

Katarina Černe¹

Toksikologija (težkih) kovin

Toxicology of (Heavy) Metals

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: težke kovine – toksičnost

Kovine se razlikujejo od drugih toksičnih snovi v tem, da niso biorazgradljive. Poleg tega se prenašajo na velike razdalje in kopičijo tako v naravi kot v človekovem telesu. Pomembno je, da se zavedamo, da so naravno prisotne v okolju. Čeprav je akutna zastrupitev v preteklosti igrala glavno vlogo in je poznavanje ter razumevanje akutnih učinkov še vedno pomembno, pa je ob upoštevanju sedanjih varnostnih standardov akutna zastrupitev s kovinami redka. Po drugi strani pa narašča zanimanje za kronične učinke, katerih potek je milejši in zato manj prepoznaven kot pri akutnih. Pri kratkotrajni izpostavljenosti so lahko klinični učinki kovin drugačni kot pri izpostavljenosti, podobni celokupnemu odmerku, ki mu je telo izpostavljeno v daljšem časovnem obdobju. Do kronične zastrupitve lahko pride pri izpostavljenosti zaradi narave dela in preko okolja. Na toksičnost kovin vplivajo številni dejavniki, med drugim kemična oblika kovine ali *speciacija* (elementarna oblika, anorganske spojine, kovinski kompleksi, organokovinske spojine), interakcije toksičnih kovin z esencialnimi, starost in stanje imunskega sistema pri posamezniku. Za toksične učinke je pomemben tudi biološki razpolovni čas kovin, tako je ta za kadmij in svinec od 20 do 30 let, medtem ko je za nekatere kovine, kot so arzen, kobalt in krom, samo nekaj ur ali dni. Kritični organi za kovine so različni, vendar so pri kroničnih učinkih v ospredju pljuča, ledvica, centralni živčni in imunski sistem. Med kronične učinke kovin spadata tudi reprodukcijska toksičnost in kancerogenost. Ker so kovine naravno prisotne v našem okolju, je glavni problem ugotoviti, kakšen je nivo izpostavljenosti, ki je še sprejemljiv ob zelo majhnem, a opredeljenem tveganju za človekovo zdravje.

ABSTRACT

KEY WORDS: metal heavy – toxicity

Metals differ from other toxic substances in that they are not destroyed in nature. Furthermore, they may be transported over great distances and they have a tendency toward accumulation in nature, as well as in the human body. It is important to recognize that they are natural substances. Historically, metal toxicology largely concerned acute effects. The knowledge and understanding of such effects must continue to be developed, but they are uncommon in present safety standards. There is, however, a growing interest in the chronic toxic effects of metals, which may be subclinical or not readily obvious. Short-term exposure may produce clinical effects very different from those produced by similar exposure in terms of total dose over a longer period of time. Chronic poisoning may occur after occupational and environmental exposure. A number of factors influence the toxicity of metals, e.g. their chemical form or speciation (elemental state, inorganic compounds, metal complexes and organometallic compounds), the interactions of toxic with essential metals, the age and immune status of an individual. A critical determinant of a metal's toxicity is its biological half-time. The

¹ Asist. dr. Katarina Černe, uni. dipl. biol., Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

biological half-times of cadmium and lead are 20 to 30 years, whereas for some metals such as arsenic, cobalt and chromium they are only a few hours or days. The critical organs affected by metals vary. Their most important effects after chronic exposure involve the lungs, kidneys, central nervous system, and immune system. Chronic effects of metals also include reproductive toxicity and carcinogenicity. Nevertheless, metals are naturally present in the environment and a major problem is to determine which levels of exposure can be accepted with only a minor, well-defined risk for human health.

UVOD

Toksikologija kovin se ukvarja s približno 80-imi elementi in njihovimi spojinami, od prostih ionskih soli do zapletenih struktur, kot so kompleksi, sestavljeni iz kovinskega atoma in različnih ligandov, ter organokovinske spojine. Do onesnaženosti okolja in izpostavljenosti človeka kovinam pride po naravni poti zaradi erozije površinskega sloja mineralov kovin v tleh ali pa zaradi človekove aktivnosti, kot je rudarstvo, livarstvo, zgorevanje fosilnih goriv ter uporaba kovin v različnih industrijah, npr. za katalizatorje, stabilizatorje pri proizvodnji plastike, maziva za stroje itd. Industrijska in komercialna uporaba kovin pa še narašča, povezana je predvsem z razvojem novih tehnoloških materialov in z odkritji novih načinov uporabe kovin, npr. za superprevodnike, kovinsko steklo, zlitine z magnetskimi lastnostmi, ter z razvojem nanotehnologije (1). Delež naravnega in antropogenega vira je za različne kovine v okolju zelo različen. Človek je odgovoren za 97 % vsega svineca od letne emisije 310 t, za 66 % živega srebra od letne emisije 150 t in za samo 12 % mangana od letne emisije 340 t (2). Po Deklaraciji iz Brescie o preprečevanju nevrotoksičnosti kovin se moramo izogibati novim načinom uporabe kovin, ki bi povzročile široko emisijo v okoljski zrak in so potrjeno nevrotoksične. Sem spadajo svinec (Pb), živo srebro (Hg) in mangan (Mn) (3).

S toksikološkega vidika je dokaj dobro definiranih preko 30 kovin: aluminij (Al), antimon (Sb), arzen (As), barij (Ba), berilij (Be), bizmut (Bi), kadmij (Cd), krom (Cr), kobalt (Co), baker (Cu), galij (Ga), germanij (Ge), indij (In), železo (Fe), svinec (Pb), mangan (Mn), živo srebro (Hg), molibden (Mo), paladij (Pd), nikelj (Ni), platina (Pt), selen (Se), srebro (Ag), telurij (Te), talij (Tl), kositer (Sn), titan (Ti), volfram (W), uran (U), vanadij (V) in cink (Zn) (1).

KEMIJA IN TERMINOLOGIJA KOVIN

Kovine so skupina elementov, ki imajo posebne fizikalne lastnosti: dobro prevajajo elektriko in toploto, imajo značilen kovinski sijaj in večino med njimi lahko poljubno oblikujemo, saj so raztegljive in kovne. Za njihove toksične učinke je pomembno predvsem to, da vstopajo v reakcije kot pozitivni ioni oz. kationi. Od 111-ih poznanih elementov periodnega sistema predstavljajo kovine večino, to je 67 elementov (1, 4).

Med težke kovine spadajo po definiciji po Bjerrumu tiste, katerih relativna gostota je 7-krat večja, kot je gostota vode ($>7 \text{ g/cm}^3$) (5). Obstajajo pa še druge definicije (1, 6). Izraz težke kovine se večkrat uporablja nepravilno, saj z njim pogosto označujemo vse kovine in polkovine (metaloidne), ki se pojavljajo kot onesnaževalci v okolju. Radi jih povezujemo tudi s potencialno toksičnostjo. Tak je npr. aluminij, ki ne spada med težke kovine (relativna gostota je $1,5 \text{ g/cm}^3$), je pa pomemben onesnaževalec okolja, ki se kopiči v možganih in ga povezujejo z nastankom Alzheimerjeve bolezni. Obenem izraz težke kovine ne upošteva, da imajo čiste kovine in njihove spojine zelo različne fizikalno-kemijske, biološke in toksikološke lastnosti. Ista kovina se tako lahko nahaja v različnih oblikah, kar imenujemo *speciacija* (1, 2). Zaradi vsega naštetega novejša toksikološka literatura uporablja samo izraz kovine, izraz težke kovine pa se opušta.

Kovine kemijsko razdelimo na tiste v elementarni obliki in tiste v spojinah. Spojine kovin pa razdelimo na tri osnovne skupine:

- anorganske spojine, kot so soli in njim podobni produkti; v naravi so kovine kot minerali in rude najpogosteje v obliki oksidov in sulfidov, medtem ko so za toksikološke študije zaradi visoke topnosti v vodi

in bioloških sistemih najpomembnejši kloridi in acetati,

- kovinski kompleksi,
- organokovinske spojine (le-te imajo vez med ogljikom in kovino) (1).

Če gremo od leve proti desni strani periodnega sistema, se težnja elementov za tvorbo kationov manjša, ker jedro postaja večje in zunanji elektroni težje uidejo. Nasprotno pa se večja težnja za tvorbo kovalentne vezi in kompleksnih ionov. Take kovine so npr. baker (Cu), železo (Fe), kobalt (Co) in nikelj (Ni). To velja predvsem za polkovine (kažejo lastnosti tako kovin kot nekovin) in kovine, ki se v periodnem sistemu nahajajo blizu polkovin. Med polkovine štejemo naslednje elemente: bor (B), silicij (Si), germanij (Ge), arzen (As), antimon (Sb), selen (Se), telurij (Te). Težnja kovin za tvorbo kovalentne vezi ima dve pomembni toksikološki posledici.

Prva je, da so kovine sposobne vezave na organske (alkilne, arilne) skupine, s čimer nastanejo v lipidih topne organokovinske spojine in ioni. Nekatere izmed njih so zelo toksične, npr. tetraalkilsvinec, tributilkositrov oksid, metilirane soli živega srebra, metilirane oblike arzena. Zaradi njihove maščobotopnosti se porazdelitev teh kovin po telesu in toksični učinek razlikujeta od preprostih ionskih oblik istega elementa.

Druga posledica pa je, da so kovine lahko toksične zaradi vezave na nekovinske sestavine celičnih makromolekul, npr. vezava Cu,

Hg in As na sulfhidrilne skupine (-SH) proteinov (tabela 1).

Z vezavo kovinskega atoma, iona ali druge kemijske oblike, ki jo imenujemo ligand (le-ta je lahko anion ali polarna molekula), nastanejo t. i. kovinski kompleksi ali koordinacijske spojine. Po drugi strani pa na ta način delujejo kelatorji, ki jih uporabljamo za detoksifikacijo pri zastrupitvah s kovinami, npr. dimerkaprol (BAL – British antilewisite).

Med kovine spadajo tudi elementi prehoda, za katere je značilno, da so v različnih oksidacijskih stanjih in tako sodelujejo v reakcijah prenosa elektronov. Če je v prenosu udeležen kisik, lahko nastanejo prosti kisikovi radikali, ki so toksični za celico (1, 2).

