

Promjene koncentracije parabena u gornjem lateralnom kvadrantu dojke u žena sa zloćudnim tumorom dojke

Roje, Željka

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:774952>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Željka Roje

**Promjene koncentracije parabena u
gornjem lateralnom kvadrantu dojke u
žena sa zloćudnim tumorom dojke**

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Kliničkoj bolnici Dubrava na Klinici za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zdenko Stanec

Zahvala prof. dr. sc. Zdenku Stanecu na dugogodišnjem kirurškom i znanstvenom mentorstvu. Čast mi je profesionalno se usavršavati pod Vašim vodstvom. Hvala kolegama i osoblju Klinike za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na strpljenju i pomoći prilikom prikupljanja uzoraka. Hvala kolegama: mr. sc. Marceli Živković na pripremi uzoraka urina i krvi, prim. dr. sc. Čedni Tomasović Lončarić, dr. sc. Danku Mülleru i doc. dr. sc. Tajani Štoos Veić na pripremi uzoraka tkiva. Hvala prof. dr. sc. Radi Žicu i prof. dr. sc. Borisu Brkljačiću na edukaciji tijekom dugogodišnjih sastanaka Tima za dojku Kliničke bolnice Dubrava.

Posebna zahvala dr. sc. Ivani Vinković Vrček i njezinom timu s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada čija je nesebična predanost znanosti omogućila provođenje istraživanja.

Hvala prof. Irene Panderi sa Zavoda za farmaciju Nacionalnog i kapodistrijskog sveučilišta u Ateni, prof. Victoriji F. Samanidou s Kemijskog odjela Sveučilišta Aristotel u Solunu i dr. sc. Abuzaru Kabiru s Međunarodnog forenzičkog instituta, Miami, SAD na implementiranju inovativnih metoda mjerenja koncentracije parabena u ljudskim uzorcima.

Hvala mojoj obitelji te sinu Maroju na potpori.

Znanstveno istraživanje navedeno u ovome doktoratu produkt je predanog multidisciplinarnog rada.

SADRŽAJ

1	UVOD I SVRHA RADA	1
1.1	Rak – hormonski ovisna bolest	1
1.2	Endokrini disruptori	2
1.2.1	Klasifikacija endokrinih disruptora	2
1.2.2	Izvor endokrinih disruptora	3
1.2.3	Mehanizam djelovanja endokrinih disruptora	5
1.2.4	Problem identifikacije endokrinih disruptora	6
1.2.5	Utjecaj endokrinih disruptora na ljudsko zdravlje	7
1.3	Parabeni	9
1.3.1	Apsorpcija, metabolizam i izlučivanje parabena	10
1.3.2	Izvor parabena	11
1.3.3	Utjecaj parabena na reproduksijski sustav	14
1.3.4	Utjecaj parabena na adipogenezu	15
1.3.5	Fetalna izloženost parabenima	15
1.4	Parabeni i rak dojke	16
1.4.1	Liječenje raka dojke	17
1.4.2	Etiologija raka dojke	23
1.4.3	Mehanizam djelovanja parabena – estrogenska mimikrija	25
1.4.4	Postoji li alternativa parabenima?	27
1.4.5	Uredbe Europske unije za zaštitu potrošača od endokrinih disruptora	29
1.5	SVRHA RADA	31
2	HIPOTEZA	35
3	CILJEVI RADA	36
4	MATERIJALI I METODE	37
4.1	Ispitanice	37
4.2	Metode	37
4.2.1	Prikupljanje anamnestičkih podataka i bioloških uzoraka	38
4.2.2	Patohistološka dijagnostika	43
4.2.3	Analiza koncentracije parabena iz humanih uzoraka urina, plazme i tkiva dojke	44
4.2.4	Sinergistički učinak parabena i nanoplastike	45
4.3	Statistička analiza	46
4.4	Etička načela	46

5	REZULTATI	47
5.1	Kirurško liječenje	47
5.2	Životni stil	49
5.2.1	Mjesto stalnog boravka i fizička aktivnost	49
5.2.2	Konzumacija alkohola, pušenje cigareta i prehrana	50
5.3	Uporaba kozmetičkih proizvoda	52
5.3.1	Kreme za tijelo	52
5.3.2	Dezodoransi i antiperspiranti	53
5.4	Rizični čimbenici za razvoj raka dojke	54
5.4.1	Menarha i menopauza	54
5.4.2	Trudnoća	54
5.4.3	Dojenje	54
5.4.4	Uporaba kontracepcijskih pilula i hormonski nadomjesne terapije	55
5.4.5	Rak u obitelji	55
5.4.6	Operirana strana dojke	56
5.4.7	Smještaj tumora prema kvadrantima dojke	57
5.5	Patohistološka analiza tkiva dojke	58
5.6	Usporedba uporabe kozmetičkih proizvoda između zdravih i bolesnih žena	61
5.7	Parabeni u plazmi i urinu	62
5.7.1	Usporedba koncentracije parabena iz urina i plazme kod zdravih žena	66
5.7.2	Usporedba koncentracije parabena iz urina i plazme kod bolesnih žena	68
5.8	Parabeni u tkivima dojke	71
5.8.1	Usporedba koncentracije parabena iz tkiva bolesnih žena	75
5.8.2	Usporedba koncentracije parabena iz tkiva zdravih žena	81
5.9	Usporedba koncentracije parabena iz tkiva, urina i plazme	83
5.9.1	Usporedba veličine tumora i koncentracije parabena između zdravih i bolesnih žena	83
5.10	Sinergistički učinak parabena i nanoplastike	85
6	RASPRAVA	87
7	ZAKLJUČAK	103
8	SAŽETAK	105
9	SUMMARY	105
10	POPIS LITERATURE	107
11	ŽIVOTOPIS	116

Popis oznaka i kratica

ADI *Acceptable Daily Intake*

AR androgenski receptor

ASA *American Society of Anesthesiology* klasifikacija

BIRADS *Breast Imaging Reporting and Data System*

BPA bisfenol A

CIR *Cosmetic Ingredient Review*

DCS *Ductal Carcinoma In Situ*

DNK deoksiribonukleinska kiselina

DSA-TOF *Direct sample analysis - time of flight*

ED Endokrini disruptor

EFSA Europska ustanova za sigurnost hrane

ER estrogen

ER α estrogenski receptor alfa

EU Europska unija

FDA *Food and Drug Administration*

GC-MS/MS kombinirana metoda plinske kromatografije-spektrometrije mase

GR glukokortikoidni receptor

HPLC-MS/MS kombinirana metoda tekućinske kromatografije-spektrometrije mase

HPLC-UV/VIS-TOF tekućinska kromatografija s ultraljubičastim i vidljivim spektrom UV/VIS i TOF detektorima

IDC NOS *Invasive Ductal Carcinoma Not Otherwise Specified*

LCIS *Lobular Carcinoma In Situ*

MAK mamila-areola kompleksa

MDK maksimalna dopuštena koncentracija

MR mineralokortikoidni receptor

MRM modificirana radikalna mastektomija

NOAEL *Observed Adverse Effective Level*

Pbmix smjesa metil-, etil, propil- i butilparabena

PDU prihvatljivi dnevni unos

PHBA esteri p-hidroksibenzojeve kiseline

PHT ftalati

PPAR peroksisom proliferatora – aktivirajući receptor

PR progesteronski receptor

PSNP polistirenske nanočestice

REACH *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical* EU

SISH *Silver In Situ Hybridisation*

SPE *Solid phase extraction*

TBT tributilkositra

TPT trifeniltina

TR tireoidni receptor

UNEP Program Ujedinjenih naroda za okoliš

WHO Svjetska zdravstvena organizacija

1 UVOD I SVRHA RADA

1.1 Rak – hormonski ovisna bolest

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) životni stil definira kao opći način života temeljen na interakciji između uvjeta života u širem smislu i individualnih obrazaca mišljenja i ponašanja uvjetovanih sociokulturnim činiteljima i osobnim karakteristikama. U suvremenom pristupu zdravlju i bolesti pretpostavlja se da je zdravlje uvjetovano složenim međudnosom bioloških, psiholoških, socijalnih i okolišnih čimbenika. (1)

Zdravlje primarno ovisi o usklađenom radu endokrinog sustava koji regulira oslobađanje hormona bitnih za metabolizam, reprodukciju, rast i razvoj. Endokrine su žlijezde žlijezde s unutarnjim lučenjem: hipotalamus, hipofiza, epifiza, štitna žlijezda, doštitna žlijezda, gušterača, nadbubrežna žlijezda i spolne žlijezde (jajnici i sjemenici). Kemijske tvari kao produkti današnje industrijalizacije mogu djelovati na endokrini sustav. Male fluktuacije u razini hormona mogu izazvati značajne patofiziološke promjene. Kao posljedica nastaju kronične nezarazne bolesti modernog čovjeka: dijabetes tip 2, kardiovaskularne bolesti, porast incidencije raka, astma, pretilost, neurobihevioralni poremećaji, neplodnost, genitalne malformacije i patološki ishodi trudnoće. Porast kroničnih nezaraznih bolesti zabilježen je u gospodarski razvijenim državama s višim ekonomskim standardom. Bez zdravog endokrinog sustava, ljudi i životinje ne mogu se razmnožavati niti normalno razvijati. (2)

Značajni porast nezaraznih bolesti vezanih za endokrini sustav sugerira da osim genetske etiologije, znatnu ulogu imaju i okolišni čimbenici. Takvi okolišni čimbenici nazivaju se endokrinim disruptorima. Endokrini disruptor (ED) egzogena je tvar ili smjesa tvari sa svojstvima koje mogu dovesti do endokrinih poremećaja u zdravom organizmu i njegovom potomstvu. (3) Znanstveni dokazi upućuju na to da ED predstavlja rizik za razvoj i funkciju organa u tijelu. To uključuje endokrine poremećaje s posebnim naglaskom na hormonski ovisne vrste raka. (4) U njih ubrajamo rak prostate i testisa kod muškaraca a kod žena su najčešće rak dojke, jajnika i endometrija. (5) Štitnjača, pluća i jetra također mogu biti hormonski ovisan oblik raka.(6)

Oko 65 % raka dojke hormonski je ovisno. Prema podacima Američkog društva za rak, u posljednjem petogodišnjem razdoblju (2012. – 2016. god.), stopa incidencije raka dojke blago se povećala za 0,3 % godišnje uglavnom zbog hormonski ovisnog oblika raka. Suprotno tome, stopa smrti od raka dojke i dalje opada, padajući za 40 % u razdoblju od 1989. do 2017. god., što znači da je izbjegnuto oko 375 900 smrtnih slučajeva od raka dojke. Smanjenje smrtnosti pripisuje se dostupnosti visokokvalitetnih usluga prevencije, ranom otkrivanju i liječenju. (7) No, ne postoji dovoljno znanstveno utemeljenih dokaza kojima bi se objasnilo povećanje incidencije raka dojke koji može imati uzročno-posljedičnu vezu između okoliša i endokrinih poremećaja. (8)

1.2 Endokrini disruptori

Zabrinutost povezana s ED-ima raste od 90-ih godina prošlog stoljeća. Definicija ED-a je utvrđena tek 2002. god. u okviru Međunarodnog programa za sigurnost kemikalija kojom je ED opisan kao egzogena tvar ili smjesa tvari koja mijenja funkciju/funkcije endokrinog sustava i time dovodi do štetnih učinaka na zdravlje zdravog organizma, njegova potomstva ili (pod)populacija. (9) ED u okoliš dolazi iz različitih izvora. Uglavnom se koristi u izradi ambalaža, pesticidima ili kao konzervansi u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Najčešće korišteni ED-i su ftalati (PHT), bisfenol A (BPA) i esteri p-hidroksibenzojeve kiseline (PHBA) koji se nazivaju parabeni. (10)

1.2.1 Klasifikacija endokrinih disruptora

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) razvrstala je ED-e u 11 kategorija zbog velike raznolikosti izvora i djelovanja na ljudski organizam (Tablica 1.).

Tablica 1. Podjela ED-a u jedanaest kategorija, prema dokumentu Svjetske zdravstvene organizacije State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012 (3)

KLASIFIKACIJA ENDOKRINIH DISRUPTORA	PRIMJERI ENDOKRINIH DISRUPTORA
Trajne i bioakumulativne halogenirane kemikalije	
Trajni organski polutanti (POP)	PCB, PFOS, PBDE, lindan, klordan, toksafen, endosulfan
Ostale bioakumulativne kemikalije	oktaklorostiren, PFCA, HBCDD
Manje trajne i bioakumulativne kemikalije	
Plastifikatori i ostali aditivi u materijalima i proizvodima	estri ftalata (DHEP), trifenilfosfat
Policikličke aromatske kemikalije (POC) uključujući PAH	piren, benzopiren, antracen, benzoantracen
Halogenirane fenolske kemikalije (HPC)	2,4-diklorfenol, pentaklorfenol, triklosan, tetrabrombisfenol A
Nehalogenirane fenolske kemikalije (non-HPC)	bisfenol A, bisfenol F, bisfenol S, resorcinol, nonilfenol
Sastojci pesticida, farmaceutskih proizvoda i proizvoda za osobnu higijenu	
Pesticidi koji su trenutno u uporabi	atrazin, vinklozolin, kloripirifos, fenitroton, linuron
Sastojci farmaceutskih proizvoda, promotora rasta i proizvoda za osobnu higijenu	dietilstilbestrol, tamoksifen, levenorgestrel, PARABENI , 3-benziliden kamfor
Ostale kemikalije	
Metali i organometalne kemikalije	arsen, kadmij, živa, olovo, TBT, TPT
Prirodni hormoni	17 β -estradiol, testosteron, estron
Fitoestrogeni	izoflavoni, prenilflavonoidi, kumestrol

S obzirom na fizikalno-kemijska svojstva ED-i se mogu podijeliti na trajne i bioakumulativne te manje trajne i manje bioakumulativne tvari. Prva se skupina očituje dugotrajnom prisutnošću u okolišu, inertnošću i bioakumulacijom u organizmima (koncentriraju se u bjelančevinama ili masnom tkivu). Za razliku od njih, druga je skupina spojeva manje postojana u okolišu i nisu bioakumulativni (brzo se izlučuju iz organizma) ali je kontakt s njima kontinuiran i otvara mogućnost svakodnevne akumulacije.

ED-i mogu biti sintetičkog ili prirodnog podrijetla. Sintetički ED-i su kao zagađivači okoliša kratkoga vijeka trajanja i u njih se ubrajaju proizvodi od plastike, ftalati (PHT) i bisfenol A (BPA). Organski onečišćivači industrijski su otpad dugog vijeka trajanja i uključuju organoklorne pesticide diklorodifeniltrikloretan (DDT) i diklordifenildkloroeten (DDE), dioksine i polibromirane difenil-etere (PBDE). (11)

1.2.2 Izvor endokrinih disruptora

U izvješću Programa Ujedinjenih naroda za okoliš (UNEP) i Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2012. god. ED-i su proglašeni „svjetskom prijetnjom”. U njemu se, između ostalog, navodi povećanje učestalosti poremećaja povezanih s endokrinim sustavom u ljudi te su zapaženi učinci na endokrini sustav divljih životinjskih vrsta. Poznato je da gotovo 800 kemijskih spojeva može ometati metabolizam hormona.

ED-i se dodaju proizvodima s namjerom poboljšanja njihovih svojstava i kvalitete u svrhu smanjenja cijene proizvodnje, dok se u manjoj mjeri mogu naći sasvim slučajno u proizvodu kao onečišćivači. Emisija se može odvijati putem vode, tla, atmosfere, tijekom otpuštanja iz materijala i proizvoda te prilikom rukovanja, spaljivanja ili reciklaže otpada. (3)

Kanalizacijska je infrastruktura bitna poveznica između kućanstava i industrije te vodenih ekosustava. Lošim gospodarenjem izvorima pitke vode s jedne strane te otpadnim vodama s druge strane, ED-i mogu dospjeti i u vodu za piće. (12) Osim urbanih sredina, poljoprivredne su površine također veliki izvor zagađenja. Pesticidi, herbicidi, konzervansi, hormoni i mnogi drugi spojevi ispiru se iz tla i dopijevaju u lokalne podzemne vode. Jednom kada dopiju u vodeni okoliš, postaju dostupni lokalnim organizmima koji ih akumuliraju u svojim tkivima. U jezerima su dovoljne nanogramske koncentracije ED-a sa svojstvom sintetskog estrogena koje mogu izazvati kemijsku sterilizaciju mužjaka i pomor riba. Broj znanstvenih publikacija o hormonskim otrovima u okolišu raste eksponencijalno a otkriveni poremećaji u životinjskom svijetu dobivaju svoju epidemiološku presliku među ljudima.

Izvori ED-a su mnogobrojni i često su predmeti svakodnevne široke potrošnje kao što su proizvodi za osobnu higijenu, elektronički uređaji, igračke, odjeća, ambalaža, pesticidi, metali, okoliš, voda i hrana (Tablica 2.).

Tablica 2. Endokrini disruptori – upotreba u okolišu, primjeri spojeva i izvori izloženosti ljudi (13)

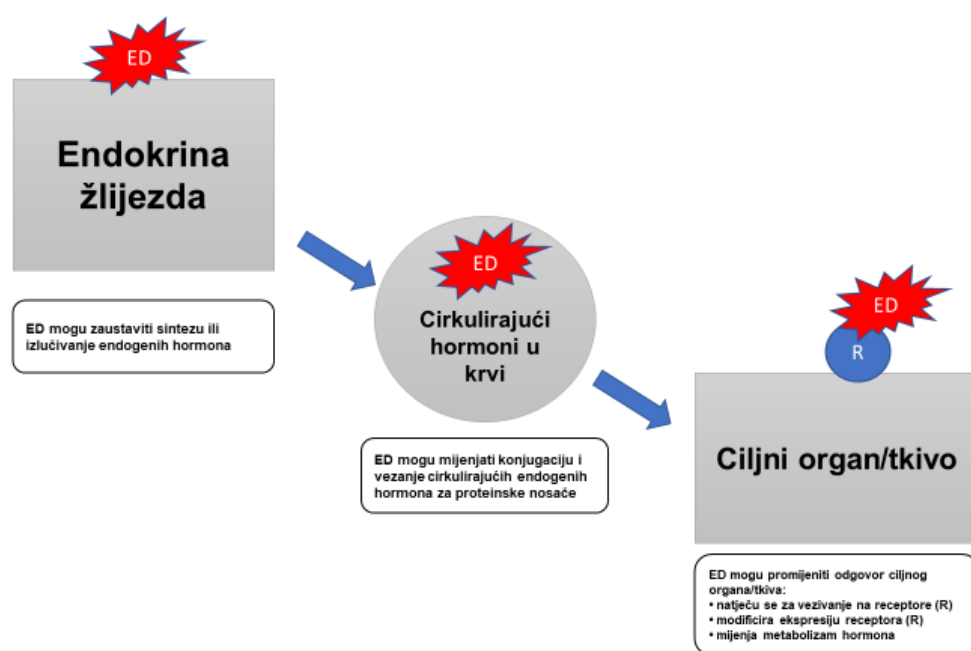
Upotreba u okolišu	Primjeri spojeva	Izvor izloženosti ljudi
Biljni fitoestrogeni	Genistein, daidzein	Jestivi biljni proizvodi (dijetalni, dodaci prehrani)
Farmaceutski lijekovi	Etinilestradiol	Kontracepcijske pilule, hormonska nadomjesna terapija, kozmetika
Pesticidi	DDT, lindan, piretroidi	Proizvodi za pesticide, životinjske masti (dijetalni)
Herbicidi	Gifosat	U vrtu za uklanjanje korova
Industrija	Poliklorirani bifenili	Životinjska mast (dijetalni)
Spaljivanje nusproizvoda	Poliklorirani dioksini	Udisanje zrakom, životinjske masti iz prehrane
Plastika, epoksidne smole	Bisfenol A	Skladištenje hrane i pića (dijetalni); poljoprivreda
Plastika	Ftalati estera	Proizvodi za široku potrošnju
Deterdženti	Alkil-fenoli	Proizvodi za široku potrošnju
Konzervansi	Parabeni	Proizvodi za osobnu njegu, hrana i lijekovi
Antiperspiranti	Aluminij klorohidrat	Antiperspiranti u spreju
Antimikrobna sredstva	Triklosana	Proizvodi za osobnu njegu i kućnu potrošnju
Apsorbira ultraljubičasto svjetlo	Benzofenon	Proizvodi za sunčanje, kozmetika, odjeća
Parfemi	Butilfenilmetilpropional, benzil-salicilat, mošus	Proizvodi za osobnu njegu i kućnu potrošnju
Regenerator / lak u spreju	Dimetil-siloksan	Proizvodi za osobnu njegu
Cigarete	Cadmium	Cigarete

ED se u ljudski organizam može unijeti prehranom, udisanjem i preko kože ali se može prenijeti i s majke na dijete preko posteljice ili mlijeka (dojenjem).

Tijekom intrauterinog razvoja majčin se odnos s čimbenicima okoliša odražava i na plod. U istraživanjima na životinjama uočilo se da mnogi ED-i mogu prijeći placentalnu barijeru. Kasnija su istraživanja na ljudima pokazala postojanje izravne veze između njihove koncentracije u majčinoj krvi i krvi pupkovine ploda. (14) Nakon porođaja, prijenos hranjivih tvari nastavlja se procesom dojenja. (15) Masno tkivo kod odraslih ljudi služi kao rezervoar ED-a koji može biti otpušten u cirkulaciju ili ostati izdvojen u adipocitima, ovisno o odgovoru na hormonsku ili neurološku signalizaciju. (16)

1.2.3 Mehanizam djelovanja endokrinih disruptora

Djelovanje ED-a postalo je značajno znanstveno područje istraživanja zbog specifičnog oblika toksičnosti. ED-i se vežu za receptore jezgre poput receptora za estrogen (ER), androgenskih receptora (AR), mineralokortikoidnih receptora (MR), progesteronskih receptora (PR), glukokortikoidnih receptora (GR), tireoidnih receptora (TR) i peroksisom proliferatora – aktivirajućeg receptora (PPAR).(17) Mehanizam djelovanja ED-a može biti izravnim aktiviranjem ili inaktivacijom endokrinih ciljnih receptora, prekidanjem sinteze hormona, inhibiranjem ili aktivacijom njihovih metabolizacijskih enzima (Slika 1.). Na taj način ED-i oponašaju ili djelomično oponašaju hormone u tijelu kao što su estrogeni, androgeni ili hormoni štitnjače. U organizmu mijenjaju normalnu razinu hormona, zaustavljaju ili potiču njihovu proizvodnju ili mijenjaju biološki put do ciljnog organa. Mogu se vezati za receptore hormona i tako blokirati vezanje endogenih hormona te samim tim spriječiti nastanak normalnog signala ciljne stanice koji je hormon trebao proizvesti. Vezivanjem mogu uzrokovati aktivaciju u pogrešnom trenutku (npr., započne proizvodnja inzulina kada organizmu nije potreban). (19) Također mogu poremetiti normalne puteve metabolizma hormona u jetri. (3)



Slika 1. Mehanizam djelovanja endokrinih disruptora (18)

Izlučivanje ED-a iz organizma ponajprije ovisi o njihovim svojstvima. Trajne bioakumulativne kemikalije su inertne. Imaju tendenciju nakupljanja u različitim tkivima, ponajviše u masnom, pa se generalno izlučuju veoma sporo. S druge strane, promjenjivi se disruptori brzo metaboliziraju u jetri, odakle se njihovi metaboliti izlučuju putem stolice i urina.

Posebno zabrinjava činjenica da izloženost ED-ima tijekom intrauterinog razvoja može imati trajne i nepopravljive posljedice koje se ne moraju odmah očitovati nego tek kasnije tijekom života. (20) Kritično

razdoblje utero i/ili neonatalnog razdoblja tijekom kojega ED-i uzrokuju suptilne promjene u ekspresiji gena i tkivnoj organizaciji dovodi do povećane osjetljivosti na bolesti u odrasloj dobi. Neki od razloga povećane osjetljivosti uključuju utjecaj ED-a na slab razvoj imunološkog sustava u plodu ili novorođenčetu. Posljedica su nerazvijeni mehanizmi popravka DNK, detoksikacijskih enzima, metabolizma u jetri i propusnija krvno/moždana barijera. (21)

Istaknuti mehanizam koji povećava potencijalni rizik od razvoja bolesti u odrasloj dobi nakon izloženosti ED-ima tijekom ranog razvoja naziva se *epigenomičko reprogramiranje*. Postoji znatan broj dokaza o izloženosti ED-ima tijekom ranog razvoja koji može utjecati na razvoj istog fenotipa u sljedećim generacijama. Istraživanje izloženosti majke miša bisfenolu A pokazuje povezanost s promjenama u ponašanju potomaka kroz četiri generacije što je vjerojatno posljedica epigenetske modifikacije određenih gena. Stoga se pretpostavlja da epigenetske promjene imaju bitnu ulogu u mehanizmu nastanka *transgeneracijskog efekta*. (22)

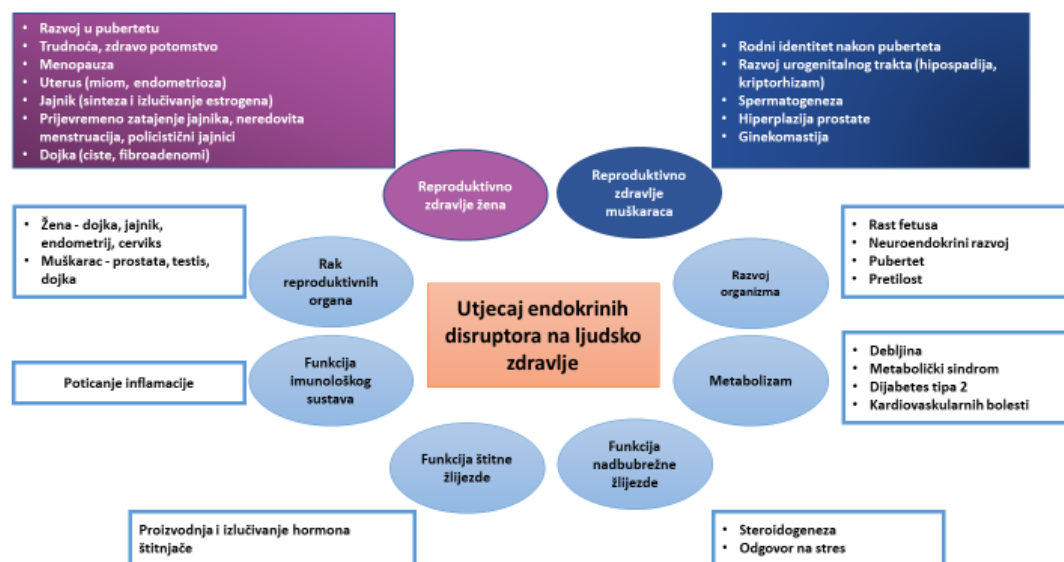
1.2.4 Problem identifikacije endokrinih disruptora

Male mjerljive doze u organizmu i pitanje potrebe za dugotrajnom izloženosti glavni su problemi identifikacije ED-a. Njihovo se djelovanje očituje na svim sustavima u organizmu bez iznimke, a vremensko razdoblje djelovanja započinje već sa začecem i nastavlja se tijekom čitavog života. Razlike se vide i u vremenu pojavljivanja posljedica s obzirom na vrijeme izlaganja. Ponekad može biti kratko nakon izlaganja, a ponekad će se posljedice vidjeti s određenim vremenskim odmakom. Jedino je promjenjiv intenzitet djelovanja tijekom različitih razvojnih faza, pri čemu se kao kritična razdoblja, u kojima je njihovo djelovanje najizraženije, ističu intrauterini razvoj, djetinjstvo i fertilna dob. (23) Tijekom ranog razvojnog razdoblja potrebne su manje doze da bi se izazvao učinak u odnosu na doze potrebne u odrasle jedinke. (24) Također, postoji razlika u stupnju izloženosti ED-ima među ukupnom svjetskom populacijom zbog različitih demografsko-kulturoloških utjecaja i navika.

Za neke je ED-e utvrđena maksimalna dozvoljena koncentracija (MDK). No, štetni se učinak može dogoditi i pri koncentracijama ispod MDK. ED-i se odlikuju efektom sinergijskog učinka („učinak mješavine” ili „učinak koktela”). U slučaju izlaganja smjesi disruptora s koncentracijama svake komponente ispod MDK (s malim ili nikakvim rizikom za zdravlje), ipak će doći do nastanka štetnog učinka zbog efekta sinergijskog djelovanja svih komponenti zajedno. Primjer su parabeni s estrogenskim djelovanjem (ksenoestrogeni). Dugo se smatralo da nisu štetni jer se pojavljuju u okolišu u izrazito malim koncentracijama, odnosno u koncentracijama ispod MDK. Međutim, miješanjem s endogenim estrogenom dolazi do dvostruko jačeg odgovora organizma na njihovo djelovanje. (25) Time je postavljen veliki zadatak pred znanstvenike. Dosadašnja saznanja o maksimalnim dozvoljenim koncentracijama (MDK) ED-a trebaju se preispitati u kontekstu djelovanja smjesa različitih kemikalija. (26)

1.2.5 Utjecaj endokrinih disruptora na ljudsko zdravlje

Utjecaj ED-a na ljudsko zdravlje prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Utjecaj endokrinih disruptora na ljudsko zdravlje. Ovalni prozori prikazuju glavne sustave pod utjecajem hormona; kvadratni prozori označavaju specifične utjecaje povezane s ED-ima (18)

Zbog interferencije s tireoidnim hormonima koji su važni za razvoj središnjeg živčanog sustava intrauterino i nakon rođenja, povećana je incidencija neurobihevioralnih poremećaja, disleksije, mentalne retardacije i ADHD-a, poteškoća u učenju, depresije i drugih poremećaja raspoloženja. U nekim zemljama poremećaji zahvaćaju čak 5 – 10 % rođene djece, a incidencija autizma i sličnih poremećaja dostiže 1 %. (3)

Znanstvenike posebno zabrinjava činjenica što brojni kemijski ED-i negativno utječu na reproduktivni sustav milijuna žena diljem svijeta te dokazano uzrokuju sljedeće promjene: sindrom policističnih jajnika, fibroidne benigne tumore maternice (*leiomyoma*), endometriozu, probleme s plodnošću, neplodnost, problematične trudnoće, smanjenu porodnu težinu novorođenčadi, prijevremene porode, prerani pubertet djevojčica i sve raniji nastup telarhe (razvoj grudi koji se javlja prije osme godine života). (27, 28) Jednako tako, ove kemijske tvari negativno utječu i na reproduktivno zdravlje muškaraca uzrokujući kongenitalni kriptorhizam, hipospadiju, smanjenu razinu testosterona, lošu kvalitetu spermija i neplodnost (broj spermija je pao čak 50 % tijekom posljednjih pola stoljeća u pojedinim regijama). Uočen je i negativni utjecaj na omjer novorođenčadi muškog i ženskog spola jednako kao i kod divljih životinja: omjer je blago povišen u korist muškog spola, a znanstvenici trenutačno ne mogu objasniti razlog. (29)

ED-i utječu na sve češću pojavu zloćudnih bolesti čiji je razvoj uvjetovan djelovanjem hormona. U tu skupinu ubrajamo rak dojke, endometrija, jajnika, testisa, prostate i štitne žlijezde. Porast navedenih zloćudnih bolesti uočava se posebice u zapadnim zemljama, a u posljednje vrijeme zbog naglog gospodarskog razvoja i u nekim državama Azije. Također je u porastu sve češća disfunkcija nadbubrežne žlijezde s posljedicom hipersekrecije hormona kortizola pa raste i broj oboljelih od Cushingovog sindroma. (3)

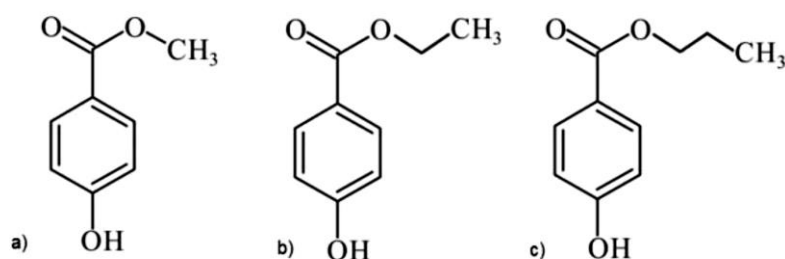
Sve veća učestalost pretilosti ozbiljni je globalni javnozdravstveni izazov. Iako epidemiju pretilosti u velikoj mjeri potiče loša prehrana i nedostatak vježbanja, određeni ED-i imaju ulogu u etiologiji. (30) Kemijske tvari poput tributilkositra (TBT) i trifeniltina (TPT) pridonose debljanju, djelujući na dijelove endokrinog sustava odgovornog za metabolizam, energetska ravnotežu i apetit, posebice tijekom razvojnog razdoblja. (31)

Poremećaji i bolesti imunološkog sustava također su u stalnom porastu – osobito alergije i autoimune bolesti. Prevalencija astme u pedijatrijskoj dobi udvostručila se u posljednjih 20 godina i sada je vodeći uzrok hospitalizacije djece i izostanaka iz škole. (3) U posljednjem desetljeću u razvijenim zemljama zabilježen je raniji početak puberteta koji je pod kontrolom neuroendokrinog sustava. (32)

1.3 Parabeni

Paraben je ED koji se ubraja u skupinu ksenoestrogena. Ksenoestrogeni su vrsta ksenohormona (grč.: *xeno* znači vanjsko, strano) koji imitiraju djelovanje endogenog hormona estrogena. Ksenoestrogeni mogu biti sintetički ili prirodni kemijski spojevi. Prirodni se ksenoestrogeni nalaze u biljkama (fitoestrogeni) ili gljivicama (mikoestrogeni). Sintetički se koriste u industrijskim proizvodima, među kojima su i parabeni. (33) Novi znanstveni dokazi potvrđuju znatni utjecaj ksenoestrogena na karcinogenezu. (34-37) Trenutno postoji oko 160 ksenoestrogena koji mogu biti uključeni u razvoj raka dojke. (38-40)

Paraben je naziv za skupinu spojeva koje čine esteri para-hidroksibenzoične ili 4-hidroksibenzoične kiseline (PHBK) i odgovarajućih alkohola (metilparaben, etilparaben, propilparaben, isopropilparaben, butilparaben, isobutilparaben i benzilparaben) (Slika 3.).



Slika 3. Kemijska struktura a) metilparabena, b) etilparabena i c) propilparabena (41)

Otkriveni su 20-ih godina prošloga stoljeća a sredinom se stoljeća počinju masovno koristiti kao konzervansi u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji zbog svojih antimikrobnih i antigljivičnih svojstava. Najzastupljeniji su u kozmetičkim proizvodima. Mikrobiološka kontaminacija (bakterije, plijesni, gljivice) svih proizvoda, pa tako i kozmetike, predstavlja rizik za zdravlje. Poznati su primjeri infekcije očiju bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* nakon primjene kozmetike koja nije bila propisno „konzervirana“. Mikroorganizmi ubrzavaju razgradnju emulzija, stvarajući štetne nusprodukte i iritirajuće sastojke neugodnog mirisa kozmetike. Parabeni sprječavaju razgradnju aktivnih sastojaka i mikrobnu kontaminaciju kozmetike te produžuju rok trajanja proizvoda.

Široka rasprostranjenost parabena u kozmetičkim proizvodima posljedica je niske cijene, izostanka perceptivnog okusa i mirisa, činjenice da ne proizvode diskoloraciju, praktički su pH neutralni, niske toksičnosti i širokog spektra aktivnosti. Također su inertni, biorazgradivi, kemijski stabilni u odnosu na pH i temperaturu čime omogućuju sterilizaciju proizvoda bez gubitka antimikrobne aktivnosti.(42) Njihova antimikrobna aktivnost raste s povećanjem duljine esterske skupine, ali topljivost u vodi opada. U praksi se obično koriste kraći esteri što pridonosi visokoj topljivosti u vodi. (43)

Parabeni su se smatrali potpuno sigurnima za čovjeka sve dok pojedina istraživanja nisu ukazala na potencijalnu toksičnost. Prvi put na takvu mogućnost ukazano je 1998. godine kada je ispitana farmakodinamika parabena. Utvrđeno je djelovanje parabena kao kompetitivnih agonista estrogenskih receptora i njihov utjecaj na razvoj karcinoma dojke. (41)

1.3.1 Apsorpcija, metabolizam i izlučivanje parabena

Parabeni se mogu apsorbirati putem sluznice gastrointestinalnog sustava, kože, kose, noktiju, sluznice usana te vaginalne sluznice. Dominantni put apsorpcije je kroz kožu.

Parabeni u kozmetičkim pripravcima primijenjenima na koži prodiru u najgornji, rožnati sloj kože (44) gdje ih u keratinocitima hidrolizira enzim karboksilesteraza. (45) Studije pokazuju nikakav do blagi stupanj kožne iritacije potaknut spojevima parabena. (46, 47) Farmakokinetika parabena ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi pa tako kroz kožu bolje penetriraju parabeni s manjim alkilnim lancem. Upravo je transdermalni put apsorpcije parabena najčešći u razvijenim zemljama s obzirom na učestalo korištenje različitih kozmetičkih proizvoda. U koži se nalaze četiri esteraze koje metaboliziraju parabene te time sprječavaju potpunu akumulaciju u organizmu. Pronađene su u kutisu, keratinocitima, supkutanoj masnoj tkivu i krvi te hidroliziraju parabene na p-hidroksibenzojevu kiselinu i postranični lanac. Supkutana esteraza I ima veći afinitet za parabene kratkog lanca kao što je metilparaben, a supkutana esteraza II prema butilparabenu. U keratinocitima se nalazi esteraza III koja pokazuje veći afinitet za butilparaben i njezin afinitet slabi što je lanac kraći. U prva 24 sata 30 % metilparabena se razgrađuje u koži dok se ostali navedeni parabeni razgrađuju sporije. Zbog individualnih razlika u aktivnosti esteraza i povećane potrošnje kozmetičkih proizvoda hidroliza parabena nije potpuna te se mogu apsorbirati kao aktivni nerazgrađeni oblici i nakupljati u organizmu. U istraživanju na 26 mladih zdravih muškaraca iz 2007. godine potvrđeno je da se parabeni mogu apsorbirati sustavno jer su nakon lokalne primjene na koži pronađeni u sustavnom krvotoku i urinu. (48)

Parabeni iz hranidbenih proizvoda metaboliziraju se većinom u jetri i bubregu. U jetri se hidroliziraju pomoću jetrenih esteraza. Glavni metabolit je p-hidroksibenzojeva kiselina, ostali metaboliti uključuju p-hidroksihipurnu kiselinu i ester te konjugirane oblike s glicinom, glukuronidom i sulfatom. Metabolizam je brz što pokazuju metaboliti koji se pojavljuju u urinu 5 sati nakon ingestije. Brzo se apsorbiraju iz gastrointestinalnog trakta, hidroliziraju na p-hidroksibenzojevu kiselinu, konjugiraju i tako konjugirani izlučuju mokraćom dok se mali dio može izlučivati putem žuči i stolice. (49) Većina parabena bude hidrolizirana i nakon toga konjugirana te u tome obliku izlučena iz organizma, tek manji dio (0,2 – 0,9 %) ostane nepromijenjen. (50)

Mjerenjem količine pojedinog parabena u urinu može se procijeniti izloženost organizama.

P-hidroksibenzojeva se kiselina smatra nespecifičnim biomarkerom za procjenu izloženosti jer je zajednički metabolit svih parabena. Zbog toga se preporučuje mjerenje slobodnih i konjugiranih oblika osnovnih spojeva. Istraživanjem provedenim na zdravoj populaciji u SAD-u pronađene su mjerljive razine metilparabena i propilparabena u više od 96 % uzoraka urina. (51)

1.3.2 Izvor parabena

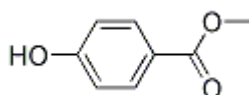
Raširena proizvodnja i uporaba parabena može rezultirati njihovim „curenjem“ u okoliš. Parabeni se ispuštaju kroz otpadne vode, ali i taloženjem čestica iz atmosfere. Zbog fizikalno-kemijskih svojstava poput topljivosti i povećanog afiniteta za organske tvari, ti se spojevi mogu akumulirati u poljoprivrednom tlu, mulju i organizmima. (52) Lošim gospodarenjem izvorima pitke vode s jedne strane te otpadnim vodama s druge strane, parabeni mogu dospjeti i u vodu za piće. (12) Kao posljedicu imamo začarani krug izloženosti parabenima preko rijeka, poljoprivrednog tla, povrća i voća, životinja, vode za piće te u budućnosti vjerojatno i zraka.

Dozvoljena koncentracija parabena kao konzervansa u proizvodu je do 0,8 % (mješavina parabena) ili do 0,4 % (jedan paraben). Najčešće korišteni parabeni su metilparaben i propilparaben. (53) Zadnjih 50 godina parabeni se koriste kao konzervansi – aditivi (E214-219) u prehrambenoj industriji. (43)

U Republici Hrvatskoj pokrenut je stručni projekt informiranja javnosti o prisutnosti i štetnosti konzervansa u hrani (E-brojevi). Na navedenoj web-stranici stoji upozorenje: *„Znanstvenici već godinama objavljuju studije kojima upozoravaju da mnogi dodaci hrani (označeni E-brojevima) izazivaju kod ljudi sindrom hiperaktivnosti, alergijske reakcije, glavobolje ili metaboličke poremećaje. Reakcije odgovornih institucija na ta otkrića prespore su i nedostatne, a prehrambena industrija takve rezultate uglavnom ignorira. Ipak, javnost ima pravo na svaku informaciju i svako upozorenje. Informiranjem javnosti ostvaruje se demokratsko načelo right-to-know, a upozoravanjem se podupire europsko načelo opreznosti (better-safe-than-sorry).“* Nakon prikaza sastava E-broja naveden je i podatak prihvatljivog dnevnog unosa parabena, tzv. ADI (Acceptable Daily Intake) / PDU (prihvatljivi dnevni unos). To je količina aditiva za koju se smatra da je potrošač može unositi u organizam bez štetnih posljedica po zdravlje. ADI se izražava u miligramima nekog aditiva po kilogramu tjelesne težine. Temelji se na rezultatima eksperimenata na životinjama gdje se izračunavaju količine aditiva koje ne narušavaju zdravlje laboratorijskih životinja, tzv. Observed Adverse Effective Level (NOAEL). Dobivene vrijednosti preračunavaju se u dnevnu dozu za ljude (ADI/PDU) tako da se obično umanjuju za sto puta.

Najzastupljeniji parabeni kao konzervansi koriste se u grickalicama, slasticama te za površinsku obradu suhomesnatih proizvoda. Slijedi popis, izvor i upozorenja za najčešće korištene parabene i njihov E-broj:

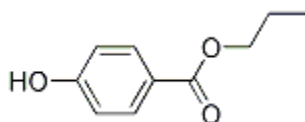
1. E218 – metil-p-hidroksibenzoat



Umjetno sredstvo za konzerviranje. Derivat benzojeve kiseline iz skupine parabena, poznat i kao metilparaben. Proizvodi se kemijskom sintezom. Vrlo često se upotrebljava u kozmetičkim i farmaceutskim pripravcima. Izbjegavati!

