Utjecaj duhanskoga dima na biokemijske promjene u cervikalnoj sluzi žena u reproduktivnoj dobi

Planinić Radoš, Gordana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:704983

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Gordana Planinić Radoš

Utjecaj duhanskoga dima na biokemijske promjene u cervikalnoj sluzi žena u reproduktivnoj dobi

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Gordana Planinić Radoš

Utjecaj duhanskoga dima na biokemijske promjene u cervikalnoj sluzi žena u reproduktivnoj dobi

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničke bolnice *Merkur*. Voditelj je rada izv. prof. dr. sc. Željko Duić, dr. med.

Velik broj ljudi zaslužan je za ovu disertaciju i svima njima zahvaljujem od srca! Velika hvala izv. prof dr. sc. Željku Duiću, dr.med. koji me je svojim znanjem, iskustvom i savjetima vodio i usmjeravao na putu mojega dosadašnjeg kliničkog i znanstvenog usavršavanja.

Posebno sam zahvalna svojim roditeljima Ratimiru i Marici, sestri Silvani i njezinoj obitelji te svojemu sinu Viti i suprugu Hrvoju na ljubavi i bezuvjetnoj potpori.

SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica
1. UVOD I SVRHA RADA 1
1.1. Cikličke promjene u sluznici maternice 1
1.1.1. Utjecaj spolnih hormona na ostale dijelove spolnoga trakta žena 2
1.1.2. Vrat maternice i cervikalna sluz 2
1.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva cervikalne sluzi 3
1.2.2. Utjecaj hormona na fizikalno-kemijska svojstva cervikalne sluzi 5
1.2.3. Funkcija cervikalne sluzi 7
1.3. Duhanski dim cigareta 10
1.3.1. Društveni aspekti pušenja 10
1.3.2. Kemijski sastav duhanskoga dima 11
1.3.3. Patofiziološko djelovanje duhanskoga dima cigareta 13
2. HIPOTEZA 19
3. CILJ RADA 20
4. ISPITANICE I METODE 21
4.1. Ispitanice 21
4.2. Biološki materijal i priprema uzoraka za ispitivanje 21
4.2.1. Određivanje proteina 23
4.2.2. Određivanje tiocijanata 23
4.2.3. Određivanje vitamina C 24
4.2.4. Određivanje citokroma P-450 25
4.2.5. Aktivnost enzima rodanaze 25
4.2.6. Aktivnost enzimskoga kompleksa citokrom-oksidaze 26
4.2.7. Lipidna peroksidacija 27
4.2.8. Ukupni antioksidacijski kapacitet cervikalne sluzi 27
4.2.9. Određivanje superoksida 28
4.2.10. Određivanje reduciranoga glutationa (GSH) 28
4.2.11. Određivanje ukupnoga antioksidacijskoga kapaciteta (FRAP) u uzorku 29
4.2.12. Određivanje dodatne oksidacije proteina (AOPP) 29
4.3. Statistička obrada podataka 30
5. REZULTATI 31

6. RASPRAVA 51
7. ZAKLJUČAK 79
8. KRATAK SADRŽAJ NA HRVATSKOME JEZIKU 82
9. KRATAK SADRŽAJ I NASLOV RADA NA ENGLESKOME JEZIKU 84
10. LITERATURA 86
11. KRATKA BIOGRAFIJA 97

Popis oznaka i pokrata:

FSH – hormon stimulacije folikula

LH – luteotropni hormon

GS – glavna struja dima

SS – sporedna struja dima

CO – ugljikov monoksid

HCN – cijanovodik

CN^- – cijanid

SCN – tiocijanat

Na_2CO_3 – natrijkarbonat

25. – 75. P. – od 25. do 75. percentila (engl. *25^{th}-75^{th} percentile*)

95 %-tni IP – 95 %-tni interval pouzdanosti (engl. *95% confidence interval*)

AOPP – dodatna oksidacija proteina (engl. *advanced oxidation protein products*)

F – vrijednost testa, univarijatna analiza varijance

FRAP – ukupni antioksidacijski kapacitet; redukcija iona željeza u plazmi (engl. *ferric reducing ability of plasma)*

GSH – reducirani glutation

GC – gvanin-citozin

AT – adenin-timin

NaCN – natrijev cijanid

KCN – kalijev cijanid

ATP – adenozin trifosfat

H – vrijednost Kruskal-Wallisova testa

P – statistička vjerojatnost (engl. *probability*)

SS – sporedna struja dima

$\bar{x}$ – aritmetička sredina

Z – vrijednost Mann-Whitneyjeva testa

1. UVOD I SVRHA RADA

Hormoni znatno utječu na razvoj i funkciju organskih sustava sisavaca. U njihovu djelovanju važnu ulogu ima interakcija hormona hipofize s hormonima perifernih endokrinih žlijezda. Između djelovanja hormona hipofize i spolnih hormona žene postoji visok stupanj interakcije. Djelovanjem hormona stimulacije folikula (FSH) i luteotropnoga hormona (LH) mijenjaju se koncentracije progesterona i estrogena u krvnoj plazmi žena (1 – 5). Te koncentracije utječu na cikličke promjene u strukturi i funkciji sluznice maternice svaka 24 – 28 dana tijekom reproduktivnoga razdoblja žene, oplodnje, implantacije embrija, fetalnoga razvoja i mehanizma porođaja (1, 2, 4, 6). Visoka koncentracija progesterona u krvi trudnih žena važna je za normalan tijek trudnoće. Istodobno je pad razine progesterona u krvnoj plazmi trudnice znak skoroga porođaja (1 – 7).

1.1. Cikličke promjene u sluznici maternice

Cikličke promjene u sluznici maternice žena reproduktivne dobi mogu se prikazati specifičnom krivuljom koju prate promjene funkcija drugih dijelova organizma.
U sluznici uterusa razlikujemo ove periodične promjene:

- fazu proliferacije
- fazu sekrecije
- fazu menstruacije
- fazu regeneracije.

U prvoj polovini mjesečnoga ciklusa sluznica endometrija zbog snažne sekrecije estrogena iz jajnika proliferira pod utjecajem hipofiznoga hormona stimulacije folikula (FSH). U jajnicima rastu folikuli, koji sadržavaju folikularnu tekućinu bogatu estrogenima. U toj fazi ciklusa sluznica uterusa zadeblja od početnoga 1 mm na strukturu debljine oko 4 mm (1, 2). Za to je razdoblje karakteristična nagla proliferacija sluznice maternice, čije žlijezde izlučuju veliku količinu sekreta. Razina estrogena u krvi žena raste do ovulacije jajne stanice, što se događa oko sredine ciklusa. U sljedećoj sekrecijskoj fazi veće izlučivanje progesterona pojačava proliferaciju i daljnju sekrecijsku aktivnost sluznice maternice, pa endometrij dodatno

zadeblja na strukturu debljine 5 – 6 mm (2, 8). Izlučeni sekret sadržava brojne hranjive tvari koje mogu osigurati osnovne energijske uvjete za implantaciju jajne stanice i rani razvoj zigote nekoliko dana poslije oplodnje.
Ako nije došlo do oplodnje u 7 – 8 dana nakon ovulacije, razgrađuje se žuto tijelo jajnika, koje izlučuje veliku količinu hormona progesterona (1, 2, 5). Posljedica je toga naglo propadanje stanica sluznice maternice u obliku menstruacije. Nakon toga započinje faza regeneracije, koja prelazi u fazu proliferacije praćenu novim pojačanim izlučivanjem estrogena (1, 2, 7).

1.1.1. Utjecaj spolnih hormona na ostale dijelove spolnoga trakta žena

Cikličke promjene jajnika i maternice prate promjene u nekim funkcijama ženskoga organizma. Najveće promjene nastaju u funkciji genitalnoga trakta. Estrogeni tako stimuliraju bujanje sluznice jajovoda i povećavaju proliferaciju epitelnih stanica s trepetljikama, što omogućuje brži i sigurniji prolazak jajne stanice nakon ovulacije do maternice (1, 5 – 8).

1.1.2. Vrat maternice i cervikalna sluz

Cerviks ili vrat maternice struktura je dugačka 2,5 – 3 cm smještena u gornjemu širem kraju rodnice. Ona je granični dio između gornjega i donjega dijela genitalnoga trakta žene (5, 9). Vrat maternice sastoji se od rodničkoga dijela, koji se proteže prema rodnici, i dijela koji se nalazi supravaginalno (4). Njihovom se duljinom proteže cervikalni kanal od vanjskoga ušća maternice pa sve do jajovoda (2, 4). Cervikalni kanal prekriven je jednoslojnim cilindričnim epitelom, koji na pojedinim mjestima stvara proširene tubularne žlijezde, čije je izlučivanje ovisno o aktivnosti i količini estrogena i progesterona. Te žlijezde imaju veliku površinu zbog niza sekundarnih kanalića (4, 5, 7). U cervikalnome kanalu najviše sluzi stvaraju sekrecijske stanice bez trepetljika (8, 10 – 13). Mjesečne cikličke promjene maternice prati promjena količine i gustoće cervikalne sluzi. U početku svakoga ciklusa povisuje se koncentracija estrogena, koja stimulira blago otvaranje cervikalnoga ušća. U tim uvjetima stanice cerviksa izlučuju sve obilniju prozirnu i elastičnu sluz (8 – 11, 14). Neposredno prije ovulacije cervikalno je ušće maksimalno

otvoreno, a sluz bistra, prozirna, obilna i velikoga obujma (8, 15). Poslije menstruacije, u fazi regeneracije sluznice endometrija, cervikalni se kanal zatvara, a sluz je oskudna, prozirna, bjelkasta i rastezljiva (8, 11 – 13, 15 – 27).
Za vrijeme trudnoće, vjerojatno zbog djelovanja visoke koncentracije progesterona iz žutoga tijela jajnika, cerviks je zatvoren. Na njegovu kraju prema rodnici nalazi se mala količina guste sluzi u obliku cervikalnoga čepa (4, 5, 14, 15).

1.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva cervikalne sluzi

Cervikalna sluz heterogena je smjesa sekretorno viskoznih tvari koje su dobro topljive u vodi, a najvećim dijelom nastaju izlučivanjem stanica cervikalnoga kanala (8, 14, 28). Ta je sluz prema sastavu složena smjesa glikoproteina, drugih makromolekula, vode, elektrolita, a katkad i nekih mikroorganizama. U sluzi se nalaze dijelovi raspadnutih stanica cervikalnoga kanala, što povećava količinu njezinih proteina i ostalih makromolekula. Dnevna sinteza i količina sekreta u cervikalnome kanalu varira do najviše 600 mg sredinom ovarijskoga ciklusa ili od 20 do 60 mg u ostalim fazama ciklusa. Tako se u lutealnoj fazi ciklusa i za vrijeme trudnoće stvara do 50 mg sluzi na dan (5, 8, 12, 18).
Cervikalna je sluz hidrogel koji se sastoji od različitih sastavnica. Njezin sastav uvelike ovisi o staničnome ciklusu izlučivanja vode, koji kontroliraju estrogeni hormoni jajnika (7, 8, 10 – 12, 18, 24, 37 – 33).
Kod cervikalne sluzi razlikujemo svojstva:

- viskoznosti
- elastičnosti
- plastičnosti
- stvaranja kristala
- stvaranja niti.

Viskoznost je sposobnost promjene strukture tvari koja dolazi do izražaja prolaskom te strukture kroz cijev ili otporom na rastezanje. Sluz iz vrata maternice male je viskoznosti jer sadržava veću količinu vode, elektrolita i topljivih proteina. Povećanje viskoznosti cervikalnoga sekreta ovisi o izlučivanju glikoproteina iz sekrecijskih stanica cervikalnoga kanala ili o obujmu izlučene vode (12, 18). Ukupna viskoznost

sluzi mijenja se tijekom menstruacijskoga ciklusa, a najmanja je u vrijeme ovulacije, čime je olakšan prolazak spermija cervikalnim kanalom do jajne stanice (12, 18, 20, 21, 25, 32, 34 – 37).

Elastičnost sluzi sposobnost je rastegnute sluzi da prestankom djelovanja vanjske sile ponovno dobije prvobitan oblik. To se svojstvo sluzi iz vrata maternice od početka ovulacije do kraja menstruacije postupno smanjuje sa 75 na 35 dina po cm površine (12, 20). Tako se taj sekret u vrijeme ovulacije zbog elastičnosti može razvući u niti dugačke od 10 do 20 cm (7, 12, 38, 39).

Plastičnost sluzi očituje se u njezinu specifičnom izgledu, koji je podložan unutarnjim promjenama o kojima malo znamo. Najslabije je izražena u vrijeme ovulacije jer vjerojatno ovisi o količini vode u tom sekretu (18, 20).

Sušenjem sluzi vrata maternice na staklenoj površini nastaju specifični kristali natrijeva klorida. Oni se stvaraju već u ranoj proliferativnoj fazi od 6. dana ciklusa i najbolje su oblikovani sredinom ciklusa, u vrijeme ovulacije jajne stanice (18, 20). Dobivanje tih kristala na mikroskopskome predmetnom staklu jednostavno je i brzo, a pouzdan je vizualni test za procjenu ovulacije i prisutnosti žutoga tijela ovarija (5, 12, 18, 20).

U sekretu vrata maternice nalaze se specifične nitaste strukture poznate pod nazivom *Spinnbarkeit* (12, 18, 20). Njihova brojnost i gustoća rastu od kraja menstruacije do sljedeće ovulacije jajne stanice, nakon čega se postupno smanjuju do sljedeće menstruacije. Postoji mišljenje da gustoća tih niti utječe na brzinu prolaska spermija u području cervikalnoga kanala (4, 5, 7, 12, 18, 20, 21, 26, 35).

Voda čini 95 % obujma cervikalne sluzi (12, 20, 40). U njoj su otopljeni proteini, elektroliti (1 %) i druge organske i anorganske molekule manje molekularne mase. Sluz iz vrata maternice, za razliku od ostalih sekreta u organizmu poput bronhalne sluzi, ne sadržava molekulu DNK-a i lipide (40). Od suhih tvari u sluzi ima najviše slobodnih aminokiselina (12 – 19 %). Najviše su zastupljene neutralne aminokiseline serin i treonin (26 – 32 %) te glutaminske kiseline (10 %), a najmanje biološki aktivna aminokiselina cistein (1 %) (7, 29, 41).

Taj sekret sadržava oko 1,5 % složenih makromolekula glikoproteina poznatih pod nazivom *mucini* ili *mukoproteini* (20, 40, 42). U njima su brojne molekule monosaharida kovalentno vezane s ostatcima aminokiselina različitih proteina (5, 7, 8, 10, 40, 43). Sadržavaju do 20 % proteinskih ostataka i 80 % monosaharida.

Mukoproteini iz sekreta kanala maternice sadržavaju pet vrsta monosaharida ili njihovih derivata kao što su: L-fukoza, D-galaktoza, N-acetil-D-galaktozamin, N-acetil-D-glukozamin i sijalična kiselina (8, 27, 31, 40). U sastavu sluzi prevladava galaktoza, čija se količina kreće od 27 % u sredini ovarijskoga ciklusa do 30 % u poslijeovulacijskoj fazi (40).

U alkalnome sekretu cervikalne sluzi prevladavaju glikoproteini molekularne mase od 0,5 milijuna do 4 milijuna daltona (7, 20, 29). Među njima je česta glikozidna veza između N-acetil-D-galaktozamina i aminokiselina serina i treonina (7, 27, 37, 44).

U sluzi vrata maternice identificiran je imunoglobulin IgA, čija je koncentracija za 75 % niža od koncentracije tih antitijela u krvnoj plazmi žena (32). Tako su Domagale i suradnici (45) utvrdili da cervikalna sluz sadržava oko 0,22 µg imunoglobulina po mL cervikalnoga sekreta.

1.2.2. Utjecaj hormona na fizikalno-kemijska svojstva cervikalne sluzi

Cervikalna sluz mijenja fizikalna svojstva u različitim fazama menstruacijskoga ciklusa. Te promjene ovise o koncentraciji estrogena i progesterona (10, 11, 13, 20, 40), hormona koji suprotno djeluju na kvalitetu i kvantitetu cervikalne sluzi. Njihova koncentracija u krvi žene važan je čimbenik aktivacije gena odgovornih za sintezu glikoproteina sluzi u sekrecijskim žlijezdama cervikalnoga kanala (4) jer je poznato da te stanice imaju receptore za spolne hormone (4 – 6).

U početku menstrualnog ciklusa povećava se sinteza estrogena u jajnicima. Njegovim porastom otvara se vrat maternice i počinje obilno izlučivanje cervikalne sluzi. Površinu cerviksa prekrivaju žlijezde koje izlučuju sekret različite gustoće i elastičnosti. Pod dominantnim djelovanjem estrogena sve do ovulacije cervikalna sluz postaje obilna, bistra, alkalična i bez staničnih elemenata (11, 28, 29).

Istraživanja su pokazala da estrogenski i progesteronski preparati uneseni u organizam mijenjaju svojstva cervikalne sluzi (20, 29). Estrogeni stimuliraju proliferaciju stanica cervikalnoga kanala i obilno izlučivanje sluzi male gustoće (25), koje počinje već šest sati nakon uzimanja estrogenskih preparata (21, 29). Istodobno, medroksiprogesteron acetat injiciran ženama u prijemenstruacijskoj fazi u roku od 24 sata smanjuje količinu cervikalne sluzi i povećava njezinu gustoću (22). Za vrijeme ovulacije količina estrogena u krvi velika je, a nastala sluz bistra i obilna.

Zbog male viskoznosti lako se širi u okolinu cerviksa. Smatra se da estrogeni ne djeluju na koncentraciju glikoproteina u sluzi vrata maternice (46).

Nakon ovulacije, u sekrecijskoj fazi, kad se stvara velika količina progesterona u žutome tijelu ovarija, cerviks se postupno zatvara. Cervikalna sluz manjega je obujma i postaje gusta. Od bistre sluzi nastaje zamućena tekućina slabe elastičnosti (4, 12, 18, 20, 35, 42). Za vrijeme lutealne faze i u trudnoći sluz vrata maternice viskozna je, maloga obujma (20 – 30 mL/dan), gusta i jako zamućena, što usporava prolazak spermija iz rodnice (12, 20, 31).

Očito je da spolni hormoni promjenom fizikalnih svojstava cervikalne sluzi mogu neizravno utjecati na pokretljivost spermija u genitalnome traktu žena. Sluz kontrolirana estrogenima, s obiljem vode i male viskoznosti, pogoduje prolasku spermija (47). Nasuprot tomu, mala količina guste sluzi u lutealnoj fazi (0,2 mL), kad se obilno izlučuje progesteron, nije medij povoljan za prolazak spermija. Tada je istodobno viša koncentracija staničnih elemenata i leukocita, što usporava prolazak spermija kroz cervikalni kanal (12, 18, 20, 29, 36).

Prevladava mišljenje da razlike u fizikalnim svojstvima cervikalne sluzi nastaju zbog promjene količine vode u njezinu sastavu (11). Prema Chantlerovu mišljenju smanjenje količine vode pod djelovanjem progesterona nastaje zato što se gube kovalentne veze između glikoproteina koji na sebe vežu molekule vode (11).

Cervikalni sekret smjesa je tvari različite viskoznosti koje se sintetiziraju i oslobađaju u stanicama cervikalnoga kanala (11, 18, 20, 29, 39). Prema koncentraciji prisutnih hormona razlikuju se dva tipa cervikalne sluzi: tip E (estrogenski) i tip G (gestagenski ili progesteronski) (18). Tip E prevladava u ovulaciji i tada je 95 % ukupne količine sluzi toga tipa. Tip G prevladava nakon ovulacije i u sluzi može biti zastupljen i do 90 % (18). Smatra se da u ovulacijskoj sluzi prevladavaju niti glikoproteina promjera 0,3 – 0,6 mm i male viskoznosti, koje stvaraju rijetku trodimenzijsku mrežu. U takvim uvjetima spermiji sporo prodiru iz rodnice prema maternici. U G-fazi niti prelaze u gustu mrežu složenih glikoproteina koji otežavaju prolazak spermija. Postoji mišljenje da progesteron istodobno specifičnom aktivacijom gena stimulira sintezu glikoproteina, što povećava konzistenciju sluzi vrata maternice tipa G (18, 20).

Odeblad sa suradnicima (14) te Menárguez i suradnici (48) predložili su 4 oblika cervikalne sluzi koje su nazvali: G, L, P, S. Oni smatraju da glikoproteini sluzi stvaraju mrežastu strukturu pora koja se dobro vidi pod mikroskopom (48).

Tip G nastaje u vrijeme dominantnoga progesteronskog djelovanja žutoga tijela jajnika i guste je konzistencije s manjim brojem pora i nizom usporednih niti, što stvara nepovoljne uvjete za prolazak spermija. Sekreti L, P i S vodenasti su i nastaju pod djelovanjem estrogena. Oni u cervikalnoj sluzi imaju široke pore. Ti oblici imaju nešto višu pH-vrijednost (7,0 – 7,5) od oblika G (6,5 – 7,0). Odeblad (14) smatra da sekreti tipa L, P i S sadržavaju male niti glikoproteina promjera 0,4 mm koje stvaraju rahlu mrežastu strukturu.

Prije smo spomenuli da sušenjem sekreta iz vrata maternice nastaju kristali natrijeva klorida (13, 14). Iz sekreta tipa L nastaju kristali slični listu paprati ili palme sa specifičnim proširenjima, dok sekret tipa S stvara kristale u obliku dugih šiljastih niti. Za razliku od njih, sekret tipa G stvara sitne kristale koji često nedostaju na predmetnome mikroskopskom staklu. Smatra se da struktura cervikalne sluzi utječe na pokretljivost spermija, koji lako prolaze kroz rijetku sluz tipa S (14, 15, 29).

Sluz iz vrata maternice izlučuju stanice u različitim dijelovima cervikalnoga kanala. Žlijezde na ulazu u cerviks stvaraju i oslobađaju veću količinu sekreta tipa G, a one u dubljemu dijelu cervikalnoga kanala stvaraju sluz tipova L i S (14, 15). Sluz različite gustoće vjerojatno nastaje prema stupnju aktivnosti pojedinih staničnih struktura u cerviksu. Cikličke promjene koncentracije estrogena i progesterona mijenjaju količinu imunoglobulina u sluzi vrata maternice. Njihova je koncentracija najniža u vrijeme ovulacije i iznosi 1 – 2 % ukupne koncentracije serumskih imunoglobulina. Izgleda da niska razina imunoglobulina u sluzi vrata maternice ovisi o koncentraciji estrogena u krvotoku. Utvrđeno je da već dva dana nakon uzimanja estrogenskih preparata ili trofaznih kontracepcijskih tableta opada razina imunoglobulina u cervikalnoj sluzi testiranih žena (22, 32, 49). Postoji mišljenje da smanjenje količine imunoglobulina u ovulaciji pogoduje lakšemu prolasku spermija jer je u tom razdoblju mala gustoća cervikalne sluzi.

1.2.3. Funkcija cervikalne sluzi

Fizikalna svojstva cervikalne sluzi sastavni su dio fiziološkoga procesa reprodukcije u žena. Taj sekret u ovulaciji olakšava nesmetani prolazak spermija prema maternici. Istodobno je u stadiju maksimalne gustoće i velike viskoznosti, koja nastaje zbog snažnoga djelovanja progesterona iz žutoga, tijela te je prolazak spermija kroz

cervikalni kanal iznimno usporen. Na temelju tih činjenica postoji mišljenje da je vrat maternice specifičan biološki otvor ili pregrada koja omogućuje povremeni ulazak spermija prema maternici djelujući aktivno i pasivno na njihov prolazak (4, 5, 7, 12, 17, 18, 25, 27, 33, 42).

Cervikalna sluz utječe na stupanj fizioloških aktivnosti spermija poput:

- prijenosa spermija
- pokretljivosti spermija
- zaštite spermija
- nakupljanja energije za spermije
- razdvajanja abnormalnih i slabo pokretnih spermija.

Spermiji brzo prolaze kroz cervikalnu sluz u prijeovulacijskoj fazi i ovulacijskoj fazi, koja je pod kontrolom estrogena (18). Tada je sluz obilna i male gustoće, što omogućuje prodor spermija brzinom od čak 3,4 mm na minutu (10, 20, 46). Smatra se da u tim uvjetima najbrži spermiji stignu do jajovoda za manje od 30 minuta (32). Katz i suradnici (35) utvrdili su da količina vode (hidracija) u cervikalnoj sluzi raste 3 – 4 dana prije maksimalnoga izlučivanja luteotropnoga hormona, što u vrijeme ovulacije olakšava prolazak spermija prema jajovodu. Prema njihovu mišljenju mjerenje stupnja hidracije cervikalne sluzi moglo bi biti pokazatelj vremena ovulacije i razdoblja pogodnoga za oplodnju (20, 35).

Pokusi *in vitro* pokazali su da su spermiji u cervikalnome sekretu pokretljiviji nego u sjemenome ejakulatu (18, 49). Oštra granica između spermija i sekreta brzo se gubi kad se kap spermija stavi u cervikalnu sluz. Na dodirnoj površini stvaraju se male klinaste udubine kroz koje spermiji lako prodiru u cervikalnu sluz (17). Te se udubine odmah šire u duboke pukotine, što olakšava brže gibanje spermija. Novija istraživanja pokazala su da spermiji vjerojatno putuju kroz cervikalnu sluz prostorom mikrokanalića koje oblikuju glikoproteini sluzi (7, 14, 17, 32). U kiselome mediju vagine spermiji već za 30 minuta gube pokretljivost (14, 32). Smatra se da jedan od svakih 40 spermija penetrira iz rodnice u područje vrata maternice (14, 32). Međutim, u blago alkaličnoj pH-vrijednosti cervikalne sluzi spermiji mogu ostati pokretni čak i nakon šest dana (7, 14, 32, 33, 50, 51). Istodobno na pokretljivost spermija djeluju leukociti koji se pojavljuju u sluzi tipa G te veća količina glikoproteina u sluzi (14, 18). Pokusi *in vitro* pokazali su da mucini iz sluzi vrata maternice olakšavaju i povećavaju prolazak spermija te smanjuju prolazak hiperaktivnih spermija (14, 15). Kao mjerilo

aktivacije uzete su amplitude lateralnoga gibanja spermija i brzina njihova prolaska kroz cervikalnu sluz.

Obilna sluz u vrijeme ovulacije sadržava veću količinu ugljikohidrata i aminokiselina (7, 43), koji su potencijalan izvor energije. Spermiji mogu ostati aktivni u vratu maternice nekoliko sati, vjerojatno zato što se iz okolne sluzi obnavljaju zalihe njihove energije u obliku ATP-a (46). Toj tvrdnji u prilog ide fiziološka pojava da spermiji sadržavaju brojne mitohondrije koji su zacijelo aktivni pri sintezi energije potrebne za njihovo kretanje.

U razmjerno gustoj cervikalnoj sluzi različita je brzina kretanja normalnih i abnormalnih spermija zbog razlika u građi (spermiji s dvama repnim nastavcima) ili u procesu sinteze ATP-a (14). Utvrđeno je da samo jedan od svakih 5000 spermija u cervikalnoj sluzi stigne u područje jajovoda (32) i da razmjerno gusta sluz tipa L zadržava veće spermije koji imaju dva repna nastavka (14).

Čini se da je cervikalna sluz neka vrsta biološkoga spremnika u kojemu spermiji mogu dulje ostati aktivni. Stoga neki autori smatraju da u vratu maternice može doći do sazrijevanja prisutnih nezrelih spermija u njihove aktivne oblike (14, 15, 32).

Cervikalna sluz ima veliku antibakterijsku aktivnost, koja sprječava rast i razvoj bakterija u tom području genitalnoga trakta (50, 51). Eggert-Kruse i suradnici (51) utvrdili su da je u cervikalnoj sluzi seksualno aktivnih žena, koja sadržava pojedinačne spermije, veća antibakterijska aktivnost nego u žena koje su pet dana bile seksualno neaktivne. Prema njihovu mišljenju velik udio antibakterijske aktivnosti potječe od enzima oslobođenih iz lizosoma, sekrecijskih stanica vrata maternice ili od stanica koje su se razgradile prirodnim procesom apoptoze i čiji je sadržaj postao dio cervikalnoga sekreta. Hein i suradnici (88) utvrdili su da cervikalna sluz *in vitro* uništava mnoge sojeve gram-pozitivnih bakterija streptokoka jednako kao antibiotik gentamicin u količini od 0,5 μg/mL.

1.3. Duhanski dim cigareta

Pušenje cigareta česta je pojava među ženama. Zbog emancipacije i financijske neovisnosti danas sve veći broj žena puši cigarete. U posljednjih 50-ak godina znanstveno je dokazano da pušenje cigareta uključuje visok zdravstveni rizik. Ono oštećuje kardiovaskularni i dišni sustav, pospješuje razvoj raka u mnogim organima i nepovoljno utječe na razvoj fetusa i djeteta (37, 52 – 54). Tako je među oboljelima od mikrocelularnoga karcinoma pluća oko 90 % aktivnih pušača cigareta. Dodatna je opasnost pušenja u tome što nepušači u prisutnosti pušača postaju pasivni pušači, te su izloženi štetnomu djelovanju mnogih sastavnica duhanskoga dima kao i aktivni pušači (38, 55 – 58).

1.3.1. Društveni aspekti pušenja

Osušeni listovi biljke duhana (*Nicotiana tabacum*) uz dodatke se žvaču ili udišu kao dim cigareta, cigara i lula. Danas je pušenje cigareta najčešći oblik uživanja duhana. Ono je u svijetu do početka Drugoga svjetskog rata bilo privilegij muškoga dijela ljudske populacije. Društvena emancipacija stvorila je novu skupinu uživatelja duhana, skupinu pušačica. Sredinom prošloga stoljeća pušači su činili oko 39 % odrasle populacije (56). Spoznajom da je pušenje rizični čimbenik za razvoj kardiovaskularnih bolesti i nekih oblika raka naglo se smanjio broj pušača u razvijenim zemljama. Nažalost, svakodnevna stresna stanja izazov su koji povećava njihov broj (38, 57). Za mlade je ljude pušenje izazov koji počinje kao bezazlen eksperiment ili puko oponašanje starijih – roditelja ili prijatelja, a desetak godina poslije završava kardiovaskularnim i dišnim problemima koji mogu prijeći i u neke oblike raka (38, 56 – 58).

