

# Određivanje hlapljivih aromatskih ugljikovodika, enzima matriks metaloproteinaze-9 i imunološkog statusa kao pokazatelja razvoja bolesti okoliša

---

**Bulog, Aleksandar**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2011**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:111144>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Aleksandar Bulog**

**ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH AROMATSKIH UGLJIKOVODIKA,  
ENZIMA MATRIKS METALOPROTEINAZE-9 I IMUNOLOŠKOG  
STATUSA KAO POKAZATELJA RAZVOJA BOLESTI OKOLIŠA**

**Doktorski rad**

**Rijeka, 2011.**

**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Aleksandar Bulog**

**ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH AROMATSKIH UGLJIKOVODIKA,  
ENZIMA MATRIKS METALOPROTEINAZE-9 I IMUNOLOŠKOG  
STATUSA KAO POKAZATELJA RAZVOJA BOLESTI OKOLIŠA**

**Doktorski rad**

**Rijeka, 2011.**

Mentori rada: Prof. dr. sc. Ines Mrakovčić-Šutić, dr. med.

Prof. dr. sc. Vladimir Mićović, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana 11. 05. 2011. godine u/na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Gordana Laškarin
2. prof.dr.sc. Jadranka Mustajbegović
3. doc.dr.sc. Dubravka Matanić
4. prof.dr.sc. Ines Mrakovčić-Šutić
5. prof.dr.sc. Vladimir Mićović

Rad ima 203 listova, 14 tablica i 47 slika.

UDK: \_\_\_\_\_

## **Zahvala**

*Od srca se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ines Mrakovčić-Šutić, dr. med. i mentoru prof. dr. sc. Vladimiru Mićoviću, dr. med., što su mi pružili priliku „otvaranja“ vrata u znanstveni svijet i uvid u nepregledna i nepoznata polja znanstvenog rada. Veliko hvala mojim roditeljima, sestri, kolegama, te neizmjereno hvala mojoj supruzi Danijeli, kćeri Katarini i sinu Karlu, na strpljivosti i uvažavanju svih mojih neprospavanih noći i teških trenutaka koje znanstveni rad za sobom nosi.*

Ovaj doktorski rad realiziran je u sklopu projekata financiranih od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa „Odgovor ljudi i morskih organizama na ekološko zagađenje u Kvarnerskom zaljevu“ br. 062-0621341-0308, glavnog istraživača prof. dr. sc. Vladimira Mićovića, dr. med. i projekta „Regulacijske T i NKT stanice u kontroli tumorskog rasta, opeklina i autoimunosti“ br. 062-0620096-0094 glavnog istraživača prof.dr.sc. Ines Mrakovčić-Šutić, dr.med.

## Sažetak

# ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH AROMATSKIH UGLJIKOVODIKA, ENZIMA MATRIKS METALOPROTEINAZE-9 I IMUNOLOŠKOG STATUSA KAO POKAZATELJA RAZVOJA BOLESTI OKOLIŠA

*Cilj istraživanja:* Čimbenici koji dovode do patogeneze i razvoja bolesti okoliša još uvijek nisu u dovoljnoj mjeri poznati. Svjetska zdravstvena organizacija pod pojmom bolesti okoliša opisuje bolesti primarno uzrokovane onečišćenjem zraka i vode, kemijskim i fizikalnim čimbenicima, radijacijom, kontaminiranom hranom i direktnim kontaktom s toksinima kojima smo izloženi u prirodnoj i/ili radnoj sredini, te je njihova učestalost u razvijenim zemljama zapada u posljednjih nekoliko desetljeća u velikom porastu. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnost određivanja pokazatelja razvoja bolesti okoliša: hlapljivih aromatskih ugljikovodika, enzima matriks metaloproteinaze-9 i imunološkog statusa.

*Ispitanici i metode:* Ispitivanja smo vršili u profesionalno izloženih djelatnika hlapljivim aromatskim ugljikovodicima (brodogradilišta Viktor Lenac u Rijeci i Kraljevica u Kraljevici) u odnosu na stanovnike urbanog (Rijeka) i ruralnog područja (Mali Lošinj). Procjenu imunološkog statusa vršili smo protočnom citometrijom i određivali fenotipsku pripadnost mononuklearnih stanica periferne krvi, te unutarstaničnim bojanjem citolitički potencijal ovih stanica. Metodu enzimskog imunoeseja (ELISA) koristili smo se za određivanje izražaja enzima matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9), a plinsku kromatografiju za određivanje BTEX-a (benzen, toluen, m/p ksilen i o-ksilen). Statistički

podaci su izračunati uz pomoć kompjuterskog programa Statistica 7.1. Grafički i tabelarni prikaz učinjen je koristeći Excel program.

*Rezultati:* profesionalno izložena skupina ima statistički značajno povišene vrijednosti MMP-9 i BTEX-a u urinu, kao i ukupni perforin, te postotak stanica urođene imunosti (NKT i T regulacijskih stanica), dok su vrijednosti NK stanica i CD56+P+ stanica statistički značajno snižene.

*Zaključak:* Naši rezultati su pokazali veliki porast enzima MMP-9 i BTEX-a u urinu djelatnika profesionalno izloženih hlapljivim aromatskim ugljikovodicima, udružen s porastom stanica urođene imunosti (NKT i T regulacijskih stanica) u perifernoj krvi, čije praćenje bi moglo pridonijeti ranijem otkrivanju bolesti okoliša s posljedičnim ranijim i učinkovitijim liječenjem.

**KLJUČNE RIJEČI:** Bolesti okoliša; hlapljivi aromatski ugljikovodici; imunološki status; matriks metaloproteinaza-9; regulacijske stanice T.

## Summary

### **Determination of volatile aromatic hydrocarbons, enzyme matrix metalloproteinases-9 and immune status as indicators of environmental diseases**

*Aim:* Factors that lead pathogenesis and to development of environmental diseases are still not sufficiently known. World Health Organization under the term environmental illness describes the disease primarily caused by pollution of air and water, chemical and physical agents, radiation, contaminated food and direct contact with the toxins we are exposed to natural and / or working environment, and their prevalence in developed West countries in past few decades are increased. The aim of this study was to investigate the possibility of determining indicators of disease development environment: volatile aromatic hydrocarbons, the enzyme matrix metalloproteinase-9 and immune status.

*Patients and methods:* We performed in workers occupationally exposed to volatile aromatic hydrocarbons (shipyard Viktor Lenac in Rijeka and Kraljevica in Kraljevica) compared to urban residents (Rijeka) and rural areas (Mali Lošinj). Assessment of immune status were done by flow cytometry and determined the phenotypic association with peripheral blood mononuclear cells, intracellular staining and cytolytic potential of these cells. The method of enzyme immunoassay (ELISA) were used to determine enzyme expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and gas chromatography for determination of BTEX (benzene, toluene, m / p xylene and o-xylene). Statistical data were calculated using computer program Statistica 7.1.



Graphical and tabular presentation was made by using the Excel program.

*Results:* The occupationally exposed group had a statistically significantly elevated levels of MMP-9 and BTEX in the urine, and total perforin, and the percentage of cells of innate immunity (NKT and T regulatory cells), while the value of NK cells and CD56 +P+ cells significantly reduced.

*Conclusion:* Our results showed a large increase in the enzyme MMP-9 and BTEX in the urine of workers occupationally exposed to volatile aromatic hydrocarbons, accompanied by growth of cells of innate immunity (NKT and T regulatory cells) in peripheral blood, which could contribute to the monitoring, early detection of environmental diseases and consequent earlier and more effective treatment.

**Key words:** Environmental diseases; immunological status; matrix metalloproteinase-9; regulatory T cells; volatile aromatic hydrocarbons.

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>1.1. Pregled područja istraživanja</b> .....	2
1.1.1. Utjecaj industrijalizacije i urbanizacije na povećano okolišno zagađenje .....	9
1.1.2. Toksično djelovanje hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena i ksilena (BTEX-a) na ljudsko zdravlje .....	11
1.1.3. Povećana prisutnost BTEX-a u okolišu kao razlog promjene imunološkog odgovora u ljudi .....	14
<b>1.2. T regulacijske stanice</b> .....	17
1.2.1. Poremećaji T regulacijskih stanica kao posljedica zagađenja okoliša hlapljivim aromatskim ugljikovodicima .....	22
<b>1.3. Citolitička molekula perforin</b> .....	24
1.3.1. Imunološke promjene na razini perforin pozitivnih stanica kao rezultat izloženosti ljudi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima u okolišu .....	31
<b>1.4. Matriks metaloproteinaza – 9</b> .....	33
1.4.1. Promjene u izražaju enzima matriks metaloproteinaze-9 kao enzimskog odgovora na okolišno zagađenje hlapljivim aromatskim ugljikovodicima .....	42
<b>1.5. Razvoj bolesti okoliša kao posljedice zagađenja okoliša hlapljivim aromatskim ugljikovodicima</b> .....	46
<b>2. Cilj istraživanja</b> .....	49
<b>3. Ispitanici i metode</b> .....	52
<b>3.1. Ispitanici</b> .....	53
3.1.1. Prikupljanje uzoraka urina i periferne venske krvi ispitanika .....	61
3.1.2. Odabrani kriteriji za ispitivana područja uzorkovanja .....	62

3.1.3. Ispitanici sa urbanog područja istraživanja-Grad Rijeka .....	63
3.1.4. Ispitanici sa ruralnog područja istraživanja-Grad Mali Lošinj .....	74
3.1.5. Profesionalno izloženi ispitanici Brodogradilišta „Viktor Lenac“ .....	76
3.1.6. Profesionalno izloženi ispitanici Brodogradilišta „Kraljevica“ .....	80
<b>3. 2. Metode .....</b>	<b>82</b>
3.2.1. Metode za određivanje promjena imunološke reakcije .....	82
3.2.1.1. Analiza fenotipske pripadnosti mononuklearnih limfatičnih stanica metodom imunofluorescencije uz očitavanje protočnom citometrijom .....	82
3.2.1.2. Priprema regulacijskih stanica T (T <sub>regs</sub> ) za analizu metodom imunofluorescencije uz očitavanje protočnom citometrijom .....	84
3.2.1.3. Analiza regulacijskih stanica T (T <sub>regs</sub> ) metodom imunofluorescencije uz očitavanje protočnom citometrijom .....	85
3.2.1.4. Određivanje unutarstaničnog sadržaja perforina .....	86
3.2.2. Metoda za određivanje enzimskog odgovora .....	88
3.2.2.1. Metoda enzimskog imunoeseja (ELISA) za određivanje stupnja izražaja enzima matriks metaloproteinaze-9 .....	88
3.2.2.2. Protokol enzimskog imunoeseja (ELISA) za određivanje koncentracija enzima matriks metaloproteinaze-9 u ljudskom urinu .....	92
3.2.2.3. Nekompenzirana Jaffe kinetička metoda .....	96
3.2.3. Metoda za određivanje BTEX-a u urinu ispitanika .....	98
3.2.3.1. Određivanje benzena, toluena, etilbenzena, o- ksilena i m/p ksilena u urinu plinskom kromatografijom .....	98
3.2.3.2. Kalibracijski postupak za metodu određivanja BTEX-a .....	100
3.2.4. Metoda spirometrijskog mjerenja plućnih funkcija.....	101

3.2.4.1. Diferencijalno dijagnostička metoda za utvrđivanje kronično opstruktivne plućne bolesti .....	105
3.2.5. Statističke metode .....	107
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>109</b>
4.1. Promjene u koncentracijama BTEX-a u urinu .....	110
4.2. Promjene koncentracije enzima MMP-9 u urinu .....	113
4.3. Promjene spirometrijskih vrijednosti .....	113
4.4. Promjene imunološkog statusa .....	115
4.4.1. Promjene stanične imunosti .....	115
4.4.2. Promjene humoralne imunosti .....	117
4.4.3. Izražaj citolitičke molekule perforina u perifernoj krvi ispitanika .....	117
4.4.3.1. Ukupni perforin .....	118
4.4.3.2. Izražaj perforinske molekule unutar T limfocitne subpopulacije .....	119
4.4.3.3. Izražaj perforinske citolitičke molekule unutar subpopulacije NK stanica .....	121
4.4.4. Karakteristike NK i NKT stanica .....	122
4.4.5. Promjene u postotku T regulacijskih stanica (Tregs) .....	124
4.4.6. Korelacije između koncentracije vrijednosti enzima MMP-9 i postotka T regulacijskih stanica .....	126
<b>5. Rasprava .....</b>	<b>129</b>
<b>6. Zaključni pregled .....</b>	<b>141</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>144</b>
<b>8. Popis radova .....</b>	<b>178</b>
<b>9. Životopis .....</b>	<b>185</b>

## Sadržaj tablica

Tablica 1	Naziv automatiziranih postaja, vrste okolišnih zagađivala i učestalost mjerenja u okolišnom zraku od strane Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije .....	66
Tablica 2	Zbirni rezultati praćenja koncentracija benzena ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zraka) na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog praćenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka .....	67
Tablica 3	Koncentracije benzena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog praćenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zraka) u vremenu usrednjavanja 24 sata .....	68
Tablica 4	Koncentracije benzena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog praćenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zraka) u vremenu usrednjavanja 1 sat .....	69
Tablica 5	Zbirni rezultati praćenja koncentracija benzena ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zraka) na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog praćenja INA rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) .....	69
Tablica 6	Koncentracije toluena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog praćenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zraka) u vremenu usrednjavanja 24 sata .....	70
Tablica 7	Koncentracije toluena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog praćenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zraka) u vremenu usrednjavanja 1 sat .....	71
Tablica 8	Zbirni rezultati praćenja koncentracija ksilena ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zraka) na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog praćenja INA rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) .....	71
Tablica 9	Koncentracije ksilena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog praćenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zraka) u vremenu usrednjavanja 24 sata .....	72
Tablica 10	Koncentracije ksilena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog praćenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ zraka) u vremenu usrednjavanja 1 sat .....	72
Tablica 11	Postotak hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena i ksilena u bojama koje se koriste prilikom premazivanja brodskih konstrukcija .....	77

Tablica 12	Postotak hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena i ksilena u otapalima i razrjeđivačima koji se koriste prilikom pripreme površina za premazivanje i razrjeđenja boja .....	78
Tablica 13	Radna tablica za provođenje ELISA metode .....	95
Tablica 14	Promjene plućnih volumena u slučajevima opstruktivnih, restriktivnih i miješanih (opstruktivno/restriktivnih) plućnih bolesti .....	103

## Sadržaj slika

Slika 1 Metabolički prijetvor benzena .....	13
Slika 2 T regulacijska stanica i koreceptorske molekule na njezinoj površini .....	18
Slika 3 Uloga regulacijskih CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> stanica prilikom izloženosti ljudi okolišnim antigenima u odsustvu upalnoga odgovora. Model utjecaja regulacijskih CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> stanica na aktivnost regulacijskih CD4 <sup>+</sup> CD25 antigen predočnih stanica (Slika 3-desno) .....	20
Slika 4 Perforinski prstenasti otvori kroz membranu ciljane stanice .....	25
Slika 5A Model stanične smrti uzrokovan stvaranjem karakterističnog prstenastog perforinskog otvora porijeklom iz citotoksičnih limfocita T i stanica prirodnih ubojica NK .....	27
Slika 5B Model aktiviranja programirane stanične smrti uzrokovane djelovanjem molekule perforina i granzima B porijeklom iz citotoksičnih limfocita T i stanica prirodnih ubojica NK na razini kaskadnih reakcija kaspaza .....	27
Slika 5C Model pokretanja programirane stanične smrti djelovanjem molekule perforina i granzima B porijeklom iz citotoksičnih limfocita T i stanica prirodnih ubojica NK na proteinskoj razini. Model proteinske stanične reakcije u procesu pokretanja programirane stanične smrti na razini mitohondrija (Slika 5C-desno) .....	29
Slika 5D Model pokretanja programirane stanične smrti djelovanjem molekularnog kompleksa serglicin-perforin-granzim B posredovanog manoza 6-fosfat receptorom .....	30
Slika 6 Struktura domene matriks metaloproteinaza .....	35
Slika 7 Model aktivacije enzima matriks metaloproteinaze-9 .....	38
Slika 8 Struktura molekule tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza TIMP-1 i TIMP-2 .....	40
Slika 9 Blokiranje enzima MMP preko TIMP-2 inhibitora .....	40
Slika 10 Remodeliranje tkiva i odgovor na razini upalnih stanica u MMP/TIMP neravnoteži uzrokovanoj djelovanjem okolišnih zagađivala .....	43
Slika 11 Anketa o zdravstvenom stanju, životnim i prehrambenim navikama ispitanika .....	58

Slika 12 Upitnik za određivanje BTEX u urinu ispitanika .....	59
Slika 13 Kontrolno područje-Otok Mali Lošinj .....	75
Slika 14 Brodogradilište „Viktor Lenac“ .....	76
Slika 15 Brodogradilište „Kraljevica“ .....	80
Slika 16 Slikovni prikaz svih faza ELISA metode za određivanje enzima MMP-9 u ljudskom urinu .....	90
Slika 17 Krivulja standarda za ljudski enzim matriks metaloptoteinazu-9 određen ELISA metodom i očitana Magellan informatičkom podrškom .....	91
Slika 18 Serija razrjeđenja standarda do 0 pg/ml .....	92
Slika 19 Vrijednosti koncentracija kreatinina u uzorcima urina ispitanika izražene u $\mu\text{mol/L}$ .....	97
Slika 20 Krivulja protok-volumen s prikazom ekspiracijskih i inspiracijskih dijelova .....	103
Slika 21 Digitalni mobilni spirometar; Winspiro-PRO 1.3; Roma; Italy .....	104
Slika 22 Prosječne koncentracije BTEX-a u urinu u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac .....	110
Slika 23 Prosječne koncentracije BTEX-a u urinu u djelatnika brodogradilišta Kraljevica .....	111
Slika 24 Prosječne koncentracije BTEX-a u urinu u stanovnika grada Rijeke .....	111
Slika 25 Prosječne koncentracije BTEX-a u urinu u stanovnika Malog Lošinja .....	112
Slika 26 Zbirni prikaz prosječnih vrijednosti koncentracija BTEX-a u urinu stanovnika svih ispitnih skupina .....	112
Slika 27 Prosječne koncentracije enzima MMP-9 u urinu .....	113
Slika 28 Spirometrijske promjene djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	114
Slika 29 Prosječne promjene FEV1/L u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	114
Slika 30 Promjene koncentracije CD3+ stanica djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	115
Slika 31 Promjene koncentracije CD4+ stanica djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	116



Slika 32 Promjene koncentracije CD8+ stanica djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	116
Slika 33 Promjene koncentracije CD19+ stanica djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	117
Slika 34 Promjene koncentracije ukupnog perforina djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	118
Slika 35 Promjene koncentracije dvostruko pozitivnih (3+P+) stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	119
Slika 36 Promjene koncentracije dvostruko pozitivnih (4+P+) stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	120
Slika 37 Promjene koncentracije dvostruko pozitivnih (8+P+) stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	120
Slika 38 Promjene koncentracije dvostruko pozitivnih (16+P+) stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	121
Slika 39 Promjene koncentracije dvostruko pozitivnih (56+P+) stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	122
Slika 40 Promjene koncentracije NK stanica (CD3-CD56+) u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	123
Slika 41 Promjene koncentracije NKT stanica (CD3+CD56+) u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	124
Slika 42 Promjene koncentracije regulacijskih T stanica (Tregs:CD4+CD25+FoxP3+) u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja .....	125
Slika 43 Povećana koncentracija regulacijskih T stanica (Tregs:CD4+CD25+FoxP3+) u stanovnika industrijskih područja u odnosu na kontrolu i na ruralno središte .....	125
Slika 44 Korelacija između regulacijskih T stanica (CD4+CD25+FoxP3+) i MMP-9 u djelatnika brodogradilišta Kraljevica .....	126

Slika 45 Korelacija između regulacijskih T stanica (Tregs:CD4+CD25+FoxP3+) i MMP-9 u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac .....	127
Slika 46 Korelacija između regulacijskih T stanica (Tregs:CD4+CD25+FoxP3+) i MMP-9 u stanovnika Rijeke .....	127
Slika 47 Korelacija između regulacijskih T stanica (Tregs:CD4+CD25+FoxP3+) i MMP-9 u stanovnika Malog Lošinja .....	128

## 1. Uvod

## 1.1. Pregled područja istraživanja

Čimbenici koji dovode do patogeneze i razvoja bolesti okoliša (engl. environmental diseases) još uvijek nisu u dovoljnoj mjeri poznati. Bolesti okoliša su po definiciji svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization-WHO) bolesti primarno uzrokovane onečišćenjem zraka i vode, kemijskim i fizikalnim agensima, radijacijom, kontaminiranom hranom i izravnim dodirrom s toksinima kojima smo izloženi u prirodnoj i/ili radnoj sredini, posljedično dovodeći do njihove povećane učestalost u razvijenim zemljama zapada u posljednjih nekoliko desetljeća. Mnoge od njih danas (astma, alergijski rinitis, kronična opstruktivna plućna bolest) predstavljaju veliki javno-zdravstveni problem, te je potrebno što ranije prepoznati okolišne toksine i utvrditi mehanizme njihova djelovanja kako bi se postigli što bolji preventivni i terapijski učinci. Izraz «bolesti okoliša» tek se u novije vrijeme počeo pojavljivati, kako u svjetskoj, tako i u našoj znanstvenoj literaturi, iako su neka od tih oboljenja već odavna poznata. U posljednjem desetljeću, sve se više javno govori o problematici "suživota" zagađenja okoliša i zdravog (kvalitetnog) življenja. Neosporna je činjenica da je industrijski napredak neophodan, ali se danas, u svjetlu novih saznanja o njegovoj štetnosti, sve više pokušava suzbiti negativne strane napretka u odnosu na ljudsko zdravlje. Pojam okolišnih bolesti stekao je zavidan status u modernim znanstvenim istraživanjima, jer je dokazano da su povišene koncentracije toksičnih i karcinogenih zagađivala u okolišu neposredan uzrok povišene pojavnosti različitih karcinoma i teških oblika bolesti okoliša (KOPB, astma), kako kod pojedinca tako i populacije koja živi i radi u takvom okruženju. Stanovanje na urbanim područjima povezano je sa čitavim nizom ozbiljnih rizika za ljudsko zdravlje, ukoliko se uspoređuje sa stanovanjem u ruralnim područjima koja nisu pod utjecajem okolišnog zagađenja, čiji je glavni izvor industrijski i prometni civilizacijski

napredak. Različite toksične tvari koje se svakodnevno ispuštaju u okoliš dovode do porasta učestalosti oboljenja u ljudi i poremećaja u biološkoj ravnoteži živih bića. Mnoge od tih tvari imaju vrlo jaka toksična djelovanja, a kako se slabo razlažu u vodi i dugo ostaju u samom okolišu, ljudski organizam je dugotrajno izložen njihovom djelovanju. Toksične tvari mogu djelovati na žive organizme neposredno ukoliko oštećuju površinske dijelove epitela i ulaze u unutrašnje organe, te posredno ukoliko djeluju na ekološke uvjete (npr. promjenom bilo kojeg okolišnog čimbenika). Biološka akumulacija neke toksične tvari u ljudskome organizmu ovisi o čitavom nizu svojstava samog zagađivala (kemijska struktura, postojanost, međusobno djelovanje različitih tvari) i karakteristikama samog organizma (fiziološkim, biokemijskim, genetskim, zdravstvenim, stanju uhranjenosti). Na biološko nagomilavanje (akumulacija) neke toksične tvari osim navedenih svojstava organizma i zagađivala, djeluju i uvjeti okoliša kao što su temperatura, vlažnost, ultraljubičasto zračenje i drugi. Hlapljivi aromatski ugljikovodici kao što su benzen, toluen, etilbenzen, m/p-ksilen i o-ksilen (BTEX), izlučuju se iz organizma manjim dijelom u nepromijenjenom obliku putem izdahnutog zraka, a najvećim dijelom u obliku metabolita preko bubrega urinom gdje je manje od 1% u nepromijenjenom obliku (1). Putem izdahnutog zraka manja količina navedenih spojeva izlazi iz organizma, a najbolji pokazatelj odstranjenja je biološki polu-život koji se razlikuje ovisno o vrsti tkiva: manje od 5 minuta za krv; nekoliko minuta do nekoliko sati za mišiće i nekoliko sati do nekoliko dana za masno tkivo (2).

Hlapljivi aromatski ugljikovodici (BTEX) su spojevi koji se ispuštaju u okoliš putem ispušnih plinova automobila, rada brojnih industrijskih postrojenja i spaljivanjem komunalnog otpada. Najopasniji po ljudsko zdravlje je benzen, kojeg je još davne 1982. godine agencija IARC (engl. International Agency for Research on Cancer) svrstala u

kategoriju ljudskih karcinogena. Mnoga su istraživanja dokazala vrlo jako toksično i genotoksično djelovanje benzena u odnosu na ljudsko zdravlje. U istraživanjima koja se bave proučavanjem toksičnog djelovanja BTEX-a na ljudsko zdravlje, isti se određuju u krvi i urinu. Koncentracija BTEX-a u ljudskom organizmu upravo je proporcionalna s blizinom stanovanja ljudi u odnosu na glavne gradske prometnice i industrijska postrojenja (3). U istraživanjima urbanih područja koja su opterećena gradskim prometom, radom naftnih rafinerija, koncentracije BTEX-a prisutnih u zraku su statistički značajno više od koncentracija na ruralnim područjima (4). Većina se istraživanja provodi tijekom zimskih mjeseci, jer je čitav niz okolišnih čimbenika (slabija fotokemijska razgradnja, velika vlažnost, niske temperature) usko povezana s povećanom koncentracijom i dužom postojanošću BTEX-a u samom okolišu, a posljedično tome i njihovom većom biološkom akumulacijom u ljudskom organizmu (5-7). Upravo je izloženost navedenim spojevima povezana s povećanim rizikom za ljudsko zdravlje (8). Oni su prije svega najčešće detektirani spojevi koji se nalaze u urbanome zraku, a povezani su s čitavim nizom razvoja bolesti okoliša (9, 10).

Izloženost benzenu je često povezana s povećanom učestalošću razvoja leukemija i solidnih tumora (11), te su mnoga znanstvena istraživanja ukazala na vezu između razvoja navedenih bolesti okoliša i urbanog stanovanja (12-14). S druge strane, izloženost ljudi toluenu i ksilenu dovodi do toksičnih učinaka na živčani sustav, jetru i bubrege kao ciljne organe navedenih zagađivala koji se u većim koncentracijama nalaze u zraku urbanih područja (15,16). Okolišna izloženost ljudi etilbenzenu, koji žive i rade na prometom i industrijom opterećenom području, izaziva ozbiljne zdravstvene probleme na respiratornom sustavu i na bubrezima (17).

Istraživanja koja su se provodila na ljudima, pokazala su usku povezanost između okolišne izloženosti različitim zagađivalima i određenih bolesti ili zdravstvenih problema. Za razumijevanje etiologije povezanosti bolesti okoliša i ljudskoga zdravlja, istraživanja su morala dokazati povezanost samog ispuštanja zagađivala u okoliš s razvojem mnogih bolesti ili oštećenja zdravlja pojedinca ili čitave zajednice. Etiologija uključuje povezivanje znanja o načinu ispuštanja zagađivala u okoliš (zrak, voda, hrana, prašina), s podacima o izloženosti ljudi onečišćenom mediju (inhalacija, kontakt, gutanje) i dokazima o razvoju bolesti okoliša (18).

Prilikom procjene zdravstvenog rizika djelovanja toksičnih spojeva iz okoliša na ljudski organizam, u vidu sprječavanja razvoja bolesti okoliša, osim poznavanja čitavog niza načina kojima ti spojevi ulaze u ekosustav kao na primjer: nenamjernim ispuštanjem, odlaganjem otpada, radom industrijskih postrojenja, prometom; od velike je važnosti poznavanje i toksikokinetike tj. apsorpcije, biološke pretvorbe, raspodjele i izlučivanja tih spojeva i njihovih metabolita iz tijela. BTEX mogu ući u organizam preko kože i probavnog sustava, ali je inhalacija najčešći put unosa (19). Prilikom inhalacije BTEX-a putem zagađenoga urbanog zraka, u ljudi dolazi do razvoja kronično opstruktivne plućne bolesti, koja je kao bolest okoliša više zastupljena u toj populaciji ispitanika u odnosu na populaciju s ruralnih područja (20-22). Sama obilježja kronično opstruktivne plućne bolesti su bolesno stanje obilježeno ograničenim protokom zraka u dišnom sustavu kojega nije moguće posve izliječiti i progresivnog je karaktera, pa se koristi metoda spirometrije kao neinvazivne i relativno jednostavne znanstveno utemeljene metode ranog otkrivanja patoloških promjena u dišnome sustavu uzrokovanih okolišnim zagađivalima (23-27).

Razvojem novih analitičkih tehnika, preporučuje se određivanje hlapljivih aromatskih ugljikovodika u urinu, zbog jednostavnosti uzorkovanja i velike preciznosti samoga mjerenja. Njihova koncentracija odražava cjelokupnu izloženost populacije navedenim spojevima. Mnogi od okolišnih čimbenika koji dovode do razvoja bolesti okoliša još su u velikom dijelu nepoznati, ili se ne zna njihova točna uloga. Pojavnost bolesti okoliša u razvijenim zemljama je u velikom porastu, te predstavljaju veliki rizik za pojedinca i zajednicu u cjelini. To su upravo razlozi zbog čega bolesti okoliša treba što ranije prepoznati, a čimbenike koji potpomažu njihov razvoj treba pokušati otkloniti ili smanjiti njihov toksični učinak (28, 29).

Danas se u modernim znanstvenim istraživanjima sve više proučava uloga mnogih enzima koji imaju zaštitnu i regenerativnu ulogu prilikom razvoja bolesti okoliša, kao izravne posljedice sve većeg zagađenja. Metaboliti BTEX spojeva, u prvome redu benzena (o-benzokinon, p-benzokinon) imaju dokazana karcinogena djelovanja na ciljnim organima kao što su jetra, koža, bubrezi i naročito pluća. Pojačani izražaj enzima matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) u ljudskom organizmu, u najnovijim se istraživanjima povezuju sa zaštitnim i regenerativnim djelovanjem na razini plućnih epitelnih stanicama, prilikom teških oštećenja plućnog epitela uzrokovanog kronično opstruktivnom plućnom bolešću (30). Statistički značajan izražaj matriks metaloproteinaze-9 dokazan je u slučajevima različitih karcinoma pluća, upalnih stanja, gdje je kao proteinaza uključena u mnoge procese proliferacije, diferencijacije i migracije mastocita, a reguliran je od strane pojačano izlučenih citokina kao što su čimbenik tumorske nekroze TNF (engl. tumor necrosis factor-TNF) i interferon (IFN) (31). Izražaj matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) prepoznat je i prilikom direktnog kontakta limfocita



T s monocitima (32) i mastocitima (33), te kod migracije neutrofila i eozinofila prilikom teških oštećenja plućnog tkiva (34, 35).

Za dokazivanje izražaja enzima matriks metaloproteinaze-9, danas se u svijetu uvode metode enzimskog imunoeseja (engl. Enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA). Pomoću ovog imunoeseja, kvalitativno i kvantitativno se određuje visina izražaja (koncentracije) enzima metaloproteinaze-9 (MMP-9) prilikom procjene malignosti i benignosti plućnih oboljenja, te se ova analiza pokušava sve više koristiti kao metoda preciznog određivanja bioloških pokazatelja (biomarkera) povezanosti povećanog rizika izlaganju karcinogenim i toksičnim okolišnim zagađivalima i eventualnog razvoja bolesti okoliša u obliku kronično opstruktivne plućne bolesti i/ili različitih oblika karcinoma pluća (36, 37).

Znanstvena istraživanja vezana za toksična djelovanja okolišnih zagađivala na ljudski imunološki sustav, usmjerena su prema određivanju uloge CD4<sup>+</sup> (engl. CD-cluster of differentiation antigens) regulacijskih/supresorskih T staničnih tipova. Najčešće su istraživane regulacijske stanice T (koje nemaju veliki izražaj CD25 na svojoj površini), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> supresorske stanice T, stanice NKT (engl. Natural Killer T cells), ali još uvijek ima malo podataka vezanih za ulogu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> stanica (engl. T<sub>reg</sub> cells) koje se međusobno razlikuju po količini lučenja IL-2 (interleukina-2), IL-10 (interleukina-10) i TGF-β (tumorskog faktora rasta-β) u patološkim zbivanjima prilikom utjecaja okolišnih zagađivala na ljudski imunološki sustav. U odgovoru organizma na okolišne alergene, najvažniju ulogu imaju regulacijske stanice T (T<sub>regs</sub>), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> stanice, NK i NKT stanice. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> stanice koje se proizvode u timusu imaju odlučujuću ulogu u prevenciji autoimunih procesa, odbacivanju alografta (presađeno tkivo sa jedne na drugu osobu) i održavanju auto-tolerancije najčešće u obliku smanjivanja lučenja IL-2 i

IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) (38). Humane stanice NK su osjetljive na toksična djelovanja benzena, jer su istraživanja dokazala statistički značajan pad u brojnosti stanica NK, CD4<sup>+</sup> limfocita T, limfocita B i granulocita u ljudi koji su profesionalno izloženi benzenu (39). U ljudi koji su profesionalno izloženi organskim otapalima, koja u svome sastavu imaju određene koncentracije toluena i mješavine toluena i benzena, dokazan je statistički značajan pad ukupnog broja svih sup-populacija stanica NK, citotoksičnih CD8<sup>+</sup> i pomagačkih CD4<sup>+</sup> limfocita T (40).

Do danas, najmanje je istražena uloga regulacijskih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> stanica koje pokazuju karakteristično svojstvo smanjivanja stvaranja IL-2 zbog represijskog djelovanja transkripcijskog faktora Foxp3 po kojem su i dobile ime (41). Posjeduju, ali ne proizvode IL-2 i druge citokine koji su im potrebni u njihovom razvoju i preživljavanju. Ključna uloga CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> stanica je u inhibirajućem djelovanju na ljudski imunološki sustav kada je izložen djelovanju različitih okolišnih čimbenika (42). Sve je više dokaza da regulacijske stanice vrlo učinkovito zaustavljaju razvoj eozinofilije u bronhima (43). U istraživanjima je dokazano da su regulacijske stanice koje proizvode IL-10 i imaju neposredni inhibicijski učinak na funkciju stanica Th2 (engl. T helper cell 2), primarno uključene u regulaciju teških respiratornih bolesti kao što su kronična opstruktivna plućna bolest i astma koje mogu nastati kao posljedica izloženosti ljudi okolišnim zagađivalima (44).

### **1.1.1. Utjecaj industrijalizacije i urbanizacije na povećano okolišno zagađenje**

Sve veća potreba za modernim načinom života iziskuje korištenje više različitih oblika energija (električna, toplinska, energija hrane) za kojima iz godine u godinu raste potražnja. Pogotovo su urbana područja i urbani način stanovanja karakteristični primjer neraskidive veze između modernizacije i eksploatiranja sve većih količina prirodnih resursa. Mnoga su nastojanja Europske unije usmjerena prema održivom razvoju urbanog stanovanja koji će integrirati kvalitetu stanovanja u gradovima s zaštitom i unapređenjem okoliša kao jedinog načina ostvarivanja cilja zdravog stanovanja, te je tako donesena i Europska stambena povelja koja je povezana s programskim dokumentima koji se odnose na područje urbanizma. Leipziška povelja o gradovima, usvojena 2007. godine, govori o kulturi građenja koja je posredovana gospodarskim, socijalnim, kulturnim, tehnološkim i nadasve ekološkim okruženjem, te zagovara politiku integriranog urbanog razvoja u kojoj se koordiniraju prostorni, sektorski i vremenski okviri održivog razvoja gradova. Gradovi se razvijaju za građane kao bi im pomogli u ostvarivanju kvalitetnijeg života, gdje je stanovanje na vrhu liste prioriteta. S izuzetkom alternativnih načina pretvorbe energije, glavnina iskoristive energije u današnjoj civilizaciji potječe iz izvora koji su glavni krivac zagađenja i trenutnog stanja u okolišu. Živeći i radeći u takvome okolišu, stanovništvo je izloženo povećanom riziku bilo da je riječ o ambijentalnom i/li profesionalnom izlaganju potencijalno opasnim okolišnim zagađivačima. Koliko je taj rizik realan na razini Hrvatske, najbolje se pokazuje u izvještajima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u kojima se navodi da je Primorsko-goranska županija na prvome mjestu po učestalosti pojavljivanja novooboljelih i umrlih od raka, a prvenstveno se misli na sve veću pojavnost karcinoma bronha i pluća. Mnogi toksični spojevi, a prvenstveno hlapljivi aromatski ugljikovodici kao što su BTEX,

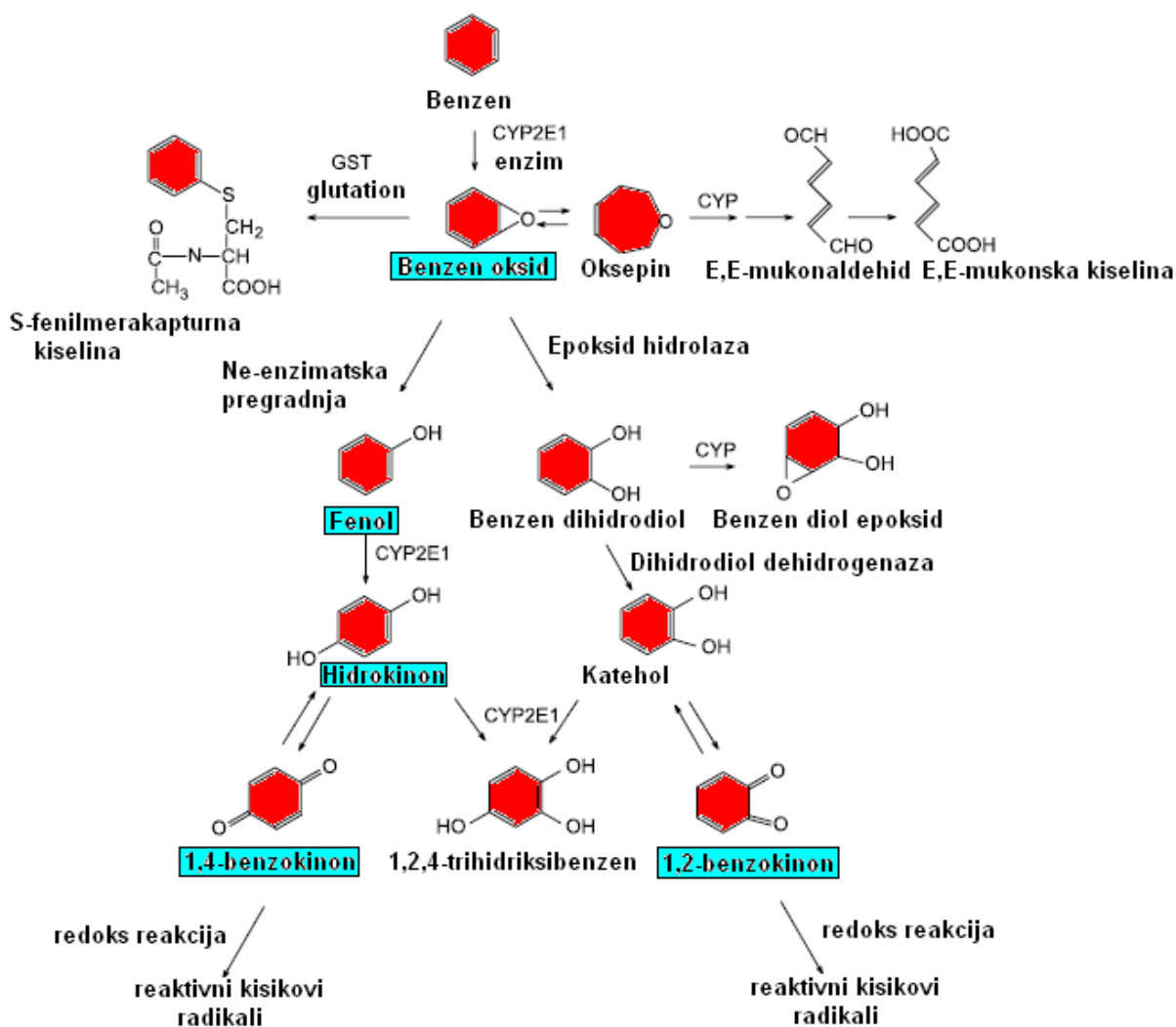
ispuštaju se u okoliš putem ispušnih plinova automobila i radom industrijskih postrojenja kao nezaobilazni nusprodukti izgaranja različitih naftnih frakcija. Mnoga su istraživanja dokazala vrlo jako toksično, karcinogeno i genotoksično djelovanje benzena u odnosu na ljudsko zdravlje. Koncentracije BTEX-a unesene u ljudski organizam upravo su proporcionalne s blizinom stanovanja ljudi u odnosu na glavne gradske prometnice i industrijska postrojenja, stoga življenje u velikim gradskim sredinama predstavlja potencijalni rizik izlaganja povećanim koncentracijama navedenim spojeva zbog velikog intenziteta prometa i neprekidnog rada mnogih industrijskih postrojenja koji su prepoznati kao njihov glavni izvor u integriranom okolišu. Određivanje koncentracija samih BTEX-a u ljudskom urinu odražava cjelokupnu i objektivnu izloženost populacije tim spojevima u neposrednom okolišu, jer istoimeni spojevi ne mogu nastati metaboličkim putovima u samome organizmu (45). Oni za istraživanja predstavljaju važne okolišne čimbenike jer dovode do razvoja bolesti okoliša, ali se još uvijek dovoljno ne zna o samim mehanizmima nastajanja bolesti ili bolesnih stanja. Pojavnost bolesti okoliša u razvijenim zemljama je u velikom porastu i predstavljaju sve veći problem za pojedinca i zajednicu u cjelini, a moderna istraživanja koja imaju za cilj rasvjetljavanje uloge okolišnih zagađivala u pokretanju staničnog, enzimskog, imunološkog i fiziološkog odgovora u ljudi mogu uvelike pridonijeti sprečavanju razvoja nepovratnih procesa u ljudskom organizmu koji u konačnici završavaju smanjenom učinkovitošću, invaliditetom ili smrću.

### **1.1.2. Toksično djelovanje hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena i ksilena (BTEX-a) na ljudsko zdravlje**

Hlapljivi aromatski ugljikovodici benzen, toluen, etilbenzen i izomeri ksilena (o-, m-, p-) su organski spojevi koji imaju široku upotrebu kao vrlo jaka organska otapala, te se pojavljuju kao sastavni dio boja i lakova koji se koriste prilikom zaštitnih premazivanja različitih metalnih i drvenih površina (članak 129. stavka 3. Zakona o zaštiti okoliša; "Narodne novine" br. 110/07-Registar onečišćavanja okoliša). Kako se zbog svojih fizikalno-kemijskih osobina (bezbojne tekućine, niska temperatura vrelišta, karakterističan miris, visok tlak para, velika mogućnost hlapljenja) mogu vrlo lako naći u okolišu, ljudi su više ili manje trajno izloženi njihovom djelovanju. Pogotovo su njihovom djelovanju izloženi ljudi koji su i profesionalno u kontaktu. Prvenstveno se misli na zaposlenike koji premazuju brodske konstrukcije, a zbog prirode svoga posla su izloženi spojevima putem udisanja hlapljivih komponenti i direktnog kontakta s bojama. BTEX spojevi se nalaze u sastavu samoga benzina, te se u atmosferu ispuštaju putem ispušnih plinova automobila i emisija plinova iz većih industrijskih pogona kao što su rafinerije za preradu naftnih derivata. Prema priručniku LUFT (engl. Leaking Underground Fuel Tank) benzin prosječno sadržava 1,8 % benzena, 12,3 % toluena, 1,6 % etilbenzena i 5,2 % svih izomera ksilena. U modernim se znanstvenim istraživanjima posljednjeg desetljeća zbog navedenih osobina hlapljivih aromatskih ugljikovodika, te vrlo lakog ulaska u ljudski organizam, najviše pažnje posvetilo rasvjetljavanju štetnog djelovanja BTEX-a na ljudsko zdravlje. Toksični učinci BTEX-a nisu podjednako istraživani za sve spojeve, najviše je podataka prikupljeno za benzen zbog njegove hematotoksičnosti i karcinogenosti, a slijedi toluen zbog svoje neurotoksičnosti, dok su za etilbenzen i izomere ksilena podaci oskudni. Svi navedeni spojevi kao organska

otapala djeluju lokalno na kožu i sluznicu, a nakon resorpcije sustavno se djelovanje očituje na središnjem živčanom sustavu. Dokazana su vrlo jaka hematotoksična djelovanja benzena u obliku smanjenja broja krvnih stanica, hipoplazije koštane srži, pancitopenije, mijeloične leukemije i vrlo jake inhibicije ugradnje željeza u eritrocite što je posebno štetno prilikom ranog razvoja ljudskog organizma. Pogotovo je profesionalna izloženost ljudi benzenu izuzetno rizična po zdravlje, jer se najčešće radi o velikim koncentracijama i akutnom djelovanju na organizam u obliku jakog smanjenja broja krvnih stanica, pancitopenije, a kao krajnji rezultat razvoj akutne ili kronične mijeloične leukemije (46-49). Za sama toksična svojstva benzena odgovorni su metaboliti koji nastaju u metaboličkoj pretvorbi samoga benzena u ljudskom organizmu (Slika 1). Najodgovorniji metaboliti za toksična svojstva su benzen oksid, kinon i semikinon, dok su fenol i hidrokinoni (1,2-benzokinon, 1,4-benzokinon) koji nastaju u jetri odgovorni za toksične učinke u koštanoj srži (50, 51). Dokazano je da prilikom profesionalne izloženosti benzenu može doći i do kromosomskih aberacija, izmjena sestrinskih kromatida, pojave mikronukleusa i inhibicije sinteze DNA i RNA molekula budući da benzen i njegovi metaboliti stvaraju DNA lomove (52-54). Neurotoksični učinci toluena i ksilena u ljudskom organizmu uglavnom su uvjetovani njihovom prisutnošću u fosfolipidnom dijelu stanične membrane živaca i narušavanjem njezine osnovne uloge (podražljivosti u stvaranju akcijskog potencijala), te prisutnošću toluena i ksilena u mijelinu živčanih vlakana i remećenjem njihove uloge u provodljivosti električnih impulsa (55). Simptomi neurotoksičnog djelovanja kod ljudi se manifestiraju kao jake glavobolje, vrtoglavice, pospanost i ponekad gubitak svijesti što može rezultirati i akutnim trovanjem ukoliko se vrijeme zadržavanja u takvom najčešće radnom okolišu ne skрати na najmanju moguću mjeru. Za etilbenzen su podaci vrlo oskudni, ali postoje istraživanja koja ipak

dokazuju njegovu akutnu i kroničnu toksičnost na središnji živčani sustav koja se manifestira u obliku jake glavobolje, nesanicе, razdražljivosti i umora (56,57).