ADI: 10 mg/kg tjelesne težine

2. E216 – propil-p-hidroksibenzoat

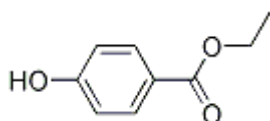


Sredstvo za konzerviranje. Esterski derivat p-hidroksibenzojeve kiseline. Može djelovati kao kontaktni alergen. Europska ustanova za sigurnost hrane (EFSA) nije odredila prihvatljivi dnevni unos (ADI) jer u pokusima na životinjama nije ustanovljena doza koja nema štetnih učinaka (EFSA-Q-2004-063). Zato je Europska komisija predložila da se ovaj aditiv skine s liste dopuštenih aditiva. U pokusima na štakorima ustanovljen je negativan utjecaj na seksualne hormone i oštećenja muških spolnih stanica.

DOPUŠTENA UPOTREBA	KOLIČINA
samo za površinsku obradu suhomesnatih proizvoda	Proizvođač sam odlučuje koliko će aditiva dodati nekoj namirnici. Tzv. DPP – utemeljen na pravilu <i>quantum satis</i> prema kojem se namirnicama smije dodati samo onoliko aditiva koliko je nužno da se postigne željeni učinak, pod uvjetom da se time ne obmanjuje potrošača
toplinski neobrađeni mliječni deserti	300 mg/kg ukupno kao sorbinska i benzojeva kiselina
bombonski proizvodi, masa za punjenje, preljevi	1500 mg/kg pojedinačno ili u smjesi (PHB max. 300 mg/kg)
snack-proizvodi na bazi žita i krumpira, preliveni plodovi i sjemenke	300 mg/kg izraženo kao PHB
tekuća umjetna sladila	1000 mg/l
dodaci prehrani u tekućem obliku	2000 mg/l pojedinačno ili u kombinaciji izraženo kao kiseline

ADI: Nije određen

3. E214 – etil-p-hidroksibenzoat



Umjetno sredstvo za konzerviranje. Ester p-hidroksibenzojeve kiseline pripada skupini parabena, a poznat je i kao etil-paraben. Proizvodi se kemijskom sintezom. Često se kombinira s benzojevom i/ili sorbinskom kiselinom. U pokusima na životinjama ustanovljeno je da djeluje omamljujuće te da može utjecati na širenje krvnih žila i pojavu grčeva. Utvrđeno je da u pojedinačnim slučajevima može uzrokovati alergijske i pseudoalergijske reakcije. Etil-paraben se u organizam apsorbira učinkovito putem kože ili probavnoga trakta, a izlučuje se bubrezima nakon hidrolize u p-hidroksibenzojevu kiselinu, bez značajnije akumulacije. Ne posjeduje akutnu toksičnost, ali u osjetljivih ljudi može uzrokovati alergijske i pseudoalergijske reakcije. Pojedinačna znanstvena istraživanja pokazuju da parabeni posjeduju kancerogena svojstva i endokrinu aktivnost te da mogu štetno djelovati na

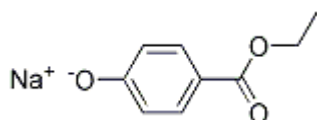
reproduktivne funkcije, fetalni razvoj te na razvoj raka dojke. Opravdanost česte upotrebe parabena danas je vrlo kontroverzna te još nije dovršena konačna procjena njihove sigurnosti i/ili moguće toksičnosti. Izbjegavati!

DOPUŠTENA UPOTREBA	KOLIČINA
želatinozni zaštitni sloj na mesnim proizvodima (kuhanim, salamurenim ili sušenim), paštete	1000 mg/kg
grickalice na osnovi žitarica i krumpira, prelivei orašasti plodovi	1000 mg/kg pojedinačno ili maks. 300 mg/kg u kombinaciji s E200
bombonski proizvodi (osim čokolade)	1500 mg/kg pojedinačno ili maks. 300 mg/kg u kombinaciji s E200, E210
samo za površinsku obradu suhomesnatih proizvoda	Proizvođač sam odlučuje koliko će aditiva dodati nekoj namirnici. Tzv. DPP – utemeljen na pravilu <i>quantum satis</i> prema kojem se namirnicama smije dodati samo onoliko aditiva koliko je nužno da se postigne željeni učinak, pod uvjetom da se time ne obmanjuje potrošača

ADI:

5 mg/kg tjelesne težine (ukupno benzojeva kiselina i svi benzoati)

4. **E215 – natrijev etil-p-hidroksibenzoat**

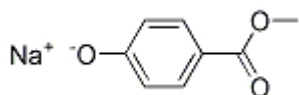


Umjetno sredstvo za konzerviranje. Proizvodi se kemijskom sintezom iz benzojeve kiseline. Izbjegavati! Dopusštena upotreba: kao i E214.

ADI:

10 mg/kg tjelesne težine

5. **E219 – natrijev metil-p-hidroksibenzoat**



Umjetno sredstvo za konzerviranje. Proizvodi se kemijskom sintezom iz benzojeve kiseline. Izbjegavati! Dopusštena upotreba: Kao E214.

ADI:

10 mg/kg tjelesne težine

Ostale su vrste parabena (izobutil, izopropil, benzil, heptilparaben – E209) manje zastupljene.

Prehrana može biti važan izvor izloženosti parabenima. Međutim, u usporedbi s izlaganjem koje potječe iz proizvoda za osobnu njegu, dnevni je unos iz hrane nizak.

Prema izvještaju Agencije za hranu i lijekove - FDA (engl. *US Food and Drug Administration*) iz 2006. godine, parabeni se koriste kao konzervansi u preko 22 000 kozmetičkih pripravaka što je u porastu u odnosu na FDA podatke (13 282 kozmetička pripravka) iz 1981. godine.

U SAD-u maksimalne dozvoljene koncentracije parabena za uporabu procjenjuje stručni panel *CIR* (engl. *Cosmetic Ingredient Review*). Navedene preporuke prihvaća i FDA. Preporuke se ne razlikuju od onih u Europskoj uniji, a zanimljivo je da ne postoji zakonski određena razina parabena već samo preporuke kojih se proizvođači ne moraju pridržavati. Ankete javnog mnijenja pokazuju da potrošač u dobi od 21 do 65 godina dnevno koristi do devet različitih kozmetičkih proizvoda. CIR panel je predložio maksimalno dozvoljene koncentracije parabena za dnevni unos od 142,08 mg za odrasle (3,024 mg/kg tjelesne težine) i 0,378 g za djecu (368 mg/kg tjelesne težine). (54) Procjenjuje se da su ljudi svakodnevno izloženi otprilike 76 mg parabena. (55) Putem kozmetičkih preparata dnevno unosimo do 50 mg, 25 mg putem farmaceutskih pripravaka i 1 mg putem prehrambenih proizvoda. (56) Istraživanje na 215 kozmetičkih proizvoda provedeno 1995. god. otkrilo je prisutnost parabena u 99 % proizvoda koji se stavljaju na kožu i 77 % proizvoda koji se ispiru nakon uporabe. (57) Alarmanтна činjenica je prisutnost ovih spojeva u značajnim koncentracijama u vlažnim dječjim maramicama. (58) U većini kozmetičkih proizvoda za odrasle i djecu prisutni su metilparaben, propilparaben i butilparaben. Najčešći proizvodi široke potrošnje u kojima su prisutni parabeni su (59):

- šamponi i proizvodi za oblikovanje kose
- kreme i losioni za lice i tijelo
- gelovi za tuširanje
- tekući sapuni
- losioni za brijanje
- dječja kozmetika
- dekorativna kozmetika
- vlažne maramice
- paste za zube
- dezodoransi
- parfemi
- lijekovi (sirupi, masti, tinkture, antiseptici)

1.3.3 Utjecaj parabena na reprodukcijski sustav

Istraživanja na štakorima pokazala su višu razinu etilparabena i butilparabena u plazmi majke, amnionskoj tekućini, placenti, tijelu i posebice jetri fetusa nakon izlaganja tim spojevima. (60) Studije usmjerene na potencijalni estrogenski učinak parabena tijekom prijelazne pubertetske i postnatalne faze kod ženki štakora pokazale su značajne promjene težine jajnika, nadbubrežne žlijezde, štitnjače, jetre i bubrega. Primijećene su i patohistološke promjene u reproduktivnim organima, poput smanjenja žutog tijela, stanjivanja folikularnog epitela i povećanja broja cističnih folikula. (61) Nadalje, otkrivena je sposobnost parabena mijenjati procese spermatogeneze i steroidogeneze kod muškog štakora. (62)

1.3.4 Utjecaj parabena na adipogenezu

Utjecaj parabena pokazao se i na diferencijaciju adipocita. Konkretno, podaci su pokazali da ti spojevi potiču adipogenezu u mišjim stanicama, proces pretvorbe multipotentnih matičnih stanica u zrele masne stanice. Adipogeni potencijal parabena raste kako se povećava duljina linearnog alkilnog lanca, a produženje toga lanca s aromatskim prstenom u benzilparabenu dodatno povećava adipogenu sposobnost. Adipogeni učinak parabeni ostvaruju vezanjem za peroksisom proliferator – aktivirajući receptor (PPAR) i glukokortikoidni receptor. (63)

1.3.5 Fetalna izloženost parabenima

Fetalna izloženost parabenima zbog primjene kozmetičkih proizvoda tijekom trudnoće važna je iz tri razloga. Prvo, parabeni prolaze krvnu barijeru posteljice i utječu na razvoj ploda. (64). Drugo, žene tijekom trudnoće izbjegavaju opće poznate štetne navike, poput pušenja i konzumiranja alkohola ali su još uvijek nesvjesne potencijalne toksičnosti kozmetičkih proizvoda te stoga neće smanjiti njihovu uporabu. Treće, dokazane su mjerljive koncentracije nerazgrađenih parabena u majčinom krvotoku i urinu. (65) Trudnice koje koriste losione, dezodoranse, ulje za masažu, šminku, parfeme, lakove za nokte, kreme za sunce ili gel za kosu imaju 29 % veće ukupne koncentracije parabena u urinu (metilparaben, propilparaben) u usporedbi s trudnicama koje ne koriste navedene proizvode. (66) Provedene su studije usporedbe koncentracije parabena kod majki i dojenčadi na norveškoj, korejskoj i švedskoj populaciji. Svi rezultati prikazuju prisutnost metilparabena u glavnom udjelu u ukupnoj količini parabena u urinu, a slijede ga etilparaben i propilparaben. (67) Također, urinske su koncentracije parabena kod žena veće nego kod muškaraca što se pripisuje učestalijem korištenju kozmetičkih proizvoda. (68)

1.4 Parabeni i rak dojke

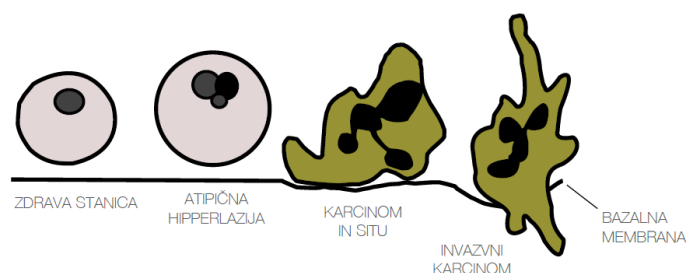
Zloćudne su bolesti jedan od vodećih javnozdravstvenih problema u Republici Hrvatskoj. Prema posljednjim dostupnim podacima Registra za rak, 2017. godine bilo je 24 385 novo dijagnosticiranih zloćudnih bolesti i to 13 229 muškaraca i 11 156 žena. Rak dojke je najčešće sijelo raka kod žena u 2 767 novo dijagnosticiranih slučajeva. (69) Prema podacima Državnog zavoda za statistiku, u 2018. godini u Hrvatskoj je umrlo 52 706 osoba. Zloćudne bolesti su na drugom mjestu uzroka smrti (14 210 osoba) u Republici Hrvatskoj, nakon srčano-žilnih bolesti (23 048 osoba). Od raka dojke u Republici Hrvatskoj umrlo je 990 žena. U oko 80 % novih slučajeva bolest bude otkrivena u fazi ranog raka, a oko 20 % u trenutku postavljanja dijagnoze bolest već bude u uznapredovaloj fazi. Hrvatska se ubraja u zemlje visokog mortaliteta od raka dojke i visokog rizika za obolijevanje od raka dojke te bilježi porast obolijevanja u mlađim dobnim skupinama. Također, rak karakterizira i određeni agresivni profil u usporedbi sa zapadnim zemljama.

Iako postoji veliki napredak u dijagnostici i terapiji, rak dojke je i dalje najčešći uzrok smrti u žena u dobi od 35. do 59. godine života. Oko 1,67 milijuna novih slučajeva dijagnosticira se diljem svijeta i više od 500 000 žena umre od te bolesti svake godine. To znači da se svakih dvadeset sekundi negdje u svijetu jednoj ženi postavi ta dijagnoza, a više od tri žene umru svakih pet minuta u svijetu. Oko 65 % raka dojke hormonski je ovisno. Prema podacima Američkog društva za rak, u posljednjem petogodišnjem razdoblju (2012. – 2016. godina) stopa incidencije raka dojke blago se povećala za 0,3 % godišnje, uglavnom zbog hormonski ovisnog oblika raka. Suprotno tome, stopa smrti od raka dojke i dalje opada, za 40 % u razdoblju od 1989. do 2017., što znači da je izbjegnuto oko 375 900 smrtnih slučajeva od raka dojke. Smanjenje smrtnosti moglo bi se pripisati dostupnosti visokokvalitetnim uslugama prevencije, ranog otkrivanja i liječenja. [9] No, ne postoji dovoljno znanstveno utemeljenih dokaza kojima bi se objasnilo povećanje incidencije raka dojke koje može imati uzročno-posljedičnu vezu između okoliša i endokrinih poremećaja. [3]

U svijetu godišnje umire od raka oko 9,6 milijuna ljudi. Jedna od šest umrlih osoba umire od raka. Svjetska zdravstvena organizacija predviđa da će se globalno broj oboljelih povećati s 18 milijuna u 2018. godini na 29,5 milijuna u 2040. godini, dok će broj umrlih porasti s 9,5 milijuna na 16,4 milijuna godišnje. Ovo se može spriječiti provedbom znanstvenih istraživanja o utjecaju ED-a na razvoj raka s ciljem stvaranja preventivne zaštite pojedinca.

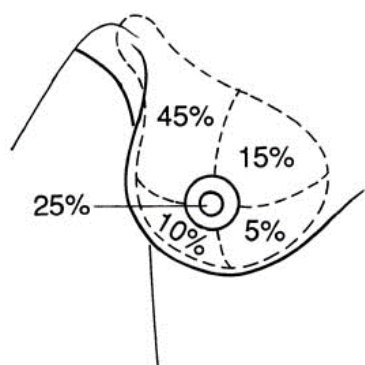
1.4.1 Liječenje raka dojke

Dojka je mliječna žlijezda građena od žljezdano, vezivnog i masnog tkiva od kojih mogu nastati tumori (rak). Tumori mogu biti dobroćudni i zloćudni. Zloćudni tumori dojke su najčešće epitelnog podrijetla (karcinomi). Karcinomi s obzirom na odnos zloćudnih stanica prema bazalnoj membrani mogu biti neinvazivni ili invazivni (Slika 4.). Dio navedenih podataka preuzeto je iz informacijske knjižice „*Znanjem protiv raka dojke*“ izdavača Hrvatske Lige protiv raka.(70)



Slika 4. - Od nastanka atipične hiperplazije treba najčešće više od desetak godina da nastane duktalni karcinom in situ. Od nastanka karcinoma in situ do nastanka invazivnog tumora promjera 0,5 – 1 cm i teškog oko 1 g u kojem ima oko milijardu zloćudnih stanica protekne otprilike sljedećih 6 – 10 godina.(70)

Više od polovice tumora dojke javlja se u gornjem lateralnom kvadrantu (GLK) i izdancima žljezdanog tkiva usmjerenim prema pazuhu (45 – 57 %). U užem području bradavice, odnosno centralnom dijelu dojke nastaje 15 – 20 %, u gornjem medijalnom kvadrantu (GMK) 12 – 15 % i u oba donja kvadranta 5 – 10 % tumora dojke. Kod 10 % slučajeva raka dojke, češće se javlja u lijevoj dojci (Slika 5.). (71)



Slika 5. Učestalost karcinoma dojke po kvadrantima. Najčešće sjelo raka je u gornjem lateralnom kvadrantu (<http://www.patient.co.uk/images/OUP260A.jpg>)

Redovitim pregledom koji uključuje samopregled, mamografiju i ultrazvučni pregled, rak dojke se može otkriti u ranom stadiju, kada su mogućnosti za izlječenje i preživljenje mnogo veće. Preporuča se da se mamografski pregledi obavljaju od 50. godine života (neki preporučuju i od 40. godine), a kod žena s visokim rizikom i ranije. Mamografija se treba raditi redovito u određenim vremenskim razmacima (1-2 godine). Ova metoda često se nadopunjuje ultrazvučnim pregledom dojki, liječničkim pregledom dojki i

prema indikaciji s magnetskom rezonancijom. Sustav kategorizacije nalaza naziva se Breast Imaging Reporting and Data System – skraćeno BIRADS. Prema njemu se otkrivene promjene procjenjuju ocjenom od 0-6. BI-RADS 1 i 2 je uredan nalaz, BI-RADS 3 vjerojatno benigni nalaz, BI-RADS 4 suspektna promjena, BIRADS 5 visoko suspektna zloćudna promjena i BI-RADS 6 predstavlja dijagnosticiran rak dojke.

Svaka sumnjiva tvorba u dojci mora biti patohistološki pregledana kako bi se sa sigurnošću utvrdilo radi li se o zloćudnom tumoru ili ne. Biopsiju je moguće napraviti uzimanjem cilindra tkiva tumora širokom iglom ili danas sve rjeđe otvorenom kirurškom biopsijom. Patohistološkom pretragom bioptata tumora, osim postavljanja točne i pouzdane dijagnoze radi li se o zloćudnom tumoru, utvrđuje se i jesu li u tkivu tumora prisutni receptori za spolne hormone i protein HER-2. Ti su podaci važni za utvrđivanje vrste tumora, a istovremeno su važni prediktivni i prognostički čimbenici na temelju kojih se planira daljnje liječenje.

Stadij bolesti i vjerojatnost preživljenja određuje se prema TNM sustavu na temelju triju elemenata: veličine tumora („T“ kategorija), broja metastazama zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova („N“ kategorija) i (ne)postojanja metastaza u drugim dijelovima organizma („M“ kategorija) (Tablica 3.).

Primarni tumor (T)	
Tx	Primarni tumor se ne može odrediti
T0	Primarni tumor se ne može dokazati
Tis	Karcinom in situ
Tis (DCIS)	Duktalni karcinom in situ
Tis (LCIS)	Lobulami karcinom in situ
Tis (Paget)	Pagetova bolest bradavice bez tumora
T1	Tumor najvećeg promjera ≤ 2 cm
T1a	0,1-0,5 cm
T1b	0,5-1 cm
T1c	1-2 cm
T2	Tumor veličine 2-5 cm
T3	Tumor >5 cm
T4	Tumor bilo koje veličine sa zahvaćanjem
	a) torakalne stijenke ili
	b) kože
T4a	Širenje na torakalnu stijenku (s izuzetkom pektoralnog mišića)
T4b	Edem ili ulceracija kože dojke ili satelitski kožni nodusi iste dojke
T4c	T4a i T4b
T4d	Upalni karcinom
Regionalni limfni čvorovi (N)	
Nx	Postojanje metastaza u regionalnim limfnim čvorovima nije moguće dokazati
N0	Histološki se ne nalaze metastaze, bez dodatnog pregleda za izolirane tumorske stanice
N0(i-)	Histološki se ne nalaze metastaze, negativan IHC
N0(i+)	Izolirane tumorske stanice identificirane histološki ili pomoću IHC, bez nakupina >0,2mm
N0(mol-)	Histološki se ne nalaze metastaze, negativan molekularni nalaz (RT-PCR)
N0(mol+)	Histološki se ne nalaze metastaze, pozitivan molekularni nalaz
N1	Metastaza u 1-3 aksilarna limfna čvora i/ili unutarnjim mamarnim čvorovima s mikroskopskom bolesti detektiranom SLN
N1mi	Mikrometastaza (>0,2mm, nijedna >2mm)
N1a	Metastaze u 1-3 aksilarna limfna čvora
N1b	Metastaze u unutarnjim mamarnim čvorovima s mikroskopskom bolesti detektiranom SLNB
N1c	pN1a+pN1b
N2	Metastaze u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova ili u klinički evidentnim unutarnjim mamarnim limfnim čvorovima u odsutnosti aksilarnih limfnih čvorova
N2a	Metastaze u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova (bar jedan tumorski depozit >2,0mm)
N2b	Metastaze u klinički evidentnim unutarnjim mamarnim limfnim čvorovima u odsutnosti metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima
N3	Metastaze u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova ili u infraklavikularnim limfnim čvorovima
N3a	Metastaze u klinički evidentnim ipsilateralnim unutarnjim mamarnim limfnim čvorovima u prisutnosti jednog ili više pozitivnog aksilarnog limfnog čvora ili u više od 3 aksilarna limfna čvora s klinički negativnim mikroskopskim metastazama u unutarnjim mamarnim limfnim čvorovima
N3b	Metastaze u klinički negativnim mikroskopskim metastazama u unutarnjim mamarnim limfnim čvorovima
N3c	Metastaze u ipsilateralnim supraklavikularnim limfnim čvorovima
Udaljene metastaze (M)	
Mx	Postojanje udaljenih metastaza nije moguće dokazati
M0	Ne postoje udaljene metastaze
M1	Postoje udaljene metastaze

Tablica 3. Patološka klasifikacija karcinoma dojke (pTNM) (72)

Vjerojatnost petogodišnjeg preživljenja bolesnica s obzirom na dob i stupanj proširenosti bolesti prikazana je u Tablici 4. :

Stadij	Petogodišnje preživljenje (%)	
	Prosječno	U dobi 20-34 godine
Ukupno	89,3%	77,8%
0	100%	98,7%
I	100%	94,5%
II	86,2%	77,6%
IIIA	57,2%	50,5%
IIIB i IIIC	49%	42,8%
IV	21,2%	19%

Tablica 4. Petogodišnje preživljenje bolesnica s obzirom na dob i stupanj proširenosti bolesti (70)

Rak dojke se najčešće javlja u dobi iznad 50 godina, no zabilježen je i porast incidencije u dobi mlađoj od 30 godina. (73) Kada tumor otkrijemo na vrijeme (veličine do 1 cm), izlječiv je u 98 % slučajeva, dok je 5-godišnje preživljenje kod uznapredovalog stadija bolesti od 35 do 75 %. U oko 75 % oboljelih žena, prema sadašnjim podacima Registra za rak Republike Hrvatske, rak dojke se neće vratiti nakon uspješno provedenog liječenja.

Značajan utjecaj na ishod liječenja imaju karakteristike tumora koje određuju biološko ponašanje tumora i koje, uz utvrđeni stadij bolesti utječu na prognozu i odabir daljnjeg liječenja. U njih spadaju:

- **Histološki tip raka.** Zloćudni tumori dojke mogu nastati iz duktalnog epitela ili iz lobularnog epitela. I duktalni i lobularni karcinomi se dijele na one koji nisu probili bazalnu membranu (neinvazivni, „in situ“) te na one koji to jesu (invazivni). Tako su glavni oblici karcinoma dojke duktalni karcinom in situ (DCIS, prema engl. Ductal Carcinoma In Situ), lobularni karcinom in situ (LCIS, prema engl. Lobular Carcinoma In Situ), duktalni invazivni karcinom bez karakteristika određenog tipa (IDC NOS, prema engl. Invasive Ductal Carcinoma Not Otherwise Specified), lobularni invazivni karcinom, medularni karcinom, koloidni karcinom, Pagetova bolest i tubularni karcinom. Svjetska zdravstvena organizacija je 2012. godine predložila klasifikaciju tumora dojke obzirom na histološki tip tumora.(74)
- **Gradus, stupanj zloćudnosti tumora** ili stupanj diferencijacije – određuje se iz patohistološkog preparata na temelju određenih specifičnih svojstava stanica od kojih je tumor građen. Za određivanje gradusa(1-3)najvažnija je brzina rasta i sličnost stanica normalnim stanicama epitela dojke. Nottinghamski sustav stupnjevanja karcinoma dojke(modifikacija Scarff-BloomRichardson sustava prema Elston-Ellisu) koristi kombinaciju jezgrinog pleomorfizma, formiranja tubula i broja mitozna na periferiji tumora pri čemu se svaki navedeni element boduje s 1-3. Prema ukupnom broju bodova, tumori se svrstavaju u histološke graduse: gradus 1 (dobro diferencirani, 3-5 bodova), gradus 2 (umjereno diferencirani, 6-7 bodova) ili gradus 3 (slabo diferencirani, 8-9 bodova). Tumori nižeg gradusa imaju bolju prognozu te je tako 10-godišnje preživljenje 90-94% za bolesnice s najnižim brojem bodova, a 30-78% s najvišim brojem bodova.(75)

- **Proliferacijski indeks Ki-67** – danas se smatra najpouzdanijim biljekom stanične proliferacije. Ki-67 manji od 10 % smatra se „niskim“, a veći od 10 % smatra se „visokim“. Ipak, prema St. Gallenskom konsenzusu iz 2013. godine, granična vrijednost za visoki proliferacijski indeks mjeren pomoću Ki-67 je 20 % što se ujedno smatra i relativnom indikacijom za kemoterapiju.
- Čimbenici koji potiču tumor na rast (**hormonski receptori, HER2 receptori**), receptorske molekule koje su prisutne na membrani ili unutar zloćudnih stanica. To su receptori za ženske spolne hormone (estrogenski i progesteronski) i HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2) koji potiču rast raka dojke. Te molekule su i terapijski cilj za različite „pametne“ onkološke lijekove.

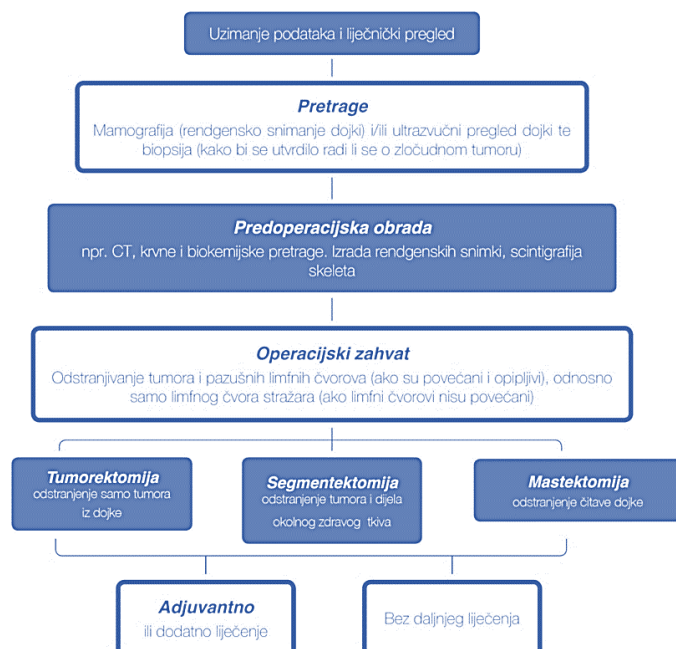
Tumori u kojima su prisutni hormonski receptori nazivaju se hormonski ovisni tumori. Takve tumore ženski spolni hormoni (estrogen i progesteron) potiču na ubrzani rast i zloćudno ponašanje. Kod žena u premenopauzi 60 %, a kod žena u postmenopauzi 67 % tumora je hormonski ovisno. Obično su bolje diferencirani, nižeg stupnja zloćudnosti i imaju povoljniji tijek bolesti od hormonski neovisnih tumora. Protein HER2 nalazi se na površini svih zdravih stanica u našem tijelu i preko njega se kontrolira dijeljenje i rast stanica te osigurava obnavljanje oštećenih ili odumrlih stanica i tkiva. Uslijed genskih oštećenja nastalih u zloćudnim stanicama dolazi do stvaranja znatno većeg broja molekula tog receptora zbog čega i rast stanica postaje mnogo brži, nekontroliran i nezaustavljiv. HER2-pozitivni tumori znatno su zloćudniji od ostalih tumora, brže metastaziraju i češće dovode do recidiva i smrti bolesnice. Svaka 5. žena koja oboli od raka dojke ima HER2-pozitivan tumor. Od tumora koji su hormonski ovisni samo ih je oko 10 % i HER2-pozitivno.

Prema navedenim parametrima određuje se **molekularna klasifikacija raka** koja određuje primjenu i odgovor na kemoterapiju i imunoterapiju te prognozu bolesti. Molekularnu klasifikaciju dijelimo prema četiri tipa ovisno o izraženosti hormonskih receptora (estrogenskih i progesteronskih), HER-2 gena i markera proliferacije Ki-67. U Luminal A skupinu svrstani su karcinomi s pozitivnim ER i/ili PR i negativnim HER2 te Ki-67 indeksom manjim od 20%. Skupina Luminal B dijeli se na dvije podskupine: HER2 negativni karcinomi koji imaju pozitivne ER i/ili PR a Ki-67 indeks im je veći od 20% (LumB/HER2-) te HER2 pozitivni karcinomi koji imaju pozitivne ER i/ili PR, neovisno o vrijednosti Ki-67 indeksa (LumB/HER2+). U skupinu HER2 pozitivnih karcinoma svrstani su karcinomi kojima su ER i PR negativni a HER2 je pozitivan. Skupini „Basal-like“ pripadaju karcinomi koji imaju negativne ER, PR i HER2 receptore (trostruko negativni). Najbolju prognozu ima podtip luminal A, a najlošiju trostruko negativan (Tablica 5.).

	ER i/ili PR	HER	Ki67
LUMINAL A	pozitivni $\geq 20\%$	negativni	$< 20\%$
LUMINAL B HER2 NEG	pozitivni	negativni	$\geq 20\%$
LUMINAL B HER2 POZ	pozitivni	pozitivan	bilo koji
HER 2 POZITIVNI	negativni	pozitivan	bilo koji
TROSTRUKO NEGATIVNI / BASAL LIKE	negativni	negativni	bilo koji

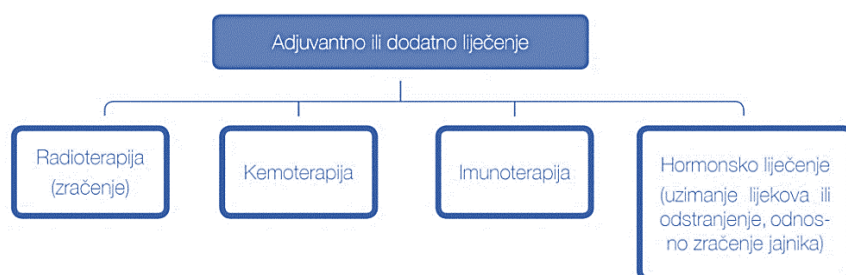
Tablica 5. - molekularna klasifikacija raka dojke

Cilj liječenja raka dojke je odstraniti sve vidljivo tumorsko tkivo iz dojke i regionalnih limfnih čvorova te spriječiti ponovnu pojavu tumora ili metastaza u drugim tkivima i organima, odnosno izlječenje raka dojke. Ovo podrazumijeva primjenu lokalnih postupaka na dojci i regionalnim limfnim čvorovima (kirurški zahvat i zračenje) te sistemsko onkološko liječenje kojim se uništavaju zaostale tumorske stanice u čitavom organizmu, a to su kemoterapija, hormonska terapija i imunoterapija (Slika 6.).



Slika 6. Najčešći redoslijed postupaka pri dijagnosticiranju i liječenju bolesnica s rakom dojke (70)

Nakon potvrđene dijagnoze prema inicijalnom patohistološkom nalazu biopsata slijedi odabir smjera liječenja. To može biti primjena onkološke terapije (neoadjuvantna terapija) prije kirurškog liječenja ili odabir kirurškog liječenja nakon kojeg po potrebi slijedi adjuvantna onkološka terapija (Slika 7.).



Slika 7. Adjuvantna onkološka terapija (70)

Preoperacijskom neoadjuvantnom kemoterapijom može se smanjiti veći tumor nakon čega je moguće obaviti manji, poštediti kirurški zahvat kojim će biti odstranjen samo tumor ili tumor i samo dio dojke. Samo kod malog broja žena, od 10 do najviše 15 %, nije potrebno primjenjivati adjuvantno liječenje, uglavnom kod bolesnica u postmenopauzi s malim (odnosno promjera 1 cm ili manje, a prema nekima 2 cm ili manje) niskozloćudnim tumorima koji su hormonski ovisni i HER2-negativni i kod kojih ne postoji limfovaskularna invazija u okolno zdravo tkivo.

Opseg i vrsta **kirurškog** zahvata ovise o vrsti i veličini tumora, veličini dojke, smještaju tumora unutar dojke te o tome postoji li više tumora unutar dojke. Tako se mogu izvršiti različiti kirurški zahvati:

- tumorektomija ili odstranjenje samo tumora iz dojke
- segmentektomija ili kvadrantektomija – odstranjenje tumora, dijela okolnog zdravog tkiva dojke oko tumora i dijela kože dojke iznad tog dijela tkiva
- mastektomija – amputacija dojke kojom se odstranjuje tumor i sve zdravo tkivo i koža dojke
- subkutana mastektomija (SNSM,SSM)– odstranjuje se sve tkivo dojke, ali se ostavlja koža dojke sa ili bez bradavice
- od limfnih čvorova može biti odstranjen samo limfni čvor stražar (Sentinel limfni čvor) ili svi limfni čvorovi i čitavo masno i ostalo tkivo iz pazuha (limfadenektomija).

Svaka žena treba imati dostupne metode rekonstrukcije dojke nakon odstranjenja raka. Rekonstrukcija dojke kirurški je postupak kojim se formira nova dojka. U istom operativnom zahvatu moguća je i korekcija druge dojke (smanjenje, podizanje ili povećanje). Cilj je rekonstrukcije poboljšati izgled žene što pridonosi njenom samopouzdanju. Najčešće korištene metode rekonstrukcije su:

- vlastitim tkivom: npr. upotrebom kože i masnog tkiva donjeg trbuha ili kože i mišića u području leđa (Slika 8.)
- rekonstrukcija protezama.



Slika 8. Supkutana mastektomija lijeve dojke sa poštedom bradavice i rekonstrukcija izgleda dojke upotrebom kože i masnog tkiva donjeg trbuha u sklopu slobodnog mikrokirurškog DIEP (Deep Inferior Epigastric Perforator) režnja. Rezultat 10 godina nakon operacije. (76)

Danas su glavni prognostički pokazatelji konačne patohistološke dijagnostike napravljene nakon kirurškog zahvata povezani s preživljenjem. U njih ubrajamo navedenu veličina tumora, status aksilarnih limfnih čvorova, histološki tip tumora, histološki gradus, prisutnost limfovaskularne invazije, status hormonskih receptora, proliferacijski indeks Ki-67, ekspresiju gena za receptor humanog epidermalnog faktora rasta (HER2) te dob bolesnice. (72) Dijagnosticiranje i liječenje raka dojke rano, prije nego što se proširi, pruža najbolje mogućnosti izlječenja.

1.4.2 Etiologija raka dojke

Etiologija raka dojke je multifaktorijalna. Čimbenici odgovorni za nastanak raka dojke podijeljeni su u tri skupine: genetski, endokrini i okolišni čimbenici.

Genetske promjene koje dovode do razvoja raka dojke su:

- 1) aktivacija protoonkogen (HER-2/neu)
- 2) inaktivacija (gubitak ili mutacija) tumor-supresor gena (BRCA1 i BRCA2)
- 3) inaktivacija gena odgovornih za popravak oštećene DNK.

U normalnim stanicama ovi geni djeluju kao tumor-supresor geni i kodiraju proteine koji osiguravaju normalan rast stanica sudjelujući u popravku DNK i održanju genetskog integriteta. Naslijeđene mutacije u ovim genima dovode do razvoja raka dojke u ranijoj dobi, često bilateralno, a posljedica im je i povećana sklonost raku jajnika. (77) Istraživanja su do sada otkrila da se rak dojke može povezati s oko 400 promijenjenih gena. Do sada su najbolje istražene promjene u BRCA 1 i BRCA 2. Polovina nasljednih tumora dojke dovodi se u vezu s mutacijama tih dvaju gena. U genetske čimbenike rizika ubrajamo:

- 1) **Pozitivnu obiteljsku anamnezu.** Rizik za nastanak raka dojke je 2-3 povećan kod žena čija majka, teta, sestra, kći ili druge rođakinje u prvom koljenu s majčine strane imaju ili su imale rak dojke ili jajnika. Taj rizik može biti i 8-10 puta veći ako su dvije rođakinje u prvom koljenu s majčine strane oboljele od raka dojke, ako im je bolest dijagnosticirana prije 40. godine života i ako su imale obostrani rak. Muški rođaci s majčine strane oboljeli od raka dojke jednako utječu na procjenu. Rak dojke u očevoj obitelji također blago povećava rizik. U odnosu na ukupan broj samo oko 10 – 12 % karcinoma dojke može se povezati s obiteljskim nasljeđem, odnosno s naslijeđenom genskom predispozicijom za nastanak raka dojke. Geni koji se dovode u vezu s nastankom obiteljskog tumora dojke su supresorski geni, BRCA1 i BRCA2, a žene s mutacijom jednog ili oba gena imaju 40 % do 85-postotnu vjerojatnost da će oboljeti od raka dojke, za razliku od normalne populacije kod koje je vjerojatnost nastanka raka dojke 10 %.

Endokrini čimbenici povezani su s duljinom ekspozicije endogenim estrogenima tijekom života. Glavni izvori estrogena kod žena u premenopauzi su jajnici, a kod žena u postmenopauzi nakon što su jajnici prestali s funkcijom, još uvijek se znatne količine estrogena stvaraju u masnom tkivu, mišićima, jetri, nadbubrežnim žlijezdama i u tkivu dojke. Djelujući na receptore u stanicama hormonski ovisnog raka dojke estrogen potiče rast, metastaziranje i zloćudno ponašanje raka. Dužina izloženosti djelovanju estrogena i progesterona je važan rizični čimbenik. Što je izloženost djelovanja estrogena duža, veća je vjerojatnost od nastanka raka dojke. (78-80) U endokrine rizične čimbenike ubrajamo:

- 1) **Stariju životnu dob** – najznačajniji rizični čimbenik nastanka raka dojke. Rizik obolijevanja neprestano se povećava i umnogostručuje od puberteta do 75.-80. godine života kada ostaje na istoj razini. Učestalost raka dojke počinje rasti s 35 – 40 godina i nakon toga kontinuirano

raste. Od svih zloćudnih tumora dojke 75 – 80 % njih dijagnosticira se u žena starijih od 50 godina (žena u postmenopauzi).

- 2) Žene koje su prvu mjesečnicu (**rana menarha**) dobile prije 12. godine života i žene koje imaju redovite mjesečnice i nakon 55. godine (**kasna menopauza**) imaju 2-3 puta povećan rizik od nastanka raka dojke.
- 3) **Prva trudnoća nakon 30. godine života** povećava relativni rizik od nastanka raka dojke za četiri puta, a što je veći broj porođaja, manja je vjerojatnost nastanka raka dojke. **Nerotkinje** imaju četiri puta veću učestalost raka dojke od žena koje su rađale djecu. Ipak najveću važnost u procjeni rizika za nastanak raka nosi dob prvog porođaja.

Prema tome kasna prva menstruacija, rana menopauza, veći broj trudnoća i rana prva trudnoća smanjuju vjerojatnost od nastanka raka dojke.

Incidencija raka dojke tijekom posljednjih nekoliko desetljeća je u konstantnom povećanju, što se dovodi u snažnu povezanost s okolišnim čimbenicima i modernim načinom života. (81) Porast incidencije bilježi se kako u manje razvijenim, tako i u najrazvijenijim zemljama svijeta. (82) Životni stil uključuje:

- 1) Socioekonomski status – žene višeg socioekonomskog statusa i one koje žive u **gradovima** mogu imati povećan rizik nastanka raka dojke do 2 puta u odnosu na žene nižeg socioekonomskog statusa i onih koje žive na selu.
- 2) Način prehrane ukazuje da postoji poveznica između **pretilosti** i raka dojke. Masne stanice organizma proizvode estrogen uz pomoć enzima aromataze, što dovodi do toga da pretile žene imaju višak estrogena koji može poticati rast epitelnih stanica dojke. Pretile žene u postmenopauzi imaju do 2 puta povećan rizik obolijevanja od raka dojke. Osim u masnom tkivu estrogen se proizvodi i u nadbubrežnoj žlijezdi, jetri, mišićima. Pretolost se određuje prema BMI - Indeks tjelesne mase (engl. Body Mass Index). To je jedan od načina procjene uhranjenosti. Od svih poznatih indeksa, indeks tjelesne mase je najuže povezan s količinom prekomjernog masnog tkiva u ljudskom tijelu. Izračun BMI se temelji na odnosu tjelesne težine i kvadrata visine osobe (Slika 9.).

BMI	Klasifikacija
<20	Pothranjenost
20 - 25	Idealna težina
25 - 30	Prekomjerna tjelesna masa
>30	Pretilost

Slika 9. BMI - Indeks tjelesne mase (engl. Body Mass Index)

- 3) Velika količina životinjskih masti u **prehrani**. Ova je tvrdnja utemeljena na niskoj pojavnosti raka dojke u zemljama Istoka u kojima je u prehrani zastupljeno malo životinjskih masti, ali i mnogo povrća i žitarica, odnosno hrane koja sadrži velike količine biljnih vlakana što je također moglo utjecati na smanjenje rizika.

- 4) Kod žena koje su ekstremne u **vježbanju** ili žena s niskom težinom zbog nedostatka masnoće dolazi do manjeg broja ovulacija. Stoga zdrava fizička aktivnost smanjuje učestalost raka dojke.
- 5) **Alkohol, pušenje** dovodi se u vezu sa smanjenom razgradnjom estrogena u jetri. Rizik za razvoj raka je dvostruko veći u žena koje svakodnevno konzumiraju alkohol.
- 6) Uzimanje **oralnih kontraceptiva** ima slabu vezu s nastankom raka dojke. Ipak, uzimanje kontraceptiva prije 25. godine života i u vremenu duljem od četiri godine povećava relativni rizik za 1,84 puta. Uzimanje oralnih kontraceptiva u kasnijoj životnoj dobi (preko 25 godina starosti) nema uzročno-posljedičnu vezu s nastankom raka dojke.
- 7) **Hormonska nadomjesna terapija** povećava relativni rizik od nastanka raka dojke za 1,36 puta. Ona se daje postmenopauzalnim ženama kako bi se smanjile tegobe i učestalost osteoporoze.
- 8) Svakodnevna izloženost **ED-ima**.

