

# Biomarkeri pasivnog pušenja

---

**Vučičić, Marija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:638305>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-29**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**MARIJA VUČIČIĆ**

**BIOMARKERI PASIVNOG PUŠENJA**

**Završni rad**

Split, 2024. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**MARIJA VUČIČIĆ**

**BIOMARKERI PASIVNOG PUŠENJA**

**PASSIVE SMOKE BIOMARKERS**

**Završni rad/Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Prof.dr.sc. Davorka Sutlović**

Split, 2024. godina

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

**Znanstveno područje:** Biomedicina i zdravstvo  
**Znanstveno polje:** Kliničke medicinske znanosti

**Mentor:** prof. dr. sc. Davorka Sutlović

### BIOMARKERI PASIVNOG PUŠENJA

Marija Vučićić, 0346013000:

#### Sažetak

**Cilj:** Cilj ovog rada je prikazati mogućnost određivanja biomarkera pasivnog pušenja kod odraslih osoba analizom uzoraka urina.

**Materijal i metode:** Materijal koji se koristi za analizu je urin. Opisani su postupci određivanja nikotina i njegovih metabolita u urinu pomoću metoda masene spektrometrije te plinske i tekućinske kromatografije.

**Rezultati:** Uspoređuju se rezultati različitih istraživanja dobiveni od osoba koje puše ili su izložene pasivnom pušenju. Srednja vrijednost kotinina u urinu nepušača izloženih pasivnom pušenju bila je 56,544 ng/mL za žene i 65,234 ng/mL za muškarce, dok je srednja vrijednost 3-OHK u urinu nakon izloženosti iznosila 41,501 ng/mL za žene i 14,941 ng/mL za muškarce.

**Zaključak:** Izloženost pasivnom pušenju može se pouzdano mjeriti analizom nikotina i njegovih metabolita u urinu. Postavljanje dobre granične vrijednosti bitno je zbog razlika u metaboliziranju nikotina. Praćenje izloženosti bitno je zbog razvoja bolesti povezanih s pasivnim pušenjem.

**Ključne riječi:** biomarkeri, metaboliti nikotina, nikotin, pasivno pušenje

**Rad sadrži:** 35 stranica, 7 tablica, 8 slika i 22 reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. Doc.dr.sc. Sendi Kuret
2. Doc.dr.sc. Esma Čečuk Jeličić
3. Prof.dr.sc. Davorka Sutlović

**Datum obrane:** 2.7.2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
University Department of Health Studies  
Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics

**Scientific area:** Biomedicine and health  
**Scientific field:** Clinical medical sciences

**Supervisor:** prof. dr. sc. Davorka Sutlović

### PASSIVE SMOKE BIOMARKERS

Marija Vučićić, 0346013000:

#### Summary

**Objectives:** The aim of this paper is to demonstrate the possibility of determining biomarkers of passive smoking in adults through the analysis of urine samples.

**Material and methods:** The material used for analysis is urine. The procedures for determining nicotine and its metabolites in urine using mass spectrometry, as well as gas and liquid chromatography methods, are described.

**Results:** The results of various studies conducted on individuals who smoke or are exposed to passive smoking are being compared. The average cotinine level in the urine of non-smokers exposed to passive smoking was 56.544 ng/mL for women and 65.234 ng/mL for men, while the average 3-OHK level in the urine after exposure was 41.501 ng/mL for women and 14.941 ng/mL for men.

**Conclusion:** Exposure to passive smoking can be reliably measured by analyzing nicotine and its metabolites in urine. Establishing a good threshold value is crucial due to differences in nicotine metabolism. Monitoring exposure is essential due to the development of diseases associated with passive smoking.

**Key words:** biomarkers, nicotine metabolites, nicotine, passive smoking

**Thesis contains:** 35 pages, 7 tables, 8 figures, and 22 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

1. Doc.dr.sc. Sendi Kuret
2. Doc.dr.sc. Esma Čečuk Jeličić
3. Prof.dr.sc. Davorka Sutlović

**Defense date:** 2.7.2024.

# SADRŽAJ:

1	UVOD.....	1
1.1	NIKOTIN I NIKOTINSKI PREPARATI .....	1
1.1.1	Farmakokinetika i farmakodinamika nikotina .....	4
1.2	PUŠENJE I NAVIKE LJUDI U SVIJETU .....	7
1.2.1	Pasivno pušenje .....	8
1.2.2	Učinci pušenja i pasivnog pušenja na zdravlje .....	10
1.3	BIOMARKERI PUŠENJA.....	12
1.4	ODREĐIVANJE BIOMARKERA PUŠENJA.....	13
1.4.1	Biološki uzorci.....	14
2	CILJ RADA.....	16
3	MATERIJALI I METODE.....	17
3.1	UZIMANJE UZORAKA.....	17
3.2	METODE ODREĐIVANJA.....	18
3.3	KONSTRUIRANJE BAŽDARNE KRIVULJE.....	20
4	REZULTATI .....	21
4.1	ISPITANICI PRIJE I NAKON NOĆNOG KLUBA .....	25
5	RASPRAVA .....	28
6	ZAKLJUČAK .....	30
7	LITERATURA.....	31
8	ŽIVOTOPIS .....	34

# 1 UVOD

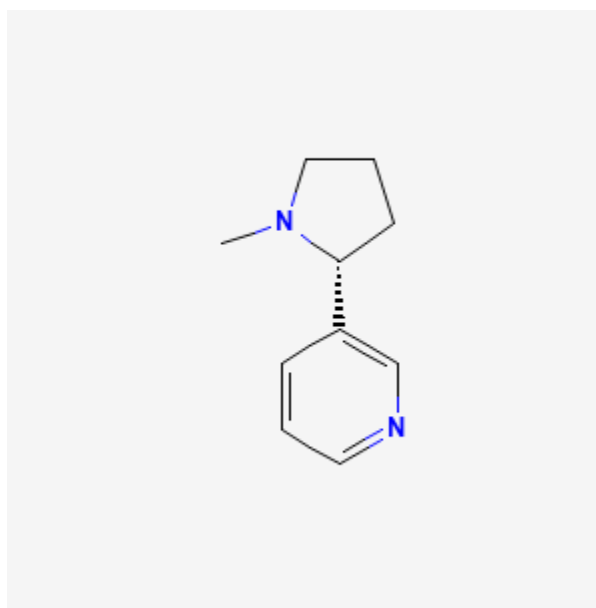
Upotreba duhana ostaje jedan od najvećih izazova javnog zdravstva širom svijeta koji uzrokuje razorne posljedice pojedincu, zajednici i ekonomiji (1). Svake godine više od 8 milijuna pušača izgubi život te se utjecaj duhana proteže i na nepušače, od kojih svake godine strada 1,3 milijuna izloženih pasivnom pušenju (1). Epidemija pušenja neravnomjerno pogađa zemlje s nižim i srednjim prihodima, gdje živi oko 80% od 1,3 milijarde pušača u svijetu. Unatoč širokoj svijesti o opasnosti duhana, društveni faktori i njegova ovisnička priroda potiču njegovu upotrebu. Na taj način doprinosi siromaštvu te preusmjerava resurse s osnovnih životnih potreba (1).

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO), eng. *World Health Organisation (WHO)*, usvojila je Okvirnu konvenciju SZO-a o kontroli duhana, eng. *Framework Convention on Tobacco Control (FCTC)*, 2003. godine, nazvanu *MPOWER* (eng. *Monitor Protect Offer help Warn Enforce Raise taxes*), na čije se principe trenutno obvezuju 182 zemlje (1). U manjem broju zemalja dostupne su potpune usluge prestanka pušenja, a oporezivanje duhana kao dokazani odvraćajući faktor od konzumacije, nije dovoljno iskorišten. Također velike napore stvara nezakonita trgovina duhanskim proizvodima. Na tržištu se pojavljuju novi duhanski proizvodi, poput grijanih duhanskih proizvoda, eng. *Heated Tobacco Products (HTP)* i elektronskih cigareta (e-cigareta) koji unatoč tvrdnjama o smanjenju štetnosti nose značajne zdravstvene rizike, ističući važnost kontinuiranog nadzora i regulacije (1).

## 1.1 NIKOTIN I NIKOTINSKI PREPARATI

Nikotin je glavni psihoaktivni agens u duhanu koji se nalazi u duhanskim listovima. Proizvodi se kao obrana protiv predatorskih insekata, no ima ulogu kao i teratogeni agens, neurotoksin, anksiolitik, agonist nikotinskog acetilkolinškog receptora, biomarker, imunomodulator, mitogen, lijek za periferni živčani sustav, psihotropni lijek, biljni metabolit

i ksenobiotik (2,3). Tercijarni je amin koji se sastoji od piridinskog i pirrolidinskog prstena (Slika 1.). Ova psihoaktivna tvar, koja se često povezuje s ovisnošću o duhanu, djeluje putem vezanja za nikotinske acetilkolinске receptore (nAChR) te poticanjem oslobađanja neurotransmitera poput dopamina, glutamata i gamma-aminobutirne kiseline (GABA) (2). Prosječno cigareta sadrži 10-14 mg nikotina, od čega se apsorbira oko 1-1,5 mg tijekom pušenja (4). Pojavljuje se kao bezbojna do svijetložuta ili smeđa zapaljiva tekućina, toksična inhalacijom i putem apsorpcije kroz kožu. Tijekom sagorijevanja proizvodi toksične okside dušika. (S)-nikotin je 3-(1-metilpirrolidin-2-il)piridin u kojem kiralni centar ima S-konfiguraciju. To je prirodno prisutni i najaktivniji enantiomer nikotina, izoliran iz *Nicotiana tabacum* (3).



