



## **Središnja medicinska knjižnica**

**Ljubičić Čalušić, Anita (2011) *Uloga pH kondenzata izdah u procjeni učinaka profesionalne izloženosti organskoj prašini na dišni sustav [The role of EBC pH in the assessment of respiratory effects of occupational exposure to organic dust]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.***

<http://medlib.mef.hr/994>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

Anita Ljubičić Čalušić

**ULOGA pH KONDENZATA IZDAHA U  
PROCJENI UČINAKA PROFESIONALNE  
IZLOŽENOSTI ORGANSKOJ PRAŠINI NA  
DIŠNI SUSTAV**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2011



**UNIVERSITY OF ZAGREB  
MEDICAL SCHOOL**

Anita Ljubičić Čalušić

**THE ROLE OF EBC pH IN THE  
ASSESSMENT OF RESPIRATORY  
EFFECTS OF OCCUPATIONAL EXPOSURE  
TO ORGANIC DUST**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2011



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

Anita Ljubičić Čalušić

**ULOGA pH KONDENZATA IZDAHA U  
PROCJENI UČINAKA PROFESIONALNE  
IZLOŽENOSTI ORGANSKOJ PRAŠINI NA  
DIŠNI SUSTAV**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Dr. sc. Veda Marija Varnai

Zagreb, 2011

Disertacija je izrađena na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, Zagreb, u Jedinici za medicinu rada i okoliša, a u sklopu znanstvenog projekta „Alergotoksični učinci čimbenika općeg i radnog okoliša“ odobrenog od MZOŠ (br. 022-0222411-2410).

Voditelj rada:

dr. sc. Veda Marija Varnai, dr. med., spec. medicine rada, viši znan. sur.,  
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Jedinica za medicinu rada i okoliša

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. Kiselost kondenzata izdaha kao biopokazatelj upalnih promjena u dišnim putovima	2
1.1.1. Porijeklo kondenzata izdaha	5
1.1.2. Kiselost kondenzata izdaha	6
1.1.2.1. Metode mjerenja kiselosti kondenzata izdaha	8
1.1.2.2. Čimbenici koji utječu na kiselost kondenzata izdaha	9
1.2. Utjecaj izloženosti organskoj prašini u radnom okolišu drvne industrije na dišni sustav	14
1.2.1. Drvna prašina	16
1.2.2. Endotoksin	18
1.2.3. Plijesan	19
1.2.4. Zdravstveni učinci profesionalne izloženosti dišnim štetnostima u drvnoj industriji	20
<b>2. HIPOTEZA, CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA</b>	
2.1. Svrha istraživanja	22
2.2. Hipoteza	22
2.3. Ciljevi istraživanja	22
<b>3. ISPITANICI, METODE I PROTOKOLI ISTRAŽIVANJA</b>	
3.1. Ispitanici	25
3.1.1. Ispitanici uključeni u Dio I istraživanja - validacija metode mjerenja pH KI-a	25
3.1.2. Ispitanici uključeni u Dio II istraživanja - učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav	27
3.2. Protokoli istraživanja	28
3.2.1. Protokoli Dijela I - validacija metode mjerenja pH KI-a	28
3.2.2. Protokol Dijela II - učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav	29
3.3. Metode	31
3.3.1. Metode u Dijelu I istraživanja - validacija metode mjerenja pH KI-a	31
3.3.1.1. Anamneza	31
3.3.1.2. Spirometrija	31
3.3.1.3. Uzorkovanje KI-a i mjerenje pH	31
3.3.2. Metode u Dijelu II - učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav	33
3.3.2.1. Mjerenje pokazatelja izloženosti dišnim štetnostima u radnom okolišu	33
3.3.2.2. Anamneza i fizikalni pregled	35
3.3.2.3. Spirometrija s bronhodilatatornim testom	36
3.3.2.4. Kožno testiranje metodom uboda (prick test)	36
3.3.2.5. Mjerenje koncentracije ukupnih IgE protutijela u serumu	37
3.3.2.6. Uzorkovanje KI-a i mjerenje pH	37
3.3.3. Statističke metode	38
<b>4. REZULTATI</b>	
4.1. Dio I - validacija metode mjerenja pH KI-a	40
4.1.1. Učinci pušenja na kiselost KI-a	40
4.1.2. Utjecaj konzumacije hrane	40
4.1.3. Utjecaj konzumacije kave	40
4.1.4. Dnevna i tjedna ponovljivost mjerenja pH KI-a	40
4.2. Dio II - učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav	47
4.2.1. Mjerenje parametara radnog okoliša	47
4.2.2. Opće osobine ispitanika	50

4.2.3. Dišni i opći simptomi	52
4.2.4. Plućna funkcija	55
4.2.5. Bronhodilatatorni test u pilanskih radnika	59
4.2.6. pH KI-a	61
4.2.7. Objektivni pokazatelji atopije	64
<b>5. RASPRAVA</b>	
5.1. Dio I - validacija metode mjerenja pH KI-a	66
5.1.1. Utjecaj pušenja cigareta na pH KI-a	66
5.1.2. Utjecaj konzumacije hrane i kave na kiselost KI-a	70
5.1.3. Varijabilnost kiselosti KI-a	72
5.1.4. Ograničenja validacijskog dijela istraživanja	72
5.2. Dio II - učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav	74
5.2.1. Izloženost dišnim štetnostima u pilanama	74
5.2.2. Dišni simptomi	76
5.2.3. Plućna funkcija	79
5.2.4. Atopija	81
5.2.5. Kiselost kondenzata izdaha	84
5.2.6. Ograničenja Dijela II istraživanja	88
5.3. Neinvazivne metode za procjenu upale u dišnim putovima u radnika izloženih dišnim štetnostima	89
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	
6.1. Dio I - validacija metode mjerenja pH KI-a	92
6.2. Dio II - učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav	92
<b>7. SAŽETAK</b>	94
<b>8. SUMMARY</b>	95
<b>9. POPIS LITERATURE</b>	96
<b>PRILOZI</b>	
<b>ŽIVOTOPIS AUTORICE</b>	
<b>POPIS OBJAVLJENIH RADOVA</b>	

## ZAHVALJUJEM

- Mentorici dr. sc. Vedi Mariji Varnai, dr. med., višoj znanstvenoj suradnici, na pomoći u koncipiranju ideje istraživanja, statističkoj obradi podataka, te na brojnim savjetima i uputama.
- Dr. sc. Jeleni Macan, dr. med., znanstvenoj savjetnici, na stručnoj pomoći te odabiru ispitivane populacije.
- Suradnicima u Jedinici za medicinu rada i okoliša zahvaljujem na tehničkoj pomoći pri provođenju istraživanja.
- Zahvaljujem svim djelatnicima Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada koji su doprinijeli svojim sudjelovanjem u istraživanjima provedenim u ovoj Disertaciji.



*Zahvaljujem se svojoj obitelji, djeci -Antoniu i Barbari Lauri te suprugu Đinku na pruženoj podršci.*

## POPIS KRATICA

ATS/ERS	Američko torakalno društvo/Europsko respiratorno društvo ( <i>American Thoracic Society/European Respiratory Society</i> )
BAL	bronhoalveolarni ispirak
BHR	bronhalna hiper-reaktivnost
CFU	broj jedinica koje formiraju kolonije (engl. <i>Colony Forming Units</i> )
eCO	izdahnuti ugljični monoksid
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FeNO	frakcija izdahnutog dušičnog oksida (engl. <i>fraction of exhaled nitric oxide</i> )
FEV <sub>1</sub>	forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi
FVC	forsirani vitalni kapacitet
FEV <sub>1</sub> /FVC	omjer FEV <sub>1</sub> i FVC-a
GERB	gastroezofagealna refluksna bolest
IL	interleukin
IS	metoda potpomognutog iskašljavanja (engl. <i>induced sputum</i> )
ITM	indeks tjelesne mase
KI	kondenzat izdaha (engl. <i>Exhaled Breath Condensate, EBC</i> )
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
KV	koeficijent varijabilnosti
GVI	granične vrijednosti izloženosti
MEF <sub>25</sub>	forsirani ekspiracijski protok pri 25% brzog vitalnog kapaciteta
MEF <sub>25-75</sub>	forsirani ekspiracijski protok pri 25-75 % brzog vitalnog kapaciteta
MMEF	srednji forsirani ekspiracijski protok
NBR	nespecifična bronhalna reaktivnost
NK stanice	engl. <i>natural killer</i> stanice
NO	dušični oksid
PEF	vršni ekspiracijski protok (engl. <i>peak expiratory flow</i> )
SPT	kožni ubodni test prick metodom
<sup>99m</sup> Tc	radioaktivni izotop tehnecija
Th limfociti	pomoćnički limfociti (engl. <i>T helper cells</i> )
TNFα	tumorcidni nekrotični faktor alfa

# 1. UVOD

Profesionalna izloženost organskoj prašini i danas je prisutna na brojnim radnim mjestima (1, 2). Termin organske prašine odnosi se na mješavinu aerosoliziranih čestica biljnog, životinjskog i mikrobnog porijekla (3). Ona može uzrokovati ili pogoršavati različite upalne poremećaje dišnog sustava, od iritativnih simptoma gornjih i donjih dišnih putova do astme, kronične opstruktivne bolesti pluća, bisinoze, hipersenzitivnog pneumonitisa i toksičnog sindroma organskih prašina (4, 5).

Različiti dijagnostički postupci mogu direktno ili indirektno upućivati na stupanj upalnih promjena u donjim dišnim putovima. U medicini rada u primjeni su fizikalni pregled s anamnezom, mjerenje ventilacijske plućne funkcije, mjerenje vršnog ekspiratornog protoka u ovisnosti o radnoj izloženosti (PEF monitoring), te RTG ili kompjuterizirana tomografija (CT) pluća (4, 5). Ove su metode, međutim, nedovoljno osjetljive za otkrivanje ranih stadija upalnih promjena u dišnom sustavu.

Osjetljive metode kojima se direktno može procjenjivati upala dišnih putova, kao što su analiza bronhoalveolarnog lavata (BAL) i inducirano sputuma (IS) nisu uvedene u rutinsku praksu u medicini rada, niti su prikladne za opsežnija epidemiološka istraživanja. Razlog je tomu što su ove pretrage invazivne (pr. BAL) i tehnički zahtjevne (IS) (6, 7). Nameće se stoga potreba za neinvazivnom pretragom koja je dovoljno osjetljiva da otkrije početne upalne promjene u dišnim putovima, a može se provoditi i u ambulantnim uvjetima ordinacije medicine rada kao i u terenskim uvjetima preventivnih pregleda i epidemioloških istraživanja (8).

## 1.1. Kiselost kondenzata izdaha kao biopokazatelj upalnih promjena u dišnim putovima

Od neinvazivnih metoda za procjenu upalnih zbivanja u donjim dijelovima dišnih putova primjenjuje se mjerenje izdahnutog ugljičnog monoksida (eCO), frakcije izdahnutog dušičnog oksida (FeNO), te vodikova peroksida u kondenzatu izdaha i kiselosti kondenzata izdaha (KI).

Mjerenje **FeNO** je standardizirana klinička metoda koja se upotrebljava za procjenu stupnja upalnih promjena u dišnim putovima te titiranje terapije u astmatičnih bolesnika (9, 11), a procjenjuje se i moguća primjena ove metode u epidemiološkim istraživanjima zdravstvenih učinaka profesionalne izloženosti respiratornim štetnostima (12-22). Rezultati ovih istraživanja za sada su proturječni (16, 19-24).

Razine **vodikovog peroksida** određivane su u KI-a ispitanika oboljelih od astme, KOPB-a, bronhiektazija, cistične fibroze, ARDS-a, upale pluća, sarkoidoze, tuberkuloze i sistemske skleroze s plućnim komplikacijama. U većini ovih istraživanja razina  $H_2O_2$  bila je viša u odnosu na zdrave ispitanike (25). Podaci o mogućoj ulozi ove metode u procjeni zdravstvenih učinaka profesionalne izloženosti dišnim štetnostima oskudni su (24).

**Ugljični monoksid** prepoznat je u do sada objavljenim istraživanjima kao modulator upale, stanične smrti, proliferacije i diferencijacije fibroblasta u različitim tkivima i stanicama (26, 27), a ima ulogu i u održavanju prikladnog staničnog odgovora na okolišne štetnosti (27). Brojna istraživanja upućuju na mogućnost kliničke primjene eCO kao pokazatelja upalnih zbivanja u dišnim putovima, bronhalne hiperreaktivnosti te odgovora na inhalatornu kortikosteroidnu terapiju (28-33). Određivanje eCO također je dobar pokazatelj aktivnog izlaganja duhanskom dimu (33), a ispitan je i kao pokazatelj učinka izloženosti azbestnim vlaknima (24).

**Kondenzat izdaha** (KI) dobiva se potpuno neinvazivnim putem, hlađenjem i kondenziranjem izdahnutog zraka tijekom mirnog disanja (34). Od 80-tih godina 20. stoljeća KI se intenzivno istražuje u svrhu proučavanja patofiziologije dišnih poremećaja, kao i njegove moguće primjene u dijagnostici i praćenju uspjeha liječenja različitih bolesti dišnog sustava, uključujući astmu (35-37), kroničnu opstruktivnu bolest pluća (38-40), alergijski rinitis (41, 42), upalu pluća (43, 44), kemijsko oštećenje pluća (45), sarkoidozu pluća (46), azbestozu (24, 47), zloćudne tumorske bolesti pluća (48, 49), odbacivanje transplantata pluća (50), cističnu fibrozu (51-53), idiopatsku fibrozu pluća (54), a i nekih bolesti koje nisu primarno vezane uz dišni sustav, kao što su, primjerice, gastroezofagealni refluks i apnea u snu (55-58).

Osnovni sastojak KI-a, koji čini 99% njegovog volumena, je vodena para, a tek mala frakcija sadrži kapljice bronhoalveolarnog sekreta. U KI-u su identificirani brojni hlapivi i nehlapivi sastojci koji mogu odražavati upalni proces u dišnim putevima, uključujući ugljični monoksid, amonijak, vodikov peroksid, nukleotide, izoprostane, leukotriene, dušikove okside, peptide, citokine i protone (24, 27, 59). Do danas još nema u potpunosti validirane metode mjerenja niti jednog biopokazatelja u KI-u čemu je glavni uzrok njihova niska koncentracija u KI-u, obično na granici mjerljivosti, što uzrokuje znatnu varijabilnost mjerenja (34). Nedostatnoj validaciji metoda mjerenja doprinose i nepoznanice o utjecaju načina čuvanja uzoraka KI-a, moguće kontaminacije uzorka sekretom iz gornjih dijelova dišnog sustava i usne šupljine te stupnja razrijeđenja KI-a (34).

Određivanje kiselosti KI-a predstavlja metodu koja je intenzivno istraživana i prepoznata kao robusna, jednostavna, ponovljiva, a financijski ne suviše zahtjevna (59-62). Iako fiziološki i patofiziološki mehanizmi koji kontroliraju pH bronhoalveolarnog sekreta nisu u potpunosti razjašnjeni (63), kao niti biološki i metodološki čimbenici koji mogu utjecati na pH KI-a (64-66), brojna su istraživanja pokazala da se pri upalnim promjenama u dišnim putovima pH KI-a smanjuje (67-69). Objavljene su smjernice i metodološke preporuke za mjerenje kiselosti kondenzata izdaha (34), kao i vrijednosti pH KI-a za zdravu populaciju (tablica 1) (70). Na temelju svega navedenog postavlja se pitanje o mogućoj ulozi pH KI-a, kao neinvazivne metode koja se može provoditi i u terenskim uvjetima, u ranom otkrivanju upalnih promjena u dišnim putovima osoba profesionalno izloženih dišnim štetnostima.

