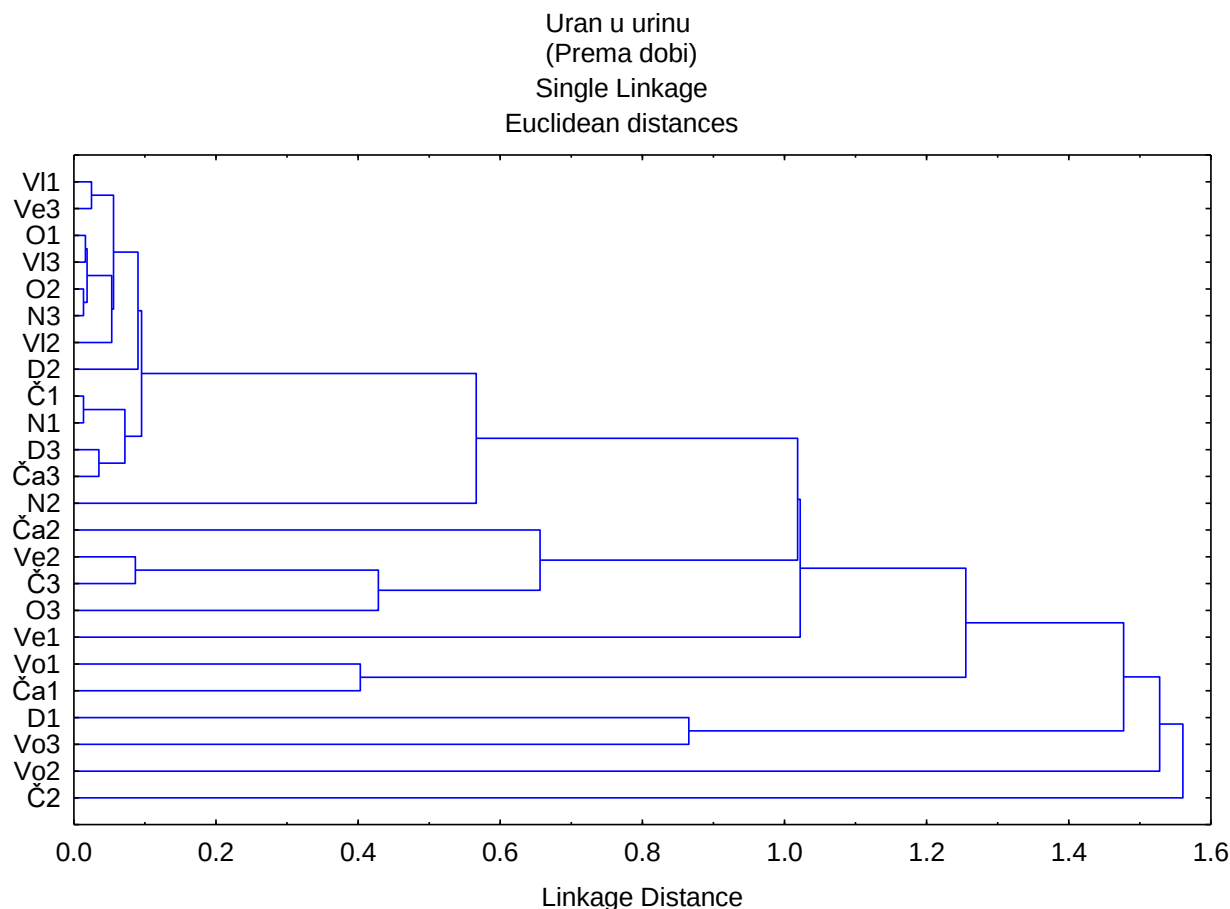


Slika 32. Rezultat hijerarhijske klaster analize koncentracija urana u serumu ispitanika, pri čemu su uzorci svrstani prema naseljima i dobnim skupinama, uz primjenu metode *single linkage* i euklidskih udaljenosti. 1- dobnja skupina 18-39 godina, 2- dobnja skupina 40-59 godina, 3- dobnja skupina 60 godina nadalje

Uzorci različitih dobnih skupina često se nalaze unutar istih ili vrlo bliskih klastera, što ukazuje na odsutnost dobnog uvjetovane razdiobe u koncentracijama urana u serumu. Većina uzoraka grupirana je u jedan dominantan klaster s vrlo niskim i homogenim koncentracijama urana, što je u skladu s rezultatima statistike i analiza prema spolu. Manji, udaljeniji klasteri obuhvaćaju pojedine uzorke s višim koncentracijama urana, no i u tim slučajevima ne uočava se dosljedan obrazac povezan s dobi, već je vjerojatnije riječ o lokalnim ili individualnim razlikama. Rezultati klaster analize prema dobi u potpunosti su u skladu s prethodnim nalazima koji su pokazali da su koncentracije urana u serumu niske, slabo varijabilne i neovisne o spolu. Dodavanje dobne dimenzije klaster analizi ne otkriva nove obrasce, što potvrđuje da dob ispitanika nema značajan utjecaj na koncentracije urana u serumu u ispitivanoj populaciji. Ovakav nalaz dodatno potvrđuje

da serum, kao biomarker kratkotrajne izloženosti, ne odražava životne razlike u izloženosti uranu kao i to da su u uvjetima niskih okolišnih koncentracija dobne razlike zanemarive.

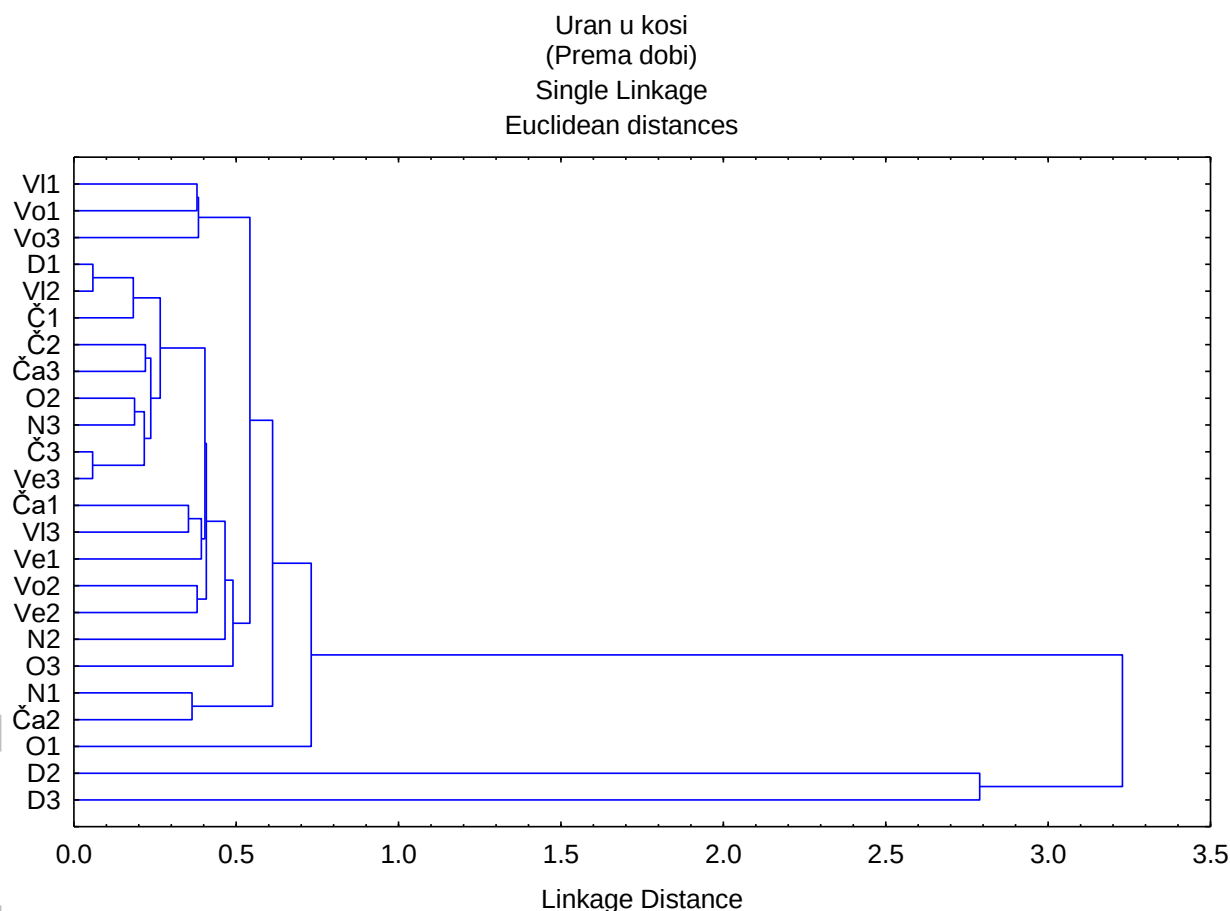
Cilj klaster analize koncentracija urana u urinu ispitanika (Slika 33) bio je ispitati postoji li dobno uvjetovan obrazac u koncentracijama urana u urinu. Iz dendrograma je vidljivo da se uzorci ne grupiraju prema dobi, već se klasteri formiraju prema razinama koncentracija urana i pripadnosti pojedinim naseljima. Uzorci različitih dobnih skupina često se nalaze u istim ili vrlo bliskim klasterima, što upućuje na odsutnost dobno specifične razdiobe u koncentracijama urana u urinu. Formiran je kompleksan klaster koji obuhvaća većinu uzoraka s vrlo niskim i homogenim koncentracijama urana, karakterističnim za većinu naselja. Manji, udaljeniji klasteri unutar kompleksnog klastera uključuju uzorke s nešto višim vrijednostima, međutim, ti se uzorci ne povezuju sustavno uz određene dobne skupine, već su vjerojatnije posljedica lokalnih ili individualnih čimbenika. Rezultati klaster analize urana u urinu prema dobi u skladu su s nalazima za serum i s prethodnim spolno stratificiranim analizama. Sve skupa upućuje na to da su koncentracije urana u urinu niske, slabo varijabilne i neovisne o dobi ispitanika. U uvjetima niskih okolišnih koncentracija urana, dob ne predstavlja determinirajući čimbenik nedavne izloženosti, što je i očekivano s obzirom na urin kao biomarker kratkotrajnog unosa.



Slika 33. Rezultat hijerarhijske klaster analize koncentracija urana u urinu ispitanika svrstanih prema naseljima i dobnim skupinama, primjenom metode *single linkage* i euklidskih udaljenosti. 1- dobnja skupina 18-39 godina, 2- dobnja skupina 40-59 godina, 3- dobnja skupina 60 godina nadalje

Cilj klaster analize (Slika 34) koncentracija urana u kosi ispitanika bio je utvrditi postoji li dobnio uvjetovan obrazac u raspodjeli koncentracija urana u kosi. Iz dendrograma je vidljivo da se uzorci ne grupiraju sustavno prema dobi, već se klasteri formiraju prvenstveno prema razinama koncentracija urana i, djelomično, prema pripadnosti pojedinim naseljima. Uzorci različitih dobnih skupina često se nalaze unutar istih ili vrlo blisko postavljenih klastera, što jasno upućuje na odsutnost dobnio raspodjele u koncentracijama urana u kosi. Većina uzoraka grupira se u jedan kompleksan klaster koji obuhvaća niske i međusobno slične koncentracije urana, što je u skladu s rezultatima opisne statistike. Nekoliko uzoraka izdvojeno je na većim udaljenostima, što upućuje na izraženiju individualnu varijabilnost, no ti izdvojeni uzorci nisu povezani s određenom dobnom

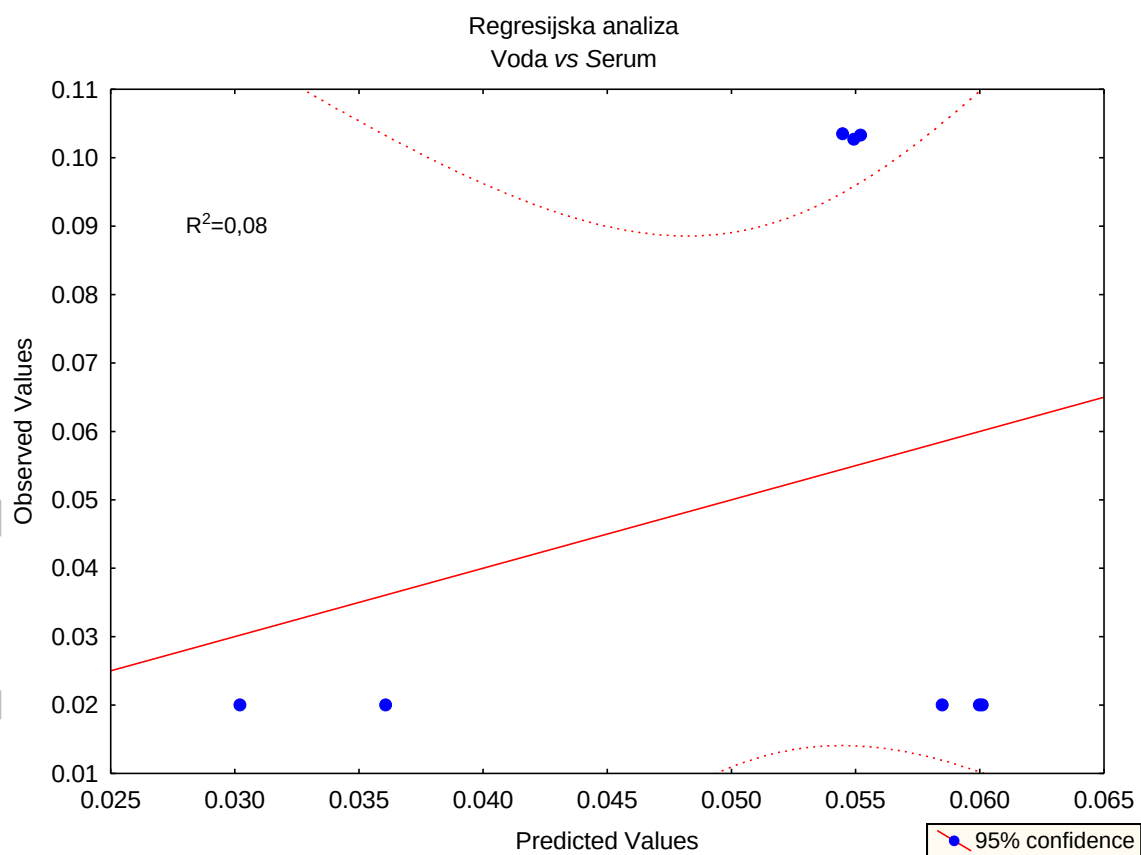
skupinom, već vjerojatnije odražavaju lokalne ili individualne čimbenike (npr. okolišni kontakt). Rezultati klaster analize urana u kosi prema dobi u potpunosti su u skladu s nalazima klaster analiza prema spolu te s rezultatima opisne statistike, koje su pokazale da su koncentracije urana u kosi niske, umjereno varijabilne i neovisne o dobi ispitanika. U uvjetima niskih okolišnih koncentracija urana, dob ne predstavlja determinirajući čimbenik kronične izloženosti, što je i očekivano s obzirom na prirodu kose kao biomarkera dugotrajnije, ali nisko intenzivne izloženosti.