Slika 1. Struktura nikotina (5)

Duhan je druga najčešće korištena psihoaktivna tvar s više od milijardu pušača diljem svijeta (2). Studije pokazuju da nikotin mijenja izražaj mikroRNK (miRNA) u različitim poremećajima povezanim s pušenjem. Ovaj utjecaj dovodi do kasnijih promjena u izražaju



ciljanih gena. Važno je napomenuti da promjene u izražaju miRNA mogu imati i zaštitne učinke, poput aktivacije protuupalnih procesa, i štetne učinke, uključujući one povezane s uvjetima poput ateroskleroze i Alzheimerove bolesti (2).

Nikotinska nadomjesna terapija dostupna je u dugotrajnom obliku kao što su flasteri s nikotinom te u raznim oblicima s bržim djelovanjem kao što su gume, pastile, inhalatori, sprej za usta i oralne trake. (6)

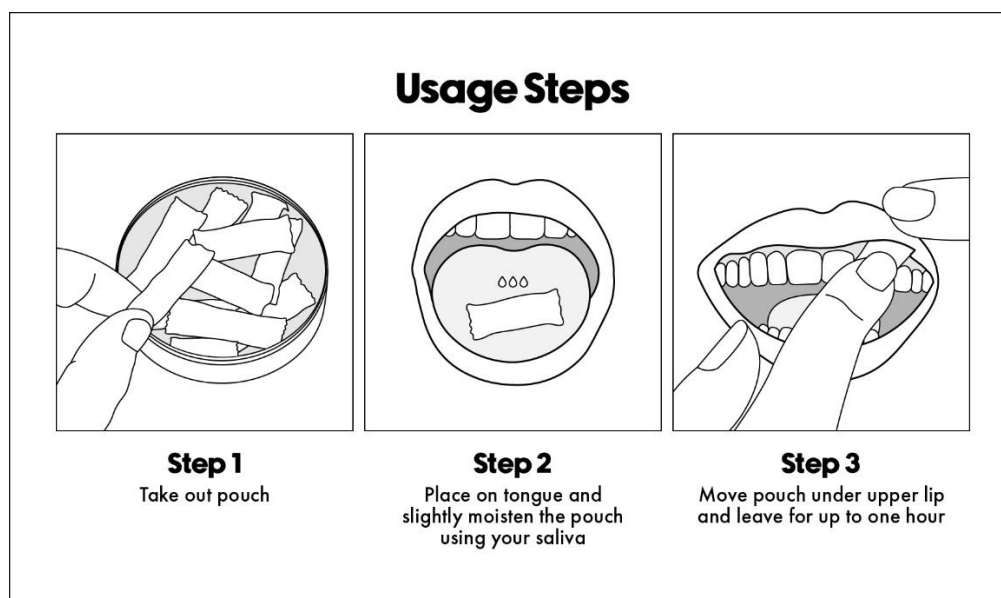
Elektronske cigarete, ili e-cigarete, predstavljene su kao potencijalna alternativa tradicionalnim duhanskim proizvodima, isporučujući nikotin i okuse u aerosolnom obliku (Slika 2.). Prvotno su promovirane kao pomoć u prestanku pušenja, iako je njihova učinkovitost u tom pogledu upitna. E-cigarete uz nadomjesnu terapiju čine dva glavna pristupa prestanku pušenja. Razlika je što terapija pruža nikotin bez duhanskog dima, dok e-cigarete isporučuju nikotin putem pare (6).

Kronična izloženost nikotinu, bilo putem tradicionalnog pušenja ili isparenja e-cigareta, može rezultirati negativnim simptomima dišnog sustava unatoč svojim ovisničkim svojstvima (7).



Slika 2. Vrste e-cigareta (8)

Nikotinski jastučići su proizvodi bez duhana koji postaju sve popularniji u Velikoj Britaniji (9). Služe u odvikavanju od pušenja te smanjuju štete od duhana. Drže se između usne i desni kako bi pružili izvor nikotina (Slika 3.). Pretpostavlja se da imaju relativno nizak profil rizika slično drugim oblicima oralno primijenjenog nikotina, no redovita i dugotrajna upotreba može povećati rizik od lokalnih oralnih problema kao što su lokalizirano povlačenje desni (9).



Slika 3. Nikotinski jastučići kao nadomjesna terapija za odvikavanje od pušenja (10)

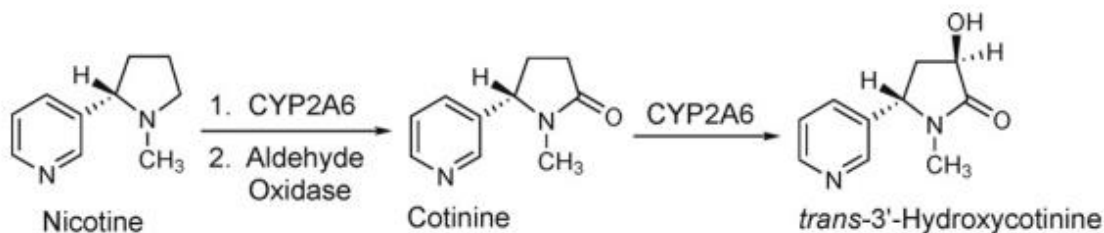
### 1.1.1 Farmakokinetika i farmakodinamika nikotina

Nakon udahnutog dima cigarete nikotin se destilira iz duhana, česticama dima se prenosi u pluća, zatim se brzo apsorbira u plućne vene te cirkulacijom brzo dolazi do mozga. Nikotin je slaba baza čija apsorpcija ovisi o pH. Duhan za žvakanje, nikotinska žvakača guma i burmut puferirani su s alkalnim pH kako bi apsorpcija kroz bukalnu sluznicu bila lakša (11). Nalazi se u gotovo svim duhanskim proizvodima u visokim koncentracijama, ali i u

neznatnim količinama u nekim namirnicama (12). Izbjegava metabolizam prvog prolaza u crijevima i jetri te se proizvode velike koncentracije u mozgu koje se mogu usporediti s onima koje se vide nakon intravenske primjene (11).

Nikotin je simpatomimetik koji oslobađa katecholamine, ubrzava rad i kontraktilnost srca, steže koronarne i kožne krvne žile te povećava krvni tlak. Otpuštanje dopamina očituje se kao ugodno iskustvo koje je ključno za pojačavanje učinka nikotina i drugih sredstava ovisnosti (11).

U jetri se nikotin opsežno i brzo metabolizira pomoću jetrenih enzima CYP2A6 i u manjoj mjeri CYP2B6 i CYP2E1 u kotinin. Poluvrijeme nikotina prosječno je dva sata, dok je poluživot kotinina prosječno šesnaest sati. Kotinin se metabolizira u trans-3-hidroksikotinin (3HC) isključivo putem CYP2A6 (Slika 4.). Kao fenotipski marker za aktivnost CYP2A6 i za brzinu metabolizma nikotina može se koristiti omjer 3HC prema kotininu (11). Tijekom dana razina kotinina u pušača je stabilna te zbog ograničene razine stvaranja 3HC omjer 3HC prema kotininu prilično je stabilan. To čini uzorke krvi, sline i urina pogodne za određivanje biomarkera pasivnog pušenja. Manjim putem nikotin i kotinin metaboliziraju se glukuronidacijom te u slučaju niske aktivnosti CYP2A6, može biti glavni put uklanjanja nikotina (11). Metaboliti nikotin, kotinin i trans-3-hidroksikotinin (3HC) i njihovi odgovarajući glukuronidni konjugati čine oko 85-90% nikotinske doze te zbroj metabolita u urinu prikazuje približan dnevni unos nikotina (12). U skladu s poluživotom od dva sata nikotin se u tijelu nakuplja kroz šest do devet sati redovitog pušenja, stoga izloženost nikotinu nije prolazna i povremena, već cjelodnevna (11).



Slika 4. Pretvorba nikotina u trans-3-hidroksikotinin (13)

Čimbenici kao što su genetske varijacije, spol, rasa, uporaba oralnih kontraceptiva ili drugih hormona koji sadrže estrogen, smanjena funkcija bubrega i lijekovi kao što su antikonvulzivi mogu utjecati na nikotinski metabolizam (12). Zbog značajnog genetskog polimorfizma u aktivnosti CYP2A6 postoje široke individualne varijabilnosti i rasne razlike, pa tako na primjer Azijci i Afroamerikanci metaboliziraju nikotin u prosjeku sporije nego bijelci ili Hispanjolci (11). Čini se da ljudi koji sporije metaboliziraju nikotin puše u prosjeku manje cigareta dnevno i imaju više razine ugljičnog monoksida od ljudi koji ga normalno metaboliziraju. Također se osobe koje sporije metaboliziraju nikotin kroz neko vrijeme prestanu pušiti i manje su općenito ovisni o nikotinu (11).

Koncentracija kotinina u uzorcima djece i dojenčadi veća je od koncentracije kotinina odraslih osoba izloženim pasivnom pušenju, a to se pripisuje većoj minutnoj ventilaciji po tjelesnoj masi te sporijem kotininskom metabolizmu, uzrokovanom nezrelošću organa u djece (12). Poznato je i da je novorođenčad izložena duhanu tijekom trudnoće imala duži poluživot nikotina u serumu nego odrasli (12). Djeca koja boluju od astme također pokazuju više koncentracije kotinina u urinu i kosi od onih koji ne boluju od astme. Majke koje puše dojenjem mogu prenijeti nikotin na djecu, iako djeca nisu izložena pasivnom pušenju. Djeca čije majke puše van kuće, a doje ih mogu imati veću koncentraciju kotinina u urinu od djece koja su izložena pasivnom pušenju, iako ih majke ne doje, već ih hrane na bočicu (12).