Unatoč strogoj regulativi o ograničenju pušenja pušači čine oko 22 % odrasle populacije, podjednako i muškaraca i žena (57).

U nerazvijenim dijelovima svijeta sve je više mladih pušača. Zbog toga je svjetski porast broja pušača na godinu velik i iznosi oko 6 % (56). Iako je pušenje društveno prihvatljiva pojava, ono je bolest, ovisnost od koje se teško odviknuti. Proces odvikavanja obično započinje nekoliko puta i može trajati više godina. Prema nekim

procjenama gotovo 50 % aktivnih pušača cigareta ne može se odviknuti od pušenja unatoč nizu pokušaja (56 – 58).

1.3.2. Kemijski sastav duhanskoga dima

Duhanski je dim heterogena smjesa sastavljena od oko 4000 anorganskih i organskih, jednostavnih i složenih spojeva, među kojima čak 42 sastavnice izravno izazivaju rak kod pokusnih životinja (56, 57, 59). Amesovim testom (biotest kojim se određuju mutagenost i kancerogenost neke tvari na temelju njezine sposobnosti izazivanja povratnih mutacija sojeva bakterije *Salmonella typhimurium*) već je 20 minuta nakon pušenja cigareta dokazana mutagenost mokraće pušača (56). Valja istaknuti da se i u mokraći nepušača koji su proveli određeno vrijeme u okolini aktivnih pušača može utvrditi mutagenost. Prema nekim procjenama u organizmu nepušača koji su proveli jedan sat s pušačima postoje sastavnice duhanskoga dima kao da su popušili 20 % cigareta aktivnih pušača (38, 57).

Osim mutagenih tvari i kancerogenih spojeva duhanski dim sadržava oko 600 otrovnih spojeva kao što su cijanid, amonijak, aceton, akrolein, benzol, arsen i toluol (38, 56, 57). Izgaranjem duhana nastaje gusti dim čiji sastav ovisi o gustoći cigarete, njezinu pakiranju, dužini, temperaturi izgaranja i prisutnosti filtra. Pušač u prosjeku uvlači jedan dim cigarete svake dvije minute (38, 58).

Pri pušenju cigarete razlikujemo glavnu struju dima, koja nastaje udisanjem dima goruće cigarete pušača, i sporednu struju dima, koja nastaje slobodnim izgaranjem cigarete. U sporednoj struji dima niža je koncentracija krutih čestica i obično viša koncentracija mnogih sastavnica nego u glavnoj struji dima. U tablici 1. prikazane su neke od sastavnica duhanskoga dima u glavnoj struji dima (GS) i u sporednoj struji dima (SS) cigareta. Kao što se vidi, u duhanskome dimu prevladavaju male krute čestice čija je veličina do 0,01 μm i koje utječu na razvoj karcinoma bronha. Važna sastavnica dima jest ugljikov monoksid (CO), koji prevladava u sporednoj struji dima, u kojoj je izgaranje kisika slabije.

Najbolje proučeni spoj iz duhanskoga dima jest alkaloid nikotin. Njegova je koncentracija u sporednoj struji dima 4 puta viša od koncentracije u glavnoj struji duhanskoga dima cigareta. Isto je s kancerogenim poliaromatskim ugljikovodicima kao što je benzo(a)piren, ali njihova je koncentracija mnogo niža od koncentracije

nikotina. U sporednoj struji dima cigareta razmjerno je visoka koncentracija dušikovih oksida (56, 57, 59, 60)

Tablica 1. Sastav glavne struje (GS) i sporedne struje (SS) duhanskoga dima jedne cigarete*

Sastavnice	GS	SS
Krute tvari	20 – 40 mg	3,5 – 18 mg
Duhanski kondenzat	10 – 15 mg	18 – 24 mg
Ugljikov monoksid	20 – 40 mg	40 – 62 mg
Nikotin	2 – 2,5 mg	4,2 – 8,6 mg
Dušikovi oksidi	0,2 – 0,5 mg	2,1 – 3,2 mg
Amonijak	0,1 – 0,2 mg	0,4 – 0,7 mg
Benzol	12 – 20 µg	120 – 400 µg
Eten	0,1 – 0,2 µg	0,9 – 1,3 µg
HCN	200 – 250 µg	22 – 34 µg
Izopren	0,5 – 0,7 µg	3,0 – 4,1 µg
Benzo(a)piren	0,02 – 0,04 µg	0,1 – 0,4 µg
O-toluidin	0,10 – 0,20 µg	1,9 – 3,2 µg

* Izvor podataka: Klepac i sur. (38)

Viša koncentracija mnogih sastavnica duhanskoga dima u sporednoj struji važna je za pasivne pušače jer su oni stalno izloženi sporednoj struji dima cigareta aktivnih pušača. U tablici 1. prikazane su vrijednosti duhanskoga kondenzata. Frakcija je to duhanskoga dima koja nastaje naglim hlađenjem u gornjemu dijelu dišnoga trakta pušača ili hlađenjem sporedne struje dima na zraku. To je tamnosmeđa uljasta tekućina intenzivnoga mirisa po duhanu, koja se naziva i *duhanski katran* (*tar*). Taj se katran nakuplja (kondenzira) u završnome dijelu cigarete koja ima filtar i u čitavome dišnom traktu pušača.

Najveća opasnost za organizam od cigaretnoga dima nastaje zbog stalnoga udisanja sitnih krutih čestica (duhanska prašina), duhanskoga katrana, nikotina i ugljikova monoksida.

U želji da se proizvedu cigarete koje bi bile manje štetne za organizam pušača, duhanska industrija u posljednjih dvadesetak godina na kraj cigareta stavlja acetatni filtar, čime je smanjena količina krupnih krutih čestica koje sa strujom dima ulaze u organizam pušača. Istodobno su specifičnim genetičkim mjerama stvorene nove odlike duhana s manjim postotkom nikotina. Zahvaljujući tehnološkim inovacijama, današnje cigarete u struji dima imaju manji postotak katrana i ugljikova monoksida.

1.3.3. Patofiziološko djelovanje duhanskoga dima cigareta

Duhanski dim cigareta sadržava oko 4000 sastavnica, od kojih su mnoge štetne za organizam pušača. Mehanizam djelovanja nekih od njih poznat je, dok se o djelovanju drugih i dalje malo zna.

Pušenje je velik izazov za žensku populaciju jer je poznato da su mnogi pušači cigareta mršavi. Taj podatak djeluje stimulativno na mnoge žene koje imaju problema s održavanjem tjelesne mase. Još nije razjašnjeno je li manja tjelesna masa pušača posljedica slabijeg apetita ili izravnoga djelovanja nekih spojeva iz duhanskoga dima. Isto je tako nepoznato jesu li ukupni učinci duhanskoga dima na organizam nastali djelovanjem jedne sastavnice dima ili više njih (56, 61).

Alkaloid nikotin najbolje je proučena sastavnica dima cigareta. On smiruje pušače, ali i stvara potrebu za pušenjem, što izaziva ovisnost o cigaretama. Nikotin je dobro topljiv u lipidima i vodi te kroz mukozne membrane lako prodire u organizam ili se apsorbira putem kože. U organizmu se brzo oksidira u farmakološki neaktivan spoj kotinin (56, 61). Polovično vrijeme njegove razgradnje u organizmu vrlo je kratko – oko 20 minuta. Od unesenoga se nikotina 2 – 20 % izluči mokraćom iz organizma, a ostatak se metabolizira u jetri. Nepušači su u pušačkome okružju izloženi djelovanju nikotina jer je njegova koncentracija viša u sporednoj struji dima cigarete nego u glavnoj.

Nažalost, iako je vrijeme razgradnje nikotina kratko, on u organizmu stvara brojne fiziološke i farmakološke učinke. U krvnoj plazmi pušača nikotin se može izmjeriti već 10 sekunda nakon prvoga udisanja dima cigarete (61). Njegova koncentracija u krvi iznosi od 10 do 40 μg/L. Pušenjem jedne cigarete u organizam se unese 0,2 – 3,0 mg nikotina, koji izaziva laganu tahikardiju, porast krvnoga tlaka, pojačane srčane kontrakcije, tahipneju i sniženje temperature kože, osobito na prstima zbog

nastale vazokonstrikcije. Taj učinak nestaje nakon 15 minuta kad se razgradi veći dio nikotina iz udahnutoga duhanskog dima.

Nikotin u organizmu stimulira oslobađanje adrenalina te povisuje razinu glukoze, glicerola, laktata i slobodnih masnih kiselina u krvnoj plazmi pušača (10, 52).

Kod ljudi nenaviknutih na pušenje ili onih koji prvi put pale cigaretu mogu nastati lagani tremor mišića, mučnina i povraćanje. Te simptome mogu imati i aktivni pušači ako je otrovanje nikotinom nastalo kao posljedica pušenja nekoliko kutija cigareta na dan.

Nikotin putem SŽS-a stvara osjećaj zadovoljstva i smiruje pušače. Osjećaj ugode nastaje zbog njegova djelovanja na receptore N1 i N2 u leđnoj moždini pušača (57, 61). Međutim, u velikoj količini ili kod nenaviklih pušača nikotin može izazvati uzbuđenje i razdražljivost. Sličan učinak nastaje nakon intravenskoga iniciranja 1 – 1,5 mg nikotina. On istodobno aktivira endokrini sustav, pa su u krvnoj plazmi pušača povišene razine hormona rasta, ACTH-a, vazopresina i kortizola, a snižena je koncentracija prostaciklina. U uvjetima *in vitro*, u ovarijima aktivnih pušačica, nikotin sprječava enzimsku pregradnju androstendiona u estrogene hormone (49, 57, 61, 62, 64).

Osim što izaziva potrebu za pušenjem, nikotin potiče toleranciju organizma prema pušenju. Povisuje razinu neurotransmitora koji stimuliraju centre za povraćanje i aktivira neurovegetativni živčani sustav. Posljedica je ubrzana peristaltika crijeva i povećana sekrecija solne kiseline iz sluznice želudca (38, 57, 61, 62).

Istodobno, nikotin povećava viskoznost krvi te povisuje razine fibrinogena i tromboksana u krvnoj plazmi. U krvi pušača raste koncentracija slobodnih masnih kiselina i lipoproteina male gustoće (LDL) te dolazi do taloženja trombocita, što sve zajedno pogoduje razvoju arterioskleroze (3, 57, 61, 65). Nikotin nije kancerogen, ali može se pregraditi u nitrozamine, koji u pušača izazivaju rak želudca (57, 65).

Velika količina nikotina unesena u organizam smrtonosna je. Odjednom uzeta letalna doza za čovjeka iznosi 0,5 – 1,0 mg/kg tjelesne mase (57, 61). Međutim, kumulativna oralna doza nikotina od čak 4,0 mg/kg bezopasna je, što odgovara količini nikotina iz duhanskoga dima cigareta popušenih tijekom 24 sata. Ako je nastupilo otrovanje nikotinom, pojavljuju se nespecifični simptomi poput glavobolje, slinjenja, mučnine i lagane drhtavice (38, 56, 57, 61, 65).

Druga štetna sastavnica duhanskoga dima cigareta jest ugljikov monoksid. U uvjetima gorenja, pri nepotpunoj oksidaciji ugljika, stvara se osjetno više ugljikova monoksida nego ugljikova dioksida. Nažalost, taj se proces zbiva pri svakome gorenju duhana u cigareti pušača. Ugljikov monoksid, koji je u organizam unesen dimom, brzo se apsorbira putem velike površine plućnih alveola i veže se s hemoglobinom eritrocita u specifičan spoj karboksihemoglobin (52, 56, 63, 66). Afinitet vezanja ugljikova monoksida za hemoglobin 250 je puta veći od sposobnosti vezanja kisika s hemoglobinom u oksihemoglobin (52, 63). To znači da se i najmanje količine ugljikova monoksida uz prisutnost kisika potpuno vežu za eritrocite i smanjuju udio oksihemoglobina. Zbog manje oksigenacije krvi u plućima pušača nastaje manja ili veća hipoksija.

Razina karboksihemoglobina u krvi nepušača iznosi do 1 %, a u krvi pušača čak i do 10 % (52, 67). Smrt nastupa kad se njegova koncentracija povisi na 65 – 75 % (52, 67), što se kod aktivnih pušača cigareta ne događa gotovo nikad. Nastali karboksihemoglobin gubi se iz organizma pušača tek 9 – 12 sati nakon prestanka pušenja. Istaknuli bismo da je u žena koje puše hipoksija nastala zbog udisanja ugljikova monoksida važan rizični čimbenik tijekom trudnoće jer može prouzročiti usporen razvoj i malformaciju fetusa (38, 52, 58, 68, 69).

Od toksičnih tvari koje se nalaze u duhanskome dimu dobro je proučeno djelovanje cijanovodika (HCN). Taj spoj u koncentraciji od 1 mg/kg tjelesne mase izaziva trenutačnu smrt u ljudi (70). Iako u glavnoj struji duhanskoga dima jedne kutije cigareta ima oko 4,2 g cijanida (CN^-), on nije opasan za život pušača jer u organizmu postoji aktivni enzim rodanaza (tiosulfat: cijanid sumporne transferaze; E. C. 2.8.1.1.), koji cijanid uz sumpor trenutačno pregradi u manje štetan spoj tiocijanat (SCN) (71 – 73). Aktivnost tog enzima dovoljna je da razgradi sav cijanid unesen u organizam hranom ili nekim produktima ljudske aktivnosti kao što su cigarete. Ta se reakcija u organizmu zbiva s pomoću tiosulfata ili persulfida:

$$S_2O_3^- + CN^- \rightarrow SCN^- + SO_3^{- -}.$$

SCN netoksičan je razgradni produkt spoja cijanida koji se nalazi u duhanskome dimu cigareta. Proces detoksikacije cijanida u tiocijanat događa se u svim stanicama organizma. Dosad je izmjerena razmjerno velika količina tiocijanata u stanicama jetre pušača, njihovoj krvnoj plazmi, slini i mokraći.

Detoksikacija cijanida zbiva se s pomoću organskoga sumpora iz aminokiselina cisteina ili metionina (72). Međutim, katkad, u iznimnim slučajevima, cijanid letalno djeluje na sve organizme. To se događa zato što cijanid ima velik afinitet vezanja na aktivno mjesto enzimskoga kompleksa citokrom-oksidaze (ferocitokrom c oksidoreduktaza; E. C. 1.9.1.3.), koji je krajnji enzim mitohondrijskoga lanca za prijenos elektrona pri sintezi staničnoga ATP-a (23, 25, 74 – 76). Tada se u stanicama smanji energija u obliku ATP-a, što u ekstremnim slučajevima može imati smrtni ishod. U oboljelih od Leberove atrofije i ambliopije mala je aktivnost enzima rodanaze (57, 77). Stoga ti bolesnici imaju teške zdravstvene probleme ako se dulje nalaze u pušačkome okružju.

Duhanski dim sadržava brojne ksenobiotike, od kojih su čak 42 izravno kancerogena za pokusne životinje (56, 57, 68, 69, 78). Oni nastaju izgaranjem samljevenoga duhana u cigareti na visokoj temperaturi (53, 56, 57, 68). Djelovanjem brojnih oksidacijskih enzima kojima je donator kisika spoj citokrom P-450 ti se spojevi u ribosomskoj frakciji stanica ljudske jetre razgrađuju u spojeve manje štetne za organizam (53, 61, 79, 80 – 82). Ispitivanja su pokazala da duhanski dim smanjuje aktivnost staničnoga citokroma P-450 te time usporava procese stanične detoksikacije (82).

Duhanski dim cigareta sadržava aktivne slobodne radikale kisika (9, 68, 74, 78, 83, 84). Ti su radikali nezasićeni atomi kisika kojima u izvanjskoj elektronskoj ljusci nedostaje jedan elektron. Najpoznatiji slobodni radikali su superoksid, hidroksilni radikal i peroksidni radikal (68, 78). Slobodni radikali kratko žive, veoma su aktivni i agresivni spojevi. Oni iz okolnih tvari brzo uzimaju elektron ili vodik i tako postaju zasićeni neaktivni spojevi (68, 74, 78). Zbog gubitka jednoga elektrona u okolini može nastati neselektivno oštećenje svih staničnih makromolekula, od molekule DNK-a do proteina (9, 35, 58, 61, 68, 74, 84, 87, 88).

Duhanski dim cigareta sadržava oko 4000 različitih anorganskih i organskih jednostavnih i složenih spojeva. Mnogi među njima detoksiciraju se u jednostavnije spojeve koji se izlučuju iz organizma. Glavni je organ za razgradnju tih spojeva jetra. U jednome obliku te razgradnje sudjeluje i kromoprotein citokrom P-450, koji djeluje pri oksidaciji mnogih spojeva stranih ljudskomu organizmu. Dosadašnja su ispitivanja

pokazala visoku koncentraciju citokroma P-450 u jetri i posteljicama pušačica cigareta (89, 90).

Organizam se od štetnoga djelovanja slobodnih radikala štiti aktivnošću različitih antioksidansa (9, 83, 86). Tu djelatnost u organizmu nazivamo *antioksidacijska obrana*. U stanici je čine molekule antioksidansa i antioksidacijski enzimi te antioksidansi uneseni u organizam hranom. Ako su u organizmu nastali uvjeti za stvaranje velike količine slobodnih radikala čije djelovanje ne može smanjiti antioksidacijska obrana organizma ili je zbog nečega trajno smanjena količina staničnih antioksidansa, nastaje specifično fiziološko stanje koje se naziva *oksidacijski stres* (9, 68, 85). Biokemijski pokazatelji oksidacijskoga stresa u ljudi dobro su mjerljivi kod velikoga broja kroničnih bolesti od dijabetesa, arterioskleroze i zatajivanja srca do nekih oblika raka (68, 74, 83, 91).

Radikali kisika na razini molekule DNK-a mijenjaju funkciju gena, što u procesu prepisivanja DNK-a može stvoriti neke nove nefunkcionalne proteine. Ta pojava može postati bitna ako je riječ o promjeni aktivnosti nekih enzima specifičnih za organizam (38, 68, 74, 78, 92).

Slobodni radikali u procesu lipidne peroksidacije oštećuju građu i funkciju lipida svih staničnih organela (9, 68, 85). Tada dolazi do razgradnje dugih lanaca nezasićenih masnih kiselina u male molekularne oblike od nekoliko ugljikovih atoma. Zbog toga stanična membrana gubi selektivnu polupropusnost i postaje propusna za ione kalcija, koji slobodno ulaze u stanicu i oštećuju njezinu funkciju (9, 56, 68, 74, 78, 93). Velika lipidna peroksidacija stanica u iznimnim slučajevima može dovesti do smrtnoga ishoda (74, 94), a ona je u krvnoj plazmi pušača specifičan biokemijski pokazatelj oksidacijskoga stresa i poremećaja općega stanja (68, 78, 83, 86).

Antioksidansi i antioksidacijski enzimi u fiziološkim uvjetima štite organizam od štetnoga djelovanja slobodnih radikala (9, 68, 74, 78, 83 – 86, 91, 92, 95 – 97). Oni reduciraju ili inaktiviraju slobodne radikale u kemijski neaktivne spojeve i time štite sve stanične makromolekule važne za život. Antioksidacijskoga su karaktera mnoge molekule koje se sintetiziraju u stanicama (albumin, reducirani glutation, mokraćna kiselina i antioksidacijski enzimi) ili se svakodnevno unose u organizam hranom (68, 74, 78). Među antioksidansima koji se unose u organizam najpoznatiji su vitamini C i E te različiti biljni polifenoli (9, 68, 74, 78, 83 – 86, 89, 91, 92, 95, 97 – 99). Vitamin C snažan je prirodni antioksidans koji brzo razgrađuje slobodne radikale iz duhanskoga

dima cigareta (9, 68, 74, 86, 91, 97, 100). Njegova je koncentracija u krvnoj plazmi i leukocitima aktivnih pušača za oko 40 % niža od koncentracije tog vitamina u plazmi i leukocitima nepušača (83, 86, 90, 100). Ljudi ne mogu sintetizirati vitamin C, nego ga svakodnevno uzimaju u voću i povrću, što bi trebala biti važna nutritivna smjernica za njegovu uporabu u pušačkoj populaciji (9, 68, 74, 84, 86, 91, 97, 99 – 101). Nedostatne količine vitamina C oštećuju razvoj vezivnoga tkiva, što u ekstremnim slučajevima dovodi do skorbuta. Askorbinska kiselina u organizmu je veoma djelatan antioksidans. Frei i suradnici (83, 86) smatraju da je askorbinska kiselina najjači antioksidans u organizmu, koji uspješno razgrađuje oksidanse iz duhanskoga dima cigareta.

Harris i suradnici (87) te Slattery i suradnici (102) utvrdili su veliku podudarnost između pušenja cigareta i povišenoga stupnja cervikalne displazije, koja često završava rakom vrata maternice (102). Do istih je zaključaka došao Hellberg sa suradnicima (13, 19) mjereći razinu nikotina i kotinina u cervikalnoj sluzi pušačica cigareta. Danas se smatra da je pušenje cigareta visok rizični čimbenik za razvoj raka vrata maternice (56, 57, 103). Taj se oblik raka usko povezuje s aktivnošću humanoga papilomavirusa u genitalnome traktu žena (23). Osim toga, čimbenici rizika od rak vrata maternice jesu poremećaj mikroelemenata i dugotrajna uporaba kontracepcijskih preparata (23, 56). Cervikalna je sluz izložena toksičnomu djelovanju duhanskoga dima cigareta. Tako su Holly i suradnici (104) te Poppe i suradnici (23) Amesovim testom utvrdili visok stupanj mutagenosti u cervikalnome obrisku pušačica. U stanicama vrata maternice pušačica utvrđeni su metabolički produkti cikličkoga aromatskog ugljikovodika benzopirena (105), koji je poznat kancerogeni spoj iz duhanskoga dima cigareta (19, 56, 61, 68, 74, 89). U istim su uzorcima nađeni složeni spojevi DNK-a s proteinima (engl. *adducts*) koji stimuliraju razvoj raka. Razina tih spojeva u stanicama cervikalnoga kanala ispitanica pušačica bila je 12,5 % viša nego u nepušačica (23). Istodobno su Prokopczyk i suradnici (106) u cervikalnoj sluzi pušačica našli oko 2,5 puta višu koncentraciju kancerogenoga spoja nitrozamina od one u cervikalnoj sluzi nepušačica.

2. HIPOTEZA

Žene u reproduktivnoj dobi koje puše imaju nižu koncentraciju askorbinske kiseline te manju aktivnost citokrom-oksidaze u mitohondrijskoj frakciji površinskih stanica vrata maternice od onih u žena što ne puše. Također, u odnosu na nepušačice pušačice imaju višu koncentraciju tiocijanata, veću količinu citokroma P-450 i veću lipidnu peroksidaciju u homogenatu površinskih stanica vrata maternice, veću aktivnost enzima rodanaze, snižene koncentracije superoksida i reduciranoga glutationa te smanjenje dodatne oksidacije proteina i ukupnoga antioksidacijskog kapaciteta (FRAP) u uzorku.

3. CILJ RADA

Cilj je ovoga rada utvrditi mogu li se u cervikalnoj sluzi pušačica naći neki od pokazatelja karakterističnih za pušenje koji su izmjereni su u krvi ili mokraći, i vidjeti mogu li promijenjene koncentracije, odnosno vrijednosti izmjerenih parametara, utjecati na veću učestalost primarne idiopatske neplodnosti u ispitanica.
Određivanjem ukupne količine proteina, razine vitamina C, koncentracije tiocijanata, koncentracije citokroma P-450, aktivnosti enzima citokrom-oksidaze i rodanaze, lipidne peroksidacije, koncentracije superoksida, reduciranoga glutationa, dodatne peroksidacije proteina i ukupnoga antioksidacijskoga kapaciteta željeli smo utvrditi sličnosti i razlike u cervikalnoj sluzi promatranih pušačica i nepušačica. Time smo procijenili kvalitetu cervikalne sluzi s obzirom na plodnost ispitanica.

Naša ispitivanja biokemijskih parametara cervikalne sluzi i organela stanica cervikalnoga kanala u pušačica mogla bi proširiti spoznaje o štetnome utjecaju pušenja na funkciju ženskoga spolnog sustava.

4. ISPITANICE I METODE

4.1. Ispitanice

Istraživanje je provedeno u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničke bolnice *Merkur* u razdoblju od 1. siječnja 2013. do 31. prosinca 2018. godine. U ovome su istraživanju ispitanice bile žene od 19 do 46 godina koje su došle na redoviti ginekološki pregled. Anamneza i opći status pokazali su da je riječ o ispitanicama dobroga zdravstvenog stanja. Od 140 žena njih 55 bile su nepušačice, a 94 pušačice koje su bez prekida pušile dulje od šest mjeseci. 90 ih je bilo u kontrolnoj skupini, a 90 ispitanica bolovalo je od primarne idiopatske neplodnosti. Primarna idiopatska neplodnost definirana je nepostignutim začećem unatoč godini dana redovitih i nezaštićenih spolnih odnosa s istim partnerom, s time da je u istraživanju isključen muški čimbenik neplodnosti. Prema broju popušenih cigareta ispitanice su podijeljene u skupinu onih koje puše do deset cigareta na dan te skupinu onih koje puše deset i više cigareta na dan. Četrdeset i pet ispitanica pušilo je do deset cigareta na dan, a njih 40 deset i više cigareta na dan. U ovo su ispitivanje bile uključene žene koje su imale uredan ginekološki nalaz, nisu bolovale od neke kronične bolesti ni uzimale lijekove. Svi muški partneri imali su uredan spermiogram, tj. neuredan spermiogram bio je isključni kriterij. Sva biokemijska ispitivanja obavljena su u Zavodu za biologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.2. Biološki materijal i priprema uzoraka za ispitivanje

Dobiveni uzorci iz cijeloga cervikalnog kanala ispitanica otopljeni su u fosfatnome puferu koncentracije 0,1 M i pH-vrijednosti 7,5. Za istraživanje su upotrijebljene kemikalije analitičke čistoće.

Natrijev karbonat, natrijev hidroksid, natrijev klorid, željezov nitrat, željezov sulfat, živin nitrit, dušična kiselina, sumporna kiselina, mravlja kiselina i natrijev tiocijanat nabavljeni su u tvornici Kemika (Zagreb).

Bakreni sulfat i kalijev natrijev tartarat dobiveni su iz *Alkaloida* (Skoplje, Makedonija).

Sephadex G-50 nabavljen je od tvrtke Pharmacia (Uppsala, Švedska).

35 %-tni formaldehid i askorbinska kiselina dobiveni su iz tvrtke Carlo Erba (Milano, Italija).

Citokrom c i serumski albumin nabavljeni su od tvrtke Sigma (Saint Louis, SAD).

Brij-35, Folin-Ciocâlteuov reagens, trikloroctena kiselina, natrijev ditionit, kalijev ferocijanid, kalijev klorid, kalcijev klorid i magnezijev klorid dobiveni su iz tvrtke Merck (Darmstadt, Njemačka).

Sasson i suradnici (24) te Schiffman i suradnici (107) prvi su opisali tehniku dobivanja cervikalne sluzi za biokemijsku analizu: uzorci sluzi dobiveni su poslije ubrizgavanja sterilne fiziološke otopine u područje cerviksa i naknadnim aspiriranjem otopine nakon 5 minuta. Danas je postupak za uzimanje cervikalnoga obriska u epruvetama pojednostavnjen nastavkom kojim se ispituju citološka svojstva sluzi prema Papanicolaouu.

Pri redovitome ginekološkom pregledu ispitanicama je, uz njihovo dopuštenje, štapićem uzet obrisak iz područja cerviksa i pohranjen u pripadajuću plastičnu epruvetu. Taj se postupak izvodio samo u žena kojima je vaginalnim pregledom utvrđena prijeovulacijska faza menstruacijskoga ciklusa, za koju su Sasson i suradnici (24) smatrali da je najpovoljnije razdoblje za uzimanje biološkoga materijala.

Uzorci sluzi pohranjeni u plastične epruvete (*Copan Sterile R*) istoga su dana preneseni u laboratorij radi daljnje obrade. Svaki je uzorak na 30 minuta stavljen u epruvetu koja je sadržavala 2 mL fosfatnoga pufera pH-vrijednosti 7,5 radi postizanja što veće topljivosti. Razrijeđeni su se uzorci centrifugirali na 3000 okretaja u centrifugi *LC-320 Tehtnica* (Železniki, Slovenija) tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Centrifugiranjem se izdvojio bistar supernatant od tamnijeg taloga, koji je sadržavao krupne netopljive čestice, mukopolisaharide, epitelne stanice i stanične organele. Da bi se stanice razgradile do staničnih organela, dobiveni se talog prema potrebi ponovno homogenizirao u 1,5 mL fosfatnoga pufera pH-vrijednosti 7,5. Tako dobiveni homogenat deset se minuta centrifugirao na 2000 okretaja. U talogu su se nalazili jezgre i dijelovi staničnih membrana, a u supernatantu ostale organele. Supernatant se ponovno centrifugirao na 10.000 xg tijekom 30 minuta. Poslije centrifugiranja u gornjemu se supernatantu nalazila ribosomska frakcija, a u talogu su ostali stanični mitohondriji. Frakcije su se razdvojile, dok se mitohondrijski talog

resuspendirao u 0,8 mL fosfatnoga pufera pH-vrijednosti 7,5. Sve su se frakcije cervikalne sluzi do sljedeće uporabe čuvale u zamrzivaču na 40 °C.
Biokemijska ispitivanja obavljena su na supernatantu cervikalne sluzi i djelomično na organelama stanica iz uzorka obriska cerviksa. Sva ispitivanja na zamrznutim uzorcima provedena su u razdoblju do mjesec dana nakon uzimanja.