ESENCIALNOST KOVIN

Ko govorimo o toksičnosti kovin, je pomemben vidik esencialnost nekaterih kovin. Kovinski elementi so prisotni v vseh živih organizmih in v njih igrajo različne vloge. Lahko so strukturni elementi, stabilizatorji bioloških struktur, komponente kontrolnih mehanizmov (npr. v živcih in mišicah) in predvsem aktivatorji ali komponente redoks sistemov. Za kovine, ki so esencialne, je značilno okno esencialnosti oz. optimalna koncentracija. Njihovo pomanjkanje tako izzove poslabšanje bioloških funkcij in določene simptome, kadar pa je njihova koncentracija v telesu presežena, pride do toksičnih učinkov. Poleg ogljika, vodika, kisika in dušika potrebujemo v organizmu za ionsko ravnotežje in kot sestavne dele aminokislin, nukleinskih kislin in strukturnih spojin še 7 elementov, in sicer: kalcij, fosfor, kalij, magnezij, natrij, klor in žveplo. Kovine, ki so esencialne za človekovo zdravje, pa so železo (Fe), cink (Zn), selen (Se), baker (Cu), kobalt (Co), krom (Cr), molibden (Mo). Druga skupina kovin, ki jih na podlagi novih študij tudi štejemo za esencialne, pa so: bor (B), mangan (Mn), nikelj (Ni), silicij (Si) in vanadij (V). Cink (Zn) je npr. esencialna komponenta najmanj 150-ih encimov, baker (Cu) je nujen za normalno funkcijo citokrom-oksidge, železo (Fe) je del hemoglobina itd. Okno esencialnosti je za nekatere kovine zelo ozko (npr. za selen (Se)), kar pomeni, da morajo biti homeostatski mehanizmi zelo natančno regulirani, saj ima lahko vsako

Tabela 1. Razdelitev nekaterih esencialnih in neesencialnih ionov kovin, ki so pomembni onesnaževalci v okolju, na razred A (vežejo se s kisikom), razred B (vežejo se z žveplom ali dušikom) in mejne elemente (7).

Razred A	Mejni	Razred B
kalcij	cink	kadmij
magnezij	svinec	baker
mangan	železo	živo srebro
kalij	krom	srebro
stroncij	kobalt	
natrij	nikelj	
	arzen	
	vanadij	

Ta razdelitev je pomembna za določanje hitrosti transporta preko celične membrane in za določanje mest na proteinih, kamor se bodo kovine vezale.

najmanjše odstopanje škodljive učinke za človekovo zdravje (1, 8).

Neesencialne kovine, kot sta živo srebro (Hg) in kadmij (Cd), so nad določeno količino toksične. Škodljivo pa lahko vplivajo na organizem tudi tako, da povzročajo pomanjkanje esencialnih kovin preko kompeticije za aktivna mesta na biološko pomembnih molekulah. Antagonizem se lahko pojavi tudi med esencialnimi kovinami. Presežena koncentracija molibdena (Mo) tako zmanjša prevzem bakra (Cu), kar pogosto vodi v pomanjkanja le-tega (2).

NAČINI IZPOSTAVLJENOSTI

Človek je izpostavljen kovinam z vdihavanjem, zaužitjem in preko kože. Transport kovin kot onesnaževalcev zraka poteka na velike razdalje (včasih več kot 1000 km), zato se povečuje izpostavljenost kovinam, kot so svinec (Pb), kadmij (Cd), živo srebro (Hg) in aluminij (Al). Te se lahko akumulirajo tako v okolju kot tudi v človeškem telesu. Inhalacija je običajno najpomembnejši način izpostavljenosti za delavca, čeprav je seveda lahko kovinam izpostavljen tudi preko kože (1). Organokovinske spojine lahko prehajajo preko kože v visokih, včasih celo smrtnih odmerkih (9). Za splošno populacijo je pomembna izpostavljenost preko zraka, hrane in pitne vode. Onesnažen zrak lahko onesnaži zemljo in vodo, posledica je prisotnost kovine v rastlinah, prehranjevalni verigi in tako tudi v hrani. Pri dojenčkih in otrocih se lahko stopnja izpostavljenosti preko zraka, hrane in vode razlikuje od odraslih. Izračun vnosa na kilogram telesne teže je za otroka v primerjavi z odraslim 2-krat večji za zrak, 4-krat za vodo in 6-krat za hrano. Ne smemo pozabiti tudi izpostavljenosti z vdihavanjem cigaretnega dima, ki vsebuje številne kovine, med drugimi kadmij (Cd), nikelj (Ni), arzen (As) in svinec (Pb). Druge možnosti izpostavljenosti so: živo srebro (Hg) v amalgamskih zalivkah in implantirani medicinski pripomočki, kjer so prisotni kobalt (Co), krom (Cr) in molibden (Mo). Druge neobičajne možnosti izpostavljenosti so hemodializa in nekateri drugi terapevtski postopki (1).

Izpostavljenost z vdihavanjem

V zraku se lahko kovine pojavijo kot aerosoli, v nekaterih primerih pa kot hlapi. Delci kovin v zunanjem zraku, ki nastanejo zaradi zgorevanja, so pogosto sestavljeni iz mešanice ogljikovih spojin in kovin. Delci, ki izvirajo iz zemeljskega površja, lahko vsebujejo aluminij (Al), magnezij (Mg) in železo (Fe), medtem ko delci, ki nastanejo pri zgorevanju fosilnih goriv, vsebujejo kovine prehoda, kot so krom (Cr), kobalt (Co), nikelj (Ni), baker (Cu), cink (Zn), arzen (As), selen (Se) in svinec (Pb) (10). Parcialni tlak kovin je za izpostavljenost nezanimiv, izjema je živo srebro. Tako sproščanje hlapov živega srebra iz amalgamskih zalivk predstavlja poseben problem (11). Pri večini industrij nastanejo pogostejše aerosoli kovin kot hlapi, npr. aerosoli svinca (Pb), kadmija (Cd), železa (Fe) itd. Tvorba kondenzatov in razpadanje aerosolov, ki vsebujejo kovine, je delno odvisna od elektronske in kristalne strukture kovine. Pri mehanski sili se kovine ne lomijo idealno. Z manjšanjem velikosti delca pa se njegova površina večja. Če je površina večja, narašča število vezi med kovinami, ki pa so zaradi neidealnega loma motene. Posledično zato narašča tudi reaktivnost delcev, topnost v telesnih tekočinah in možnost, da kovine preidejo v ionsko obliko, kar nadalje vodi v interakcije z biološkimi molekulami. Poleg tega manjši delci prodrejo globlje v respiratorni trakt, kjer je verjetnost, da bodo odstranjeni s pomočjo mukociliarne aktivnosti, manjša in večja, da se bodo adsorbirali v kri (1).

Izpostavljenost z zaužitjem

Splošna populacija je nevarnim kovinam običajno še bolj izpostavljena s hrano in vodo kot z zrakom. Takšna izpostavljenost je največja v tistih deželah, kjer je prehrana lokalnega izvora, okolje pa je onesnaženo. Primer zato je bolezen Itai-Itai na Japonskem, kjer so jedli riž, onesnažen s kadmijem (Cd) iz bližnje reke (1). Naslednji primer zastrupitve s kovinami zaradi enolične lokalne prehrane je iz zaliva Minamata na Japonskem. Med ribiški družinami je prišlo do resnih zastrupitev in tudi smrtnih primerov, ker so ribe zaradi industrije, ki je spuščala odpadke v morje, vsebovale zelo veliko metiliranega živega sre-

bra (12). Tudi pitna voda je lahko pomemben dejavnik izpostavljenosti. Primer je prisotnost arzena v pitni vodi v Bangladešu in zahodni Bengaliji, kjer je podtalnica onesnažena zaradi geološke prisotnosti arzena (As) (13). Kislja zemlja (zaradi določenih gnojil in kislega dežja) lahko poveča prevzem določenih kovin v pridelke, npr. kadmija (Cd). Majhni otroci so lahko kovinam izpostavljeni na drugačne načine kot odrasli, saj se plazijo po tleh, dajejo roke v usta, npr. izpostavljenost svincu (Pb) v barvah. Dojenčki so preko materinega mleka posredno izpostavljeni npr. svincu (Pb) in živemu srebru (Hg) (1).

ABSORPCIJA

Ko pridejo kovine v pljuča ali prebavila, se odlagajo na stene dihalnih poti ali na sluznico prebavil. Količina odložene snovi na steni je odvisna od fizikalnih lastnosti aerosola oz. kemijske oblike kovine v hrani ali pitni vodi. Določen delež kovine, ki se je odložila na steno, preide skozi steno pljuč ali prebavil v sistemski krvni obtok. Obseg absorpcije je odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti kovine v mediju (zrak, hrana ali pitna voda), ki smo mu izpostavljeni. Ta proces je zelo dobro preučen za aerosole v zraku, medtem ko je predvsem za hrano manj podatkov (1).

Depozicija in absorpcija pri vdihovanju hlapov ali aerosolov

Poleg kemijske oblike kovinskih delcev so za njihovo depozicijo in absorpcijo pomembne tudi fizikalne lastnosti, kot so velikost, oblika in gostota. Srednji aerodinamični masni premer (MMAD – *mass median aerodynamic diameter* pomeni izračunani aerodinamični premer, ki razpolovi porazdelitev velikosti delcev aerosola, kadar se meri z maso) je pomemben parameter za določanje depozicije in prodiranje delcev do alveolov. Delci, večji od 10 μm MMAD, se učinkovito filtrirajo pri prehodu skozi nos, medtem ko lahko manjši dosežejo alveole. Čeprav večina absorpcije poteka v spodnjih dihalnih poteh, lahko ultrafini delci ($\Phi < 100\text{nm}$) prehajajo olfaktorno sluznico v nosu in dosežejo olfaktorni živec v možganih. Vpliv ultrafinih delcev (kamor štejemo nanodelce) na človekovo zdravje je

pomembno področje, ki ga v zadnjem času intenzivno preučujemo (1, 14, 15).