U ostale čimbenike rizika ubrajamo postojanje dijagnoze atipične hiperplazije ili lobularnog karcinoma in situ, žene koje su već imale rak dojke te ako su dojke bile izložene radioterapiji prije 30. godine, osobito zbog Hodgkinovog limfoma.

1.4.3 Mehanizam djelovanja parabena – estrogenska mimikrija

Iako je identificiran niz genetskih i okolišnih čimbenika koji utječu na razvoj raka dojke, još uvijek nema učinkovitih metoda za primarnu prevenciju. (82) Najsigurniji rizični čimbenik je duljina ekspozicije prema endogenim estrogenima tijekom života, odnosno prosječna razina koncentracije estrogena i broj menstruacijskih ciklusa tijekom života. (78-80)

Estrogeni su ženski spolni hormoni koji imaju višestruku ulogu u razvoju i funkciji ženskog reproduktivnog sustava. Prirodni su estrogeni steroidne molekule koje se vežu za estrogenske receptore i utječu na ekspresiju gena u koje se svrstavaju estron (E1), estradiol (E2) i estriol (E3). Estron dominira tijekom menopauze, estradiol tijekom menstruacijskog ciklusa a estriol u trudnoći. Sintetski estrogeni su ksenoestrogeni.

Estrogeni primarno nastaju tijekom razvoja folikula u jajnicima, u žutom tijelu (*corpus luteum*) i placenti. U manjoj mjeri do sinteze dolazi u jetri, nadbubrežnoj žlijezdi, žljezdanom tkivu dojke i u masnom tkivu. U ljudskom tijelu estrogeni nastaju iz androgena uz pomoć enzima. Od prve mjesečnice (menarha) do menopauze glavni hormon je 17 β -estradiol, a u menopauzi u tijelu nalazimo više estrona. Estradiol nastaje iz testosterona i estrona koji nastaju iz androstendiona. Kemijsku promjenu testosterona u estradiol i androstendiona u estron katalizira enzim koji se naziva aromataza. Najjači estrogenski učinak ima estradiol (12 je puta jači od estradiola, a 80 puta od estriola) zbog čega se smatra glavnim estrogenom. Estriol je oksidacijski produkt estrona i estradiola.

Estrogeni receptori (ER) koje aktivira hormon estrogen (17 β -estradiol) skupina je proteina koji se nalaze unutar stanica. Postoje dvije klase ER: estrogenski receptori jezgre (ER α i ER β) i membranski estrogenski receptori (mERs) (GPER (GPR30), ER-X i Gq-mER). Oba ER-a se nalaze u različitim

tipovima tkiva. Međutim, postoje neke značajne razlike u njihovim obrascima ekspresije. ER α se nalazi u endometriju, stanicama karcinoma dojke, stromalnim stanicama jajnika i hipotalamusu. U muškaraca se protein ER α nalazi u epitelu eferentnih kanala. Ekspresija proteina ER β dokumentirana je u stanicama granulose jajnika, bubrezima, mozgu, kostima, srcu, plućima, crijevnoj sluznici, prostati i endotelnim stanicama. (83)

Estrogenski su receptori izolirani u zloćudnim tumorima ženskog reproduktivnog sustava. U višoj koncentraciji estrogeni su kancerogeni te povećavaju stanično oksidativno oštećenje DNK molekule. (37) Kako je samo 5 % raka dojke vezano za genetsku predispoziciju, ostaje 95 % sporadične pojavnosti raka zbog nepoznatog uzroka. Stoga povećana dodatna izloženost žena kemikalijama koje imaju ED ksenoestrogenog oblika može potaknuti razvoj raka dojke. Istraživanja su već potvrdila razvoj raka kod životinja koje su bile izložene ksenoestrogenima, no potrebno je pružiti znanstveno utemeljene dokaze o ulozi parabena u nastanku raka dojke. (84)

Parabeni se vežu za estrogenske receptore gdje mogu oponašati ili antagonizirati djelovanje endogenog estrogena. Također mogu utjecati na sintezu, transport, metabolizam i izlučivanje estrogena. (85) Iako je poznato da se u ljudskoj koži nalazi enzim karboksilesteraza koji razgrađuje parabene, još je uvijek upitno nalazi li se on u potrebnoj količini da razgradi sve parabene koji tijekom dana dođu u kontakt s ljudskom kožom. (86) Godine 1998. prvi su put dokazana estrogena svojstva parabena. Povećanje dužine alkilnog lanca dovodi do povećanja estrogenosti parabena, tj. lakšeg prodora u stanicu zbog većeg afiniteta za receptore. (41) Parabeni s dužim ili većim lancima ugljika, poput butilparabena i benzilparabena, bit će učinkovitiji pri prodoru kroz staničnu membranu. (87) Iako su parabeni nazvani „slabi estrogeni“, in vitro studije pokazuju da djelovanje može biti jednako 17 β estradiolu ako se nalaze u dovoljnoj koncentraciji. (88) Stoga bi svakodnevno korištenje preparata koji sadrže parabene moglo imati svoj kumulativni učinak. (89)

Također je dokazano da incidencija karcinoma dojke u SAD-u rapidno raste s prodajom dezodoransa i antiperspiranata. Dokazano je i da je etiketa na proizvodu koja opisuje sastojke korištenih konzervansa u 10,2 % slučajeva netočna, a kada se testira na neki od sastojaka koji nisu navedeni u toj deklaraciji, u 17 % slučajeva pokazuje pozitivan rezultat za barem jednu tvar. (90)

Objavljen je značajan broj publikacija o sposobnosti parabena da kroz njihovo estrogeno djelovanje povećaju proliferaciju estrogen-osjetljivih stanica raka dojke. (91) Također postoje mnogi podaci o nastanku raka dojke nakon izloženosti parabenima. Prvi dokazi prisutnosti parabena u tkivu ljudskog tumora dojke prosječne količine od 20 nanograma/gram parabena u malim uzorcima 20 oboljenja od raka dojke objavljeni su 2004. godine. Novije studije pokazuju njihovu prisutnost u svim kvadrantima dojke. (92, 93) In vitro studije na MCF 7 stanicama raka dojke dokazuju da parabeni mogu potaknuti rast stanica raka dojke kroz svoja estrogena svojstva. (94,95) Druga je studija otkrila da dugotrajna izloženost metilparabenu, propilparabenu i butilparabenu može in vitro povećati migracijska i invazivna svojstva stanica raka dojke. (96) Parabeni su, samostalno ili u kombinaciji, prisutni u ljudskim tkivima dojke. U istraživanju objavljenom 2012. godine prikazano je prisustvo jednog od metilparabena, etilparabena, propilparabena, butilparabena ili isobutilparabena u 158/160 (99 %) uzoraka tkiva dok je 96 od 160 uzoraka (60 %) sadržavalo sve izmjerene estere. (93) Među parabenima također postoje

određene razlike. Tako metilparaben utječe na više gena nego butilparaben pa se postavlja pitanje koji je od ta dva parabena slabiji estrogen, jer je poznato da butilparaben ima veći afinitet vezanja za receptore, a metilparaben kvalitativno sličniji učinak estradiolu.

Isto kao i što učestalost uporabe kozmetičkih proizvoda pokazuje statistički značajnu korelaciju gdje su žene koje su najmanje koristile dezodoranse i antiperspirante dobile rak dojke sa 64,9 godina, one u srednjoj učestalosti s 58,6 godina, a one koje su najučestalije koristile dobile su rak s 52,6 godina. (97) Navedena prisutnost parabena na etiketama je netočna u 45 % kozmetičkih proizvoda te su jedan ili više parabena nađeni u 87 % proizvoda. (98, 99) Takav je rezultat zabrinuo mnoge zbog mogućih alergijskih učinaka, ali je još više zabrinjavajući ako se pretpostavka o parabenima kao uzročnim čimbenicima u nastanku raka dojke pokaže točnom.

Objavljene su studije mjerenja koncentracije parabena u urinu. (99-101) Od znanstvene je važnosti vidjeti postoji li povezanost između količine parabena u dojci i izmokrene koncentracije parabena.

Godine 2011. dokazalo se da je koncentracija parabena u serumu kod žena značajno povezana s korištenjem losiona za tijelo što ukazuje da često korištenje održava povišene koncentracije. (102)

Analiza uzoraka plazme 332 žene pokazala je srednju vrijednost metilparabena 9,4 ng/ml, < 3ng/ml etilparabena i < 2 ng/ml propilparabena. Vrijednosti u plazmi i urinu bile su više u adolescenata i žena u usporedbi s muškarcima što je u korelaciji s češćom uporabom kozmetičkih proizvoda kod žena. (103)

Također, rak se dojke najčešće javlja u gornjem lateralnom kvadrantu (GLK) i lijevoj dojci. To se povezuje s mjestom primjene dezodoransa i antiperspiranata (GLK graniči lateralno s pazuhom) i pritiskom prilikom primjene (samo je 10 % populacije ljevaka). Pretpostavka je da ako postoji endogeni biološki/genetski čimbenik koji uzrokuje razvoj raka dojke, onda bi raspodjela trebala biti jednaka prema svim kvadrantima. Činjenica da to nije tako sugerira postojanje vanjskih ili okolišnih čimbenika koji utječu na razvoj raka dojke. Na temelju toga se postavlja hipoteza o migraciji parabena iz dezodoransa i ostalih kozmetičkih preparata u tkivo dojke koji pridonose razvoju tumora. Međutim, ne postoji izravni dokaz uzročne veze. (81, 104)

Iako je toksičnost parabena detaljno proučavana, vode se kao konzervansi sigurni za uporabu. S obzirom na učestalost izloženosti tim spojevima, sve su učestalije rasprave treba li dopustiti uporabu tih spojeva u našim formulama za kožu, hrani i farmaceutskim pripravcima. (43)

1.4.4 Postoji li alternativa parabenima?

Na temelju znanstvenih istraživanja, Europski odbor za zaštitu potrošača zaključio je da se metilparaben, etilparaben, propilparaben, izobutilparaben i butilparaben smatraju sigurnim dijelovima kozmetičkih pripravaka u kojima ukupna koncentracija parabena ne prelazi 0,8 %. Najveća dozvoljena koncentracija parabena u Japanu je 1,0 %.

Korištenje prirodnih sirovina pokazuje dobra antiseptička svojstva. Parabene kao konzervanse u kozmetici mogu zamijeniti: bademovo i maslinovo ulje, lavanda, jojobino ulje, ulje čajevca, arganovo i

lavandino ulje, ekstrakti origana, timijana, ružmarina, sjemenke grejpa. No, prirodni kozmetički proizvodi imaju nekoliko nedostataka: skupe sirovine, mogućnost alergije i čuvanje u hladnjaku.

Znanstveni laboratoriji najvećih proizvođača kozmetike traže alternative parabenima. Ipak, zbog niske cijene i dokazane učinkovitosti, parabeni nisu izbačeni iz uporabe. Natpis „bez parabena“ na kozmetičkim proizvodima ne znači u potpunosti odsutnost parabena. Zbog rasprave o njihovoj štetnosti proizvođači pribjegavaju raznim trikovima kako bi uvjerali potrošača. Umjesto da zamijene parabene, oni ih preimenuju. Dakle, metilparaben je preimenovan u metil-paoksibenzoat, etilparaben u etil-paoksibenat, propilparaben u propoksiparabenzoat i tako dalje. Opća rasprava o štetnosti parabena vodi se u znanstvenim krugovima i u medijima zadnjih 25 godina. Potrebno je pružiti znanstveno utemeljene dokaze da parabeni zaista mogu potaknuti stanice endokrinog sustava na proliferaciju. Rezultati doktorskog rada pružaju utemeljene znanstvene dokaze o in vivo prisutnosti parabena u zloćudno promijenjenom tumoru dojke te in vitro proliferaciji stanica raka dojke pod utjecajem „učinka mješavine/ koktela“ nanoplastike i parabena.

Unatoč konstantnom porastu znanstvenih publikacija o štetnosti parabena, još uvijek ne postoji niti jedno zakonodavstvo koje bi zabranilo njihovu uporabu u kozmetičkim proizvodima. Stoga su se mnogobrojna udruženja potrošača usmjerila na lobiranje regulative zabrane uporabe parabena u kozmetici, posebice kod male djece. Djeca imaju izrazitu propusnost i nerazvijen imunološki sustav kože do treće godine života, kada ona postaje slična odrasloj koži. U pojedinim zemljama Europe počele su se događati pozitivne inicijative zabrane parabena u kozmetici za djecu do tri godine. Danska je najbolji primjer, a vjeruje se kako će uskoro i Francuska izglasati takvu regulativu. U tim zemljama proizvođači kozmetike pripremaju se na takve promjene i postupno rade na preformulacijama svojih kozmetičkih proizvoda koristeći druge konzervanse koji su neškodljivi i bez rizika, a posebice su zanimljivi oni iz prirodnih izvora, poput probiotika, CO₂-ekstrakta ružmarina i grejpa.

U Europi svake godine nastane 25 milijuna tona plastičnog otpada, od čega se manje od 30 posto prikuplja radi recikliranja dok ostatak ide u okoliš. Mikroplastika nije lako biorazgradiva pa se u okolišu zadržava dulje vrijeme. Na sebe može apsorbirati (zalijepiti) otrovne kemikalije i endokrine disruptore, poput parabena. Takav spoj se naziva „učinak mješavine/koktela“. Zbog zadržavanja mikroplastike u ljudskom organizmu dodatno se može poremetiti funkcija endokrinog sustava. Prema Međunarodnoj pomorskoj organizaciji, mikroplastika je pronađena u više od 114 vodenih vrsta u 2018. godini, a pronađena je i u soli, zelenoj salati, jabukama i mnogim drugim namirnicama. Multidisciplinarnim pristupom znanstvenici nastoje izumiti nove tehnologije razgradnje mikroplastike iz okoliša. Mikrobiolozi su osmislili održivi način razgradnje pomoću bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. (105) Bakterije na sebe „lijepe“ mikroplastiku te je na taj način skupljaju i recikliraju kako bi se zaustavila 'plastifikacija' prirodnog okruženja. Europski parlament je uveo uredbu o prikladnosti plastične ambalaže za recikliranje na tržištu EU-a do 2030. godine.

1.4.5 Uredbe Europske unije za zaštitu potrošača od endokrinih disruptora

EU pristup temelji se na znanstvenim savjetima na visokoj razini koje daju relevantna tijela EU za procjenu rizika, primjerice *Europska agencija za kemikalije*, *Europska agencija za sigurnost hrane* ili *Znanstveni odbor za zaštitu potrošača*. U Sedmom programu djelovanja za okoliš navodi se da bi građani EU trebali biti zaštićeni od ekoloških pritisaka i rizika za zdravlje te se jamči da će se do 2020. sigurnosni problemi povezani s ED-ima zaista i riješiti. *REACH* (engl. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical*) je uredba Europske unije prihvaćena kako bi se poboljšala zaštita ljudskog zdravlja i okoliša s obzirom na opasnosti koje mogu predstavljati kemikalije. (106) Neuspješna provedba Uredbe, u smislu visokog postotka neusklađenih registracijskih dosjea, spore evaluacije zbog nedostatka podataka i nepoduzimanje regulatornih mjera u svezi s tvarima koje su pronađene nakon evaluacije, predstavljaju ozbiljni rizik za zdravlje ljudi ili okoliš. U nedostatku konkretnog akcijskog plana, države članice poput Francuske, Švedske, Danske i Belgije, poduzele su korake na nacionalnoj razini kako bi se povećala razina zaštite njihovih građana raznim nacionalnim mjerama. Također, zaključak najnovije studije Instituta za znanost procjene rizika (engl. *Institute for Risk Assessment Sciences*) na temu „Troškovi zdravstvene zaštite koji bi mogli biti povezani s kemikalijama sa svojstvima endokrine disrupcije” procjenjuju iznos od 46 do 228 milijardi EUR godišnje. (107)

Smatra se da se s kemikalijama koja imaju svojstva endokrine disrupcije, kategorija kemikalija koja je jednako problematična kao i tvari koje su klasificirane kao kancerogene, mutagene ili toksične za reprodukciju (CMR tvari), trebalo postupati na isti način u zakonodavstvu EU.

Zakonodavstvo EU u području ED-a navodi opći cilj zaštite ljudskog zdravlja i okoliša smanjenjem izloženosti tim tvarima na najmanju moguću mjeru, izgradnju temelja za netoksično kružno gospodarstvo te poticanje industrijske inovacije zamjenom sigurnijim tvarima. Utvrđeno je da još treba razviti i/ili validirati ispitivanja koja obuhvaćaju druge aspekte endokrinog sustava ili druge životinjske vrste, da nema primjerenih prognostičkih modela za određene endokrine bolesti, primjerice određene hormonski ovisne vrste raka ili metaboličke poremećaje/pretilost i da ne postoji jedinstvena studija o procjeni učinaka izlaganja sisavaca tijekom čitavog životnog ciklusa. (108)

S obzirom da je sposobnost utvrđivanja tvari za koje se sumnja da su kemikalije sa svojstvima endokrine disrupcije izuzetno važna, smatra se da postoji hitna potreba za ubrzavanjem razvoja i provjere ispitivanja kako bi se ispravno identificirale kemikalije i nove metodologije pristupa ne samo u populaciji ljudi i životinja već i u okolišu, uključujući vodu za piće. Postoje konsenzusi i o tome da je stadij razvoja fetusa i pubertet najosjetljivije doba izlaganja ED-ima tijekom kritičnih razvoja. (109) Izlaganje ED-ima u tim stadijima može imati trajne učinke i povećati sklonost bolestima kasnije u životu. Postoji i sve više dokaza o tome da ED-i mogu imati zbirni učinak („**učinak mješavine**” ili „**učinak koktela**”), što znači da izlaganje kombinaciji ED-a može izazvati štetni učinak pri koncentracijama koje zasebno nemaju zamjetnih učinaka. (110)

Stoga EU navodi potrebu provođenja znanstvenih istraživanja u svrhu:

- **razumijevanja mehanizama** endokrine disrupcije
- ostvarivanja većeg napretka **razvojem i validacijom metoda ispitivanja**. Za utvrđivanje ED-a i upravljanje njima nužno je pouzdano ispitivanje kojim bi se u obzir uzeli različiti načini na koje endokrini disruptori mogu utjecati na endokrini sustav.
- daljnjih razvoja metoda koje mogu zamijeniti pokuse na životinjama. To bi podrazumijevalo oslanjanje na dostupne podatke i pridavanje veće važnosti **matematičkom modeliranju**.
- učinka **izloženosti ED-ima na nastanak bolesti**. U tom su kontekstu ograničene spoznaje o posebnom utjecaju izlaganja kemikalijama i o tome kako taj utjecaj odvojiti od drugih mogućih uzroka negativnih učinaka koji se istražuju. Drugi čimbenici doista imaju ulogu u razvoju takvih endokrinih poremećaja (npr. geni, prehrana, stil života ili drugi čimbenici iz okoline).
- **polemike o tome mogu li se i na koji način određena toksikološka načela, primjerice načelo „sigurne granične vrijednosti”, tj. doze ispod kojih se ne očekuje pojava štetnih učinaka, primijeniti pri ocjeni sigurnosti ED-a**. Neki znanstvenici smatraju da se za endokrine disruptore ne može utvrditi sigurna granična vrijednost. (111)
- **potpunog razumijevanja kombiniranog izlaganja** („učinak mješavine/koktela”)
- **razvoja sigurnijih alternativa** (uključujući nekemijski pristup) za zamjenu ED-a.

Iz svega navedenog potrebno je poduzeti mjere kako bi se zajamčila visoka razina zaštite ljudskog zdravlja i okoliša od kemikalija sa svojstvima endokrine disrupcije tako što će se izloženost ljudi i okoliša tim tvarima zaista svesti na minimum.

1.5 SVRHA RADA

Trendovi medicinskih istraživanja, posebice onih na području otkrivanja i tretmana malignih bolesti, rezultat su multidisciplinarnе suradnje. Zdravlje je uvjetovano složenim međuodnosom bioloških, psiholoških, socijalnih i okolišnih čimbenika. Nesmetano i uravnoteženo funkcioniranje endokrinog sustava pridonosi očuvanju zdravlja, jer čak i male fluktuacije u razini hormona mogu izazivati značajne patofiziološke promjene u organizmu. Endokrini disruptori pod nazivom parabeni, djeluju kao kompetitivni agonisti estrogenskih receptora te imitiraju djelovanje endogenog estrogena što može utjecati na proliferaciju estrogen-osjetljivih stanica dojke i kao takvi povećati rizik za razvoj hormonski ovisnog raka dojke. U doktorskom radu procjenjuje se utjecaj parabena na razvoj raka dojke određivanjem i usporedbom koncentracije parabena iz uzoraka tkiva dojke, urina i plazme zdravih žena i žena sa zloćudnim tumorom dojke. Ograničenje istraživanja planirani je broj ispitanika. Po nacrtu Priloga prijave teme dokorskog rada trebalo se uključiti 170 ispitanica kojima se mjeri koncentracija parabena u četiri kvadranta dojke. S obzirom na to da je na službenoj obrani nacrt istraživanja prijedlog komisije bio da se istraživanje usmjeri na mjerenje parabena samo iz gornjeg lateralnog kvadranta, broj ispitanica je smanjen na 72. Ova je odluka znanstveno opravdana s obzirom da je gornji lateralni kvadrant najčešće sjelo zloćudnog tumora dojke. Čak i na smanjenom broju ispitanica imamo značajan broj statističkih varijabli koje jamče statističku snagu. Rezultati dokorskog rada podijeljeni su na dvije skupine analiza. Prva uključuje ispitivanje vrste kirurškog liječenja ispitanica, uporabe kozmetičkih proizvoda i rizičnih čimbenika za razvoj raka dojke. Analiza se radi na skupini od ukupno 72 ispitanice. U skupinu bolesnih uključeno je 49 žena sa zloćudnim tumorom dojki. U skupinu zdravih uključene su 23 žene, 13 biopsija i 10 redukcija. Druga analiza uključuje mjerenje koncentracije parabena iz humanih uzoraka urina, plazme i tkiva dojke ispitanica. Kako je gornji lateralni kvadrant (GLK) najčešće sjelo tumora dojke, za doktorski se rad odabire reprezentativna skupina žena koje imaju promjene u GLK-u dojke. Zbog visokih troškova analitičkog dijela ekstrakcije parabena, analiza se radi na skupini od 20 ispitanica, 11 bolesnih i 9 zdravih (4 biopsije i 5 redukcija). Primjenom nove, ekološki prihvatljive i jednostavnije metode za određivanje parabena u humanim uzorcima mjeri se koncentracija parabena kod zdravih i bolesnih žena. Svrha dokorskog rada je utvrditi izloženost parabenima ispitivane skupine te mogući povećani rizik za razvoj hormonski ovisnog raka dojke. Obradom podataka dobit će se odgovor na pitanje postoji li promjena u koncentraciji parabena u gornjem lateralnom kvadrantu dojke kod žena sa zloćudnim tumorom dojke. Zbog sve većeg zagađenja okoliša s plastikom istraživanje se proširilo na procjenu "učinka koktela", izlaganja mješavini plastičnih nanočestica i parabena na proliferaciju stanica raka dojke, što bi dodatno moglo pridonijeti povećanom riziku za razvoj raka dojke. Kroz sljedeće inovativnosti dokorskog rada proširit će se područje utemeljenih dokaza i unaprijediti razumijevanje o utjecaju parabena na zdravlje:

1. Cilj analitičkog dijela dokorskog rada je primjena nove metode analize parabena iz humanih uzoraka urina, plazme i tkiva dojke. Zbog svojih kemijskih specifičnosti, određivanje parabena u humanim uzorcima zahtjeva primjenu visokospecifičnih metoda mjerenja. U postojećoj znanstvenoj literaturi opisano je samo nekoliko metoda. Razlozi za nepostojanje jedinstvene

metode mogu se naći u mukotrpnom i složenom analitičkom radu vezanom uz rukovanje i obradu uzoraka čvrstog tkiva u usporedbi s tekućim biološkim uzorcima, kao i u poteškoćama sa primjenom bioanalitičkih metoda validacije. **Rezultati istraživanja ovog doktorskog rada predstavljaju novu, ekološki prihvatljivu i jednostavnu metodu ekstrakcije parabena pomoću membrane adsorpcijske tekstilne faze (FPSE, od eng. fabric-phase sorptive extraction).** U usporedbi sa dosadašnjim metodama analize dobio se poboljšani i brži postupak pripreme uzoraka. Rezultati optimiziranog protokola FPSE ekstrakcije parabena objavljeni su u tri znanstvene publikacije. Prva prikazuje ekstrakciju parabena iz uzoraka urina, druga iz tkiva dojke i treća iz plazme. Svi objavljeni radovi pokazali su da je ekstrakcija parabena putem FPSE membrane prikladna i učinkovita za buduće epidemiološke i toksikološke studije. Nazivi radova su : „*An improved fabric-phase sorptive extraction protocol for the determination of seven parabens in human urine by HPLC–DAD*“ , Biomedical Chromatography. 2020., „*Fabric phase sorptive extraction combined with high-performance-liquid chromatography-photodiode array analysis for the determination of seven parabens in human breast tissues: Application to cancerous and non-cancerous samples*“ , Journal of Chromatography A. 2020. te „*Determination of Intact Parabens in the Human Plasma of Cancer and Non-Cancer Patients Using a Validated Fabric Phase Sorptive Extraction Reversed-Phase Liquid Chromatography Method with UV Detection*“ Molecules 2021. (112-114)

2. Do sada je objavljeno malii broj znanstvenih studija koje mjere koncentracije parabena u humanim uzorcima tkiva, urina i krvi. Također, nije rađena korelacija koncentracija parabena između tih uzoraka kod istih ispitanica. Istraživanje ovog doktorskog rada obuhvaća **do sada najveću grupu ispitivanih žena na svijetu.** U jednoj znanstvenoj studiji mjerene su koncentracije parabena samo iz tkiva dvadeset bolesnih ispitanica, a u drugoj studiji samo iz četrdeset. (115,116) Ukupan broj ispitanica ovog doktorskog rada je 72 pacijentice (23 zdrave žene s dobroćudnim i 49 bolesnih sa zloćudnim promjenama tkiva dojke). Osim toga do sada nikada nije rađena usporedba koncentracija između zdravih i bolesnih žena. **Rezultatima usporedbe koncentracije parabena između zdravih i bolesnih žena utvrdit će se postoji li povećana koncentracija parabena u zloćudno promijenjenom tkivu dojke, urinu i plazmi kod bolesnih žena.**
3. Podjela dojke u dosadašnjim istraživanjima napravljena je kroz vertikalne rezove od sternuma prema pazuhu. (116) Prema uvriježenoj podjeli, dojka se dijeli na četiri kvadranta. U ovom istraživanju mjerenje će biti postavljeno prema četiri kvadranta s fokusom na GLK (gornji lateralni kvadrant) dojke, koje predstavlja mjesto najčešćeg sjela raka dojke. **Rezultatima mjerenja koncentracije utvrdit će se postoji li veća koncentracija parabena u tkivu GLK dojke, blizu mjesta svakodnevne primjene dezodoransa u pazušnu regiju.**
4. U dosadašnjim istraživanjima koncentracija parabena mjerena je samo iz uzoraka tkiva dojke oko mjesta zloćudnog tumora. Nikada nije izmjerena koncentracija direktno iz tumorskog tkiva

da bi se izbjeglo utjecanje na konačnu patohistološku dijagnozu. U istraživanju doktorskog rada patolog će uzorkovati dio zloćudnog tkiva dojke kada je tumor jednak ili veći od 1 ccm, jer to ne utječe na konačnu patohistološku dijagnozu. Također nikada nije izmjerena koncentracija parabena iz tkiva pazušne regije oko limfnih čvorova. Tijekom kirurškog liječenja raka dojke uzima se tkivo pazušne regije s limfnim čvorovima radi procjene diseminacije bolesti. Ovim istraživanjem mjerit će se koncentracija parabena i iz masnog tkiva pazušne regije smještene oko izvađenog limfnog čvora kod žena s rakom dojke. **Rezultatima mjerenja koncentracije utvrdit će se postoji li povećana koncentracija parabena u zloćudno promijenjenom tkivu dojke i u masnom tkivu oko limfnih čvorova pazušne regije.**

5. U doktorskome istraživanju utvrdit će se stupanj povezanosti životnih navika te učestalost i vrste primjene kozmetičkih proizvoda s koncentracijama parabena iz humanih uzoraka zdravih i bolesnih žena. Procjena životnih navika o učestalosti i vrsti primjene proizvoda s parabenima provodit će se *Upitnikom za pacijente* odobrenom sa strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice Dubrava. Svi dobiveni podaci usporedit će se sa čimbenicima rizika za razvoj raka dojke te učestalosti primjene dezodoransa i antiperspiranata. Ovim istraživanjem potvrdit će se postoji li **razlika u životnim navikama** između zdravih žena i žena sa rakom dojke.
6. Na osnovi stupanja povezanosti između koncentracije parabena u humanim uzorcima može se postaviti osnova za budući razvoj „probnog testa“ mjerenja koncentracije parabena u urinu i krvi u općoj populaciji žena. Time bi se procijenila potencijalna veća izloženost parabenima i njihovom ksenoestrogenskom djelovanju na endokrini sustav.
7. Procjena sinergističkog učinka („**učinak mješavine**“ ili „**učinak koktela**“) parabena i **nanoplastike na proliferaciju stanica raka dojke** inovativni je korak u istraživanju utjecaja endokrinih disruptora. Rezultati istraživanja objavljeni su kao prvi znanstveni rad doktorske disertacije pod nazivom „*Synergistic effects of parabens and plastic nanoparticles on proliferation of human breast cancer cells*“, Arh Hig Rada Toksikol 2019. (117) Zakonodavstvo EU još uvijek je usredotočeno na istraživanje pojedinačnih kemikalija i ne uključuje posebne odredbe o izloženosti mješavinama različitih kemikalija. Postoji sve više dokaza o tome da ED-i mogu imati zbirni učinak („učinak mješavine“ ili „učinak koktela“), što znači da izlaganje kombinaciji ED-a može izazvati štetan učinak pri koncentracijama koje zasebno nemaju zamjetnih učinaka. (110) Mnogi autori danas upućuju na to da je fokus istraživanja potrebno prebaciti na razumijevanje kombiniranog izlaganja štetnim kemikalijama. Mogu li ED-i pri niskim dozama mješavina imati potencijalno štetne učinke na zdravlje životinja i ljudi? O ovom aktualnom znanstvenom pitanju tek će se raspravljati na budućim zasjedanjima Europske unije na temu zaštite potrošača od endokrinih disruptora. Izloženost plastičnim mikro- i nanočesticama koje nastaju tijekom proizvodnje, uporabe i odlaganja plastičnog otpada velik je zdravstveni i okolišni problem koji treba hitno rješavati. Brz globalni rast proizvodnje i uporabe plastike odgovoran je za onečišćenje okoliša s ukupno 300 milijuna tona

nerazgradivog otpada od čega osam milijuna završi u moru. Takva plastika postupno se razgrađuje u mikro- i nanočestice. (118) Nedavna izvješća procjenjuju da trilijuni plastičnih čestica leže na površini oceana. (119) Ljudi su izloženi mikro- i nanočesticama plastike putem plastificiranih proizvoda, hrane, pitke vode ili kozmetičkih proizvoda za osobnu njegu. (120) Cilj ovog dijela istraživanja je procijeniti učinak plastičnih nanočestica, parabena i njihovih koktela na vijabilnost i proliferaciju dviju različitih stanica raka dojke: stanične linije MDA-MB 231, kojoj nedostaju HER2, progesteronski i estrogenski receptori, te MCF-7 stanična linija, karakterizirana bolje diferenciranim stanicama koje imaju progesteronski i estrogenski receptor alfa ($ER\alpha$). Protumorska aktivnost stanica raka dojke može se očekivati kao konačni ishod izloženosti takvom kemijskom koktelu. Podaci prikazani u Rezultatima dragocjeno su upozorenje na novi problem utjecaja izloženosti plastičnom otpadu i štetnim kemikalijama.

2 HIPOTEZA

Koncentracija parabena je povišena kod žena sa zloćudnim tumorom dojke u gornjem lateralnom kvadrantu dojke, u zloćudnom tumorskom tkivu, u masnom tkivu oko limfnih čvorova pazušne regije te u urinu i plazmi u usporedbi sa koncentracijom parabena iz uzoraka zdravih žena.

Kod žena sa zloćudnim tumorom dojke postoji statistički značajna povezanost između koncentracije parabena u tkivu dojke te koncentracije u urinu i plazmi.

3 CILJEVI RADA

Opći cilj :

utvrditi stupanj povezanosti sociodemografskih obilježja, antropometrijskih mjera i čimbenika rizika za razvoj raka dojke s koncentracijom parabena kod žena sa zloćudnim tumorima dojke u usporedbi sa zdravim ženama.

Specifični ciljevi :

1. utvrditi postojanje povećane koncentracije parabena u zloćudno promijenjenom tkivu dojke u usporedbi sa zdravim tkivom
2. utvrditi postojanje statistički značajne razlike između koncentracije parabena iz tkiva dojke i koncentracije parabena iz masnog tkiva oko limfnih čvorova pazušne regije
3. utvrditi postojanje statistički značajne razlike u koncentraciji parabena iz urina i plazme između zdravih žena i žena sa zloćudnim tumorima dojke
4. utvrditi stupanj povezanosti koncentracije parabena iz plazme i urina s koncentracijom parabena i patohistološkim nalazom tkiva zdravih žena i žena sa zloćudnim tumorima dojke
5. utvrditi stupanj povezanosti životnih navika te učestalost i vrste primjene kozmetičkih proizvoda s izmjerenim koncentracijama parabena kod zdravih žena i žena sa zloćudnim tumorima dojke
6. procjena sinergijskog učinka („učinak mješavine” ili „učinak koktela”) parabena i nanoplastike na proliferaciju humanih stanica raka dojke.

4 MATERIJALI I METODE

4.1 Ispitanice

Doktorski je rad izrađen na Klinici za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju, Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkom zavodu za patologiju, Kliničkom zavodu za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju Kliničke bolnice Dubrava, Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, Zavodu za farmaciju Nacionalnog i kapodistrijskog sveučilišta u Ateni, Kemijskom odjelu Sveučilišta Aristotel u Solunu i Međunarodnom forenzičkom Institutu u Miamiju.

Prospektivna studija u trajanju od travnja 2017. do studenoga 2019. godine obuhvaća žene hospitalizirane na Klinici za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u Kliničkoj bolnici Dubrava. Ispitanice su pri prijemu na Kliniku usmenim putem pozvane na sudjelovanje u istraživanju nakon čega su pisanim i usmenim putem detaljno upoznate s ciljem i načinom provođenja istraživanja te potpisale **suglasnost za sudjelovanje**. Ispitanice su podijeljene u dvije skupine:

- A. **zdrave žene** podvrgnute elektivnim zahvatima korekcije izgleda dojke kirurškom metodom redukcije hipertrofičnog tkiva (patohistološkog nalaza dobroćudne fibrocistične mastopatije) i žene podvrgnute biopsiji dobroćudnog tkiva dojke (patohistološkog nalaza fibroadenom)
- B. **žene sa zloćudnim tumorima dojke** kod kojih se uzima tkivo kvadranta oko ležišta tumora, tkivo zloćudnog tumora i masno tkivo oko limfnih čvorova pazušne regije.

Operativni zahvat na dojkama kod zloćudnih promjena uključuje jednu od standardiziranih kirurških metoda liječenja, ovisno o vrsti raka i stadiju bolesti. Tkivo dojke uzima se nakon pošteditne operacije kvadrantektomije, modificirane radikalne mastektomije (MRM), mastektomije s poštedom kože ili mastektomije s poštedom kože i mamila-areola kompleksa (MAK). Verificiranje invazije limfnih čvorova radi se putem biopsije prvog pazušnog limfnog čvora, tzv. sentinel čvora ili čvora čuvara kroz kojega prvo prolazi limfatična drenaža dojke. U slučaju pojave metastaza radi se limfadenektomija prva dva reda limfnih čvorova. Masno tkivo oko limfnih čvorova pazušne regije uzima se za mjerenje koncentracije parabena. Sam limfni čvor neće biti dostupan za analizu jer to može utjecati na konačnu patohistološku dijagnozu. Koncentracija parabena iz urina i krvi mjeri se iz prijeoperacijski uzetih uzoraka.

Kriterij uključenja su žene u dobi od 18 do 80 godina kojima je indiciran operativni zahvat na dojkama i koje su dragovoljno potpisale suglasnost za sudjelovanje. Drugi kriterij uključenja u slučaju uzimanja tkiva je da isti mora biti minimalne težine od 1 g. Tkivo manje težine ne sadrži adekvatnu količinu dostatnu za provođenje svih potrebnih analiza, kako patohistoloških tako i kromatografskih. **Kriterij isključenja** je adjuvantna onkološka terapija (kemoterapija, radioterapija, hormonska) i prisutnost karcinoma druge etiologije.

4.2 Metode

4.2.1 Prikupljanje anamnestičkih podataka i bioloških uzoraka

Kod ispitanica se prijeoperacijski postavlja dijagnoza pomoću **slikovnih radioloških metoda mamografije, ultrazvuka i magnetske rezonancije**. Također se postavlja i prijeoperacijska **dijagnoza** pomoću citološke verifikacije, core-biopsije ili otvorene biopsije tkiva dojke. Nadalje, specijalist plastične, rekonstrukcijske i estetske kirurgije napravi klinički pregled gdje utvrđuje točan smještaj raka dojke i informira pacijenticu o **kirurškim standardiziranim načinima liječenja** ovisno o vrsti raka i stadiju bolesti.

Pri prijemu na Kliniku odjelni će liječnik ispuniti „**Upitnik za pacijentice**“ (Slika 11.) o anamnestičkim podacima ispitanica, antropometrijskim mjerama, sociodemografskim obilježjima, prisutnosti čimbenika rizika za razvoj raka dojke te vrsti i učestalosti primjene dezodoransa i antiperspiranata.

Na dan operacije uzet će se prvi jutarnji urin u količini od minimalno 15 ml, dvije epruvete krvi te nakon operacije uzorkovati 1 g tkiva u suradnji s patologom. Protokol uzorkovanja tkiva, urina i krvnih uzoraka prikazan je na Slici 10.

Obrazloženje zašto možemo ulaziti u tumorsko tkivo veličine jednake ili iznad 1 cm vezano je uz gustoću žljezdanog tkiva, odnosno njegovu specifičnu težinu. S obzirom da se radi o tkivu najbližijem masnom tkivu, pretpostavka je da je specifična težina ispod 1 g/cm. Gustoća masti je 920 - 940 kg/m³ što je 0,92 – 0,94 g/cm. Većina je tumora oblika sličnog kugli. Veličina se tumora može aproksimirati veličini kugle sličnog polumjera (r). Volumen izračunavamo pomoću matematičke formule $V = \frac{4}{3} \cdot r^3 \cdot \pi$. Za provođenje analize koncentracije parabena potrebno nam je minimalno 1 g tumorskog tkiva. Tumori manjeg promjera, ispod 1 cm, ne sadrže adekvatnu količinu dostatnu za provođenje svih potrebnih analiza, kako patohistoloških tako i kromatografskih. Humane uzorke numerira odjelni liječnik Klinike za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju. Na dan operacije uzima se uzorak urina i krvi koji se alikvotiraju i numeriraju na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KB Dubrava. Tijekom operativnog zahvata kirurg uzima tkivo dojke koje se orijentacijski označava koncem i prosljeđuje na patohistološku dijagnostiku na Klinički zavod za patologiju KB Dubrava. Prije provedbe patohistološke dijagnostike, patolog uzorkuje 1 g tkiva za analizu koncentracije parabena. Navedeno se tkivo numerira prema podrijetlu i smještaju unutar dojke. Iz numeriranih se uzoraka mjeri koncentracija parabena na Zavodu za farmaciju Nacionalnog i kapodistrijskog sveučilišta u Ateni te Kemijskom odjelu Sveučilišta Aristotel u Solunu. Laboratorijsko osoblje neće biti upoznato sa značenjem numeriranja sve dok posljednji uzorak tkiva i urina ne budu analizirani. Na taj se način randomizira podrijetlo i mjesto uzimanja tkiva kao i svi medicinski podaci ispitanica.

Slika 10. Protokol uzorkovanja tkiva, urina i krvnih uzoraka

Endokrini disruptori u etiologiji raka dojke <u>Protokol uzorkovanja tkiva, urina i krvnih uzoraka</u>				
ISPITANICE (broj i struktura ispitanica koje je potrebno regrutirati)				
SKUPINA	N	Oznaka	DOB (god)	UKLJUČNI KRITERIJ
ZDRAVE	49	B-biopsija R-redukcija	18-80	redukcije, biopsije
BOLESNE	23	CA	18-80	rak dojke
Isključni kriteriji za ispitanice: adjuvantna onkološka terapija (kemoth, radioth, hormonska), odsustvo karcinoma druge etiologije.				
Svakoj pacijentici treba izvaditi 2 epruvete krvi, uzeti uzorak urina, te nakon operacije uzorkovati tkivo.				
<u>Kirurški zahvat na Klinici za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju</u>				
nakon kirurškog zahvata tkivo se staviti u plastičnu posudu bez formalina i prenese na Klinički zavodu za patologiju unutar 15 minuta. Patolog raspodijeli dio tkiva i pohrani u epruvete. Tkivo se odmah zamrzne na -20 °C.				
Svaki uzorak se označi :				
1. Broj uzorka (ID ispitanice) 2. GLK - gornji lateralni kvadrant, GMK - gornji medijalni kvadrant, DLK - donji lateralni kvadrant, DMK - donji medijalni kvadrant 3. D - desna dojka, L - lijeva dojka 4. A - tkivo aksile (oko sentinel limfnog čvora) 5. T - tkivo tumora (ukoliko je tumor veći od 1 ccm) 6. B - biopsija, R - redukcija, CA - rak dojke				
<u>Uzorkovanje krvi i urina na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku</u>				
CENTRIFUGA UZORAKA PRIJE ALIKVOTIRANJA (10 min, 3000 o/min)				
1. jedna biokemijska s crvenim čepom - 10 mL za redovne analize u serumu. Ostatak seruma se alikvotira u 3 epruvete (0.5 ml po epruveti) i zamrzava na -80 °C (oznaka S za serum) 2. jedna K₃EDTA s ljubičastim čepom - 6 mL za redovne analize u plazmi. Ostatak plazme se alikvotira u 6 epruveta (0.2 ml po epruveti) i zamrzava na -80 °C (oznaka P za plazmu) 3. urin - za redovne analize, ostatak alikvotira u 3 epruvete (1 ml po epruveti) i zamrzava na -80°C (oznaka U za urin)				

Slika 11. Upitnik za pacijentice

UPITNIK ZA PACIJENTICE (ispunjava liječnik)

Datum: _____

Ime i prezime: _____

Godište : _____

Godine: _____

Adresa: _____

Telefon: _____

ANAMNEZA

VISINA, TEŽINA

Koliko ste visoki ? cm

Koliko ste teški?kg

Da ste dešnjak ili ljevak?