4.2.1. Određivanje proteina

Koncentracija proteina određena je tehnikom koju su prvi primijenili Lowry i suradnici (108), a zasniva se na sposobnosti aminokiselina triptofana i tirozina da u lužnatome mediju s ionima bakra i Folin-Ciocâlteuovim reagensom stvaraju plavu obojenost. Nastala boja na sobnoj je temperaturi stabilna nekoliko sati.
U epruvetu smo prebacili 20 µL uzorka i 0,180 mL destilirane vode. Tom smo uzorku dodali 3,0 mL 50 volumnih dijelova 2 %-tne vodene otopine Na_2CO_3 u 0,1 N NaOH te 1 volumni dio jednake količine 1 %-tnoga bakrenoga sulfata i 2 %-tne otopine kalijeva natrijeva tartarata. Slijepa proba sadržavala je 0,2 mL destilirane vode i 3,0 mL reagensa. Nakon 30 minuta svakomu smo uzorku dodali 0,3 mL Folin-Ciocâlteuova reagensa (razrijeđenoga destiliranom vodom u omjeru 1 : 2). Na sobnoj se temperaturi u sljedećih 30 minuta razvila plava obojenost, koja se mjerila u spektrofotometru prema boji slijepe probe pri valnoj duljini od 560 nm. Koncentraciju proteina dobili smo uspoređivanjem intenziteta boje uzorka s bojom standardne otopine serumskoga albumina (mg/mL), čije su vrijednosti nanesene na standardnu krivulju. Dobivene vrijednosti proteina izražene su u mg/mL.

4.2.2. Određivanje tiocijanata

Duhanski dim sadržava toksični cijanid, koji se u organizmu pregrađuje u manje štetan spoj tiocijanat (SCN) (72). On se nalazi u krvnoj plazmi, a iz organizma se izlučuje mokraćom i slinom, i to čak nekoliko tjedana poslije popušene cigarete.
Razina tiocijanata u cervikalnoj sluzi ispitanica mjerena je u skladu s metodom koju su uveli Degiampietro i suradnici (71). U epruveti za ispitivanje pomiješali smo 0,1 mL cervikalne sluzi i 0,3 mL destilirane vode. Toj smo smjesi dodali 0,5 mL reagensa koji se sastojao od 3 g deterdženta Brij-35 otopljenoga u 50 mL destilirane vode i 0,9

mL koncentrirane dušične kiseline (HNO_3). Takav je uzorak stajao na sobnoj temperaturi 10 minuta. U slijepoj probi uzorak je zamijenjen destiliranom vodom. Apsorpciju uzorka izmjerili smo prema slijepoj probi nakon 10 minuta u spektrofotometru na valnoj duljini od 460 nm. Odmah poslije mjerenja u uzorak smo dodali 0,5 mL HNO_3 i 1027 mg živina nitrata. Apsorpciju smo ponovno izmjerili u spektrofotometru pri 460 nm u roku od 30 sekunda. Ako je uzorak sadržavao tiocijanat, stupanj apsorpcije prvoga mjerenja bio je viši od vrijednosti drugoga mjerenja. Koncentracija tiocijanata u µM/L uzorka izračunana je s pomoću formule:

$$C = 2820\ (0{,}9\ A_1 - A_2),$$

gdje je A_1 apsorpcija uzorka prvoga mjerenja, a A_2 apsorpcija uzorka pri drugome mjerenju. Razina tiocijanata u uzorcima cervikalne sluzi ispitanica izražena je u µM/mg proteina ili u µM/mL.

4.2.3. Određivanje vitamina C

Askorbinsku kiselinu ili vitamin C odredili smo u skladu s metodom Shukle i suradnika (101). U epruvetu s 0,5 mL uzorka dodali smo 0,5 mL 20 %-tne otopine trikloroctene kiseline. Smjesu smo dobro promiješali i tijekom 10 minuta centrifugirali na 4000 okretaja s pomoću centrifuge *LC-320 Tehtnica* da bi se istaložili svi denaturirani proteini. Kiseli smo supernatant prebacili u nove epruvete koje su sadržavale 3,0 mL 0,5 %-tne vodene otopine Folin-Ciocâlteuova reagensa. Kao slijepa proba služili su nam 0,5 mL destilirane vode i 0,5 mL 20 %-tne otopine trikloroctene kiseline u 3,0 mL reagensa. Epruvete su 30 minuta stajale na sobnoj temperaturi da bi se razvila obojenost. Otopina vitamina C s reagensom stvara žutozelenu obojenost. Njezin smo intenzitet izmjerili u spektrofotometru *Ultrospec 1000E* (Pharmacia Biotech, Velika Britanija) prema slijepoj probi na valnoj duljini od 700 nm. Izmjerenu apsorpciju uzorka usporedili smo s apsorpcijom poznate količine vitamina C koja je bila nanesena na standardnu krivulju. Dobivene vrijednosti vitamina C izražene su u µg/mg proteina.

4.2.4. Određivanje citokroma P-450

Citokrom P-450 jest hemoprotein koji prenosi kisik u različitim procesima stanične detoksikacije. Tehniku određivanja citokroma P-450 razvili su Omura i Sato (109). Ona se temelji na pojavi da taj hemoprotein u prisutnosti ugljikova monoksida stvara kompleks karakterističnoga apsorpcijskog spektra s maksimumom na 450 nm i minimumom na 490 nm. Koncentraciju citokroma P-450 u ispitivanim uzorcima mjerili smo u skladu s metodom Matsubare i suradnika (81). Tako smo 0,05 mL uzorka razrijedili s 4,95 mL fosfatnoga pufera koncentracije 0,1 M i pH-vrijednosti 7,5. Epruvetu smo odnijeli u digestor i 1 minutu uplinjavali s ugljikovim monoksidom oslobođenim u kemijskoj reakciji između sumporne i mravlje kiseline (81). Poslije uplinjavanja uzorak smo podijelili na dvije probe. Jedna je proba bila slijepa, a druga ispitivani uzorak u koji smo dodali nekoliko kristala natrijeva ditionita. To je snažno redukcijsko sredstvo koje reducira uzorak. Dvije minute nakon uplinjavanja s ugljikovim monoksidom apsorpciju uzorka izmjerili smo u spektrofotometru *Ultrospec 1000E* (Pharmacia Biotech, Velika Britanija) na valnim duljinama od 450 nm i 490 nm. Ako je u uzorku bilo citokroma P-450, maksimalna se apsorpcija razvila na 450 nm, a minimalna na 490 nm (109). Koncentraciju citokroma P-450 izračunali smo iz razlika vrijednosti apsorpcija kod mjerenih valnih duljina i molarnoga ekstincijskog koeficijenta od 104 mM/cm. Dobivene vrijednosti citokroma P-450 izražene su u nm/mg proteina.

4.2.5. Aktivnost enzima rodanaze

Enzim rodanaza (tiosulfat: cijanid sumporne transferaze; E. C. 2.8.1.1.) katalizira kemijsku reakciju u kojoj se toksični cijanid (CN^-) iz duhanskoga dima pregrađuje u manje štetan tiocijanat (SCN). Aktivnost tog enzima odredili smo u skladu s metodom Szczepowskoga i Wooda (73). 20 µL homogenata stanica cervikalnoga kanala dobivenoga nakon centrifugiranja inkubirali smo 2 minute na 37 °C u vodenoj kupelji s 1,0 mL otopine natrijeva tiosulfata koncentracije 5 M i 1,0 mL otopine kalijeva cijanida (KCN) koncentracije 0,91 mM. Inkubaciju smo prekinuli dodavanjem 0,3 mL 35 %-tne vodene otopine formaldehida. U slijepu smo probu, koja je sadržavala ispitivani uzorak, prvo dodali formaldehid koji je denaturirao enzim pa tek

zatim ostale reagense. Nakon inkubacije iz reakcijske smo smjese prenijeli 1,3 mL u novu epruvetu koja je sadržavala 1,3 mL reagensa za određivanje rodanaze prema Sörbu (72). Taj je reagens po 1 mL sadržavao 100 mg željezova nitrata $Fe(NO_3)_3$, 0,2 mL koncentrirane dušične kiseline HNO_3 u 0,8 mL destilirane vode. Smjesu smo promiješali mješalicom *Vortex* i 10 minuta centrifugirali na 2500 xg pri sobnoj temperaturi da bi se istaložile moguće krupne čestice. Sadržaj epruveta prelili smo u spektrofotometrijske kivete i njihovu apsorpciju izmjerili prema slijepoj probi u spektrofotometru *Ultrospec 1000E* (Pharmacia Biotech, Velika Britanija) na valnoj duljini od 560 nm. Dobivene vrijednosti apsorpcije usporedili smo s apsorpcijom poznatih količina tiocijanata (SCN) koji je prošao sve faze određivanja. Aktivnost enzima rodanaze (tiosulfat: cijanid sumporne transferaze) prikazana je u µM stvorenoga tiocijanata po minuti po mg izmjerenih proteina.

4.2.6. Aktivnost enzimskoga kompleksa citokrom-oksidaze

Enzimski kompleks citokrom-oksidaza (ferocitokrom c oksidoreduktaza; E. C. 1.1.3.1.) terminalni je enzim mitohondrijskoga lanca za prijenos elektrona koji služi pri sintezi staničnoga ATP-a. Željeli smo utvrditi mijenja li cijanid iz duhanskoga dima cigareta aktivnost tog enzima u mitohondrijskoj frakciji stanica vrata maternice, a time i količinu stanične energije.

Za određivanje aktivnosti citokrom-oksidaze trebalo je reducirati citokrom c, koji je supstrat kemijske reakcije. Redukciju smo izveli s pomoću nekoliko kristala natrijeva ditionita. Dobiveni spoj pročistio se prolaskom kroz kolonu smole *Sephadex G-50* (Pharmacia, Švedska) u skladu s metodom koju su opisali Yonetani i Ray (82). Reducirani citokrom c na koloni *Sephadexa G-50* razdvojio se u dvije frakcije, pri čemu se citokrom c nalazio u sporijoj, intenzivno crveno obojenoj frakciji. Koncentracija citokroma c nakon prolaska kolonom iznosila je 1 mg/mL otopine.

Aktivnost enzimskoga kompleksa citokrom-oksidaze odredili smo u skladu s metodom koju su prvi primijenili Wharton i Tzagoloff (110). U spektrofotometrijsku smo kivetu, koja je sadržavala 2,5 mL destilirane vode i 0,3 mL fosfatnoga pufera pH-vrijednosti 7,5, dodali 50 µL ispitivanoga uzorka mitohondrija stanica cervikalne sluzi i 50 µL otopine reduciranoga citokroma c. Apsorpciju smo izmjerili u spektrofotometru, na valnoj duljini od 550 nm, a prema slijepoj probi koja je umjesto

uzorka sadržavala destiliranu vodu. Zatim smo u isti uzorak dodali 10 µL zasićene otopine kalijeva ferocijanida i ponovno izmjerili apsorpciju na 550 nm. Ako je u ispitivanome uzorku postojala aktivnost citokrom-oksidaze, vrijednost drugoga mjerenja bila je niža od vrijednosti prvoga mjerenja. Iz razlike mjerenja i molarnoga ekstinkcijskog koeficijenta od 27,7 µM/cm za citokrom c dobili smo koncentraciju citokrom-oksidaze koja je izražena u µM po minuti po mg proteina.

4.2.7. Lipidna peroksidacija

Već je prije spomenuto da slobodni radikali kisika oštećuju strukturu staničnih lipida. Nastala peroksidacija viših masnih kiselina mjeri se tehnikom koju su prikazali Ohkawa i suradnici (93) te Satoh (111). Ona se zasniva na pojavi da lipidnom peroksidacijom nastaje spoj malondialdehid, koji u kiselome mediju (pH-vrijednosti 2,0) pri visokoj temperaturi s tiobarbiturnom kiselinom stvara ljubičasto obojeni kompleks.

Reakciju smo izveli tako što smo u 0,2 mL uzorka dodali 1,3 mL destilirane vode, 1,5 mL 20 %-tne otopine octene kiseline i 1,5 mL 0,8 %-tne vodene otopine tiobarbiturne kiseline. Slijepa je proba umjesto uzorka sadržavala destiliranu vodu i reagens. Smjesu smo stavili u kipuću vodenu kupelj tijekom 30 minuta. Kad se ohladila, u uzorak smo dodali 1,0 mL destilirane vode i 5,0 mL smjese n-butanola i piridina u omjeru volumnih dijelova 15 : 1. Dobivenu smo smjesu 30 minuta centrifugirali u centrifugi *LC-320 Tehtnica* na 5000 okretaja. Apsorpciju gornjega n-butanola izmjerili smo u spektrofotometru *Ultrospec 1000E* (Pharmacia Biotech, Velika Britanija) prema slijepoj probi i pri valnoj duljini od 532 nm. Intenzitet obojenosti izražen u jedinicama apsorpcije usporedili smo s količinom malondialdehida iz standardne krivulje koju je dao Satoh (111). Dobiveni rezultati prikazani su u nm malondialdehida po mg proteina.

4.2.8. Ukupni antioksidacijskii kapacitet cervikalne sluzi

Ukupni antioksidacijski kapacitet, tj. ukupna količina antioksidansa u cervikalnoj sluzi, određivali smo mjerenjem redukcije iona željeza, poznate pod nazivom FRAP (engl. *ferric reducing ability of plasma*), koju su opisali Benzie i Strain (112). U 0,750

mL acetatnoga pufera pH-vrijednosti 3,6, koji je sadržavao 2,4,6-tripiridil-s-triazin i željezov klorid, mikropipetom smo dodali 0,025 mL uzorka i 0,075 mL destilirane vode. Apsorpciju uzorka izmjerili smo u spektrofotometru *Ultrospec 1000E* (Pharmacia Biotech, Velika Britanija) na valnoj duljini od 593 nm prema slijepoj probi. Slijepa je proba umjesto uzorka sadržavala destiliranu vodu. Stupanj apsorpcije uzorka izmjerili smo dva puta: odmah nakon što smo unijeli kivetu u spektrofotometar i poslije 6 minuta. Ako je u uzorku bilo antioksidansa, oni su reducirali feri-oblik željeza (Fe^{3+}) u njegov fero-oblik (Fe^{2+}), čime se smanjila apsorpcija nakon drugoga mjerenja. Usporedbom razlike između dvaju mjerenja (0. i 6. minuta) s vrijednostima standardne otopine $FeSO_4$ (obično 500 µM) izračunali smo antioksidacijsku vrijednost ispitivane otopine i izrazili je kao FRAP u µM/L. Što je vrijednost FRAP-a viša, to je antioksidacijski kapacitet ispitivane tvari veći.

4.2.9. Određivanje superoksida

Superoksid smo odredili u skladu s metodom Inouea i Koyame (114). U 1,1 mL fosfatnoga pufera pH-vrijednosti 7,6 dodali smo 0,04 mL cervikalne sluzi i 0,04 mL citokroma c (1,0 mg/mL). Uzorak smo pomiješali i prebacili u kivetu spektrometra. Stupanj obojenosti izmjerili smo s pomoću spektrometra *Ultrospec 1000E* (Pharmacia Biotech, Velika Britanija) pri valnoj duljini od 550 nm. Mjerenje smo proveli u 0. i 1. minuti, a koncentraciju smo dobili iz razlike mjerenja. Koncentracije uzoraka prikazane su u µM/mL/min.

4.2.10. Određivanje reduciranoga glutationa (GSH)

GSH je glavni stanični i tkivni antioksidans. Njegovu smo koncentraciju odredili u skladu s Langovom metodom (113). U 0,1 mL cervikalne sluzi dodali smo 0,05 mL 20 %-tne trikloroctene kiseline (CCl_3COOH) te je centrifugirali da bi se oborili proteini. Dobivenu tekućinu prebacili smo u epruvetu koja je sadržavala 0,9 mL fosfatnoga pufera pH-vrijednosti 7,6. U tako dobiveni uzorak dodali smo 0,1 mL otopine spoja ditiobisnitrobenzojeve kiseline (DTNB) koncentracije 0,5 mM. Stupanj obojenosti mjerili smo u spektrometru *Ultrospec 1000E* (Pharmacia Biotech, Velika

Britanija) pri valnoj duljini od 412 nm, a prema poznatoj koncentraciji GSH. Koncentracije uzoraka prikazane su u µM/mL.

4.2.11. Određivanje ukupnoga antioksidacijskog kapaciteta (FRAP) u uzorku

FRAP smo odredili u skladu s metodom Benziea i Straina (112). U acetatni pufer pH-vrijednosti 3,6 i koncentracije 300 mM dodali smo 10 mM/L kemikalije 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ). Za rad smo uzeli 3,5 mL dobivene otopine, kojoj smo dodali 2,5 mL 20 mM/L željezova klorida ($FeCl_3$). Tako smo dobili FRAP otopinu.. Za određivanje antioksidacijskoga kapaciteta uzeli smo 0,75 mL FRAP reagensa, 0,025 mL cervikalne sluzi i 0,075 mL destilirane vode. Obojenost uzorka (apsorpciju) mjerili smo u spektrofotometru pri valnoj duljini od 593 nm. Apsorpciju boje izmjerili smo dva puta: u 0. i 6. minuti. Iz razlike mjerenja izračunali smo ukupni antioksidacijski kapacitet, koji je prikazan u µM/L, prema standardnoj otopini željezova sulfata ($FeSO_4$).

4.2.12. Određivanje dodatne oksidacije proteina (AOPP)

AOPP raste u organizmu kad se poveća količina kisikovih radikala. Mjerili smo ga u skladu s metodom Witko-Sarsata i suradnika (115). U 0,5 mL cervikalne sluzi koja je bila pet puta razrijeđena destiliranom vodom dodali smo 0,025 mL otopine natrijeva jodida i apsorpciju odmah izmjerili u spektrofotometru pri valnoj duljini od 390 nm. Uzorku smo zatim dodali 0,05 mL koncentrirane octene kiseline i ponovili mjerenje. Iz razlika apsorpcija izračunali smo koncentraciju AOPP-a izraženu u µM/L, a prema standardu kloramina T.

4.3. Statistička obrada podataka

Kategorijski podatci prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički su podatci opisani srednjom vrijednosti (aritmetičkom sredinom) i standardnom devijacijom pri raspodjelama koje slijede normalnu vrijednost, a u ostalim slučajevima središnjom vrijednosti (medijanom) i granicama interkvartilnoga raspona. Normalnost raspodjele numeričkih varijabla testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabla između dviju neovisnih skupina testirane su Studentovim t-testom, a pri odstupanju od normalne raspodjele Mann-Whitneyjevim U-testom. Razlika normalno raspodijeljenih varijabla između više od dviju neovisnih skupina testirana je analizom varijanca, a pri odstupanju od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom. Razlike kategorijskih varijabla testirane su χ^2-testom te, prema potrebi, Fisherovim egzaktnim testom. Povezanost numeričkih varijabla čija je raspodjela odstupala od normalne ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ (rho). Provedena je ROC analiza i utvrđene su osjetljivost i specifičnost pojedinih varijabla kao dijagnostičkoga testa u odnosu prema neplodnosti. Podatci dobiveni ROC analizom iskorišteni su za izračun omjera vjerojatnosti za neplodnost pri nalazu višemu od kritične koncentracije pojedinoga parametra. Sve P-vrijednosti dvostrane su. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Podatci su analizirani statističkim postupcima s pomoću programa *MedCalc Statistical Software*, verzija 14.8.1. (98).

5. REZULTATI

Ukupno su analizirani uzorci 140 ispitanica , koje su bile i pušačice i nepušačice. Pušačice su podijeljene u dvije podskupine. Prvu su činile ispitanice koje su konzumirale do deset cigareta na dan, a drugu skupinu ispitanice koje su konzumirale deset i više cigareta na dan (tablica 2.). Takva je podjela napravljena u skladu s podatkom da nijedna ispitanica nije pušila od 16 do 19 cigareta na dan.

Tablica 2. Pregled ispitanica

Ispitanice		N	%
Nepušačice		55	39,3
Pušačice	≤ 10 cigareta na dan	45	32,1
	> 10 cigareta na dan	40	28,6
Ukupno		140	100

Sve su ispitanice podijeljene u pet dobnih skupina, od 18 do 50 godina, kao što je prikazano u tablici 3. Nije bilo statistički značajne razlike u dobi ispitanica među skupinama (χ^2 = 2,487; P = 0,146).

Tablica 3. Pregled ispitanica prema dobnim skupinama

Dob (god.)	Nepušačice		Pušačice			
			≤ 10 cigareta na dan		> 10 cigareta na dan	
	N	%	N	%	N	%
18 – 20	4	7,3	2	4,4	2	5
21 – 30	30	54,5	15	33,4	16	40
31 – 40	17	30,9	21	46,7	14	35
41 – 50	4	7,3	7	15,5	8	20
Ukupno	55	39,2	45	32,1	40	28,6

U tablici 4. prikazana je raspodjela pušačica prema broju popušenih cigareta.

Tablica 4. Pregled pušačica prema broju popušenih cigareta na dan

Broj cigareta	Broj ispitanica	%
1 – 3	5	5,9
4 – 6	20	25,3
7 – 10	20	23,5
11 – 15	4	4,7
20 – 22	29	34,1
23 – 25	2	2,4
26 i više	5	5,9

Ukupni proteini u otopini cervikalne sluzi, homogenatu površinskih stanica vrata maternice i njihovim mitohondrijima prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Ukupni proteini u otopini cervikalne sluzi, homogenatu površinskih stanica vrata maternice i njihovim mitohondrijima

		Cervikalna sluz (mg/mL)	Homogenat (mg/mL)	Mitohondriji (mg/mL)
Nepušačice		6,94 ± 1,59	5,43 ± 1,05	3,62 ± 0,87
Pušačice	≤ 10 cigareta na dan	7,16 ± 1,68	5,64 ± 1,01	3,77 ± 0,84
	> 10 cigareta na dan	7,28 ± 1,82	5,59 ± 1,17	3,49 ± 0,86
ANOVA. Cervikalna sluz: F = 2,494, P = 0,088; homogenat: F = 0,845, P = 0,919; mitohondriji: F = 0,096, P = 0,909				

F – vrijednost testa; P – statistička vjerojatnost

Količina ukupnih proteina u otopini cervikalne sluzi i ispitivanim frakcijama površinskih stanica vrata maternice pokazuje male razlike koje nisu statistički značajne. Iz tih se rezultata može zaključiti da dugotrajno pušenje većeg broja

cigareta ne utječe na ukupnu količinu proteina u cervikalnoj sluzi i stanicama vrata maternice žena koje konzumiraju više od deset cigareta na dan.

Prvi promatrani parametar u pušačica bila je koncentracija tiocijanata u otopini cervikalne sluzi ispitanica. Naša ispitivanja prikazana u tablici 6. pokazuju da cervikalni sekret svih ispitanica sadržava određenu količinu tiocijanata.

Tablica 6. Količina tiocijanata u cervikalnoj sluzi ispitanica

Ispitanice		X (nm/mL)	SD	P*
Nepušačice (a)		7,26	1,36	a : b < 0,001
Pušačice	≤ 10 cigareta na dan (b)	16,87	3,25	a : c < 0,001
	> 10 cigareta na dan (c)	25,70	2,33	b : c < 0,001
ANOVA. F = 34,905; P < 0,001				

X – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; * – Bonferronijev *post hoc* test; F – vrijednost testa; P – statistička vjerojatnost

Najmanja količina tiocijanata nalazi se u cervikalnoj sluzi nepušačica. Ona je za 53 % manja od količine tiocijanata u cervikalnoj sluzi žena koje konzumiraju do deset cigareta na dan. Vrlo velika količina tiocijanata izmjerena je u cervikalnome sekretu žena koje su pušile deset i više cigareta svakoga dana. Ona je čak 17,3 puta veća od količine tiocijanata kod nepušačica i 7,5 puta veća od one u ispitanica s navikom pušenja do deset cigareta na dan.

Sljedeći parametar ispitivan u ovoj studiji bila je askorbinska kiselina ili vitamin C. Rezultati u tablici 7., koja prikazuje količinu vitamina C u sekretu vrata maternice ispitanica, pokazuju da pušenje cigareta smanjuje količinu askorbinske kiseline u cervikalnoj sluzi ispitanica. Pušenje cigareta u ispitanica koje konzumiraju do 10 cigareta na dan u odnosu prema nepušačicama snižava razinu vitamina C za 2,5 puta, a kod ispitanica koje puše najmanje deset cigareta dnevno za čak četiri puta. Istodobno, razlike između dviju navedenih podskupina pušačica na razini su od oko 39 %.

Tablica 7. Količina askorbinske kiseline u sekretu vrata maternice

Ispitanice		X (µ/mL)	SD	P*
Nepušačice		42,08	3,81	a : b < 0,001
Pušačice	≤ 10 cigareta na dan	16,73	2,28	a : c < 0,001
	> 10 cigareta na dan	10,16	1,22	b : c < 0,001
ANOVA. F = 27,421; P < 0,001				

X – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; * – Bonferronijev *post hoc* test; F – vrijednost testa; P – statistička vjerojatnost

Tiocijanat izmjeren u cervikalnoj sluzi ispitanica nastao je djelovanjem enzima rodanaze. U ovoj smo studiji ispitivali aktivnost rodanaze u staničnome homogenatu površinskih stanica vrata maternice koje izlučuju cervikalnu sluz.
U tablici 8. prikazana je aktivnost rodanaze u staničnome homogenatu cervikalnih stanica ispitanica.

Tablica 8. Aktivnost enzima rodanaze u homogenatu površinskih stanica vrata maternice

Ispitanice		X (µM/min/mg proteina)	SD
Nepušačice		11,63	2,23
Pušačice	≤ 10 cigareta na dan	12,21	2,56
	> 10 cigareta na dan	12,04	3,43
ANOVA. F = 0,673; P = 0,513			

X – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; F – vrijednost testa; P – statistička vjerojatnost

Rezultati u tablici 8. pokazuju malu i statistički neznačajnu razliku među skupinama. Aktivnost rodanaze gotovo je jednaka kod svih pušačica. Na temelju podataka iz tablice 8. možemo reći da dugotrajno pušenje cigareta ne mijenja aktivnost tog enzima. Očito je da cijanid i mnogobrojne sastavnice duhanskoga dima cigareta ne povećavaju ili inhibiraju aktivnost enzima rodanaze u cervikalnome sekretu žena.

U ovome je istraživanju određena količina kromoproteina citokroma P-450, koji sudjeluje pri oksidaciji mnogih spojeva stranih ljudskomu organizmu. Količina citokroma P-450 u homogenatu površinskih stanica vrata maternice naših ispitanica prikazana je u tablici 9.

Tablica 9. Količina citokroma P-450 u homogenatu površinskih stanica vrata maternice

Ispitanice		X (nm/mg proteina)	SD	P*
Nepušačice (a)		0,09	0,04	a : b < 0,001
Pušačice	≤ 10 cigareta na dan (b)	0,24	0,12	a : c < 0,001
	> 10 cigareta na dan (c)	1,04	0,22	b : c < 0,001
ANOVA. F = 21,123; P < 0,001				

X – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; * – Bonferronijev *post hoc* test; F – vrijednost testa; P – statistička vjerojatnost

Pušenje cigareta povećava količinu citokroma P-450 u homogenatu cervikalnih stanica. Tako nepušačice imaju oko 22 puta nižu koncentraciju citokroma P-450 od žena koje puše 10 i više cigareta na dan. Istodobno, razlika u koncentraciji citokroma P-450 između podskupina ispitanica koje puše iznosi 4,3 puta. Ti rezultati pokazuju da neke od sastavnica duhanskoga dima nakon višegodišnjega pušenja povisuju koncentraciju citokroma P-450, vjerojatno na razini gena za sintezu tog proteina ili njegove glasničke molekule RNK-a.

Poznato je da cijanid, od brojnih sastavnica duhanskoga dima cigarete, inhibira aktivnost mitohondrijskoga enzima citokrom-oksidaze. Taj je enzim terminalna oksidaza u lancu za prijenos elektrona koji sudjeluje u sintezi staničnoga ATP-a. Aktivnost citokrom-oksidaze u naših ispitanica mjerili smo u mitohondrijima stanica vrata maternice. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Aktivnost enzima citokrom-oksidaze u mitohondrijskoj frakciji površinskih stanica vrata maternice

Ispitanice		X (nm/mg proteina)	SD	P*
Nepušačice (a)		14,34	4,45	a : b < 0,001
Pušačice	≤ 10 cigareta na dan (b)	1,37	6,97	a : c < 0,001
	> 10 cigareta na dan (c)	0,14	0,07	b : c < 0,001
ANOVA. F = 20,150; P < 0,001				

X – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; * – Bonferronijev *post hoc* test; F – vrijednost testa; P – statistička vjerojatnost

Naša ispitivanja pokazuju statistički značajno manju aktivnost enzima citokrom-oksidaze kod ispitanica koje su pušile. Ta razlika između žena koje ne puše i onih koje puše 10 i više cigareta na dan iznosi čak oko sto puta. Rezultati ispitivanja pokazuju da pušenje manje od 10 cigareta na dan smanjuje aktivnost citokrom-oksidaze u mitohondrijima uzoraka ispitanica za 29 %, odnosno oni pokazuju veliku ovisnost aktivnosti enzima citokrom-oksidaze o broju popušenih cigareta.