Absorpcija pri zaužitju

Kovine v prebavilih izvirajo iz hrane, pijače in iz dihalnih poti, od koder pridejo s pomočjo mukociliarne aktivnosti. Lahko pa izvirajo tudi iz žolča, izločkov trebušne slinavke ali pridejo v prebavila z izločanjem preko črevesne sluznice. Kovine se iz prebavil absorbirajo in sekvestrirajo v celice črevesne sluznice. Prenosu kovin iz črevesnega lumna v celice sluznice ne sledi vedno sistemska absorpcija. Ker se stena prebavil zelo hitro obnavlja, se kovine skupaj z odluščenimi celicami črevesne sluznice vrnejo nazaj v prebavila. Ta proces tako omejuje sistemsko absorpcijo (1). Vezava kovin na protein metalotionein v sluznici in izguba z luščenjem celic črevesne sluznice v prebavila predstavlja pomemben homeostatski mehanizem za regulacijo sistemskega privzema esencialnih kovin, kot je npr. cink (Zn). Visoki odmerki zaužitega cinka inducirajo sintezo metalotioneinov v celicah sluznice. Ti pa blokirajo tudi prevzem kobalta (Co) v celice, kar se uporablja klinično pri bolnikih z Wilsonovo boleznijo (16). Podoben homeostatski mehanizem obstaja za železo (Fe), in sicer je ta spravljen v črevesnih celicah, vezan na feritin (17). Črevesna mikroflora lahko kovino metilira, demetilira ali spremeni njeno oksidacijsko stanje ter s tem vpliva na stopnjo črevesne absorpcije in fekalnega izločanja kovine. Zelo pomembno je tudi, v kakšni kemijski obliki se kovina nahaja v črevesni tekočini (elementarni, anorganski, organski). Primer je živo srebro (Hg), pri katerem je absorpcija metilživega srebra 90–100 %, medtem ko je absorpcija anorganskih Hg(II)soli samo 10 % ali manj. Včasih je pomembna tudi fizikalna oblika kovine. Kovine se lahko v hrani nahajajo kot delci različnih velikosti, pomešani s sestavinami. Čeprav velikost delcev v prebavilih ne igra tako velike vloge kot v pljučih, pa je včasih zelo pomembna za topnost in posledično za absorpcijo (1).

Kovine se absorbirajo iz prebavil s pasivno difuzijo ali s posebnimi transportnimi proteini. Anorganske soli običajno niso lipidotopne, zato je absorpcija s pasivno difuzijo zelo nizka. Za kovine je pomembno, da so raztopljene

v črevesni tekočini, ker se tako lahko vežejo na molekule, ki jih transportirajo preko membrane in s tem olajšajo njihovo absorpcijo (1). Absorpcijski mehanizem za nekatere esencialne ione kovin včasih služi tudi za prenos neesencialnih kovin. Primer so talijeve (Tl) soli in kadmijevi (Cd) ioni (18, 19). Slednji se transportirajo z dvovalentnim kovinskim transporterjem-1 (DMT-1), ki transportira železo (Fe) in druge dvovalentne esencialne kovine. Velike razlike v prebavni absorpciji anorganskih soli kovin, in sicer od manj kot 10 % za ioniziran kadmij (Cd), indij (In), kositer (Sn) in uran (U) do skoraj popolne absorpcije (90–100%) za vodotopne anorganske soli arzena (As), germanija (Ge) in talija (Tl), so lahko povezane s prisotnostjo ali odsotnostjo ustreznega transportnega sistema v prebavilih. Za esencialne kovine je značilno, da se manjši odmerki absorbirajo v večjem deležu kot večji. Razlog zato so homeostatski mehanizmi (absorpcija/sekrecija), ki vzdržujejo koncentracijo esencialnih kovin v okviru fiziološkega nivoja. Za neesencialne kovine, kot je npr. kadmij (Cd), pa obstajajo dokazi o ravno nasprotnem odnosu, in sicer se manjši odmerki absorbirajo v manjši meri kot zmerni, a še netoksični odmerki (20). Tako esencialne kovine, npr. železo (Fe), kot neesencialne, npr. kadmij (Cd), pa pri povišanih odmerkih zmanjšajo integriteto prebavne sluznice in tako povečajo absorpcijo (1).

Za mnoge kovine, kot so svinec (Pb), kadmij (Cd), železo (Fe), kobalt (Co) in živo srebro (Hg), so poskusi na živalih pokazali, da je prebavna absorpcija pri novorojenih in mladih živalih večja kot pri odraslih. Razlog je lahko višja pinocitorna aktivnost nedozorele črevesne sluznice ali večja medcelična prepustnost mladega epitela. Primer za človeka je svinec (Pb), kjer so otroci občutljivejši na izpostavljenost Pb zaradi večje črevesne absorpcije (21).

Sestava zaužite hrane lahko močno vpliva na absorpcijo, npr. fitati, askorbinska kislina in druge kovine (22).

TRANSPORT IN PORAZDELITEV

Transport in porazdelitev kovin po telesu sta odvisna predvsem od kemijske oblike, v ka-

teri se kovina nahaja v krvi. Čeprav je kri glavni medij v telesu, pa je v določenih primerih pomembna tudi limfa, in sicer za transport kovin iz pljuč v krvni obtok. Za porazdelitev je pomembna:

- vezava na proteine,
- difuzijska frakcija v plazmi, intersticijski in celični tekočini,
- velikost vaskularne perfuzije v organu,
- velikost presnove,
- permeabilnost celične membrane za tisto kemijsko obliko kovine, v kateri se nahaja v plazmi,
- razpoložljivost ter hitrost premene za intracelularne ligande, ki se vežejo na kovine.

Kovine se med seboj zelo razlikujejo v vezavi na proteine v plazmi in organih. Germanij (Ge) naj se ne bi vezal na plazemske proteine, medtem ko se vsaj 99 % kadmija (Cd) in živega srebra (Hg) veže nanje. Berilij (Be) naj bi se transportiral v obliki koloidnega fosfata, vezanega na plazemski α -globulin. Kovine se lahko vežejo tudi na proteine, ki so praviloma odgovorni za transport esencialnih kovin. Tako transferin navadno veže in transportira železo (Fe^{3+}), lahko pa veže tudi indij (In^{3+}), mangan (Mn^{3+}), galij (Ga^{3+}), bizmut (Bi^{3+}) in aluminij (Al^{3+}). Izraz difuzijska frakcija ne pomeni, da kovine prehajajo iz enega predelka v drugega s pomočjo pasivne difuzije. Gre za ultrafiltracijsko frakcijo spojin kovin z nizko molsko maso, ki se lahko transportirajo na specifičnih transporterjih. Pri arzenatnem in kromatnem oksianionu gre za mimikrijo endogenih anionov fosfata in sulfata, zato se transportirata skozi membrano na transporterjih za endogene anione. Ta oblika ionske mimikrije je pomembna tudi za transport enovalentnih kationov, kot so talijev (Tl^+), kalijev (K^+), litijev (Li^+) in natrijev (Na^+) prenašalec. Kompleks med metilživim srebrom (MeHg) in cisteinom je strukturno podoben nevtralnemu aminokislinski metionin. Tako lahko omejen kompleks prehaja v endotelijske celice krvno-možganske pregrade kar s pomočjo transporterja za metionin. MeHg se izloča v žolč tako, da tvori kompleks s glutationom in pride iz celic s pomočjo transporterja za reducirani glutation. Verjetno je ta vpleten tudi v prehod MeHg skozi endotelijske celice

krvno-možganske pregrade, kjer gre za proces v več stopnjah:

- transport v celice s pomočjo transporterja za nevtralne aminokisljine,
- prehod MeHg s tiolne skupine cisteina na glutationovo (ta je v celici prisoten v dosti višjih koncentracijah kot cistein)
- in transport iz celice s pomočjo transporterja za glutation (1, 23).

PRESNOVA

Izraz presnova kovin je običajno omejen na biokemijske reakcije, kjer pride do spremembe oksidacijskega stanja kovine ter tvorbe in razpada vezi med kovino in ogljikom v organokovinskih spojinah. Primer vloge spremenjenega oksidacijskega stanja, ki ima toksične učinke na ČŽS, so hlapi elementarnega živega srebra (Hg^0). V takih primerih se izkaže pomembnost oz. nevarnost hitre vaskularne perfuzije za distribucijo kovin. Hitra perfuzija možganov omogoča, da se fizikalno raztopljeni hlapi živega srebra transportirajo iz pljuč v možgane, še preden se Hg^0 v krvi s pomočjo katalaze oksidira v Hg^{2+} . Hlapi lahko prehajajo skozi krvno-možgansko pregrado in se šele nato v celicah oksidirajo v Hg^{2+} , ki tako ostane ujet v celicah, kjer učinkuje toksično.

Šestvalentni krom (Cr^{6+}) je primer transporta v celice, ki mu sledi redukcija v trivalentni krom (Cr^{3+}). Zanj predpostavljajo, da prek neposrednih interakcij z DNK inducira mutacije, ki vodijo v kancerogenezo (1, 23, 24).

Metilacija oz. demetilacija spojin s kovinami imata velik pomen za toksičnost. Proces metilacije je pomemben za detoksifikacijo arzena (As), proces demetilacije pa za detoksifikacijo in izločanje živega srebra (Hg) pri izpostavljenosti metiliranemu živemu srebru (1, 25). Po drugi strani pa razpad ene vezi med ogljikom in kovino v tetraetilkositru vodi v nastanek zelo toksičnega presnovka trietilkositra (26). Podoben primer je nastanek toksičnega presnovka trietilsvinca iz tetraetilsvinca (27). Za presnovo teh organokovinskih spojin so odgovorni mikrosomski encimi (1).

IZLOČANJE

Kovine se iz telesa večinoma odstranjujejo skozi prebavni trakt in ledvice. Le v posameznih primerih pa se izločajo preko sline, krvi, mlečnih izločkov, z luščenjem kože, izgubo las, nohtov, z znojenjem in izdihovanjem (1).

Izločanje preko prebavil

Izločanje preko črevesne sluznice je lahko aktiven ali pasiven proces, pri katerem se kovine transportirajo iz celic sluznice v lumen prebavne cevi. Na ta način se lahko izločata anorgansko živo srebro (Hg^{2+}) in kadmij (Cd). Celice črevesne sluznice se hitro obnavljajo. Propadle celice se skupaj z vezanimi kovinami izgubljajo v lumen in izločajo s fecesom (1).