Provedena studija pokazala je kako žene općenito i žene u predmenopauzi metaboliziraju nikotin i njegov metabolit, kotinin brže od muškaraca, one koje uzimaju oralne kontraceptive

također imaju brži metabolizam nikotina te da faza menstrualnog ciklusa ne utječe značajno na klirens nikotina i kotinina (14). Žene koje su u postmenopauzi metaboliziraju nikotin sličnom brzinom kao muškarci. Korisnice kombiniranih kontraceptiva i onih koji sadrže samo estrogen pokazuju da imaju brži metabolizam nikotina, stoga se smatra da upravo on potiče metabolizam nikotina (14). Također brojne druge studije pokazuju da primjena oralnih kontraceptiva inhibira oksidativni metabolizam. Jedna provedena studija usporedila je žene i muškarce sa sličnom količinom konzumiranih cigareta i otkriveno je da žene imaju značajno niže koncentracije nikotina u plazmi, ali su imali slične razine izdahnutog ugljičnog monoksida, što odražava ukupnu izloženost duhanskom dimu. Potrebne su daljnje studije koje će istraživati utječe li uporaba oralne kontracepcije na ponašanje pušača ili pušenje kod žena. Neka istraživanja otkrila su da su stope uspjeha s nikotinskom nadomjesnom terapijom manje kod žena te se to može objasniti bržim metabolizmom (14).

## **1.2 PUŠENJE I NAVIKE LJUDI U SVIJETU**

Nezdrava prehrana, pretilost, tjelesna neaktivnost, konzumacija alkohola, a posebice pušenje koje je poznato kao glavni čimbenik rizika uzrokuju kardiovaskularne bolesti. Pušenje je odgovorno za čak 10% smrti od kardiovaskularnih bolesti i 140 000 preuranjenih smrti od kardiovaskularnih bolesti (15). Poznato je da ovisnost i uporaba duhana započinje prije osamnaeste godine života (16).

U početku se pušenje nije smatralo ovisnošću, već navikom. Argumentiralo se činjenicama kao što su odvikavanje od duhana koje ne predstavlja životnu prijetnju, no sindrom fizičke apstinencije koji je uočljiv u pušača ključna je značajka koja definira ovisnost. 1970-ih se pušenje počinje smatrati i liječiti kao ovisnost obzirom da ispunjava određene kriterije, uključujući i sindrom povlačenja (16). Ovisnost o pušenju naučena je i rezultat je uvjetovanja jer ljudi tijekom vremena počinju povezivati svoja raspoloženja, situacije ili čimbenike okoliša s korisnim učincima narkotika, odnosno nikotina. Nikotin kod ljudi izaziva simulaciju i zadovoljstvo te smanjuje tjeskobu i stres. Tijekom svakodnevnog

života kako bi kontrolirali raspoloženje i modulirali razinu uzbuđenja ljudi se podvrgavaju pušenju. Pušenje može poboljšati vrijeme reakcije, koncentraciju i izvedbu određenih zadataka (11).

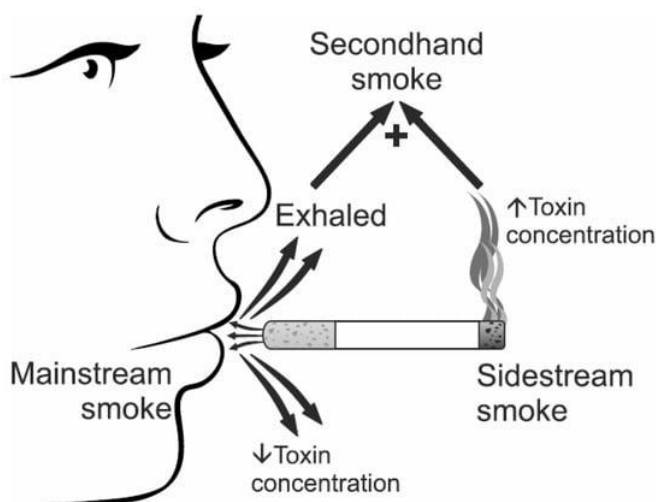
Ljudi obično puše nakon obroka, uz kavu ili alkohol te s prijateljima koji puše. Osim toga uvjetovani znakovi za pušenjem mogu postati i neugodna raspoloženja. Vezujući se na nikotinske kolinergičke receptore, nikotin olakšava oslobađanje neurotransmitera (11). Oslobađanje dopamina, glutamata i gama aminomaslačne kiseline osobito je važno u razvoju ovisnosti o nikotinu. Pretpostavlja se da čimbenik koji oslobađa kortikotropin pridonosi potrebi za povlačenjem nikotina. Osobe s poremećajima ovisnosti o opojnim tvarima kao i one s mentalnim bolestima predstavljaju visok udio pušača (11). Zbog razvoja svijesti o štetnom utjecaju duhana, pušenje se smanjuje od 1964., no uočljivo je da postoje razlike u pušenju među rasom, različitoj etničkoj pripadnosti, razini obrazovanja i socioekonomskom statusu te regiji u zemlji (16).

Nikotin koji stvara ovisnost i veliki napori industrija da održe svoje tržište stvarali su velike probleme u borbi protiv pušenja koje postaje sve manje prihvatljivo zbog povezanosti pasivnog pušenja s bolestima, ovisnosti o duhanu koje započinje već u adolescenciji i fokus same industrije koja predstavlja ključan utjecaj na ponašanje pušača te pokazuje važnost suprotstavljanju njegovim postupcima. Smatra se kako bi se pušenje trebalo zbog mnogih uključenih čimbenika razmotriti kao opsežna društvena odluka i kulturni fenomen, a ne samo kao individualna odluka o ponašanju (16).

### **1.2.1 Pasivno pušenje**

Pasivnim pušenjem smatra se udisanje dima cigareta i ostalih duhanskih proizvoda koje puše druge osobe (Slika 4.) (15). Pasivno pušenje uzrokuje respiratorne, kardiovaskularne i neoplastične bolesti kod odraslih, nepovoljne reproduktivne ishode kod žena te kod djece respiratorne i zarazne bolesti i odgođen rast (17). Već se 1970-ih počela razvijati svijest o utjecaju duhanskog dima na nepušače. Studije provedene 1960-ih pokazuju kako pušenje

tijekom trudnoće utječe na fetus u razvoju i na dijete, a iduće desetljeće pojavljuju se dokazi o povezanosti pušenja s rakom i kroničnim bolestima. Istraživanjima provedenim 1986. godine dolazi se do zaključka da pasivno pušenje izaziva rak pluća kod zdravih odraslih nepušača i respiratorne probleme kod djece (16). Koronarna arterijska bolest povezana je s osobama koje su bile izložene pasivnom pušenju te se povećava rizik za razvoj koronarne srčane bolesti za 70-80% (15).



Slika 5. Sastav pasivnog dima. Bočni dim, koji sadrži toksine u višim koncentracijama u usporedbi s glavnim dimom, čini više od 80% pasivnog dima (18).

Kroz vrijeme su se uvodila nova pravila kao što su: odvojena sjedala za pušače i nepušače, u početku se pušenje ograničilo u autobusima na 20% sjedala, ograničava se pušenje u restoranima. Pušenje je postalo javno zdravstveni problem koji je zahvatio osim pušača i nepušače te je jedno od glavnih uzroka smrti koje se može spriječiti (16). Provedene meta-analize zaključuju da su zakoni o zabrani pušenja na radnim mjestima, u restoranima i barovima doveli do smanjenog broja prijema pacijenata u bolnicu s akutnim infarktom miokarda i drugim srčanim i ostalim bolestima koje se povezuju s utjecajem pušenja te se smanjuje trošak zdravstvene skrbi za širok raspon bolesti. Čak su studije provedene u Irskoj

otkrile pad prijevremenih poroda i povećanje, do tada niske porođajne težine, samo godinu dana nakon zakona o zabrani pušenja (17).

