Određivanje koncentracije nikotina i njegovih metabolita u uzorku urina pasivnih pušača

Vazdar, Bernarda

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:433872

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Bernarda Vazdar

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NIKOTINA I NJEGOVIH METABOLITA U UZORKU URINA PASIVNIH PUŠAČA

Diplomski rad

Akademska godina: 2018./2019.

Mentor:

prof.dr.sc. Davorka Sutlović

Split, rujan 2019. god.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Bernarda Vazdar

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NIKOTINA I NJEGOVIH METABOLITA U UZORKU URINA PASIVNIH PUŠAČA

Diplomski rad

Akademska godina: 2018./2019.

Mentor:

prof.dr.sc. Davorka Sutlović

Split, rujan 2019. god.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Farmaceutska toksikologija
Tema rada je prihvaćena na 60. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Davorka Sutlović

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NIKOTINA I NJEGOVIH METABOLITA U UZORKU URINA PASIVNIH PUŠAČA

Bernarda Vazdar, broj indeksa: 149

Sažetak:
Ciljevi ispitivanja: Cilj ovog eksperimentalnog rada je bio je pmomoću GC-MS metode kvantitativno odrediti koncentracije nikotina i kotinina i *trans*-3- hdroksikotinina u biološkim uzorcima urina dobrovoljnih ispitanika prije i poslje odlaksa u noćni klub u kojem je dozvoljeno pušenje**.**
Materijal i metode: U straživanju je sudjelovalo 22 ispitanika, od toga 7 muškaraca i 15 žena. Biološki uzorci urina nepoznath koncentracija nikotina i metabolita pripremljen za analizu ekstrakcijskom metodom tekuće-tekuće (LLE).Za analizu koristili smo GC-MS.
Rezultati: Svi uzorci bili su pozitivni na nikotin i metabolite. Srednja vrjednost nikotina, kotinina i 3-OHK prije izloženosti u noćnom klubu kod nepušača iznosila je 8,197 ng/mL, 28,372 ng/mL, 12,303 ng/mL kod žena i 11,235 ng/mL, 25,763 ng/mL, 3,673 ng/mL kod muškaraca. Srednja vrijednost nakon izloženosti iznosila je: 123,373 ng/mL, 56,544 ng/mL, 41,501 ng/mL kod žena i 21,366 ng/mL, 65,234 ng/mL, 14,941 ng/mL kod muškaraca.
Zaključci: Koncentracije nikotina i metabolita kod nepušača prije izloženosti bile su značajn manje neko nakon izloženosti. Razine nikotina i metabolita kod pušača značajn su veće nego li kod nepušaća. S obzirom a dužinu izloženost porast koncentracija kod konobara, nepušača za nikotin, kotinin i 3-OHK veći je neko kod muških ispitanika koji su boravili u klubu kao posjetitelji.

Ključne riječi: nikotin, kotinin, *trans*-3-hidroksikotinin, pasivno pušenje, biološki uzorak mokraće, LLE, GC—MS metode

Rad sadrži: 74 stranice, 23 slike, 9 tablica, 80 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Marija Definis-Gojanović	predsjednica Povjerenstva
2. doc. dr. sc. Daniela Šupe-Domić	član
3. prof. dr. sc. Davorka Sutlović	član- mentor

Datum obrane: 26. rujna 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area:	Biomedical sciences
Scientific field:	Pharmacy
Course title:	Pharmaceutical toxicology
Thesis subject	was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 60 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine.
Mentor:	Davorka Sutlović. PhD, full prof.

DETERMINATION OF THE CONCENTRATION OF NICOTIN AND ITS METABOLITES IN THE URINE SAMPLE OF PASSIVE SMOKERS

Bernarda Vazdar, rec. number: 149

Summary:
Aims of the study: The purpose of this experimental work was to quantitatively determine the concentrations of nicotine and cotinine and trans-3-hydroxycotinine in biological urine samples from voluntary subjects before and after their visit to a nightclub in which smoking was allowed, by using the GC-MS method.
Material and methods: Twenty-two subjects participated in the research, including 7 men and 15 women. Biological urine samples of unknown nicotine and metabolite concentrations were prepared for analysis by the liquid-liquid extraction (LLE) method. For analysis, we used the GC-MS method.
Results: All samples were positive for nicotine metabolites. The mean value of nicotine, cotinine and 3-OHK before exposure at a nightclub in non-smokers was 8,197 ng / mL, 28,372 ng / mL, 12,303 ng / mL in women and 11,235 ng / mL, 25,763 ng / mL, 3,673 ng / mL in men. Mean post-exposure values were: 123,373 ng / mL, 56,544 ng / mL, 41,501 ng / mL in women and 21,366 ng / mL, 65,234 ng / mL, 14,941 ng / mL in men.
Conclusions: Concentrations of nicotine and metabolites in non-smokers before exposure were significantly lower than after exposure. The levels of nicotine and metabolites in smokers are significantly higher than in non-smokers. Considering the length of exposure, the increase in concentrations of nicotine, cotinine, and 3-OHK in non-smoker waiters was higher than in male respondents who stayed in the club as visitors.

Keywords: nicotine, cotinine, trans-3-hydroxycotinin, passive smoking, biological urine sample, LLE, GC-MS methods

The work contains: 74 pages, 23 images, 9 tables, 80 written references

Original language: Croatian

Thesis Defense Committee:

1. Marija Definis-Gojanović, PhD, full professor	Chair person
2. Daniela Šupe-Domić, assistant professor	Member
3. Davorka Sutlović, PhD, full professor	Supervisor

Date of thesis defense: September 26th, 2019.

The work is stored in printed and electronic format (pdf format) at the Library of the Faculty of Chemistry and Technology, Ruđer Bošković 35 and at the School of Medicine, Split, Šoltanska 2

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Nikotin 2
1.1.1. Opće karakteristike nikotina 2
1.2.1. Upotreba nikotina 3
1.3.1. Farmakodimanika 4
1.4.1. Farmakokinetika 5
1.5.1. Toksičnost nikotina 8
1.2. Pasivno pušenje 10
1.2.1. Što označava pojam pasivnog pušenja? 10
1.2.2. Utjecaj pasivnog pušenja na zdravlje 12
1.3. Biomarker, pokazatej izloženosti pasivnom pušenju 14
1.3.1. Određivanje nikotina i metabolita u biološkim uzorcima 16
1.4. Metode određivanja 18
1.4.1. Metode ekstrakcije 18
1.4.2. Ekstrakcija tekuće – tekuće (LLE) 19
1.4.3. Plinska kromatografija 19
1.4.4. Masena spektormetrija 21
1.4.5. Vezana tehnika plinska kromatografija sa spektrometrijom masa 22
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 23
3. MATERIJAL I METODE 25
3.1. Kemikalije korištene u eksperimentalnom radu 26
3.2. Instrumenti 26
3.3. Referentni standardi nikotina i metabolita 26
3.4. Priprema referentnih standardnih otopina za analizu koristeći GC-MS tehniku 27
3.5. Biološki uzoci za analizu 28
3.6. Instrumentalna analiza GC-MS metodom 31
3.6.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske kolone 32
4. REZULTATI 33
4.1. Analiza referentnih standarda nikotina i metabolita 34
4.2. Umjerna krivulja za nikotin i metabolite 35
4.3. Kvantitativna analiza nikotina i metabolita u biološkim uzorcima mokraće 37
5. RASPRAVA 46

6. ZAKLJUČCI 51
7. POPIS CITIRANE LITERATURE 53
8. SAŽETAK 61
9. SUMMARY 64
10. ŽIVOTOPIS 67

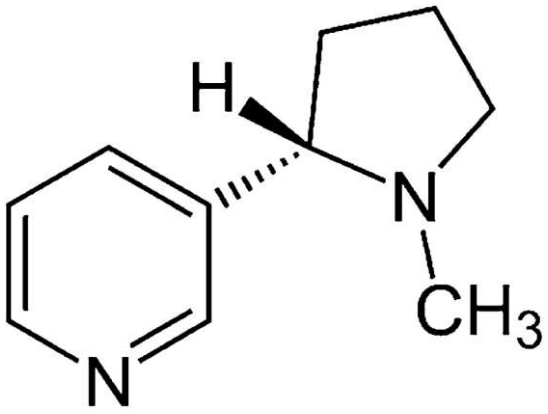
1. UVOD

1.1. Nikotin

1.1.1. Opće karakteristike nikotina

Nikotin je piridinski alkaloid, nalazi se u različitim vrstama biljaka koje pripadaju obitelji *Solanaceae.* prvi put je određen i izoliran 1828 godine iz listova biljke *Nicotiana tabacu.* Glavni je sastojak duhana i čini 95% ukupinh alkaloida. Također pristuan je u određenim ljudskim namirnicama, posebno u biljkama iz obitelji Solanaceae (krumpir, rajčica, zelena paprika i patlidžan). Nikotin je jedan od najjačih biljnih otrova, koji djeluje na središnji i periferni živčani sustav pa se zbog tog svojsva koristi u proizvodnji insekticida. Spoj je vrlo snažnog adiktivnog svojstva te je odgovoran za razvijanje ovisnosti o duhanskim proizvodima koja se smatra vrlo teškom, čak težom od ovisnosti o teškim drogama poput heroina (1, 2). Na skali od 1-5 relativni rizik nikotina za psihičku ovisnost, adikciju iznosi 4 što ga svrstava među vrlo adiktivne tvari (3).

Kemijska formula nikotina je $C_{10}H_{14}N_2$ i naziv prema JUPACU 3- [2- (N-metilpirolidinil)] piridin, a stukturana formula prikazana je na slici 1 (4). Nikotin je u čistom stanju masna, bezbojna, higroskopna tekućina s karakterističnim mirisom, na zraku postaje smeđa. Raspada se zagrijavanjem i sagorijevanjem pritom nastaju korozivne pare dušikovog dioksida. Topiv je u alkoholima i eterima, mješa se s vodom. Optički je aktivan spoj, u prirodi se nalazi S nikotin, dok je sintetski racemična smjesa S i R nikotina (5).



Slika 1. Struktura nikotina

1.2.1. Upotreba nikotina

Prema procjenama WHO u svijetu je 1.27 milijardi korisnika duhana . Danas je upotreba duhana vodeći uzročnik smrti i raka koji se može spriječiti u svijetu. Niti jedan drugi potrošački proizvod nije opasan niti ubija kao duhan koji je odgovoran za 8 milijuna smrtnih slučajeva godišnje. Od toga izravna upotreba duhana ubija više od 7 milijuna dok je 1.2 milijuna smrti posljedica izloženosti pasivnom pušenju (6). U organizam se unosi uživanjem biljke *Nicotiana tabacum* (žvakanjem, pušenjem, ušmrkavanjem). Osušeni listovi duhana sadrže 1,5% do 4.0% nikotina. Cigarete i cigare sadrže u prosjeku od 1% do 2% nikotina (10-20mg nikotina) (7). Prema Direktivi Europske zajednice sadržaj nikotina ograničen je na najviše 1 mg po cigareti od 1. siječnja 2004. jer se više od 75% nikotina emitira iz cigarete u zrak kao duhanski dim (8).

Osim duhanske industrije vrtlari dugi niz godina koriste mješavinu duhana i vode kao učinkoviti prirodni pesticid. Upravo nikotin u mali dozama djeluje toksično na središnji i periferni živčani sustav i ubija insekte. Od 17. stoljeća nikotin se koristio kao pesticid u obliku 40% otopine nikotin sulfata. Nakon Drugog svjetskog rata pojavili su se jači pesticidi, manje štetni za sisavce i jeftiniji pa je upotreba nikotina pala. Od 2014. godine u SAD-u je zabranjena upotreba nikotina kao pesticida. Indija kao najveći proizvođač i izvoznik nikotin sulfata također je zabranila upotrebu (9).

Nikotin se koristi i u medicini kao nadomjesna terapija za postepeno odvikavanje od pušenja, (*nicotine replacement therapy*, NRT). U terapiji djeluje stimulirajuće na nikotinske kolinergične receptre u području ventralnog tegmentuma mozga što izaziva oslobađanje dopamina i kao rezulta toga smanjuju se simptomi ustezanja. Na tržištu su dostupni različiti farmaceutski oblici sa različitim dozama nikotina koji ne sadrže brojne toksične tvari pronađene u duhanskom dimu. Terapija za cilj ima smanjiti želju za nikotinom i ublažiti simptome ustezanja. Niti jedan oblik nadomjestne terapije ne postiže visoku razinu nikotina u arterijskoj krvi kao udah dima cigarete. Nadomjena terapija sa postepenim oslobađanjem održava razinu nikotina konstantnu kroz dan (10). Istraživanja pokazuju da svi dostupni oblici nadomjesne terapije; guma za žvakanje, transdermalni flaster, nazalni sprej, inhalator i sublingvalne tablete / pastile imaju pozitivan učinak na prestanak pušenja, povečava stopu odvikavanja za 50-70% (11). Nadomjestna terapija u formi guma za žvakanje, nazalnog spreja i pastila ima kategoriju C dok su trandermalni flasteri kategorija D u trudnoći (12).

1.3.1. Farmakodimanika

Nikotin je sedativ ali i stimulans. Nakon izlaganja tijela nikotinu vrlo brzo se ostvaruje njegov učinak. Stimulirana je nadbubrežnja žljezda, što rezultira otpuštanjem adrenalin. Val adrenalina stimulira tijelo dolazi do konstrikcije malih krvnih žila i povišenja krvnog tlaka, ubrzava se srčani ritam i disanje te dolazi do naglog otpuštanja glukoze u krv, a slabije produkcije inzulina, tako da se u pušača može naći blago povišena razina šećera u krvi, što dovodi do poremećaja metabolizma i gubitka apetita. Popratni sastojci duhnaskog dima koji su inhalirani u pluća ulaze u krvotok i oštećuju stijenku krvnih žila što pokreće proces ateroskleroze u kasnijim stadijima pucanje aterosklerotskog plaka i trombogenezu. Veće doze nikotina imaju sedativan učinak koji se očituje kao pad koncentracije i sposobnosti pamćenja. Neizravno nikotin izaziva oslobađanje dopamina u mozgu u području zadovoljstva i motivacije. Sličan učinak na mozak imaju kokain i heroin. Osobe koje uživaju drogu imaju osjećaj ugode i stvara se ovisnost (13).

Nikotin je stereoselektivni agonist nikotinskih kolinergičkih receptora (nAChR) koji se fiziološki aktiviraju acetilkolinom. Glavni mehanizmi djelovanja nikotina su: transmisija preko ganglija, nAChR na kromafinim stanicama putem katekolamina i stimulacija središnjeg živčanog sustava. Veže se za receptore na postsinaptičkoj membrani (simpatički i parasimpatički gangliji i živčano-mišićna spojnica), nadbubrežnoj meduli i u mozgu. Stimulacija središnjeg živčanog sustava djelovanjem nikotina posredovana je oslobađanjem više različitih neurotransmitera: acetilkolina, adrenalina, beta-endorfina, serotonina, dopamina i adrenokortikotropnog hormona. Nikoin kao i druge opojne droge podražuje dopaminergične neurone u području ventralnog tegmentuma (14, 15). Opetovano uživanje nekoliko tjedana svakodnevno može dovesti do ovisnosti i trajnih promjena, neuroadapatacije (16). Neurobiološka prilagodba usljed kronične izloženosti nikotinu razvija ovisnost (17). Dolazi do up – regulacije, povečava se broj acetilkolinskih receptora kao posljedica prilagodbe mozga na učinke nikotina. Nikotin stimulira nAchRs poput acetilkolina. U trenutku aktivacije receptora dolazi do depolarizacije koja traje znatno duže nego sa vezanjem endogenog liganda, acetilkolina na receptor. Prema tome nikotin ima dvostruki učinak, stimulacija receptora, nakon čega slijedi blokada receptora zbog produžene depolarizacije. Neuroadaptacija nastaje kao prilagodba na blokadu receptora, obrana organizma od toksičnog učinka nikotina (16).

Različiti oblici isporuke nikotina nemaju jednak rizik za razvoj i održavanje ovisnosti. Duhanski proizvodi, cigarete dizajnirane su tako da razviju ovisnost vrlo brzo zbog dodatnih sastojaka koje sadrže uz nikotin kao što su acetaldehid i mentol (17). Produkti kondenzacije acetaldehida inhibiraju monoaminookidaze (MAO) u mozgu i na taj način povečavaju razinu biogenih amina, noradrenalina, serotonina i dopamina, što dodatno pojačava učinak nikotina. Istraživanja su pokazala da je aktivot MAO-A i MAO-B za 28% odnosno 40% manja u mozgu pušača duhana. (Fowler et al., 1996, 1998, 2003) (18, 2). Mentol u cigaretama nihibira metabolizam nikotina djelujući na CYP2A6 što pojačava učinak nikotina (19). S druge strane NRT lijekovi imaju mali rizik razvoja ovisnosti i puno je lakše prekinuti upotrebnu nego što je sa duhanskim proizvodima (17). Prestanak pušenja izaziva deprivaciju nikotina na koju se mora prilagoditi živčani sustav što se očituje bojim simptomima sustezanja: anksioznost, depresija, nemogućnost koncentracije, razdražljivost, nemir, nesanica, omaglica, glad, drhtavica, znojenje, nesvjestica, glavobolja i probavni poremećaji. Simptomi dosežu svoj vrhunac u prvom tjednu, samnjuju se za tri do četiri tjedna. Osim ovisnosti nikotin izaziva toleranciju, potrebne su sve veće doze da se postigne stanje željenog učinka.