Glavni način izločanja preko prebavne poti pa je z žolčem in izločki trebušne slinavke. Izločanje z žolčem je pomembno tako za anorganske kot organske spojine mnogih kovin, kot so aluminij (Al), arzen (As), kadmij (Cd), kobalt (Co), živo srebro (Hg), svinec (Pb) in telurij (Te). Veliko dejavnikov vpliva na velikost izločanja kovine z žolčem. Velikost izločanja je npr. odvisna tudi od valenčnega stanja, primer za to je arzen (As). Pri podganah se z žolčem izloči približno 10-krat več vbrizganega odmerka arzenita (As^{3+}) kot arzenata (As^{5+}). Zadnjega se izloči 1 % na 2 uri. Ker je koncentracija arzena (As) več stokrat večja v žolču kot v plazmi, gre tukaj verjetno za izločanje z aktivnim transportom. Številne kemikalije in zdravila vplivajo na izločanje kovin z žolčem. Snovi, ki aktivirajo jetrne encime, spodbujajo izločanje metilživega srebra v žolč. Nizko molekularne tiolne substance, kot so cistein, reducirani glutation (GSH) in protistrup penicilamin, tudi spodbujajo izločanje MeHg z žolčem (1, 28).

Kovine, ki se izločijo z žolčem, se lahko v prebavilih reabsorbirajo in so tako ponovno razpoložljive za izločanje z žolčem. Proces izločanja z žolčem ter ponovne reabsorpcije v žolčnem vodu in črevesnem traktu imenujemo enterohepatična cirkulacija. Vse kovine, ki se izločijo z žolčem, se verjetno v določeni meri reabsorbirajo. Enterohepatično cirkulacijo poznamo za arzen (As^{3+}), metilživo srebro (MeHg^+), anorgansko živo srebro (Hg^{2+}), mangan (Mn^{2+}) in svinec (Pb^{2+}). Ta proces je

lahko zelo kompleksen. Dobro je preučen na primeru metilživega srebra (MeHg), ki se izloči v žolč v obliki kompleksa z reduciranim glutationom. Ta prvi korak je odvisen od starosti (dokazano na živalih) in je popolnoma odsoten v obdobju dojenja. Encim glutation-transpeptidaza hidrolizira kompleks MeHg-glutinationom, ko le-ta potuje po žolčnem vod. Glutationom razpade na aminokislino, MeHg pa se sprosti kot kompleks s cisteinom. Kot je bilo že omenjeno (glej Transport in porazdelitev), se kompleks takoj transportira preko celične membrane s pomočjo transporterja za velike nevtralne aminokislino. V žolčniku se ga nato nekaj reabsorbira v sistemski krvni obtok, preostali del pa gre v prebavni trakt, kjer se ga nadalje nekaj spet reabsorbira preko črevesne sluznice (1, 24). MeHg pride tudi v stik s črevesno floro, ki ga spremeni v anorgansko živo srebro (Hg^{2+}). Tako je demetilacija ključni korak pri fekalnem izločanju (29). Spremembe v prehrani in jemanje antibiotikov, ki vplivajo na sestavo mikroflore v črevesu, vplivajo na fekalno izločanje MeHg pri glodalcih. Anorgansko živo srebro se zelo slabo absorbira preko črevesne sluznice in gre tako neposredno v feces. Proces izločanja z žolčem, ki mu sledi demetilacija, je odgovoren za približno 90% vse eliminacije živega srebra (Hg) iz telesa. Proces enterohepatične cirkulacije je odvisen od genetske kontrole in fizioloških sprememb zaradi bolezni in starosti. Moramo pa se zavedati, da je bila večina preizkusov narejenih na podganah in da lahko obstajajo velike kvantitativne razlike med posameznimi živalskimi vrstami v deležu kovine, ki se izloči z žolčem, v primerjavi z deležem, ki se iz telesa izloča na druge načine (1).

Izločanje preko ledvic

Mnoge kovine se izločajo v glavnem preko ledvic. To je pomembno vedeti, saj lahko ob zastrupitvi s kovinami pospešimo odstranjevanje strupa iz telesa tako, da vzpodbudimo izločanje preko ledvic. Za izločanje kovin preko ledvic je pomembno fizikalno-kemijsko stanje kovine v krvi. Kovine so lahko raztopljene v obliki koloidnih raztopin ali pa vezane na različne vrste proteinov. Izločanje preko ledvic je povezano v glavnem z ultrafiltracijsko frakcijo v plazmi. Glomerularni filtrat vsebu-

je različne ione in snovi iz plazme v velikostnem razredu do albumina (molska masa 68.000). Delež plazemskega albumina, ki se pojavi v glomerularnem filtratu, je zelo majhen. Večji proteini pri zdravem človeku ostanejo v krvi. Makromolekule s sorazmerno nizko molekulkulsko maso, kot sta inulin (molekulska masa 5000) in metalotioneini (molekulska masa 6500), prehajajo čez glomerularno membrano. Tako se lahko tudi kovine, vezane na proteine z nizko molekulkulsko maso, izčistijo iz plazme v tubularno tekočino. Izločanje preko ledvic je dokazano za kovine, kot so krom (Cr), baker (Cu), nikelj (Ni), radon (Ra), talij (Tl), uran (U) in cink (Zn). Ledvični izčistek je nižji kot glomerularna filtracija, kar lahko razložimo s tubularno reabsorpcijo določenega deleža kovin, ki se nahaja v tubularni tekočini. Kadmij (Cd), vezan na metalotioneine, se zelo učinkovito reabsorbira iz ledvičnih tubulov in samo majhen delež se ga izloča z urinom. Izločanje berilija (Be) v urinu je verjetno posledica tubularnega izločanja. Vloga tubularnega izločanja in drugih transtubularnih transportov je lahko pomembna za ledvično akumulacijo in izločanje živega srebra (Hg) ter svinca (Pb) (1).

Zaradi spremembe v pH urina se spremeni izločanje kovin, kot sta svinec (Pb) in uran (U). Uran se nahaja v plazmi kot UO_2^{++} , delno vezan na proteine, delno pa v kompleks z bikarbonatnimi anioni (30). Bikarbonatni kompleks se takoj filtrira čez glomerule v proksimalne tubule, kjer v odvisnosti od pH disociira na uranilkation. Le-ta se veže na celice proksimalnih tubulov. Če je prisoten v dovolj visoki koncentraciji, lahko pride do okvar resorpcijskih mehanizmov. Dokaz za to je pojav aminoacidurije. Nedisociiran bikarbonatni kompleks gre neposredno v urin. Če dodamo natrijev bikarbonat, le-ta vzdržuje visok pH v tubulih, tako da je disociacija zelo majhna in uran preide neposredno v urin. Če damo živali kisli amonijev klorid, le-to povzroči nizek pH v tubulih in s tem skoraj popolno disociacijo kompleksa. Posledica je tudi velik prevzem v celice in majhna ekskrecija urana. pH vpliva tudi na izločanje svinca (Pb) v urinu. Koncentracija nekaterih aminokislin, kot sta cistein in histidin, poveča filtracijsko frakcijo živega srebra (Hg), bakra (Cu) in

niklja (Ni). Kovine se izločajo tudi z luščenjem tubulnih celic. Tako vsaka snov, ki povzroči luščenje celic, poveča tudi izločanje kovine. Nasprotno pa akutna ledvična odpoved dramatično zniža izločanje kovin z urinom (1).

ŠKODLJIVI UČINKI KOVIN ZA ČLOVEKOVO ZDRAVJE

Kovine delujejo na posamezne organe različno. Tako molibden (Mo) povzroči znake povečanega delovanja ščitnice, aluminij (Al) pa ima resne učinke na centralni živčni sistem. Antimon (Sb) in kobalt (Co) lahko škodljivo vplivata na srčnožilni sistem. Nekatere organokovinske spojine učinkujejo na centralni živčni in imunski sistem. Na imunski sistem vplivajo tudi platina (Pt), paladij (Pd) in berilij (Be). Kronična izpostavljenost zadnje omenjenemu vodi v razvoj berilioze (progredientna granulomatozna pljučna fibroza s hitrim razvojem kroničnega pljučnega srca). Škodljivi učinek na pljuča v obliki pnevmokonioze se lahko razvije tudi pri izpostavljenosti aluminiju (Al), antimonu (Sb), bariju (Ba), kobaltu (Co), železu (Fe), kositru (Sn), volframu (W) ali njihovim spojinam. Poseben problem predstavljajo učinki, ki so posledica izpostavljenosti kombinaciji toksičnih in/ali esencialnih kovin, kar pa je značilno za izpostavljenost pri človeku (1).

Izbrani molekularni mehanizmi toksičnosti kovin

Osnova za interakcije toksičnih kovin s celičnimi sestavinami je njihova koordinacija z biološkimi ligandi. Pri tem se kovine povežejo z eno ali več reaktivnimi skupinami – ligandi, ki vsebujejo kisik, žveplo ali dušik. Nastane kovinski kompleks (koordinacijska spojina), ki vsebuje koordinacijsko vez, oba elektrona pa prispeva ligand (1).

V nadaljevanju so predstavljeni nekatere osnovni molekularni mehanizmi toksičnosti kovin.

- Nereguliran transport neesencialnih kovin in deregulacija transporta esencialnih kovin. Transportni proteini za prenos endogenih snovi v/iz celice ter za kopičenje kovin v veziklih imajo nizko selektivnost za substrat in lahko transportirajo različne kovine ali

njihove komplekse, ki so si podobni na molekularnem nivoju. Tako lahko npr. mangan (Mn), kadmij (Cd) in baker (Cu) tekmujejo z esencialno kovino cinkom (Zn) za ista vezavna mesta na transporterju za Zn ter tako pridejo v celico. Po drugi strani pa motijo prevzem oz. sproščanje samega Zn v/iz celice (31–33).