### **1.2.2 Učinci pušenja i pasivnog pušenja na zdravlje**

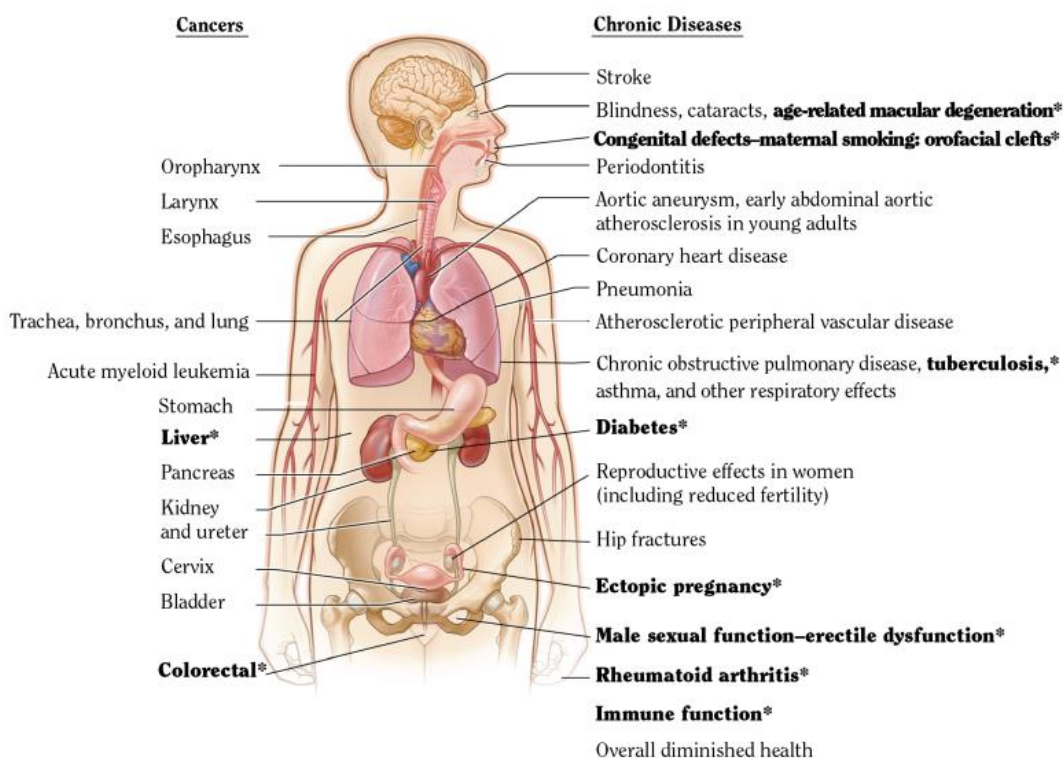
Još od prije poznato je da se pušenje povezuje sa 70% većom smrtnošću među muškarcima. Najvažniji je uzrok kroničnog bronhitisa te uzrokuje rak pluća i rak grkljana kod muškaraca i vjerojatni je uzrok raka pluća kod žena. Također su dijabetes melitus, reumatoidni artritis i kolorektalni karcinom povezani s pušenjem te se s pasivnim pušenjem još povezuju karcinom i bolesti dišnog sustava te kardiovaskularne bolesti i štetni učinci na zdravlje dojenčadi i djece (16). Brojne studije smatraju da kod pušača žene imaju veći rizik od obolijevanja od raka pluća u odnosu na muškarce, a to se objašnjava utjecajem ženskih spolnih hormona koji utječu na način na koji su se cigarete pušile ili kako se nikotin i karcinogeni duhanskog dima metaboliziraju (14). Posljednjih 50 godina značajno je porastao rizik od obolijevanja zbog pušenja kod žena te su sada jednaki rizici za muškarce i žene kod raka pluća, kardiovaskularnih bolesti i kroničnih opstruktivnih plućnih bolesti. Pušenje također uzrokuje slabljenje imunskog sustava i izaziva upale (16).

Postoje i drugi učinci kojima se mijenja aktivnost CYP2A6 koji bi mogli utjecati na povezanost pušenja s rizikom od karcinoma. Vjeruje se da CYP2A6 doprinosi metaboličkoj aktivaciji nitrozamina i drugih prekarcinogena specifičnih za duhan, a bržom aktivacijom dolazi do povećanog rizika za nastanak raka. Jedno od objašnjenja za povećan rizik od raka pluća kod žena u usporedbi s muškarcima leži u bržoj aktivaciji CYP2A6 izazvanog ženskim spolnim hormonima (14).

Kako smanjuje osjetljivost na inzulin, nikotin može pogoršati dijabetes i pridonijeti endotelnoj disfunkciji. Utjecajem na kardiovaskularni sustav može potaknuti aterogenezu i akutni ishemijski događaj kod ljudi s koronarnom bolesti arterije. Nije izravan kancerogen, ali može inhibirati apoptozu, što dovodi do slabijeg ubijanja tumorskih stanica u organizmu te potiče angiogenezu, odnosno proces koji pridonosi invaziji tumora i stvaranju metastaza



(11). Dokazi pokazuju da nikotin u visokim dozama ima akutnu toksičnost te aktivira više bioloških puteva preko kojih nikotin povećava rizik za nastanak bolesti (Slika 5.). Tijekom trudnoće nikotin uzrokuje trajne štetne posljedice za razvoj mozga te može uzrokovati preuranjen porod ili mrtvorodenje (16).



Source: USDHHS 2004, 2006, 2012.

Note: Each condition presented in bold text and followed by an asterisk (\*) is a new disease that has been causally linked to smoking in this report.

Slika 6. Bolesti povezane s pušenjem (16)

Tijekom odvikavanja od nikotina pojavljuju se negativna emocionalna stanja kao što su tjeskoba i povećan stres, što može biti veliki i snažan poticaj za ponovnu konzumaciju duhana. Dokazano je da aktivacija ekstrapotalamusnog faktora otpuštanja kortikotropina (CRF) – CRF1 receptorski sustav doprinosi negativnim učincima u osoba koje su na

odvikavanju ne samo od nikotina, već i alkohola, kokaina, opijata i kanabinoida. Simptomi ustezanja od nikotina pojavljuju se kod osoba koje prestanu pušiti (11). Osoba može postati razdražljivija, upasti u depresivno raspoloženje, osjećati nemir, tjeskobu, početi se svađati s bližnjima, imati probleme s koncentracijom, pojačanu potrebu za hranom i glad, nesanicu te žudnju za duhanom. Odvikavanje od nikotina kod neliječenih pušača uzrokuje poremećaje raspoloženja koji se uspoređuju po intenzitetu s onima kod psihijatrijskih ambulantnih pacijenata. Pretpostavlja se da relativni nedostatak dopamina koji se oslobodi nakon dugotrajne izloženosti nikotinu uzrokuje različite poremećaje raspoloženja i anhedoniju, potrebu i žudnju za duhanom te to može trajati dugo vremena nakon prestanka pušenja (11).

Nedavna istraživanja otkrivaju njegovu moguću povezanost s težinom bolesti COVID-19, što otvara pitanje o utjecaju pušenja na tijek infekcije virusom SARS-CoV-2 (2).

Godine 1992. *EPA* (eng. *The U.S. Environmental Protection Agency*) je proglasila okolišni duhanski dim kao ljudski kancerogen te ga svrstava u grupu A u svojim smjernicama za procjenu kancerogena. Godine 1998. izjavljuje se da je nikotin primarni uzročnik ovisnosti te stvara ovisnost sličnu heroinu i kokainu. Implicirano je liječenje korištenjem nikotinske nadomjesne terapije (16).

### **1.3 BIOMARKERI PUŠENJA**

Dva osnovna kriterija za dobre i valjane biomarkere su predviđanje rizika od bolesti te promjena koncentracije metabolita proporcionalno s promjenom rizika od bolesti (12).

Istraživanja su problematična jer su potrebne godine da bi se razvile bolesti povezane s pasivnim pušenjem, a biomarkere kao što je kotinin možemo mjeriti samo kao kratkotrajnu izloženost (12). Jedini način je mjeriti metabolit kroz duži period uz kroničnu izloženost pasivnom pušenju i zatim odrediti kvantitativan odnos između koncentracije biomarkera i izloženosti. Na primjer smanjenje porođajne težine statistički je povezano s trudnicama koje su bile izložene pasivnom pušenju (12).

Keton nitrozamina izveden iz nikotina (*eng. nicotine-derived nitrosamine ketone, NNK*) je nitrozamin i moćan kancerogen koji nastaje prvenstveno tijekom sušenja duhana, kada nikotin ili pseudooksinikotin reagira s nitritom u duhan (12). NNK se u tijelu metabolizira u alkohol nitrozamina izveden iz nikotina, 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (*eng. nicotine-derived nitrosamine alcohol, NNAL*) i NNAL glukuronide (NNAL-glu), koji se obično mjere zajedno kao ukupni NNAL (*eng. total NNAL, tNNAL*). tNNAL ostaje u tijelu duže od kotinina ( $t_{1/2}$ =10 dana do 3 tjedna). Poznato je da u štakora NNK i NNAL induciraju tumore gušterače, a NNK također uzrokuje tumore nosne sluznice i jetre, no u većoj količini nego kod raka pluća. Kotininske koncentracije u urinu i plazmi visoko koreliraju s tNNAL-om urina, ali ne postoje podaci koji ih povezuju s ostalim biomarkerima pasivnog pušenja (12).

Hlapljivi spoj kao što je nikotin apsorbira se brzo za površine i napušta zrak, dok neki drugi hlapljivi spojevi mogu biti prisutni u zraku. Otkrivanje tNNAL-a u urinu nepušača, kao što su djeca, signalizira opasnost jer je karcinogen pa to povećava svijest roditelja i pruža se veća podrška zakonodavstvu bez duhana i kontroliranju pušenja (12).