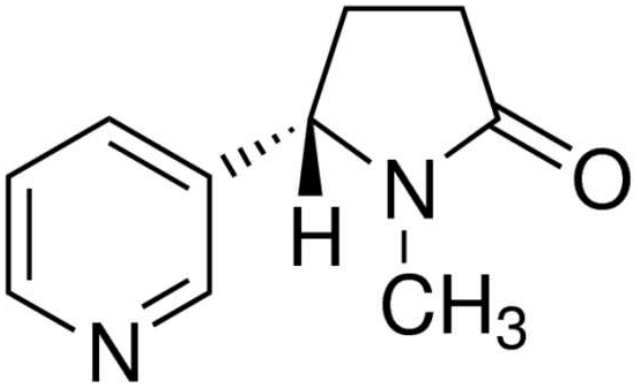
1.4.1. Farmakokinetika

Apsorpcija nikotina odvija se preko kože, bukalne sluznice, respiratornog trakta i crijeva. Apsorpcija ali i renalna ekskrecija nikotina uvelike ovisi i pH. Nikotin je slaba baza pK_a 8.0, prema tome u alkalnoj okolini nikotin je u neioniziranoj formi i kao takav lako prolazi kroz membrane. Ionizirana forma koja nastaje u kiselom mediju ne može proći biološke membrane. Alkalni mediji je povoljniji za apsorpciju nikotina pa se upravo zbog toga i različiti farmaceutski oblici nikotinske nadomjesne terapije (gume za žvakanje, pastile, nazalni sprejevi, sublingvalne tablete, transdermalni flasteri) puferiraju na alkalni pH. Nikotin iz dima cigarete se brzo apsorbira kroz pluća zbog velike površine plućnih alveola i fiziološkog pH (19). Biodostupnost je veća kroz bukalnu sluznicu i pluća, nego gutanjem jer direktno dolazi u sistemsku cirkulaciju i zaobilazi jetru gdje se u velikom udjelu metabolizira. Efekt prvog prolaska jako je izrađen. Pušenjem koncentracija nikotina u arterijama veća je nego u venama. Prema istraživanjima, omjer arterija: venska koncentracija je u rasponu od 2,3-10. (Henningfield et al. 1993; Gourlay i Benowitz 1997; Rose i sur. 1999) (17). Koncentracije nikotina nakon pušenja u arterijskoj krvi u prosjeku su između 20-60 ng/ml, a

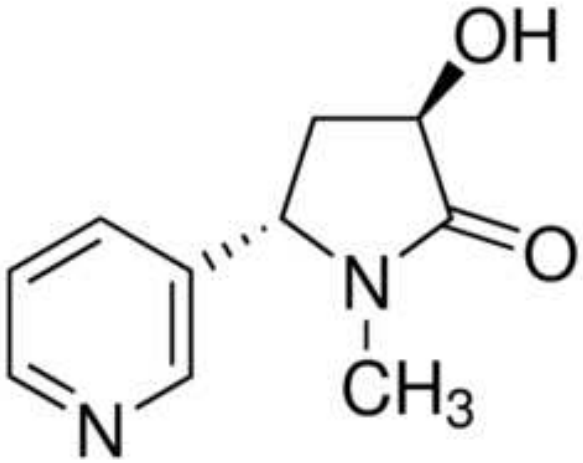
mogu doseći do 100 ng/ml. Za 10-20 sekundi nikotin dolazi do mozga, brže nego intravenskom primjenom. Zbog toga je pušenje najjači oblik razvoja ovisnosti o nikotinu. Vezanje nikotina za proteine plazme je manje od 5% dok je volumen distribucije 2.6 L/kg.

Na temelju autopsije aktivnih pušača najveći afinitet za nikotin imaju pluća, jetra, slezena i bubrezi dok za masno tkivo pokazuje mali afinitet. Nikotin ima visoki afinitet vezanja za mozak, usljed pušenja zbog neuroadaptacije taj kapactet raste. Nikotin lako prolazi placentarnu barijeru i ulazi u cirkulaciju fetusa što potvrđuju 15% veće koncentraciji nikotina u fetalnoj krvi i 88% veća koncentacija u amnionskoj tekućini nego što su u plazmi majke. Nikotin se izlučje i u majčino mlijeko.

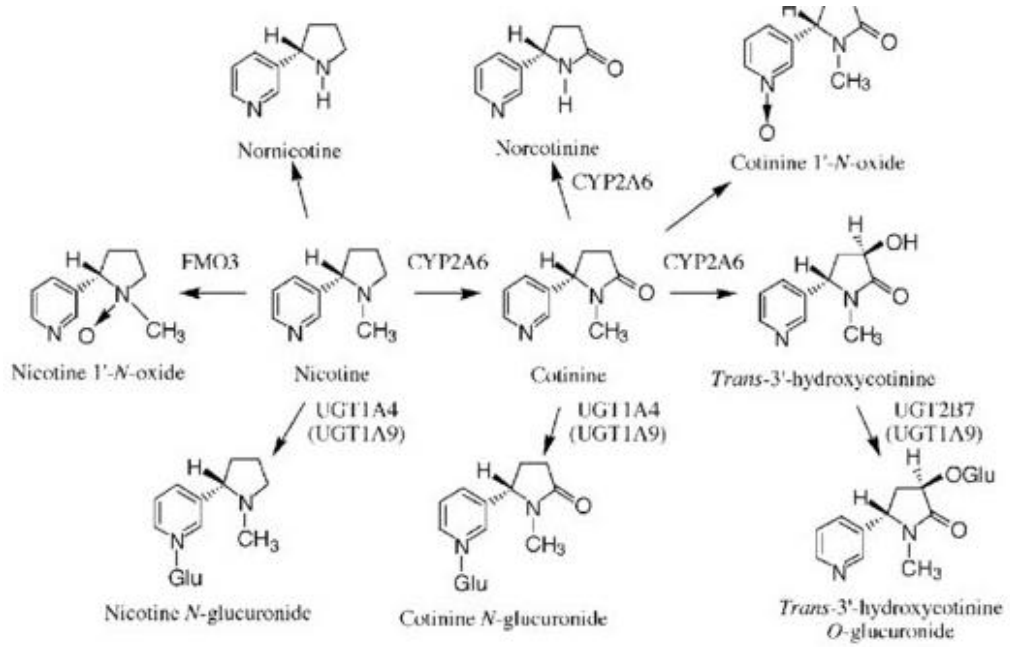
Metabolizam nikotina može se podjeliti u dvije faze. Prva faza je oksidacija preko mikrosomalnih enzima u kojoj nastaju primarni metaboliti kotinin i nornikotin, demetil kotinin, trans-3-hidroksi-kotinin i d- (3-piridil) -g-metilamin maslačna kiselina. U drugoj fazi dolazi do N´ i O´ glukuronidacije metabolita prve faze. 5-10 % nikotina eliminira se iz organizma nepromjenjeno, 4-7% eliminira se kao N-oksid nikotina i 3-5% kao nikotinski glukuronid. Kvantitativno najzastupljeniji metabolit je laktamski derivat, kotinin (KOT), slika 3 (20). U ljudskom metabolizmu 70-80% nikotina prelazi u kotinin (21). Oksidacija nikotina u KOT odvija se u dva stupnja. Prvi rekacija, oksidacija na 5´C atomu pirolidinskog prstena djelovanjem CYP enzima (CYP2A6) i nastaje 5´- hidroksinikotin. U drugom stupnju reakcije djelovanjem aldehid-oksidaze preko intermedijarnog produkta, nikotin- 1´, 5´-iminium iona, nastaje KOT (22). 10-15% nepromijenjenog KOT izluči se nepromijenjeno putem urina kod pušača. Najveći dio KOT, 33-44% metabolizira se u *trans*-3´-hidroksikotinin, (3-OHK) slika 4 (23). Reakcija je posredovana isključivo CYP2A6 i pokazuje stereoselektivnost za *trans* izomer jer je pronađeno manje od 5% *cis* izomera. 3-OHK i njegov konjugat O´ glukuronid glavni su metaboliti biotransformacije nikotina. Oni čine 40-60% doze niktona u urinu. Preostali kotinin se metabolizira i izlučuje kao kotinin glukuronid 12-17% i kao trans-3´-hidroksikotinin glukuronid 7-9%. Shema metabolizma nikotina, slika 5 i 5a (24, 25). Omjer 3-OHK/KOT koristi se kao test marker reakcija fenotipske aktivnosti CYP2A6 i neinvazivni pokazatelj brzine metabolizma nikotina i pokazatelj odgovora na farmakoterapiju NRT. (19, 21)



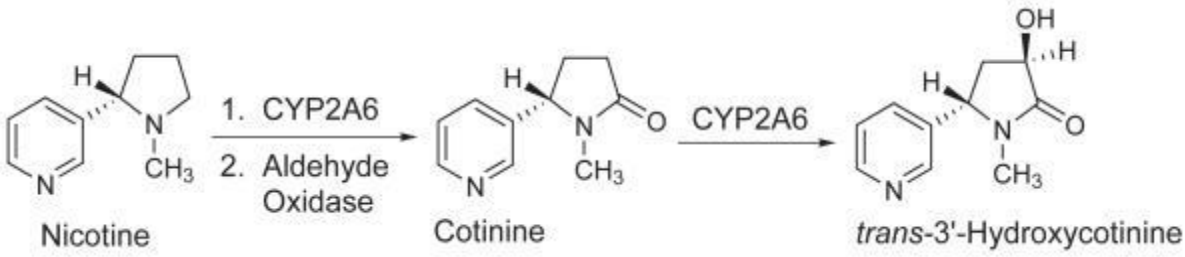
Slika 3. Struktura kotinina (20)



Slika 4. Struktura *trans*-3-hidroksikotinina (23)



Slika 5. Metabolizam nikotina (24)



Slika 5a. Glavni put metabolizma nikotina (25)

1.5.1. Toksičnost nikotina

Pušenjem jedne cigarete unosi se približno 2 mg nikotina i postiže se srednja koncentracija u arterijskoj krvi od oko 0,03 mg/L. Prema literarnim podacima o smrtonosnoj intoksikaciji nikotina donja granica koja uzrokuje fatalne ishode iznosi 500 – 1000 mg unesenog nikotina što odgovara LD_{50} 6,5 – 13 mg/kg (26). Smrt obično nastupa zbog depresije centra za disanje i paralize respiratornih mišića. Lakša otrovanja karakteriziraju simptomi; glavobolja, mučnina, vrtoglavica, može se javiti povraćanje, tremor ruku i slabost u nogama. Teži oblici trovanja praćeni su simptomima bradikardije i kolapsom (27).

Osim trovanja nikotinom ingestijom, zabilježeni su slučajevi dermalnog trovanja koje je izazvano nepropisnim korištenjem pesticida ili kao posljedica profesionalnog kontakta sa listovima duhana. Radnici na plantažama duhana izloženi su izravnom kontaktu sa listovima biljke. Nikotin koji se nalazi u biljci topljiv je u vodi za vrijeme kiše, rose ili vlage i koncentrira se na vlažnu površinu lista. U direktnom je kontaktu sa kožom koja je u uvjetima fizičkog rada bolje prokrvljena zbog povećane tjelesne temperature. Sve to ide u prilog boljoj apsorpciji nikotina direktno u krvotok i distribuciju po cijelom organizmu. Povećana asporpcija nikotina rezultira akutnom toksičnosti nikotina poznatija kao zelena groznica duhana *(green tobacco sickness).* Najčešće se javlja nekoliko sati nakon kontakta sa zelenim listovima duhana, a najveći rizik za pojavu predstavlja žetva duhana. Toksični učinci na živčani sustav su mučnina, povraćanje, bljedilo, vrtoglavica, glavobolja, pojačano znojenje, zimica, abdominalna bol, proljev i povećana salivacija. Zbog nadražaja dišnog sustava javlja se kašalj i otežano disanje. Izloženost pesticidima i početni pušači imaju vrlo slične simptome. Nažalost ova bolest nije dobro dokumentirana i ne prijavljuje se jer nije prepoznata (28).

Brojne studije i istraživana pokazala su toksičnost zbog izloženosti duhanskom dimu i bezdimnom duhanu. Zbog prisutstva brojnih drugih štetnih i kancerogenih tvari u duhanskim proizvodima koje se unose u organizam i opterećuju pasivne pušače, štetni učinci ne mogu se izravno pripisati nikotinu. Kronična izloženost nikotinu u duhanskom dimu, ali i kao nikotinska nadomjesna terapija ima štetne učinke na zdravlje. Prema podacima Nacionalnog instituta za sigurnost i zdravlje na radu (NIOSH) preporučena granica izloženosti (REL) i dopuštena granica izloženosti (PEL) za nikotin je 0.5 mg/m^3 za 8 sati rada dnevno i 40 sati rada tjedno (29). Nikotin predstavlja visok rizik za zdravlje ljudi zbog velike prisutnosti u okolišku u obliku duhanskog dima. Nikotin je glavni psihoaktivni sastojak duhana koji prolazi posteljicu i specifično se veže za nAChR u fetalnom mozgu i uzrokuje abnormalnosti u rastu i razvoju ploda te neurobehavioralne abnormalnosti. Unatoč dokazanim štetnim učincima 15-20% svih žena puši tijekom trudnoće. Nikotinski acetilkolinski receptori reguliraju sinaptičku plastičnost i razvoj mozga. Rana aktivacija i desenzibilizacija receptora nikotinom može izazvati trajne promjene u razvoju mozga što potvrđuje neuroteratogenost nikotina (30). Prema epidemiološkim studijama, izloženost duhanu tijekom trudnoće povezana je sa brojnim štetnim neurobihevioralnim postnatalnim učincima poput poremećaja hiperaktivnosti s nedostatkom pažnje, poteškoća u učenju, problema u ponašanju i povećani rizik od nikotinske ovisnosti (31).

1.2. Pasivno pušenje

1.2.1. Što označava pojam pasivnog pušenja?

Pasivno pušenje predsavlja udisanje smjese plinova i finih čestica odnosno dima koji dolazi izravno iz zapaljenog duhanskog proizvoda i dima koji izdiše pušač. Prema tome možemo govoriti o bočnom i glavnom stujanju dima. Glavno strujanje dima je sve što izdiše aktivni pušač. Bočno strujanje dima je sve što izgara iz zapaljenog duhanskog proizvoda i sadrži veće koncentracije toksičnih i kancerogenih agenasa. Svaka pa i najmanja izloženost pasivnom pušenju predstavlja rizik za zdravlje. Veči dio dima koji izgara iz zapaljene cigarete, 85% odlazi u okoliš i postaje dio zaka koji udišemo pa se često pasivno pušenje naziva i duhanski dim u okolišu (*environmental tobacco smoke*), a preostalih 15% inhalira aktivni pušač. Kada su nepušači izloženi duhanskom dimu govorimo o nehotičnom ili pasivnom pušenju (32).

Svaki dim cigareta daje mješavinu karcinogenih i toksičnih tvari prema tome udisanje čak i male količine štetno je kako za pušače tako i za nepušače. Sagorjevanjem jedne cigarete nastaje 2 litre duhanskog dima koji sadrži više od 7000 kemikalija, poznato je da najmanje 250 štetnih, uključujući cijanovodik, ugljikov monoksid i amonijak a najmanje 69 od njih može uzrokovati rak (USDHHS 2010) (33). Neke od njih su: acetaldehid, aromatski amini, arsen („otrov kraljeva i kralj među otrovima“), benzol, berilij (otrovni metal), 1,3-butadien (opasni plin), kadmij (otrovni metal), krom (metalni element), kumen, etilen oksid, formaldehid, nikal (metalni element), polonij-210 (radioaktivni kemijski element), policiklički aromatski ugljikovodici (PAH), duhanski specifični nitrozamini, vinil klorid (34). Amonijak, formaldehid i sumporni dioksid nadražuju dišni sustav i mogu pogoršati stanje osoba s poteškoćama disanja. Nekoliko komponenti među kojima su akrolein, krotonaldehid, formaldehid i cijanovodik, utječu na mukocilijarnu funkciju, pri visokoj koncentraciji mogu spriječiti čišćenje čestica dima iz pluća (Battista, 1976). Nikotin je glavni alkaloid u duhanu i čimbenik koji izaziva ovisnost. Različita farmakološka i toksikološka djelovanja, od akutnog trovanja do kroničnih učinaka, pripisuju se nikotinu. Više od 35 različitih policikličkih aromatskih ugljikovodika indentificirano je u duhanskom dimu, a neki od njih spadaju u skupinu kancerogena: benz [a] antracen, benzo [a] piren i dibenz [a, h] antracen i nastaju u trenutku izgaranja duhanskog proizvoda. N-nitrozamini nastaju u procesu sušenja duhana ali ipak većina nastaje tijekom izgaranja. Neki od njih su hlapljivi N-nitrozodimetilamon;

nehlapljivi N-nitrozodietanolamin; duhan specifični N-nitrozonornicotin. Ispitivanja karcinogenosti na eksperimentalnim životinjama za većinu nitrozamina su pozitivna. Duhan specifični nitrozamini su prema težini najzastupljeniji od do sada ponađenih karcinogena (IARC, 1986) (35). Udisanje dušikovih oksida i amina u duhanskom dimu može doprinijeti endogenom stvaranju karcinogenih N-nitrozamina (Hoffmann i Brunneman, 1983; Ladd i sur., 1984) (36, 37).

Analizom više od 7000 članaka koji su se odnosili na štetnost pušenja, 1964 godine američki Savjetodavni odbora za javno zdravlje donio je zaključak o štetnosti pušenja na zdravlje. Prvi rezultati potvrdili su uzročnu povezanost pušenja i karcinoma pluća i bronha. Naime pojavnost raka pluća i grkljana kod muškaraca bila je posljedica pušenja. Štetnost pasivnog pušenja prvi put je razmatrana 1972 godine u izvješću "Zdravstvene posljedice pušenja", u poglavlju pod nazivom "Javna izloženost onečišćenju zraka iz duhanskog dima" (*U.S. Department of Health, Education, and Welfare*, 1972) u kojem su analizirali brojne dokaze o onečišćenju zraka (38). Više od 50 godina „*Surgeon General's Reports*“ izvor je novih istraživanja o šetenosti pušenja kako za pušače tako i za nepušače što za glavni cilj ima smanjiti upotrebu a tim i utjecaj pušenja na zdravlje (39). U siječnju 1993. godine američka agencija EPA (US *Environmental Protection Agency*) pasivno pušenje svrstala je u kategoriju „A“ kancerogenosti (40). Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) u kategorija „A“ ulaze sve tvari za koje je dokazano da izazivaju rak kod ljudi. Izloženost pasivnom pušenju jedan je od najčešćih zagađivača zatvorenog prostora.