**Tablica 1.** Vrijednosti pH kondenzata izdaha u zdravoj populaciji

Zdravstveni kriteriji (referenca)	n	uređaj / plin	pH
Zdravi, bez pojedinosti (51)	12	PA / ne	6.15±0.16*
Zdravi nepušači, bez pojedinosti (71)	30	ES / ne	6.30±0.30*
Zdravi nepušači, ne-atopičari, bez simptoma respiratornih bolesti, normalna spirometrija i NBR, negativan SPT (11)	15	PA / ne	6.08 (5.58-6.64)†
Zdravi (spirometrija učinjena ali nije korištena kao kriterij za isključivanje) (67)	10	PA / ne	7.24±0.24‡
Zdravi ( općenito - temeljeno na zdravstvenom upitniku) (72)	21	RT / ne	6.17, 5.96-6.31§
Zdravi nepušači, normalna spirometrija (FEV <sub>1</sub> ) (73)	7	ES / ne	7.29±0.25*
	16	ES / argon	8.26±0.20*
Zdravi nepušači bez simptoma akutnih ili kroničnih respiratornih simptoma i bolesti, ne - atopičari, uredan fizikalni pregled, normalna spirometrija (74)	48	RT / ne	6.05±0.09*, 6.12 (5.25-6.82)†
			6.01±0.05*, 6.01 (5.25-6.41)†
		RT / argon	7.50±0.13*, 7.72 (5.26-8.13)†
			7.59±0.09*, 7.72 (6.44-8.12)†
Zdravi nepušači i pušači, bez simptoma astme, peludne groznice, alergijskog rinitisa ili atopijski dermatitis (10)	270	RT / ne	6.17, 5.50-6.78§
		RT / argon	8.09, 7.41-8.23§
Ispitanici bez dišnih smetnji i simptoma astme (67)	19	PA / argon	7.65±0.20 <sup>  </sup>
Zdravi nepušači, neatopičari, SPT, normalna spirometrija i NBR (68)	10	PA / argon	7.47±0.12, 7.49±0.10*
Zdravi nepušači, bez detalja (75)	12	ES / argon	7.46±0.48*
Zdravi nepušači bez simptoma respiratornih bolesti (60)	76	RT / argon	7.70±0.49*
Ispitanici kojima predstoji elektivni kirurški zahvat, bez simptoma respiratornih bolesti (76)	32	RT / s argon	7.90±0.23*
Zdravi nepušači, nema detalja (76)	10	RT / argon	7.90±0.30*, 7.80±0.30*
Zdravi nepušači bez upale dišnih putova u zadnja 4 tjedna (77)	12	ES / argon	7.61 (7.52-7.70) <sup>¶</sup>
Zdravi nepušači, bez simptoma respiratornih bolesti, ne atopičari (negativan SPT, normalne razine specifičnog i nespecifičnog IgE, normalna spirometrija, NBR, plinska analiza krvi) (78)	15	ES / argon	7.85±0.14*
Zdravi ispitanici bez plućnih bolesti, neatopičari (negativan SPT), normalna spirometrija i NBR (36)	7	ES / argon	7.90±0.10‡
Zdravi ispitanici bez dišnih smetnji, akutnih i kroničnih sistemskih bolesti, želučanih bolesti dijagnosticiranih od strane liječnika (62)	404	RT / argon	8.00, 7.80-8.10§ (4.50-8.40)**
		ES / argon	7.55 (6.88-7.90)§
Zdravi nepušači bez dijagnosticirane astme od strane liječnika, bez dišnih smetnji, normalna spirometrija (FEV <sub>1</sub> ), negativan bronhodilatatorni test i SPT (79)	30	RT / argon	7.54 (7.09-7.93)§
Zdravi nepušači, normalne tjelesne težine, bez srčanih, plućnih i alergijskih bolesti (anamneza i pregled) (80)	15	RT / dušik	8.20±0.13*
Zdravi nepušači, bez simptoma respiratornih bolesti, normalna spirometrija, negativan NBR (81)	16	ES / argon	6.72 (6.38-6.98)§

\*aritmetička sredina±SD; †medijan (raspon); ‡aritmetička sredina±SEM; §medijan, interkvartilni raspon; <sup>||</sup>geometrijska sredina±SEM; <sup>¶</sup>aritmetička sredina (95% raspon pouzdanosti); \*\*raspon; ††uključujući 226 ispitanika starijih od 20 godina; EBC – kondenzat izdaha; NBR – nespecifična bronhalna reaktivnost; SPT – kožni ubodni test; FEV<sub>1</sub> – forsirani izdahnuti volumen u prvoj sekundi; PA – prurčno izrađen aparat za uzorkovanje KI-a; ES – EcoScreen ; RT – RTube. Iz: Varnai i sur. Arh Hig Rada i Toksikol 2009 (70).

### 1.1.1. Porijeklo kondenzata izdaha

Znanje o mjestu te mehanizmima stvaranja uzorka neophodno je kako bi mogli razumjeti i ispravno tumačiti rezultate mjerenja određenog biološkog pokazatelja. Izdahnute kapljice aerosola odražavaju kemijski sastav tekućine koja oblaže dišne putove. U do sada objavljenoj literaturi, međutim, malo je istraživanja koja su uspjela objektivizirati mjesto nastanka čestica KI-a. Sljedeća nepoznanica je stupanj razrjeđenja KI-a, odnosno mjera u kojoj su zastupljene aerosolizirane izdahnute kapljice. Istraživanja su određivanjem različitih biopokazatelja utvrdila varijaciju stupnja razrjeđenja od 1:1000 do 1:50000 (82-84).

Rezultati novijih istraživanja upućuju da je fiziološka promjena volumena dišnih putova tijekom disanja glavni mehanizam aerosolizacije tekućine koja oblaže dišne putove (85). Istraživanje utjecaja načina disanja na broj i veličinu čestica u KI-u pomoću kondenzacijskog brojača jezgara (engl. *condensation nuclei counter*) i laserskog spektrometra s visokom vremenskom rezolucijom pokazalo je da su čestice KI-a manje od 1  $\mu\text{m}$ , te da se njihova veličina ne mijenja tijekom mirnog disanja (86). Porast volumena disanja značajno je utjecao na veličinu čestica, dok je protok zraka tijekom disanja imao manji učinak. Odnos između funkcionalnog rezidualnog kapaciteta i totalnog plućnog volumena pozitivno je korelirao s brojem izdahnutih čestica vjerojatno uslijed otvaranja terminalnih bronhiola. Autori opisanog istraživanja preporučili su ovu metodu kao preduvjet u postupku standardizacije mjerenja nehlapivih biopokazatelja u KI-u.

Nedavno provedeno istraživanje porijekla KI-a u zdravih dobrovoljaca koji su udisali aerosol fiziološke otopine obilježene tehnecijem ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) pokazalo je da se kapljice koje se kondenziraju u izdahu pretežno stvaraju u središnjim dijelovima dišnih putova (87).

Za procjenu stupnja razrjeđenja KI-a primjenjuje se nekoliko metoda, od kojih niti jedna nije u potpunosti validirana (34). Najčešće se u tu svrhu mjeri konduktivnost (provodljivost) uzorka, te koncentracija pojedinih iona ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , različiti anioni) i uree, koja se zatim uspoređuje s koncentracijom iste tvari u krvi i/ili urinu (82-84). Prema sadašnjim spoznajama čini se da je najpouzdaniji pokazatelj stupnja razrjeđenja KI-a urea uslijed činjenice da se nalazi u jednakoj koncentraciji u plazmi i u tekućini koja oblaže respiratorni epitel (84). Urea se, naime, ne razgrađuje značajno u plućima, a s obzirom da je to mala molekula koja lagano prelazi iz staničnog u izvanstanični prostor, jednoliko je raspoređena po cijelom organizmu (s izuzetkom bubrežne nakapnice) (84).

### 1.1.2. Kiselnost kondenzata izdaha

pH je mjera kiselosti ili alkalnosti (bazičnosti) otopine, i predstavlja negativni logaritam koncentracije vodikovih iona u otopini. Ovu definiciju uveo je 1909. godine danski biokemičar Soren Peter Lauritz Sorenski. Postoji više metoda mjerenja koncentracije vodikovih iona u vodenoj otopini, uključujući pH indikatore, kolorimetriju te određivanje pH pomoću pH metra, elektroničkog uređaja koji mjeri pH pomoću staklene ili metalne elektrode. Iako je mjerenje pH pomoću indikatora najjednostavnije ono nije dovoljno precizno. Od preciznijih metoda mjerenja pH otopine najviše se primjenjuje pH-metrija sa staklenom elektrodom, s obzirom na kratko vrijeme mjerenja, visoku reproducibilnost, relativno malu osjetljivost na oksidirajuće i reducirajuće tvari, te mogućnost mjerenja kiselosti različitih otopina.

Važno je također napomenuti kako koncentracija vodikovih iona nije jedini čimbenik koji utječe na pH otopine. Drugi ioni, kao što su to ioni natrija i kalija te sulfatni i nitratni ioni, također mogu mijenjati pH otopine. Termin ionske jakosti koristi se kako bi se opisala količina drugih ionskih vrsta u otopini kao i jačina naboja tih iona. Prisutnost spomenutih iona u otopini ograničava mobilnost vodikovih iona, odnosno njihovu aktivnost, te pH vrijednost otopine raste (88). Spomenuta kemijska pojava osobito je važna za pH-metriju KI-a s obzirom na vrlo nisku koncentraciju vodikovih iona u ovom mediju.

Biološka važnost kiselosti odnosno bazičnosti tekućine koja oblaže dišni epitel je u regulaciji mukocilijarnog klirensa, aktivaciji obrambenih mehanizama, a s farmakološkog gledišta u transportu i resorpciji inhalatorno primijenjenih lijekova (63).

Pretpostavlja se da kiselost KI-a uvjetuju slabe baze i kiseline, prvenstveno amonijev ( $\text{NH}_4^+$ ) i hidrogenkarbonatni ( $\text{HCO}_3^-$ ) ion, te anioni octene, mliječne i mravlje kiseline (89). Naime, u zdravih je osoba nađena visoka korelacija između kiselosti KI-a i koncentracije  $\text{NH}_4^+$ , iona octene i mliječne kiseline (89). Dva glavna puferska sustava, hidrogenkarbonatni i amonijev, nalaze se u KI-u u približno jednakim koncentracijama u plinovitom stanju.  $\text{HCO}_3^-$ , glavni anion u KI-u, nastaje otapanjem  $\text{CO}_2$  u tekućini koja oblaže dišni epitel. Koncentracija  $\text{CO}_2$  u dišnim putovima najviša je na kraju izdaha, a ovisi o promjenama parcijalnog tlaka u arterijskoj krvi, frekvenciji disanja i mrtvom prostoru pluća. Stoga se smatra kako pH vrijednost nativnih uzoraka KI-a, iz kojih  $\text{CO}_2$  nije uklonjen, ne predstavlja istinski odraz zakiseljavanja tekućine koja oblaže dišni epitel (65, 69, 86, 92).



Rezultati istraživanja utjecaja  $\text{NH}_4^+$  na pH KI-a proturječni su (66, 67, 75, 76, 91-93). Pretpostavlja se da je koncentracija  $\text{NH}_4^+$  usko vezana uz aktivaciju glutaminaznog puta koji je prvi opisan kao regulator homeostaze pH tekućine koja oblaže dišni epitel (67). S druge strane, pojedine skupine istraživača mišljenja su da je amonijev ion uglavnom pridodan KI-u u usnoj šupljini (66), iako za to ne postoje čvrsti dokazi. Naime, u većini objavljenih radova pH KI-a nije bio vezan uz pH sline (60, 67, 73, 93).

Čimbenik koji također može utjecati na kiselost KI-a, kao i na druge biopokazatelje u KI-u, je stupanj **razrjeđenja** KI-a. Kao što je već napomenuto u poglavlju 1.1.1. Porijeklo KI-a, još uvijek se traga za pouzdanim metodama mjerenja stupnja razrjeđenja KI-a (82-84, 94-97). Na osnovu dosadašnjih spoznaja čini se da će one biti specifične za svaki pojedini biopokazatelj u KI-u ili, barem, za određene skupine biopokazatelja.

Smatra se da kiselosti KI-a doprinosi i octena kiselina, osobito u osoba koje boluju od astme (98) i KOPB-a (40). Porijeklo octene kiseline u KI-u je, međutim, upitno jer se octena kiselina nalazi u razmjerno visokoj koncentraciji u slini (40).

Pored spomenutih mehanizama za koje se pretpostavlja da utječu na pH KI-a, na molekularnoj razini kiselost tekućine koja oblaže dišni epitel reguliraju i proteini odgovorni za transfer protona, uključujući  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  izmjenjivački protein 1 (engl. *exchange protein*) i anionski izmjenjivački proteini 1 i 3 (engl. *anion exchange protein*) (slika 1), te albumini koji sudjeluju u neutralizaciji suviška izlučenih kiselina (99). Neki od ovih mehanizama u upalnim se procesima inaktiviraju, te dozvoljavaju pojačano zakiseljavanje tekućine koja oblaže dišni epitel s ciljem obrane domaćina od zaraze (100).

Važno je napomenuti kako pH KI-a najvjerojatnije nije isključivo odraz kiselosti tekućine koja oblaže dišni epitel u donjim dišnim putovima. Na kiselost KI-a može utjecati i pojačana proizvodnja i hlapljenje kiselina iz gornjih dijelova dišnog sustava (101), a moguć je i utjecaj acidobaznog statusa krvi (90). U istraživanju u pacijenata s bubrežnim zatajenjem nađene su značajno više vrijednosti pH KI prije hemodijalize u odnosu na vrijednosti poslije hemodijalize (92). Kiselost KI-a ispitanika koji boluju od GERB također je viša, što se pripisuje aspiraciji kapljica želučane kiseline (56, 91).

### 1.1.2.1. Metode mjerenja kiselosti kondenata izdaha

U većini do sada objavljene literature opisana su četiri glavna načina metoda pripreme uzoraka KI-a i mjerenja njegovog pH (34, 51, 70, 93):

1. u svježim nativnim uzorcima (51);
2. u uzorcima propuhivanim inertnim plinom (argon, dušik, helij) kako bi se u njima smanjio sadržaj CO<sub>2</sub> (34);
3. u uzorcima u kojima se sadržaj CO<sub>2</sub> stabilizirao stajanjem uzoraka na sobnoj temperaturi (70);
4. u uzorcima iz kojih CO<sub>2</sub> nije uklanjan, već su izmjerene pH vrijednosti korigirane za standardni parcijalni tlak CO<sub>2</sub> od 5,33 kPa. Pretpostavlja se, naime, da je to fiziološka vrijednost parcijalnog tlaka CO<sub>2</sub> u tekućini koja oblaže respiratorni epitel (93).

Većina autora smatra da CO<sub>2</sub>, glavna hlapiva komponenta u KI-u koja u vodenom okružju disocira na H<sup>+</sup> i HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ione, maskira utjecaj ostalih iona na pH KI-a, te time onemogućava procjenu upalnih zbivanja u dišnim putovima. Difuzija CO<sub>2</sub> iz uzoraka u okolnu atmosferu dovodi do kontinuirane promjene pH KI-a u nativnim uzorcima, a čak i nakon više sati stajanja na sobnoj temperaturi u uzorcima se zadržava značajna i varijabilna količina CO<sub>2</sub> (77).

Stoga se danas uvriježilo mjerenje pH KI-a u uzorcima u kojima je sadržaj CO<sub>2</sub> smanjen na najmanju moguću mjeru, najčešće propuhivanjem uzoraka inertnim plinom argonom tijekom 10 minuta uz protok od 350 mL/min (34). Spomenuti postupak dovodi do porasta pH vrijednosti za 1-1,5 logaritamskih jedinica u odnosu na svježije native uzorke.

Mjerenje kiselosti argoniziranih uzoraka pokazuju dobru reproducibilnost, **s unutar-dnevnim i unutar-tjednim koeficijentima varijabilnosti od 3,5% i 4,5%** (60). Sličan unutar-tjedni koeficijent varijabilnosti, 3.3%, utvrđen je i za uzorke u kojima su izmjerene pH vrijednosti korigirane za standardni parcijalni tlak CO<sub>2</sub> od 5,33 kPa (93).

### 1.1.2.2. Čimbenici koji utječu na kiselost kondenzata izdaha

Čimbenike koji mogu utjecati na kiselost KI-a može se općenito podijeliti na vanjske, t.j. metodološke, vezane uz metodu uzorkovanja, pripremu i čuvanje uzoraka, te fiziološke i patofiziološke čimbenike vezane uz osobine organizma ispitanika (33).