## 1.4 ODREĐIVANJE BIOMARKERA PUŠENJA

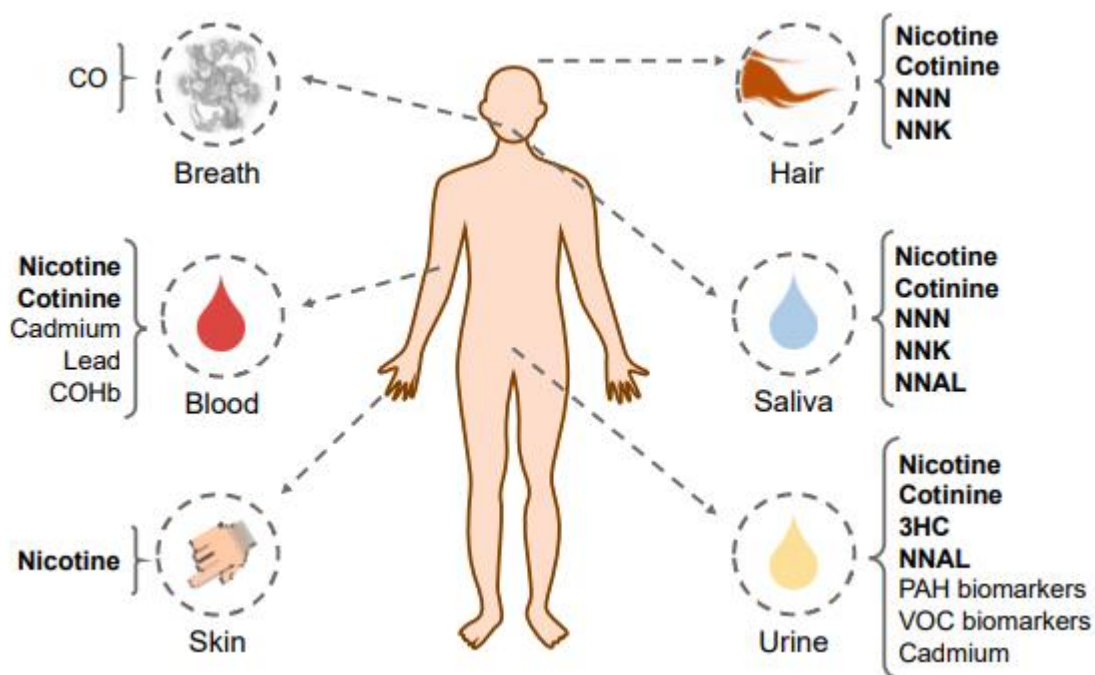
Biomarkeri za određivanje pasivnog pušenja trebali bi biti jedinstveni za pasivno pušenje, lako se određivati analitičkim metodama koje su ponovljive u svim laboratorijima, odražavati korelaciju između poznate toksične izloženosti ili visoku korelaciju s takvim izloženostima te bi se trebala mijenjati razina proporcionalno s odgovarajućom promjenom rizika od bolesti. Ovisno o duljini izloženosti pasivnom pušenju kod analize dužeg razdoblja biraju se uzorci iz kose i noktiju, a manje biološke tekućine. (12)

Kao isključivi marker izlaganja duhanskom dimu koristi se nikotin (19). Također, kotinin i tNNAL kada se pronade u urinu upućuje na izloženost duhanu, duhanskom dimu ili medicinskom nikotinu jer su izravni metaboliti nikotina (12). Biomonitoring kotinina u urinu, slini ili serumu zajedno s drugim biomarkerima duhana i izbor drugih alternativnih

uzoraka kao što su kosa, koža ili izdahnuti dah omogućuju bolju karakterizaciju vrste i opseg izloženosti duhanu, nego određivanje samog nikotina (19). Slobodni kotinin se preferira za mjerenje jer bolje korelira s koncentracijama kotinina u plazmi u usporedbi s ukupnim kotininom. tNNAL u urinu može imati značajniji javnozdravstveni utjecaj i bolju prediktivnu vrijednost za negativne zdravstvene učinke pasivnog pušenja u usporedbi s detekcijom nikotinskih metabolita (12).

### 1.4.1 Biološki uzorci

Nikotin se tijekom pušenja emitira u čestičnoj i plinovitoj fazi te se brzo apsorbira u krvotok. Biološki uzorci iz kojih se mjeri razina nikotinskih metabolita su urin, krv, slina, nokti, kosa i koža (Slika 6.) (19).



Slika 7. Biomarkeri pasivnog pušenja u određenim uzorcima (19)

Kotinin se koristi kao biomarker za mjerenje pasivnog pušenja u urinu, krvi i slini (12). Čak i nakon kratkotrajnog izlaganja pasivnom pušenju raste koncentracija kotinina u slini, stoga može služiti kao biomarker kratkotrajne izloženosti (19). Koncentracija kotinina visoko korelira u krvi i slini, a u mokraći je koncentracija prosječno četiri do šest puta veća, što čini urin osjetljivijim za određivanje metabolita pri niskim koncentracijama (12). Prosječno se tek 10-15% kotinina nalazi u urinu pušača jer se kotinin pretvori u druge metabolite. Koncentracija kotinina u slini obično je viša 15-40% nego u krvi jer su molekule kotinina male, topljive u vodi te se minimalno u krvi vežu za proteine (19). Poželjno je da se kotinin određuje iz sline, krvi i da se određuju biomarkeri za pasivno pušenje iz urina (12). Postoji varijabilnost među pojedincima kod tumačenja rezultata kotinina u slini ovisno o spolu, dobi, oralnom pH, rasi, dehidraciji, dijeti i lijekovima (19).

Obzirom da na nikotin u kosi manje utječe dnevna izloženost moguće je postaviti graničnu vrijednost za razlikovanje aktivnih pušača i onih izloženim pasivnom pušenju. Još bi se kao uzorci mogli koristiti koža, posebice na rukama i prstima. Nakupljanje nikotina u rukama nepušača u korelaciji je s nikotinom u zraku i kotininom u urinu, što nam omogućuje praćenje niske izloženosti pasivnom pušenju (19).

Jak karcinogen pluća NNAL ima slično djelovanje kao NNK te se detektira tNNAL u urinu pušača izloženih pasivnom pušenju, iako predstavlja samo 15% unesenog NNK (12).

## **2 CILJ RADA**

Prikazati mogućnost određivanja biomarkera pasivnog pušenja kod odraslih osoba analizom uzoraka urina.

### **3 MATERIJALI I METODE**

Za procjenu izloženosti kancerogenim tvarima iz duhanskog dima, može se mjeriti prisutnost DNK adukata u ciljanim stanicama pluća ili se može pratiti vezanje kancerogenih tvari na proteine kao što su albumin ili hemoglobin. Međutim, najčešći pristup je mjerenje kancerogenih spojeva i njihovih metabolita u urinu (20). Urin je praktičan za prikupljanje u velikim količinama, a suradnja ispitanika je obično zadovoljavajuća. Najpouzdaniji biomarkeri za procjenu izloženosti pasivnom pušenju su NNAL i NNAL-Glu, koji su derivati karcinogena specifičnog za duhanske proizvode, NNK. Posebno je važna analiza urina kod djece, gdje je utvrđena povezanost između koncentracija kotinina i NNAL/NNAL-Glu. Većina biomarkera mjeri se pomoću masene spektrometrije, uključujući plinsku i tekućinsku kromatografiju (20).

#### **3.1 UZIMANJE UZORAKA**

U jednom od provedenih istraživanja, koje prikazujemo kao primjer, koristio se biološki uzorak urina, čije prikupljanje spada u neinvazivne metode sakupljanja. Svakom ispituvaču analizirao se uzorak prije odlaska u noćni klub, oko 1 sat iza ponoći, i prvi jutarnji urin, prikupljen 5-6 sati nakon izloženosti (21). Konobarima se analizirao i treći: jedan prije smjene, oko 21 sat, drugi na kraju smjene, oko 9 sati ujutro, i prvi jutarnji urin, 7 sati nakon izloženosti. Uzorci volumena 20-50ml prikupljeni su u test tubu polipropilena/polistirola s navojnim čepom. Uzorci su bili pohranjeni na temperaturi do -20°C u zamrzivaču. Konzumacija alkohola bila je dozvoljena (21).

## 3.2 METODE ODREĐIVANJA

Kotinin u urinu može se precizno mjeriti korištenjem visoko osjetljive metode natjecateljskog enzimski povezanog imunosorbentnog testa (ELISA). Iako su metode poput plinske kromatografije, tekućinske kromatografije i radioimunoeseja također korištene, kromatografija se smatra zlatnim standardom zbog svoje pouzdanosti (Slika 7.) (20). Međutim, ova metoda je skupa i složena za obradu velikog broja uzoraka odjednom. S druge strane, metoda natjecateljskog enzimske imunoeseja je jeftinija i prikladnija za masovno testiranje s granicom mjerenja od 0,1 ng/ml (20). Kromatografija se koristi za mjerenje ukupne koncentracije kotinina, koja uključuje kotinin i njegove metabolite. Ta činjenica je bitna jer unakrsna reakcija s metabolitima može utjecati na rezultate mjerenja. Ova metoda uzima u obzir individualne razlike u enzimskoj aktivnosti, što je ključno za točno procjenjivanje izloženosti sekundarnom duhanskom dimu (20).