U razdoblju od 50 godina u SAD-u je umrlo 20 milijuna ljudi zbog pušenja od čega su 2,5 milijuna ljudi bili nepušači izloženi pasivnom pušenju (41). Procjenjuje se da je čak 40% djece, 35% žena i 33% muškaraca svakodnevno izloženo pasivnom pušenju. Upravo su djeca najizloženija dobna skupina i nisu u mogućnosti izbjeći pasivno pušenje. U studiji na tri kontinenta u 31 zemlji otkrili smo da je 88% roditelja koji su pušili to učinilo kod kuće i da je više od 80% pušilo u blizini svoje djece. Pušenje od strane roditelja udvostručilo je razinu nikotina u kosi svoje djece (42). Također statistički podaci za 2004. godinu pokazuju da je pasivno pušenje odgovorno za 603 000 smrtna slučaja i 10.9 milijuna opterećenih bolestima što je 1.0% svih smrtnih slučajeva i 0.7% svjetskog opterećenja bolešću. Najčešći uzok smrtnom ishodu bile su ishemijske bolesti srca, infekcije doljnjeg respiratornog sustava kod djece i astma kod odraslih (43). Glavno mjesto izloženosti duhanskom dimu iz okoliša, uz dom, je radno mjesto. Informacijski sustav izloženosti karcinogenima (CAREX) navodi

duhanski dim iz okoliša, iza solarnog zračenja, kao drugi najčešći uzrok izloženosti karcinogenima u državama članicama EU prije 2004. godine. Studija provedena 2001. – 2002. u sedam europskih gradova pokazala je da je duhanski dim prisutan u većini javnih prostora, uključujući prostore za provođenje slobodnog vremena, ugostiteljske objekte, transport, bolnice i prostore za edukaciju. Najviše koncentracije duhanskog dima iz okoliša nađene su u kafićima i noćnim klubovima. Potvrđeno je da je četverosatna ekspozicija u noćnom klubu slična kao živjeti s pušačem jedan mjesec (44).

1.2.2. Utjecaj pasivnog pušenja na zdravlje

Zdravlje odraslih, a posebno djece koja su izložena duhanskom dimu iz okoliša, narušeno je jer ne postoji sigurna razina izloženosti duhanskom dimu. Jedini način zaštite nepušača od utjecaja pasivnog pušenje je potpuno uklanjanje duhanskog dima iz zatvorenih prostora. Znanstvena literatura donosi dokaze da je pasivno pušenje u odraslih povezano s povećanom incidencijom kardiovaskularnih bolesti i ateroskleroze, astmom, infekcijama (srednjeg) uha i gubitkom sluha, alergijama, atopijskim i drugim dermatitisima, oštećenjem kognicije i razvojem demencija te karcinomima različitih lokalizacija (pluća, dojka, bubreg i dr.). U trudnoći pasivno pušenje može dovesti do usporenog rasta i razvoja (male porođajne mase i duljine) djeteta, preuranjenog porođaja, kongenitalnih anomalija i sindroma sustezanja u novorođenčeta. Procjenjuje se da trudnice koje su izložene pasivnom pušenju imaju 13% veći vjerojatnost da će roditi dijete sa kongenitalnim malformacijala i 23% veću vjerojatnost za iznenadnu smrt novorođenčeta (45). U dječjoj dobi pasivna izloženost duhanskom dimu može biti uzrok Crohnovoj bolesti, oštećenenju karotida, usporenom psihomotoričkom rastu i razvoju, neurokognitivnim oštećenjima, teškoćama u učenju i problemima u ponašanju, upalama srednjeg uha, propadanju zubi, bronhitisu, bronhiolitisu, infekcijama pluća i tuberkulozi, pretilosti pa čak i tumoru mozga. Jedna od najstrašnijih posljedica svakako je sindrom iznenadne smrti dojenčeta, tzv. „smrt u kolijevci“. Djeca čiji roditelji puše u godinu dana su eksponirana tolikoj količini nikotina kao da su aktivno popušila između 60 i 150 cigareta (3 i 7,5 kutija). Analize pokazuju da se jedan od sedam dana izostanka djece iz škole može povezati s izloženosti pasivnom pušenju (46, 47). Većina štetnih učinaka duhanskog dima raste s dozom izloženosti, ali su učinci manji u pasivnih nego u aktivnih pušača. Jedino za bolesti srca porast nije linearan, već izloženost duhanskom dimu iz okoliša dovodi do rizika koji je približno polovina onog u pušača (44). Postoje naznake koje upućuju da postoji

povezanost između pasivnog pušenja i sljedećih zloćudnih bolesti: rak grkljana, rak ždijela, karcinom nosno sinusne šupljine, rak dojke (povečava rizik 70% u perimenopauzalnih žena), rak abdomena, rak mjehura, rektuma i tumor mozga (32). Metaanalize su pokazale da tijekom života nepušači koji žive sa pušačima zajedno u domu imaju 20-30% veći rizik za karcinom pluća i bronha nego nepušači koji ne žive s pušačem. Nepušači izloženi pasivnom pušenju na svom radnom mjestu imaju 16-19% veći rizik za oboljevanje od raka pluća (48,49). Najnovija istraživanja također ukazuju da izloženost duhanskom dimu iz okoliša gotovo udvostručuje rizik od makularne degeneracije u starijoj životnoj dobi – glavnog uzroka gubitka vida u EU (44). Prema sustavnom pregledu suvremenih epidemioloških dokaza postoji statistički značajan pozitivan odnos između pasivnog pušenja i povečanog rizika za jedanaest bolesti. Među njima posebno se ističu: invazivna meningokokna bolest kod djece (OR 2.18; 95% CI 1.63–2.92), rak grlića maternice (OR 1.73; 95% CI 1.35-2.21), Neisseria meningitidis (OR 1.68; 95% CI 1.19-2.36) i Streptococcus pneumoniae (OR 1.66; 95% CI 1.33-2.07). Za preostale bolesti postoji statistički značajna povezanost, ali je rizik manji od 1.5%, a to su: infekcije donjih dišnih putova u djetinjstvu (OR 1.42; 95% CI 1.33–1.51), alergija na hranu (OR 1.43; 95% CI 1.12–1.83), astma u djetinjstvu (OR 1.32; 95% CI 1.23–1.42), rak pluća (OR 1.27; 95% CI 1.17–1.37), moždani udar (OR 1.25; 95% CI 1.12–1.38), alergijski rinitis (OR 1.09; 95% CI) 1.04–1.14) i alergijski dermatitis (OR 1.07; 95% CI 1.03–1.12) (50).

Pasivno pušenje i SIDS (Sudden Infant Death Syndrome)

Sindrom iznenadne smrti dojenčadi je iznenadna, neobjašnjiva i neočekivana smrt djeteta u prvoj godini života. SIDS je vodeći uzrok smrti u inače zdravih dojenčadi. Djeca koja su tijekom trudnoće i/ili nakon rođenja bila izložena pasivnom pušenju imaju povečan rizik za iznenadnu smrt. Toksične komponente pasivnog dima utjecu na centar za regulaciju disanja u mozgu dojenčadi. Bebe koje umiru od SIDS imaju veće koncentracije nikotina u plućima i veću razinu kotinina od djece koja umiru od drugih uzroka. Roditelji mogu zaštititi svoje dijete od SIDS na način da dijete ne izlažu duhanskom dimu i da majka ne puši tijekom trudnoće.

Pasivno pušenje može ozbiljno narušiti zdravlje djece.

Izloženost pasivnom dimu prije i tijekom trudnoće uzročno je povezana sa smanjenom plodnošću, komplikacijama u trudnoći uključujući poremećaj razvoja pluća, nisku porođajnu težinu i prijevremeno rođenje. Brojni šeteni spojevi prolaze placentu pa tako i ugljični

monoksid koji smanjuje opskrbu ploda kisikom. Naime CO ima 200 puta veći afitnitet za hemoglobin nego kisik pa 10-15% hemoglobina kod pušača zasićeno je ugljičnim monoksidom. Djeca čiji su roditelji pušači dokazano češće oboljevaju od upale pluća, bronhitisa i upale uha. Manji rast pluća jedna je od posljedica udisanja duhanskog dima. Iritansi duhanskog dima nadražuju respiratorni sustav što kod djece može izazvati astmu ili pogoršati već posojeću astmu. Teški napad astme može ugroziti život djeteta. Bolesti djece koje se mogu pripisati pušenju završe smrtnim ishodom kod 65 000 djece.

Rak pluća

Odrasle osobe koje nikad nisu pušile oboljevaju od raka pluća zbog izloženosti pasivnom pušenju. Izloženost kod kuće ili na radnom mjestu povećava rizik razvoja raka pluća za 20-30% jer nepušači i pušači udišu većinu istih kancerogenih komponenti duhanskog dima. Svake godine u SAD-u od raka pluća izazvanog pasivnim pušenjem umre više od 7 300 ljudi. Rizik razvoja raka pluća raste s vremenom izloženosti pasivnom pušenju.

Kardiovaskularne bolesti

Svake godine u SAD-u od bolesti srca uzrokovanih pasivinim pušenjem umre 34 000 ljudi. Nepušači koji su na radnom mjestu ili kod kuće izloženi pasivnom pušenju imaju 25-30% veći rizik od razvoja srčanih bolesti. Disanje pasivnog dima ometa normalno funkcioniranje srca i krvožilnog sustava na način koji povećava rizik od srčanog udara. Kratkotrajna izloženost može izazvati štetu na stijekama krvnih žila pa trombociti postanu skloniji koagulaciji. Na taj način se stvaraju uvijeti sa srčani ili moždani udar. Izloženost pasivnom pušenju uzrokuje više od 8000 smrtnih slučajeva moždanog udara godišnje (51, 52).

1.3. Biomarker, pokazatej izloženosti pasivnom pušenju

Vodeći uzrok smrtnosti u svijetu koji se može prevenirati je pušenje dok pasivno pušenje uzokuje 1.0% svijetske smrtnosti. U biološkim matricama određuju je biomarkeri duhnaskog dima koji su pokazatelji izloženosti duhnaskom dimu u okolišu i povezuju se sa brojim štetnim učincima na zdravlje (53). Osim procjene štetnog učinka na zdravstvlje kako aktivnih tako i pasivnih pušača radi se i objetkivna mjera uspješnosti terapije za program liječenja ovisnosti o duhanu (25). Biomarker izloženosti duhanskom dimu definiran je kao

sastojak duhana ili metabolit koji se može izmjeriti u tkivu ili biološkoj tekućini, a sa biološkim makromolekulama ima potencijal za interakciju (54).

Američka agencija za zaštitu okoliša (*United States Environmental Protection Agency*, *USEPA*) 1992. godine odredila je uvjete koje bi trebao zadovoljavati određeni biomarker za izloženost određenom kontaminantu zraka. Prema tim kriterijima idealan biomarker izloženosti pasivnom pušenju trebao bi biti specifičan za pasivno pušenje, imati odgovarajuće vrijeme poluživota u organizmu, imati visoku osjetljivost i preciznost prilikom mjerenja, biti dostupan za ispitivanje cijenom i vrstom uzorka koji se može prikupiti neinvazivnom tehnikom. Također bi trebao biti sredstvo povezano sa učincima pasivnog pušenja na zdravlje ili sredstvo koje je dosljedno i snažno povezano sa takvim sredstivma pasivnog pušenja koja utječu na zdravlje te kvantitativno povezan sa predhodnom izloženosti pasivnom pušenju. Idealni biomarker za izloženost pasivnom pušenju ne postoji. Nekoliko ih je različitih koji su korišteni u istraživanjima, ali svaki ima neko ograničenje. Neki od spojeva koju su korišteni kao bimarkeri su: ugljični monoksid u izdahnutom zraku, karboksihemoglobin, tiocijanat, nikotin i njegov primarni metabolit kotinin te policiklički aromatski ugljikovodik (PAH) u leukocitnoj DNA ili plazmatskom albuminu. Benzen, 2,5-dimetilfuran i benzo [a] piren spojevi su koji se nalaze u duhanskom dimu ali nisu specifični. Zbog toga imaju ograničenu vrijednost kao biomarkeri pasivnog pušenja, (54) tablica 1. (51). Od svih gore navedenih kriterija koje je izdala USEPA najvažnija je visoka specifičnost i osjetljivost spoja za procjenu izloženosti pasivnom pušenju. Uzevši sve to u obzir najčešće se za biomarkere predlažu tiocijanat, ugljični monoksid, nikotin i njegovi metaboliti. Pasivno pušenje predstavlja unošenje smjese toksičnih tvari pa se može procjeniti vše različitih biomarkera specifičnih za duhan također treba uzeti u obzir i faktore varijabilnosti prilikom određivanja pojedinog biomarkera kao što su: rasa, dob, spol, genetika, trudnoća i drugi. Prema tome određivanje više biomarkera u različitim biološkim matricama daje širi opseg informacija za procjenu izloženosti duhnaskom dimu, a time i bolje razumijevanje djelovanja na ljudsko zdravlje (53).

Tablica 1. Biomarkeri izloženosti duhanskom dimu (51)

Biomarker	Uzorak	$t_{1/2}$	Specifičan za duhan	Drugi izvori
Nikotin	Krv, urin, slina, kosa	1-2 h	Da	NRT
Kotinin	Krv, urin, slina, kosa	16-18 h	Da	NRT
NNAL, NNAL- glukuronid	Krv, urin	16 tj	Da	-
Izdahnuti CO	Izdahnuti zrak	2-6 h	Ne	Promet, ljudski organizam
Karbokishemoglobin	Krv	4-6 h	Ne	Promet, ljudski organizam
Metaboliti policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH)	Urin	20 h	Ne	Promet, meso na žaru, profesija, izgaranje biomase u domovima
Tiocijanat	Serum, slina, urin	7-14 dana	Ne	Hrana

NNAL, NNAL-glukuronid - duhanski specifični nitrozamin, 4- (metilnitrozammo) -l- (3-piridil) -l-butanol

1.3.1. Određivanje nikotina i metabolita u biološkim uzorcima

Nikotin i njegovi metaboliti, specifični za duhan, često su korišteni biomarkeri u biološkim tekućinama. Nikotin, kotinin i 3-OHK specifični su biomarkeri za određivanje izloženosti pojedinaca pasivnom pušenju s velikom osjetljivošću u različitim biološkim matricama (55). Kotinin i 3-OHK primarni su metaboliti nikotina. Imaju prednost pred nikotinom prilikom odabira biomarkera za aktivno pušenje i izloženost duhanskom dimu zbog dužeg poluvremena eliminacije i većih koncentracija u tjelesnim tekućinama (56).

Nikotin kao primarna komponenta ovisnosti i potencijalan toksin može se lako odrediti kod aktivnih, ali i pasivnih pušača u brojim biološki uzorcima; slina, serum, urin, kosa i nokti. U dimu je prisutan kao plin kojeg nepušači udišu. 90% sadržaja apsorbiranog nikotina se opsežno metabolizira, a tek se mali dio eliminira putem mokraće nepromijenjen. Zbog svog opsežnog metabolizma, kratkog vremena poluživota (2-3 sata) i fluktuacije koncentracije u krvi nikotin je pokazatelj nedavne izloženosti duhanskom dimu (57). Određivanje nikotina u uzorcima kose i noktiju dobar su pokazatelj kronične izloženosti pasivnom pušenju i konzumiranja duhana. Ako je prisutan u cirkulaciji nikotin se ugrađuje u kosu pa tako 1 cm vlasi proksimalno od tjemena predstavlja izloženost tijekom prošlog mjeseca (55). Koncentracija nikotina pronađena u uzorcima kose 10 do 100 puta veća je nego

koncentracija kotinina. Prema provedenim istraživanjima razina nikotina u kosi kod pušača u rasponu je od 2,01 do 79,3 ng / mg i od 0,08 do 5,02 ng / mg kod nepušača (58, 59). Procjena pasivne i aktivne izloženosti moguća je određivanjem nikotina iz uzoraka noktiju nožnih prstiju čak i nakon 20 godina čuvanja uzorka na sobnoj temperaturi (60).

Kotinin je biomarker izbora zbog svoje specifičnosti, visoke osjetljivosti i prihvatljivog vremena polueliminacije od 16 do 18 sati u istraživanjima izloženosi nepušača pasivnom dimu ali i kod procjene aktivne upotrebe duhana. Različiti biološki uzorci mogu služiti za određivanje koncentracije kotinina, od plazme, seruma, urina do sline, kose i noktiju. Koncentracije u plazmi koreliraju sa onima u slini dok su koncentracije kotinina u urinu 5 do 6 puta veće od koncentracija u serumu što pruža veću osjetljivost kod procijene izloženosti niskoj razini duhanskog dima (25). Uzorak krvne plazme ili seruma idealan je uzorak za određivanje kotinina, ali zbog invazivne metode prikupljanja alternativni uzorak je slina. Uzorak urina ima svoje prednosti pred ostalima jer se može dobiti velika količina uzorka, metoda prikupljanja nije invazivna, a uz kotinin uzorak urina sadržava i druge metabolite (51).

Najveći udio kotinina prelazi u t*rans*-3-hidroksikotinin. Moguće ga je odrediti u slini, serumu i mokraći, a vrijeme polueliminacije mu je 5 do 6 sati, ali kada se generira vrijeme polueliminacije približno mu je kao i kotininu. Koncentracije 3-OHK u serumu 2 do 4 puta su manje nego što su koncentracije kotinina (61). Kada se koncentracije 3-OHK izmjerene u slini ili plazmi stave u odnos sa koncentracijama kotinina nastali omjer predstavlja brzinu metabolizma nikotina (*Ncotine metabolite ratio*, NMR). Metabolizam nikotina u kotininu i 3-OHK posredovana je CYP enzimima i to uglavnom CYP2A6 pa omjer ova dva metabolita služi za fenotipizaciju aktivnosti CYP2A6 kod pušača, ali i nepušača. Brzina metabolizma nikotina povezana je i sa stavaranjem ovisnosti pa tako brzi metabolizatori brže razvijaju ovisnost. Također potvrđeno je da je ovaj omjer prediktor potrošnje cigareta (19).