Među brojnim sastavnicama duhanskoga dima cigareta nalaze se i jaki oksidansi i slobodni radikali kisika, koji mogu oštetiti stanične makromolekule kao što su DNK, RNK, proteini, lipidi i ugljikohidrati. Lipidi grade staničnu membranu i membrane svih organela. Lipidne molekule lako se oksidiraju jer sadržavaju brojne dvostruke i trostruke veze između atoma ugljika i vodika. Djelovanjem slobodnih radikala kisika nastaje oštećenje lipida poznato pod nazivom *lipidna peroksidacija*. U tom procesu duge se molekule nezasićenih masnih kiselina cijepaju na male segmente, čime se mijenja permeabilnost staničnih organela. Nastanak lipidne peroksidacije siguran je parametar djelovanja slobodnih radikala na stanicu. U ovome smo projektu mjerili lipidnu peroksidaciju u cervikalnoj sluzi i homogenatu stanica vrata maternice naših ispitanica. U tablici 11. prikazana je lipidna peroksidacija u cervikalnoj sluzi ispitanica.

Tablica 11. Lipidna peroksidacija u cervikalnoj sluzi žena

Ispitanice		X (nm malondialdehida/mg proteina)	SD
Nepušačice		1,12	0,01
Pušačice	≤ 10 cigareta na dan	1,26	0,03
	> 10 cigareta na dan	1,15	0,03
ANOVA. F = 2,398; P = 0,109			

X – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; F – vrijednost testa;
P – statistička vjerojatnost

U cervikalnoj sluzi svih ispitanica postoji vrlo mala količina lipidnih peroksida mjerenih kao spoj malondialdehid. Među promatranim skupinama nema statističke razlike, a svi se uzorci međusobno razlikuju na razini od 10 %.

Pretpostavljamo da je sva količina izmjerenoga lipidnoga peroksida došla u cervikalnu sluz difuzijom iz krvotoka ili iz razgrađenih epitelnih stanica površine vrata maternice. Da bismo to provjerili, izmjerili smo lipidnu peroksidaciju u homogenatu površinskih stanica vrata maternice naših ispitanica nepušačica i pušačica nakon centrifugiranja cervikalne sluzi. Rezultati tog mjerenja prikazani su u tablici 12.

Tablica 12. Lipidna peroksidacija u homogenatu pokrovnih epitelnih stanica iz vrata maternice ispitanica

Ispitanice		X (nm malondialdehida / mg proteina)	SD	P*
Nepušačice (a)		36,23	1,48	a : b < 0,001
Pušačice	≤ 10 cigareta na dan (b)	42,56	1,62	a : c < 0,001
	> 10 cigareta na dan (c)	55,82	2,21	b : c < 0,001
ANOVA. F = 29,547; P < 0,001				

X – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; * – Bonferronijev *post hoc* test;
F – vrijednost testa; P – statistička vjerojatnost

Pušenje utječe na količinu lipidnih peroksida, mjerenih kao malondialdehid, u sekrecijskim stanicama cervikalnoga kanala. Najveća količina lipidne peroksidacije izmjerena je u staničnome homogenatu žena koje su pušile 10 i više cigareta na dan. Kod njih je lipidna peroksidacija 1,5 puta veća od one u ispitanica koje ne puše. Istodobno je lipidna peroksidacija u staničnome homogenatu ispitanica koje su pušile do 10 cigareta na dan veća za 26 % u odnosu na lipidnu peroksidaciju žena koje ne puše. Mnoga su ispitivanja pokazala da pušenje smanjuje ukupne antioksidanse kod aktivnih pušača. Željeli smo izmjeriti kolika je količina svih antioksidansa (FRAP) u cervikalnoj sluzi ispitanica, odnosno smanjuje li pušenje cigareta osim koncentracije vitamina C i koncentraciju ostalih antioksidansa. Vrijednosti ukupnoga antioksidacijskog kapaciteta cervikalne sluzi skupine nepušačica i obiju skupina pušačica cigareta prikazane su u tablici 13.

Tablica 13. Ukupni antioksidacijski kapacitet u cervikalnoj sluzi ispitanica

Ispitanice		X (µM/L)	SD	P*
Nepušačice (a)		7080	532	a : b < 0,001
Pušačice	≤ 10 cigareta na dan (b)	5997	628	a : c < 0,001
	> 10 cigareta na dan (c)	4761	491	b : c < 0,001
ANOVA. F = 29,547; P < 0,001				

X – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; * – Bonferronijev *post hoc* test; F – vrijednost testa; P – statistička vjerojatnost

Najvišu vrijednost ukupne antioksidacijske aktivnosti, izraženu kao FRAP, ima cervikalna sluz ispitanica koje nisu pušile. Nešto niža vrijednost izmjerena je u cervikalnoj sluzi žena koje su pušile do deset cigareta na dan. U cervikalnoj sluzi žena koje su konzumirale više od deset cigareta na dan statistički je manja količina ukupnih antioksidansa koja je, prema vrijednostima za FRAP kod nepušačica, manja za 34 %.

U tablici 14. prikazana je povezanost nekih promatranih parametara Spearmanovim rho-koeficijentom povezanosti kod ispitanica s navikom pušenja. Prikazani su odnosi

između tiocijanata i vitamina C, tiocijanata i aktivnosti enzima citokrom-oksidaze, tiocijanata i koncentracije citokroma P-450 te vitamina C i količine citokroma P-450.

Tablica 14. Korelacija između pojedinih parametara iz sekreta vrata maternice ispitanica s navikom pušenja

Parovi varijabla	r_S	P
vitamin C – cit. P-450	– 0,16	0,351
tiocijanat – vitamin C	– 0,45	0,001
tiocijanat – cit. P-450	0,47	0,030
tiocijanat – cit. oksidaza	– 0,72	0,001

r_S – Spearmanov koeficijent povezanosti; P – statistička vjerojatnost

U tablici 14. možemo vidjeti da u ispitanica s navikom pušenja nije postojala statistički značajna razlika između vitamina C i količine citokroma P-450. No, nađena je pozitivna povezanost između količine tiocijanata i citokroma P-450. Također, nađena je pozitivna povezanost tiocijanata prema količini askorbinske kiseline (vitamina C) i aktivnosti enzima citokrom-oksidaze. Potvrđena je obrnuta povezanost između koncentracije tiocijanata i koncentracije vitamina C. Tako se brojem popušenih cigareta povisuje koncentracija tiocijanata i smanjuje količina vitamina C. Između količine tiocijanata i aktivnosti enzima citokrom-oksidaze također postoji obrnuta povezanost, što znači da je porast količine tiocijanata povezan s padom aktivnosti enzima citokrom-oksidaze u mitohondrijskoj frakciji sekrecijskih stanica vrata maternice naših ispitanica.

Promatraju li se korelacije prikazane u tablici 14., možemo uočiti da postoje dvije skupine parametara: oni koji su statistički različiti i oni koji se statistički razlikuju. Parametrima koji su statistički različiti, a to su korelacije između tiocijanata i askorbinske kiseline te tiocijanata i aktivnosti enzima citokrom-oksidaze, zajedničko je to što su usko povezani s cijanidom iz duhanskoga dima cigareta. Cijanid se detoksicira i pretvara u manje štetan tiocijanat, čija količina raste s brojem popušenih cigareta. Istodobno, cijanid inhibira aktivnost mitohondrijskoga enzima citokrom-oksidaze. Poznato je da je u krvnoj plazmi, mokraći, slini, leukocitima i nekim organima pušača razina vitamina C niža. Ta se pojava može povezati s povećanom redukcijom vitamina C potrebnom za razgradnju slobodnih radikala iz duhanskoga

dima cigareta. Danas je poznato i da cijanid iz duhanskoga dima može stvarati neke od slobodnih radikala, što utječe na koncentraciju vitamina C u organizmu pušača. Analizirali smo cervikalnu sluz s obzirom na to boluje li ispitanica od neplodnosti odnosno puši li cigarete. Uspoređene su koncentracije superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a te FRAP-a. Ukupno je bilo 90 ispitanica, od kojih je 58 nije bilo neplodno, a 32 ispitanice imale su dijagnozu neplodnosti. Pušilo je 29 ispitanica, od kojih je njih 19 pušilo do 10 cigareta na dan. Deset ispitanica pušilo je više od 10 cigareta na dan. Od ukupnoga broja ispitanica oboljelih od neplodnosti njih 13 (40,61 %) pušilo je, a onih koje ne boluju od neplodnosti, no puše, bilo je 16 (27,6 %), što nije bila statistički značajna razlika (χ^2 = 1,605; P = 0,205). Primjećujemo da je većina žena imala uredan indeks tjelesne mase. Od 58 žena koje nisu bolovale od neplodnosti njih osam imalo je prekomjernu tjelesnu masu, a pet ispitanica bilo je pretilo. U skupini ispitanica oboljelih od primarne neplodnosti od njih 32 šest ispitanica imalo je prekomjernu tjelesnu masu i isto je toliko njih bilo pretilo.

Analizirali smo dob i indeks tjelesne mase ispitanica s obzirom na neplodnost. Nije bilo statistički značajne razlike u dobi i indeksu tjelesne mase, što je prikazano u tablici 15.

Tablica 15. Dob i indeks tjelesne mase ispitanica s obzirom na neplodnost

	Neplodnost	N	C	25. P.	75. P.	U	P
Dob (god.)†	Ne	58	29	18	35	–1,249	0,212
	Da	32	30	18	35		
Indeks tjelesne mase (kg/m^2)	Ne	58	22,23	20,20	24,91	–1,859	0,063
	Da	32	23,28	21,71	27,02		

C – medijan; 25. P. – 25. percentil; 75. P. – 75. percentil; U – vrijednost Mann-Whitneyjeva testa; P – statistička vjerojatnost; † – dob je prikazana medijanom i najnižom te najvišom vrijednosti

Nadalje, analizirali smo koncentracije superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a te FRAP-a, čija je koncentracija izmjerena iz uzoraka cervikalne sluzi. Ispitanice oboljele od neplodnosti imale su statistički značajno višu koncentraciju superoksida O_2 i GSH-a te niže vrijednosti AOPP-a i FRAP-a u odnosu prema ispitanicama koje nisu bolovale

od neplodnosti. U tablici 16. prikazane su vrijednosti koncentracija navedenih varijabla s obzirom na neplodnost.

Tablica 16. Koncentracije superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a te FRAP-a s obzirom na neplodnost

	Neplodnost	N	C	25. P.	75. P.	U	P
Superoksid O_2 (µM/min/mL)	Ne	58	3,11	2,06	5,86	–4,384	< 0,001
	Da	32	6,19	4,23	10,84		
GSH (µM/mL)	Ne	58	15,24	13,67	22,15	–6,145	< 0,001
	Da	32	30,86	24,22	56,43		
AOPP (µM/L)	Ne	58	22,37	17,27	33,15	–7,688	< 0,001
	Da	32	3,89	2,68	7,42		
FRAP (µMFESO4/L)	Ne	58	265,50	244,20	290,45	–6,971	< 0,001
	Da	32	173,15	142,70	201,70		

C – medijan; 25. P. – 25. percentil; 75. P. – 75. percentil;

U – vrijednost Mann-Whitneyjeva testa; P – statistička vjerojatnost

Slična analiza učinjena je s obzirom na naviku pušenja. Naime, 61 ispitanica istraživanja nije pušila, dok je njih 29 pušilo. Nije bilo razlike s obzirom na dob i indeks tjelesne mase, što je prikazano u tablici 17.

Tablica 17. Dob ii indeks tjelesne mase ispitanica s obzirom na pušenje cigareta

	Pušenje cigareta	N	C	25. P.	75. P.	U	P
Dob (god.)†	Ne	61	29	18	35	–0,143	0,886
	Da	29	29	18	35		
Indeks tjelesne mase (kg/m^2)	Ne	61	23,05	20,80	25,91	–0,445	0,657
	Da	29	22,68	20,66	25,56		

C – medijan; 25. P. – 25. percentil; 75. P. – 75. percentil;

U – vrijednost Mann-Whitneyjeva testa; P – statistička vjerojatnost;

† – dob je prikazana medijanom i najnižom te najvišom vrijednosti

Analizirali smo i koncentracije superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a te FRAP-a izmjerenih iz uzoraka cervikalne sluzi s obzirom na pušenje cigareta. Žene s navikom pušenja imale su statistički značajno višu koncentraciju svih navedenih varijabla. Koncentracija superoksida O_2 bila je više nego dvostruko viša u ispitanica koje su konzumirale duhan. Slični su rezultati dobiveni i za koncentracije GSH-a. Vrijednost FRAP-a i AOPP-a bila je oko dva odnosno tri puta niža u ispitanica koje su pušile. U tablici 18. prikazane su vrijednosti koncentracija navedenih varijabla s obzirom na pušenje.

Tablica 18. Koncentracije superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a te FRAP-a s obzirom na pušenje cigareta

	Pušenje cigareta	N	C	25. P.	75. P.	U	P
Superoksid O_2 (µM/min/mL)	Ne	61	3,12	2,07	4,30	–6,537	< 0,001
	Da	28	8,47	6,82	11,25		
GSH (µM/mL)	Ne	61	15,74	13,79	22,38	–6,402	< 0,001
	Da	28	34,28	27,41	57,44		
AOPP (µM/L)	Ne	61	12,74	9,20	31,55	–4,917	< 0,001
	Da	29	3,92	2,81	14,58		
FRAP (µMFESO$_4$/L)	Ne	61	274,60	204,80	297,10	–4,701	< 0,001
	Da	29	176,50	150,40	235,40		

C – medijan; 25. P. – 25. percentil; 75. P. – 75. percentil;
U – vrijednost Mann-Whitneyjeva testa; P – statistička vjerojatnost

U svih smo ispitanica proveli dodatnu analizu (bez obzira na neplodnost) s obzirom na količinu cigareta konzumiranih tijekom dana. Kao što prikazuje tablica 19., nije bilo razlike u dobi i indeksu tjelesne mase među ispitanicama koje ne puše, onima koje puše do deset cigareta na dan te onima koje puše više od deset cigareta na dan.

Tablica 19. Dob i indeks tjelesne mase ispitanica s obzirom na količinu cigareta konzumiranih tijekom dana

	Količina cigareta	N	C	25. P.	75. P.	χ^2	P
Dob (god.)†	nepušačice	62	29	18	35	0,023	0,989
	pušačice ≤ 10 cig.	18	29	24	35		
	pušačice > 10 cig.	10	29	18	34		
Indeks tjelesne mase (kg/m^2)	nepušačice	62	23,00	20,76	25,91	5,396	0,067
	pušačice ≤ 10 cig.	18	23,77	21,45	30,47		
	pušačice > 10 cig.	10	20,84	20,08	22,68		

C – medijan; 25. P. – 25. percentil; 75. P. – 75. percentil;

χ^2 – vrijednost Kruskal-Wallisova testa; P – statistička vjerojatnost;

† – dob je prikazana medijanom i najnižom te najvišom vrijednosti

Analizom koncentracije superoksida O_2 i GSH-a za sve ispitanice (bez obzira na neplodnost) pokazali smo da postoji razlika s obzirom na količinu cigareta konzumiranih tijekom dana. Nađena je razlika u koncentracijama svih navedenih varijabla. Najniže koncentracije imale su ispitanice koje nisu pušile, i to statistički značajne u odnosu na one koje su pušile do deset i više cigareta na dan (tablica 20.). Ispitanice koje su pušile više od deset cigareta na dan imale su najviše koncentracije superoksida O_2 i GSH-a, znatno više od koncentracija u ispitanica koje su pušile do deset cigareta na dan. Isto tako, ispitanice koje su pušile imale su niže vrijednosti AOPP-a i FRAP-a, i to razmjerne količini cigareta konzumiranih tijekom dana.

Tablica 20. Analiza koncentracija superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a s obzirom na količinu cigareta konzumiranih tijekom dana, bez obzira na neplodnost

	Količina cigareta	N	C	25. P.	75. P.	U	P
Superoksid O_2 (μM/min/mL)†	nepušačice (a)	62	3,11	2,07	4,30	a : b = –5,416	< 0,001
	pušačice ≤ 10 cig. (b)	18	7,82	5,86	9,95	a : c = –4,959	< 0,001
	pušačice > 10 cig. (c)	10	12,51	8,47	13,58	b : c = –2,541	0,011
GSH (μM/mL)‡	nepušačice (a)	62	15,58	13,73	22,38	a : b = –5,381	< 0,001
	pušačice ≤ 10 cig. (b)	18	29,11	25,34	44,23	a : c = –4,966	< 0,001
	pušačice > 10 cig. (c)	10	74,24	34,28	83,80	b : c = –2,925	0,003
AOPP (μM/L)§	nepušačice (a)	62	31,80	12,74	38,41	a : b = –3,946	< 0,001
	pušačice ≤ 10 cig. (b)	18	11,36	8,74	28,60	a : c =–3,867	< 0,001
	pušačice >10 cig. (c)	10	3,97	2,81	14,58	b : c = –2,158	0,031
FRAP (μMFESO$_4$/L)*	nepušačice (a)	62	388,75	289,40	402,10	a : b = –3,215	0,001
	pušačice ≤ 10 cig. (b)	18	216,85	194,30	276,40	a : c = –4,885	< 0,001
	pušačice > 10 cig. (c)	10	176,05	148,60	235,40	b : c = –3,644	< 0,001
Kruskal-Wallisov test: †χ^2 = 47,069; P < 0,001; ‡χ^2 = 47,131; P < 0,001; §χ^2 = 26,849; P < 0,001; *χ^2 = 31,992; P < 0,001							

C – medijan; 25. P. – 25. percentil; 75. P. – 75. percentil;
U – vrijednost Mann-Whitneyjeva testa; P – statistička vjerojatnost

Slična je analiza provedena među ispitanicama koje boluju od neplodnosti. Pokazali smo da su koncentracije superoksida O_2 i GSH-a najniže u ispitanica koje boluju od neplodnosti te ne puše, znatno niže u odnosu na koncentracije u ispitanica što boluju od neplodnosti i pritom puše do 10 ili više cigareta na dan. Iako je samo sedam ispitanica pušilo do deset cigareta na dan i bolovalo od neplodnosti, a šest ispitanica oboljelih od neplodnosti pušilo više od deset cigareta na dan, nađena je statistički

značajna razlika. Najviše koncentracije navedenih varijabla imale su ispitanice koje su bolovale od neplodnosti i pušile više od deset cigareta na dan, što je prikazano u tablici 21. U ispitanica koje su bolovale od neplodnosti i pušile nađene su niže vrijednosti AOPP-a i FRAP-a, i to razmjerne količini cigareta konzumiranih tijekom dana.

Tablica 21. Analiza koncentracija superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a s obzirom na količinu cigareta konzumiranih tijekom dana, za ispitanice oboljele od neplodnosti

	Količina cigareta	N	C	25. P.	75. P.	U	P
Superoksid O_2 (µM/min/mL)†	nepušačice (a)	19	4,26	3,98	5,47	a : b = –3,847	< 0,001
	pušačice ≤ 10 cig. (b)	7	10,12	9,43	11,25	a : c = –3,630	< 0,001
	pušačice > 10 cig. (c)	6	13,22	12,57	14,21	b : c = –2,714	0,007
GSH (µM/mL)‡	nepušačice (a)	19	24,85	22,38	30,12	a : b = –3,844	< 0,001
	pušačice ≤10 cig. (b)	7	54,41	44,00	57,44	a : c = –3,627	< 0,001
	pušačice > 10 cig. (c)	6	82,73	77,12	86,92	b : c = –3,000	0,003
AOPP (µM/L)§	nepušačice (a)	19	37,75	34,60	38,72	a : b = –2,919	0,004
	pušačice ≤ 10 cig. (b)	7	29,53	22,94	35,14	a :c = –3,468	0,001
	pušačice > 10 cig. (c)	6	18,00	15,20	22,30	b : c = -1,857	0,063
FRAP (µMFESO$_4$/L)*	nepušačice (a)	19	396,05	389,00	416,80	a : b = –3,497	< 0,001
	pušačice ≤ 10 cig. (b)	7	284,20	274,60	294,10	a : c = –3,627	< 0,001
	pušačice > 10 cig. (c)	6	247,60	235,40	264,10	b : c = –3,000	0,003
Kruskal-Wallisov test: †χ^2 = 14,803; P < 0,001; ‡χ^2 = 14,778; P < 0,001; §χ^2 = 8522; P = 0,004; *χ^2 = 12,231; P < 0,001							

C – medijan; 25. P. – 25. percentil; 75. P. – 75. percentil; U – vrijednost Mann-Whitneyjeva testa; P – statistička vjerojatnost

Također smo analizirali povezanost koncentracija superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a s jedne strane te neplodnosti i pušenja cigareta s druge strane. U tablici 22. prikazane su vrijednosti koeficijenata povezanosti. Postojala je povezanost superoksida O_2 i neplodnosti, no pokazano je da postoji veća povezanost s obzirom na pušenje cigareta. Pacijentice koje su imale višu koncentraciju superoksida O_2 češće su bolovale od neplodnosti. Isto tako, ispitanice koje su pušile više cigareta imale su i višu koncentraciju superoksida O_2. Nađena je povezanost pušenja i neplodnosti te koncentracije GSH-a, bez razlike među veličinama koeficijenata. Koeficijent povezanosti AOPP-a i neplodnosti bio je veći u odnosu prema veličini koeficijenta povezanosti s pušenjem cigareta. Također, povezanost koncentracije FRAP-a bila je veća s obzirom na neplodnost u odnosu prema pušenju iako su svi koeficijenti povezanosti bili statistički značajni. Valja istaknuti velike koeficijente povezanosti koncentracija AOPP-a i FRAP-a te neplodnosti.

Tablica 22. Koeficijenti povezanosti koncentracija superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a s neplodnosti i pušenjem cigareta i usporedbom veličine koeficijenata povezanosti

		Neplodnost	Pušenje cigareta	Razlika u veličini koeficijenata povezanosti	
				Z	P
Superoksid O_2 (µM/min/mL)	r_s	0,465	0,693	–2,309	0,021
	P	< 0,001	< 0,001		
	N	90	90		
GSH (µM/mL)	r_s	0,651	0,679	–0,331	0,741
	P	< 0,001	< 0,001		
	N	90	90		
AOPP (µM/L)	r_s	-0,815	-0,521	3,720	< 0,001
	P	< 0,001	< 0,001		
	N	90	90		
FRAP (µM$FESO_4$/L)	r_s	-0,739	-0,498	2,649	0,008
	P	< 0,001	< 0,001		
	N	90	90		

r_s – vrijednost Spearmanova koeficijenta povezanosti; P – statistička vjerojatnost; Z – vrijednost testa usporedbe koeficijenata povezanosti

Analizirali smo i povezanost koncentracija superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a te navike pušenja, posebno za ispitanice oboljele od neplodnosti i za one koje od nje nisu bolovale. Zatim smo usporedili vrijednosti koeficijenata povezanosti. U tablici 23. prikazani su rezultati navedene analize. Pokazana je velika povezanost koncentracije superoksida O_2 i pušenja cigareta u ispitanica koje boluju od neplodnosti. Povezanost je bila veća u odnosu prema onoj u ispitanica koje puše, a ne boluju od neplodnosti. Slično je pokazano za koncentraciju GSH-a te FRAP-a. Povezanost AOPP-a s konzumiranjem cigareta bila je velika u objema skupinama ispitanica, bez razlike u veličini koeficijenata povezanosti.

Tablica 23. Koeficijenti povezanosti koncentracija superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a s pušenjem cigareta, s obzirom na neplodnost

		Pušenje cigareta – plodne žene	Pušenje cigareta – neplodne žene	Razlika u veličini koeficijenata povezanosti	
				Z	P
Superoksid O_2 (µM/min/mL)	r_s	0,626	0,851	–2,288	0,022
	P	< 0,001	< 0,001		
	N	58	32		
GSH (µM/mL)	r_s	0,705	0,851	–1,667	0,096
	P	< 0,001	< 0,001		
	N	58	32		
AOPP (µM/L)	r_s	-0,755	-0,724	0,298	0,765
	P	< 0,001	< 0,001		
	N	58	32		
FRAP (µM$FESO_4$/L)	r_s	-0,523	-0,810	–2,382	0,017
	P	< 0,001	< 0,001		
	N	58	32		

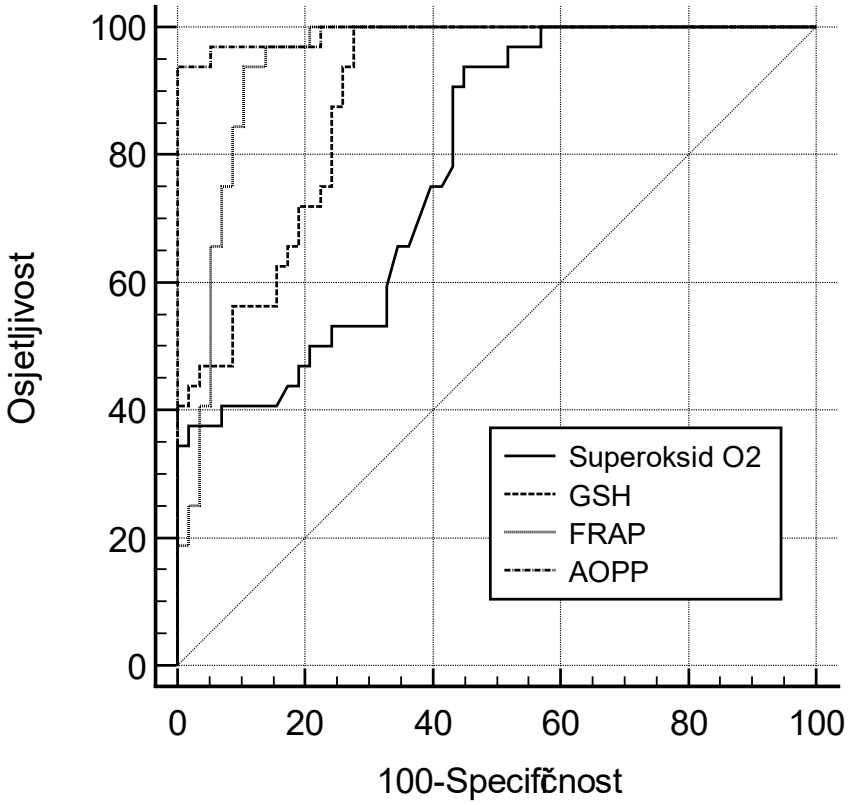
r_s – vrijednost Spearmanova koeficijenta povezanosti; P – statistička vjerojatnost;
Z – vrijednost testa usporedbe koeficijenata povezanosti

ROC analizu proveli smo radi ispitivanja dijagnostičkoga potencijala koncentracija superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a u odnosu prema neplodnosti. Ispitali smo prediktivnu vrijednost svake od navedenih varijabla. U tablici 24. prikazane su vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti te je navedena koncentracija pri kojoj je odnos osjetljivosti i specifičnosti bio najpovoljniji. Treba istaknuti osjetljivost i specifičnost AOPP-a u odnosu prema neplodnosti. Naime, za AOPP osjetljivost iznosi 93,75 % (za vrijednosti koncentracije < 13,41 µM/L), a specifičnost je 100 %-tna. Također, izvrsnu dijagnostičku mogućnost ima i FRAP (koncentracija < 223,4 µM$FESO_4$/L) s osjetljivosti od 93,75 % i specifičnosti od 89,66 %. Površine ispod krivulje prikazane su na grafikonu 1.

Tablica 24. Rezultati ROC analize koncentracija superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a u odnosu prema neplodnosti

	AUC	Osjetljivost	Specifičnost	+LR	–LR	Z	P
Superoksid O_2 (µM/min/mL) > 3,41	0,780	93,75 %	55,17 %	2,09	0,11	5,805	< 0,001
GSH (µM/mL) > 17,25	0,893	100 %	72,41 %	3,62	0,00	12,315	< 0,001
AOPP (µM/L) < 13,41	0,991	93,75 %	100 %		0,063	65,583	< 0,001
FRAP (µM$FESO_4$/L) < 223,4	0,946	93,75 %	89,66 %	9,06	0,07	18,926	< 0,001

Klasifikacijska varijabla – neplodnost; AUC – površina ispod krivulje;
+LR – pozitivna prediktivna vrijednost; -LR – negativna prediktivna vrijednost;
Z – vrijednost testa; P – statistička vjerojatnost



Grafikon 1.: Prikaz površine ispod krivulje provedenom ROC analizom koncentracija superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a u odnosu prema neplodnosti

Provedenom ROC analizom dobivene su koncentracije superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a koje pokazuju najkorisniji omjer osjetljivosti i specifičnosti u odnosu prema neplodnosti. Zatim smo analizirali udio žena ispod zadane koncentracije i iznad nje te je za svaku varijablu izračunan omjer vjerojatnosti. Njime je prikazana vjerojatnost da će ispitanica koja ima koncentraciju kritične vrijednosti (koncentracije su navedene uz varijable) ujedno bolovati od neplodnosti. U tablici 25. navedene su vrijednosti omjera vjerojatnosti. Neke rezultate treba promatrati oprezno zbog manjega broja ispitanica koje boluju od neplodnosti u uzorku.

Tablica 25. Izračunani omjeri vjerojatnosti za koncentracije superoksida O_2, GSH-a, AOPP-a i FRAP-a koje pokazuju najkorisniji omjer osjetljivosti i specifičnosti u odnosu prema neplodnosti

Neplodnost	Omjer vjerojatnosti (95 %-tni IP)	Z	P
Superoksid O_2 (µM/min/mL) > 3,41	16,071 (3,511 – 73,572)	3,578	< 0,001
GSH (µM/mL) > 17,25	154,143 (8,930 – 2660,579)	3,467	0,001
AOPP (µM/L) < 13,41	855,000 (74,458 – 9817,995)	5,421	< 0,001
FRAP (µM$FESO_4$/L) < 223,4	109,286 (21,307 – 560,534)	5,627	< 0,001

IP – interval pouzdanosti; Z – vrijednost testa; P – statistička vjerojatnost

6. RASPRAVA

U ovoj su studiji ispitivana biokemijska svojstva sluzi koju izlučuju sekrecijske stanice iz vrata maternice nepušačica i pušačica cigareta. Među ispitanicama njih 67 % pušilo je cigarete više mjeseci prije provođenja ispitivanja. Prema broju cigareta popušenih na dan ispitanice su podijeljene u skupinu onih koje su pušile do deset cigareta na dan te onih koje su pušile deset i više cigareta na dan.