**Table 2** Analytical methods for measurement of biomarkers of secondhand smoke exposure (SHSe)

Method	Sensitivity	Specificity	Cost	Comments
<b>Cotinine</b>				
Radioimmunoassay (RIA) <sup>13 14</sup>	0.10–2.00 ng/ml	Variable (poorest in urine)	Low	Quick and relatively low cost analysis of large number of samples
ELISA <sup>14 15</sup>	0.10–0.20 ng/ml	Good	Low	Quick and relatively low cost analysis of large number of samples
Gas chromatography-nitrogen-phosphorous detection (GC-NPD) <sup>16</sup>	0.10–0.20 ng/ml	Good	Moderate	Lacks sensitivity for very low level of SHSe
Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) <sup>18</sup>	0.10–0.20 ng/ml	Excellent	High	
Liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry (LC-APCI MS/MS) <sup>21</sup>	<0.05 ng/ml	Excellent	Extremely high	Current state-of-the-art method for urine cotinine. It can perform 100 samples/day
High performance liquid chromatography (HPLC) <sup>22 23</sup>	0.13–1.00 ng/ml	Good	Moderate	
<b>Nicotine</b>				
GC-MS <sup>23</sup>	0.02–0.25 ng/ml	Excellent	Moderate-high	It has been used for nicotine determination in hair and toenails
HPLC <sup>19 23</sup>	0.10–0.32 ng/ml	Good	Low	It has been used for nicotine determination in hair and with electrochemical detection for toenails
<b>NNAL (4-[methylnitrosamino]-1-[3-pyridyl]-1-butanol)</b>				
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) <sup>20</sup>	0.25 pg/ml	Excellent	Extremely high	NNAL assay of choice.
Gas chromatography-thermal energy analysis (GC-TEA) <sup>17</sup>	0.15 pmol/ml	Excellent	Moderate	Difficult implementation

Modified from Benowitz 1996.<sup>4</sup>

Slika 7. Prikaz osjetljivosti i specifičnosti metoda za mjerenje biomarkera pasivnog pušenja (12)



Ekstrakcija je ključni postupak u laboratorijskim procesima, primjenjuje se za izolaciju ciljane tvari iz tekuće ili krute smjese, kao i za pročišćavanje. Proces se temelji na različitim topljivostima tvari koje se žele izdvojiti u dva otapala koja se međusobno ne miješaju (21). U toksikološkoj analizi postoje dvije osnovne vrste ekstrakcije: ekstrakcija na čvrstom nosaču (*Solid Phase Extraction, SPE*) i ekstrakcija tekuće-tekuće (*Liquid-Liquid Extraction LLE*). Ove metode koriste se za pripremu složenih bioloških uzoraka prije kvalitativne i kvantitativne analize kromatografskim tehnikama kao što su plinska kromatografija (*Gas Chromatography, GC*), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*), te kombinirane tehnike poput plinske kromatografije-spektrometrije masa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS*) i tekućinske kromatografije-spektrometrije masa (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS*) (21). Biološki uzorci su kompleksni zbog prisutnosti endogenih komponenti koje mogu ometati analit. Procesom ekstrakcije analit se izdvaja od popratnih primjesa te se povećava njegova koncentracija u odnosu na početnu otopinu (21).

Povezivanje separacijskih tehnika s masenom spektrometrijom predstavlja snažan dvodimenzionalni pristup analizi uzoraka, omogućujući simultano odvajanje visoke rezolucije i strukturno specifičnu, visoko osjetljivu detekciju (21). Ovakva metoda čini identifikaciju pouzdanijom, jer uz kromatografsko retencijsko vrijeme sadrži i podatke o specifičnim masama strukture. Plinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS*) standardna je tehnika za identifikaciju, kojom se potvrđuje prisutnost ciljanog spoja. Ova tehnika našla je primjenu u strukturnoj karakterizaciji biomolekula u područjima medicinske kemije, toksikologije, kemije okoliša i forenzičke analize lijekova (21).

### 3.3 KONSTRUIRANJE BAŽDARNE KRIVULJE

U istraživanju su pripremljene referentne standardne otopine za analizu pomoću GC-MS tehnike. Iz početne koncentracije (1mg/mL u metanolu) za svaki standard napravljeno je pet razrjeđenja. U prethodno analiziran urin određenog volumena, negativan na prisustvo nikotina i njegovih metabolita, dodane su pripremljene standardne otopine (21). Zatim su pripremljene baždarne krivulje za nikotin i njegove metabolite, pomoću kojih će se određivati nepoznate koncentracije uzoraka. Krivulja obuhvaća široki raspon koncentracija, s obzirom da su neki ispitanici pušači, dok drugi nisu. Mogle su se odrediti vrlo niske do vrlo visoke koncentracije (21).

## 4 REZULTATI

U posljednje vrijeme najpouzdanije metode kao što su GC-MS/MS i LC-MS/MS koriste se za detekciju s granicama od 0,05 ng/mL u urinu. Takva osjetljivost je neophodna u zemljama s niskom izloženosti pasivnom pušenju zbog regulacija čistog zraka i nižih koncentracija nikotina u zraku (12). Optimalna točka odvajanja trebala bi minimizirati pogrešno klasificiranje osoba koje su izložene pasivnom pušenju kao pušača ili nepušača. Ova točka ovisi o razini izloženosti pasivnom pušenju nepušača i ponašanju pušača u toj populaciji (12).

Prosječne koncentracije tNNAL-a u urinu nepušača izloženih pasivnom pušenju variraju između 18 i 90 fmol/mL urina, dok kod pušača ta vrijednost iznosi 1000 fmol/mL urina ili više (Tablica 1.). Postoje iznimke i moguće je djelomično preklapanje koncentracija tNNAL-a kod pušača i nepušača (12). Na temelju koncentracije od 50 fmol/mL urina kod nepušača izloženih pasivnom pušenju, procjenjuje se da je dnevna eliminacija tNNAL-a oko 75 pmol/dan. S obzirom da tNNAL predstavlja oko 15% ukupne doze NNK-a, izloženost NNK-u kod nepušača izloženih pasivnom pušenju procjenjuje se na oko 500 pmol/dan, ili otprilike 1,1 mg (0,01 mg/kg) tijekom 30 godina izloženosti pasivnom pušenju. Najmanja ukupna doza NNK-a koja je pokazala indukciju tumora pluća kod štakora iznosi 1,8 mg/kg, što je 200 puta više od doze kojoj je izložen nepušač izložen pasivnom pušenju (12). U jednom istraživanju, koncentracije tNNAL-a u urinu žena izloženih pasivnom pušenju iznosile su otprilike 5,6% u odnosu na koncentracije u urinu njihovih partnera pušača. Epidemiološka istraživanja procjenjuju da je višak rizika od raka pluća kod žena izloženih pasivnom pušenju oko 20% veći u odnosu na neizložene žene, ili oko 1% do 2% višeg rizika za rak pluća u usporedbi s pušačima u odnosu na ne-pušače, što je u skladu s relativnim koncentracijama tNNAL-a od 5,6% (12). Jedno istraživanje provedeno na 74 djece pokazalo je da porast tNNAL-a od 0,05 do 0,35 pmol/ml urina dovodi do povećanja ukupnog kotinina (zbroj kotinina i njegovog glukuronida) s 15 na 50 ng/ml urina. Ovi podaci jasno impliciraju prisutnost tNNAL-a kod nepušača pri ovim koncentracijama kotinina u urinu (12).

Tablica 1. Prikaz koncentracije tNALL-a u urinu

	<b>tNALL (fmol/mL)</b>
<b>Nepušači</b>	18 – 19
<b>Pušači</b>	≥ 1000

Kako prolazi vrijeme od izloženosti pasivnom pušenju, razine nikotina opadaju brzo, ali razine NNK rastu, pa su tako prema Torresu i suradnicima prosječne koncentracije NNAL-a u urinu aktivnih pušača 80,9 – 405,5 pg/mL, kod osoba koje su visoko izložene 5,9 – 20,1 pg/mL, a kod niske izloženosti 0,95 – 2,21 pg/mL (19). Benowitz i suradnici procjenjuju graničnu vrijednost NNAL-a u urinu za razlikovanje aktivnih pušača od nepušača koji su izloženi pasivnom pušenju, pri čemu je za kotinin od 30 mg/L procijenjena vrijednost NNAL-a 14,4 pg/mL (10,2 pg/mg kreatinina) s 94,6% osjetljivosti i 93,4% specifičnosti (Tablica 2.) (19).

Tablica 2. Prikaz koncentracije NNAL-a u urinu prema Torresu i suradnicima

	<b>NNAL (pg/mL)</b>
<b>Aktivni pušači</b>	80,9 – 405,5
<b>Visoka izloženost pasivnom pušenju</b>	5,9 – 20,1
<b>Niska izloženost pasivnom pušenju</b>	0,95 – 2,21
<b>Granična vrijednost</b>	14,4

Granična vrijednost kotinina u urinu iznosi 30 ng/mL. Koncentracije kotinina u urinu pušača variraju od 34,5 do 489 ng/mL, dok kod nepušača izloženih pasivnom pušenju iznose od 0,25 do 30 ng/mL, iako se kod akutne izloženosti pasivnom pušenju koncentracije mogu popeti na one kod pušača (Tablica 3.). Primjerice, osobe koje ne puše, a rade u barovima i restoranima u kojima se puši dosežu koncentracije kotinina u urinu od 35,9 do 61,2 ng/mL (19).