Tablica 2. Biomarkeri, izloženosti duhaskom dimu i njihovo vrijeme poluživota u različitim biološkim uzorcima (53)

Biomarker/matriks	Krv	Urin	Slina
Nkotin	2 h	11 h	-
Kotinin	16 h	72-96 h	15 h
***Trans*-3-hidroksikotinin**	6.6 h	6.4 h	

1.4. Metode određivanja

1.4.1. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija je laboratorijski i industrijski postupak, osnovna tehnološka operacija. Koristi se za izolaciju željene tvari iz tekuće ili krute smjese i kao metoda za pročišćavanje. Temelji se na različitoj topljivosti tvari, koju želimo izdvojiti iz smjese i primjesa koje ju prate, u dva otapala koja se međusobno ne mješaju (62).

Dvije su osnovne vrste ekstrakcija u toksikološkoj analizi; ekstrakcija na čvrstom nosaču (*Solid phase extraction,* SPE) i ekstrakcija tekuće-tekuće (*liquid-liquid* extraction) (63). Koriste se za pripremu složenih bioloških uzoraka prije kvalitativne i kvantitativne analize nekom od metoda kromatografije; plinska kromatografija (*Gas chromatography*, GC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*High performance liquid chromatography*, HPLC), vezanim tehnikama plinska kromatografija–spektrometrija masa (*Gas chromatography–Mass spectrometry*, GC–MS) i tekućinska kromatografija–spektrometrija masa (*Liquid chromatography–Mass spectrometry*, LC–MS) (62). Biološki uzorci su kompleksi zbog prisutnosti endogenih komponenti koje se mogu interferirati sa analitom. Postupkom ekstrakcije analit se izolira od popratnih primjesa i povećava se njgova koncnetracija u odnosu na matičnu otopinu (63). Ispravna ekstrakcija povečava vjerojatnost uspješne analize.

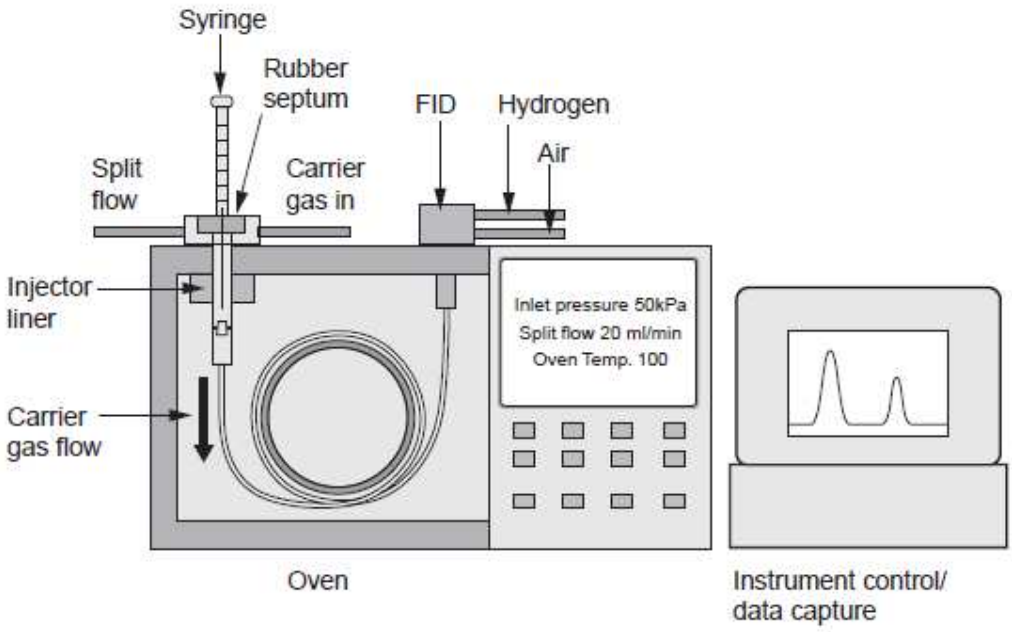
1.4.2. Ekstrakcija tekuće – tekuće (LLE)

Ekstrakcija tekuće-tekuće (*Liquid–liquid extraction*, LLE) tehnika je odjeljivanja i način pripreme uzorka za analizu. Glavni princip tehnike je raspodjela uzorka između dviju tekućih faza koje se međusobno ne mogu miješati, a pritom da uzorak i matrica imaju različitu topljivosti između dviju faza. Najčešće je jedna faza vodena (matrica sa uzorkom) dok je druga faza organska (ekstrakcijsko otapalo) (64). Često korištena ekstrakcijska otapala su heksan, toluen, dietileter, klorobutan, diklormetan, kloroform ili njihove smjese. Zbog lakše izolacije organske faze, u kojoj je koncentriran analit nakon ekstrakcije, pogodno je koristiti otapala manje gustoće, od gustoće uzorka (63). Koristi se u ekološkim, kliničkim i industrijskim laboratorijima (65). Ekstrakcija tekuće-tekuće prigodna je metoda za pripremu bioloških uzoraka s vrlo niskm sadržajem proteina. Tehnka je brza, jeftina i učinkovita. Zbog toga se često koristi za hitne analize sa nepoznatim analitom u toksikologiji (66). Pravilni odabir ekstrakcijskog otapala i regulacija pH uzorka važni su za učinkovitu ekstrakciju ciljnog analita iz uzorka (63).

1.4.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatogafija (*Gas chromatograpy*, GC) je instrumentalna analitička metoda razdjeljivanja i kvantifikacije uzoraka. Široko je primjenjena; u području znanosti o okolišu, pivarstvu, prehrambenoj industriji, analizi parfumerije i aroma, analitici lijekova, petrokemijskoj industriji, mikrobiološkim analizama i kliničkoj biokemiji. Glavni uvjet je da uzorci koji se ispituju imaju sposobnost prijeći u plinovitu fazu ili stvoriti prikladni derivat u plinskoj fazi pri temperaturi do 400 °C, a da ostanu termički stabilni. Dijelovi plinskog kromatografa prikazani su na slici 8. (67). Susatv plinske kromatografije razlikuje se prema; tipu mobilne faze, sustavu injektiranja, vrstama kolona i detektora. Mobilna faza koja prenosi uzorak kroz kolonu je inertni plin. Najčešće korištene mobilne faze su helij ili dušik, a u novije vrijeme i superktitične tekućine. Odabir plina nosioca ovisi o vrsti detektora. Mobilna faza se ne mora odlagati i cijenom je prihvatljivija nego organska otapala za HPLC. Dvije su osnovne vrste kolona u plinskoj kromatografiji; kapilarna i punjena kolona (67). U forenzičkoj toksikologiji za analizu bioloških uzoraka koriste se uglavnom kapilarne kolone promjera 0,25-0,53 mm, duljine 25-30 m sa stacionarnom fazom 5% diphenyl – 95% dimethyl polysiloxane (63). Koristeći kapilarnu kolonu postiže se veća snaga odvajanja nego

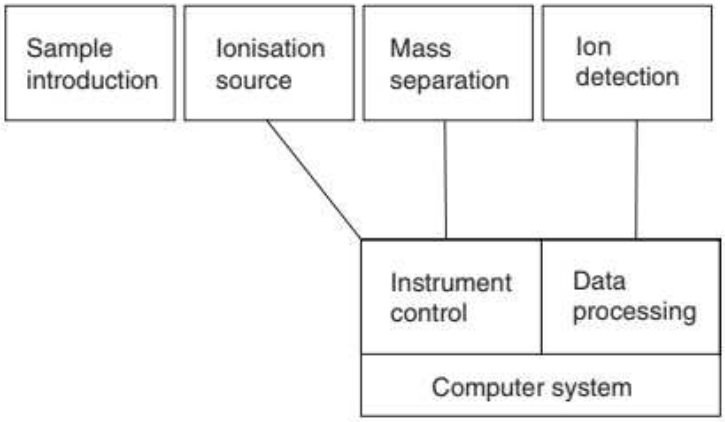
kod HPLC-a. Plameno ionizacijski detektor često je korišten u plinskoj kromatografiji (66). Osjetljiv je na veliki broj različitih spojeva, prvenstveno organskih i pokriva široki koncentracijski raspon (63). Razdvajanje komponenti uzorka odvija se u koloni koja sadrži tekuću ili krutu stacionarnu fazu. Kroz kolonu proleti kontinuiranim protokom mobilne faze koja nosi uzorak od injektora do detektora. Kolona je zagrijana na određenu temperaturu koja može biti stalna ili se mijenja prema željenom temperaturnom programu (67). Vrelište uzorka diktira temperaturu kolone. Bolje razdjeljivanje, ali uz duže vrijeme eluacije postiže se na nižim temperaturama. Temperaturni program uglavnom se koristi kada se analiziraju kompleksni uzorci koji sadrže komponente vrlo različitih vrelišta (64). Princip razdvajanja temelji se na različitom afinitetu komponenti uzorka za stacionarnu i mobilnu fazu. Molekule koje imaju veći afnitet za stacionarnu fazu duže se zadržavaju na koloni i kasnije dolaze na detektor dok molekule sa manim afinitetom za stacionarnu fazu brže prolaze kroz kolonu i prije dolaze na detektor. Vrijeme zadržavanja je karakteristično za svaku tvar koja se eluira sa kolone. Optimizacijom radnih uvjeta i kolone i odabirom stacionarne faze cilj je dobiti razdvojene šiljaste pikove, bez preklapanja (68).



Slika 8. Shematski prikaz plinskog kormatogarma (67)

1.4.4. Masena spektormetrija

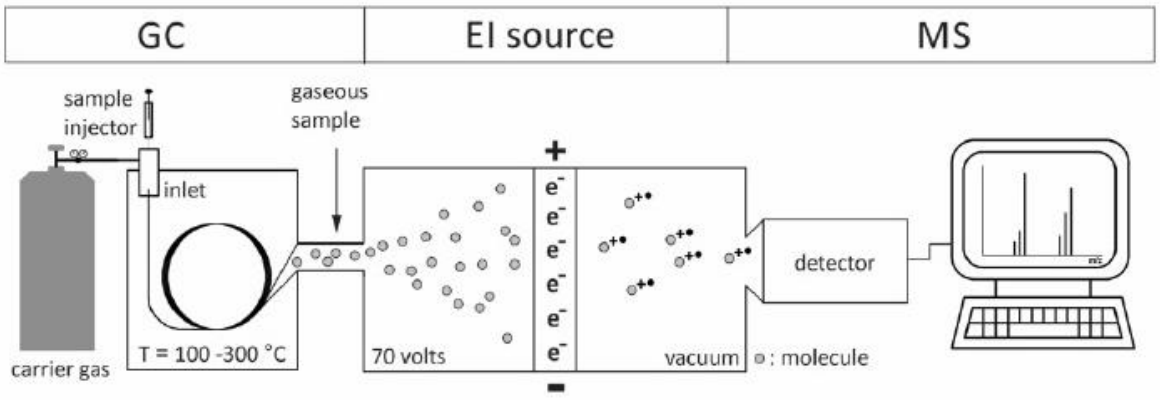
Masena spektromerija (M*ass spectrometryi*, MS) snažna je analitička tehnika koja se primjenjuje u različitim područjima zbog svoje iznimne osjetljivosti, točnosti i preciznosti. Primjenjuje se za toksikološke analize lijekova, otrova i njihovih metabolita te u procjeni kvalitete farmaceutskih proizvoda (69). Instrumentna tehnika u kojoj se električki neutralne molekule ioniziraju u plinovitoj fazi dobivaju pozitivan ili negativan naboj. Nakon ionizacije u plinskoj fazi dolazi do odvajanja molekule prema omjeru mase i naboja (*m/z*) (70). Maseni spektrometar sastavljen je od četiri osnovna dijela: sustav za unošenje uzorka, izvor ionizacije, analizator mase i detektor, slika 9 (70). Procesi unutar masenog spektrometra odvijaju se u uvjetima visokog vakuuma koji osigurava nesmetano kretanje iona bez interakcija i sudara sa molekulama zraka (71). U procesu ionzacije uzorak se prevodi u plinovitu fazu ionske vrste. Nastali ioni se ubrzavaju djelovanjem električnog polja u analizator, glavni dio spektrometra, koji ih razdvaja prema odnosu mase i naboja *(m/z),* pritom korsteći različita električna i/ili magnetska polja. Razdvojeni ioni dolaze na detektor koji pohranjuje električni signal kao *m/z* omjer odnosno maseni spektar (69).



Slika 9. Shematski prikaz osnovnih dijelova spektrometra masa (70)

1.4.5. Vezana tehnika plinska kromatografija sa spektrometrijom masa

Povezivanje separacijskih tehnika sa masenom spektrometrijom snažan je dvodimenzionalni pristup analizi uzoraka. Istovremeno se odvija odjeljivanje visoke rezolucije i strukturno specifična, visoko osjetljiva detekcija. Indentifikacija je sigurnija jer uz kromatografsko retencijsko vrijeme sadrži podatke o spektru specifičnih masa stukture. Plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom (*Gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) standardna je tehnika indentifikacije kojom se potvrđuje prisutnost ciljanog spoja, slika 10 (69). Ova vezana tehnika pronašla je primjenu u strukturnoj karakterizaciji biomolekula u području medicinske kemije, toksikologije, kemije okoliša i forenzičke analize lijekova (72). Kinetička energija iz struje elektrona visoke energije je metoda ionizacije uzorka u plinskoj fazi (*electron ionization*, EI). EI metoda ionizacije proizvodi reproducibilan uzorak fragmenta što omogučuje međulaboratorijeske spektralne usporedbe i generiranje opsežne EI-GC-MS knjižnice za indentifikaciju (69).



Slika 10. Shematski prikaz vezane tehnike GC-MS (69)

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog rada bili su:

Odrediti koncentraciju nikotina i njegovih metabolita kod pušača i nepušača, prije i poslije boravka u prostorijama u kojima je dozvoljeno pušenje GC-MS analizom bioloških uzoraka.

Pokazati razliku koncentracije nikotina i njegovih metabolita kod pušača koja je značajno viša u odnosu na nepušače, mjerena u uzorcima urina prije i poslije boravka u prostorijama u kojima je dozvoljeno pušenje (noćni klubovi i kafići).

Odrediti koliki je doprinos pasivnog pušenja kod obe skupine za vrijeme boravka u prostorijama u kojima je dozvoljeno pušenje.

Ukazati na izloženost konobara nepušača u noćnim klubovima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Kemikalije korištene u eksperimentalnom radu

U ovom radu korištene su sljedeće kemikalije:

Diklormetan, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Etil acetat, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Kloroform, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Natrijev volframat dihidrat, Merck, Darmstadt, Njemačka

3.2. Instrumenti

Instrumenti korišteni u istraživanju:

Digitalna tehnička vaga; Kern; mjerenje na 3 decimale

Rotor za ekstrakciju, Vorteks; IKA

Centrifuga Centric; Tehnica.

Plinski kromatograf s masenim spektrometrom; Shimadzu GCMS-QP2010

3.3. Referentni standardi nikotina i metabolita

U istraživanju su korišteni certificirani referentni standardi za pripremu standardnih otopina i izdradu umjerne krivulje, SIgma-Aldrich. Otopine nikotina, kotinina i *trans*-3`-hidroksikotinina u metanolu koncentracija 1.0 mg/ml (tablica 3).

Tablica 3. Standardi nikotina i metabolita korišteni u izradi umjerne krivulje

Ime standarda	Kemijsko ime	Formula	Koncentracija u metanolu	Čuvanje
Nikotin	3-[(2S)-1-methylpyrrolidin-2-yl]pyridine	$C_{10}H_{14}N_2$	1.0 mg/ml	2-8°C
Kotinin	1-methyl-5-(pyridin-3-yl)pyrrolidin-2-one	$C_{10}H_{12}N_2O$	1.0 mg/ml	- 20°C
trans-3`-hidroksikotinina	(2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-{[(3R)-1-methyl-2-oxo-5-(pyridin-3-yl)pyrrolidin-3-yl]oxy}oxane-2-carboxylic acid	$C_{16}H_{20}N_2O_8$	1.0 mg/ml	- 20°C

3.4. Priprema referentnih standardnih otopina za analizu koristeći GC-MS tehniku

Za svak pojedini standard iz početne koncentracije; c_0 u metanolu; napravilo se pet razrjeđenja: koncentracije od c_1 do c_5 tablica 4. Pripremljene standardne otopine i dodane u određen volumen urina, koji je prethodno analizran te je utvrđeno da je bio negativan na prisustvo nikotina i njegovih metabolita, Pripremljene su umjerne krivulje za nikotin i metabolite u mediju uzorka kojima će se određivati nepoznata koncentracija.

Tablica 4. Priprema standardnih otopina za umjerne krivulje nikotina i metabolita

Standard	Početna koncentracija standarda c_0 (mg/mL)	Koncentracije otopina standarda nakon razređenja (mg/mL)				
		c_1	c_2	c_3	c_4	c_5
Nikotin	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001
Kotinin	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001
3-OH-K	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001

Tablica 5. Priprema točaka za umjerne krivulje nikotina i metabolita**.**

Točke baždarne krivulje standardnih otopina (ng/mL)	**Volumeni pripremljenih standardnih otopina (mL)**			**Volumen urina mL**
	Nikotin	**Kotinin**	**3-OHK**	
1 000	4,5			4,3656
100				4,3656
10				4,3656
1				4,3656
0,1				4,3656

3.5. Biološki uzoci za analizu

Ovo ispitivanje pregledalo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu koje je nakon uvida u određenu dokumentaciju odobrilo istraživanje. Volonteri istraživanja potpisali su pismo informiranog pristanka kojim pristaju sudjelovati u istraživanju.