Slika 1 Metabolički prijetvor benzena (51)

### **1.1.3. Povećana prisutnost BTEX-a u okolišu kao razlog promjene imunološkog odgovora u ljudi**

Sve veće količine potencijalno opasnih zagađivala po ljudsko zdravlje ispuštaju se u okoliš putem različitih nepokretnih i pokretnih izvora, koji svojom lokacijom na području gradskih i prigradskih sredina imaju izravan utjecaj na kvalitetu življenja. Najčešće je riječ o različitim vrstama tvorničkih postrojenja koja kao popratne produkte svoga radnoga procesa imaju hlapljive aromatske ugljikovodike, koje putem cjelodnevnih emisija neposredno ispuštaju u atmosferu. To su u prvome redu rafinerije za preradu naftnih derivata, koje zbog nepresušne potrebe za sve većim količinama fosilnih goriva koja se koriste u svrhu pokretanja različitih motornih vozila i strojeva, neprestano povećavaju svoje kapacitete da bi odgovorile potrebama moderne civilizacije. Gradski promet zbog svoje frekvencije predstavlja veliki izvor BTEX spojeva u okolišu, te su istraživanjima i dokazala statistički značajno veće koncentracije BTEX-a u atmosferi gradova za razliku od koncentracija istih u atmosferi ruralnih područja (58,59). Hlapljivi aromatski ugljikovodici ne nastaju samo u proizvodnom procesu destilacije naftnih derivata, nego se nadalje ispuštaju u okoliš prilikom sagorijevanja samih goriva prilikom njihovog korištenja za zagrijavanje domaćinstava mnogobrojnih gradskih četvrti. To su ujedno uzroci neprestane potrebe prilagođavanja ljudskog organizma, a u prvome redu imunološkog sustava, svakodnevnim izazovima održavanja ravnoteže u cilju zaštite od nastanka bolesnog stanja, bolesti ili u konačnici smrtnoga ishoda izazvanog povećanim koncentracijama toksičnih spojeva u atmosferi. Mnoge su imunološke stanice uključene u lančane reakcije ljudskog imunološkog sustava potaknute okolišnim zagađivalima. Limfociti T koji se inače dijele u osnovne dvije skupine, CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> stanice, mogu biti potaknute različitim okolišnim antigenima (60). Kod CD4<sup>+</sup> imunološkog odgovora, Th1 i



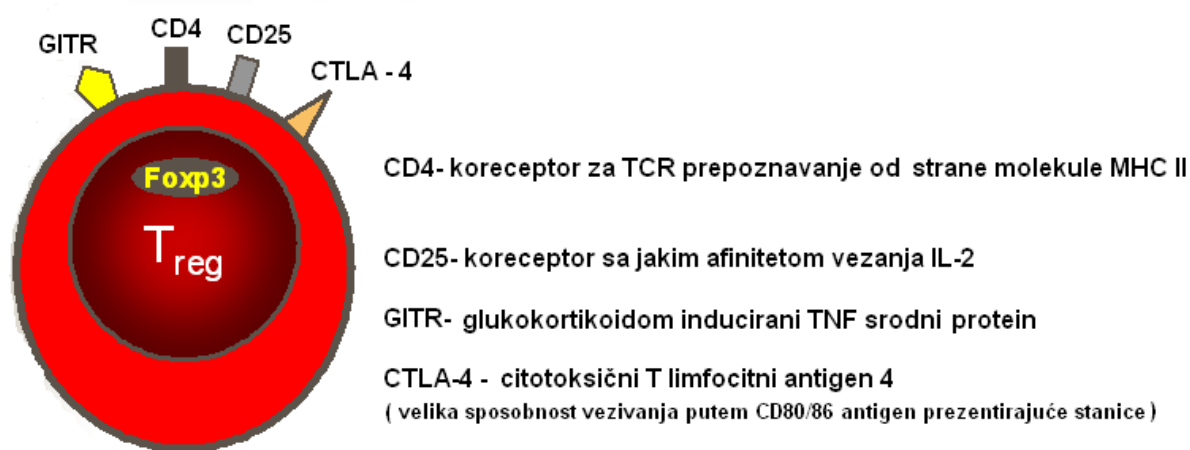
Th2 podskupine su uključene u procese napada astme, kronično opstruktivne plućne bolesti i drugih imunoloških poremećaja uzrokovanih okolišnim čimbenicima. CD4<sup>+</sup> stanični odgovor reagira na način da utječe na pojačano lučenje mnogih citokina i medijatora upalnih procesa koji su uključeni u mehanizme alergijskog i autoimunog odgovora. Th1 odgovor reagira lučenjem IFN- $\gamma$  (engl. Interferon-IFN); IL-2 (engl. Interleukin-IL); TNF- $\beta$  (engl. Tumor necrosis factor-TNF), a Th2 odgovor lučenjem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13. Postoji i zajedničko djelovanje Th1 i Th2 odgovora prilikom izloženosti ljudskog organizma štetnim okolišnim spojevima, a to se manifestira u obliku snažnog lučenja citokina IL-1, IL-3, IL-8, TNF- $\alpha$  i GM-CSF (engl. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor). S druge strane, CD8<sup>+</sup> limfociti T supresori (engl. Ts-supressors) koji su odgovorni za usporavanje imunološke reakcije i mogu sazrijeti u citotoksične T limfocite, ubijaju ciljne stanice koje su izložene policikličkim aromatskim ugljikovodicima (PAU), hlapljivim aromatskim ugljikovodicima (BTEX), ispušnim dizelskim česticama DEP (engl. Diesel exhaust Particles) i teškim metalima (Hg, Cd, Pb) (61-64). Na modelima C57BL/6 miševa, ispitivanja toksičnih utjecaja benzena na nivou stanica NK splenocita (stanica slezene) su dokazala odsutnost promjena u funkcionalnosti i broju stanica NK, ali je došlo do statistički značajnog pada i kočenja produkcije IL-2 od strane splenocita. Drugim riječima, rezistencija stanica NK miševa na toksično djelovanje benzena je velika, ali je isto tako dokazana statistički značajno veća osjetljivost stanica slezene na toksična djelovanja benzena u vidu produkcije IL-2 (65). Za razliku od mišjih, ljudske stanice NK su osjetljivije na toksična djelovanja benzena, jer su istraživanja dokazala statistički značajan pad u broju stanica NK, CD4<sup>+</sup> limfocita T, limfocita B i granulocita u ljudi koji su profesionalno izloženih benzenu. U ljudi koji su

profesionalno izloženi povećanim koncentracija toluena, te mješavinama toluena i benzena, dokazan je statistički značajan pad ukupnog broja svih subpopulacija stanica NK, citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocita T, pomagačkih CD4<sup>+</sup> limfocita T, stanica B, dok za promjene na nivou citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocita T i NK stanica postoje i različiti podaci (66-68). Naime, postoje istraživanja koja ukazuju da prilikom izloženosti benzenu na radnome mjestu, ljudski imunološki sustav reagira u obliku statistički značajnog rasta postotka stanica NK, te ne dovodi do statistički značajnije promjene u broju citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocita T (69-71). Istraživanja nadalje ukazuju na činjenicu, da povećane koncentracije produkata izgaranja fosilnih goriva koje se nalaze u atmosferi urbanih područja, a u prvome redu benzena i DEP-a, uzrokuju pojavu jakih imunoloških reakcija koje se očituju promjenom distribucije CD4/CD8 limfocita T s karakterističnom klonalnom ekspanzijom subpopulacija limfocita T u koštanoj srži, te da dolazi do razvoja limfocitopenije, značajnih promjena u omjeru CD4/CD8 limfocita T, serumske razine upalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  (72-74). Iako postoje oprečna mišljenja o načinu reagiranja imunološkog sustava na prisutnost BTEX spojeva u okolišu, zajedničko je svima da ljudski imunološki sustav predstavlja ključnu liniju obrane samoga organizma na štetna djelovanja koja BTEX spojevi mogu potencijalno prouzročiti u organizmu ako se nalaze u povećanim koncentracijama u radnom i/ili ambijentalnom okolišu.

## 1.2. T regulacijske stanice

Postoji čitav niz T regulacijskih stanica koje po svojoj ulozi u ljudskom imunološkom sustavu predstavljaju važan sustav obrane organizma od različitih okolišnih utjecaja. U istraživanjima je identificirano nekoliko  $CD4^+$  regulacijskih/supresorskih T staničnih tipova. To su stanice TR (koje nemaju veliki izražaj CD25 na svojoj površini),  $CD4^+CD25^+$  supresorske stanice T, stanice NKT (engl. Natural-killer T cells),  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  stanice ( $T_{reg}$  cells) koje su ujedno i ključni predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji. Navedene regulacijske stanice T međusobno se razlikuju po količini lučenja IL-2, IL-10 i TGF- $\beta$  za koje autori navode da igraju odlučujuću ulogu u regulaciji staničnih procesa posredovanih regulacijskim stanicama T (75). Stanice NKT su po funkcionalnim i fenotipskim karakteristikama slične stanicama NK (engl. Natural-killer cells). Kao i drugi limfociti T, stanice NKT imaju TCRs receptore (engl. T cell receptors) na svojoj membrani, ali s tom razlikom što im je varijabilnost djelomično ograničena (75). Za razliku od ostalih stanica T, stanice NKT imaju na svojoj površini izražaj karakterističnog NK 1.1. biljega koji prepoznaje specijalizirani MHC-CD1 (engl. Major histocompatibility complex-MHC) receptor izražen na antigen predočnim stanicama. Funkcionalnost stanica NKT u imunotoksikologiji još uvijek nije u potpunosti jasna, jer njihovo djelovanje ima karakteristike prirodene i stečene imunosti. Proučavajući njihovu aktivaciju, autori navode da postoji izlučivanje nekoliko vrsta molekula kojima stanice NKT djeluju unutar imunološkog sustava, a to su prije svega citokini IL-4 i interferon- $\gamma$ . Ubijanje ciljnih stanica ostvaruju putem interakcije Fas-Fas liganda kojeg imamo i u slučaju citotoksičnih  $CD8^+$  limfocita T, a kao rezultat ima pokretanje programirane stanične smrti (75). Stanice NKT su prisutne u plućima i

aktivirane proizvode velike količine IL-4, IFN- $\gamma$  i IL-13, te mogu posredovati pri povećanom odgovoru bronha na djelovanje okolišnih zagađivala (75). Bitno je napomenuti, da se u patološkim zbivanjima dišnih putova koja su vezana za alergijske promjene, kronično opstruktivnu plućnu bolest i astmu koje mogu biti izazvane raznim okolišnim čimbenicima, mora voditi računa o važnoj ulozi koju imaju stanice TR, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> stanice i stanice NKT (76). Naziv regulacijske stanice T odnosi se na stanice koje primarno kontroliraju, potiču ili efikasno zaustavljaju funkciju drugih stanica specifičnim mehanizmima koji su još predmet istraživanja, a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> stanice koje je otkrio prof. Muhherji 1986. godine i prvi takvim imenom nazvao prof. Sakaguchi 1995. godine u navedenim procesima imaju vrlo važnu ulogu (Slika 2) (77).

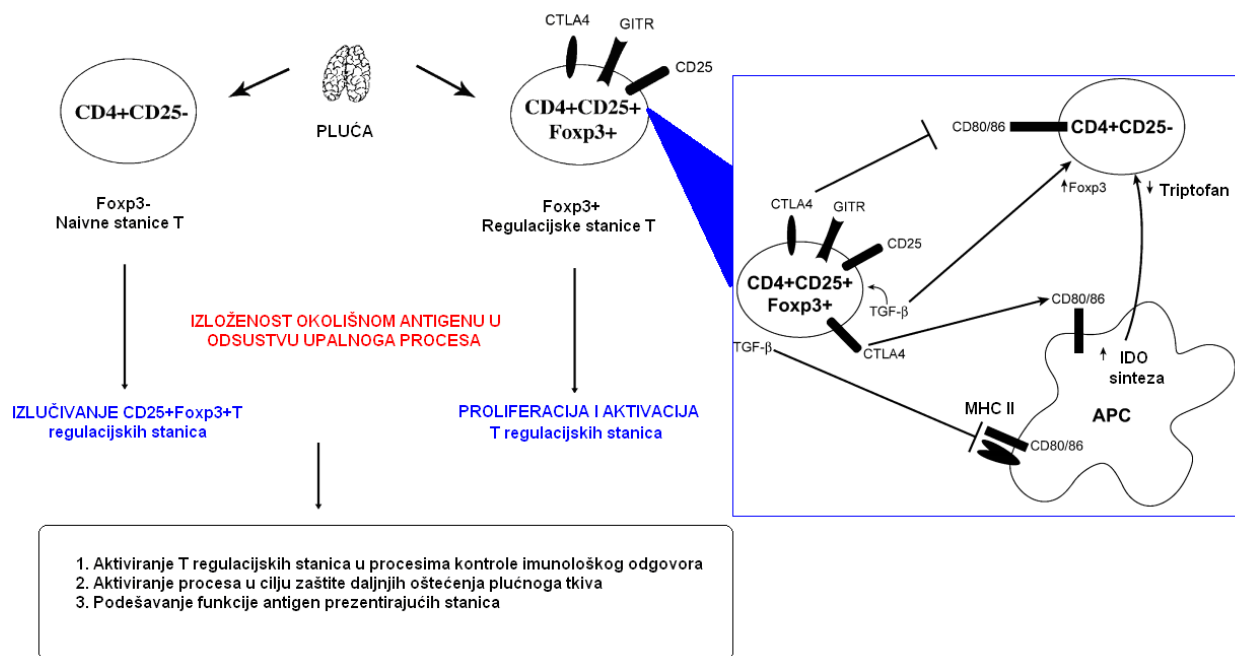


Slika 2 T regulacijska stanica i koreceptorske molekule na njezinoj površini

Regulacijske CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> stanice predstavljaju približno 10% perifernih CD4<sup>+</sup> limfocita T u ljudi koji trebaju IL-2 za preživljavanje (78). Najvažnija zadaća ovih stanica, a ujedno i razlog proučavanja u ovom istraživanju, je u supresivnom djelovanju na

Ljudski imunološki sustav kada je isti izložen djelovanju okolišnih čimbenika (79). Sve je više dokaza da regulacijske  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  stanice vrlo efikasno inhibiraju razvoj eozinofilije u bronhima (80). U ljudi kod kojih je dijagnosticirana kronično opstruktivna plućna bolest, dokazan je statistički značajno povećan izražaj regulacijskih  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  stanica koje kod ovakvoga oboljenja imaju važnu ulogu u staničnoj kontroli imunološkog odgovora (81, 82). Posebno je bitno posvetiti pažnju na povećanu pojavnost astme kao teške plućne bolesti koja može nastati kao posljedica izloženosti ljudi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima u ambijentalnom i/ili radnome okolišu, te objasniti povezanost promjena u izražaju regulacijskih  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  stanica kao ranog pokazatelja imunoloških poremećaja u procesima koji dovode do njezinog razvoja. Istraživanja su dokazala međusobnu ovisnost između koncentracija benzena u zraku i razvoja jakog imunološkog odgovora u obliku poremećaja u izlučivanju pro-upalnih medijatora histamina, IL-4 od strane plućnih bazofila sa razvojem bronhijalne astme, na način da dva metabolita benzena (hidrokinon, benzokinon) u plućnim bazofilima blokiraju unutarstanično signaliziranje što dovodi do poremećaja u izlučivanju pro-upalnih medijatora (histamina) i citokina (IL-4) koji su uključeni u Th2 imunološki odgovor (83). U istraživanjima je dokazana povezanost utjecaja povećanih koncentracija hlapljivih aromatskih ugljikovodika (u prvome redu benzena) u zraku urbanih područja, sa visokom pojavnosću različitih oblika respiratornih poremećaja (restrikcija i opstrukcija) i statistički značajno većim rizikom oboljenja od astme kao teškog oblika bolesti okoliša u djece (84). Poznata je važnost regulacijskih stanica  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  u Th2 imunološkom odgovoru prilikom procesa koji dovode do razvoja bolesti astme kao posljedice izloženosti ljudi raznim okolišnim antigenima (85). Vrlo je važna uloga transkripcijskog faktora  $Foxp3^+$  kao ključnog faktora u kontroli aktivnosti i razvoja

regulacijskih CD25<sup>+</sup> stanica T i izražaja regulacijskih CD4<sup>+</sup> stanica T (Slika 3)(85). Mnogi eksperimentalni modeli ukazuju na činjenicu da regulacijske CD25<sup>+</sup> stanice T zahtijevaju stanični kontakt preko specijaliziranih T staničnih receptora i prisutnost IL-2 za pokretanje kočenja staničnih procesa. To se najbolje vidi na primjeru utjecaja regulacijskih CD25<sup>+</sup> stanica T koje direktno usporavaju aktivaciju CD25<sup>-</sup> stanica T ili indirektno usporavaju aktivaciju CD25<sup>-</sup> stanica T posredstvom antigen prezentirajućih stanica (Slika 3 –desno) (83-87).



Slika 3 Uloga regulacijskih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> stanica prilikom izloženosti ljudi okolišnim antigenima u odsustvu upalnoga odgovora. Model utjecaja regulacijskih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> stanica na aktivnost regulacijskih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> i antigen predočnim stanica (Slika 3-desno)

Citokin TGF- $\beta$  je direktno uključen kao važan biološki faktor u funkcioniranju regulacijskih CD25<sup>+</sup> stanica T. Njegova prisutnost ima odlučujuću ulogu u kočenju aktivnosti regulacijskih CD25<sup>+</sup> stanica T prilikom kontakta sa stanicama. U eksperimentalnim modelima je dokazano da povećana izloženost većim dozama TGF- $\beta$ , ima značajnu ulogu u regulaciji izražaja transkripcijskog faktora Foxp3<sup>+</sup> kod regulacijskih CD4<sup>+</sup> stanica T (87,88). Citotoksični T limfocitni antigen (CTLA-4) je površinski važan receptor na regulacijskim CD25<sup>+</sup> stanica T i ima odlučujuću ulogu u mehanizmu kočenja stanične aktivacije antigen predočnim stanica i efektorskih stanica T posredovano molekulama CD80 i CD86 (Slika 3–desno). Ova molekularna veza može navesti antigen predočne stanice da pojačano izlučuju enzim indolamin 2,3-dioksidogenu i ubrzavaju reakciju s molekulom triptofana uzrokujući smanjenu proliferaciju stanica T (87,88).

### **1.2.1. Poremećaji T regulacijskih stanica kao posljedica zagađenja okoliša hlapljivim aromatskim ugljikovodicima**

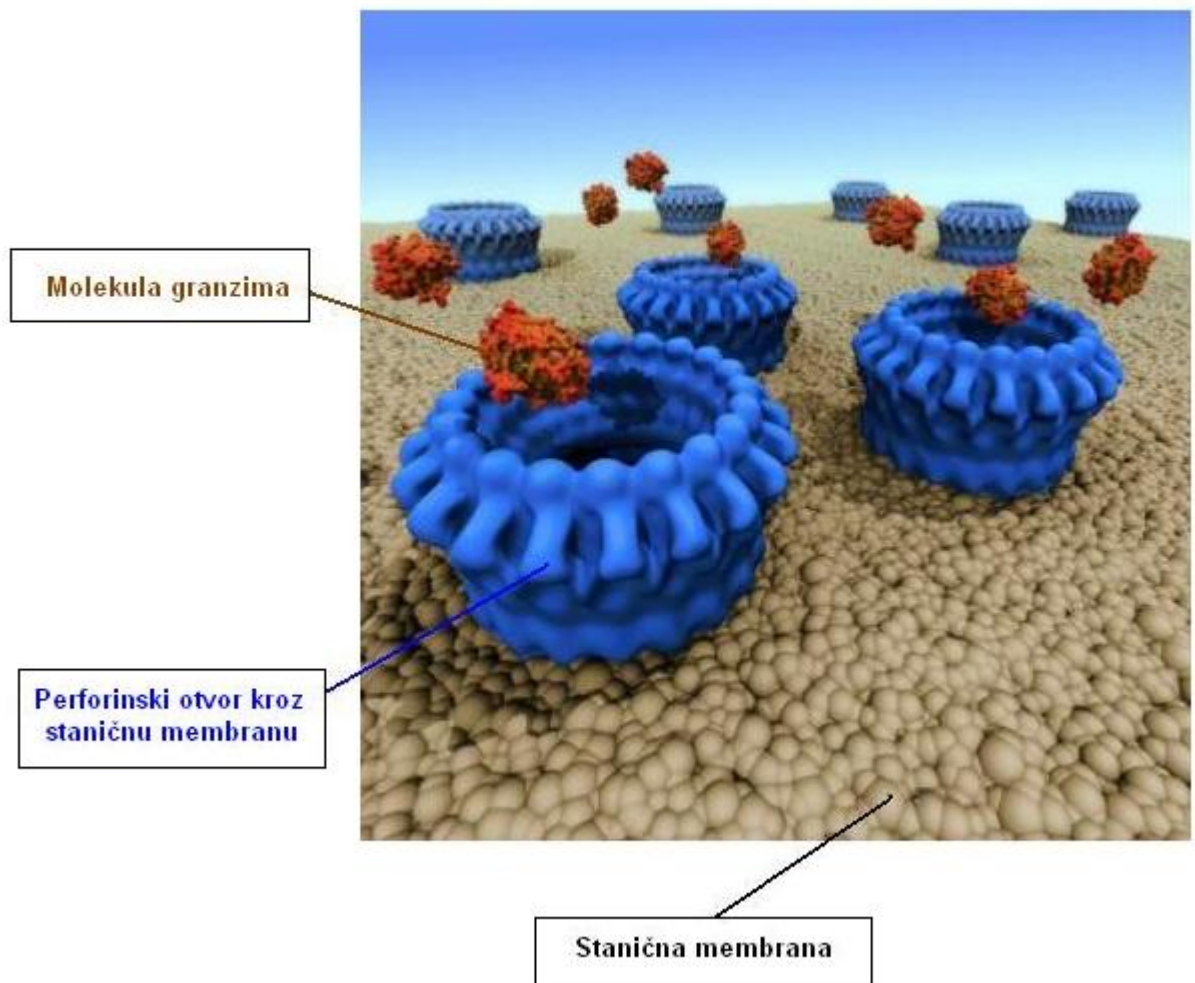
Istraživanja koja su se bazirala na istraživanjima utjecaja hlapljivih aromatskih ugljikovodika (BTEX-a) iz okoliša na ljudsko zdravlje, upravo dokazuju vrlo štetna djelovanja istih na nivou T regulacijskih stanica. Na primjerima utjecaja benzena i toluena na zdravlje radnika koji su unutar radnoga procesa izloženi vrlo malim koncentracijama istih, dokazano je statistički značajno smanjivanje ukupnog broja regulacijskih CD4<sup>+</sup>T stanica, stanica NK, te čitavog niza drugih imunoloških stanica kao što su granulociti, ukupni limfociti, stanice T i stanice B (89-92). Benzen kao karakteristični predstavnik hlapljivih aromatskih ugljikovodika, koji se u povećanim koncentracijama nalazi u zraku urbanih područja, svojim hematotoksičnim djelovanjem i dokazanom limfocitnom toksičnošću negativno djeluje na ljudski imunološki sustav u ranim fazama razvoja mnogih imunoloških stanica, što neupitno dovodi do narušavanja ravnoteže cijelog sustava (93). Ciljana istraživanja utjecaja benzena na imunološki sustav dokazala su da je ukupan broj mononuklearnih stanica periferne krvi u ljudi koji nisu izloženi benzenu daleko veći u odnosu na ispitanike koji su profesionalno i/ili ambijentalno izloženi istom (94,95). Izloženost ljudi benzenu, toluenu, etilbenzenu i izomerima ksilena kao zagađivalima nastalim u prometu radom motora sa unutrašnjim izgaranjem, dovodi u ljudi koji žive i rade na tim područjima do statistički značajnog pada broja regulacijskih CD4<sup>+</sup> limfocita T, stanica B i stanica NK imunološkog sustava (96). Mnogi autori navedene tvrdnje povezuju sa procesima nastajanja T regulacijskih stanica u koštanoj srži i sazrijevanja istih u timusu kod kojih kada su izložene djelovanju benzena, dolazi do statistički značajnog pada u procesima rasta, razvoja i imunološke aktivacije. Pogotovo je to slučaj na primjerima istraživanja kod regulacijskih CD4<sup>+</sup>



limfocita T, gdje većina autora dijeli iste zaključke o statistički značajnom padu njihovog ukupnog broja (97). Istraživanja koja su se bazirala na ispitivanjima toksičnih učinaka benzena na imunološki status profesionalno izloženih radnika naftne industrije, dokazala su zabrinjavajuće poremećaje na nivou citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocita T i regulacijskih CD4<sup>+</sup> limfocita T u odnosu na kontrolne skupine ispitanika(97,98).. Vođeni rezultatima navedenih istraživanja utjecaja hlapljivih aromatskih ugljikovodika na ljudski imunološki sustav, autori donose zajednički zaključak da je neophodno uvođenje stalnog biološkog praćenja koje bi uključivalo mjerenja koncentracija BTEX-a u krvi i urinu radnika, te određivanja imunološkog statusa istih u vidu izražaja citotoksičnih CD8<sup>+</sup>T stanica i regulacijskih CD4<sup>+</sup> T za koje smatraju da igraju ključnu ulogu kod imunološkog odgovora u ljudi na toksično djelovanje hlapljivih aromatskih ugljikovodika, u prvome redu benzena (97,98). Na temelju svega navedenog o važnosti izražaja citotoksičnih CD8<sup>+</sup>T stanica i regulacijskih CD4<sup>+</sup> T stanica, u sklopu našega istraživanja uveli smo određivanje imunološkog statusa na razini citotoksičnih CD8<sup>+</sup>T stanica i regulacijskih CD4<sup>+</sup> T stanica i čitavog niza drugih imunoloških mjerenja izražaja na razini stanica T, B, NK, NKT i ključnih regulacijskih stanica T<sub>regs</sub>, kako bi dobili potpuniju sliku promjena imunološkog odgovora u ljudi koji su okolišno i/ili profesionalno izloženi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima.

### 1.3. Citolitička molekula perforin

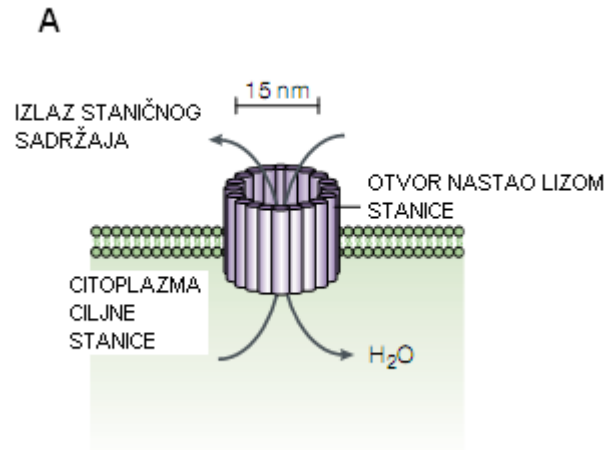
Ljudski perforin dekodiran na genu PRF1 (engl. pore forming protein), je glikoprotein građen od 534 aminokiseline, prvi puta nađen u granulama citotoksičnih limfocita i stanica NK, molekularne težine 70 kD (99, 100). Ljudski perforin je u trenutku otkrivanja bio nazvan «bjelančevina srodna C-9» zbog svoje homolognosti u prve 34 aminokiseline na N-terminalnom kraju molekule s C9 komponentom komplekta. Vodeći peptid humanog perforina ima karakteristični aminokiselinski sastav, što ga razlikuje od mišjeg perforina. N-terminalni kraj perforinske molekule zadužen je za lizu ciljne stanice (101-103). Stanična liza moguća je samo u trenutku kada  $\alpha$ -helix omogući presudnu adheziju molekule perforina i ciljne stanice, te stvaranje karakterističnog prstenastog otvora na membrani ciljne stanice (Slika 4). Ovaj proces je ovisan o prisutnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iona što je dokazao prof. Rukavina sa svojom grupom istraživača još 1998. godine. Tako nastaje poremećaj u propusnosti membrane ciljne stanice, poremeti se homeostaza unutar stanice, potakne se endocitoza i nastupa osmotska liza stanice (104). Zahvaljujući oštećenju ciljne stanice nastale perforinskim otvorima (perforin je neophodan za citotoksičnost posredovanu granulama), omogućena je i komunikacija ciljne stanice s posrednicima citotoksičnih limfocita, te tako perforin utiče i na lizu posredovanu citotoksičnim limfocitima (105-107).



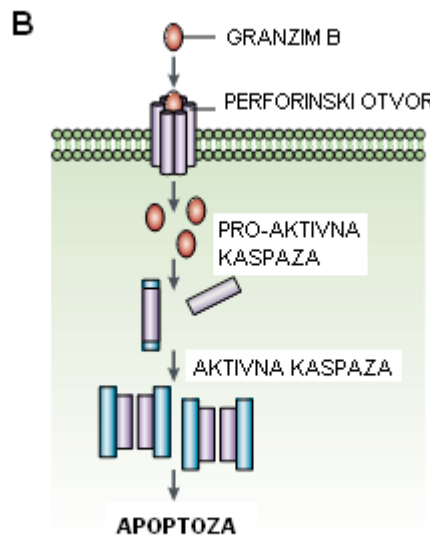
Slika 4 Perforinski prstenasti otvori kroz membranu ciljne stanice (103)  
Otvor omogućuje molekuli granzima da uđe i uništi ciljnu stanicu.

Ca<sup>2+</sup> ovisna C2 domena igra ključnu ulogu, jer omogućuje spajanje humane perforinske molekule u trenutku adhezije sa membranom ciljne stanice (108). Centralni dijelovi kao što su domena male homologije, domena slična-EGF (engl. epidermal growth factor) pokazuju sličnost sa C7, C8 $\alpha$  i C8 $\beta$  komponentom kompleksa (108,109). Perforin ima izražaj u *in vivo* i *in vitro* uvjetima, kako u fiziološkim tako i u patološkim uvjetima. Izražaj perforina ovisi o oštećenju tkiva, kao i o njegovoj citolitičkoj

aktivnosti. U limfocitima periferne krvi, izražaj perforina je najviše zastupljen u stanicama NK, manje u citotoksičnim  $CD8^+$  i pomagačkim  $CD4^+$  stanicama T (110). U jednom od prvih modela osamdesetih godina prošloga stoljeća, kada je perforin i otkriven, funkcionalnost ubijanja ciljne stanice povezivala se samo s procesom ubijanja iste procesom lize, gdje je ciljna stanica zbog gubitka unutarstaničnih komponenti i ulaza vode umirala kao posljedica gubitka membranske ravnoteže (Slika 5A). Otkrićem povezanosti djelovanja perforina i granzima, te dokazivanjem uloge perforina u otvaranju ulaznoga puta molekuli granzima u stanicu, otvara se novo poglavlje u otkrivanju načina ubijanja ciljnih stanica. Kada perforin putem prstenastoga otvora omogući ulaz granzimu, granzim procesom pasivne difuzije ulazi u stanični citosol ciljne stanice i putem staničnog signaliziranja aktivira kaspazne kaskadne reakcije koje pokreću proces programirane stanične smrti (Slika 5 B). U istraživanjima kasnih devedesetih godina prošloga stoljeća, otkriva se mehanizam ulaska molekule granzima u ciljnu stanicu procesom endocitoze (endocitoznih mjehurića), koji je neovisan o prisutnosti same molekule perforina (Slika 5 C).



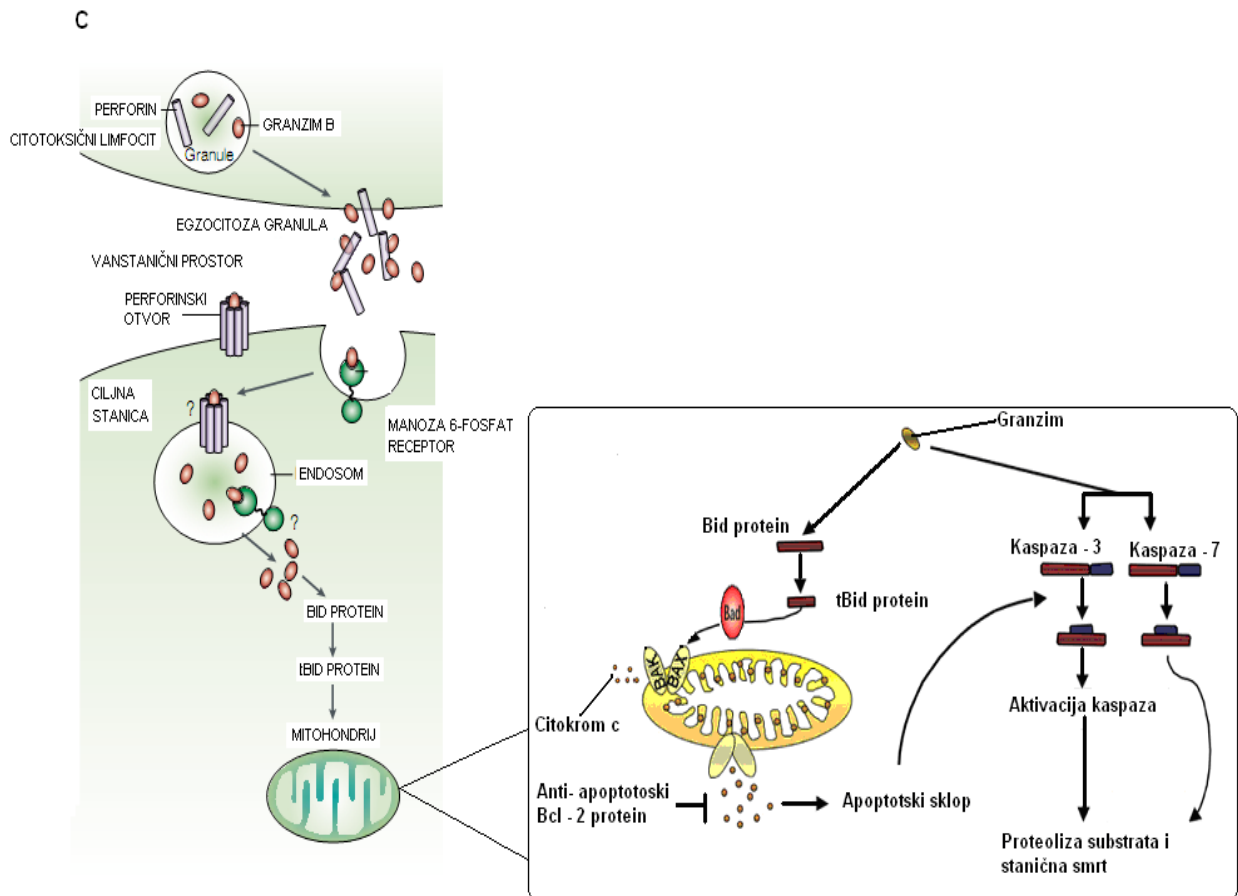
Slika 5A Model stanične smrti uzrokovan stvaranjem karakterističnog prstenastog perforinskog otvora porijeklom iz citotoksičnih limfocita T i stanica prirodnih ubojica NK (113)



Slika 5B Model aktiviranja stanične smrti uzrokovane djelovanjem molekule perforina i granzima B porijeklom iz citotoksičnih limfocita T i stanica prirodnih ubojica NK na razini kaskadnih reakcija kaspaza (113)

U istome procesu, moguća je prisutnost malog broja molekula perforina (kao posljedica puno manje perforinskih otvora na površini ciljne stanice), gdje dolazi do sinergističkog djelovanja molekula granzima A i B sa molekulom perforina u pokretanju programirane stanične smrti. Upitnici na samoj slici ukazuju na problem nedovoljno istraženog načina molekularnog mehanizma koji omogućuje granzimu da putem molekule perforina uđe u stanični endosom, jer i sama molekula perforina još nije nađena u endosomu ili citosolu ciljne stanice. Sam proces u mitohondriju ciljne stanice, kada se granzim B nađe u prostoru njezinog citosola, već je otkriven i detaljno opisan u djelovanjima molekule perforina kod citotoksičnih limfocita i stanica NK (Slika 5C-desno). U tom slučaju, pokreću se procesi koji dovode do smrti stanice (111,112). Postoje dva osnovna procesa, a to su proces koji uključuje Bid proteine (engl. BH3-interacting domain death agonist) i tBID proteine (engl. truncated BID) ili direktno uključivanjem aktivacije kaspaza (kaspaza-3, kaspaza-7). Granzim pokreće stanično signaliziranje, te Bid proteini koji su usmjereni prema staničnom mitohondriju dovode do indukcije oligomerizacije Bak i Bax (pro-apoptoznih) proteina na vanjskoj strani mitohondrija. Bad proteini se vežu za anti-apoptozne proteine Bcl-2 i Bcl-xl koji su ugrađeni u membranu mitohondrija. Vezivanjem samih Bad proteina sprečava se interakcija anti-apoptoznih proteina sa pro-apoptoznim proteinima kao što su Bax i Bak. Bax proteini formiraju homooligomerne ionske kanale u samoj membrani kroz koje izlaze ioni. Upravo ti novonastali kanali, dovode do oslobađanja ključnog citokroma c u stanični citosol što dovodi do kaskadnih reakcija kaspaza i posljedično pokretanje programirane stanične smrti. Bitno je napomenuti, da vezivanje anti-apoptoznih Bcl-2 proteina uzrokuje blokadu otpuštanja citokroma c i sprečavanje ovoga procesa (111, 112). Granzim je sposoban pokrenuti kaspazne (kaspaza-3, kaspaza-7) kaskadne reakcije

koje dovode do proteolize supstrata i stanične smrti, a da pri tome ne dolazi do reakcija s Bid proteinima (111, 112).

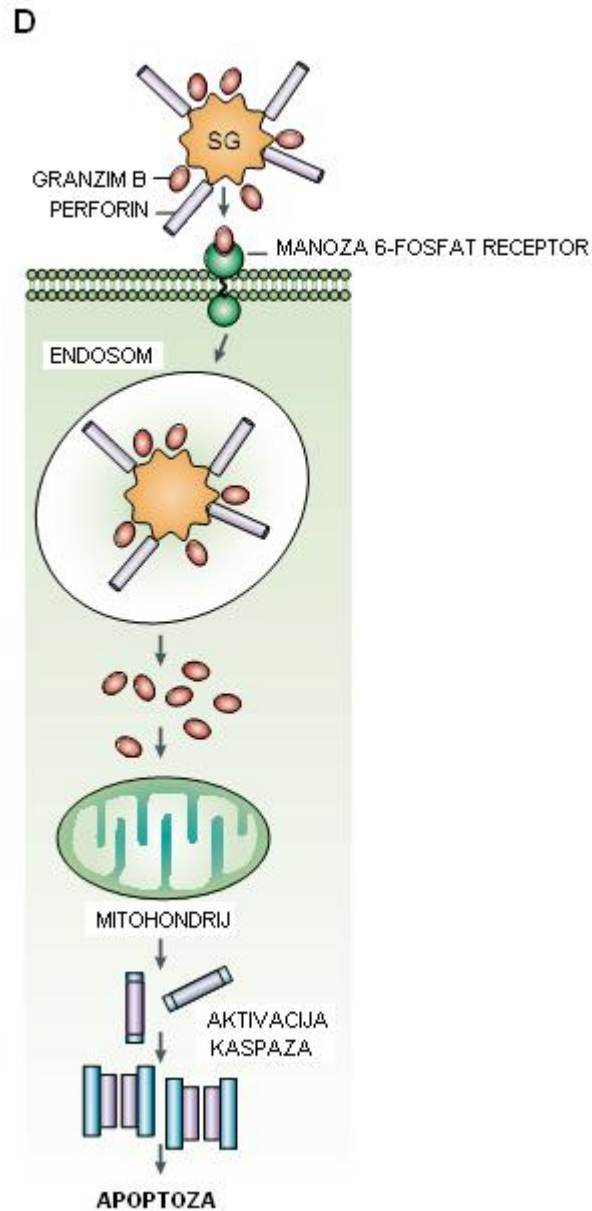


Slika 5C Model pokretanja programirane stanične smrti djelovanjem molekule perforina i granzima B porijeklom iz citotoksičnih limfocita T i stanica prirodnih ubojica NK na proteinskoj razini (113).

Model proteinske stanične reakcije u procesu pokretanja programirane stanične smrti na razini mitohondrija (slika desno)(112)

Novija istraživanja uloge molekule perforina u procesima ubijanja ciljnih stanica, koja ujedno predstavljaju ozbiljnu znanstvenu raspravu, govore o ulozi manozna 6-fosfat receptora kao ključnog površinskog staničnog receptora za granzim B. Postojanje manozna 6-fosfat receptora objedinjuje mnoge ideje o ulasku u ciljnu stanicu molekularnog kompleksa koji sadrži perforin, granzim i druge molekule kao što je na

primjer serglicin (SG), bez nužnog postojanja perforinskih otvora na površini ciljne stanice, a u konačnici kao posljedicu ima pokretanje aktivacije kaspaza i programiranu staničnu smrt ciljne stanice na koju se molekularni kompleks vezao (Slika 5D) (113).



Slika 5D Model pokretanja programirane stanične smrti djelovanjem molekularnog kompleksa serglicin-perforin-granzim B posredovanog manozu 6-fosfat receptorom (113)



### **1.3.1. Imunološke promjene na razini perforin pozitivnih stanica kao rezultat izloženosti ljudi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima u okolišu**

Poznata je činjenica da je izloženost benzenu, toluenu, etilbenzenu i izomerima ksilena povezana sa pušenjem duhana, te da se navedeni spojevi nalaze u duhanskome dimu kojemu je izložen pušač i ljudi koji su u njegovoj neposrednoj blizini, takozvani pasivni pušači. Procijenjeno je da pušač udahne 20-80  $\mu\text{g}$  benzena, 80-160  $\mu\text{g}$  toluena, 10  $\mu\text{g}$  etilbenzena i 10-30  $\mu\text{g}$  ksilena po jednoj cigareti (114). Pasivni pušači su također izloženi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima i to 50% više nego neizloženi nepušači (115). Kod nepušača je izloženost benzenu uglavnom povezana sa ispušnim plinovima automobila i radom industrijskih postrojenja, dok je kod pušača 90% benzena prisutnog u njegovom organizmu porijeklom iz duhanskog dima (116). Sukladno navedenim istraživanjima, dokazana je povezanost između razvoja kronično opstruktivne plućne bolesti i mnogih imunoloških poremećaja u ljudi sa povećanim koncentracijama hlapljivih aromatskih ugljikovodika porijeklom iz duhanskog dima. Dolazi do statistički značajnog rasta ukupnog broja i postotka citotoksičnih  $\text{CD8}^+\text{T}$  limfocita u ljudi koji boluju od kronično opstruktivne plućne bolesti i puše, u odnosu na zdrave nepušače i one koji ne boluju od kronično opstruktivne plućne bolesti ali su pušači. U istom istraživanju dokazan je i statistički značajno veći izražaj perforina na razini citotoksičnih  $\text{CD8}^+\text{T}$  limfocita u ljudi koji boluju od kronično opstruktivne plućne bolesti i puše u odnosu na druge dvije skupine ispitanika, što ukazuje na važnost citolitičke molekule perforina u odnosu na mehanizme razvoja kronično opstruktivne plućne bolesti (117-119). Imunološki poremećaji na razini perforin pozitivnih stanica dokazani su na primjerima istraživanja povezanosti astme i statistički značajnog rasta izražaja regulacijskih  $\text{CD4}^+\text{T}$  perforin pozitivnih limfocita i citotoksičnih  $\text{CD8}^+\text{T}$  perforin

pozitivnih limfocita gdje dokazano perforin ima važnu ulogu u razvoju upalnoga procesa. Autori zaključuju da perforin igra odlučujuću ulogu membranskog citotoksičnog djelovanja CD8<sup>+</sup> stanica T i pokretanja procesa programirane stanične smrti prilikom razvoja kronično opstruktivne plućne bolesti i astme (120,121). Nadalje, istraživanja dokazuju važnu ulogu perforina u imunološkom odgovoru ljudi koji boluju od kronično opstruktivne plućne bolesti i izražaja NK perforin pozitivnih i NKT perforin pozitivnih stanica. Dokazana je povezanost razvoja kronično opstruktivne plućne bolesti kod pušača u odnosu na zdrave nepušače sa statistički značajnim rastom izražaja NK perforin i granzim B pozitivnih i NKT perforin i granzim B pozitivnih stanica, te statistički značajno veći perforin i granzim B citotoksični potencijal kod CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK, CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK i NKT (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) stanica u ispitanika koji boluju od kronično opstruktivne plućne bolesti u odnosu na one koji samo puše (122,123). Iz svih ovih istraživanja koja govore o važnosti perforina u imunološkom odgovoru ljudi na utjecaj okolišnih zagađivala kao što su hlapljivi aromatski ugljikovodici, u našem istraživanju bazirali smo se na određivanju sadržaja unutarstanične molekule perforina u CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> stanicama, kao i sadržaju ukupnog perforina u limfocitima periferne venske krvi svih ispitanika koji su okolišno i/ili profesionalno izloženi djelovanju hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena i izomera ksilena.