Slika 34. Rezultat hijerarhijske klaster analize koncentracija urana u kosi ispitanika, svrstanih prema naseljima i dobnim skupinama, uz primjenu metode *single linkage* i euklidskih udaljenosti. 1- dobna skupina 18-39 godina, 2- dobna skupina 40-59 godina, 3- dobna skupina 60 godina nadalje

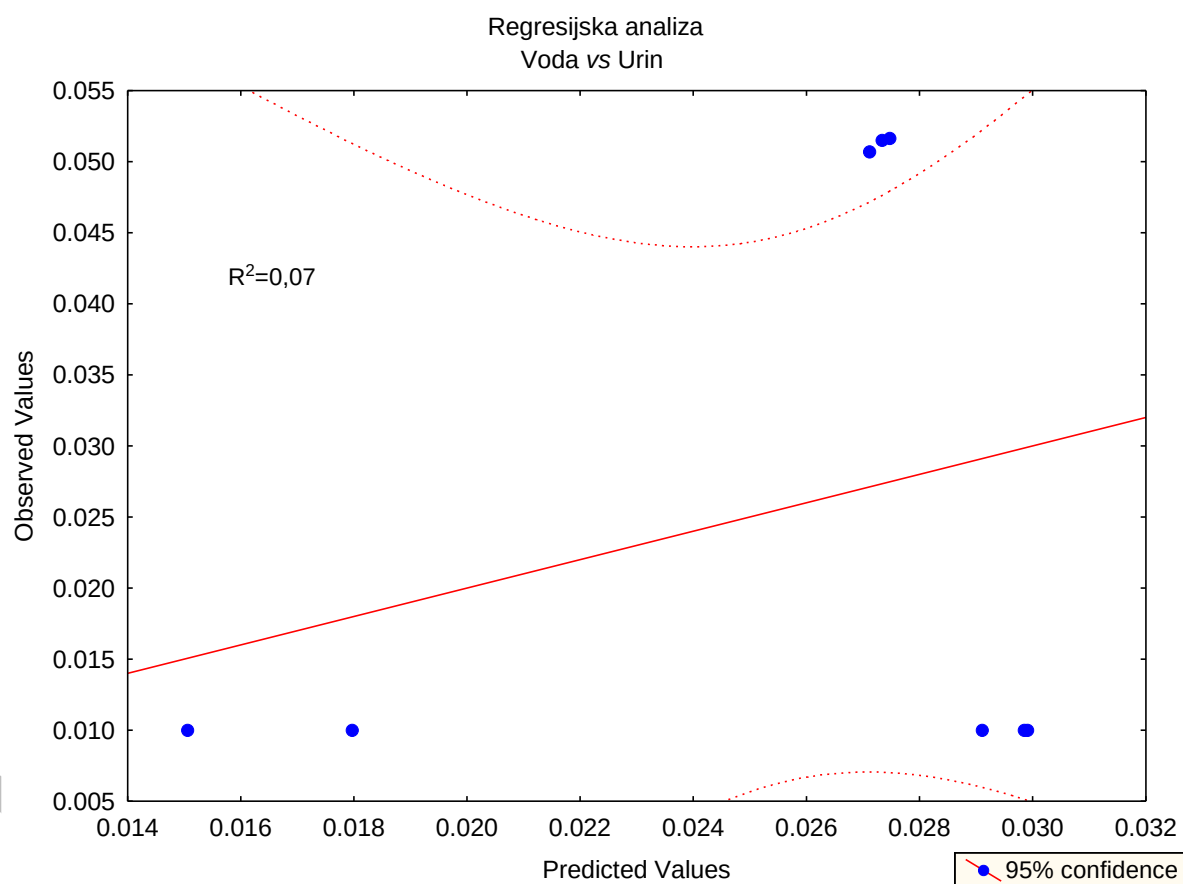
5.9. Regresijska analiza između vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana u vodi za piće i serumu, urinu i kosi ispitanika

Vrijednost koeficijenta determinacije iznosi $R^2 = 0,08$, što ukazuje na vrlo slabu povezanost između promatranih varijabli (Slika 35). Dobivena vrijednost R^2 pokazuje da svega oko 8 % varijabilnosti koncentracija urana u serumu može biti objašnjeno koncentracijama urana u vodi za piće, dok se preostali dio varijabilnosti može pripisati drugim čimbenicima ili slučajnim varijacijama. Linearni regresijski trend je blag i statistički slabo izražen, a raspršenost točaka oko regresijske linije dodatno potvrđuje odsutnost jasne linearne ovisnosti. Prikazani 95 %-tni intervali pouzdanosti dodatno ukazuju na nesigurnost procjene regresijskog modela, osobito na rubovima raspona podataka, što je očekivano s obzirom na nizak raspon i vrlo niske apsolutne koncentracije urana u serumu.



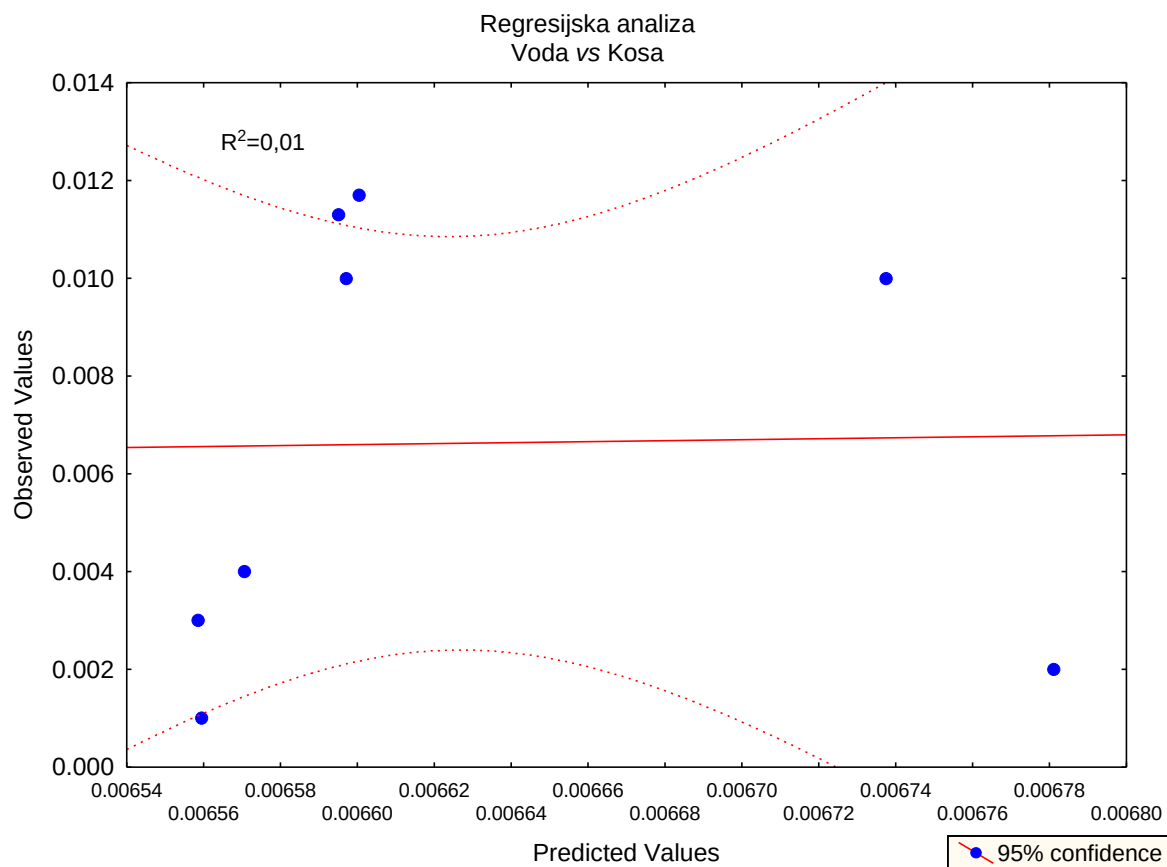
Slika 35. Rezultat regresijske analize između vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana u vodi za piće i serumu ispitanika

Vrijednost koeficijenta determinacije iznosi $R^2 = 0,07$, što ukazuje na izrazito slabu povezanost između promatranih varijabli (Slika 36). Dobivena vrijednost R^2 pokazuje da svega oko 7 % varijabilnosti koncentracija urana u urinu može biti objašnjeno koncentracijama urana u vodi za piće, dok je preostala varijabilnost posljedica drugih čimbenika ili slučajnih oscilacija. Regresijska linija pokazuje vrlo blag pozitivan trend, no raspršenost točaka oko regresijske linije jasno upućuje na odsutnost stvarne linearne ovisnosti.



Slika 36. Rezultat regresijske analize između vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana u vodi za piće i urinu ispitanika

Prikazani 95 %-tni intervali pouzdanosti dodatno naglašavaju nesigurnost regresijskog modela, osobito na krajevima raspona vrijednosti, što je očekivano s obzirom na vrlo nizak raspon i bliske vrijednosti koncentracija urana u urinu, koje su u velikom broju uzoraka blizu granice detekcije.

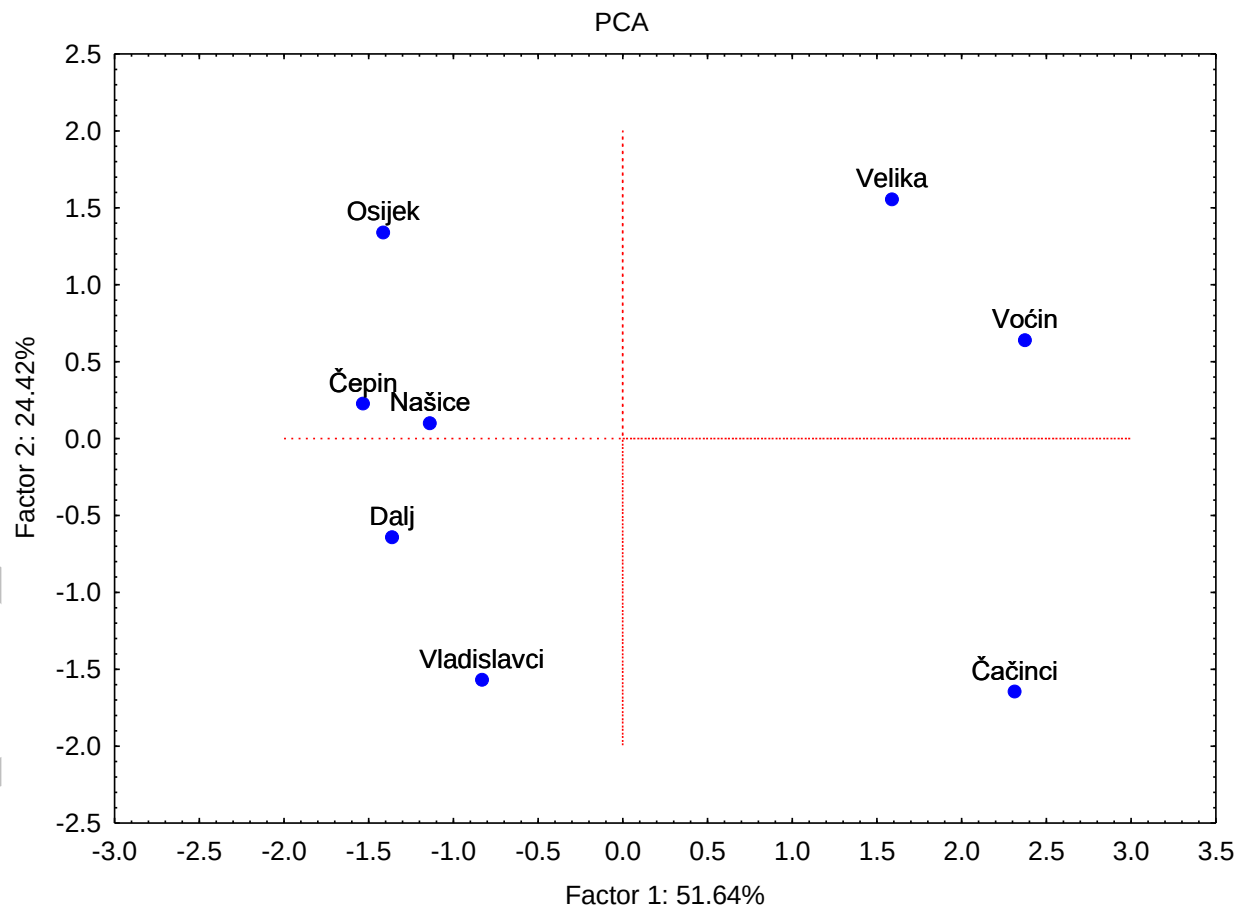


Slika 37. Rezultat regresijske analize između vrijednosti aritmetičkih sredina koncentracija urana u vodi za piće i vrijednosti urana u kosi svih ispitanika

Vrijednost koeficijenta determinacije iznosi $R^2 = 0,01$, što također ukazuje na izrazito slabu, praktički zanemarivu povezanost između promatranih varijabli (Slika 37). Regresijska linija je gotovo horizontalna, a raspršenost podataka oko linije dodatno potvrđuje odsutnost bilo kakvog linearnog odnosa. Prikazani 95 %-tni intervali pouzdanosti vrlo su široki u odnosu na raspon podataka, što upućuje na nisku prediktivnu vrijednost regresijskog modela. Ovakav rezultat je očekivan s obzirom na nisku apsolutnu razinu urana u kosi i izraženi utjecaj individualnih čimbenika na ovaj biomarker.

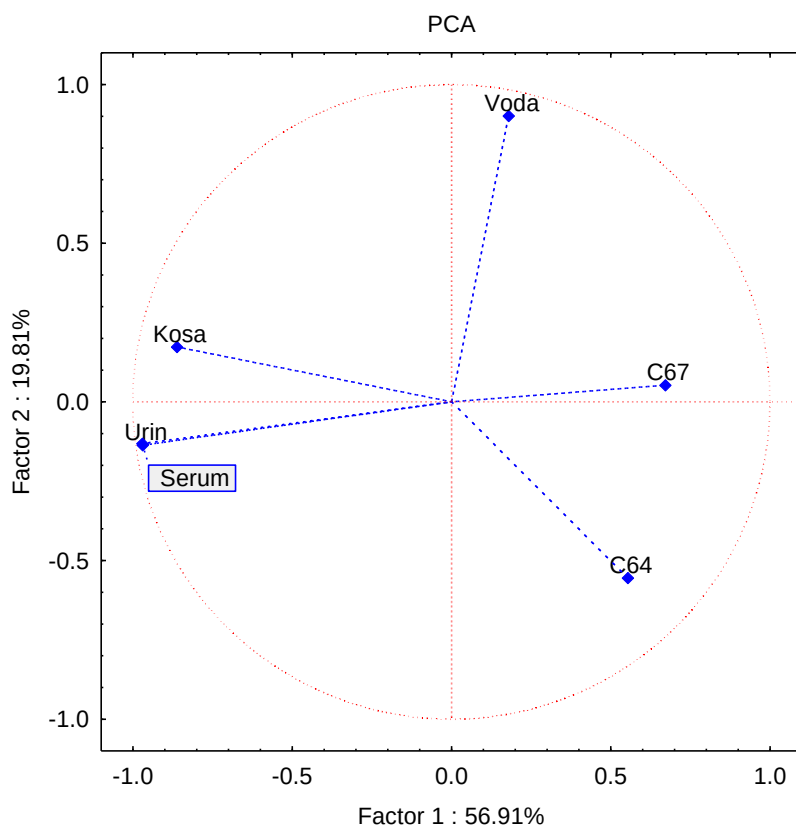
5.10. Analiza glavnih komponenta na podacima koncentracija urana u vodi, biološkim uzorcima (urinu, serumu i kosi) prema naseljima sa pojavnošću raka bubrega i mokraćnog mjehura

Budući da rezultati deskriptivne statistike pružaju isključivo jednodimenzionalni uvid u podatke, za dobivanje cjelovitijeg, višedimenzionalnog prikaza primijenjena je analiza glavnih komponenta (PCA). Rezultati PCA prikazani su u dvodimenzionalnom prostoru tj. uz pomoć prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2). Dvjesto komponentama je objašnjeno približno 76 % ukupne varijabilnosti podataka, što omogućuje vjerodostojnu interpretaciju rezultata. Rezultati analize glavnih komponenta nisu ukazali su na postojanje grupiranja lokacija koje pripadaju kontrolnoj skupini u odnosu na preostale lokacije naselja s nešto većim izmjerenim koncentracijama U u vodi za piće.



Slika 38. Rezultati metode analize glavnih komponenta na podacima koncentracija urana u vodi, biološkim uzorcima (urinu, serumu i kosi) prema naseljima sa pojavnošću raka bubrega i mokraćnog mjehura (C 64 i C67 prema MKB)

Prve dvije glavne komponente objašnjavaju više od 75 % ukupne varijabilnosti podataka, čime je omogućena pouzdana interpretacija odnosa među varijablama i objektima (lokacije). Usporedbom slika uočava se jasno razdvajanje između okolišne matrice (voda), bioloških uzoraka i epidemioloških pokazatelja. Koncentracija urana u vodi projicirana je gotovo okomito na prvu glavnu komponentu, dok su koncentracije urana u serumu, urinu i kosi grupirane na suprotnoj strani ravnine, što upućuje na slabu ili zanemarivu povezanost između urana u vodi i njegovih koncentracija u biološkim uzorcima. Vektori bioloških uzoraka (serum, urin i kosa) međusobno su relativno bliski, što ukazuje na njihovu međusobnu povezanost, ali i na to da oni ne prate varijacije koncentracija urana u vodi.