Ispitivanje je provedno u skladu sa svim primjenljivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnovne dobre kliničke prakse i Helsinšku deklaraciju. U istraživanju se koristi biološki uzorak urina koji spada u biološki otpad, a uzorkovanje ne spada u invazivne tehnike. Tijekom istraživanja za istog ispitivača izuzet je jedan uzorak urina prije odlaska u noćni klub i jedan uzorak prvog jutarnjeg urina. Uz posjetitelje noćnih klubova u istraživanju su sudjelovali i konobari od kojih su izuzeta po tri uzorka. Jedan prije odlaska u smjenu, drugi po završetku smjene i treći uzorak kao prvi jutarnji urin.

Ukupni volumen urina po jednom uzimanju je 20-50 mL. Uzorak urina prikupljen je u test tubu polipropen/polistiren, adekvatnu za urin, sa navojnim čepom *(ISOLAB, laborgeräte GmbH)*. Prikupljeni uzorci urina adekvatno su čuvani u zamrzivaču na temperatur do -20°C do analize. Između kontakata sa istraživačem ispitanik se baviti svojom svakodnevicom bez ikakvih dodatnih zahtjeva. Prilikom prvog izuzimanja uzorka urina ispitanici su potpisali suglasnost za dobrovoljno sudjelovanje. Prilikom drugog izuzimanja urina ispunjen je upitnik

sa podacima koje smo koristili za interpretaciju rezultata. Svi uzorci označeni su isključivo brojem, a podatci u upitniku su povezani samo s brojem ispitanika i njegovim inicijalima.

Isptanici koji su sudjelovali u ovom istraživanju posjećivali su noćne klubove na području grada Kutine i grada Splita. U ispitivanju je sudjelovalo 22 ispitanika, od toga 7 muškaraca i 15 žena. prosječna dob svih ispitanika je 24 godine. Prosjek godina muškarac je 27 godina a žena 23 godine. Većina ispitanika, 72% studenti su Splitskog Sveučilišta i polovina njih izlazi 1-2 puta mjesečno, 20% izlazi svaki tjedan jednom dok ostali rijeđe. U večeri tijekom koje su izuzeti uzorci urina ispitanici su oko 1 sat iza ponoći pristigli u noćni klub, žene su provele prosječno 222 min u noćnom klubu dok su muškarci boravili nešto krače 123 min. Noćni klub su napustili između 4 i 5 sati iza ponoći. Konzumacija alkohola nije bila zabranjena zbog sudjelovanja u studiji. Prvi jutarnji urin kao drugi uzorak izuzet je 5 do 6 sati nakon izloženosti. Tri ispitanika zaposlena su u jednom splitskom noćnom klubu kao konobari. Tjedno provedu dva do tri dana po dvanaest sati u noćnom klubu izloženi pasivnom pušenju. Prvi uzorak zuzet je u 21 sat po dolasku u smjenu, drug uzorak izuzet je u 9 sati ujutro po savršetku smjene, a treći uzorak izuzet je 7 sati nakon izloženosti. Od ukupnog broja sudionika petero ih se izjasnilo da su aktivni pušači od toga jedan ispitanik puši povremeno, 4-5 cigareta mjesečno, troje ispitanka tjedno puši do 10 cigareta i jedan ispitanik puši 10 cigareta dnevno. Izloženost pasivom pušenju svakodevno pijavilo je 70% nepušača.

Upitinik:

U P I T N I K U Z I S T R A Ž I V A NJ E

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NIKOTINA I NJEGOVIH METABOLITA
U UZORKU URINA PASIVNIH PUŠAČA

Broj uzorka: prije _____ poslije _____	Datum uzorkovanja : _____
Ispitanik (inicijali): _____ Broj ispitanika: _____ (redni broj pod kojim je ušao u studiju) Godina rođenja: _____ Spol Ž M Težina (kg) _____	Mjesto ispitivanja: _____ Vrsta objekta: Površina/Volumen (m^2/m^3) Kafić o _____ Stambeni prostor o _____ Noćni klub o _____
Koliko često posjećujete kafiće u kojima se puši i koliko sati ukupno tjedno boravite: ° 1 tjedno _____h ° 2-3 puta tjedno _____h ° 3-5 puta tjedno _____h ° više puta dnevno _____h	Koliko često posjećujete noćne klubove u kojima se puši i koliko sati u njima boravite: ° 1 tjedno _____h ° 2-3 puta tjedno _____h ° 1-2 puta mjesečno _____h ° drugo _____ _____h
Da li ste svakodnevno izloženi : ° dimu ° ispušnim plinovima ° nekim drugim zagađivačima:_____	Da li ste pušač: ° ne ° 2-3 cigarete/dan ° 2-3 cigarete/tjedno ° do 10 cigareta/dan ° do 10 cigareta/tjedno ° 10-20 cigareta /dan ° više od 20 cigareta/dan ° drugo _____
Za vrijeme boravka u kafiću/klubu popušili ste: ° nijednu cigaretu ° uobičajenu količinu ° manje od uobičajene količine ° više od uobičajene količine	Za vrijeme boravka u kafiću/klubu konzumirali ste napitke: ° bezalkoholna pića količina _____ ° alkoholna pića: (0,03) količina _____ ° vruće napitke količina _____ ° gazirana pića količina _____
Prije boravka u kafiću/klubu jeli ste: ° ništa ° lagani obrok (nemasni) ° mesni obrok ° mliječni obrok	Za vrijeme boravka u kafiću/klubu konzumirali ste napitke: ° bezalkoholna pića količina _____ ° alkoholna pića: (0,03) količina _____ ° vruće napitke količina _____ ° gazirana pića količina _____

Vaša osobnost nam je bitna i želimo je maksimalno zaštiti. Potpisivanjem ovog formulara Vi ste ovlastili Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu i njegove istraživače, za korištenje podataka i informacija dobivenih tijekom vašeg sudjelovanja u studiji, isključivo u istraživačke svrhe.
Imala/o sam priliku dobiti odgovore na sva moja pitanja i nedoumice vezane u ovom istraživanju. Kopija ovog formulara mi je uvijek dostupna na gore navedenoj adresi. Suglasna/san sam sudjelovati u ovoj istraživačkoj studiji.

Datum: _____

_____ ----------

Potpis ispitanika: Potpis istraživača:

Postupak pripreme uzoraka za analizu ekstrakcijom tekuće-tekuće, LLE

Biloški uzorci urina prijemljeni su za kromatografsku analizu metodom ekstrakcije tekuće-tekuće (LLE). Na taj način eliminirane su sve nepotrebne primjene u urinu i izdvojena je organska faza. U staklenu tubicu sa navojem i čepom za ekstrakciju odvagano je 1.8g natrijeva volframat-dihidrata. Zatim dodano 3 ml prethodno pripremljene ekstrakcijske smjese diklormetana i etilacetata, u omjeru diklormeran:etilacetat (*v/v=3:1).* U tako pripremljenu smjesu dodano je 2 ml uzorka. Uzorci su ekstrahirani na rotoru za ekstrakciju 10 minuta na 50 rpm, zatim prebačeni u centrifugu 10 min na 3500 rpm. Nakon centrifugiranja u staklenim tubicama odvojile su se dvije faze; organska i vodena faza. Propipetom odvojeno je 3 ml organske faze, prebačeno u petrijeve zdjelice te u struji dušika evaporirano do suha. Organski sadržaj kloroformom je otopljen sa 30µL ukupnog volumena te prebačen u staklene insert tubice za GCMS analize.

3.6. Instrumentalna analiza GC-MS metodom

U radu je korišten plinski kromatograf sa spektrometrom masa, Shimadzu GCMS-QP2010, za izradu metode kvantitativnog određivanja nikotina i metabolita u uzorku urina kao i za analizu uzoraka. Kapilarna kolona plinskog kromatografa Restek, RTx–5MS, duljine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine filma nepokretne faze 0,25 µm. Za obradu podataka i kontrolu rada instrumenta pomoću računalnog programa GCMS Solution.

3.6.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske kolone

Pripremljeni uzorci analizirani su na plimskom kromatografu uz spektrometriju masa metodom koja omogućuje istovremeno snimanje samo odabranih iona (engl. Single ion monitoring, SIM) i snimanje ukupnog ionskog kromatograma (engl. Total Ion Chromatogram, TIC) u području od 40 do 600 m/z.

Razvijena je metoda za kvantitativnu analizu nikotina i metabolita u uzorcima urina sa definiranim temperaturnim programom i optimalnim uvjetima rada

Optimani uvjeti rada:

- volumen injektiranja: 1 µl (splitless)
- temperatura injektora: 250°C
- protok plina nosioca: 1.5 ml/min

Temperaturni program:

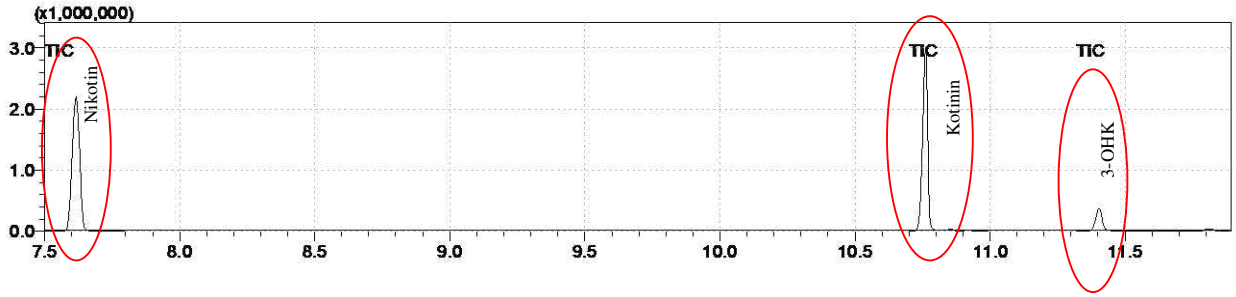
Ukupno trajanje temperaturnog programa: 13 min

1. 90 °C izotermno 3 min
2. 15°C/min do 240 °C

4. REZULTATI

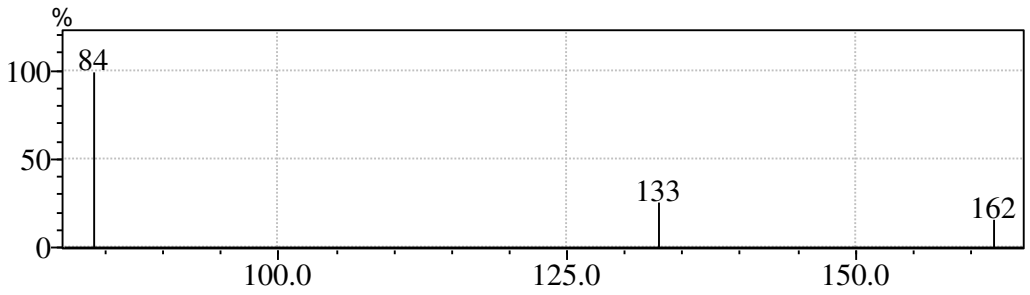
4.1. Analiza referentnih standarda nikotina i metabolita

GC-MS analizom dobiven je ukupni ionski kromatogram nikotina, kotinina i 3OHK, slika 11. Grafički prikaz kromatografa sastoji se od retencijskog vremena i RT vrijeme zadržavanja na koloni za svaki standard, prikazan na apscisi dok je na ordinati odziv detektora odnosdno intenzitet signala koji je proporconalan koncentraciji tvari.

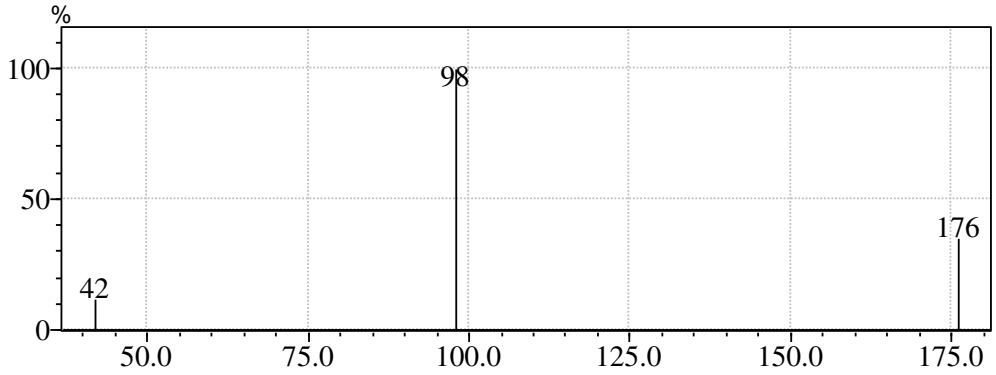


Slika 11. Prikaz dijela ukupni ionski kromatogram nikotina, kotinina, 3OHK, analiziranih GC-MS tehnikom, s karakterističnim signalima i retencijskim vremenima izraženim u minutama; nikotin (RT =7,619), kotinin (RT=10.760) i 3-OHK (RT=11,401).

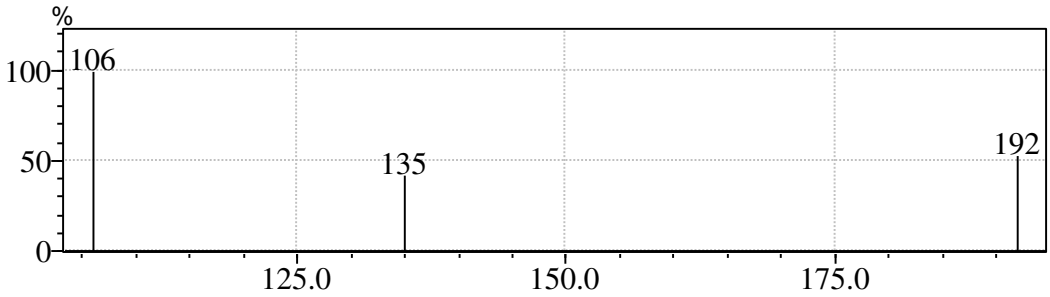
Analizom otopina referntnih standarda pomoću masenog spektrometra dobiveni su spektri masa (slika 12-14) koji su uspoređeni sa spektrima pohranjenim u EI bazama podataka. Na apcisi se nalazi vrijednost omjera mase i naboja, (m/z) dok ordinata prikazuje relativnu abundancija (intenzitet signala).



Slika 12. Karakterističan spektar masa nikotin (m/z 84, 133, 162)



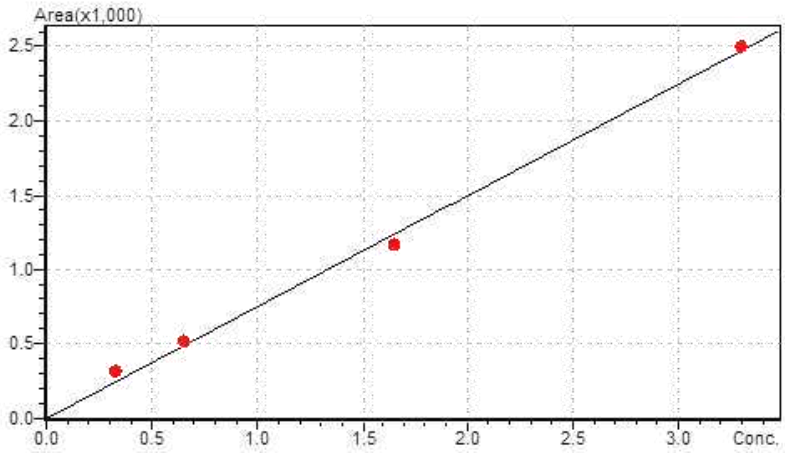
Slika 13. Karakterističan spektar masa kotinin (m/z 42,96,176).



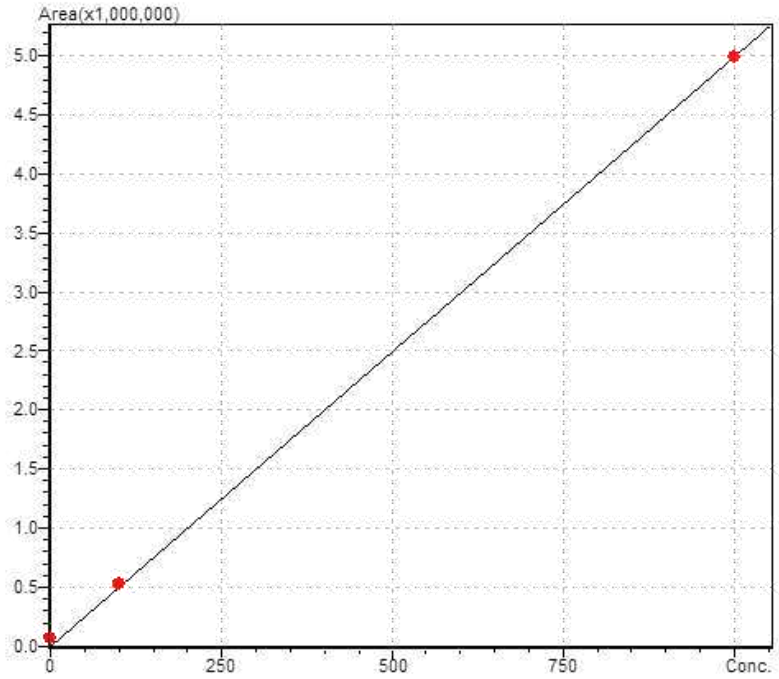
Slika 14. Karakterističan spektar masa 3-OHK (m/z 106, 135,192).

4.2. Umjerna krivulja za nikotin i metabolite

Pomoću optimalnih radnih uvjeta i uz koncentracije pripremljenih otopina, detaljno opisano u *Materijal i metode* (Poglavlje 3), određene su umjerne krivulje višeg i nižeg koncentracijskog područja za kvantitativnu analizu nikotina i njegovih metabolita u uzorcima urina. Detaljnije je opisano u diplomskom radu studentice Ivane Kurbaše. Pomoću dvije umjerne krivulje za svaku tvar obuhvačeno je široko koncentracijsko područje s obzrom da je među ispitanicim bilo i pušača i nepušača. Osigurano je određivanje vrlo niskih ali i vrlo visokih koncentracija, slika 15 i 16.