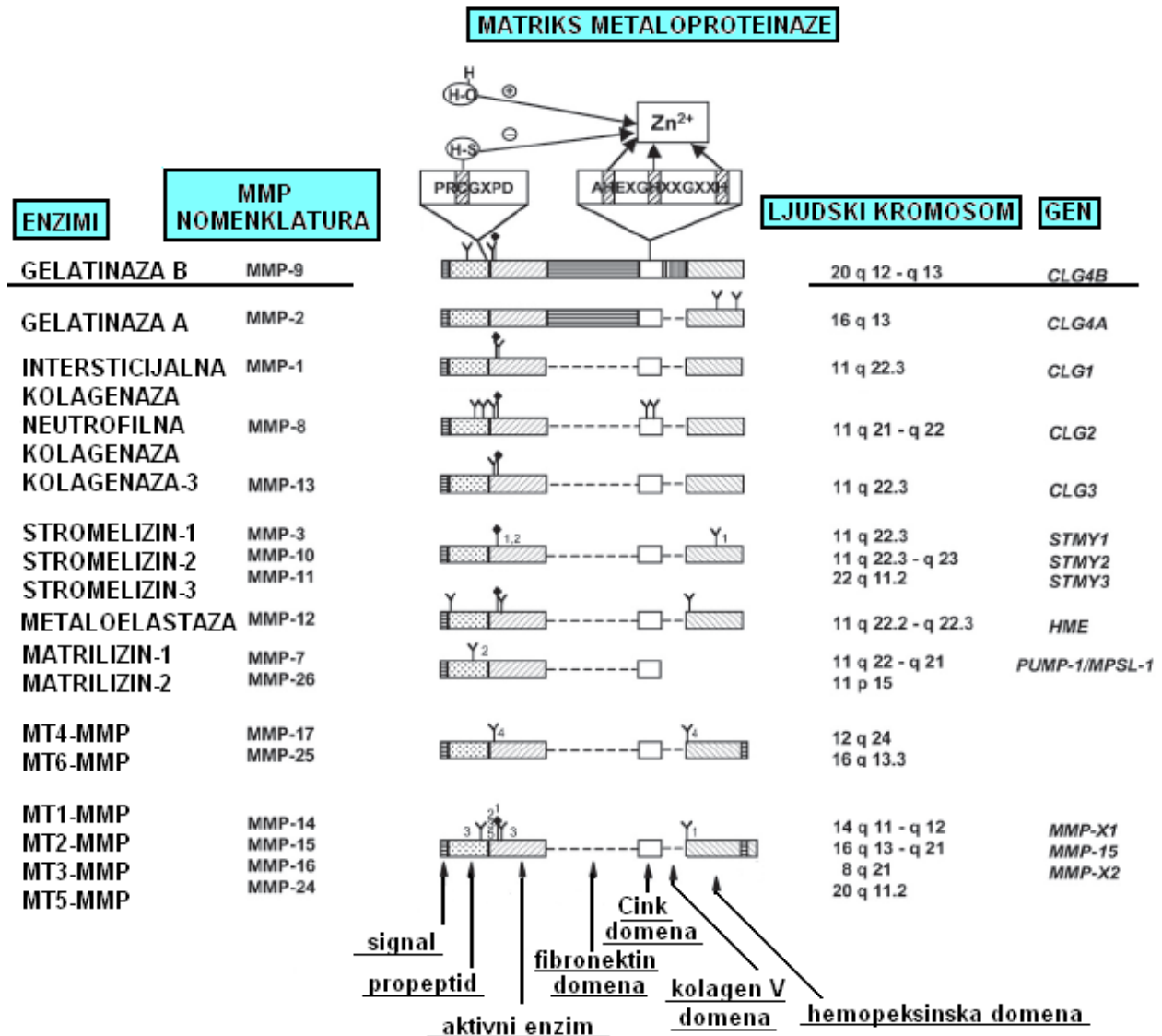
#### 1.4. Matriks metaloproteinaza – 9

Matriks metaloproteinaza –9 (MMP-9) ili gelatinaza B pripada porodici enzima koje zajedničkim imenom nazivamo matriks metaloproteinaze (124). Danas postoji zavidan broj od ukupno 24 više ili manje istraženih matriks metaloproteinaza, koje se prvenstveno dijele po strukturi svoje domene (Slika 6). MMP porodicu karakterizira prisutnost stabilnih proteinskih domena: prodomena, aktivnih domena i cink ovisnih domena. Svi matriks metaloproteinaza enzimi, s izuzetkom kod MMP-7 (Matrilizin–1) i MMP–26 (Matrilizin–2) enzima, sadrže karakterističnu hemopeksin domenu smještenu na karboksilnom kraju molekule. Membranski tipovi matriks metaloproteinaza enzima osim što sadrže male unutarstanične domene, vezane su za membrane pomoću hidrofobnog spoja na karboksilnom kraju molekule, te je u slučaju matriks metaloproteinaza-1 (Intersticijalna), matriks metaloproteinaza-2 (Gelatinaza–2), matriks metaloproteinaza-3 (Stromelizin–1) i matriks metaloproteinaze MT5 hidrofobni spoj upravo trans-membranska domena, dok je kod matriks metaloproteinaze-4 i matriks metaloproteinaze-6 veza s membranom uspostavljena preko glikozil-fosfatidil-inozitol spoja (125). Gelatinaze imaju karakterističnu gelatin vezujuću fibronektin domenu sastavljenu od tri fibronektinska odsječka, smještenih između aktivnog dijela domene i cink domene, a gelatinaza B sadrži karakteristične Ser/Thr/Pro (Serin/Treonin/Prolin) bogate kolagen V domene (Slika 6).

U usporedbi s ostalim matriks metaloproteinazama, gelatinaza B je strukturno najsloženija i najveća članica porodice (126). Cink ovisna domena u ljudskoj matriks metaloproteinazi–9 sadrži jako stabilnu sekvencu AHXGHXXGXXH, gdje su tri aminokiseline histidina odgovorne za koordinaciju katalize cinkovih iona. Zajedno s aktivnom domenom, cink domena formira aktivni dio enzima i neophodna je za samu

aktivnost enzima. Kod ljudskog oblika proaktivnog enzima, četvrti ligand cinka je cistein<sub>86</sub> vrlo stabilne sekvence PRCGXPD u sastavu proaktivne domene koja ima ključnu ulogu provođenja aktivnog enzima kroz mehanizam čiji početak djelovanja ovisi o prisutnosti aminokiseline cistein (127).

Funkcija hemopeksin domene još uvijek nije dovoljno razjašnjena, pretpostavlja se da ima ulogu definiranja specifičnosti enzimskog supstrata kolagenaze. Za gelatinazu B se zna da ima ključni ulogu vezanja tkivnih inhibitora metaloproteinaza TIMP-a (engl. Tissue inhibitors of metalloproteinases), te je fibronektin II domena odgovorna za vezivanje gelatina, lamina i kolagena tipa I i IV. To je suprotno od ostalih kolagenaza, gdje se kapacitet vezivanja kolagena povezuje s hemopeksin domenom. Sama aktivacija gelatinaze B je važna, jer se proaktivna gelatinaza B veže za kolagen tipa I i gelatin s daleko većim intenzitetom u odnosu na vezivanje za kolagen tipa IV u usporedbi s aktivnom formom enzima gelatinaze B. Kada promatramo matriks metaloproteinazu-9 s ostalim matriks metaloproteinazama na genetskoj i citogenetičkoj razini, vidimo da je lokalizacija mnogih MMP gena vezana za kromosom 11q22, te je zanimljivo da su sve ljudske membranske matriks metaloproteinaze smještene na različitim kromosomima, a gelatinaza B na specifičnom mjestu kromosoma 20q12-q13 (Slika 6) (128).



Slika 6 Struktura domene matricne metaloproteinaze (128)

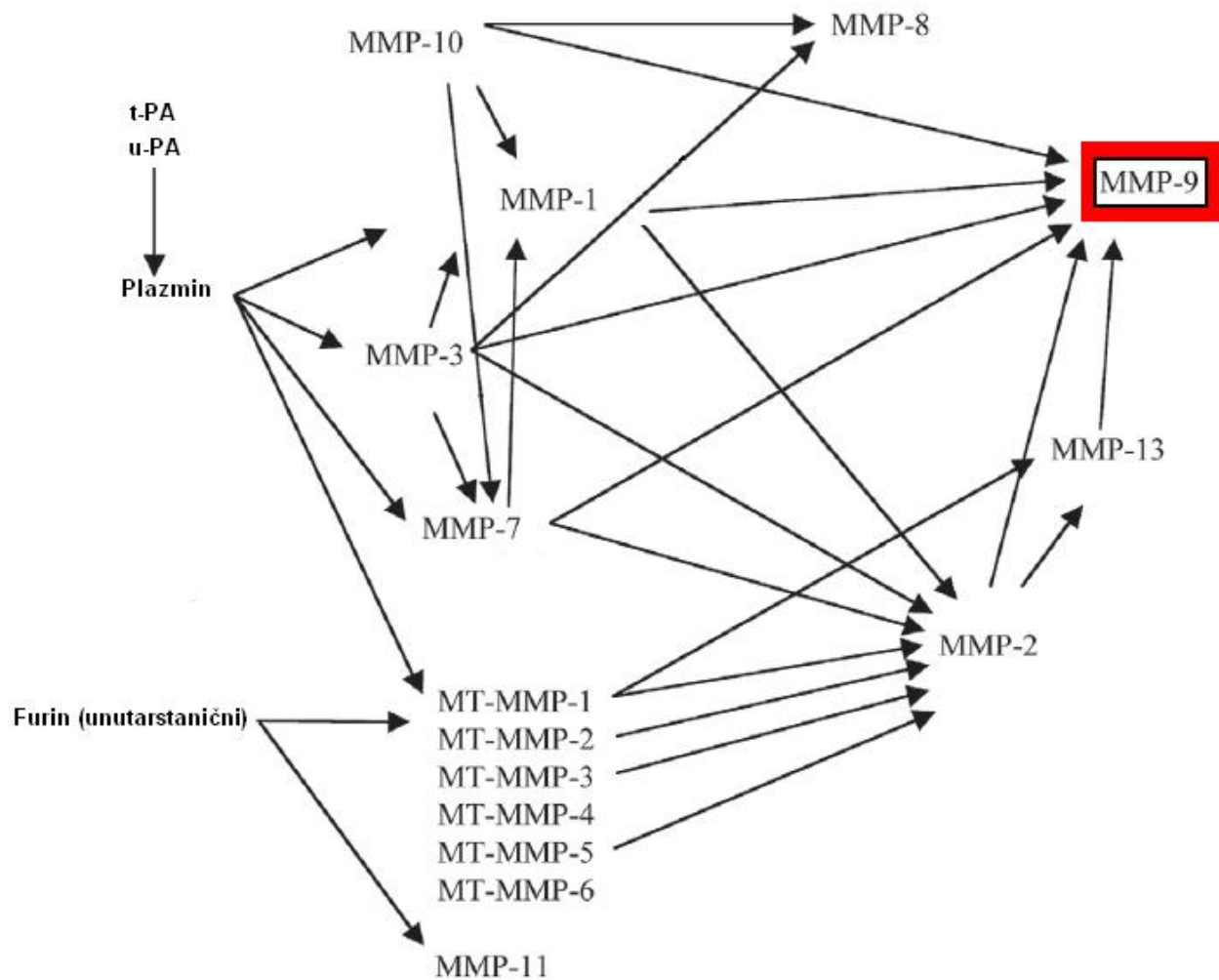
Gelatinaza B se sintetizira u mnogim vrstama stanica, kao što su keratinociti, monociti, tkivni makrofagi, polimorfonuklearni leukociti i mnoge vrste tumorskih stanica, te je intenzitet oslobađanja aktivnog enzima ovisan o količini pohranjenog enzima gelatinaze B u granulama navedenih stanica. Sintetiziranje može biti potaknuto od strane različitih pokretača kao što su polipeptidni faktori (EGF, PDGF, HGF/SF, Bfgf, amfiregulin), faktori

rasta (TGF- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ ; CTGF), citokini (IL-1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  IFN- $\gamma$ , IL-4,IL-10, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF), onkogeni, a isto tako sintetiziranje može biti potaknuto od strane mnogih fizioloških elemenata kao što su metalni ioni, reaktivni kisikovi radikali i hormoni (129-135). Nakon izlučivanja proaktivne gelatinaze B iz stanica, te same aktivacije enzima gelatinaze B, enzim ima važnu funkciju prilikom razgrađivanja komponenti van-staničnih matriks proteina, te regulacije aktivnosti mnogobrojnih proteina koji imaju odlučujuću ulogu u mnogim fiziološkim i patofiziološkim procesima. Primjer regulacije izlučivanja matriks metaloproteinaze-9 je najbolje istražen na primjeru neutrofila, stanica predstavnika nespecifične imunosti koje fagocitiraju ili direktno ubijaju ciljane stanice putem različitih mehanizama posredovanih lizozimom ili defenzinom. Kao upalne stanice, neutrofili su prva crta imunološke obrane ljudskog organizma na razne okolišne čimbenike, a prilikom upalotvornih procesa matriks metaloproteinaza-9 ima ključnu ulogu. Kao i ostale visoko specijalizirane imunološke stanice, limfociti T i B, monociti/makrofagi, dendritičke stanice, stanice prirodne ubojice NK (engl. Natural Killer Cells), sintetiziraju i pregrađuju matriks metaloproteinazu-9 u svojim granulama (guste peroksidaza pozitivne granule, rijetke peroksidaza pozitivne granule, prijelazne peroksidaza negativne granule, rijetke peroksidaza negativne granule, sekretorne vezikule). Sintetiziranje i pregrađivanje matriks metaloproteinazu-9 rezultira brzom imunološkom obranom u obliku oslobađanja velikih količina aktivnog enzima u vremenu od svega 15 minuta bez potrebe za procesima kao što su transkripcija i translacija (136-138). Sam proces oslobađanja enzima iz granula neutrofila, a samim time i početak aktivnog uključivanja enzima matriks metaloproteinaze-9 u mnogobrojne imunološke procese, prvi puta je dokazano nakon stimulacije kemokinom IL-8, a kasnije i specifičnim proteinom GCP-2 (139, 140).

Matriks metaloproteinaza-9 se sintetizira i oslobađa u formi proaktivnog enzima, neaktivne forme enzima do momenta uklanjanja propeptida. Taj propeptid ima vrlo stabilnu sekvencu PRCGXPD kod koje za aminokiselinu cistein odlučujuću ulogu koordinacije funkcije igra kataliza cinkovog iona ( $Zn^{2+}$ ). Koordinacija se zasniva na proteolizi propeptida gdje dolazi do promjene strukture, uslijed čega cink postaje dostupan hidrofilnim molekulama vode i enzimskom supstratu, a kao posljedica svega nastaje aktiviranje enzima matriks metaloproteinaze-9 (141). Aktivacija gelatinaze B može biti potaknuta različitim proteazama kao što su tripsin (uz obavezno posredovanje  $Ca^{2+}$  iona), kalikrein, katepsin G, neutrofilna elastaza, međutim, najčešće se aktivacija gelatinaze povezuje s djelovanjem drugih matriks metaloproteinaza na ostale članice iste porodice (141).

Gelatinaza B kao najveća i najkompliciranija matriks metaloproteinaza može biti potaknuta na aktivaciju od strane gotovo svih ostalih članica iste porodice, koje nakon procesa obrade u staničnim granulama kao izlučeni proaktivni enzimi i kasnije aktivni enzimi potiču pretvorbu ciljanog proaktivnog enzima u aktivni oblik enzima (Slika 7). Djelovanjem tkivnog aktivatora plazminogena t-PA (engl. tissue-type plasminogen activator) ili urokinaznog aktivatora plazminogena u-PA (engl. urokinaza plasminogen activator) na plazminogen nastaje plazmin. Plazminogen i u-PA su povezani s membranom, što dovodi do lokalizirane aktivacije matriks metaloproteinaza. Aktivirane metaloproteinaze zatim direktno aktiviraju druge metaloproteinaze što na kraju utječe na aktivaciju matriks metaloproteinaze-9, izuzetak čini samo MMT-26 koja se auto-aktivira. Membranski oblici matriks metaloproteinaza (MT-MMP-1...6) sadrže osjetljivi motiv furina u svojem propeptidu koji ih može aktivirati i unutarstanično. Motiv prepoznaje protein konvertaza, te se na taj način aktiviraju unutar stanice i izlučuju kao aktivni

enzimi ili se mogu vezati na površinu stanice kao aktivni enzimi. Danas se zna da reverzibilni procesi aktivacije matriks metaloproteinaza koji bi bili potaknuti od strane matriks metaloproteinaze-9 još nisu dokazani (Slika 7) (142).

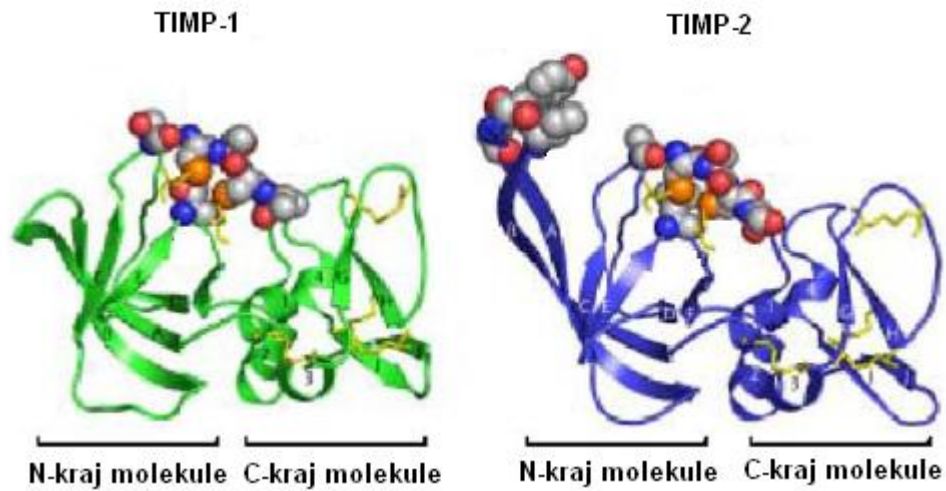


Slika 7 Model aktivacije enzima matriks metaloproteinaze-9 (128)

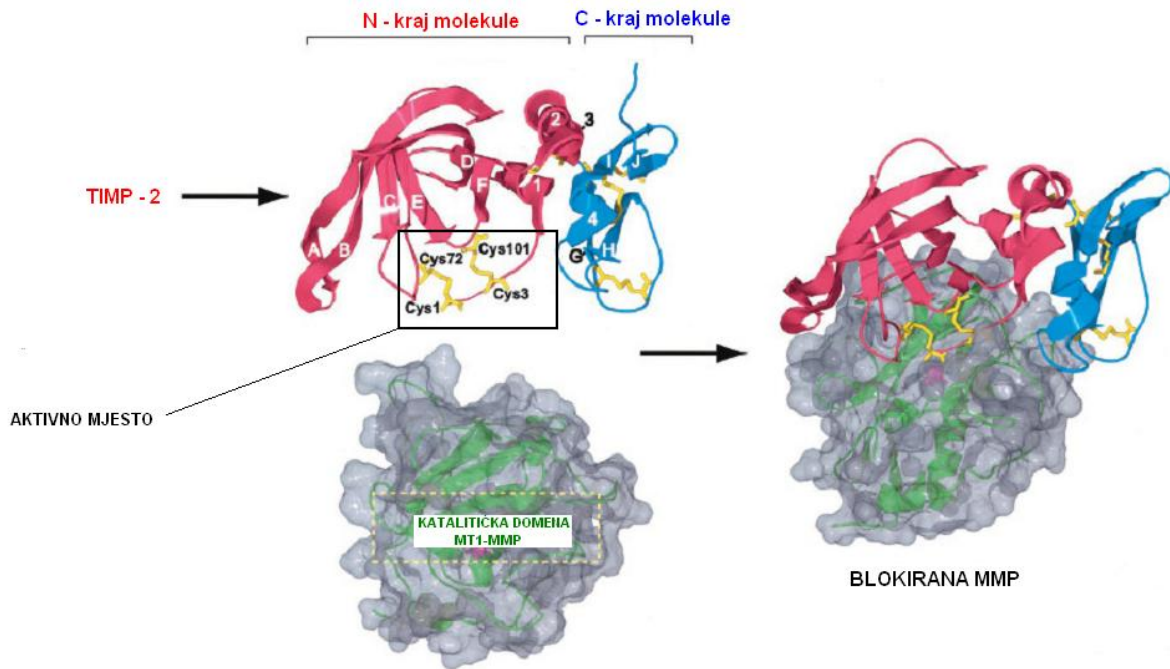
Jednom kada se galatinaza B izluči i aktivira, njezina se aktivnost može regulirati putem razgradnje samoga enzima ili putem kočenja aktivacije enzima. Humani  $\alpha$ 2-makroglobulin je poznati glikoprotein u plazmi koji se sastoji od 4 jednake pod-jedinice i opći je blokator endopeptidaza i većine proteinaza uključujući matriks metaloproteinaze u krvi i drugim tjelesnim tekućinama. Međutim, danas se zna da najveću ulogu u



regulaciji aktivacije gelatinaze B imaju tkivni inhibitori (TIMP proteini). Pripadaju obitelji sekretornih, stabilnih glikoproteina, relativne molekularne mase od 20-30 kDa koji blokiraju aktivnost matriks metaloproteinaza na način da se ne kovalentno vežu na aktivne oblike enzima matriks metaloproteinaza u izvanstaničnom prostoru. TIMP čine dvije domene, jedna na N i druga na C kraju molekule, gdje se domena na N kraju molekule sklapa kao neovisna jedinica i veže za aktivno mjesto matriks metaloproteinaza enzima i zaustavlja njihovu aktivnost. Postoje TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4 tkivni inhibitori čiji je izražaj reguliran tijekom razvoja i remodeliranja tkiva. TIMP-1 ima veliku sklonost vezivanja na gelatinazu B, dok ostali TIMP inhibitori imaju daleko manju sklonost vezivanja na gelatinazu B (Slika 8) (143). Blokiranje aktivnog enzima matriks metaloproteinaze-9 preko TIMP-1 inhibitora nastupa u trenutku vezanja N-kraja molekule TIMP -1 inhibitora s aktivnom C-domenom molekule enzima gelatinaze B (hemopeksin i kolagen tipa V domenom), s druge strane vezivanje TIMP-2 inhibitora za koji se zna da se veže za gelatinazu B s daleko manjim intenzitetom, uzrokuje blokadu aktivacije gelatinaze B u trenutku spajanja N-domene molekule gelatinaze B s TIMP-2 inhibitorom (Slika 9)(144). Ne samo da se TIMP inhibitori mogu vezati za aktivnu formu enzima matriks metaloproteinaze-9, nego se određenim intenzitetom mogu vezati i za proaktivni enzim matriks metaloproteinaze-9 i na taj način blokirati enzim gelatinazu B dok je u formi proaktivnog enzima (145).



Slika 8 Struktura molekule tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza TIMP-1 i TIMP-2 (143)

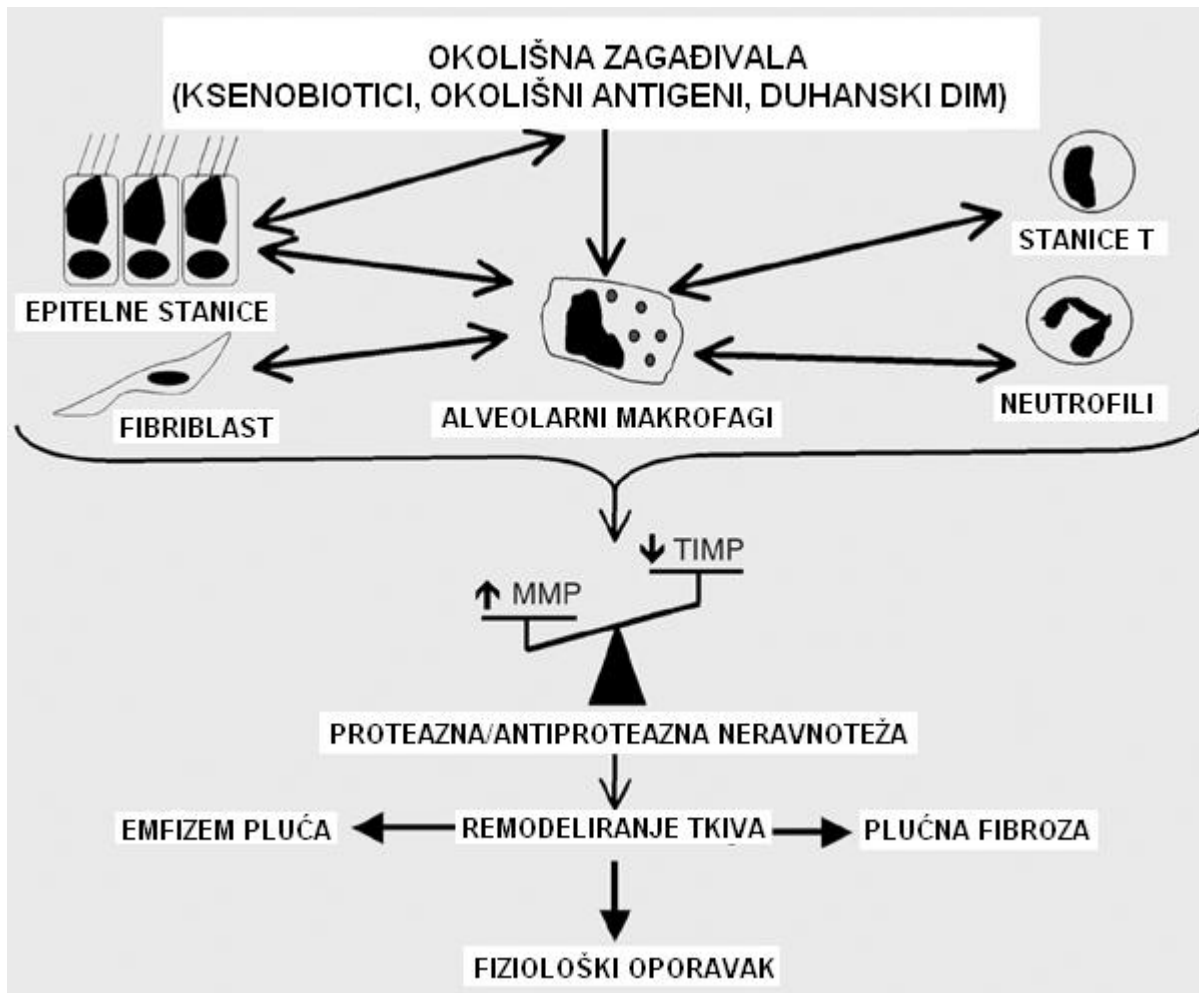


Slika 9 Blokiranje enzima MMP preko TIMP-2 inhibitora. TIMP-2 inhibitor čine dvije domene na N i C kraju molekule(144). Domena na N kraju molekule sklapa se kao neovisna jedinica, veže za aktivno mjesto MMP i blokira enzim MMP

Matriks metaloproteinaza-9 ima važnu ulogu u mnogim biološkim, fiziološkim, patofiziološkim i biokemijskim procesima ljudskog organizma. Njezina uloga vrlo je važna kod same biološke aktivacije u procesu organogeneze i patoloških procesa koji mogu nastati tijekom organogeneze, metabolizma izvanstaničnih matriks proteina (membranskih i stromalnih glikoproteina kao što su kolagen I, II i V, fibronektin, lamin) prilikom njihove razgradnje, rasta i razvoja. Matriks metaloproteinaza-9 ima jednu od ključnih uloga prilikom procesa reprodukcije, rasta i razvoja, upalni procesa izazvanih mnogobrojnim endogenim i egzogenim uzrocima, morfogeneze, popravka i remodeliranja tkiva prilikom ozljeda i upalnih procesa (146-148).

#### **1.4.1. Promjene u izražaju enzima matriks metaloproteinaze-9 kao enzimskog odgovora na okolišno zagađenje hlapljivim aromatskim ugljikovodicima**

Znanstvena istraživanja utjecaja okolišnih zagađivala na promjene u izražaju matriks metaloproteinaze-9 ukazuju na važnost tog enzima kao ranog imunološkog odgovora u ljudi na povećano okolišno zagađenje u prvome redu hlapljivim aromatskim ugljikovodicima kao što su benzen, toluen, etilbenzen i izomeri ksilena. U imunološkom odgovoru ljudi izazvanom djelovanjem okolišnih zagađivala na stanice T, plućne epitelne stanice, fibroblaste, alveolarne makrofage, može doći do narušavanja ravnoteže između izražaja, regulacije i produkcije matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora TIMP, a kao posljedica se javlja neravnoteža u aktivnosti serinskih proteaza i neutrofilnih elastaza što dovodi do razvoja teških oboljenja kao što su emfizem pluća, remodeliranja plućnoga tkiva i plućna fibroza (Slika 10) (149). Veći dio strukture bazalne membrane pluća čini specifičan kompleks kolagena tipa IV čija je funkcija održavanje integriteta zidova alveola, a kako matriks metaloproteinaza-9 ima sposobnost prekida kolagena, neophodan je čimbenik prilikom procesa degradacije struktura bazalne membrane zbog posjedovanja supstrata koji je specifičan za kolagen tipa IV (149). Poznata je činjenica da prekidanje izvanstaničnog matriksa može dodatno utjecati na plućnu strukturnu nestabilnost. Stanice u kontaktu s intaktnim izvanstaničnim matriksom normalno funkcioniraju, ali prilikom kontakta s promijenjenim ili prekinutim izvanstaničnim matriksom (MMP-9) aktiviraju brojne patofiziološke stanične signale koji uzrokuju promijenjene stanične odgovore (150).



MMP – matriks metaloproteinaza; TIPM – tkivni inhibitor metaloproteinaza

Slika 10 Remodeliranje tkiva i odgovor na razini upalnih stanica u MMP/TIMP neravnoteži uzrokovanoj djelovanjem okolišnih zagađivala (149)

Matriks metaloproteinaza-9 može cijepati različite proteine koji na pripadaju izvanstaničnom matriksu i dokazano generira biološke procese, a kako ima sposobnost oslobađanja različitih biološki aktivnih molekula s površine stanice (IL-6, TNF- $\alpha$ , L-selektin), predstavlja važan čimbenik u kontroli programirane stanične smrti i upalnih procesa na razini plućnih stanica (151-154). Epitelne plućne stanice, fibroblasti, alveolarni makrofagi izlučuju matriks metaloproteinazu-9, dok se neutrofili u istraživanjima navode kao glavni izvor na razini stanica (155). MMP-9 pripada

gelatinazama koje degradiraju elastin i kolagen tipa IV kao glavne komponente bazalnih membrana, te na taj način mogu utjecati na remodeliranje tkiva nakon oštećenja parenhima i alveola teškim oblicima bolesti okoliša kao što su astma i kronično opstruktivna plućna bolest (Slika 10) (156-159). Istraživanja ukazuju na opravdanost upotrebe matriks metaloproteinaze-9 kao ranog biološkog pokazatelja izloženosti ljudi karcinogenim hlapljivim aromatskim ugljikovodicima u ambijentalnom i/ili radnome okolišu. Određivanje stupnja izražaja enzima matriks metaloproteinaze-9 koristi se kao kvalitetni prognostički biološki marker određivanja rizika teškog oboljenja od NSCLC-a (engl. Non-small-cell lung cancer), kao vrste karcinoma pluća koja je često uzrokovana okolišnih karcinogenih spojevima kao što su hlapljivi aromatski ugljikovodici (160-163). Zabrinjavajuća je činjenica da na godišnjoj svjetskoj razini gotovo jedan milijun ljudi oboli od nekog oblika karcinoma pluća, gdje 75% svih karcinoma pluća otpada upravo na NSCLC (164-166). Izražaj enzima matriks metaloproteinaza-9 predstavlja jedan od najvažnijih enzimskih odgovora u ljudi koji je direktno povezan s određivanjem potencijala tumorskog metastaziranja i tumorske agresivnosti (167-169). Upravo navedeno ukazuje da se pojačani izražaj enzima matriks metaloproteinaze-9 u ljudskom organizmu povezuje sa zaštitnim i regenerativnim djelovanjem na nivou plućnih epitelnih stanicama, prilikom teških oštećenja plućnog epitela uzrokovanog kronično opstruktivnom plućnom bolesti, emfizemom pluća i astmom koje mogu biti uzrokovane raznim okolišnim zagađivalima kao što su BTEX spojevi, policiklički aromatski ugljikovodici (PAU) i DEP čestice (engl. Diesel exhaust particles) (170-173). U istraživanjima su autori dokazali direktan utjecaj i najmanjih koncentracija hlapljivih aromatskih ugljikovodika (u prvome redu benzena) na statistički povećan rizik za oboljenje od različitih oblika karcinoma (174-176). U skladu s time, matriks

metaloproteinaza-9 koja je kao proteinaza uključena u mnoge procese rasta, razvoja, podjele i migracije mastocita, prilikom direktnog kontakta limfocita T sa monocitima i mastocitima, te kod migracije neutrofila, eozinofila i stanica T preko bazalne membrane alveola tijekom oštećenja plućnog tkiva uzrokovanih toksičnim okolišnim zagađivačima, a istovremeno regulirana od strane pojačano izlučenih citokina kao što su faktor tumorske nekroze (engl. Tumor necrosis factor-TNF) i interferon (IFN) u slučajevima pojave različitih karcinoma pluća i upalnih procesa, predstavlja važan biološki faktor u određivanju potencijalnog rizika od ovako teških bolesti okoliša u ljudi koje mogu biti uzrokovane hlapljivim aromatskim ugljikovodicima (177-187).

## **1.5. Razvoj bolesti okoliša kao posljedice zagađenja okoliša hlapljivim aromatskim ugljikovodicima**

Hlapljivi aromatski ugljikovodici benzen, toluen, etilbenzen i izomeri ksilena (o-, m-, p-) predstavljaju zagađivala koja se u povećanim koncentracijama nalaze u atmosferi urbanih područja i predstavljaju spojeve koji povećavaju rizik od oboljenja ljudi različitim oblicima bolesti okoliša (188-190). BTEX spojevi ulaze u urbani okoliš iz različitih izvora, te su istraživanja dokazala statistički značajno veće koncentracije istih na područjima modernih gradova (191-193). Najznačajniji izvor BTEX spojeva iz okoliša je gradski promet koji iz godine u godinu bilježi streloviti porast u mnogim svjetskim i europskim metropolama (194). Predstavljaju dokazani okolišni čimbenik zabrinjavajućeg trenda rasta ukupnog broja oboljelih od različitih oblika bolesti okoliša, a u prvome redu bolestima dišnoga sustava koji je najizloženiji djelovanju hlapljivih aromatskih ugljikovodika u obliku teških restrikcija i opstrukcija disanja, te u konačnici razvijanje teških oblika astme, kronično opstruktivne plućne bolesti, emfizema pluća i različitih sijela karcinoma pluća (195-197). Karakteristični predstavnik hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzen, predstavlja okolišno zagađivalo koje dokazano uzrokuje oboljenja ljudi od akutne i kronične mijeloične leukemije i solidnih tumora, te su mnogobrojna epidemiološka istraživanja dokazala vezu između povećanih koncentracija benzena u atmosferi urbanih gradova sa razvojem različitih vrsta karcinoma pluća u ljudi koji žive i rade na takvim prometom opterećenim područjima (198-201). Kronična izloženost toluenu i izomerima ksilena koja je posebno rizična kod ljudi koji su svakodnevno profesionalno izloženi njihovom biološkom djelovanju u krugu radnoga okoliša (radnici u naftnim rafinerijama, tvornicama boja i lakova, tvornicama obuće), dovodi do teških oblika oboljenja na razini živčanog sustava, jetra i bubrega (202, 203). Teška oboljenja



dišnoga sustava i bubrega zabilježena su kod kronične okolišne izloženosti etilbenzenu koji se dokazano može odrediti u povećanim koncentracijama u radnome okolišu specifičnih zanimanja koja ga u svome radnome procesu koriste kao jednu od sastavnica organskih otapala (204,205). Istraživanja koja se bave dokazivanjem kompletne etiologije razvoja bolesti okoliša u ljudi koji su okolišno (radno i/ili ambijentalno) pod utjecajem hlapljivih aromatskih ugljikovodika, često se provode u obliku prospektivnih kohortnih epidemioloških istraživanja (206-208). Temelje se na uspoređivanju dobivenih podataka o koncentracijama hlapljivih aromatskih ugljikovodika u ljudi (urin, krv), podataka sabranih u anketama i upitnicima koji govore o načinu života i rada ljudi ukazujući na individualnu svakodnevnu izloženost ljudi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima (hrana, pušenje, način prijevoza, radno mjesto, zdravlje) sa podacima o izmjerenim koncentracijama hlapljivih aromatskih ugljikovodika u urbanome zraku (najčešće u obliku stacionarnog mjerenja upotrebom automatiziranih mjernih postaja) (209-211). Ono što su opisana istraživanja dokazala predstavlja poseban zdravstveni rizik za ljudsko zdravlje prilikom izloženosti hlapljivim aromatskim ugljikovodicima isključivo iz okoliša, koja se ne može izbjeći i predstavlja rastući problem cijele civilizacije (212, 213). Istraživanja su dokazala da benzen kao neophodni nusprodukt industrije i gradskoga prometa uzrokuje pojavu aplastične anemije, mijelodisplastičnog sindroma, akutnu i kroničnu mijeloičnu leukemiju u ljudi koji su isključivo okolišno izloženi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima (214, 215). Posebno se navedena oboljenja javljaju kod ljudi koji su uz okolišnu izloženost dodatno izloženi na svome radnome mjestu, u koncentracijama koje su izuzetno male (manje od 1 ppm benzena), a to ide u prilog činjenicama koje govore o opasnostima po ljudsko zdravlje prilikom

izloženosti hlapljivim aromatskim ugljikovodicima u samome životnom okolišu, kojega smo svakodnevno kao populacija sastavni dio (216- 218).

## 2. Cilj istraživanja

Imunološke promjene na nivou regulacijskog CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> staničnog izražaja i izražaja enzima matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) još uvijek nisu u dovoljnoj mjeri razjašnjene, poglavito u domeni utjecaja okolišnih zagađivala. Malo je podataka u literaturi o mogućoj korelaciji povišenih koncentracija hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena, o-ksilena i m/p-ksilena kao toksičnih i uvjetno karcinogenih spojeva u ljudi s promjenom funkcionalnosti imunološkog sustava na staničnoj i enzimskoj razini, te shodno tome i razvoja vrlo ozbiljnih bolesti okoliša. Vrlo je malo podataka vezanih za utjecaj okolišnih hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena, o-ksilena i m/p-ksilena na pojavu bolesti okoliša kao što su kronično opstruktivna plućna bolest i astma, te utjecaj na pojavnost ostalih poremećaja na nivou respiratornog sustava kao što su različiti stupnjevi razvoja restrikcija i opstrukcija disanja prije svega urbane i profesionalno izložene populacije. Sukladno navedenom, ciljevi ovog doktorskog rada bili su:

1. Odrediti postojanje statističkih razlika u koncentracijama toksičnih i uvjetno karcinogenih hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena, o-ksilena i m/p-ksilena u urinu između naših skupina ispitanika.
2. Ustanoviti postojanje promjena stanicama posredovane imunosti u odnosu na okolišnu izloženost hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenu, toluenu, etilbenzenu, o-ksilenu i m/p-ksilenu između naših skupina ispitanika.
3. Odrediti statističke razlike u izražaju (koncentracijama) enzima matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) u urinu između naših skupina ispitanika.
4. Odrediti prisutnost/odsutnost uzročno-posljedičnih veza u pojavnosti bolesti okoliša (prije svega kronično opstruktivne plućne bolesti) i koncentracija hlapljivih aromatskih ugljikovodika u urinu između naših skupina ispitanika.

Analizom navedenih parametara u ovom doktorskom radu, pridonijet ćemo boljem razumijevanju uzročno-posljedičnih veza između razine koncentracija hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena, o-ksilena i m/p-ksilena u urinu sa promjenama u imunološkom statusu i promjenama respiratornih funkcija (restrikcija, opstrukcija) koje mogu ukazivati na rizik oboljenja od astme i kronično opstruktivne plućne bolesti kao čestih bolesti okoliša. Prvi puta će se na znanstvenoj razini dobiti podaci o koncentracijama hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena, o-ksilena i m/p-ksilena u urinu usporediti sa izražajem enzima matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) kao potencijalnog ranog biološkog pokazatelja (Biomarkera) enzimskih promjena u ispitivane skupine ljudi s urbanog područja (Grad Rijeka) u odnosu na ispitivanu skupinu ljudi s ruralnog područja (Mali Lošinj) kao kontrolne skupine i profesionalno izložene skupine ispitanika (premazivača brodskih konstrukcija) iz Brodogradilišta „Viktor Lenac“ i Brodogradilišta „Kraljevica“. Važan doprinos ovoga znanstvenog rada jest i primjena znanstveno utemeljenih metoda određivanja utjecaja okolišnih zagađivala na izražaj enzima MMP-9 kao ranog biološkog pokazatelja opterećenosti okoliša istim, te bi dobiveni rezultati mogli biti od velike važnosti u dokazivanju svrsishodnosti i opravdanosti korištenja navedenih ranih bioloških indikatora u procjeni utjecaja okolišnog zagađivala na ljudsko zdravlje i mogućim profilaktičkim mjerama koje javno-zdravstvene institucije mogu provesti u cilju zaštite i unaprjeđenja ljudskoga zdravlja u cilju smanjivanja rizika izlaganja toksičnim i dokazano karcinogenim okolišnim zagađivalima.

### **3. Ispitanici i metode**

### 3.1. Ispitanici

Kao uzorke u ovome radu koristili smo prvi jutarnji urin (srednji mlaz) i perifernu vensku krv ispitanika muškoga spola. Svi ispitanici planiranih ispitnih skupina u ovome istraživanju, morali su zadovoljiti čitav niz kriterija koje smo sabrali u Anketi o zdravstvenom stanju, životnim i prehrambenim navikama ispitanika (Slika 11) koju je svaki ispitanik ispunjavao samostalno, te poseban Upitnik za određivanje BTEX u urinu ispitanika na čija je pitanja odgovarao svaki ispitanik zasebno, nama kao ispitivačima osobno prilikom uzorkovanja na terenu (Slika 12). Obavezni isključujući kriteriji (isključivanje iz daljnjeg istraživanja) koje je svaki ispitanik morao zadovoljiti da bi postao član ispitne skupine bili su slijedeći:

- punoljetan (18-65 godina)
- poslovno sposoban
- živi (prebivalište) na području istraživanja duže od 5 godina
- zaposlen na radnome mjestu duže od 5 godina (posebno se odnosilo na profesionalno izložene)
- nema zdravstvenih problema sa jetrom
- nema nikakvih zdravstvenih problema (zubobolja, glavobolja, bolovi u tijelu vrtoglavice, nesаницe, mučnine, proljevi) zadnjih mjesec dana
- ne upotrebljava nikakve lijekove zadnjih mjesec dana

- muškog spola
- nepušač
- u posljednjih godinu dana nije bolovao od bronhalne astme, kronične opstruktivne bolesti pluća, akutne respiratorne infekcije
- nije djelatnik u jednoj od naftnih rafinerija
- unutar 24 sata nije bio izložen bojama i lakovima za drvo ili metal. Kriterij se nije odnosio na ispitanike koji su profesionalno na radnome mjestu izloženi bojama, lakovima, otapalima i razrjeđivačima, osim u slučajevima kada su izvan radnoga mjesta unutar 24 sata bili izloženi istim.

#### **ANKETA O ZDRAVSTVENOM STANJU, ŽIVOTNIM I PREHRAMBENIM NAVIKAMA ISPITANIKA**

1. Spol (zaokružite)                      1. muški                      2. ženski
2. Koja je Vaša težina i visina?      visina \_\_\_\_\_ cm      težina \_\_\_\_\_ kg
3. Godina dolaska na područje sadašnjeg prebivališta: \_\_\_\_\_
4. Školska sprema
  1. bez završene osnovne škole
  2. osnovna škola
  3. srednja škola
  4. viša škola
  5. fakultet
  6. stručni magisterij
  7. magisterij znanosti
  8. doktorat znanosti
5. Koliko članova obitelji živi sa Vama u Vašem domu? \_\_\_\_\_ članova
6. Kako ocjenjujete materijalno stanje svoje obitelji
  1. mnogo lošije od prosjeka
  2. malo lošije od prosjeka
  3. prosječno
  4. malo bolje od prosjeka
  5. mnogo bolje od prosjeka
7. Da li ste u posljednjih godinu dana bolovali ili bolujete od slijedećih bolesti:
  1. bronhijalna astma
  2. kronična opstruktivna bolest pluća
  3. akutna respiratorna infekcija
  4. dermatitis
  5. bolesti uha
  6. bolesti jetre
8. Dali ste u posljednjih mjesec dana imali neki od ovih simptoma:
 

1. zubobolja	3. vrtoglavice	6. proljev
2. glavobolja	4. nesаницe	
3. bolovi u tijelu	5. mučnine	
9. Dali ste u zadnjih mjesec dana konzumirali neki lijek (ako je Vaš odgovor da, navedite naziv) ?
  1. DA \_\_\_\_\_
  2. NE
10. Kako bi ste općenito ocijenili svoje zdravlje
  1. odlično
  2. vrlo dobro
  3. dobro
  4. zadovoljavajuće
  5. loše
11. Kako bi ste svoje zdravlje usporedili sa zdravljem svojih vršnjaka
  1. znatno bolje
  2. bolje
  3. podjednako
  4. lošije
  5. znatno lošije
12. U odnosu na prošlu godinu, vaše zdravlje je sada
  1. znatno bolje
  3. podjednako
  5. znatno lošije





24. Da li ste zaposlenik u naftnoj industriji (INA)?

1. Da                      2. Ne

25. Da li pušite duhan

1. Da, svakodnevno                      3. Ne    5. Ne, ali puše drugi oko mene  
(pušim pasivno)

2. Da, povremeno                      4. Prestao pušiti

26. Pasivno pušite – izloženi ste duhanskom dimu

1. Kući    3. Drugdje  
2. Na poslu    4. Ne izlažem se duhanskom dimu

27. Da li pušite na radnom mjestu?

1. Da                      2. Ne                      3. Da, povremeno

28. Ako ste prestali pušiti, prije koliko godina ste prestali pušiti (posljednji put): \_\_\_\_\_

29. Prestali ste pušiti radi:

1. Zdravstvenih tegoba                      3. Štednje    5. Posla  
2. Obitelji    4. Hobija – sporta    6. Drugog razloga

30. Za prestanak pušenja imali ste stručnu pomoć:

1. Da                      2. Ne

31. Nakon prestanka pušenja, vaše zdravstveno stanje se:

1. Poboljšalo    2. Nastavilo se pogoršavati    3. Nije se promijenilo

32. Koliko cigareta dnevno popušite

1. Do 5                      2. 6 – 10                      3. 11 – 20                      4. Više od 20

33. Radi čega pušite

1. Smirenja    3. Zadovoljstva    5. Sigurnosti    7. Smanjenja  
apetita  
2. Želim ostaviti dojam                      4. Utjecaja društva                      6. Radoznalosti                      8. Drugo

34. S koliko godina starosti ste počeli pušiti: \_\_\_\_\_ godina

35. Pušite li pred djecom i mladeži:

1. Nikada    2. Ponekad, ali izbjegavam    3. Da

36. Što obično pijete uz cigaretu

1. Crnu kavu    3. Sokove    5. Žestoka pića  
2. Vino    4. Pivo    6. Vodu

37. Način uvlačenja dima u pluća

1. Duboko                      2. Umjereno                      3. Slabo                      4. Ne uvlačim dim

38. Zna li da je pušenje štetno?

1. Da                      2. Ne

39. Konzumirate li alkoholna pića?

1. Da                      2. Ne

40. Kako često pijete alkoholna pića?	ne	nekoliko puta godišnje	2-3 puta mjesečno	1. tjedno	više puta tjedno	1. dnevno	više puta dnevno	Koku količinu pića najčešće pijete? dcl		
pivo								2	3	5
vino								1, 5	2	3
žestoka pića								0, 3	0, 5	1

41. Da li se opijate?

1. Nikada se ne opijem    4. Stalno sam malo «pod gasom»  
2. Opijam se tjedno    5. Opijam se svakodnevno  
3. Opijem se povremeno, vikendom, pri izlasku ili nekom prigodom

42. Kada bi ste mogli, željeli bi ste prestati

1. Pušiti duhan    3. Uzimati droge  
2. Piti alkohol    4. Ništa od navedenog, dobro mi je ovako

43. Zaokružite što najbolje opisuje Vaše dnevne tjelesne aktivnosti:
1. Obično sjedim, hodam kraće vrijeme
  2. Stojim, hodam duže vrijeme
  3. Nosim lakše predmete, hodam stepenicama
  4. Teži fizički rad, nosim teške predmete i sl.
44. Zaokružite što najbolje opisuje Vaše aktivnosti u slobodno vrijeme:
1. Natjecateljski sport, aktivni trening
  2. Rekreacijski sport:
  3. Šetnja, lagani kućni poslovi i rekreacijski sport
  4. Sjedilačke aktivnosti (čitanje, gledanje TV...)
45. Koliko često konzumirate hranu sa roštilja na kruta goriva (ugljen, drva):
1. Ne konzumiram
  2. Nekoliko puta godišnje
  3. Jednom tjedno
  4. Dva puta tjedno
  5. Više puta tjedno
46. Da li doručkujete?
1. Da
  2. Ne
47. Koju vrstu masnoće najčešće koristite u pripremanju hrane (zaokružite samo jednu vrstu)
1. Biljno ulje
  2. Margarin
  3. Maslac, svinjska mast
  4. Maslinovo ulje
48. Da li koristite proizvode od punog zrna žitarica (integralni kruh, tjestenina...)?
1. Da, svakodnevno
  2. Da, povremeno
  3. Ne konzumiram
49. Ako konzumirate mlijeko ili mliječne proizvode (jogurt, kiselo mlijeko) to su najčešće proizvodi:
1. Punomasni (oko 3,2% m.m.)
  2. Djelomično obrani (manje od 1,5% m.m.)
  3. Nije mi važno
50. Kako često ste konzumirali slijedeće namirnice, jela i pića tijekom prošlog tjedna?