Gdje živite ? Grad Selo

Kojim se poslom bavite ?

Ako ste umirovljeni, kojim ste se poslom bavili ?

FIZIČKA AKTIVNOST

Navedite razinu svoje tjelesne aktivnosti na skali od vrlo niske do vrlo visoke. Skala ide 1 do 10. Na fizičku aktivnosti se misli rad u kući i van kuće , kao i neka vrsta dodatnog vježbanja (hodanje, trčanje, dr.).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

KOZMETIČKA SREDSTVA

Da li koristite kozmetička sredstva? Da / Ne

Ako Da koja?

KREME ZA LICE, koje

KREME ZA TIJELO, koje

Ako koristite kreme , sa koliko godina ste ih počeli koristiti ?

Da li koristite kreme za sunčanje ? Da / Ne

Koje ?

Koristite li

DEZODORANSE, koje

Dezodoranse (zaokruži) „roll-on“ ili u „stiku“

Ako koristite dezodoranse , sa koliko godina ste ih počeli koristiti ?

ANTIPERSPIRANTE, koje

Ako koristite antiperspirante , sa koliko godina ste ih počeli koristiti ?

Da li brižete pazušnu regiju ? Da / Ne

Ako DA, da li odmah nanosite dezodoranse ? Da / Ne

BOLESTI

Imate li ili ste imali bilo koju od sljedećih bolesti ? (odaberite jednu ili više polja)

Da / Ne . Ako DA, godine kada je prvi put otkrivena bolest.

- Rak
- Visoki krvni tlak
- Srčani udar
- Moždani udar
- dijabetes
- Depresija - liječena
- Bolest štitnjače
- Hodgkinov limfom

LIJEKOVI

Da li uzimate lijekove sada ? Da / Ne

Ako DA navedi koje :

PUŠENJE

Da li pušite ? Da / Ne

Koliko dugo ?

Koliko cigareta dnevno ?

PREHRANA

Da li ste vegetarijanac? Da / Ne

Da li pijete alkohol ? Da / Ne

Ako DA – prigodno / svakodnevno

Što jedete najviše

povrće voće meso paštu, kruh, slastice

SUPLEMENTI _____

RAK DOJKE U OBITELJI

Je li itko od vaših bliskih srodnika imao rak dojke:

Da Ne Ne znam Koliko je imala godina Umrlo (da/ne)

Kći

Majka

Sestra

Baka

Da li ste se testirali za tumor supresorske gene BRCA 1 i BRCA ? Da / Ne

Da li je još netko iz obitelji imao rak?

Koja vrsta raka?

MENOPAUAZA

SA KOLIKO GODINA STE DOBILI MENSTRUACIJU ?

Imate li još uvijek imate redovite menstruacije?

- Imam
- Imam neredovito
- Izostala je zbog bolesti
- Izostala je zbog upotrebe lijekova koji sadrže estrogene (kontraceptivi)
- Nemam

Ako imate, molim vas u kojoj ste danu menstrualnog ciklusa:

od 5. do 14. dana – prije menstruacije

od 14. do 20 dana – menstrualni ciklus

od 20. Dana – poslije menstruacije

Ako nemate:

- Jesu li menstruacija prestala sama ?
- Jesu Vam uklonjeni jajnici (adnektomija) ?
- Jeli Vaša maternica uklonjena (histerektomija)?
- Ostalo?
- Godine kada je prestala menstruacija ?

TRUDNOĆA, POROD, DOJENJE

Jeste li ikad bili trudni? Da / Ne

Ako DA, koliko djece ste rodili ?

Da li ste bili na umjetnoj oplodnji (IVF) ? Da / Ne

Da li ste dojili ? Da / Ne

Koliko dugo ste dojili ? mjeseci.....

Koliko godina ste imali kada ste prvi put rodili? godine

Korištenje kontracepcijske pilule - Jeste li ikada koristili pilulu ili minipilulu? Da / Ne

Ako DA, koliko godina je već uzimate? godine

Jeste li trenutno na pilulama? Da / Ne

Upotreba nadomjesnih hormona s estrogenima u menopauzi

Jeste li ikada koristili estrogene tablete ? Da / Ne

Ako DA, koliko dugo ste koristili estrogene tablete? godine

Koliko godina ste imali kada ste prvi put koristili estrogene tablete? godine

Da li li trenutno koristite pilule / flastere? Da / Ne

DOJKA

Da li ste do sada imali proliferativnu bolest dojke sa atipijom ? Da / Ne

Ako Da koju ?

Da li imate MFC (fibrocističnu mastopatiju dojke) ?

4.2.2 Patohistološka dijagnostika

U istraživanju su korišteni uzorci tkiva dobiveni tijekom operativnog zahvata. Uvidom u patohistološki nalaz utvrđena je veličina tumora, status aksilarnih limfnih čvorova, histološki gradus, LVI, status hormonskih receptora (ER i PR), ekspresija HER2 te proliferacijski indeks Ki-67. (72)

Uzorci dobiveni operativnim zahvatom obrađeni su prema standardnom protokolu: tkivo je fiksirano u 10 % puferiranom formalinu, uklopljeno u parafinske blokove koji su zatim rezani na debljinu do 5 µm, deparafinizirani i bojeni hemalaun-eozininom (H-E). Histološki tip tumora određen je prema histološkoj klasifikaciji tumora dojke Svjetske zdravstvene organizacije iz 2012. godine.

Prema veličini i statusu aksilarnih limfnih čvorova, tumori su podijeljeni u skupine temeljene na TNM klasifikaciji dojke.

Histološki je gradus određen na temelju modifikacije Scarff-Bloom-Richardson metode po Elstonu i Ellisu kojom se tri osobine tumora (formiranje tubula, jezgrin pleomorfizam i broj mitotičkih stanica) boduju s 1 do 3 boda. Na temelju ukupnog broja bodova određuje se histološki gradus pri čemu su tumori od 3 do 5 bodova svrstani u gradus 1, 6 - 7 bodova u gradus 2, a 8 - 9 bodova u gradus 3.

Imunohistokemijskim bojenjem pomoću komercijalno dostupnih protutijela određeni su ER, PR, HER2 i Ki-67 (svi Ventana, Tucson, AZ, USA). Granična vrijednost za pozitivnu ekspresiju ER i PR postavljena je na 1 %.

Pozitivna ekspresija HER2 određena je semikvantitativno prema intenzitetu bojenja i postotku obojenih tumorskih stanica na sljedeći način: 0 – nema membranskog bojenja, 1+ – slabo i djelomično membransko bojenje prisutno u > 10 % tumorskih stanica, 2+ – slabo do umjereno membransko bojenje u > 10 % tumorskih stanica, 3+ – jako bojenje cijele membrane koje se nalazi u > 10 % tumorskih stanica. Nalazi 0 i 1+ kategorizirani su kao negativni, nalaz 2+ kao dvosmislen, a samo nalaz 3+ kao pozitivan, odnosno kao prekomjerna ekspresija HER2 proteina. Kod uzoraka s dvosmislenim nalazom (2+) dodatno je primijenjena metoda *in situ* hibridizacije (u našoj ustanovi SISH, engl. *Silver In Situ Hybridisation*) kako bi se identificirali tumori koji pokazuju amplifikaciju gena HER2.

Također, sukladno preporukama St. Gallenske konferencije iz 2013. godine, na temelju receptorskog statusa, proliferacijskog indeksa Ki-67 i ekspresije HER2, tumori su kategorizirani u surogatne molekularne podtipove: Luminal A (ER+, PR+, HER2-, Ki67 < 20 %), Luminal B1 (ER+, HER2-, jedno od: PR < 20 %, Ki67 ≥ 20 %), Luminal B2 (ER+, HER2+), HER2 tip (HER2+, ER-, PR-) i „Basal-like“ trostruko negativan (ER-, PR-, HER2-). Iz navedenoga se može primijetiti da su kao vrijednost razgraničenja tumora unutar Luminalnog podtipa uzete vrijednosti Ki-67 i/ili status PR (sukladno St. Gallenskom konsenzusu iz 2013. godine granična vrijednost za Ki-67 iznosi 20 %).

4.2.3 Analiza koncentracije parabena iz humanih uzoraka urina, plazme i tkiva dojke

Zbog svojih kemijskih specifičnosti, određivanje parabena u humanim uzorcima zahtijeva primjenu visokospecifičnih metoda mjerenja. U postojećoj znanstvenoj literaturi opisano je samo nekoliko metoda. (120) Razlozi za nepostojanje jedinstvene metode mogu se naći u mukotrpnom i složenom analitičkom radu vezanom uz rukovanje i obradu uzoraka čvrstog tkiva u usporedbi s tekućim biološkim uzorcima kao i u poteškoćama s primjenom bioanalitičkih metoda validacije. Cilj analitičkog dijela doktorskog rada je primjena nove, ekološki prihvatljive i jednostavnije metode analize parabena iz humanih uzoraka urina, plazme i tkiva dojke. Rezultati istraživanja objavljeni su u tri znanstvene publikacije. Prva publikacija prikazuje ekstrakciju parabena iz uzoraka urina, druga iz tkiva dojke i treća iz plazme.

Istraživačka skupina prof. dr. Abuzara Kabira s Međunarodnog instituta za forenzička istraživanja Odjela za kemiju i biokemiju Međunarodnog sveučilišta Florida, razvila je 2014. godine ekstrakcijski sustav za pripremu uzoraka za analizu organskih analita u tragovima. Prije mjerenja koncentracije parabena, uzorci moraju biti pročišćeni kako bi se uklonile moguće interferencije koje otežavaju interpretaciju podataka. Koristi se sol-gel postupak za stvaranje hibridne organsko-anorganske polimerne mreže uz stabilno usidrenje na površini fleksibilnih supstratnih materijala. Membrane adsorpcijske tekstilne faze (FPSE, engl. *Fabric-Phase Sorptive Extraction*) obložene su sol-gelom te posjeduju visoku kemijsku i toplinsku stabilnost zbog jake kovalentne veze između supstrata tkanine i sol-gel-premaz. Nakon ekstrakcije na površini FPSE membrani koncentracija parabena je visoka te se može koristiti široki raspon organskih otapala u malom volumenu. U većini slučajeva nije potrebno isparavanje otapala i rekonstitucija uzorka. Priprema uzorka na FPSE membrani kompatibilna je za analizu s plinskom i tekućinskom kromatografijom, kapilarnom elektroforezom i drugim analitičkim instrumentima. U doktorskome radu, primjenom ove metode na bazi FPSE membrane, ekstrahirani su parabeni iz humanih uzoraka urina, plazme i tkiva dojke. Ispituje se koncentracija sedam tipova parabena poredanih po veličini alkilnog lanca (od manjega prema većem) - metilparaben (MPB), etilparaben (EPB), propilparaben (PPB), butilparaben (BPB), isopropilparaben (iPPB), isobutilparaben (iBPB) i benzilparaben (BzPB). Nakon ekstrakcije, koncentracija se parabena kvantificira primjenom tekućinske kromatografije visoke preciznosti (HPLC, engl. *High Precision Liquid Chromatography*). U prvom je analitičkom radu opisana primjena nove metode na bazi selektivne ekstrakcije parabena iz uzoraka urina primjenom adsorpcijske tekstilne faze (FPSE, engl. *Fabric-Phase Sorptive Extraction*). Naziv rada je „*An improved fabric-phase sorptive extraction protocol for the determination of seven parabens in human urine by HPLC–DAD*“, Biomedical Chromatography. 2020. (112) Ekstrakcija parabena iz urina primjenom FPSE sustava obloženih sol-gelom (tetrahidrofuran) membranom rezultiralo je optimalnom osjetljivošću. U usporedbi s dosadašnjim metodama analize dobio se poboljšani i brži postupak pripreme uzoraka.

U drugom je radu opisana primjena nove metode ekstrakcije parabena iz uzoraka tkiva dojke pomoću FPSE membrane. Naziv rada je „*Fabric phase sorptive extraction combined with high-performance-liquid chromatography-photodiode array analysis for the determination of seven parabens in human*

breast tissues: Application to cancerous and non-cancerous samples“, Journal of Chromatography A. 2020. (113) Optimizirani protokol FPSE ekstrakcije parabena iz tkiva dojke rezultirao je adekvatnom pripremom uzoraka za HPLC-PDA analitičku metodu mjerenja koncentracije.

U trećem je radu opisana primjena nove metode na bazi FPSE selektivne ekstrakcije parabena iz uzoraka krvi (plazme). Naziv rada je „*Determination of Intact Parabens in the Human Plasma of Cancer and Non-Cancer Patients Using a Validated Fabric Phase Sorptive Extraction Reversed-Phase Liquid Chromatography Method with UV Detection*“, Molecules 2021. (114) U ovoj je studiji opisana uporaba protokola za FPSE ekstrakciju parabena iz uzorka plazme i analiza uz pomoć FPSE-HPLC-UV. U uzorcima pacijenata detektirana je određena koncentracija svih sedam parabena i njihovog glavnog metabolita p-hidroksibenzojeve kiseline.

Svi su objavljeni radovi pokazali da je ekstrakcija parabena putem FPSE membrane prikladna i učinkovita za buduće epidemiološke i toksikološke studije.

4.2.4 Sinergistički učinak parabena i nanoplastike

U prvom objavljenom znanstvenom doktorskom radu na temu „*Synergistic effects of parabens and plastic nanoparticles on proliferation of human breast cancer cells*“, Arh Hig Rada Toksikol 2019;70:310-314, prikazani su rezultati istraživanja učinaka kemijskog koktela koji sadrži plastične nanočestice i parabene na vijabilnost i proliferaciju dviju različitih stanica adenokarcinoma dojke. [114] Navedeno je istraživanje provedeno u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Tretirane su vrlo agresivne i slabo diferencirane stanične linije: MDA-MB 231 kojoj nedostaju HER2, progesteronski i estrogenski receptori te MCF-7 stanična linija, karakterizirana bolje diferenciranim stanicama koje imaju progesteronski i estrogenski receptor alfa (ER α) te su morfološki slične žljezdanom epitelu. Za plastične nanočestice izabrane su nanočestice polistirena (PSNP) koje su miješane sa smjesom metil-, etil, propil- i butilparabena (PBmix). Stanice su bile tretirane pojedinačno s PSNP-om, sa smjesom PBmix te koktelom PSNP i PBmix.

4.3 Statistička analiza

Podaci će biti prikazani tablično i grafički. Napravit će se analiza normalnosti raspodjele podataka (Smirnov-Kolmogorovljev test) te će se shodno dobivenim rezultatima primijeniti odgovarajuće parametrijske i/ili neparametrijske statističke analize i načini prikaza podataka. Kvantitativni podaci će biti prikazani kroz raspone, aritmetičke sredine i standardne devijacije, odnosno medijane i interkvartilne raspone u slučajevima neparametrijske raspodjele. Kategorijski podaci će biti prikazani kroz apsolutne frekvencije i pripadajuće udjele. Razlike u kvantitativnim vrijednostima između pojedinih skupina će se procijeniti analizom varijance (ANOVA) odnosno Kruskal-Wallisovim testom u slučaju neparametrijske raspodjele, te će se pojedini međudodnosi dodatno analizirati odgovarajućim post-hoc metodama (npr. po Bonferroniju). Razlike u kategorijskim varijablama između ispitivanih skupina će se analizirati hi kvadrat testom. Izračunat će se odgovarajući koeficijenti korelacije (Pearsonovi ili Spearmanovi) između izmjerenih vrijednosti parabena u tkivu dojki i urinu. U analizi će se koristiti programska podrška STATISTICA verzija 12.0 (www.statsoft.com).

4.4 Etička načela

Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima, nakon odobrenja etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Dubrava i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

5 REZULTATI

5.1 Kirurško liječenje

Istraživana skupina sastojala se od 72 ispitanice koje su kirurški liječene na Klinici za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U skupinu BOLESNICA uključeno je 49 (68,1 %) pacijentica sa zloćudnim tumorom dojke. U skupinu ZDRAVIH uključene su 23 (31,9 %) pacijentice i to 13 pacijentica s dobroćudnim tumorima dojke koje su kirurški liječene metodom biopsije (18,1 %) i 10 pacijentica s dobroćudnom hipertrofijom žljezdanog tkiva koje su kirurški liječene metodom redukcije (13,9 %).

Kirurške metode liječenja zloćudnog tumora dojke uključivale su kvadrantektomiju i biopsiju sentinel limfnog čvora kod 23 pacijentice (46,9 %), jednostranu modificiranu radikalnu mastektomiju kod 13 pacijentica (26,5 %), obostranu modificiranu radikalnu mastektomiju kod jedne pacijentice (2,0 %), supkutanu mastektomiju s poštedom bradavice kod 5 (10,2 %) i supkutanu mastektomiju bez poštede kod 7 pacijentica (14,3%) (Tablica 6.).

Tablica 6. Opis ispitivane grupe prema kirurškim metodama liječenja

		N	%
Istraživana skupina	BOLESNE	49	68,1%
	ZDRAVE	23	31,9%
	Ukupno	72	100,0%
Kirurško liječenje ZDRAVIH	Biopsija	13	18,1%
	Redukcija	10	13,9%
Kirurško liječenje BOLESNIH	Kvadrantektomija i biopsija sentinel limfnog čvora	23	31,9%
	Modificirana radikalna mastektomija	13	18,1%
	Supkutana mastektomija bez poštede bradavice	7	9,7%
	Obostrana modificirana radikalna mastektomija	1	1,4%
	Supkutana mastektomija sa poštedom bradavice	5	6,9%
	Ukupno	72	100,0%

U odnosu na Sustav klasifikacije rizičnih bolesnika pred anesteziju (ASA) većina ispitanica su zdravi kandidati s vrlo malim rizikom. Od ukupnog broja ispitanica njih 25,0 % uzima terapiju za povišeni tlak i tek 4,2 % koristi terapiju za dijabetes tip 1. Najčešće kategorije su ASA kategorija 2 (52,8 %) ili ASA kategorija 1 (38,9 %). To znači da ispitanice nisu anamnestički opterećene drugim težim oboljenjima. Nije uočena statistički značajna razlika između ASA kategorija bolesnih i zdravih ispitanica (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,117 ($p > 0,05$)).

U Tablici 7. navedena je prosječna dob bolesnica u trenutku operacije 58,69 godina (u rasponu od 35 do 84 godine) s prosječnom godinom rođenja 1960. Prosječna dob zdravih je 41,04 godina (u rasponu od 20 do 64 godine) s prosječnom godinom rođenja 1977. Ispitanice iz skupine bolesnih značajno su starije jer vrijednost signifikantnosti za godinu rođenja i dob ispitanice je manje od 5 % ($p < 0,05$). Prosječni je indeks tjelesne mase (BMI) 26,42 kod bolesnica što odgovara kategorizaciji prekomjerne tjelesne mase s prosječnom visinom od 164,61 cm i težinom od 71,59 kg. Kod zdravih je žena BMI 24,97 i odgovara idealnoj težini s visinom od 167,39 cm i težinom od 69,74 kg. Iako je razina signifikantnosti Fisherovog egzaktnog testa od 0,075 ($p > 0,05$), postoji tendencija veće tjelesne težine kod bolesnih žena.

Tablica 7. Dob i indeks tjelesne mase (BMI)

	BOLESNE			ZDRAVE			p*
	Percentile 25	Median	Percentile 75	Percentile 25	Median	Percentile 75	
Godina rođenja	1954,00	1960,00	1967,00	1970,00	1978,00	1988,00	0,001
Dob (2019-X)	52,00	59,00	65,00	31,00	41,00	49,00	0,001
Visina	162,00	165,00	168,00	164,00	168,00	170,00	0,090
Težina	65,00	71,00	78,00	63,00	69,00	78,00	0,531
BMI	23,80	26,70	28,80	22,60	24,30	27,60	0,186

*t-test

5.2 Životni stil

5.2.1 Mjesto stalnog boravka i fizička aktivnost

Većina ispitanica (75 %) živi u gradu. Razlog je tome činjenica da pacijentice operirane na Klinici za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju većinom dolaze iz Zagreba i Zagrebačke županije. Nije uočena statistički značajna razlika između života u gradu i na selu kod bolesnih i zdravih ispitanica (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,075 ($p > 0,05$)).

Ispitanice su određivale razinu svoje svakodnevne fizičke aktivnosti prema skali od 1 do 10 gdje je rezultat 1 vrlo niska, 3 razina svakodnevnih kućanskih poslova a 10 visoka fizička aktivnost (profesionalni sport). Nije uočena statistički značajna razlika između fizičke aktivnosti kod bolesnih i zdravih ispitanica (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,150 ($p > 0,05$)). No, postoji tendencija da zdrave žene imaju višu fizičku aktivnost, dok više od četvrtine bolesnih (28,6 %) ima nisku fizičku aktivnost ranga 3/10 (Tablica 8.).

Tablica 8. Fizička aktivnost

			BOLESNE	ZDRAVE	Ukupno	p*
Fizička aktivnost	2	N	7	1	8	0,150
		%	14,3%	4,3%	11,1%	
	3	N	14	2	16	
		%	28,6%	8,7%	22,2%	
	4	N	5	3	8	
		%	10,2%	13,0%	11,1%	
	5	N	5	4	9	
		%	10,2%	17,4%	12,5%	
	6	N	9	4	13	
		%	18,4%	17,4%	18,1%	
	7	N	5	3	8	
		%	10,2%	13,0%	11,1%	
	8	N	3	4	7	
		%	6,1%	17,4%	9,7%	
	9	N	0	2	2	
		%	0,0%	8,7%	2,8%	
	10	N	1	0	1	
		%	2,0%	0,0%	1,4%	
Ukupno		N	49	23	72	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Fisherov egzaktni test

5.2.2 Konzumacija alkohola, pušenje cigareta i prehrana

Većina je pacijentica izjavila da povremeno konzumira alkohol (59,7 %). Nije uočena statistički značajna razlika između konzumiranja alkohola kod bolesnih i zdravih ispitanica (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 1,000 ($p > 0,05$)). U odnosu na pušenje cigareta većina ispitanica ne puši (70,8 %). Kod pušača (29,2 %) nije uočena statistički značajna razlika između bolesnih i zdravih (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 1,000 ($p > 0,05$)).

U Tablici 9. prikazane su prehrambene navike ispitanica. Kod prehrane povrćem vrijednost Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,001 ($p < 0,05$) što znači da je uočena statistički značajna razlika između bolesnih i zdravih gdje većina bolesnih češće jede povrće. Pri tome se može uočiti kako 57,1 % bolesnih odabire varijable oznake učestalosti 1 u odnosu na 30,4 % zdravih (oznaka varijable učestalosti 2).

Kod prehrane voćem vrijednost Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,004 ($p < 0,05$) te predstavlja statistički značajnu razliku između bolesnih i zdravih gdje većina zdravih češće jede voće. Postotak od 44,9 % bolesnih stavlja oznaku varijable učestalosti 4 u odnosu na zdrave kojima je najčešća oznaka varijable učestalosti 3 (69,6 %).

Kod prehrane mesom vrijednost Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,036 ($p < 0,05$) i čini statistički značajnu razliku bolesnih i zdravih gdje većina zdravih češće jede meso. Pri tome 43,5 % zdravih navodi varijablu učestalosti 1 u odnosu na 22,4 % bolesnih.

Kod prehrane ugljikohidratima vrijednost Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,066 ($p > 0,05$), dakle nije uočena statistički značajna razlika učestalosti između bolesnih i zdravih.

Vitamine i suplemente kao dodatke prehrani većina ispitanica (76,4 %) ne uzima.

Tablica 9. Prehrambene navike

		CA,B,R						p*
		Bolesne		Zdrave		Ukupno		
		N	%	N	%	N	%	
Povrće	1	28	57,1%	7	30,4%	35	48,6%	0,001
	2	16	32,7%	9	39,1%	25	34,7%	
	3	5	10,2%	1	4,3%	6	8,3%	
	4	0	0,0%	6	26,1%	6	8,3%	
	Ukupno	49	100,0%	23	100,0%	72	100,0%	
Voće	1	3	6,1%	0	0,0%	3	4,2%	0,004
	2	11	22,4%	1	4,3%	12	16,7%	
	3	13	26,5%	16	69,6%	29	40,3%	
	4	22	44,9%	6	26,1%	28	38,9%	
	Ukupno	49	100,0%	23	100,0%	72	100,0%	
Meso	1	11	22,4%	10	43,5%	21	29,2%	0,036
	2	15	30,6%	5	21,7%	20	27,8%	
	3	10	20,4%	0	0,0%	10	13,9%	
	4	13	26,5%	8	34,8%	21	29,2%	
	Ukupno	49	100,0%	23	100,0%	72	100,0%	
Ugljikohidrati	1	7	14,3%	6	26,1%	13	18,1%	0,066
	2	7	14,3%	8	34,8%	15	20,8%	
	3	20	40,8%	6	26,1%	26	36,1%	
	4	15	30,6%	3	13,0%	18	25,0%	
	Ukupno	49	100,0%	23	100,0%	72	100,0%	

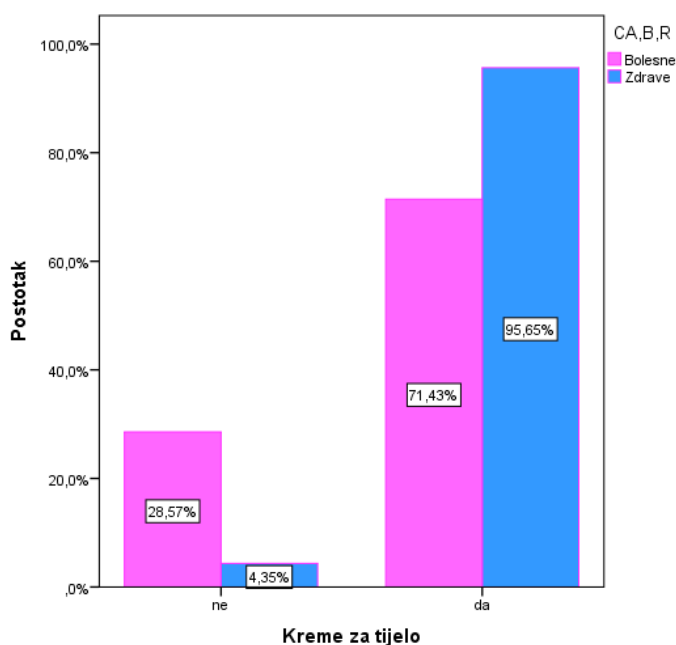
*Fisherov egzaktni test

5.3 Uporaba kozmetičkih proizvoda

5.3.1 Kreme za tijelo

Od ukupnog broja ispitanica 79,2 % koristi kreme za tijelo. Postoji statistički značajna razlika između bolesnih i zdravih (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,027 ($< 0,05$)), gdje je veća učestalost uporabe krema kod zdravih (95,7 %) za razliku od bolesnih žena (71,4 %). Također, među ispitanicama koje ne koriste kreme za tijelo više je bolesnih (28,6 %) te samo jedna zdrava (4,3%). (Slika 12.). Najčešće korišten kozmetički brend je Nivea (36,1%).

Slika 12. Upotreba krema za tijelo kod bolesnih i zdravih ispitanica



Analizira li se vrijednost signifikantnosti od p koji iznosi manje od 5 % ($p < 0,05$), može se reći s razinom pouzdanosti od 95 % da je prosječna dob početka korištenja krema za tijelo značajno starija za bolesne (24,29 godina) nego za zdrave žene (17,86 godina). Zdrave žene ranije počinju koristiti kreme za tijelo (Tablica 10.).

Tablica 10. Prosječna dob početka korištenja krema za tijelo

		N	$\bar{x}$	Sd	p^*
Dob početka korištenja krema za tijelo	BOLESNE	35	24,29	8,847	0,005
	ZDRAVE	22	17,86	6,728	

* t-test

5.3.2 Dezodoransi i antiperspiranti

Dezodoranse i antiperspirante koristi 66,7 %. Učestalost uporabe približno je jednaka za obje ispitivane skupine (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,027 ($p < 0,05$)). Najčešće korišteni kozmetički brend je Nivea (26,4 %).

Analizira li se vrijednost signifikantnosti od p koji iznosi manje od 5 % ($p < 0,05$), može se reći s razinom pouzdanosti od 95 % da je prosječna dob početka korištenja dezodoransa i antiperspiranta značajno starija kod bolesnih (19,98 godina) za razliku od zdravih žena (16,83 godine). Zdrave žene ranije počinju koristiti dezodoranse i antiperspirante (Tablica 11.).

Tablica 11. Prosječna dob početka korištenja dezodoransa i antiperspiranata

		N	$\bar{x}$	Sd	p^*
Dob početka korištenja dezodoransa i antiperspiranta	BOLESNE	42	19,98	4,635	0,020
	ZDRAVE	23	16,83	5,828	

*Fisherov egzaktni test

Značajni postotak žena, čak 80,6 %, netom nakon brijanja pazuha stavlja dezodoranse i antiperspirante na kožu pazušne regije. Učestalost brijanja kod zdravih (95,7 %) češća je nego kod bolesnih žena (73,5 %), (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,029 ($p < 0,05$)) (Tablica 12.).

Tablica 12. Brijanje pazušne regije

			BOLESNE	ZDRAVE	Ukupno	p*
Brijanje pazušne regije	NE	N	13	1	14	0,029
		%	26,5%	4,3%	19,4%	
	DA	N	36	22	58	
		%	73,5%	95,7%	80,6%	
Ukupno		N	49	23	72	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Fisherov egzaktni test

5.4 Rizični čimbenici za razvoj raka dojke

5.4.1 Menarha i menopauza

Prosječna dob za menarhu od 13 godina jednaka je za bolesne i zdrave ispitanice, dok je prosječna dob za menopauzu 50 godina. Većina ispitanica (82,9 %) ima prirodni tijek ulaska u menopauzu, dok je 7 ispitanica (17,1 %) bilo podvrgnuto histerektomiji. No, uzrok tome nisu bile zloćudne promjene jajnika ili maternice.

5.4.2 Trudnoća

Većina zdravih ispitanica nije bila trudna (43,5 %) iako je njihova prosječna dob 41,04 godina. Prosječni broj djece svih ispitanica je dvoje (41,7 %). Razina signifikantnosti Fisherovog egzaktnog testa od 0,072 ($p > 0,05$) u broju rođene djece između bolesnih i zdravih nije statistički značajna. Prosječna dob prvorotkinja ispitivane skupine je 24 godine za bolesne i 28 godina za zdrave žene (Tablica 13.). Pet je ispitanica (6,9 %) bilo podvrgnuto umjetnoj oplodnji.

5.4.3 Dojenje

Ukupno 51 ispitanica je dojila (70,8 %) od toga prosječno vrijeme dojenja kod bolesnih je 6 mjeseci, a kod zdravih 3 mjeseca (Tablica 13.). Bolesne žene su češće (79,6 %) dojile u odnosu na zdrave (52,2 %) (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,026 ($p < 0,05$)).

Tablica 13. Dob prvog poroda i prosječno vrijeme dojenja

	BOLESNE			ZDRAVE			p*
	Percentile 25	Median	Percentile 75	Percentile 25	Median	Percentile 75	
Vrijeme dojenja u mjesecima	1,00	6,00	12,00	,00	3,00	12,00	0,345
Godina prvog poroda	21,00	24,00	28,00	24,00	28,00	30,00	0,196

*Mann-Whitney U test

5.4.4 Uporaba kontracepcijskih pilula i hormonski nadomjesne terapije

U odnosu na uporabu kontracepcijskih pilula, zdrave i mlađe ispitanice (30,4 %) češće su koristile pilule nego bolesne (12,2 %).

U odnosu na hormonsku nadomjesnu terapiju, zdrave žene su mlađe dobi (41,04 godina) te ih većina nije ušla u menopauzu (77,6 %). Od 36 bolesnih žena koje su ušle u menopauzu samo je njih šest koristilo hormonsku nadomjesnu terapiju (16,7 %).

5.4.5 Rak u obitelji

Od ukupnog broja ispitanica 59,7 % ima povijest pojavljivanja određene vrste raka u obitelji. Najčešća je vrsta rak dojke (32 %), od ostalih se po učestalosti pojavljuju rak pluća i grla, rak prostate, kolona, maternice i rak štitnjače (Tablica 14.).

Zabrinjavajući podatak je da 11 (22,4 %) od ukupno 49 bolesnih žena ima pozitivnu obiteljsku anamnezu za rak dojke u prvom koljenu (majka i/ili sestra), dok većina od 26,1 % zdravih žena ima pozitivnu obiteljsku anamnezu za rak dojke u drugom koljenu (baka i/ili teta).

Tablica 14. Vrste raka u obitelji

		BOLESNE		ZDRAVE		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Rak u obitelji	Bez raka	17	34,7%	10	43,5%	27	37,5%
	Rak dojke - prvo koljeno (majka, sestra)	11	22,4%	2	8,7%	13	18,1%
	Rak dojke - drugo koljeno (baka, teta)	4	8,2%	6	26,1%	10	13,9%
	Rak pluća i grla	6	12,2%	1	4,3%	7	9,7%
	Kolon	3	6,1%	0	0,0%	3	4,2%
	Jetra, gušterača	2	4,1%	0	0,0%	2	2,8%
	Maternica	2	4,1%	1	4,3%	3	4,2%
	Leukemija	2	4,1%	0	0,0%	2	2,8%
	Štitnjača	1	2,0%	0	0,0%	1	1,4%
	Prostata	1	2,0%	1	4,3%	2	2,8%
	Bubreg	0	0,0%	1	4,3%	1	1,4%
	Nadbubrežna žljezda	0	0,0%	1	4,3%	1	1,4%
	Ukupno	49	100,0%	23	100,0%	72	100,0%

Nije uočena statistički značajna razlika (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,789 ($p < 0,05$) između povijesti pojavljivanja raka dojke u obitelji između bolesnih i zdravih (Tablica 15.). Razlog sličnoj pojavnosti raka dojke među zdravima (34,8 %) i bolesnima (30,6 %) može se objasniti činjenicom da se zdrave žene s pozitivnom obiteljskom anamnezom češće kontroliraju i češće podvrgavaju kirurškim zahvatima biopsije dobroćudnih tumora dojke.

Tablica 15. Rak dojke u obitelji

			BOLESNE	ZDRAVE	Ukupno	p*
Rak dojke u obitelji	NE	N	34	15	49	0,789
		%	69,4%	65,2%	68,1%	
	DA	N	15	8	23	
		%	30,6%	34,8%	31,9%	
Ukupno		N	49	23	72	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Fisherov egzaktni test

5.4.6 Operirana strana dojke

Od ukupnog broja ispitanica 97,2 % su dešnjakinje, dok su samo dvije žene ljevakinja. U odnosu na dojk u koja je operirana, 44,4 % ispitanica imalo je tumor na desnoj dojci i to 28 bolesnih (57,1 %) i četiri zdrave biopsije. Prema literaturi, češće se operira lijeva dojka. No, i lijeva dojka je zastupljena kod 40 bolesnih (40,8 %) i devet zdravih biopsija (39,1 %). Postoji tendencija o većoj zastupljenosti lijeve dojke, no s obzirom na manji uzorak zdravih žena hipotezu ne možemo statistički dokazati. Sve su ispitanice s hipertrofijom žljezdanog tkiva dojke operirane metodom bilateralne redukcije (obje dojke). Jedna je pacijentica imala obostrani rak dojke (Tablica 16.).

Tablica 16. Operirana strana dojke

			BOLESNE	ZDRAVE	Ukupno	p*
Operirana strana dojke	Obostrano	N	1	10	11	p<0,001
		%	2,0%	43,5%	15,3%	
	Desna	N	28	4	32	
		%	57,1%	17,4%	44,4%	
	Lijeva	N	20	9	29	
		%	40,8%	39,1%	40,3%	
Ukupno		N	49	23	72	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Fisherov egzaktni test

5.4.7 Smještaj tumora prema kvadrantima dojke

Najčešće sjelo zloćudnog tumora u čak 61,3 % ispitanica je u gornjem lateralnom kvadrantu (GLK) dojke. Također, većina zdravih biopsija ima dobroćudne tumore dojke (fibroadenom) u GLK-u (84,6 %) (Tablica 17.). Ispitanice iz skupine redukcija nisu bile uključene u izračun smještaja tumora jer one nemaju tumore već hipertrofiju cjelokupnog žljezdanog tkiva.

Od ostalih kvadranta drugi po zastupljenosti je gornji medijalni kvadrant (GMK) (22,6 %). Postoji statistički značajna razlika između zastupljenosti tumora u GMK-u kod bolesnih i zdravih žena (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,001 ($p < 0,05$)). Promjene u GMK-u ima 26,5 % bolesnih i samo 4,3 % zdravih.

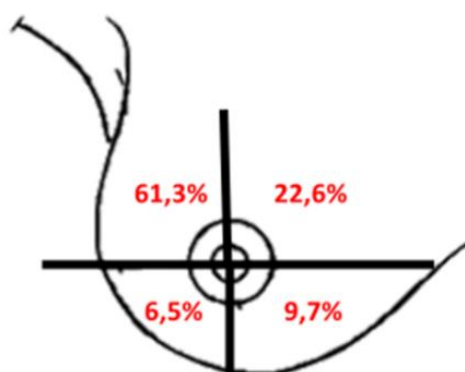
Tablica 17. Smještaj tumora prema kvadrantima dojke

			BOLESNE	ZDRAVE	Ukupno	p*
Kvadrant dojke	GLK	N	27	11	38	0,001
		%	55,1%	84,6%	61,3%	
	GMK	N	13	1	14	
		%	26,5%	7,7%	22,6%	
	DLK	N	5	1	6	
		%	10,2%	7,7%	9,7%	
	DMK	N	4	0	4	
		%	8,2%	0,0%	6,5%	
Ukupno		N	49	13	62	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Fisherov egzaktni test

Smjer nanošenja dezodoransa od pazuha prema medijalno moglo bi pružiti objašnjenje zašto je većina zloćudnih i dobroćudnih tumora smješteno u gornjem medijalnom i gornjem lateralnom kvadrantu (Slika 16.).

Slika 13. Prikaz zastupljenosti tumora prema kvadrantima dojke



5.5 Patohistološka analiza tkiva dojke

Konačni patohistološki nalaz tkiva zdravih ispitanica dobivenog operativnim zahvatom redukcije odgovara dobroćudnoj fibrocističnoj mastopatiji (FCM) te nalaz biopsije odgovara fibroadenom (FA).

U skupini bolesnih kod 43 ispitanice (85,7 %) utvrđeno je da su tumori bili duktalni invazivni karcinom bez karakteristika određenog tipa (IDC NOS), kod četiri ispitanice (8,2 %) utvrđen je lobularni invazivni karcinom (ILC), kod dvije (4,1 %) duktalni karcinom in situ (DCIS) te kod jedne (2,0 %) maligni filodes tumor dojke (*phylloides mammae*). Kod sedam (14,3 %) ispitanica nađena je multicentrična smještenost tumora (Tablica 18.). U skupini bolesnih većina žena (73,5 %) ima BIRADS kategoriju 5.

Tablica 18. Patohistološka analiza tkiva dojke

			BOLESNE	ZDRAVE	Ukupno	p*
Patohistološka dijagnostika	FA	N	0	13	13	p<0,001
		%	0,0%	56,5%	18,1%	
	FCM	N	0	10	10	
		%	0,0%	43,5%	13,9%	
	CDI	N	42	0	42	
		%	85,7%	0,0%	58,3%	
	DCIS	N	2	0	2	
		%	4,1%	0,0%	2,8%	
	CLI	N	4	0	4	
		%	8,2%	0,0%	5,6%	
Tm phyllodes	N	1	0	1		
	%	2,0%	0,0%	1,4%		
Ukupno		N	49	23	72	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Fisherov egzaktni test

Srednja vrijednost veličine tumora na patohistološkoj analizi kod zdravih biopsija je 22,23 cm (raspon veličine 0,3 – 5,0 cm) te kod bolesnih 17,86 cm (raspon veličine 1,2 – 3,8 cm). Signifikantnost Mann-Whitneyjevog testa je veća od 0,05 što znači da razlika između zdravih i bolesnih što se tiče veličine tumora nije uočena (Tablica 19.).

Tablica 19. Veličina tumora dojke

		N	$\bar{x}$	Sd	p*
Veličina tumora u centimetrima	BOLESNE	49	17,86	9,927	0,089
	ZDRAVE	13	22,23	8,710	

*Mann-Whitney U test

Kod zdravih ispitanica s dobroćudnom fibrocističnom mastopatijom cjelokupnog tkiva dojke, operiranih metodom redukcije, nema podataka o veličini tumora. Kod zdravih ispitanica s fibroadenomom operiranih metodom biopsije postoji samo dodatni patohistološki podatak o veličini tumora. Ostali se patohistološki podaci odnose na analizu kod bolesnih ispitanica. Patohistološki su nalazi za skupinu od 49 bolesnih ispitanica prikazani u Tablici 20.

Tablica 20. Patohistološki nalaz zloćudnog tkiva dojke

TNM STADIJ	0	3 (6,1)
	1	27 (55,1)
	2	13 (26,5)
	3	5 (10,2)
	4	1 (2,0)
GRADUS	<i>Phyllodes</i>	1 (2,0)
	1	11 (22,4)
	2	30 (61,2)
	3	7 (14,3)
ER		90,61 (25,117)
PgR		68,65 (38,761)
Ki67	<10	5 (10,2)
	10-14	1 (2,0)
	15-19	13 (26,5)
	20-24	6 (12,2)
	≥25	24 (49,0)
Mol.tip	A	12 (26,7)
	B	32 (71,1)
	trostruko negativan	1 (2,2)

Srednja vrijednost veličine tumora na patohistološkoj analizi kod bolesnih je 17,86 cm (raspon 0,3-5,0 cm). Kod 27 ispitanica (55,1 %) tumori su TNM stadij 1, 13 ispitanica (26,5 %) je TNM 2a, 5 ispitanica (10,2 %) TNM 2b te jedna (2,0 %) TNM 3a.

Zabilježeno je 11 (22,4 %) dobro diferenciranih tumora (niski gradus 1 - G1), 30 (61,2 %) umjereno diferenciranih tumora (intermedijalni gradus 2 - G2) te 7 (14,3 %) slabo diferenciranih tumora (visoki gradus 3 - G3).

Negativni pazušni limfni čvorovi zabilježeni su u 40 (81,6 %), a pozitivni u 9 (18,4 %) bolesnica. Od broja pozitivnih limfnih čvorova 8 ispitanica (16,4 %) je bilo u N1 skupini i jedna (2,0 %) u N2 skupini. Prosječna vrijednost ER receptora je 90,61, dok je prosječna vrijednost PgR receptora 68,65.