Slika 15. Umjerna krivulja za nikotin, koncentracijsko područje od 0,3-3,33 ng/mL

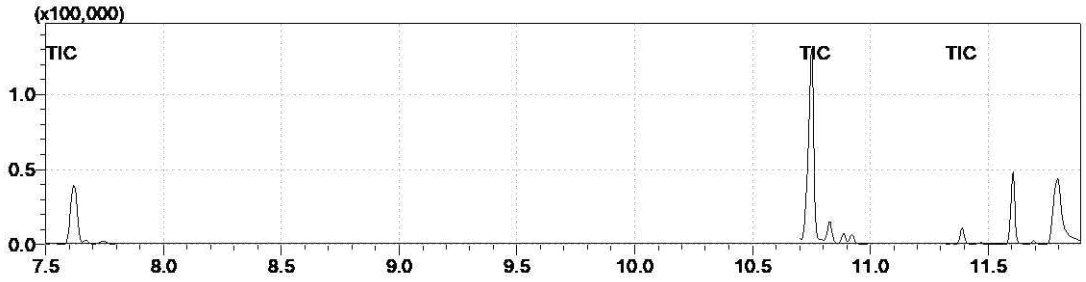


Slika 16. Umjerna krivulja za nikotin, koncentracijsko područje od 1 do 1000 ng

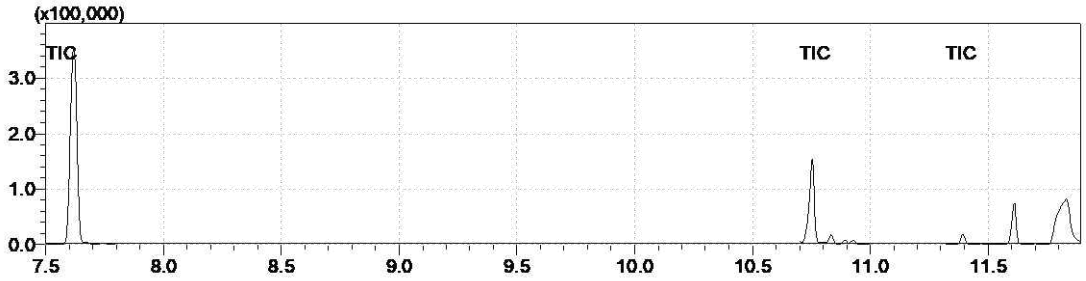
4.3. Kvantitativna analiza nikotina i metabolita u biološkim uzorcima mokraće

Uzorci urina ispitanka pripremljeni su kako je detaljno opisano u *Materijal i metode* (Poglavlje 3). GC-MS metoda i umjerne krivlje, opisane u diplomskom radu (73). Na slikama od 17. do 19. prikazani su dobiveni kromatogrami za tri uzorka urina jednog ispitanika. U svakom uzorku detektirani su nikotin i njegovi metaboliti s karakterističnim retencijskim vremenima koja su prikazana na apcisi dok ordinata prikazuje intenzitet signala koji je razmjeran koncentraciji u ispitivanim uzorcima.

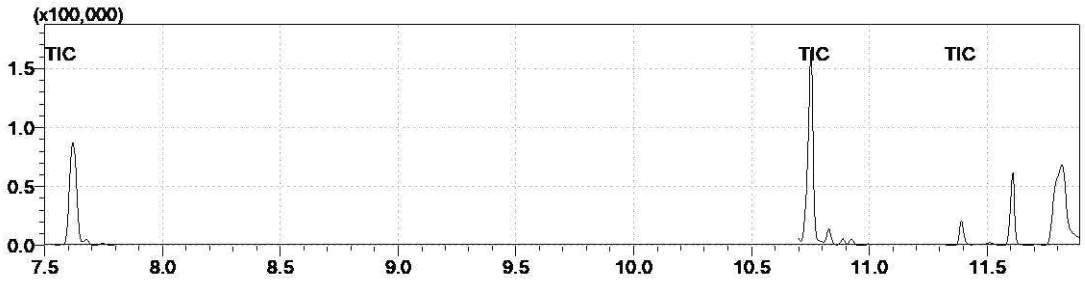
Koncentracije nikotina, kotinina i 3-OHK za svaki analizirani uzorak određen je pomoću izrađenih umjernih krivulja. Masene koncentracije izražene su u ng/mL i prikazane u tablici 6. i 7. Karakteristike ispitanika i koncentracije nikotina i metabolita prije i poslje boravka u noćnom klubu prikazane su u tablicama 8. i 9.



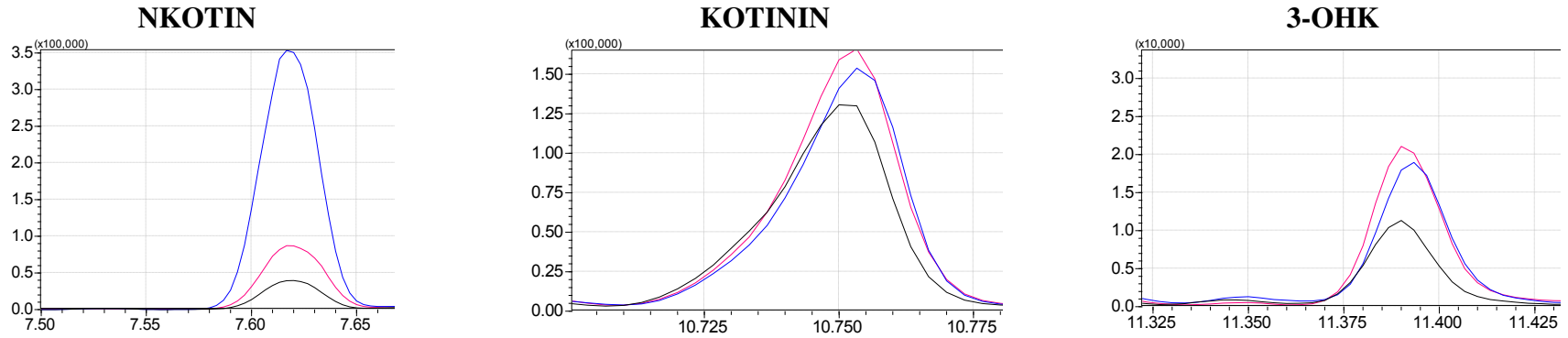
Slika 17. Prikaz dijela ukupni ionski kromatogram nikotina, kotinina, 3OHK, za uzorak 46 analiziran GC-MS metodom, s karakterističnim signalima i retencijskim vremenima izraženim u minutama; nikotin (RT =7,619), kotinin (RT=10.752) i 3-OHK (RT=11,390).



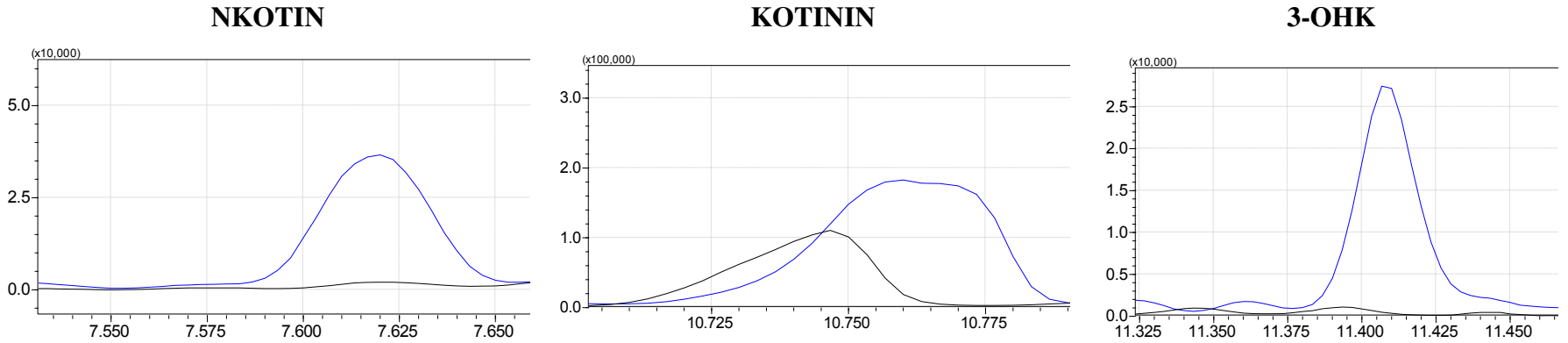
Slika 18. Prikaz dijela ukupni ionski kromatogram nikotina, kotinina, 3OHK, za uzorak 47 analiziran GC-MS metodom, s karakterističnim signalima i retencijskim vremenima izraženim u minutama; nikotin (RT =7,618), kotinin (RT=10.754) i 3-OHK (RT=11,393).



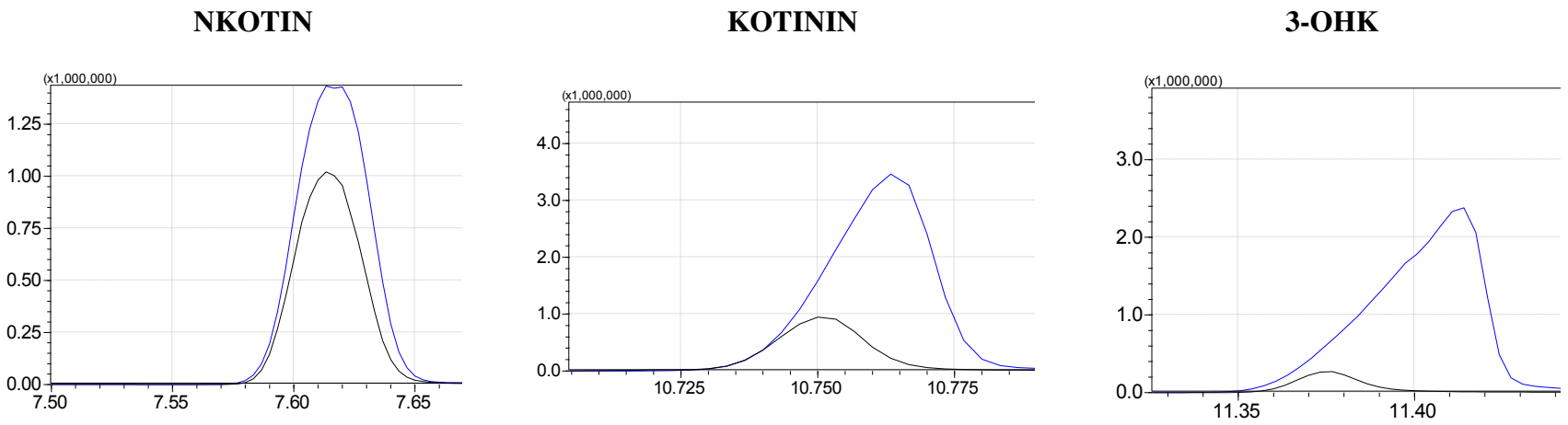
Slika 19. Prikaz dijela ukupni ionski kromatogram nikotina, kotinina, 3OHK, za uzorak 48 analiziran GC-MS metodom, s karakterističnim signalima i retencijskim vremenima izraženim u minutama; nikotin (RT =7,619), kotinin (RT=10.753) i 3-OHK (RT=11,391)



Slika 20. Grafički prikaz promjena koncetracija nikotina i metabolita prije i nakon boravka u noćnom klubua; konobar 3 uzorka br. 46,47i 48.



Slika 21. Grafički prikaz promjena koncetracija nikotina i metabolita prije i nakon boravka u noćnom klubua; nepušač 2 uzorka br. 29 i 12.



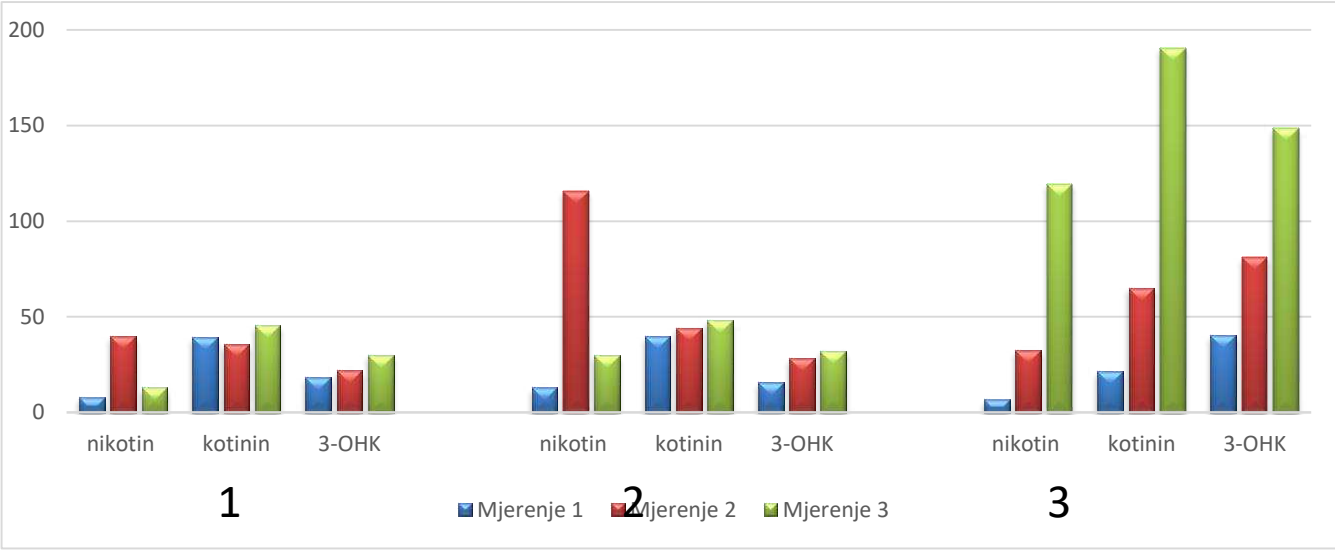
Slika 22. Grafički prikaz promjena koncetracija nikotina i metabolita prije i nakon boravka u noćnom klubua; pušač 2 uzorka br. 54 i 55.

Tablica 6. Koncentracije nikotina, kotinina i 3-OHK izražene u ng/mL dobivene GC-MS analizom uzoraka urina prikupljenih prije i nakon boravka u noćnom klubu.

Br uzorka	Spol	Nikotin		Kotinin		3OHK	
		Prije	poslje	prije	Poslje	prije	poslje
				Nepušači			
22/23	M	0,840	7,446	43,938	92,263	5,464	32,952
30/14	Ž	0,941	38,527	62,999	81,659	2,159	5,765
½	Ž	2,659	19,016	33,861	11,634	7,495	5,030
3/9	Ž	0,895	27,039	43,376	27,649	2,708	11,657
12/17*	M	0,961	14,168	0,170	2,620	2,125	2,457
4/20	M	0,889	23,584	2,239	90,646	1,348	10,396
29/32	Ž	0,674	12,439	35,355	79,145	1,561	47,933
7/8	Ž	1,397	69,046	50,302	93,72	77,757	90,644
16/18	Ž	0,790	33,554	20,486	35,251	5,657	38,946
63/64	Ž	1,434	11,209	0,556	5,340	1,231	4,417
59/60	Ž	36,093	56,144	0,761	59,878	1,816	119,700
39/40	Ž	8,242	378,488	6,303	143,367	3,820	72,932
42/43	M	42,253	40,266	56,705	75,408	5,781	21,961
35/36	Ž	15,883	588,269	29,718	27,794	18,83	18,524
				Pušači			
10/11	Ž	17,492	364,720	201,648	486,957	168,406	1446,348
54/55	Ž	332,338	509,579	323,150	946,036	451,505	5933,415
13/5	Ž	4,760	134,329	54,441	54,821	22,045	16,201
6/15	Ž	0,662	391,698	2,614	373,059	5,463	1190,168
72/73	Ž	16,224	25,200	51,757	99,610	232,319	575,153

Tablica 7. Koncentracije nikotina, kotinina i 3-OHK izražene u ng/mL dobivene GC-MS analizom uzoraka urina konobara prikupljenih prije smjene i po završetku smjene u noćnom klubu te nakon buđenja; vrijeme izloženosti 12 sati.

Br. uzorka	Spol	Nikotin			Kotinin			3-OHK		
		prije	Nakon 12 h izloženosti	7 sati nakon izloženosti	prije	Nakon 12 h izloženosti	7 sati nakon izloženosti	Prije	Nakon 12 h izloženosti	7 sati nakon izloženosti
Konobari, nepušači										
43/ 44, 45	M	8,033	39,559	13,088	39,115	35,529	45,575	18,163	21,840	29,902
46/ 47, 48	M	13,056	115,808	29,734	39,789	44,186	47,972	15,814	28,233	32,195
51/ 50, 49	M	6,909	32,373	119,488	21,394	65,087	190,551	40,244	81,160	148,770
Srednja vrijednost		9,332	62,58	54,077	33,433	45,267	94,699	24,740	43,744	70,289
Prosječni porast				**44,745**			**61,266**			**45,549**



Slika 23. Prikaz promjena koncentracija nikotina, kotinina i 3-OHK izražene u ng/mL dobivene GC-MS analizom uzoraka urina konobara 1,2,i,3 prikupljenih prije smjene i po završetku smjene u noćnom klubu te nakon buđenja; vrijeme izloženosti 12 sati.

Tablica 8. Karakteristike ispitanika nepušača i razine nikotina i metabolita.

	ŽENE			MUŠKARCI		
	Srednja vrijednost	**Minimum**	**Maksimum**	**Srednja vrijednost**	**Minimum**	**Maksimum**
Dob/godine	22,5	18	24	26,25	23	34
Težina/ kg	63,2	50	72	77,75	69	85
Vrijeme boravka u noćnom klubu /min	222	180	300	142,5	30	240
Izloženost pasivnom šušenju svakodnevno		60%			25%	
Nikotin/ (ng/mL)						
prije	8,197	0,79	36,093	11,235	0,84	42,253
poslje	123,373	11,209	588,269	21,366	7,446	40,266
prosječni porast		115,176			10,131	
Kotinin /(ng/ml)						
prije	28,372	0,556	2,62	25.763	0,17	56,705
poslje	56,544	62,999	143,367	65.234	2,62	92,263
prosječni porast		28,172			37,763	
3-OHK/ (ng/ml)						
prije	12,303	1,231	77,757	3,679	1,348	14,718
poslje	41,501	4,417	90,644	14,941	2,457	32,952
prosječni porast		29,198			11,262	

Tablica 9. Karakteristike ispitanika pušača i razine nikotina i metabolita.