(Stavite X)	nikad	1-2 puta	3-5 puta	6-7 puta	više puta dnevno	Prosječna količina navedenih namirnica u jednom obroku (zaokružite)		
kruh, pecivo						manje od kriške	kriška	više od kriške
croissant, krafna						manje od 1 komada	komad	više komada
tjestenina						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
riža						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
krumpir kuhani						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
krumpir prženi/pečeni						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
muesli, corn-flakes						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
mlijeko, kakao						pola šalice	šalice	više šalice
tvrdi sir						manje od 50g	50g	više od 50g
jogurt						pola čašice	čašica	više od čašice
piletina, puretina						1 komad	2 komada	3 komada
junetina,						1 komad	2	3

svinjetina							komada	komada
riba						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
jaje prženo/kuhano						1 komad	2 komada	3 komada
salama, kobasica						manje od 50g	50g	više od 50g
zeleno lisnato povrće						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
rajčica, mrkva, paprika, cikla						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
grah, grašak, leća						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
jabuka, kruška, banana						manje od 1 komada	komad	više komada
narandža, mandarina						manje od 1 komada	komad	više komada
jagode						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
čokolada, keksi s čokoladom						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
kolači						manje od pola tanjura	pola tanjura	više od pola tanjura
gazirana pića, cola, fanta						manje od 2dcl	2dcl	više od 2dcl
voćni sok						manje od 2dcl	2dcl	više od 2dcl
kava						mala šalica	šalica	više od šalice
pivo						manje od 2dcl	2dcl	više od 2dcl
vino						manje od 2dcl	2dcl	više od 2dcl
žestoka pića						manje od 0,3cl	0,3cl	više od 0,3cl
ćevapčići, hamburger						mala porcija	srednja porcija	velika porcija
pizza						mala	srednja	velika
hot dog						1 komad	2 komada	3 komada

Slika 11 Anketa o zdravstvenom stanju, životnim i prehrambenim navikama ispitanika

## UPITNIK ZA ODREĐIVANJE BTEX U URINU ISPITANIKA

1. Šifra ispitanika : \_\_\_\_\_

Godina rođenja : \_\_\_\_\_ Spol :  M  Ž

2. Opća populacija

Nepušač bez pasivne izloženosti pušenju

Pasivni pušač – izloženost broju cigareta dnevno : \_\_\_\_\_

Pušač – broj popušanih cigareta dnevno : \_\_\_\_\_

3. Profesionalna izloženost BTEX :  NE  DA

4. Izloženost BTEX u slobodno vrijeme :  NE  DA – opisati :

\_\_\_\_\_

5. Da li se izloženost BTEX (cigaretni dim, profesionalna izloženost, izloženost u slobodno vrijeme) u zadnja 24 sata razlikuje od uobičajene ?

NE  DA – opisati : \_\_\_\_\_

6. Datum i vrijeme uzimanja uzorka urina : \_\_\_\_\_

7. Stanje uzorka urina zaprimljenog u laboratorij :  Intaktan  Izmijenjen  
Opisati: \_\_\_\_\_

### KONCENTRACIJE BTEX ODREĐENE GC/MS TEHNIKOM

Benzen: \_\_\_\_\_ ng/L

Toluen: \_\_\_\_\_ ng/L

Etilbenzen: \_\_\_\_\_ ng/L

m/p ksilen: \_\_\_\_\_ ng/L

o-Ksilen: \_\_\_\_\_ ng/L

Ime i prezime odgovorne osobe

\_\_\_\_\_

Datum :

\_\_\_\_\_

Slika 12 Upitnik za određivanje BTEX u urinu ispitanika

Nakon obrađenih svih Anketa o zdravstvenom stanju, životnim i prehrambenim navikama ispitanika i Upitnika za određivanje BTEX u urinu, pristupili smo odabiru onih ispitanika koji su zadovoljavali sve prije navedene kriterije. Ukoliko je bio prisutan isključujući kriterij, ispitanik nije postao dio ispitne skupine i isključen je iz daljnjih istraživanja. U ovom doktorskom radu obuhvatili smo skupinu ispitanika grada Rijeke (n=35) koja živi i radi u karakterističnom gradskom području (urbano područje), skupinu ispitanika koji žive i rade na otoku Malom Lošinju (n=35) kao karakterističnom nezagađenom području (ruralno područje), te profesionalno izložene ispitanike koji kao premazivači brodskih konstrukcija rade u Brodogradilištu „Viktor Lenac“ (n=35) i istu takvu skupinu ispitanika koji rade kao premazivači brodskih konstrukcija u pogonima Brodogradilišta „Kraljevica“ (n=28). Profesionalno izložene skupine ispitanika su svakodnevnim premazivanjem brodskih konstrukcija (brodogradilišta) izloženi djelovanju hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena i izomera ksilena putem inhalacije i kontaktno, upotrebljavajući boje, lakove, otapala, razrjeđivače i biocidne preparate koji dokazano (članak 129. stavka 3. Zakona o zaštiti okoliša; "Narodne novine" br. 110/07-Registar onečišćavanja okoliša) u svom sastavu imaju navedene hlapljive aromatske ugljikovodike kao organska otapala.

### **3.1.1. Prikupljanje uzoraka urina i periferne venske krvi ispitanika**

Uzorke urina i periferne venske krvi ispitanika uzimali smo u jutarnjim satima sredinom tjedna (srijeda, četvrtak), a analize uzoraka obavljali isti dan. U ovom prospektivnom kohortnom istraživanju, analizirali smo ukupno 133 reprezentativna ispitanika, koji su po čitavom nizu kriterija sadržanih u anketama i upitniku odgovarali predloženim ciljevima istraživanja. Svi su se uzeti uzorci periferne venske krvi ispitanika odradili isti dan, a ukoliko uzorke urina nismo analizirali isti dan zbog složenosti analiza, pohranili smo ih u specijalizirane, kemijski potpuno neutralne staklene bočice od 6 ml s gumenim čepom i aluminijskim poklopcem na +4 °C do slijedećeg dana. Sve smo uzorke pomoću profesionalnih mobilnih hladnjaka pri +4 °C s mjesta uzorkovanja otpremili u laboratorij radi analiza. Prilikom samoga uzimanja uzoraka urina i periferne venske krvi, odradila su se i sva spirometrijska mjerenja plućnih funkcija ispitanika po ciljanim ispitnim skupinama.

### 3.1.2 Odabrani kriteriji za ispitna područja uzorkovanja

Dugogodišnjim praćenjem kvalitete zraka od strane Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, te određivanjem koncentracija BTX-a u zraku na potpuno automatiziranoj mjernoj postaji ("INA-Mlaka"), došlo se do odabira Grada Rijeke kao područja objektivno povećanog rizika po zdravlje ljudi. Korištenjem postojeće baze podataka o koncentracijama BTX-a u urbanome zraku Grada Rijeke, te novih podataka mjerenja u planiranom razdoblju istraživanja (2009/2010), dobili smo uvid o mogućim uzročno-posljedičnim vezama s koncentracijama BTEX-a dobivenih u urinu naših skupina ispitanika sa urbanog područja Grada Rijeke. Kriteriji za odabir otoka Maloga Lošinja kao karakterističnog ruralnog (kontrolnog) područja, ogledalo se u činjenici da je to područje poznatog lječilišta i karakteristične mikroklimi za liječenje kronično opstruktivne plućne bolesti i bronhalne astme, te da nisu postojali preduvjeti za povećane koncentracije BTEX-a u zraku (nema industrije, mala frekvencija prometa). Zaposlenici Brodogradilišta „Viktor Lenac“ i Brodogradilišta „Kraljevica“ koji rade na poslovima pripreme i premazivanja brodskih konstrukcija bojama, otapalima i razrjeđivačima koji u svome sastavu sadrže hlapljive aromatske ugljikovodike kao što su benzen, toluen, etilbenzen i izomere ksilena (sigurnosno tehnički list za kemijske proizvode izrađen prema normi HRN ISO 11014-1:1997), odabrani su kao profesionalno izložena skupina ispitanika koja je na radnome mjestu svakodnevno izložena djelovanju hlapljivih aromatskih ugljikovodika (BTEX-a).



### **3.1.3. Ispitanici sa urbanog područja istraživanja-Grad Rijeka**

Grad Rijeka (Zapadna Hrvatska, sjeverni Jadran 14° 26' istočne zemljopisne dužine 45° 21' sjeverne zemljopisne širine) najvažnija i najveća morska luka u Hrvatskoj, treći po veličini grad u Hrvatskoj i administrativno središte Primorsko-goranske županije. U 2007. godini, kroz riječku je luku prošlo 13 milijuna tona tereta. S ostatkom Hrvatske i regije, Rijeka je dobro povezana cestovnim, željezničkim i avionskim vezama. 2004. godine je dovršen dio autoceste A7, koji povezuje Rijeku sa slovenskom granicom, dok je autocesta A6 Zagreb-Rijeka dovršena 2008. godine. Preko tunela Učka, kroz istoimenu planinu, Rijeka osigurava vezu sa brzom cestom A8/A9 (Istarski ipilon). Izgrađena je i nova riječka obilaznica što je povećalo intenzitet tranzitnog cestovnog prometa u neposrednoj okolini Grada Rijeka. Mnogi industrijski pogoni koji se nalaze u neposrednoj blizini Grada Rijeke kao što su INA–Rafinerija nafte Rijeka na lokaciji Mlaka koja se nalazi u samome centru grada, INA-Rafinerija nafte Urinj na području Općine Kostrena koja teritorijalno graniči sa Gradom Rijeka, Termoelektrana Rijeka u neposrednoj blizini, mnogobrojne gradske toplane koje koriste naftu kao pogonsko gorivo, dovoljno govore o činjenici neprestanog ispuštanja okolišnih zagađivala (BTEX-a) u urbanu atmosferu grada. Grad Rijeka se još u 19. stoljeću zbog svog zemljopisnog položaja i komercijalne dubine mora u Kvarnerskom zaljevu, razvio u jednu od najvećih srednjoeuropskih luka i moćno industrijsko središte. Početkom devedesetih dolazi do propasti industrije i naglog smanjenja lučkog prometa pa se u novom mileniju Rijeka počinje okretati razvoju turizma i uslužnog sektora (219). Međutim, samo središte rijeke je poznato po svome gustom i intenzivnom cestovnom prometu koji iz godine u godinu zbog rasta pomorskog prometa „Luke Rijeka“ opterećuje okoliš zagađivalima. Prvenstveno je riječ o BTEX spojevima koji kao nusprodukti nastaju u prometu radom

motornih vozila. Zbog nesređenog cestovnog prometa u centru grada pa i šire, sav teški kamionski i željeznički promet lučkog tereta kao jedinih prijevoznih sredstava, prolazi centrom grada gdje dolazi do porasta koncentracija zagađivala tijekom korištenja naftnih frakcija kao pogonskog gorivo. Poznata je činjenica, da je dugi niz godina u samome centru Grada Rijeke radila spomenuta INA–rafinerija nafte Rijeka na lokaciji Mlaka, koja se tek ove 2010. godine počela intenzivnije premještati na novu lokaciju INA-rafineriju Urinj, dok je pogon proizvodnje mazuta kao najteže frakcije procesa destilacije nafte ostao u proizvodnji INA–rafinerije nafte na Mlaci. Isto tako je poznato da BTEX spojevi nastaju kao nusprodukti rada naftnih rafinerija, te da se u većim količinama ispuštaju u neposredan okoliš samih rafinerija (220). Benzen je prirodni sastojak fosilnih goriva, te se u atmosferu emitira isparavanjem i/ili izgaranjem istoga. Promet je najznačajniji izvor benzena u atmosferi, no prerada nafte značajno pridonose ukupnoj razini. U urbanim područjima koncentracije benzena u vanjskoj atmosferi iznose 5-20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka. Na mjestima izvora kao što su prerada nafte, tankovi i pumpne stanice, što u slučaju Grada Rijeke znači sami centar grada, koncentracija benzena može biti viša i do nekoliko stotina  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka (220). Kao benzen, toluen je isto tako prirodni sastojak nafte, a nastaje izgaranjem i organskog materijala poput drva, nafte ili ugljena. Izvor toluena u urbanim sredinama je promet. No značajne količine u okoliš dolaze isparavanjem iz spremnika goriva i pumpnih stanica. U urbanim područjima koncentracija toluena u zraku iznosi 5-150  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , dok se više koncentracije mogu naći u blizini industrijskih izvora (220-223). Ksilena se kao još jedan hlapljivi aromatski ugljikovodik nalazi kao prirodan sastojak nafte, a nastaje izgaranjem organskog materijala poput drveta, nafte i ugljena. Sastav ksilena koji se dobiva iz nafte je 40% m-ksilena, 20% o-ksilena, 20% p-ksilena i 20% izomera etilbenzena. Promet u središtima urbanih sredina je najveći izvor

ksilena u zraku, kao i isparavanja iz spremnika goriva i pumpnih stanica što je pogotovo za okoliš problematično kada se rafinerija za obradu nafte nalazi u samome središtu grada kao što je slučaj u Gradu Rijeci. Ksilena se u vanjskoj atmosferi nalazi u koncentracijama od 1-100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka (220-223).

Iz svega navedenoga, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije uveo je u svoju praksu kao jedina ovlaštena institucija na širem području županije potpuno automatizirano mjerenje koncentracija BTX spojeva u okolišnom zraku koje se svakodnevno provodi već duži niz godina. O intenzitetu mjerenja i zagađivalima čije se koncentracije u određenim vremenskim razmacima mjere, najbolje govori slijedeća tablica (Tablica 1), u kojoj se nalaze nazivi automatiziranih postaja, vrste onečišćujućih tvari koje se mjere u zraku, od kojih je za odabir Grada Rijeka kao urbane sredine najznačajniji podatak o koncentracijama BTX spojeva i podatak o učestalosti samoga mjerenja.

Tablica 1 Naziv automatiziranih postaja, vrste okolišnih zagađivala i učestalost mjerenja u okolišnom zraku od strane Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko goranske županije

<b><u>Naziv postaje</u></b>	<b><u>Zagađivala čije se koncentracije mjere</u></b>	<b><u>Učestalost mjerenja</u></b>
INA Rafinerija Mlaka	SO <sub>2</sub> ,NO <sub>x</sub> ,O <sub>3</sub> ,H <sub>2</sub> S,CO,PM <sub>10</sub> , <b><u>BTX</u></b>	1h
INA Vrh Martinšćice	SO <sub>2</sub> ,NO <sub>x</sub> ,O <sub>3</sub> ,H <sub>2</sub> S,CO,PM <sub>10</sub> , <b><u>BTX</u></b>	1h
INA Paveki	SO <sub>2</sub> ,NO <sub>x</sub> ,O <sub>3</sub> ,H <sub>2</sub> S,CO,PM <sub>10</sub> , <b><u>BTX</u></b>	1h
Urinj	SO <sub>2</sub> ,NO <sub>x</sub> ,O <sub>3</sub> ,H <sub>2</sub> S,CO,PM <sub>10</sub>	1h
Kostrena	SO <sub>2</sub> ,dim,NH <sub>3</sub> ,UTT i sadržaj metala (Pb,Cd,Fe,Zn,Cu)	1h
Martinšćica	PM <sub>10</sub> , UTT i sadržaj metala (Pb,Cd,Fe,Zn,Cu)	1h

SO<sub>2</sub> - sumporni dioksid; NO<sub>x</sub> - dušični oksid; O<sub>3</sub> – ozon; H<sub>2</sub>S-sumporovodik; CO - ugljični monoksid; PM<sub>10</sub> - čestice veličine do 10 µm; UTT- ukupna taložna tvar; BTX - benzen, toluen, ksilen

Mjerenja koncentracija benzena u zraku za 2009. godinu na području Grada Rijeka zbirno su prikazana u tablicama 2, 3 i 4. Izmjerene koncentracije benzena u zraku slične su onima iz prethodnih godina. Za usporedbu, noviji rezultati mjerenja benzena u atmosferi gradova u Europi kreću se od 2,3 µg/m<sup>3</sup> zraka u predgrađima s malim prometom do 10,3 µg/m<sup>3</sup> zraka u centrima gradova s jakim intenzitetom prometa (220-223). Nažalost, naši zakonski propisi ne sadrže norme za toluen. Svjetska zdravstvena organizacija navodi preporučenu vrijednost od 260 µg/m<sup>3</sup> zraka kao tjedni prosjek, odnosno granicu mirisa od 1000 µg/m<sup>3</sup> zraka za vremenski period uzimanja uzoraka od 30 minuta (220-223). Mjerenja koncentracija toluena u zraku za 2009. godinu na području Grada Rijeka zbirno su prikazana u tablicama 5, 6 i 7. Činjenica je da Hrvatski

zakonski propisi i norme na sadrže ni dopuštene koncentracije za ksilen. Prema preporučenim vrijednostima od strane Svjetske zdravstvene organizacije, koncentracija za ksilen iznosi 870  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka kao godišnji prosjek, odnosno 4800  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka kao prosjek unutar 24 sata. Mjerenja koncentracija ksilena u zraku za 2009. godinu na području Grada Rijeka zbirno su prikazana u tablicama 8, 9 i 10.

Tablica 2 Zbirni rezultati praćenja koncentracija benzena ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka) na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog mjerenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka)

Vrijeme usrednjavanja	N	Obuhvat (%)	$C_{sr}$	$C_{50}$	$C_{98}$	$C_M$	Vrijeme dan	$C_{max}$ sat
24-sata	120	33	1,4	1,2	3,4	3,7	14.01.2009.	
1-sat	2766	31	1,4	1,0	5,9	21,2	19.01.2009.	17:00

N - broj podataka,  $C_{sr}$  – prosječna koncentracija, aritmetička sredina,  $C_M$  – najviša izmjerena vrijednost,  $C_{50}$  - medijan, vrijednost ispod koje je 50% podataka,  $C_{98}$  – 98 percentil, vrijednost ispod koje je 98% podataka, Obuhvat (%) - razdoblje ispitivanja pokriveno pouzdanim izmjerenim podacima

Tablica 3 Koncentracije benzena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog mjerenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka) u vremenu usrednjavanja 24 sata

<b>Mjesec</b>	<b>N</b>	<b>C<sub>sr</sub></b>	<b>C<sub>Min</sub></b>	<b>C<sub>Max</sub></b>	<b>Vrijeme C<sub>Max</sub></b>
Siječanj	18	2,4	0,7	3,7	14.01.2009.
Veljača	23	2,1	1,1	3,6	23.02.2009.
Ožujak	28	1,3	0,6	2,5	01.03.2009.
Travanj	30	0,8	0,3	1,9	02.04.2009.
Svibanj	8	0,5	0,3	0,7	08.05.2009.
Rujan	3	1,5	1,4	1,8	30.09.2009.
Listopad	10	1,3	0,9	2,2	07.10.2009.
Vrijednost za razdoblje	120	1,4	0,3	3,7	14.01.2010.

N - broj podataka, C<sub>sr</sub> – prosječna koncentracija, aritmetička sredina, C<sub>Max</sub> – najviša izmjerena vrijednost, C<sub>Min</sub> – najniža izmjerena vrijednost

Tablica 4 Koncentracije benzena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog mjerenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka) u vremenu usrednjavanja 1 sat

Mjesec	N	C <sub>sr</sub>	C <sub>Min</sub>	C <sub>Max</sub>	Vrijeme dan	C <sub>max sat</sub>
Siječanj	413	2,3	0,3	21,2	19.01.2009.	17:00
Veljača	528	2,1	0,3	10,6	23.02.2009.	21:00
Ožujak	653	1,3	0,2	10,0	13.03.2009.	19:00
Travanj	690	0,8	0,1	5,0	02.04.2009.	16:00
Svibanj	184	0,5	0,0	1,9	08.05.2009.	7:00
Rujan	61	1,6	0,5	6,0	30.09.2009.	20:00
Listopad	237	1,3	0,2	5,8	05.10.2009.	8:00
Vrijednost za razdoblje	2766	1,4	0,0	21,2	19.01.2010.	17:00

N - broj podataka, C<sub>sr</sub> – prosječna koncentracija, aritmetička sredina, C<sub>Max</sub> – najviša izmjerena vrijednost, C<sub>Min</sub> – najniža izmjerena vrijednost

Tablica 5 Zbirni rezultati praćenja koncentracija toluena ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka) na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog mjerenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka)

Vrijeme usrednjavanja	N	Obuhvat (%)	C <sub>sr</sub>	C <sub>50</sub>	C <sub>98</sub>	C <sub>M</sub>	Vrijeme dan	C <sub>max sat</sub>
24-sata	120	33	2,5	1,8	4,6	7,0	07.10.2009.	
1-sat	2766	31	2,5	1,3	9,5	22,8	21.01.2009.	11:00

N - broj podataka, Obuhvat (%) - razdoblje ispitivanja pokriveno pouzdanim izmjerenim podacima, C<sub>sr</sub> – prosječna koncentracija, aritmetička sredina, C<sub>M</sub> – najviša izmjerena vrijednost, C<sub>50</sub> - medijan, vrijednost ispod koje je 50% podataka, C<sub>98</sub> – 98 percentil, vrijednost ispod koje je 98% podataka

Tablica 6 Koncentracije toluena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog mjerenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka) u vremenu usrednjavanja 24 sata

<b>Mjesec</b>	<b>N</b>	<b>C<sub>sr</sub></b>	<b>C<sub>Min</sub></b>	<b>C<sub>Max</sub></b>	<b>Vrijeme C<sub>Max</sub></b>
Siječanj	18	2,4	0,7	3,9	19.01.2009.
Veljača	23	2,2	1,1	4,4	23.02.2009.
Ožujak	28	1,9	0,5	4,1	31.03.2009.
Travanj	30	1,7	0,4	4,5	08.04.2009.
Svibanj	8	1,3	0,7	2,4	08.05.2009
Rujan	3	3,8	3,0	4,7	30.09.2009.
Listopad	10	3,9	2,2	7,0	07.10.2009.
Vrijednost za razdoblje	120	2,5	0,4	7,0	07.10.2009

N - broj podataka, C<sub>sr</sub> – prosječna koncentracija, aritmetička sredina, C<sub>Max</sub> – najviša izmjerena vrijednost, C<sub>Min</sub> – najniža izmjerena vrijednost



Tablica 7 Koncentracije toluena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog mjerenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka) u vremenu usrednjavanja 1 sat

Mjesec	N	$C_{sr}$	$C_{Min}$	$C_{Max}$	Vrijeme dan	$C_{max}$ sat
Siječanj	413	2,4	0,2	22,8	21.01.2009.	17:00
Veljača	528	2,2	0,2	12,7	02.02.2009.	21:00
Ožujak	651	1,9	0,1	18,3	19.03.2009.	19:00
Travanj	692	1,7	0,1	15,8	02.04.2009.	16:00
Svibanj	184	1,2	0,1	6,3	06.05.2009.	7:00
Rujan	61	4,0	0,7	14,8	29.09.2009.	20:00
Listopad	237	4,1	0,4	16,9	05.10.2009.	8:00
Vrijednost za razdoblje	2766	2,5	0,1	22,8	21.01.2010.	11:00

N - broj podataka,  $C_{sr}$  – prosječna koncentracija, aritmetička sredina,  $C_{Max}$  – najviša izmjerena vrijednost,  $C_{Min}$  – najniža izmjerena vrijednost

Tablica 8 Zbirni rezultati praćenja koncentracija ksilena ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka) na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog mjerenja INA rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka)

Vrijeme usrednjavanja	N	Obuhvat (%)	$C_{sr}$	$C_{50}$	$C_{98}$	$C_M$	Vrijeme dan	$C_{max}$ sat
24-sata	107	29	3,1	2,7	9,7	21,3	26.01.2009.	
1-sat	2468	28	3,2	2,1	15,4	114,4	26.01.2009.	15:00

N - broj podataka, Obuhvat (%) - razdoblje ispitivanja pokriveno pouzdanim izmjerenim podacima,  $C_{sr}$  – prosječna koncentracija, aritmetička sredina,  $C_M$  – najviša izmjerena vrijednost,  $C_{50}$  - medijan, vrijednost ispod koje je 50% podataka,  $C_{98}$  – 98 percentil, vrijednost ispod koje je 98% podataka

Tablica 9 Koncentracije ksilena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog mjerenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka) u vremenu usrednjavanja 24 sata

Mjesec	N	$C_{sr}$	$C_{Min}$	$C_{Max}$	Vrijeme $C_{Max}$
Siječanj	18	4,2	1,8	21,3	26.01.2009.
Veljača	23	3,3	1,4	5,9	23.02.2009.
Ožujak	28	3,6	0,8	13,4	02.03.2009.
Travanj	30	2,5	1,0	5,4	15.04.2009.
Svibanj	8	2,1	1,0	6,2	07.05.2009
Vrijednost za razdoblje	107	3,1	0,8	21,3	26.01.2010.

N - broj podataka,  $C_{sr}$  – prosječna koncentracija, aritmetička sredina,  $C_{Max}$  – najviša izmjerena vrijednost,  $C_{Min}$  – najniža izmjerena vrijednost

Tablica 10 Koncentracije ksilena na području Grada Rijeke u 2009. godini (postaja imisijskog mjerenja INA-rafinerije nafte Rijeka lokacija Mlaka) po mjesecima ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka) u vremenu usrednjavanja 1sat

Mjesec	N	$C_{sr}$	$C_{Min}$	$C_{Max}$	Vrijeme dan	$C_{max}$ sat
Siječanj	413	4,2	0,6	114,4	26.01.2009.	15:00
Veljača	528	3,3	0,3	34,0	04.02.2009.	11:00
Ožujak	651	3,6	0,2	83,9	16.03.2009.	19:00
Travanj	692	2,6	0,2	37,8	06.04.2009.	18:00
Svibanj	184	2,1	0,0	26,2	07.05.2009.	14:00
Vrijednost za razdoblje	2468	3,2	0,0	114,4	26.01.2010.	15:00

N - broj podataka,  $C_{sr}$  – prosječna koncentracija, aritmetička sredina,  $C_{Max}$  – najviša izmjerena vrijednost,  $C_{Min}$  – najniža izmjerena vrijednost

Analizirane vrijednosti koncentracija benzena, toluena i ksilena u razini su koncentracija koje se mjere u urbanim i/ili industrijskim područjima većeg dijela Europe. Ovdje treba naglasiti da tehnološki razvijene zemlje imaju tolerantniju normu za benzen kao na primjer Italija  $8 \mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka, Engleska  $16,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka i Novi Zeland  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  zraka, dok je neke zemlje i nemaju, kao što je slučaj u Njemačkoj (221-223). Nepostojanje normi niti zakonskih propisa koji govore o graničnim vrijednostima istih u urbanoj atmosferi gradova na području Republike Hrvatske, za ovako potencijalno opasne okolišne spojeve kao što su benzen, toluen i ksilen, koji dokazano narušavaju ljudsko zdravlje, bio je jedan od ključnih razloga uvođenja biološkog mjerenja koncentracija tih spojeva u ljudskom urinu znanstveno utemeljenom metodom kao sastavnog dijela ove doktorske disertacije. Nepostojanje nikakvih podataka o koncentracijama etilbenzena kao još jednog potencijalno opasnog hlapljivog aromatskog ugljikovodika za ljudsko zdravlje, bio je još jedan od razlog uvođenja biološkog mjerenja koncentracija etilbenzena u urinu skupine ispitanika koji žive i rade na području Grada Rijeke, te dobiveni podaci predstavljaju prve znanstveno utemeljene podatke koncentracija etilbenzena u urinu ispitanika sa ispitivanog područja istraživanja. Iz svega navedenog, područje Grada Rijeke je odabrano kao karakteristično urbano područje relativno povećanog rizika po zdravlje ljudi koji žive i rade na istom, tako da smo upravo tu skupinu ispitanika odabrali kao urbanu skupinu uz obavezno zadovoljavanje svih odabranim kriterijima istraživanja.

### **3.1.4. Ispitanici sa ruralnog područja istraživanja-Grad Mali Lošinj**

Zbog inicijative mnogih ljudi, među kojima se posebno isticao prof. Ambroz Haračić, krajem 19. stoljeća pošumljene su velike površine otočnog kamenjara oko Malog i Velog Lošinja, gdje se sada ističu guste borove šume (Slika 13). Zahvaljujući prof. Ambrozu Haračiću, koji je 1880. godine u Malom Lošinju otvorio meteorološku stanicu i povezo je s meteorološkim institutom u Beču, pozornost svjetske javnosti već je tada bila usmjerena na specifičnost lošinjske klime, te je odlukom ministarstva zdravstva Austrougarske monarhije Lošinj davne 1892. godine proglašen klimatskim lječilištem. Veli i Mali Lošinj 1892. godine dobivaju status klimatskih lječilišta i oporavilišta. Za to je veliku zaslugu imao dr. Conrad Clark (1844.-1904.) koji dolaskom na Lošinj 1885. godine otkriva vrijednost Lošinja kao klimatskog mjesta. Na Lošinj dolazi sa sinom koji boluje od teškog oboljenja grla kojem se nakon tri tjedna boravka stanje čudesno poboljšava. Izuzetno blaga klima otoka Lošinja odražava se u velikom bogatstvu biljnih vrsta. Guste borove šume Malog Lošinja postale su zeleni pojas koji mjesto i luku štiti od vjetrova, posebice bure. Na predjelu uvale Čikat, šume su se postepeno pretvorile u perivoj. Danas je gusta borova šuma simbol Lošinja i od neprocjenjive je vrijednosti za razvoj zdravstvenog turizma (224). Predjel Čikat proglašen je park šumom, jer po čitavom nizu kriterija spada u posebno zaštićena područja u Republici Hrvatskoj. Veliku vrijednost ima i perivoj u Velom Lošinju koji je dao podići austrijski nadvojvoda Karlo Stefan Habsburški, gdje se nalazi oko 200 vrsta različitog drveća iz cijelog svijeta (225). Crveni križ Hrvatske otvara u Velom Lošinju Klimatsko lječilište za djecu koje 1962. godine postaje Dječja bolnica za alergijske bolesti dišnog sustava i kože, a 1968. godine postaje ista s odjelom za odrasle. 1993. godine gubi status Dječje bolnice i postaje Lječilište (226). Svjetski poznata vegetacija na otočju je izrazito bujna u sva četiri

godišnja doba. Prema istraživanjima prof. Haračića stanje vegetacije poboljšava klimu. Sama klima je u svijetu poznata po svojim mikroklimatskim komponentama koje su bile razlog osnivanja Lječilišta za liječenje plućnih oboljenja kao što su astma i kronična opstruktivna plućna bolest.



Slika 13 Kontrolno područje-Otok Mali Lošinj (224)

Iz svega navedenog, Otok Mali Lošinj je za ovo istraživanje izabran kao kontrolno područje, gdje zbog izostanka industrije i malog intenziteta prometa ima čisti okoliš koji je u svijetu poznat kao idealan za liječenje kako lakših poremećaja dišnih putova tako i za liječenje razvijenih teških plućnih bolesti kao što su astma i kronična opstruktivna plućna bolest. Svi ispitanici koji su postali dio kontrolne skupine ispitanika, mora li su odgovarati po svim odabranim kriterijima ovoga istraživanja, u protivnom su bili isključeni iz daljnjih obrada.

### 3.1.5. Profesionalno izloženi ispitanici Brodogradilišta „Viktor Lenac“

Brodogradilište „Viktor Lenac“ (Slika 14) ima status jednog od najvećih brodogradilišta u djelatnosti kao što je remont i preinaka na Sredozemlju. Osnovano je davne 1896. godine i ima dugogodišnju tradiciju produljenja brodova u čemu je pionir u svijetu. Smješteno je u Jugoistočnoj Europi, na sjeveru Jadranskog mora, 3 km južno od najveće hrvatske luke Rijeka, u uvali Martinšćica (227).



Slika 14 Brodogradilište „Viktor Lenac“ (227)

Jedna od glavnih djelatnosti brodogradilišta je popravak brodova i zaštita brodskih konstrukcija. Najveći se dio popravaka odnosi na zaštitno premazivanje konstrukcija brodova posebnim bojama namijenjenim za tu ulogu. Premazivači brodskih konstrukcija svakodnevno provode radne zadatke koji se sastoje od mehaničkih načina skidanja stare boje (upotreba specijalnoga pijeska, brušenje), pripreme velikih površina broskog trupa za završno nanošenje (uklanjanje masnoća i čišćenje) i samog proces nanošenja novih slojeva boja (temeljne i završne) koje štite trup broda od oštećenja i ubranog propadanja. U sastavu boja koje se koriste u Brodogradilištu „Viktor Lenac“

nalazi se čitav niz hlapljivih aromatskih ugljikovodika koji kontaktno preko kože, vidljivih sluznica ili putem udisanja hlapljivih komponenti u većim ili manjim količinama ulaze u organizam zaposlenika koji rade na tim radnim mjestima. U svome sastavu (sigurnosno-tehnički list za kemijske proizvode izrađen prema normi HRN ISO 11014-1:1997), boje sadrže slijedeće hlapljive aromatske ugljikovodike (Tablica 11).

Tablica 11 Postotak hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena i ksilena u bojama koje se koriste prilikom premazivanja brodskih konstrukcija

<b>Naziv boje</b>	<b>Benzinsko otapalo % (0,1 % benzena)</b>	<b>Ksilen %</b>	<b>Etilbenzen %</b>	<b>Toluen %</b>
NOA 10 M BUFF 175 BASE	/	10-15	1-5	/
SEA GRANDPRIX 500	/	10-25	/	/
EPICON T- 500 FINISH BASE	/	5-10	/	5-10
SEAFORCE 15	2,5-10	10-25	2,5-10	/
HEMPEL'S UNI PRIMER 13140	5-10	15-25	3-5	/

Osim korištenja boja, premazivači brodskih konstrukcija kao profesionalno izloženi zaposlenici, u velikim količinama manipuliraju organskim otapalima koje koriste u fazama skidanja masnoća sa brodskih konstrukcija i opreme, te u fazama razrjeđivanja navedenih boja. U svome sastavu (sigurnosno-tehnički list za kemijske proizvode izrađen prema normi HRN ISO 11014-1:1997; sigurnosno-tehnički list za kemijske proizvode izrađen prema odredbama pravilnika o ispunjavanju sigurnosno-tehničkog lista EC No.1907/2006, Reach, Annex II), otapala i razrjeđivači sadrže slijedeće hlapljive aromatske ugljikovodike (Tablica 12).

Tablica 12 Postotak hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena i ksilena u otapalima i razrjeđivačima koji se koriste prilikom pripreme površina za premazivanje i razrjeđenja boja

<b>Naziv proizvoda</b>	<b>Benzinsko otapalo % (0,1 % benzena)</b>	<b>Ksilen %</b>	<b>Etilbenzen %</b>	<b>Toluen %</b>
International Equipment Cleaner (otapalo)	10-25	25-50	2,5-10	/
Thinner VFE 35, Thinner 700 (razrjeđivač)	/	5-100	12,5-20	/
Marine Thinner (otapalo, razrjeđivač)	50-100	/	/	/



Unutar navedenih radnih procesa, profesionalno izloženi zaposlenici manipuliraju određenim količinama sredstava koja se koriste u svrhu suzbijanja rasta i naseljavanja organizama u obliku biocidnog premaza na osnovi kolofonija, pigmenata, punila i organskih otapala. U svome sastavu, sredstvo koje se koristi u brodogradilištu (Sigma-ALPHAGEN 240), po proizvođačkim specifikacijama (PPG Coatings S.A./N.V., Deurne-Antwerpen) sadrži 1-2,5 % etilbenzena i 2,5-10 % ksilena. Svakodnevno, putem radnih procesa pripreme brodskih površina za premazivanje i nanošenja samih boja na brodske komponente u obliku štrcanja (zračno i bez zraka), kistom ili valjkom, zaposlenici su putem kontakta (kože i vidljivih sluznica) i udisanja lako hlapljivih komponenti izloženi povećanom riziku unosa većih količina hlapljivih aromatskih ugljikovodika (BTEX-a) u svoj organizam. Iz svega navedenoga, odabrali smo one premazivače brodskih konstrukcija Brodogradilišta „Viktor Lenac“ (n=28) koji su zadovoljili sve odabrane kriterije predviđene ovim istraživanjem kao skupinu ispitanika koja je profesionalno izložena djelovanju hlapljivih aromatskih ugljikovodika (BTEX-a).

### 3.1.6. Profesionalno izloženi ispitanici Brodogradilišta „Kraljevica“

Brodogradilište „Kraljevica“ (Slika 15) osnovano je davne 1792. godine i predstavlja kolijevku hrvatske industrijalizacije. Nosi epitet prvoga brodogradilišta na istočnoj obali Jadranskoga mora. Smješteno je u središtu Grada Kraljevice u Primorsko-goranskoj županiji i predstavlja jedan od važnih poslovnih subjekata u Republici Hrvatskoj (228).



Slika 15 Brodogradilište „Kraljevica“ (228)

Glavna djelatnosti brodogradilišta je popravak brodova. Najveći dio poslova vezanih za popravak, kao i u Brodogradilištu „Viktor Lenac“, odnosi se na mehanički način skidanja stare boje (upotreba specijalnoga pijeska, brušenje), pripreme velikih površina broskog trupa za završno nanošenje i sam proces nanošenja novih slojeva boja koje štite trup broda od oštećenja i ubrzanog oksidiranja (korodiranja). Kako se u Brodogradilištu „Kraljevica“ koriste iste boje, razrjeđivači, otapala i biocidni premazi nabavljeni na Hrvatskome tržištu, postotak hlapljivih aromatskih ugljikovodika koji se nalazi u sastavu istih naveden je u tablicama 11 i 12.

Iz svega navedenoga, odabrali smo one premazivače brodskih konstrukcija Brodogradilišta „Kraljevica“ (n=7) koji su zadovoljili sve odabrane kriterije predviđene ovim istraživanjem, kao profesionalno izloženu skupinu ispitanika koja je tijekom svoga radnoga dana i unutar radnih procesa izložena djelovanju hlapljivih aromatskih ugljikovodika (BTEX-a).

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Metode za određivanje promjena imunološke reakcije**

#### **3.2.1.1. Analiza fenotipske pripadnosti mononuklearnih limfatičnih stanica**

##### **metodom imunofluorescencije uz očitavanje protočnom citometrijom**

Metodom imunofluorescencije uz očitavanje protočnom citometrijom, odredili smo fenotip stanica koristeći se FACSscan protočnim citometrom (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), pomoću kojega se mogu pratiti i analizirati pet različitih staničnih parametara: FCS (parametar veličine stanica), SSC (parametar granuliranosti-gustoće stanica), te valnu dužinu i intenzitet tri različita emisijska spektra fluorescentnih boja: FL1 (intenzitet zelene fluorescencije), FL2 (intenzitet narančaste fluorescencije) i FL3 (intenzitet crvene fluorescencije).

Nakon pripreme stanica na ledu i brojanja stanica, u svaku smo probu stavili  $1 \times 10^6$  stanica po mililitru i pristupili direktnoj metodi obilježavanja. Direktna imunofluorescencija podrazumijeva korištenje monoklonskih protutijela za obilježavanje staničnih biljega koja su izravno vezana za fluorescentnu boju. Metoda imunofluorescencije se zasniva na konjugaciji protutijela fluorescentnim bojama, čime se dokazuje specifičnost epitopskog vezivanja antigena za protutijelo, te fluorescentna boja koja je potaknuta ultraljubičastom ili laserskom svjetlošću određene valne duljine, počinje emitirati vlastitu svjetlost pomoću koje se tada antigen i dokazuje.

Broj od  $10^6$  stanica smo resuspendirali u 50  $\mu$ l hladnog FACS pufera (sastav pufera: 1x PBS-engl. phosphate buffered saline; GIBCO™; Invitrogen; Carlsbad; USA + 5% FBS-engl. fetal bovine serum; GIBCO™; Invitrogen; Carlsbad; USA + 0.1% NaN<sub>3</sub>) i u suspenziju je dodano 1; 2; 2,5; ili 5  $\mu$ g monoklonskih protutijela. U našem radu koristili

smo slijedeća protutijela: FITC-om (engl. fluorescein isothiocyanate) vezana protu-CD3 i PE (engl. phycoerythrin) vezana protu-CD16+56 monoklonska protutijela za detekciju stanica NK, NKT i T (Becton Dickinson, Biosciences Pharmingen; USA). Za detekciju regulacijskih T<sub>regs</sub> (engl. Human Regulatory T cell) stanica koristili smo stanični kit (engl. Human Regulatory T cell Staining KIT; eBioscience; San Diego; USA) koji sadrži FITC-CD4, APC-CD25 i PE-Foxp3 monoklonska protutijela po protokolu 3.2.1.2.

### **3.2.1.2. Priprema regulacijskih stanica T ( $T_{regs}$ ) za analizu metodom imunofluorescencije uz očitavanje protočnom citometrijom**

Prije obilježavanja regulacijskih stanica T (engl. Human Regulatory T cell -  $T_{regs}$ ), napravili smo radne otopine razrjeđenjem koncentrata za fiksaciju i permeabilizaciju (Fixation/Permeabilization Diluent; eBioscience; San Diego; USA) u omjeru 1:3. Dodali smo 100  $\mu$ l pripremljenih stanica (1 milion) u svaku epruvetu i 20  $\mu$ l CD4/25 (1 $\mu$ g CD4 i 0,125  $\mu$ g CD25; eBioscience; San Diego; USA). Zatim je slijedila faza inkubacije u vremenu od 30 minuta na 4° C u tami. Nakon ispiranja u hladnome puferu (engl. Flow Cytometry Staining Buffer; eBioscience; San Diego; USA) i centrifugiranja 5 min. na 2000 okretaja/min., te odlijevanja supernatanta (tekućine iznad staničnog taloga), resuspendirane stanice smo dodali u 1 ml svježe pripremljenog pufera (Fixation/Permeabilization Diluent; eBioscience; San Diego; USA). Nakon miješanja (Vortex), slijedila je inkubacija stanica od 60 minuta na 4° C u tami. Zatim smo izvršili ispiranje stanica dodavanjem 1 ml pufera (Fixation/Permeabilization Diluent; eBioscience; San Diego; USA) i postupak ispiranja ponovili 2 puta, centrifugirali 5 min. na 2000 okretaja/min.. Uslijedila je faza blokiranja dodavanjem 2  $\mu$ l štakorskog seruma (2%) u 100  $\mu$ l volumena kroz vrijeme od 15 minuta. Dodali smo 20  $\mu$ l anti-human Foxp3 (PCH101; eBioscience; San Diego; USA) protutijela ili 20  $\mu$ l štakorskog protutijela IgG2a izotipa kao kontrole (Isotype; Rat IgG<sub>2a</sub>; eBioscience; San Diego; USA) i inkubirali na 4° C kroz vrijeme od 1 h.