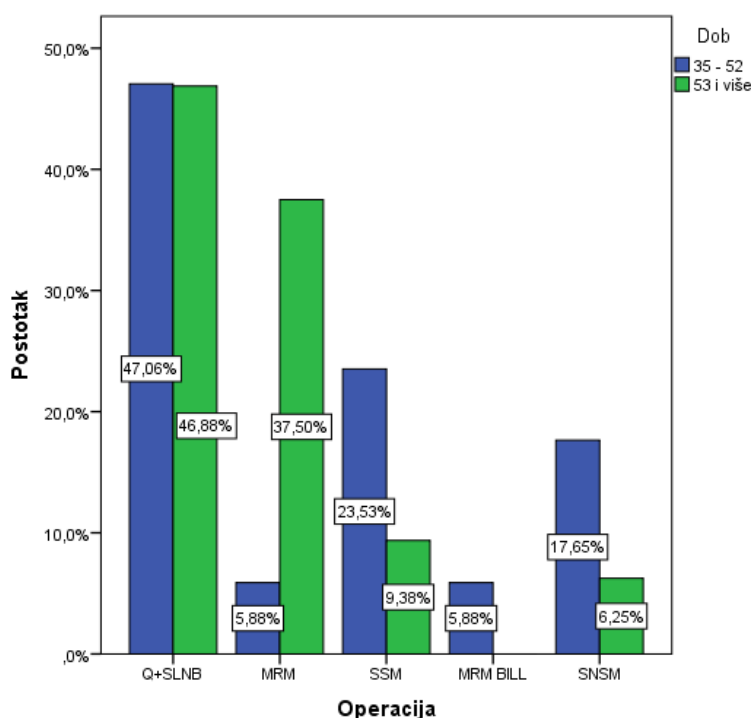
Negativna ekspresija HER2 0 i 1+ je zabilježena kod 41 (83,7 %) bolesnice, umjerena HER2 2+ kod šest (12,2 %), te prekomjerna HER2 3+ kod dvije (4,1 %) bolesnice.

Nadalje, kad je u pitanju proliferacijski indeks Ki-67, može se uočiti kako je niski Ki67 < 10 bio kod pet (10,2 %), Ki-67 od 10 do 14 kod jedne (2,0 %) te Ki-67 od 15 do 19 kod 13 (26,5 %) bolesnica. Visoki Ki-67 od 20 do 24 ima šest (12,2 %) te Ki-67 ≥ 25% ima 25 (49,0 %) bolesnica.

Prema molekularnoj klasifikaciji raka najveći broj tumora je kod 12 bolesnica je svrstano u Luminal B (65,3%), dok u Luminal A podtip spada 31 bolesnice (24,5%). Jedna bolesnica je imala basal-like trostruko negativan tumor.

Bolesne ispitanice, njih 49, podijelilo se obzirom na dob ulaska u menopauzu. Mlađe bolesne ispitanice su u rasponu 35 – 52 godine, a starije u rasponu od 53 na više godina. Navedena se podjela napravila da bi se moglo usporediti kirurško liječenje, rizični čimbenici i patohistološki nalaz među bolesnih ispitanicama. Jedina statistički značajna razlika navedena jen kod odabira vrste operacije. Jednak broj mlađih i starijih ispitanica podvrgnut je kvadrantekomiji i biopsiji sentinel limfnog čvora. No, signifikantnost Fisherovog egzaktnog testa od 0,033 ($p < 0,05$) znači da je uočena statistički značajna razlika prema kojoj mlađe ispitanice (41,1 %) odabiru češće supkutanu mastektomiju s rekonstrukcijom izgleda dojki (Slika 14.).

Slika 14. Usporedba kirurškog liječenja ispitanica



Nije uočena statistički značajna razlika između mlađih i starijih bolesnica kod operirane strane dojke (vrijednost značajnosti Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,582 ($p > 0,05$)), operiranog kvadranta dojke (0,584 ($p > 0,05$)), patohistološkog nalaza (0,275 ($p > 0,05$)), multicentričnog smještaja tumora (1,000 ($p > 0,05$)), TNM stadija (0,159 ($p > 0,05$)), gradusa tumora (0,621 ($p > 0,05$)), veličine tumora (više od 5 % ($p > 0,05$)), ER i PgR receptora (više od 5 % ($p > 0,05$)), Ki67 indeksa (0,594 ($p > 0,05$)), HER2 ekspresije (0,691 ($p > 0,05$)) te molekularnog tipa tumora (0,892 ($p > 0,05$)).

5.6 Usporedba uporabe kozmetičkih proizvoda između zdravih i bolesnih žena

Uporaba kozmetičkih proizvoda podijeljena je u dvije skupine: skupina dezodoransi i kreme kao glavni izvor parabena i skupina koja upotrebljava antiperspirante. Od ukupnog broja ispitanica (njih 72), 63 ispitanice (87,5 %) upotrebljavaju dezodoranse i kreme, a 25 ispitanica upotrebljava samo antiperspirante (34,7 %). Sve zdrave žene upotrebljavaju dezodoranse dok 9 bolesnih žena (18,4 %) uopće ne upotrebljava dezodoranse. Kod upotrebe antiperspiranta većina ispitanica ih ne upotrebljava (65,3%). Nije uočena statistički značajna razlika kod upotrebe kozmetičkih proizvoda između zdravih i bolesnih.

Godine izloženosti uporabi kozmetičkih proizvoda izračunale su se kao formula dobi ispitanice minus dob početka korištenja proizvoda. Izloženost se također podijelila u dvije skupine: skupina dezodoransi i kreme kao glavni izvor parabena i skupina koja upotrebljava antiperspirante.

Analizira li se vrijednost signifikantnosti za godine izloženosti uporabi dezodoransa i krema, može se uočiti kako p iznosi manje od 5 % ($p < 0,05$), dakle, može se reći, s razinom pouzdanosti od 95 %, kako postoji statistički značajna razlika kod bolesnih i zdravih. Bolesne ispitanice duže koriste dezodoranse i kreme. Razlog tome je da su bolesnice starije životne dobi i duže razdoblje života bile izložene kozmetičkim proizvodima pa tako i parabenima (Tablica 21.).

Tablica 21. Godine izloženosti uporabi kozmetičkih proizvoda

	BOLESNE			ZDRAVE			p*
	Percentile 25	Median	Percentile 75	Percentile 25	Median	Percentile 75	
DOB – DOB KORIŠTENJA (kreme)	26,00	32,00	41,00	15,00	22,00	29,00	p<0,001
DOB – DOB KORIŠTENJA (dezodoranse)	31,00	37,00	43,00	17,00	24,00	31,00	p<0,001

*t-test

Prosječna godina izloženosti kremama kod bolesnih je 32,97, a za dezodoranse je 36,88 godina. Kod zdravih prosječna godina izloženosti kremama je 22,14, a za dezodoranse je 24,22 godine (Tablica 22.).

Tablica 22. Prosječna godina izloženosti kozmetičkim proizvodima

		N	$\bar{x}$	Sd
DOB – DOB KORIŠTENJA (kreme)	BOLESNE	35	32,97	11,094
	ZDRAVE	22	22,14	9,677
DOB – DOB KORIŠTENJA (dezodoranse)	BOLESNE	42	36,88	9,554
	ZDRAVE	23	24,22	9,798

5.7 Parabeni u plazmi i urinu

U Tablici 23. prikazane su izmjerene koncentracije sedam tipova parabena u urinu, poredanih po veličini alkinog lanca (od manjeg prema većem) - metilparaben (MPB), etilparaben (EPB), propilparaben (PPB), butilparaben (BPB), isopropilparaben (iPPB), isobutilparaben (iBPB) i benzilparaben (BzPB). Može se uočiti kako za skupinu bolesnih prosječna vrijednost parabena iznosi 245,5 ng/mL dok za skupinu zdravih žena prosječna vrijednost parabena iznosi 298,9 ng/mL. Najveći doprinos ukupnoj sumi parabena daje metilparaben i propilparaben.

Tablica 23. Parabeni u urinu

CA_B_R	MPB	PPB	EPB	iPPB	iBPB	BPB	BzPB	Suma	$\bar{x}$
CA	80	LOD	LOD	LOD	10	LOD	10	100	245,5 ng/mL
CA	230	.	.	.	160	.	.	390	
CA	190	.	10	.	40	.	LOD	240	
CA	120	90	LOD	.	.	.	.	210	
CA	230	80	.	.	.	.	.	310	
CA	110	120	.	.	.	.	.	230	
CA	190	30	10	70	10	20	80	410	
CA	110	.	.	.	.	.	.	110	
CA	80	.	60	.	.	.	.	140	
CA	200	110	.	.	.	.	.	330	
CA	.	170	LOD	.	20	LOD	40	230	
R	220	10	.	LOD	.	LOD	50	280	298,9 ng/mL
R	180	210	.	160	100	110	90	850	
R	.	110	.	.	.	.	.	110	
B	140	.	.	.	.	.	.	140	
R	.	60	LOD	.	LOD	.	80	140	
R	90	LOD	LOD	.	.	.	.	90	
B	210	150	.	.	.	.	.	360	
B	180	360	.	.	.	.	.	540	
B	170	.	LOD	.	.	.	10	180	

*Oznaka CA (karcinom) za zloćudni tumor dojke, B za zdrave biopsije i R za redukcije. LOD (engl. Limit of detection) je granica dokazivanja tj. najniža koncentracija parabena u uzorku koja se može dokazati pri zadanim uvjetima, ali ne i odrediti.

U Tablici 24. prikazane su izmjerene koncentracije sedam tipova parabena u plazmi, poredanih po veličini alkilnog lanca. Može se uočiti kako za skupinu bolesnih prosječna vrijednost parabena iznosi 190,1 ng/mL, dok za skupinu zdravih žena prosječna vrijednost izmjerenih parabena iznosi 85,56 ng/mL. Najveći doprinos ukupnoj sumi parabena u plazmi čine metilparaben i etilparaben.

Tablica 24. Parabeni u plazmi

CA_B_R	MPB	EPB	iPPB	PPB	iBPB	BPB	BzPB	Suma	$\bar{x}$
CA	140	30	30		LOD		LOD	200	190,1 ng/mL
CA	80	LOD	70		-	-	50	150	
CA	20	-	40	-	50	-	LOD	110	
CA	150	-	LOD	-	80	-	70	300	
CA	60	-	50	-	LOD	-	-	110	
CA	150	-	20	-	LOD	-	-	170	
CA	60	-	20	LOD	LOD	-	-	80,1	
CA	30	40	-	20	90	-	-	180,5	
CA	100	-	-	20	320	-	150	590	
CA	60	-	-	30	40	-	-	130	
CA	70	LOD	-	LOD	LOD	-	-	70	
R	LOD	30	-	-	-	-	-	30	85,56 ng/mL
R	20	70	-	40	-	-	-	130	
R	20	30	-	-	-	-	-	50	
B	-	80	-	-	-	-	-	80	
R	30	LOD	-	LOD	-	-	-	30	
R	60	40	-	-	-	-	-	100	
B	150	80	30		50			260	
B	LOD	30	-	LOD	-	-	-	30	
B	LOD	60	-	-	-	-	-	60	

*Oznaka CA (karcinom) za zloćudni tumor dojke, B za zdrave biopsije i R za redukcije. LOD (engl. Limit of detection) je granica dokazivanja tj. najniža koncentracija parabena u uzorku koja se može dokazati pri zadanim uvjetima, ali ne i odrediti.

U Tablicama 25. i 26. napravljena je statistička usporedba izmjerene koncentracije parabena u urinu i plazmi između zdravih i bolesnih ispitanica.

Analizira li se vrijednost signifikantnosti za koncentracije parabena u urinu, može se uočiti kako p iznosi više od 5 % ($p < 0,05$), dakle, ne postoji statistički značajna razlika između koncentracija parabena u urinu kod zdravih i bolesnih. Zdrave i bolesne žene imaju jednaku dinamiku izlučivanja parabena u urinu (Slika 19.). Iako je mali broj uzoraka, pogleda li se vrijednost signifikantnosti za koncentracije parabena u plazmi, može se uočiti kako je p manji od 5 % ($p < 0,05$). Dakle, može se reći s razinom pouzdanosti od 95 %, kako postoji statistički značajna razlika između koncentracija parabena u plazmi kod bolesnih i zdravih. Žene sa zloćudnim tumorima dojke imaju značajno veću koncentraciju parabena u plazmi (krvi) (Slika 20.).

Tablica 25. Usporedba izmjerene koncentracije (ng/mL) parabena u urinu i plazmi između zdravih i bolesnih ispitanica

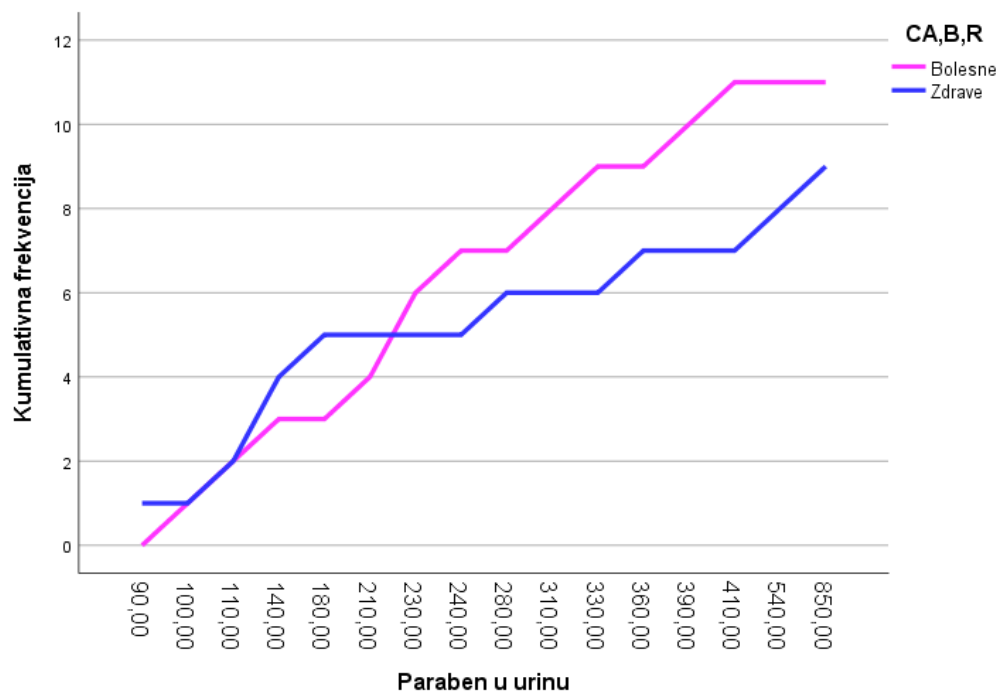
	CA,B,R						p*
	Bolesne			Zdrave			
	Percentile	Median	Percentile	Percentile	Median	Percentile	
	25		75	25		75	
Parabeni u urinu	140,00	230,00	330,00	140,00	180,00	360,00	0,879
Parabeni u plazmi	110,00	150,00	200,00	30,00	60,00	100,00	0,012

*Mann-Whitney U test

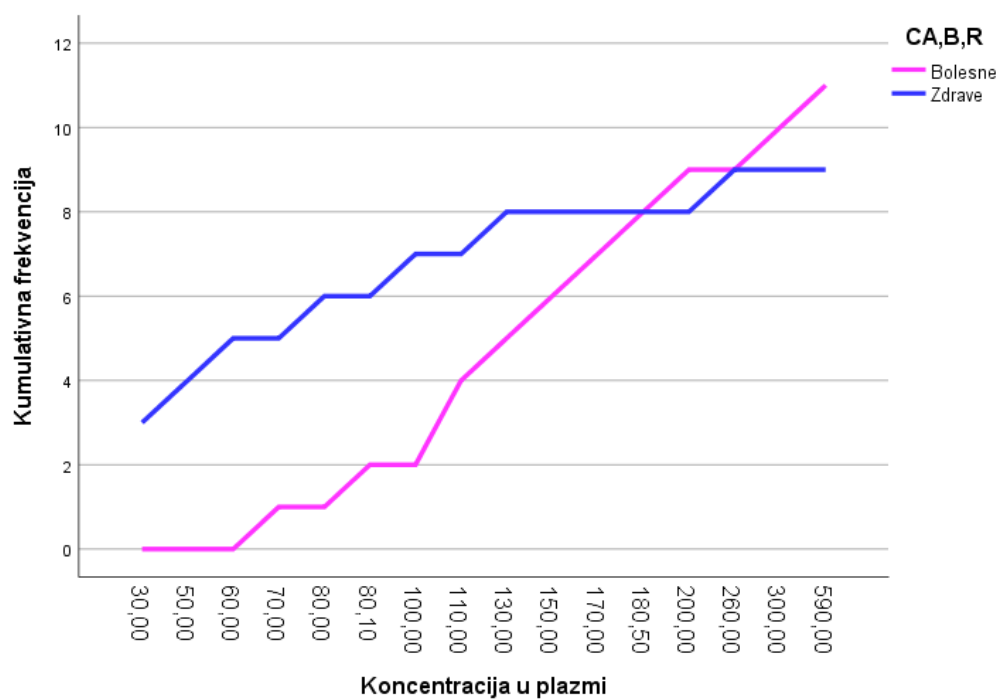
Tablica 26. Prosječna koncentracija (ng/mL) parabena u urinu i plazmi kod zdravih i bolesnih ispitanica

	CA,B,R	N	$\bar{x}$	Sd
Parabeni u urinu	Bolesne	11	245,4545	105,67532
	Zdrave	9	298,8889	252,46012
Parabeni u plazmi	Bolesne	11	190,0547	147,36602
	Zdrave	9	85,5556	74,01201

Slika 19. Prosječna koncentracija (ng/mL) parabena u urinu kod zdravih i bolesnih ispitanica



Slika 20. Prosječna koncentracija (ng/mL) parabena u plazmi kod zdravih i bolesnih ispitanica



5.7.1 Usporedba koncentracije parabena iz urina i plazme kod zdravih žena

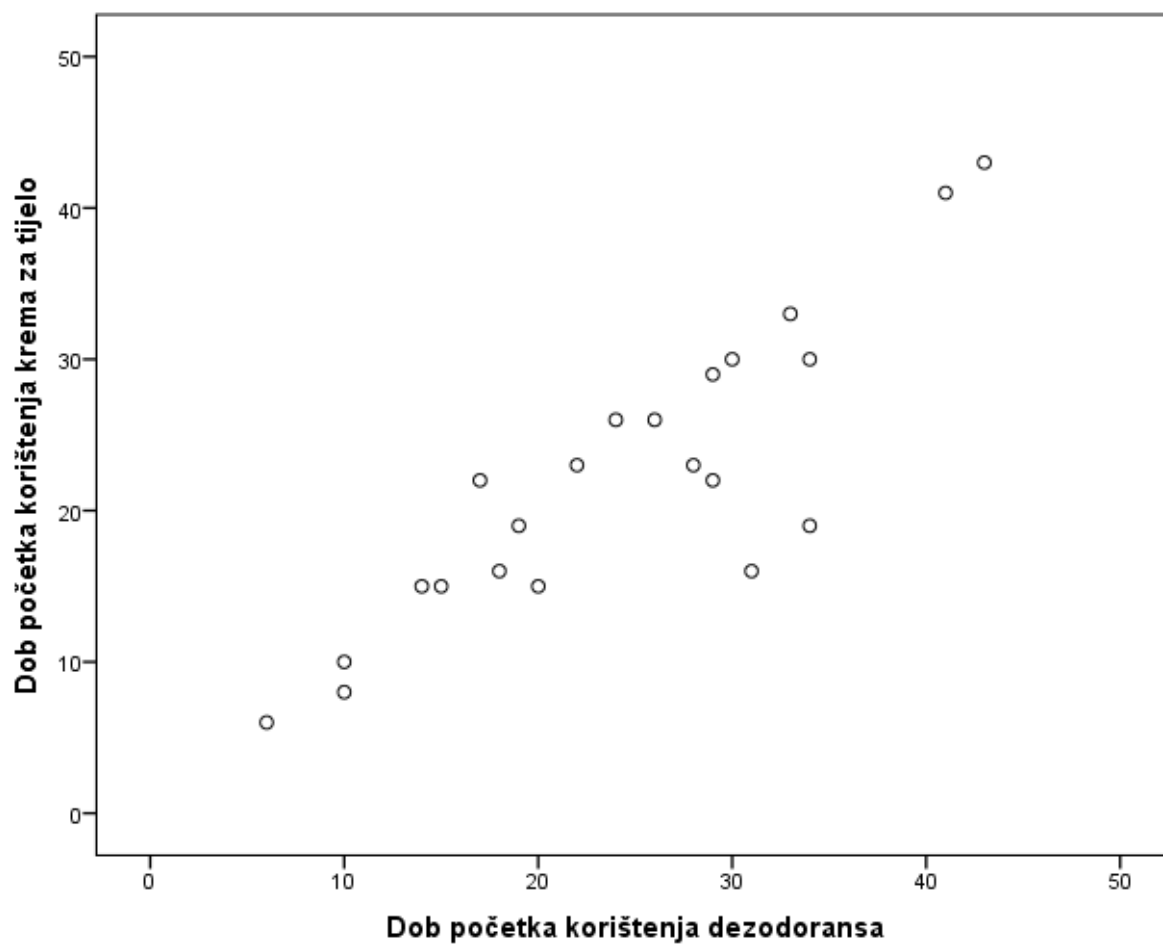
Iz Tablice 27. može se uočiti kako je najveća pozitivna korelacija zabilježena između varijabli dob početka korištenja krema za tijelo i dezodoransa ($r = 0,823$; $p < 0,01$). To znači da su zdrave žene u istom trenutku počele koristiti kreme i dezodoranse te da ih tijekom života koriste istodobno (Slika 21.). Taj podatak upućuje na zaključak da parabeni pretežito ulaze u naše tijelo iz svakodnevne primjene krema i dezodoransa. Također se iz navedene tablice može uočiti da kod zdravih žena ne postoji značajni odnos između koncentracija parabena i izloženosti navedenim kozmetičkim proizvodima zato što nemamo niti jedan značajni koeficijent povezanosti.

Tablica 27. Usporedba koncentracije parabena sa dobi početka korištenja krema i dezodoransa kod skupine zdravih žena

		Parabeni u urinu	Parabeni u plazmi	Dob početka korištenja krema za tijelo	Dob početka korištenja dezodoransa
Parabeni u urinu	r	1,000	,102	-,277	-,277
	p	.	,794	,470	,470
	N	9	9	9	9
Parabeni u plazmi	r	,102	1,000	,562	,374
	p	,794	.	,115	,321
	N	9	9	9	9
Dob početka korištenja krema za tijelo	r	-,277	,562	1,000	,823**
	p	,470	,115	.	,000
	N	9	9	22	22
Dob početka korištenja dezodoransa	r	-,277	,374	,823**	1,000
	p	,470	,321	,000	.
	N	9	9	22	23

** . Koeficijent korelacije značajan je na razini 0,01 (dvostrano).

Slika 21. Usporedba dobi početka korištenja krema i dezodoransa sa koncentracijom parabena kod skupine zdravih žena



5.7.2 Usporedba koncentracije parabena iz urina i plazme kod bolesnih žena

Iz Tablice 28. može se uočiti kako je zabilježena pozitivna i negativna korelacija između promatranih varijabli.

Najveća negativna korelacija uočena je između varijabli paraben u plazmi i dob menopauze ($r=-0,873$; $p<0,05$). To znači da sa porastom koncentracije parabena u plazmi žene sa rakom dojke ulaze ranije u menopauzu. Radi se o korelaciji jakoga intenziteta.

Druga negativna korelacija uočena je između varijabli paraben u urinu i paraben u plazmi ($r=-0,680$; $p<0,05$), što znači ako koncentracija parabena u plazmi raste pada u urinu.

Treća negativna korelacija uočena je između varijabli veličina tumora i fizička aktivnost ($r=-0,376$; $p<0,05$), što znači ako je bolesne žene imaju manje fizičku aktivnost onda im je veličina tumora bila veća. Također navedeno je potvrđeno slijedećom negativnom korelacijom koja je uočena između varijabli fizička aktivnost i BMI ($r=-0,328$; $p<0,05$), što znači ako je fizička aktivnost veća BMI je manji.

Ono što je od značajne znanstvene važnosti je da veća razina koncentracije parabena u plazmi podrazumijeva nižu (sličnu) koncentraciju parabena u urinu, riječ je o negativnom odnosu ($r=-0,680$; $p<0,05$) (Slika 22.). Ta podatak upućuje na mogućnost da bezobzira koliko unosimo parabena naše tijelo ima uvijek jednak kapacitet izlučivanja. Stoga ako unosimo više parabena veća će biti koncentracija cirkulirajućih parabena u krvi (plazmi) koje onda djeluju ako ksenoestrogenske molekule te mogu utjecati na naš endokrini sustav.

Najveće pozitivne korelacije zabilježene su između varijabli dob početka korištenja antiperspiranta i dob početka korištenja dezodoransa ($r=0,721$; $p<0,01$), koja prikazuje da su bolesne žene u istom trenutku počele koristiti antiperspirante i dezodoranse te da ih cijeli život upotrebljavaju istovremeno.

Slijedeća pozitivna korelacija zabilježena je između varijabli fizička aktivnost i dob menopauze ($r=0,361$; $p<0,05$), ako je intenzivnija fizička aktivnost dob ulaska u menopauzu je kasnija. Što je opet logično jer veća fizička aktivnost ima manje masnog tkiva stoga i manju bioakumulaciju ED parabena te ne dolazi do višeg otpuštanja aktivnih ksenoestrogena u krv te je manje koncentracija cirkulirajućih hormona. Stoga ženino tijelo može ući u prirodnu menopauzu u kasnijoj dobi ako se bavi fizičkom aktivnosti.

Slijedeća pozitivna korelacija zabilježena je između varijabli veličina tumora i Ki67 indeks ($r=0,330$; $p<0,05$), što znači ako je tumor veći onda je i Ki67 indeks viši.

Također nije uočena statistički značajna razina korelacije u odnosu receptora s ostalim promatranim varijablama.

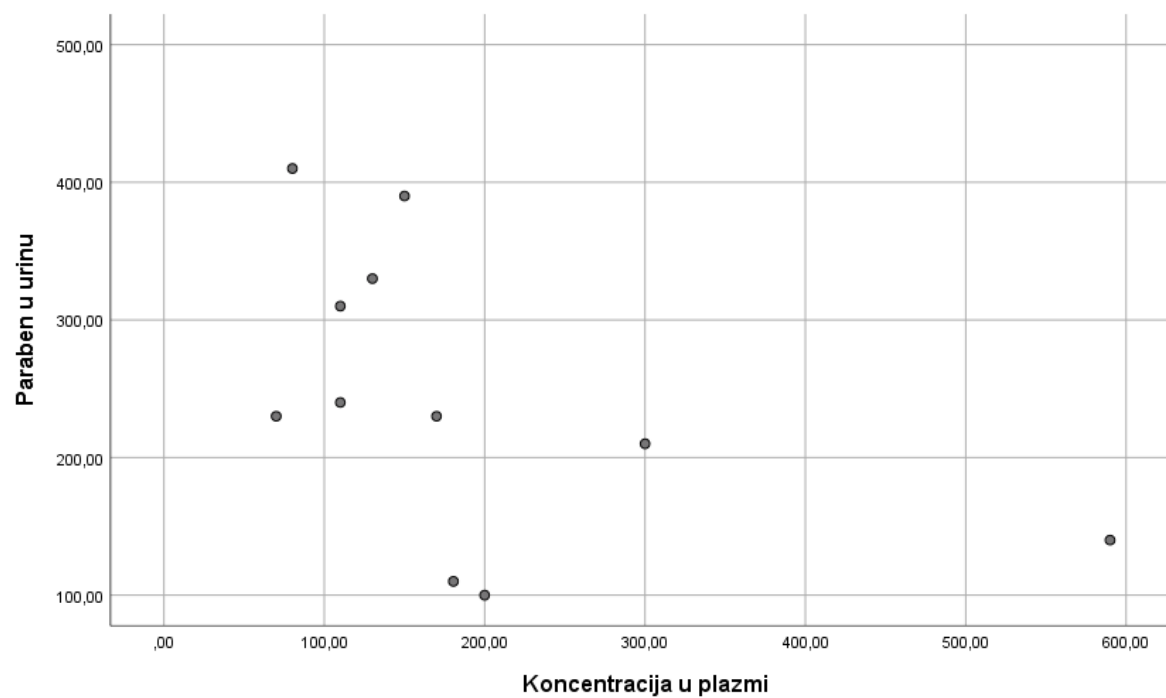
Tablica 28. Usporedba koncentracije parabena i promatranih varijabli kod skupine bolesnih žena

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Parabeni u urinu	r	1,000	-,680*	,255	,541	-,116	-,324	-,657	-,050	-,431	,027	,068
	p	.	,021	,449	,086	,734	,330	,156	,898	,185	,954	,842
	N	11	11	11	11	11	11	6	9	11	7	11
2. Parabeni u plazmi	r	-,680*	1,000	-,111	-,514	-,016	,263	,200	-,651	,044	-,873*	,091
	p	,021	.	,744	,106	,963	,435	,704	,057	,897	,010	,790
	N	11	11	11	11	11	11	6	9	11	7	11
3. Veličina tumora	r	,255	-,111	1,000	-,246	-,158	,330*	-,139	-,087	-,376**	-,165	-,258
	p	,449	,744	.	,088	,278	,021	,426	,583	,008	,335	,074
	N	11	11	49	49	49	49	35	42	49	36	49
4. ER	r	,541	-,514	-,246	1,000	,179	-,188	,106	,081	-,083	,044	-,025
	p	,086	,106	,088	.	,218	,197	,545	,611	,573	,799	,867
	N	11	11	49	49	49	49	35	42	49	36	49
5. PgR	r	-,116	-,016	-,158	,179	1,000	-,025	-,220	-,204	-,049	,061	,116
	p	,734	,963	,278	,218	.	,864	,203	,196	,736	,725	,428
	N	11	11	49	49	49	49	35	42	49	36	49
6. Ki67	r	-,324	,263	,330*	-,188	-,025	1,000	,203	,097	-,015	-,083	-,040
	p	,330	,435	,021	,197	,864	.	,243	,540	,918	,629	,783
	N	11	11	49	49	49	49	35	42	49	36	49
7. Dob početka kreme	r	-,657	,200	-,139	,106	-,220	,203	1,000	,721**	-,184	-,107	,188
	p	,156	,704	,426	,545	,203	,243	.	,000	,290	,612	,280
	N	6	6	35	35	35	35	35	33	35	25	35
8. Dob početka dezodoransa	r	-,050	-,651	-,087	,081	-,204	,097	,721**	1,000	-,187	-,062	,128
	p	,898	,057	,583	,611	,196	,540	,000	.	,237	,749	,421
	N	9	9	42	42	42	42	33	42	42	29	42
9. Fizička aktivnost	r	-,431	,044	-,376**	-,083	-,049	-,015	-,184	-,187	1,000	,361*	-,328*
	p	,185	,897	,008	,573	,736	,918	,290	,237	.	,030	,022
	N	11	11	49	49	49	49	35	42	49	36	49
10. Dob menopauze	r	,027	-,873*	-,165	,044	,061	-,083	-,107	-,062	,361*	1,000	-,046
	p	,954	,010	,335	,799	,725	,629	,612	,749	,030	.	,788
	N	7	7	36	36	36	36	25	29	36	36	36
11. BMI	r	,068	,091	-,258	-,025	,116	-,040	,188	,128	-,328*	-,046	1,000
	p	,842	,790	,074	,867	,428	,783	,280	,421	,022	,788	.
	N	11	11	49	49	49	49	35	42	49	36	49

*. Koeficijent korelacije značajan je na razini 0,05 (dvostrano).

**.. Koeficijent korelacije značajan je na razini 0,01 (dvostrano).

Slika 22. Usporedba koncentracije parabena iz plazme i urina kod skupine bolesnih žena



5.8 Parabeni u tkivima dojke

Protokol uzorkovanja tkiva iz gornjeg lateralnog kvadranta dojke (GLK) opisan je u odjeljku 4.2.1.

Uzorkovanje tkiva za bolesne žene je :

Q1 – tkivo GLK-a dojke oko zloćudnog tumora. Patohistološki nalaz potvrđuje „slobodan rub preparata“ tj. u ovom tkivu nema zloćudnih stanica jer predstavlja dio kvadranta oko ležišta tumora

A - masno tkivo oko sentinel limfnog čvora pazušne regije / aksile

TM - tkivo zloćudnog tumora (ukoliko je tumor veći od 1 ccm)

Uzorkovanje tkiva za zdrave žene, gdje su sva tkiva uzeta iz GLK-a dojke:

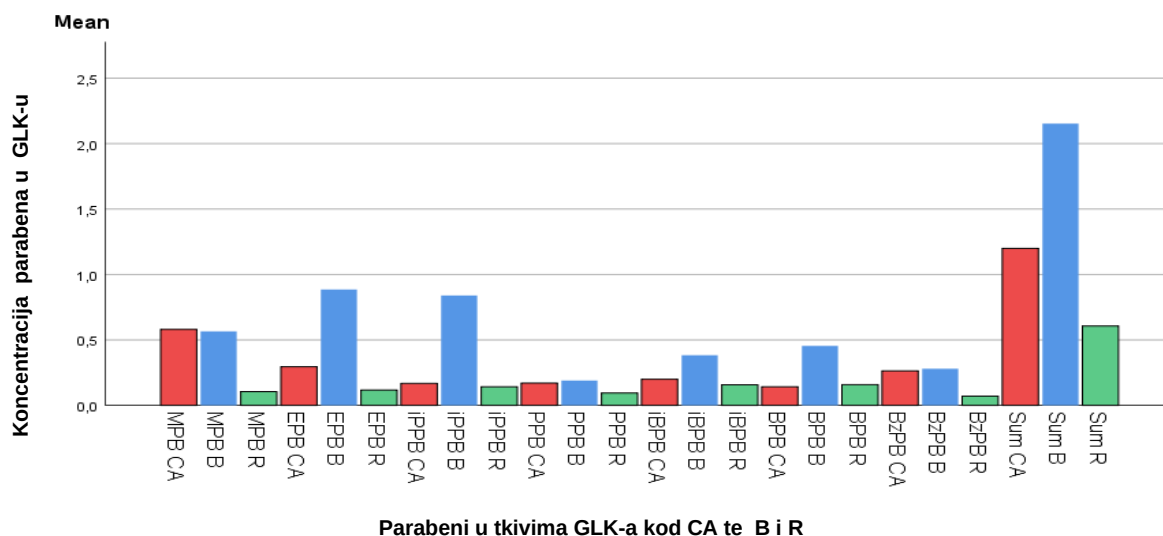
B-tkivo biopsije (patohistološke dijagnoze fibroadenom– FA)

R-tkivo redukcije (patohistološka dijagnoza fibrocistične mastopatije -FCM)

U Tablici 29. prikazane su prosječne vrijednosti koncentracija parabena iz tkiva GLK-a dojke uzetih od bolesnih žena (CA), zdravih žena sa biopsijom (B) i zdravih žena sa redukcijom (R). Testiranjem statističke značajnosti uočena je razlika za tri izmjerene koncentracije: etilparaben (EPB), benzilparaben (BzPB) i ukupnu sumu svih parabena (Sum).

Ukupni je zbroj svih parabena u tkivu GLK-a dojke najveća za skupinu zdravih žena s BIOPSIJOM (2,15 ng/mg) gdje patohistološki nalaz odgovara fibroadenom (Slika 23.). Ukupni zbroj parabena kod bolesnih je nešto niži (1,2 ng/mg) nego kod zdravih biopsija, no značajno je niži nego kod zdravih žena s redukcijom dojki (0,60 ng/mg).

Slika 23. Prikaz prosječne koncentracije (ng/mg) parabena u tkivima GLK-a dojke bolesnih žena (CA) te zdravih žena sa biopsijom (B) i redukcijom (R)



Tablica 29. Prosječna koncentracija (ng/mg) parabena u tkivima GLK-a dojke bolesnih žena (CA) te zdravih žena sa biopsijom (B) i redukcijom (R)

		N	$\bar{x}$	Sd
MPB	CA	19	,5805	,96038
	B	2	,5650	,67175
	R	11	,1055	,07421
EPB	CA	17	,2947	,24597
	B	2	,8850	,20506
	R	10	,1170	,13992
iPPB	CA	9	,1678	,08570
	B	1	,8400	.
	R	5	,1420	,08198
PPB	CA	18	,1700	,24147
	B	2	,1900	,04243
	R	9	,0944	,09697
iBPB	CA	22	,1991	,16095
	B	3	,3833	,33561
	R	10	,1570	,10914
BPB	CA	23	,1422	,10711
	B	2	,4550	,36062
	R	8	,1588	,11667
BzPB	CA	11	,2636	,17896
	B	1	,2800	.
	R	8	,0700	,03464
Sum	CA	26	1,2000	,93672
	B	3	2,1533	1,35183
	R	12	,6067	,34624

U Tablici 30. provedena je statistička usporedba prosječne koncentracije pojedinačnih parabena između bolesnih žena (CA) te zdravih žena s biopsijom (B) i redukcijom (R). Navedeni rezultati pokazuju kod bolesnih žena tendenciju značajno više koncentracije BzPB u tkivu GLK-a dojke što postavlja temelje za dijagnostički potencijal navedenog pokazatelja. Naravno, navedeno je nužno provjeriti na većem uzorku ispitanica gdje bi se napravila analiza odsječka, svojevrsna ROC krivulja putem koje bismo mogli dobiti referentnu prosječnu vrijednost BENZILPARABENA (BzPB) kao DIJAGNOSTIČKOG POKAZATELJA/markera za procjenu potencijale veće izloženost parabenima i njihovom ksenoestrogenskom djelovanju na endokrini sustav.

Tablica 30: Usporedba prosječne koncentracije pojedinačnih parabena između bolesnih žena (CA) te zdravih žena sa biopsijom (B) i redukcijom (R)

	CA/B/R	N	Aritmetička sredina rangova	p*
MPB	CA	19	17,95	0,388
	B	2	19,75	
	R	11	13,41	
	Total	32		
EPB	CA	17	16,94	0,006
	B	2	27,75	
	R	10	9,15	
	Total	29		
iPPB	CA	9	8,17	0,202
	B	1	15,00	
	R	5	6,30	
	Total	15		
PPB	CA	18	15,61	0,241
	B	2	22,75	
	R	9	12,06	
	Total	29		
iBPB	CA	22	18,02	0,623
	B	3	23,00	
	R	10	16,45	
	Total	35		
BPB	CA	23	15,98	0,239
	B	2	28,00	
	R	8	17,19	
	Total	33		
BzPB	CA	11	13,55	0,010
	B	1	16,00	
	R	8	5,63	
	Total	20		
Sum	CA	26	23,00	0,039
	B	3	30,67	
	R	12	14,25	
	Total	41		

*Kruskal-Wallis H test

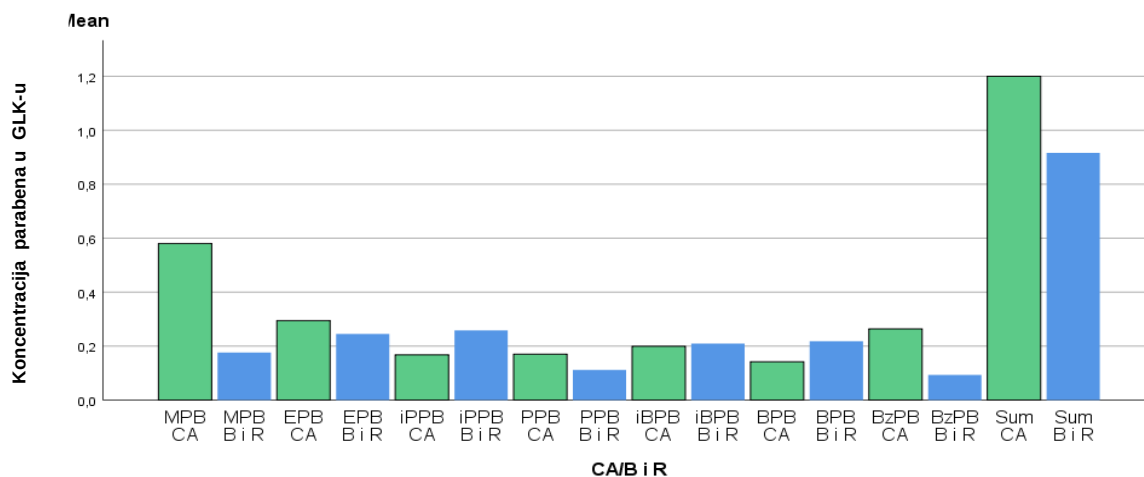
U Tablici 31. i na Slici 24. prikazane su prosječne vrijednosti koncentracija parabena iz GLK-a dojke kod usporedbe bolesnih i zdravih žena (objedinjene su biopsije i redukcije). Ukupni je zbroj parabena kod bolesnih viši nego kod zdravih žena ako objedinimo biopsije i redukcije. No, u prethodnoj smo analizi pokazali da je ukupni zbroj parabena najveći kod zdravih biopsija koje slijede bolesne žene, dok je kod redukcija najniži (Slika 23.).

Tablica 31. Prosječna koncentracija (ng/mg) parabena u tkivima GLK-a bolesnih (CA) i zdravih žena (B i R)

	CA / B i R	N	$\bar{x}$	Sd	p*
MPB	CA	19	,5805	,96038	0,291
	B i R	13	,1762	,26828	
EPB	CA	17	,2947	,24597	0,144
	B i R	12	,2450	,33047	
iPPB	CA	9	,1678	,08570	0,859
	B i R	6	,2583	,29424	
PPB	CA	18	,1700	,24147	0,620
	B i R	11	,1118	,09590	
iBPB	CA	22	,1991	,16095	0,986
	B i R	13	,2092	,19380	
BPB	CA	23	,1422	,10711	0,356
	B i R	10	,2180	,20159	
BzPB	CA	11	,2636	,17896	0,011
	B i R	9	,0933	,07714	
Sum	CA	26	1,2000	,93672	0,159
	B i R	15	,9160	,87484	

*Mann-Whitney U test

Slika 24. Prikaz prosječne koncentracije (ng/mg) parabena u tkivima GLK-a dojke bolesnih žena (CA) te zdravih žena (objedinjene su biopsije i redukcije, B i R)



Testiranjem statističke značajnosti između bolesnih i zdravih (Tablica 31.) uočena je značajna razlika za izmjerenu koncentraciju benzilparabena (BzPB), ali ne i za ukupni zbroj svih parabena, pri čemu je vrijednost BzPB značajno viša za skupinu bolesnih žena. Dakle, BzPB i u ovome kontekstu indicira mogućnost uporabe kao dijagnostičkog pokazatelja/markera za procjenu veće izloženost parabenima. Veća koncentracija BzPB u tkivu GLK-a bolesnih žena može značiti povećani rizik za razvoj zloćudnog tumora u tome kvadrantu. Navedeno bi poslužilo preventivnom određivanju skupine žena s povećanim rizikom za razvoj raka dojke. Zdrave ispitanice imaju statistički (dokazano) značajno nižu koncentraciju BzPB u GLK-u dojke i to u tkivu fibroadenoma kod biopsija i fibrocističnom tkivu kod redukcija.