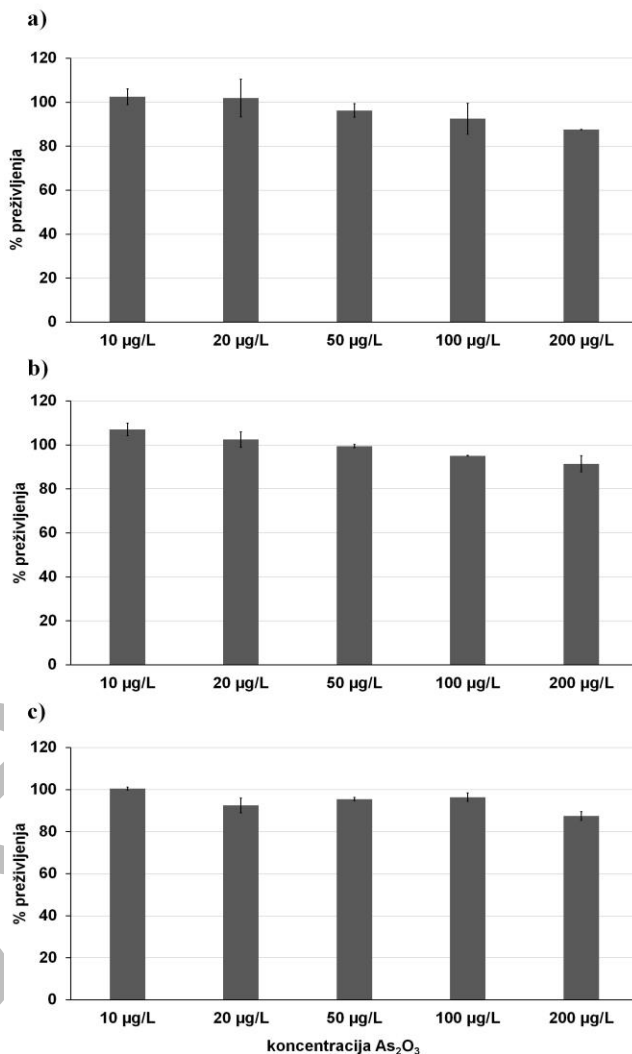
Slika 39. Rezultati metode analize glavnih komponenata na podacima koncentracija urana u vodi, biološkim uzorcima (urinu, serumu i kosi) prema naseljima sa pojavnošću raka bubrega i mokraćnog mjehura (C 64 i C67 prema MKB). Slika prikazuje varijable.

Ovo je u potpunosti u skladu s rezultatima regresijskih analiza (Slike 35-37), koje su pokazale vrlo niske vrijednosti koeficijenta determinacije. Epidemiološke varijable C64 i C67 prostorno su

odvojene od vektora bioloških uzoraka i urana u vodi. Niti jedna od epidemioloških varijabli (C64, C67) nije koreliran s koncentracijama urana u vodi niti u biološkim uzorcima. Na projekciji naselja vidljivo je grupiranje naselja u skladu s prethodnim analizama. Naselja s nešto višim koncentracijama urana u vodi (npr. Dalj i Vladislavci) nalaze se u dijelu koji nije povezan s povećanom učestalošću C64 ili C67, dok su naselja s višom učestalošću karcinoma (npr. Velika, Voćin i Čačinci) prostorno odvojena od varijabli urana u vodi i biološkim uzorcima. Ovakva prostorna raspodjela potvrđuje da razlike u pojavnosti raka bubrega i mokraćnog mjehura među naseljima nisu povezane s izloženošću uranu, već su vjerojatno uvjetovane drugim, *confounding* čimbenicima (demografskim, životnim navikama, profesionalnim izloženostima).

5.10. Određivanje stanične nefrotoksičnosti

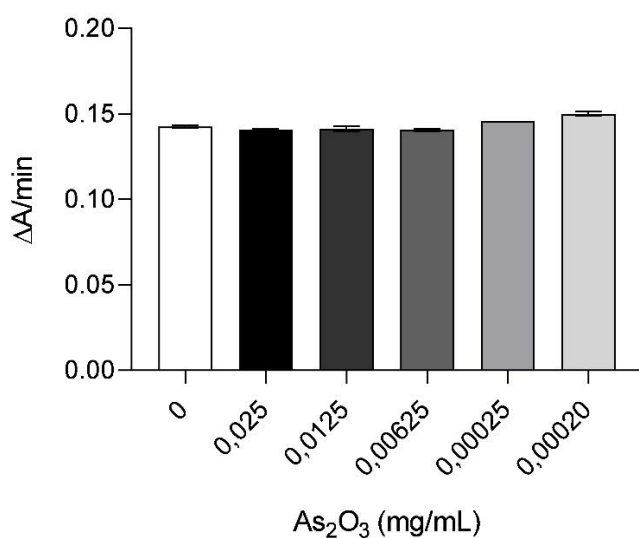
Rezultati MTT testa pokazali su da pri svim zadanim koncentracijama As_2O_3 te u vremenima inkubacije od 48, 72 i 96 sati nije zapažen citotoksični učinak na epitelne stanice bubrega psa.



Slika 40. Rezultati preživljenja izraženi u postotcima nakon MTT testa na staničnoj liniji MDCK1 a) 48, b) 72 i c) 96 sati nakon tretmana arsenovim trioksidom (As_2O_3). U u koncentracijama od 10, 20, 50, 100 i 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD) tri nezavisna mjerenja. Nije uočena statistička značajnost među tretmanima ($p \leq 0.05$, ANOVA, Tukey HSD test)

5.11. Utjecaj As_2O_3 na aktivnost ljudske acetilkolinesteraze

Na Slici 41 prikazane su izmjerene vrijednosti aktivnosti AChE uz prisutnost različitih koncentracija As_2O_3 . U testiranim koncentracijama nije zamijećen utjecaj As_2O_3 na aktivnost ljudske AChE.



Slika 41. Aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) na humanim eritrocitima 48, 72 i 96 sati nakon tretmana arsenovim trioksidom (As_2O_3) u koncentracijama od 10, 20, 50, 100 i 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standarda devijacija (SD). Nije uočena statistička značajnost među tretmanima ($p \leq 0.05$, ANOVA, Tukey HSD test)

6. RASPRAVA

Istraživanje je zasnovano na integriranom pristupu koji objedinjuje analizu okolišnih uzoraka vode za piće, biomonitoring stanovništva, epidemiološku analizu pojavnosti malignih bolesti uropoetskog sustava te *in vitro* eksperimentalni model. Takav multidisciplinarni okvir omogućuje cjelovitiju interpretaciju dobivenih nalaza u odnosu na istraživanja koja se oslanjaju isključivo na pojedinačne razine dokaza, poput okolišnog monitoringa ili epidemioloških pokazatelja. Objedinjavanje okolišnih, bioloških i epidemioloških podataka omogućuje bolje razumijevanje odnosa između okolišne izloženosti i potencijalnih zdravstvenih učinaka, a također predstavlja i metodološki pristup koji se sve češće primjenjuje u suvremenim istraživanjima okolišne epidemiologije.

6.1. Prostorna raspodjela koncentracija arsena i urana u vodi za piće

6.1.1. Arsen

Analiza koncentracija arsena (As) u dostupnim izvorima vodoopskrbe pokazala je izraženu prostornu varijabilnost među naseljima istočne Hrvatske. Najviše izmjerene vrijednosti zabilježene su u Čepinu (maksimalno $250,40 \mu\text{g L}^{-1}$), Vladislavcima ($160,16 \mu\text{g L}^{-1}$) i Osijeku (maksimalno $37,61 \mu\text{g L}^{-1}$). U većini ostalih naselja koncentracije su bile niske i relativno stabilne tijekom promatranog razdoblja. U navedena tri naselja (Vladislavci, Čepin i Osijek) srednje ili maksimalne vrijednosti prelazile su maksimalno dopuštenu koncentraciju (MDK) od $10 \mu\text{g L}^{-1}$ prema važećem Pravilniku o vodi za ljudsku potrošnju, dok su preostala naselja bila znatno ispod te vrijednosti uz mala odstupanja (20). Ovi rezultati u skladu su s ranijim istraživanjima provedenima na području istočne Hrvatske. Ujević Bošnjak i suradnici analizirali su 31 naselje u Vukovarsko-srijemskoj i Osječko-baranjskoj županiji (56 izvora vode) te utvrdili da je 46 izvora imalo koncentracije arsena iznad $10 \mu\text{g L}^{-1}$, uz maksimalne vrijednosti do $491 \mu\text{g L}^{-1}$ (80).

Prostorna raspodjela arsena u podzemnim vodama povezana je s geološkim, geomorfološkim i hidrogeološkim razvojem sliva Drave te sedimentnim nakupinama srednjeg i gornjeg pleistocena panonske nizine, što je karakteristično za šire podunavsko područje (7). U ranijim istraživanjima provedenima u okviru istog projekta utvrđeno je da je rizik povišenih koncentracija arsena izraženiji u sustavima javne vodoopskrbe zasnovanim na lokalnim zdencima dubljim od 30 m (arteški bunari), što uključuje dijelove lokalne vodoopskrbe Čepina, Vladislavaca i Dalja (81).

Nasuprot tome, u površinskim, ručno kopanim zdencima kakvi se često nalaze u kućanstvima, vrijednosti arsena u pravilu su niže. Zbog izmjerenih vrijednosti koje su se kretale u rasponu od 100 do 220 $\mu\text{g L}^{-1}$, Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske za dio naselja opskrbljenih lokalnim vodovodima privremeno je odredilo dopuštene vrijednosti arsena u vodi za piće do 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ do 1. srpnja 2019. godine, uz istodobne zabrane uporabe vode za piće u pojedinim lokalnim vodovodima istočne Slavonije (Čepin, Komletinci, Korođ, Markušica i Ostrovo) (82). U javnozdravstvenom smislu važno je naglasiti da je MDK od 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ $\mu\text{g/L}$ postavljena na temelju epidemioloških istraživanja provedenih na populacijama izloženima znatno višim koncentracijama arsena nego što se u pravilu bilježi u Hrvatskoj. Unatoč tome, dugotrajna izloženost koncentracijama arsena iznad MDK predstavlja značajan čimbenik rizika za razvoj bolesti povezanih s izloženošću arsenu. Capak je u svojoj doktorskoj disertaciji procijenio da je na području Osječko-baranjske županije, temeljem izmjerenih i objavljenih vrijednosti arsena u vodoopskrbnim sustavima, zbog konzumiranja vode s koncentracijama većim od 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, izravno ugroženo 74 177 muškaraca i 83 295 žena (83).

6.1.2. Uran

Koncentracije urana (U) u pitkoj vodi pokazale su drugačiji prostorni obrazac u odnosu na arsen. Uočljive su razlike između panonskog dijela istraživanog područja (Osijek, Našice, Čepin, Dalj, Vladislavci) i područja Papuka (Voćin, Čačinci, Velika). Najviše izmjerene pojedinačne vrijednosti zabilježene su u Dalju i Vladislavcima (medijan 4,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 3,14 $\mu\text{g L}^{-1}$), uz pojedinačne uzorke veće od 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, što upućuje na lokalnu heterogenost vodonosnika i moguće razlike u izvorima vodoopskrbe. Naselja na području Papuka u odnosu na preostale lokacije smještene istočnije, pokazala su kontinuirano umjereno povišene, ali stabilne koncentracije (0,53–0,76 $\mu\text{g L}^{-1}$), što je kompatibilno s geološkom građom metamorfnih i eruptivnih stijena koje prirodno sadrže veće koncentracije urana. Prirodni uran u vodi potječe prvenstveno od otapanja stijena, erozije i transporta čestica tla u vodene tokove. Antropogeni izvori urana uključuju rudarenje, industrijska ispuštanja, fosfatna gnojiva i vojnu uporabu osiromašenog urana. Područje Papuka istraživano je još u razdoblju bivše Jugoslavije zbog potencijala eksploatacije urana. Iako su zabilježene povišene koncentracije u metamorfnim stijenama i okolnim potocima, nisu utvrđeni eksploatacijski značajni lokaliteti (9). Mineralizacija urana na području Papuka i Krndije mjerena je još od 1983. godine, a u tzv. Radlovačkoj seriji opisan je sadržaj urana u slabo metamorfiziranim

sedimentima do 1500 ppm (59). U većini europskih zemalja koncentracije urana u pitkoj vodi najčešće se kreću između 15 i 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, dok su vrijednosti iznad tog raspona relativno rijetke (60). U velikim međunarodnim hidrogeokemijskim istraživanjima prosječne vrijednosti urana u vodi za piće obično su ispod 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, s medijanom između 1 i 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (9). Smjernice SZO za uran u pitkoj vodi mijenjale su se tijekom vremena. Ranije privremene vrijednosti iznosile su 2, 9 i 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, dok je aktualna smjernica od 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ uvedena 2011. godine na temelju epidemioloških studija na populacijama izloženima povišenim koncentracijama urana u pitkoj vodi (84). Kanada je propisala maksimalno dopuštenu koncentraciju od 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, dok Sjedinjene Američke Države (SAD) primjenjuju standard od 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (85). Njemačka ima stroži standard koji iznosi 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (86). U toksikološkoj interpretaciji urana važno je naglasiti da je kemijska nefrotoksičnost primarni zdravstveni učinak kronične izloženosti, dok je radiološki doprinos u okolišnim koncentracijama obično sekundaran. Zamora i suradnici prvi su sustavno prikazali učinke kroničnog unosa urana iz pitke vode na ljudsko zdravlje te opisali subkliničke promjene bubrežne funkcije pri povišenim razinama izloženosti (87). Kurtio i suradnici izvijestili su o nefrotoksičnim učincima čak i pri relativno niskim koncentracijama urana u vodi, bez jasnog praga sigurnosti (88). U kasnijem istraživanju isti autori označili su i koštani sustav kao dodatni cilj kemijske toksičnosti urana (89). Konietzka predlaže podnošljivi dnevni unos od 0,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase te preporučuje koncentraciju od 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ kao sigurnu razinu urana u pitkoj vodi za dugotrajnu izloženost (90). Vrijednosti urana izmjerene u ovom istraživanju znatno su niže od maksimalno dopuštenih vrijednosti i nalaze se unutar raspona izmjerenog u općoj populaciji u drugim istraživanjima. Stoga dobiveni rezultati ne upućuju na značajan javnozdravstveni rizik niti ukazuju na potrebu za dodatnim preventivnim mjerama.

Rezultati istraživanja ukazuju na izražene prostorne razlike u raspodjeli arsena i urana u vodi za piće na području istočne Hrvatske. Arsen pokazuje veće vrijednosti u dijelu dravskog i podunavskog sliva, dok uran pokazuje obrazac povezan s metamorfno-magmatskom podlogom Papuka. Raspodjela oba elementa u najvećoj mjeri upućuje na geogene izvore, uz zanemariv doprinos antropogenih aktivnosti.

6.2. Arsen i uran u biološkim uzorcima

6.2.1. Arsen – rezultati biomonitoringa

Biomonitoringom su obuhvaćena tri biološka medija: serum, urin i kosa. Ovi uzorci razlikuju se prema biokinetici arsena i vremenskom okviru izloženosti koji odražavaju. Urin predstavlja najosjetljiviji biomarker nedavne izloženosti, kosa može odražavati dulje razdoblje izloženosti, uz određeni rizik vanjske kontaminacije i metodoloških varijacija, dok serum u pravilu ima ograničenu uporabnu vrijednost za procjenu kronične izloženosti zbog brzog klirensa i visoke intraindividualne varijabilnosti koncentracija arsena.