### **3.2.1.3. Analiza regulacijskih stanica T ( $T_{regs}$ ) metodom imunofluorescencije uz očitavanje protočnom citometrijom**

Za određivanje regulacijskih stanica T (engl. Human Regulatory T cell -  $T_{regs}$ ) iz periferne venske krvi naših ispitanika, koristili smo metodu imunofluorescencije uz očitavanje protočnim citometrom. Nakon metode pripreme T regulacijskih stanica na ledu (3.2.1.2.), pristupili smo direktnoj metodi obilježavanja regulacijskih T stanica ( $T_{regs}$ ) koristeći se staničnim kitom (engl. Human Regulatory T cell Staining KIT; eBioscience; San Diego; USA) koji sadrži FITC-CD4, APC-CD25 i PE-Foxp3 monoklonsko protutijelo. Direktna imunofluorescencija podrazumijeva korištenje monoklonskih protutijela za obilježavanje staničnih biljega koja su izravno vezana za fluorescentnu boju. Metoda imunofluorescencije se zasniva na konjugaciji protutijela fluorescentnim bojama, čime se dokazuje specifičnost epitopskog vezivanja antigena za protutijelo, te fluorescentna boja koja je potaknuta ultraljubičastom ili laserskom svjetlošću određene valne duljine, počinje emitirati vlastitu svjetlost pomoću koje se tada antigen i dokazuje.

Stanice smo zatim resuspendirali u odgovarajućem volumenu pufera (engl. Flow Cytometry Staining Buffer; eBioscience; San Diego; USA) i analizirali metodom imunofluorescencije uz očitavanje na protočnom citometru (FACSCalibur, Becton Dickinson; USA) upotrebljavajući CELLQuestPro informatičku podršku (Macintosh, Quadra 650).

#### 3.2.1.4. Određivanje unutarstaničnog sadržaja perforina

Kako je perforin unutarstanični antigen, prije samoga postupka obilježavanja staničnu membranu treba fiksirati i permeabilizirati. Staničnu membranu smo fiksirali 4% otopinom para-formaldehida (sastav otopine: para-formaldehid + Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O + NaOH + glukoza) koja se dodaje na talog (100 µl) i ostavi 10 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice smo dva puta isprali u FACS puferu i pohranili u 100 µl saponinskog pufera (sastav pufera: PBS + SAPONIN; Fluka Chemicals (Biochemika); New Jersey; USA + NGS-engl. normal goat serum; PCN5000; GIBCO™; Invitrogen; Carlsbad; USA + EGTA-engl. ethylene glycol tetraacetic acid; GIBCO™; Invitrogen; Carlsbad; USA) radi permeabilizacije stanične membrane. Slijedila je faza inkubiranja od 20 minuta i centrifugiranja od 5 minuta na 2000 okretaja/min., te smo na talog dodali monoklonska mišja protu–humana protu–perforinska protutijela u dozi od 3 µl po uzorku, razrijeđena u 100 µl saponinskog pufera i dodatno inkubirali 30 minuta na +4° C. Nakon faze inkubacije, uzorke smo dva puta isprali u saponinskom puferu da bi uklonili nevezana primarna protutijela. Na talog smo dodali sekundarno protutijelo GAMA–FITC (engl. Goat–Anti–Mouse) obilježeno fluorescin–izotiocijanatom (FITC) (Becton Dickinson, Biosciences Pharmingen; USA) u dozi od 1 µg po uzorku, razrijeđeno u 100 µl saponinskog pufera, inkubirali 30 minuta na +4° C i ponovno dva puta isprali u saponinskom puferu. Na talog smo dodali 0,5 ml FACS pufera, čija je funkcija zatvaranje stanične membrane permeabilizirane saponinom. Na tako dobiveni talog dodali smo membranske biljege PE–obilježene protu–CD3<sup>+</sup>, protu–CD4<sup>+</sup>, protu–CD8<sup>+</sup>, protu–CD16<sup>+</sup> i protu–CD56<sup>+</sup> (Becton Dickinson, Biosciences Pharmingen; USA)., te metodom imunofluorescencije uz očitavanje na protočnom citometru (FACSCalibur, Becton Dickinson; USA) odredili sadržaj unutarstanične



molekule perforina u CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD56+ stanicama, kao i sadržaj ukupnog perforina u limfocitima periferne krvi svih ispitanika.

### **3.2.2. Metoda za određivanje enzimskog odgovora**

#### **3.2.2.1. Metoda enzimskog imunoeseja (ELISA) za određivanje stupnja izražaja enzima matriks metaloproteinaze-9**

Za određivanje koncentracije enzima matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) u ljudskome organizmu, u ovome radu smo koristiti metodu enzimskog imunoeseja tzv. ELISA eseja (engl. Enzyme-linked immunosorbent assay) (Slika 16) (229-232). Ovako koncipirana, znanstveno utemeljena metoda korištena je za precizno određivanje izražaja navedenog enzima koristeći se urinom kao ispitivanim medijem, te specijalnim i visoko selektivnim ELISA kitom proizvedenim točno za tu ulogu (engl. The RayBio® Human MMP-9 ELISA -Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, USA). Navedeni kit smo koristili kao visoko selektivni *in vitro* ELISA kit za kvantitativno mjerenje koncentracija proaktivne i aktivne forme enzima matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) u ljudskom urinu. Kit sadrži specifična protutijela za ljudski tip enzima matriks metaloproteinaze-9 postavljena na stjenke specijalne mikroploče od ukupno 96 jamica (engl. MMP-9 Microplate; Item A; The RayBio®). Standarde (RayBio®) i uzorke urina smo pipetirali specijalnim mikro-pipetama (Ependorf, Hamburg, Germany) u jamice mikroploče, te se je proaktivna i aktivna forma enzima matriks metaloproteinaze-9 koja je prisutna u uzorku vezala za imobilizirana protutijela na stjenkama samih jamica. Jamice smo zatim isprali specijalnim potpuno automatiziranim ispiračem mikroploča (TECAN-hydroflex, Austria) po preporukama proizvođača, te smo dodali biotinizirana MMP-9 protutijela (engl. Anti-human MMP-9 antibody). Nakon faze ispiranja nevezanih biotiniziranih protutijela, u jamice smo dodali HRP-vezani streptavidin koji je sastavni dio istoimenoga ELISA kita. Slijedila je faza ispiranja jamica mikroploče automatiziranim ispiračem po

preporukama proizvođača i dodavanje TMB (tetrametilbenzidin, RayBio®, USA) supstrata za obojenje u plavu boju svih reakcija u kojima se za prisutna protutijela vežu proaktivne i aktivne forme enzima matriks metaloproteinaze-9 koje su se nalazila u uzorku. U posljednjoj fazi smo dodali karakterističnu otopinu za zaustavljanje reakcije (engl. Stop Solution) koja je sastavni dio istoga ELISA kita i koja mijenja boju reakcije iz plave u žutu, a sam intenzitet žute boje koji je proporcionalan apsorbanciji prisutnih proaktivnih i aktivnih formi enzima matriks metaloproteinaze-9 u uzorku očitali smo odmah nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije na specijalnom čitaču apsorbancije (TECAN-sunrise, Austria) pri 450 nm i kontrolno na 625 nm po preporukama proizvođača. Pomoću specijalnog informatičkog programa (TECAN, Magellan, USA) koji se kao informatička podrška koristi prilikom očitavanja apsorbancija i očitavanja koncentracija na TECAN čitačima, srednje vrijednosti apsorbancija proaktivnih i aktivnih formi enzima matriks metaloproteinaze-9 u našim uzorcima očitavali smo logaritamskim programskim (TECAN, Magellan, USA) spuštanjem na apcisu kao koncentracije proaktivnih i aktivnih formi enzima matriks metaloproteinaze-9 izraženih u pg/ml urina. Svi su se standardi, uzorci i slijepi probe radili u duplikatima (Tablica 13), gdje smo pomoću Magellan programa određivali srednju vrijednost apsorbancija za svaki standard, uzorak i slijepu probu. Koncentracije proaktivnih i aktivnih formi enzima matriks metaloproteinaze-9 u uzorcima očitavale su se iz dobivenih karakterističnih krivulja srednjih vrijednosti apsorbancija za niz razrjeđenja standarda, koje su se posebno radile u duplikatu za svaku novu grupu uzoraka po proizvođačkim preporukama (Slika 17).

## ELISA

### Priprema



### Inkubacija



s - faza razrijeđenja standarda

### Završna obrada



### w - faza ispiranja



### Dodavanje substrata



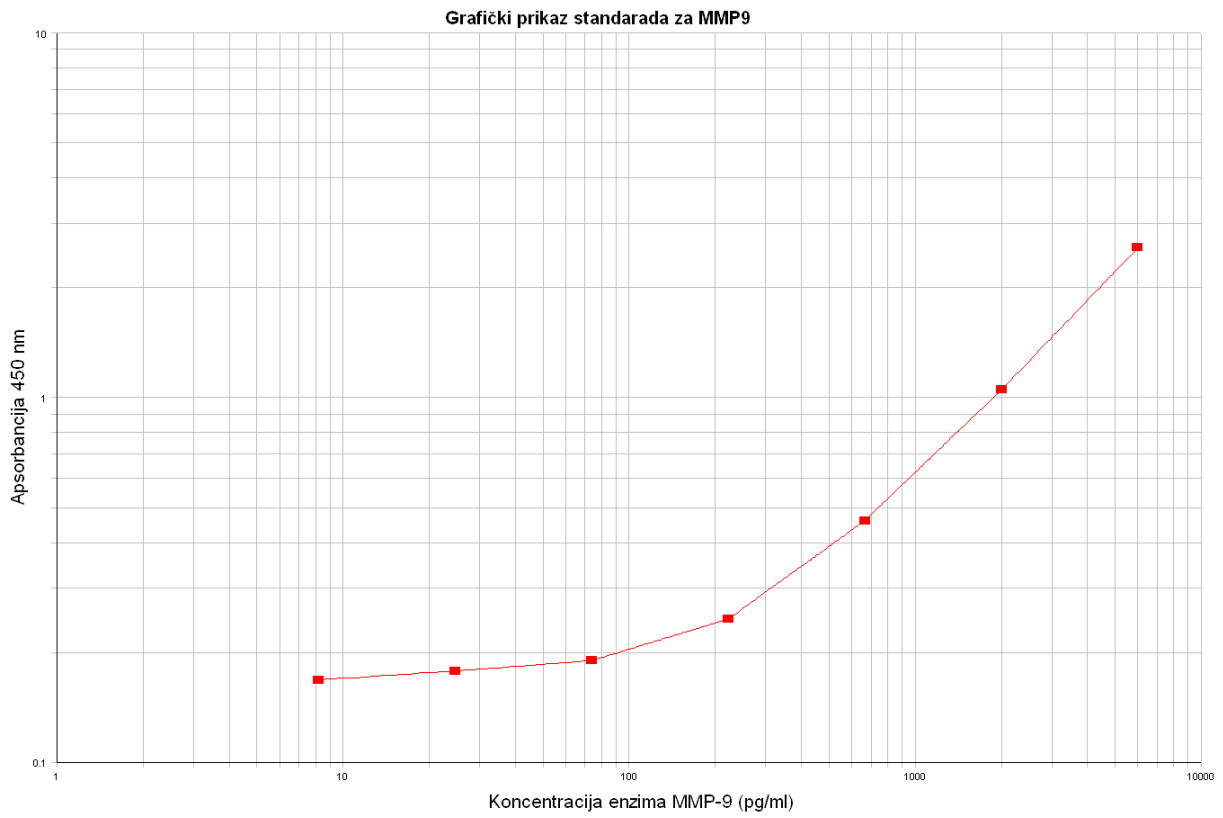
### Faza blokiranja reakcije



### Očitavanje absorbancije na 450 nm



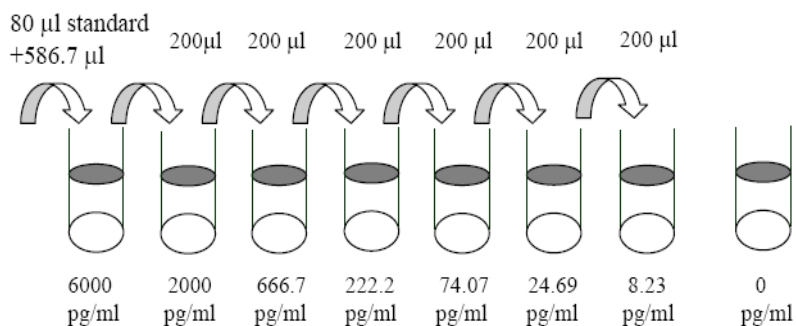
Slika 16 Slikovni prikaz svih faza ELISA metode za određivanje enzima MMP-9 u ljudskom urinu (230)



Slika 17 Krivulja standarda za ljudski enzim matriks metaloptoteinazu-9 određen ELISA metodom i očitani Magellan informatičkom podrškom

### 3.2.2.2. Protokol enzimskog imunoeseja (ELISA) za određivanje koncentracija enzima matriks metaloproteinaze-9 u ljudskom urinu

1. Temperirali smo sve reagense i uzorke na sobnoj temperaturi (18-20 °C). Svi su se standardi, slijepe probe i uzorci raditi u duplikatu (Tablica 13).
2. Standard smo pripravili i razrijedili na slijedeći način: Na tresilici ( Heidolph Germany) smo protresli otopinu C (engl. Item-C) – otopina standarda koja sadrži rekombinantni ljudski enzim MMP-9. Dodali smo 400 µl 1x otopine za razrjeđenje E (engl. Item E - 15 ml 5 x koncentriranog pufera) u otopinu C kojim se dobije 50 ng/ml standarda. Otopili smo smjesu otopina E i C uz umjereno miješanje. Dodali smo 80 µl standarda MMP-9 iz otopine C u epruvetu (Eppendorf, Germany) u kojoj se nalazi 586,7 µl 1x otopine za razrjeđenje E za pripremu 6000 pg/ml štok otopine standarda. Pipetirali smo 400 µl 1x otopine za razrjeđenje E u svaku od epruveta za razrjeđenje standarda (S1-S7). Koristili smo pripremljenu štok otopinu za seriju razrjeđenja standarda. Prije svakoga prebacivanja novoga razrjeđenja, promiješali smo svaku prethodnu epruvetu sa standardom do krajnjeg razrjeđenja standarda od 0 pg/ml (Slika 18) .



Slika 18 Serija razrjeđenja standarda do 0 pg/ml

3. Dodali smo 100  $\mu$ l standarda (S1-S7) u duplikatu.
4. Dodali smo 100  $\mu$ l otopine za razrjeđenje E na zadnje mjesto u nizu za standarde (slijepa proba).
5. Dodali smo 100  $\mu$ l svakog uzorka u potreban broj jamica (u duplikatu svaki uzorak).
6. Inkubirali smo 2.5 sata na sobnoj temperaturi u mraku (miješanje na tresilici; Mini Shaker, Biosan, Hamburg, Germany).
7. Isprali smo jamice na automatskom ispiraću (4 x 300  $\mu$ l otopine za ispiranje).
7. Zatim smo pripremili biotinizirana MMP-9 protutijela, otopinu F (engl. Item F – Detection Antibody MMP-9; Biotinylated anti-human MMP-9) na slijedeći način:  
Dodati smo 100  $\mu$ l 1x otopine za razrjeđenje E u epruveta za pripremu koncentrata MMP-9 protutijela. Nakon miješanja, razrijedili smo koncentrat MMP-9 protutijela 100 x upotrebom 1x otopine za razrjeđenje E. Dodali smo 100  $\mu$ l pripremljenog biotiniziranog MMP-9 protutijela u svaku jamicu na mikroploči.
8. Inkubirali smo 1 sat na sobnoj temperaturi uz miješanje na tresilici.
9. Isprali smo jamice na automatskom ispiraću (4 x 300  $\mu$ l otopine za ispiranje).
10. Pripremili smo HRP-streptavidin koncentrat, otopinu G (engl. Item G - 8  $\mu$ l 20,000 X concentrated HRP- conjugated streptavidin) na slijedeći način: Promiješali smo otopinu G pipetiranjem prije upotrebe. HRP streptavidin koncentrat smo razrijedili 20,000 x sa 1x otopinom za razrjeđenje E. Dodati smo 100  $\mu$ l pripremljenog HRP-streptavidin koncentrata u svaku jamicu.
11. Inkubirali smo 45 minuta na sobnoj temperaturi uz miješanje na tresilici.
12. Isprali smo jamice na automatskom ispiraću (4 x 300  $\mu$ l otopine za ispiranje).
13. Dodali smo 100  $\mu$ l otopine tetrametilbenzidina, TMB (engl. Item H, One-Step Substrate Reagent – 12 ml 3,3,5,5-tetra-methyl-benzidine) u svaku jamicu.

14. Inkubirali smo 30 minuta na sobnoj temperaturi ( miješanje na tresilici u mraku).
15. Dodali smo 50  $\mu$ l otopine za zaustavljanje reakcije (engl. Stop Solution).
16. Odmah smo na čitaču očitali apsorbanciju na valnoj duljini od 450 nm (kontrola na 620 nm po preporukama proizvođača).



Tablica 13 Radna tablica za provođenje ELISA metode.  
Svaki standard, uzorak urina i slijepa proba odrađen je u duplikatu

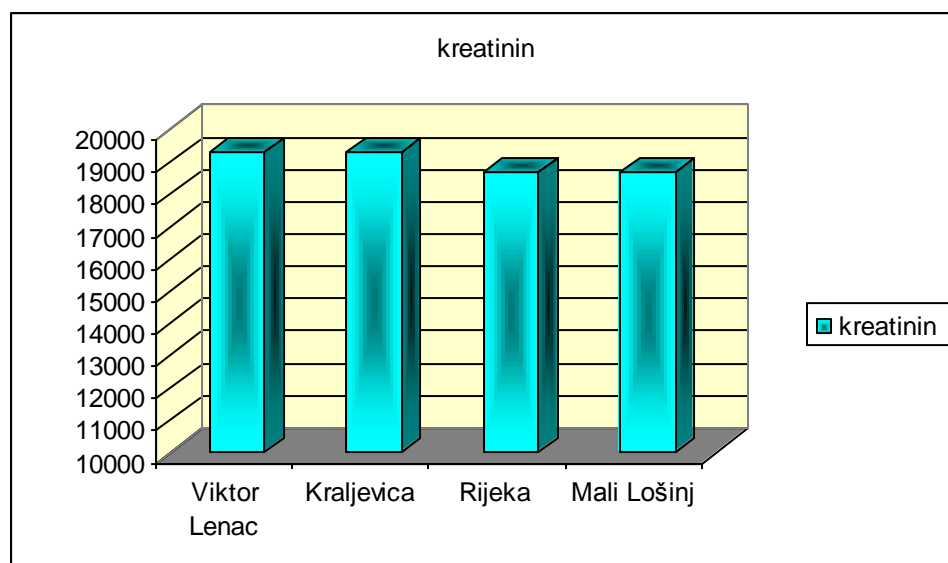
<b>A</b>	<b>St1</b>	<b>St1</b>	<b>UZ 1</b>	<b>UZ 1</b>	<b>UZ 9</b>	<b>UZ 9</b>	<b>UZ 17</b>	<b>UZ 17</b>	<b>UZ 25</b>	<b>UZ 25</b>	<b>UZ 33</b>	<b>UZ 33</b>
<b>B</b>	<b>St2</b>	<b>St2</b>	<b>UZ 2</b>	<b>UZ 2</b>	<b>UZ 10</b>	<b>UZ 10</b>	<b>UZ 18</b>	<b>UZ 18</b>	<b>UZ 26</b>	<b>UZ 26</b>	<b>UZ 34</b>	<b>UZ 34</b>
<b>C</b>	<b>St3</b>	<b>Stt3</b>	<b>UZ 3</b>	<b>UZ 3</b>	<b>UZ 11</b>	<b>UZ 11</b>	<b>UZ 19</b>	<b>UZ 19</b>	<b>UZ 27</b>	<b>UZ 27</b>	<b>UZ 35</b>	<b>UZ 35</b>
<b>D</b>	<b>St4</b>	<b>St4</b>	<b>UZ 4</b>	<b>UZ 4</b>	<b>UZ 12</b>	<b>UZ 12</b>	<b>UZ 20</b>	<b>UZ 20</b>	<b>UZ 28</b>	<b>UZ 28</b>	<b>UZ 36</b>	<b>UZ 36</b>
<b>E</b>	<b>St5</b>	<b>St5</b>	<b>UZ 5</b>	<b>UZ 5</b>	<b>UZ 13</b>	<b>UZ 13</b>	<b>UZ 21</b>	<b>UZ 21</b>	<b>UZ 29</b>	<b>UZ 29</b>	<b>UZ 37</b>	<b>UZ 37</b>
<b>F</b>	<b>St6</b>	<b>St6</b>	<b>UZ 6</b>	<b>UZ 6</b>	<b>UZ 14</b>	<b>UZ 14</b>	<b>UZ 22</b>	<b>UZ 22</b>	<b>UZ 30</b>	<b>UZ 30</b>	<b>UZ 38</b>	<b>UZ 38</b>
<b>G</b>	<b>St7</b>	<b>St7</b>	<b>UZ 7</b>	<b>UZ 7</b>	<b>UZ 15</b>	<b>UZ 15</b>	<b>UZ 23</b>	<b>UZ 23</b>	<b>UZ 31</b>	<b>UZ 31</b>	<b>UZ 39</b>	<b>UZ 39</b>
<b>H</b>	<b>BLK</b>	<b>BLK</b>	<b>UZ 8</b>	<b>UZ 8</b>	<b>UZ 16</b>	<b>UZ 16</b>	<b>UZ 24</b>	<b>UZ 24</b>	<b>UZ 32</b>	<b>UZ 32</b>	<b>UZ 40</b>	<b>UZ 40</b>

St – standard; UZ – uzorak; BLK – slijepa proba

### 3.2.2.3. Nekompenzirana Jaffe kinetička metoda

U ovome doktorskom radu, koristili smo znanstveno utemeljenu nekompenziranu Jaffe kinetičku metodu za određivanja kreatinina u urinu naših ispitanika. Metodu smo koristili kao kinetički test bojama za kvantitativno određivanje kreatinina u urinu na Olympus analizatorima u obliku *in vitro* dijagnostike. Princip metode je kemijska reakcija kreatinina i pikrinske kiseline, kada nastaje kreatinin-pikrat kompleks žuto-narančaste boje u lužnatom mediju, te se prati promjena apsorpcije pri 520/800 nm koja je proporcionalna koncentraciji kreatinina u uzorku. Linearnost testa se kretala u rasponu koncentracija od 88 do 35.360  $\mu\text{mol/L}$  za urin, dok je najniža mjerljiva razina koristeći postavke za urin na analizatoru AU2700 (Olympus) utvrđena na 0,1  $\mu\text{mol/L}$ . U radu smo se služiti samo certificiranim materijalima prema Olympus Creatinine OSR6178 testnom standardu za ljudski urin. Razlog korištenja navedene metode u ovome radu bila je kontrola razrjeđenja uzoraka urina prilikom standardiziranja uzoraka na koncentraciju prisutnog kreatinina. Na temelju mjerenja koncentracije kreatinina u svim uzorcima urina ispitanika svih ispitnih skupina, došlo se do zaključka da zbog umjerenosti koncentracija kreatinina u uzorcima urina nije bilo potrebe za početnim razrjeđenjima (umjeravanjima) urina (Slika 19). Nakon prvog određivanja koncentracija enzima matriks metaloproteinaze-9, kod onih uzoraka urina kod kojih su izmjerene koncentracije bile izvan mjernoga područja standarda (Magellan programom prikazane kao > Max.), pristupili smo razrjeđivanju istih uzoraka urina (otopinom za razrjeđenje E; RayBio®, USA ) u svrhu određivanja koncentracija enzima matriks metaloproteinaze-9 unutar mjernom području standarda po preporukama proizvođača. Zatim smo u tim uzorcima urina pristupili novom određivanju koncentracija enzima matriks metaloproteinaze-9 u razrijeđenim uzorcima kod kojih smo odredili koncentracije unutar mjernoga područja

standarda, te razmjerno izmjerenu koncentraciju enzima matriks metaloproteinaze-9 množili sa visinom razrjeđenja po preporukama proizvođača.



Slika 19 Vrijednosti koncentracija kreatinina u uzorcima urina ispitanika izražene u  $\mu\text{mol/L}$

### **3.2.3. Metoda za određivanje BTEX-a u urinu ispitanika**

#### **3.2.3.1. Određivanje benzena, toluena, etilbenzena i ksilena u urinu plinskom kromatografijom**

Sam princip metode zasniva se na mikroekstrakciji analita na čvrstoj fazi (HS-SPME) (233-238). Nakon ispiranja tekućom vodom, sav stakleni pribor koji uključuje posudice, epruvete, lijevke (Hirschman; Eberstadt; Germany) smo uronili u Kemex (KEMEX<sup>®</sup> A-Kemika; Zagreb; Hrvatska) u vremenu od 3 sata, isprali destiliranom vodom (SG-ULTRA CLEAR; Barsbittel; Germany), uronili u krom-sumpornu kiselinu (KEMEX<sup>®</sup> A-Kemika; Zagreb; Hrvatska) kroz 1 sat, ponovo isprali destiliranom vodom, a zatim dobro isprali redestiliranom vodom (SG-ULTRA CLEAR; Barsbittel; Germany). Uzorak smo stavili u plastičnu posudicu na način da se napuni do samoga vrha prvim jutarnjim urinom. U pravilu smo urin ispitanika analizirali isti dan. Ukoliko to nije bilo moguće, određeni volumen urina smo odmah stavili u odgovarajuću bočicu i pohranili na +4 °C do slijedećeg dana. U staklene bočice (Hirschman; Eberstadt; Germany) stavili smo magnet, pipetirali 1 ml urina i odmah zatvorili. Zatim je slijedila faza inkubacije uzorka u vremenu od 30 minuta. Vlako (Supelco; Bellefonte; USA) smo izložili plinovitoj fazi na sobnoj temperaturi uz miješanje (300 okretaja/min.) kroz 15 minuta. Slijedila je faza desorbiranja analita u injektoru SPME uređaja (Supelco; Bellefonte; USA) na 200 °C kroz 3 minute; i to 2 minute pri 35 °C, grijanje pri 90 °C brzinom od 5 °C/min., grijanje pri 300 °C brzinom 50 °C/min.. Protok plina nosioca helija (Messer; Gumpoldskirchen; Osterreich) u plinskom kromatografu (Varian 3400 CX; Blue Lion Biotech; Snoqualmie; USA) sa spektrometrom masa i kolonom je iznosio 1 ml/min. (15psi). Analit se desorbira u injektoru plinskog kromatografa s masenim spektrometrom kao detektorom. Koncentracije BTEX-a izračunali smo iz baždarenog pravca dobivenog metodom

vanjskog standarda. Metodu vanjskog standarda obavili smo dodatkom radnih standarda u urin neizloženog ispitanika (urin smo najprije propuhali dušikom na + 40 °C kroz pola sata). U staklene bočice smo stavili 0,9 ml propuhanog urina i 100 µl metanola kao slijepe probe (99,9%; Merck; Darmstadt; Germany), odnosno po 100 µl standarda (3.2.3.2.). Konačna koncentracija BTEX-a je iznosila :

**benzen** (ng/l): st. 1 = 99; st. 2 = 198; st. 3 = 396; st. 4 = 792;

**toluen** (ng/l): st. 1 = 96,8; st. 2 = 193,6; st. 3 = 387,2; st. 4 = 774,4;

**etilbenzen** (ng/l): st. 1 = 96,8; st. 2 = 193,6; st. 3 = 387,2; st. 4 = 774,4;

**m/p-ksilen** (ng/l): st. 1 = 193,6; st. 2 = 387,2; st. 3 = 774,4; st. 4 = 1548,8;

**o-ksilen** (ng/l): st. 1 = 96,8; st. 2 = 193,6; st. 3 = 387,2; st. 4 = 774,4.

### 3.2.3.2. Kalibracijski postupak za metodu određivanja BTEX-a

Kao osnovni standard BTEX-a koristili smo po 3 µl benzena, toluena, etilbenzena i ksilena (certificirani referentni materijal BTEX; Supelco; Bellefonte; USA) kojima smo dodali 10 ml metanola (99,9%, Merck; Darmstadt; Germany). Stabilnost im iznosi približno 6 mjeseci pri 20 °C. Za međustandard BTEX-a koristili smo 30 µl osnovnog standarda kojemu smo dodali 10 ml metanola. Iz navedenih otopina smo napravili radne standarde za opću populaciju, a oni su slijedeći :

**Standard 1:** 12,5 µl međustandarda (BTEX-a) i metanola do 10 ml;

**Standard 2:** 25 µl međustandarda (BTEX-a) i metanola do 10 ml;

**Standard 3:** 50 µl međustandarda (BTEX-a) i metanola do 10 ml;

**Standard 4:** 100 µl međustandarda (BTEX-a) i metanola do 10 ml.

Postupak smo ispitali u koncentracijskom području 50-2000 ng/l koji je linearan. Granice detekcije za navedena otapala iznose: benzen 50 ng/l, toluen 39 ng/l, etilbenzen 35 ng/l, m/p-ksilen 42 ng/l i o-ksilen 42 ng/l. Ponovljivost izvedene metode izražena kao RSD bila je  $\leq 11\%$ , a točnost se kretala od 91% do 100 %.

### **3.2.4. Metoda spirometrijskog mjerenja plućnih funkcija**

Spirometrija je precizno mjerenje zapremine zraka koji pluća dišu. Pomoću spirometrije možemo mjeriti statičke plućne volumene i kapacitete, dinamičke plućne volumene, gdje se ovisno o stanju razvoja bolesti vrijednosti pojedinih izmjerenih parametara plućnih volumena mijenjaju (Tablica 14) (239-244). Spomenuti dinamički plućni volumeni vezani su uz faktor vrijeme, precizno nam određuju prohodnost dišnih putova, a ta grupa volumena sadrži forsirani ekspiracijski volumen (FEV), Tiffeneau indeks i krivulju protok-volumen (Slika 20). Forsirani ekspiracijski volumen je volumen zraka izdahnut forsiranim ekspirijem nakon maksimalnog inspirija. Mi smo ga u ovome doktorskom radu mjerili u prvoj sekundi (FEV1) zbog činjenice da početni dio krivulje ovisi o naporu i suradnji ispitanika, a krajnji dio više ukazuje na promjene kapaciteta (245). Mjerenje forsiranog ekspiracijskog volumena na opisani način predstavlja važan test za otkrivanje opstruktivnih promjena u većim dišnim putovima, a s druge strane ukazuje na promjene u malim dišnim putovima i normalno iznosi oko 80% FVC (245). Metodom spirometrije se mogu direktno mjeriti dišni volumen, inspiracijski rezervni volumen, ekspiracijski rezervni volumen, dok se rezidualni volumen može mjeriti indirektnim metodama kao što je metoda dilucije helijem. Spirometriju smo obavljali istoga dana na terenu, nakon samog uzimanja uzoraka krvi i urina kod svakog ispitanika. Svakom smo ispitaniku odredili dinamičke plućne funkcije pomoću specijalnog digitalnog mobilnog Spirometra (WinSpiro-PRO 1.3; Roma; Italy) (Slika 21) koji u sebi sadrži kompletnu programsku opremu i informatičku podršku za preciznu dijagnostiku plućnih funkcija (engl. Spirometry management program). Od parametara koje smo izmjerili na svim ispitanicima, u ovome doktorskom radu analizirali smo sljedeće :

**FVC** Forsirani vitalni kapacitet;

**FEV 1** Volumen zraka izdahnut u prvoj sekundi testa;

**FEV 1%**  $FEV1/FVC \times 100$ ;

**PEF** Maksimalni protok zraka tijekom izdisaja;

**FEF 25,75** Prosječan protok zraka prilikom 25% do 75% FVC-a;

**FEF 25%** Maksimalni protok zraka prilikom 25% FVC-a;

**FEF 50%** Maksimalni protok zraka prilikom 50% FVC-a;

**FEF 75%** Maksimalni protok zraka prilikom 75% FVC-a;

**FIVC** Forsirani vitalni kapacitet udisaja;

**FIV 1** Volumen zraka udahnut u prvoj sekundi testa;

**FIV 1%**  $FIV1/FIVC \times 100$ ;

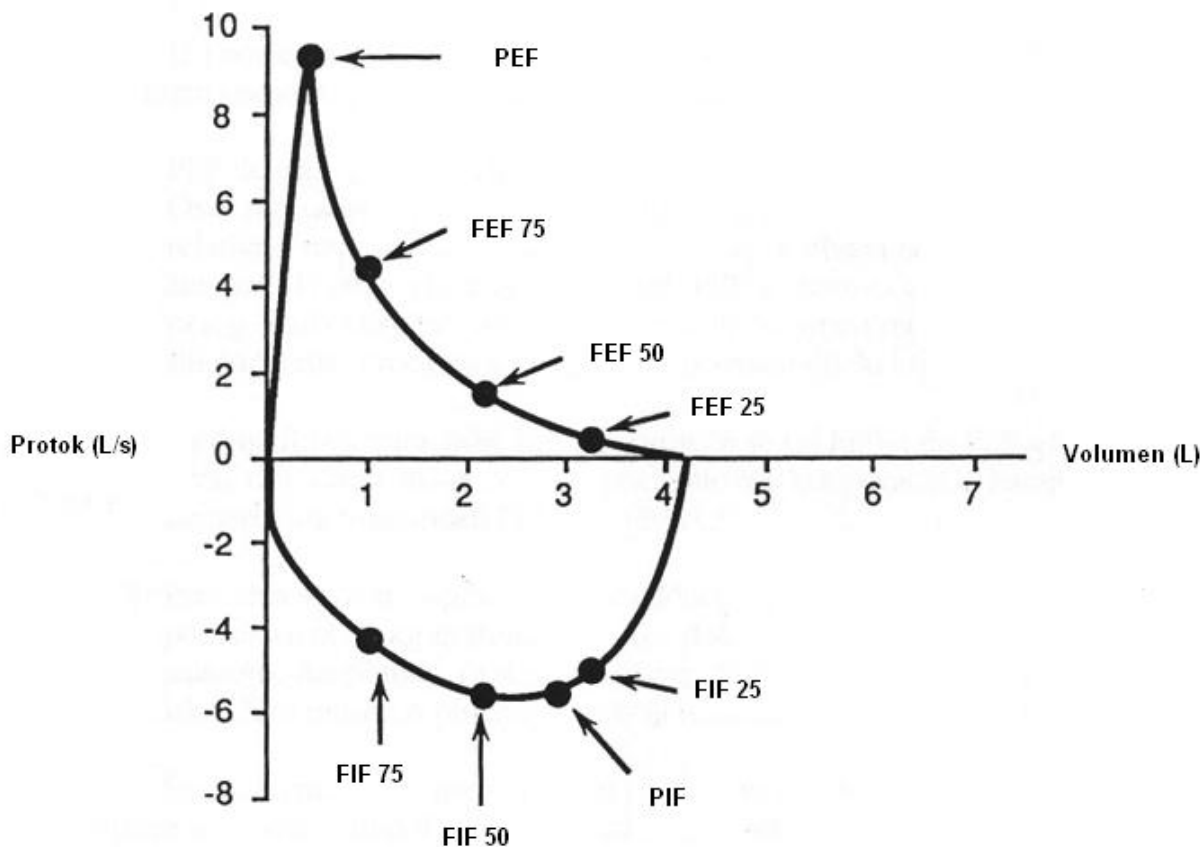
**PIF** Maksimalni protok zraka tijekom udisaja;

**FIF 25%** Forsirani inspiracijski protok pri 25 % inspiracijskog vitalnog kapaciteta;

**FIF 50%** Forsirani inspiracijski protok pri 50 % inspiracijskog vitalnog kapaciteta;

**FIF 75%** Forsirani inspiracijski protok pri 75 % inspiracijskog vitalnog kapaciteta.





Slika 20 Krivulja protok-volumen s prikazom ekspiracijskih i inspiracijskih dijelova (244)

Tablica 14 Promjene plućnih volumena u slučajevima opstruktivnih, restriktivnih i miješanih (opstruktivno/restriktivnih) plućnih bolesti

	BOLEST PLUĆA		
	OPSTRUKTIVNA	RESTRIKTIVNA	MIJEŠANA
VC	S ILI N	S	S
TLC	P	S	N ILI S
IC	N	S	N ILI S
FRC	P	S	N ILI S
ERV	S ILI N	S	S
RV	P	S	N ILI S

VC-vitalni kapacitet, TLC-totalni plućni kapacitet, IC-inspiracijski kapacitet, FRC-funkcionalni rezidualni kapacitet, ERV-ekspiracijski rezervni volumen, RV-rezidualni volumen, P-povišen, S-snižen, N -normalan



Slika 21 Digitalni mobilni spirometar; Winspiro-PRO 1.3; Roma; Italy

### **3.2.4.1. Diferencijalno dijagnostička metoda za utvrđivanje kronično opstruktivne plućne bolesti**

Da bismo razlikovali kronično opstruktivnu plućnu bolest od bronhalne astme kao još jednog oblika opstruktivne plućne bolesti, na temelju rezultata naših spirometrijskih mjerenja, uveli smo diferencijalno dijagnostičku metodu mjerenja osjetljivosti na bronhodilatator Ventolin (Pliva; Zagreb; Hrvatska). Metoda se temelji na ponovljenom spirometrijskom mjerenju nakon tretmana ispitanika bronhodilatatorom Ventolinom kojeg smo ubacili pomoću specijalizirane pumpice (Pliva; Zagreb; Hrvatska) u specijalnu komoru za inhalaciju sa sterilnim nastavkom za usta (Lek; Ljubljana), putem koje je ispitanik kod kojega su spirometrijskim mjerenjima dokazane opstrukcije ventilacije kroz 10 minuta udisao aerosol za inhaliranje po proizvođačkim preporukama doziranoga Ventolina. Na temelju nalaza koji je pozitivan ili negativan, procijenili smo da li je riječ o reverzibilnoj opstrukciji bronha (poboljšanju) nakon lijeka, što je obilježje astme, ili o fiksiranoj opstrukciji (nema poboljšanja), što je obilježje kronično opstruktivne plućne bolesti. Prema GOLD-u (engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases), postoje 4 osnovna stupnja KOPB-a(246, 247). Blagi stupanj (GOLD 1) prisutan je u bolesnika koji imaju poteškoće, ali još uvijek urednu plućnu funkciju i spirometriju (FEV1 >80%). Umjereno teški stupanj (GOLD 2) prisutan je u bolesnika s FEV1 između 50 do 80% od pretpostavljene vrijednosti za tog ispitanika, teški stupanj (GOLD 3) procjenjuje se u bolesnika s FEV1 između 30 do 50% i vrlo teški KOPB imaju bolesnici s FEV1 ispod 30% od pretpostavljene vrijednosti (246, 247). Osnova klasifikacije uključuje važnost nalaza Tiffeneauova indeksa ispod 70%. Kada je taj uvjet ispunjen, stupanj klasifikacije određuje se prema postotku FEV1 u odnosu na pretpostavljenu (referentnu) vrijednost (246-249).

U ovom doktorskom radu odredili smo Tiffeneau-ov indeks kao post-bronhodilatacijsku vrijednost (FEV1/FVC), koja je kod kronično opstruktivne plućne bolesti ispod 0,70 (ili 70%) (250, 251). Drugim riječima, Tiffeneau-ov indeks je odnos FEV1 prema VC X 100 (FEV1/FVC), gdje se normalne vrijednosti ovog indeksa kreću iznad 80%, a u slučajevima izmjerenih sniženih vrijednosti riječ je o opstruktivnim smetnjama ventilacije (252-254). Naše smo spirometrijske nalaze prikazali na slijedeći način:

- Normalne vrijednosti: FEV1 > 80% predviđenih vrijednosti, FEV1/FVC X 100 > 80% od predviđenih vrijednosti;
- Restriktivne smetnje: FEV1 < 80% predviđenih vrijednosti;
- Opstruktivne smetnje: FEV1 < 70% predviđenih vrijednosti, FEV1/FVC X 100 < 70% predviđenih vrijednosti;
- Kronično opstruktivna plućna bolest: FEV1 < 70% predviđenih vrijednosti, FEV1/FVC X 100 < 70% od predviđenih vrijednosti, fiksirana opstrukcija bronha (nema poboljšanja) nakon inhalacije aerosola Ventolina;
- Astma: FEV1/FVC X 100 < 70% od predviđenih vrijednosti, FEV1 < 70% predviđenih vrijednosti, reverzibilna opstrukcija bronha (poboljšanje) nakon inhalacije aerosola Ventolina.

### 3.2.5. Statističke metode

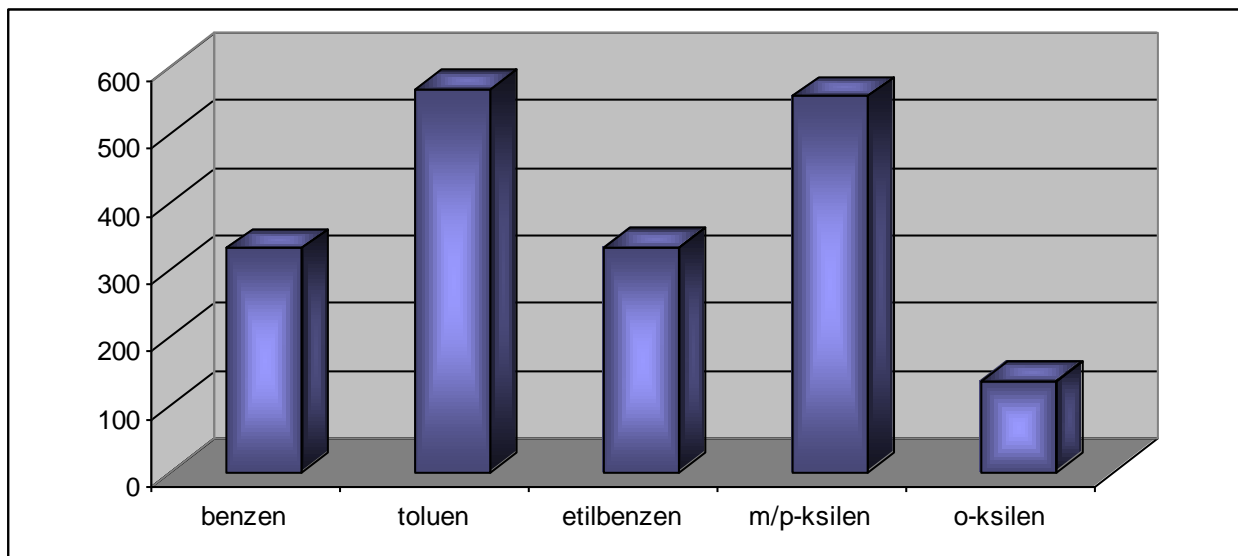
U radu smo za određivanje statističkih razlika između koncentracija hlapljivih aromatskih ugljikovodika u urinu urbane, ruralne i profesionalno izložene populacije, te statističkih razlika između vrijednosti statičkih i dinamičkih plućnih funkcija ispitanika dobivenih metodom spiro-metrije koristili Mann–Whitney-Wilcoxonov test (Mann-Whitney U-test) u sklopu programa Statistic per Windows (Statistica 8.0; Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA). Navedeni test se koristi kod neparametrijskih uzoraka, idealan je za testiranje hipoteze o jednakosti oblika dviju distribucija pomoću dvaju nezavisnih uzoraka, te su za provođenje istoga bitne vrijednosti numeričke varijable u nezavisnim uzorcima koji potječu iz dvaju osnovnih skupova. Statističke razlike između dobivenih rezultata za opisane skupine ispitanika određivali smo na razini statističke značajnosti  $p < 0,05$ . Za određivanje stupnja ekspresije enzima matriks metaloproteinaze-9 u urinu naših ispitanika, izračunavali smo srednju apsorbanciju (450 nm) za svaki set dvostrukih standarda, slijepih proba i uzoraka, te oduzimali prosječni nulti standard optičke gustoće po proizvođačkim preporukama. Rezultate smo prikazati na dobivenoj standardnoj krivulji, gdje nam ordinata prikazuje apsorbanciju izraženu u nm, a na apcisi očitavamo koncentraciju ispitivanog enzima za svaki uzorak urina izražen u pg/ml. U određivanju statističkih razlika na razini statističke značajnosti  $p < 0,05$  između dobivenih vrijednosti koncentracija enzima, koristili smo također Mann–Whitney- Wilcoxonovim testom (Mann-Whitney U-test). Za precizno određivanje apsorbancije u svakom uzorku urina, te kasnije određivanje koncentracije enzima, koristili smo vrijednosti dobivene za kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ ) poradi određivanja razrjeđenja urina standardom (RayBio®). Krivulju ekspresije enzima izradili smo prema standardnoj krivulji upotrebljavajući Sigma plot informatičku podršku (TECAN, Magellan, USA) po preporuci proizvođača. Svi slikovni rezultati su napravljeni

u kompjuterskim programima Microsoft Excel i Sigma Plot 2000 for Windows (Jandel Scientific Software, Chichago, IL, USA), te smo iste obradili u programu Statistic per Windows (Statistica 8.0; Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA) koristeći se prije opisanim Mann–Whitney-Wilcoxonovim testom. Za određivanje korelacija između različitih pojava u našim rezultatima, te utvrđivanja pokazatelja jakosti statističke veze između odabranih pojava, koristili smo se izračunavanjem koeficijenta linearne korelacije (Pearsonov koeficijent korelacije ili produkt moment koeficijent korelacije;  $r$  od  $-1$  do  $+1$ ), koji izražava mjeru povezanosti između dvije varijable u jedinicama neovisnima o konkretnim jedinicama mjere u kojima su iskazane vrijednosti varijabli. Rezultate smo zorno prikazali u obliku karakterističnih dijagrama rasipanja, tzv. Scatter dijagrama.