Valja se osvrnuti na skupinu ispitanica koje ne puše. To je u odnosu prema pušenju izrazito heterogena skupina. S praktične su točke gledišta mnoge od njih zapravo pasivne pušačice jer se često, gotovo svakodnevno, nalaze u pušačkoj okolini. Količina dima koji povremeno udahnu svakoga dana ovisi o brojnim čimbenicima kao što su broj aktivnih pušača oko njih, broj popušenih cigareta, veličina prostora u kojemu se puši, strujenje zraka u pušačkome okružju i, ponajprije, vrijeme provedeno u pušačkome okružju. Budući da svaki od nabrojenih čimbenika može varirati, dolazi se do zaključka da se pasivni pušači vjerojatno međusobno znatno razlikuju prema količini udahnutih sastavnica duhanskoga dima.

Istodobno, postoji mogućnost da je u skupini nepušačica bio i manji broj onih koje povremeno puše, ali im je bilo neugodno priznati to liječniku. Vrlo je vjerojatno da za neke od njih pušenje jedne cigarete svakih nekoliko dana u prisutnosti prijateljica pri ispijanju kave nije razlog da se izjasne kao pušačice. Jedini siguran način da se utvrdi pušački status ispitanica jest mjerenje koncentracije kotinina i nikotina u mokraći ili plazmi, što u ovome ispitivanju nije provedeno.

Poznato je da se razina nikotina u krvi nepušača koji su u prostoriji s aktivnim pušačima (onima koji su popušili četiri cigarete) proveli jedan sat izjednačava s razinom nikotina u pušača koji su popušili jednu cigaretu (56, 57, 61).

U ovome istraživanju prosječan broj cigareta u skupini ispitanica koje su konzumirale do deset cigareta na dan bio je 7,3 cigarete, a u skupini onih koje su pušile više od deset cigareta na dan 23 cigarete.

Zahvaljujući objektivnomu obavještavanju medija o štetnome djelovanju pušenja na zdravlje ljudi, mnoge žene nastoje pušiti što manji broj cigareta (27, 38, 54 – 58, 63, 65, 67, 96, 86, 117 – 119). Poznato je da pušenje utječe na tjelesnu masu, pa su mnogi pušači mršave konstitucije (57). Neke od sastavnica duhanskoga dima poput nikotina smanjuju apetit pušača i njihovu želju za uzimanjem slatke hrane, što

sigurno utječe na tjelesnu masu (57, 61). Međutim, mnogi pušači prestankom pušenja povećaju tjelesnu masu za nekoliko kilograma (61). Zato mnoge žene počinju pušiti manji broj cigareta da bi održale vitku liniju ili smršavile, a pušačice nastavljaju povremeno pušiti kako bi zadržale postojeću tjelesnu masu (38, 57, 61, 94). Ta je činjenica dobro poznata svim ženama koje imaju problema s održavanjem tjelesne mase.

U skupini pušačica koje puše deset i više cigareta na dan nešto više od 70 % ispitanica pušilo je 20 cigareta na dan. Ti rezultati upućuju na to da takve pušačice nastoje ostati u granicama pušenja jedne kutije cigareta na dan. Time se razlikuju od muškoga dijela populacije u našoj sredini, koji s vremenom postupno povećava broj popušenih cigareta (38, 57).

Dokazano je da pušenje cigareta stvara visok zdravstveni rizik zbog mogućega trajnog oštećenja ponajprije kardiovaskularnoga i respiratornoga sustava pušača, s trajnom invalidnošću ili smrtnim posljedicama (4, 9, 28, 30, 37, 38, 55, 57, 58, 61, 68, 89, 94, 96, 118, 120). Nažalost, kod dugogodišnjih pušača cigareta nastaju mnogi oblici raka kao što su rak usana, bronha, gornjih dišnih putova te mokraćnoga mjehura u muškaraca ili rak vrata maternice i dojka u žena (4, 9, 13, 19, 24, 28, 37, 55, 61, 68, 87, 107, 120, 121).

Pušenje cigareta stvara dugotrajnu, često doživotnu ovisnost (56, 57, 61 65, 77, 89, 119, 122), koja ima brojne sličnosti s ovisnošću izazvanom alkoholom i drogama (57). Bitna je razlika u tome što ljudi pušenje doživljavaju kao manje opasan i društveno prihvatljiviji čin. Prema nekim ispitivanjima objavljenima u SAD-u od pušenja se može odviknuti oko 40 % aktivnih pušača, obično tek nakon 2 – 3 godine pokušavanja da prestanu pušiti (38, 39, 57, 123).

Pred pušačicama u reproduktivnoj dobi velika je odgovornost u razdoblju trudnoće. Postoje brojni dokazi da je pušenje u trudnoći štetno i za majku i za njezin plod (31, 37, 38, 42, 52, 53, 57, 58, 67, 120). Kod trudnica koje puše učestalost spontanih prekida trudnoće veća je za 18 % u usporedbi s trudnicama koje ne puše (2, 31, 37, 52, 57, 67). Pušenje istodobno povisuje rizik od fetalnoga mortaliteta i smanjuje rodnu masu djece (52, 53, 57, 58, 102, 119, 124). Velika oštećenja pri razvoju ploda mogu nastati zbog vazokonstrikcijskoga djelovanja nikotina na krvne žile posteljice,

hipoksije izazvane prisutnošću ugljikova monoksida te djelovanja teških metala (željeza, kadmija, nikla) iz dima cigareta (52, 53, 57, 61, 63, 66, 67, 120, 124).

U prosječnoj populaciji žena u reproduktivnoj dobi puši njih do 30 % (31, 94). U razvijenim se zemljama taj postotak smanjuje, pa je u SAD-u i Švedskoj na razini od oko 24 % (94). U našoj zemlji udio pušačica velik je i prelazi vrijednost od 30 % (57).

U ovome su radu predstavljeni rezultati ispitivana nekih novih biokemijskih svojstava sekreta epitelnih stanica vrata maternice nepušačica i pušačica cigareta. Uzorci su uzimani skupljanjem cervikalnoga obriska na način koji se rutinski rabi pri određivanju testa prema Papanicolaouu (4, 125). Uzimanje je uzoraka jednostavno, brzo i neinvazivno. U svakome su se uzorku nalazile intaktne epitelne stanice iz vrata maternice, raspadnute stanice, a vjerojatno i poneki leukocit i cervikalna sluz (8, 10 – 13, 16, 18 – 21, 24, 26, 29, 33, 35, 36, 40, 42, 44, 105, 107). Svaki je uzorak odmah otopljen u fosfatnome puferu pH-vrijednosti 7,5 te centrifugiranjem na 1000 okretaja razdvojen u stanični talog i u gornji bistri supernatant. Uzorci sekreta uzimani su od ispitanica koje su bile u prijeovulacijskoj fazi, kad je sekret stanica vrata maternice bio obilan, bistar i bez vidljivih primjesa leukocita i eritrocita koje bi mogle utjecati na kvalitetu ispitivanih pokazatelja (10, 11, 14, 15, 21, 29, 40, 44, 45).

Ovim ispitivanjem proširene su spoznaje koje se dobiju standardnim papa-testom, pa se u obrisku cervikalne sluzi uz citološke parametre mogu odrediti i neki novi biokemijski pokazatelji, što je promatrano i u ovoj studiji. Prvotno, vremenski dosta složeno uzimanje sekreta stanica iz cervikalnoga kanala, koje su predložili Sasson i suradnici (24) te Schiffman i suradnici (107), danas je postalo brzo zahvaljujući standardnim plastičnim epruvetama za uzimanje obriska s nastavkom. Uzimanje uzorka sekreta jednostavno je, neinvazivno i sastavni je dio ginekološkoga pregleda te ga prihvaćaju sve ispitanice. U kratko se vrijeme, gotovo istodobno, prema potrebi mogu uzeti dva uzorka – jedan obrisak za određivanje papa-testa i drugi za neko biokemijsko testiranje. Prijenos uzoraka u ispitivački laboratorij brz je, siguran i jednostavan.

Cervikalna sluz ili *mucus* nastaje periodičnim izlučivanjem epitelnih sekrecijskih stanica iz područja vrata maternice (7, 8, 10 – 19, 26, 29, 33, 40, 44, 45, 51, 87). Manji dio sekreta vjerojatno nastaje od stanica cervikalnoga kanala, koje su se raspale procesom apoptoze (7, 26). Poznato je da se količina, gustoća, viskoznost i prozirnost sekreta iz pokrovnih sekrecijskih stanica vrata maternice mijenjaju tijekom

ovarijskoga ciklusa te ovise o koncentraciji i estrogenih hormona i progesterona (4, 7, 8, 10 – 14, 16, 18, 19, 21, 26, 40, 44, 50, 88).

U prvoj polovini ovarijskoga ciklusa, prije ovulacije jajne stanice, raste koncentracija estrogena, koji stimuliraju obilno izlučivanje cervikalne sluzi (7, 8, 11, 12, 14 – 16, 18, 19, 21, 23, 26, 28, 29, 33 – 35, 40, 44). Zbog povećane količine tekućine u sekretu, povećava se njegova prozirnost i smanjuje gustoća (4, 7, 8, 12, 18, 21 – 23, 26, 27, 46). Poslije ovulacije, osobito ako je došlo do trudnoće, sekret postaje neproziran i gust, često tvoreći strukturu čepa (4, 11, 12, 26, 27, 29, 35, 126). Tad se u ovariju stvara žuto tijelo, koje izlučivanjem velike količine progesterona čuva trudnoću i onemogućuje kontrakcije maternice (1, 2, 4, 8, 29, 40). Porastom razine progesterona u krvi žena smanjuju se količina i prozirnost sekreta koji izlučuju sekrecijske stanice vrata maternice (4, 5, 7, 14, 15, 19, 20, 23 – 27, 32, 33, 40, 42, 44, 46, 49, 126). Tada se dnevna produkcija sluzi iz prijeovulacijske faze od oko 30 mL smanjuje na količinu od samo 0,2 mL (4, 8, 10, 11, 14, 15, 21, 33, 40, 126). Nakon ovulacije cervikalna sluz postaje gusta, viskozna i mutna zbog brojnih leukocita, eritrocita i dijelova raspadnutih stanica vrata maternice (4, 7, 8, 10 – 12, 14, 15, 21, 33, 40).

Postoji mišljenje da estrogeni hormoni stimuliraju nakupljanje vode u sekretu stanica vrata maternice (7, 8, 10, 11, 14, 15, 33, 40, 49). Chantler (11) smatra da se tijekom ovarijskoga ciklusa u cervikalnome sekretu mijenja samo količina vode, a koncentracija ostalih anorganskih i organskih sastavnica sluzi ostaje nepromijenjena.

Promjena obujma i gustoće sluzi u ovarijskome ciklusu mogući je važan fizički čimbenik koji djeluje na pokretljivost spermija (16, 21, 29, 34, 42, 45, 50, 125). U fazi prije sazrijevanja jajne stanice i u vrijeme ovulacije velika je količina sluzi male viskoznosti, što objektivno olakšava prolazak spermijima iz vagine prema jajovodu (11, 15, 16, 24, 29, 34, 46, 49). Poslije ovulacije, kad je došlo do oplodnje jajne stanice ili njezine razgradnje, sluz iz područja vrata maternice gusta je, viskozna i maloga obujma. Bogata je brojnim leukocitima, eritrocitima te dijelovima raspadnutih epitelnih stanica iz sluznice uterusa (4, 7, 8, 10, 11, 15, 17, 40). Vjerojatno je u takvoj okolini pokretljivost spermija smanjena (12, 17, 49). Oni se sporije kreću ispred vrata maternice, pa im je zbog zadržavanja u nepovoljnome kiselom mediju smanjena vitalnost (4, 7, 10, 11, 14, 16, 17, 21, 34, 49).

Da bismo dobili dovoljnu količinu sekreta stanica vrata maternice, bez leukocita i eritrocita koji mogu utjecati na rezultate mjerenja, ispitanicama su uzimani uzorci obriska u prijeovulacijskoj fazi, kao što su to u svojim ispitivanjima prvi predložili Sasson i suradnici (24) te Schiffman i suradnici (107).

U ovoj je studiji promatran utjecaj pušenja cigareta na neka od specifičnih biokemijskih svojstava iz sluzi sekrecijskih stanica vrata maternice nepušačica i pušačica. Poznato je da pušenje cigareta mijenja različite pokazatelje u organima pušača, njihovoj plazmi, slini i mokraći (9 – 11, 13, 19, 24, 28, 52, 57, 58, 62, 63, 65, 77, 89, 100, 102, 104, 106, 120, 128 – 130). Zbog toga smo pretpostavili da postoje slične promjene i u sekretu stanica vrata maternice žena koje su bile aktivne pušačice. U prilog toj pretpostavci ide i činjenica da su u sluzi stanica vrata maternice identificirane sastavnice duhanskoga dima kao što su nikotin i kotinin (13, 19, 56, 57, 129) te kancerogeni spojevi benzo(a)piren i N-nitrozamin (24, 102, 103, 105 – 107, 131, 132). Istodobno je Amesovim testom pokazana mutagenost cervikalne sluzi u pušačica (23, 104).

Duhanski dim aerosol je krutih tvari, tekućine i plinova, koji sadržava oko 4000 različitih jednostavnih i složenih, anorganskih i organskih spojeva (9, 38, 56 – 59, 61, 89, 113). U njemu ima oko 600 toksičnih spojeva kao što su amonijak, aceton, akrolein, anilin, benzol, toluol, vodikov cijanid, dimetilamin, karbonil sulfid, metilamin, vinilpiridin, fenol, formaldehid, hidrokinon, piridin i krezol (38, 56 – 59, 61, 89, 127, 128). Iz dima su izolirane specifične sastavnice poput teških metala: željeza, bakra, cinka, kroma, nikla, pa čak i radioaktivnoga elementa polonija 210 (38, 56, 59, 89). Dokazano je i da duhanski dim sadržava 42 kancerogena policiklička spoja (56, 89).

Pušenjem cigareta nastaju glavna i sporedna struja dima (56, 57, 89). Sporednu struju dima uz pušače udišu i nepušači, koji tako postaju pasivni pušači (38, 56 – 58, 61, 89, 96, 117). Glavna struja duhanskoga dima brzo se apsorbira u krv pušača putem velike površine plućnih alveola (38, 57). Tako se alkaloid nikotin može dokazati u krvi pušača već 10 sekunda nakon prvoga udahnutoga dima cigarete (61).

Prolaskom kroz usnu šupljinu i gornji dio dišnoga sustava duhanski se dim naglo hladi s 800 °C (temperatura izgaranja na vrhu cigarete) na 40 °C (38, 56 – 58). Pritom se iz aerosola kondenziraju mnoge na visokoj temperaturi isparive sastavnice

dima u gustu, tamnosmeđu tekućinu oštra mirisa po duhanu, koja se naziva *duhanski katran* (56, 57, 59, 89).

Nastali kondenzat dima taloži se na zubnoj caklini, sluznici gornjeg dijela dišnoga trakta, u dušniku na plućnim alveolama (38, 56, 57, 61). Zbog dugotrajnoga termičkog djelovanja duhanskoga dima atrofiraju trepetljike epitelnih stanica koje oblažu sluznicu bronha (38, 57, 96, 120). Posljedice su toga poteškoće pri disanju i teško iskašljavanje nakupljenoga sekreta i duhanskoga katrana iz bronhiola i plućnih alveola (38, 57, 120). Mnogi organski spojevi dobro topljivi u lipidima, kao što su prije spomenuti nikotin, aceton, akrolein ili benzol, brzo prolaze kroz membranu alveolarnih stanica i dolaze u krvotok pušača (56, 57, 61, 89). Može se pretpostaviti i da nakon svakoga udisaja duhanskoga dima neke od sastavnica duhanskoga katrana zaostaju istaložene u donjemu dijelu dišnoga trakta odakle se postupno apsorbiraju u krvotok pušača.

Pretpostavlja se da brojne sastavnice iz glavne struje dima cigareta ulaze u krvotok pušača difuzijom, olakšanom difuzijom, aktivnim transportom ili, možda, pinocitozom (3, 57, 89, 120). Mnoge sastavnice dima manje molekularne mase, dobro topljive u lipidima, brzo prolaze alveolarnim epitelom u krvotok pušača, vjerojatno zato što im je koncentracija u alveolama desetak puta viša od one u krvi (75, 120). Isto tako i neke tvari dimnoga kondenzata, npr. kancerogeni spojevi, brzo prolaze kroz alveole jer ih nema u organizmu pušača (56, 61, 75, 80, 104, 120, 123).

Kancerogeni spojevi iz duhanskoga dima prema svojoj su strukturi kondenzirane prstenaste organske molekule (24, 105 – 107, 131). Ispitivanja su pokazala da je mokraća pušača mutagena već jedan sat nakon udisanja prvoga dima cigarete (28, 38, 89). Takva ostaje čak 24 sata poslije posljednjega pušenja (28, 38). I mokraća pasivnih pušača, koji su bili u pušačkome okružju, može pokazivati mutagene značajke. Istaknuli bismo da je Amesov test na pokusnim životinjama nedvojbeno pokazao kako je 95 % mutagenih tvari dokazanih tim testom kancerogeno.

Postoji mišljenje da kancerogene sastavnice duhanskoga dima velike molekularne mase procesom pinocitoze polagano prelaze iz alveola u krv aktivnih i pasivnih pušača. U dimu cigareta ima mnogo malih krutih anorganskih čestica veličine do 10 μm (56, 59, 89). Njihova koncentracija u glavnoj struji dima iznosi i do 40 mg po cigareti (38, 56). One se uglavnom sastoje od sitne duhanske prašine bogate silicijevim dioksidom (kremen) i kalcijevim karbonatom (56, 59). Postoji mišljenje da

mehaničkim djelovanjem tih čestica dima na bronhalni i alveolarni epitel nastaju promjene koje pospješuju malignu transformaciju tih stanica kod pušača (57). Taj se zaključak izvodi analogijom s činjenicom da je učestalost raka pluća velika i kod rudara i radnika izloženih dugotrajnomu djelovanju anorganske prašine (38, 56 – 58). U želji da pušačima pruže manje štetne cigarete, tvornice duhana u posljednjih pedesetak godina proizvode cigarete s filtrom. Filtar ugrađen na vrhu cigarete zaustavlja veći dio krupnijih krutih čestica iz udahnutoga dima (38, 57).

Nikotin iz duhanskoga dima kod pušača stvara trajnu potrebu za pušenjem. Ona nastaje kad se u krvnoj plazmi snizi koncentracija nikotina (57, 58, 61). Zbog određene tolerancije organizma prema nikotinu žudnja za pušenjem cigareta kod dugotrajnih se pušača javlja svakih 20-ak minuta, a kod novih pušača svakih nekoliko sati (38, 56, 58). Nikotin stimulira razgradnju masti u lipoproteine male gustoće (LDL), koji se nalaze u krvnoj plazmi pušača (56, 61). Zbog njihove visoke koncentracije brzo dolazi do taloženja LDL-a na stijenke arteriola. Time se tijekom duljega vremena smanjuje prohodnost krvožilnoga sustava i stvaraju uvjeti za razvoj arterioskleroze (38, 57, 58, 61, 113). Zbog nastalih promjena mnogi pušači obolijevaju od ishemičnoga oštećenja miokarda i mozga s trajnom invalidnošću i smanjenom kvalitetom života. Duhanski dim sadržava razmjerno visoku koncentraciju ugljikova monoksida (10 – 15 mg po cigareti), koji se veže za hemoglobin eritrocita 250 puta jače od kisika (1, 57, 58, 63, 67). Nastali karboksihemoglobin prenosi manje kisika od oksihemoglobina, pa su pušači u laganoj hipoksiji (38, 57, 63, 67, 89). Tako u krvi pušača može biti do 10 % karboksihemoglobina, dok kod nepušača ta vrijednost ne prelazi 1 % (67). Sav vezani CO oslobodi se iz krvi tek 8 sati nakon prestanka pušenja (38, 52, 57, 58).

Nastala hipoksija može biti bitan rizični čimbenik u tijeku trudnoće pušačica (52, 53, 117, 120 – 122). Već smo prije spomenuli da mnoga djeca pušačica imaju manju rodnu masu nego djeca nepušačica, a u kasnijemu životu i niz respiratornih poteškoća (38, 52, 57, 58, 100).

Epidemiološka ispitivanja pokazuju da zbog djelovanja duhanskoga dima dio pušača umire prije nego nepušači istih godina i jednakih životnih uvjeta, najčešće zbog razvoja kroničnih bolesti koje prate pušenje (9, 38, 52, 56, 57, 61, 67, 68, 89,100).

Prema slobodnim procjenama pušenje jedne cigarete ima kumulativno djelovanje i skraćuje život pušača za 4 – 7 minuta (56, 57) odnosno za 3 – 5 godina.

U organizmu se mnogi spojevi koji su njemu strani razgrađuju s pomoću specifičnih enzima u jednostavnije, često manje štetne spojeve različitim procesima kao što su oksidacija, redukcija ili konjugacija. Nastale sastavnice izlučuju se iz organizma putem bubrega u obliku mokraće (56 – 58, 61, 80, 89, 127, 128). To se odnosi i na brojne sastavnice duhanskoga dima cigareta (57, 89, 128).

U posljednjih je 40 godina iz duhanskoga dima cigareta izolirana skupina reaktivnih spojeva poznata pod nazivom *slobodni radikali kisika* (9, 55, 68, 69, 74, 78, 83 – 86, 91, 92, 95, 112, 134). To su različiti oblici elemenata kisika ili spojevi kisika u kojima atomu kisika u vanjskoj ljusci nedostaje jedan elektron (68, 69, 74, 78, 84, 92, 95, 112). Riječ je o reaktivnim, nezasićenim spojevima koji reagiraju s različitim molekulama u svojoj okolini uzimajući od njih elektron, a često i proton. Preuzimanjem elektrona u svoju strukturu radikali postaju zasićeni i neaktivni molekularni oblici (2, 68, 74, 91, 92, 95). Istodobno sve molekule koje su radikalima predale elektron postaju nezasićeni molekularni oblici, koji su novi slobodni radikali (2, 92, 95). Time u kratkome vremenu iz jednoga slobodnog radikala nastaje lančana reakcija novih radikala (9, 68, 78, 84, 85, 89, 95). Ona u organizmu može prestati samo onda kad se radikali inaktiviraju djelovanjem antioksidacijskih enzima i specifičnih molekula antioksidansa (9, 68, 92, 97, 135).

Najpoznatiji kisikovi radikali jesu nabijeni kisikov anion, koji se zove superoksid – O_2*, pri čemu zvjezdica označava da je to molekula slobodnoga radikala (74, 95), te hidroksilni radikal – OH*, dušični oksid – NO* i vodikov peroksid – H_2O_2 (42, 74, 84, 95). Vodikov peroksid nije slobodni radikal, ali se uz ion željeza Fe^{2+} ili bakra Cu^{+} s pomoću Fentonove reakcije pretvara u reaktivni hidroksilni radikal OH* (9, 78, 84, 91, 95, 112) prema reakciji: $H_2O_2 \rightarrow OH^* + OH^-$.

Istodobno, superoksid O_2* s vodikovim peroksidom stvara hidroksilni radikal u reakciji poznatoj kao Haber-Weissova reakcija (78, 95). Te kemijske promjene kataliziraju atomi željeza ili bakra: $H_2O_2 + O_2^* \rightarrow O_2 + OH^* + OH^-$.

Budući da duhanski dim cigareta sadržava veliku količinu atoma željeza i bakra (56, 59, 89), možemo pretpostaviti da je u organizmu pušača povećana produkcija hidroksilnih radikala OH* iz vodikova peroksida H_2O_2 i superoksida O_2*.

U stanici su mitohondriji glavna organela u kojoj nastaju slobodni radikali kisika (2, 9, 69, 95, 134).

Svakoga se dana staničnim disanjem u lancu za prijenos elektrona 2 – 3 % unesenoga kisika pretvori u superoksidni radikal O_2* (9, 62, 74, 75, 78, 83, 84, 86, 95, 112, 134). Premda je to veoma velika količina slobodnih radikala, u organizmu postoji stalna antioksidacijska obrana koja aktivnost radikala u normalnim fiziološkim uvjetima drži pod kontrolom (9, 78, 84 – 86, 97).

Kad se u organizmu poremeti prirodna ravnoteža između tih sastavnica, bilo zbog smanjene aktivnosti antioksidansa bilo zbog pojačane proizvodnje slobodnih radikala kisika, nastaje pojava poznata pod nazivom *oksidacijski stres* (9, 69, 74, 75, 78, 84, 85, 91, 95, 97, 134). Treba istaknuti da oksidacijski stres u ljudi izaziva niz biokemijskih i funkcionalnih oštećenja te mnoge kronične bolesti kao što su šećerna bolest, arterioskleroza, zatajenje srca i mozga, kronične opstrukcijske plućne promjene, zamućenje očne leće (katarakta) i neki od oblika raka (9, 69, 78, 84, 85, 95, 97, 134).

Antioksidacijsku obranu organizma čine različite molekule antioksidansa i specifični antioksidacijski enzimi (9, 68, 69, 74, 75, 78, 83 – 86, 91, 92, 95, 97, 98, 100, 105, 113, 135). Antioksidansi su prema funkciji brojne molekule male molekularne mase iz organizma kao što su albumin, hemoglobin, feritin, bilirubin, žučne kiseline, mokraćna kiselina, reducirani glutation (GSH), ili molekule koje se svakodnevno unose hranom, tj. voćem i povrćem. Tipičan primjer toga jest vitamin C, koji se ne može sintetizirati u organizmu ljudi, primata i zamoraca. Jedini izvor vitamina C za ljudsku populaciju svakodnevna je prehrana bogata svježim voćem i povrćem te, u novije vrijeme, specifični dodatci prehrani i voćni sokovi (9, 74, 84, 97, 100, 135).

Antioksidansi se dijele na skupinu onih koji su dobro topljivi u vodi (vitamin C, proteini bogati skupinama SH i neke aminokiseline) i onih koji su topljivi u lipidima (vitamin A, vitamin E, omega masne kiseline) (9, 74, 84, 97, 113).

Slobodne radikale u stanicama i krvnoj plazmi razgrađuju antioksidacijski enzimi: superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza i glutation-reduktaza (9, 74, 78, 86, 91, 92, 95). Njihova se aktivnost zbiva u dvama enzimskim stupnjevima. Prvo se radikali djelovanjem superoksid-dismutaze pretvaraju u spoj vodikov peroksid, koji se u drugom stupnju pretvara u neutralni kisik i vodu (9, 97, 113). Određivanje aktivnosti tih spojeva nije bilo uključeno u ispitivanje svojstava cervikalne sluzi nepušačica i pušačica. Najagresivniji slobodni radikal u organizmu već je prije spomenuti hidroksilni radikal OH*.

On mijenja strukturu staničnih makromolekula: DNK-a, proteina, složenih ugljikohidrata i lipida (9, 69, 74, 78, 83 – 85, 91, 92, 95, 112). Posljedica toga jest promjena građe i funkcije makromolekula i staničnih organela. Slobodni radikali lome lance molekule DNK-a ili mijenjaju strukturu pojedinih nukleotida, zbog čega nastaje trajna mutacija parova purinskih i pirimidinskih baza DNK-a (9, 85, 95, 104). Najčešća mutacija jest promjena strukture baze gvanina u 8-hidroksi-deoksi-gvanozin (9, 85, 95). Zbog toga nastaju tranzicijske promjene u kojima se parovi baza molekule DNK-a gvanin-citozin (GC) promijene u novi komplementarni par nukleotida adenin-timin (AT). To može promijeniti aktivnost nekih gena i dovesti do drukčije sinteze staničnih proteina (9, 75). Ako se time promijeni struktura nekih enzima važnih za ljudski organizam, mogu nastati funkcionalna oštećenja. Danas se smatra da slobodni radikali iz duhanskoga dima cigareta ovim ili sličnim mehanizmom na razini gena (9, 68, 83 – 85) pospješuju proces transformacije normalnih stanica u kancerogene. Istodobno, slobodni radikali mijenjaju strukture pojedinih aminokiselina, a time i pojedinih proteina. Tako aminokiselina tirozin prelazi u spoj hidroksitirozol, a metionin u metionin-sulfoksid (9, 78, 95). Zbog promijenjenih odnosa među aminokiselinama funkcija nekih proteina može se smanjiti ili nestati, a to je važno za funkcioniranje enzima ili imunosnih molekula u organizmu (9, 83, 84, 86, 95).

Slobodni radikali razgrađuju stanične lipide procesom lipidne peroksidacije u manje molekularne komplekse manje molekularne mase (9, 69, 84, 86, 93). U ovoj je studiji ispitivano djelovanje duhanskoga dima na opseg lipidne peroksidacije.

Prvi ispitivani parametar bila je količina ukupnih topljivih proteina u sekretu stanica vrata maternice, homogenata sekrecijskih stanica i njihovih mitohondrija kod svih ispitanica. Količina proteina u tim frakcijama pokazuje male razlike u različitim skupinama ispitanica. Međutim, u sluzi sekrecijskih stanica vrata maternice ispitanica količina je proteina bila oko 10 puta manja od one u krvnoj plazmi žena. Tako velika razlika nastala je zbog dvaju eksperimentalnih uvjeta. Prvi je razrjeđivanje obriska s 2 mL fosfatnoga pufera prije ispitivanja. Svaki uzorak obriska uzeli smo u prijeovulacijskoj fazi ovarijskoga ciklusa. Kao što smo prije spomenuli, u toj fazi ciklusa obilna sluz sadržava gotovo 95 % vode i oko 5 % ostalih organskih tvari (8, 11, 14, 15, 18, 21, 28, 29, 35, 40), od kojih su samo neke proteini. Dobiveni rezultati zbog slične količine topljivih proteina pokazuju da pušenje cigareta ne mijenja bitno

sinteze ukupnih proteina u organizmu, što potvrđuje rezultate drugih istraživača (52, 120). Ipak, ta tvrdnja ne znači da količina nekih specifičnih proteina, kao što je aktivnost enzima, nije promijenjena u ispitivanim uzorcima. Moguće razlike u vrijednosti tih parametara mogu se utvrditi provođenjem posebnih ispitivanja koja specifičnih za njihovo određivanje. Takva smo mjerenja u ovoj studiji upotrijebili za određivanje količine proteina citokrom P-450 te aktivnosti enzima rodanaze i citokrom-oksidaze.