	ŽENE		
	Srednja vrijednost	**Minimum**	**Maksimum**
Dob/godine	24	19	30
Težina/ kg	64,2	55	67
Vrijeme boravka u klubu /min	222	300	210
Nikotin/ (ng/mL)			
prije	74,299	0,662	332,338
poslje	285,141	25,200	509,759
prosječni porast		210,842	
KOT /(ng/ml)			
prije	126,722	2,614	323,150
poslje	391,697	99,610	949,036
prosječni porast		264,975	
3-OHK/ (ng/ml)			
prije	175,948	5,463	451,505
poslje	1832,257	16,201	5933,415
prosječni porast		1656,309	

5. RASPRAVA

U ovom radu prikazano je kvantitativno određivanje nikotina i metabolita u uzorku urina kod pasivnih pušača prije i nakon bokavka u noćnom klubu pomoću GC-MS metode. Srednja vrijednost nikotina, kotinina i 3-OHK prije izloženosti u noćnom klubu kod nepušača iznosila je: 8,197 ng/mL, 28,372 ng/mL, 12,303 ng/mL kod žena i 11,235 ng/mL, 25,763 ng/mL, 3,673 ng/mL kod muškaraca.

Ciljana populacija u ovoj studiji bili su studenti grada Splita te i konobari nepušači, kao ugrožena skupina, jednog splitskog noćnog kluba. Kako bi odredili početna razinu nikotina i njegovih metabolita u urinu, te porast njihovih koncentracija, prikupljeni su uzorci prije odlaska u noćni klub te nakon odlaska iz noćnog kluba. U svim uzorcima potvrđena je prisutnos nikotina, kotinina i 3-OHK.

Razina nikotina ukazuje na nedavnu izloženost duhanskom dimu jer je vrijeme polueliminacije za urin 11 sati. Vrijednosti kod nepušača kreću se od 0,790 ng/mL do 42,253 ng/mL. Podaci dobiveni iz upitnika podudaraju se sa rezultatima tj. povečane razine nikotina kod nepušača uočene su kod ispitanika koji su svakodnevno izloženi duhanskom dimu u svojim obiteljina, društvu ili javnom prijevozu. Kotinin u biološkom uzorku potječe samo iz nikotina, kao njegov metabolit. U urnu vrijeme poluživota je od 72 do 96 sati što znači da njegaova koncentracija potvrđujue izloženost duhanskom dimu u zadnjih tri do četiri dana. Kod gotovo svih ispitanika u uzorcima prije odlaksa u noćni klub, vrijednost kotinina potvrđuju pasivno pušenje i stalnu izloženost duhanskom dimu.

Izmjerene vrijednosti nikotina i metabolita u uzorcima nakon izloženosti u noćnom klubu očekivano su veće kod svih ispitanika nego koncentracije dobivene u prvom uzorku. Srednja vrijednost nikotina, kotinina i 3-OHK nakon izloženosti u noćnom klubu kod nepušača iznosila je: 123,373 ng/mL, 56,544 ng/mL, 41,501 ng/mL kod žena i 21,366 ng/mL, 65,234 ng/mL, 14.941 ng/mL kod muškaraca Prosječan porast nikotina, kotinina i 3-OHK kod nepušača bio je 115,176 ng/mL, 28,172 ng/mL, 29,198 ng/mL kod žena i 10,131 ng/mL, 37,763 ng/mL, 11,262 ng/mL kod muškaraca. S obzirom na dužinu izloženost porast koncentracija kod konobara, nepušača za nikotin, kotinin i 3-OHK veći je nego kod muških ispitanika koji su boravili u klubu kao posjetitelji i iznosio je 44,745 ng/mL, 61,266 ng/mL, 45,549 ng/mL.

Vrijednosti nikotina i metabolita prije i nakon izloženosti kod pušača su značajno veće nego kod pasivnh pušača. Srednje koncentracija nikotina i metabolita prije izloženosti iznosile su 74,299 ng/mL, 126,722 ng/mL, 175,948 ng/mL u korelacji su sa podacima iz

upitnika o količini popušenih cigareta. Srednje koncentracije nako izloženosti iznosile su 285,141 ng/mL, 391,697 ng/mL, i 1832,257 ng/mL.

Izdvojeni su rezultati troje ispitanika, konobar broj uzoraka 46, 47 i 48; nepušač broj uzoraka 29 i 32, pušač broj uzoraka 54 i 55, slike od 20 do 22. Grafički prikazi predstavljaju promjene u koncentracijama prije i nakon izlaganja pasivnom pušenju za svaku pojedinu tvar koju je određivan; nikotin, kotinin i 3-OHK. Na apscisi su prikazane koncentracije dok ordinata prestavlja intenztet signala koji je razmjeran koncentracijama. Krivulje na grafikonima koje predočavaju promjene koncentracija nikotina i metabolita kod konobara i pušaća, slične su, imaju strmi porast i nagli pad dok krivulja na grafikonu nepušača ima plato i blagi porast i pad. Posljedni graf u nizu prikazuje promjene koncentracija 3-OHK, vidljiv je nagli porast i pad kod sva ti ispitanika. Rezultati uzoraka konobara, nepušaća, koji su bili izloženi duhanskom dimu 12 sati, međusobno se razlikuju, slika 23.

Prema odboru za kemijsku verifikaciju (SRNT Subcommittee on Biochemical Verification) s obzirom na specifičnost i osjetljivost kotinina kao biomarkera optimalna vrijednost za razlikovanje pušača od nepušača je 15 ng/mL kotinina u plazmi i slini dok je za urin 50 ng/Ml (74). Razina kotinina u urinu nakon izloženosti duhanskom dimu u noćnom klubu bila je visoka s najvećom vrijednossću od 190,551 ng/mL, a polovina ispitanika nadmašilo je graničnu vrijednost aktivnog pušenja koja je 50 ng/mL. Pregled literature Torresa i suradnika koji obuhvaća studije od 2012. do ožujka 2018. godine spušta graničnu vrijednost kotinina u urinu za razlikovanje pušača od pasivnih pušača na 30ng/mL u odnosu na vrijednost SNRT-a iz 2002. godine (53). Uzevši u obzir nižu graničnu vrijednost, 70% ispitanika u našem istraživanju prešlo je graničnu vrijednost kotinina u urinu nakon izloženosti u noćnom klubu, uključujući i konobare. Koncentracija kotinina u urinu iz pregleda literature kretale su se od 34,5 do 489 ng/ml za pušače i od 0,25 do 30 ng/ml za nepušače koji su bili izloženi duhanskom dimu, ali akutno izlaganje može povećati koncentracije kotinina u urinu do razine koncentracije koje su zabilježene kod pušača. Prosječne vrijednosti iz ovog rada za kotinin prije izloženosti nepušača poklapaju se sa intervalom iz pregleda literature, ali koncentracije nakon izloženosti prelaze isti interval što je u skladu s naznačenim za akutno izlaganje. Pravi primjer akutnog izlaganja su konobari i nepušači koji su tijekom cijele noći izloženi svim štetnostima duhanskog dima. Prema pregledu literature radnici nepušači u kafićima i restoranima bez zabrane pušenja imali su prosječne koncentracije kotinina u urinu od 35,9 do 61,2 ng/mL što se u potpunosti slaže sa vrijednostima dobivenim u ovom radu (53).

U studijama Johnstone et al. 2006. i Kandel et al. 2007. (75, 76) dokazano je da postoje rodne razlike u brzini metabolizma nikotina. Potvrđeno je da žene imaju veći klirens nikotina i kotinina nego muškarci. Uspoređujući prosječne koncentracije nepušača iz ovog rada vidimo da su u urinu žena koncetracije nikotina i metabolita veće nego kod muškaraca, tablica 9. Koncentracije kotinina kod žena manje su, ali to objašnjava činjenica da je metabolizam brži pa se veći dio kotinina metabolizirao u 3-OHK. Spolni hormoni posljedica su rodne razlike prema istraživanju Higashi i suradnika koji su ispitivali aktivaciju CYP2A6 estogenom na razini gena. Estrogeni i progesteroni induciraju aktivnost CYP2A6 enzima. Indukcija je veća kod žena koje uzimaju oralne kontraceptive i kod trudnica (77).

Lazcano-Ponce i suradnici 2007. godine ispitivali su raznu kotinina i 3-OHK u urinu pasivnih pušača prije i poslje boravka u jednom noćnom klubu u Meksiku. U istraživanju je sudjelovalo 100 ispitanika. Dva tjedna prije početka istraživanja izbjegavali su izlaske u noćni klub, ali ih je 60% potvrdilo izloženost pasivnom pušenju kod kuće. Najmaje sat vremena proveli su u noćnom klubu i konzumirali su samo bezalkoholna pića. Drugi uzorak urina izuzet je u prosjeku 6 sati nakon izloženosti. Uzorci urina anslizirani su LC-MS/MS metodom. Koncentracija kotinina u urinu kod žena prije izloženosti u prosjeku je 2,2 ng/mL, a nakon izložeosti 15,7 ng/mL dok je kod muškaraca prosječna koncentracije kotinina u urinu prije i poslje izloženosti nešto viša, 3,7 ng/mL i 49 ng/mL. Koncentracije 3-OHK u urinu kod žena prije izloženosti bile su u prosjeku 5,7 ng/mL i nakon izloženost 51,3 ng/mL dok su kod muškaraca proječe koncentracije 3-OHK u urinu prije i poslje 10,4 ng /ml i 116,2 ng/mL (78). Koncentracija kotinina u urinu kod oba spola prije i poslje izloženosti manje su u odnosu na vrijednosti dobvene u ovom radu. Veća razlika je kod žena jer su prosječne koncentraje prjie izloženosti u studij iz Meksika, 28,372 ng/mL u odnosu na 2,2 ng /mL (78). Po tom se može zaključiti da su žene koje su sudjelovale u ovoj studiji svakodnevno više izložene pasivnom pušenju. Prosječne koncentraije 3-OHK kod muškaraca nakon izloženosti dobivene u ovoj studiji manje su nego u studiji iz Meksika, 14,941 ng/mL u odnosu na 116,2 ng/mL.

U uzorau 17 uočena je razlika u odnosu na ostale ispitanike nepušače nakon izloženosti duhnaskom dimu u noćnom klubu. Vidljiv je značajno manji porast u koncentracija kotinina i 3-OHK. Ispitanik je tijekom bokavka u noćnom klubu boravio neposredno blizu ventilacije. Ovo je pravi primjer kako dobra ventilacija može značajno smanjiti, ali ne i u potpunosti spriječit utjecaj duhanskog dima. Kada se govori o pasivnom pušenju nisu samo nikotin i metaboliti štetni za osobu koja je izložena. U duhanskom dimu

indentificirano je 7000 kemjskih spojeva od toga su preko 50 poznati kao kancerogeni za ljude, a najmanje 250 ih je štetno. Zdravstveni učinci izloženosti duhanskom dimu, deseta je monografija američkog Naconalnog instituta za rak *(National Cancer Institute)* u kojoj su izdvojeni kemijski spojevi duhanskog dima koji su klasificirani ili identificirani s obzirom na kancerogenost, reproduktivnu toksičnost ili druge štetne učinke na zdravlje, tablica 2. 2. (79). Svi ovi štetni spojevi opterećuju organizam pušača, ali i pasivnih pušača i predstavljaju veliki zdravstveni rizik za djecu koja žive i mlade ljude koji rade u takvim uvjetima. Koliko je zrak u zatvorenom prostoru opterećen duhanskim dimom dokazuje studija u kojoj je na 40 javih mjesta (kafići, restorani, igraonice) u Rimu praćena kvalitetu zraka prije i nakon zabrane pušenja u zatvorenim prostorima na temelju koncentracije finih i ultrafinih čestica, promjera 2.5 mm i 0.1 mm. Srednja vrijednsot finih i ultra finih čestica prije zabrane bila je 119,3 μ/m^3, 76 956 čestica/cm^3. Tri mjeseca nakon zabrane vrijednosti su se značajno smanjile 43.3 $\mu g/m^3$ i 38 079 čestica / cm3. Koncentracija kotinina u urnu zaposlenika nepušača u korelaciji je sa promjenom kvalitete zraka prije i nakon novog zakona (80).

Izlaganje duhanskom dimu štetno utječe na zdravlje što se može dokazati procjenom biomarkera duhaskih kemikalija u biološkim uzorcima. Kotinin, prema svojoj specifičnosti, osjetljivosti i vremenu zadržavanja u organizmu, najčešće je korišten biomarker izloženosti duhanaskom dimu. Pračenjem kotinina kao glavnog biomarkera nikotina moguće je procijeniti vrstu, opseg i učestalost izloženosti duhnaskom dimu, analizom uzoraka urina, krvi ili sline. Pasvno pušenje rezultira unosom mješavine tokisčnih tvari duhanskog dima što otvara mogućnost procjene širokog raspona specifičnh biomarkera za duhan. Studija višestrukih biomarkera i analiza više različitih vrsta uzoraka omogućuje bolju procjenu opsega i učestalosti izloženosti duhanskom dimu koja će dodatno razjasniti implikaciju pasivnog pušenja na ljudsko zdravlje (53). Brojna znanstevna istraživanja i statistički podaci ukazuju na štetnost pasivnog pušenja i veliki rizik za nepušače. Posebno treba spomenuti nepušače koji rade u zatvorenim prostorima u kojima je dozvoljeno pušenje jer su na radnom mjestu zdravstveno ugroženi. Također treba spomenuti i djecu koja su svakodnevno izložena i zdravstveno ugrožena u svojim domovima, brojne posljedice osjećaju tek kasnije kad odrastu.

6. ZAKLJUČCI

1. Kvantitativnom analizom bioloških uzoraka urina 22 ispitanika koji su sudjeloali u ovom radnu potvrđeno je GC-MS analizom prisutnost nikotina, kotinina i 3-OHK prije i nakon boravka u noćom klubu.
2. Koncentracije nikotina i metabolita pasivnih pušača ne prelazi koncentracije izmjerene u uzorcima akitvnih pušača.
3. Uzorci urina nepušača prije odlaska u noćni klub u 60% slučajeva prelaze graničnu koncentraciju kotinina u urinu, a pomoću koje se razlikuje aktivne pušače od nepušača što ukazuje na značajnu svakodnevnu izloženost štetim utjecajima duhanskog dima.
4. Značajan porast u koncentraciji nikotina i metabolita u uzorcima nakon boravka u noćnom klubu potvrđuje opterećenje organizma pasivnih pušača štenim utjecajima duhanskog dima.
5. Konobari nepušači u zatvorenim klubovima u kojima je dozvoljeno pušenje opterećeni su utjecaju duhanskog dima više nego ostali što potvrđuju izmjerene koncentracije nikotina i metabolita, što dugoročno predstavlja rizik za njihovo zdravlje.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Kostanjšak L. Ovisnost o nikotinu. Pliva zdravlje. 6.6.2013. Dostupno na: https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/23615/Ovisnost-o-nikotinu.html (pristup: 4. 5. 2019.)
2. Centers for Disease Control and Prevention (US); National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US); Office on Smoking and Health (US). Nicotine Addiction: Past and Present. U: How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease, Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010.
3. Katzung B. G, Opojne droge. U:Temeljna i klinička farmakologija. 11. Zdanje. Mediciska naklada: Zagreb; 2011, 11:32:533-62
4. https://www.researchgate.net/profile/Marloes_Peeters/publication/237097770/figure/fig4/AS:668562435883009@1536409114633/Structure-of-L-nicotine.png (pristup 29. 6. 2019.)
5. Brčić Karačonji I. Facts about nicotine toxicity. Arh Hig Rada Toksikol 2005;56:363-371
6. WHO, Tobacco. Svibanj, 2019. Dostupno na: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco (pristup: 18. 6. 2019.)
7. Žuntar I, Plavšić F, Otrovi biljaka i životinja. U: Sutlović D. i suradnici. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 171-210
8. Directive 2001/37/ec of the European parliament and of the council, Official Journal of the European Communities. 18. 7. 2001.
9. Mishra A, Chaturvedi P, Datta S, Sinukumar S, Joshi P, Garg A, Harmful effects of nicotine. Indian J Med Paediatr Oncol. 2015; 36(1): 24–31
10. Wadgave U, Nagesh L, Nicotine Replacement Therapy: An Overview. Int J Health Sci (Qassim). 2016;10(3): 425–435
11. Stead LF, Perera R, Bullen C, Mant D, Lancaster T. Nicotine replacement therapy for smoking cessation. Cochrane Database Syst Rev. 2008;23;(1)
12. Pauly JR, Slotkin TA. Maternal tobacco smoking, nicotine replacement and neurobehavioural development, Acta Paediatr. 2008;97(10):1331-7
13. Felman A, Everything you need to know about nicotine, MedicalNewsToday. 2018. Dostupno na: https://www.medicalnewstoday.com/articles/240820.php (pristup 4.5. 2019.)
14. DrugBank. Dostupno na: https://www.drugbank.ca/drugs/DB00184 (pristup 4.5.2019.)