- Zamenjava esencialnih kovin (kofaktori/komponente) v encimih in drugih biološko pomembnih molekulah ter s tem motenje njihovega delovanja. Za optimalno delovanje anhidraze ogljikove kisline je tako v eritrocitih potreben cink (Zn) kot kofaktor. Če ga zamenja kobalt (Co), pride do inhibicije aktivnosti encima. Le-ta se zmanjša na 56%. Še huje je, če ustreznemu kofaktor cink zamenja baker (Cu). Takrat je aktivnost inhibirana na 1% (2). Svinec (Pb), arzen (As) in selen (Se) motijo delovanje *Zn-finger* proteinov (domene, imenovane cinkovi prsti, vsebujejo ponovitve cisteinskih in histidinskih ostankov, ki vežejo cinkove ione ter se pri tem zvijejo v zankasto strukturo v obliki prsta, ki veže DNK). Posledično so moteni transkripcija in popravljalni mehanizmi (34).
- Vezava kovin na proteine. Najpomembnejša proteina, ki vežeta kovine, sta glutation (GSH) in metalotioneini (MTs). Čeprav oba po eni strani zmanjšata toksičnost kovin s tem, da jih kelirata in omejeta njihovo razpoložljivost, pa lahko po drugi tudi povečata toksičnost. MTs omogočajo, da kovine ostanejo dalj časa v telesu, kar lahko vodi v kronične učinke, če so zaščitni mehanizmi nezadostni (35). GSH olajšajo transport kovin čez biološke membrane in povečajo toksičnost v tarčnem organu. Tako GSH lahko poveča toksičnost Hg^{2+} , ker omogoča, da se le-ta akumulira v tarčnem organu (36). Poleg teh dveh proteinov pa so v telesu na voljo še mnogi drugi, ki tudi vežejo kovine (1).
- Vpliv na signalne poti v celici in na izražanje genov. S kovinami sprožene signalne poti v celici so npr. nastanek reaktivnih kisikovih radikalov (ROS), aktivacija MAPK (z mitogenom aktivirane protein kinaze, katerih posledice aktivnosti so spremembe v izražanju genov za celično rast, proliferacijo, diferenciacijo, apoptozo in trans-

formacijo) in druge signalne poti, ki vplivajo na izražanje genov s pomembno vlogo v procesu kancerogeneze (npr. PI3K, HIF-1, AP-1) (37).

Imunotoksičnost

Toksični učinki kovin na imunski sistem se kažejo kot supresija, nespecifična stimulacija, preobčutljivostna reakcija in avtoimunost (1, 38). Toksičnost, ki jo posreduje imunski sistem, lahko odstopa od osnovnih pravil odnosa odmerka – učinek. Kovina lahko pri nizkem odmerku okrepi specifično imunsko vlogo, pri srednjem lahko nima učinka, medtem ko visok odmek deluje imunosupresivno. To vrsto odnosa odmerka – učinek so ugotovili za arzen (As), kadmij (Cd), krom (Cr), svinec (Pb) in selen (Se) (39–41). Zaradi redundance in rezervne kapacitete imunskega sistema so klinično relevantni učinki neobičajni. Prevladujoča klinično relevantna preobčutljivostna reakcija je s T-celicami posredovan alergijski kontaktni dermatitis, ki je povezan predvsem z izpostavljenostjo beriliju (Be), kobaltu (Co), kromu (Cr), zlatu (Au), živemu srebru (Hg) in niklju (Ni). Takojšnja (tip I) preobčutljivostna reakcija s prevladujočimi simptomi dihalnih poti je redka. Če se že pojavi, je najpogosteje povezana s platino (Pt), redko z nikljem (Ni) in kromom (Cr). Zelo malo je dokumentiranih primerov, ko bi kovine povzročile avtoimunosti pri človeku. Preizkusi na živalih so pokazali, da živo srebro (Hg), svinec (Pb) in kadmij (Cd) pospešijo in/ali povečajo razvoj avtoimunosti. Velik pomen pri tem imajo genetski dejavniki, kot je npr. regulacija občutljivosti na živo srebro (Hg) (1, 42–44).

Reprodukcijska toksičnost

Snovi, ki so strupene za razmnoževanje, lahko slabijo plodnost moških in žensk ali povzročajo razvojne napake na potomcih bodisi pred rojstvom ali po njem. Kovine imajo zelo različne škodljive učinke na plodnost ter na prenatalni in neonatalni razvoj. Nekatere učinke, kot so splav ali prirojene nepravilnosti, je lažje prepoznati kot subtilne učinke na plodnost (1). V zadnjih letih pa se več zanimalo za mehanizme, ki vodijo v motnje hormonskega ravnotežja in oksidativni stres

(45, 46). Evropska zakonodaja (direktiva 67/548/EEC z dopolnitvami) razvršča kemikalije na podlagi toksičnosti za razmnoževanje v tri skupine. Pri tem ločeno obravnava vpliv na plodnost in toksičnost za razvoj potomcev.

V skupini 1 so snovi, ki so dokazano reprodukcijsko toksične za človeka. Zanje obstaja dovolj dokazov za vzročno povezavo med izpostavljenostjo človeka tem snovem in reprodukcijsko toksičnostjo. V skupini 2 so snovi, ki se jih šteje med reprodukcijsko toksične za človeka, ker se utemeljeno sklepa, da lahko izpostavljenost človeka tem snovem toksično vpliva na razmnoževanje. Zanje so jasni izsledki primernih preizkusov na živalih in drugi pomembni podatki. V skupini 3 so snovi, za katere se domneva, da so reprodukcijsko toksične za človeka. Zanje izsledki preizkusov na živalih kažejo na možnost, da so reprodukcijsko toksične za človeka. Zakonodaja pa posebej označuje snov, če njen toksični učinek izvira le iz izpostavljenosti preko materinega mleka. Taka snov ni razvrščena med reprodukcijsko toksične (47). Pri razvrščanju snovi na podlagi toksičnosti za razmnoževanje pa moramo vedeti, da ima lahko neka kovina določene toksične učinke samo v določeni kemijski obliki. Tako je lahko kovina v eni kemijski obliki strupena za razmnoževanje, v drugi obliki pa ni razvrščena med reprodukcijsko toksične ali pa je razvrščena v različnih kemijskih oblikah v različne skupine. Primer za to je kadmij (Cd), ki kot kadmijev fluorid slabi plodnost in toksično vpliva na razvoj (skupina 2), kot kadmijev sulfid domnevno slabi plodnost in toksično vpliva na razvoj (skupina 3), kot kadmijev jodid pa ni razvrščen kot toksičen za razmnoževanje (48).

Pri poskusih na živalih so ugotovili, da so mnoge kovine pri visokih odmerkih škodljive za reprodukcijski sistem pri samcih. Le za malo kovin pa so na voljo dokazi o njihovi škodljivosti za moško plodnost (1, 49). Kot toksične za moško plodnost so razvrščene naslednje kovine oz. njihove spojine:

- kadmij kot kadmijev fluorid, klorid, sulfat (skupina 2), v obliki sulfida ali prahu je kadmij domnevno toksičen (skupina 3), saj poslabša delovanje prostate in serumskega testosterona (47, 49, 51, 52),

- svinec (Pb) (skupina 3), za katerega se domneva, da vpliva na moško plodnost in na določene parametre kvalitete semenčic (48, 53, 54), in
- krom kot kromov trioksid (Cr) (skupina 3), ki domnevno vpliva na število in kvaliteto semenčic (48, 55, 56).

Tudi vodotopne kobaltove soli so bile predlagane, da se jih razvrsti med snovi, ki slabi-jo moško plodnost (skupina 2) (57). Učinki nekaterih drugih kovin so precej slabše dokumentirani. Sem spadajo živo srebro (Hg), mangan (Mn), nikelj (Ni) in arzen (As). Za človeka so tudi še vedno nezadostni dokazi, da so učinki na moško plodnost odvisni od odmerka (1).

Učinki kovin na plodnost žensk lahko izvirajo iz izpostavljenosti v različnih starostnih obdobjih. Izpostavljenost v obdobju razvoja plodu, med zgodnjim razvojem in dozorevanjem se lahko izrazi kot zmanjšana plodnost ali neplodnost, intrauterino zaostajanje v rasti, spontani splav, teratogenost, napake pri rojstvu, postnatalna smrt, pomanjkljivosti pri učenju in vedenju, prezgodnje staranje. Podatki izvirajo večinoma iz poskusov na živalih ter iz študij o plodnosti in spontan-ih splavih. Klinične in epidemiološke podatke s tega področja je pogosto težko razložiti, ker na rezultat vpliva veliko dejavnikov, npr. starost, ovarijska rezerva, neravnovesje hormonov, vedenje, genetika, dejavniki plodnosti pri moških in spolno prenosljive bolezni. Dokumentacija o določenih učinkih na žensko plodnost obstaja za svinec (Pb), kadmij (Cd), živo srebro (Hg), mangan (Mn), krom (Cr), nikelj (Ni), arzen (As) in platino (Pt). Vendar so za zdaj izsledki nezadostni, da bi zakonodaja razvrstila katero od teh kovin kot toksično za plodnost žensk (1, 58–61).

Kovine povzročajo zelo različne razvojne napake, kot so intrauterino zaostajanje v rasti, splav, teratogenost in nepravilnosti predvsem v delovanju živčnega sistema (1). Kot toksične za razvoj so razvrščene naslednje kovine oz. njihove spojine:

- svinec (skupina 1) (47, 62–64),
- kadmij v obliki kadmijevega fluorida, klorida, sulfata (skupina 2), medtem ko je v obliki sulfida ali prahu domnevno toksičen (skupina 3) (47, 65, 66),

- nikelj v obliki nikljevega tetrakarbonila (skupina 2) (47, 67),
- vanadij v obliki vanadijevega pentoksida (skupina 3) (47, 68).

Kot domnevno toksične za razvoj (skupina 3) pa so predlagane še številne druge nikljeve spojine, kot so npr. acetat, nitrat, diklorid (55, 67). Preizkusi teratogenosti pri živalih so bili pozitivni tudi za aluminij (Al), arzen (As), krom (Cr), baker (Cu), galij (Ga), živo srebro (Hg), litij (Li), mangan (Mn), selen (Se), uran (U) in cink (Zn). Zanje pa ni dovolj ustreznih dokazov, da bi jih lahko razvrstili v skupino 3. Učinki na poskusnih živalih so bili med drugim fetalna ali postnatalna letalnost, malformacije (anencefalija, defekti oči, razklano nebo, skeletne nepravilnosti). Pomen teh rezultatov za človeka pa je še vedno nejasen (1, 69). V neonatalnem in zgodnjem postnatalnem obdobju je občutljivost organizma za kovine zelo velika. Primer za to je svinec (Pb). V zadnjem desetletju se je nivo svınca v krvi otrok znižal na manj kot 50 µg/L. Kljub temu zmanjšanju pa je zastrupitev otrok s svincom ostala zdravstveni problem v določenih skupinah populacije. Nedavne študije so prinesle nove dokaze, ki kažejo v prid povezavi med nivojem svınca v krvi in poslabšanjem intelektualnih sposobnosti otrok pri nivoju svınca pod 100 µg/L (64). Vprašljivo je tudi, če lahko mejno vrednost za toksičnost svınca sploh postavimo oz. če obstaja vrednost, ki ne bi imela toksičnih učinkov. To je tudi eden od razlogov, da je evropska zakonodaja (direktiva 2001/466/EC) postavila nove mejne vrednosti za vsebnost svınca v hrani, ki naj bi bile čim nižje (71).