U sekretu stanica vrata maternice nepušačica i u objema skupinama pušačica mjerili smo količinu vitamina C. Već smo istaknuli da je askorbinska kiselina ili vitamin C spoj važan za normalnu fukciju organizma. On je nuždan za sintezu kolagena u vezivnome tkivu i kao kofaktor nekih enzima (69, 75, 86, 92, 97, 118, 135). Zbog mutacije gena za enzim L-glukonolakton-oksidazu (97, 118, 135), koji katalizira završni stupanj pri sintezi vitamina C, ljudi, primati i zamorci ne mogu sintetizirati taj vitamin u organizmu. Međutim, taj se nedostatak lako kompenzira svakodnevnim unošenjem vitamina C u organizam hranom ili različitim dodatcima prehrani (68, 69, 97, 99, 100, 135). Manjak vitamina C u organizmu, koji se danas pojavljuje vrlo rijetko, u drastičnim slučajevima izaziva pojavu skorbuta (99, 118, 135). Ljudi svoje dnevne potrebe za vitaminom C od oko 100 mg na dan zadovoljavaju raznovrsnom prehranom bogatom voćem i povrćem (99, 118, 135).

Novija su ispitivanja pokazala da je vitamin C učinkovit antioksidans koji razgrađuje mnoge vrste slobodnih kisikovih radikala (9, 69, 83, 85, 86, 91, 92, 95). U prisutnosti slobodnih radikala on reducira i oslobađa proton te biološki prelazi u neaktivan oblik – dehidroaskorbinsku kiselinu. Taj se spoj može razgraditi u gulonske kiseline ili s pomoću nove enzimske aktivnosti (uzimanjem vodika) ponovno pregraditi u aktivnu askorbinsku kiselinu (9, 69, 91, 97, 118, 135).

Ames sa suradnicima (9) te Frei i suradnici (83, 86, 92) smatraju da je vitamin C djelatan antioksidans koji razgrađuje slobodne radikale iz duhanskoga dima cigareta. Poznato je da je razina vitamina C u mnogim organima, krvnoj plazmi i leukocitima aktivnih pušača niža od one u nepušača (9, 68, 69, 78, 83, 86, 92, 97, 99, 100, 118, 135). Schectman i suradnici (99) drže da su dnevne potrebe pušača za vitaminom C gotovo dvostruko veće od potreba nepušača. Prema njihovu mišljenju (99), dnevne potrebe za vitaminom C za pušače iznose 180 mg, a za nepušače 100 mg. Koncentracija od oko 900 µg u 100 mL vitamina C u krvnoj plazmi nepušača kod

teških se pušača cigareta snižava na koncentraciju od oko 600 µg u 100 mL plazme (99, 100, 118).

Naši su rezultati pokazali da pušenje snižava razinu vitamina C u cervikalnome obrisku pušačica. Koncentracija tog vitamina u sekretu stanica vrata maternice nepušačica bila je dva puta viša od koncentracije askorbinske kiseline u istome sekretu ispitanica koje su pušile 10 i više cigareta na dan. Kod žena koje su pušile do 10 cigareta na dan razlike u odnosu prema nepušačicama bile su osjetno manje. U ispitivanome uzorku pušenje do 10 cigareta na dan snizilo je koncentraciju vitamina C za 17 % u odnosu na onu koju su imale ispitanice nepušačice. Rezultati potvrđuju već više puta izmjereno sniženje razine vitamina C kod pušača cigareta u krvnoj plazmi, leukocitima i nekim organima. Tako velike razlike između skupine nepušačica i skupine pušačica nastale su zbog toga što se rezerve askorbinske kiseline u organizmu troše za razgradnju jakih oksidansa u duhanskome dimu cigareta. Ti se rezultati podudaraju sa zapažanjima Murate (118), koji je utvrdio da povećani broj popušenih cigareta snižava razinu askorbinske kiseline kod pušača. Na temelju rezultata ovoga ispitivanja može se zaključiti da koncentracija vitamina C u sekretu stanica vrata maternice ispitanica pušačica i nepušačica pokazuje odnos sličan onomu koji postoji u krvnoj plazmi i leukocitima pušača i nepušača (83, 86, 92, 100, 118). Istodobno, ti rezultati podupiru mišljenje da se aktivnim pušačima sugerira zdrava prehrana bogata vitaminom C.

Međutim, ako se dobiveni rezultati za vitamin C izraze po 1 mL uzorka, dobije se vrijednost od oko 6 µg/mL sluzi stanica vrata maternice ispitanica nepušačica u odnosu prema 85 µg/mL krvne plazme nepušača. U takvome izražavanju podataka u sekretu stanica cervikalne sluzi po 1 mL otopine koncentracija vitamina C niža je 12 – 17 puta od koncentracije tog vitamina u plazmi nepušača. Ona je vjerojatno niža stoga što je uzeti uzorak sekreta stanica vrata maternice prije određivanja višestruko razrijeđen fosfatnim puferom. Drugi mogući razlog smanjenja količine vitamina C u sekretu stanica vrata maternice jest to što u području cerviksa postoji nešto veća količina kisika. U takvim su uvjetima spontana oksidacija i pregradnja askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu vjerojatno veće. Istodobno, sekret stanica vrata maternice ima blago alkaličnu pH-vrijednost (11, 28, 50), što pogoduje prolasku spermija (50) iz rodnice prema jajovodu. Međutim, u alkaličnim uvjetima spontano

dolazi do razgradnje vitamina C jer je poznato da je on dulje stabilan jedino pri niskim pH-vrijednostima od 1 do 2 (84, 97, 118, 135).

Sjemena tekućina sadržava veliku količinu vitamina C, koji vjerojatno štiti makromolekule spermija od oksidacije (ponajprije DNK) (9, 78). Ames i suradnici (9) smatraju da askorbinska kiselina štiti DNK spermija od mutagenoga djelovanja okoline. Već smo prije spomenuli da spermiji mogu preživjeti nekoliko dana u području vrata maternice i ostati intaktni (11, 12, 29, 35, 50). Postoji mogućnost da u tom razdoblju vitamin C koji izlučuju stanice cervikalnoga kanala djelomično štiti spermije od oksidacijskoga djelovanja okoline.

U ovoj je studiji u sekretu stanica vrata maternice mjerena koncentracija tiocijanata. Taj spoj empirijske formule SCN nastaje pregradnjom molekule vodikova cijanida (HCN), koji je sastavnica glavne struje dima cigareta (56, 57, 59). Cijanid (CN) u našoj okolini dolazi u obliku slabe kiseline cijanovodika (HCN) ili njezinih soli, natrijeva cijanida (NaCN) ili kalijeva cijanida (KCN) (70, 127, 128, 136, 139). Svi ti spojevi u vodenim otopinama obično brzo disociraju na cijanidni ion CN^- i H^+ (56, 70, 77, 138, 139).

Cijanid je za većinu organizama toksičan spoj jer inhibira stanično disanje i bitno smanjuje sintezu ATP-a, koji je prijeko potreban za život. Zbog toga veća količina slobodnoga cijanida u organizmu može dovesti do smrtnoga ishoda (38, 56, 58, 70, 77, 80, 111, 127, 128, 136, 138, 139). Tako je za čovjeka smrtonosna doza od samo 1 mg/kg tjelesne mase (38, 70, 111, 136).

Više od 2000 biljnih vrsta u prirodi sadržava cijanid u kompleksnim oblicima s ugljikohidratima u spojevima, koji se nazivaju cijanogeni glikozidi (70, 139). Tu spadaju mnoge jestive biljke poput onih iz porodice leguminoza (grah) te gomolji krumpira i manioke (38, 70). Velika količina cijanogenih glikozida nalazi se u korijenu biljke manioke, koja je glavni prehrambeni proizvod siromašnoga stanovništva Južne Amerike i središnje Afrike (70). U tim su područjima česta otrovanja cijanidom jer se manioka, bogata cijanogenim glikozidima, nedovoljno pročisti prije upotrebe. Cijanogeni se glikozidi u biljnim proizvodima prije hranjenja moraju inaktivirati termičkom obradom na visokoj temperaturi, što se postiže kuhanjem, pečenjem ili pirjanjem hrane bogate tim spojevima.

Istaknuli bismo da HCN nije sastavnica duhanskoga lista, nego nastaje izgaranjem duhana u cigareti pri temperaturi od oko 800 °C iz slobodnih aminokiselina koje

sadržavaju atome dušika i ugljika (56, 70, 80, 127, 128, 139). U glavnoj struji duhanskoga dima jedne cigarete ima oko 0,4 mg cijanida (38, 56, 80). To znači da pušenjem jedne kutije cigareta pušač u glavnoj struji dima udahne oko 8 mg cijanida. Istodobno, količina cijanida koji se oslobađa u sporednoj struji dima, a izloženi su joj pasivni pušači, iznosi oko 0,04 mg po jednoj cigareti (56).

Već smo nekoliko puta istaknuli da je cijanid otrov opasan za čovjeka i mnoge više organizme. Nasreću, organizam je u fiziološkim uvjetima zaštićen od štetnoga djelovanja cijanida zahvaljujući specifičnoj aktivnosti enzima rodanaze, koji ga kemijski pregrađuje u manje opasan spoj tiocijanat (SCN) (70, 111, 136, 139). U tom se procesu, uz upotrebu ATP-a kao izvora energije, u molekulu cijanida ugrađuje organski sumpor (S). Izvor tog sumpora u prirodnim su uvjetima aminokiseline metionin i cistein (70, 71, 127, 128, 136, 139). Ispitivanja su pokazala da je enzim rodanaza jako djelatan ako je prisutan spoj natrijev tiosulfat ($Na_2S_2O_3$), koji je učinkovit donator atoma sumpora u tim kemijskim reakcijama (70). Ta je pojava iznimno važna jer se ljudima otrovanima cijanidom nakon davanja natrijeva tiosulfata poboljšava zdravstveno stanje (56, 70, 80, 138, 139).

U pušača se tiocijanat (SCN) stvoren enzimskom reakcijom prenosi po organizmu krvnom plazmom i eritrocitima. Iz organizma se izlučuje mokraćom i slinom (38, 57, 58, 70, 77, 80, 127, 128, 136, 139). Pritom su količine tiocijanata izmjerenoga u slini i mokraći gotovo dvostruko veće od onih u krvnoj plazmi (38, 70, 127, 128). Izgleda da se stvoreni tiocijanat veže s nekim specifičnim proteinskim nosačima u plazmi (vjerojatno albumin), eritrocitima, slini i mokraći jer poluvrijeme njegova izlučivanja iz organizma pušača cigareta iznosi gotovo 50 dana (38, 56, 70, 71, 77, 127, 128, 136, 139). To znači da je količina tiocijanata nastala pušenjem jedne cigarete u plazmi ili mokraći pušača mjerljiva dulje, gotovo dva mjeseca nakon posljednjega pušenja. Zbog toga se smatra da je određivanje tiocijanata u krvnoj plazmi ili mokraći ispitanika dobar okvirni vremenski pokazatelj njihova kroničnoga pušačkog statusa (38, 56, 77, 127). Za razliku od toga, koncentracija nikotina i (ili) kotinima pokazatelj je akutnoga pušačkog statusa. Spomenuli smo i da su mnogi nepušači zapravo pasivni pušači. Primjer s cijanidom (CN^-) iz duhanskoga dima pokazuje da je određeni dio koncentracije tiocijanata u krvnoj plazmi nepušača nastao zbog udisanja prostrane struje duhanskoga dima u blizini aktivnih pušača. Ipak, ne možemo zanemariti činjenicu da dio tiocijanata izmjeren kod nepušača nije nastao iz

duhanskoga dima cigareta, nego kemijskom razgradnjom cijanogenih glikozida iz hrane.

U sekretu stanica vrata maternice naših ispitanica koncentracija tiocijanata (SCN) bila je najviša kod aktivnih pušačica, što potvrđuje rezultate više istraživača koji pokazuju da je u aktivnih pušača razina tiocijanata visoka (38, 56 – 58, 71, 80, 89, 102). U ovome su istraživanju ispitanice koje su pušile 10 i više cigareta na dan u sekretu stanica vrata maternice imale čak 12 puta višu razinu tog spoja od ispitanica nepušačica. Istodobno, ispitanice koje su pušile do 10 cigareta na dan imale su statistički višu koncentraciju tiocijanata u sekretu stanica vrata maternice od onih u skupini nepušačica. Ti rezultati samo potvrđuju otprije poznate rezultate drugih istraživača (38, 70, 71, 77, 127, 128, 136) koji pokazuju da broj popušenih cigareta povisuje koncentraciju izmjerenoga tiocijanata. Svoje rezultate koji se odnose na razinu tiocijanata u cervikalnome sekretu pušačica i nepušačica nismo mogli uspoređivati s rezultatima drugih istraživača jer je, prema našim spoznajama, ovo prvo istraživanje o koncentraciji tiocijanata u cervikalnome obrisku žena.

Usporedi li se količina tiocijanata u sekretu stanica vrata maternice s njegovom količinom u plazmi pušačica (38), vidi se da je razina tog spoja u plazmi pušačica oko 10 puta viša od koncentracije tiocijanata u sekretu stanica vrata maternice. Ta razlika nastaje vjerojatno zato što je mjereni uzorak ispitanica razrijeđen fosfatnim puferom pH-vrijednosti 7,5 te uzet u prefolikularnoj fazi, koja je bogata vodom (8, 11, 14, 15, 21, 29, 35, 40, 51).

Budući da su u sve tri skupine ispitanica postojale razlike u koncentraciji tiocijanata u sekretu stanica vrata maternice s obzirom na to jesu li žene pušačice ili nepušačice, to može biti još jedan pokazatelj štetnosti pušačkoga statusa, osobito ako je riječ o trudnoći.

Već smo nekoliko puta spomenuli da je tiocijanat (SCN) izmjeren u sekretu stanica vrata maternice nastao iz toksičnoga cijanida CN^- u duhanskome dimu cigareta. Tu pretvorbu katalizira specifičan enzim rodanaza (engl. *rhodanese*) (tiosulfat: cijanid sumporne transferaze; E. C. 2.8.1.1.). Smatra se da je to jedan od najstarijih enzima čija je aktivnost izmjerena kod nekih prokariota i svih eukariota (70, 73, 77, 111, 139). On štiti stanice od prevelike količine toksičnoga cijanida i omogućuje prijenos organskoga sumpora iz njegovih donatora – molekula tiosulfata i persulfida na cijanidni ion CN^-.

Reakcija se zbiva prema mehanizmu: $S_2O_3^{--} + CN^- \rightarrow S_2O_3^- + SCN^-$.

Nakon intravenske injekcije cijanida u ljudskome se organizmu toksični cijanid (CN^-) kemijski pregradi u tiocijanat (SCN) brzinom od 0,017 mg po kg tjelesne mase u minuti (138). To znači da se u organizmu čovjeka prosječne tjelesne mase od 70 kg u jednoj minuti pregradi oko 1,19 mg cijanida. Povežemo li to s pušenjem, proizlazi da su, da bi se u organizmu tog čovjeka količina cijanida od 0,4 mg u jednoj cigareti kemijski pregradila u tiocijanat, potrebne 0,33 minute. Taj odnos samo potvrđuje gledište da je aktivnost enzima rodanaze dovoljno snažna za brzu razgradnju cijanida iz duhanskoga dima cigareta u organizmu pušača.

Westley (139) je utvrdio da u organizmu postoje dva enzima aktivna pri detoksikaciji molekule cijanida: rodanaza i merkaptopiruvatna sumporna transferaza. Reakcije rodanaze s cijanidom brze su, gotovo trenutačne (70, 73, 136, 139), dok enzim merkaptopiruvatna sumporna transferaza sporo prenosi sumpor na cijanidni ion CN^- (139). Zbog sporosti tijeka kemijske reakcije važnost je tog enzima u organizmu minorna. Mjerenja su pokazala da u jetri sisavaca 1 M rodanaze pregradi 20 000 M cijanida u minuti (70, 139). Time je organizam sisavaca zaštićen od štetnoga djelovanja velike količine cijanida koja može nastati u okolini. Njegova detoksikacijska aktivnost smanjena je samo pri ekstremno velikim količinama cijanida, što je rijetka pojava.

Rodanaza je dobro rasprostranjena u prirodi i nalazi se u mnogim organizmima – od bakterija pa sve do čovjeka (38, 70, 72, 73, 77, 111, 127, 128, 136, 139). Njezina je molekularna masa 37 000 i u aktivnome obliku dolazi kao dimer iz dviju podjedinica (72, 73, 136). Aktivnost rodanaze optimalna je pri pH-vrijednosti 8,6 (72, 136), a najveća je kod sisavaca: teladi, štakora i kunića (139), i to u stanicama jetre (70, 72, 136, 139). Enzim rodanaza nađen je u svim staničnim organelama, a najveću aktivnost pokazuju mikrosomi (70, 72, 73, 111, 132, 136, 139, 140). Zanimljivo je da i eritrociti, kao stanice koje nemaju jezgru i mitohondrije, imaju veliku aktivnost enzima rodanaze (70, 72, 77, 139). To je iznimno važno za organizam jer se u krvi, na velikoj površini eritrocita, znatan dio cijanida unesenoga u organizam može detoksicirati prije nego što dospije do pojedinih organa u kojima inhibira stanično disanje i pritom smanjuje aktivnost mitohondrijskoga enzimskog kompleksa citokrom-oksidaze. Budući da eritrociti nemaju mitohondrije, cijanid unesen u organizam ne djeluje na njihovu fiziološku aktivnost. Ovo je ispitivanje pokazalo da se u

homogenatu stanica vrata maternice naših ispitanica cijanid pregradio u tiocijanat. S pomoću aktivnosti rodanaze tiocijanat postaje sastavnicom cervikalne sluzi žena. Pritom postoji mogućnost da je određeni dio tiocijanata izmjerenoga u sekretu stanica vrata maternice nastao negdje drugdje u organizmu i krvlju stigao u područje vrata maternice. Na temelju činjenice da je aktivnost rodanaze izmjerena u stanicama različitih ljudskih organa, skloni smo mišljenju da aktivnost tog enzima postoji i u stanicama vrata maternice (72, 136). Naime, aktivnost rodanaze bila je jednaka u ispitivanim uzorcima nepušačica i pušačica iz obiju skupina, što vrijedi i za aktivnost tog enzima u ljudskoj plazmi i nekim organima (139). To pokazuje da među sastavnicama duhanskoga dima cigareta nema onih koje bi mijenjale aktivnost tog enzima. Na temelju tih rezultata možemo zaključiti da stanice vrata maternice, a time vjerojatno i čitava maternica, imaju enzimski sustav za detoksikaciju cijanida kao i mnogi drugi organi (70, 89, 139).

Naši se rezultati podudaraju s rezultatima nekih istraživača (70, 72, 136, 139) koji pokazuju da pušenje cigareta i preparati cijanida uneseni u organizam ne stimuliraju aktivnost rodanaze u jetri i nekim drugim organima.

Cijanid CN^- mala je molekula nastala u davnoj prošlosti, vjerojatno još u doba nastanka života. Smatra se da su molekule cijanida nastale električnim pražnjenjem u prvotnoj atmosferi kad i molekule vode (H_2O), ugljikova monoksida (CO) i metana (CH_4). Cijanid je bio važan pri nastanku života jer je ta molekula nužna za stvaranje aminoskupine NH_2, koja je sastavnica građe aminokiselina. Kao što je poznato, bez aminokiselina nije moglo doći do sinteze jednostavnih i složenih proteina. Tek je sintezom proteina mogao nastati život, najprije stvaranjem organela, a poslije najjednostavnijih stanica. Budući da je cijanid istodobno i toksičan za organizam, došlo je do evolucijskoga razvoja enzima rodanaze, koji sve organizme štiti od toksičnoga utjecaja prevelike količine cijanida. Tako je rodanaza bila jedan od evolucijski rano nastalih enzima koji je omogućio nesmetan razvoj ponajprije svih eukariota.

Već smo više puta istaknuli da cijanid iz duhanskoga dima inhibira aktivnost mitohondrijskoga enzima citokrom-oksidaze (citokrom c, oksidoreduktaza; E. C. 1.9.1.3.) (38, 77, 111, 128, 132, 139, 141). Smatra se da cijanid s tim enzimom stvara stabilan kompleks prema reakciji:

$$CN^- + \text{citokrom-oksidaza} \rightarrow CN^- \text{citokrom-oksidaza}.$$

Citokrom-oksidaza enzimski je kompleks koji je u stanici nastao prije 1,5 milijarda godina (77, 82, 111, 134, 141, 142). Nalazi se na unutarnjoj membrani mitohondrija svih eukariota i u dijelu staničnih membrana nekih prokariota (75, 141, 142). To je krajnji enzim u lancu za prijenos elektrona mitohondrija, koji katalizira prijenos elektrona iz reduciranoga supstrata ferocitokroma c na molekularni kisik i stvara vodu (7, 75, 111, 134). Istodobno, pri ovoj se reakciji energija elektrona koji prolaze unutarnjom membranom mitohondrija pretvara u elektrokemijski gradijent. Energija gradijenta prevodi se u složenome enzimskom sustavu oksidacijske fosforilacije u energiju molekule ATP-a, koji je glavni izvor energije za sve procese u stanici (36, 75, 141, 143). U tome složenom prijenosu kroz membranu mitohondrija četiri protona gube energiju i stvaraju molekularnu vodu kao što je prikazano:

4 citokrom c (Fe^{2+}) + O_2 + $4H^+$ + $4H^+$ unutra $\rightarrow$ 4 citokrom c (Fe^{3+}) + $2H_2O$ + $4H^+$.

U tom procesu izvana dolaze protoni bogati energijom, koji nakon prolaska membranom ostaju bez te energije (H izvana). Ona će se ugraditi u spoj ATP-a (9, 69, 75, 111). Smatra se da mitohondrijski enzimski kompleks citokrom-oksidaza sudjeluje u više od 90 % potrošnje ukupnoga kisika u živim organizmima (74, 75, 77, 78, 134, 142). Prema svojemu sastavu citokrom-oksidaza složen je enzimski kompleks od 6 do 13 podjedinica u koje su ugrađena 2 iona željeza (Fe) i 2 – 3 iona bakra (Cu) (75, 142). Kod prokariota koji nemaju mitohondrije enzim se nalazi u bakterijskoj membrani i smješten je na unutarnjoj membrani staničnih mitohondrija (141, 142). Smatra se da tri najveće podjedinice, poznate pod nazivom podjedinica I, podjedinica II i podjedinica III, nastaju kao produkti gena kružne molekule mitohondrijskoga DNK-a na nekoliko ribosoma u mitohondrijima. Ostalih 10 podjedinica, poznatih pod nazivom podjedinice IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc i VIII, kod sisavaca su proteinski produkti koje kontrolira jezgrin DNK (75, 134, 141, 142). Nakon sinteze malih polipeptida na ribosomima u citoplazmi stanice proteinski dijelovi tih 10 podjedinica ulaze u mitohondrije i na njihovoj unutarnjoj membrani grade složeni enzimski kompleks citokrom-oksidazu (134, 141, 142). Proces prijenosa, translokacije i aktivacije tih proteina iz citoplazme u mitohondrije nadziru specifični proteinski čimbenici koji se sintetiziraju u citoplazmi. To je složen i još slabo poznat proces u kojemu sudjeluju citosolni faktori i složeni mehanizam translokacijskih sastavnica na vanjskoj i unutarnjoj membrani mitohondrija (134, 142). Promatranje mitohondrija jetre u sisavaca pokazalo je da mali proteinski

segmenti iz kojih će nastati složeni proteini vrlo brzo ulaze iz citosola (polovično vrijeme 3 minute) u mitohondrije (134). Analogno tomu vjerojatno istodobno u mitohondrijima dolazi do nakupljanja i vezanja brojnih proteinskih segmenata u 10 podjedinica, čijim prostornim razmještajem nastaje funkcionalni holoenzim citokrom-oksidaza (134, 142). Smatra se da su tri najveće podjedinice mitohondrijskoga podrijetla I, II, III prema primarnoj strukturi jednake za mitohondrije svih eukariotskih stanica i membranske strukture nekih prokariota. Vjerojatno je i funkcija tih podjedinica istovjetna u svim mitohondrijima. Tako je poznato da se podjedinica II spaja s dijelom enzima citokrom-oksidaze koji prenosi elektron u lancu za prijenos elektrona s enzima ubikvinol-ferocitokrom c oksidoreduktaze (E. C. 1.10.2.2.) na citokrom-oksidazu (142) i nalazi se na citosolnoj strani unutarnje membrane mitohondrija (75, 141, 142). Smatra se da je podjedinica III odgovorna u redoks-reakciji nužna za prijenos protona na atom kisika pri nastanku vode (75, 142). Funkcija prve podjedinice i dalje je slabo poznata (75, 142). Kod podjedinica nastalih na citoplazmatskim ribosomima (VIa, VIIa i VIII) uočena je visoka koncentracija u jetri (tip L) ili srcu i poprečno-prugastim mišićima (tip H) sisavaca (142). Drži se da odnos i raspored 10 podjedinica enzima citokrom-oksidaze koje nastaju u citoplazmi čini molekularnu, a možda i funkcionalnu razliku u sposobnosti mitohondrija da prenose protone između pojedinih organa u jednome organizmu (75, 141, 142). Postoji mišljenje da su razlike među aktivnostima mitohondrijskoga enzima citokrom-oksidaze, koje postoje među različitim skupinama organizama kao što su ljudski i ostalih primata, posljedica različitih odnosa 10 enzimskih podjedinica koje se sintetiziraju pod kontrolom jezgrina DNK-a (142). Enzimski kompleks citokrom-oksidaza odgovoran je za gotovo svu potrošnju kisika u staničnim mitohondrijima (75, 141, 142). Stoga je bitan za nesmetanu funkciju vitalnih organa iznimno osjetljivih na smanjeni dotok kisika kao što su mozak, srce ili bubrezi. Tako ljudski mozak, koji čini svega 2 % tjelesne mase, troši čak 20 % kisika unesenoga u organizam (3, 75). Prije smo istaknuli da mitohondriji u normalnim fiziološkim uvjetima stvaraju slobodne radikale kisika (9, 69, 74, 78, 85, 95, 97). U organizmu je dobro uravnotežen odnos između dotoka kisika i mogućnosti njegova spajanja s protonom u molekularnu vodu (9, 69, 95). Zahvaljujući tom mehanizmu, u mitohondrijima ima vrlo malo slobodnoga kisika (do 2 %) koji se pretvara u slobodne radikale. Mutacijom mitohondrijskoga ili jezgrina DNK-a mogu nastati promjene u

građi i funkciji svih enzima citokrom-oksidaze ili nekih podjedinica, što može smanjiti njegovu aktivnost u procesu dobivanja energije. Takve promjene mogu imati nesagledive posljedice na provedbu metabolizma u organima u kojima se troši velika količina kisika kao što su mozak, srce ili bubrezi. Danas je poznat niz oštećenja staničnoga metabolizma zbog kojih se smanjuje aktivnost enzima citokrom-oksidaze. Najbrojniji od njih jesu neurodegenerativni poremećaji, od kojih je najpoznatiji Leighov sindrom (141, 142).

Cijanid inhibira aktivnost citokrom-oksidaze zbog vezanja iona CN^- na atom željeza u kompleks koji onemogućuje prijenos protona u mitohondrijskim membranama i njegovo vezanje s molekularnim kisikom u vodu (75, 77, 141, 142). Nažalost, dugotrajno vezanje cijanida za taj enzim može dovesti do smrtnoga ishoda.

U našemu istraživanju pušenje cigareta smanjuje aktivnost enzima citokrom-oksidaze u mitohondrijima sekrecijskih stanica vrata maternice ispitanica. Tako je aktivnost tog enzima kod žena koje su pušile 10 i više cigareta na dan bila 14 puta manja od aktivnosti citokrom-oksidaze u mitohondrijima nepušačica. Istodobno je aktivnost citokrom-oksidaze u mitohondrijskoj frakciji epitelnih stanica vrata maternice pušačica koje su pušile do 10 cigareta na dan bila osjetno veća nego kod pušačica koje su pušile 10 i više cigareta na dan, a manja od one u ispitanica nepušačica.

Prema našim spoznajama ovo je prvo određivanje aktivnosti enzima citokrom-oksidaze u mitohondrijskoj frakciji stanica vrata maternice. Naši rezultati pokazuju da cijanid udahnut duhanskim dimom krvlju stiže iz pluća u područje vrata maternice gdje inhibira aktivnost enzima citokrom-oksidaze. Budući da je njegova aktivnost ključna za stanično disanje, ti rezultati neizravno pokazuju oksidacijski kapacitet ispitivanoga tkiva (9, 74, 75, 141, 142). Stoga možemo pretpostaviti da je u području stanica vrata maternice pušačica manja mogućnost iskorištavanja unesenoga kisika pri procesu dobivanja energije od one u tim stanicama nepušačica. Analogno tomu možemo pretpostaviti da cijanid iz duhanskoga dima cigareta krvlju dolazi u sva područja genitalnoga trakta žena i tamo inhibira aktivnost mitohondrijskoga enzima citokrom-oksidaze te smanjuje oksidacijski kapacitet tog dijela organizma. Ta činjenica vrijedi za sve organe aktivnih pušača cigareta. Naši rezultati neizravno potvrđuju tvrdnju da je u stanicama pušača cigareta smanjena sinteza ATP-a, koji je glavni izvor stanične energije (9, 127).