6.2.1.1. Arsen u urinu

Koncentracije arsena u urinu u ovom istraživanju pokazuju najjasniji i najkonzistentniji prostorni obrazac povezan s mjestom prebivališta ispitanika. U prikazanim rezultatima uočljive su velike razlike među naseljima. Čepin se posebno izdvaja izrazito povišenom srednjom vrijednošću ($\bar{x} = 113,71 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{SD} = 115,39$) i širokim rasponom vrijednosti ($0,595\text{--}351,519 \mu\text{g L}^{-1}$), uz visok medijan ($73,45 \mu\text{g L}^{-1}$) i širok interkvartilni raspon ($11,90\text{--}204,16 \mu\text{g L}^{-1}$). Ovakav obrazac ukazuje na heterogenu izloženost unutar naselja. Povišene srednje vrijednosti zabilježene su i u Osijeku, Vladislavcima i Dalju, dok su naselja Čačinci i Velika pokazala najniže koncentracije arsena u urinu (prosječno $<1 \mu\text{g L}^{-1}$) uz uske interkvartilne raspone. Raspodjele koncentracija u većini naselja pokazuju asimetriju, što je čest nalaz u biomonitoringu kada manji broj ispitanika ima povremeno ili trajno veći unos arsena, primjerice zbog korištenja specifičnih bunara ili različitih navika konzumacije vode. Dobivene vrijednosti znatno su više od tipičnih vrijednosti u općoj populaciji većine europskih i sjevernoameričkih zemalja. U europskim biomonitoring studijama vrijednosti medijana koncentracija ukupnog arsena u urinu kod adolescenata i odraslih najčešće se kretao između $3,8$ i $13,4 \mu\text{g L}^{-1}$, dok je 95. percentil u Francuskoj iznosio $72,75 \mu\text{g L}^{-1}$, a u Italiji $86,27 \mu\text{g L}^{-1}$ (91). Usporedbe radi, medijan koncentracije arsena u urinu u području Tajlanda poznatom po kontaminaciji podzemnih voda arsenom iznosio je $61,33 \mu\text{g L}^{-1}$ (92). Spolno-stratificirani prikazi pokazuju da naselja s povišenim arsenom u urinu ne pokazuju izražene razlike između muškaraca i žena. Takav nalaz u skladu je s ranijim istraživanjima u kojima spolne razlike nisu bile univerzalne, već su više ovisile o prehranbenim navikama i izloženosti pojedinim izvorima arsena (93). Posebno je potrebno naglasiti da su srednje vrijednosti arsena u urinu u

naseljima Vladislavcima, Čepinu, Dalju Našicama i Osijeku prelazile gornju vrijednost referentnog raspona od $11,7 \mu\text{g L}^{-1}$ prema Rodushkinu (94).

Posebno značajno za ovo istraživanje predstavlja regresijska analiza koja je pokazala **vrlo visoku povezanost između koncentracije arsena u vodi i arsena u urinu** ($R^2 \approx 0,8$). Ovaj rezultat snažno podupire zaključak da je pitka voda dominantan izvor izloženosti arsenu u ispitivanoj populaciji. Slični rezultati opisani su i u međunarodnoj literaturi. U područjima s povišenim koncentracijama arsena u podzemnim vodama, poput Bangladeša, Indije, Argentine i Čilea, često se bilježi snažna linearna povezanost između arsena u vodi i arsena u urinu (R^2 približno 0,6–0,9), osobito kada je pitka voda glavni izvor izloženosti (95).

6.2.1.2. Arsen u kosi

Koncentracije arsena u kosi pokazuju razlike među naseljima, no njihova interpretacija zahtijeva određeni oprez zbog mogućih metodoloških ograničenja. Vladislavci ($\bar{x} = 32,34$; $SD = 95,95$; $\max = 647,35$) i Čepin ($\bar{x} = 28,70$; $SD = 106,29$; $\max = 526,78$) imaju visoke vrijednosti aritmetičke sredine, ali relativno niske medijane ($0,37 \mu\text{g g}^{-1}$ i $0,99 \mu\text{g g}^{-1}$). Takav obrazac upućuje na činjenicu da na aritmetičku sredinu u velikoj mjeri utječe manji broj ekstremnih vrijednosti. Ovakva raspodjela može odražavati heterogenu izloženosti, npr. korištenje različitih izvora vode unutar naselja, ali i metodološke čimbenike poput duljine i dijela uzorka kose, kozmetičkih tretmana ili taloženja arsena iz okoliša na površinu kose. Izmjerene vrijednosti medijana nalaze se unutar referentnog raspona za opću populaciju u većini zemalja. U studijama provedenima na neizloženim populacijama koncentracije arsena u kosi najčešće su ispod $1 \mu\text{g g}^{-1}$ (96). U područjima s poznatom kontaminacijom podzemnih voda arsenom koncentracije u kosi često prelaze $1 \mu\text{g g}^{-1}$, a u nekim slučajevima mogu dosegnuti i više od $7 \mu\text{g g}^{-1}$ (97). Naselja Voćin, Čačinci i Velika pokazuju niske i relativno homogene koncentracije arsena u kosi bez izraženih ekstremnih vrijednosti, što je u skladu s niskim koncentracijama arsena u vodi za piće na tim područjima. Regresijska analiza odnosa arsena u vodi i arsena u kosi pokazuje umjerenu povezanost ($R^2 \approx 0,45$). Takav rezultat odgovara nalazima iz literature prema kojima kosa rijetko predstavlja pouzdan kvantitativni biomarker izloženosti, već se prije smatra dopunskim pokazateljem dugotrajne izloženosti. Izmjerene vrijednosti medijana i srednje vrijednosti u naseljima Vladislavci, Osijek, Čepin, Našice i Dalj veće su od referentnih literaturnih vrijednosti po Rodushkinu (medijan $0,067 \mu\text{g g}^{-1}$, raspon $0,034\text{--}0,319 \mu\text{g g}^{-1}$) (98).

6.2.1.3. Arsen u serumu

Serum se u ovom istraživanju pokazao slabijim indikatorom kronične izloženosti arsenu u usporedbi s urinom. Rezultati pokazuju izraženu varijabilnost koncentracija te povremene ekstremne vrijednosti. Dalj se izdvaja relativno visokom srednjom vrijednošću ($\bar{x} = 19,77 \mu\text{g L}^{-1}$) uz veliku standardnu devijaciju ($SD = 55,19$) i maksimalnu vrijednost od $335,90 \mu\text{g L}^{-1}$, dok je vrijednost medijana relativno niska ($4,81 \mu\text{g L}^{-1}$). Takav odnos upućuje na utjecaj manjeg broja ekstremnih vrijednosti na aritmetičku sredinu. Naselja Voćin, Čačinci i Velika pokazuju stabilno niske koncentracije arsena u serumu (oko $0,11\text{--}0,12 \mu\text{g L}^{-1}$) uz vrlo uske raspone vrijednosti, što je u skladu s niskom izloženošću u tim područjima. Arsen u serumu općenito se ne smatra pouzdanim biomarkerom kronične izloženosti zbog relativno brze eliminacije iz krvi. U velikim populacijskim studijama medijan koncentracije arsena u krvi kod osoba bez profesionalne izloženosti najčešće iznosi između 1 i $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (99). U područjima s povišenim koncentracijama arsena u vodi za piće, primjerice u nekim regijama Indije, medijani mogu prelaziti $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (100). Također, vrijednosti medijana i srednje vrijednosti u naseljima Vladislavci, Osijek, Čepin, Našice i Dalj veće su od referentnih literaturnih vrijednosti prema Rodushkinu $-3,6 \mu\text{g L}^{-1}$ (101). Regresijska analiza u ovom istraživanju pokazuje slabu do umjerenu povezanost između koncentracije arsena u vodi i serumu ($R^2 \approx 0,44$). Ovaj nalaz dodatno potvrđuje da je serum najmanje pouzdan biomarker za procjenu dugotrajne izloženosti arsenu na populacijskoj razini.

6.2.2. Uran – rezultati biomonitoringa

U kontekstu biomonitoringa izloženosti uranu urin predstavlja najpouzdaniji biomarker nedavne izloženosti zbog činjenice da se uran iz organizma primarno eliminira putem bubrega. Zbog brzog uklanjanja iz cirkulacije i akumulacije u bubrezima i kostima koncentracije urana u krvi obično su vrlo niske čak i kod izloženih osoba (102). Kosa može odražavati dugotrajniju akumulaciju urana, ali njezina interpretacija također je opterećena mogućom vanjskom kontaminacijom i nedostatkom standardizacije u metodologiji analize (103). Uran je poznati nefrotoksin s primarnim djelovanjem na proksimalne tubule bubrega. Kronična izloženost uranu, čak i pri relativno niskim koncentracijama može uzrokovati subkliničku tubularnu disfunkciju koja se očituje povećanom ekskrecijom kalcija, fosfata, glukoze i niskomolekularnih proteina u urinu (104). Unatoč tim učincima, epidemiološki dokazi o povezanosti izloženosti uranu i karcinoma bubrega ili mokraćnog mjehura ostaju ograničeni i nedovoljno konzistentni (105). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da su koncentracije urana u svim analiziranim biomarkerima niske i nalaze se unutar

raspona koji se smatra tipičnim za opću populaciju, uz manja odstupanja koja se mogu pripisati geogenom utjecaju. Također, nisu uočene značajne spolno specifične razlike u koncentracijama urana, što upućuje na sličan obrazac okolišne izloženosti kod muških i ženskih ispitanika.

6.2.2.1. Uran u urinu

Analiza koncentracija urana u urinu pokazuje izrazito homogenu raspodjelu u većini panonskih naselja (Vladislavci, Dalj, Čepin, Našice i Osijek). Medijan koncentracije iznosi približno 0,010 $\mu\text{g/L}$ (10 ng L^{-1}), dok su 25. i 75. percentil identični ili gotovo identični medijanu, što upućuje na minimalnu varijabilnost među ispitanicima. Naselja na području Papuka (Voćin, Čačinci i Velika) pokazuju nešto više medijane koncentracija (oko 0,050 $\mu\text{g L}^{-1}$), ali uz relativno uske raspone vrijednosti. Takav obrazac ukazuje na stabilnu, kroničnu, ali kvantitativno nisku izloženost, najvjerojatnije geogenog podrijetla. Ove vrijednosti predstavljaju uobičajene koncentracije urana u biomarkerima stanovništva istraživanog područja te su u skladu s rasponima koji se u literaturi navode za opću populaciju izloženu prirodnim razinama urana u okolišu, ali su nešto više od vrijednosti koje Rodushkin definira kao referentne (0,019 $\mu\text{g L}^{-1}$) (94). Analiza prema spolu pokazuje vrlo male razlike između muških i ženskih ispitanika. Koncentracije urana u urinu kod muškaraca nalaze se u rasponu od 0,010 do 0,052 $\mu\text{g L}^{-1}$, a kod žena od 0,010 do 0,058 $\mu\text{g L}^{-1}$. i nalaze se unutar referentnog raspona izmjerenog u općoj populaciji u različitim zemljama. Primjerice, medijani koncentracija urana u urinu u općoj populaciji iznose približno 7,5 ng L^{-1} u Češkoj, 15 ng L^{-1} u Švicarskoj i oko 16 ng L^{-1} u Finskoj (106).

6.2.2.2. Uran u serumu

Za ukupnu populaciju ispitanika (muški i ženski zajedno) koncentracije urana u serumu kreću se u rasponu od približno 0,020 do 0,124 $\mu\text{g L}^{-1}$. Rezultati koncentracija urana u serumu pokazuju izražene razlike između panonskih i papučkih naselja. U panonskim naseljima medijan koncentracije iznosi približno 0,020 $\mu\text{g/L}$ uz vrlo uzak interkvartilni raspon. Naselja na području Papuka imaju medijane oko 0,103–0,104 $\mu\text{g/L}$, također uz relativno uske raspone vrijednosti. Kod muškaraca koncentracije urana u serumu kreću se u rasponu od približno 0,020 do 0,127 $\mu\text{g L}^{-1}$, dok kod žena iznose približno 0,020 do 0,130 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ovakav obrazac ukazuje na ujednačeno povišenje na razini populacije povezano s lokalnim geološkim izvorima, uz izostanak značajnih razlika između spolova. Dobivene koncentracije ne predstavljaju značajno odstupanje u odnosu na vrijednosti zabilježene u neizloženoj populaciji u drugim europskim i sjevernoameričkim studijama iako u dijelu naselja oko Papuka premašuju referentne vrijednosti prema Rodushkinu

(0,005- 0,019 $\mu\text{g L}^{-1}$) (101). Pri tim razinama izloženosti ne očekuju se klinički značajni nefrotoksični učinci.

6.2.2.3. *Uran u kosi*

U kosi ispitanika koncentracije urana kreću se od približno 0,001 do 0,028 $\mu\text{g g}^{-1}$; u kosi muškaraca koncentracije urana kreću se između približno 0,001 i 0,036 $\mu\text{g g}^{-1}$, dok su kod žena nešto niže i iznose približno 0,001 do 0,024 $\mu\text{g g}^{-1}$. Koncentracije urana u kosi pokazuju nešto više vrijednosti medijana koncentracija u papučkim naseljima (Čačinci, Voćin i Velika), gdje vrijednosti iznose približno 0,011–0,012 $\mu\text{g/g}$. U panonskim naseljima medijani su niži (0,001–0,004 $\mu\text{g/g}$), što upućuje na minimalnu kroničnu izloženost. Vladislavci pokazuju nešto viši medijan u odnosu na ostala panonska naselja, no interpretacija ovog nalaza zahtijeva oprez jer kosa integrira dulje razdoblje izloženosti i širi spektar potencijalnih izvora. Dobivene vrijednosti usporedive su s nalazima iz drugih europskih zemalja i općenito su niže od koncentracija zabilježenih u područjima s povišenom prirodnom radioaktivnošću (98,102).

6.3. Povezanost koncentracija arsena u vodi i biološkim uzorcima

Analiza odnosa koncentracija arsena u vodi za piće i biološkim uzorcima stanovništva pokazala je **jasnu i statistički značajnu povezanost između koncentracija arsena u vodi i urinu**, dok su povezanosti sa serumom i kosom bile slabije izražene. Takav obrazac očekivan je s obzirom na poznatu toksokinetiku anorganskog arsena. Nakon ingestije arsen se brzo apsorbira u probavnom sustavu, prolazi biotransformaciju metilacijom u jetri te se primarno eliminira renalnim putem. Zbog toga urin predstavlja najpouzdaniji biomarker recentne izloženosti arsenu u populacijskim biomonitorinškim istraživanjima (107). Dobiveni rezultati pokazuju da se varijacije koncentracija arsena u vodi najdosljednije odražavaju upravo u koncentracijama arsena u urinu ispitanika, osobito u naseljima s povišenim koncentracijama arsena u vodi za piće. Takav obrazac posebno je izražen u naselju Čepin, gdje su zabilježene najviše koncentracije arsena u vodi i istodobno najviše koncentracije arsena u urinu ispitanika. Ovaj nalaz potvrđuje temeljnu pretpostavku biomonitoringa, prema kojoj okolišna razina izloženosti prelazi u mjerljivu internu dozu u organizmu, što se u ovom istraživanju jasno očituje kroz povezanost koncentracija arsena u vodi i urinu ($R^2 \approx 0,8$). Slične nalaze opisuje i velik broj epidemioloških i biomonitorinških studija provedenih u područjima s geogenim arsenom u podzemnim vodama. U preglednom radu Hughesa navodi se da je urin najpouzdaniji biomarker izloženosti anorganskom arsenu jer odražava nedavni

unos arsena putem vode i hrane te omogućuje procjenu individualne izloženosti u populacijskim studijama (107). Upravo zbog toga biomonitoring urina predstavlja standardni pristup u epidemiološkim istraživanjima koja ispituju zdravstvene učinke kronične izloženosti arsenu. Nasuprot tome, koncentracije arsena u kosi pokazale su slabiju povezanost s koncentracijama arsena u vodi za piće. Iako kosa može uključivati izloženost tijekom duljeg vremenskog razdoblja, ona je istodobno podložna utjecaju brojnih čimbenika koji nisu nužno povezani s vodom za piće. Vanjska kontaminacija, kozmetički tretmani, individualne higijenske navike te prehrambeni izvori arsena mogu značajno utjecati na koncentracije arsena u kosi i otežati interpretaciju rezultata (108). Zbog toga se kosa u istraživanjima najčešće koristi kao dopunski pokazatelj dugotrajnije izloženosti, dok urin ostaje primarni biomarker za procjenu aktualnog unosa arsena. Koncentracije arsena u serumu u ovom su istraživanju bile relativno niske i pokazivale su ograničenu varijabilnost među naseljima i nisu pokazale sličan trend s vrijednostima koncentracija u vodi za piće. Takav nalaz također je u skladu s poznatom toksokinetikom arsena, budući da se arsen relativno brzo uklanja iz krvotoka i redistribuira u tkiva ili eliminira putem bubrega. Zbog kratkog poluvijeka arsena u krvi serum se smatra manje pouzdanim biomarkerom kronične izloženosti u populacijskim studijama. Za razliku od arsena, korelacije između koncentracija urana u vodi za piće i biološkim uzorcima bile su slabije izražene i u većini slučajeva statistički neznčajne. Ovakav rezultat može se objasniti vrlo niskim koncentracijama urana izmjerenima u vodi za piće na većini ispitivanih lokacija. U uvjetima niskih koncentracija biomarkeri izloženosti često su ograničeni granicama detekcije analitičkih metoda, što može otežati preciznu procjenu odnosa između okolišne i interne izloženosti. Dodatni čimbenik predstavlja heterogenost stvarne izloženosti stanovništva. Različiti izvori vode za piće, individualne navike konzumacije vode te korištenje alternativnih izvora poput flaširane vode mogu značajno utjecati na stvarnu izloženost pojedinaca uranu i drugim elementima prisutnima u vodi. U takvim okolnostima povezanost između koncentracija u vodi i biomarkerima može biti oslabljena ili prikrivena. U kontekstu urana urin se također smatra najosjetljivijim biomarkerom izloženosti jer odražava unos i bubrežnu eliminaciju ovog elementa. Međutim, za razliku od arsena, uran se u okolišnim uvjetima najčešće pojavljuje u znatno nižim koncentracijama, zbog čega rezultati biomonitoringa mogu biti slabije izraženi. U brojnim studijama istaknuto je da je urin najpouzdanija matrica za procjenu izloženosti uranu, dok su koncentracije u serumu i drugim biološkim uzorcima često preniske za pouzdanu interpretaciju (109). Dobiveni rezultati ukazuju na postojanje jasne izloženosti arsenu u pojedinim