Tablica 3. Prikaz koncentracije kotinina u urinu

	<b>Kotinin (ng/mL)</b>
<b>Pušači</b>	34,5 – 489
<b>Nepušači</b>	0,25 – 30
<b>Granična vrijednost</b>	30

Najčešće korištena granica za razlikovanje serumske razine kotinina (14 ng/mL) temelji se na istraživanjima iz ranih 1980-ih u Engleskoj. Nedavna istraživanja korištenjem podataka iz Velike Britanije od 1996. do 2004. godine postavila su novu granicu od 12 ng/mL, sugerirajući da se izloženost pasivnom pušenju nije značajno smanjila tijekom 20 godina (12). Istraživanja korištenjem podataka iz nacionalnog istraživanja koje provodi Nacionalni centar za zdravstvenu statistiku, dio Centara za kontrolu i prevenciju bolesti u SAD-u (*eng. National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES*), za razdoblje od 1999. do 2004. godine sugeriraju optimalnu granicu od 3 ng/ml. Zbog razlika u ponašanju pušenja i potencijalno u metabolizmu kotinina, optimalna granica varira ovisno o rasi i etničkoj pripadnosti u SAD-u. Za ne-hispano bijele iznosi 5 ng/ml, za ne-hispano crne 6 ng/ml, dok je za meksičko-američku populaciju 1 ng/ml (12). Niža granica kod meksičko-američke populacije odražava manju izloženost pasivnom pušenju i veću prevalenciju laganog i povremenog pušenja. Istraživači trebaju također uzeti u obzir karakteristike ciljne populacije pri odabiru optimalne granice za razlikovanje pušača od nepušača. Na primjer, radnici u kasinima s visokom razinom izloženosti pasivnom pušenju mogli bi zahtijevati višu granicu od 3 ng/ml (12). Kod nepušača izloženih pasivnom pušenju uobičajeno se kreću vrijednosti od 0,015 do 14,6 ng/mL, dok su kod pušača više za jedan red veličine, odnosno od 0,15 do 146 ng/mL (19). Intenzivna izloženost pasivnom pušenju može uzrokovati povišene razine kotinina u krvi nepušača, koje mogu doseći do 25 ng/mL (Tablica 4.). Ovo može dovesti do preklapanja koncentracija kotinina između nepušača izloženih intenzivnom pasivnom pušenju i laganih ili povremenih pušača (12).

Tablica 4. Prikaz koncentracije kotinina u serumu

	<b>Kotinin (ng/mL)</b>
<b>Pušači</b>	0,15 – 146
<b>Visoka izloženost pasivnom pušenju</b>	do 25
<b>Izloženost pasivnom pušenju</b>	0,015 – 14,6
<b>Granična vrijednost</b>	14

Kotinin iz sline ima koncentraciju veću za 15-40% nego u krvi, a uobičajena granična vrijednost kotinina u slini iznosi 13 ng/mL za razlikovanje nepušača od aktivnih pušača, dok granica od 10 ng/mL služi za razlikovanje niske i visoke izloženosti pušenju. Koncentracija kotinina iz sline povećava se i nakon kratke izloženosti pasivnom pušenju, što ga čini prikladnim biomarkerom za određivanje kratkotrajne izloženosti (19). Otkriveno je da je NNN najzastupljeniji biomarker u uzorcima sline nepušača s prosječnom koncentracijom od 5,3 pg/mL, a omjer NNN/kotinin u slini potvrdio je relativno povećanje NNN-a kod izloženosti pasivnom pušenju (Tablica 5.). S obzirom da je NNN povezan s rakom jednjaka i usne šupljine, predloženo je praćenje NNN-a u slini za procjenu rizika od raka povezanog s izloženošću pasivnom pušenju (19).

Tablica 5. Prikaz koncentracije salivarnog kotinina i NNN-a

	<b>Kotinin (ng/mL)</b>
<b>Granična vrijednost za razlikovanje pušača od nepušača</b>	13
<b>Granična vrijednost za razlikovanje visoke od niske izloženosti</b>	10
	<b>NNN (pg/mL)</b>
<b>Nepušači</b>	5,3

Vrijednosti granica za razdvajanje kotinina u kosi kod žena, trudnica i djece (0,8, 0,2 i 0,2 ng/mg, redom) određene su korištenjem podataka iz SAD-a, Kanade i Francuske. Međutim, nedostatak reprezentativnih podataka za druge biomarkere u različitim matricama

otežava predviđanje optimalnih vrijednosti granica za te markere (12). Nikotin se u kosi može naći u 10 do 100 puta većim koncentracijama od kotinina, kod pušača 2,01-79,3 ng/mg, a kod osoba izloženih pasivnom pušenju 0,08-5,02 ng/mg. Budući da je manje podložan dnevnim varijacijama, granica od 5,68 ng/mg predložena je za razlikovanje aktivnih pušača od pasivnih. Za razliku od kose, u koži pušača koncentracije nikotina dosežu do 1160 ng/maramici, dok u nepušača izloženih pasivnom pušenju dosežu 48,9 ng/maramici, što omogućuje praćenje niske izloženosti pasivnom pušenju (Tablica 6.) (19).

Tablica 6. Prikaz koncentracije nikotina u kosi i koži

	<b>Nikotin</b>
<b>Kosa pušača</b>	2,01 – 79, 3 ng/mg
<b>Kosa nepušača izloženim pasivnom pušenju</b>	0,08 – 5,02 ng/mg
<b>Granična vrijednost nikotina u kosi</b>	5, 68 ng/mg
<b>Koža pušača</b>	1160 ng/maramica
<b>Koža nepušača izloženim pasivnom pušenju</b>	48,9 ng/ maramica

#### **4.1 ISPITANICI PRIJE I NAKON NOĆNOG KLUBA**

Provedeno istraživanje, iz našeg primjera, mjerilo je metabolite nikotina u urinu ispitanika prije i nakon noćnog kluba. Kod nepušača, vrijednosti izmjerenog nikotina variraju od 0,790 ng/mL do 42,253 ng/mL. U gotovo svih ispitanika, uzorci uzeti prije odlaska u noćni klub pokazuju razine kotinina koje potvrđuju pasivno pušenje i kontinuiranu izloženost duhanskom dimu (21).

Izmjerene koncentracije nikotina i njegovih metabolita u uzorcima nakon izlaganja duhanskom dimu u noćnom klubu bile su, kako se i očekivalo, veće kod svih ispitanika u usporedbi s vrijednostima iz prvog uzorka. Srednje vrijednosti nikotina, kotinina i 3-OHK

nakon izlaganja kod nepušačica bile su: 123,373 ng/mL, 56,544 ng/mL i 41,501 ng/mL, dok su kod nepušača iznosile: 21,366 ng/mL, 65,234 ng/mL i 14,941 ng/mL (21). Prosječni porast koncentracija nikotina, kotinina i 3-OHK kod nepušačica iznosio je 115,176 ng/mL, 28,172 ng/mL i 29,198 ng/mL, dok je kod nepušača bio 10,131 ng/mL, 37,763 ng/mL i 11,262 ng/mL. Uzimajući u obzir vrijeme izloženosti, porast koncentracija kod konobara, nepušača za nikotin, kotinin i 3-OHK bio je veći nego kod muških ispitanika koji su bili u klubu kao posjetitelji, te je iznosio 44,745 ng/mL, 61,266 ng/mL i 45,549 ng/mL (21).

Koncentracije nikotina i njegovih metabolita kod pušača, prije i nakon izloženosti, bile su znatno veće u usporedbi s pasivnim pušačima. Srednje vrijednosti nikotina i njegovih metabolita prije izlaganja iznosile su 74,299 ng/mL, 126,722 ng/mL i 175,948 ng/mL, što je u skladu s podacima iz upitnika o broju popušenih cigareta. Nakon izlaganja, srednje koncentracije porasle su na 285,141 ng/mL, 391,697 ng/mL i 1832,257 ng/mL (Tablica 7.) (21).

Tablica 7. Prikaz koncentracija nikotina, kotinina i 3-OHK nakon noćnog kluba

	<b>Nikotin (ng/mL)</b>	<b>Kotinin (ng/mL)</b>	<b>3-OHK (ng/mL)</b>
<b>Srednja vrijednost u nepušačica</b>	123,373	56,544	41,501
<b>Srednja vrijednost u nepušača</b>	21, 366	65, 234	14,941
<b>Prosječan porast koncentracije u nepušačica</b>	115,176	28,172	29,198
<b>Prosječan porast koncentracije u nepušača</b>	10,131	37,763	11,262
<b>Prosječan porast koncentracije u konobara</b>	44,745	61,266	45,549
<b>Srednja vrijednost u pušača</b>	285,141	391,697	1832,257



Nakon izlaganja duhanskom dimu u noćnom klubu, razina kotonina u urinu bila je značajno viša, s najvišom vrijednošću od 190.551 ng/mL, pri čemu je polovina ispitanika premašila graničnu vrijednost aktivnog pušenja od 50 ng/mL (21).

## 5 RASPRAVA

Prednosti određivanja izloženosti pasivnom pušenju putem urina uključuju veće koncentracije kotinina i drugih metabolita u odnosu na druge biološke tekućine; predstavlja relativno akutnu izloženost prikupljanje je neinvazivno (12). Nedostaci uključuju potrebu za privatnošću tijekom prikupljanja, teškoće pri prikupljanju u studijama na populacijskoj razini ili kod djece, varijabilnost faktora konverzije kotinina i potrebu za prilagodbom za klirens kreatinina. Iako je lakše i jeftinije mjeriti nikotin nego NNK metabolite, ističe se da bi mjerenje NNK metabolita u urinu moglo imati veći javnozdravstveni utjecaj i bolju prediktivnu korist za negativne zdravstvene učinke pasivnog pušenja (12). Otkrivanje NNK metabolita, kao što je tNNAL, u urinu nepušača koji su izloženi pasivnom pušenju može signalizirati opasnost i potaknuti daljnje napore u suzbijanju pušenja i promicanju zdravijih okoliša. Također se treba istaknuti važnost razumijevanja čimbenika koji mogu utjecati na koncentracije biomarkera, poput dobi, stanja bolesti i drugih izvora izloženosti nikotinu, kako bi se pravilno interpretirali rezultati mjerenja (12).