Ovo ispitivanje pokazuje da mitohondriji sekrecijskih stanica vrata maternice ispitanica koje su konzumirale veći broj cigareta imaju manju aktivnost citokrom-oksidaze. Očito je da je kapacitet rodanaze, koja detoksicira cijanid iz duhanskoga dima cigareta u organizmu pušača, prilično ograničen kad dio tog cijanida krvlju nesmetano stiže u područje vrata maternice. Na temelju toga možemo pretpostaviti da u cijelome organizmu pušača poslije pušenja postoji određena količina cijanida koju organizam nije uspio metabolizirati u manje štetan tiocijanat.

Ovisnost između stupnja aktivnosti enzima citokrom-oksidaze i broja popušenih cigareta promatranih prema količini cijanida mogla bi se iskoristiti kao praktični parametar za procjenu pušačkoga statusa svih ispitanica ako znamo da je uzimanje uzorka za ispitivanje jednostavno i neinvazivno. Određivanje aktivnosti citokrom-oksidaze u staničnim mitohondrijima, analogno tomu, neizravno pokazuje je li u organizam prije mjerenja unesena manja ili veća količina cijanida (CN^-).

Tako bi se, prema potrebi, u mitohondrijskoj frakciji staničnoga sedimenta dobivenoga nakon uzimanja obriska iz područja vrata maternice načinom koji se rabi za papa-test u razmjerno kratkome vremenu mogla odrediti aktivnost toga enzimskog kompleksa. Mitohondrijska frakcija epitelnih stanica vrata maternice, uz mitohondrije segmentiranih leukocita i trombocita te stanica bukalne sluznice i stanica amnionske tekućine, jedina je dostupna struktura u kojoj se može odrediti aktivnost enzima citokrom-oksidaze ili nekih drugih mitohondrijskih enzima nakon razmjerno neinvazivnoga dobivanja tih stanica iz organizma ispitanica.

Ireverzibilna inhibicija aktivnosti citokrom-oksidaze s cijanidom u suprotnosti je s tijekom životnih procesa. Cijanid iz duhanskoga dima cigareta i neki industrijski razgradljivi produkti bogati cijanidom poput plastike stalna su potencijalna prijetnja normalnome funkcioniranju organizma. To se ponajprije odnosi na organe osjetljive na količinu kisika poput mozga, srca i bubrega, koji prvi otkazuju pri prisutnosti veće količine cijanida. Otrovanje cijanidom posljedica je za oko 30 % smanjenoga stvaranja stanične energije u obliku ATP-a (3, 75). Manjak ATP-a u stanici znači nedovoljno energije za aktivan prijenos iona u stanice i iz njih, održavanje membranskoga potencijala te usporenu sintezu svih staničnih makromolekula, a ponajprije proteina, čime se usporavaju rast i dioba stanica (3, 75, 77).

Pri otrovanju cijanidom nemogućnost prijenosa protona citokrom-oksidazom na molekularni kisik povećava mogućnost stvaranja već prije spomenutih slobodnih

radikala kisika koji dodatno oštećuju strukturu i funkciju mitohondrija (9, 78, 85, 95, 97). Stoga se osobama koje su otrovane cijanidom daju natrijev tiosulfat ili natrijev nitroprusid, koji stimuliraju enzim rodanazu da pregradi otrovni cijanid u manje štetan spoj tiocijanat (SCN). Cijanid je mala molekula koja se krvlju prenosi po organizmu. Dobro je topljiv u lipidima i lako se difundira u sve stanice u kojima smanjuje aktivnost enzimskoga kompleksa citokrom-oksidaze ako ga prije toga enzim rodanaza nije detoksicirao u tiocijanat.

Već smo prije spomenuli evolucijsko značenje molekule cijanida (CN^-), bez koje bi se teško organizirao život na Zemlji. Naša istraživanja pokazuju da je aktivnost rodanaze u epitelnim stanicama vrata maternice prilično ograničena jer je aktivnost citokrom-oksidaze kod ispitanica koje puše deset i više cigareta na dan osjetno manja od aktivnosti tog enzima kod ispitanica koje ne puše. Očito je da je smanjena aktivnost citokrom-oksidaze u mitohondrijskoj frakciji sekrecijskih stanica vrata maternice ispitanica koje su pušile 10 i više cigareta na dan nastala zbog prisutnosti cijanida iz duhanskoga dima cigareta. Analogno tomu, možemo pretpostaviti da cijanida ima i u sekretu stanica vrata maternice žena koje puše i manji broj cigareta. Tu pretpostavku možemo povezati s činjenicom da se u području vrata maternice mogu skupljati spermiji, koji ondje ostaju vitalni i do dva dana (10, 11, 14, 15). Pretpostavlja se da u tom razdoblju cervikalni sekret ispitanica pušačica sadržava cijanid. S obzirom na djelovanje cijanida u organizmu postoji mogućnost da cijanid iz duhanskoga dima cigareta smanjuje aktivnost citokrom-oksidaze u brojnim mitohondrijima tijela spermija. U takvim uvjetima spermiji bi u području vrata maternice ispitanica koje su pušile 10 i više cigareta na dan mogli sintetizirati manje ATP-a, što bi utjecalo na njihovu vitalnost. U prilog tom razmišljanju govore i činjenice da su češća oštećenja funkcije spermija pušača nego nepušača.

Duhanski dim cigareta heterogena je smjesa oko 4000 različitih anorganskih i organskih, jednostavnih i složenih spojeva koji se krvlju prenose po organizmu pušača. On sadržava 600 tvari štetnih za organizam i čak 42 organska spoja dokazane kancerogenosti (38, 56 – 59, 89). Iz cervikalne sluzi stanica vrata maternice pušačica izolirani su kancerogeni policiklički aromatski ugljikovodici, čija prisutnost važan uzročnik razvoja raka vrata maternice (13, 19, 24, 103, 105, 107, 131). Brojni spojevi strani organizmu, poznati pod imenom ksenobiotici, detoksiciraju se različitim reakcijama poput hidroksilacije, oksidacije, redukcije ili konjugacije u

manje štetne metaboličke produkte koji se iz organizma obično izlučuju putem žuči ili mokraće (75, 80, 81, 89, 90, 109). Detoksikaciju obavljaju enzimi iz skupine oksidoreduktaza, koji staničnim reakcijama prenose elektrone (33, 144). Oni su utvrđeni kod mnogih organizama i dobro proučeni kod sisavaca (144). Dolaze u svim staničnim strukturama osim u poprečno-prugastim mišićima i eritrocitima (144, 145). U stanici se nalaze u mitohondrijskoj membrani i membrani endoplazmatskoga retikuluma. Ti enzimi prenose hidroksilnu skupinu OH i, ponajprije u jetri sisavaca, detoksiciraju različite tvari kao što su specifični lijekovi, sredstva za smirenje, narkotici, pesticidi, insekticidi, steroidni hormoni, lipidne molekule i prostaglandini (144). Oksidoreduktaze, uključene u metabolizam ksenobiotika, pripadaju skupini enzima faze I (oksidacijski enzimi) ili faze II (konjugacijski enzimi). Enzimi iz faze I stvaraju funkcionalne skupine koje mogu naknadno služiti kao mjesta za konjugaciju s glukuronskom kiselinom ili sulfatima, što se zbiva uz katalitičko djelovanje enzima iz faze II (75, 80, 90, 123).

Citokrom P-450 aktivna je sastavnica mnogih enzima iz faze I koji sudjeluju u procesu detoksikacije različitih metabolita, lijekova ili štetnih tvari netopljivih u vodi, a koje bi se bez sudjelovanja tih enzima nakupile u staničnoj membrani do razine toksičnosti (79, 80, 90, 144, 145). Ti enzimi iz porodice citokroma P-450, poznati pod pokratom CYP, u ljudskome se organizmu nalaze u više od tridesetak izoenzima (80, 90, 144, 145). Ulazak ksenobiotika u stanicu mogući je važan čimbenik indukcije enzima iz skupine citokroma P-450. Tako je poznato da, primjerice, fenobarbiton ili metopiron, dani eksperimentalnim životinjama, naglo povećavaju količinu citokroma P-450 u njihovoj jetri (33, 144, 145).

Iako u ljudskome organizmu ima najmanje 25 – 30 izoenzima iz skupine citokroma P-450 monooksigenaza, od kojih se najveća skupina nalazi u mikrosomskoj frakciji jetrenih stanica, još se malo zna o njihovim genskim značajkama (80, 90,144). Poznato je da su hepatociti glavno mjesto proizvodnje lipoproteinskih molekula koje se krvlju prenose u ostale dijelove organizma. Enzimi koji sintetiziraju lipidne sastavnice lipoproteina locirani su, kao i enzimi za detoksikaciju štetnih tvari, u membranama glatkoga endoplazmatskog retikuluma. Tako se s pomoću enzima koji sadržavaju citokrom P-450 istodobno provodi hidroksilacija, oksidacija ugljikovodika, dealkilacija, dehidrogenacija i pregradnja kancerogenih tvari (80, 90, 144, 145).

Mnogi sastojci duhanskoga dima cigareta nastali pirolizom, među kojima su akrolein, formaldehid, nitrozamini i nikotin, potiču porast koncentracije citokroma P-450 i povećavaju aktivnost specifičnih enzima detoksikacije u različitim tkivima pušača cigareta (56, 89, 144). Ksenobiotike iz duhanskoga dima cigareta detoksicira enzim CYP2E1, koji ima najveću aktivnost u jetri sisavaca (80, 90). Gen za enzim CYP2E1 smješten je na 10. kromosomu ljudi (80, 144).

Povišena koncentracija citokroma P-450 izmjerena je u jetri, bubrezima i posteljicama žena koje puše (56, 80, 89, 90). Ona je u posteljici pušačica gotovo 100 puta viša od koncentracije tog spoja u posteljicama nepušačica (80, 89, 90). Vjerojatno jedna ili više sastavnica duhanskoga dima cigareta aktivira specifične gene na 5. i 10. kromosomu, pri čemu se stvaraju specifični proteini molekularne mase oko 60 000. Iz njih nastaje aktivni spoj citokrom P-450 (53, 80, 89).

Naši rezultati pokazuju povišenu koncentraciju citokroma P-450 u području stanica vrata maternice ispitanica pušačica, osobito onih koje su pušile 10 i više cigareta na dan. To potvrđuje rezultate nekih istraživača koji pokazuju da pušenje povećava količinu citokroma P-450 u organima pušačica cigareta (56, 80, 89, 90). Možemo pretpostaviti da maternica i ostali dijelovi genitalnoga trakta pušačica aktivno sudjeluju u procesu detoksikacije ksenobiotika iz duhanskoga dima cigareta. Duhanski dim cigareta u svojoj isparivoj fazi i duhanskome katranu sadržava brojne organske slobodne kisikove radikale kao što su katehinski i semikinonski radikali (9, 89, 95). Već smo spomenuli da su slobodni radikali derivati molekula (spoja) kisika ili dušika u kojima atom kisika ima u vanjskoj elektronskoj ljusci jedan nespareni elektron (9, 68, 69, 74, 75, 78, 83 – 86, 92, 95, 97, 112, 123). To su vrlo reaktivne molekule koje destabiliziraju i oštećuju funkciju staničnih makromolekula: DNK-a, proteina i lipida (9, 68, 69, 74, 78, 84 – 86, 95).

U početnome dijelu ove rasprave istaknuli smo štetni učinak slobodnih radikala kisika na molekule DNK-a i proteine. Također, ti radikali djeluju na funkciju staničnih struktura koje su bitne za život, a to su lipidi. Lipidi su prema strukturi različite stanične makromolekule koje grade membrane svih organela (9, 74, 75). Iznimno su važni za slobodan prolazak malih i velikih molekula u stanice i organele te izvan njih. Slobodni radikali kisika segmentiraju duge lance ugljikovodika u molekulama lipida u manje segmente, osobito na mjestima na kojima se nalaze dvostruke nezasićene veze između dvaju atoma ugljika (9, 69, 83). U procesu lipidne peroksidacije, koji se

eksplozivno širi uzduž makromolekula složenih lipida, stvara se niz kratkih lipidnih odsječaka od nekoliko ugljikovih atoma. Tako nastaju brojne male molekule, od kojih su najpoznatije izoprostan, eten, nanoaldehid i malondialdehid (9, 69, 74, 78, 83, 84, 86, 92, 95, 112). Stupanj oštećenja staničnih lipida proporcionalan je koncentraciji tih tvari (9, 69, 84). Pod djelovanjem slobodnih radikala stanična membrana postaje porozna (69). Kroz nastale mnogobrojne pukotine ioni i različite male molekule prodiru brzo i lako (osobito ioni Ca) te izlaze iz stanice. Stanična membrana gubi selektivnu propustljivost i mijenja ionski potencijal. U njoj nestaju mebranski kanali za prolazak iona kalija, natrija i kalcija. Zbog toga u stanici naglo rastu osmotski tlak i količina kalcija, što može izazvati oštećenje stanice, a u ekstremnim slučajevima i njezinu smrt (9, 69, 86, 112).

U ovome istraživanju lipidnu smo peroksidaciju mjerili određivanjem koncentracije spoja malondialdehida u cervikalnome sekretu i homogenatu sekrecijskih stanica vrata maternice nepušačica i pušačica cigareta. U vodenoj otopini cervikalne sluzi naših ispitanica utvrđena je prisutnost malondialdehida, koji je krajnji produkt lipidne peroksidacije. Količina izmjerenih lipidnih peroksida bila je jednaka kod ispitanica nepušačica i u objema skupinama pušačica. Pretpostavljamo da lipidna peroksidacija nije mogla nastati u samome cervikalnom sekretu jer je poznato da on ne sadržava makromolekule kao što su DNK i lipidi (10, 14, 40). Izmjerena količina malondialdehida vjerojatno je nastala prolaskom tog spoja iz sekrecijskih stanica vrata maternice bilo kao dio njihova sekreta bilo nakon apoptotičkoga raspada tih stanica. Da bismo dobili stvaran uvid u to nastaje li lipidna peroksidacija u području stanica vrata maternice, mjerili smo lipidnu peroksidaciju u homogenatu sekrecijskih stanica uzetih u cervikalnome sekretu. Homogenat je dobiven nakon centrifugiranja sluzi ispitanica kojim je odijeljen nestanični dio sekreta od staničnoga. Stanični homogenat obiju skupina pušačica sadržavao je veću količinu produkata lipidne peroksidacije nego homogenat stanica vrata maternice nepušačica, što potvrđuje dobro poznate rezultate da pušenje cigareta povisuje stupanj lipidne peroksidacije u ispitivanim uzorcima (9, 69, 83, 86, 89). Broj popušenih cigareta utječe na razinu lipidne peroksidacije, koja je bila najviša u staničnome homogenatu ispitanica koje puše deset i više cigareta na dan. Ti rezultati pokazuju da duhanski dim cigareta povisuje razinu lipidne peroksidacije u stanicama vrata maternice, vjerojatno zbog specifičnoga djelovanja slobodnih radikala kisika na lipidne strukture stanica tog

sustava. Ukupna vrijednost lipidne peroksidacije u homogenatu stanica vrata maternica možda se odnosi i na manji dio lipidnih peroksida koji su nastali drugdje u organizmu i krvlju stigli u područje cerviksa. Ta se pretpostavka temelji na rezultatima niza istraživanja koja su pokazala visok stupanj lipidne peroksidacije u krvnoj plazmi i nekim organima aktivnih pušača cigareta (9, 38, 78, 83, 84, 86, 95, 112). Ti rezultati nedvojbeno pokazuju da duhanski dim cigareta povisuje razinu lipidne peroksidacije u stanicama vrata maternice. Analogno tomu, pretpostavljamo da se lipidna peroksidacija događa u svim dijelovima genitalnoga trakta žena koje su aktivne pušačice cigareta. Iz praktičnih je razloga mjerenje ukupnih neenzimskih antioksidansa, koje je nazvano *ukupan antioksidacijski kapacitet*, najprije provedeno u krvnoj plazmi (9, 74, 84, 113). Mjerenjem tog parametra u krvnoj plazmi, urinu ili pojedinim tkivima može se procijeniti odnos razine oksidansa i antioksdansa u ispitivanome uzorku. Danas su snižena razina antioksidacijskoga kapaciteta plazme i povišenje razine lipidne peroksidacije najsigurniji pokazatelji oksidacijskoga stresa (9, 74, 78, 84, 113).

U ovoj smo studiji mjerili ukupan antioksidacijski kapacitet cervikalne sluzi nepušačica i dviju skupina pušačica cigareta. Već smo istaknuli da duhanski dim cigareta sadržava brojne oksidanse (9, 56, 69, 74, 83, 86, 89, 92, 95, 97, 100, 135). Željeli smo utvrditi mijenja li pušenje cigareta koncentraciju ukupnih antioksidansa u cervikalnoj sluzi ispitanica.

Glavni antioksidansi u krvnoj plazmi ljudi jesu mokraćna kiselina, vitamin C te proteini bogati skupinama SH kao što su reducirani glutation i albumin (9, 74, 78, 84, 86, 91, 92, 113). Djelovanjem slobodnih radikala ili drugih oksidansa razgrađuju se antioksidansi prisutni u tkivu, pa je njihova razina, izražena vrijednošću antioksidacijski kapaciteta, proporcionalna djelovanju prisutnih oksidansa.

Naša ispitivanja pokazuju da je antioksidacijski kapacitet cervikalne sluzi aktivnih pušačica od 10 i više cigareta na dan za oko 30 % manji od razine ukupnih antioksidansa u cervikalnoj sluzi ispitanica nepušačica. Između podskupina pušačica male su razlike u vrijednostima antioksidacijskoga kapaciteta. Ti rezultati potvrđuju da pušenje većega broja cigareta smanjuje antioksidacijski kapacitet pušača (9, 83, 84, 86, 95, 100). Duhanski dim u stanicama, uz prije spomenuti vitamin C, vjerojatno snižava razinu i nekih drugih antioksidansa i proteina bogatih skupinama SH.

U ovome smo istraživanju veliku pozornost posvetili djelovanju cijanida (CN^-) iz duhanskoga dima cigareta na sekrecijske stanice vrata maternice, što je promatrano u homogenatu i mitohondrijima tih stanica ili u njihovu sekretu. Utjecaj cijanida izrazili smo kao koeficijent korelacije između nekoliko mjerenih parametara. Prvi promatrani parametri bili su koncentracija tiocijanata (SCN) i aktivnost enzimskoga kompleksa citokrom-oksidaze kod svih pušačica cigareta. Aktivno pušenje cigareta povisuje koncentraciju tiocijanata u cervikalnoj sluzi te istodobno smanjuje aktivnost enzima citokrom-oksidaze u mitohondrijima epitelnih stanica vrata maternice. Broj popušenih cigareta gotovo linearno povećava količinu tiocijanata, odnosno smanjuje aktivnost citokrom-oksidaze. Ta dva obrnuto proporcionalna parametra istodobno su dobri pokazatelji pušačkoga statusa naših ispitanica. Ako taj odnos postoji u području stanica vrata maternice, možemo pretpostaviti da isto vrijedi i za velik broj organa u organizmu aktivnih pušačica cigareta. Istovjetan statistički signifikantan odnos postoji usporedimo li koncentracije tiocijanata i vitamina C u ispitivanim uzorcima pušačica. Pušenje cigareta povišava razinu tiocijanata u sekretu stanica vrata maternice i snižava koncentraciju vitamina C. Za razliku od prethodne korelacije, ne možemo tvrditi da je cijanid sastavnica odgovorna za nižu koncentraciju vitamina C u pušača kao što je to bilo pri aktivnosti enzima citokrom-oksidaze. Već smo prije istaknuli da se vitamin C u organizmu pušača troši za razgradnju slobodnih radikala iz duhanskoga dima cigareta (9, 68, 69, 74, 78, 83, 84, 86, 91, 92, 95, 97, 99). Ovo je istraživanje još jednom potvrdilo potvrdilo više puta potvrđene rezultate da duhanski dim cigareta snižava koncentraciju vitamina C u organizmu pušača (9, 68, 83, 84, 86, 92, 95, 97, 99, 100). I ovdje postoji gotovo linearan odnos između broja popušenih cigareta i koncentracije vitamina C. Što je broj popušenih cigareta bio veći, to je niža bila koncentracija vitamina C u sekretu stanica vrata maternice naših ispitanica. Promatranje odnosa koncentracije vitamina C u sekretu i koncentracije citokroma P-450 u stanicama vrata maternice te koncentracije tiocijanata i razine citokroma P-450 uputilo je na drugačiji odnos. Između tih parametara nema izražene korelacije. Između koncentracija tiocijanata i citokroma P-450 sličnost je u tome što kod pušača obje rastu. Međutim, s porastom broja popušenih cigareta koncentracija tiocijanata rasla je mnogo brže od koncentracije citokroma P-450 kod istih pušačica. Sličan je i u odnos vitamina C i citokroma P-450. Ti su parametri obrnuto

proporcionalni, ali je pad koncentracije vitamina C kod pušačica mnogo veći od porasta koncentracije citokroma P-450 kod istih ispitanica.

Rezultati ovih ispitivanja pokazuju da cervikalna sluz pušačica ima brojne parametre koji se razlikuju od istih pokazatelja kod nepušačica. Neki od tih parametara nalaze se u organelima: mitohondrijima (citokrom-oksidaza) ili ribosomima (rodanaza). To pokazuje da sekret cervikalnih stanica može poslužiti kao izvor za određivanje brojnih metaboličkih parametara koji postoje u cervikalnim stanicama, koje su sastavni dio genitalnoga trakta žena. Neinvazivan i brz način dobivanja bioloških uzoraka potvrđuje da je cervikalna sluz potencijalno koristan sustav za biokemijska ispitivanja koji može proširiti naše spoznaje o funkciji genitalnoga trakta žena dobivene morfološkim, citološkim i histološkim ispitivanjem. Uspoređujući pacijentice koje ne puše s onima koje puše do 10 cigareta na dan i onima koje puše više od 10 cigareta na dan, pokazalo se da one koje puše više od 10 cigareta na dan statistički značajno češće pate od primarne idiopatske neplodnosti u odnosu na pacijentice koje uopće ne puše ili puše manje od 10 cigareta na dan. Stopa primarne idiopatske neplodnosti povezana je s koncentracijama mjerenih supstancija koje pokazuju razinu oksidacijskoga stresa i redovito su bile statistički značajno više u skupini pacijentica koje puše više od 10 cigareta na dan nego ikod onih koje ne puše (superoksid O_2, GSH), dok su kapaciteti kojima se organizam bori protiv oksidacijskoga stresa bili manji (AOPP i FRAP). Također, pokazane su znatno niže koncentracije superoksida O_2 i GSH-a u ispitanica koje ne puše nego kod onih koje puše manje od deset cigareta na dan. To upućuje na to da povećanje oksidacijskoga stresa, koje prouzročuje nikotin kao glavna štetna sastavnica duhanskoga dima, proporcionalno ovisi o dozi: što je viša ukupna doza nikotina kojoj je organizam svakodnevno izložen, viša je i razina oksidacijskoga stresa. Sve to govori u prilog činjenici da nikotin povećava oksidacijski stres. Pretpostavku potkrepljuje studija Swami i suradnika (76), koja dokazuje da nikotin prouzročuje oksidacijski stres. Potrebne su, međutim, dodatne nasumične nadzirane kliničke studije na većemu uzorku pacijentica koje bi dalje rasvijetlile povezanost nikotina, razine oksidacijskoga stresa koju on inducira u cervikalnoj sluzi pacijentica i posljedične neplodnosti da bismo došli do čvrstih zaključaka koji bi bili klinički važni te služili kao baza i referencija za savjetovanje i postupanje u obradi pacijentica s primarnom idiopatskom neplodnosti.

7. ZAKLJUČAK

U ovome su radu promatrani neki parametri duhanskoga dima u sekretu i stanicama vrata maternice nepušačica i pušačica cigareta. Prema broju popušenih cigareta pušačice su bile podijeljene u dvije skupine: one koje su pušile manje od 10 cigareta na dan te one koje su pušile 10 i više cigareta na dan. Najveći broj pušačica najmanje je tri mjeseca prije ispitivanja pušio između 10 cigareta i 22 cigarete na dan.

Količina proteina u cervikalnoj sluzi i stanicama vrata maternice pušačica i nepušačica bila je jednaka.

Duhanski dim cigareta snizio je razinu askorbinske kiseline u sekretu stanica vrata maternice naših ispitanica. Količina vitamina C u naših ispitanica smanjila se s brojem popušenih cigareta, pa je najmanja bila kod ispitanica koje su pušile 10 i više cigareta na dan.

Duhanski dim cigareta sadržava cijanid CN^-, koji enzim rodanaza (tiosulfat: cijanid sumporne transferaze; E. C. 2.8.1.1.) pregrađuje u tiocijanat (SCN). Koncentracija tiocijanata u sekretu stanica vrata maternice bila je viša kod ispitanica koje su aktivne pušačice. U žena koje puše 10 i više cigareta na dan koncentracija tiocijanata bila je nekoliko puta viša od koncentracije tiocijanata u sekretu epitelnih stanica vrata maternice. Ta ispitivanja pokazuju da s porastom broja popušenih cigareta raste i koncentracija tiocijanata u cervikalnoj sluzi pušačica.

Kod svih je ispitanica bila jednaka aktivnost enzima rodanaze, što pokazuje da u duhanskome dimu cigareta nema sastavnica koje bi inhibirale ili povećavale aktivnost tog enzima.

Cijanid iz duhanskoga dima cigareta inhibirao je aktivnost mitohondrijskoga enzima citokrom-oksidaze, koji je krajnji enzim lanca za prijenos elektrona. On prenosi proton na kisik i stvara molekularnu vodu. Aktivnost tog enzima bila je smanjena u mitohondrijskoj frakciji sekrecijskih stanica vrata maternice pušačica i naglo opadala s brojem popušenih cigareta.

Duhanski dim cigareta sadržava brojne ksenobiotike koji su stimulativno djelovali na razinu citokroma P-450 u ispitivanim uzorcima. Koncentracija citokroma P-450 u homogenatu epitelnih stanica vrata maternice u ispitivanim je uzorcima bila viša kod

ispitanica koje su pušile 10 cigareta na dan i više nego kod onih koje su pušile manje od 10 cigareta na dan.

Slobodni radikali iz duhanskoga dima cigareta povećali su lipidnu peroksidaciju mjerenu kao malondialdehid u homogenatu sekrecijskih stanica vrata maternice ispitanica koje su pušile 10 i više cigareta na dan. U tih je ispitanica bila smanjena i ukupna antioksidacijska aktivnost.

Između koncentracije tiocijanata u sekretu stanica vrata maternice ispitanica koje su pušile 10 i više cigareta na dan i aktivnosti mitohondrijskoga enzima citokrom-oksidaze postojala je obrnuta korelacija. Pušenje cigareta povisilo je razinu tiocijanata i smanjilo aktivnost enzima citokrom-oksidaze. Promatrani parametri izravno ovise o prisutnosti cijanida (CN^-) u duhanskome dimu cigareta. Valja istaknuti da među nepušačicama njih gotovo 45 % uopće nije imalo mjerljivu količinu tiocijanata, što upućuje na zaključak da mjerenje tiocijanata u cervikalnoj sluzi žena može biti dobar pokazatelj njihova pušačkoga statusa. S obzirom na količinu tiocijanata cervikalna sluz pokazuje ista svojstva kao i krvna plazma, slina i mokraća, kod kojih je vrlo visoka razina tiocijanata u žena koje konzumiraju veću količinu cigareta (38). Razlika od oko 7,5 puta u količini tiocijanata između dviju podskupina ispitanica koje puše pokazuje da se tim jednostavnim mjerenjem može procijeniti koliko cigareta puše ispitanice.

Identičan odnos postoji između količine tiocijanata i količine vitamina C u sluzi sekrecijskih stanica vrata maternice ispitanica koje su pušile 10 i više cigareta na dan. Za razliku od prethodnoga odnosa količina tiocijanata ovisi o koncentraciji cijanida, dok je koncentracija vitamina C pokazatelj sposobnosti organizma da razgradi slobodne radikale iz duhanskoga dima cigareta.

Na temelju obavljenoga ispitivanja može se zaključiti da se određivanjem količine tiocijanata (SCN) ili aktivnosti mitohondrijskoga enzima citokrom-oksidaze u sekretu stanica vrata maternice žena uzetom za citološka istraživanja mogu brzo dobiti jasni pokazatelji koji razlikuju pušačice od nepušačica. To je iznimno važno radi određivanja aktivnosti enzima citokrom-oksidaze jer je dobivanje uzoraka brzo i neinvazivno.

Stopa primarne idiopatske neplodnosti povezana je s višim koncentracijama superoksida O_2 i GSH-a te nižim vrijednostima AOPP-a i FRAP-a, a više koncentracije superoksida O_2 i GSH-a potvrđene su upravo u ispitanica koje su

češće pušile. To je jasno pokazala analiza provedena s obzirom na količinu popušenih cigareta. Također, pokušali smo odgovoriti na pitanje može li se s pomoću analize navedenih parametara pomoći dijagnostici neplodnosti koja se povezuje s kvalitetom cervikalne sluzi. Rezultati istraživanja govore u prilog tomu da je to moguće, ali s obzirom na to da je riječ o parametrima koji u literaturi dosad nisu opisani u tom svjetlu te o razmjerno malome uzorku s obzirom na zahtjev, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se potvrdila dijagnostička upotreba.