područjima istočne Hrvatske. Povezanost između koncentracija arsena u vodi i biomarkerima, osobito u urinu, potvrđuje da pitka voda predstavlja dominantni izvor izloženosti u promatranim populacijama. Takav obrazac posebno je važan u kontekstu procjene zdravstvenih rizika, jer omogućuje povezivanje okolišnih mjerenja s internom dozom u organizmu. Istodobno, slabija povezanost biomarkera izloženosti uranu s koncentracijama u vodi ukazuje na potrebu oprezne interpretacije rezultata i dodatnih istraživanja koja bi uključivala veći broj uzoraka i detaljniju procjenu individualne izloženosti. Klaster analiza nije pokazala jasno razgraničenje između skupina u odnosu na tri dobne skupine, a niti lokacije. Ispitanici nisu bili grupirani u zasebne klastere koji bi odgovarali unaprijed definiranim dobnim kategorijama, već su se dobne skupine međusobno preklapale unutar mješovitih klastera postavljenih na vrlo bliskim udaljenostima. Ovakav obrazac upućuje na to da dobna skupina ispitanika ne predstavlja dovoljno diferencirajuću varijablu za stvaranje homogenih klastera. Rezultati regresijske analize pružili su informaciju o pozitivnim ali vrlo slabim korelacijama praćenih varijabli pri čemu su doprinijeli boljem razumijevanju njihovog međusobnog odnosa. S obzirom na vrlo niske koncentracije urana u analiziranim biološkim uzorcima, nije bilo moguće uspostaviti pouzdan regresijski model koji bi opisao odnos između koncentracija urana u biološkim uzorcima i vodi. U slučajevima kada su vrijednosti koncentracija metala u vodi unutar uskog raspona, varijabilnost podataka je ograničena, što otežava određivanje značajnih trendova i smanjuje statističku snagu modela. Uspostavljanje modela s većim koeficijentom regresije bilo bi moguće pri širem rasponu koncentracija, čime bi se postigla bolja procjena smjera i jačine povezanosti.

Objedinjavanje okolišnih mjerenja, biomonitorinških podataka i epidemioloških analiza u ovom istraživanju omogućilo je sveobuhvatan uvid u obrasce izloženosti arsenu i uranu u ispitivanim područjima, stoga predstavlja važan temelj za daljnju procjenu njihovih potencijalnih zdravstvenih učinaka.

6.4. Povezanost izloženosti arsenu i uranu sa pojavnnošću karcinoma uropoetskog sustava

6.4.1. Arsen i karcinom bubrega (C64)

Epidemiološka povezanost između kronične izloženosti arsenu i karcinoma bubrega znatno je manje konzistentna nego za karcinom mokraćnog mjehura. Iako je arsen dobro poznat karcinogen za urotel mokraćnog mjehura, njegova povezanost s malignim bolestima bubrega ostaje predmet rasprave u literaturi (110). U ovom istraživanju grafički prikazi odnosa između koncentracija arsena u vodi za piće i biološkim uzorcima te incidencije karcinoma bubrega (C64) ne pokazuju jasan odnos na razini promatranih naselja. Iako su u pojedinim naseljima s višim koncentracijama arsena zabilježene nešto više vrijednosti incidencije, takav obrazac nije bio konzistentan niti proporcionalan razinama izloženosti. Posebno je zanimljivo da naselje Čepin, unatoč najvišim koncentracijama arsena u vodi za piće i urin, ne pokazuje proporcionalno najveću incidenciju karcinoma bubrega. Ovakav nalaz nije u suprotnosti s postojećom literaturom. Sustavni pregled epidemioloških studija koji obuhvaća više od trideset godina istraživanja pokazuje da je povezanost između arsena i karcinoma bubrega slabija i heterogenija nego za karcinom mokraćnog mjehura. Autori navode da su procjene rizika često osjetljive na metodološke razlike među studijama, uključujući način procjene izloženosti, duljinu praćenja i kontrolu konfuznih čimbenika (29,111). Jedno od mogućih objašnjenja takvog obrasca jest činjenica da arsen ne uzrokuje jednako sve histološke tipove karcinoma bubrega. Studija provedena u sjevernom Čileu pokazala je da je izloženost arsenu snažno povezana s karcinomom prijelaznog epitela bubrežne pijelone i uretera, dok za karcinom bubrežnih stanica (*Renal cell carcinoma*) nije utvrđena značajna povezanost (112). Budući da se u epidemiološkim registrima često svi maligni tumori bubrega klasificiraju unutar iste skupine (C64), takva heterogenost može prikriti potencijalne specifične učinke arsena. Dodatni čimbenik predstavlja razina izloženosti. U mnogim studijama povećanje incidencije karcinoma bubrega zabilježeno je tek pri vrlo visokim koncentracijama arsena u vodi za piće. Primjerice, studija provedena u Tajvanu pokazala je povećanu smrtnost od karcinoma bubrega tek pri koncentracijama arsena višim od 350 µg/L, dok pri nižim razinama izloženosti takva povezanost nije bila statistički značajna (110). Važan element interpretacije predstavlja i duljina latentnog razdoblja karcinogeneze. Dugoročne epidemiološke studije pokazale su da se povećani rizik od karcinoma bubrega može pojaviti desetljećima nakon početka izloženosti arsenu. U nekim populacijama povećana smrtnost zabilježena je i više od četrdeset godina nakon smanjenja

izloženosti (113). Rezultati ovog istraživanja stoga su u skladu s literaturom koja pokazuje da je povezanost između arsena i karcinoma bubrega kompleksna, ovisna o razini izloženosti, histološkom tipu tumora i duljini latentnog razdoblja te općenito slabija nego za karcinom mokraćnog mjehura.

6.4.2. Arsen i karcinom mokraćnog mjehura (C67)

Za razliku od karcinoma bubrega, povezanost između kronične izloženosti arsenu i karcinoma mokraćnog mjehura smatra se jednom od najdosljednije potvrđenih veza između okolišnog kontaminanta i malignih bolesti u ljudi. Anorganski arsen klasificiran je kao karcinogen skupine 1 prema IARC, pri čemu su dokazi za karcinom mokraćnog mjehura osobito snažni (3). Rezultati ovog istraživanja su sukladni s tim istraživanjima. Naselje Čepin, u kojem su zabilježene najviše koncentracije arsena u vodi za piće i urinu stanovništva, pokazuje i relativno povišenu incidenciju karcinoma mokraćnog mjehura. Takva podudarnost okolišnih, biomonitorinških i epidemioloških nalaza biološki je prihvatljiva s obzirom na način eliminacije arsena iz organizma. Nakon ingestije arsen prolazi metabolizam metilacijom te se izlučuje putem urina, čime urotel mokraćnog mjehura dolazi u dugotrajan kontakt s arsenovim metabolitima. Upravo zbog tog mehanizma mokraćni mjehur smatra se jednim od glavnih ciljnih organa karcinogenog djelovanja arsena (114). Jedna od najpoznatijih epidemioloških studija provedena je u području endemske izloženosti arsenu u sjeveroistočnom Tajvanu. U longitudinalnoj studiji koja je obuhvatila više od osam tisuća stanovnika utvrđena je jasna doza-odgovor povezanost između koncentracije arsena u vodi za piće i incidencije tranzicijskog karcinoma mokraćnog mjehura (110). Relativni rizik razvoja karcinoma povećavao se s porastom koncentracije arsena u vodi, dosežući vrijednosti veće od 15 pri koncentracijama iznad 100 µg/L. Slični rezultati zabilježeni su i u regiji Antofagasta u sjevernom Čileu, gdje su koncentracije arsena u vodi za piće tijekom sredine dvadesetog stoljeća dosezale iznimno visoke vrijednosti. U toj je populaciji zabilježeno višestruko povećanje mortaliteta od karcinoma mokraćnog mjehura, s omjerima smrtnosti od 6,0 kod muškaraca i 8,2 kod žena u usporedbi s nacionalnim prosjekom (112). Sustavni pregled epidemioloških studija dodatno potvrđuje postojanje povezanosti između izloženosti arsenu i karcinoma mokraćnog mjehura čak i pri relativno niskim koncentracijama arsena u vodi za piće. Autori navode da koncentracije blizu preporučene granične vrijednosti od 10 µg/L mogu biti povezane s povećanim rizikom od malignih bolesti mokraćnog sustava (29,111). U tom kontekstu, rezultati ovog istraživanja mogu se

interpretirati kao dio šireg epidemiološkog obrasca koji povezuje kroničnu izloženost arsenu putem pitke vode s povećanim rizikom od karcinoma mokraćnog mjehura.

6.4.3. Uran i karcinomi bubrega i mokraćnog mjehura

Za razliku od arsena, dokazi o povezanosti između kronične izloženosti uranu i malignih bolesti mokraćnog sustava znatno su slabiji i manje konzistentni. Uran je prvenstveno poznat kao kemijski nefrotoksin koji djeluje na epitelne stanice proksimalnih tubula bubrega, dok su dokazi o njegovoj karcinogenosti u okolišnim uvjetima ograničeni. Nakon ingestije uran se djelomično apsorbira u probavnom sustavu te se distribuira u krvotok, gdje se veže na proteine plazme. Glavni ciljani organ njegove kemijske toksičnosti su bubrezi, osobito proksimalni tubuli, u kojima se mogu razviti funkcionalne promjene povezane s tubularnom disfunkcijom (115). Epidemiološke studije koje su istraživale povezanost između urana u vodi za piće i karcinoma bubrega ili mokraćnog mjehura dale su heterogene rezultate. Većina studija provedenih u populacijama izloženim prirodnom uranu nije utvrdila statistički značajnu povezanost između izloženosti i povećane incidencije malignih bolesti mokraćnog sustava (116). Nedavni sustavni pregledi i meta-analize također zaključuju da kronična izloženost uranu u okolišnim koncentracijama nije dosljedno povezana s povećanim rizikom od raka bubrega ili mokraćnog mjehura. U tim se analizama ističe da je najdosljedniji zdravstveni učinak urana subklinična tubularna disfunkcija, dok dokazi o karcinogenosti ostaju nedovoljni (117,118). Rezultati ovog istraživanja uklapaju se u takav obrazac. Iako su u nekim biološkim uzorcima zabilježene povišene koncentracije urana, epidemiološki podaci ne pokazuju konzistentno povećanje incidencije karcinoma bubrega ili mokraćnog mjehura u naseljima s povišenim koncentracijama urana u vodi za piće. Ovakav nalaz sugerira da u promatranim uvjetima uran prvenstveno predstavlja okolišni nefrotoksin, dok njegova potencijalna uloga u karcinogenezi mokraćnog sustava ostaje nejasna (119).

6.5. Ispitivanje citotoksičnosti arsena primjenom MTT testa na staničnoj liniji MDCK1

Eksperimentalni dio ovog istraživanja uključivao je ispitivanje citotoksičnih učinaka arsena na staničnoj liniji MDCK1 (*Madin–Darby Canine Kidney*), koja predstavlja dobro karakteriziran *in vitro* model epitela distalnog tubula bubrega. Ova stanična linija široko se koristi u toksikološkim istraživanjima za procjenu učinaka različitih kemijskih spojeva na bubrežne epitelne stanice, osobito u kontekstu istraživanja nefrotoksičnosti i mehanizama oštećenja tubularnog epitela. U

ovom istraživanju stanice su izložene arsenovu trioksidu (As_2O_3) u koncentracijama od 10 do 200 $\mu\text{g/L}$ tijekom različitih vremenskih intervala inkubacije (48, 72 i 96 sati). Odabrani raspon koncentracija temeljen je na okolišno relevantnim vrijednostima arsena izmjeranima u pitkoj vodi pojedinih naselja istočne Hrvatske, čime je eksperimentalni model usklađen s realnim scenarijima kronične izloženosti stanovništva. Citotoksični učinak procijenjen je primjenom MTT testa, jedne od najčešće korištenih metoda za procjenu metaboličke aktivnosti i održivosti stanica. MTT test temelji se na sposobnosti mitohondrijskih dehidrogenaza živih stanica da reduciraju tetrazolijevu sol MTT u netopljivi formazan. Količina nastalog formazana proporcionalna je metaboličkoj aktivnosti stanica i koristi se kao indikator stanične održivosti i proliferacije. Rezultati MTT testa u ovom istraživanju pokazali su da pri nijednoj ispitivanoj koncentraciji arsenova trioksida niti u jednom vremenskom intervalu inkubacije nije zabilježen statistički značajan pad stanične održivosti u odnosu na kontrolne stanice. Drugim riječima, u rasponu koncentracija od 10 do 200 $\mu\text{g/L}$ arsenov trioksid nije inducirao mjerljivu citotoksičnost u MDCK1 stanicama. Interpretacija ovog nalaza zahtijeva uzimanje u obzir molarnih koncentracija primijenjenog arsenova trioksida. Preračunom korištenih koncentracija u molarni raspon dobiva se približno 0,05–1,0 μM . Takve koncentracije smatraju se relativno niskima u kontekstu eksperimentalnih studija arsenove citotoksičnosti. Brojna istraživanja pokazuju da se izraženi citotoksični učinci arsena na bubrežne epitelne stanice javljaju tek pri znatno višim koncentracijama, često u rasponu od nekoliko desetaka mikromola.(54,55)

Ovakav rezultat stoga nije u suprotnosti s literaturom, nego je s njom u potpunosti usklađen. Brojna *in vitro* istraživanja na bubrežnim staničnim linijama, uključujući MDCK stanice, opisuju bipazni ili hormetički dozni odgovor na arsen. U takvom modelu niske koncentracije arsena mogu potaknuti adaptivne ili čak proliferativne odgovore stanica, dok više koncentracije dovode do oksidativnog stresa, mitohondrijske disfunkcije i stanične smrti. Takav hormetički odgovor posebno je relevantan u kontekstu okolišnih scenarija kronične izloženosti, u kojima stanice nisu izložene akutnim visokim dozama, već dugotrajnom djelovanju relativno niskih koncentracija toksina. (48,56) U tim uvjetima stanice mogu aktivirati niz adaptivnih mehanizama koji omogućuju održavanje metaboličke aktivnosti i preživljavanje. Važno je naglasiti da MTT test prvenstveno odražava metaboličku aktivnost mitohondrija, a ne nužno sve oblike subletalnog ili

funkcionalnog oštećenja stanica. Promjene koje ne dovode do neposrednog pada mitohondrijske aktivnosti mogu ostati neotkrivene ovom metodom, iako mogu imati značajne biološke posljedice.

Primjerice, pri izloženosti niskim koncentracijama arsena mogu se javiti promjene u organizaciji citoskeleta, poremećaji staničnog polariteta, promjene u funkciji ionskih transportera te smanjenje integriteta međustaničnih spojeva (*tight junctions*). Takve promjene mogu utjecati na funkcionalna svojstva epitelnog sloja, iako ne moraju odmah rezultirati smanjenjem stanične održivosti (47,54).