Mutagenost

Snovi, ki so mutagene, povzročajo trajne spremembe v množini in strukturi genetskega materiala organizma, kar se izraža kot sprememba njegovih fenotipskih značilnosti. Spremembe lahko zajamejo posamezen gen, zaporedje genov ali cel kromosom. Mutagen je tisti dejavnik, ki poveča pogostost pojavljanja mutacij (47). Večina kovin le v majhni meri učinkuje neposredno na genetski material. Take uvrščamo med t. i. šibke mutagene (1). Evropska zakonodaja (direktiva 67/548/EEC z dopolnitvami) razvršča mutagene kemikalije

v tri skupine. V skupini 1 so snovi, ki so dokazano mutagene za človeka. Zanje obstaja dovolj dokazov za vzročno povezavo med izpostavljenostjo človeka tem snovem in nastankom dednih genetskih okvar. V skupini 2 so snovi, ki se jih šteje med mutagene za človeka, ker se utemeljeno sklepa, da izpostavljenost človeka tem snovem lahko povzroča nastanek dednih genetskih okvar. Zanje so podani jasni izsledki primernih dolgotrajnih preizkusov na živalih in drugi pomembni podatki. V skupini 3 so snovi, za katere se domneva, da povzročajo nastanek mutagenih okvar pri človeku. Zanje izsledki ustreznih preizkusov mutagenosti kažejo na to možnost, vendar dostopne informacije še ne zadoščajo za zanesljivo uvrstitev v skupino 2. Če je snov razvrščena v 3. skupino mutagenosti zaradi povzročanja genetskih sprememb v somatskih celicah, se to po navadi šteje kot znak za močno rakotvorno delovanje (47). Pri razvrščanju mutagenih snovi pa moramo tako kot pri toksičnosti za razmnoževanje vedeti, da ima lahko neka kovina določene toksične učinke samo v določeni kemijski obliki. Tako je lahko kovina v eni kemijski obliki mutagena, v drugi pa ne ali pa jo razvrščamo v različnih kemijskih oblikah v različne skupine. Primer za to je kadmij (Cd), ki ga kot kadmijev klorid štejemo med mutagene za človeka (skupina 2), kot kadmijev sulfid je domnevno mutagen (skupina 3), kot kadmijev jodid pa ni razvrščen med mutagene (48).

Kot mutagene kovine evropska zakonodaja razvršča kadmij (Cd), krom (Cr), kobalt (Co) in nikelj (Ni) (46). Kadmij je kot kadmijev klorid in sulfat razvrščen med mutagene za človeka (skupina 2), medtem ko je v obliki fluorida, oksida, sulfida, diformata, cianida, heksafluorasilikata, jodida ali elementaren domnevno mutagen (skupina 3) (48). Kadmij povzroča kromosomske nenormalnosti, mutacije tumorskih supresorskih genov in ovira popravilne mehanizme DNK (72–75). Mehanizem genotoksičnosti kadmija (Cd) je lahko posredna indukcija oksidativnega stresa, ker inhibira antioksidantske encime in izzove pomanjkanje antioksidantskih molekul, kot je GSH (76). Krom je kot kromov trioksid razvrščen med mutagene za človeka (skupina 2) (48). Mutagenost kroma naj bi temeljila predvsem na oksidativnem stresu,

redukciji Cr (VI) v Cr (III) in vezavi Cr (III) na DNK. Ker pa se veže na fosfatni skelet in s tem ne poškoduje veliko vijačnice DNK, je to verjetno razlog za njegovo šibko mutageno delovanje (77, 78). Obstaja tudi možnost, da zavira popravilne mehanizme DNK (79). Kobalt je v obliki acetata, nitrata in karbonata razvrščen kot domnevno mutagen (skupina 3) (48). Predpostavljajo, da mutagenost kobalta lahko temelji na dveh molekularnih mehanizmih:

- povzroča kromosomske nepravilnosti preko vezave Co (II) na DNK in
- inhibira popravila poškodb DNK zaradi endogenih procesov in delovanja drugih snovi (80–83).

Nikelj je v obliki diklorida in dinitrata razvrščen kot domnevno mutagen (skupina 3) (48). Preizkusi so pokazali, da lahko nikelj povzroča oksidativni stres, kromosomske nepravilnosti in nestabilnost genoma (84–86).

Kancerogenost

Za rakotvornost kovin so pomembni epigenetski mehanizmi, ki vključujejo inaktivacijo tumorskih supresorskih genov in aktivacijo onkogenov. Tako delujejo arzen (As), kadmij (Cd) in nikelj (Ni), in sicer povzročajo hipometilacijo in/ali hipermetilacijo DNK ter modifikacijo histonov (acetilacija, metilacija, fosforilacija, ubikvitinacija, sumoilacija in ADP-ribozilacija) (1). Kovine delujejo tudi kot kokarcinogeni. Zelo močna je interakcija kovin s kancerogenimi snovmi, kot so PAH, UV, in s kancerogeni, ki so prisotni v cigaretne dimu (87–89). Evropska zakonodaja razvršča rakotvorne kemikalije v tri skupine. V skupini 1 so snovi, ki so dokazano rakotvorne za človeka. Zanje obstaja dovolj dokazov za vzročno povezavo med izpostavljenostjo človeka tem snovem in nastankom raka. V skupini 2 so snovi, ki se jih šteje med rakotvorne za človeka, ker se utemeljeno sklepa, da izpostavljenost človeka tem snovem lahko povzroča nastanek raka. Zanje so podani jasni izsledki primernih dolgotrajnih preizkusov na živalih in drugi pomembni podatki. V skupini 3 so snovi, za katere se domneva, da povzročajo nastanek raka pri človeku. Zanje izsledki ustreznih preizkusov na živalih kažejo na to možnost, vendar dostopni

podatki še ne zadoščajo za zanesljivo uvrstitev v skupino 2. Razvrstitev snovi v skupino 1 temelji na epidemioloških podatkih, v skupino 2 ali 3 pa v prvi vrsti na izsledkih preizkusov na živalih (47). Obstajajo pa še druge razvrstitve rakotvornih snovi. Znana je predvsem IARC-ova razvrstitev (angl. *International Agency for Research on Cancer*), ki poleg kemikalij razvršča tudi zdravila, mikroorganizme, druge agense in tudi mešanice snovi v naslednje skupine:

- v skupino 1, v kateri so dokazano rakotvorne snovi za človeka,
- v skupino 2a, v kateri so verjetno rakotvorne snovi za človeka, in v skupino 2b, v kateri so mogoče rakotvorne snovi za človeka,
- v skupino 3, v kateri so snovi, ki ne morejo biti razvrščene (pogosto so v tej skupini snovi, za katere potrebujemo dodatne raziskave, da bi jih lahko razvrstili), ter
- skupino 4, v kateri so snovi, ki verjetno niso rakotvorne za človeka (90).

Med razvrščanjem rakotvornih snovi po evropski zakonodaji in po IARC so določene razlike. Evropska zakonodaja razvršča samo vsako spojino posebej, medtem ko so pri IARC zaključki tudi za skupino spojin, npr. razvrstitev anorganskih spojin svinca v skupino 2a. Evropska zakonodaja posebej označuje snovi, ki so rakotvorne le pri vdihavanju, ne pa tudi pri zaužitju ali v stiku s kožo. Pri razvrščanju rakotvornih snovi pa moramo

vedeti, da ima lahko neka kovina določene toksične učinke samo v določeni kemijski obliki. Tako je lahko kovina v eni kemijski obliki rakotvorna, v drugi pa ni razvrščena ali pa so različne kemijske oblike iste kovine razvrščene v različne skupine. Primer je kobalt (Cd), ki je razvrščen po evropski zakonodaji kot kobaltov diklorid v 2. skupino, kot kadmijev oksid pa ni razvrščen (46).

IARC je kot rakotvorne razvrstil naslednje kovine oz. njihove spojine (90, 91):

- skupina 1: nikljeve spojine, kromove (VI) spojine, anorganske spojine arzena, kadmij in njegove spojine, berilij in njegove spojine (tabela 2);
- skupina 2a: anorganske spojine svinca, cisplatin;
- skupina 2b: kovinski nikelj, metilživo srebro, kobalt in njegove spojine ter železov dekstran.

Kot rakotvorne kovine pa so po evropski zakonodaji razvrščeni arzen (As), berilij (Be), kadmij (Cd), krom (Cr), kobalt (Co), nikelj (Ni) in svinec (Pb) (48). Arzen je kot kislina in soli, trioksid in pentoksid razvrščen med rakotvorne snovi za človeka (skupina 1). Berilij in njegove spojine so razvrščeni med snovi, ki se štejejo med rakotvorne za človeka, a le pri vdihavanju (skupina 2). Kadmij je v elementarni obliki ter kot kadmijev fluorid, klorid, sulfat in sulfid razvrščen med snovi, ki se štejejo med rakotvorne za človeka (skupina 2).

Tabela 2. Kovine in njihove spojine, ki so dokazano kancerogene za človeka (skupina 1), ter vrsta tumorjev. Razvrstitev po IARC (*International Agency for Research on Cancer*). ¹ Naštetni samo tisti karcinomi, za katere je dovolj dokazov za človeka. ² Pojavi se pri daljši izpostavljenosti višjim odmerkom. ³ Starejše študije kažejo povečano tveganje, rezultati novejših pa niso konsistentni.