5.8.1 Usporedba koncentracije parabena iz tkiva bolesnih žena

5.8.1.1 Usporedba koncentracije parabena iz tkiva gornjeg lateralnog kvadranta dojke kod bolesnih žena

U Tablici 32. provedena je statistička usporedba ukupne koncentracije svih parabena iz GLK-a bolesnih žena (Sum Q) sa koncentracijom parabena iz urina i plazme, patohistološkom analizom tkiva, godinama izloženosti parabenima te početkom menarhe i menopauze. Pogleda li se razina statističke značajnosti može se uočiti kako nije zabilježen niti jedan značajan koeficijent korelacije, tj. nije uočena statistički značajna veza.

Tablica 32. Usporedba ukupne koncentracije svih parabena iz GLK-a bolesnih žena (Sum Q) sa koncentracijom parabena iz urina i plazme, patohistološkom analizom tkiva, godinama izloženosti parabenima te početkom menarhe i menopauze

	Spearman's rho *		
	Sum (Q)		
	r	p	N
Parabeni u urinu	-,018	,958	11
Parabeni u plazmi	,260	,441	11
TNM STADIJ	,418	,201	11
GRADUS	,412	,208	11
Veličina tumora	,435	,181	11
ER	,054	,875	11
PgR	,168	,620	11
Ki67	,235	,486	11
DOB–DOB KORIŠTENJA (dezodoranse)	-,042	,915	9
Menarha	-,024	,945	11
Menopauza	-,270	,558	7

* Spearmanov koeficijent korelacije

5.8.1.2 Usporedba koncentracije parabena iz masnog tkiva oko sentinel limfnih čvorova pazušne regije kod bolesnih žena

U Tablici 33. provedena je statistička usporedba ukupne koncentracije svih parabena u aksili (Sum A) iz masnog tkiva oko sentinel limfnih čvorova pazušne regije bolesnih žena sa koncentracijom parabena iz urina i plazme, patohistološkom analizom tkiva, godinama izloženosti parabenima te početkom menarhe i menopauze.

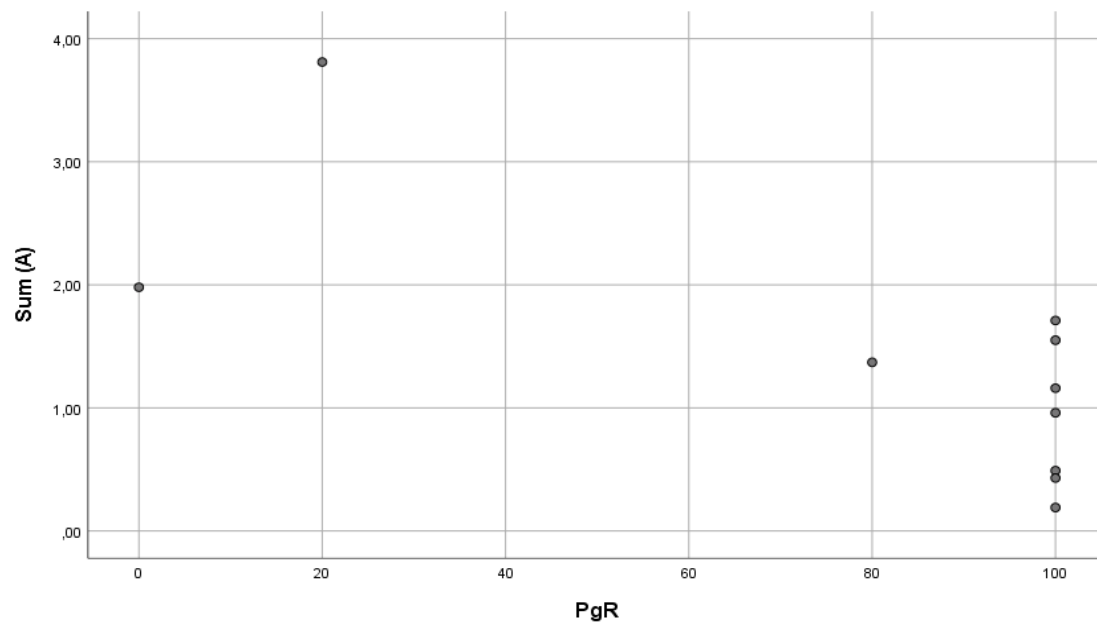
Razina korelacije između prosječne ekspresije progesteronskih receptora (PgR) i ukupne koncentracije svih parabena u aksili (Sum A) ($r=-0,679$; $p<0,01$) je negativna i značajna. Radi se o korelaciji srednjeg intenziteta, To znači što je veća koncentracija parabena u masnom tkivu pazušne regije to je ekspresija progesteronskih receptora na zloćudnom tumoru manja (Slika 25.).

Tablica 33. Usporedba ukupne koncentracije svih parabena u aksili (A) iz masnog tkiva oko sentinel limfnih čvorova) sa koncentracijom parabena iz urina i plazme, patohistološkom analizom tkiva, godinama izloženosti parabenima te početkom menarhe i menopauze

	Spearman's rho *		
	Sum (A)		
	r	p	N
Parabeni u urinu	,128	,725	10
Parabeni u plazmi	-,505	,137	10
TNM STADIJ	-,009	,981	10
GRADUS	,055	,880	10
Veličina tumora	-,267	,456	10
ER	-,234	,516	10
PgR	-,679	,031	10
Ki67	,007	,986	10
DOB–DOB KORIŠTENJA (dezodoranse)	,407	,317	8
Menarha	-,691	,027	10
Menopauza	,754	,084	6

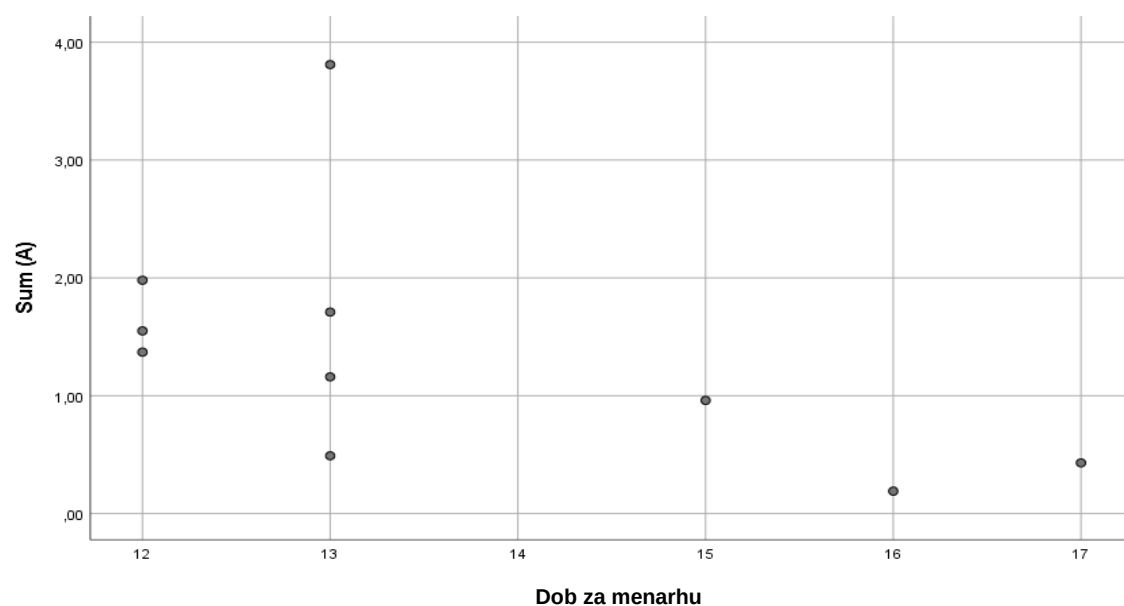
* Spearmanov koeficijent korelacije

Slika 25. Usporedba prosječne ekspresije progesteronskih receptora (PgR) i ukupne koncentracije svih parabena u aksili (Sum A)



Razina korelacije između Dobi za menarhu i ukupne koncentracije svih parabena u aksili (Sum A) ($r=-0,691$; $p<0,01$) je negativna i značajna. Radi se o korelaciji srednjeg intenziteta. To znači da što je veća koncentracija parabena u masnom tkivu pazušne regije to žena ranije dobije menstruaciju. Mlađe žene sve ranije i češće koriste kozmetičke preparate sa parabenima koji se apsorbiraju putem kože i mogu imati ksenoestrogensko djelovanje na endokrini sustav. Takvim djelovanjem potencijalno mogu izazvati menarhu u ranijoj dobi. (Slika 26.)

Slika 26. Usporedba dobi za menarhu i ukupne koncentracije svih parabena u aksili (Sum A)



5.8.1.3 Usporedba koncentracije parabena iz zloćudnog tumorskog tkiva dojke kod bolesnih žena

U Tablici 34. provedena je statistička usporedba ukupne koncentracije svih parabena u zloćudnom tumorskom tkivu dojke (Sum TM) s koncentracijom parabena iz urina i plazme, patohistološkom analizom tkiva, godinama izloženosti parabenima te početkom menarhe i menopauze. Iz razine statističke značajnosti može se uočiti kako nije zabilježen niti jedan značajni koeficijent korelacije, tj. nema statistički značajne veze. No, postoji pozitivna tendencija značajne korelacije na većem uzorku ispitanica.

Tablica 34. Usporedba ukupne koncentracije svih parabena u zloćudnom tumorskom tkivu dojke (Sum TM)

	Spearman's rho *		
	Sum (TM)		
	r	p	N
Parabeni u urinu	-,300	,624	5
Parabeni u plazmi	,300	,624	5
TNM STADIJ	,000	1,000	5
GRADUS	-,354	,559	5
Veličina tumora	-,462	,434	5
ER	-,112	,858	5
PgR	-,103	,870	5
Ki67	,577	,308	5
DOB–DOB KORIŠTENJA (dezodoranse)	-,400	,600	4
Menarha	-,527	,361	5
Menopauza	,866	,333	3

* Spearmanov koeficijent korelacije

5.8.1.4 Usporedba koncentracije parabena između tkiva bolesnih žena

U sljedećim je Tablicama (Tablice 35., 36. i 37.) provedena statistička usporedba ukupne koncentracije parabena između tkiva dojke bolesnih žena. Prikazana je usporedba koncentracije za aksilu (A) iz masnog tkiva oko sentinel limfnih čvorova pazušne regije za GLK oko ležišta zloćudnog tumora (Q) i za zloćudno tumorsko tkivo dojke (TM).

Tablica 35. Usporedba ukupne koncentracije (ng/mL) parabena (Sum) između tkiva dojke bolesnih žena. Oznaka : aksila (A), GLK ležište zloćudnog tumora (Q) i zloćudno tumorsko tkivo dojke (TM)

			Sum
A/Q/TM (CA)	A	Minimum	,19
		Median	1,27
		Maximum	3,81
	Q	Minimum	,19
		Median	,68
		Maximum	1,78
	TM	Minimum	,15
		Median	1,49
		Maximum	3,63

Tablica 36. Prikaz rangova kod A/Q/TM (CA)

	A/Q/TM (CA)	N	Mean Rank
Sum	A	10	14,95
	Q	11	10,68
	TM	5	16,80
	Total	26	

Tablica 37. Prikaz testnih rezultata^{a,b}

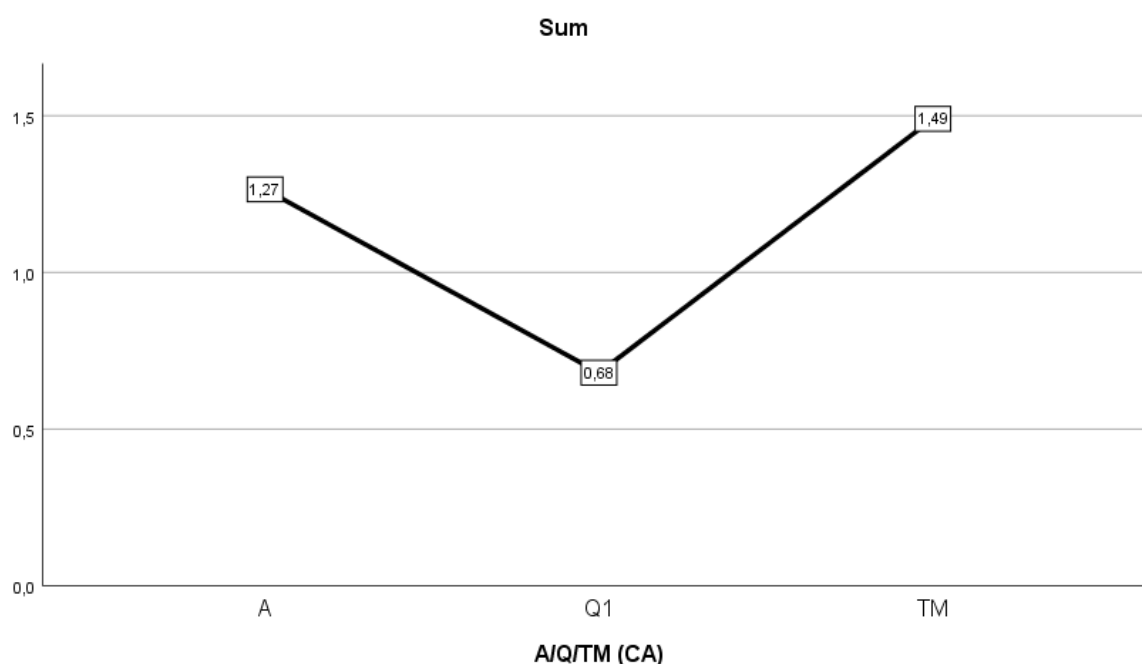
	Sum
Kruskal-Wallis H	2,785
df	2
Asymp. Sig.	,249

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: A/Q/TM (CA)

Analizom vrijednosti značajnosti kod ukupne koncentracije parabena iz tkiva bolesnih žena može se uočiti kako značajnost testa iznosi više od 0,05, odnosno $p > 0,05$, dakle, ne postoji statistički značajna razlika kod iste bolesne ispitanice s obzirom na koncentraciju parabena u tkivima pazuha, GLK-a i zloćudnom tumoru. No, postoji tendencija da se najmanja koncentracija parabena nalazi u tkivu GLK-a oko ležišta zloćudnog tumora (Q) iza koje slijedi koncentracija u aksili (A) iz masnog tkiva oko sentinel limfnih čvorova pazušne regije. Najveća se koncentracija parabena nalazi u samom zloćudnom tumorskom tkivu (TM). Koncentracija parabena u zloćudnom tkivu i aksili slične su i uvijek više nego koncentracija u kvadrantu dojke gdje je tumor smješten. Naravno, navedeno je nužno provjeriti na većem uzorku ispitanica. (Slika 27.)

Slika 27. Prikaz koncentracija (ng/mg) parabena za aksilu (A) iz masnog tkiva oko sentinel limfnih čvorova pazušne regije, za GLK-a oko ležišta zloćudnog tumora (Q) i za zloćudno tumorsko tkivo dojke (TM)



5.8.2 Usporedba koncentracije parabena iz tkiva zdravih žena

5.8.2.1 Usporedba koncentracije parabena iz tkiva gornjeg lateralnog kvadranta dojke kod zdravih žena

U Tablici 38. provedena je statistička usporedba ukupne koncentracije svih iz tkiva GLK (Sum Q) kod skupine zdravih žena (biopsije i redukcije) s koncentracijom parabena iz urina i plazme, godinama izloženosti parabenima te početkom menarhe i menopauze. Iz razine statističke značajnosti može se uočiti kako nije zabilježen niti jedan značajni koeficijent korelacije, tj. nije uočena statistički značajna veza.

Tablica 38. Usporedba ukupne koncentracije svih parabena iz tkiva GLK (Sum Q) kod skupine zdravih žena (biopsije i redukcije) sa koncentracijom parabena iz urina i plazme, godinama izloženosti parabenima te početkom menarhe i menopauze

	Spearman's rho *		
	Sum (Q)		
	r	p	N
Parabeni u urinu	,418	,262	9
Parabeni u plazmi	-,203	,600	9
DOB–DOB KORIŠTENJA (dezodoranse)	-,218	,574	9
Menarha	,111	,776	9
Menopauza	-,500	,667	3

* Spearmanov koeficijent korelacije

5.8.2.2 Usporedba koncentracije parabena iz tkiva gornjeg lateralnog kvadranta između lijeve i desne dojke kod redukcija

Da bismo odgovorili na pitanje postoji li razlika u koncentraciji parabena između lijeve i desne dojke kod iste zdrave ispitanice napravili smo usporedbu koncentracije parabena iz tkiva GLK-a obje dojke dobivenih metodom redukcije. Kako bi se uočila značajnost razlike kod redukcija desno i lijevo provedeno je testiranje putem Mann-Whitneyjeva U testa. (Tablica 39., 40. i 41.)

Tablica 39. Koncentracija (ng/mg) parabena u lijevoj i desnoj dojci kod iste zdrave ispitanice

	DESNO / LIJEVO					
	DESNO			LIJEVO		
	Minimum	Median	Maximum	Minimum	Median	Maximum
Sum	,14	,74	1,10	,09	,45	1,14

Tablica 40. Prikaz rangova između lijeve i desne dojke kod iste zdrave ispitanice

		N	Aritmetička sredina rangova	Suma rangova
Sum	DESNO	6	7,00	42,00
	LIJEVO	6	6,00	36,00
	Total	12		

Tablica 41. Prikaz testnih rezultata^{a,b}

	Sum
Mann-Whitney U	15,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-,480
Asymp. Sig. (2-tailed)	,631
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,699 ^b

a. Grouping Variable: RIGHT/LEFT

b. Not corrected for ties.

Iz vrijednosti značajnosti kod ukupne koncentracije parabena između lijeve i desne dojke može se uočiti kako značajnost testa iznosi više od 0,05, odnosno $p > 0,05$, dakle, može se reći kako ne postoji statistički značajna razlika s obzirom na lijevu i desnu stranu dojke kod iste zdrave ispitanice.

5.9 Usporedba koncentracije parabena iz tkiva, urina i plazme

U Tablici 42. prikazana je usporedba prosječne koncentracije parabena između zdravih i bolesnih žena za promatrane parametre: koncentracija parabena iz urina i plazme, godine izloženosti parabenima te godina početka menarhe i menopauze. Prosječna koncentracija parabena u urinu kod zdravih biopsija ima tendenciju biti veća nego kod redukcija i bolesnih žena, no nije statistički dokazana. Postoji pozitivna tendencija dobivanja značajne korelacije na većem uzorku ispitanica. Iz Tablice 42. može se očitati podatak koji je opisan u poglavlju 5.7.1. Iako je mali broj uzoraka može se reći s razinom pouzdanosti od 95 % kako postoji statistički značajna razlika između koncentracija parabena u plazmi kod bolesnih i zdravih ispitanica. Žene sa zloćudnim tumorima dojke imaju značajno veću koncentraciju parabena u plazmi (Slika 20.). Iz vrijednosti signifikantnosti koja iznosi manje od 5 % ($p < 0,05$) može se reći s razinom pouzdanosti od 95 % da su prosječne godine izloženosti dezodoransima značajno veće za bolesne (37 godina) za razliku od zdravih žena (22 godine za biopsije i 32 godine za redukcije).

Tablica 42. Usporedba prosječne koncentracije parabena između bolesnih (CA) i zdravih (B i R) žena za promatrane parametre: koncentracija (ng/mL) parabena iz urina i plazme, godine izloženosti parabenima te godina početka menarhe i menopauze

	CA,B,R									p*
	BOLESNE			BIOPSIJE			REDUKCIJE			
	Percentile 25	Median	Percentile 75	Percentile 25	Median	Percentile 75	Percentile 25	Median	Percentile 75	
Parabeni u urinu	140,00	230,00	330,00	180,00	360,00	540,00	110,00	140,00	280,00	0,342
Parabeni u plazmi	110,00	150,00	200,00	30,00	60,00	260,00	30,00	65,00	100,00	0,037
DOB–DOB KORIŠTENJA (dezodorans)	31,00	37,00	43,00	18,00	22,00	28,00	17,00	32,00	34,00	0,000
Menarha	12,00	13,00	14,00	12,00	13,00	14,00	12,00	13,00	14,00	0,636
Menopauza	49,00	50,00	53,00	56,00	56,00	56,00	49,00	50,00	51,50	0,301

*Kruskal-Wallis H test

5.9.1 Usporedba veličine tumora i koncentracije parabena između zdravih i bolesnih žena

U Tablici 43. provedena je statistička usporedba veličine dobroćudnog tumora patohistološke dijagnoze fibroadenom u odnosu na koncentracije parabena iz urina i plazme kod zdravih biopsija. Može se uočiti kako p u svim slučajevima iznosi $p > 0,05$, što znači da nije uočena statistički značajna razlika kod promatranih varijabli. Veličina fibroadenoma nije u korelaciji sa koncentracijom parabena u plazmi i urinu.

Tablica 43. Usporedba koncentracije parabena iz urina i plazme s obzirom na veličinu tumora kod zdravih biopsija

	Veličina tumora u centimetrima	N	Aritmetička sredina rangova	Suma rangova	p*
Parabeni u urinu	0-20	2	2,00	4,00	1,000
	21 i >	1	2,00	2,00	
	Ukupno	3			
Parabeni u plazmi	0-20	2	1,50	3,00	0,221
	21 i >	1	3,00	3,00	
	Ukupno	3			

*Mann-Whitney U test

U Tablici 44. provedena je statistička usporedba veličine zloćudnog tumora dojke bolesnih žena u odnosu na koncentracije parabena iz urina i plazme te koncentraciju u GLK-u dojke gdje je smješten tumor (Q1). Može se uočiti kako p u svim slučajevima iznosi $p > 0,05$, što znači da nije uočena statistički značajna razlika kod promatranih varijabli. Veličina zloćudnog tumora nije u korelaciji sa koncentracijom parabena u plazmi i urinu.

Tablica 44. Usporedba veličine zloćudnog tumora dojke u odnosu na koncentracije parabena iz urina i plazme te koncentraciju u GLK ležištu zloćudnog tumora (Q)

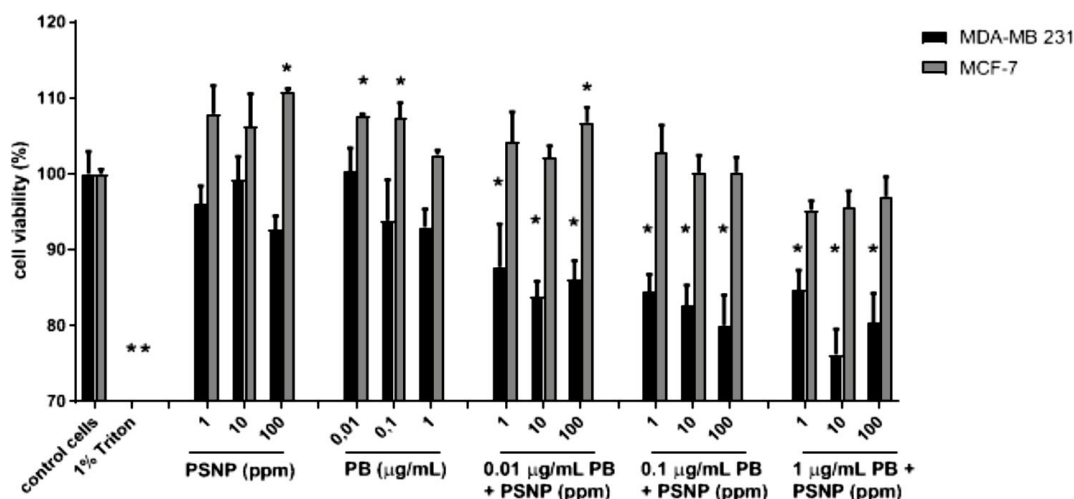
	Veličina tumora u centimetrima	N	Aritmetička sredina rangova	Suma rangova	p*
Parabeni u urinu	0-20	11	6,45	71,00	0,073
	21 and more	3	11,33	34,00	
	Ukupno	14			
Parabeni u plazmi	0-20	11	7,45	82,00	0,938
	21 and more	3	7,67	23,00	
	Ukupno	14			
Q1	0-20	11	7,73	85,00	0,697
	21 and more	3	6,67	20,00	
	Ukupno	14			

*Mann-Whitney U

5.10 Sinergistički učinak parabena i nanoplastike

U prvom objavljenom znanstvenom doktorskom radu na temu *Synergistic effects of parabens and plastic nanoparticles on proliferation of human breast cancer cells*, *Arh Hig Rada Toksikol* 2019;70:310-314, prikazani su rezultati istraživanja učinaka kemijskog koktela koji je sadržavao plastične nanočestice i parabene na vijabilnost i proliferaciju dviju različitih stanica adenokarcinoma dojke. (116) Tretirane su vrlo agresivne i slabo diferencirane stanične linije: MDA-MB 231, kojoj nedostaju HER2, progesteronski i estrogenski receptori, te MCF-7 stanična linija, karakterizirana bolje diferenciranim stanicama koje imaju progesteronski i estrogenski receptor alfa (ER α), te su morfološki slične žljezdanom epitelu. Za plastične nanočestice izabrane su nanočestice polistirena (PSNP) koje su miješane sa smjesom metil-, etil, propil- i butilparabena (PBmix). Stanice su bile tretirane pojedinačno s PSNP-om, sa smjesom PBmix te s koktelom PSNP i PBmix.

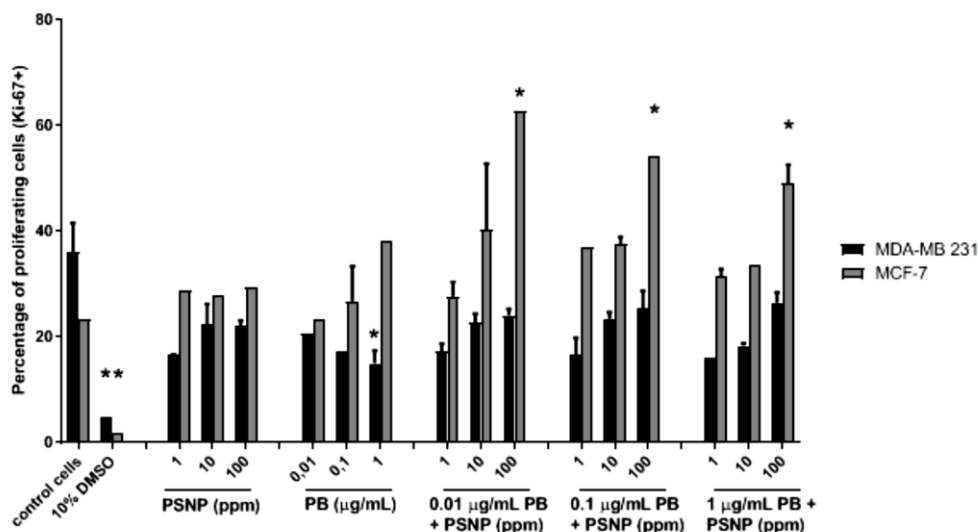
Rezultati vijabilnost stanica (Slika 28.) pokazali su pad vijabilnost MDA-MB231 stanica ovisno o primijenjenoj dozi PBmix, PSNP-a ili njihovog koktela. Iako sami PSNP ili PBmix tretman nije uzrokovao statistički značajan pad vijabilnosti, njihov koktel jest, te je ovisno o dozi smanjio vijabilnost MDA-MB231 stanica između 10 i 25 %.



Slika 28. Učinci parabena (PB) i/ili polistirenskih nanočestica (PSNP) na održivost stanica raka dojke. Oznakom * prikazane su vrijednosti koje su se statistički značajno ($P < 0,05$) razlikovale od negativne kontrole.

Suprotno tome, MCF-7 stanice pokazuju stalno povećanje vijabilnosti kada ih se zasebno tretiralo PSNP-om ili PBmixom, dok je samo kombinacija od 0,01 $\mu\text{g/mL}$ PB-a + 100 $\mu\text{g/mL}$ PSNP-a značajno povećala njihovu vijabilnost u odnosu na negativnu kontrolu. Ovi rezultati pokazali su da niti PSNP, niti PBmix, a ni njihov koktel nema toksičnog učinka na te stanice, nego čak pojačavaju njihovu vijabilnost što je ukazivalo na mogućnost stimulirane proliferacije stanica. Stoga je istražen učinak koktela nanoplastike s parabenima na proliferativnu aktivnost stanica raka dojke određivanjem Ki-67 proliferacijskog indeksa.

Nalazi proliferacije stanica još su dodatno naglasili razlike između MCF-7 i MDA-MB231 stanica kao odgovor na kombinirani tretman PBmix + PSNP (Slika 29.).



Slika 29. Učinci parabena (PB) i/ili polistirenskih nanočestica (PSNP) na proliferaciju stanica raka dojke. Oznakom * prikazane su vrijednosti koje su se statistički značajno ($P < 0,05$) razlikovale od negativne kontrole.

Postoci proliferacije (pozitivan na Ki67) MDA-MB231 stanice bili su manji u svim tretmanima (PBmix, PSNP i PBmix + PSNP kokteli) u usporedbi s kontrolnim stanicama, ali pad je bio statistički značajan samo za koncentraciju PBmixa od 1 µg/mL. Takvi rezultati ukazali su na to da niti PSNP niti njihov koktel s parabenima nije značajno promijenio proliferacijsku aktivnost MDA-MB231 stanica. Međutim, MCF-7 stanice su pokazale sasvim suprotne rezultate kao u slučaju rezultata vijabilnosti. Iako sami PSNP ili PBmix nisu značajno promijenili, koktel PSNP + PBmix je povećavao proliferacijsku aktivnost MCF-7 stanice u ovisnosti o dozi PBmix uz prisustvo PSNP-a.

S obzirom na razlike u receptorima stanične površine između dvije ispitivane stanične linije i dobro poznate interakcije između parabena i estrogenskih receptora, ovi rezultati su izuzetno zanimljivi jer pokazuju da prisutnost plastičnih nanočestica povećava djelovanje parabena na estrogen-osjetljive stanice dojke. Postotak proliferacije (Ki67-pozitivne) stanica značajno se povećao i više nego udvostručio pri najvišim koncentracijama PSNP-a, bez obzira na koncentracije PBmixa (Slika 29.). Ta opažanja pokazala su da je aktivnost širenja PBmixa u stanicama raka dojke osjetljivih na estrogen bio sinergistički potaknut prisutnošću PSNP-a. Mehanizam koji stoji iza toga mogao bi biti povezan sa svojstvima translokacije i adsorpcije PSNP-a, koje mogu djelovati kao trojanski konj za prijenos endokrinih otrova kao što su parabeni u različita tkiva. Stoga izloženost kemijskom koktelu kakav je ovaj za koji se očekuje da će promovirati proliferaciju stanica osjetljivih na estrogen doprinosi razvoju raka dojke.

6 RASPRAVA

Zdravlje poglavito ovisi o usklađenom radu endokrinog sustava koji regulira oslobađanje hormona bitnih za metabolizam, reprodukciju, rast i razvoj. Značajni porast nezaraznih bolesti vezanih za endokrini sustav sugerira da osim genetske etiologije, znatnu ulogu imaju i okolišni čimbenici. To uključuje endokrine poremećaje s posebnim naglaskom na hormonski ovisne vrste raka. Male fluktuacije u razini hormona mogu izazvati značajne patofiziološke promjene. (3) Kao posljedica promjena mogu se pojaviti hormonski ovisne vrste raka (prostate, testisa, dojke, jajnika i endometrija) te kronične bolesti modernog čovjeka (dijabetes tip 2, kardiovaskularne bolesti, astma, pretilost, neurobihevioralni poremećaji i neplodnost). Endokrini poremećaji kao multidisciplinarno istraživačko područje obuhvaća studije od ekotoksikologije do medicine i od terenskih promatranja do molekularne biologije. (122) Endokrini disruptor je egzogena kemikalija koja oponaša učinak hormona i time mijenja funkciju endokrinog sustava što dovodi do štetnih učinaka na zdravlje organizma, njegovo potomstvo ili (pod)populaciju. Neki se javljaju u prirodi ali većina su spojevi koje je proizveo čovjek za uporabu u industriji bez prethodne znanstvene evaluacije štetnosti za zdravlje životinja i ljudi. Smanjenje onečišćenja okoliša endokrinim disruptorima zahtijeva regulatorne mjere na međunarodnoj i nacionalnoj razini uz povećanje svjesnosti svakog pojedinca o njihovoj štetnosti. Značajni izazov za procjenu rizika za ljudsko zdravlje predstavlja sposobnost endokrinih disruptora da u niskim koncentracijama djeluju putem staničnih receptora, često uz individualni stanični odgovor na dozu, male mjerljive doze u organizmu, pitanje potrebe za dugotrajnom izloženosti te mogućeg efekta sinergijskog učinka („učinak mješavine” ili „učinak koktela”). (106) Paraben je endokrini disruptor koji se koristi kao konzervans u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji te se zbog svakodnevnog korištenja može akumulirati u tijelu. Paraben djeluje kao kompetitivni agonist estrogenskih receptora te imitira učinak endogenog estrogena što može utjecati na proliferaciju estrogen osjetljivih stanica dojke i kao takav može povećati rizik za razvoj hormonski ovisnog raka dojke.

Rezultati dosadašnjih istraživanja otvaraju znanstveni dijalog o mogućem utjecaju parabena na razvoj raka dojke što mora biti potkrijepljeno snažnijim znanstvenim dokazima. Mali broj znanstvenih studija prikazuje samo zasebno mjerenje koncentracije parabena iz tkiva, urina ili krvi. Nikada do sada nije rađena korelacija koncentracija parabena između tih uzoraka kod istih ispitanica. Stoga se u doktorskom radu procjenjuje izloženost parabenima i uspoređuje koncentracija iz urina, plazmi i tkiva između zdravih i bolesnih žena sa zloćudnim tumorom dojke. Rezultati istraživanja pridonijet će procjeni povećanog rizika za razvoj hormonski ovisnog raka dojke. Zbog sve većeg zagađenja okoliša s plastikom istraživanje se proširilo i na procjenu „učinka koktela” na proliferaciju stanica raka dojke, tj. izlaganje mješavini plastičnih nanočestica i parabena što bi dodatno moglo pridonijeti povećanom riziku za razvoj raka dojke.

Iako se parabeni intenzivno istražuju u zadnjih 25 godina postoje izazovi vezani uz složeni analitički rad. Cilj je analitičkog dijela dokorskog rada primjena nove, pouzdanije i brže metode za određivanje parabena u humanim uzorcima. Zbog svojih kemijskih specifičnosti, određivanje parabena u humanim uzorcima zahtijeva primjenu visoko specifičnih metoda mjerenja. U postojećoj je

znanstvenoj literaturi opisano samo nekoliko metoda. Razlozi za nepostojanje jedinstvene metode mogu se naći u mukotrpnom i složenom analitičkom radu vezanom uz rukovanje i obradu uzoraka čvrstog tkiva u usporedbi s tekućim biološkim uzorcima kao i u poteškoćama s primjenom bioanalitičkih metoda validacije. Rezultati istraživanja doktorskog rada predstavljaju novu, ekološki prihvatljivu i jednostavnu metodu ekstrakcije parabena pomoću membrane adsorpcijske tekstilne faze (FPSE, engl. *Fabric-Phase Sorptive Extraction*). U usporedbi s dosadašnjim metodama analize dobio se poboljšani i brži postupak pripreme uzoraka. Rezultati optimiziranog protokola FPSE ekstrakcije parabena objavljeni su u tri znanstvene publikacije. Prva publikacija prikazuje ekstrakciju parabena iz uzoraka urina, druga iz tkiva dojke i treća iz plazme. Svi su objavljeni radovi pokazali prikladnost i učinkovitost ekstrakcija parabena putem FPSE membrane za buduće epidemiološke i toksikološke studije. Nazivi objavljenih radova su: „An improved fabric-phase sorptive extraction protocol for the determination of seven parabens in human urine by HPLC–DAD“, *Biomedical Chromatography*. 2020., „Fabric phase sorptive extraction combined with high-performance-liquid chromatography-photodiode array analysis for the determination of seven parabens in human breast tissues: Application to cancerous and non-cancerous samples“, *Journal of Chromatography A*. 2020. te „Determination of Intact Parabens in the Human Plasma of Cancer and Non-Cancer Patients Using a Validated Fabric Phase Sorptive Extraction Reversed-Phase Liquid Chromatography Method with UV Detection“, *Molecules* 2021. (112-114)

Izloženost plastičnim mikro- i nanočesticama koje nastaju tijekom proizvodnje te uporaba i odlaganje plastičnog otpada veliki su zdravstveni i okolišni problemi koje treba hitno rješavati. Plastične nanočestice mogu na sebe vezati ostale kemijske spojeve iz okoline. Za pouzdanu procjenu rizika izloženosti nužno je objasniti ne samo učinke pojedinačnih kemijskih spojeva nego i njihovih mješavina. U prvoj znanstvenoj publikaciji doktorskoga rada na temu „Synergistic effects of parabens and plastic nanoparticles on proliferation of human breast cancer cells“, *Arh Hig Rada Toksikol* 2019;70:310-4 prikazani su rezultati istraživanja učinaka kemijskog koktela plastičnih nanočestica i parabena. (117) Cilj ovoga dijela doktorskog rada je procijeniti učinak plastičnih nanočestica, parabena i njihovih koktela na vijabilnost i proliferaciju dviju različitih stanica adenokarcinoma dojke: stanične linije MDA-MB 231 kojoj nedostaju estrogene receptori i MCF-7 stanica koje izražavaju te receptore. Dobiveni rezultati pokazuju da paraben i plastične nanočestice, primijenjeni posebno, u ispitivanim koncentracijskim rasponima nisu značajnije promijenili vijabilnost i proliferacijsku aktivnost u stanicama raka dojke. Međutim, sinergijski potaknuti koktel parabena i plastičnih nanočestica pojačali su proliferacijsku aktivnost parabena u stanicama raka dojke osjetljivih na estrogene. Mehanizam takvog učinka može biti povezan s translokacijskim i adsorpcijskim svojstvima nanočestica koje su poslužile kao vektor za učinkovitije izlaganje stanica parabenima. Protumorska aktivnost stanica raka dojke osjetljivih na estrogen može se očekivati kao konačni ishod dugotrajnoj izloženosti takvom kemijskom koktelu. Ova preliminarna studija upozorava na rizike sinergijskog učinka kemijskih koktela koji sadrže nanočestice plastike i endokrinih disruptora na proliferaciju stanica raka dojke. Na globalnoj razini to zahtijeva jasno definirani plan aktivnosti za upravljanje rizikom od izloženosti endokrinim disruptorima i plastičnom otpadu. Istraživanje procjene rizika izloženosti kemijskim mješavinama odražava scenarije iz stvarnog života ali eksperimentalnu procjenu svih mogućih kombinacija gotovo je nemoguće provesti. Rezultati se stoga mogu koristiti u izradi naprednih matematičkih i statističkih modela simulacija izloženosti

kombinacijama kemijskih koktela. Da bi se taj cilj postigao, potrebno je definirati endokrine disruptore visokog rizika te provesti još istraživanja njihovog kombiniranog izlaganja i učinka.

Prospektivno istraživanje doktorskog rada provodilo se od travnja 2017. do studenoga 2019. godine. U istraživanju sudjeluju 72 ispitanice koje su kirurški liječene u Kliničkoj bolnici Dubrava na Klinici za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kod skupine bolesnih žena kirurški se liječi rak dojke. Zdrave žene podvrgnute su biopsiji dobroćudnog tkiva dojke (patohistološkog nalaza fibroadenom) i elektivnim zahvatima korekcije izgleda dojke kirurškom metodom redukcije hipertrofičnog tkiva (patohistološkog nalaza dobroćudne fibrocistične mastopatije). Kod ispitanica se prikupljaju anamnestički i dijagnostički podaci te uzimaju uzorci tkiva dojke, urina i krvi (plazme). Također se prikupljaju podaci o životnom stilu ispitanica, uporabi kozmetičkih proizvoda, rizičnim čimbenicima za razvoj raka dojke te patohistološkom nalazu tkiva dojke. U istraživanju se mjere i uspoređuju koncentracije nerazgrađenih parabena iz humanih uzoraka te učestalost uporabe kozmetičkih proizvoda. Ispituje se sedam tipova parabena poredanih po veličini alkilnog lanca (od manjega prema većem) - metilparaben (MPB), etilparaben (EPB), propilparaben (PPB), butilparaben (BPB), isopropilparaben (iPPB), isobutilparaben (iBPB) i benzilparaben (BzPB). Usporedbom podataka procjenjuje se postoji li povišena koncentracija parabena u uzorcima bolesnih žena u usporedbi sa zdravim ženama. Rezultati istraživanja pridonose procjeni izloženosti parabenima i mogućem povećanom riziku za razvoj hormonski ovisnog raka dojke.

Rezultati doktorskog rada podijeljeni su na dvije skupine analiza. Prva uključuje ispitivanje vrste kirurškog liječenja ispitanica, uporabe kozmetičkih proizvoda i rizičnih čimbenika za razvoj raka dojke. Analiza se radi na skupini od svih 72 ispitanice. U skupinu bolesnih uključeno je 49 žena sa zloćudnim tumorom dojke. U skupinu zdravih uključene su 23 žene, 13 biopsija i 10 redukcija. Druga analiza uključuje mjerenje koncentracije parabena iz humanih uzoraka urina, plazme i tkiva dojke ispitanica. S obzirom da je gornji lateralni kvadrant (GLK) najčešće sjelo tumora dojke, za doktorski se rad odabire reprezentativna skupina žena koje imaju promjene u GLK-u dojke. Zbog visokih troškova analitičkog dijela ekstrakcije parabena, analiza se radi na skupini od 20 ispitanica, 11 bolesnih i 9 zdravih (4 biopsije i 5 redukcija). Također i na ovome smanjenom broju ispitanica imamo značajni broj statističkih varijabli koje jamče statističku snagu. Usporedbom podataka procjenjuje se promjena u koncentraciji parabena u gornjem lateralnom kvadrantu dojke kod žena sa zloćudnim tumorom dojke u usporedbi sa zdravim ženama.