U tom kontekstu izostanak citotoksičnog učinka u MTT testu ne znači nužno da arsen nema biološki učinak na bubrežne epitelne stanice. Naprotiv, moguće je da pri korištenim koncentracijama dolazi do suptilnih funkcionalnih promjena koje bi se mogle detektirati primjenom osjetljivijih metoda, poput analize oksidativnog stresa, određivanja apoptotskih markera ili mjerenja transepitelijalne električne otpornosti (48).

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju stoga su u skladu s konceptom kronične niskodozne izloženosti, prema kojem dugotrajna izloženost relativno niskim koncentracijama arsena može dovesti do postupnih bioloških promjena bez neposredne citotoksičnosti.

6.6. Učinak arsenova trioksida i acetilkolinesteraze (AChE)

U ovom istraživanju dodatno je razmatran potencijalni učinak arsenova trioksida (As_2O_3) na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE), enzima koji ima ključnu ulogu u kolinergičkom sustavu. Iako se AChE prvenstveno koristi kao biomarker neurotoksičnih učinaka različitih kemijskih spojeva, pojedine studije istraživale su i njegovu povezanost s izloženošću arsenovim spojevima (65). Acetilkolinesteraza je enzim odgovoran za hidrolizu neurotransmitera acetilkolina u sinaptičkom prostoru, čime se regulira prijenos živčanih impulsa. Promjene u aktivnosti ovog enzima mogu ukazivati na poremećaje u kolinergičkom sustavu, ali i na opće toksične učinke različitih kemijskih spojeva (119).

U populacijskim studijama provedenim u područjima s povišenim koncentracijama arsena u vodi za piće zabilježena je inverzna povezanost između izloženosti arsenu i aktivnosti plazmatske kolinesteraze. Takvi rezultati sugeriraju da arsen može djelovati kao inhibitor kolinesterazne aktivnosti te na taj način doprinijeti neurotoksičnim i hepatotoksičnim učincima (119).

Međutim, koncentracije arsena pri kojima se uočava značajna inhibicija acetilkolinesteraze znatno su više od koncentracija korištenih u ovom istraživanju. Eksperimentalne studije pokazuju da se inhibicija AChE javlja tek pri koncentracijama arsena višim od približno $10\,000\ \mu\text{g L}^{-1}$, što je višestruko više od koncentracija arsena izmjerenih u pitkoj vodi analiziranih naselja (120).

U ovom istraživanju korištene koncentracije arsenova trioksida ($10\text{--}200\ \mu\text{g L}^{-1}$) nalaze se u rasponu okolišno relevantnih vrijednosti. Pri tim koncentracijama nije zabilježena značajna inhibicija aktivnosti acetilkolinesteraze, što je u skladu s literaturnim podacima koji ukazuju da se neurotoksični učinci arsena javljaju tek pri znatno višim razinama izloženosti.

Ovakav nalaz dodatno podupire zaključak da koncentracije arsena prisutne u vodi za piće analiziranih područja vjerojatno nisu dovoljne za izazivanje akutnih neurotoksičnih učinaka. Međutim, dugotrajna izloženost nižim koncentracijama može potencijalno dovesti do suptilnih biokemijskih promjena koje se ne moraju nužno manifestirati kao izravna inhibicija enzimskih aktivnosti. Osim neurotoksičnih učinaka, arsen može djelovati i na različite signalne putove uključene u regulaciju proliferacije i apoptoze stanica. Studije na MDCK stanicama pokazale su da niske koncentracije arsenova trioksida mogu potaknuti proliferaciju stanica putem aktivacije transkripcijskog faktora AP-1 i povećanja aktivnosti Na^+/H^+ izmjenjivača NHE1. Aktivacija ovog transportnog sustava dovodi do intracelularne alkalinizacije, što može potaknuti proliferativne procese u epitelu (55).

Takav proliferativni odgovor specifičan je za određene stanične linije i ne mora se pojaviti u svim tipovima stanica. Osjetljivost stanica na arsen u velikoj mjeri ovisi o njihovom antioksidativnom kapacitetu, ekspresiji antiapoptotskih proteina te učinkovitosti mehanizama detoksikacije. Eksperimentalne studije također pokazuju da izloženost arsenovu trioksidu može potaknuti ekspresiju različitih antioksidativnih enzima, uključujući katalazu, superoksid dismutazu i tioredoksin (121). Povećana ekspresija ovih enzima može povećati otpornost stanica na oksidativni stres i smanjiti citotoksični učinak arsena. U tom kontekstu MDCK stanice mogu pokazivati relativno visoku otpornost na citotoksične učinke arsenova trioksida u koncentracijama koje su citotoksične za druge stanične linije. Takva otpornost može biti povezana s učinkovitijim mehanizmima detoksikacije i antioksidativne zaštite (55,56). Dobiveni eksperimentalni rezultati stoga pružaju dodatni mehanistički kontekst za interpretaciju epidemioloških nalaza ovog

istraživanja. Iako kronična izloženost arsenu može imati važnu ulogu u karcinogenezi, rezultati *in vitro* eksperimenata sugeriraju da pri okolišno relevantnim koncentracijama arsen ne mora nužno inducirati izravnu citotoksičnost bubrežnih epitelnih stanica.

6.7. Ograničenja istraživanja i implikacije za buduća istraživanja

Unatoč značajnim nalazima, ovo istraživanje ima određena metodološka ograničenja koja je potrebno uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata. Prvo, epidemiološka analiza provedena je na razini populacije, što znači da je individualna izloženost ispitanika ostalim izvorima arsena i urana teško precizno procijeniti. Značaj i uloga *confounding* čimbenika je u ovakvim istraživanjima od velike važnosti. Drugo, koncentracije arsena i urana u vodi i biološkim uzorcima odražavaju trenutačno ili recentno stanje izloženosti, dok razvoj malignih bolesti uključuje dugotrajan proces karcinogeneze s latentnim razdobljem koje može trajati desetljećima. Treće, na pojavnost karcinoma mokraćnog sustava mogu značajno utjecati drugi čimbenici rizika, poput pušenja, profesionalne izloženosti kemikalijama, prehrambenih navika i genetske predispozicije, koji u ovom istraživanju nisu mogli biti detaljno analizirani. Četvrto, eksperimentalni dio istraživanja proveden je na jednoj staničnoj liniji bubrežnog epitela (MDCK1), koja predstavlja dobro validiran model distalnog tubularnog epitela, ali ne može u potpunosti odražavati složenost fizioloških uvjeta u ljudskom organizmu. *In vitro* modeli omogućuju detaljno proučavanje staničnih mehanizama, ali ne uključuju složene interakcije između tkiva, metaboličkih procesa i imunoloških odgovora prisutnih *in vivo*. Unatoč tim ograničenjima, rezultati istraživanja pružaju važan doprinos razumijevanju okolišne izloženosti arsenu i uranu u istočnoj Hrvatskoj te njihovih potencijalnih zdravstvenih učinaka. Povezanost arsena sa rakom mokraćnog mjehura je dokazana, i stoga bi trebala imati i javnozdravstvenu implikaciju u smislu omogućavanja pravodobne dijagnostike stanovnika pogođenih područja istočne Hrvatske u formi citološke analize urina. Nefrotoksičnost, nefrokarcinogenost, kao i općeniti toksični učinak arsena na stanice u navedenim dozama nije dokazana ali, zbog specifičnosti djelovanja arsena kroz desetljeća, se ne mogu jednoznačno isključiti. Buduća istraživanja trebala bi uključivati detaljniju procjenu individualne izloženosti, dulje epidemiološko praćenje populacije te primjenu dodatnih biomarkera koji bi omogućili precizniju procjenu zdravstvenih učinaka kronične izloženosti metalima u okolišu.

7. ZAKLJUČCI

Rezultati ovog istraživanja predstavljaju integriranu procjenu povezanosti arsena i urana u vodi za piće s biomarkerima izloženosti te pojavnosti malignih bolesti uropoetskog sustava u populaciji istočne Hrvatske. Istraživanje izloženosti stanovništva osam naselja istočne Hrvatske uranu (U) i arsenu (As) putem pitke vode te bioloških uzoraka (urin, seruma i kose) pokazalo je sljedeće:

1. Prostorna varijabilnost: Uran i arsen pokazuju jasnu prostornu heterogenost, u skladu s lokalnom geologijom. Analizom koncentracija arsena i urana u vodi za piće utvrđene su značajne razlike između ispitivanih naselja. Najviše koncentracije arsena zabilježene su u naselju Čepin, gdje su vrijednosti u pojedinim uzorcima višestruko premašivale maksimalnu dozvoljenu koncentraciju od $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

2. Relativno visoke koncentracije urana zabilježene su u Vladislavcima, Voćinu i Čačincima, dok su najviše vrijednosti arsena prisutne u Čepinu, Vladislavcima i Osijeku.

3. Povezanost s biološkim markerima: Urin se pokazao najosjetljivijim indikatorom izloženosti, posebno za arsen ($R^2 = 0.8$). Kosa najbolje odražava kumulativnu, dugotrajnu izloženost oba elementa. Serum pokazuje kratkotrajnu izloženost, s niskom do umjerenom korelacijom s koncentracijama u vodi. Analiza bioloških uzoraka je pokazala da su koncentracije arsena u urinu ispitanika povezane s koncentracijama arsena u vodi za piće, što potvrđuje da voda predstavlja važan put izloženosti stanovništva. Koncentracije arsena u kosi i serumu pokazale su veću varijabilnost, što je u skladu s različitim kinetičkim svojstvima tih bioloških matrica. Spolne i dobne razlike su također prisutne. Muškarci su pokazali nešto više koncentracije u kosi i urinu nego žene. Starije dobne skupine pokazuju veće akumulacije u kosi, dok serum i urin ne pokazuju sustavne dobne razlike. U nekim naseljima (Čepin, Vladislavci, Osijek) medijani i srednje vrijednosti premašuju referentne vrijednosti, a urinarne vrijednosti kod pojedinaca prelaze literaturne granične vrijednosti. Unatoč tome, trenutno stanovništvo nije izloženo akutno toksičnim razinama. Sve izmjerene vrijednosti urana u biološkim matricama su bile ispod granica za nefrotoksičnost i kemijsku toksičnost.

4. Analiza epidemioloških podataka o incidenciji karcinoma bubrega (C64) i mokraćnog mjehura (C67) pokazala je varijacije između pojedinih naselja. **U naseljima s povišenim koncentracijama arsena u vodi i biološkim uzorcima uočen je trend povećane incidencije karcinoma**

mokraćnog mjehura dok za karcinom bubrega takva povezanost nije bila jasno izražena.

5. Eksperimentalni dio istraživanja proveden na staničnoj liniji MDCK1 pokazao je da arsenov trioksid u koncentracijama usporedivima s okolišnim razinama ne uzrokuje značajnu citotoksičnost u MTT testu. Ovakav nalaz upućuje na mogućnost da kronična izloženost niskim koncentracijama arsena ne uzrokuje neposredno oštećenje bubrežnog epitela, ali može potaknuti suptilne promjene u staničnim signalnim putevima. Ispitivanje utjecaja arsenova trioksida na aktivnost acetilkolinesteraze pokazalo je da pri okolišno relevantnim koncentracijama nije zabilježena značajna inhibicija enzimske aktivnosti.

6. Istraživanje ima značajan geološki kontekst. Prostorne razlike u koncentracijama povezane su s lokalnom geološkom podlogom i hidrogeologijom. Uran se akumulira u područjima granitne mineralizacije, dok arsen dominira u aluvijalnim sedimentima bogatim glinom.

Dobiveni rezultati potvrđuju da arsen u vodi za piće predstavlja važan okolišni čimbenik izloženosti u pojedinim područjima istočne Hrvatske te da može biti povezan s povećanom učestalošću karcinoma mokraćnog mjehura. Uran je u ovom istraživanju pokazao znatno slabiju povezanost s biomonitorinškim i epidemiološkim pokazateljima. Rezultati ove disertacije doprinose boljem razumijevanju okolišne izloženosti arsenu i uranu u istočnoj Hrvatskoj te naglašavaju važnost kontinuiranog praćenja kvalitete vode za piće i daljnjih istraživanja. Potrebno je kontinuirano praćenje naselja s povišenim koncentracijama arsena, posebno Čepina i Vladislavaca. Urin i kosa ispitanika su najpouzdaniji biomarkeri za praćenje izloženosti uranu i arsenom u populaciji. Sveukupno, rezultati potvrđuju važnost kombiniranog pristupa: analiza pitke vode u kombinaciji s više bioloških matrica omogućava sveobuhvatnu procjenu izloženosti stanovništva, identifikaciju rizičnih područja i pruža temelj za preventivne mjere i javnozdravstvene smjernice.

8. LITERATURA

- 1.Podgorski J, Berg M. Global threat of arsenic in groundwater. *Science*. 2020;368(6493):845-50.
- 2.World Health Organization. Arsenic in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva: WHO; 2011.
- 3.International Agency for Research on Cancer (IARC). Arsenic and arsenic compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: IARC; 2012.
- 4.World Health Organization. Uranium in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva: WHO; 2012.
- 5.Magdo HS, Forman J, Graber N, Newman B, Klein K, Satlin L, *i sur*. Grand Rounds: Nephrotoxicity in a young child exposed to uranium from contaminated well water. *Environ Health Perspect*. 2007;115(8):1237–1241.
- 6.Uthus EO. Evidence for arsenic essentiality. *Environ Geochem Health*. 1992;14(2):55–58.
- 7.Ćavar S, Klapac T, Jurišić Grubešić R, Valek M. High exposure to arsenic from drinking water at several localities in eastern Croatia. *Sci Total Environ*. 2005;339(1–3):277–282.
- 8.Habuda-Stanić M, Kuleš M, Kalajdžić B, Romić Ž. Quality of groundwater in eastern Croatia: the problem of arsenic pollution. *Desalination*. 2007;210(1–3):157–162.
- 9.Braun K, Dravec J, Slovic V, Crnogaj S, Valković V, Makjanić J. Pojava mineralizacije urana na Papuku i Krndiji. *Geološki vjesnik*. 1983;36:111–115.
- 10.Venus M, Puntarić D, Gvozdić V, Vidosavljević D, Bijelić L, Puntarić A *i sur*. Determination of uranium concentrations in soil, water, vegetables and biological samples from inhabitants of war affected areas in eastern Croatia (ICP-MS method). *J Environ Rad*. 2019; 203:147–153.
- 11.Vicente-Vicente L, Quiros Y, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa JM, López-Hernández FJ, Morales AI. Nephrotoxicity of uranium: pathophysiological, diagnostic and therapeutic perspectives. *Toxicol Sci*. 2010;118(2):324–347.

12. Rahaman MS, Rahman MM, Mise N, Sikder MT, Ichihara G, Uddin MK i sur. Environmental arsenic exposure and its contribution to human diseases, toxicity mechanism and management. *Environ Pollut*. 2021;289:117940.
13. Chen QY, Costa M. Arsenic: a global environmental challenge. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2021;61:47–63.
14. Abdul KS, Jayasinghe SS, Chandana EP, Jayasumana C, De Silva PMCS. Arsenic and human health effects: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;40(3):828–846.
15. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Arsenic. Atlanta (GA): ATSDR; 2005.
16. Waalkes MP. Arsenic and metals. In: Baan RA, Stewart BW, Straif K, editors. Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2019.
17. Ahuja S. Arsenic Contamination of Groundwater: Mechanism, Analysis, and Remediation. Hoboken (NJ): Wiley; 2008.
18. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L. Handbook on the Toxicology of Metals. 3rd ed. New York: Academic Press; 2010.
19. Ujević M, Duić Ž, Casiot C, Sipos L, Santo V, Halamić J. Occurrence and geochemistry of arsenic in the groundwater of Eastern Croatia. *Appl Geochem*. 2010;25:1017–1029.
20. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće. *Narodne novine*. 56/2013.
21. Ma M, Wang R, Xu L, Xu M, Liu S. Emerging health risks and underlying toxicological mechanisms of uranium contamination: lessons from the past two decades. *Environ Int*. 2020;145:106107.
22. Bjørklund G, Christophersen OA, Chirumbolo S, Selinus O, Aaseth J. Recent aspects of uranium toxicology in medical geology. *Environ Res*. 2017;156:526–533.
23. Domingo JL, Llobet JM, Tomás JM, Corbella J. Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1987;39:168–174.