15. NCI Thesaurus. Dostupno na: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C691 (pristup: 4.5. 2019.)
16. Fagerström K, Nicotine: Pharmacology, Toxicity and Therapeutic use. Journal of Smoking Cessation. 2014 9(2), 53–59.
17. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health. Nicotine. U: The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2014.
18. Talhout R1, Opperhuizen A, van Amsterdam JG, Role of acetaldehyde in tobacco smoke addiction. Eur Neuropsychopharmacol. 2007;17(10):627-36.
19. Hukkanen J, Jacob III P, Benowitz N. L, Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine, Pharmacological reviews, 2005;57:79–115
20. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/cerillian/c016?lang=en&region=HR (pristup 29. 6. 2019.)
21. Benowitz N. L, Hukkanen J, Jacob III P, Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. Handb Exp Pharmacol. 2009; (192): 29–60
22. Rendić S, Medić-Šarić M, Biotransformacija i toksičnost odaranih lijekova i ksenobiotika. U: Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 337-70.
23. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/cerillian/h101?lang=en&region=HR (pristup 29. 6. 2019.)
24. https://www.researchgate.net/profile/Tsuyoshi_Yokoi/publication/7619013/figure/fig1/AS:601748188168194@1520479356553/Metabolic-pathways-of-nicotine-in-humans_W640.jpg (pristup 29. 6. 2019.)
25. Jacob P 3rd, Yu L, Duan M, Ramos L, Yturralde O, Benowitz NL. Determination of the nicotine metabolites cotinine and trans-3'-hydroxycotinine in biologic fluids of smokers and non-smokers using liquid chromatography- tandem mass spectrometry: biomarkers for tobacco smoke exposure and for phenotyping cytochrome P450 2A6 activity. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2011;879(3-4):267–276.
26. Mayer B, How much nicotine kills a human? Tracing back the generally accepted lethal dose to dubious self-experiments in the nineteenth century. Arch Toxicol. 2014;88:5–7

27. Brčić Karačonji. Facts about nicotine toxicity. Arh Hig Rada Toksikol. 2005;56(4):363-71.
28. Fotedar S, Fotedar V, Green Tobacco Sickness: A Brief Review. Indian J Occup Environ Med. 2017; 21(3): 101–104.
29. Centers for Disease Control and Prevention. Dostupno na: https://www.cdc.gov/niosh/idlh/54115.html (pristup: 17. 6. 2019.)
30. Bruin J. E, Hertzel Gerstein C, Holloway A. C, Long-Term Consequences of Fetal and Neonatal Nicotine Exposure: A Critical Review. U: Toxicological Sciences. 2010;2(116): 364–74.
31. Winzer-Serhan UH. Long-term consequences of maternal smoking and developmental chronic nicotine exposure. Front Biosci. 2008;13:636-49
32. The American Cancer Society medical and editorial content team, Health Risks of Secondhand Smoke; studeni, 2015. Dostupno na: https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/tobacco-and-cancer/secondhand-smoke.html (pristup 13. 4. 2019.)
33. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health, Cancer. U: The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Atlanta. (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2014.
34. National Cancer Institute at the National Institutes of Health, Harms of Cigarette Smoking and Health Benefits of Quitting.2017. Dostupno na: https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/tobacco/cessation-fact-sheet (pristup 13. 4. 219.)
35. International Agency for Research on Cancer. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Human. Lyon 2004;83:1-1438.
36. Hoffmann D, Brunnemann, K.D. Endogenous formation of N-nitrosoproline in cigarette smokers. Cancer Research. 1983;43(11):5570-4.
37. Ladd KF, Newmark HL, Archer MC. N-nitrosation of proline in smokers and nonsmokers. Journal of the National Cancer Institute. 1984;73(1):83-7.
38. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health. Advances in Knowledge of the Health Consequences of Smoking: From 1964–2014. U: The Health Consequences of Smoking—50 Years of

Progress: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2014

39. Office on Smoking and Health, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, History of the Surgeon General's Reports on Smoking and Health. Prosinac, 2018. Dostupno na: https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/history/index.htm (pristup 5. 4. 219.)
40. EPA Designates Passive Smoking a »Class A« or Known Human Carcinogen. Dostupno na: https://archive.epa.gov/epa/aboutepa/epa-designates-passive-smoking-class-or-known-human-carcinogen.html (pristup: 5. 4. 2019.)
41. https://www.hhs.gov/sites/default/files/consequences-smoking-consumer-guide.pdf (pristup: 5. 4. 2019.)
42. Wipfli HL, Samet JM. Second-hand smoke's worldwide disease toll. Lancet. 2011;377(9760):101-2.
43. Öberg M, Jaakkola M. S.,Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A, Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. Lancet. 2011;377(9760):139-46.
44. Hrabak-Žerjavić V, Kralj V. Pušenje – čimbenik rizika za zdravlje. Hrvatski časopis za javno zdravstvo 2007;3:11–7
45. Leonardi-Bee J1, Britton J, Venn A. Secondhand smoke and adverse fetal outcomes in nonsmoking pregnant women: a meta-analysis. Pediatrics. 2011;127(4):734-41.
46. National Cancer Institute. Cancer Trends Progress Report: Secondhand Smoke Exposure. Veljača, 2019. Dostupno na: https://progressreport.cancer.gov/prevention/smoke_exposure (pristup: 13.4. 2019.)
47. Rojnić Palavra I, Pejnović Franelić I, Musić Milanović S, Puljić K, Pasivno pušenje – aktivni ubojica. Liječnički Vjesnik. 2013;135:326–329.
48. Ceronja I, Zašto ograničiti uporabu duhanskih proizvoda? Liječnički vjesnik. 2013;135: 3-4.
49. Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. Lung Cancer. 2004;45(2): S3–9.
50. Shiyi Cao, Chen Yang, Yong Gan, Zuxun Lu. The Health Effects of Passive Smoking: An Overview of Systematic Reviews Based on Observational Epidemiological Evidence. Pilos One. 2015. 6;10(10)

51. Office on Smoking and Health (US). The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2006.
52. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General, 2014
53. Torres S, Merino C, Paton B, Correig X, Ramírez N, Biomarkers of Exposure to Secondhand and Thirdhand Tobacco Smoke: Recent Advances and Future Perspectives. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(12)
54. Centers for Disease Control and Prevention (US); National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US); Office on Smoking and Health (US). Chemistry and Toxicology of Cigarette Smoke and Biomarkers of Exposure and Harm. U: How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010.
55. Avila-Tang E, Al-Delaimy WK, Ashley DL, Benowitz N, Bernert JT, Kim S, Samet JM i sur. Assessing secondhand smoke using biological markers. Tob Control. 2013;22(3):164-71
56. https://wwwn.cdc.gov/nchs/data/nhanes/20132014/labmethods/UCOT_I_UCOTS_I_Urinary_Cotinine_and_Hydroxycotinine_MET.pdf (pristupljeno 4.8.2019.)
57. Hatsukami DK, Hecht SS, Hennrikus DJ, Joseph AM, Pentel PR, Biomarkers of tobacco exposure or harm: application to clinical and epidemiological studies. 25-26 October 2001, Minneapolis, Minnesota. Nicotine Tob Res. 2003 Jun;5(3):387-96.
58. Kim S, Apelberg B.J, Avila-Tang E, Hepp L, Yun D, Samet J.M i sur. Utility and Cutoff Value of Hair Nicotine as a Biomarker of Long-Term Tobacco Smoke Exposure, Compared to Salivary Cotinine. Int. J. Environ. Res. Public Health 2014, 11, 8368–8382.
59. Tzatzarakis MN, Vardavas CI, Terzi I, Kavalakis M, Kokkinakis M, Liesivuori J, Hair nicotine/cotinine concentrations as a method of monitoring exposure to tobacco smoke among infants and adults. Hum Exp Toxicol. 2012;31(3):258-65
60. Al-Delaimy WK, Mahoney GN, Speizer FE, Willett WC, Toenail nicotine levels as a biomarker of tobacco smoke exposure. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002;11(11):1400-4.

61. Benowitz NL, Jacob P. Trans-3'-hydroxycotinine: disposition kinetics, effects and plasma levels during cigarette smoking. Br J Clin Pharmacol 2001;51(1):53-9.
62. Njegomir R, Kukoč Modun L, Ravnoteža analita između dviju faza, ekstrakcija. U:Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 519-58.
63. Vesna H, Mandić S, Nestić M, Sutlović D, Veršić M, Analiza bioloških uzoraka. U: Sutlović D i sur. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 335-84.
64. Dean JR. Classical Approaches for Aqueous Extraction. U: Dean JR. Extraction Techniques in Analytical Sciences. Wiley; 2009. str. 39-44.
65. Harvey D, Collecting and Preparing Samples. U: Analytical Chemistry 2.0. 2008. Str. 285-354
66. TIAFT – The International Association of Forensic Toxicologists. Recommendations on Sample Preparation of Biological Specimens for Systematic Toxicological Analysis
67. Watson G.D, Gas chromatography. U: Pharmaceutical Analysis, third edition. Elsevier Ltd. All rights reserved, 2012. Str. 265-300
68. Dawling S, Gas Chromatography. U: Moffat Anthony C, Osselton David M, Widdop B, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, fourth edition. TICTAC Communications: Chapter 13: Figures 13.1–13.21, 13.25–13.32, Pharmaceutical Press; 2011, str 636-717.
69. Mbughuni M. M, Jannetto P. J, Langman LJ. Mass Spectrometry Applications for Toxicology. EJIFCC. 2016;27(4):272–287.
70. Haskins N, Mass spectrometry in pharmaceutical analysis. Lee D.C, Webb M. L, Pharmaceutical Analysis. Blackwell Publishing Company. 2003. Str: 165-202.
71. Dass C, Basics of mass spectrometry. U: Fundamentals of contemporary mass spectrometry. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2007. Str 1-13.
72. Dass C, Hyphenated separation techniques. U: Fundamentals of contemporary mass spectrometry. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2007. Str 151-87.
73. Kurbaša I, Određivanje koncentracije nikotina i negovih metabolta u biološkim uzorcima. 2019.
74. SRNT Subcommittee on Biochemical Verification. Biochemical verification of tobacco use and cessation. Nicotine & Tobacco Research. 2002. 4, 149–159.
75. Johnstone E, Benowitz N, Cargill A, Jacob R, Hinks L, Day I i sur. Determinants of the rate of nicotine metabolism and effects on smoking behavior. Clin Pharmacol Ther. 2006. 80(4):319-30.

76. Kandel DB, Hu MC, Schaffran C, Udry JR, Benowitz NL, Urine nicotine metabolites and smoking behavior in a multiracial/multiethnic national sample of young adults. Am J Epidemiol. 2007. 165(8):901-10.
77. Higashi E, Fukami T, Itoh M, Kyo S, Inoue M, Yokoi T i sur. Human CYP2A6 is induced by estrogen via estrogen receptor. Drug Metab Dispos. 2007; 35(10):1935-41.
78. Lazcano-Ponce E, Benowitz N, Sanchez-Zamorano LM, Barbosa-Sanchez L, Valdes-Salgado R, Jacob III P i sur, Secondhand smoke exposure in Mexican discotheques. Nicotine & Tobacco Research. 2007. 9(10):1021-6.
79. https://cancercontrol.cancer.gov/brp/tcrb/monographs/10/m10_2.pdf (pristup 4.8.2019)
80. Valente P, Forastiere F, Bacosi A, Cattani G, Di Carlo S, Ferri M i sur, Exposure to fine and ultrafine particles from secondhand smoke in public places before and after the smoking ban, Italy 2005. Tobacco Control 2007;16:312–317.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Cilj ovog eksperimentalnog rada je bio je pomoću GC-MS metode kvantitativno odrediti koncentracije nikotina i metabolita u biološkim uzorcima urina dobrovoljnih ispitanika prije i poslje odlaska u noćni klub u kojem je dozvoljeno pušenje. Pokazati razliku koncentracije nikotina i njegovih metabolita kod pušača koja je značajno viša u odnosu na nepušače. Odrediti koliki je doprinos pasivnog pušenja kod obe skupine za vrijeme boravka u prostorijama u kojima je dozvoljeno pušenje i ukazati na izloženost konobara nepušača u noćnim klubovima.

Materijal i metode: Otopine nikotina, kotinina i trans-3`- hidroksikotinina u metanolu koncentracija 1.0 mg/ml kao certificirani referentni standardi za pripremu standardnih otopina i izdradu umjerne krivulje. Odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Splitu, informirani pristanak za ispitanike i upitnik. U straživanju je sudjelovalo 22 ispitanika, od toga 7 muškaraca i 15 žena. Od ukupnog broja sudioika petero ih se izjasnilo da su aktivni pušači dok su ostali nepušači, uključujući i konobare. Biološki uzorci urina nepoznath koncentracija nikotina i metabolita pripremljen za analizu ekstrakcijskom metodom tekuće-tekuće (LLE). Za analizu koristili smo GC-MS metodu sa optimalnim temperaturnim programom koja omogućuje istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma u području od 50 do 600 m/z vrijednosti.

Rezultati: Svi uzorci bili su pozitivni na nikotin i metabolite. Srednja vrijednost nikotina, kotinina i 3-OHK prije izloženosti u noćnom klubu kod nepušača iznosila je 8,197 ng/mL, 28,372 ng/mL, 12,303 ng/mL kod žena i 11,235 ng/mL, 25,763 ng/mL, 3,673 ng/mL kod muškaraca. Srednja vrijednost nakon izloženosti iznosila je: 123,373 ng/mL, 56,544 ng/mL, 41,501 ng/mL kod žena i 21,366 ng/mL, 65,234 ng/mL, 14,941 ng/mL kod muškaraca. Kod pušača srednje koncentracije nikotina i metabolita prije izloženosti iznosile su 7,299 ng/mL, 126,722 ng/mL, 175,948 ng/mL. Srednje koncentracije nakon izloženosti iznosile su 285,141 ng/mL, 391,697 ng/mL, i 1832,257 ng/mL.

Zaključci: Koncentracije nikotina i metabolita kod nepušača prije izloženosti bile su značajno manje neko nakon izloženosti. Podaci iz upitnika o svakodnevnoj izloženosti duhanskom dimu u korelaciji su sa dobivenim koncentracijama prije izloženosti u klubu. Razine nikotina i metabolita kod pušača značajno su veće nego li kod nepušača u svim uzorcima i u korelaciji je sa podacima iz upitnika o količini popušenih cigareta. S obzirom na dužinu izloženosti, porast koncentracija kod konobara nepušača za nikotin, kotinin i 3-OHK, veći je nego kod muških ispitanika koji su boravili u klubu kao posjetitelji. Brojna

znanstevna istraživanja i statistički podaci ukazuju na štetnost pasivnog pušenja i veliki rizik za nepušače. Posebno treba naglasiti nepušače koji rade u zatvorenim prostorima u kojima je dozvoljeno pušenje jer su na radnom mjestu zdravstveno ugroženi. Također treba spomenuti i djecu koja su svakodnevno izložena i zdravstveno ugrožena u svojim domovima, brojne posljedice vidljive su tek kasnije kad odrastu.

9. SUMMARY

Aims of the study: The objective of this experimental work was to quantitatively determine the concentrations of nicotine and metabolites in biological urine samples from voluntary subjects before and after visiting a nightclub where smoking is allowed by using the GC-MS method. To show a difference in the concentration of nicotine and its metabolites in smokers that is significantly higher than in non-smokers. To determine the influence of passive smoking to both groups during their stay in rooms where smoking is permitted and to indicate the exposure of non-smoking waiters at nightclubs.

Material and Methods: Nicotine, cotinine and trans-3`-hydroxycotinine solutions in methanol concentration 1.0 mg/ml as certified reference standard for production of standard solution and the production of a moderate curve. Approval of the Ethics Committee of the Faculty of Medicine in Split, informed consent for respondents and a questionnaire. Twenty-two subjects participated in the research, including 7 men and 15 women. Of the total number of subjects, five declared themselves to be active smokers while other were non-smokers, including waiters. Biological urine samples of unknown concentrations of nicotine and metabolites were prepared for the liquid-liquid extraction (LLE) analysis. For analysis, we used the GC-MS method with an optimal temperature program that allows simultaneous recording of the total ion chromatogram in the range of 50 to 600 m/z values.

Results: All samples were positive for nicotine and metabolites. The mean nicotine, cotinine, and 3-OHK value before nightclub exposure in non-smokers was 8,197 ng/mL, 28,372 ng/mL, 12,303 ng/mL in women and 11,235 ng/mL, 25,763 ng/mL, 3,673 ng/mL in men. Mean post-exposure values were: 123,373 ng/mL, 56,544 ng/mL, 41,501 ng/mL in women and 21,366 ng/mL, 65,234 ng/mL, 14,941 ng/mL in men. With smokers, the mean concentrations of nicotine and metabolites before exposure were 7.299 ng/mL, 126.722 ng/mL, 175.948 ng/mL. Mean concentrations after exposure were 285,141 ng/mL, 391,697 ng/mL, and 1832,257 ng/mL.

Conclusions: Concentrations of nicotine and metabolites in non-smokers before exposure were significantly lower than after the exposure. Data from the questionnaire on daily exposure to tobacco smoke correlate with the concentrations obtained prior to club exposure. The levels of nicotine and metabolites in smokers were significantly higher than in non-smokers in all samples and correlated with the data from the questionnaire on the number of cigarettes smoked. Considering the length of exposure, the increase in concentrations of nicotine, cotinine and 3-OHK in non-smoker waiters is higher than in male respondents who

were the visitors in the club. Numerous scientific studies and statistical data indicate the harmfulness of passive smoking and a high risk for non-smokers. Particular emphasis should be placed on non-smokers who work indoors where smoking is allowed, because they are at health risk at the work place. Also, children, who are exposed on daily basis and at health risk in their homes, have to be mentioned. Numerous consequences are visible only later when they grow up.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

IME I PREZIME: Bernarda Vazdar

DATUM ROĐENJA: 21.10.1995.

MJESTO ROĐENJA: Zagreb, Hrvatska

ADRESA STANOVANJA: Repušnica Lipa 56, 44320 Kutina

DRŽAVLJANSTVO: Hrvatsko

E-MAIL: bernarda.vazdar@gmail.com

ŠKOLOVANJE

2014. – 2019. Kemijsko-tehnološki i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

2010. – 2014. SŠ Tina Ujevća Kutina, opća gimnazija

2002. – 2010. Osnovna škola Stjepana Kefelje Kutina, PŠ Repušnica

STRUČNO OSPOSOBLJAVANJE:

25.02.2019. – 30.08.2019. Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Plokite

STRANI JEZIK:

Engleski

OSTALO:

Rad na računalu: Microsoft Office, Eskulap 2000

Vozačka dozvola: B kategorija