Slijedi opis ukupne ispitivane skupine od 72 ispitanice. U skupinu BOLESNICA uključeno je 49 (68,1 %) pacijentica sa zloćudnim tumorom dojke. U skupinu ZDRAVIH uključene su 23 (31,9 %) pacijentice i to 13 pacijentica s dobroćudnim tumorima dojke koje su kirurški liječene metodom biopsije (18,1 %) i 10 pacijentica s dobroćudnom hipertrofijom žljezdanog tkiva koje su kirurški liječene metodom redukcije (13,9 %). Prosječna dob bolesnica u trenutku operacije bila je 58,69 godina (u rasponu od 35 do 84 godine) s prosječnom godinom rođenja 1960. Prosječna dob zdravih bila je 41,04 godina (u rasponu od 20 do 64 godine) s prosječnom godinom rođenja 1977. Navedeno odgovara dobnoj distribuciji objavljenoj u znanstvenoj literaturi gdje se 75 – 80 % raka dojke dijagnosticira u žena starijih od 50 godina (žene u poslijemenopauzi). (72)

Najčešći anesteziološki kriteriji su bile ASA (American Society of Anesthesiology) kategorija 2 (52,8 %) ili ASA kategorija 1 (38,9 %). To znači da ispitanice nisu anamnestički opterećene drugim težim oboljenjima. Kirurške metode liječenja zloćudnog tumora dojke uključivale su kvadrantektomiju i biopsiju sentinel limfnog čvora kod 23 pacijentice (46,9 %), jednostranu modificiranu radikalnu mastektomiju kod 13 pacijentica (26,5 %), obostranu modificiranu radikalnu mastektomiju kod jedne pacijentice (2,0 %), supkutanu mastektomiju s poštedom bradavice kod pet (10,2 %) i supkutanu mastektomiju bez poštede kod sedam pacijentica. Kirurške metode liječenja zdravih pacijentica uključivale su 13 biopsija (18,1 %) i 10 redukcija (13,9 %).

Od ukupnog broja ispitanica 97,2 % su dešnjakinje, dok su samo dvije žene ljevakinje. U odnosu na dojk u koja je operirana, 44,4 % ispitanica imalo je tumor na desnoj dojci i to 28 bolesnih (57,1 %) i četiri zdrave biopsije. Prema literaturi, češće se operira lijeva dojka. No, i lijeva dojka je zastupljena kod 40 bolesnih (40,8 %) i devet zdravih biopsija (39,1 %). Postoji tendencija o većoj zastupljenosti lijeve dojke, no kako je manji broj uzoraka zdravih žena, hipotezu ne možemo statistički dokazati. Najčešće sijelo zloćudnog tumora u čak 61,3 % ispitanica je u gornjem lateralnom kvadrantu (GLK) dojke. Također, većina zdravih biopsija ima dobroćudne tumore dojke (fibroadenom) u GLK-u (84,6 %). Zato se doktorski rad temelji na procjeni promjene koncentracije parabena u GLK-u dojke između bolesnih i zdravih žena. Ispitanice iz skupine redukcija nisu bile uključene u izračun smještaja tumora jer one nemaju tumore već hipertrofiju sveukupnog žljezdanog tkiva. Od ostalih kvadranta drugi po zastupljenosti je gornji medijalni kvadrant (GMK) (22,6 %). Iz razine signifikantnosti između zastupljenosti tumora u GMK-u kod bolesnih i zdravih žena, vrijednost Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,000 ($p < 0,05$), što znači da je uočena statistički značajna razlika. Promjene u GMK-u ima 26,5 % bolesnih i samo 4,3 % zdravih žena. Smjer nanošenja dezodoransa od pazuha prema medijalno moglo bi pružiti objašnjenje zašto je većina zloćudnih i dobroćudnih tumora smješteno u gornjem medijalnom i gornjem lateralnom kvadrantu.

Kod statističke obrade, 49 žena sa zloćudnim tumorom dojke razvrstano je u skupine s obzirom na dob. Mlađe bolesne ispitanice su u rasponu od 35 – 52 godine i starije od 53 na više godina. Navedena je podjela nastala prema prosječnoj dobi ulaska u menopauzu. Nije uočena statistički značajna razlika između mlađih i starijih bolesnica kod operirane strane dojke (0,582 ($p > 0,05$), operiranog kvadranta dojke (0,584 ($p > 0,05$), patohistološkog nalaza (0,275 ($p > 0,05$), multicentričnog smještaja tumora (1,000 ($p > 0,05$), TNM stadija (0,159 ($p > 0,05$), gradusa tumora (0,621 ($p > 0,05$), veličine tumora (više od 5 % ($p > 0,05$), ER i PgR receptora (više od 5 % ($p > 0,05$), Ki67 indeksa (0,594 ($p > 0,05$), HER2 ekspresije (0,691 ($p > 0,05$) te molekularnog tipa tumora (0,892 ($p > 0,05$).

Patohistološki nalaz odgovara objavljenoj znanstvenoj literaturi o histološkom tipu tumora. (72) U skupini bolesnih kod 43 ispitanice (85,7 %) utvrđeno je da su tumori bili duktalni invazivni karcinom bez karakteristika određenog tipa (IDC NOS), kod četiri ispitanice (8,2 %) utvrđen je lobularni invazivni karcinom (ILC), kod dvije (4,1 %) duktalni karcinom in situ (DCIS) te kod jedne (2,0 %) maligni filodes tumor dojke (phyllodes mammae). Kod sedam (14,3 %) ispitanica nađena je multicentrična smještenost tumora. U skupini bolesnih većina žena ima BIRADS kategoriju 5 (73,5 %).

Srednja vrijednost veličine tumora na patohistološkoj analizi kod zdravih je biopsija 22,23 cm (raspon 0,3 - 5,0 cm) a kod bolesnih 17,86 cm (raspon 1,2 - 3,8 cm). Signifikantnost Mann Whitneyjeva testa je veća od 0,05 što znači da nije uočena razlika između zdravih i bolesnih što se tiče veličine tumora.

Kod 3 ispitanice (6,1 %) tumori su bili TNM stadija 0 (Tis) , 27 ispitanica (55,1 %) stadija IA, 13 ispitanica (26,5 %) stadija IIA, 5 ispitanica (10,2 %) stadija IIB te jedna (2,0 %) stadija III A.

Zabilježeno je 11 (22,4 %) dobro diferenciranih tumora (niski gradus - G1), 30 (61,2 %) umjereno diferenciranih tumora (intermedijalni gradus - G2) te 7 (14,3 %) slabo diferenciranih tumora (visoki gradus - G3).

Negativni pazušni limfni čvorovi zabilježeni su u 40 (81,6 %), a pozitivni u 9 (18,4 %) bolesnica. Od broja pozitivnih limfnih čvorova 8 je ispitanica (16,4 %) bilo u N1 skupini i jedna (2,0 %) u N2.

Negativna je ekspresija HER2 0 i 1+ zabilježena kod 41 (83,7 %) bolesnice, umjerena HER2 2+ kod šest (12,2 %) te prekomjerna HER2 3+ kod dvije (4,1 %) bolesnice.

Parabeni se vežu za estrogenski receptor jezgre gdje mogu oponašati ili antagonizirati učinak endogenog estrogena što može utjecati na proliferaciju estrogen-osjetljivih stanica raka dojke. Također mogu utjecati na sintezu, transport, metabolizam i izlučivanje estrogena. (85) U ovome istraživanju nije uočena statistički značajna korelacija u usporedbi ekspresije estrogenskih (ER) i progesteronskih (PgR) receptora zloćudnog tumora i izmjerene koncentracije parabena iz urina i plazme bolesnih žena. Prosječna vrijednost ER receptora jezgre je 90,61, dok je prosječna vrijednost PgR receptora 68,65.

Nadalje, kada je u pitanju proliferacijski indeks Ki-67 može se uočiti kako je niski Ki67 < 10 bio kod pet (10,2 %), Ki-67 od 10 do 14 kod jedne (2,0 %) te Ki-67 od 15 do 19 kod 13 (26,5 %) bolesnica. Visoki Ki-67 od 20 do 24 ima šest (12,2 %) te Ki-67 ≥ 25% ima 24 (49,0 %) bolesnica. Prema molekularnoj klasifikaciji raka 12 bolesnica je svrstano u Luminal A (65,3 %), dok u Luminal B podtip spadaju 32 bolesnice (24,5 %). Jedna bolesnica (2,2 %) imala je basal-like trostruko negativan tumor.

Parabeni su otkriveni 20-ih godina prošloga stoljeća. Stoga su sve ispitanice na temelju godine rođenja bile izložene parabenima tijekom svojega života. Već sredinom 20. stoljeća parabeni se masovno koriste kao konzervansi u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji zbog svojih antimikrobnih i antigljivičnih svojstava, a najzastupljeniji su u kozmetičkim proizvodima. (42) Najčešće se kombinira uporaba nekoliko spojeva parabena da bi se postigla što veća učinkovitost. Učinkovitiji su protiv gljivica nego protiv bakterija, a najmanje su učinkoviti protiv skupine *Pseudomonasa*. Prosječna dnevna izloženost parabenima iznosi otprilike 76 mg odnosno 1,3 mg/kg/dan za osobu težine 70 kg. Na kozmetička sredstva i proizvode za osobnu higijenu otpada 50 mg, na lijekove i razne dodatke prehrani 25 mg i na hranu 1 mg. (56) Stoga *Upitnik za pacijentice* sadrži pitanja vezana uz uporabu glavnih izvora parabena, a to su kreme, dezodoransi i antiperspiranti.

Prema rezultatima iz Upitnika najčešće korištena kozmetička marka krema i dezodoransa je Nivea. Kod uporabe antiperspiranata većina ispitanica ih ne upotrebljava (65,3 %). Također nije uočena statistički značajna razlika uporabe između zdravih i bolesnih. Kreme za tijelo koristi 79,2% ukupnog broja ispitanica. Prosječna dob početka korištenja krema za tijelo značajno je starija za bolesne (24,29 godina) nego za zdrave žene (17,86 godina). No, s druge strane postoji statistički značajna razlika u učestalosti uporabe krema između bolesnih i zdravih gdje je veća učestalost kod zdravih (95,7 %) nego

bolesnih (71,4 %). Razlog tome može biti činjenica da su mlađe žene izloženije sveprisutnom oglašavanju proizvoda te svakodnevno provode njegu tijela što ih potencijalno stavlja u povećani rizik za budući razvoj raka dojke. Uporaba dezodoransa (66,7 %) i antiperspiranata (65 %) poprilično je jednaka za obje ispitivane skupine. Prosječna dob početka korištenja dezodoransa i antiperspiranata također je značajna za starije bolesne (19,98 godina) nego za zdrave žene (16,83 godine). Iako su bolesne žene počele kasnije koristiti kozmetičke proizvode one su duže razdoblje života njima bile izložene. Pogleda li se vrijednost signifikantnosti za ukupne godine izloženosti (korištenja) dezodoransa i kreme, može se uočiti kako p iznosi manje od 5 % ($p < 0,05$), dakle može se reći, s razinom pouzdanosti od 95 %, da postoji statistički značajna razlika između bolesnih i zdravih. Bolesne ispitanice duže koriste dezodoranse i kreme. Kod bolesnih prosječni broj godina izloženosti kremama je 32,97 godina, a za dezodoranse je 36,88. Kod zdravih prosječni broj godina izloženosti kremama je 22,14 godina, a za dezodoranse je 24,22. Dodatno značajno puno žena (80,6 %) odmah nakon brijanja pazuha stavlja dezodoranse i antiperspirante na kožu pazušne regije. Brijanjem se koža pazuha dodatno mehanički ozljeđuje što omogućava lakšu apsorpciju parabena.

Bolesne ispitanice duže koriste dezodoranse i kreme. Razlog tome je da su bolesne žene starije životne dobi i duže razdoblje života izložene kozmetičkim proizvodima pa tako i parabenima. To ih stavlja u skupinu povećanog rizika za razvoj raka dojke. S druge strane, zdrave žene su mlađe dobi, ranije kreću s uporabom kozmetičkih preparata i češće ih koriste. To bi mogao biti razlog zašto u današnje vrijeme sve više mlađih žena imaju dobroćudne promjene tkiva dojke (fibroadenome) koje treba kirurški liječiti. Također je poznato da se rak dojke najčešće javlja u dobi iznad 50 godina, no zabilježen je i porast incidencije u dobi mlađoj od 30 godina. (73) Upravo je pojavnost raka dojke u sve mlađoj dobi razlog istraživanja endokrinih disruptora i njihovog utjecaja na razvoj hormonski ovisnog raka. Navedeno dobije još više na značajnosti ako znamo da smo izloženi kumulativnom učinku endokrinih disruptora još od fetalnog razdoblja.

Od ostalih rizičnih čimbenika za razvoj raka dojke u odnosu na hormonsku nadomjesnu terapiju činjenica je da su zdrave žene mlađe dobi (41,04 godina) i većina ih nije ušla u menopauzu (77,6 %). Od 36 bolesnih žena koje su ušle u menopauzu samo njih 6 je koristilo hormonsku nadomjesnu terapiju (16,7 %). To pokazuje današnju tendenciju smanjenja uporabe nadomjesne hormonske terapije. No, u odnosu na uporabu kontracepcijskih pilula, zdrave i mlađe žene (30,4 %) češće su koristile pilule nego bolesne žene. Današnji pristup i seksualno obrazovanje dovodi do češće primjene kontracepcijskih pilula u mlađoj dobi.

Većina zdravih ispitanica nije bila trudna (43,5 %) iako je njihova prosječna dob 41,04 godina. Prosječni broj djece ostalih ispitanica je dvoje (41,7 %). Razina signifikantnosti Fisherovog egzaktnog testa od 0,072 ($p > 0,05$) u broju rođene djece između bolesnih i zdravih nije statistički značajna. Iz znanstvene literature vidljivo je da se Hrvatska u Europskoj uniji nalazi na prilično niskom 21. mjestu sa stopom fertiliteta od 1,4 posto. Najviše žena u Hrvatskoj prvo dijete rađa u dobi između 20 i 29 godina (53,4 %). Prosječna dob žena prvorotkinja u 2017. god. u EU bila je 29,1 godina. Zanimljivo je da je najveći udio majki koje su rodile četvero ili više djece zabilježen u Finskoj, Irskoj, Britaniji i Belgiji, također bogatijim europskim zemljama. Prosječna dob prvorotkinja ispitivane skupine doktorskoga rada je 24 godine za bolesne i 28 godina za zdrave žene, 5 ispitanica (6,9 %) bilo je podvrgnuto umjetnoj oplodnji.

Ukupno je 51 ispitanica dojila (70,8 %), od toga prosječno vrijeme dojenja kod bolesnih je šest mjeseci, a kod zdravih tri mjeseca. (Tablica 20.) Ipak, iz razine signifikantnosti kod dojenja se može uočiti kako vrijednost Fisherovog egzaktnog testa iznosi 0,026 ($p < 0,05$) što znači da su bolesne žene (79,6 %) češće dojile u odnosu na zdrave (52,2 %).

Od ukupnog broja ispitanica 59,7 % ima povijest pojavljivanja određene vrste raka u obitelji. Najčešći tipovi raka vezani su za rak dojke (32 %), od ostalih po učestalosti pojavljuju se rak pluća i grla, rak prostate, kolona, maternice te rak štitnjače. To ipak govori u prilog učestalijoj pojavnosti hormonski ovisnih tumora koji mogu biti pod utjecajem endokrinih disruptora. Iz razine signifikantnosti između povijesti pojavljivanja raka dojke u obitelji između bolesnih i zdravih, razvidna je vrijednost Fisherovog egzaktnog testa koja iznosi 0,789 ($p > 0,05$), dakle, nije uočena statistički značajna razlika među ispitanicama. Razlog sličnoj pojavnosti raka dojke među zdravima (34,8 %) i bolesnima (30,6 %) može se objasniti činjenicom da se zdrave žene s pozitivnom obiteljskom anamnezom češće kontroliraju i podvrgavaju kirurškim zahvatima biopsije dobroćudnih tumora dojke. Također, zabrinjavajući je podatak da 11 (22,4 %) od ukupno 49 bolesnih žena ima pozitivnu obiteljsku anamnezu za rak dojke u prvom koljenu (majka i/ili sestra), dok većina od 26,1 % zdravih žena ima pozitivnu obiteljsku anamnezu za rak dojke u drugom koljenu (baka i/ili teta).

Prosječni BMI indeks tjelesne mase je 26,42 kod bolesnica što odgovara kategorizaciji prekomjerne tjelesne mase s prosječnom visinom 164,61 cm i težinom 71,59 kg. Kod zdravih žena BMI je 24,97 što odgovara idealnoj težini s visinom 167,39 cm i težinom 69,74 kg.

Ispitanice su određivale razinu svoje svakodnevne fizičke aktivnosti prema skali od 1 do 10 gdje je 1 vrlo niska, 3 razina svakodневnih kućanskih poslova, a 10 visoka fizička aktivnost (profesionalni sport). Iz razine signifikantnosti Fisherovog egzaktnog testa od 0,150 ($p > 0,05$) između fizičke aktivnosti bolesnih i zdravih nije uočena statistički značajna razlika. No, postoji tendencija da zdrave žene imaju višu fizičku aktivnost, dok više od četvrtine bolesnih žena (28,6 %) ima nisku fizičku aktivnost 3/10. Navedeno dobije na još većem značaju ako uzmemo u obzir BMI zdravih i bolesnih žena. Postoji tendencija da bolesne žene imaju veću tjelesnu težinu i nižu fizičku aktivnost. Ako uzmemo u obzir da je masno tkivo glavno mjesto bioakumulacije parabena u organizmu dobit ćemo podatak da bolesne žene, osim svakodnevnog unošenja parabena, imaju i dodatni izvor bioakumuliranih parabena iz masnog tkiva. Navedeno je potvrđeno negativnom korelacijom koja je uočena kod bolesnih između varijabli fizička aktivnost i BMI ($r = -0,328$; $p < 0,05$), što znači ako je fizička aktivnost veća, BMI je manji. Također je uočena negativna korelacija između varijabli veličina tumora i fizička aktivnost gdje je veličina tumora bila veća kod bolesnih žena koje imaju manju fizičku aktivnost. Također, što je tumor bio veći, proliferacijski indeks Ki-67 je bio viši. To znači da žene koje su manje aktivne i imaju veću težinu imaju veće i agresivnije tumore. Uočeno je da više koncentracije parabena mogu imati i veći adipogeni utjecaj što dovodi do dodatne pretilosti i povećanja BMI indeksa. Razlog tome je činjenica da parabeni utječu na diferencijaciju adipocita. Konkretno, znanstvena je literatura pokazala da parabeni potiču adipogenezu u mišjim stanicama, proces pretvorbe multipotentnih matičnih stanica u zrele masne stanice. (63)

Ispitivanjem prehrambenih navika uočeno je da zdrave žene češće jedu meso i voće dok bolesne povrće. Kod ugljikohidrata nema razlike. Razlog tome može biti starija dob bolesnih pacijentica čije su navike rjeđe imati meso u tjednom planu prehrane i više unositi povrća. Zdrave žene su mlađe te u tjednom planu prehrane češće konzumiraju meso, fast food prehranu i razne dijete koje podržavaju veće količine voća. Upravo ovo govori u prilog koliko nam životni stil, marketing i konzumerizam može promijeniti prehrambene navike. No, u slučaju parabena izvor izloženosti su ipak većinom kozmetički proizvodi. CIR (Cosmetic Ingredient Review) panel predlaže da maksimalne dopuštene koncentracije parabena za dnevni unos budu od 142,08 mg za odrasle (3,024 mg/kg tjelesne težine) i 0,378 g za djecu (368 mg/kg tjelesne težine). (54)

U doktorskom radu primjenom nove, ekološki prihvatljive i jednostavne analitičke metode na bazi FPSE za selektivnu ekstrakciju parabena, mjere se i uspoređuju koncentracije nerazgrađenih parabena iz humanih uzoraka plazme, urina i tkiva ispitanica. Parabeni se mogu apsorbirati putem sluznice gastrointestinalnog sustava, kože, kose, noktiju, sluznice usana te vaginalne sluznice. Hidroliziraju se pomoću enzima esteraza u glavni metabolit p-hidroksibenzojevu kiselinu. Većina parabena bude hidrolizirana i nakon toga konjugirana te u tome obliku izlučena iz organizma, tek manji dio (0,2 – 0,9 %) ostane nerazgrađen. P-hidroksibenzojeva kiselina smatra se nespecifičnim biomarkerom za procjenu izloženosti jer je zajednički metabolit svih parabena. Zbog toga se preporučuje mjerenje slobodnih i konjugiranih oblika osnovnih spojeva. U doktorskom se radu mjere i uspoređuju koncentracije nerazgrađenih parabena iz humanih uzoraka te učestalost uporabe kozmetičkih proizvoda. Ispituje se sedam tipova parabena poredanih po veličini alkilnog lanca (od manjega prema većemu) - metilparaben (MPB), etilparaben (EPB), propilparaben (PPB), butilparaben (BPB), isopropilparaben (iPPB), isobutilparaben (iBPB) i benzilparaben (BzPB). Rad se temelji na činjenici da je glavni put apsorpcije parabena koža. Parabene nanese na kožu djelomično metaboliziraju četiri karboksil esteraze koje se nalaze u koži i potkožnom masnom tkivu. U znanstvenoj je literaturi navedeno da zbog individualnih razlika u aktivnosti enzima esteraza iz kože i povećane potrošnje kozmetičkih proizvoda hidroliza parabena nije potpuna te se mogu apsorbirati kao aktivni nerazgrađeni spojevi i cirkulirati organizmom. Tada djeluju kao ksenoestrogenske molekule te mogu utjecati na rad endokrinog sustava i razvoj raka dojke. (48) Dinamika apsorpcije parabena kroz kožu ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Zbog svoje lipofilnosti, parabeni se akumuliraju u koži, što neki autori smatraju uzrokom njihove toksičnosti i kancerogenosti. Što su parabeni zbog dužeg alkilnog lanca bili više lipofilni (BPB > PPB > EPB > MPB), manje su se apsorbirali putem kože (BPB < PPB < EPB < MPB). (123) U znanstvenoj se studiji uspoređuje apsorpcija kroz kožu za navedena četiri parabena nakon jednog i opetovanog nanošenja na kožu. Zaključak je da se nakon jednog nanošenja najbrže apsorbira metilparaben (MPB) iza kojega slijedi etilparaben (EPB), zatim propilparaben (PPB) i butilparaben (BPB). Nakon opetovanog nanošenja kozmetike ispitivani su parabeni imali značajno povećanje apsorpcije. U prva 24 sata nakon nanošenja kozmetičkih preparata oko 30 % metilparabena razgrađuje se u koži dok se ostali parabeni s dužim alkilnim lancem razgrađuju sporije. (48) U doktorskom radu istraživanje obuhvaća svih sedam tipova parabena poredanih po veličini alkilnog lanca.

Slijedi prikaz i rasprava rezultata izmjerenih koncentracija parabena prvo za plazmu, zatim za urin te tkivo ispitanica.

Ako želimo odgovoriti na pitanje mogu li parabeni utjecati na razvoj raka dojke moramo znati postoji li razlika u koncentraciji parabena između zdravih i bolesnih ispitanica. Iako je mali broj uzoraka, može se reći s razinom pouzdanosti od 95 % kako postoji statistički značajna razlika u koncentraciji parabena u plazmi između bolesnih i zdravih žena. Žene sa zloćudnim tumorima dojke imaju značajno veću koncentraciju parabena u plazmi. Kod njih je prosječna vrijednost ukupne sume svih parabena 190,1 ng/mL, dok za skupinu zdravih žena prosječna vrijednost sume parabena 85,56 ng/mL. Najveći doprinos ukupnoj sumi parabena u plazmi svih ispitanica čine MPB i EPB. Kod većine zdravih žena nađeni su samo MBP, EPB i IPPB, dok su iBPB i BzPB pronađeni u manjim koncentracijama. Kod bolesnih žena u većini uzoraka su osim MBP, EPB i IPPB nađeni i ostali parabeni dužeg lanca (PPB, iBPB i BzPB.) i to u značajno većim koncentracijama nego kod zdravih. Prema brzini apsorpcije kod zdravih žena prosječna koncentracija parabena za MPB je 60,3 ng/mL, EPB 50,0 ng/mL, IPPB 50,0 ng/mL, iBPB 50,0 ng/mL i BzPB 50,0 ng/mL. Kod bolesnih je prosječna koncentracija za MPB 77,0 ng/mL, EPB 35,0 ng/mL, IPPB 40,0 ng/mL, iBPB 112,5 ng/mL i BzPB 80,0 ng/mL. Postoji tendencija rasta koncentracija parabena u plazmi bolesnih s povećanjem alkilnog lanca. Iznimka je isobutilparaben (iBPB) koji je kod bolesnih (112,5 ng/mL) u značajno većoj koncentraciji nego kod zdravih (50,0 ng/mL). U obje skupine nije nađen butilparaben (BPB), dok je propilparaben (PPB) nađen samo kod bolesnih u prosječnoj koncentraciji od 20 ng/mL. Navedeno se potvrđuje u znanstvenoj literaturi rezultatima analize uzoraka plazme zdravih žena u postmenopauzi gdje su maksimalne razine koncentracije za MPB (142,9 ng/mL), EPB (45,9 ng/mL) i PPB (43,9 ng/mL). U navedenoj studiji kao niti u doktorskom radu nije nađen butilparaben (BPB). Također u studiji nije mjeren benzilparaben (BzPB) koji se u doktorskom radu pojavljuje u značajnoj koncentraciji kod bolesnih žena. (103)

S razinom pouzdanosti od 95 % navodi se da bolesne žene imaju značajno veću koncentraciju parabena u plazmi nego zdrave žene, što može poslužiti kao temelj za razvoj novoga dijagnostičkog laboratorijskog testa za procjenu rizika izloženosti parabenima. Proširenjem analize na sve 72 ispitanice mogao bi se postaviti dijagnostički „probni test“ mjerenja koncentracije parabena u urinu i krvi u općoj populaciji žena. Testom bi se procijenila potencijalna veća izloženost parabenima i njihovom ksenoestrogenskom učinku na endokrini sustav te time i povećani rizik za razvoj raka dojke.

U istraživanju na mladim zdravim muškarcima iz 2007. godine potvrđeno je da se parabeni mogu apsorbirati sustavno jer su nakon lokalne primjene na kožu pronađeni u sustavnom krvotoku i urinu. (48) U doktorskom radu nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji parabena u urinu između bolesnih i zdravih žena. Stoga se može donijeti zaključak da zdrave i bolesne žene imaju jednaku dinamiku izlučivanja parabena putem urina. Za skupinu bolesnih prosječna vrijednost parabena u urinu iznosi 245,5 ng/mL dok za skupinu zdravih žena prosječna vrijednost iznosi 298,9 ng/mL, pri čemu najveći doprinos ukupnoj količini parabena daje MPB i PPB. Također, najveća se koncentracija od svih ispitivanih parabena odnosi na MPB. Navedeno u znanstvenoj literaturi potvrđuju rezultati analize uzoraka urina zdrave populacije u SAD-u gdje su pronađene mjerljive razine MPB i PPB u više od 96 % uzoraka. Urinske su koncentracije parabena kod žena bile veće nego kod muškaraca što se pripisuje učestalijem korištenju kozmetičkih proizvoda. (51)

Usporedbom koncentracije parabena iz plazme i urina kod bolesnih žena dobije se negativna i značajna razina korelacije ($r = -0,634$; $p < 0,05$). Radi se o korelaciji srednjeg intenziteta gdje veća koncentracija parabena u plazmi podrazumijeva nižu (sličnu) koncentraciju parabena u urinu. I obrnuto, ako koncentracija parabena u urinu raste onda će se smanjiti koncentracija u plazmi. Bubrezi uvijek filtriraju parabene iz plazme jednakom dinamikom bez obzira na koncentraciju u plazmi. Štoviše, moguće je pretpostaviti da se prestankom nanošenja parabena na kožu može napraviti „detoksikacija organizma“ izlučivanjem putem urina. No, ako i dalje putem kože svakodnevno apsorbiramo parabene iz kozmetičkih proizvoda, njihova će koncentracija rasti samo u plazmi, dok će dinamika izlučivanja ostati ista. To znači ako koncentracija parabena u plazmi bolesnih raste i dalje će koncentracija izlučenog parabena putem urina biti niža (slična).

Osim jednake dinamike izlučivanja putem bubrega uzimamo u obzir i proces starenja organizma. Sa starenjem se mijenja konzistencija kože i ona postaje propustljivija dok se dinamika izlučivanja bubrezima smanjuje. U znanstvenoj je literaturi opisano da se za procjenu metabolizma i apsorpcije lijekova putem kože mogu koristiti metode validacije aktivnosti kožnih esteraza humanih keratinocita. Starenjem se smanjuje aktivnost estezara u tijelu. (124) Stoga je za pretpostaviti da se starenjem kože smanjuje aktivnost esteraza keratinocita gdje se sve veća količina nerazgrađenog parabena apsorbira putem kože. Isto tako, starenjem nastaju brojne bore zbog propadanja masnog tkiva ispod površinskih slojeva kože. U potkožnom se masnom tkivu također nalaze esteraze koje metaboliziraju parabene pa njihov manjak omogućuje još bržu apsorpciju nerazgrađenog parabena. Znanstvena literatura prikazuje na koji način bubrezi starenjem mijenjaju funkciju izlučivanja. (125) Izlučivanje lijekova bubrezima kao i njihovih metabolita smanjuje se kako starimo zbog funkcijskih i parenhimnih promjena. Od četvrtoga desetljeća života protok plazme kroz bubrege smanjuje se prosječno za oko 10 % po desetljeću. Stoga se može pretpostaviti da se dinamika apsorpcije i izlučivanja parabena mijenja ovisno o dobi žena. Starenjem se, zbog manjka esteraza kože, apsorbira više parabena i sporije se izlučuje zbog promjena parenhima bubrega. Navedeno dovodi do povećanja koncentracije nerazgrađenih parabena u plazmi.

U doktorskom se radu navodi da su bolesne ispitanice starije životne dobi s većom koncentracijom parabena u plazmi nego zdrave. Bolesne žene imaju stariju kožu i manjak esteraza te se stoga više nerazgrađenih parabena apsorbira u plazmu. Kako se starenjem smanjuje i izlučivanje bubrezima, time se koncentracija parabena u plazmi dodatno povećava. Danas žene i dalje svakodnevno nanose kozmetičke proizvode što dodatno povećava koncentraciju u plazmi. Zbog dokazane negativne korelacije između koncentracije parabena iz plazme i urina kod bolesnih može se zaključiti da bubrezi ipak neće dodatno više filtrirati bez obzira na veću koncentraciju u plazmi. Parabeni su se smatrali potpuno sigurnima za čovjeka sve dok pojedina istraživanja nisu ukazala na potencijalnu toksičnost. Prvi je put na takvu mogućnost ukazano 1998. godine kada je ispitivanjem na miševima uočena ksestrogenost parabena, tj. mogućnost da djeluju kao kompetitivni agonisti estrogenskih receptora i tako utječu na razvoj raka dojke. (41) Sve navedeno potvrđuje hipotezu doktorskog rada gdje bolesne starije žene imaju više nerazgrađenih parabena koje cirkuliraju krvi (plazmom) te tako mogu imati učinak na estrogenske receptore žljezdanih stanica dojke i potaknuti njihovu proliferaciju.

Usporedbom koncentracije parabena iz plazme i urina s podacima o životnom stilu ispitanica, uporabi kozmetičkih proizvoda, rizičnim čimbenicima za razvoj raka dojke te patohistološkim nalazom, dobije se statistička značajnost samo za dob menarhe i menopauze. To su inače dva glavna rizična čimbenika za razvoj raka dojke koji ovise o koncentraciji endogenog estrogena. Što žena ranije dobije menstruaciju i kasnije je izgubi, to će duže razdoblje života biti izložena endogenom estrogenu koji može utjecati na proliferaciju stanica dojke. Kako parabeni rade mimikriju estrogena tako mogu potencijalno mijenjati dob za menarhu i menopauzu. U doktorskom radu prosječna dob za menarhu od 13 godina jednaka je za bolesne i zdrave ispitanice, dok je prosječna dob za menopauzu 50 godina. Negativna korelacija uočena je kod bolesnih između varijabli koncentracija parabena u plazmi i dob menopauze ($r = -0,873$; $p < 0,05$). Porastom koncentracije parabena u plazmi, žene s rakom dojke ranije ulaze u menopauzu. Naglašavam da se radi o korelaciji jakoga intenziteta koja bi mogla upozoriti na činjenicu da izloženost parabenima može mijenjati prirodni tijek ulaska u menopauzu. Veća koncentracija cirkulirajućih ksenoestrogena može dovesti do ranije pojave menopauze. Isto se potvrdilo i pozitivnom korelacijom između varijabli fizička aktivnost i dob menopauze ($r = 0,361$; $p < 0,05$). Ako je fizička aktivnost intenzivnija tada je dob ulaska u menopauzu kasnija. Slijedom toga, veća fizička aktivnost znači manji BMI i manju količinu masnog tkiva u kojemu se akumuliraju endogeni estrogene i parabeni koji mogu ometati normalni rad endokrinog sustava. Stoga, ženino tijelo može ući u prirodnu menopauzu u kasnijoj dobi ako se bavi fizičkom aktivnošću.

Prije rasprave o analizi parabena iz tkiva razmotrimo sažeti opis ispitivane skupine dokorskog rada. Prosječna dob žena sa zloćudnom bolešću dojke je 58 godina (u rasponu od 35 do 84 godine), s prosječnom godinom rođenja 1960. Većina ispitanica (85,7 %) ima duktalni invazivni karcinom bez karakteristika određenog tipa (IDC NOS), srednje veličine tumora 17,86 cm (raspon 1,2 - 3,8 cm), od kojih je 55,1 % stadij IA. Prosječna dob zdravih je 41 godina (u rasponu od 20 do 64 godine) s prosječnom godinom rođenja 1977. Patohistološki nalaz za redukcije odgovara dobroćudnoj fibrocističnoj mastopatiji (FCM). Za biopsije patohistološki nalaz odgovara fibroadenom (FA), srednje veličine tumora 22,23 cm (raspon 0,3 - 5,0 cm). Statistički je dokazano da veličina zloćudnog tumora ili fibroadenoma nije u korelaciji s koncentracijom parabena u plazmi i urinu. Zabrinjavajući je podatak da čak oko četvrtina bolesnih žena (22,4 %) ima pozitivnu obiteljsku anamnezu za rak dojke u prvom koljenu (majka i/ili sestra), dok većina (26,1 %) zdravih ima pozitivnu obiteljsku anamnezu za rak dojke u drugom koljenu (baka i/ili teta). To se može objasniti činjenicom da se zdrave žene s pozitivnom obiteljskom anamnezom češće kontroliraju i podvrgavaju kirurškim zahvatima biopsije dobroćudnih tumora dojke. Od ostalih rizičnih faktora za razvoj raka dojke jedino se za menopauzu našla korelacija jakoga intenziteta koja bi mogla upozoriti da izloženost parabenima može mijenjati prirodni tijek ulaska u menopauzu. Dokazano je da porastom koncentracije parabena u plazmi, žene s rakom dojke ranije ulaze u menopauzu.

Zdrave žene više su fizički aktivne, dok čak četvrtina bolesnih (28,6 %) ima nisku fizičku aktivnost. Također je uočena negativna korelacija gdje bolesne žene s manjom fizičkom aktivnošću imaju veće tumore s višim proliferacijskim Ki-67 indeksom. Bolesne žene imaju i veću tjelesnu težinu (BMI). To znači da žene koje su manje aktivne i imaju veću težinu imaju veće i agresivnije tumore. Od

ukupnog broja ispitanica, 97,2 % su dešnjakinje te postoji tendencija da lijeva dojka bude češće sijelo zloćudnog ili dobroćudnog tumora. Iako je lijeva dojka češće zahvaćena, nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji parabena između lijeve i desne dojke kod iste zdrave ispitanice podvrgnute redukciji. Osim toga, najčešće sijelo zloćudnog tumora i dobroćudnog fibroadenoma dojke je gornji lateralni kvadrant (61,3 %) iza kojega slijedi gornji medijalni kvadrant (22,6 %). Smjer nanošenja dezodoransa od pazuha prema medijalno mogao bi objasniti zašto je više tumora u gornjem medijalnom i gornjem lateralnom kvadrantu. Značajno puno žena (80,6 %) odmah nakon brijanja stavlja dezodoranse i antiperspirante na kožu pazušne regije koji se zbog mehaničke ozljede lakše apsorbiraju..

Zdrave žene ranije počinju koristiti kozmetičke preparate, prosječna dob je od 16,8 godina te ih češće koriste od bolesnih. Prosječna dob početka korištenja kod bolesnih je 19,98 godina. Razlog tome može biti činjenica da su mlađe žene izloženije sveprisutnom oglašavanju kozmetičkih proizvoda te ih svakodnevno koriste, što ih potencijalno stavlja u skupinu povećanog rizika za budući razvoj raka dojke. No, bolesne ispitanice ipak duže godina koriste kozmetičke preparate jer je prosječni broj godina izloženosti dezodoransima kod njih 36, dok je kod zdravih 24 godine.

Kako su bolesne ispitanice starije i duže su razdoblje života izložene kozmetičkim proizvodima s parabenima, tada bi i koncentracija parabena u njihovim uzorcima trebala biti veća. No, rezultati analize pokazuju drugačije. Glavni put izlučivanja parabena su bubrezi. U doktorskom radu navedeno je da zdrave žene (prosječna vrijednost parabena u urinu je 298,9 ng/mL) i bolesne (245,5 ng/mL) imaju jednaku dinamiku izlučivanja parabena putem urina, pri čemu najveći doprinos ukupnoj sumi parabena daje metilparaben (MPB) i propilparaben (PPB). No, pronađena je razlika ako se zdrave žene gledaju zasebno. Koncentracije parabena u urinu zdravih biopsija ima tendenciju da bude veća nego kod redukcija i bolesnih žena.

Glavni put apsorpcije parabena je koža. Što su parabeni dužeg alkilnog lanca to su više lipofilni (BPB > PPB > EPB > MPB) i sporije se apsorbiraju putem kože (BPB < PPB < EPB < MPB). Nakon apsorpcije parabeni kao aktivni nerazgrađeni ksenoestrogenski spojevi cirkuliraju našom krvi (plazmom) te utjecajem na rad endokrinog sustava mogu dovesti do razvoja raka dojke. U doktorskom je radu dokazano s razinom pouzdanosti od 95 % da žene sa zloćudnim tumorima dojke imaju značajno veću koncentraciju parabena u plazmi (190,1 ng/mL) za razliku od zdravih (85,56 ng/mL). Dokazana je i pozitivna korelacija između dobi bolesnih ispitanica i koncentracije parabena u plazmi. Što je žena sa zloćudnim tumorom dojke starija, to će imati više parabena u plazmi. Bolesne žene imaju stariju kožu i manjak esteraza, stoga se više nerazgrađenih parabena apsorbira u plazmu. Bez obzira na veću koncentraciju parabena u plazmi bolesnih, zbog negativne korelacije, koncentracija će parabena u urinu uvijek biti niža (slična). Sve navedeno potvrđuje hipotezu da bolesne starije žene imaju više nerazgrađenih parabena koje cirkuliraju krvi (plazmom) te tako mogu imati učinak na estrogenske receptore žljezdanih stanica dojke i potaknuti njihovu proliferaciju.

Osim razlike u ukupnoj koncentraciji parabena u plazmi između bolesnih (190,1 ng/mL) i zdravih (85,56 ng/mL), postoji i razlika u koncentraciji pojedinih parabena. Najveći doprinos ukupnoj

koncentraciji parabena u plazmi svih ispitanica čine metilparaben (MPB) i etilparaben (EPB). Kod zdravih žena nađeni su većinom MBP, EPB i IPPB. Apsorpcija kod zdravih žena slijedi pravilo lipofilnosti gdje se najviše apsorbira MPB (60,3 ng/mL) > EPB (50,0 ng/mL) > IPPB (44 ng/mL). Tko se prije apsorbira veća će mu biti koncentracija u plazmi zdravih. Kod bolesnih žena ta se pravilnost ne prati. Kod bolesnih žena u većini uzoraka plazme osim MBP, EPB i IPPB nađeni su i ostali parabeni dužeg lanca (PPB, iBPB i BzPB.) i to u značajno većim koncentracijama nego kod zdravih. Postoji tendencija da koncentracija parabena u plazmi bolesnih raste s povećanjem alkilnog lanca. Iznimka je isobutilparaben (iBPB) koji je kod bolesnih (112,5 ng/mL) u značajno većoj koncentraciji nego kod zdravih (50,0 ng/mL).

Kako je samo je 5 % raka dojke vezano za genetsku predispoziciju (nasljedna mutacija tumorskog supresorskog gena BRCA1 i BRCA2) ostaje 95 % sporadične pojavnosti raka zbog nepoznatog uzroka. Najsigurniji rizični čimbenik kod sporadičnog raka dojke je duljina ekspozicije prema endogenim estrogenima tijekom života, odnosno prosječna razina koncentracije estrogena i broj menstruacijskih ciklusa tijekom života. U višoj koncentraciji estrogeni su kancerogeni te povećavaju stanično oksidativno oštećenje DNK molekule. Estrogenski receptori izolirani su u zloćudnim tumorima ženskog reproduktivnog sustava. Djelujući na receptore u stanicama hormonski ovisnog raka dojke estrogen potiče rast, metastaziranje i zloćudno ponašanje raka. (37) Parabeni se vežu za estrogenske receptore jezgre gdje mogu oponašati ili antagonizirati učinak endogenog estrogena. Iako su parabeni nazvani „slabi estrogeni“, in vitro studije pokazuju da učinak može biti jednak 17β estradiolu ako se nalaze u dovoljnoj koncentraciji. Stoga svakodnevno korištenje preparata koji sadrže parabene moglo bi imati svoj kumulativni učinak. Studije na MCF 7 stanicama raka dojke dokazuju da parabeni mogu potaknuti proliferaciju estrogen-osjetljivih stanica raka dojke. (94, 95) Druga je studija otkrila da dugotrajna izloženost metilparabenu, propilparabenu i butilparabenu može in vitro povećati migracijska i invazivna svojstva stanica raka dojke. (96) Povećanje dužine alkilnog lanca dovodi do povećavanja estrogenosti parabena, tj. lakšeg prodora u stanicu zbog većeg afiniteta za receptore. (41) Parabeni s dužim ili većim lancima ugljika, poput butilparabena i benzilparabena, bit će učinkovitiji pri prodoru kroz staničnu membranu. (87) No dokazano je da metilparaben ipak utječe na više gena nego butilparaben. Postavlja se pitanje koji je od ta dva parabena slabiji estrogen, jer zna se da butilparaben ima veći afinitet vezanja za receptore, a metilparaben kvalitativno sličniji učinak 17β estradiolu.