#### Metodološki čimbenici

U literaturi su objavljena brojna istraživanja u kojima se ispitivao utjecaj različitih metodoloških čimbenika na kiselost KI-a, uključujući uzorkovanje KI-a sa i bez nosne kvačice (102, 77), način disanja (60, 72), duljinu uzorkovanja (60, 77), vrstu aparata za uzorkovanje i temperaturu hlađenja tijekom kondenzacije uzorka (76, 103), temperaturu okoliša i vlažnost zraka (104, 105), te prethodnu inhalaciju fiziološke otopine (106) i hipertonične otopine (78).

Nošenje **nosne kvačice** tijekom uzorkovanja smanjuje volumen uzorka (102), no čini se, ne utječe na kiselost KI-a niti u zdravih ispitanika niti u osoba s KOPB-om (77).

**Način disanja** (frekvencija i dubina) tijekom uzorkovanja također nije utjecao na kiselost argoniziranih (60) niti na nativnih uzoraka (71).

**Duljina uzorkovanja** KI-a nije bitno utjecala na kiselost KI-a u zdravih dobrovoljaca (60) kao niti u ispitanika s KOPB-om (77).

Utjecaj vrste uređaja za uzorkovanje KI-a i temperature hlađenja uzorka tijekom njegove kondenzacije nije još dovoljno razjašnjen. U literaturi se većinom opisuje uzorkovanje KI-a pomoću dva komercijalna uređaja, RTube (Respiratory Research, Charlottesville, SAD) i EcoScreen (Jaeger, Hoechberg, Njemačka). U dva istraživanja zabilježene su više vrijednosti pH KI-a u uzorka dobivenih EcoScreen uređajem u odnosu na one dobivene RTube uređajem (61, 107), dok u druga dva istraživanja ovakve razlike nisu uočene (79, 108). Podaci o **utjecaju temperature uzorkovanja**, odnosno temperature kondenzacije izdahnutog zraka, također su proturječni. Temperatura uzorkovanja od +13 °C, -6 °C, -16 °C i -44 °C nije utjecala na vrijednosti pH KI-a u argoniziranim uzorcima (76). U istraživanju Czebe i sur. (103), međutim, uočena je značajna razlika u pH vrijednostima u ovisnosti od temperature hlađenja. Uzorci dobiveni hlađenjem izdaha na -70 °C bili su alkalniji u odnosu na uzorke dobivene kondenzacijom izdaha na -20 °C. Ova razlika može se djelomično objasniti i korištenjem različitih metoda mjerenja pH (argonizirani uzorci vs. uzorci standardizirani za parcijalni tlak CO<sub>2</sub>) (93).

Nadalje, istraživanja su pokazale kako **temperatura okoliša te vlažnost zraka** utječu na izmjerene vrijednosti pH KI-a (104, 105). U uzorcima KI-a u kojima je pH mjereno pri okolišnoj temperaturi od 37 °C izmjerene su za 0,44 logaritamske jedinice više vrijednosti u odnosu na uzorke čiji je pH mjereno pri okolišnoj temperaturi od 23 °C.

Proučavan je također **utjecaj dvotjedne inhalacije termalne vode i obične fiziološke otopine** na pH KI-a u ispitanika s KOPB-om (106). pH KI-a nije se značajno promijenio nakon inhalacije fiziološke otopine, dok je uočen značajan pad pH nativnih uzoraka KI-a nakon inhalacije termalne vode. Udisanje hipertonične otopine koja ne dovodi do bronhokonstrikcije bilo je povezano s padom vrijednosti pH u argoniziranih uzoraka u zdravih ispitanika i osoba koje boluju od astme ili KOPB-a, dok izotonična otopina nije utjecala na pH vrijednosti u spomenutih ispitanika (78). U šest ispitanika, bolesnika sa stabilnom astmom ili osoba sa suspektnom bronhalnom hiperreaktivnošću, bronhokonstrikcija izazvana metakolinom nije utjecala na kiselost uzoraka (60).

Podaci o utjecaju konzumacije hrane i pića na kiselost KI izuzetno su oskudni. U dostupnoj literaturi objavljeno je samo jedno istraživanje o utjecaju konzumacije mineralne vode i Coca Cole na pH KI-a (109). Konzumacija ovih napitaka 15 minuta prije uzorkovanja KI-a bila je povezana sa značajnim padom pH vrijednosti.

Istraživanja na zdravim pušačima pokazala su da je **kronični učinak aktivnog izlaganja duhanskom dimu** povezan sa značajno nižim vrijednostima pH KI-a u odnosu na nepušače (110-115), što se može povezati sa iritativnim, proupalnim i toksičnim svojstvima duhanskog dima (116-119). Pojedina istraživanja, doduše, nisu potvrdila ovaj nalaz (70, 120).

U do sada objavljenoj literaturi podaci o **akutnom učinku aktivnog izlaganja duhanskom dimu** na kiselost KI-a oskudni su (113, 114). Spomenuta istraživanja ili nisu uočila razlike u vrijednostima pH KI-a prije i nakon popušene cigarete (114) ili je uočen trend porasta pH KI-a nakon popušene cigarete koji nije dostigao statističku značajnost, vjerojatno zbog malog broja ispitanika (n=9) (113).

Istraživanja o utjecaju **temperature pohrane uzoraka** kroz duži vremenski period na rezultate mjerenja kiselosti nakon zamrzavanja argoniziranih i nativnih uzoraka pokazala su oprečne rezultate. Parni uzorci KI-a (zdravih ispitanika i bolesnika u fazi pogoršanja kliničke slike astme) od kojih je jedan alikvot mjereno odmah po uzorkovanju, a drugi zamrznuti na -20 °C i argoniziran po odmrzavanju, nisu pokazali statistički značajne razlike u odnosu na vrijednosti dobivene prije zamrzavanja (60), kao niti zamrzavanje nativnih uzoraka bolesnika s KOPB-om na -80 °C tijekom razdoblja od 2 tjedna do 3 mjeseca (77). Nasuprot ovim

rezultatima, uočen je porast vrijednosti pH KI nakon 8 tjedana zamrzavanja nativnih uzoraka ispitanika koji su zdravi ili boluju od astme i alergijskog rinitisa na -80 °C, dok se spomenuta razlika nije uočila u uzorcima koji su prije zamrzavanja bili argonizirani (107). Utjecaj temperature zamrzavanja na pH vrijednosti nativnih uzoraka KI-a najvjerojatnije se može objasniti promjenom parcijalnog tlaka CO<sub>2</sub> u uzorku tijekom njegovog zamrzavanja i odmrzavanja (121).

### **Fiziološki čimbenici**

Od fizioloških čimbenika koji bi mogli utjecati na kiselost KI-a proučavana je dob (60, 62, 74, 122), spol (62), rasa (10, 62), fizička aktivnost (89) i cirkadijani ritam (34).

Istraživanja provedena u zdravih odraslih ispitanika većinom nisu pronašla utjecaj **dobi** na pH vrijednosti KI-a (60, 62, 74). U istraživanju Cruz i sur. (122) uočene su, međutim, niže vrijednosti pH argoniziranih uzoraka KI-a u osoba dobne skupine od 60-80 godina u odnosu na mlađe dobne skupine.

Utjecaj **spola** na kiselost KI-a nije uočen u do sada objavljenim istraživanjima (10, 62).

Utjecaj **rase** na vrijednosti pH KI-a nije utvrđen u opsežnom istraživanju Paget-Brown i sur. (62), iako postoje podaci koji upućuju na veću učestalost nižih vrijednosti pH KI-a (<6.5 logaritamskih jedinica) u afroameričkih zdravih ispitanika u odnosu na bijelu rasu, ali samo za dobnu skupinu od 31-40 godina (10).

U do sada provedenim istraživanjima jasno je pokazano kako **fizička aktivnost** dovodi do porasta vrijednosti pH KI-a u zdravih ispitanika (89).

Čini se da **cirkadijani ritam** nema utjecaja na pH KI-a (34), čemu govori u prilog i usporedba vrijednosti koeficijenata unutar-dnevne i unutar-tjedne varijabilnosti mjerenja pH KI-a (3,5% vs. 4,5%) (60).

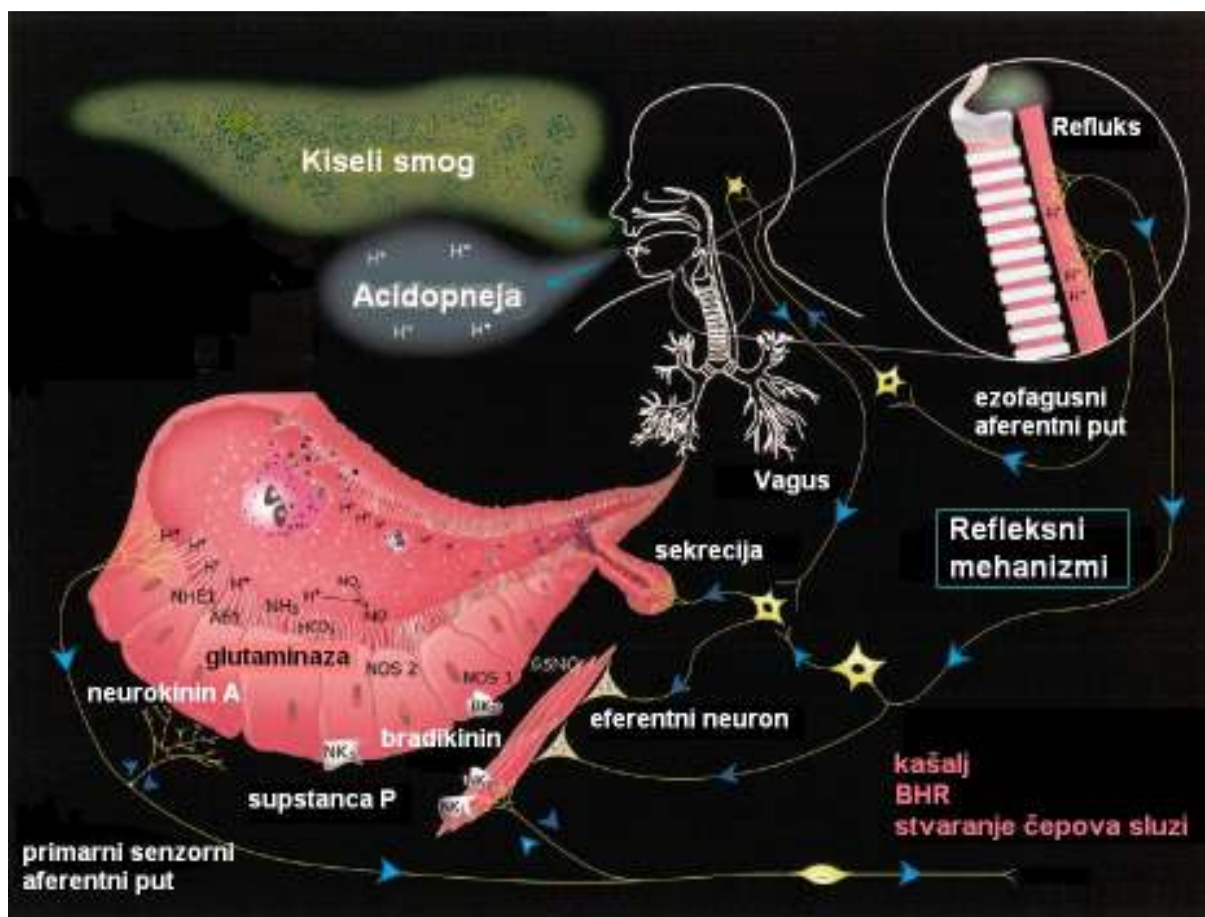
### **Patološki čimbenici**

Brojna istraživanja utvrdila su da se u različitim upalnim bolestima dišnog sustava, uključujući astmu, KOPB, upalu pluća, cističnu fibrozu i upalne promjene pluća prouzrokovane mehaničkom ventilacijom (11, 39, 52, 68, 75, 77, 123), vrijednosti pH KI-a smanjuju u odnosu na zdrave ispitanike. Promjena kiselosti KI zabilježena je i u bolestima koje nisu vezane uz dišni sustav, primjerice u bolesnika s bubrežnim zatajenjem prije i poslije hemodijalize (90). Hunt i sur. (67), koji su opisali sniženje pH KI-a u ispitanika koji boluju od astme u odnosu na respiratorno zdrave ispitanike, spomenutu su pojavu nazvali „**acidopnea**“.

Pretpostavlja se da u kroničnim upalnim bolestima dišnog sustava, kao što su astma i KOPB, povećanje kiselosti tekućine koja oblaže dišne puteve, pa time i povećanje kiselosti KI-a, nastaje na sljedeći način: Lučenje pojedinih upalnih citokina dovodi do inhibicije glutaminaze s posljedično smanjenim stvaranjem amonijaka, povećanim stvaranjem protona i zakiseljavanjem tekućine koja oblaže dišni epitel (67) (slika 1) (91). Sniženje pH tekućine koja oblaže dišne puteve ima za posljedicu bronhokonstrikciju (91), oštećenje cilijarne pokretljivosti s posljedičnim smanjenjem mukocilijarnog klirensa (124), te povećanje viskoznosti sluzi (125), a izrazito niske vrijednosti pH dovode i do smrti (apoptoze) dišnog epitela (125).

Među endogenim čimbenicima koji se mogu povezati s povećanjem kiselosti KI-a važno je spomenuti **gastroezofagealnu refluksnu bolest** (55, 56, 126). Pokazalo se, naime, da gastroezofagealna refluksna bolest može biti dodatan čimbenik u zakiseljavanju dišnih putova zbog porasta tlaka u trbušnoj šupljini tijekom kašljanja. Smjer zbivanja može biti i suprotan te GERB može dovesti do nadražaja grkljana i bronha zbog mikroaspiracije kiselog želučanog sadržaja. Međutim, u ispitanika s znakovima kroničnog nadražajnog kašlja i GERB-a nije se potvrdio povoljan učinak omeprazola (inhibitor protonske pumpe) na spomenute simptome kao niti na pH KI-a (126).

Utjecaj **kroničnog alkoholizma** na pH KI-a ispitan je samo u jednom istraživanju koje nije uočilo razliku između argoniziranih vrijednosti KI-a ispitanika koji kronično uzimaju alkohol i onih koji ne boluju od spomenute ovisnosti (120).



**Slika 1.** Patofiziološki mehanizmi zakiseljavanja KI-a

NO – dušični oksid; NO<sub>2</sub> – dušični dioksid; AE1 – anionski izmjenjivački protein 1; NK<sub>1</sub> – neurokininski receptor 1; BK<sub>2</sub> – bradikininski receptor 2; NHE1 – Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmjenjivački protein; NOS 1 i 2 – sintetaza dušičnog oksida 1 i 2; VR1 – vaniloidni receptor 1; BHR – bronhalna hiperreaktivnost; GSNOS – S-nitrozoglutation. IZ: Ricciardolo FL. i sur. Am J Respir Crit Care Med 1999 (91).

## **1.2. Utjecaj izloženosti organskoj prašini u radnom okolišu drvne industrije**

Drvna industrija, kao i brojna radna mjesta u drugim industrijama, kao što su tekstilna i prehrambena industrija, poljodjelstvo, stočne farme i šumarstvo, podrazumijevaju znatnu izloženost organskoj prašini (1, 2, 127). Organska prašina može se definirati kao mješavina aerosoliziranih čestica biljnog, životinjskog i mikrobnog porijekla (3, 128). Radnici u drvnoj industriji, primjerice, izloženi su prašini drveta ali i hlapivim tvarima koje se oslobađaju pri preradi drveta (pr. terpeni, kateholi, plikatična i abietična kiselina), bakterijama i sporama različitih vrsta plijesni i njihovim raspadnim produktima, uključujući endotoksin i beta-glukane (132, 133), pesticidima kojima se drvo tretira radi zaštite od nametnika, te metalima koji se oslobađaju s reznih površina strojeva (134) (slika 2 i 3).

U tekstu koji slijedi bit će više riječi o drvnoj prašini, endotoksinu i plijesnima, kao najznačajnijim štetnim čimbenicima kojima su izloženi radnici u pilanama (132).