## 4. Rezultati

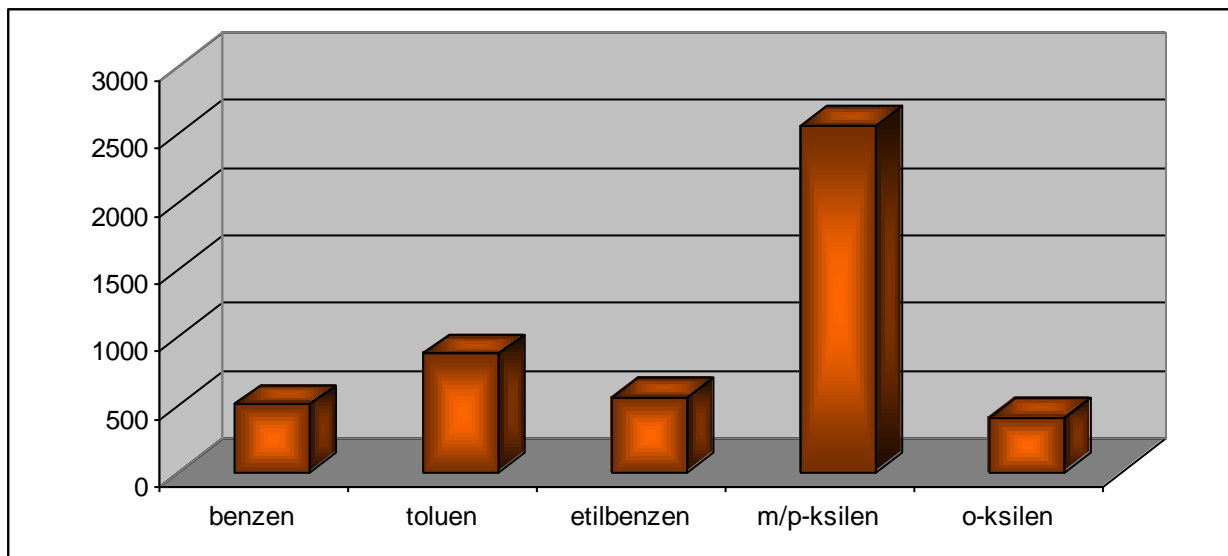
#### 4.1. Promjene u koncentracijama BTEX-a u urinu

Ispitali smo i analizirali promjene BTEX-a u urinu djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica, te stanovnika urbanog područja grada Rijeke i ruralnog područja Malog Lošinja. Slike 22-25 prikazuju razlike u koncentracijama BTEX-a u urinu u našim ispitivanim grupama. Najviše su koncentracije u djelatnika brodogradilišta Kraljevica. Slika 26 prikazuje zbirni prikaz prosječnih vrijednosti BTEX-a u urinu svih ispitnih skupina.

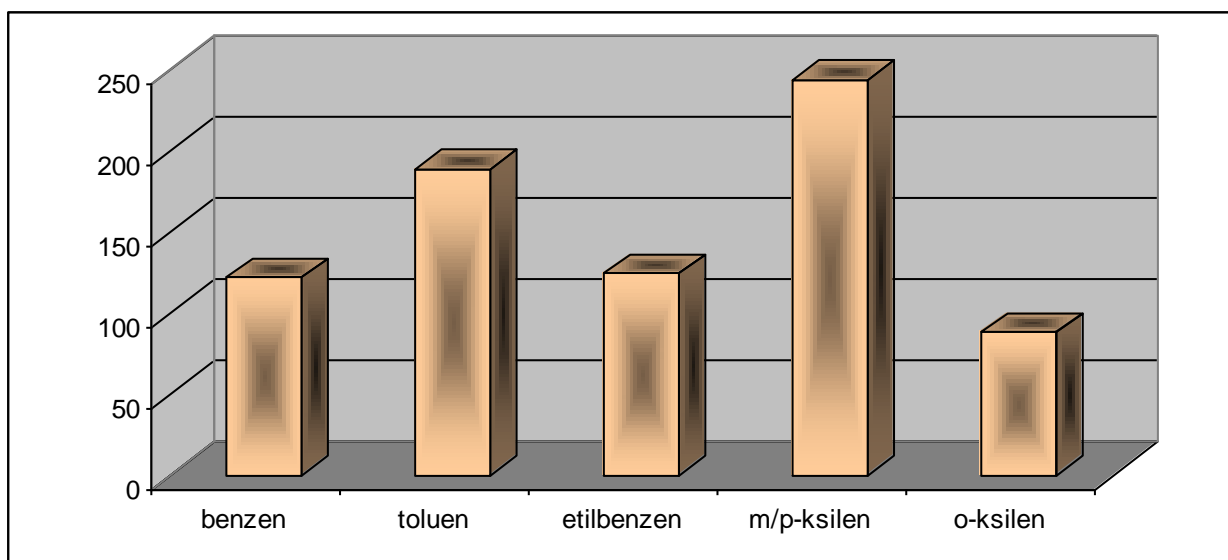


Slika 22 Prosječne koncentracije BTEX-a u urinu u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac (ng/L)



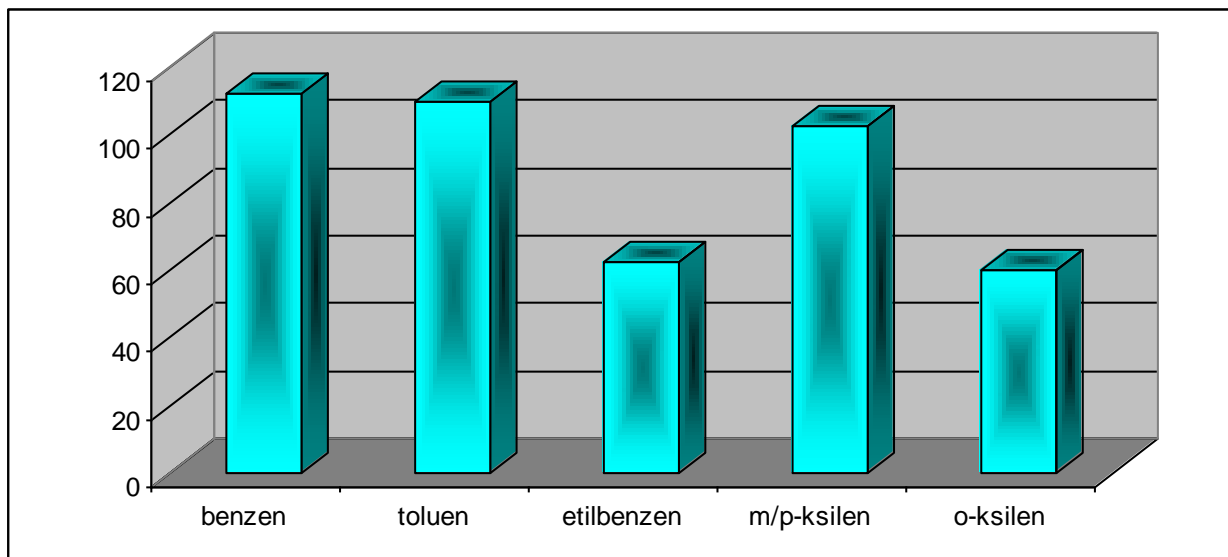


Slika 23 Prosječne koncentracije BTEX-a u urinu u djelatnika brodogradilišta Kraljevica (ng/L)

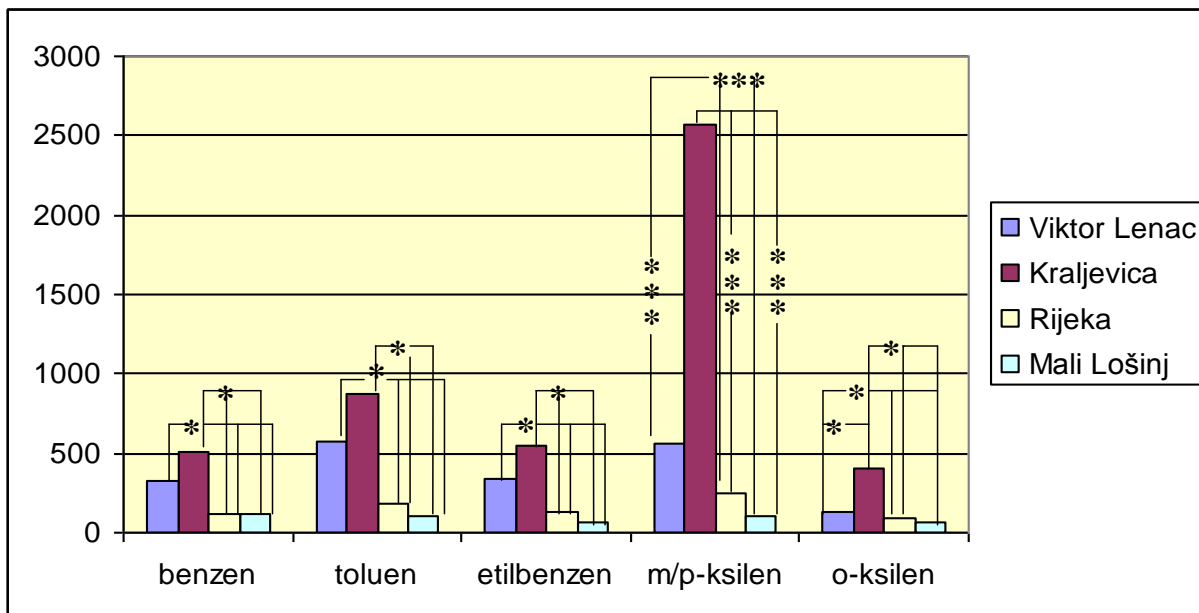


Slika 24 Prosječne koncentracije BTEX-a u urinu u stanovnika grada Rijeke (ng/L)

Uspoređujemo li koncentracije BTEX-a stanovnika Rijeke i Malog Lošinja, statistički značajno nižu koncentraciju BTEX-a imaju stanovnici ruralnog područja Malog Lošinja.



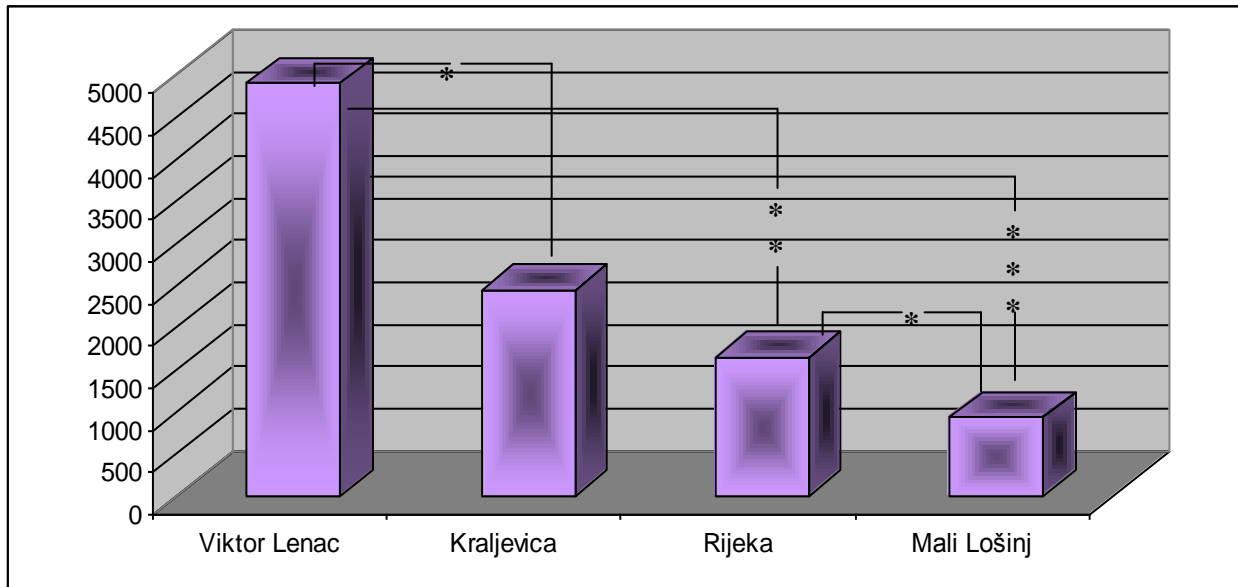
Slika 25 Prosječne koncentracije BTEX-a u urinu u stanovnika Malog Lošinja (ng/L)



Slika 26 Zbirni prikaz prosječnih vrijednosti koncentracija BTEX-a u urinu stanovnika svih ispitnih skupina (ng/L)

## 4.2. Promjene koncentracije enzima MMP-9 u urinu

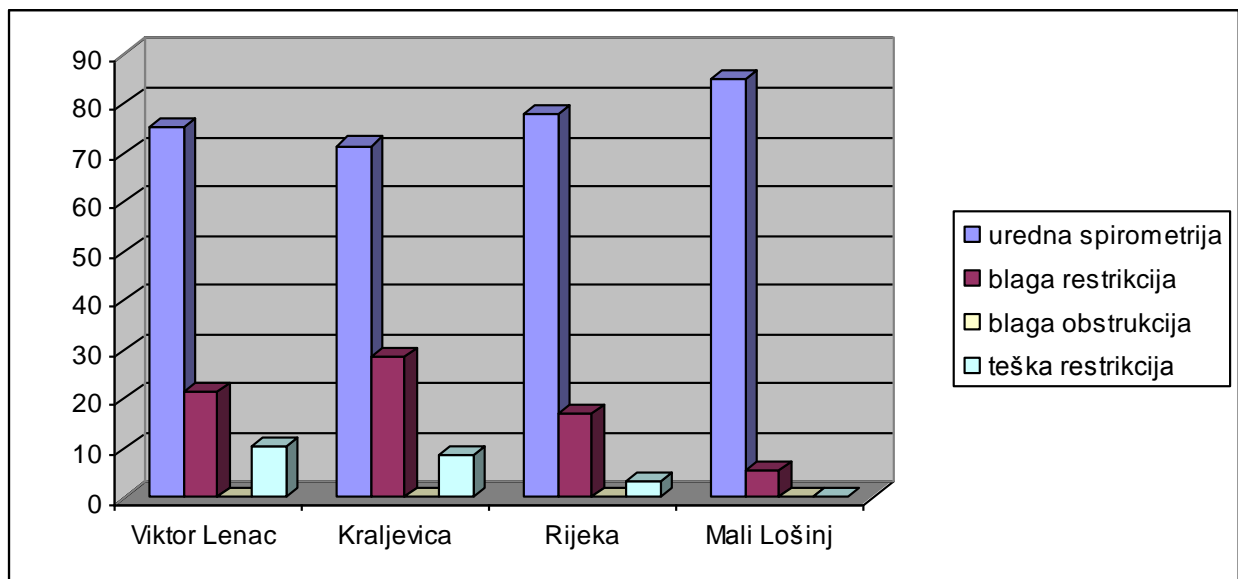
Koncentracije enzima MMP-9 su statistički značajno povišene u stanovnika grada Rijeke u odnosu na Mali Lošinj ( $p < 0,05$ ), a u odnosu na djelatnike brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica statistička značajnost je na razini  $p < 0,01$  (Slika 27).



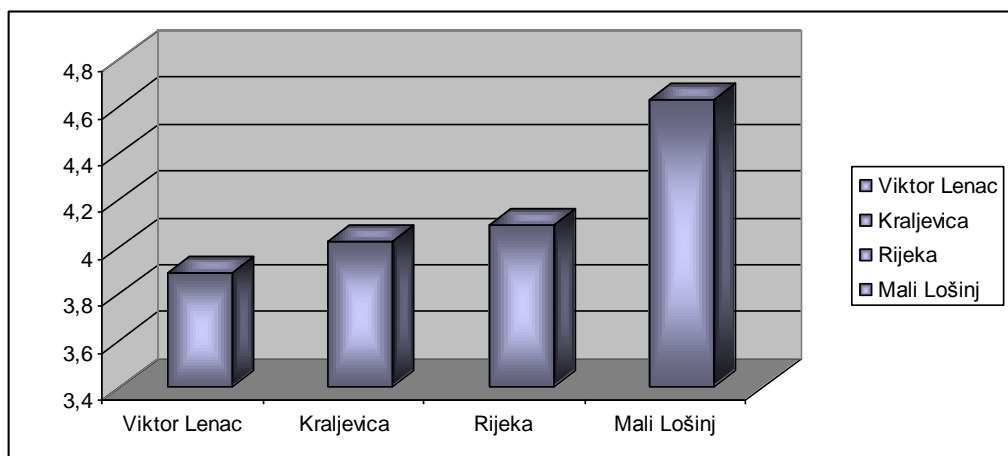
Slika 27 Prosječne koncentracije enzima MMP-9 u urinu (pg/ml)

## 4.3. Promjene spirometrijskih vrijednosti

Slika 28 prikazuje zbirne razlike spirometrijskih vrijednosti u stanovnika ispitnih skupina. Na slici 29 prikazana je razlika u FEV1/L, ali ona nije statistički značajna.



Slika 28 Spirometrijske promjene djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja

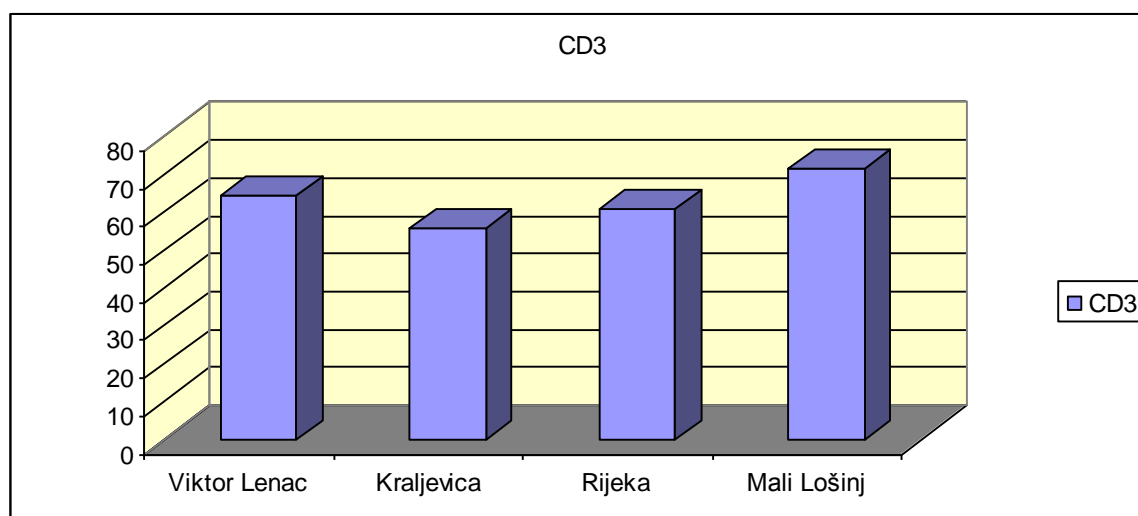


Slika 29 Prosječne promjene FEV1/L u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja

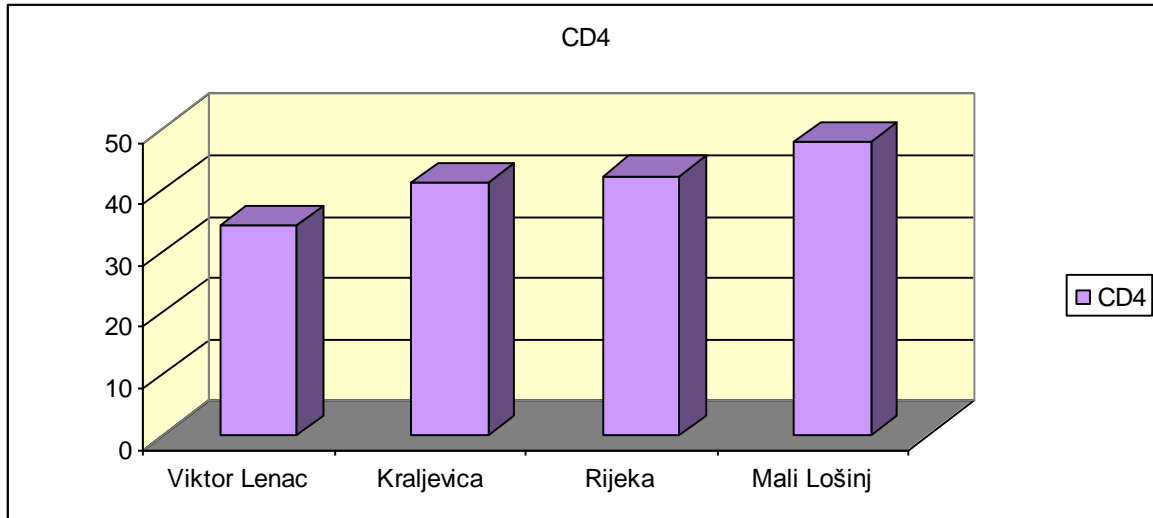
#### 4.4. Promjene imunološkog statusa

##### 4.4.1. Promjene stanične imunosti

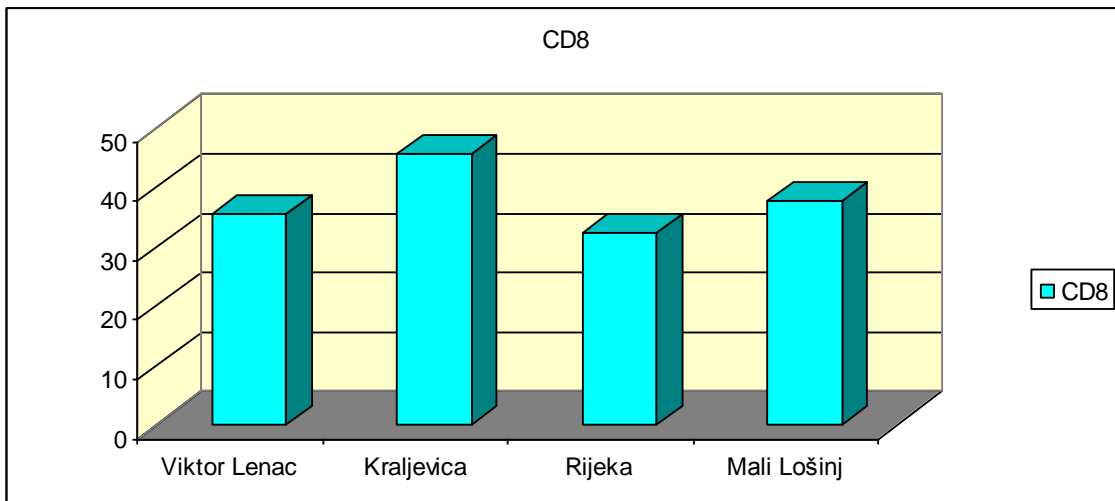
Ispitanicima grada Rijeke i Malog Lošinja, kao i brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica su se vrijednosti ukupnih T limfocita (CD3+), pomoćničkih T stanica (CD4+) i citotoksičnih/supresijskih T stanica (CD8+) nalazili unutar normalnih vrijednosti (Slike 30-32).



Slika 30 Promjene koncentracije CD3+ stanica djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja



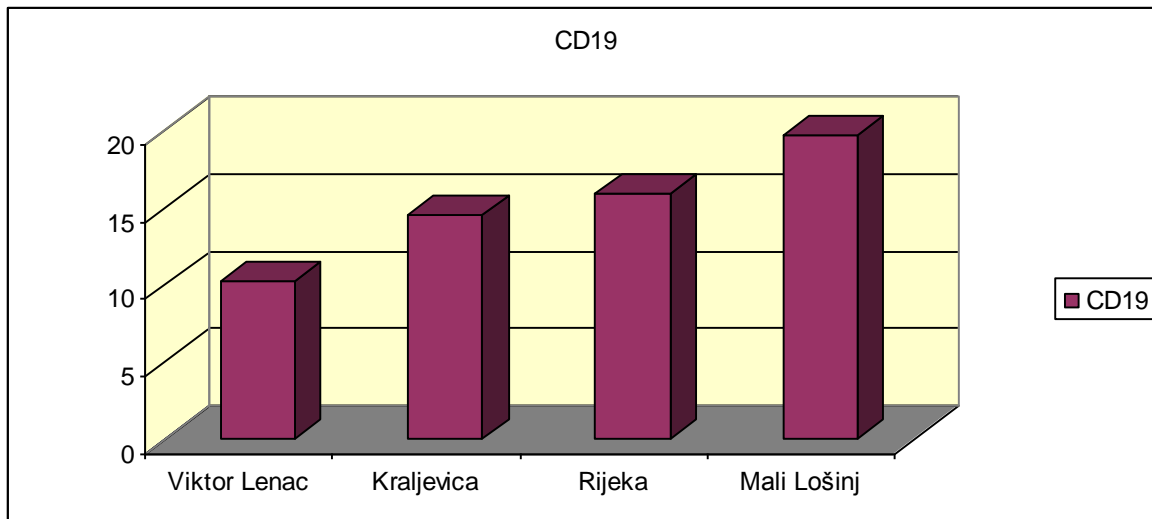
Slika 31 Promjene koncentracije CD4+ stanica djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja



Slika 32 Promjene koncentracije CD8+ stanica djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja

#### 4.4.2. Promjene humoralne imunosti

Iako procjena humoralne imunosti nije bio uski cilj našeg istraživanja, određivali smo i broj B limfocita (CD 19+) stanica u perifernoj krvi naših ispitanika. Između ispitanih skupina nije bilo statistički značajne razlike u postotku B stanica u odnosu na normalne vrijednosti (Slika 33).



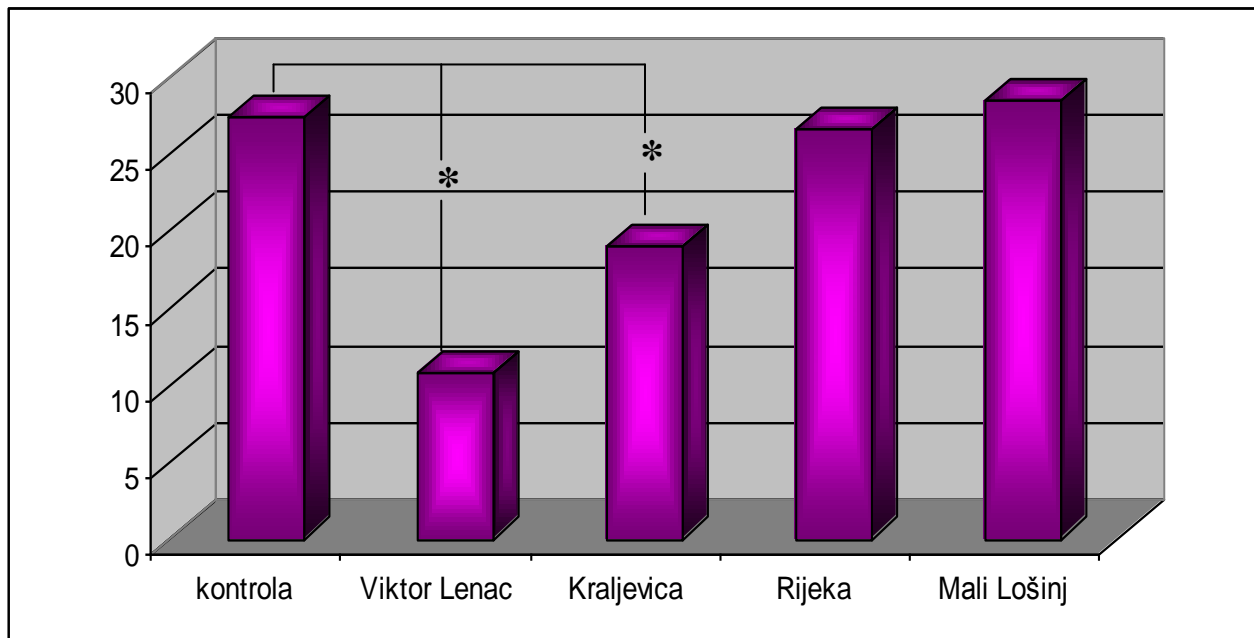
Slika 33 Promjene koncentracije CD19+ stanica djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja

#### 4.4.3. Izražaj citolitičke molekule perforina u perifernoj krvi ispitanika

U perifernoj krvi svih ispitivanih skupina određivali smo izražaj citolitičke molekule perforina (P) unutar stanica. Istovremenim unutarstaničnim površinskim bojanjem rezultate smo prikazali na slijedeće načine: udio ukupnog perforina, broj dvostruko pozitivnih stanica (perforin+stanice, površinski biljeg + stanice), izračunavanje udjela perforin+ stanica unutar svake pojedine limfocitne subpopulacije, te praćenje prosječnog intenziteta fluorescencije za perforin unutar svake limfocitne subpopulacije (engl. AFI-average fluorescent intensity).

#### 4.4.3.1. Ukupni perforin

Ukupan broj perforin + stanica (P+) statistički značajno pada u perifernoj krvi djelatnika brodogradilišta (Slika 34) u odnosu na kontrolnu skupinu (dobrovoljni darivatelji krvi) ( $p < 0,05$ ). Slika 34 prikazuje koncentraciju ukupnog perforina djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica, te ispitne skupine Rijeke i Malog Lošinja.

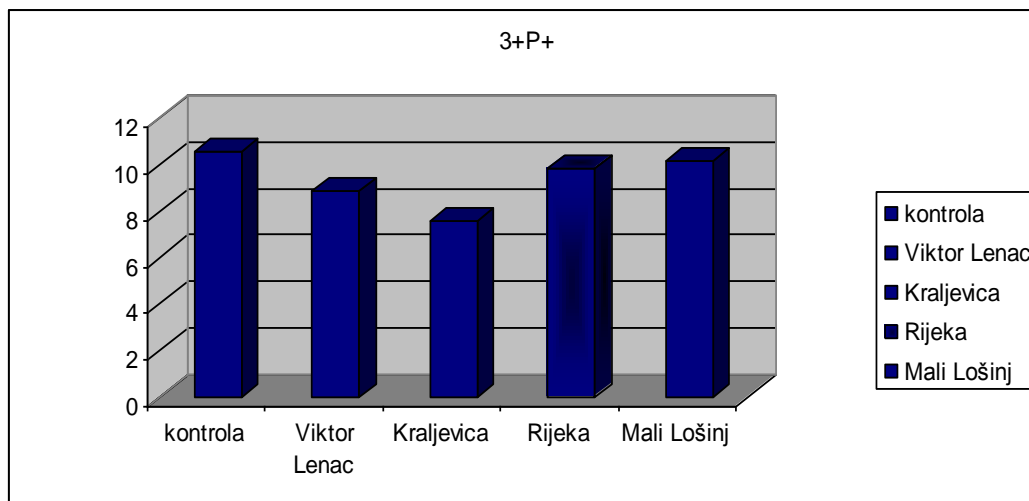


Slika 34 Promjene koncentracije ukupnog perforina djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja

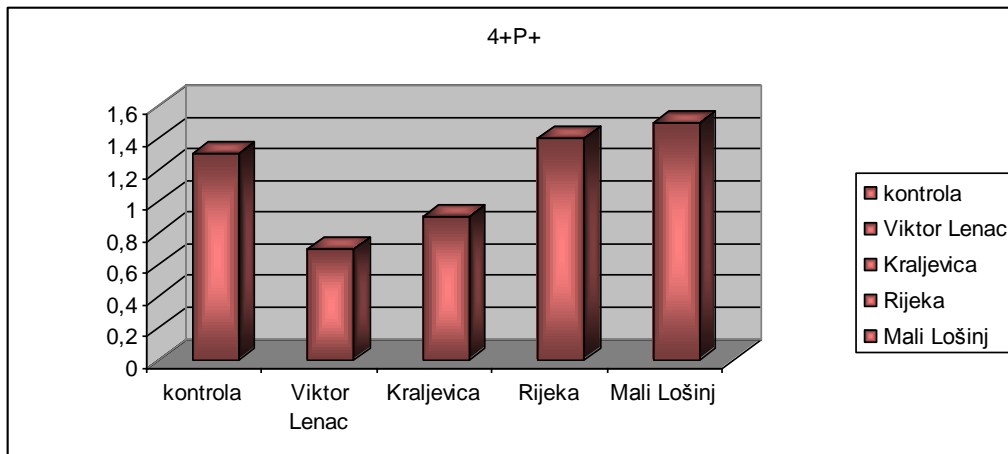


#### 4.4.3.2. Izražaj perforinske molekule unutar T limfocitne subpopulacije

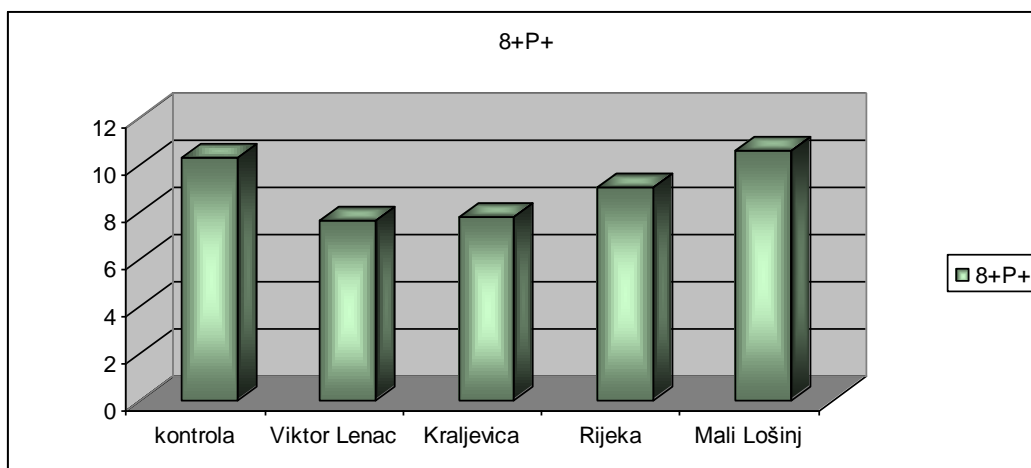
Unutar naših ispitivanih skupina nema statistički značajne razlike u broju dvostruko pozitivnih stanica unutar CD3+, CD4+, CD8+ i CD16+ limfocita (Slike 35-37).



Slika 35 Promjene koncentracije dvostruko pozitivnih (3+P+) stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja



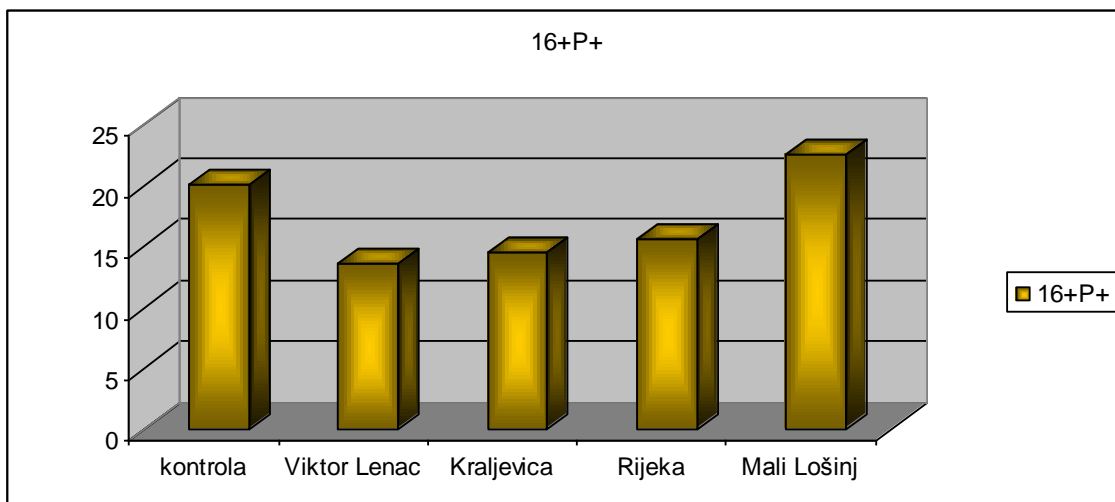
Slika 36 Promjene koncentracije dvostruko pozitivnih (4+P+) stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja



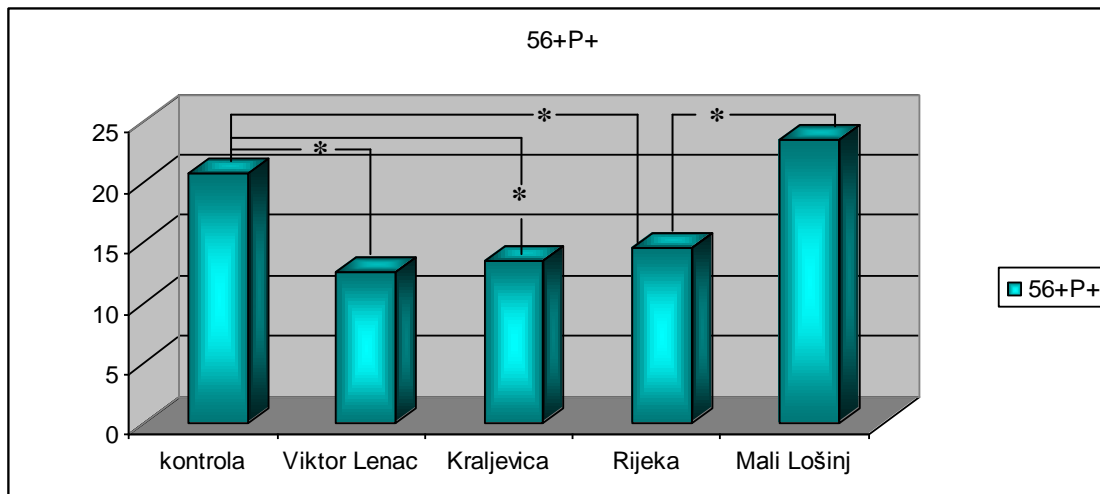
Slika 37 Promjene koncentracije dvostruko pozitivnih (8+P+) stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja

#### 4.4.3.3. Izražaj perforinske citolitičke molekule unutar subpopulacije NK stanica

Izražaj citolitičke molekule perforina unutar CD 16+ stanica (Slika 38) ne pokazuje statistički značajne promjene. Međutim vrijednosti su statistički značajno snižene unutar C56+P+ ( $p < 0,05$ ) u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica, kao i u stanovnika grada Rijeke u odnosu na kontrolu (Slika 39). Na razini značajnosti od  $p < 0,05$  ove ispitivane grupe pokazuju sniženje broja C56+P+ u odnosu na stanovnike Malog Lošinja čije su vrijednosti unutar normalnih kontrolnih, ukazujući na manjak citolitičkog potencijala, te samim tim i na smanjenu funkciju ovih stanica.



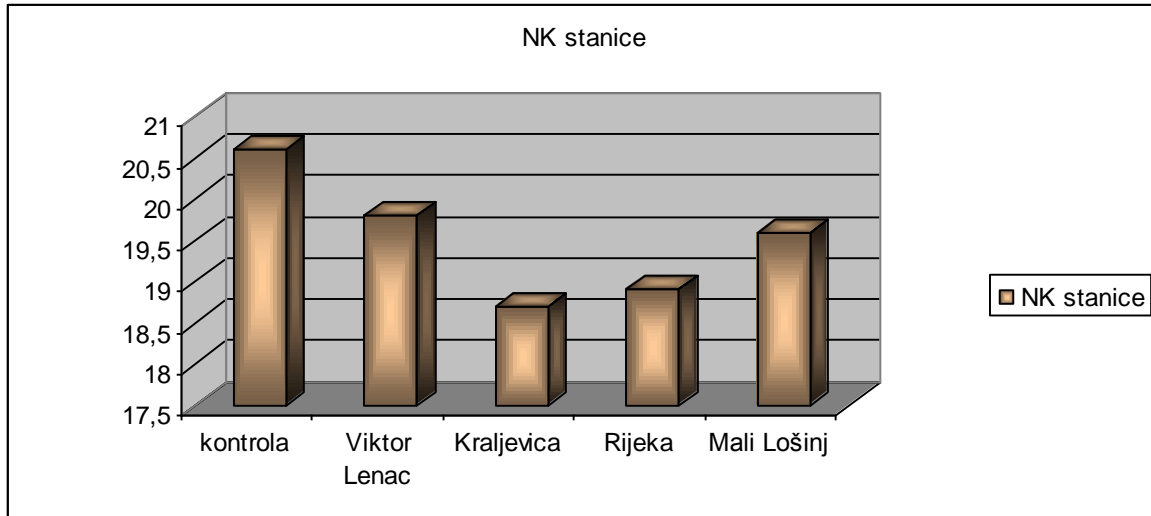
Slika 38 Promjene koncentracije dvostruko pozitivnih (16+P+) stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja



Slika 39 Promjene koncentracije dvostruko pozitivnih (56+P+) stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja

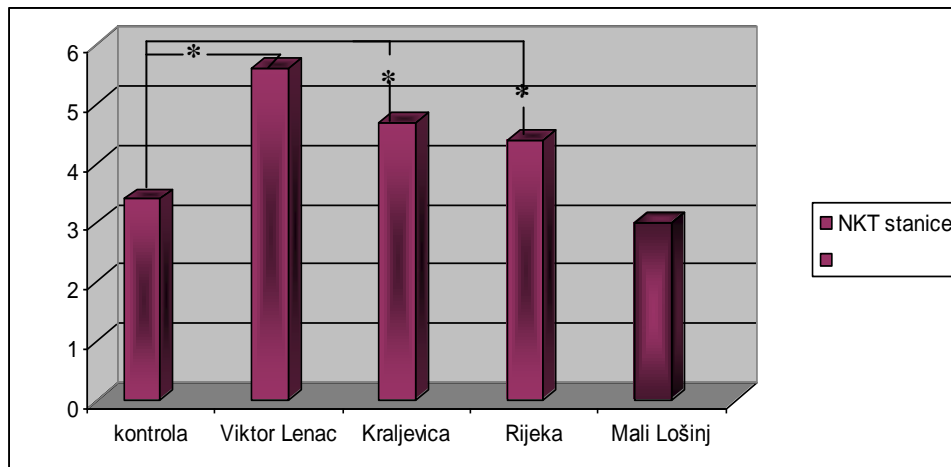
#### 4.4.4. Karakteristike NK i NKT stanica

Slika 40 pokazuje smanjenje postotka NK stanica u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica, međutim navedena smanjenja su malena i sporadična, te nisu statistički značajna.



Slika 40 Promjene koncentracije NK stanica (CD3-CD56+) u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja

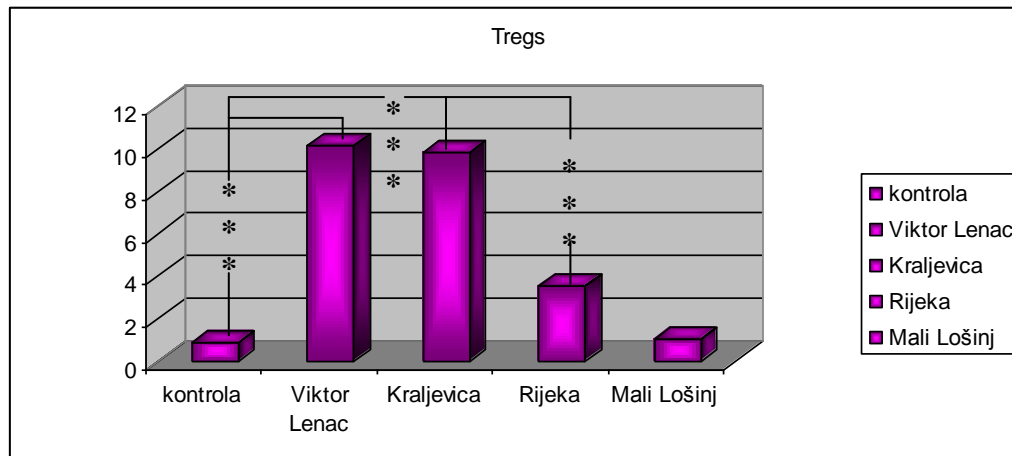
Međutim, udio NKT stanica (CD3+CD16+56+) je statistički značajno veći u djelatnika brodogradilišta i stanovnika urbanog područja ( $p < 0,05$ ) u usporedbi sa kontrolnom grupom i stanovnicima ruralnog područja (Mali Lošinj) (Slika 41).



Slika 41 Promjene koncentracije NKT stanica (CD3+CD56+) u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja

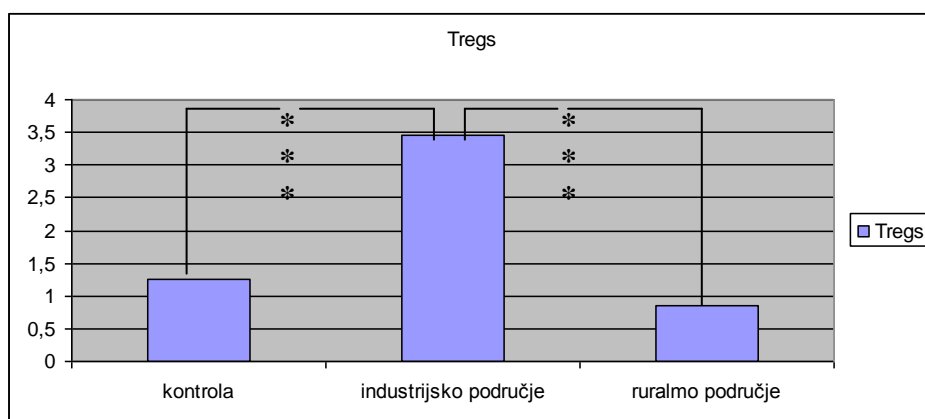
#### 4.4.5. Promjene u postotku T regulacijskih stanica (Tregs)

Slika 42 prikazuje statistički značajno povišenje stanica urođene imunosti karakterističnog fenotipa (CD4+CD25+Foxp3+) u perifernoj krvi djelatnika brodogradilišta ( $p < 0,001$ ) kao i stanovnika urbanog područja grada Rijeke u odnosu na normalne vrijednosti. Ove se vrijednosti veoma razlikuju u perifernoj krvi ispitanika jer su kontrolne vrijednosti veoma niske i izgleda da ih mogu povisiti i kratkotrajne akutne respiracijske promjene koje nismo mogli isključiti iz ispitivanja.



Slika 42 Promjene koncentracije regulacijskih T stanica (Tregs:CD4+CD25+FoxP3+) u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i Kraljevica te stanovnika Rijeke i Malog Lošinja

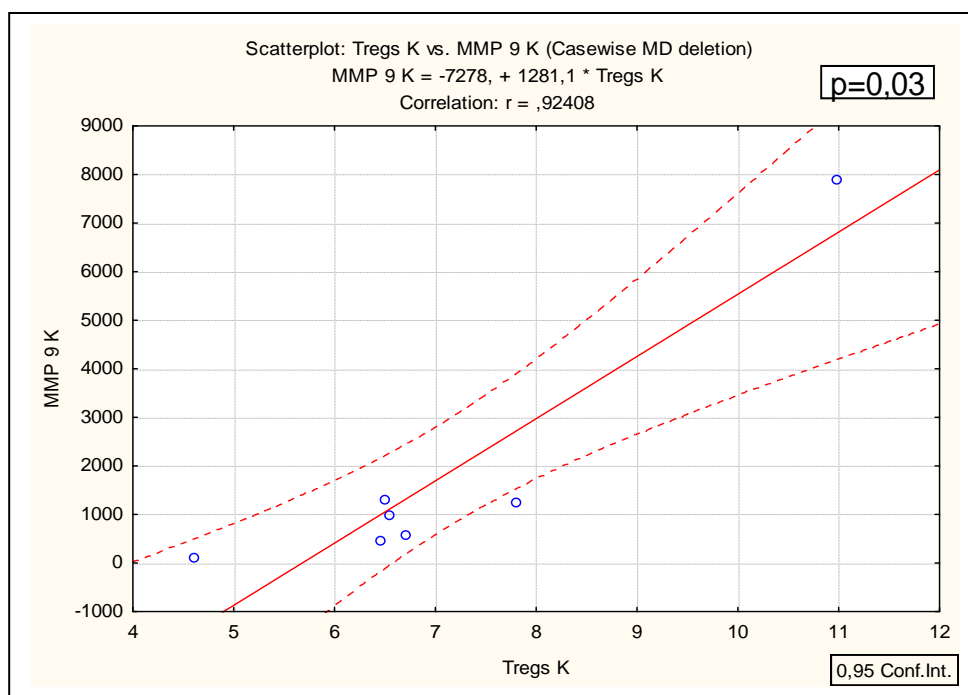
Posebno želimo naglasiti, kada uspoređujemo koncentraciju T regulacijskih stanica između urbanog i ruralnog područja u odnosu na kontrolne ispitanike (dobrovoljne darivatelje krvi), statistički je značajno povećan broj T regulacijskih stanica urođene imunosti u stanovnika industrijskih područja u usporedbi sa ruralnim stanovništvom (Slika 43).