- 24.Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, Saha H, Pekkanen J, Mäkeläinen I i sur. Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect.* 2002;110(4):337–342.
- 25.Squibb KS, McDiarmid MA. Depleted uranium exposure and health effects in Gulf War veterans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1468):639–648.
- 26.Tirmarche M, Baysson H, Telle-Lamberton M. Exposition à l'uranium et risque de cancer: une revue des études épidémiologiques. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 2004;52(1):81–90.
- 27.Bjørklund G, Semenova Y, Pivina L, Dadar M, Rahman MM, Chirumbolo S i sur. Uranium in drinking water: a public health threat. *Arch Toxicol.* 2020;94:1551–1560.
- 28.Schuhmacher-Wolz U, Dieter HH, Klein D, Schneider K. Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of its carcinogenic and non-carcinogenic effects. *Crit Rev Toxicol.* 2009;39(4):271–298.
- 29.Dauphiné DC, Smith AH, Yuan Y, Balmes JR, Bates MN, Steinmaus C. Case-control study of arsenic in drinking water and lung cancer in California and Nevada. *Int J Environ Res Public Health.* 2013 Aug 2;10(8):3310-24.
- 30.Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C i sur. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Lyon: IARC; 2012.
- 31.Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M i sur. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X. Lyon: IARC; 2013.
- 32.Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7–30.
- 33.Scélo G, Larose TL. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(36):356–365.
- 34.Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(1):12-49.
- 35.Tokar EJ, Person RJ, Sun Y, Perantoni AO, Waalkes MP. Chronic exposure of renal stem cells to inorganic arsenic induces a cancer phenotype. *Chem Res Toxicol.* 2013;26(1):96–105.

- 36.Tsai TL, Kuo CC, Hsu LI, Tsai SF, Chiou HY, Chen CJ, Hsu KH, Wang SL. Association between arsenic exposure, DNA damage, and urological cancers incidence. *Chemosphere*. 2021;266:129094.
- 37.Yamamoto T, Gi M, Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Kakehashi A, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. DNA methylation aberrations in dimethylarsinic acid-induced bladder carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2023;15(21):5274.
- 38.Rose TL, Kim WY. Renal cell carcinoma: a review. *JAMA*. 2024;332(12):1001–1010.
- 39.Pandey J, Syed W. Renal cancer. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
- 40.Motzer RJ, Jonasch E, Agarwal N, Beard C, Bhayani S, Bolger GB, Chang SS, Choueiri TK, Costello BA *i sur*. Kidney cancer, version 3.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015;13(2):151–159.
- 41.Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview. *Eur Urol*. 2017;71(1):96–108.
- 42.Gill E, Perks CM. Current bladder cancer treatment—the need for improvement. *Int J Mol Sci*. 2024;25:1557.
- 43.Mink PJ, Alexander DD, Barraj LM, Kelsh MA, Tsuji JS. Low-level arsenic exposure in drinking water and bladder cancer: a review and meta-analysis. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008;52(3):299–310.
- 44.Rambau PF, Chalya PL, Jackson K. Schistosomiasis and urinary bladder cancer in north-western Tanzania. *Infect Agent Cancer*. 2013;8:19.
- 45.Chen CJ, Wang CJ. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res*. 1990;50:5470–5474.
- 46.Lynch HN, Zu K, Kennedy EM, Lam T, Liu X, Pizzurro DM *i sur*. Quantitative assessment of lung and bladder cancer risk and oral exposure to inorganic arsenic. *Environ Int*. 2017;106:178–206.

47. Medda N, De SK, Maiti S. Different mechanisms of arsenic-related signaling in cellular proliferation and neoplastic transformation. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;208:111752.
48. Wadgaonkar P, Chen F. Connections between endoplasmic reticulum stress and arsenic-induced carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2021;76:258–266.
49. Zhou Q, Jin P, Liu J, Li S, Liu W, Xi S. Arsenic-induced HER2 promotes bladder epithelial cell proliferation and angiogenesis. *Sci Total Environ.* 2021;753:141962.
50. Dy GW, Gore JL, Forouzanfar MH, Naghavi M, Fitzmaurice C. Global burden of urologic cancers, 1990–2013. *Eur Urol.* 2017;71(3):437–446.
51. European Collection of Authenticated Cell Cultures. MDCK I cell line description [Internet]. Dostupno na: <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/mdck-i> [Pristupljeno 17. ožujka 2025.].
52. Rothen-Rutishauser B, Krämer SD, Braun A, Günthert M, Wunderli-Allenspach H. MDCK cell cultures as an epithelial in vitro model: cytoskeleton and tight junctions as indicators for the definition of age-related stages by confocal microscopy. *Pharm Res.* 1998 Jul;15(7):964-71
53. Arthur JM. The MDCK cell line is made up of populations of cells with diverse resistive and transport properties. *Tissue Cell.* 2000;32(5):446-50.
54. Zongyuan Li, Fengyuan Piao, Shuang Liu, Yan Wang, Shuxian Qu. Subchronic exposure to arsenic trioxide-induced oxidative DNA damage in kidney tissue of mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*; 2010; 62, 2010, 543-547.
55. Cornejo M, Mieres-Castro D, Blanco EH, Beltrán AR, Araya JE, Fuentes G, et al. Arsenic trioxide-increased MDCK cells proliferation requires activator protein 1-mediated increase of the sodium/proton exchanger 1 activity. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021 1;1867(1):165977.
56. Elmustafa M, Wallace H, Mohamed E. Cytotoxicity and mode of cell death of Dimethylarsinothionic acid (DMAS) in MDCK canine cocker spaniel kidney cells. *Gezira Journal of Health Sciences*, 2020; 1-16.

57. Nurchi VM, Djordjevic AB, Crisponi G, Alexander J, Bjørklund G, Aaseth J. Arsenic Toxicity: Molecular Targets and Therapeutic Agents. *Biomolecules*. 2020;4; 10:235.
58. Sharma A, Kshetrimayum C, Sadhu HG, Kumar S. Arsenic-induced oxidative stress, cholinesterase activity in the brain of Swiss albino mice, and its amelioration by antioxidants Vitamin E and Coenzyme Q10. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018;25(24):23946-23953.
59. Zhu X, Larsen NA, Basran A, Bruce NC, Wilson IA. Observation of an arsenic adduct in an acetyl esterase crystal structure. *J Biol Chem*. 2003;278(3):2008-14.
60. Chandravanshi LP, Yadav RS, Shukla RK, Singh A, Sultana S, Pant AB *i sur*. Reversibility of changes in brain cholinergic receptors and acetylcholinesterase activity in rats following early life arsenic exposure. *Int J Dev Neurosci*. 2014;34:60-75.
61. Dutta A, Phukan BC, Roy R, Bhattacharya P, Kumar D, Borah A. Arsenic Exposure Induces Cognitive Impairment in Mice with Increased Acetylcholinesterase Activity and Inflammation in the Cortex and Hippocampus: Implications for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2025;22(10):745-756.
62. Thakur M, Rachamalla M, Niyogi S, Datusalia AK, Flora SJS. Molecular Mechanism of Arsenic-Induced Neurotoxicity including Neuronal Dysfunctions. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, 10077.
63. Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro investigations. *Arch Toxicol*. 2012;86(3):525–538
64. Aggarwal M, Naraharisetti SB, Sarkar SN, Rao GS, Degen GH, Malik JK. Effects of subchronic coexposure to arsenic and endosulfan on the erythrocytes of broiler chickens: a biochemical study. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2009;56(1):139-48.
65. Patlolla AK, Tchounwou PB. Serum Acetyl Cholinesterase as a Biomarker of Arsenic Induced Neurotoxicity in Sprague-Dawley Rats. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2005, 2, 80-83.
66. Papić P, Ćuk M, Todorović M, Stojković J, Hajdin B, Atanacković N, Polomčić D. Arsenic in tap water of the South Pannonian Basin. *Pol J Environ Stud*. 2012;21:1783–1790.

67. Ujević Bošnjak M, Casiot C, Duić Ž, Fazinić S, Halamić J, Šipoš L. Sediment characterization and its implications for arsenic mobilization in deep aquifers of eastern Croatia. *J Geochem Explor.* 2013;126–127:55–66.
68. Jurković I. Metalogenija južne Tisije – Moslavačka gora, Psunj, Papuk, Krndija. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik.* 2007;15(1):1–17.
69. Ćurković M, Sipos L, Puntarić D, Dodig-Ćurković K, Pivac N, Kralik K. Detection of thallium and uranium in well water and biological specimens of an Eastern Croatian population. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2013;64(3):385–393.
70. Vitale K, Marijanović Rajčić M, Senta A. Waters in Croatia between practice and needs: a public health challenge. *Croat Med J.* 2002;43:485–492.
71. Republika Hrvatska. Državni zavod za statistiku. Popis stanovništva 2011. Zagreb: Državni zavod za statistiku; 2011.
72. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 1983;65:55–63.
73. Florea AM, Büsselberg D. Arsenic toxicity: cellular mechanisms and health implications. *Hum Exp Toxicol*, 2011; 30(11): 952–963.
74. Upreti RK, Kannan A, Pant AB. Experimental exposure of arsenic in cultured rat intestinal epithelial cells and cell line: toxicological consequences. *Toxicol In Vitro.* 2007;21(1):32–40.
75. Dukes JD, Whitley P, Chalmers AD. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol.* 2011;7:12:43.
76. Jolliffe, IT. Principal Component Analysis (2nd ed.). Springer, New York; 2002.
77. Johnson RA, Wichern DW. Applied Multivariate Statistical Analysis (6th ed.). Pearson Prentice Hall. 2007; London, UK.
78. Hair JF, Black WC, Babin BJ, Anderson RE. Multivariate Data Analysis (7th ed.). Pearson Education Limited, 2013; London, UK.
79. Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, De Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Amsterdam: Elsevier; 1997.

80. Ujević Bošnjak M, Capak K, Jazbec A, Casiot C, Sipos L, Poljak V i sur. Hydrochemical characterization of arsenic contaminated alluvial aquifers in Eastern Croatia using multivariate statistical techniques and arsenic risk assessment. *Sci Total Environ.* 2012;420:100-10. 22326140.
81. Vidosavljević M, Puntarić D, Gvozdić V, Vidosavljević D, Jurić D, Begović L. Assessment of Arsenic in Hair of the Inhabitants of East Croatia- Relationship to Arsenic Concentrations in Drinking Water. *Water.* 2022;14:1558.
82. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske. Izvješće o kvaliteti vode za ljudsku potrošnju. Zagreb: Ministarstvo zdravstva; 2019. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske. Izvješće o kvaliteti vode za ljudsku potrošnju. Zagreb; 2019.
83. Capak K. Izloženost arsenu u vodi za piće i njegov utjecaj na zdravlje. Doktorski rad. Medicinski fakultet, Rijeka; 2012.
84. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 4. izd. Geneva: WHO; 2017.
85. United States Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Regulations. *Fed Regist.* 2000;65:76708-53.
86. Bundesministerium für Gesundheit. Ordinance on the quality of water intended for human consumption (Trinkwasserverordnung – TrinkwV 2001). Berlin: Bundesministerium für Gesundheit; 2016.
87. Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM, Meyerhof DP, Moss MA. Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci.* 1998 ;43(1):68-77.
88. Kurttio P, Komulainen H, Hakala E, Kahelin H, Pekkanen J. Urinary excretion of arsenic species after exposure to arsenic present in drinking water. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1998; 34(3):297-305.

- 89.Kurttio P, Komulainen H, Leino A, Salonen L, Auvinen A, Saha H. Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect.* 2005 ; 113(1):68-72.
- 90.Konietzka R, Dieter HH. Uranium and drinking water. *StrahlenschutzPraxis (Koeln)*. 2014.;20(1): 15–18.
- 91.Nilkarnjanakul W, Watchalayann P, Chotpantararat S. Urinary arsenic and health risk of the residents association in contaminated-groundwater area of the urbanized coastal aquifer, Thailand. *Chemosphere.* 2023 Feb;313:137313.
- 92.Caldwell KL, Jones RL, Verdon CP, Jarrett JM, Caudill SP, Osterloh JD. Levels of urinary total and speciated arsenic in the US population: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2009;19(1):59-68.
- 93.Rodushkin I, Odman F. Application of inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for elemental analysis of urine. *J Trace Elem Med Biol.* 2001;14(4):241-7.
- 94.Orloff K, Mistry K, Metcalf S. Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2009;12(7):509-24.
- 95.Chen X, Liu S, Shi M, Luo Y. Arsenic levels in the hair of people exposed to arsenic and awareness of its risk factors. *Environ Geochem Health.* 2025; 21;47(10):450.
- 96.Gault AG, Rowland HA, Charnock JM, Wogelius RA, Gomez-Morilla I, Vong S i sur. Arsenic in hair and nails of individuals exposed to arsenic-rich groundwaters in Kandal province, Cambodia. *Sci Total Environ.* 2008;1,393(1):168-76.
- 97.Rodushkin I, Axelsson M. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden. *Sci Tot Environ.* 2000, 262. 21-36.
- 98.Ellingsen DG, Weinbruch S, Sallsten G, Berlinger B, Barregard L. The variability of arsenic in blood and urine of humans. *J Trace Elem Med Biol.* 2023;78:127179.
- 99.Iyer S, Sengupta C, Velumani A. Blood arsenic: Pan-India prevalence. *Clin Chim Acta.* 2016,1;455:99-101.

100. Rodushkin I., Odman F., Branth S. Multielement analysis of whole blood by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999; 364(4): 338-346.
101. Byrne AR, Benedik L. Uranium content of blood, urine and hair of exposed and non-exposed persons determined by radiochemical neutron activation analysis, with emphasis on quality control. *Sci Total Environ.* 1991 Sep;107:143-57.
102. Joksić AŠ, Katz SA. Efficacy of hair analysis for monitoring exposure to uranium: a mini-review. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2014;49(13):1578-87.
103. Kurttio P, Pukkala E, Kahelin H, Auvinen A, Pekkanen J. Arsenic concentrations in well water and risk of bladder and kidney cancer in Finland. *Environ Health Perspect.* 1999;107(9):705-10.
104. Arzuaga X, Rieth SH, Bathija A, Cooper GS. Renal effects of exposure to natural and depleted uranium: a review of the epidemiologic and experimental data. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2010;13(7-8):527-45.
105. Jones AD, Miller BG, Walker S, Anderson J, Colvin AP, Hutchison PA i sur. A normative value pilot study: levels of uranium in urine samples from UK civilians. *Environ Res.* 2007;104(2):216-23.
106. Hughes MF. Biomarkers of exposure: a case study with inorganic arsenic. *Environ Health Perspect.* 2006;114(11):1790-1796.
107. Brima EI, Haris PI, Jenkins RO, Polya DA, Gault AG, Harrington CF. Understanding arsenic metabolism through a comparative study of arsenic levels in the urine, hair and fingernails of healthy volunteers from three unexposed ethnic groups in the United Kingdom. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;1;216(1):122-30.
108. Zupunski L, Street R, Ostroumova E, Winde F, Sachs S, Geipel G i sur. Environmental exposure to uranium in a population living in close proximity to gold mine tailings in South Africa. *J Trace Elem Med Biol.* 2023;77:127141.
109. Chiou HY, Chiou ST, Hsu YH, Chou YL, Tseng CH, Wei ML i sur. Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. *Am J Epidemiol.* 2001;1;153(5):411-8.

- 110.Saint-Jacques N, Parker L, Brown P, Dummer TJ. Arsenic in drinking water and urinary tract cancers: a systematic review of 30 years of epidemiological evidence. *Environ Health*. 2014;13:44.
- 111.Smith AH, Goycolea M, Haque R, Biggs ML. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of northern Chile due to arsenic in drinking water. *Am J Epidemiol*. 1998;147:660-669.
- 112.Naujokas MF, Anderson B, Ahsan H, Aposhian HV, Graziano JH, Thompson C i sur. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ Health Perspect*. 2013;121(3):295-302.
- 113.Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12(10):1161-208.
- 114.Prat O, Vercouter T, Ansoborlo E, Fichet P, Perret P, Kurttio P i sur. Uranium speciation in drinking water from drilled wells in southern Finland and its potential links to health effects. *Environ Sci Technol*. 2009;15;43(10):3941-6.
115. De Castro L, Manoury A, Claude O, Simoneau B, Monceau V, Suhard D i sur. Renal toxicity and biokinetics models after repeated uranium instillation. *Sci Rep*. 2023 13;13(1):4111.
- 116.Zamora ML, Zielinski JM, Moodie GB, Falcomer RA, Hunt WC, Capello K. Uranium in drinking water: renal effects of long-term ingestion by an aboriginal community. *Arch Environ Occup Health*. 2009;64(4):228-41.
- 117.Chandravanshi LP, Gupta R, Shukla RK. Arsenic-Induced Neurotoxicity by Dysfunctioning Cholinergic and Dopaminergic System in Brain of Developing Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2019 ;189(1):118-133.
- 118.Anderson WA, Domingo-Relloso A, Galvez-Fernandez M, Schilling K, Glabonjat RA, Basu A, i sur.. Uranium exposure and kidney tubule biomarkers in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Environ Res*. 2025, 15;271:121060.
- 119.Mochizuki H. Arsenic Neurotoxicity in Humans. *Int J Mol Sci*. 2019;20(14):3418.
- 120.Ali N, Hoque MA, Haque A, Salam KA, Karim MR, Rahman A i sur. Association between arsenic exposure and plasma cholinesterase activity: a population based study in Bangladesh. *Environ Health*. 2010,10;9:36.