Upravo u doktorskom radu analizom prisutnosti parabena u tkivima ispitanica imamo priliku pratiti put učinka parabena. Prvo znamo da se apsorbira kroz kožu u plazmu gdje cirkulira kao aktivni nerazgrađeni ksenoestrogenski spoj i veže se za estrogenske receptore jezgre tkiva dojke. Određivanjem koncentracije i vrste parabena u urinu, plazmi i tkivu dojke ispitanica možemo naći razliku između zdravih i bolesnih. Dokazalo se da je koncentracija parabena u urinu jednaka između zdravih i bolesnih, no u plazmi bolesnih značajno je veća. Nakon što bolesne žene imaju veću koncentraciju cirkulirajućih parabena u plazmi očekuje se da će koncentracija u tkivu GLK-a dojke također biti najveća za bolesne. No, rezultati su pokazali drugačije. Bolesne žene iako imaju veću koncentraciju svih parabena u plazmi, imaju manju koncentraciju u tkivu od zdravih. Zloćudni tumor dojke smješten u GLK ima manju ukupnu koncentraciju parabena (1,2 ng/mg) nego tkivo fibroadenoma zdrave žene (2,15

ng/mg) iz istog kvadranta. Najnižu koncentraciju imaju zdrave žene s redukcijom dojki (0,60 ng/mg). Bolesne žene su starije životne dobi i duže su razdoblje života izložene parabenima i imaju značajno veću koncentraciju parabena u plazmi nego zdrave žene. S druge strane, zdrave žene su mlađe dobi, ranije kreću s uporabom kozmetičkih preparata i češće ih koriste što povećava kumulativni učinak parabena. To bi mogao biti razlog zašto u današnje vrijeme sve više mlađih žena imaju dobroćudne promjene tkiva dojke (fibroadenome) koje treba kirurški liječiti. Također istraživanja prikazuju da se rak dojke najčešće javlja u dobi iznad 50 godina, no zabilježen je i porast incidencije u dobi mlađoj od 30 godina (73). Upravo je pojavnost raka dojke u sve mlađoj dobi razlog istraživanja kumulativnog učinka endokrinih disruptora kojima smo izloženi još od fetalnog razdoblja.

U doktorskom radu, što se tiče pojedinačnih parabena, nađena je najveća prosječna vrijednost EPB (0,88 ng/mg) u tkivu fibroadenoma zdravih i benzilparabena (BzPB) (0,26 ng/mg) u tkivu GLK-a oko ležišta zloćudnog tumora bolesnih žena. Bolesne žene imaju statistički dokazanu značajno višu koncentraciju BzPB u tkivu GLK-a dojke. To indicira mogućnost upotrebe BzPB kao dijagnostičkog pokazatelja/markera za procjenu veće izloženosti parabenima. Veća koncentracija BzPB u tkivu GLK-a bolesnih žena može značiti povećani rizik za razvoj zloćudnog tumora u tom kvadrantu. Navedeno bi poslužilo preventivnom određivanju skupine žena s povećanim rizikom za razvoj raka dojke jer sve zdrave ispitanice imaju statistički dokazano značajno nižu koncentraciju BzPB u GLK-u dojke i to u tkivu fibroadenoma kod biopsija i fibrocističnom tkivu kod redukcija.

Kod bolesnih se ispitanica koncentracije parabena analiziraju iz tkiva zloćudnog tumora, tkiva GLK-a oko ležišta zloćudnog tumora te iz aksile (masnog tkiva oko limfnih čvorova pazušne regije, bilo da je sentinel čvor ili dio limfadenektomije). Postoji tendencija da se gradijent koncentracije između tih tkiva pravilno penje. Dokazano je da se najveća koncentracija parabena nalazi u samom zloćudnom tumorskom tkivu kojega slijedi koncentracija u aksili iz masnog tkiva oko limfnih čvorova dok se najmanja nalazi u tkivu GLK-a oko ležišta zloćudnog tumora. Koncentracija je parabena u zloćudnom tkivu i aksili slična i uvijek viša nego koncentracija u kvadrantu dojke gdje je tumor smješten. To potvrđuje hipotezu da se paraben iz dezodoransa u najvećoj koncentraciji nalaze u pazušnoj regiji. Tome dodamo i činjenicu da većina žena nanosi dezodoranse direktno na oštećenu kožu odmah nakon brijanja pazušne regije što povećava njegovu apsorpciju. Povećana koncentracija u gornjim kvadrantima dojke može značiti ili da paraben migriraju putem kože iz pazušne regije prema medijalno ili da se putem plazme apsorbiraju u većoj koncentraciji. Hipoteza o mehaničkoj migraciji je izglednija nakon uvida u podatke iz doktorskoga rada. Nakon usporedbe koncentracije u tkivima s koncentracijom parabena iz urina i plazme, patohistološkom analizom tkiva, godinama izloženosti parabenima te početkom menarhe i menopauze, statistički se pokazala značajna samo koncentracija parabena u aksili. Negativna korelacija nađena je između prosječne ekspresije progesteronskih receptora (PgR) i koncentracije parabena u aksili. Što je veća koncentracija parabena u masnom tkivu pazušne regije to je ekspresija progesteronskih receptora na zloćudnom tumoru manja. Negativna je korelacija nađena je za dob za menarhu i koncentraciju parabena u aksili. Što je veća koncentracija parabena u masnom tkivu pazušne regije to je bolesna žena ranije dobila menarhu.

Znanstvena literatura navodi da definicija otrovanja farmaceutskim lijekovima predstavlja bolest izazvanu otrovima koje su s obzirom na kvalitetu, količinu ili koncentraciju tijelu strane, a unesene na bilo koji način u tijelo, djeluju kemijski ili fizikalno-kemijski te remete anatomske ustroj ili funkcijski sklad organa. (125) Otrovom smatramo tvar čiji su učinci na organizam štetni ili opasni, neovisno o tome jesu li povratni ili nepovratni. Ovo znači da neka tvar pri određenoj dozi može biti lijek, no ako se doza povećava mogu se pojaviti ili pojačati štetni učinci pri kojima postaje otrovom za organizam. Može se reći kako je svaka tvar otrov u prikladnim okolnostima. Na temelju dokaza iz doktorskog rada postavlja se znanstveno pitanje mogu li parabeni u prikladnim okolnostima biti uzrokom povećane incidencije fibroadenoma u mladih žena? Rezultati pokazuju da tkivo fibroadenoma ima najveću koncentraciju parabena i da koncentracija parabena u urinu zdravih biopsija ima tendenciju biti veća nego kod redukcija i bolesnih žena. Sljedeće znanstveno pitanje je može li dugogodišnja izloženost parabenima imati za posljedicu povećani rizik za razvoj raka dojke? Rezultati pokazuju da su žene sa zloćudnim tumorom dojke starije životne dobi i imaju stariju kožu s manjkom esteraza, stoga više nerazgrađenih parabena apsorbiraju u plazmu. Dinamika izlučivanja bubrezima uvijek je manja (slična) i neovisna o povećanoj koncentraciji parabena u plazmi. Dokazano je da se isobutilparaben (iBPB) nalazi u plazmi bolesnih u značajno većoj koncentraciji nego kod zdravih. Bolesne žene imaju i statistički dokazanu značajno višu koncentraciju benzilparabena (BzPB) u tkivu GLK-a dojke kao i više nerazgrađenih parabena u plazmi koji mogu imati učinak na estrogenske receptore žljezdanih stanica dojke i potaknuti njihovu proliferaciju. Zato se postavlja pitanje svrstavaju li se parabeni u otrove? Otrovom se smatra ako brzina apsorpcije nadmaši brzinu izlučivanja ili se apsorbirana tvar samo djelomično izlučuje ili razgrađuje, on će se u tijelu nakupljati i raspodijeliti po različitim tkivima. Ovo se naziva kumulativnim učinkom. Rezultati doktorskog rada postavljaju temelj za razmatranje bioakumulativnog učinka parabena jer brzina apsorpcije parabena nadmašuje njegovo izlučivanje. Dokazano je da bolesne i zdrave žene imaju istu dinamiku izlučivanja parabena putem urina ali svakodnevno nanošenje kroz duže razdoblje dovodi do povećane koncentracije nerazgrađenog parabena u plazmi bolesnih. Uočeno je i da bolesne žene s manjom fizičkom aktivnošću imaju veće tumore s višim proliferacijskim Ki-67 indeksom. Bolesne žene imaju i veću tjelesnu težinu (BMI). To znači da manje aktivne žene s većom težinom imaju veće i agresivnije tumore. Ako se tome doda i mogući pojačani sinergijski učinak parabena izazvan djelovanjem nanoplastike, tada rezultati postaju dodatno zabrinjavajući. Osim bioakumulacije i ksenoestrogenskog utjecaja na endokrini sustav parabeni mogu pojačati svoj učinak na proliferacijsku aktivnost u stanicama raka dojke sinergijom s nanoplastikom. Protumorska se aktivnost stanica raka dojke osjetljivih na estrogen može očekivati kao konačni ishod dugotrajnoj izloženosti takvom kemijskom koktelu

Iako je mali broj uzoraka, dokazano je s pouzdanošću od 95 % da žene sa zloćudnim tumorima dojke imaju značajno veću koncentraciju parabena u uzorcima. Upravo ovo predstavlja imperativ provedbe daljnjih istraživanja na sveukupnoj ispitivanoj skupini u skladu s budućim prikupljenim financijama. Inovativni korak u istraživanju utjecaja „učinka mješavine“ endokrinih disruptora na zdravlje također predstavlja aktualno znanstveno pitanje o kojemu će se tek raspravljati na budućim zasjedanjima Europske unije na temu zaštite potrošača od endokrinih disruptora. S obzirom na izazove i manjak do sada objavljenih istraživanja, navedeni preliminarni rezultati predstavljaju značajne

smjernice za daljnja istraživanja utjecaja endokrinih disruptora na razvoj raka što odgovara projektnim pozivima međunarodnih i europskih inicijativa.

Sposobnost parabena da djeluju putem staničnih receptora u niskim koncentracijama, često uz individualni stanični odgovor na dozu, male mjerljive doze u organizmu, pitanje potrebe za dugotrajnom izloženošću te mogućeg efekta sinergijskog učinka („učinak mješavine” ili „učinak koktela”) predstavlja značajan izazov za procjenu rizika za ljudsko zdravlje. Stoga je znanstveni doprinos doktorskoga rada neupitan jer do sada nije napravljena tako opsežna prospektivna studija procjene utjecaja endokrinih disruptora na zdravlje ljudi. Rezultati doktorskog rada pružaju utemeljene znanstvene dokaze o: in vivo prisutnosti parabena u zloćudno promijenjenom tumoru dojke, razlikama u koncentraciji parabena između uzoraka tkiva, urina i plazme zdravih i bolesnih žena te in vitro proliferaciji stanica raka dojke pod utjecajem „učinka mješavine/koktela” mikroplastike i parabena. Navedeno je od široke aplikativne primjene obzirom na moderni stil života koji uključuje svakodnevnu uporabu kozmetičkih proizvoda s potvrđenim negativnim ili barem diskutabilnim utjecajem na zdravlje u cjelini. Dugogodišnja izloženost parabenima kao i mogućnosti prevencije pojave bolesti izazovi su koji su u fokusu aktivnosti relevantnih svjetskih i europskih organizacija i inicijativa. Upravo se iz navedenih razloga pristupilo ovome istraživanju, a dobivene spoznaje mogu biti od koristi prilikom osmišljavanja i provođenja preventivnih aktivnosti sa ciljem smanjenja incidencije raka dojke, ranijem otkrivanju i uspješnijem liječenju. Istraživanje je uspoređivalo spoznaje o svakodnevnim navikama ispitanica, posebice u dijelu korištenja kozmetičkih proizvoda s izmjerenim koncentracijama parabena iz njihovih uzoraka tkiva, plazme i urina. Obzirom da gotovo 80 % ispitanica koristi dezodoranse, kreme i antiperspirante te da su statistički značajne razlike pronađene u koncentraciji parabena u tkivu, urinu i plazmi, ove je rezultate potrebno poglavito usmjeriti na prevenciju raka dojke. Koncept promocije zdravlja proces je informiranja i osposobljavanja pojedinca u svrhu zaštite njegovog zdravlja. Kampanje podizanja svijesti o uporabi provjerenih i kvalitetnih kozmetičkih proizvoda kao i lobiranje kod kozmetičkih korporacija na usmjeravanje industrije na uporabu manje štetnih konzervansa, također su značajna područja aktivnosti.

Glavna težnja zdravstvene zaštite pojedinca nije u liječenju bolesti već u sveukupnoj prevenciji njezinog nastanka. Začarani krug izloženosti endokrinim disruptorima nastaje otpuštanjem velike količine industrijskog, građevinskog i farmaceutske otpada i plastike u mora, rijeke, poljoprivredna tla koji tako ulaze u povrće i voće, životinje, vode za piće te u budućnosti vjerojatno i zrak. Važno je provoditi mjere zaštite pojedinca, ali i planeta Zemlje smanjenjem proizvodnje koja ometa rad endokrinog sustava i boljim gospodarenjem otpadom.

7 ZAKLJUČAK

1. Koncentracija parabena povišena je u plazmi kod žena sa zloćudnim tumorom dojke u usporedbi s koncentracijom parabena u plazmi zdravih žena. S razinom pouzdanosti od 95% dokazano je da žene sa zloćudnim tumorima dojke imaju značajno veću koncentraciju parabena u plazmi (190,1 ng/mL) za razliku od zdravih žena (85,56 ng/mL).
2. Najveći doprinos ukupnoj koncentraciji parabena u plazmi svih ispitanica daje metilparaben (MPB) i etilparaben (EPB). Kod žena sa zloćudnim tumorom dojke osim MPB i EPB nađeni su i ostali parabeni dužeg lanca i to u većim koncentracijama nego kod zdravih. Isobutilparaben (iBPB) je kod žena sa zloćudnim tumorom dojke (112.5 ng/mL) u značajno većoj koncentraciji nego kod zdravih žena (50.0 ng/mL).
3. Dokazana je pozitivna korelacija između dobi žena sa zloćudnim tumorom dojke i koncentracije parabena u plazmi. Žene sa zloćudnim tumorom dojke starije životne dobi imaju veću koncentraciju parabena u plazmi nego mlađe žene sa zloćudnim tumorom dojke.
4. Koncentracija izlučenog parabena u urinu slična je za zdrave žene i žene sa zloćudnim tumorom dojke
5. Postoji tendencija da zdrave žene (prosječna vrijednost parabena u urinu je 298,9 ng/mL) i žene sa zloćudnim tumorom dojke (prosječna vrijednost parabena u urinu je 245,5 ng/mL) imaju jednaku dinamiku izlučivanja parabena putem bubrega.
6. Najveći doprinos ukupnoj koncentraciji parabena u urinu svih ispitanica daje metilparaben (MPB) i propilparaben (PPB).
7. Od svih uzoraka tkiva dojke najveću koncentraciju parabena ima dobroćudno tkivo fibroadenoma zdrave žene iza koje slijedi koncentracija u tkivu zloćudnog tumora dojke. Zloćudni tumor dojke smješten u GLK-u ima manju ukupnu koncentraciju parabena (1,2 ng/mg) nego tkivo fibroadenoma zdrave žene (2,15 ng/mg) iz istog kvadranta. Najnižu koncentraciju parabena ima dobroćudno fibrocistično tkivo zdrave žene s redukcijom dojki (0,60 ng/mg).
8. Zabrinjavajući je podatak da je najveća koncentracija parabena u tkivu fibroadenoma, jer akumulacijom parabena tijekom života žljezdane stanice mogu dodatno proliferirati i postati maligne. Pojavnost raka dojke u sve mlađoj dobi razlog je zašto je potrebno istraživati kumulativni učinak endokrinih disruptora kojima smo izloženi još od fetalnog razdoblja.
9. Najveća koncentracija pojedinačnih parabena u tkivima nađena je kod zdravih žena za etilparaben (EPB) (0,88 ng/mg) u tkivu fibroadenoma i kod žena sa zloćudnim tumorom dojke za benzilparaben (BzPB) (0,26 ng/mg) u tkivu GLK-a oko ležišta zloćudnog tumora. Bolesne žene imaju statistički dokazanu značajno višu koncentraciju BzPB u tkivu GLK-a dojke.

10. Postoji tendencija pojavljivanja pravilnog gradijenta koncentracije između tkiva dojke žene sa zloćudnim tumorom dojke. Dokazano je da se najveća koncentracija parabena nalazi u samom zloćudnom tumorskom tkivu iza koje slijedi koncentracija iz masnog tkiva oko limfnih čvorova pazušne regije. Najmanja koncentracija parabena nalazi se u tkivu GLK-a oko ležišta zloćudnog tumora. Također su slične koncentracije parabena u zloćudnom tkivu i pazušnoj regiji i uvijek su više nego koncentracija u kvadrantu dojke gdje je tumor smješten.
11. Kod žena sa zloćudnim tumorom dojke postoji statistički značajna povezanost između koncentracije parabena u masnom tkivu oko limfnih čvorova pazušne regije i ekspresije progesteronskih receptora (PgR). Što je veća koncentracija parabena u masnom tkivu pazušne regije to je ekspresija progesteronskih receptora na zloćudnom tumoru manja.
12. Kod žena sa zloćudnim tumorom dojke postoji statistički značajna povezanost između koncentracije parabena u masnom tkivu oko limfnih čvorova pazušne regije i dobi za menarhu. Što je veća koncentracija parabena u masnom tkivu pazušne regije to je žena sa zloćudnim tumorom dojke ranije dobila meharhu.
13. Veličina zloćudnog tumora ili dobroćudnog fibroadenoma nije u statističkoj korelaciji s koncentracijom parabena u plazmi i urinu. Navedeno je znanstveno utemeljeno jer manji zloćudni tumori dojke mogu zbog svojih patohistoloških karakteristika imati maligniji tijek nego veliki tumori. Stoga se pretpostavlja da određeni parabeni svojom lipofilnošću, a ne samo povećanom koncentracijom, mogu poticati proliferaciju stanica raka.
14. Žene sa zloćudnim tumorom dojke koje su manje aktivne i imaju veću tjelesnu težinu (BMI), imaju također veće tumore s višim proliferacijskim Ki-67 indeksom. Ako uzmemo u obzir da je masno tkivo glavno mjesto bioakumulacije parabena u organizmu, dobit ćemo podatak da bolesne žene, osim svakodnevnog unošenja parabena putem kože, imaju i dodatni izvor bioakumuliranih parabena iz masnog tkiva.
15. Zdrave žene ranije počinju koristiti kozmetičke preparate, čak u prosječnoj dobi od 16 godina te ih češće koriste. Prosječna dob početka korištenja kod žena sa zloćudnim tumorom dojke je 19 godina.
16. Žene sa zloćudnim tumorom dojke duže razdoblje koriste kozmetičke preparate jer je prosječni broj godina izloženosti dezodoransima kod njih 36, dok je kod zdravih 24 godine.
17. Nova, ekološki prihvatljiva i jednostavna metoda ekstrakcije parabena pomoću membrane adsorpcijske tekstilne faze (FPSE, engl. Fabric-Phase Sorptive Extraction) prikladna je i učinkovita za ekstrakciju parabena.
18. Parabeni sinergijski potaknuti („učinak mješavine” ili „učinak koktela”) prisutnošću plastičnih nanočestica pojačavaju proliferacijsku aktivnost stanica raka dojke osjetljivih na estrogene.

8 SAŽETAK

Promjene koncentracije parabena u gornjem lateralnom kvadrantu dojke u žena sa zloćudnim tumorom dojke

Svrha rada: Utvrditi postoji li statistički značajna razlika u koncentraciji parabena u urinu, krvi i tkivu dojke između zdravih žena i žena sa zloćudnim tumorima dojke. Utvrditi učinak mješavine endokrinih disruptora, parabena i plastičnih nanočestica na proliferacijsku aktivnost humanih stanica raka dojke.

Metode: U istraživanje su uključene 72 ispitanice, 49 žena sa zloćudnim tumorom dojke i 23 zdrave žene. Analizirana su sociodemografska obilježja, antropometrijske mjere, čimbenici rizika za razvoj raka, životne navike i učestalost primjene kozmetičkih proizvoda. Rezultati se uspoređuju s koncentracijama parabena iz humanih uzoraka. Sinergijski učinak koktela parabena i nanoplastike procjenjuje se na temelju proliferacije MDA-MB 231 te MCF-7 stanične linije raka dojke.

Rezultat: S razinom pouzdanosti od 95% dokazano je da žene sa zloćudnim tumorima dojke u GLK-u imaju značajno veću koncentraciju parabena u plazmi. Statistički se nije našla značajna razlika između koncentracija parabena u urinu. Bolesne žene, iako imaju veću koncentraciju svih parabena u plazmi, imaju manju koncentraciju u tkivu od zdravih. Bolesne žene starije životne dobi, manje su fizički aktivne, imaju veći BMI te veće i agresivnije tumore.

Zaključak: Žene sa zloćudnim tumorom dojke starije životne dobi imaju više nerazgrađenih parabena koji cirkuliraju krvi (plazmom) te mogu utjecati na proliferaciju estrogen osjetljivih stanica dojke što dovodi do povećanog rizika za razvoj hormonski ovisnog raka dojke. Parabeni sinergijski potaknuti („učinak mješavine” ili „učinak koktela”) prisutnošću plastičnih nanočestica pojačavaju proliferacijsku aktivnost stanica raka dojke osjetljivih na estrogene.

Ključne riječi: rak dojke, endokrini disruptor, ksenoestrogen, paraben, kozmetički proizvod, kvaliteta života.

9 SUMMARY

Changes in parabens concentration in women with breast cancer in upper lateral quadrant of the breast

Objective. Determine significant difference comparing urine, plasma and breast tissue paraben concentrations between healthy and breast cancer woman. Endocrine disruptors chemical cocktails of parabens and plastic nanoparticles is evaluated by proliferative activity of breast cancer.

Methods. This study includes 72 patients, 49 breast cancer and 23 healthy women. Sociodemographic, anthropometric measures, cancer risk factors, lifestyle, and frequency of cosmetic use is compared with paraben concentrations in human samples. Study evaluates effects of mixture of plastic and parabens on proliferation of breast cancer lines: MDA-MB 231 and MCF-7 cells.

Results: Women with breast cancer in upper lateral quadrant have higher plasma paraben concentration. No statistical differences are found between urine concentration. Breast cancer women with higher plasma concentration have less parabens in breast tissue than healthy women. Less active women with breast cancer have more weight and larger, aggressive cancer.

Conclusion. Women with breast cancer located in upper lateral quadrant have higher plasma parabens levels and similar concentrations in urine compared to healthy women. Parabens in synergistic with plastic nanoparticles increased proliferation of estrogen-sensitive breast cancer cells.

Keywords: breast cancer, endocrine disruptor, xenoestrogen, paraben, cosmetic product, , quality of life

Željka Roje, 2021.

10 POPIS LITERATURE

1. Kickbusch I. The contribution of the World Health Organization to a new public health and health promotion. *American journal of public health*. 2003;93(3):383-8.
2. Mandić T. Utjecaj endokrinih disruptora na reproduktivno zdravlje žena. Zagreb:Sveučilište u Zagrebu , Medicinski Fakultet ; 2016.
3. Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, Kidd K, Zoeller TR, Organization WHO. State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: World Health Organization; 2013.
4. Herington AC, Chopin LK, Jeffery P, de Amorim L, Veveris-Lowe T, Bui L, i sur. Hormone-dependent cancers: new approaches to identification of potential diagnostic and/or therapeutic biomarkers. *AsPac J Mol Biol Biotechnol*. 2010;18(1):63-6.
5. KK C. Experimental evidence of dietary factors and hormone-dependent cancers. *Cancer Reserach* 1975;35(11 Part 2).
6. Stabile LP, Davis AL, Gubish CT, Hopkins TM, Luketich JD, Christie N, i sur. Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen. *Cancer Res*. 2002;62(7):2141-50.
7. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, i sur. Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(6):438-51.
8. Kortenkamp A, Martin O, Faust M, Evans R, McKinlay R, Orton F, i sur. State of the art assessment of endocrine disrupters. Final Report[Online] 2017. Dostupno na: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota_edc_final_report.pdf
9. Organization WHO. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012: Summary for Decision-Makers. 2012. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78102>
10. Giulivo M, Lopez de Alda M, Capri E, Barcelo D. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental research*. 2016;151:251-64.
11. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chemical research in toxicology*. 2002;15(10):1281-7.
12. Fick J, Söderström H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M, Larsson DJ. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009;28(12):2522-7.
13. Darbre PD. The potential for estrogen disrupting chemicals to contribute to migration, invasion and metastasis of human breast cancer cells. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. 2019;5:58.

14. Needham LL, Grandjean P, Heinzow B, Jørgensen PJ, Nielsen F, Patterson Jr DG, i sur. Partition of environmental chemicals between maternal and fetal blood and tissues. *Environmental science & technology*. 2010;45(3):1121-6.
15. Thomsen C, Haug LS, Stigum H, Frøshaug M, Broadwell SL, Becher G. Changes in concentrations of perfluorinated compounds, polybrominated diphenyl ethers, and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast-milk during twelve months of lactation. *Environmental science & technology*. 2010;44(24):9550-6.
16. Regnier SM, Sargis RM. Adipocytes under assault: environmental disruption of adipose physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(3):520-33.
17. Yang O, Kim HL, Weon JI, Seo YR. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *J Cancer Prev*. 2015;20(1):12-24.
18. Darbre PD. Overview of air pollution and endocrine disorders. *International journal of general medicine*. 2018;11:191.
19. Lee HR, Jeung EB, Cho MH, Kim TH, Leung PC, Choi KC. Molecular mechanism (s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent oestrogenicity in diverse cells and tissues that express oestrogen receptors. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2013;17(1):1-11.
20. Skakkebaek NE, Toppari J, Söder O, Gordon CM, Divall S, Draznin M. The exposure of fetuses and children to endocrine disrupting chemicals: a European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) and Pediatric Endocrine Society (PES) call to action statement. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(10):3056-8.
21. Muscogiuri G, Barrea L, Laudisio D, Savastano S, Colao A. Obesogenic endocrine disruptors and obesity: myths and truths. *Archives of toxicology*. 2017;91(11):3469-75.
22. Ćurić M, Klobučar Majanović S, Detel D, Ružić A, Štimac D. Endokrini disruptori i debljina. *Liječnički vjesnik*. 2017;139(7-8):0-.
23. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, i sur. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*. 2012;33(3):378-455.
24. Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, i sur. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental health perspectives*. 2010;118(9):1243-50.
25. Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from “nothing”– eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental science & technology*. 2002;36(8):1751-6.
26. Kortenkamp A. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental health perspectives*. 2007;115(1):98-105.

27. Adamson GD, Kennedy S, Hummelshoj L. Creating solutions in endometriosis: global collaboration through the World Endometriosis Research Foundation. SAGE Publications Sage UK: London, England; 2010.
28. Abaci A, Demir K, Bober E, Buyukgebiz A. Endocrine disrupters-with special emphasis on sexual development. *Pediatric endocrinology reviews: PER*. 2009;6(4):464-75.
29. Perheentupa A, Sadov S, Rönkä R, Virtanen HE, Rodprasert W, Vierula M, i sur. Semen quality improves marginally during young adulthood: a longitudinal follow-up study. *Human Reproduction*. 2016;31(3):502-10.
30. Heindel JJ, Newbold R, Schug TT. Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015;11(11):653-61.
31. Kirchner S, Kieu T, Chow C, Casey S, Blumberg B. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Molecular endocrinology*. 2010;24(3):526-39.
32. Özen S, Darcan Ş. Effects of environmental endocrine disruptors on pubertal development. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*. 2011;3(1):1.
33. Harvey PW, Everett DJ. Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumours. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2004;24(1):1-4.
34. Gonzales RJ, Ansar S, Duckles SP, Krause DN. Androgenic/estrogenic balance in the male rat cerebral circulation: metabolic enzymes and sex steroid receptors. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Nov;27(11):1841-52.
35. Chen A, Huminer D. The role of estrogen receptors in the development of gallstones and gallbladder cancer. *Medical hypotheses*. 1991;36(3):259-60.
36. Lemmen JG, Arends RJ, van Boxtel AL, van der Saag PT, van der Burg B. Tissue- and time-dependent estrogen receptor activation in estrogen reporter mice. *Journal of molecular endocrinology*. 2004;32(3):689-701.
37. Roy D, Liehr JG. Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutation research*. 1999;424(1-2):107-15.
38. Brody JG, Moysich KB, Humblet O, Attfield KR, Beehler GP, Rudel RA. Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies. *Cancer*. 2007;109(12):2667-711.
39. Brody JG, Aschengrau A, McKelvey W, Swartz CH, Kennedy T, Rudel RA. Breast cancer risk and drinking water contaminated by wastewater: a case control study. *Environmental health : a global access science source*. 2006;5:28.
40. Brody JG, Rudel RA, Michels KB, Moysich KB, Bernstein L, Attfield KR, i sur. Environmental pollutants, diet, physical activity, body size, and breast cancer: where do we stand in research to identify opportunities for prevention? *Cancer*. 2007;109(12):2627-34.
41. Routledge EJ, J. Parker, J. Odum, J. Ashby, and J. P. Sumpter. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998; 153:12–19.

42. Neidig, C. P. , and Burrell, H. The esters of p-hydroxybenzene acid as preservatives. *Drug Cosmet. Ind.* 54(4), 408–10, 481–9.
43. Soni M, Carabin I, Burdock G. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and chemical toxicology.* 2005;43(7):985-1015.
44. Whitworth CW, and H. W. Jun. . Influence of polysorbate 20 and sodium cholate on uptake of p-hydroxybenzoates by the frog, *Rana pipiens*. *J Pharm Sci* 62:1890–1891. 1973.
45. Lobemeier C, Tschoetschel C, Westie S, Heymann E. Hydrolysis of parabenes by extracts from differing layers of human skin. *Biological chemistry.* 1996;377(10):647-51.
46. CTFA. Safety data test summary: Primary skin irritation test of product containing Methylparaben. 1979; CTFA Code No 2-7-108
47. Murrell WG, and J. M. Vincent. . The 4-hydroxybenzoic acid esters and related compounds. 4. The bacteriostatic action of 4 hydroxybenzoic acid-n-alkyl esters. *J Soc Chem Ind* 69:109–113. 1950.
48. Janjua NR, Mortensen GK, Andersson A-M, Kongshoj B, Skakkebaek NE, Wulf HC. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environmental science & technology.* 2007;41(15):5564-70.
49. Tsukamoto H, and S. Terada. Metabolism of drugs. XXVI. Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbit. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 10:86–90. 1962.
50. Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of applied toxicology.* 2008;28(5):561-78.
51. Ye X, Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environmental health perspectives.* 2006;114(12):1843-6.
52. Yu Y, Huang Q, Wang Z, Zhang K, Tang C, Cui J, i sur. Occurrence and behavior of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in wastewater and the recipient river water of the Pearl River Delta, South China. *Journal of Environmental Monitoring.* 2011;13(4):871-8.
53. Dodge LE, Kelley KE, Williams PL, Williams MA, Hernández-Díaz S, Missmer SA, i sur. Medications as a source of paraben exposure. *Reproductive toxicology.* 2015;52:93-100.
54. CIR Expert Panel. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. . *Int J Toxicol* 27 (4), S1–S82
55. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. *International journal of toxicology.* 2008;27 (4):1-82.
56. Kirchhof MG, de Gannes GC. The health controversies of parabens. *Skin Therapy Lett.* 2013;18(2):5-7.

57. Rastogi S, Schouten A, De Kruijf N, Weijland J. Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact dermatitis*. 1995;32(1):28-30.
58. Liao C, Kannan K. Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes. *Science of the Total Environment*. 2014;475:8-15.
59. Guo Y, Wang L, Kannan K. Phthalates and parabens in personal care products from China: concentrations and human exposure. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2014;66(1):113-9.
60. Frederiksen H, Taxvig C, Hass U, Vinggaard AM, Nellemann C. Higher levels of ethyl paraben and butyl paraben in rat amniotic fluid than in maternal plasma after subcutaneous administration. *Toxicological Sciences*. 2008;106(2):376-83.
61. Vo TT, Yoo Y-M, Choi K-C, Jeung E-B. Potential estrogenic effect (s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reproductive toxicology*. 2010;29(3):306-16.
62. Zhang Y, Meng X, Chen L, Li D, Zhao L, Zhao Y, i sur. Age and sex-specific relationships between phthalate exposures and obesity in Chinese children at puberty. *PloS one*. 2014;9(8):e104852.
63. Hu P, Chen X, Whitener RJ, Boder ET, Jones JO, Porollo A, i sur. Effects of parabens on adipocyte differentiation. *Toxicological sciences*. 2012;131(1):56-70.
64. Ferguson KK, McElrath TF, Cantonwine DE, Mukherjee B, Meeker JD. Phthalate metabolites and bisphenol-A in association with circulating angiogenic biomarkers across pregnancy. *Placenta*. 2015;36(6):699-703.
65. Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology*. 2010;30(2):301-12.
66. Guidry VT, Longnecker MP, Aase H, Eggesbø M, Zeiner P, Reichborn-Kjennerud T, i sur. Measurement of total and free urinary phenol and paraben concentrations over the course of pregnancy: assessing reliability and contamination of specimens in the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *Environmental health perspectives*. 2015;123(7):705-11.
67. Braun JM, Just AC, Williams PL, Smith KW, Calafat AM, Hauser R. Personal care product use and urinary phthalate metabolite and paraben concentrations during pregnancy among women from a fertility clinic. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 2014;24(5):459.
68. Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Bishop AM, Needham LL. Urinary concentrations of four parabens in the US population: NHANES 2005–2006. *Environmental health perspectives*. 2010;118(5):679-85.
69. Šekerija M i sur. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. 2019;Bilten 41.
70. Tomek R, Vrbanc D, Podolski P. Znanjem protiv raka dojke. Hrvatska liga protiv raka dojke 2010.
71. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2005.-2009. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Bilteni br. 30-34.; 2006-2010.

72. Alduk AM. Povezanost morfoloških i kinetičkih osobitosti duktalnoga invazivnoga karcinoma dojke dobivenih magnetnom rezonancijom s patohistološkim prognostičkim pokazateljima. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski Fakultet; 2015.
73. Šekerija M. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. 2018; Bilten 40.
74. Lakhani SR. WHO Classification of Tumours of the Breast: International Agency for Research on Cancer; 2012.
75. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1992;22(3):207-19.
76. Stanec Z, Žic R, Budi S, Stanec S, Milanovic R, Vlajcic Z, i sur. Skin and nipple-areola complex sparing mastectomy in breast cancer patients: 15-year experience. *Annals of plastic surgery*. 2014;73(5):485-91.
77. Melchor L, Benítez J. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis*. 2008;29(8):1475-82.
78. Moss RL, Gu Q, Wong M. Estrogen: nontranscriptional signaling pathway. Recent progress in hormone research. 1997;52:33-68.
79. Woolley CS. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2007;47:657-80.
80. Fucic A MS, Zeljezic D, Bogdanovic N, Katic J, Gjergja R, Karelson E, Gamulin M. Is the role of estrogens and estrogen receptors in epilepsy still underestimated? *Medical Hypotheses*. 2009;73:703-705
81. Darbre PD. Recorded quadrant incidence of female breast cancer in Great Britain suggests a disproportionate increase in the upper outer quadrant of the breast. *Anticancer Res*. 2005 May-Jun;25(3c):2543-50.
82. Znaor A. Rak dojke u Hrvatskoj – kako stojimo i što očekujemo? *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*. 2008;ISSN 1845-3082, Vol 4, Broj 13
83. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson J-Ak, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology*. 1997;138(11):4613-21.
84. Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, i sur. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(20)
85. Macon MB, Fenton SE. Endocrine disruptors and the breast: early life effects and later life disease. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2013;18(1):43-61.
86. Bando H, Mohri S, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1997;86(6):759-61.

87. Pedersen S, Marra F, Nicoli S, Santi P. In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. *International journal of cosmetic science*. 2007;29(5):361-7.
88. Charles A, Darbre P. Oestrogenic activity of benzyl salicylate, benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology*. 2009;29(5):422-34.
89. Harvey PW, Darbre P. Endocrine disruptors and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? *Journal of applied toxicology*. 2004;24(3):167-76.
90. Hall JM, Korach KS. Analysis of the molecular mechanisms of human estrogen receptors alpha and beta reveals differential specificity in target promoter regulation by xenoestrogens. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(46):44455-61.
91. Darbre PD, Harvey PW. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *Journal of Applied Toxicology*. 2014;34(9):925-38.
92. Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope G. Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*. 2004;24(1):5-13.
93. Barr L, Metaxas G, Harbach C, Savoy L, Darbre P. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *Journal of Applied Toxicology*. 2012;32(3):219-32.
94. Byford J, Shaw L, Drew M, Pope G, Sauer M, Darbre P. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2002;80(1):49-60.
95. Webber KE. Studies on the effects of paraben mixtures on MCF-7 breast cancer cells in culture. 2013.
96. Khanna S, Dash PR, Darbre PD. Exposure to parabens at the concentration of maximal proliferative response increases migratory and invasive activity of human breast cancer cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology*. 2014;34(9):1051-9.
97. McGrath KG. An earlier age of breast cancer diagnosis related to more frequent use of antiperspirants/deodorants and underarm shaving. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation*. 2003;12(6):479-85.
98. Rastogi SC, Schouten A, de Kruijf N, Weijland JW. Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact dermatitis*. 1995;32(1):28-30.
99. Ye X, Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM. Temporal stability of the conjugated species of bisphenol A, parabens, and other environmental phenols in human urine. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*. 2007;17(6):567-72.

100. Frederiksen H, Jorgensen N, Andersson AM. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of exposure science & environmental epidemiology*. 2011;21(3):262-71.
101. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Bishop AM, Needham LL. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006. *Environmental health perspectives*. 2010;118(5):679-85.
102. Sandanger TM, Huber S, Moe MK, Braathen T, Leknes H, Lund E. Plasma concentrations of parabens in postmenopausal women and self-reported use of personal care products: the NOWAC postgenome study. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*. 2011;21(6):595-600.
103. Ma W-L, Wang L, Guo Y, Liu L-Y, Qi H, Zhu N-Z, i sur. Urinary concentrations of parabens in Chinese young adults: implications for human exposure. *Archives of environmental Contamination and Toxicology*. 2013;65(3):611-8.
104. Harvey PW, Everett DJ. Parabens detection in different zones of the human breast: consideration of source and implications of findings. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2012;32(5):305-9.
105. Yang Liu S., Ming-Lok Leung, Kar-Hei F. Engineering a microbial ‘trap and release’ mechanism for microplastics removal. *Chemical Engineering Journal*, Volume 404, 2021.
106. REACH "Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical"; <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/registration-evaluation-authorisation-and-restriction-of-chemicals>
107. Rijk I, M. Van Duursen, and M. van den Berg. . Health costs that may be associated with endocrine disrupting chemicals: an inventory, evaluation and way forward to assess the potential socio-economic impact of EDC-associated health effects in the EU.: Institute Risk Assessment Sci. 2016.
108. Assessment OSoTa. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption 2018.
109. State of the science of endocrine disrupting chemicals (Znanstvene spoznaje o kemikalijama sa svojstvima endokrine disrupcije), (2012).
110. Thrupp TJ i sur.. The consequences of exposure to mixtures of chemicals: Something from ‘nothing’ and ‘a lot from a little’ when fish are exposed to steroid hormones. In: UNEP/WHO, editor.: *Science of the total environment*; 2018. p. 1482.–92.
111. Goumenou MM, Sharon. Key scientific issues relevant to the identification and characterisation of endocrine disrupting substances - Report of the Endocrine Disrupters Expert Advisory Group - Study. In: Centre) IfHaCPJR, editor.
112. Rigkos G, Alampanos V, Kabir A, Furton KG, Roje Ž, Vrčak IV, et al. An improved fabric-phase sorptive extraction protocol for the determination of seven parabens in human urine by HPLC–DAD. *Biomedical Chromatography*. 2020:e4974.

113. Alampanos V, Kabir A, Furton KG, Roje Ž, Vrček IV, Samanidou V. Fabric phase sorptive extraction combined with high-performance-liquid chromatography-photodiode array analysis for the determination of seven parabens in human breast tissues: Application to cancerous and non-cancerous samples. *Journal of Chromatography A*. 2020;1630:461530.
114. Parla A, Zormpa E, Paloumpis N, Kabir A, Furton KG, Roje Ž, Samanidou V, Vinković Vrček I, Panderi I. Determination of Intact Parabens in the Human Plasma of Cancer and Non-Cancer Patients Using a Validated Fabric Phase Sorptive Extraction Reversed-Phase Liquid Chromatography Method with UV Detection. *Molecules*. 2021; 26(6):1526.
115. Darbre PD. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2006;20(1):121-43.
116. Darbre PD. Underarm cosmetics and breast cancer. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation*. 2004;13(2):153.
117. Roje Ž, Ilić K, Galić E, Pavičić I, Turčić P, Stanec Z, i sur. Synergistic effects of parabens and plastic nanoparticles on proliferation of human breast cancer cells. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2019;70(4):310-4.
118. Lehner R, Weder C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Emergence of nanoplastic in the environment and possible impact on human health. *Environmental science & technology*. 2019;53(4):1748-65.
119. Eriksen M, Lebreton LC, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, Borerro JC, i sur. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PloS one*. 2014;9(12):e111913.
120. Galloway TS. Micro-and nano-plastics and human health. *Marine anthropogenic litter*: Springer, Cham; 2015. p. 343-66.
121. Govindaraj S. BR, Vijayalakshmi R., Hiroaki T. GC–MS method for the determination of paraben preservatives in the human breast cancerous tissue. *Microchemical Journal* 96 (2010) 391–396. 2010.
122. Darbre PD. The history of endocrine-disrupting chemicals. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*. 2019.
123. El Hussein, S., Muret, P., Berard, M., Makki, S. and Humbert, P. (2007), Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis–dermis layers (ex-vivo study). *Experimental Dermatology*, 16: 830-836.
124. Fu J, Sadgrove M, Marson L, Jay M. Biotransformation Capacity of Carboxylesterase in Skin and Keratinocytes for the Penta-Ethyl Ester Prodrug of DTPA. *Drug Metab Dispos*. 2016 Aug;44(8):1313-8.
125. Z. Duraković, "Hipersaturacija i otrovanje lijekovima u starijoj dobi", *Medicus*, vol.14, br.2-Gerijatrija, str. 261-272, 2005..

11 ŽIVOTOPIS

Željka Roje rođena je 4. prosinca 1980. godine u Splitu gdje završava osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je 2005. godine. Pripravnički liječnički staž obavlja u Kliničkoj bolnici Dubrava gdje je zaposlena od 2008. godine. Od 2006. do 2007. god. bila je znanstvena novakinja na projektu „Mikrokirurško liječenje ozljeda perifernih živaca“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2006. godine. U Kliničkoj bolnici Dubrava 2012. godine završava specijalizaciju iz opće kirurgije, a 2018. godine specijalizaciju iz plastične, rekonstrukcijske i estetske kirurgije.

Godine 2018. završava poslijediplomski studij na Europskoj mikrokirurškoj školi – RMES, *Master's Degree in Surgical Oncology, Reconstructive and Aesthetic Breast Surgery* te poslijediplomski specijalistički studiji Plastična, rekonstrukcijska i estetska kirurgija Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2019. polaže europski ispit i postaje *Fellow of the European Board of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*.

Objavila je 19 znanstvenih i stručnih radova, autorica je poglavlja u knjigama te sudjeluje na znanstvenim konferencijama. Član je Hrvatskog društva plastične, rekonstrukcijske i estetske kirurgije, 2012. god. bila je potpredsjednica *International Confederation for Plastic Reconstructive & Aesthetic Surgery Trainees' Association*. Predstavnica je Udruge „Sve za nju“ pri Hrvatskom Cochrane društvu.