Slika 43 Povećana koncentracija regulacijskih T stanica (Tregs:CD4+CD25+FoxP3+) u stanovnika industrijskih područja u odnosu na kontrolu i na ruralno područje

#### 4.4.6. Korelacije između koncentracije vrijednosti enzima MMP-9 i postotka T regulacijskih stanica

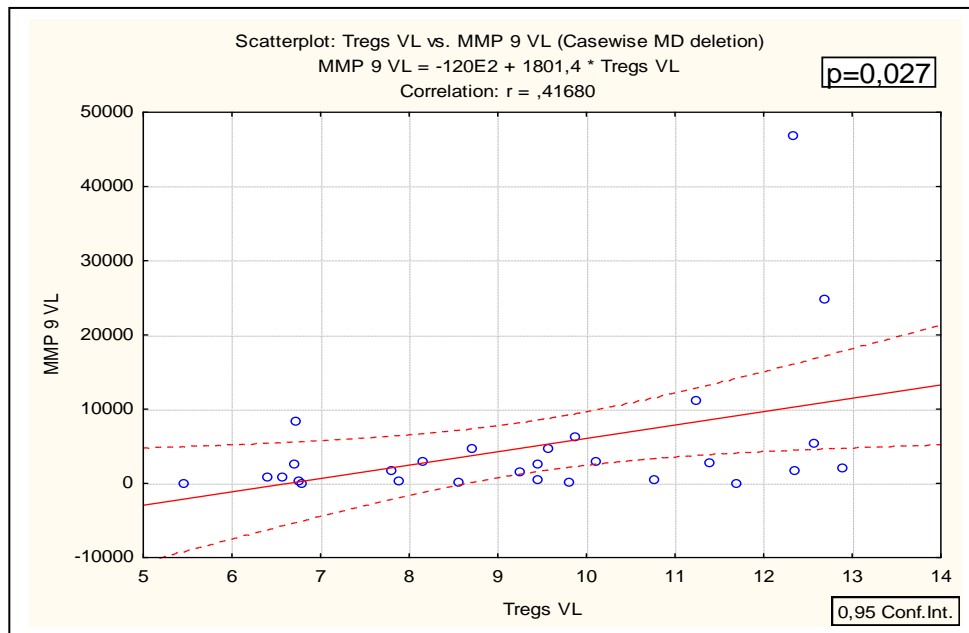
Tijekom našeg istraživanja uočili smo značajnu ushodnu regulaciju između postotka regulacijskih T stanica i izražaja enzima MMP-9. Ispitali smo postoji li korelacija između postotka Tregs i izražaja enzima MMP-9. Slika 44 prikazuje korelaciju navedenih parametara u djelatnika brodogradilišta Kraljevica gdje uočavamo statistički značajnu korelaciju između MMP-9 i Tregs ( $p=0,03$ ;  $r=0,92408$ ).



Slika 44 Korelacija između regulacijskih T stanica (CD4+CD25+FoxP3+) i MMP-9 u djelatnika brodogradilišta Kraljevica

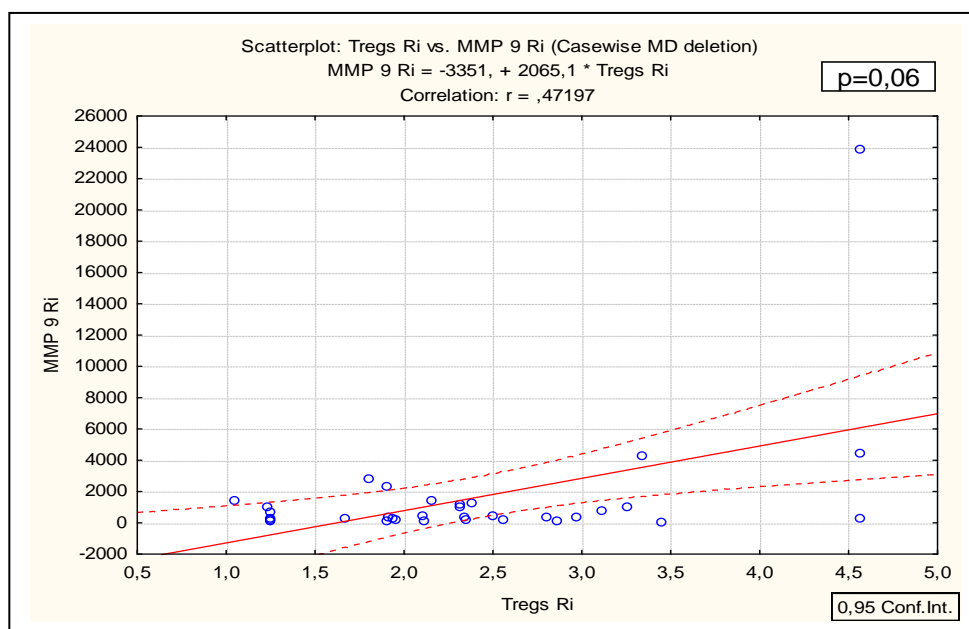


Statistički značajnu korelaciju između Tregs i MMP-9 uočili smo također i kod djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac (Slika 45); ( $p=0,027$ ;  $r=0,4168$ ).



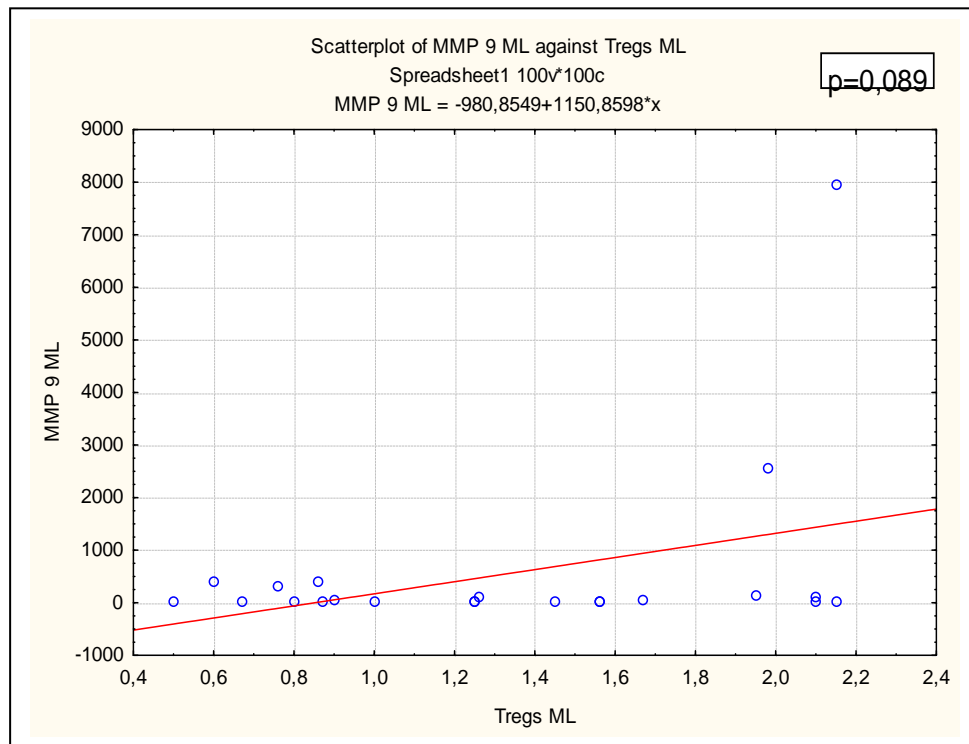
Slika 45 Korelacija između regulacijskih T stanica (Tregs:CD4+CD25+FoxP3+) i MMP-9 u djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac

Pozitivna korelacija između postotka Tregs i izražaja enzima MMP-9 se primjećuje i kod stanovnika grada Rijeke (Slika 46), ali ona nije statistički značajna ( $p=0,06$ ;  $r=0,4720$ ).



Slika 46 Korelacija između regulacijskih T stanica (Tregs:CD4+CD25+FoxP3+) i MMP-9 u stanovnika Rijeke

Slika 47 prikazuje korelaciju postotka Tregs i izražaja enzima MMP-9 u stanovnika Malog Lošinja koja je pozitivna, iako bez statističke značajnosti ( $p=0,089$ ;  $r=0,3711$ ).



Slika 47 Korelacija između regulacijskih T stanica (Tregs:CD4+CD25+FoxP3+) i MMP-9 u stanovnika Malog Lošinja

## 5. Rasprava

Razvojem modernih gradova i društva koji za svoje svakodnevno funkcioniranje trebaju sve više energije, dolazi do neophodnog i brzog razvoja različitih oblika industrija koje svojim neprekidnim radom, najčešće uz korištenje naftnih derivata kao glavnog energenta, omogućavaju pokretanje vrlo intenzivnog gradskog prometa i vrše pretvorbu različitih oblika energije u onu (najčešće električnu) koju stanovnici gradova obilato koriste. U Gradu Rijeci se zbog navedenih potreba za električnom energijom, lučkim, cestovnim i željezničkim gradskim prometom u nekoliko prošlih desetljeća razvila vrlo jaka naftna industrija kojoj je glavna karakteristika ispuštanje potencijalno opasnih spojeva koji na različite načine ulaze u procese okolišne ravnoteže i utječu na zdravlje ljudi. Mnogi ispušni spojevi nastali radom industrije koji utječu na procese u ljudskome organizmu dovodeći do patogeneze i razvoja bolesti okoliša još su uvijek nedovoljno poznati. Učestalost razvoja bolesti okoliša u razvijenim zemljama je u porastu, te one predstavljaju veliko opterećenje za pojedinca i javno zdravstvo u cjelini. To su ujedno i glavni razlozi zbog čega ove bolesti treba što ranije prepoznati, a čimbenike koji potpomažu njihov razvoj treba pokušati otkloniti ili njihov štetni utjecaj smanjiti koliko je to najviše moguće (28, 29, 255).

Osim karakteristika ljudskoga organizma (fizioloških, biokemijskih, genetskih), te kemijskih obilježja potencijalno opasnih zagađivala (topljivost, hlapljivost), mnogi drugi čimbenici iz okoliša utječu na pojavnost bolesti okoliša. Čimbenici kao što su temperatura, vlažnost i intezitet svjetla, imaju veliki utjecaj na procese biološkog nakupljanja i raspoloživosti zagađivala u organizmu. Biološka raspoloživost predstavlja stupanj do kojega je zagađivalo slobodno da uđe u organizam i potencijalno proizvede učinak na mjestu djelovanja, a ta mjesta mogu biti mjesto ulaza (lokalno), mjesto izlaza (sustavno) i mjesta izlučivanja (koža, vidljive sluznice) (256). Od svih navedenih

okolišnih čimbenika, koncentracija zagađivala u samom okolišu ipak predstavlja ključni razlog pojavljivanja određene bolesti okoliša (257). Tako se za mnoge spojeve koji su potencijalno opasni za ljudsko zdravlje provode opsežna znanstvena istraživanja kojima se pokušava dokučiti sva problematika vezana za pojavnost bolesti okoliša na određenim područjima i utjecaja okolišnih čimbenika na tu pojavnost. Dokazano je u istraživanjima da se na urbanim područjima koja su opterećena gradskim prometom, radom naftnih rafinerija, koncentracije nekih zagađivala kao što su hlapljivi aromatski ugljikovodici benzen, toluen, etilbenzen, o-ksilen i m/p-ksilen (BTEX) pojavljuju u daleko većim koncentracijama od onih određenih na ruralnim područjima (4,195). Većina se istraživanja temeljila na zimske mjesece u godini, jer je čitav niz okolišnih čimbenika (slabija fotokemijska razgradnja, velika vlažnost, niske okolišne temperature) usko povezana sa povećanom koncentracijom i dužom postojanošću BTEX-a u samome okolišu, a posljedično tome i većom biološkom akumulacijom istih u ljudskome organizmu (5, 7, 258-260). Na temelju ovih znanstvenih činjenica, sva smo naša istraživanja u ovome doktorskom radu vršili u zimskim mjesecima. U Hrvatskoj su se provela slična znanstvena istraživanja, gdje je nedvojbeno dokazano da se u ljetnim mjesecima u zraku mjere niže koncentracije dotičnih spojeva nego zimi, što se objašnjava činjenicom da je u tom razdoblju jača fotokemijska razgradnja (261). U istraživanjima je dokazano da su izmjerene koncentracije u zraku prvenstveno ovisile o gustoći prometa i klimatskim uvjetima karakterističnim za zimsko doba godine, te autori zaključuju da je rizik za štetno djelovanje zagađivala iz okolišu na ljudsko zdravlje tim veći što je veća blizina stanovanja ljudi izvorima zagađenja kao što su gradske prometnice u zimskim mjesecima godine (261).

Mnogi toksični spojevi prisutni u zraku, a u prvome redu hlapljivi aromatski ugljikovodici: benzen, toluen, etilbenzen, o-ksilen i m/p-ksilen čiji su najveći izvor u modernim gradskim sredinama gradski promet i naftne rafinerije, uvelike pridonose povećanju rizika za narušavanje ljudskog zdravlja i učestalosti nastanka bolesti okoliša. Hlapljivi aromatski ugljikovodici benzen, toluen, etilbenzen, o-ksilen i m/p-ksilen dokazani su u povećanim koncentracijama na područjima sa razvijenom naftnom industrijom i povećanom frekvencijom prometa, te su i naši podaci za koncentracije BTEX-a u zraku na područja Grada Rijeke dobiveni preko automatizirane mjerne postaje Mlaka u skladu sa navedenim istraživanjima. Upravo je okolišna izloženost navedenim spojevima povezana sa povećanim rizikom za ljudsko zdravlje (188). Oni su prije svega najčešće otkriveni spojevi koji su nalaze u urbanom zraku, a povezani su u mnogim istraživanjima sa čitavim nizom razvoja bolesti okoliša od kojih su najzastupljenije bolesti respiratornog sustava kao što su astma i kronična opstruktivna plućna bolest (9, 55). Benzen koji se u visokim koncentracijama nalazi u zraku urbanih područja, svojim hematotoksičnim djelovanjem i dokazanom limfocitnom toksičnošću negativno djeluje na ljudski imunološki sustav u ranim fazama razvoja imunoloških stanica, što nedvojbeno dovodi do narušavanja ravnoteže cijelog sustava (40). Istraživanja obuhvaćena ovim doktorskim radom imala su za cilj odrediti postojanje statističkih razlika u koncentracijama toksičnih i uvjetno karcinogenih hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena, o-ksilena i m/p-ksilena u urinu između naših skupina ispitanika kao znanstvene nadogradnje do sada postojećih isključivo kemijskih praćenja koncentracija hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, o-ksilena i m/p-ksilena u zraku. Apsolutno odsustvo bilo kakvih podataka o koncentracijama etilbenzena u okolišu, te uvođenje mjerenja istog u urinu svih ispitanika naših ispitnih skupina u

ovome doktorskom radu, predstavlja važan znanstveni doprinos u sagledavanju problematike prisustva hlapljivih aromatskih ugljikovodika u okolišu i njihovog potencijalnog utjecaja na povećanje rizika po zdravlje ljudi koji su profesionalno i/ili ambijentalno izloženi toksičnom djelovanju istih. Skupine ispitanika su definirane po karakteristikama isključivo okolišne izloženosti hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenu, toluenu, etilbenzenu, o-ksilenu i m/p-ksilenu, te su svi ispitanici reprezentativni predstavnici profesionalno izložene skupine, kontrolne skupine i gradske (urbane) skupine ispitanika. Iz naših je rezultata vidljivo da su koncentracije BTEX-a u urinu povišene u djelatnika brodogradilišta (posebno u profesionalno izloženih djelatnika brodogradilišta Kraljevica) u odnosu na stanovnike urbanog područja (grad Rijeka), a naročito su velike promjene u usporedbi sa stanovnicima ruralnog područja (Mali Lošinj).

Literaturni podaci navode da je ukupan broj mononuklearnih stanica periferne krvi u ljudi koji nisu izloženi benzenu daleko veći u odnosu na ispitanike koji su profesionalno i/ili ambijentalno izloženi istom (39, 95). Izloženost ljudi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenu, toluenu, etilbenzenu i izomerima ksilena kao produktima izgaranja naftnih derivata prvenstveno u prometu i radu naftnih industrijskih postrojenja, dovodi u ljudi koji žive i rade na tim područjima do statistički značajnog pada broja ukupnih limfocita, CD4<sup>+</sup> limfocita T, stanica B i stanica NK imunološkog sustava; dok kod citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocita T još uvijek postoji čitav niz nesuglasica. Mnogi autori navode da prilikom procesa nastajanja stanica T u koštanoj srži i sazrijevanja istih u timusu koji je izložen djelovanju benzena, dolazi do statistički značajnog pada proliferacije, diferencijacije i aktivacije CD4<sup>+</sup> limfocita T (40). Poseban problem za ljudsko zdravlje predstavlja kronična izloženost hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenu, toluenu, etilbenzenu i izomerima ksilena koja se najčešće povezuje s

profesionalnom izloženosti na radnom mjestu. Istraživanja koja su se temeljila na ispitivanjima toksičnih učinaka benzena na imunološki status profesionalno izloženih djelatnika naftne industrije, dokazala su zabrinjavajuće poremećaje na razini citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocita T i pomagačkih CD4<sup>+</sup> limfocita T u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Neophodno je potrebno uvođenje stalnog biološkog praćenja koje bi uključivalo mjerenja koncentracija benzena u urinu djelatnika, te sukladno tome određivanja imunotoksikološkog statusa istih u vidu izražaja citotoksičnih CD8<sup>+</sup> i pomagačkih CD4<sup>+</sup> limfocita T za koje se smatra da igraju ključnu ulogu kod imunološkog odgovora ljudi na toksično (kronično) djelovanje benzena (39, 40, 97). Mnoge od navedenih imunotoksikoloških promjena još uvijek nisu u dovoljnoj mjeri razjašnjene. Nema podataka u literaturi o ulozi otpuštanja citolitičke molekule perforina iz mononuklearnih stanica periferne krvi stanovnika koji stanuju u gradskim sredinama u usporedbi sa stanovnicima ruralnih sredina, kao ni kod profesionalno izloženih ljudi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenu, toluenu, etilbenzenu i izomerima ksilena. Patološka zbivanja vezana uz respiracijski sustav, kao i čitav niz oboljenja koja možemo ujediniti pod nazivom hiperreaktivnost, uključuju djelovanja regulacijskih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> stanica te stanica NKT (38). Regulacijske CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> stanice koje se proizvode u timusu imaju odlučujuću ulogu u prevenciji autoimunih procesa i održavanja autotolerancije, najčešće u obliku nishodne regulacije lučenja IL-2 i IFN- $\gamma$  (38). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> stanice pokazuju karakteristično svojstvo inhibicije produkcije IL-2, najvjerojatnije zbog represijskog djelovanja transkripcijskog faktora Foxp3, te ih mnogi autori opisuju kao stanice koje imaju supresivno djelovanje na ljudski imunološki sustav kada je izložen djelovanju okolišnih čimbenika (41). Sve je više



dokaza da ove regulacijske stanice vrlo uspješno mogu suprimirati razvoj eozinofilije u bronhima (79) i sudjelovati u regulaciji respiracijskih bolesti, astmatske upale i bronhalne hiperreaktivnosti (43). U ovom doktorskom radu ustanovili smo postojanje promjena stanicama posredovane imunosti u odnosu na okolišnu izloženost hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenu, toluenu, etilbenzenu, o-ksilenu i m/p-ksilenu. Između naših skupina ispitanika je uočen smanjen postotak CD3<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> stanica i povećanje CD8<sup>+</sup> stanica kod djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac, iako promjene nisu statistički značajne. Ukupni perforin u perifernoj krvi ispitanika profesionalno izloženih hlapljivim aromatskim ugljikovodicima je statistički značajno snižen. Naši rezultati ukazuju da je postotak stanica NK snižen u profesionalno izloženih djelatnika brodogradilišta, kao i postotak CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica ukazujući na smanjenu citolitičku sposobnost ovih stanica. Nadalje, naši rezultati isto tako pokazuju da je postotak stanica NKT (CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>) i T regulacijskih stanica karakterističnog fenotipa (Tregs:CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) statistički značajno povišen. Rezultati su u skladu s našim podacima objavljenim 2009. godine, koji su ukazali prvi put na značajnu osobinu da je broj T regulacijskih stanica povišen u stanovnika industrijskih područja čiji je okoliš opterećen hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenom, toluenom, etilbenzenom i izomerime ksilena (262). Međutim, kod stanovnika toga područja kod kojih su zabilježene značajnije spirometrijske promjene, uočili smo snižen broj T regulacijskih stanica urođene imunosti (262).

Tematski slična istraživanja idu u prilog našim rezultatima i ukazuju na činjenicu da izloženost ljudi benzenu i toluenu, kao stalnim produktima izgaranja fosilnih goriva, dovodi u ljudi koji žive i rade na urbanim područjima do statistički značajnog pada broja ukupnih limfocita, CD4<sup>+</sup> limfocita T, stanica B i stanica NK (40, 69, 263), dok se

literaturni podaci o broju i ulozi citotoksičnih CD8+ limfocita T u navedenim primjerima dosta razlikuju. U znanstvenim istraživanjima pokazuje se upravo potpuno suprotan učinak djelovanja benzena na broj stanica NK ljudskog imunološkog sustava. Uočeno je statistički značajno povećanje postotka stanica NK u ljudi izloženih toksičnom djelovanju benzena kao nusproduktu rada navedene industrije (70, 264). Novija znanstvena istraživanja nadalje ukazuju na činjenice koje smo i mi u ovome radu dokazali, da izloženost ljudi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima ne dovodi do statistički značajnije promjene u broju citotoksičnih CD8+ limfocita T (67), ali da dovodi do statistički značajnog smanjenja postotka stanica NK i postotka CD56+P+ stanica koji za posljedicu ima smanjenu citolitičku sposobnost mononuklearnih limfatičkih stanica periferne krvi (263, 264).

Ako promatramo biološku pretvorbu hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena, o-ksilena i m/p-ksilena, jetra predstavlja ciljni organ u kojem se procesi biološke pretvorbe zbivaju u dvije faze. U prvoj fazi biološke pretvorbe dolazi do promjene strukture spojeva putem kemijskih reakcija kao što su oksidacija, redukcija i hidroliza koje su katalizirane najčešće monooksigenazama, enzimima iz sustava citokroma (P- 450), smještenim u endoplazmatskom retikulumu stanica jetre. Proces biološke pretvorbe kao rezultat nema uvijek detoksikaciju kemijskih spojeva, ponekad se dogodi i "bioaktivacija" početnog spoja koji na taj način postaje još toksičniji. Ovim mehanizmom nastaju vrlo reaktivni elektrofilni produkti koji mogu reagirati unutar stanica sa proteinima, lipidima, enzimima, nukleinskim kiselinama uzrokujući citotoksičnost, nekrozu stanica, mutacije pa čak i teška patogena stanja kao što su maligne promjene. U drugoj fazi dolazi do vezanja osnovnih spojeva ili metabolita iz prethodne faze sa endogenim spojevima prisutnim u organizmu (glicin, sulfat, glukuronska kiselina), pri

čemu nastaju u vodi topivi (polarniji) derivati koji se iz organizma najčešće izlučuju putem bubrega. U najvećem broju slučajeva, konjugacijom u organizmu nastaju manje toksičniji spojevi ("detoksikacija"). Može se reći, kada je unos pojedinog spoja u organizam veći od njegove razgradnje i izlučivanja dolazi do procesa "biološke akumulacije", gdje opseg procesa ovisi o razini i vremenu izloženosti ljudskoga organizma tim spojevima i njihovoj topljivosti u mastima (1, 265). Hlapljivi aromatski ugljikovodici (BTEX) se izlučuju iz organizma manjim dijelom u nepromijenjenom obliku putem izdahnutog zraka, a najvećim dijelom u obliku metabolita bubrežnim izlučivanjem (1). Putem izdahnutog zraka manja količina navedenih spojeva izlazi iz organizma, a najbolji pokazatelj njihovog odstranjenja je biološki poluživot koji se razlikuje ovisno o vrsti tkiva: manje od 5 minuta za krv; nekoliko minuta do nekoliko sati za mišiće i nekoliko sati do nekoliko dana za masno tkivo (2). Znanstvena je činjenica da do pojačanog izražaja enzima matriks metaloproteinaze-9 u ljudskom organizmu dolazi zbog potrebe vrlo intenzivnog zaštitnog i regenerativnog djelovanja na razini plućnih epitelnih stanicama prilikom teških oštećenja plućnog epitela uzrokovanog kronično opstruktivnom plućnom bolešću, emfizemom pluća i astmom. Navedene bolesti okoliša dokazano mogu nastati kao rezultat djelovanja okolišnih zagađivala kao što su hlapljivi aromatski ugljikovodici benzen, toluen, etilbenzen, o-ksilen i m/p-ksilen (170-173). U ovom doktorskom radu odredili smo po prvi puta statistički značajne razlike u izražaju (koncentracijama) enzima matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) u urinu između naših skupina ispitanika koje ukazuju na veliko povećanje izražaja enzima matriks metaloproteinaze-9 u profesionalno izloženih grupa hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenu, toluenu, etilbenzenu, o-ksilenu i m/p-ksilenu u odnosu na stanovnike grada Rijeke, a naročito u odnosu na stanovnike Maloga Lošinja. Izraziti

postotak povećanja enzima matriks metaloproteinaze-9 u profesionalno izloženih djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac i u odnosu na brodogradilište Kraljevica, može se objasniti činjenicom da djelatnici brodogradilišta Viktor Lenac u većini slučajeva stanuju u urbanom području (u Rijeci). Okoliš grada Rijeke je u usporedbi sa ruralnim područjem dokazano više opterećen hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenom, toluenom i izomerima ksilena koji su konstantno prisutni u životnom i radnom okolišu profesionalno izloženih djelatnika brodogradilišta Viktor Lenac. Iz istog razloga, profesionalno izloženi djelatnici brodogradilišta Viktor Lenac su posljedično kronično izloženi djelovanju hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena, o-ksilena i m/p-ksilena. Za razliku od njih, profesionalno izloženi djelatnici brodogradilišta Kraljevica većinom stanuju upravo u ruralnom području Kraljevice i okolice, pa su vremenski i okolišno (životni okoliš) daleko manje izloženi djelovanju hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena i izomera ksilena. Iz navedenog možemo reći da je upravo dugotrajna izloženost hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenu, toluenu, etilbenzenu i izomerima ksilena putem životnog i radnoga okoliša u slučaju profesionalno izloženih ispitanika brodogradilišta Viktor Lenac razlog povećanog izražaja enzima matriks metaloptoteinaze -9 koja je dokazano vrlo važna u imunološkom odgovoru ljudi izazvanog djelovanjem hlapljivih aromatskih ugljikovodika na stanice T, plućne epitelne stanice, fibroblaste, alveolarne makrofage gdje posljedično dolazi do narušavanja ravnoteže između izražaja, regulacije i produkcije matriks metaloproteinaza (149). Doprinos gradskog prometa zagađenju životnog okoliša hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenu, toluenu, etilbenzenu i izomerima ksilena jasno se vidi u našim rezultatima statistički značajnih razlika u koncentracijama istih određenih u urinu, dok s druge strane na to ukazuju i statistički značajne razlike u izražaju enzima matriks

metaloproteinaze-9 između skupine ispitanika urbanog područja grada Rijeka u usporedbi sa ispitanicima ruralnoga područja Maloga Lošinja. U prilog iznesenim tvrdnjama idu i naši rezultati mjerenja spirometrijskih vrijednosti svih ispitnih grupa, gdje smo dokazali postojanje promjena spirometrijskih vrijednosti koje su izraženije u profesionalno izloženih djelatnika u usporedbi sa stanovnicima ruralnog područja kao posljedice okolišne izloženosti hlapljivim aromatskim ugljikovodicima.

Na osnovi rezultata predstavljenih u ovome radu, može se reći da izloženost hlapljivim aromatskim ugljikovodicima benzenu, toluenu, etilbenzenu i izomerima ksilena u životnom i radnom okolišu predstavlja ozbiljan rizik za zdravlje ljudi, jer nedvojbeno imaju vrlo jaka toksična djelovanja na imunološki sustav uz ostale negativne čimbenike u okolišu. Na izneseno ukazuje sniženi postotak stanica NK, postotak NKT (CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>) i T regulacijskih stanica (Tregs: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) koji je statistički značajno povišen u profesionalno izloženih ispitanika u usporedbi s ispitanicima grada Rijeka i posebno u odnosu na ispitanike Maloga Lošinja. Treba naglasiti da je upravo u ovome radu dokazana statistički značajno povišena koncentracija hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena i izomera ksilena u urinu profesionalno izloženih ispitanika (premazivači brodskih konstrukcija) jedan od glavnih razloga iznesenih tvrdnji, te da upravo njihova koncentracija u okolišu predstavlja jedan od glavnih rizika za zdravlje ljudi koji se sustavno mora pratiti. Navedene tvrdnje potvrđene su i našim rezultatima izražaja enzima matriks metaloproteinaze-9 koji je statistički značajno povišen u profesionalno izloženih ispitanika, te rezultati spirometrijskih mjerenja koji ukazuju na postojeće promjene unutar njihovog respiracijskog sustava koje mogu biti u izravnoj vezi sa prije iznesenim tvrdnjama kao ranih pokazatelja rizika nastanka bolesti okoliša kao što su kronično opstruktivna plućna bolest i astma. Vrlo je važno uvođenje

stalnog biološkog nadziranja koncentracija hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, o-ksilena i m/p-ksilena, kao nadogradnje do sada isključivo kemijskih praćenja koncentracija istih u okolišnom zraku. Nadziranje se treba proširiti i na imunotoksikološke pretrage kod profesionalno izloženih djelatnika ukoliko mislimo kvalitetno upravljati zdravstvenim rizicima kako pojedinaca, tako i čitave zajednice u cjelini. Samo ovakav sveobuhvatni biološko-kemijski pristup može pružiti rješenja koja bi zadovoljila očuvanje zdravlja i kvalitete života u odnosu na industrijski razvoj koji zbog nepresušne potrebe za različitim oblicima energije ima sve brži i neprestani rast.

## 6. Zaključni pregled

## ZAKLJUČNI PREGLED

Naše istraživanje je obuhvatilo ispitivanje promjena koncentracija toksičnih i uvjetno karcinogenih hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena, o-ksilena i m/p-ksilena u urinu naših skupina ispitanika, kao i promjena stanicama posredovane imunosti u perifernoj krvi ispitanika u odnosu na okolišnu izloženost hlapljivim aromatskim ugljikovodicima. Ispitali smo razlike u izražaju (koncentracijama) enzima matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) u urinu i prisutnost/odsutnost uzročno-posljedičnih veza u pojavnosti bolesti okoliša i koncentracija hlapljivih aromatskih ugljikovodika u urinu. Istraživanje je uključilo skupine ispitanika koje su profesionalno izložene djelovanju hlapljivih aromatskih ugljikovodika benzena, toluena, etilbenzena, o/ksilena i m/p ksilena (profesionalni premazivači brodskih konstrukcija u brodogradilištima) u odnosu na ispitanike karakterističnog urbanog područja grada Rijeke i ruralnog područja Maloga Lošinja, uspoređeno s nalazima kontrolne grupe ispitanika (dobrovoljni darivatelji krvi).

Dobiveni su sljedeći rezultati:

1. Koncentracije benzena, toluena, etilbenzena, o/ksilena i m/p ksilena u urinu su statistički značajno povišene u ispitanika koji su profesionalno izloženi hlapljivim aromatskim ugljikovodicima.
2. Postotak stanica urođene imunosti: NKT (CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>) i T regulacijskih stanica (Tregs:CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) je statistički značajno povišen u perifernoj krvi ispitanika profesionalno izloženih hlapljivim aromatskim ugljikovodicima.
3. Ukupni perforin u perifernoj krvi ispitanika profesionalno izloženih hlapljivim aromatskim ugljikovodicima je statistički značajno snižen.



4. Postotak NK stanica je snižen u perifernoj krvi ispitanika profesionalno izloženih hlapljivim aromatskim ugljikovodicima, kao i postotak CD56+P+ stanica ukazujući na smanjenu citolitičku sposobnost ovih stanica.
5. Izražaj enzima matrix metaloproteinaze -9 je statistički značajno povišen kako u profesionalno izloženih skupina, tako i u ispitanicima urbanog područja.
6. U profesionalno izloženih djelatnika brodogradilišta prisutna je statistički značajna pozitivna korelacija između postotka Treg stanica i izražaja enzima matrix metaloproteinaze -9.
7. Promjene spirometrijskih vrijednosti su izraženije u profesionalno izloženih djelatnika u usporedbi sa stanovnicima ruralnog područja

Naši rezultati ukazuju na prisustvo narušene aktivnosti prirođenog i stečenog imunološkog odgovora (vidljivo iz statistički povišenih vrijednosti NKT i Treg stanica, kao i značajnog smanjenja izražaja unutarstanične koncentracije perforina) u ispitanika profesionalno izloženih hlapljivim aromatskim ugljikovodicima.

Regulacijske T stanice izražavaju perforin i granzim i mogu suprimirati NK i NKT-ovisnu citotoksičnost, te bi biološko praćenje ovih stanica moglo predstavljati značajni pokazatelj razvoja i praćenja bolesti okoliša. Relativno jednostavne metode određivanja MMP-9 i BTEX-a u urinu doprinijele bi prevenciji i ranijoj dijagnozi bolesti okoliša, te popratnom uspješnijem liječenju.

## 7. Literatura

1. Koss G, Tesseraux I. Hydrocarbons. U: Marquardt H, Schafer SG, McClellan RO, Welsch F, ur. Toxicology Academic Press, 1999;str. 603-644.
2. Heinrich-Ramm R, Jakubowki M, Heinzow B, Molin Christensen J, Olsen E, Hertel O. Biological monitoring for exposure to volatile organic compounds (VOCs). Pure Appl Chem 2000;72:385-436.
3. Crebelli R, Tomei F, Zijno A i sur. Exposure to benzene in urban workers: environmental and biological monitoring of traffic police in Rome. Occup Environ Med 2001;58:165-171.
4. Kouniali A, Cicoella A, Gonzalez-Flesca N, Dujardin R, Gehanno JF, Bois F. Environmental benzene exposure assessment for parent-child pairs in Rouen, France. Sci Total Environ 2003;308:73-82.
5. Caricchia AM, Chiavarini S, Pezza M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmospheric particulate matter in the city of Naples (Italy). Atmos Environ 1999; 33:3731-38.
6. Kuo HW, Wei HC, Liu CS i sur. Exposure to volatile organic compounds while commuting in Taichung, Taiwan. Atmos Environ 2000; 34:3331-36.
7. Fernandes MB, Brickus LSR, Moreira JC, Cardoso JN. Atmospheric BTX and polyaromatic hydrocarbons in Rio de Janeiro, Brazil. Cesteh-ensp 2002;1480:21041-210.
8. Lovino P, Polverino R, Salvestrini S, Capasso S. Temporal and spatial distribution of BTEX pollutants in the atmosphere of metropolitan areas and neighbouring towns. Environmental Monitoring and Assessment 2008;8:0242-5.

9. Lee SC, Chiu MY, Ho KF, Zou SC, Wang X. Volatile organic compounds (VOCs) in urban atmosphere of Hong Kong. *Chemosphere* 2002;48:375–382.
10. Waidyanatha S, Rothman N, Fustinoni S, Smith MT, Hayes RB, Bechtold W. Urinary benzene as a biomarker of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. *Carcinogenesis* 2001;22:279-286.
11. Duarte-Davidson R, Courage C, Rushton L, Levy L. Benzene in the environment: an assessment of the potential risks to the health of the population. *Occup Environ Med* 2001;58:2–13.
12. Nordlinder R, Jarvholm B. Environmental exposure to gasoline and leukemia in children and young adults—an ecology study. *Int Arch Occup Environ Health* 1997; 70:57–60.
13. Jarvholm B, Forsberg B. Childhood cancer and possible exposure to benzene from traffic and petrol stations. *Occup Environ Med* 2000;57:500–501.
14. Steffen C, Auclerc MF, Auvrignon A, Baruchel A, Kebaili K, Lambilliotte A. Acute childhood leukaemia and environmental exposure to potential sources of benzene and other hydrocarbons: a case-control study. *Occup Environ Med* 2004;61:773–778.
15. ATSDR. Toxicological profile information sheet. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Department of Health and Human Services 2003;Public Health Service, USA. <http://www.atsdr.cdc.gov/>; pristup 26.04.2009.
16. Pastor PN, Makuc DM, Reuben C, Xia H. Chartbook on Trends in the Health of Americans, Health, United States, 2002. Hyattsville 2002;MD:National Center for Health Statistics. <http://www.cdc.gov/nchs/>; pristup 20.03.2009.

17. NTP. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ethylbenzene (CAS No. 100-41-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). Natl Toxicol Program. Tech Rep Ser 1999;466:1–231.
18. US EPA. Integrated Risk Information; System (IRIS) Substance List Website. United States Environmental Protection Agency, Office of research and development 2004; National Center for Environmental Assessment, USA. [http://www.epa.gov/;](http://www.epa.gov/) pristup 17.02.2009.
19. Gobba F, Ghittori S, Imbriani M, Maestri L, Capodaglio E, Cavalleri A. The urinary excretion of solvents and gases for the biological monitoring of occupational exposure : a review. Sci Total Environ 1997;199:3-12.
20. Arnold V, Balkow S, Staats R. Increase in perforin positive peripheral blood lymphocytes in extrinsic and intrinsic asthma. Am J Respir Crit Care Med 2000;161: 182–186.
21. Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D i sur. Perforin Expression and Cytotoxic Activity of Sputum CD8<sup>+</sup> Lymphocytes in Patients With COPD. Chest 2004;125:71-76.
22. Bach PB, Brown C, Gelfand SE, McCrory DC. Management of Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A Summary and Appraisal of Published Evidence. Ann Intern Med 2001;134:600.
23. Liistro G, Vanwelde C, Vincken W, Vandevoorde J, Verleden G, Buffels J. Technical and Functional Assessment of 10 Office Spirometers: A Multicenter Comparative Study. Chest 2006;130:657-665.

24. Buffels J, Degryse J, Heyrman J. Office spirometry significantly improves early detection of COPD in general practice: the DIDASCO study. *Chest* 2004;125:1394-1399.
25. NHLBI/WHO. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Workshop report 2001. <http://www.utmem.edu/pulmonary/documents/GlobalStrategyCOPD.pdf>; pristup 15.01.2009.
26. Enright PL, Kaminsky DA. Strategies for screening for chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Care* 2003;48:1194–1201.
27. Schermer TR, Jacobs JE, Chavannes NH. Validity of spirometric testing in a general practice population of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Thorax* 2003;58:861–866.
28. Friesen MC, Davies HW, Teschke K, Ostry AS, Hertzman C, Demers PA. Impact of the specificity of the exposure metric on exposure-response relationships. *Epidemiology* 2007;18:88-94.
29. Biggeri A, Lagazio C, Catelan D, Pirastu R, Casson F, Terracini B. Report on health status of residents in areas with industrial, mining or military sites in Sardinia, Italy. *Epidemiol Prev* 2006;30:5-95.
30. Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway Epithelial Repair, Regeneration, and Remodeling after Injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:726-733.
31. Girolamo ND, Indoh I, Jackson N i sur. Human Mast Cell-Derived Gelatinase B (Matrix Metalloproteinase-9) Is Regulated by Inflammatory Cytokines: Role in Cell Migration. *Immunology* 2006;177:2638-2650.

32. Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 1994;269:22027-22033.
33. Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, HersHKoviz R, Mekori YA. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 2001;167:4008-4016.
34. Okada S, Kita H, George TJ, Gleich GJ, Leiferman KM. Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am. J. Respir Cell Mol Biol* 1997;17:519-528.
35. Keck T, Balcom JH, Fernandez del Castello C, Antoniu BA, Warshaw AL. MMP-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis associated lung injury in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:188-201.
36. Koc M, Ediger D, Budak F i sur. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer. *Journal of Experimentel and Clinical Oncology* 2006;2:92.
37. Lund AK, Knuckles TL, Akata CO i sur. Gasoline Exhaust Emissions Induce Vascular Remodeling Pathways Involved in Atherosclerosis *Toxicological Sciences* 2007;95:485–494.
38. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). *J Immunol* 1995;160:1151-64.

39. Takeshi T, Shunichi A, Akinori N, Kazuhito Y, Tadashi S, Susumu S. Decreases of Natural Killer Cells and T-Lymphocyte Subpopulations and Increases of B Lymphocytes Following a 5-Day Occupational Exposure to Mixed Organic Solvents. *Archives of Environmental Health* 2001;56(5):443-448.
40. Lan Q, Zhang L, Hakim F i sur. Lymphocyte toxicity and T cell receptor excision circles in workers exposed to benzene. *Chemico– Biological Interactions* 2005;153:111-115.
41. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3<sup>+</sup> programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–336.
42. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+T cells. *Nat Immunol* 2007;8:12.
43. Ahern DJ, Robinson DS. Regulatory T cells as a target for induction of immune tolerance in allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:531-8.
44. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1357-1366.
45. Skender L, Brcic I, Karacic V. Urine analysis for the evaluation of environmental exposures to aromatic hydrocarbons. *Arch Environ Health* 2004;59:237-244.
46. Pekari K. Biological monitoring of benzene, toluene, and styrene (dissertation). Kuopio, Finland:Kuopio University Publications C. Natural and Environmental Sciences 1994;16.



47. Bogadi-Šare A, Turk R, Karačić V, Zavalic M, Trutin-Ostović K. Red blood cell glycerol lysis and hematologic effects in occupational benzene exposure. *Toxicol Ind Health* 1997;13:458-94.
48. Maitre A, Soulat JM, Masclet P, Stoklov M, Marques- Gaudemaris R. Exposure to carcinogenic air pollutants among policeman working close to traffic in an urban area. *Scand J Work Environ Health* 2002;28:402-10.
49. Ruchirawat M, Navasumrit P, Settachan D, Autrup H. Environmental impacts on children's health in Southeast Asia: genotoxic compounds in urban air. *Annals New York Academic of Sciences* 2006;1076:678-690.
50. Medinsky MA, Kenyon EM, Schlosse PM. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. *Toxicology* 1995;105:225–233.
51. Kim S, Vermeulen R, Waidyanatha S i sur. Modeling Human Metabolism of Benzene Following Occupational and Environmental Exposures. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2246–2252.
52. Kolachana P, Subrahmanyam VV, Meyer KB, Zhang L, Smith MT. Benzene and Its Phenolic Metabolites Produce Oxidative DNA Damage in HL60 Cells in Vitro and in the Bone Marrow in Vivo. *Cancer Research* 1993;53:1023-1026.
53. Sørensen M, Autrup H, Hertel O, Wallin H, Knudsen LE, Loft S. Personal exposure to PM<sub>2.5</sub> and biomarkers of DNA damage. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:191–196.

54. Sørensen M, Skov H, Autrup H, Hertel O, Loft S. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. *Science of the total environment* 2003;309:69-80.
55. Bono R, Scursatone E, Schiliro T, Gilli G. Ambient Air Levels and Occupational Exposure to Benzene, Toluene, and Xylenes in Northwestern Italy. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2003;66:519 – 531.
56. Applegate BM, Kehrmeyer SR, Saylor GS. A chromosomally based tod-luxCDABE whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:2730-2735.
57. Yueh-Fen L, Feng-Yin L, Chen-Lung H, Vivian Hsiu-Chuan L. Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds. *Environmental Pollution* 2007;1-7.
58. Crebelli R, Tomei F, Zijno A i sur. Exposure to benzene in urban workers: environmental and biological monitoring of traffic police in Rome. *Occup Environ Med* 2001; 58:165-171.
59. Kouniali A, Cicoella A, Gonzalez-Flesca N, Dujardin R, Gehanno JF, Bois F. Environmental benzene exposure assessment for parent-child pairs in Rouen, France. *Sci Total Environ* 2003;308:73-82.

60. Bentley AM, Menz G, Storz C i sur. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(2):500-6.
61. Azzawi M, Johnston PW, Majumdar S, Kay AB, Jeffery PK. T lymphocytes and activated eosinophils in airway mucosa in fatal asthma and cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:1477–1482.
62. Kemeny DM. The effects of pollutants on the allergic immune response. *Toxicology* 2000;152:3–12 .
63. Peden DB. Development of atopy and asthma: candidate environmental influences and important periods of exposure. *Environ Health Perspect* 2000;108:475–482.
64. Busse W W, Rosen FS. Asthma. *New Eng J Med* 2001;344:350–362.
65. Fan XH. Effect of exposure to benzene on natural killer (NK) cell activity and interleukin-2 (IL-2) production of C57BL/6 mice. *NIDI* 1992;59:393-9.
66. Akbas S, Derici E, Söylemez F, Kanik A, Polat F. An investigation of effects of toluene and cigarette smoking on some blood parameters and lymphocyte life span. *Cell Biology and Toxicology* 2004;20 (1):33-40
67. Lan Q, Zhang L, Li G i sur. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* 2004;306:1774–1776.
68. Joo WA, Sul D, Lee DY, Lee E, Kim CW. Proteomic analysis of plasma proteins of workers exposed to benzene. *Mutat Res* 2004;558(1-2):35-44.