8. KRATAK SADRŽAJ NA HRVATSKOME JEZIKU

U Klinici za ženske bolesti i porode Kliničke bolnice *Merkur* u razdoblju od 1. siječnja 2013. do 31. prosinca 2018. godine provedeno je prospektivno istraživanje o utjecaju duhanskoga dima na smanjenje kvalitete cervikalne sluzi žena reproduktivne dobi i s time povezane veće učestalosti neplodnosti. Cilj je istraživanja bio utvrditi koncentracije pojedinih parametara u uzorcima sluzi iz cervikalnoga kanala žena koje boluju od primarne idiopatske neplodnosti te imaju naviku pušenja cigareta i istražiti u kojoj mjeri pušenje pridonosi povećanju učestalosti primarne idiopatske neplodnosti. U uzorcima cervikalne sluzi dobivenima iz cervikalnoga kanala izmjerene su ukupne količine proteina, koncentracije askorbinske kiseline, tiocijanata, citokroma P-450, aktivnosti enzima citokrom-oksidaze i rodanaze, lipidne peroksidacije, koncentracije superoksida, reduciranoga glutationa i dodatne peroksidacije proteina te je izračunan ukupan antioksidacijski kapacitet. U istraživanju je sudjelovalo 140 ispitanica podijeljenih u dvije skupine s obzirom na plodnost (90 zdravih i 60 ispitanica s primarnom idiopatskom neplodnosti) te s obzirom na naviku pušenja i količinu cigareta konzumiranih tijekom dana. U ispitanica pušačica nađene su više koncentracije tiocijanata (pušačice > 10 cig. = 25,70 nm/mL; pušačice < 10 cig. = 16,87 nm/mL; nepušačice = 7,26 nm/mL) i citokroma P-450 (pušačice > 10 cig. = 1,04 nm/mg proteina; pušačice < 10 cig. = 0,24 nm/mg proteina; nepušačice = 0,09 nm/mg proteina) u homogenatu površinskih stanica vrata maternice u odnosu na nepušačice te je potvrđena niža koncentracija citokroma P-450 u mitohondrijskoj frakciji površinskih stanica vrata maternice (pušačice > 10 cig. = 0,14 nM/mg proteina; pušačice < 10 cig. = 1,37 nM/mg proteina; nepušačice = 14,34 nM/mg proteina). Ta se razlika povećavala s većim brojem cigareta konzumiranih tijekom dana. Obrnute vrijednosti potvrđene su za koncentraciju askorbinske kiseline koje je znatno najmanje bilo u skupini ispitanica koje su konzumirale deset i više cigareta na dan (pušačice > 10 cig. = 10,16 µ/mL; pušačice < 10 cig. = 16,73 µ/mL; nepušačice = 42,08µ/mL). Aktivnost enzima rodanaze i lipidna peroksidacija u cervikalnoj sluzi nisu pokazale bitnu razliku među skupinama ispitanica, no lipidna peroksidacija u homogenatu epitelnih stanica vrata maternice bila je veća u ispitanica pušačica, osobito u onih koje su konzumirale deset i više cigareta na dan (pušačice > 10 cig. = 55,82 nm malondialdehida/mg

proteina; pušačice < 10 cig. = 42,56 nm malondialdehida/mg proteina; nepušačice = 36,23 nm malondialdehida/mg proteina). U ispitanica s navikom pušenja koje k tomu boluju od primarne idiopatske neplodnosti potvrđene su znatno više koncentracije superoksida O_2 (pušačice > 10 cig. =13,22 μM/min/mL; pušačice < 10 cig. = 10,12 μM/min/mL; nepušačice = 4,26 μM/min/mL) i reduciranoga glutationa (pušačice > 10 cig. = 82,73 μM/mL; pušačice < 10 cig. = 54,41 μM/mL; nepušačice = 24,85 μM/mL). Štoviše, najvišu koncentraciju imale su neplodne ispitanice s navikom pušenja deset i više cigareta. Dodatna oksidacija proteina (pušačice > 10 cig. = 18,00 μM/L; pušačice < 10 cig. = 29,53 μM/L; nepušačice = 37,75 μM/L) i ukupan antioksidacijski kapacitet (pušačice > 10 cig. = 247,60 μM$FESO_4$/L; pušačice < 10 cig. = 284,20 μM$FESO_4$/L; nepušačice = 396,05 μM$FESO_4$/L) bili su najnižih vrijednosti u skupini ispitanica koje su bile neplodne i pušile deset i više cigareta na dan. Ovim smo istraživanjem utvrdili da dim cigareta utječe na kvalitetu sluzi iz cervikalnoga kanala povećavajući udio tvari koje štetno djeluju na njezinu kvalitetu i smanjuju antioksidacijski kapacitet, što rezultira slabijom kvalitetom cervikalne sluzi.

Ključne riječi: primarna idiopatska neplodnost, cervikalna sluz, pušenje, askorbinska kiselina, tiocijanat, citokrom P-450, citokrom-oksidaza, rodanaza, lipidna peroksidacija, superoksid O_2, reducirani glutation, dodatna peroksidacija proteina, ukupan antioksidacijski kapacitet

9. KRATAK SADRŽAJ I NASLOV RADA NA ENGLESKOME JEZIKU

The influence of smoking on biochemical changes in cervical mucus of women in reproductive age

Gordana Planinić Radoš, 2022.

A prospective study on the effect of tobacco smoke on reducing the quality of cervical mucus of the women of reproductive age and consequently a higher incidence of infertility, was performed at Department of gynecology and obstetrics Merkur Clinical Hospital from January 1st, 2013 till December 31st, 2018. The aim of the study was to determine the concentrations of individual parameters from mucus samples from the cervical canal in women suffering from primary idiopathic sterility and who have a habit of smoking tobacco, and to investigate the extent to which smoking contributes to the incidence of primary idiopathic infertility. In the cervical mucus samples obtained from the cervical canal total protein content, concentrations of ascorbic acid, thiocyanate, cytochrome P-450, cytochrome c oxidase and rhodanese enzyme activity, lipid peroxidation, superoxide concentration, reduced glutathione, additional protein peroxidation were measured and total antioxidative capacity calculated. The study involved 140 subjects, divided into two groups with respect to fertility (90 healthy and 60 subjects with primary idiopathic infertility), and smoking habits and daily cigarettes consumption. In subjects with smoking habits higher concentrations of thiocyanate (smoking >10 cig. = 25,70 nm/mL; smoking <10 cig. = 16,87 nm/mL; non-smoking = 7,26 nm/mL) and cytochrome P-450 (smoking >10 cig. = 1,04 nM/mg protein; smoking <10 cig. = 0,24 nM/mg protein; non-smoking = 0,09 nM/mg protein) were found in the superfical cervical cell homogenate when compared to to non-smokers, as well as a lower concentration of cytochrome P-450 in the mitochondrial fraction of superficial cervical cells (smoking >10 cig. = 0,14 nM/mg protein; smoking <10 cig. = 1,37 nM/mg protein; non-smoking = 14,34 nM/mg protein). This difference was greater with the higher number of cigarettes consumed per day. Reverse values were found for the concentration of ascorbic acid which was significantly lower in the group of subjects who consumed ten or more cigarettes daily (smoking >10 cig. = 10,16 µ/mL; smoking <10 cig. = 16,73 µ/mL; non-smoking = 42,08 µ/mL). The rhodanese enzyme

activity and lipid peroxidation in the cervical mucus showed no significant difference between the groups, but the lipid peroxidation in the cervical epithelial cell homogenate was higher in subjects with smoking habits, especially in those who consumed ten or more cigarettes daily (smoking >10 cig. = 55,82 nm malondialdehid/mg protein; smoking <10 cig. = 42,56 nm malondialdehid/mg protein; non-smoking = 36,23 nm malondialdehid/mg protein). Significantly higher concentrations of superoxide O2 (smoking >10 cig. =13,22 μM/min/mL; smoking <10 cig. = 10,12 μM/min/mL; non-smoking = 4,26 μM/min/mL) and reduced glutathione (smoking >10 cig. = 82,73 μM/mL; smoking <10 cig. = 54,41 μM/mL; non-smoking = 24,85 μM/mL) were found in smoking subjects as well as subjects suffering from primary idiopathic sterility. Moreover, infertile subjects with the habit of smoking ten or more cigarettes a day had the highest concentration. Advanced protein oxidation (smoking >10 cig. = 18,00 μM/L; smoking < 10 cig. = 29,53 μM/L; non-smoking = 37,75 μM/L) and total antioxidant capacity (smoking >10 cig. = 247,60 μMFESO4/L; smoking <10 cig. = 284,20 μMFESO4/L; non-smoking = 396,05 μMFESO4/L) had the lowest values in the group of subjects who were infertile and smoked ten or more cigarettes a day. This study showed that cigarette smoke affects the quality of mucus from the cervical canal by increasing the proportion of substances that have a detrimental effect on its quality and that reduce the antioxidant capacity resulting in lower quality cervical mucus.

Keywords: primary idiopathic infertility, cervical mucus, smoking, ascorbic acid, thiocyanate, cytochrome P-450, cytochrome c oxidase, rhodanesis, lipid peroxidation, superoxide O2, reduced glutathione, advanced protein peroxidation, total antioxidant capacity

10. LITERATURA

1. Assali NS (ur.). Biology of gestation. 1. dio. New York, London: Academic Press; 1986.
2. Dražančić A i sur. Porodništvo. Zagreb: Školska knjiga; 1992., str. 100–11.
3. Gayton AC. Medicinska fiziologija. 10. izd. Zagreb: Medicinska knjiga; 1989., str. 686–7.
4. Grgurević M, Pavlić Z, Grizelj V. Ginekologija. Zagreb: Jumena; 1987., str. 111–367.
5. Short RV. Role of hormones in sex cycles. U: Austin CR, Short RV (ur.). Reproduction in mammals. Cambridge University Press; 1972., str. 42–72.
6. Langman J. Medical embryology. 2. izd. Baltimore: Williams & Wilkins; 1969., str. 1–223.
7. Wolf DP, Blasco L, Khan MA, Litt M. Human cervical mucus. Changes in viscoelasticity during the ovulatory menstrual cycle. Fertil Steril 1977;28:47–52.
8. Clamp JR, Allen A, Gibbons RA, Roberts GP. Chemical aspects of mucus. Br Med Bull 1978;34:25–41.
9. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:7915–22.
10. Carlstedt I, Sheehan J, Ulmstein U, Wingerup I. Isolation and purification of the mucin component of human cervical mucus. Adv Exp Med Biol 1982;144:273–5.
11. Chantler E. Structure and function of cervical mucus. Adv Exp Med Biol 1982;144:251–63.
12. Elstein M. Cervical mucus: Its physiological role and clinical significance. Adv Exp Med Biol 1982;144:301–8.
13. Hellberg D, Valentin J, Nilsson S. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: An association independent of sexual and other factors? Acta Obstet Gynecol Scand 1986;65:625–31.
14. Odeblad E. The biophysical properties of cervical-vaginal secretions. Int Rev Natural Family Plann 1983;7:1–56.
15. Odeblad E. The functional structure of human cervical mucus. Acta Obstet Gynaecol Scand 1983;47:127–31.

16. Duijkers IJ, Klipping C. Ultrasongraphic assessment of endocervix and cervical mucus in ovulatory menstrual cycle. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1992;93:13–7.
17. Eggert-Kruse W, Leinhos G, Gerhard I, Tilgen W, Runnenbaum B. Prognostic value of in vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus. Fert Steril 1989;51:317–23.
18. Elstein M. Functions and physical properties of mucus in the female genital tract. Br Med Bull 1978;34:83–8.
19. Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffman D, Wynder E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: Nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and non smokers. Am J Obstet Gynecol 1988;158:910–3.
20. Katz DF, Slade DA, Nakajima ST. Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. Adv Contracept 1997;13:143–51.
21. Overstreet JW. Evaluation sperm cervical mucus interaction. Fertil Steril 1986;45:324–9.
22. Petta CA, Faundes A, Dunson TR i sur. Timing of onset of contraceptive effectiveness in Depo-Provera users. 1. dio. Changes in cervical mucus. Fertil Steril 1998;69:252–7.
23. Poppe WA, Ide PS, Drijkoningen MP, Lauweryns JM, Van Assche FA. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. Gynecol Obstet Invest 1995;39:34–8.
24. Sasson IM, Haley NJ, Hoffman D i sur. Cigarette smoking and neoplasia of the uterine cervix: Constituents in cervical mucus. N Engl J Med 1985;312:315–6.
25. Thomas JA, Dallenbach FD. Endocervical changes in the guinea pig after treatment with 17-beta-estradiol and 9,10, dimethylbenzanthracene. Indian J Med Res 1982;75:233–44.
26. Tsiligianni T, Karagiannidis A, Brikas P, Saratsis P. Physical properties of bovine cervical mucus during normal and induces estrus. Theriology 2001;55:629–41.
27. Van Kooij RJ, Kramer MF. Carbohydrate chains of human pre- and postovulatory cervical mucus glicoprotein. Adv Exp Med Biol 1982;144:271–2.

28. Chostyk OT, Chamberlain WJ. A study on mutagenity of tobacco smoke from low tar cigarettes. Arch Environ Health 1990;45:237–44.
29. Eriksen G, Carlstedt I, Uldbjerg N, Ernst E. Cervical mucus affect the motility of human spermatozoa in vitro. Fert Steril 1998;70:350–4.
30. Gibbons RA. Mucus of the mammalian genital tract. Br Med Bull 1978;34:34–8.
31. Meyer FA, King M, Gelman RA. One the role of sialic acid in the rheological properties of mucus. Biochim Biophys Acta 1975;392:223–32.
32. Schumacher GF. Immunology of spermatozoa and cervical mucus. Hum Reprod 1988;3:289–300.
33. Wolf DP, Sokolski JS, Litt M. Composition and function of human cervical mucus. Biochim Biophys Acta 1980;630:545–58.
34. Anilkumar R, Devanathan TG, Pattabiraman SR, Edwin MJ. Correlation between the spermatozoal characteristics and sperm penetration distance in polyacrylamide gel and bovine cervical mucus. Theriogenology 2001;55:685–91.
35. Katz DF, Overstreet JM. The mechanisms and analysis of sperm migration through cervical mucus. Adv Exp Med Biol 1982;144:319–30.
36. Tejedor AG, Doncel GF, Ballagh SA, Archer DF. Evaluation of human spermatozoa in cervical mucus: Comparison of different microscopic and extraction tehnique. Contraception 2000;62:231–7.
37. Van der Welde WJ, Treffers PE. Smoking in pregnancy: the influence on percentile birth weight, mean birth weight, placental weight, menstrual age, perinatal mortality and maternal diastolic blood pressure. Gynecol Obstet Invest 1985;19:57–63.
38. Klepac R. Duhanski dim i ljudsko zdravlje. Priroda 1994;800:16–7.
39. Witschi H, Lundgaard SM, Rajini P, Hendrickx AG, Last JA. Effects of exposure to nicotine and to sidestream smoke on pregnancy outcome in rats. Toxicol Lett 1994;71:278–86.
40. Creeth JM. Constituents of mucus and their separation. Br Med Bull 1978;34:17–24.
41. Moore ML. Biochemical markers for preterm labor and birth: what is their role in the care of pregnant women? MCN Am J Matern Child Nurs 1999;24:80–6.

42. McCoshen JA. The role of cervical mucus in reproduction. Contem Obstet Gynaecol 1987;30:94–9.
43. Buddecke E. Miscellaneous glycoproteins. U: Gottschalk A. (ur.). Glycoproteins, their composition, structure and function. New York: Elsevier; 1966., str. 563–7.
44. Parke DV. Pharmacology of mucus. Br Med Bull 1978;34:89–94.
45. Domagale A, Kasprzak M, Kurpisz M. Immunological characteristics of cervical mucus in infertile women. Zentralbl Gynekol 1997;119:616–20.
46. Kremer J, Jager S. Sperm-cervical mucus interaction, in particular in the presence of antispermatozoal antibodies. Human Reprod 1988;3:69–73.
47. Annapurna V, Dhaliwal LK, Gopalan S. Effect of two antiestrogens, clomiphene citrate and tamoxifen, on cervical mucus and sperm-cervical mucus interaction. Int J Fertil Womens Med 1997;42:215–8.
48. Menárguez M, Pastor LM, Odeblad E. Morphological characterization of different human cervical mucus types using light and scanning electron microscopy. Hum Reprod 2003;18(9):1782–9.
49. Yeh J, Barbieri RL. Effects of smoking on steroid production, metabolism, and estrogen-related diseases. Seminars Reprod Endocrinol 1989;7:326–34.
50. Eggert-Kruse W, Kohler A, Rohr G, Runnebaum B. The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. Fert Steril 1993;59:617–28.
51. Eggert-Kruse W, Botz I, Pohl S, Rohr G, Strowitzki T. Antimicrobical activity of human cervical mucus. Hum Reprod 2000;150:778–84.
52. Abel EL. Smoking during pregnancy: A review of effects on growth and development of offspring. Hum Biol 1980;52:593–626.
53. Jauniax E, Burton GJ. The effect of smoking in pregnancy on early placental morphology. Obstet Gynecol 1992;79:645–8.
54. Kline J, Stein ZA, Susser M, Warmiton D. Smoking: A risk factor for spontaneous abortion. N Engl J Med 1977;297:793–6.
55. Fisher EB, Bishop DB, Goldmuntz J, Jacobs AE. Implications for the practicing physician of psychosocial dimensions of smoking. Chest 1988;93(2 Suppl):69S–78S.

56. Hughes DA, Haslam PL, Townsend PJ. Numerical and functional alterations in circulatory lymphocytes in cigarette smokers. Clin Exp Immunol 1985;61:459–66.
57. IARC. Tobacco Smoking. IARC Monography on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Lyon: IARC; 1986., str. 1–390.
58. Klepac R. Antioksidativna obrana. U: Bradamante V, Lacković Z (ur.). Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa. Zagreb: Medicinska naklada; 2002., str. 30–42.
59. Stedman RL. The chemical composition of tobacco smoke. Chem Rev 1968;68:153–207.
60. Vesey CJ, Saloojee Y, Cole PV, Russel MA. Blood carboxyhaemoglobin, plasma thiocyanate and cigarette consumption: implication for epidemiological studies in smokers. Br Med J 1982;284(6328):1516–8.
61. Benowitz NL. Pharmacologic effects of cigarette smoking and nicotine addition. N Engl J Med 1988;319:1318–30.
62. Gossain VV, Sherma NK, Srivastava L, Michelakis AM, Rovner DR. Hormonal effects of smoking – II: Effects on plasma cortisol, growth hormone, and prolactin. Am J Med Sci 1986;291:325–7.
63. Longo LD. Carbon monoxide: Effects on oxygen of fetus in utero. Science 1976;194:523–5.
64. Schulman A, Ellenbogen A, Maymon R, Bahary C. Smoking out the oestrogens. Hum Reprod 1990;5:231–3.
65. Levy LS, Martin PA. Toxicology of nicotine. U: Wald N, Froggatt P (ur.). Nicotine, smoking and the low tar programme. Oxford; New York: Oxford University Press; 1989., str. 11–23.
66. Isom GE, Way JL. Lethality of cyanide in the absence of inhibition of liver cytochrome oxidase. Biochem Pharmacol 1976;25:605–8.
67. Nordenberg D, Yip R, Binkin NJ. The effect of cigarette smoking on hemoglobin levels and anemia screening. JAMA 1990;264:1556–9.
68. Ames BN. Identifying environmental chemical causing mutations and cancer. Science 1979;204(4393):587–93.
69. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 1990;15:129–35.

70. Way JL. Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1984;24:451–81.
71. Degiampietro P, Peheim E, Drew D, Graf H, Colombo JP. Determination of thiocyanate in plasma and saliva without deproteinisation and its validation as a smoking parametar. J Clin Chem Clin Biochem 1987;25:711–7.
72. Sörbo BH. Crystalline rhodanese. Acta Chem Scand 1951;7:1129–36.
73. Szczepkowski TW, Wood JL. The cystathionase-rhodanese system. Biochim Biophys Acta 1967;139:469–78.
74. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). Free Radic Res 1999;31:261–72.
75. Strayer S. Biokemija. Zagreb: Školska knjiga; 1991.
76. Swami S, Suryakar AN, Katkam RV, Kumbar KM. Absorption of nicotine induces oxidative stress among bidi workers. Indian J Public Health 2006;50(4):231–5.
77. Igić R. Pušenje i zdravlje. Liječ Vjesn 1987;109(11–12):409–17.
78. Halliwell B. Antioxidants in human health and diseases. Ann Rev Nutr 1996;16:33–50.
79. Bryan GT, Lewis AM, Harkins JB, Micheletti SF, Boyd GS. Citochrome P-450 and steroid 21-hydroxilation in microsomes from beef adrenal cortex. Steroids 1974;23:185–202.
80. Juchau MR. Mechanisms of drug biotransformation reactions in the placenta. Fed Proc 1972;31:48–54.
81. Matsubara T, Koike M, Touchi A, Tochino Y, Sugeno K. Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. Anal Biochem 1976;75:596–603.
82. Yonetani T, Ray GS. Studies on cytochrome oxidase. VI. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome oxidase. J Biol Chem 1965;240:3392–8.
83. Frei B, Forte M, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Biochem J 1991;277:133–8.
84. Rose RC, Bode AM. Biology of free radical scavengers: An evaluation of ascorbate. Faseb J 1993;7:1135–42.

85. Farber JJ. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Environ Health Perspect 1994;102:17–24.
86. Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low density lipoprotein against oxidative damage. Am J Clin Nutr 1991;54:1113S–8S.
87. Harris RW, Brinton LA, Cowdell S. Characteristics of women with displasia or carcinoma in situ of the cervix uteri. Br J Cancer 1980;42:35S–6S.
88. Hein M, Helmig BP, Schønheyder HC, Ganz T, Uldbjerg N. An in vitro study of antibacterial properties of the cervical mucus plug in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2001;185:586–92.
89. Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: An endogenous metabolic marker for neuronal activity. Trend Neurosci 1989;12:94–101.
90. Yaffa SL, Juchau MR. Perinatal pharmacology. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1974;14:219–38
91. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein R. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidants and radicals caused aging and cancer. A hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:6858–62.
92. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate in outstanding antioxidant in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:6377–89.
93. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidases in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979;95:351–8.
94. Eriksen MP, LeMaistre CA, Newell GR. Health Hazards of Passive Smoking. Annu Rev Public Health 1988;9:47–70.
95. Halliwell B. Antioxidant characterisation. Methodology and Mechanism. Biochem Pharmacol 1995;49:1341–8.
96. Klepac R, Blažić-Čop N, Mitrović B. Funkcionalni aspekti pušenja. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1992., str. 1–38.
97. Rose RC. Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins. Biochim Biophys Acta 1988;947:335–66.
98. MedCalc Statistical Software Version 14.8.1 (2014). MedCalc Software Bvba, Ostend, Belgija. Dostupno na: https://www.medcalc.org.
99. Schectman G, Byrd JC, Hoffmann R. Ascorbic acid requirements for smokers: analysis of a population survey. Am J Clin Nutr 1991;53:1466–70.

100. Pelletier O. Vitamin C status of cigarette smokers and nonsmokers. Am J Clin Nutr 1970;23:520–4.
101. Shukla VKS, Kokate CK, Srivastava KC. Spectrophotometric determination of ascorbic acid. Microchem J 1979;24:124–6.
102. Slattery MZ, Robison LM, Schuman KL i sur. Cigarette smoking and exposure of passive smoke are risk factor for cervical cancer. JAMA 1989;261:1593–8.
103. Lyon JL, Gardner JW, West DW i sur. Smoking and carcinoma in situ of the uterine cervix. Am J Public Health 1983;73:558–62.
104. Holly EA, Petrakis NL, Friend NF i sur. Mutagenic mucus in the cervix of smokers. J Natl Cancer Inst 1986;76:983–6.
105. Melikian AA, Sun P, Prokopczyk B i sur. Identification of benzo(a)pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry. Cancer Lett 1999;146:127–34.
106. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. J Natl Cancer Inst 1997;89:868–73.
107. Schiffman MH, Haley NJ, Felton JS i sur. Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: Measuring cigarette smoke constituents in cervix. Cancer Res 1987;47:3886–8.
108. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265–75.
109. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. J Biol Chem 1964;239:2379–85.
110. Wharton DC, Tzagoloff S. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. Methods Enzymol 1967;10:245–50.
111. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta 1978;90:37–43.
112. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: The Frap assay. Anal Biochem 1996;239:70–6.
113. Lang CA, Naryshkin S, Schneider DL, Mills BJ, Lindeman RD. Low blood glutathione levels in healthy aging adults. J Lab Clin Med 1992;120:720–5.

114. Inoue M, Koyama K. In vivo determination of superoxide and vitamin C radicals using cytochrome c and superoxide dismutase derivatives. Methods Enzymol 1994;234:338–43.
115. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T i sur. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. J Immunol 1998;161:2524–32.
116. Makin J, Fried PA, Watkinson B. A comparison of active and passive smoking during pregnancy. Long-term effects. Neurotoxicol Teratol 1991;13:5–12.
117. Murata A. Smoking and vitamin C. U: Simopoulos AP (ur.). Selected Vitamins, Minerals and Functional Consequences of Maternal Malnutrition. Basel: Karger. World Rev Nutr Diet 1991;64:31–57.
118. Nash JE, Persaud TV. Embryopathic risks of cigarette smoking. Exp Pathol 1988;33:65–73.
119. Garn SM. Smoking and human biology. Human Biol 1968;57:505–23.
120. Baird DD, Wilcox AJ. Cigarette smoking associated with delayed conception. JAMA 1985;253(20):2979–83.
121. Remmer H. Passively inhaled tobacco smoke. A Challenge to Toxicology and Preventive Medicine. Arch Toxicol 1987;61:89–104.
122. McBride PE. The health consequences of smoking: Cardiovascular Diseases. Med Clin North Amer 1992;76:333–53.
123. Segal IJ. Biochemical calculations. 1. izd. London, New York, Sydney, Toronto: John Wiley & Sons; 1968., str. 213–58.
124. Magers T, Talbot P, DiCarlantonio G i sur. Cigarette smoke inhalation affects the reproductive system of female hamster. Reprod Toxicol 1995;9:513–25.
125. Malik SN, Wilkinson EJ, Drew PA, Hardt NS. Benign cellular changes in Pap smears. Causes and significance. Acta Cytol 2001;45:5–8.
126. Vigil P, Perez A, Neira J, Morales P. Post-partum cervical mucus: Biological and rheological properties. Hum Reprod 1991;6:475–9.
127. Buzaleh AM, Vazquez ES, Batlle AM. Cyanide intoxication – I. An oral chronic animal model. Gen Pharmacol 1989;20:323–7.
128. Buzaleh AM, Vazquez ES, Batlle AM. The effect of cyanide intoxication on hepatic rhodanese kinetics. Gen Pharmacol 1990;21:219–22.

129. Jones CJ, Schiffman M, Kurman R, Jacobs P, Benowitz NL. Elevated nicotine levels in cervical lavages from passive smokers. Am J Public Health 1991;81:378–9.
130. MacMahon B, Trichopoulos D, Cole P, Brown J. Cigarette smoking and urinary estrogenes. N Engl J Med 1982;307:1062–5.
131. Winkelstein W Jr. Smoking and cervical cancer – current status: A review. Am J Epidemiol 1990;131:945–57.
132. Lewis JL, Rhoades CE, Gervasi PG, Griffith WC, Dahl AR. The cyanide-metabolizing enzyme rhodanese in human nasal respiratory mucosa. Toxicol Appl Pharmacol 1991;108:114–20.
133. Levine S. Experimental cyanide encephalopathy: Gradients of Susceptibility in the Corpus Callosum. J Neuropathol Exp Neurol 1967;26:214–22.
134. Wright G, Terada K, Yano M, Sergeev I, Mori M. Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. Exp Cell Res 2001;263:107–17.
135. Padh H. Cellular function of ascorbic acid. Biochem Cell Biol 1990;68:1166–73.
136. Sörbo BH. Rhodanese. U: Colowick SP, Kaplan NO (ur.). Methods in Enzymology. New York: Academic Press; 1951., str. 334–7.
137. Westley J. Rhodanese. Adv Enzymol 1973;39:327–68.
138. Leuschner J, Winkler A, Leuschner F. Toxicokinetic aspects of chronic cyanide exposure in the rat. Toxicol Lett 1991;57:195–201.
139. Aminlari M, Gilanpour H. Comparative studies on the distribution of rhodanese in different tissues of domestic animals. Comp Biochem Physiol 1991;99:673–7.
140. McMahon TF, Birnbaum LS. Age-related changes in toxicity and biotransformation of potassium cyanide in male C57BL6N mice. Toxicol Appl Pharmacol 1990;105:305–14.
141. Rose RC, Nahrwold DL. Ascorbic acid analysis in biological fluids. Anal Biochem 1982;123:389–93.
142. Tanji K, Bonilla E. Neuropathologic aspects of cytochrome c oxidase deficiency. Brain Pathol 2000;10:422–30.

143. Willits RK, Saltzman WM. Synthetic polymers alter the structure of cervical mucus. Biomaterials 2001;22:445–52.
144. Coon MJ, Strobel HW, Boyer RF. On the mechanism of hydroxylation reactions catalyzed by cytochrome P-450. Drug Metab Dispos 1973;1:92–7.
145. Johannesen KA, DePierre JW. Measurement of cytochrome P-450 in the presence of large amounts of contaminating hemoglobin and methemoglobin. Anal Biochem 1978;86:725–32.

KRATAK ŽIVOTOPIS

Gordana Planinić Radoš rođena je 1972. godine u Oberhausenu u Njemačkoj. Diplomirala je na Medicinskome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2002.godine. Stručni je staž obavila u Kliničkoj bolnici *Merkur* i 2003. godine položila stručni ispit. Od 2004. do 2009. godine bila je na specijalizaciji iz ginekologije i opstetricije. 2009. godine položia je specijalistički ispit iz ginekologije i opstetricije. Uspješno je završila poslijediplomski specijalistički studij Ultrazvuk u ginekologiji i opstetriciji na Medicinskome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Supspecijalistički ispit iz humane reprodukcije položila je 2015. godine. Danas radi u Kliničkoj bolnici *Merkur* kao specijalist ginekologije i opstetricije.