**Slika 2.** List kružne pile – oštrica iz tvrdih ili sinteriranih metala (sadržaj: volframovi karbidi, nikel i željezo)



**Slika 3.** List tračne pile – oštrica iz nelegiranog ili niskolegiranog čelika

### 1.2.1. Drvna prašina

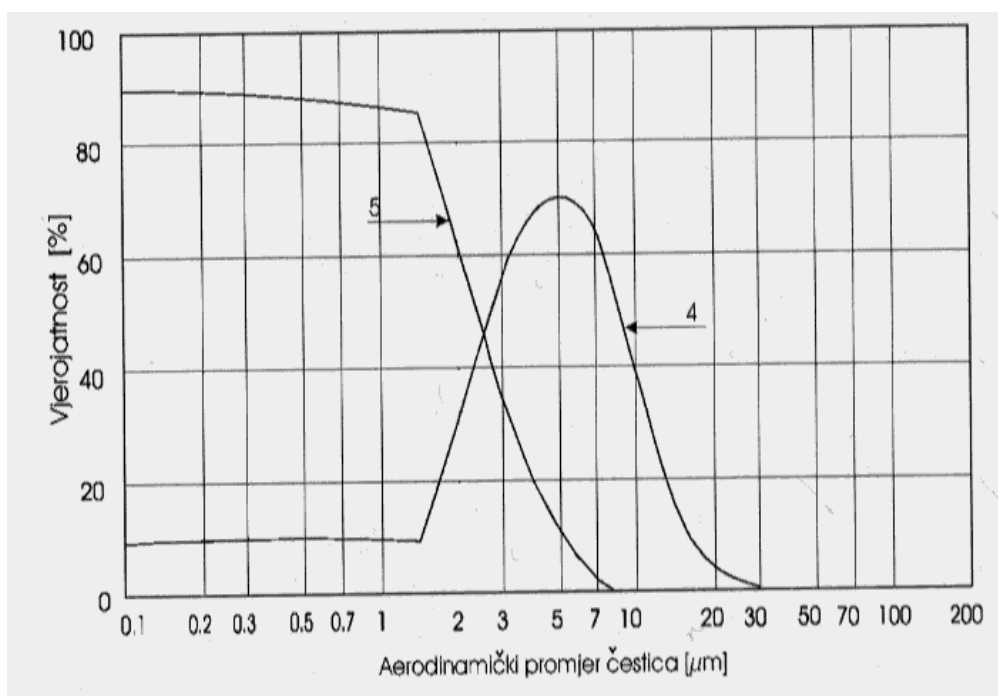
Prašina je disperzijski kruti aerosol kojeg sačinjavaju čestice veličine  $<1$  do  $100 \mu\text{m}$  (4). Većina je drvnih čestica srednjeg aerodinamičkog promjera većeg od  $5 \mu\text{m}$  (135). U dišnim putevima promatrana su odvojena područja koja se međusobno razlikuju prema načinu uklanjanja inhaliranih čestica, kao i vremenu zadržavanja čestica na mjestu taloženja. Zrak se pročišćava ulazeći u organizam pri prolasku kroz ulazni dio dišnog sustava. Krupne čestice zaustavljaju se na nosnim dlačicama ili talože na sluznici nosa, ždrijela i grla nakon čega se mehanički otklanjaju kihanjem, brisanjem nosa ili gutanjem. Manje čestice prodiru dublje u dišni sustav. Dosadašnja istraživanja pokazala su da se odlaganje čestica u dišnom sustavu može prikazati kao funkcija aerodinamičkog promjera čestica (slika 4).

Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO) uvela je pet frakcija čestica u ovisnosti o vjerojatnosti prodiranja u određene dijelove dišnog sustava (4):

1. Inhalabilna frakcija – masa čestica koje ulaze u dišni sustav pri odgovarajućoj koncentraciji ukupnih čestica u zraku.
2. Ekstratorakalna frakcija – masa inhalabilnih čestica koje ne prodiru dublje od larinksa ( aerodinamički ekvivalentni promjer čestica  $> 10\mu\text{m}$  ).
3. Torakalna frakcija – masa inhalabilnih čestica koje prodiru dublje od larinksa.
4. Traheobronhalna frakcija – masa inhalabilnih čestica koje prodiru dublje od larinksa, ali ne prodiru dublje od terminalnih bronhiola ( aerodinamički ekvivalentni promjer čestica  $3-15\mu\text{m}$  ).
5. Respirabilna frakcija – masa inhalabilnih čestica koje prodiru u alveolarne prostore ( aerodinamički ekvivalentni promjer čestica  $< 0,2 - 10\mu\text{m}$ ).

Spomenute frakcije čestica nisu striktno razgraničene, te se u pojedinoj frakciji čestica nalazi određeni postotak čestica i manjeg i većeg ekvivalenta aerodinamičkog promjera, kako je to prikazano na slici 4.

U Republici Hrvatskoj prema trenutno važećem Pravilniku o maksimalnim dopustivim koncentracijama štetnih agenasa u radnom okolišu (NN 13/2009), granična vrijednost izloženosti (GVI) za prašinu drva ( tvrdog i mekanog) iznosi  $5 \text{ mg/m}^3$ .



**Slika 4.** Odlaganje lebdećih čestica u traheobronhalnoj regiji (4) i alveolarnim prostorima (5)  
 Vjerojatnost penetracije kroz kolektor ili odlaganje u donje dijelove dišnih putova izražena u postotku (%) od ukupne koncentracije čestica u zraku u ovisnosti o aerodinamičkom promjeru.(ISO 7708:1995)

Drvena prašina posjeduje iritativna i alergogena svojstva (134). Jedan od primjera je alergogeno djelovanje **plikatične kiseline** koja se oslobađa pri obradi crvenog cedra (*Thuja plicata*). Izloženost visokim koncentracijama ovog alergena povezuje se s povećanom prevalencijom astme u radnika (135). Pretpostavlja se da mehanizmi koji dovode do razvoja astme kod izloženih radnika nisu isključivo alergogene prirode. Iako je nađen porast specifičnih IgE antitijela na plikatičnu kiselinu u izloženih radnika uz pozitivnu korelaciju između koncentracije ovih antitijela i učestalosti bronhalne hiper-reaktivnosti (BHR) (136), povećana učestalost BHR-a utvrđena je i u neatopičnih radnika (137). Čini se da alergogena i iritativna svojstva posjeduju i **kateholi** iz hrasta (*Quercus sp*) te **seskviterpeni** iz bukve (*Fagus sp*) (138), koji se povezuju s povećanom učestalošću BHR-a u izloženih radnika.

### 1.2.2. Endotoksin

Endotoksin je po građi lipopolisaharid vanjskog sloja stanične stijenke gram-negativnih patogenih i nepatogenih bakterija (129, 139) te je do sada prepoznat i u jednoj gram-pozitivnoj bakteriji (*Lysteria monocytogenes*) (129). Molekula endotoksina građena je od tri dijela: lipida A, polisaharidne jezgre i polisaharidnog lanca. Lipid A je sastavni dio hidrofobnog sloja stanične stijenke bakterije, a na polisaharidnu jezgru vezani su polisaharidni lanci (129). Različita imunogenost endotoksina rezultat je različitosti struktura polisaharidnih lanaca koji su specifični za određenu vrstu bakterija i čine O-antigene Gram-negativnih bakterija (132). Imunološki odgovor organizma na endotoksin vrlo je slab. Pri parenteralnom unosu ili ingestiji potiče stvaranje antitijela IgM, IgG odnosno IgA klase (140). Samo je endotoksin u obliku agregata biološki aktivan, dok monomeri ne stimuliraju otpuštanje citokina iz monocita (141). Za endotoksin je karakteristično da je vrlo otporan na toplinu (ne može se uništiti autoklaviranjem), ne posjeduje enzimsku aktivnost i od njega se ne može pripremiti toksoid (141), a inaktivira se zagrijavanjem tijekom 4 sata na 160°C (129). Nalazimo ga u općem i radnom okolišu, a udisanje je glavni put ulaska u organizam (142). Istraživanja u ljudi i na životinjama pokazala su da endotoksin uzrokuje nespecifičnu upalu dišnih putova (142), pogoršava kliničku sliku astme, pogoduje nastanku kroničnog bronhitisa (143, 130), bisinoze (144, 145) i toksičnog sindroma organskih prašina (145). Imunološki odgovor na izloženost endotoksinu različit je za svakog pojedinca i rezultat je međudjelovanja

dužine izloženosti i koncentracije endotoksina, te genetske predispozicije i okolišnih čimbenika (146).

Opisani su i pozitivni učinci endotoksina koji se povezuju s manjom učestalošću atopije u populacijama izloženim niskim koncentracijama endotoksina u djetinjstvu i tijekom života (tzv. „higijenska teorija“) (147-150), te smanjenjem učestalosti obolijevanja od karcinoma pluća u radnika izloženih endotoksinu na stočnim farmama (151) i poljoprivrednim gospodarstvima (152).

Trenutačno, u Republici Hrvatskoj ne postoji pravilnik kojim bi bile regulirane GVI endotoksina u zraku radnih prostora. U objavljenoj literaturi preporučene GVI kreću se u širokom rasponu od 50 do 2000 EU/m<sup>3</sup> (153). Nacionalno vijeće za zdravlje Kraljevine Nizozemske preporučilo je GVI od 45 EU/m<sup>3</sup> (4,5 ng/m<sup>3</sup>) (154), dok je Međunarodna komisija za zdravlje na radu (*International Commission on Occupational Health*, ICOH) preporučila graničnu vrijednost profesionalne izloženosti endotoksinu od 125 EU/m<sup>3</sup> (12,5 ng/m<sup>3</sup>) (153).

### 1.2.3. Plijesni

Plijesni zajedno s bakterijama predstavljaju najvažnije mikroorganizme koji recikliraju organski materijal. Široko su rasprostranjene u okolišu i procjenjuje se da čine 25% ukupne biomase (155, 156). Razmnožavaju se stvaranjem spolnih i nespolnih spora. Razine izloženosti sporama variraju u znatnoj mjeri, te se u uvjetima koji pogoduju razmnožavanju njihov broj naglo povećava. Temperaturni raspon od 15-30 °C osobito je pogodan za rast plijesni, iako neke vrste, pr. *Cladosporium herbarum*, mogu rasti i na temperaturama do -5 °C. Radnici izloženi organskoj prašini, primjerice poljoprivrednici, radnici u drvenoj industriji i oni zaposleni na zbrinjavanju otpada, mogu biti izloženi sporama plijesni u koncentraciji većoj od 10<sup>3</sup> CFU/m<sup>3</sup> (engl. *Colony Forming Units*), t.j. vrijednostima koje se povezuju s iritativnim i alergijskim učincima na respiratornu sluznicu (130). Vanjski sloj plijesni, kojeg čine uglavnom glikoproteini koji određuju antigena svojstva pojedinih vrsta plijesni, važan je za njihove alergogene, iritativne i toksične zdravstvene učinke, uključujući alergijske bolesti dišnog sustava i hipersenzitivni pneumonitis (130).

Kao i u slučaju izloženosti endotoksinu, GVI za plijesni u radnim prostorima za sada nije zakonski regulirana u Republici Hrvatskoj, a također ne postoje uniformne preporuke na

međunarodnoj razini. Švicarsko nacionalno osiguranje (Swiss National Insurance – SUVA) izdalo je preporuke vezane za gornju razinu izloženosti koja iznosi 1000 CFU/m<sup>3</sup> u radnom okolišu (132).

#### **1.2.4. Zdravstveni učinci profesionalne izloženosti dišnim štetnostima u drvnoj industriji**

Kao što je već navedeno u prethodnim poglavljima, izloženost organskoj drvnoj prašini može uzrokovati akutne i kronične poremećaje dišnog sustava, od iritativnih simptoma gornjih i donjih dišnih putova do astme, KOPB-a, hipersenzitivnog pneumonitisa i toksičnog sindroma organskih prašina (4, 5, 134). Drvna prašina, prvenstveno tzv. tvrdih vrsta drva (pr. harsta i bukve) može imati i kancerogene učinke, te se povezuje s nastankom karcinoma nosne šupljine i sinusa (133).

**Astma** je bolest obilježena varijabilnim smetnjama u protoku zraka kroz dišne putove i/ili hiper-reaktivnošću dišnih putova popraćenih upalom. Profesionalna astma odnosi se na slučajeve astme uzrokovane udisanjem štetnosti na radnom mjestu (4). Profesionalna astma može biti alergijska i iritativna, pri čemu se razlikuju dva oblika iritativne astme. Prvi je reaktivni disfunkcijski sindrom dišnih putova (RADS) koji nastaje iznenadno nakon kratkotrajne izloženosti (najčešće akcidentalne) visokim koncentracijama plinova, para, dimova ili prašina koje djeluju kao dišni iritansi i to u osoba koje do tada nisu bolovale od astme (4). Drugi oblik profesionalne iritativne astme izazvan je dugotrajnom izloženošću iritativnim astmogenim tvarima u koncentracijama znatno nižim od onih koje izazivaju RADS. Alergeni odgovorni za nastanak alergijske astme brojni su, a po kemijskom sastavu najčešće su proteini (4). S obzirom na molekularnu masu mogu se podijeliti na one visoke molekularne mase (>5000 daltona, pr. prašinske grinje, lateks, plijesni, kava, brašno) i niske molekularne mase (<5000 daltona, pr. diizocijanati, anhidridi kiselina, metali, penicilin). U alergene niske molekularne mase ubrajaju se i abietična i plikatična kiselina koje se oslobađaju pri obradi drva (137, 138, 157).

**Kronična opstruktivna plućna bolest** karakterizirana je ograničenjem protoka zraka kroz dišne puteve koji nije u potpunosti reverzibilan (4). Ograničenje protoka obično je progresivno i povezano je s (vjerojatno genetski uvjetovanim) prekomjernim upalnim odgovorom u dišnim putevima i plućnom parenhimu uzrokovanim udisanjem štetnih plinova ili čestica. Kronična opstrukcija u dišnim putevima nastaje uslijed patoloških promjena na

malim dišnim putevima (opstruktivni bronhiolitis) i propadanja plućnog parenhima (emfizem). Ova bolest jedan je od vodećih javnozdravstvenih problema, te će po predviđanjima Svjetske zdravstvene organizacije postati treći uzrok smrti, a peti najčešći uzrok radne nesposobnosti u svijetu do 2020. godine. Troškovi liječenja KOPB-a trostruko premašuju troškove liječenja astme (158). U razvijenim zemljama svijeta najučestaliji uzrok nastanka i razvoja KOPB-a je pušenje, ali ulogu imaju i zagađenost zraka, prehrana siromašna bjelančevinama, kao i radna izloženost dišnim štetnostima, uključujući drvenu prašinu (134).

**Bisinoza** se također ubraja u skupinu profesionalnih plućnih bolesti uzrokovanih udisanjem biološki aktivne prašine vegetabilnog porijekla kao što je to pamuk, konoplja i lan. Na početku se bolest manifestira kašljem, stezanjem u prsima i pomanjkanjem zraka prvog radnog dana u tjednu nakon tjednog odmora, dok s vremenom ti simptomi traju tijekom čitavog radnog tjedna i bolest prelazi u KOPB (4).

**Hipersenzitivni pneumonitis** (ekstrinzički alergijski alveolitis) praćen je upalnom reakcijom u alveolama i terminalnim bronhiolima nakon prethodne senzibilizacije i ponovnog udisanja prašine organskog porijekla (farmerska pluća, bolest uzgajivača golubova) (4).

**Toksični sindrom organske prašine** popraćen je općim simptomima porasta tjelesne temperature, te simptomima vezanim uz oči i dišni sustav koji nastaju kao posljedica izloženosti visokim koncentracijama organske prašine (4).

## **2. HIPOTEZA, CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. Svrha istraživanja**

Do danas nije pronađena metoda primjenjiva u ambulantnim uvjetima ordinacije medicine rada kao i u terenskim uvjetima preventivnih pregleda i epidemioloških istraživanja, kojom se mogu otkriti rane, pretkliničke upalne promjene u dišnim putevima.

Određivanje kiselosti KI-a predstavlja u potpunosti neinvazivnu metodu koja je prepoznata kao robusna, jednostavna, ponovljiva, a financijski ne suviše zahtjevna. Zbog nedostatnog stupnja validacije i standardizacije te mnogih nerazjašnjenih pitanja u vezi porijekla KI-a i bioloških i metodoloških čimbenika vezanih uz mjerenje pokazatelja upale u ovom biološkom uzorku, kiselost KI-a nije još uveden kao rutinska dijagnostička metoda u kliničku praksu.