69. Hertz-Picciotto I, Herr CE, Yap PS i sur. Air pollution and lymphocyte phenotype proportions in cord blood. *Environ Health Perspect* 2005;113:1391-1398.
70. Ray MR, Roychoudhury S, Mukherjee S, Lahiri T. Occupational benzene exposure from vehicular sources in India and its effect on hematology, lymphocyte subsets and platelet P-selectin expression. *Toxicol Ind Health* 2007;23:167-175.
71. Li B, Li Y, Chen S i sur. The T-cell receptor Vbeta gene repertoire and clonal expansion from peripheral blood T cells in benzene-exposed workers in China. *Hematology* 2009;14(2):106-10.
72. Polosa R, Salvi S, Di Maria GU. Allergic susceptibility associated with diesel exhaust particle exposure: clear as mud. *Arch Environ Health* 2002;57(3):188-93.
73. Kook H. Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia. *Exp Hematol* 2001;29:1270–7.
74. Diaz-Sanchez M D, Morris D. Diesel exhaust particles suppress in vivo IFN-gamma production by inhibiting cytokine effects on NK and NKT cells. *J Immunol* 2004;172:3808-3813.
75. Coico R, Sunshine G, Benjamini E, ur. *Immunology : A Short Course, Fifth Edition ; John Wiley & Sons, Inc; 2003.*
76. Ling EM, Smith T, Nguyen XD. Relation of CD4+CD25 regulatory T-cell suppression of allergen driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004;363:608-615.

77. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M i sur. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10(12):1969-80.
78. D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 2005;6:1152–1159.
79. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+T cells. *Nat Immunol* 2007; 8 : 12.
80. Ahern DJ, Robinson DS. Regulatory T cells as a target for induction of immune tolerance in allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 531-8.
81. Smith LJC, Starkey C, Vestbo J, Singh D. CD4-Regulatory Cells in COPB Patients. *Chest* 2007;132:156-163.
82. Oosterhout AJ, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *Eur Respir J* 2005; 26:918-932.
83. Borrelli I, Loffredo S, Staiano RI i sur. Benzene metabolites inhibit the release of proinflammatory mediators and cytokines from human basophils. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010; 23(3):737-44.
84. Charpin D, Penard-Morand C, Raheison C i sur. Long-term exposure to urban air pollution measured through a dispersion model and the risk of asthma and allergy in children. *Bull Acad Natl Med.* 2009; 193(6):1317-28.

85. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cells development by the transcription factor foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
86. Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressors T cells. *Nat Immunol* 2005; 6:338-44.
87. Apostolu I, Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 2004;199:1401-1408.
88. Grohman U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A et al. CTLA-4 Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002;3:1097-101.
89. Li B, Li YQ, Yang LJ i sur. Decreased T-cell receptor excision DNA circles in peripheral blood mononuclear cells among benzene-exposed workers. *Int J Immunogenet* 2009;36(2):107-11.
90. Snyder R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. *Drug Metab Rev* 2004;36(3-4):531-47.
91. Hayes RB. Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in the China. *CAPM* 1997;1065-1071
92. Vermeulen R, Li G, Lan Q i sur. Detailed exposure assessment for a molecular epidemiology study of benzen in two shoe factoris in China. *Ann Occup Hyg* 2004;48:105-116.
93. Sul D, Lee D, Im H, Oh E, Kim J, Lee E. Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. *Toxicol Lett* 2002;134(1-3):87-95.

94. Tomei G, Ciarrocca M, Bernardini A i sur. Plasma IL-2, NK, IFN- $\gamma$ , and C3 in male workers exposed to traffic pollutants. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2006;22(2):131-135.
95. Han SF, Li YQ, Yang LJ i sur. Evaluation of recent thymic output function in benzene-exposed workers, *Zhonghua Lao. Dong. Wei Sheng Zhi. Ye Bing. Za Zhi.* 2004;22: 181–183.
96. Snyder R. Benzene's toxicity: a consolidated short review of human and animal studies by HA Khan. *Hum Exp Toxicol* 2007;26(9):687-96.
97. Brandão MM, Rêgo MAV, Pugliese L i sur. Phenotype analysis of lymphocytes of workers with chronic benzene poisoning. *Immunology Letters* 2005;101(1):65-70.
98. Moszczyński P, Rutowski J, Słowiński S. The effect of cigarettes smoking on the blood counts of T and NK cells in subjects with occupational exposure to organic solvents. *Cent Eur J Public Health* 1996;4:164-168.
99. Fink TM, Zimmer M, Weitz S, Tschopp J, Jenne DE, Lichter P. Human perforin (PRF1) maps to 10q22, a region that is syntenic with mouse chromosome 10. *Genomics* 1992;13:300–2.
100. Shinkai Y, Yoshida MC, Maeda K i sur. Molecular cloning and chromosomal assignment of a human perforin (PFP) gene. *Immunogenetics* 1990;30:452–7.
101. Trapani JA. Target cell apoptosis induced by cytotoxic T cells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin, and the serine protease, granzyme B. *Australian and New Zealand journal of medicine* 1996;25: 793-9.

102. Göransdotter Ericson K, Fadeel B, Nilsson-Ardnor S i sur. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hum Genet* 2001; 68:590-7.
103. Kuiper M. Decloaking perforin, the protein assassin. A new target for cancer drugs 2010; <http://biosingularity.wordpress.com>; pristup 04.11.2010.
104. Rukavina D, Laskarin G, Rubesa G i sur. Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Blood* 1998;92:2410-20.
105. Laskarin G, Strbo N, Sotosek V i sur. Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. *Am J Reprod Immunol* 1999;42:312-20.
106. Strbo N, Laskarin G, Sotosek V, Randić LJ, Podack ER, Rukavina D. Modulation of perforin expression in the decidual and peripheral blood cytotoxic lymphocytes in culture. *Am J Reprod Immunol* 1999;42:14-21.
107. Kastelan M, Prpić Massari L, Gruber F i sur. The role of perforin-mediated apoptosis in lichen planus lesions. *Arch Dermatol Res* 2004;296:226-30.
108. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995;16:194–201.
109. Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Current Opinion in Immunology* 2007;19:339-347.
110. Smyth MJ, Thia K, Cretney E i sur. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol* 1999;162: 6658–6662.
111. Lodish H. *Molecular Cell Biology* (fifth edition), W.H. Freeman and Co., New York, USA 2004.



112. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death and Differentiation* 2008;15:251–262.
113. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology* 2002;2:735-747.
114. Hajimiragha H, Ewers U, Brockhaus A, Boetter A. Levels of benzene and other volatile aromatic compounds in the blood of nonsmokers and smokers. *Int Arch Occup Environ Health*. 1989;61:513-8.
115. Wallace L, Pellizzari E, Hartwell TD, Perrit R, Ziegenfuss R. Exposure to benzene and other volatile compounds from active and passive smoking. *Arch Environ Health*. 1987;42:272-9.
116. Maitre A, Soulat JM, Masclat P, Stoklov M, Marques GR. Exposure to carcinogenic air pollutants among policemen working close to traffic in an urban area. *Scand J Work Environ Health* 2002;28:402-10.
117. Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D *et al*. Perforin Expression and Cytotoxic Activity of Sputum CD8<sup>+</sup> Lymphocytes in Patients With COPD. *Chest* 2004;125:71-76.
118. O' Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, *et al*. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD<sup>+</sup> T lymphocytes with FEV<sub>1</sub>. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:852-857.
119. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, *et al*. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:822-826.

120. Arnold V, Balkow S, Staats R, et al. Increase in perforin positive peripheral blood lymphocytes in extrinsic and intrinsic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:182-186.
121. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, et al. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1304-1309.
122. Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd L, Corne JM, Fairclough LC. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respiratory Research* 2010;11:76.
123. Hodge S, Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN. Increased airway granzyme b and perforin in current and ex-smoking COPD subjects. *Copb* 2006;3:179-187.
124. Egeblad M. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev Cancer* 2002;2:161–174.
125. Kojima S, Itoh Y, Matsumoto S, Masuho Y and Seiki M. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6–MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Lett* 2000;480:142–146.
126. Opdenakker G, Van den Steen P E and Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 2001;22:571–579.
127. Bannikov GA, Karelina TV, Collier IE, Marmer BL , Goldberg GI. Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J Biol Chem* 2002;277:16022–16027.

128. Van den Steen PE . Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2002;37:375-536.
129. Zhu HJ, Burgess A W. Regulation of transforming growth factor beta signaling. *Mol. Cell Biol. Res. Commun* 2001;4:321–330.
130. Ma Z, Qin H, Benveniste EN. Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1alpha. *J Immunol* 2001;167:5150–5159.
131. Bartholomé EJ, Van Aelst I, Koyen E i sur. Human monocyte-derived dendritic cells produce bioactive gelatinase B: inhibition by IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:495–501.
132. Hummel V, Kallmann B A, Wagner S i sur. Production of MMPs in human cerebral endothelial cells and their role in shedding adhesion molecules. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:320–327.
133. Kitahara M, Ichikawa M, Kinoshita T, Shiozawa S, Shigematsu H, Komiyama A. Prostacyclin inhibits the production of MMP-9 induced by phorbol ester through protein kinase A activation, but does not affect the production of MMP-2 in human cultured mesangial cells. *Kidney Blood Press Res* 2001;24:18–26.
134. Vos CM, Gartner S, Ransohoff RM i sur. Matrix metalloprotease-9 release from monocytes increases as a function of differentiation: implications for neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroimmunol* 2000;109:221–227.
135. Nelissen I, Ronsse I, Van Damme J, Opdenakker G. Regulation of gelatinase B in

human monocytic and endothelial cells by PECAM-1 ligation and its modulation by interferon beta. *J Leukoc Biol* 2002;71:89–98.

136. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B i sur. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001;69:851–859.

137. Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol* 2001;22:571–579.

138. Bartholomé EJ, Willems F, Crusiaux A, Thielemans K, Schandene L, Goldman M. IFN-beta interferes with the differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells: selective inhibition of CD40-dependent interleukin-12 secretion. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19(5):471-8.

139. Masure S, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur J Biochem* 1991;198:391–398.

140. Proost P, De Wolf-Peeters C, Conings R, Opdenakker G, Billiau A, Van Damme J. Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10 and IL-8. *J Immunol* 1993;150:1000–1010.

141. Kleifeld O, Van den Steen PE, Frenkel A i sur. Structural characterization of the catalytic active site in the latent and active natural gelatinase B from human neutrophils. *J Biol Chem* 2000;275:34335–34343.

142. Bu CH, Pourmotabbed T. Mechanism of activation of human neutrophil gelatinase B. Discriminating between the role of Ca<sup>2+</sup> in activation and catalysis. *J Biol Chem* 1995;270:18563-18569.
143. Ugwu F, Lemmens G, Collen D, Lijnen HR. Matrix metalloproteinase deficiencies do not impair cell-associated fibrinolytic activity. *Thromb Res* 2001;102:61–69.
144. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J Cell Biol* 1997;74:111–122.
145. Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and 9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 1997;272:29975–29983.
146. Butler GS, Apte SS, Willenbrock F, Murphy G. Human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. Regulation by polyanions. *J Biol Chem* 1999;274:10846-10851.
147. Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274: 21491–4.
148. Nagase H, Visse R , Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIPMs. *Cardiovascular Research* 2006;69:562–573.
149. Lagente V, Manoury B, Nenan S, Qument Le Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2005;38:1521-1530.

150. Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem* 1995;270:11555-66.
151. Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1100-2.
152. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990;6:121-5.
153. Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 200;2:10-9.
154. Shapiro SD. Matrix metalloproteinases degradation of extracellular matrix:biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:602-8.
155. Opdenakker G, Van den Stenn PE, Dubois B. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001;69:851-9.
156. Brown GM, Brown DM, Donaldson K, Drost E, MacNee W. Neutrophil sequestration in rat lungs. *Thorax* 1995;50:661-7.
157. Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:749-54.
158. Delacourt C, Le Bourgeois M, D'Ortho MP. Imbalance between 95 kDa type collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases in sputum of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Care Med* 1995;152:765-74.

159. Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Hart C. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:288-95.
160. Laack E, Kohler A, Kugler C i sur. Pretreatmnet serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell cancer. *Annals of Oncology* 2002;13:1550-1557.
161. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Pro* 2008;83:584-594.
162. Yang P, Sun Z, Krowka MJ, Aubry MC, Bamlet WR, Wampfler JA. Alpha1-antitrypsin deficiency carriers, tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer risk. *Arch Intern Med* 2008;168:1097-1103.
163. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM;American College of Chest Physicians. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:29S-55S.
164. Parkin DM. The global burden of cancer. *Semin Cancer Biol* 1998;8:219-235.
165. Clifton F, Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997;111:1711-1717.
166. Sobin LH, Wittekind CH. UICC-TNM classification of malignant tumours. Nev York, NY:Wiley & Sons 1997;5<sup>th</sup> edition.
167. Gress TM, Muller-Pillasch F, Lerch MM i sur. Expression and *in-situ* localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1995;62:407-413.

168. Iwata H, Kobayashi S, Iwase H i sur. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:602-611.
169. Ueda Y, Imai K, Tsuchiya H i sur. Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) is expressed in multinucleated giant cells of human giant cell tumor of bone and is associated with vascular invasion. *Am J Pathol* 1996;148:611-622.
170. Bollati V, Baccarelli A, Hou L i sur. Changes in DNA Methylation Patterns in Subjects Exposed to Low-Dose Benzene. *Cancer Res* 2007;67:3.
171. Balmes JR, Earnest G, Katz PP i sur. Exposure to traffic: Lung function and health status in adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:626-31.
172. Pandya RJ, Solomon G, Kinner A, Balmes JR. Diesel exhaust and asthma: Hypotheses and molecular mechanisms of action. *Environ Health Perspect* 2002;110:103–12.
173. Leem JH, Kim JH, Hongy, Lee KH, Kang D, Kwon HJ. Asthma attack associated with oxidative stress by exposure to ETS and PAH. *J Asthma* 2005;42:463–7.
174. Ram S, Awasthi S, Mahdi A, Patel DK, Singh VK, Misra R. Assessment of association of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with bronchial asthma and oxidative stress in children: A case control study *Indian J Occup Environ Med* 2009;13: 33–37.
175. Ross D. The role of metabolism and apecific metabolites in benzene-induced toxicity:evidence and issues. *J Toxicol Environm Health* 2000;61:357-372.



176. Snyder R. Overview of the toxicology of benzene. *J Toxicol Environm Health* 2000;61:339-346.
177. Snyder R. Xenobiotic metabolism and the mechanisms of benzene toxicity. *Drug Metab Rev* 2004;36:531-547.
178. Rappaport SM, Waidyanatha S, Qu Q i sur. Albumin adducts of benzene oxide and 1,4-benzoquinone as measures of human benzene metabolisms. *Cancer Res* 2002;62:1330-7.
179. Schnatter AR, Rosamilia K, Wojcik NC. Review of the literature on benzene exposure and leukemia subtypes. *Chem Biol Interact* 2005;153-154:9-21.
180. Winkler MK, Foldes JK, Bunn RC, Fowlkes JL. Implications for matrix metalloproteinases as modulators of pediatric lung disease. *Am J Physiol. Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:557-65.
181. Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway Epithelial Repair, Regeneration, and Remodeling after Injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:726-733.
182. Girolamo ND, Indoh I, Jackson N i sur. Human mast cell-derived gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) is regulated by inflammatory cytokines: role in cell migration. *J Immunol* 2006;177(4):2638-50.
183. Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem.* 1994 Sep 2;269(35):22027-33.

184. Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, Hershkoviz R, Mekori YA. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *J Immunol* 2001;167(7):4008-16.
185. Okada S, Kita H, George TJ, Gleich GJ, Leiferman KM. Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(4):519-28.
186. Keck T, Balcom JH, Fernández-del Castillo C, Antoniu BA, Warshaw AL. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology* 2002;122(1):188-201.
187. Ohbayashi H. Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr Protein Pept Sci* 2002;3:409-421.
188. Hinwood AL, Rodriguez C, Runnion T i sur. Risk factors increased BTEX exposure in four Australian cities. *Chemosphere* 2007;66:533-541.
189. Lee SC, Chiu MY, Ho KF, Zou SC, Wang X. Volatile organic compounds (VOC<sub>S</sub>) in urban atmosphere of Hong Kong. *Chemosphere* 2002;48:375-382.
190. Bono R, Scursatone E, Schiliro T, Gilli G. Ambient air levels and occupation exposure to benzene, toluene, and xylenes in northwestern Italy. *J Toxicol Environ Health* 2003; 66:519-531.
191. Environment Australia. National pollution inventory contextual information. Department of the Environment and Heritage. Commonwealth of Australia, Canberra; 1999. [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere); pristup 07.12. 2010.

192. Environment Australia. A Status Report to the Community : Living Cities – Air Toxics Program. Department of the Environment and Heritage. Commonwealth of Australia, Canberra; 2002. [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere); pristup 07.12. 2010.
193. Environment Australia. Technical report Number 6:BTEX Personal Exposure Monitoring in four Australian Cities. Department of the Environment and Heritage. Commonwealth of Australia, Canberra; 2003. [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere); pristup 08.12. 2010.
194. Jo WK, Park KH. Concentrations of volatile organic compounds in the passenger side and the back of automobiles. J Expo Anal Epidemiol 1999;217-227.
195. Crebelli R, Tomei F, Zijino A, Ghittori S, Imbriani M, Gmberale D, i sur. Exposure to benzene in urban workers:environmental and biological monitoring of traffic police in Rome. Occup Environ Med 2001;58:165-171.
196. Kim YM, Harrad S, Harrison RM. Concentrations and sources of VOC<sub>S</sub> in urban domestic and public microenvironments. Environ Sci Technol 2001;35:997-1004.
197. Kim YM, Harrad S, Harrison RM. Levels and sources of personal inhalation exposure to volatile organic compounds. Environ Sci Technol 2002;36:5405-5410.
198. Duarte-Davidson R, Courage C, Rushton L, Levy L. Benzene in the environment:an assessment of the potential risks to the health of the popilation. Occup Environ Med. 2001;58:2-13.
199. IARC. International Agency for Research on Cancer. Overall evaluations of carcinogenicity to humans as evaluated in IARC Monographs Volumes (a total of 885 agents, mixtures and exposures) 2004;1-82.

200. Nordlinder R, Jarvholm B. Environmental exposure to gasoline and leukemia in children and young adults – an ecology study. *Int Arch Occup Environ Health* 1997; 70:57-60.
201. Jarvholm B, Forsberg B. Childhood cancer and possible exposure to benzene from traffic and petrol stations. *Occup Environ Med*. 2000;57:500-501.
202. Steffen C, Auclerc MF, Auvrignon A, Baruchel A, Kebaili K, Lambilliotte A, i sur. Acute childhood leukemia and environmental exposure to potential sources of benzene and other hydrocarbons:a case-control study. *Occup Environ Med*. 2004;61:773-778.
203. USEPA. United States Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) Substance List Website. National Center for Environmental Assessment, Office of research and development, USA. 2004; <http://www.epa.gov>; pristup 08.12. 2010.
204. NTP. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ethylbenzene (CAS No. 100-41-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 1999;466:1-231.
205. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile information sheet. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2003; [www.atsdr.cdc.gov](http://www.atsdr.cdc.gov); pristup 08.12.2010.
206. Gilli G, Scursatone E, Bono R. Benzene, toluene and xylenes in air, geographical distribution in the Piedmont region (Italy) and personal exposure. *Sci Total Environ* 1994;148:49-56.

207. Miller SL, Branoff S, Nazaroff WW. Exposure to toxic air contaminants in environmental tobacco smoke:an assessment for California based on personal monitoring data. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 1998;8:287-311.
208. Verma DK, Johnson DM, McLean JD. Benzene and total hydrocarbon exposure in the upstream petroleum oil and gas industry. *Am Ind Hyg Assoc* 2000;61:255-63.
209. Freeman NC, Lioy PJ, Pellizzari E i sur. Responses to the region 5 NHEXAS time/activity diary. National Human Exposure Assessment Survey. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 1999;9:414-426.
210. Hoffmann K, Krause C, Seifert B, Ullrich D. The German Environmental Survey 1990/1992 (GerES II):sources of personal exposure to volatile organic compounds. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2000;10:115-125.
211. Steinsvag K, Bratveit M, Moen BE. Exposure to carcinogens for defined job categories in Norway's offshore petroleum industry, 1970-2005. *Occup Environ Med* 2007;64:250-8.
212. Wallace L. Environmental exposure to benzene:an update. *Environ Health Perspect* 1996;6:1129-36.
213. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registr. Toxicological profile for benzene. 1997;98:101157/AS:27.
214. Hayes RB, Yin SN, Dosemeci M i sur. Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. Chinese Academy of Preventive Medicine-National Cancer Institute Benzene Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1065-71.

215. Savitz DA, Andrews KW. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. *Am J Med* 1997;31:287-95.
216. Lee E, Oh E, Lee J, Sul D, Lee J. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicol Sci* 2004;81(1):121-32.
217. Ross D. The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity:evidence and issues. *J Toxicology Environ Health A* 2000;61:357-72.
218. Snyder R. Overview of the toxicology of benzene. *J Toxicology Environ Health A* 2000;61:339-46.
219. Ervin Dubrović, ur. Riječka luka - povijest, izgradnja, promet. Rijeka, 2001.
220. Air Quality Guidelines for Europe. WHO Regional Publication Series No 91. WHO Copenhagen 2000;2.
221. Air Quality Guidelines for Europe:Health-based Guidelines 2000;3. [http://www.who.int/environmantal\\_information/Air/Guidelines/Chapter3.htm](http://www.who.int/environmantal_information/Air/Guidelines/Chapter3.htm); pristup 9.12. 2010.
222. Bono R, Scursatone E, Schiliro T, Gilli G. Ambient air levels and occupational exposure to benzene, toluene, and xylenes in northwestern Italy. *J Toxicol Environm Hlth, Part A.* 2003;66:519.
223. Perez BP, Field RA, Fernandez PR, Galan MD, Connolly R, Baeza CA i sur. An aprooach for the evaluation of exposure patterns of urban populations to air pollution. *Atmospheric Environment* 2008;42:5350—5364.
224. <http://www.tz-malilosinj.hr/ListItem.aspx?id=825>; pristup 02.12. 2010.

225. <http://www.tz-malilosinj.hr/ListItem.aspx?id=385>; pristup 02.12. 2010.
226. [www.ljeciliste-veli-losinj.hr/3/ljeci](http://www.ljeciliste-veli-losinj.hr/3/ljeci); pristup 02.12. 2010.
227. [www.lenac.hr/](http://www.lenac.hr/); pristup 12.12. 2010.
228. [www.kraljevica.hr/](http://www.kraljevica.hr/); pristup 14.12. 2010.
229. Baka S, Zourla K, Malamitsi-Puchner A i sur. Intrafollicular Levels of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 in Patients with Polycystic Ovaries Are Not Associated with Pregnancy Rate During IVF Cycle. *In vivo* 2009;23:89-92.
230. Koc M, Ediger D, Budak F i sur. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer. *Journal of Experimental and Clinical Oncology* 2006;2:92.
231. Wang H, Wen Y, Mooney S, Li H, Behr B, Polan ML. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2003;80:736-742.
232. Lee DM, Lee TK, Song HB, Kim CH. The expression of matrix metalloproteinase-9 in human follicular fluid is associated with *in vitro* fertilization pregnancy. *Int J Obstet Gyn* 2005;112:946-951.
233. Skender L, Brcic I, Karacic V. Urine analysis for the evaluation of environmental exposures to aromatic hydrocarbons. *Arch Environ Health* 2004;59:237-244.
234. Kok PW, Ong CN, Wong MK i sur. Environmental and Biological Assessment of Exposure to Benzene in Petroleum Workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1994; 66:195-201.

235. Lagorio S, Crebelli R, Ricciarello R, Conti L, Iavarone I, Zona A. Methodological issues in biomonitoring of low level exposure to benzene. *Occup Med* 1998;48:497-504.
236. Ljungkvist G, Lärstad M, Mathiasson L. Determination of low concentration of benzene in urine using multi-dimensional gas chromatography. *Analyst* 2001;126:41- 45.
237. Fustinoni S, Giampiccolo R, Pulvirenti S, Buratti M, Colombi A. Headspace solid-phase microextraction for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;19:105-15.
238. Waidyanatha S, Rothman N, Fustinoni S, Smith MT, Hayes RB, Bechtold W. Urinary benzene as a biomarker of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. *Carcinogenesis* 2001;22:279-286.
239. Liistro G, Vanwelde C, Vincken W, Vandevoorde J, Verleden G, Buffels J. Technical and Functional Assessment of 10 Office Spirometers: A Multicenter Comparative Study. *Chest* 2006;130:657-665.
240. Buffels J, Degryse J, Heyrman J. Office spirometry significantly improves early detection of COPD in general practice: the DIDASCO study. *Chest* 2004;125:1394-1399.
241. NHLBI/WHO. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Workshop report 2001. [http://www.utmem.edu/pulmonary/documents/Global\\_Strategy\\_COPD.pdf](http://www.utmem.edu/pulmonary/documents/Global_Strategy_COPD.pdf); pristup 15.01.2010.
242. Enright PL, Kaminsky DA. Strategies for screening for chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Care* 2003;48:1194–1201.



243. Schermer TR, Jacobs JE, Chavannes NH. Validity of spirometric testing in a general practice population of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Thorax* 2003;58:861–866.
244. Wanger J. Pulmonary function testing; A practical approach. Baltimore Maryland, USA: Williams&Wilkins,1992:1-221.
245. Pavičić F. Dijagnostičke metode u pulmologiji. U: Vrhovac B & sur. *Interna medicina*. Zagreb: Naprijed, 1991;str. 787-93.
246. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A i sur. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176 (6):532–55.
247. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(5):1256-76.
248. Petty TL . The history of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2006;1(1):3–14.
249. Simpson CR, Hippisley-Cox J, Sheikh A. Trends in the epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease in England: a national study of 51804 patients. *Brit J Gen Pract* 2010;60(576):483–488.
250. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V i sur. ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26(2):319-338.
251. Hyatt RE, Scanlon PD, Nakamura M. Interpretation of Pulmonary Function Tests.

A Practical Guide. Second Edition. Lippincot Philadelphia: Williams & Wilkins, 2003.

252. Lane DJ. Pulmonary function testing in clinical practice. U: Lane DJ. Respiratory diseases. London: William Heinemann Medical Books LTD, 1976:60-91.

253. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: National clinical guideline for management of chronic obstructive pulmonary disease in adults in primary and secondary care. Thorax 2004;59(1):1-232.

254. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. Eur Respir J 1993;6(16):5-40.

255. Stejskal D, Karpisek M. Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? Eur J Clin Invest 2006;36: 621-625.

256. Landis WG, Ming-Ho Y. Introduction to Environmental Toxicology. Impacts of Chemicals upon Ecological Systems. USA: Lewis Publishers; 1998, str. 15-125.

257. Walker CH, Hopkin SP, Sibley RM , Peakall DB. Principles of Ecotoxicology. USA: Taylor & Francis; 2001, str. 10-95.

258. Kuo HW, Wei HC, Liu CS i sur. Exposure to volatile organic compounds while commuting in Taichung, Taiwan. Atmos Environ 2000;34:3331–6.

259. Ilgen E, Karfich N, Levsen K i sur. Aromatic hydrocarbons in the atmosferic environment : Part I. Indoor versus outdoor sources, the influence of traffic. Atmos Environ 2001;35:1235-52.

260. Bahrani AR, Edwards JW. Evaluation of benzene exposure in adults and urinary s-phenylmercapturic acid in children living in Adelaide, South Australia. *Int J Environ Sci Technol* 2006;3:113-117.
261. Brčić I. Izloženost opće populacije hlapivim aromatskim ugljikovodicima. *Arh Hig Rada Toksikol* 2004;55:291-300.
262. Mićović V, Vojniković B, Bulog A, Coklo M, Malatestinić D, Mrakovčić-Sutić I. Regulatory T cells (Tregs) monitoring in environmental diseases. *Coll Antropol* 2009 ;33(3):743-6.
263. Tanigawa T, Araki S, Nakata A, Yokoyama K, Sakai T, Sakurai S. Decreases of natural killer cells and T-lymphocyte subpopulations and increases of B lymphocytes following a 5-day occupational exposure to mixed organic solvents. *Arch Environ Health* 2001;56:443-8.
264. Hertz-Picciotto I, Dostál M, Dejmek J i sur. Air pollution and distributions of lymphocyte immunophenotypes in cord and maternal blood at delivery. *Epidemiology* 2002;13:172-183.
265. Ashley DL, Boin MA, Cardinali FL i sur. Determining volatile organic compounds in human blood from a large sample population by using purge and trap gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 1992;64:1021-9.

## 8. Popis radova

### **Poglavlja u knjizi (SCI):**

- Aleksandar Bulog, Ines Mrakovčić-Šutić, Đulija Malatestinić, Zdenka Barićev-Novaković, Vladimir Mićović. Industrial emissions as risk factors for respiratory and allergic effects // Advances in Research & Management of Asthma and COPD - Proceedings of the World Asthma and COPD Forum / Sepiashvili R. (ur.). Bologna, Italy : Medimond, S.r.l. 2008. Str. 61-65.
- Ines Mrakovčić-Šutić, Vladimir Mićović, Aleksandar Bulog, Đulija Malatestinić, Zdenka Barićev-Novaković. The role of regulatory t cells (tregs) in environmental diseases // Advances in Research & Management of Asthma and COPD - Proceedings of the World Asthma and COPD Forum / Sepiashvili R. (ur.). Bologna Italy : Medimond S. r.l. 2008. Str. 82-87.
- Vladimir Mićović, Aleksandar Bulog, Ines Mrakovčić-Šutić. Moderate activities of regulatory t (treg) and nkt cells on innate immunity in chronic exposure to vapors // 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro (Brazil), August 21-25, 2007 / Jorge Kalil, Edecio Cunha-Neto, Luiz Vicente Rizzo (ur.). Bologna, Italy : Medimond S.r.l. 2007. Str. 317-321.
- Vladimir Mićović, Aleksandar Bulog, Ines Mrakovčić-Šutić. The role of chronic exposure to gasoline and diesel on cell mediated immunity of people situated near gasoline industry // 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro (Brazil), August 21-25, 2007. / Jorge Kalil, Edecio Cunha-Neto, Luiz Vicente-Rizzo (ur.). Bologna, Italy : Medimond S.r.l. 2007. Str. 313-316.

### **Znanstveni radovi**

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

- Mićović, Vladimir; Vojniković, Božidar; Bulog, Aleksandar; Čoklo, Miran; Malatestinić, Đulija; Mrakovčić-Šutić, Ines. Regulatory T cells (Tregs) Monitoring in Environmental Diseases. Collegium Antropologicum 2009;33(3):743-746.
- Mićović, Vladimir; Bulog, Aleksandar; Kučić, Natalia; Jakovac, Hrvoje; Radošević-Stašić, Biserka. Metallothioneins and heat shock proteins in marine mussels as sensors of environmental pollution in Northern Adriatic Sea. Environmental Toxicology and Pharmacology 2009;28(3):439-447.
- Grebić, Damir; Jakovac, Hrvoje; Mrakovčić-Šutić, Ines; Tomac, Jelena; Bulog, Aleksandar; Mićović, Vladimir; Radošević-Stašić, Biserka. Short-term exposure of mice to gasoline vapor

increases the metallothionein expression in the brain, lungs and kidney. Histology and Histopathology 2007;22(6):593-601.

#### **Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu**

- Bulog, A.; Mrakovcic-Sutic, I.; Micovic, V. The role of perforin cytolytic pathway in patients with obstructive and restrictive spirometry's changes // Asthma-New Horizons in Asthma and COPD Management and Prevention / Revaz I Sepiashvili (ur.). Moscow Russia, 2009;56 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Mrakovcic-Sutic, I.; Bulog, A.; Micovic, V. Overexpression of NKT cells increases the cell-mediated cytotoxicity againsts tumor cell lines in patient with environmental disease // Asthma-New Horizons in Asthma and COPD Management and Prevention, Vol 10, Supp.1, 2009 / Revaz I Sepiashvili (ur.). Moscow, Russia, 2009. 66 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Bulog, Aleksandar; Mrakovčić-Šutić, Ines; Mićović, Vladimir. Industrial Emissions as Risk Factors for Respiratory and Allergic Effects // Abstracts of the World Asthma and COPD Forum; International Journal on Immunorehabilitation / Sepiashvili, R.I. (ur.). Moscow : Meditzina-Zdorov'e, 2008 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Ines Mrakovčić-Šutić, Aleksandar Bulog, Vladimir Mićović. The role of regulatory T cells (Tregs) in environmental diseases // International Journal on Immunorehabilitation / Sepiashvili RI (ur.). Moscow : Meditzina-Zdorov'e, 2008. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

#### **Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima**

- Bulog, Aleksandar; Jakovac, Hrvoje; Grebić, Damir; Mrakovčić-Šutić, Ines; Mićović, Vladimir; Radošević-Stašić, Biserka. Heat shock proteins and metallothionein expression in tissues of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as sensors of environmental pollution // Periodicum biologorum/ Vitale, B. (ur.). Zagreb : Hrvatsko prirodoslovno društvo, 2007. 155-155 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

#### **Objavljena pozvana predavanja na skupovima**

- Mrakovcic-Sutic, I.; Bulog, A.; Micovic, V. Overexpression of NKT cells increases the cell-mediated cytotoxicity againsts tumor cell lines in patient with environmental disease // Asthma-New

Horizonts in Asthma and COPD Management and Prevention, Vol 10, Supp.1, 2009 / Revaz I Sepiashvili (ur.). - Moscow, Russia, 2009 (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, objavljeni rad, znanstveni).

- Mrakovcic-Sutic, I.; Bulog, A.; Micovic, V. Immune response in the population of industrial areas at risk // Zbornik radova Prvog kongresa hrvatskih alergologa i kliničkih imunologa s međunarodnim sudjelovanjem / Asja Stipičić-Marković (ur.). Zagreb : Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju i Hrvatski liječnički zbor, 2009 (pozvano predavanje, domaća recenzija, objavljeni rad, znanstveni).

#### **Radovi u zbornicima skupova sa međunarodnom recenzijom**

- Traven, Luka; Vukić, Darija; Bulog, Aleksandar; Mićović, Vladimir. Integrirano biološko i kemijsko praćenje organskog i anorganskog onečišćenja morskog okoliša na području Kvarnerskog zaljeva ;( Intergated biological and chemical monitoring of organic and ionorganic contaminants in the marine environment of the Kvarner bay area ). Zbornik radova /HUSI (ur.). Hrvatska : Hrvatska udruga za sanitarno inženjerstvo,2005; Prvi seminar sanitarnog inženjerstva sa međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, 18-19 veljače 2005 (oralna prezentacija).

#### **Sažeci u zbornicima skupova**

- Bulog, Aleksandar; Mićović, Vladimir; Mrakovčić-Šutić, Ines. Industrial Emissions as Risk Factors for the Development of Environmental Diseases // Zbornik radova Prvog kongresa hrvatskih alergologa i kliničkih imunologa s međunarodnim sudjelovanjem / Stipičić-Marković, Asja (ur.). Zagreb : Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju i Hrvatski liječnički zbor, 2009 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
- Bulog, A.; Mićović, V.; Mrakovčić-Šutić, I. Efector changes in immune cells of people situated near gasoline industry // Book of abstracts / HID / Rabatić, Sabina et al. (ur.). Zagreb : Hrvatsko-imunološko društvo, 2008. (poster,međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Mrakovčić-Šutić, I.; Bulog, A.; Mićović, V. Cross-talk between regulatory T (Treg) and NKT cells in environmental diseases // Book of abstracts / HID / Rabatić, Sabina et al. (ur.). Zagreb : Hrvatsko-imunološko društvo, 2008. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

- Aleksandar Bulog, Ines Mrakovčić-Šutić, Vladimir Mićović. The role of chronic exposure to gasoline and diesel on cell mediated immunity of the people situated near gasoline industry // Immuno Rio 2007. (poster, sažetak, znanstveni).
- Ines Mrakovčić-Šutić, Aleksandar Bulog, Vladimir Mićović. Moderating activities of regulatory T (Treg) and NKT cells on innate immunity in chronic exposure to vapors // Immuno Rio 2007, 13th International Congress of Immunology (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Ines Mrakovčić-Šutić, Hrvoje Jakovac, Damir Grebić, Aleksandar Bulog. Stres-prilagođenost naših odgovora izazovima nepredvidivog-privlačenje pozornosti medija na znanstvene teme i istraživanja // Drugi kongres hrvatskih znanstvenika iz domovine i inozemstva (demonstracija, domaća recenzija, sažetak).
- Bulog, Aleksandar; Jakovac, Hrvoje; Grebić, Damir; Kučić, Natalia; Mrakovčić-Šutić, Ines; Radošević-Stašić, Biserka; Mićović, Vladimir. Metallothioneins and heat shock proteins in marine mussels as biomarkers of environmental pollution // Book of abstracts / Sabina Rabatić et al. (ur.). Zagreb : Hrvatsko imunološko društvo, 2007. 48-48. (sažetak, znanstveni rad).
- Bulog, Aleksandar; Jakovac, Hrvoje; Grebić, Damir; Mrakovčić-Šutić, Ines; Mićović, Vladimir; Radošević-Stašić, Biserka. Heat shock proteins and metallothionein expression in tissues of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as sensors of environmental pollution // Periodicum biologorum/ Vitale B. (ur.). Zagreb : Hrvatsko prirodoslovno društvo, 2007. 155-155 (sažetak, znanstveni rad).
- Grebić, Damir; Jakovac, Hrvoje; Mrakovčić-Šutić, Ines; Tomac, Jelena; Bulog, Aleksandar; Mićović, Vladimir; Radošević-Stašić, Biserka. Chronic exposure to vapors of gasoline and diesel upregulates the metallothionein I and II expression in the olfactory brain of mice. Abstract book / Takeshi Tabira (ur.). Nagoya : Japanese Neuroimmunology Organizing Committee, 2006. A0056 8<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Nagoya, Japan, October 15-19, 2006.
- Grebić, Damir; Jakovac, Hrvoje; Mrakovčić-Šutić, Ines; Tomac, Jelena; Bulog, Aleksandar; Rukavina, Daniel; Radošević-Stašić, Biserka. Metallothioneins and heat shock protein gp96 as sensors of stress and toxin-induced damages. Book of abstracts / EFIS (ur.). Pariz : EFIS, 2006.



498 ; PA3302. 1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology & 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology, Paris, France, September 6-9, 2006., poster.

- Jakovac, Hrvoje; Mrakovčić-Šutić, Ines; Bulog, Aleksandar; Grebić, Damir; Mićović, Vladimir; Radošević-Stašić, Biserka. Systemic immunotoxicity in mice induced by whole body inhalation exposure to gasoline and diesel exhaust. Abstract book / Jonjić, Stipan (ur.). Rijeka : Hrvatsko imunološko društvo, 2004. 49-49. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Opatija, 8-10 October, 2004., poster.

### **Kongresna priopćenja u CC časopisima**

- Aleksandar Bulog, Ines Mrakovčić-Šutić, Vladimir Mićović. Industrial emissions as risk factors for respiratory and allergic effects // International Journal on Immunorehabilitation / Sepiashvili RI (ur.). Moscow : Meditzina-Zdorov'e 2008; (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Ines Mrakovčić-Šutić, Aleksandar Bulog, Vladimir Mićović. The role of regulatory t cells (tregs) in environmental diseases // International Journal on Immunorehabilitation / Sepiashvili RI (ur.). Moscow : Meditzina-Zdorov'e 2008; (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Aleksandar Bulog, Ines Mrakovčić-Šutić, Vladimir Mićović. The role of chronic exposure to gasoline and diesel on cell mediated immunity of the people situated near gasoline industry // Immuno Rio 2007 (poster, sažetak, znanstveni).
- Ines Mrakovčić-Šutić, Aleksandar Bulog, Vladimir Mićović. Moderating activities of regulatory T (Treg) and NKT cells on innate immunity in chronic exposure to vapors // **Immuno Rio 2007, 13th International Congress of Immunology** (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Ines Mrakovčić-Šutić, Hrvoje Jakovac, Damir Grebić, Aleksandar Bulog. Stres-prilagođenost naših odgovora izazovima nepredvidivog-privlačenje pozornosti medija na znanstvene teme i istraživanja // Drugi kongres hrvatskih znanstvenika iz domovine i inozemstva (demonstracija, domaća recenzija, sažetak).
- Bulog, Aleksandar; Jakovac, Hrvoje; Grebić, Damir; Kučić, Natalia; Mrakovčić-Šutić, Ines; Radošević-Stašić, Biserka; Mićović, Vladimir. Metallothioneins and heat shock proteins in marine mussels as biomarkers of environmental pollution // Book of abstracts / Sabina Rabatić et al. (ur.). Zagreb : Hrvatsko imunološko društvo 2007;48-48 (sažetak, znanstveni rad).

- Bulog, Aleksandar; Jakovac, Hrvoje; Grebić, Damir; Mrakovčić-Šutić, Ines; Mićović, Vladimir; Radošević-Stašić, Biserka. Heat shock proteins and metallothionein expression in tissues of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as sensors of environmental pollution // *Periodicum biologorum/ Vitale B.* (ur.). Zagreb : Hrvatsko prirodoslovno društvo, 2007;155-155 (sažetak, znanstveni rad).
- Grebić, Damir; Jakovac, Hrvoje; Mrakovčić-Šutić, Ines; Tomac, Jelena; Bulog, Aleksandar; Mićović, Vladimir; Radošević-Stašić, Biserka. Chronic exposure to vapors of gasoline and diesel upregulates the metallothionein I and II expression in the olfactory brain of mice. *Abstract book / Takeshi Tabira* (ur.). Nagoya : Japanese Neuroimmunology Organizing Committee, 2006. A0056 8<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Nagoya, Japan, October 15-19,2006.
- Grebić, Damir; Jakovac, Hrvoje; Mrakovčić-Šutić, Ines; Tomac, Jelena; Bulog, Aleksandar; Rukavina, Daniel; Radošević-Stašić, Biserka. Metallothioneins and heat shock protein gp96 as sensors of stress and toxin-induced damages. *Book of abstracts / EFIS* (ur.). Pariz : EFIS, 2006. 498 ; PA3302. 1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology & 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology, Paris, France, September 6-9 2006;(poster).
- Jakovac, Hrvoje; Mrakovčić-Šutić, Ines; Bulog, Aleksandar; Grebić, Damir; Mićović, Vladimir; Radošević-Stašić, Biserka. Systemic immunotoxicity in mice induced by whole body inhalation exposure to gasoline and diesel exhaust. *Abstract book / Jonjić, Stipan* (ur.). Rijeka : Hrvatsko imunološko društvo, 2004;49-49. Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Opatija, 8-10 October 2004; (poster).

#### **Magistarski radovi**

- Bulog, Aleksandar. "Citotoksičnost limfocita u žitelja područja naftne industrije" / magistarski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, 04.07. 2008., 85 str.Voditelj:Mićović, Vladimir; Mrakovčić-Šutić, Ines.

## 9. Životopis

**Ime i prezime**

Aleksandar Bulog

**Datum rođenja**

22. listopada, 1977., Rijeka

**Mjesto stanovanja**

Brdina 16; Drenova, Rijeka

**Kontakt**

Tel: 051/254-908; Mob. 095/905-4434; 091/120-7615

E-mail: [aleksandar.bulog@medri.hr](mailto:aleksandar.bulog@medri.hr); [aleksandar.bulog@zzjzpgz.hr](mailto:aleksandar.bulog@zzjzpgz.hr)

**Zaposlenja**

- 2004.Katedra za zdravstvenu ekologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci;
- 2004.Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci;
- 2004.Nastavni zavod za javno zdravstvo, Primorsko-goranske županije Rijeka.
- 2007.Voditelj Odsjeka za ekotoksikologiju, Nastavnog zavoda za javno zdravstvo PGŽ.
- 2011.Tehnički voditelj Zdravstveno-ekološkog odjela, Nastavnog zavoda za javno zdravstvo PGŽ.

**Edukacija**

- 2004.Poslijediplomski znanstveni studij, Prirodoslovno–matematički fakultet, Zagreb.
- 1998.Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.
- 1992.Srednja tehnička škola, Ambroz Haračić; Mali Lošinj.
- 1984.Osnovna škola, Mario Martinolić; Mali Lošinj.

**Akademski stupnjevi**

- 2002.Diplomirani sanitarni inženjer, Medicinski fakultet; Rijeka.
- 2008.Magistar znanosti iz znanstvenog područja prirodnih znanosti, znanstvenog polja biologija (toksikologija), Prirodoslovno-matematički fakultet; Zagreb.

**Znanstveni stupnjevi**

- 2004.Znanstveni novak na Katedri za zdravstvenu ekologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.
- 2010.Asistent na Katedri za zdravstvenu ekologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

**Znanstvena djelatnost**

- Znanstveni projekt:"Toksikološki aspekti naftne industrije u Primorsko–goranskoj županiji "; Voditelj prof. dr. sc. Vladimira Mićovića br. 062-0062081.
- Znanstveni projekt:"Odgovor ljudi i morskih organizama na ekološko zagađenje u Kvarnerskom zaljevu"; Voditelj prof. dr. sc. Vladimira Mićovića br. 062-0621341-0308.
- znanstveni program:"Reparacijski i imuno-modulacijski mehanizmi";Koordinator prof. dr. sc. Biserka Radošević-Stašić.

### **Sveučilišna nastava**

Kolegiji: Fiziologija s patofiziologijom, Fiziologija, Imunologija, Neurofiziologija i Patofiziologija, Zdravstvena ekologija, Pesticidi, Epidemiološke metode u javnom zdravstvu, Metode zdravstveno-ekoloških istraživanja, Rad Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije.

### **Članstva**

Hrvatska udruga za sanitarno inženjerstvo (HUSI), Hrvatsko imunološko društvo (HID), Hrvatsko društvo fiziologa (HDF), Hrvatska komora zdravstvenih radnika (HKZR).

### **Ostale aktivnosti**

- 2010.Član povjerenstva za edukaciju i trajno usavršavanje Hrvatske komore zdravstvenih radnika.
- 2007.Aktivni sudionik Drugog kongresa hrvatskih znanstvenika iz domovine i inozemstva u organizaciji MZOŠ Republike Hrvatske, Split, 7.-10. svibnja 2007.
- 2005.Aktivni sudionik (predavač) Prvog seminara sanitarnog inženjerstva sa međunarodnim sudjelovanjem u organizaciji HUSI, Hrvatska, Opatija, 18.-19. veljače 2005.
- 2001.Demonstrator na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci.
- 2000.Demonstrator na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.