121. Kobayashi H, Yuyama A, Ishihara M. Effects of arsenic on cholinergic parameters in brain in vitro. *Neuropharmacology*. 1987; 26,1707–1713

Ocjena rada
u tileku!

9. SAŽETAK

Arsen i uran prirodno su prisutni u okolišu, a dugotrajna izloženost putem vode za piće predstavlja važan javnozdravstveni problem u mnogim dijelovima svijeta, uključujući i područje istočne Hrvatske. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost koncentracija arsena i urana u vodi za piće s njihovim koncentracijama u biološkim uzorcima stanovništva te s pojavnosti karcinoma bubrega (C64) i mokraćnog mjehura (C67) u naseljima istočne Hrvatske.

U istraživanje je uključeno 492 ispitanika iz osam naselja Osječko-baranjske, Virovitičko-podravske i Požeško-slavonske županije. Analiziran je 81 uzorak vode za piće te uzorci urina, seruma i kose ispitanika. Koncentracije arsena i urana određene su metodom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS). Epidemiološki podaci o incidenciji karcinoma bubrega i mokraćnog mjehura prikupljeni su iz Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za razdoblje 2000.–2018.

Rezultati su pokazali značajne razlike u koncentracijama arsena u vodi za piće između pojedinih naselja, pri čemu su najviše vrijednosti zabilježene u naselju Čepin. Koncentracije arsena u urinu ispitanika bile su povezane s koncentracijama u vodi za piće, što potvrđuje važnost ovog puta izloženosti. Analiza incidencije malignih bolesti pokazala je trend povećane učestalosti karcinoma mokraćnog mjehura u područjima s povišenim koncentracijama arsena.

Eksperimentalni dio istraživanja proveden na staničnoj liniji MDCK1 pokazao je da arsenov trioksid u koncentracijama od 10 do 200 µg/L ne uzrokuje značajnu citotoksičnost u MTT testu. Također nije zabilježena značajna inhibicija aktivnosti acetilkolinesteraze.

Rezultati istraživanja ukazuju na važnost kontinuiranog praćenja koncentracija arsena u vodi za piće te na potrebu daljnjih epidemioloških i eksperimentalnih istraživanja kako bi se bolje razumjeli dugoročni zdravstveni učinci kronične izloženosti.

Ključne riječi: arsen; uran; voda za piće; biomonitoring; urin; kosa; karcinom mokraćnog mjehura; istočna Hrvatska; okolišna izloženost.

10. SUMMARY

Arsenic and uranium are naturally occurring elements in the environment, and long-term exposure through drinking water represents an important public health concern in many parts of the world, including east Croatia. The aim of this study was to investigate the relationship between arsenic and uranium concentrations in drinking water, their levels in biological samples of the population, and the incidence of kidney cancer (C64) and bladder cancer (C67) in selected settlements of eastern Croatia.

The study included 492 participants from eight settlements located in Osijek-Baranja, Virovitica-Podravina and Požega-Slavonia counties. A total of 81 drinking water samples were analyzed together with urine, serum and hair samples obtained from the participants. Arsenic and uranium concentrations were determined using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Epidemiological data on kidney and bladder cancer incidence were obtained from the Croatian National Cancer Registry for the period 2000–2018.

The results revealed substantial differences in arsenic concentrations in drinking water among the studied settlements. The highest concentrations were recorded in Čepin, where levels frequently exceeded the recommended guideline value for drinking water. Arsenic concentrations in urine were associated with arsenic levels in drinking water, confirming drinking water as an important exposure pathway.

Epidemiological analysis indicated a trend toward increased bladder cancer incidence in settlements with higher arsenic concentrations in drinking water. In contrast, the association between arsenic exposure and kidney cancer incidence was less consistent.

In vitro experiments using the MDCK1 renal epithelial cell line demonstrated that arsenic trioxide at concentrations between 10 and 200 µg/L did not induce significant cytotoxic effects in the MTT assay. No significant inhibition of acetylcholinesterase activity was observed at environmentally relevant concentrations.

The findings of this study highlight the importance of continuous monitoring of arsenic concentrations in drinking water and the need for further epidemiological and experimental studies to better understand the long-term health effects of chronic exposure to arsenic and uranium.

Key words: arsenic; uranium; drinking water; biomonitoring; urine; hair; bladder cancer; eastern Croatia; environmental exposure

11. PRILOZI-UPITNIK

Anketni upitnik

Liječnik obiteljske medicine:

1. SPOL: M Ž

2. DOB (godine):

3. PUŠAČ:

a) DA (izrazit preko 20 cigareta dnevno)

b) DA (umjeren do 20 cigareta dnevno)

c) NE

4. KONZUMIRATE ALKOHOLNA PIĆA:

a) NE uopće

b) DA umjeren (manje od 5 čaša/časića tjedno)

c) DA (više od 5 čaša/časića tjedno)

5. KONZUMIRATE VODU:

a) Iz javnog vodovodnog sustava (gradski vodovod)

b) Iz lokalnog vodovodnog sustava (mali «seoski» vodovod)

c) Iz bunara (vlastitog ili zajedničkog za više obitelji)

d) Ostalo (kupovna voda,...)

6. DA LI STE BORAVILI (duže od godinu dana) ILI BORAVITE U BLIZINI:

a) U blizini industrijskih pogona

b) U blizini industrijskih pogona metalne industrije

c) Odlagališta otpada

d) Velikih prometnica sa gustim prometom vozila na fosilna goriva

e) Benzinskih postaja (crpki)

f) Ostalo: _____

e) Ne

7. DA LI STE U PROFESIONALNOM ŽIVOTU, PREMA VAŠIM SAZNANJIMA
ZNAČAJNO IZLOŽENI ŠTETNIM TVARIMA I KOJIM:

- a) Štetnim metalima (živa, olovo, kadmij, arsen...)
- b) Pesticidima i sličnim tvarima (polikloriranim bifenilima, dioksinima...)
- c) Fosilnim gorivima ili njihovim ispušnim plinovima
- d) Ostalo: _____
- e) Ne

8. DA LI OSJEĆATE SMETNJE ILI SE LIJEČITE OD POSLJEDICA IZLOŽENOSTI
ŠTETNIM TVARIMA:

- a) DA
- b) NE
- c) Ako želite napišite dodatno pojašnjenje:

9. SKUPINE ISPITANIKA:

1. Branitelji, ranjeni ili koji su bili u višestrukom (dugotrajnom, redovitom) kontaktu s pješađijsko-eksplozivnim sredstvima (pješađijsko streljivo, minsko-eksplozivne naprave, topničko-tenkovski projektili i sl.)
2. Branitelji koji nisu bili u kontaktu s pješađijsko-eksplozivnim sredstvima (npr. sanitet, kuhari, vozači, opskrba intendantskim sredstvima i materijalima itd.)
3. Civili ranjeni pješađijsko-eksplozivnim sredstvima; civili koji su tijekom rata bili u višestrukom kontaktu s istim sredstvima; ostali civili iz područja koja su bila zahvaćena neposrednim ratnim zbivanjima.
4. Civili iz područja koja su bila nezahvaćena neposrednim ratnim zbivanjima.
5. Civili koji su 1991.–1995. imali 2 do 14 godina iz područja koja su bila zahvaćena neposrednim ratnim zbivanjima.
6. Civili koji su 1991.–1995. imali 2 do 14 godina iz područja koja su bila nezahvaćena neposrednim ratnim zbivanjima.

10. KAO VOJNIK BILI STE:

- a) Pješaštvo

- b) Topništvo
- c) Oklopno mehanizirane postrojbe
- d) Inženjerija
- e) Veza
- f) ABKO (atomska-biološka-kemijska obrana)
- g) Postrojbe za elektronsko djelovanje
- h) Zrakoplovstvo
- i) Mornarica
- j) ZMIO (zemaljsko motrenje i osmatranje)
- k) Održavanje elektronske opreme
- l) Održavanje mehaničke i električne opreme
- m) Opskba
- n) Zdravstveni i veterinarski poslovi
- o) Administrativni poslovi
- p) Ostalo: _____

11. JESTE LI TIJEKOM RATA BILI RANJENI?:

- a) DA
- b) NE

12. BILI STE RANJENI:

- a) Eksplozivnom napravom topničko-tenkovskog tipa (granata,...)
- b) Pješadijskim streljivom (pištolj, mitraljez, puška, snajper,...)
- c) Ručna bomba
- d) Nagazna mina
- e) Ostalo: _____

13. TIJEKOM RATA BORAVILI STE:

- a) U Istočnoj Hrvatskoj na područjima zahvaćenim ratnim djelovanjima
- b) Uz granicu sa Srbijom (ili u Srbiji) gdje je bilo ratnih djelovanja
- c) Uz granicu sa BiH (ili u BiH) gdje je bilo ratnih djelovanja
- d) NE nisam boravio na područjima zahvaćenim ratom
- e) ostalo _____

14. Bojite li kosu : a.) NE

b.) DA (_____ -u koju boju ?)

15. Imate li amalgamske („srebrne“) plombe u zubima : a.) NE

b.) DA _____ (upisati broj)

16. POPIS RELEVANTNIH DIJAGNOZA IZ LIJEČNIČKOG KARTONA U POSLJEDNJIH 10 GODINA:

12. ŽIVOTOPIS

Marina Vidosavljević (dj. Marin) rođena 1974. godine u Vinkovcima, osnovnu školu i gimnaziju sam završila u Vinkovcima, Medicinski fakultet u Zagrebu. Specijalistički ispit iz interne medicine sam položila na Klinici za unutarnje bolesti KB Dubrava 2006. godine, ispit iz uže specijalizacije kardiologije na KBC „Sestre Milosrdnice,, u Zagrebu 2016. godine a zaposlena sam na radnom mjestu interniste -kardiologa u Domu zdravlja Osijek.

U akademskoj godini 2010./2011. sam odslušala i položila ispite na specijalističkom poslijediplomskom studiju „Hitna i intenzivna medicina“ na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Aktivno sam sudjelovala na Projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske „Istraživanje dugotrajnih posljedica ratnih zbivanja na zdravlje stanovništva“ (broj projekta: 219-1080315-0288), voditelja prof.dr.sc. Dinko Puntarić, prim.dr.med.

U svojstvu autora ili koautora sam objavila 15 znanstvenih radova indeksiranih u bazama WOS /SCOPUS, te 11 kongresnih radova ili sažetaka u zbornicima radova. Udana, majka Maše i Marina.

Popis objavljenih radova:

- 1.Vidosavljević D, Puntarić D, Gvozdić V, Jergović M, Jurčev-Savičević A, Puntarić I, Puntarić E, Vidosavljević M. Trace metals in the environment and population as possible long term consequence of war in Osijek-Baranja County, Croatia. Coll Antropol. 2014;38(3):925-932.
- 2.Gvozdić V, Brana J, Orešković K, Puntarić D, Vidosavljević D, Jergović M, Puntarić I, Puntarić E, Vidosavljević M, Muller A. Analysis and assessment of available water sources in eastern Croatia. Rev Roum Chim. 2015;60(10):935-941.
- 3.Orkić Ž, Puntarić D, Vidosavljević D, Puntarić I, Puntarić E, Gvozdić V, Mayer D, Vidosavljević M, Muller Vranješ A. Climatic factors and epidemiologic characteristics of head and neck skin malignancies in Osijek-Baranya County, Croatia. Cent Eur J Public Health. 2015;23(4):275-285. doi:10.21101/cejph.a4075.
- 4.Jurić D, Puntarić D, Gvozdić V, Vidosavljević D, Lončarić Z, Puntarić A, Puntarić E, Puntarić I, Šijanović S, Vidosavljević M. Kupus (Brassica oleracea var. capitata) jedan od mogućih pokazatelja ratom uzrokovanih onečišćenja okoliša u istočnoj Hrvatskoj. Med Jadertina. 2017;47(1):39-48.
- 5.Jurić D, Puntarić D, Gvozdić V, Vidosavljević D, Lončarić Z, Puntarić A, i sur. Cabbage (Brassica oleracea var. capitata) as possible indicator of wartime metal and metalloid

- contamination in Eastern Croatia (ICP-MS method). *Acta Agric Scand B Soil Plant Sci*. 2017;67(3):270-277. doi:10.1080/09064710.2016.1259651.
6. Bijelić L, Puntarić D, Gvozdić V, Vidosavljević D, Lončarić Z, Puntarić A, Puntarić E, Puntarić I, Šijanović S, Vidosavljević M. Maslačak (*Taraxacum officinale*) kao mogući pokazatelj ratnih onečišćenja u istočnoj Hrvatskoj. *Acta Med Croatica*. 2017;71(1):25-32.
7. Bijelić L, Puntarić D, Gvozdić V, Vidosavljević D, Jurić D, Lončarić Z, i sur. Presence of war-related elements in dandelion (*Taraxacum officinale*) as a possible consequence of military activities in Croatia. *Acta Agric Scand B Soil Plant Sci*. 2018;68(3):264-272. doi:10.1080/09064710.2017.1394485.
8. Venus M, Puntarić D, Gvozdić V, Vidosavljević D, Bijelić L, Puntarić A, Puntarić E, Vidosavljević M, Jergović M, Šabarić J. Determination of uranium concentrations in soil, water, vegetables and biological samples from inhabitants of war-affected areas in eastern Croatia (ICP-MS method). *J Environ Radioact*. 2019;203:147-153.
9. Venus M, Puntarić D, Gvozdić V, Vidosavljević D, Bijelić L, Puntarić A, Puntarić E, Špehar M, Venus T, Vidosavljević M. Koncentracija urana u tlu, vodi, povrću i biološkim uzorcima stanovnika pogođenih ratom u istočnoj Hrvatskoj. *Med Jadertina*. 2019;49(1):15-24.
10. Vidosavljević M, Puntarić D, Gvozdić V, Vidosavljević D, Jurić D, Begović L. Assessment of arsenic in hair of the inhabitants of East Croatia: relationship to arsenic concentrations in drinking water. *Water*. 2022;14(10):1558. doi:10.3390/w14101558.
11. Vidosavljević M, Puntarić D, Gvozdić V, Vidosavljević D, Šijanović S, Šekerija M, Venus M, Jovičić M, Begović L. Arsenic in drinking water and urine and its relationship with malignant tumors of urinary tract in Osijek-Baranja County, Croatia. *Acta Clin Croat Suppl*. 2023;62(Suppl 2):95-103. doi:10.20471/acc.2023.62.s2.13.
12. Sušić L, Marčić L, Kralik K, Šahinović I, Sušić T, Vidosavljević M, Ćosić M. Prevalence of lower extremity arterial disease, correlation with diastolic dysfunction of the left ventricle and plasma concentration of asymmetric dimethylarginine in the general population aged 40-65 years: a cross-sectional study. *Cardiol Croat*. 2024;19:540. doi:10.15836/ccar2024.540.
13. Vidosavljević M, Dumančić D, Dumenčić B, Sušić L, Galić G, Vidosavljević D. Right atrial mass in a colon cancer patient. *Cardiol Croat*. 2024;19:566-567.

doi:10.15836/ccar2024.566.

14. Ćosić M, Vidosavljević M, Sušić L, Pavlović D, Galić G. The ankle-brachial index as a tool for detecting clinically significant atherosclerosis: a case report. *Cardiol Croat.* 2024;19:648. doi:10.15836/ccar2024.648.
15. Gvozdić V, Vidosavljević M, Venus M, Puntarić D, Užarević Z, Puntarić E, Begović M, Danolić D, Vidosavljević D. Analysis of selected elements in rivers and streams of Papuk Nature Park, Croatia. *Water.* 2025;17(6):902. doi:10.3390/w17060902.