Uzimajući u obzir da pušači reguliraju unos nikotina kako bi održali određene razine nikotina u tijelu tijekom dana, osobe koje brže metaboliziraju nikotin očekivano će unijeti više dima cigareta dnevno u usporedbi s onima koji sporije metaboliziraju (4). Genetski loši metabolizatori (npr. osobe s varijantnim CYP2A6 genima koji su povezani sa značajno smanjenom enzimskom aktivnošću) u prosjeku puše manje cigareta dnevno i imaju tendenciju postići više razine ugljičnog monoksida nego normalni metabolizatori (4). Uz to, genetski spori metabolizatori čini se da su manje ovisni, na temelju promatranja da udio sporih metabolizatora u populaciji pušača opada s povećanjem starosti pušačkog kohorta, što sugerira da su spori metabolizatori skloniji prestanku pušenja. U populaciji azijskih i bijelih pušača, klirens nikotina procijenjen intravenskom infuzijom nikotina označenog deuterijem bio je pozitivno koreliran s brojem popušenih cigareta dnevno i unosom nikotina po cigareti, što podržava ideju da klirens utječe na pušačko ponašanje (4).

Prema pregledu literature autora Torresa i suradnika, koji obuhvaća studije od 2012. do ožujka 2018., granična vrijednost kotinina u urinu za razlikovanje pušača od pasivnih pušača smanjena je na 30 ng/mL u odnosu na prethodnu vrijednost SRNT-a iz 2002, koja je postavila

graničnu vrijednost od 50 ng/mL. U skladu s tom nižom graničnom vrijednošću, 70% ispitanika u provedenom istraživanju premašilo je graničnu vrijednost kotinina u urinu nakon izlaganja u noćnom klubu, uključujući i konobare (21). Prema pregledu literature, koncentracije kotinina u urinu kretale su se od 34,5 do 489 ng/mL za pušače i od 0,25 do 30 ng/mL za nepušače izložene duhanskom dimu, pri čemu akutno izlaganje može rezultirati povećanim koncentracijama kotinina u urinu na razinu sličnu onoj kod pušača. Prosječne vrijednosti kotinina prije izlaganja nepušača u istraživanju poklapaju se s rasponom vrijednosti iz pregleda literature, no koncentracije nakon izlaganja premašuju taj raspon, što odražava akutno izlaganje (21). Konobari i nepušači izloženi duhanskom dimu tijekom cijele noći predstavljaju primjer akutnog izlaganja. 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 podudara s rezultatima našeg primjera istraživanja (21).

Studija provedena u Italiji dokazala je varijabilnost u postotku nikotina koji se pretvara u kotinin (između 50% i 90%) zbog različite brzine metaboliziranja nikotina, a kretala se od 20 do 75 mL/min. Istraživanje sugerira korištenje 95. percentila koncentracije kotinina u urinu skupine nepušača, što iznosi 24 µg/g kreatinina za muškarce i 35 µg/g kreatinina za žene (22). Granična vrijednost od 30 ng/mL, dobivena u studiji Campo i suradnici provedena u Italiji, blizu je vrijednosti 95. percentila koncentracije kotinina u urinu nepušača koja je u studiji iznosila 28 µg/g kreatinina. Međutim, medijan razine kotinina u urinu kod pušača u studiji Campo i sur. bio je 883 ng/mL, što je niža vrijednost od medijana pronađenog u ovoj studiji (22).

## 6 ZAKLJUČAK

Urin se često koristi zbog praktičnosti, ali se za dublje uvide ponekad koriste i druge matrice poput krvi. Za kratkotrajnu izloženost, proučavaju se slina i izdahnuti zrak, dok se kosa koristi za dugotrajnu izloženost.

Kotinin, kao metabolit nikotina, tradicionalno je biomarker za mjerenje pasivnog pušenja u urinu, krvi i slini. Međutim, NNK metaboliti, poput tNNAL-a, također mogu biti korisni u pružanju dodatnih informacija o štetnim učincima pasivnog pušenja. Kod mjerenja kotinina važno je uzeti u obzir individualne varijacije u genskom polimorfizmu CYP2A6, enzima koji pretvara nikotin u kotinin. Varijacije u aktivnosti CYP2A6 mogu pomoći u objašnjenju rasnih razlika u riziku od raka pluća, ali nisu dovoljni da objasne sve promatrane razlike. Ovi nalazi naglašavaju važnost personaliziranih pristupa u razumijevanju i tretiranju pušačkih navika i povezanih zdravstvenih rizika .

U bliskoj budućnosti, bit će ključno provesti visoko osjetljivo i specifično određivanje urinarnih metabolita specifičnih za duhan kako bi se procijenila veza između izloženosti pasivnom pušenju i razvoja karcinoma organa.

## 7 LITERATURA

1. World Health Organization. Tobacco [Internet]. Geneva: World Health Organization; [objavljeno 2023.7.31.; ažurirano 2023.11.8.; pristupljeno 2024.5.5.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>
2. Sansone L, Milani F, Fabrizi R, Belli M. Nicotine: From Discovery to Biological Effects. *Int J Mol Sci.* 2023 Sep 26;24(19):14570. doi:10.3390/ijms241914570
3. PubChem. Nicotine. Bethesda (MD): Nacionalni centar za biotehnoške informacije (SAD); [Pristupljeno: 5. svibnja 2024.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicotine>
4. Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009;49:57-71. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742 Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18834313/>
5. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 133157, 3-[(2R)-1-methylpyrrolidin-2-yl]pyridine. PubChem. [cited 2024 Jun 12]. Available from: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-\\_2R\\_-1-methylpyrrolidin-2-yl\\_pyridine](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-_2R_-1-methylpyrrolidin-2-yl_pyridine)
6. Jackson JM, Weke A, Holliday R. Nicotine pouches: a review for the dental team. *Br Dent J.* 2023 Oct;235(8):643-646. doi: 10.1038/s41415-023-6383-7. Epub 2023 Oct 27. PMID: 37891304. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37891304/>
7. Zwar NA. Smoking cessation. *Aust J Gen Pract.* 2020 Aug;49(8):474-481. doi: 10.31128/AJGP-03-20-5287. PMID: 32738868. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32738868/>
8. U.S. Food and Drug Administration. How are non-combusted cigarettes, sometimes called heat-not-burn products, different from e-cigarettes and other electronic nicotine delivery systems? [Internet]. Silver Spring, MD: FDA; [cited 2024 Jun 12]. Available from: <https://www.fda.gov/tobacco-products/products-ingredients-components/how-are-non-combusted-cigarettes-sometimes-called-heat-not-burn-products-different-e-cigarettes-and>

9. Herman M, Tarran R. E-cigarettes, nicotine, the lung and the brain: multi-level cascading pathophysiology. *J Physiol.* 2020 Nov;598(22):5063-5071. doi: 10.1113/JP278388. Epub 2020 Jul 6. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32515030/>
10. The COCO Pouch. COCO Usage Steps Desktop v1.2 [Internet]. [cited 2024 Jun 12]. Available from: <https://thecocopouch.com/wp-content/uploads/2023/09/COCO-Usage-Steps-Desktop-v1.2.jpg>
11. Benowitz NL. Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease, and Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009;49:57-71. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742.
12. Avila-Tang E, Al-Delaimy WK, Ashley DL, Benowitz N, Bernert JT, Kim S, Samet JM, Hecht SH. Assessing secondhand smoke using biological markers. *Tob Control.* 2013 May;22(3):164-171. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2011-050298. Epub 2012 Sep 2.
13. Jacob P III, 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. San Francisco (CA): Division of Clinical Pharmacology and Experimental Therapeutics, The Departments of Medicine, Psychiatry, and Biopharmaceutical Sciences, San Francisco General Hospital Medical Center, University of California, San Francisco; 2011.
14. Benowitz NL, Lessov-Schlaggar CN, Swan GE, Jacob P 3rd. Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 May;79(5):480-488. doi: 10.1016/j.clpt.2006.01.008.
15. Khoramdad M, Vahedian-Azimi A, Karimi L, Rahimi-Bashar F, Amini H, Sahebkar A. Association between passive smoking and cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. *Int J Biomed Sci.* 2019 Dec 13;15(4):1-14. doi: 10.1002/iub.2207.
16. U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Rockville, MD: 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; 2014.

17. Tan CE, Glantz SA. Association between smoke-free legislation and hospitalizations for cardiac, cerebrovascular, and respiratory diseases: a meta-analysis. *Circulation*. 2012 Oct 30;126(18):2177-2183. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.121301.
18. Štěpánek L, Ševčíková J, Horáková D, Patel MS, Durd'áková R. Public health burden of secondhand smoking: case reports of lung cancer and a literature review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(20):13152. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph192013152>
19. 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 Nov 29;15(12):2693. doi: 10.3390/ijerph15122693.
20. Ino T, Ohtani T, Yoshimi I. Urinary Biomarkers for Secondhand Smoke. *J Clin Lab Anal*. 2011;25:354–358.
21. B. Vazdar, diplomski rad, Određivanje koncentracije nikotina i njegovih metabolita u uzorku urina pasivnih pušača, prvo izdanje, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, 2018./19.
22. Paci E, Pigni D, Bauleo L, Ancona C, Forastiere F, Tranfo G. Urinary Cotinine Concentration and Self-Reported Smoking Status in 1075 Subjects Living in Central Italy. *JAMA*. 2022;320(5):543-545.

## 8 ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODATCI:

Ime i prezime: Marija Vučićić

Datum i mjesto rođenja: 21.2.2003., Split, Republika Hrvatska

E-mail adresa: marija.vucicic@gmail.com

### OBRAZOVANJE:

2009. – 2017. Osnovna škola Kraljice Jelene, Solin

2018. – 2021. Zdravstvena škola Split, zdravstveno laboratorijski tehničar

2022. – 2024. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

### STRANI JEZICI:

Engleski jezik

Talijanski jezik