Svrha eksperimentalnog dijela istraživanja (Dio I) bila je, stoga, doprinijeti razumijevanju čimbenika koji mogu utjecati na metodu mjerenja kiselosti KI-a, t.j. procijeniti do sada nedovoljno istražene moguće učinke akutnog izlaganja cigaretnom dimu te konzumacije hrane i kave na kiselost KI-a.

Svrha epidemiološkog dijela ovog istraživanja (Dio II) bila je procijeniti primjenjivost metode mjerenja pH KI-a u ranom otkrivanju upalnih promjena u dišnim putevima uzrokovanih udisanjem štetnosti na radnom mjestu.

### **2.2. Hipoteza**

pH KI-a mogući je biološki pokazatelj učinaka profesionalne izloženosti organskoj prašini na dišni sustav, primjenjiv za upotrebu u praksi medicine rada i u terenskim epidemiološkim istraživanjima.

### **2.3. Ciljevi istraživanja**

- Doprinijeti validiranosti metode uzorkovanja i mjerenja pH KI-a s obzirom na mogući utjecaj pušenja cigareta i konzumacije hrane i kave na kiselost KI-a;
- Procijeniti povezanost izloženosti dišnim štetnostima, prvenstveno organskoj prašini, s kiselošću KI-a, ventilacijskom funkcijom pluća te prevalencijom respiratornih simptoma i objektivnih pokazatelja atopije u radnika u pilani;



- Procijeniti povezanost kiselosti KI-a s dišnim simptomima, parametrima ventilacijske funkcije pluća i objektivnim pokazateljima atopije;
- Procijeniti izloženost radnika dišnim štetnostima u pilani.

**Neposredni ciljevi** ovog istraživanja koje se sastojalo iz dva dijela, eksperimentalnog (Dio I – validacija metode mjerenja pH KI-a) i epidemiološkog (Dio II – učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav), bili su:

#### **Dio I – validacija metode mjerenja pH KI-a**

- Procijeniti akutni i kronični učinak pušenja cigareta te akutne učinke konzumacije hrane i kave na kiselost KI-a u zdravih dobrovoljaca;
- Utvrditi unutar-dnevnu i unutar-tjednu ponovljivost mjerenja pH KI-a u zdravih dobrovoljaca.

#### **Dio II – učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav**

- Odrediti razine ukupne zapašenosti i respirabilnih čestica, vrstu i razinu plijesni te razinu endotoksina i alergena piroglifidne grinje *Dermatophagoides pteronyssinus* u radnom okolišu pilana iz kojih su regrutirani radnici uključeni u istraživanje;
- Procijeniti postoje li razlike u vrijednostima pH KI-a, parametrima ventilacijske funkcije pluća te prevalenciji dišnih simptoma i pozitivnih pokazatelja atopije (pozitivni kožni test prick metodom, povišena razina ukupnih IgE protutijela) između radnika izloženih dišnim štetnostima u pilani i kontrolne skupine ispitanika, te analizirati odnos navedenih parametara s pH KI-a;
- Procijeniti da li se vrijednost pH KI-a, parametara ventilacijske funkcije pluća i bronhodilatatornog testa mijenjaju tijekom tjedne radne izloženosti dišnim štetnostima u pilani.

Prvi, eksperimentalni dio istraživanja (**Dio I – validacija metode mjerenja pH KI-a**) sadržavao je četiri protokola:

**Pušenje** – utjecaj pušenja cigareta na pH KI-a;

**Doručak** – utjecaj konzumacije hrane na pH KI-a;

**Kava** – utjecaj konzumacije kave na pH KI-a i

**Ponovljivost** – dnevna i tjedna ponovljivost mjerenja pH KI-a.

U drugom, epidemiološkom, dijelu istraživanja (**Dio II – učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav**) proučavana je povezanost izloženosti dišnim štetnostima u pilani s poremećajima dišnog sustava i vrijednostima pH KI-a.

## **3. ISPITANICI, METODE I PROTOKOL STRAŽIVANJA**

### **3.1. Ispitanici**

#### **3.1.1. Ispitanici uključeni u Dio I istraživanja – validacija metode mjerenja pH KI-a**

U ovom dijelu istraživanja sudjelovao je 41 ispitanik s prosječnom dobi od  $40,9 \pm 10,5$  godina (raspon 22-60 godina) koji nije bio izložen dišnim štetnostima u radnom okolišu. Respiratorno zdravlje je u ispitanika definirano kao odsutnost kroničnih respiratornih bolesti u anamnezi uz nalaz normalnih spirometrijskih vrijednosti forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC), forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi ( $FEV_1$ ) i omjera  $FEV_1/FVC$ . Vrijednosti FVC i  $FEV_1$  smatrane su normalnim ako su bile veće od 80% od očekivanih vrijednosti, a omjer  $FEV_1/FVC$  veći od 70% (CECA II) (159). Ispitanici s želučanim smetnjama, prvenstveno gastroezofagealnim refluksom, te akutnom respiratornom infekcijom bili su isključeni.

Karakteristike ispitanika u ovom dijelu istraživanja prikazane su u tablici 2. U ispitivanje su uključeni i pušači i nepušači. Nepušači (24 ispitanika) sudjelovali su u protokolu Doručak, Kava i Ponovljivost, a pušači (15 ispitanika) u protokolu Pušenje. Medijan (raspon) pušačkog indeksa ispitanika u protokolu Pušenje iznosio je 300 (78-1200), s medijanom vrijednošću od 15 popušanih cigareta na dan (10-40).

**Tablica 2.** Osobine ispitanika u Dijelu I - validacija metode mjerenja pH KI-a

	<b>Protokol</b>			
	<b>Pušenje</b>	<b>Doručak</b>	<b>Kava</b>	<b>Ponovljivost</b>
Broj ispitanika, n (muškarci)	15 (4)	19 (7)	7 (3)	10 (2)
Dob (godine)	39,2±8,1	40,2±11,4	43,6±7,3	40,7±9,8
Pušači, n	15	0	0	0

Dob je izražena kao aritmetička sredina±standardna devijacija. U protokolima Doručak, Kava i Ponovljivost sudjelovalo je ukupno 24 ispitanika (određeni broj ispitanika sudjelovao je u dva i više protokola).

### **3.1.2. Ispitanici uključeni u Dio II istraživanja – učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav**

U epidemiološkom dijelu istraživanja sudjelovao je 61 pilanski radnik (izložena skupina) i 61 muški kontrolni ispitanik koji profesionalno nije bio izložen organskoj prašini. Pilanski radnici regrutirani su iz dvije pilane iz bliže okolice Zagreba (u daljnjem tekstu Pilana 1 i Pilana 2). Kriteriji uključivanja ispitanika u izloženu skupinu bili su izloženost drvnoj prašini  $\geq 20$  sati tjedno i muški spol, s obzirom na vrlo mali broj radnika ženskog spola zaposlenih u pilanama. U istraživanje nisu uključene osobe s akutnim bolestima gornjih i donjih dijelova dišnih putova (pr. prehlada) te one u kojih se na temelju anamnestičkih podataka posumnjalo na prisutnost gastroezofagealnog refluksa. U skladu s navedenim kriterijima iz istraživanja su isključena tri radnika zaposlena u Pilani 1 i jedan radnik zaposlen u Pilani 2 (tri radnika zbog akutne upale gornjih dišnih putova i jedan radnik zbog gastroezofagealnog refluksa) (slika 5).

Istraživanja su provedena u suglasju s preporukama Helsinške deklaracije o ljudskim pravima i sa Zakonom o potvrđivanju Konvencije o zaštiti ljudskih prava i dostojanstva ljudskog bića u pogledu primjene biologije i medicine (NN Međunarodni ugovor 13/03). Projekt, kojeg je ovo istraživanje dijelom, odobrilo je Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada 28. veljače 2006.g. (u prilogu). U istraživanju se osiguralo dragovoljno sudjelovanje ispitanika i pismeni svjesni pristanak obaviještenog ispitanika (engl. *informed consent*), kao i povjerljivost, tajnost i anonimnost podataka o ispitanicima. Ispitanici su u bilo kojem dijelu istraživanja mogli odustati od sudjelovanja u istraživanju. Podaci o ispitanicima upotrijebili su se samo u znanstvene svrhe. Postupke predviđene protokolom istraživanja provodilo je odgovarajuće kvalificirano osoblje.

## **3.2. Protokoli istraživanja**

### **3.2.1. Protokoli Dijela I - validacija metode mjerenja pH KI-a**

#### **Protokol Pušenje**

U 15 ispitanika, pušača, KI je uzorkovan pet puta: u jutro u 8 sati nakon cjelonoćnog odricanja od aktivnog izlaganja duhanskom dimu (u trajanju najmanje 10 sati, bazalni uzorak), te 15, 30, 60 i 120 minuta nakon aktivnog izlaganja duhanskom dimu jedne cigarete vrste Marlboro Gold (0,6 mg nikotina, 8 mg katrana). Ispitanici su popušili cijelu dužinu cigarete, u trajanju od 2-3 minute. Ispitanici su najmanje dva sata prije uzorkovanja bazalnog KI-a konzumirali svoj uobičajeni doručak. Trajanje protokola iznosilo je 160 minuta.

#### **Protokol Doručak**

U 19 ispitanika, nepušača, KI je uzorkovan četiri puta: u jutro u 8 sati nakon cjelonoćnog gladovanja, te 30, 60 i 120 minuta nakon konzumacije standardiziranog doručka. Doručak se sastojao od 100 g bijelog kruha (1071 kJ, 40 g vode, 8 g bjelančevina, 4 g masti, 47 g ugljikohidrata), 25 g svježeg krem kravljeg sira (30% mlječne masti, 229 kJ, 15.5 g vode, 5 g bjelančevina, 3.75 g masti, 0.25 g ugljikohidrata), 75 g pureće šunke (114.75 kJ, 45.75 g vode, 21 g bjelančevina, 3.45 masti) i 150 mL čaja (bez šećera). U cijelosti, obrok se sastojao od 101.3 g vode (osim čaja), 34 g bjelančevina, 11.2 g masti i 47.3 g ugljikohidrata. Sastav obroka procijenjen je na temelju knjige Hrvatske tablice jela i pića (160). Trajanje protokola iznosilo je 170 minuta.

#### **Protokol Kava**

U 7 ispitanika, nepušača, KI je uzorkovan tri puta: u jutro u 8 sati nakon cjelonoćnog gladovanja, te 30 i 60 minuta nakon konzumacije 150 mL espresso kave. Trajanje protokola iznosilo je 100 minuta.

#### **Protokol Ponovljivost**

U 10 ispitanika, nepušača, KI je uzorkovan tijekom tri dana u istom tjednu. Prvog dana uzorkovalo se tri puta, i to u razdoblju između 8 i 9 sati, 11 i 12 sati i između 14 i 15 sati, kako bi se procijenila unutar-dnevna ponovljivost mjerenja pH KI-a. Tijekom preostala dva dana KI je uzorkovan jednom dnevno, u jutro između 8 i 9 sati, kako bi se procijenila unutar-tjedna ponovljivost mjerenja pH KI-a. Ispitanici su upućeni da najmanje jedan sat prije uzorkovanja KI ne konzumiraju hranu ili piće, osim negazirane vode.

### 3.2.2 Protokol Dijela II - učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav

Protokol istraživanja prikazan je na slici 5.

Mjerenje temperature, vlage i strujanja zraka, kao i uzorkovanje sedimentirane i aerosolizirane prašine u radnom okolišu radi procjene izloženosti radnika dišnim štetnostima u radnom okolišu (ukupna i respirabilna prašina, endotoksin, plijesni, alergen grinje *Dermatophagoides pteronyssinus*) provedeno je u radnim prostorima pilana kako je detaljno opisano u poglavlju 3.3.2.1.

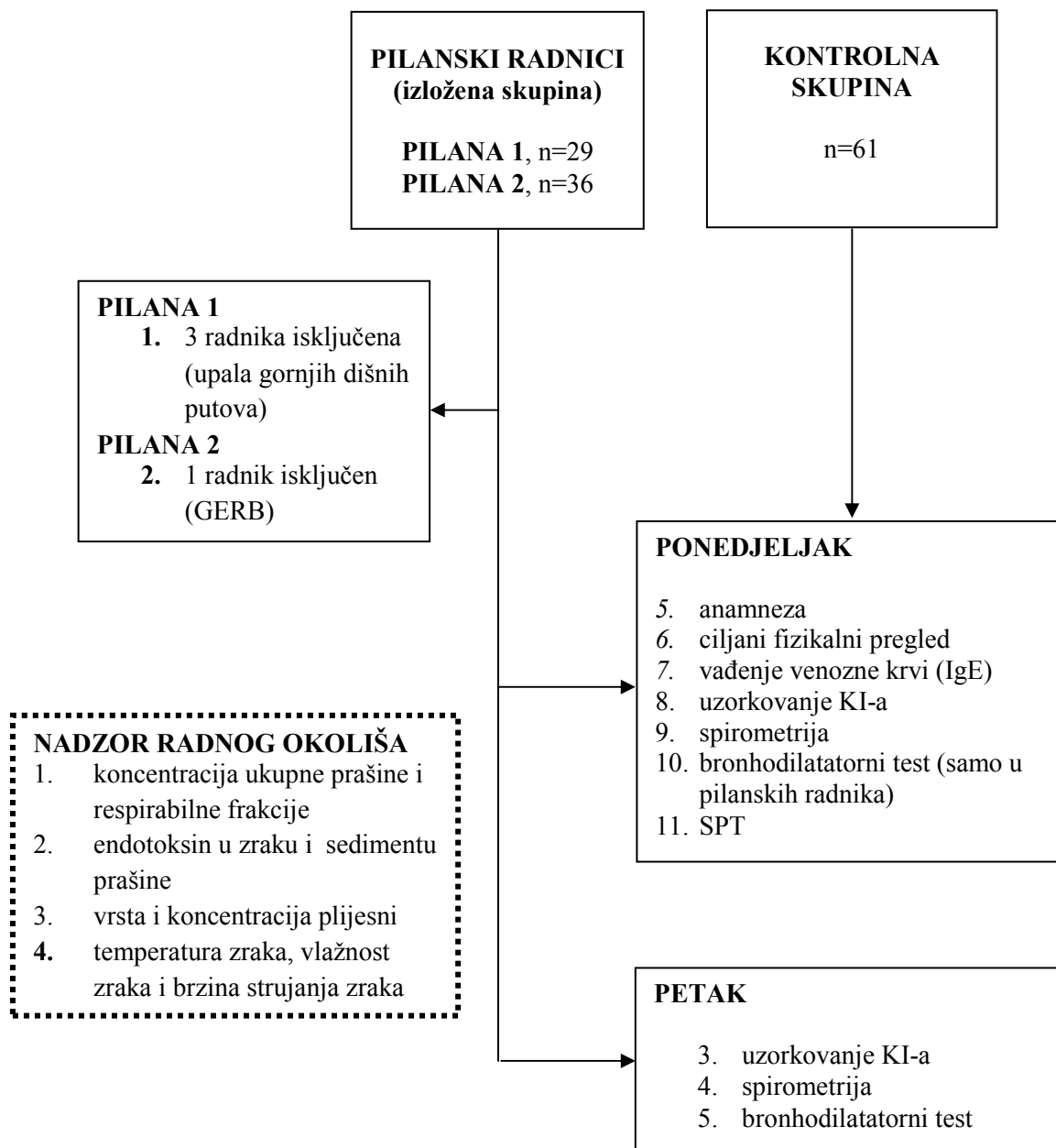
U radnika u pilanama proveli su se sljedeći postupci, navedenim redoslijedom:

4. u **ponedjeljak** na početku radne smjene, radnicima je uzeta anamneza, učinjen ciljani fizikalni pregled, izvađena venozna krv, uzorkovan KI-a, učinjena spirometrija i bronhodilatatorni test salbutamolom, te testiranje prick metodom na standardne inhalacijske alergene;
5. u **petak** na početku radne smjene ponovljeno je uzorkovanje KI-a, spirometrija i bronhodilatatorni test salbutamolom.

U kontrolnoj skupini ispitanika provedeni su sljedeći postupci, navedenim redoslijedom:

1. u jutarnjim satima radnicima je uzeta anamneza, učinjen ciljani fizikalni pregled, uzorkovana venozna krv i KI, učinjena spirometrija i testiranje prick metodom na standardne inhalacijske alergene.