Kovina	Tarčni organi za karcinom pri človeku ¹	Vir: IARC »Monographs on the evaluation of carcinogenicity risk to humans«
arzen: anorganske spojine As	pljuča, koža	Vol.: 23 (1980)
berilij: elementarni in spojine Be	pljuča, ČŽS ²	Vol.: 58 (1993)
kadmij: elementarni in spojine Cd	pljuča, prostata ³	Vol.: 58 (1993)
krom: Cr (VI) spojine	pljuča, sinonazalna votlina	Vol.: 49 (1990)
nikelj: ni spojine	pljuča, nos	Vol.: 49 (1990)

Krom je kot kromov trioksid razvrščen kot rakotvoren za človeka (skupina 1), kot kromov (III) kromat in kromove (VI) spojine pa v skupino 2, slednji je rakotvoren le pri vdihavanju. Kobalt v obliki diklorida in sulfata je razvrščen med snovi, ki se štejejo kot rakotvorne za človeka le pri vdihavanju (skupina 2) (48). Na podlagi novih podatkov pa so predlagane kot rakotvorne kovine pri vdihavanju še druge kobaltove spojine, in sicer kobaltov karbonat, nitrat in diklorid (skupina 2) (57). Nikelj je v obliki monoksida, dioksida, trioksida in sulfida razvrščen kot rakotvoren za človeka le pri vdihavanju (skupina 1), medtem ko je elementarni nikelj ter kot nikelj tetra karbonil, karbonat, dihidroksid in sulfat razvrščen kot domnevno rakotvoren za človeka (skupina 3) (48). Na podlagi novih podatkov pa so predlagane kot rakotvorne kovine za človeka pri vdihavanju še nikljev dinitrat, acetat, njegove kisline in soli (skupina 1), medtem ko je nikelj v prahu predlagan, da se razvrsti kot domnevno rakotvoren za človeka (skupina 3) (57, 69). Svinec je v obliki svinčevega hidrogenarsenata razvrščen kot rakotvoren za človeka (skupina 1), medtem ko je kot svinčev kromat, acetat in sulfokromat rumeni razvrščen kot domnevno rakotvoren za človeka (skupina 3) (48).

MEJNE VREDNOSTI KOVIN V PITNI VODI, HRANI IN ZUNANJEM ZRAKU

Če želimo nadzirati človekovo izpostavljenost toksičnim kovinam, ki so prisotne v okolju, moramo med drugim postaviti maksimalne dovoljene vrednosti kovin v pitni vodi, hrani in zraku (93–96). To je še toliko pomembnejše, ker kovine ne razpadejo, temveč se akumulirajo in njihov transport lahko poteka na dolge razdalje. V evropski zakonodaji so določene maksimalne dovoljene vrednosti v:

- **pitni vodi** za arzen (As), baker (Cu), bor (B), kadmij (Cd), krom (Cr), nikelj (Ni), selen (Se), svinec (Pb), aluminij (Al), mangan (Mn) in železo (Fe) (tabela 3),
- **okoljskem zraku** za svinec (Pb), arzen (As), kadmij (Cd), nikelj (Ni) in živo srebro (Hg) (tabela 4),

- **hrani** za svinec (Pb), kadmij (Cd) in živo srebro (Hg) (tabela 5).

Vsebnost svinca, kadmija in živega srebra v hrani naj bi bila tako nizka, kot jo lahko dosežemo. Razlog za to je, da svinec pri otrocih zavira kognitivni razvoj, pri odraslih pa je povezan s povišanim krvnim pritiskom in boleznimi srčnožilnega sistema. Kadmij se v telesu akumulira in vodi v ledvično odpoved, skeletne poškodbe, znižanje reprodukcijskih funkcij in je dokazano kancerogen za človeka. Živo srebro pri dojenčkih vpliva na normalen razvoj možganov, medtem ko je pri odraslih povezan z nevrološkim spremembami. Z živim srebrom so onesnažene predvsem ribe (92).

Tabela 3. Maksimalne dovoljene vrednosti kovin v pitni vodi po evropski direktivi 98/83/E (93). ¹Vzorec, vzet tako, da predstavlja tedensko povprečno koncentracijo. ²Svinec mora vrednost izpolniti do 1. 11. 2013. Do takrat je vrednost 25 µg/L.

Kovina	Mejna vrednost [µg/L]
arzen	10
baker	2000 ¹
bor	1000
kadmij	5
krom	50
nikelj	20 ¹
selen	10
svinec	10 ^{1, 2}
živo srebro	1
aluminij	200
mangan	50
železo	200

Tabela 4. Maksimalne dovoljene vrednosti kovin v okoljskem zraku za svinec po direktivi 99/30/EC ter za arzen, kadmij, nikelj in živo srebro po evropski direktivi 2004/107/EC (95, 96). ¹Gljne mejne vrednosti do 31. 12. 2012.

Kovina	Mejna letna vrednost [ng/m ³]
svinec	500
arzen	6 ¹
kadmij	5 ¹
nikelj	20 ¹

Tabela 5. Maksimalne dovoljene vrednosti kovin v izbranih vrstah hrane po evropski direktivi EC 466/2001. Vrednosti so različne glede na vrsto hrane, zato so podane samo vrednosti za izbrane vrste hrane (93).

Vrsta hrane	Mejna vrednost [mg/kg]		
	Svinec	Kadmij	Živo srebro
kravje mleko	0,02	–	–
meso govedí, ovac, svinj in perutnine razen drobovine	0,1	0,05	–
konjsko meso	–	0,2	–
jetra govedí, ovac, svinj in perutnine	–	0,5	–
ledvica govedí, ovac, svinj in perutnine	–	1,0	–
mišičnina rib	0,2	0,05	0,5
mišičnina rib določenih vrst (npr. tunov)	0,4	0,1	1,0
raki, razen rjavega mesa	0,5	0,5	–
školjke	1,0	1,0	–
glavonožci (brez drobovine)	1,0	1,0	–
maščobe in olja	0,1	–	–
sadni sokovi	0,05	–	–
vina	0,2	–	–
zelenjava	0,1	0,05	–
zelje, listna zelenjava, gobe	0,3	0,2	–
sadje (razen jagodičja)	0,1	0,05	–
riž	–	0,2	–
soja	–	0,2	–

MEJNE VREDNOSTI ZA POKLICNO IZPOSTAVLJENOST

Če želimo zavarovati delavca pred tveganji zaradi izpostavljenosti kovinam pri delu, moramo postaviti mejne vrednosti kovin v zraku na delovnem mestu. Vdihavanje je namreč najpomembnejša izpostavljenost za delavca. Mejne vrednosti so podane za 8-urno izpostavljenost. Za krajše obdobje lahko obstaja za določene snovi t. i. kratkotrajna vrednost,

ki pomeni dovoljeno odstopanje od mejne vrednosti navzgor. Evropska komisija je postavila mejne vrednosti za naslednje kovine: arzen (As), baker (Cu), berilij (Be), bor (B), indij (In), kadmij (Cd), kobalt (Co), kositer (Sn), krom (Cr), litij (Li), mangan (Mn), nikelj (Ni), platino (Pt), silicij (Si), srebro (Ag), svinec (Pb), talij (Tl), telurij (Te), uran (U), vanadij (V), volfram (W), železo (Fe) in živo srebro (Hg). Mejne vrednosti so za isto kovino v različnih kemijskih oblikah lahko različne (97).

LITERATURA

1. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, et al. Handbook on the toxicology of metals. 3rd ed. Burlington, San Diego, London: Elsevier; 2007.
2. Walker CH, Hopkin SP, Silby RM, et al. Major classes of pollutant. In: principles of ecotoxicology. 2nd ed. Boca Raton, London: Taylor & Francis Group; 2001: 3–22.
3. Landrigan P, Nordberg M, Lucchini R, et al. The Declaration of Brescia on Prevention of the Neurotoxicity of Metals. June 2006. Med Lav 2006; 97: 811–4.
4. IUPAC: Periodic table of the elements. Dosegljivo na: http://www.iupac.org/reports/periodic_table/index.html
5. Bjerrum N. Bjerrum's Inorganic Chemistry. 3rd Danish ed. London: Heinemann; 1936.
6. Duffus JH. Glossary for chemists of terms used in toxicology. Pure Appl Chem 1993; 65: 2003–122. Dosegljivo na: <http://www.iupac.org/reports/1993/6509duffus/index.html>
7. Nieboer E, Richardson DHS. The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environmental Pollution 1980; 1 (1): 3–26.

8. US EPA. Air quality criteria for particulate matter. 2004. EPA /600/ P-99/ 002aF.
9. WHO. Trace elements in human nutrition and health. World Health Organization, Geneva, 1996.
10. Nierenberg DW, Nordgren RE, Chang MB. Delayed cerebellar disease and death after accidental exposure to dimethylmercury. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1672–6.
11. US EPA. Air quality criteria for particulate matter. 2004. EPA /600/ P-99/ 002aF.
12. WHO. Environmental Health Criteria 118: Mercury. World Health Organization, Geneva, 1991.
13. Hunter D. Diseases of occupations. London: Little Brown and Co. 1969.
14. Wasserman GA, Liu X, Pervez F, et al. Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh. *Environ Health Perspect.* 2004; 112: 1329–33.
15. Nemmer A, Hoet PH, Vanquickenborne B, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 2002; 105: 411–4.
16. Mills NL, Amin N, Robinson SD, et al. Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173: 426–31.
17. Richards MP, Cousins RJ. Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats. *J Nutr.* 1976; 106: 1591–9.
18. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2004; 117: 285–97. Review.
19. Leopold G, Furukawa E, Forth W, et al. Comparative study of the absorption of heavy metals in vivo and in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1969; 263: 275–6.
20. Talkvist J, Bowlus CL, Lönnnerdal B. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol Lett.* 2001; 122: 171–7.
21. Engström B, Nordberg GF. Dose dependence of gastrointestinal absorption and biological half-time of cadmium in mice. *Toxicology.* 1979; 13: 215–22.
22. Engström B, Nordberg GF. Factors influencing absorption and retention of oral ¹⁰⁹Cd in mice: age, pretreatment and subsequent treatment with non-radioactive cadmium. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1979; 45: 315–24.
23. Mertz W. Trace elements in human and animal nutrition. 5th ed. New York: Academic Press; 1987.
24. Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med.* 2007; 50: 757–64. Review.
25. Zhitkovich A, Quievryn G, Messer J, et al. Reductive activation with cysteine represents a chromium(III)-dependent pathway in the induction of genotoxicity by carcinogenic chromium(VI). *Environ Health Perspect.* 2002; 110(Suppl): 729–31.
26. Buchet JP, Lauwerys R, Roels H. Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsenate, or dimethylarsinate in man. *Int Arch Occup Environ Health.* 1981; 48: 71–9.
27. Cremer JE. The biochemistry of organotin compounds; the conversion of tetraethyltin into triethyltin in mammals. *Biochem J.* 1958; 68: 685–92.
28. Grandjean PH, Grandjean EC. Biological effects of organolead compounds. Boca Rato: CRC press; 1984.
29. Cikrt M, Bencko V. Fate of arsenic after parenteral administration to rats, with particular reference to excretion via bile. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1974; 18: 129–36.
30. Rowland LR, Robinson RD, Doherty RA, et al. Reproductive and Developmental Toxicity of Metals. New York: Plenum Press; 1983.
31. Voegtlin C, Hodge HC. Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds. New York: McGraw-Hill Books; 1960.
32. Gaither LA, Eide DJ. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem.* 2000; 275: 5560–4.
33. Ballatori N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect.* 2002; 110(Suppl): 689–94. Review.
34. Chen H, Davidson T, Singleton S, et al. Nickel decreases cellular iron level and converts cytosolic aconitase to iron-regulatory protein 1 in A549 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 206: 275–87.
35. Maret W. Zinc and sulfur: a critical biological partnership. *Biochemistry.* 2004; 43: 3301–9. Review.
36. Satoh M, Nishimura N, Kanayama Y, et al. Enhanced renal toxicity by inorganic mercury in metallothionein-null mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283: 1529–33.
37. Zalups RK, Barfuss DW. Transport and toxicity of methylmercury along the proximal tubule of the rabbit. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993; 12: 176–85.
38. Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 1921–42. Review.
39. Duffus JH. Toxicology of metals—science confused by poor use of terminology. *Arch Environ Health.* 2003; 58: 263–5.
40. McCabe M, Maguire D, Nowak M. The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocyte mitogenesis in vitro. *Environ Res.* 1983; 31: 323–31.