Uzorkovanje KI-a provedeno je u 32 od 61 kontrolnog ispitanika.



**Slika 5.** Protokol Dijela II istraživanja

n – broj ispitanika; SPT – testiranje prick metodom na standardne inhalacijske alergene



## **3.3. Metode**

### **3.3.1. Metode u Dijelu I istraživanja - validacija metode mjerenja pH KI-a**

#### **3.3.1.1. Anamneza**

Ciljanom anamnezom prikupljeni su podaci o dobi, mogućoj izloženosti dišnim štetnostima na radnom mjestu, navici pušenja, prisutnosti kroničnih respiratornih bolesti (pr. astme i kroničnog bronhitisa), želučanih smetnji, prvenstveno gastroezofagealnog refluksa, te akutnih respiratornih infekcija. U pušača prikupljeni su podaci o dužini pušačkog staža i broju popušanih cigareta na dan. Nepušačima su smatrane osobe koje nikad nisu pušile. Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je iz visine i težine ispitanika prema formuli: težina (kg) / visina (m)<sup>2</sup>. Pretilost je definirana kao ITM $\geq$ 30 kg/m<sup>2</sup>.

#### **3.3.1.2. Spirometrija**

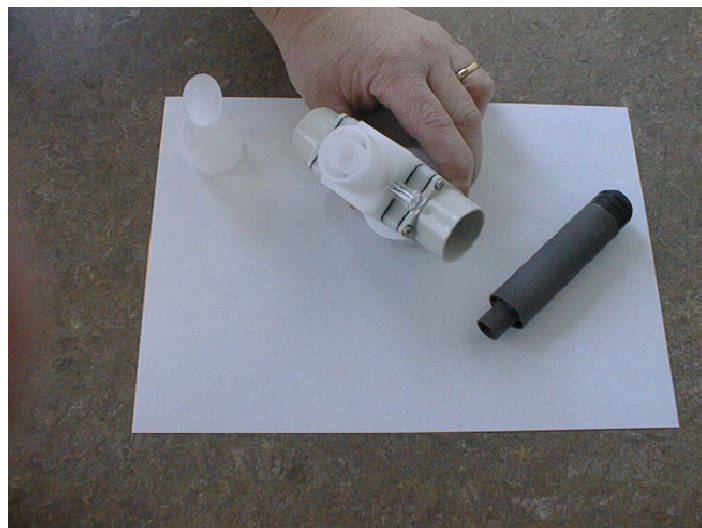
Ispitivanje ventilacijske funkcije pluća provelo se bilježenjem krivulje protok-volumen tijekom forsiranog izdisaja pomoću spirometra MasterScreen (Jaeger, Würzburg, Njemačka). Spirometrija se u svakog ispitanika provela najmanje tri puta, a najbolje vrijednosti interpretirane su u odnosu na referentnu vrijednost (CECA II) (159).

#### **3.3.1.3. Uzorkovanje KI-a i mjerenje pH**

Uzorkovanje KI-a u oba dijela istraživanja (Dio I i Dio II) provedeno je u skladu s preporukama ATS/ERS Radne skupine za metodološke preporuke i nerazjašnjena pitanja na području određivanja biopokazatelja u KI-u (34). Ispitanici su tijekom uzorkovanja KI-a sjedili i mirno disali u uređaj za kondenzaciju izdaha EcoScreen (Jaeger, Njemačka) tijekom 10 minuta kroz usni nastavak na kraju dvosmjernog ventila koji onemogućava povrat zraka (slika 6 i 7). Tijekom uzorkovanja ispitanici su nosili nosne kvačice. Prije početka uzorkovanja ispitanici su isprali usta običnom vodom i upozoreni su da se povremeno odmaknu od aparata i progutaju u ustima nakupljenu slinu. Uzorak se skupljao pomoću teflonskih nastavaka na kraju kojih su natakute plastične čašice. Teflonski nastavci dezinficirani su 1,5% otopinom Descogena (Antiseptica chemisch-pharmazeutische Produkte, Pulheim; dezinficijens s aktivnim kisikom) u trajanju od 15 minuta, potom isprani tekućom i destiliranom vodom, te na kraju osušeni.



**Slika 6.** Uređaj za uzorkovanje KI-a, EcoScreen (Jaeger, Njemačka)



**Slika 7.** Dvosmjerni ventil u koji ulazi teflonski cilindar s plastičnom čašicom za skupljanje KI-a

U prvom dijelu istraživanja (Dio I), uzorci su neposredno nakon uzorkovanja ostavljeni u zatvorenoj čašici na sobnoj temperaturi da se otope, a potom su argonizirani u trajanju od 10 minuta (propuhivanje uzoraka argonom u staklenoj epruveti pri protoku od 350 mL/min). Kiselost uzoraka mjerena je pH metrom MP 220 (Mettler Toledo, Švicarska) sa standardnom staklenom mikroelektrodom InLab Micro Pro (Mettler Toledo, Švicarska) (raspon od 0,00-14,00, preciznost  $\pm 0,01$ ). Navedena elektroda je kombinirana staklena elektroda tip „3 u 1“ koja sadrži senzornu elektrodu (koja mjeri električni potencijal), referentnu elektrodu s referentnim elektrolitom (kalijev klorid) i termometar, s obzirom da instrument očitane vrijednosti pH korigira za odabarnu temperaturu, u ovom slučaju 25 °C . Referentna elektroda osigurava stalan potencijal za senzornu elektrodu kako bi se mogla izmjeriti razlika potencijala. Prije svakog niza mjerenja, a najmanje jedan puta dnevno, elektroda je kalibrirana standardnim puferima (Mettler Toledo, Švicarska) u dvije točke (pH 7,00 and pH 4,01).

### **3.3.2. Metode u Dijelu II - učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav**

#### **3.3.2.1. Mjerenje pokazatelja izloženosti dišnim štetnostima u radnom okolišu**

Obje pilane godišnje obrade oko 20.000 m<sup>3</sup> trupaca kojima nije odstranjena kora prije ulaska u pilanu. S obzirom na vrste drva, u Pilani 1 obrađuje se tvrdo i meko drvo u omjeru 2:1, a u Pilani 2 isključivo tvrdo drvo. Od tvrdih vrsta drveta u Pilani 1 obrađuju se bukva (*Fagus silvatica* L.) i hrast (*Quercus Robur* L.), a u Pilani 2 bukva, hrast i jasen (*Fraxinus angustifolia*). Od mekih vrsta drveta (isključivo u Pilani 1) obrađuju se jela (*Abies alba* Mill.) i smreka (*Picea abies*).

Mjereni su sljedeći parametri radnog okoliša u pilanama: temperatura, vlažnost i brzina strujanja zraka, koncentracija ukupne zapašenosti i respirabilnih čestica u zraku, vrsta i razina plijesni i endotoksina u zraku, te razina endotoksina i alergena grinje *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1) u sedimentu prašine. Uzorci su skupljeni tijekom ljeta 2007. g. (Pilana 1) i 2008. g. (Pilana 2).

Ukupna i respirabilna frakcija prašine skupljana je tijekom dva dana u Pilani 1 i tri dana u Pilani 2, u razmacima od oko mjesec dana između mjerenja. Zrak namijenjen mjerenju razina endotoksina i plijesni i sediment prašine namijenjen mjerenju endotoksina i alergena Der p1, uzorkovani su tijekom jednog radnog dana. Mjesta za uzorkovanje zraka i sedimenta

prašine u pilanama izabrana su u blizini strojeva za piljenje, rezanje, odstranjivanje kore. Broj i vrsta uzoraka skupljenih u radnom okolišu pilana prikazan je u tablici 3, poglavlje 4.2.1. U svrhu određivanja koncentracije i vrste plijesni u zraku vanjskog okoliša pilana, uzorci zraka skupljeni su na udaljenosti od 300-500 m od tvorničkog kruga. Uzorkovanje je provedeno na isti način kao i u unutrašnjosti radnih prostorija pilana.

Tijekom uzorkovanja zraka i sedimenta prašine za određivanje spomenutih parametara, mjerena je **temperatura, vlažnost i brzina strujanja zraka** pomoću uređaja Kestrel® 4000 Pocket Weather Tracker (Nielsen-Kellerman Co, SAD).

### **Skupljanje uzoraka zraka i sedimentirane prašine**

Uzorci zraka za određivanje ukupne i respirabilne prašine i endotoksina skupljali su se tijekom 8 sati (vrijeme trajanja jedne radne smjene) u radnim prostorima pilana stacionarnim skupljačima zraka Casella (Bedford, UK) s kvarenim filterima (Whatman QM-A) promjera 25 mm, uz protok zraka od 2 L/min u sisaljci (EN ISO 10882-1:2001). Ovaj protok zraka odgovara intenzitetu disanja, a određen je hrvatskom normom nastalom prema prihvaćenoj međunarodnoj normi ISO 10882-1:2001 (Zdravlje i sigurnost pri zavarivanju i srodnim postupcima – Uzorkovanje lebdećih čestica i plinova u području disanja radnika) (161).

Uzorci sedimenta prašine za mjerenje koncentracije endotoksina skupljeni su s poda u blizini strojeva pomoću čiste četkice u čiste plastične vrećice i zamrznuti na -20 °C do analize.

### **Mjerenje koncentracije prašine u zraku**

Za određivanje masene koncentracije prašine gravimetrijskom metodom (Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, Zentralstelle für Unfallverhütung und Arbeitsmedizin, ZH 1/120.41) koristila se mikrovaga Mettler-Toledo MX-5 (Švicarska) koja ima mogućnost preciznog mjerenja i očitavanja vrijednosti do  $10^{-6}$  grama s mjernom nesigurnošću od  $10^{-5}$  grama. S obzirom na higroskopsnost materijala, filterima je i prije i nakon uzorkovanja ujednačen sadržaj vlage čuvanjem u eksikatoru tijekom 24 sata prije vaganja (161).

### **Mjerenje aktivnosti endotoksina**

Filteri za skupljanje zraka i usitnjeni uzorci sedimentirane prašine ekstrahirani su u 0,05% otopini Tween-20 u vodi pročišćenoj od endotoksina (*pyrogen-free LAL water*, Charles River Endosafe, USA), centrifugirani i zagrijavani 20 minuta na 75 °C. Aktivnost endotoksina mjerena je biološkom *end-point* LAL metodom (Limulus amebocitni lizat test) pomoću komercijalnog kita Endochrom (Charles River Endosafe, USA) (162, 163). Kao standard

upotrijebljen je endotoksin *Escherichiae coli* (Endosafe; CSE lot no. ET 84092). Optička gustoća uzoraka, standarda i slijepih proba (u duplikatu) očitana je u mikrotitarskoj pločici (*Pyrogen-free microtitre plates*, Greiner Labortechnik, GmbH, Germany) pri 405 nm na Personal Lab čitaču mikropločica (Iason, Graz, Austria) (162). Osjetljivost testa iznosila je 0,015 EU/mL. Vrijednosti endotoksina izražene su u endotoksinskim jedinicama po m<sup>3</sup> zraka (EU/m<sup>3</sup>) ili miligramu sedimentirane prašine (EU/mg).

### **Skupljanje uzoraka zraka i određivanje vrste i količine plijesni u zraku radnih prostora**

Plijesni su uzorkovane pomoću skupljača zraka Mas 100 Eco (Merck) s 400 perforacija na agar i malt agar (BBL) podlogu obogaćenu s 50 mg/mL streptomocina i 20.000 IU penicilina, pri protoku zraka od oko 100 L/min. Vrijeme skupljanja je iznosilo 30 s, što znači da je uzorkovano 50 L zraka.

Nakon skupljanja zraka za određivanje vrsta i koncentracije plijesni u pilanama podloge su inkubirane na 25±2 °C tijekom 4 do 7 dana. Razvijene kolonije plijesni nakon inkubacije brojane su u razmaku od 3, 5 i 7 dana. Koncentracija plijesni u zraku izražena je kao broj jedinica koje formiraju kolonije (engl. *Colony Forming Units*) po kubnom metru zraka (CFU/m<sup>3</sup>) (164).

Plijesni određene u zraku identificirane su na osnovi makroskopskih i mikroskopskih karakteristika po supkultivaciji na različitim podlogama (164).

### **Određivanje alergena Der p1**

Koncentracija alergena Der p1 mjerena je ELISA testom (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) s dvostrukim monoklonalnim antitjelima (mAb) (165). Monoklonalna antitijela (5H8 i 4C1) i standard alergena Der p 1 nabavljeni su od Indoor Biotechnologies Ltd (Cardiff, Engleska). Jačina boje mjerena je pomoću mikrotitarskog čitača (apsorpcija pri 450 nm) na uređaju PersonalLab (IASON, Graz, Austria). Koncentracija alergena izračunata je iz standardne krivulje. Svaki uzorak mjeran je u duplikatu. Donja granica mjerljivosti bila je 2 ng/mL (165, 166).

#### **3.3.2.2. Anamneza i fizikalni pregled**

Anamnestički podaci o dišnim i općim simptomima koji se povezuju s izloženošću organskoj prašini prikupljeni su od svih ispitanika modificiranim zdravstvenim upitnikom temeljenim na

upitniku „*Organic dusts questionnaire*“ (167). Ispitanici su upitani da li su ikad iskusili simptome rinitisa, suhog kašlja, kašlja s iskašljavanjem koji ne zadovoljava kriterij kroničnog bronhitisa, kroničnog bronhitisa, astme, te opće simptome, koji nisu bili povezani s akutnom respiratornom infekcijom. U **simptome rinitisa** uključeni su kihanje, svrbež nosa, iscjedak iz nosa te otežano disanje na nos. **Simptomi astme** definirani su kao zviždanje u prsima i/ili otežano disanje. **Kronični bronhitis** definiran je kao svakodnevni kašalj uz iskašljavanje tijekom najmanje tri mjeseca godišnje, tijekom dvije uzastopne godine. Opći simptomi uključivali su povišenu tjelesnu temperaturu i bolove u zglobovima.

Prema navici pušenja ispitanici su podijeljeni na nepušače, bivše pušače i aktivne pušače. Bivši pušači kategorizirani su kao nepušači ako su prestali pušiti najmanje godinu dana prije uključanja u istraživanje. S obzirom na mali broj bivših pušača u pilanama (ukupno 8 ispitanika u obje pilane) navika pušenja u statističkoj obradi (regresijski modeli) izražena je kao dihotomna varijabla, t.j. pušač ili nepušač, pri čemu su bivši pušači ubrojani u nepušače. U aktivnih pušača kumulativna izloženost duhanskom dimu izražena je kao pušački indeks (broj cigareta popušen na dan pomnožen s brojem godina pušenja).

U svih ispitanika učinjen je ciljani fizikalni pregled koji je uključivao auskultatorni pregled srca i pluća, pregled ždrijela i mjerenje krvnog tlaka. Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je iz visine i težine ispitanika prema ranije navedenoj formuli.

Upitnikom su prikupljeni i opći podaci o ispitanicima, uključujući dob i stupanj obrazovanja, te podaci o eventualnim kontraindikacijama za alergološko kožno testiranje i test bronhodilatatorom.

### **3.3.2.3. Spirometrija s bronhodilatatornim testom**

Spirometrija je učinjena na način i pomoću uređaja opisanih u prethodnom poglavlju 3.3.1.2. Bronhodilatatorni test proveo se na način da je ispitanik nakon učinjene početne spirometrije primio dva udaha (400 µg) aerosola salbutamola, te mu se nakon stanke od 20 minuta ponovo učinila spirometrija. Pozitivnim testom smatrao se porast vrijednosti FVC ili FEV<sub>1</sub> jednak ili veći od 0.2 L i jednak ili veći od 12% od početne vrijednosti (168).

### **3.3.2.4. Kožno testiranje metodom uboda (prick test)**

Alergološko kožno testiranje provelo se standardnom prick metodom (169) s komercijalnim pripravcima uobičajenih inhalacijskih alergena (mješavina peludi trava, breze, lijeske, peludi korova *Ambrosia elatior* i *Artemisia vulgaris*, grinja *Dermatophagoides pteronyssinus*,

*Dermatophagoides farinae* i *Lepidoglyphus destructor*, plijesni *Cladosporium herbarum* i *Alternaria alternata*, te alergeni mačke i psa) (Allergopharma, Njemačka). Pilanski radnici također su testirani alergenima plijesni *Aspergillus niger*, *Rhizopus niger* i *Penicillium notatum* (Allergopharma, Njemačka), te inhalacijskim alergenima drva koje su prerađivali. Radnici Pilane 1 testirani su alergenima bukve (*Fagus sylvatica*), jele (*Picea abies*) i hrasta (*Quercus robur*), a radnici Pilane 2 bukve, hrasta i jasena (*Fraxinus angustifolia*) (Imunološki zavod d.d., Zagreb). U testiranje je uključena i otopina histamina (10 mg/mL histamin hidroklorida) i komercijalna otopina pufera, kao kontrole pozitivne i negativne kožne reakcije. Kožna reakcija mjerila se nakon 20 minuta kao dva promjera urtike u milimetrima: najveći (D) i okomit na njega na polovici njegove dužine (d). Rezultati su izraženi kao srednji promjer urtike izračunat prema jednadžbi  $(D+d)/2$ . Pozitivnom reakcijom smatrala se razlika u srednjem promjeru urtike veća od 3 mm u odnosu na negativnu kontrolu (otopina pufera) u istog ispitanika.

#### **3.3.2.5. Mjerenje koncentracije ukupnih IgE protutijela u serumu**

Koncentracija ukupnih IgE protutijela u serumu venozne krvi izmjerila se ELISA metodom (IASON, Austrija) (170). Povišenim vrijednostima ukupnog IgE smatrala se koncentracije veće od 150 kIU/L.

#### **3.3.2.6. Uzorkovanje KI-a i mjerenje pH**

Uzorkovanje KI-a provedeno je na način opisan u poglavlju 3.3.1.3.

Za razliku od Dijela I istraživanja u kojem je pH mjereno neposredno nakon uzorkovanja, u ovom dijelu istraživanja (Dio II) uzorci su nakon uzorkovanja zamrznuti i čuvani na temperaturi od -20 °C do trenutka mjerenja (otprilike 8 mjeseci). Nakon vađenja iz ledenice, uzorci su ostavljeni u zatvorenoj čašici na sobnoj temperaturi da se otope, a potom su argonizirani u trajanju od 10 minuta (propuhivanje uzoraka argonom u staklenoj epruveti pri protoku od 350 mL/min). Kiselost uzoraka mjerena je na način opisan u prethodnom poglavlju 3.3.1.3.

### **3.3.3. Statističke metode**

Statistička analiza učinjena je pomoću programa Stata/SE 10.1 for Windows (StatCorp LP, TX, USA). Kao statistički značajna određena je razina značajnosti  $P < 0,05$ . Primijenjene su

metode univarijatne i multivarijatne statistike. Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilkovim testom, a homogenost varijanci modificiranim Levenovim testom te Breusch-Pagan/Cook-Weisbergovim testom u modelima analize varijance i modelima multiple linearne regresije.

U **Dijelu I** (validacija mjerenja pH KI-a) razlike između bazalnih pH vrijednosti i vrijednosti izmjerenih u određenim vremenskim razmacima od konzumacije cigarete, hrane i kave, kao i razlike vrijednosti pH KI-a između ponavljanih uzorkovanja KI-a unutar istog dana (unutar-dnevna ponovljivost) i unutar istog tjedna (unutar-tjedna ponovljivost), testirane su analizom varijance zavisnih uzoraka (*repeated-measures* ANOVA), s obzirom da su vrijednosti pH KI-a bile normalno distribuirane. Ukoliko je ANOVA model bio značajan, pojedinačne usporedbe testirane su Studentovim t-testom za zavisne uzorke uz Bonferronijevu korekciju. Usporedba pH vrijednosti u nepušača s vrijednostima u pušača izmjerenih prije i nakon pušenja cigarete, testirana je analizom varijance (ANOVA). S obzirom da je model bio značajan, pojedinačne usporedbe testirane su Studentovim t-testom uz Bonferronijevu korekciju. Spearmanovom korelacijom testirana je povezanost kiselosti KI-a s ITM-om. Rezultati za unutar-dnevnu i unutar-tjednu ponovljivost pH KI-a prikazani su i kao koeficijenti varijabilnosti (omjer standardne devijacije i aritmetičke sredine).

U **Dijelu II** (učinak izloženosti organskoj prašini na pH KI-a) mjereni **parametri radnog okoliša** uspoređeni su između dvije pilane Mann-Whitney U testom, s obzirom da su varijable bile nenormalno distribuirane. Razlike između tri skupine ispitanika (kontrolna, Pilana 1 i Pilana 2) s obzirom na **opće osobine ispitanika i njihove zdravstvene karakteristike** analizirane su metodama univarijatne, te potom multivarijatne statističke analize.

U okviru **univarijatne analize**, nezavisne kategorijske varijable (pušački status, stupanj obrazovanja, prevalencija pretilosti, očnih i dišnih simptoma, spirometrijskih vrijednosti nižih od očekivanih, pozitivnog bronhodilatatornog testa, respiratorno zdravih ispitanika, pozitivnog SPT i povišenog IgE) analizirane su Pearsonovim  $\chi^2$  testom ili Fisherovim testom ako su očekivane vrijednosti u jednoj ili više ćelija bile  $\leq 5$ . Zavisne kategorijske varijable (razlike u prevalenciji spirometrijskih vrijednosti nižih od očekivanih i pozitivnog bronhodilatatornog testa u pilanskih radnika na početku i na kraju promatranog radnog tjedna) analizirane su McNemarovim testom. Normalno distribuirane nezavisne kontinuirane varijable (visina, težina, broj dnevno konzumiranih cigareta, pušački staž, vrijednosti spirometrije) analizirane su analizom varijance, te *post-hoc* Tukey HSD testom u slučaju



značajnog ANOVA modela. Nenormalno distribuirane nezavisne kontinuirane varijable (dob, radni staž u drvnjoj industriji, pušački indeks, razlika vrijednosti spirometrije prije i poslije bronhodilatatornog testa, ITM, pH KI-a) analizirane su Kruskal-Wallisovom analizom varijance, te *post-hoc* Mann-Whitney U testom uz Bonferronijevu korekciju u slučaju značajnog ANOVA modela. Zavisne kontinuirane varijable respiratornih parametara u pilanskih radnika na početku i na kraju promatranog radnog tjedna analizirane su Studentovim t-testom za zavisne uzorke u slučaju normalno distribuiranih varijabli (vrijednosti spirometrije), te Wilcoxonovim testom ekvivalentnih parova u slučaju nenormalno distribuiranih varijabli (pH KI-a, razlika vrijednosti spirometrije prije i poslije bronhodilatatornog testa). Spearmanovom korelacijom testirana je povezanost kiselosti KI-a s ITM-om, te razina endotoksina u uzorcima zraka i sedimentirane prašine.

Od metoda **multivarijatne analize** primijenjeni su različiti modeli multiple linearne regresije. Prevalencije dišnih simptoma (rinitisa, suhog kašlja, astme i/ili kroničnog bronhitisa) analizirane su kao zavisne varijable u modelima logističke multiple regresije s dobi, pušačkim statusom, pozitivnim SPT i radnim mjestom (kontrola, Pilana 1 ili Pilana 2) kao prediktorima. Kašalj s iskašljavanjem (koji ne zadovoljava kriterij kroničnog bronhitisa) nije analiziran kao prediktor zbog njegove niske prevalencije u ispitivanih skupina. Spirometrijske vrijednosti izmjerene na početku radnog tjedna analizirane su kao zavisne varijable u modelu multiple linearne regresije s dobi, pušačkim statusom, prisutnošću periodičkog suhog kašlja, prisutnošću simptoma astme i/ili kroničnog bronhitisa, te radnim mjestom (kontrola, Pilana 1 ili Pilana 2) kao prediktorima. Prisutnost kašlja s iskašljavanjem nije uvršten kao prediktor zbog njegove niske prevalencije. Pozitivni SPT nije uvršten u prediktore zbog kolinearnosti s drugim prediktorima. U pilanskih radnika, promjena vrijednosti  $FEV_1$  tijekom bronhodilatatornog testa (izražena kao % od početne spirometrije) analizirana je, s obzirom na nenormalnu distribuciju, kao zavisna varijabla u modelu multiple medijane regresije s dobi, pušačkim statusom, simptomima astme, atopijskim statusom (SPT) i radnim mjestom u Pilani 1 ili Pilani 2 kao prediktorima. Vrijednosti pH KI-a analizirane su kao zavisne varijable multiplom medijanom regresijom s dobi, pušačkim statusom, prisutnošću periodičkog suhog kašlja, prisutnošću simptoma astme i/ili kroničnog bronhitisa,  $FEV_1$ , pozitivnog SPT i radnog mjesta (kontrola, Pilana 1 ili Pilana 2) kao prediktorima. ITM nije uvršten kao prediktor zbog jake kolinearnosti s drugim prediktorima. Medijana regresija je primijenjena zbog nenormalne distribucije vrijednosti kiselosti KI-a koje se nisu mogle normalizirati standardnim matematičkim transformacijama (primjerice logaritmiranjem, kvadriranjem i sl.).

## **4. REZULTATI**

### **4.1. DIO I - Validacija metode mjerenja pH KI-a**

#### **4.1.1. Učinci pušenja na kiselost KI-a**

Slika 8. prikazuje individualne i srednje vrijednosti pH KI-a u 15 zdravih pušača i 24 zdrava nepušača, pri čemu su za pušače prikazane bazalne vrijednosti pH KI-a (prvi jutarnji uzorak KI-a nakon najmanje desetosatnog odricanja od pušenja), te vrijednosti izmjerene 15, 30, 60 i 120 minuta nakon pušenja jedne cigarete. Bazalne vrijednosti pH KI-a u pušača bile su statistički značajno niže od vrijednosti pH u zdravih nepušača ( $7,00 \pm 0,50$  vs.  $7,65 \pm 0,32$ ,  $P=0,001$ ), ali su već 15 minuta nakon pušenja jedne cigarete porasle za oko polovicu logaritamske jedinice ( $7,50 \pm 0,46$ ) i ostale značajno povišene u odnosu na bazalne vrijednosti i 30 minuta ( $7,63 \pm 0,48$ ), 60 minuta ( $7,56 \pm 0,33$ ) i 120 minuta ( $7,63 \pm 0,45$ ) nakon pušenja. Vrijednosti pH KI-a nakon pušenja nisu se razlikovale od vrijednosti u nepušača.

#### **4.1.2. Utjecaj konzumacije hrane**

Slika 9. prikazuje individualne i srednje vrijednosti pH KI-a u 19 zdravih ispitanika nepušača prije i nakon konzumacije standardiziranog doručka. Nije nađena statistički značajna razlika između bazalnih vrijednosti pH KI-a dobivenih u jutro nakon cjelonoćnog gladovanja i vrijednosti dobivenih 30, 60 i 120 minuta nakon konzumacije hrane.

#### **4.1.3. Utjecaj konzumacije kave**

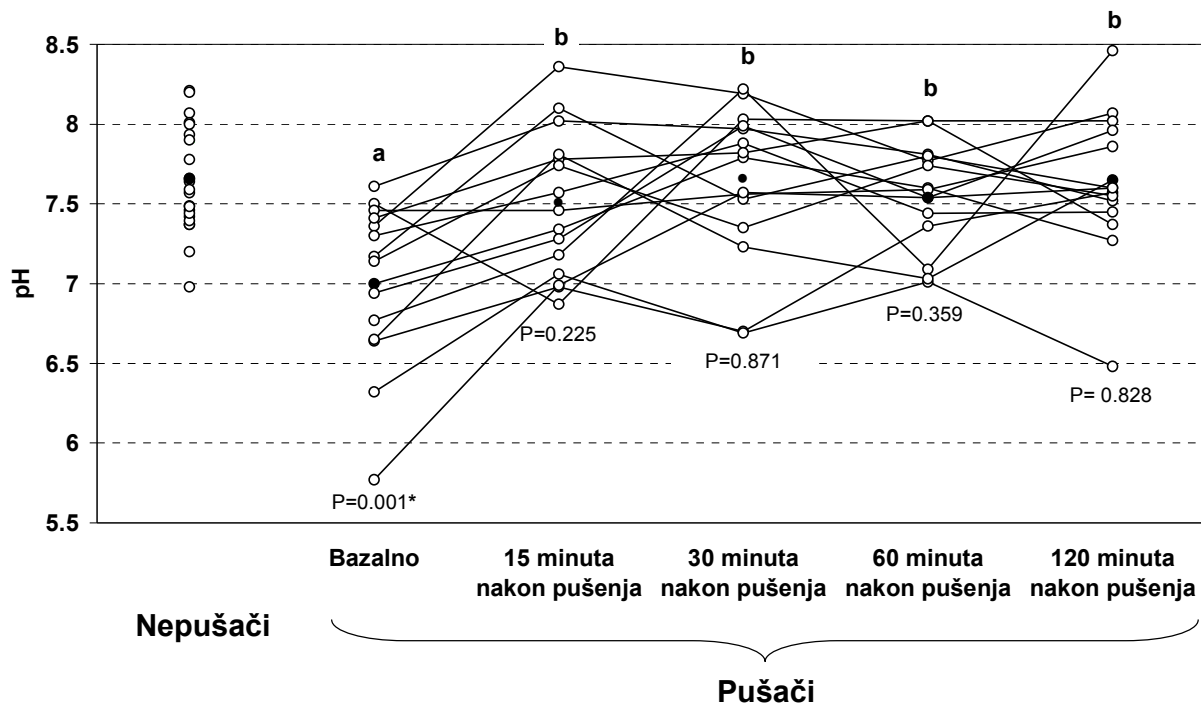
Slika 10. prikazuje individualne i srednje vrijednosti pH KI-a u 7 zdravih ispitanika nepušača prije i nakon konzumacije 150 mL espresso kave. Nisu nađene statistički značajne razlike između bazalnih vrijednosti pH KI-a dobivenih u jutro natašte i vrijednosti dobivenih 30 i 60 minuta nakon konzumacije kave.

#### **4.1.4. Unutar-dnevna i unutar-tjedna ponovljivost mjerenja pH KI-a**

Unutar-dnevna i unutar-tjedna ponovljivost mjerenja pH KI-a ispitivana je u 10 zdravih nepušača. Jedan ispitanik odustao je od sudjelovanja nakon prvog dana istraživanja, te su vrijednosti za unutar-tjednu ponovljivost analizirane na 9 ispitanika. Vrijednosti pH KI-a nisu

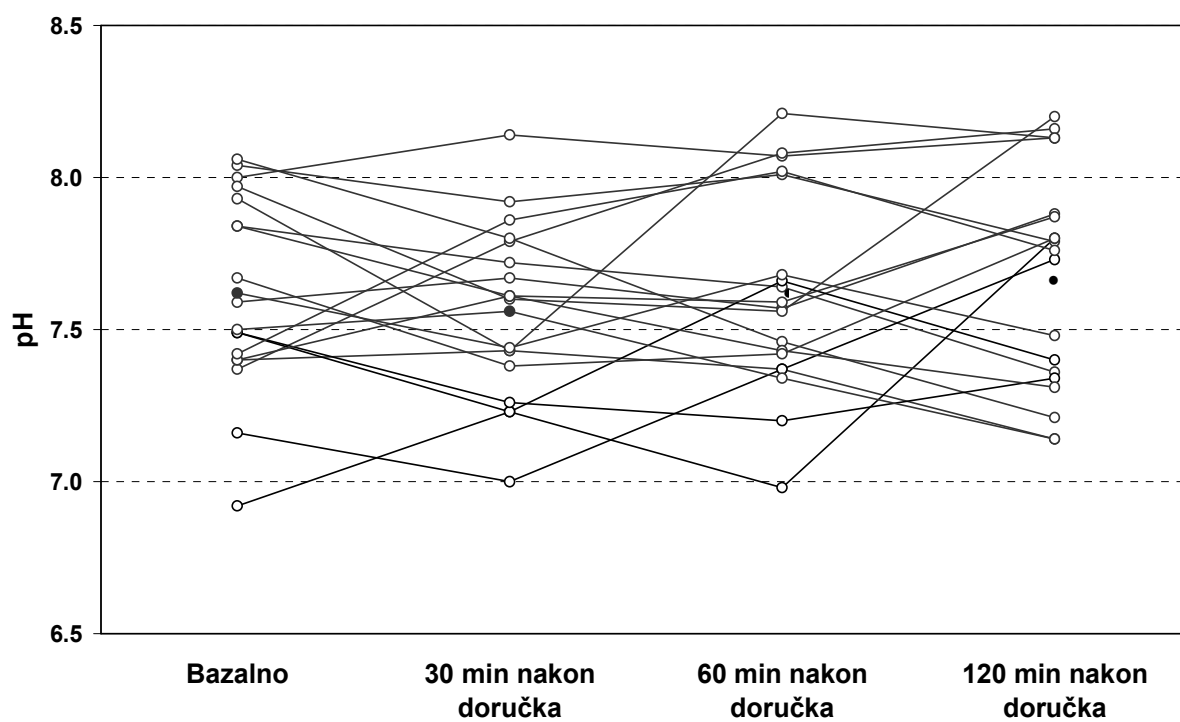
značajno varirale niti unutar jednog dana (slika 11.), niti unutar jednog tjedna (slika 12.). Koeficijenti unutar-dnevne varijabilnosti pH KI-a kretali su se u rasponu od 0,4% do 8,4% s medijanom vrijednošću od 3,7%, a koeficijenti unutar-tjedne varijabilnosti u rasponu od 0,5% do 6,8% s medijanom vrijednošću od 4,6%.