41. Borella P, Manni S, Giardino A. Cadmium, nickel, chromium and lead accumulate in human lymphocytes and interfere with PHA-induced proliferation. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1990; 4: 87–95.
42. Descotes J, Choquet-Kastylevsky G. Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology* 2001; 158: 43–9.
43. Kimber I, Selgrade MK. *T lymphocyte populations in immunotoxicology*. Chister: John Wiley & Sons; 2003.
44. Schuppe HC, Rönnau AC, Von Schmiedeberg S, et al. Immunomodulation by heavy metal compounds. *Clin Dermatol* 1998; 16: 149–57.
45. Martin SF. T lymphocyte-mediated immune responses to chemical haptens and metal ions: implications for allergic and autoimmune disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134: 186–98.
46. Sharpe RM, Irvine DS. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 2004; 328: 447–51.
47. Henson MC, Chedrese PJ. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med* (Maywood) 2004; 229: 383–92.
48. Pravilnik o razvršćanju, pakiranju in označevanju nevarnih snovi. Priloga VI: Splošne zahteve in merila za razvršćanje in označevanje nevarnih snovi in pripravkov. Uradni list RS, št. 35/05.
49. 29th Adaptation to Technical Progress of Directive 67/548/EEC. Annex I, the published list of substances with a harmonised classification and labelling. European Chemicals Bureau. Dosegljivo na: <http://ecb.jrc.it/classification-labelling/>
50. Working PK. Male reproductive toxicology: comparison of the human to animal models. *Environ Health Perspect* 1988; 77: 37–44.
51. Xu DX, Shen HM, Zhu QX, et al. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res* 2003; 534: 155–63.
52. Jurasović J, Cvitković P, Pizent A, et al. Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects. *Biomaterials* 2004; 17: 735–43.
53. Zeng X, Jin T, Buchet JP, et al. Impact of cadmium exposure on male sex hormones: a population-based study in China. *Environ Res* 2004; 96: 338–44.
54. Apostoli P, Kiss P, Porru S, et al. Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. ASCLEPIOS Study Group. *Occup Environ Med* 1998; 55: 364–74.
55. Telisman S, Cvitković P, Jurasović J, et al. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 45–53.
56. Li H, Chen Q, Li S, et al. Effect of Cr(VI) exposure on sperm quality: human and animal studies. *Ann Occup Hyg* 2001; 45: 505–11.
57. Danadevi K, Rozati R, Reddy PP, et al. Semen quality of Indian welders occupationally exposed to nickel and chromium. *Reprod Toxicol* 2003; 17: 451–6.
58. 30th Adaptation to Technical Progress of Directive 67/548/EEC. Annex I, the published list of substances with a harmonised classification and labelling. European Chemicals Bureau. Dosegljivo na: <http://ecb.jrc.it/classification-labelling/>
59. Fagher U, Laudanski T, Schütz A, et al. The relationship between cadmium and lead burdens and preterm labor. *Int J Gynaecol Obstet* 1993; 40: 109–14.
60. Gerhard I, Waibel S, Daniel V, et al. Impact of heavy metals on hormonal and immunological factors in women with repeated miscarriages. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 301–9.
61. Gardella JR, Hill JA. Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2000; 18: 407–24.
62. Kumar S. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J Occup Health* 2004; 46: 1–19.
63. Ferm VH, Carpenter SJ. Developmental malformations resulting from the administration of lead salts. *Exp Mol Pathol* 1967; 7: 208–13.
64. Koller K, Brown T, Spurgeon A, et al. Recent developments in low-level lead exposure and intellectual impairment in children. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 987–94.
65. Lanphear BP, Hornung R, Khoury J, et al. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 894–9.
66. Kostial K, Blanus M, Schönwald N, et al. Organ cadmium deposits in orally exposed female rats and their pups and the depleting efficiency of sodium N-(4-methoxybenzyl)-D-glucamine-N-carbodithioate monohydrate (Me-OBDCG). *J Appl Toxicol* 1993; 13: 203–7.
67. Nagymajtenyi L, Schulz H, Desi I. Behavioural and functional neurotoxicological changes caused by cadmium in a three-generational study in rats. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16: 691–9.
68. Sunderman FW Jr, Shen SK, Reid MC, et al. Teratogenicity and embryotoxicity of nickel carbonyl in Syrian hamsters. *Teratog Carcinog Mutagen* 1980; 1: 223–33.
69. Domingo JL. Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents: a review of their toxic effects. *Biol Trace Elem Res* 2002; 88: 97–112.

70. 31st Adaptation to Technical Progress of Directive 67/548/EEC. Annex I, the published list of substances with a harmonised classification and labelling. European Chemicals Bureau. Dosegljivo na: <http://ecb.jrc.it/classification-labelling/>
71. Carpenter DO. Effects of metals on the nervous system of humans and animals. *Int J Occup Med Environ Health* 2001; 14: 209–18.
72. Pravilnik o onesnaževalcih v živilih. Uradni list RS, št. 69/03.
73. Deknudt G, Leonard A. Cytogenetic investigations on leucocytes of workers from a cadmium plant. *Environ Physiol Biochem* 1975; 5: 319–27.
74. Han C, Wu G, Yin Y, et al. Inhibition by germanium oxide of the mutagenicity of cadmium chloride in various genotoxicity assays. *Food Chem Toxicol* 1992; 30: 521–4.
75. Méplan C, Mann K, Hainaut P. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 31663–70.
76. Waisberg M, Joseph P, Hale B, et al. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003; 192: 95–117.
77. Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, et al. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 201–13.
78. Biedermann KA, Landolph JR. Role of valence state and solubility of chromium compounds on induction of cytotoxicity, mutagenesis, and anchorage independence in diploid human fibroblasts. *Cancer Res* 1990; 50: 7835–42.
79. Zhitkovich A. Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI). *Chem Res Toxicol* 2005; 18: 3–11.
80. Hu W, Feng Z, Tang MS. Chromium(VI) enhances (\pm)-anti-7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene-induced cytotoxicity and mutagenicity in mammalian cells through its inhibitory effect on nucleotide excision repair. *Biochemistry* 2004; 43: 14282–9.
81. Mao Y, Liu KJ, Jiang JJ, et al. Generation of reactive oxygen species by Co(II) from H₂O₂ in the presence of chelators in relation to DNA damage and 2'-deoxyguanosine hydroxylation. *J Toxicol Environ Health* 1996; 47: 61–75.
82. Kasten U, Mullenders LH, Hartwig A. Cobalt(II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutat Res* 1997; 383: 81–9.
83. Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, et al. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ Health Perspect* 2002; 110 (Suppl 5): 797–9.
84. De Boeck M, Lombaert N, De Backer S, et al. In vitro genotoxic effects of different combinations of cobalt and metallic carbide particles. *Mutagenesis* 2003; 18: 177–86.
85. Lin XH, Sugiyama M, Costa M. Differences in the effect of vitamin E on nickel sulfide or nickel chloride-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. *Mutat Res* 1991; 260: 159.
86. Costa M, Salnikow K, Sutherland JE, et al. The role of oxidative stress in nickel and chromate genotoxicity. *Mol Cell Biochem* 2002; 234–235, 265–75.
87. Kasprzak KS, Bal W, Karaczyn AA. The role of chromatin damage in nickel-induced carcinogenesis. A review of recent developments. *J Environ Monit* 2003; 5: 183–7.
88. Grimsrud TK, Berge SR, Martinsen JI, et al. Lung cancer incidence among Norwegian nickel-refinery workers 1953–2000. *J Environ Monit* 2003; 5: 190–7.
89. Schwerdtle T, Seidel A, Hartwig A. Effect of soluble and particulate nickel compounds on the formation and repair of stable benzo[a]pyrene DNA adducts in human lung cells. *Carcinogenesis* 2002; 23: 47–53.
90. Wozniak K, Błasiak J. Nickel impairs the repair of UV- and MNNG-damaged DNA. *Cell Mol Biol Lett* 2004; 9: 83–94.
91. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 2006. Dosegljivo na: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf>
92. IARC Complete List of Agents evaluated and their classification. Dosegljivo na: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
93. Direktiva 466/2001/EC.
94. Pravilnik o pitni vodi. Uradni list RS, št. 19/04.
95. Pravilnik o onesnaževalcih v živilih. Uradni list RS, št. 69/03.
96. Uredba o žveplovm dioksidu, dušikovih oksidih, delcih in svincu v zunanjem zraku. Uradni list RS, št. 52/02.
97. Uredba o arzeniu, kadmiju, živem srebru, niklju in policikličnih aromatskih ogljikovodikih v zunanjem zraku. Uradni list RS, št. 56/06.
98. Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti kemičnim snovem pri delu. Uradni list RS, št. 100/01.