U ispitanika analiziran je i utjecaj tjelesne mase na kiselost KI-a. Medijan (raspon) ITM-a bio je 24,5 (18,7-41,7) u nepušača i 23,8 (19,6-28,3) u pušača, te se ove dvije skupine nisu razlikovale po stupnju uhranjenosti. Samo su četiri ispitanika, pušača, bila pretila s medijanom vrijednošću ITM-a od 31,8. Povezanost između ITM-a i bazalnih vrijednosti pH KI-a nije uočena, niti u nepušača ( $\rho=0.1282$ ,  $P=0.601$ ) niti u pušača ( $\rho=0.1376$ ,  $P=0.625$ ), a pH KI-a u pretilih ispitanika bio je sličan vrijednostima u ispitanika normalne tjelesne težine ( $7,62\pm 0,32$  vs.  $7,59\pm 0,33$ ).

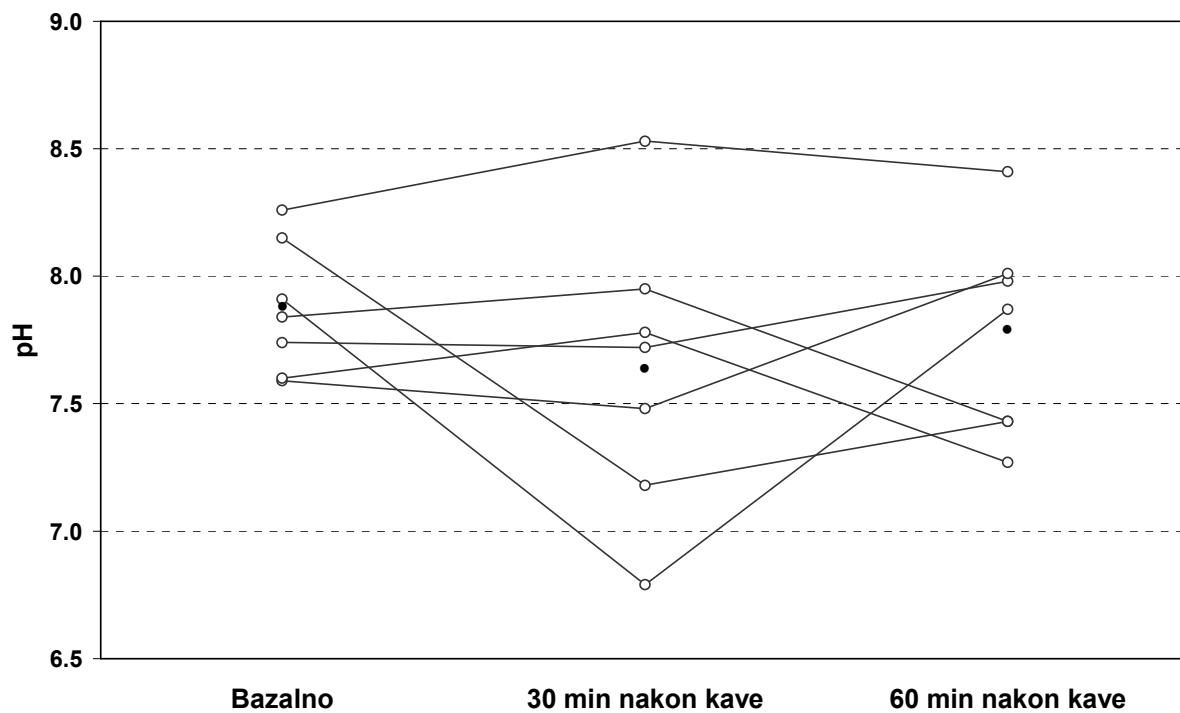


**Slika 8.** Vrijednosti pH KI-a u pušača i nepušača

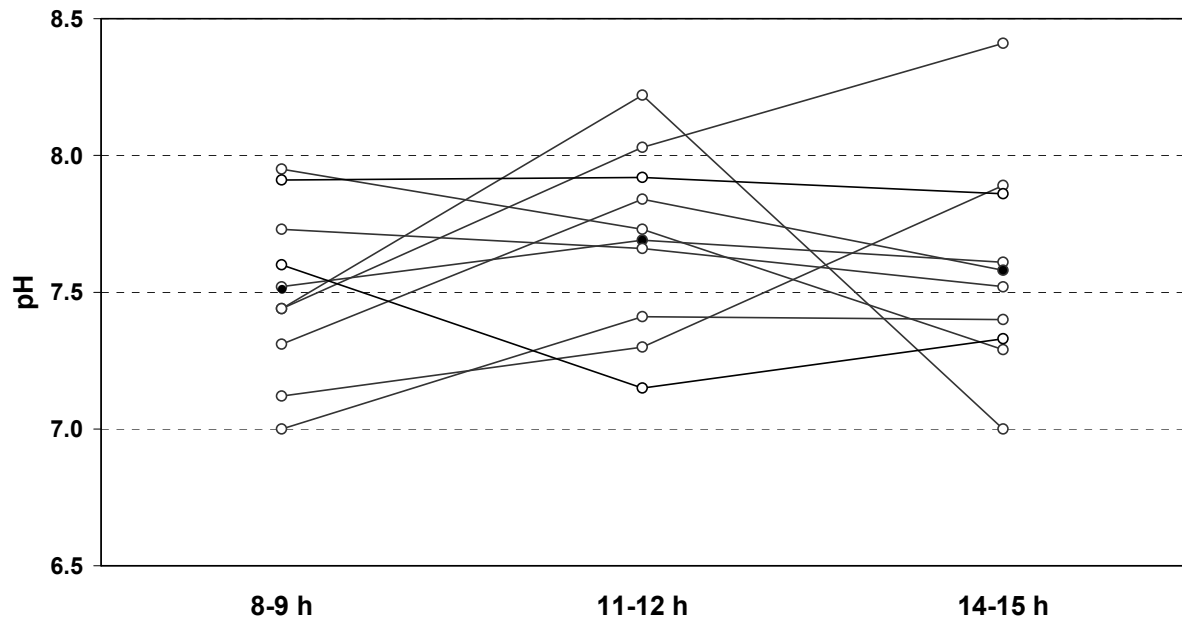
● Aritmetička sredina. Vrijednosti u pušača (15 ispitanika) izmjerene prije i nakon pušenja cigarete uspoređene su s vrijednostima u nepušača (24 ispitanika) (ANOVA,  $F=5,09$ ,  $P<0,001$ , *post-hoc* Studentov t-test uz Bonferronijevu korekciju). Prikazane su P vrijednosti, a značajna vrijednost ( $P<0,05$ ) označena je zvjezdicom. <sup>a,b</sup>Statistički značajne ( $P<0,05$ ) razlike između pH vrijednosti KI-a izmjerene u pušača prije i nakon pušenja cigarete (ANOVA za zavisne uzorke,  $F=8,58$ ,  $P<0,001$ , *post-hoc* Studentov t-test za zavisne uzorke uz Bonferronijevu korekciju).



**Slika 9.** Vrijednosti pH KI-a prije i nakon standardiziranog doručka u 19 zdravih nepušača  
 ● Aritmetička sredina. Statistički značajne razlike nisu nađene (ANOVA za zavisne uzorke,  $F=0,56$ ,  $P=0,644$ ).

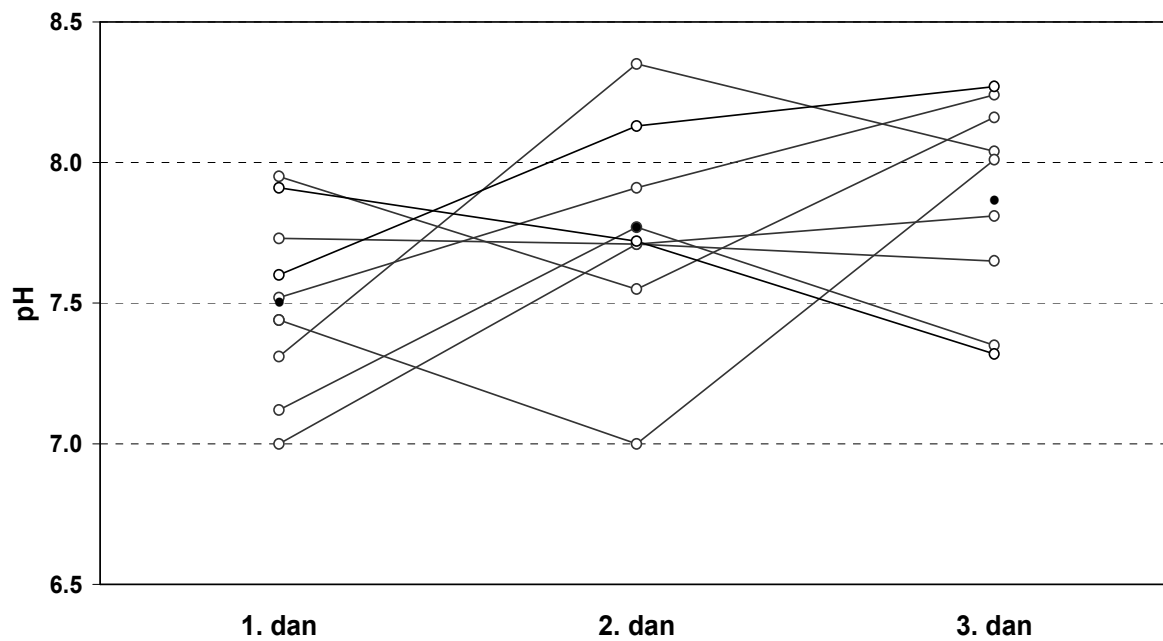


**Slika 10.** Vrijednosti pH KI-a prije i nakon konzumacije kave u sedam zdravih nepušača  
 ● Aritmetička sredina. Statistički značajne razlike nisu nađene (ANOVA za zavisne uzorke,  $F=0,73$ ,  $P=0,503$ ).



**Slika 11.** Unutar-dnevna ponovljivost mjerenja pH KI-a u deset zdravih nepušača

● Aritmetička sredina. Statistički značajne razlike nisu nađene (ANOVA za zavisne uzorke,  $F=0,84$ ,  $P=0,447$ ).



**Slika 12.** Unutar-tjedna ponovljivost mjerenja pH KI-a u devet zdravih nepušača

● Aritmetička sredina. Statistički značajne razlike nisu nađene (ANOVA za zavisne uzorke,  $F=2,56$ ,  $P=0,109$ ).



## 4.2. Dio II – učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav

### 4.2.1. Mjerenje parametara radnog okoliša

Temperatura zraka u obje pilane kretala se u rasponu od 17-31 °C s medijanom vrijednošću od 25 °C. Vlažnost zraka kretala se u rasponu od 41-60% s medijanom vrijednošću od 55%. Brzina strujanja zraka bila je u rasponu od 0-0,1 m/s. Tablica 3. prikazuje izmjerene vrijednosti ukupne zaprašenosti i njezine respirabilne frakcije, endotoksina, plijesni i alergena grinje *Dermatophagoides pteronissinus* (Der p 1) u Pilani 1 i Pilani 2. Statistički značajna razlika nađena je samo za koncentraciju spora plijesni u zraku koja je bila 2,5 puta viša u Pilani 1 u odnosu na Pilanu 2. Vrijednosti u obje pilane bile su daleko više od koncentracije plijesni izmjerene u zraku vanjskog okoliša pilana (oko 700 CFU/m<sup>3</sup>). Vrijednosti ukupne zaprašenosti, respirabilne frakcije prašine u zraku i endotoksina nisu se razlikovale među pilanama, a koncentracija alergena Der p 1 bila je ispod granice detekcije u obje pilane. Vrijednosti endotoksina izmjerene u uzorcima zraka i sedimentu prašine nisu korelirale (Spearmanov  $\rho=0,357$ ,  $P=0,385$ ).

Tablica 4. prikazuje vrste plijesni izolirane iz zraka pilana i vanjskog okoliša pilana. Znatne razlike u učestalosti pojedinih vrsta plijesni između pilana nije bilo, kao niti između pilana i vanjskog okoliša s izuzetkom vrste *Chrysonilia sitophila*. Ova vrsta bila je pri vrhu po učestalosti u pilanama, dok u vanjskom okolišu nije identificirana. Daleko najučestalija u pilanama bila je plijesan vrste *Penicillium* koja je nađena u svim uzorcima u obje pilane. Ostale plijesni visoke učestalosti u pilanama (identificirane u više od 40% uzoraka u obje pilane) bile su vrste *Cladosporium*, *Chrysonilia sitophila*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger* i *Paecilomyces*. U vanjskom okolišu najučestalije bile su vrste *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus niger* i *Epicoccum*.

Drvena prašina nastala tijekom radnog procesa usisavana je u obje pilane uređajima postavljenim iznad strojeva za odstranjivanje kore te piljenje i rezanje drvnog materijala. Prema podacima iz upitnika većina radnika iz obje pilane (57 od 61) nije nosila propisana sredstva za osobnu zaštitu u uvjetima izloženosti dišnim štetnostima (drvena prašina).

**Tablica 3.** Ukupna zprašenost s respirabilnom frakcijom, endotoksin, plijesni i alergen grinje *Dermatophagoides pteronissinus* u pilanama

	PILANA 1		PILANA 2	
	n	medijan (raspon)	n	medijan (raspon)
<b>Prašina</b> (mg/m <sup>3</sup> )				
ukupna	20	0,822 (0,089-5,15)	20	0,843 (0,449-1,75)
respirabilna	20	0,077 (0,015-0,596)	20	0,157 (0,071-0,302)
<b>Endotoksin</b>				
u zraku (EU/m <sup>3</sup> )	9	269 (148-618)	9	277 (157-672)
u sedimentu prašine (EU/mg)	15	501 (173-964)	11	275 (188-692)
<b>Plijesni</b> (CFU/m <sup>3</sup> )	30	8620 (820-14400)	30	3410 (860-8780)*
<b>Der p 1</b> (µg/g)	15	<0.1 µg/g	10	<0.1 µg/g

\*Značajna razlika između dvije pilane (P<0.05, Mann-Whitney U test). n – broj uzoraka; raspon – najniža do najviša vrijednost. Uzorci zraka prikupljeni su stacionarnim skupljačima. Der p 1 mjereno je u sedimentu prašine.

**Tablica 4.** Učestalost (%) pojedinih vrsta plijesni u unutrašnjim radnim prostorima pilana

	<b>Pilana 1</b>	<b>Pilana 2</b>	<b>Vanjski okoliš</b>
<i>Penicillium</i>	100	100	75
<i>Cladosporium</i>	73	76	90
<i>Chrysonilia sitophila</i>	68	56	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	50	71	25
<i>Aspergillus niger</i>	43	50	50
<i>Paecilomyces</i>	43	50	25
<i>Trichoderma</i>	21	26	-
<i>Rhizopus</i>	18	15	-
<i>Epicoccum</i>	20	7	75
<i>Aspergillus flavus</i>	11	7	-
<i>Mucor</i>	3	7	-
<i>Nigrospora</i>	4	2	-
<i>Fusarium</i>	-	7	-
<i>Acremonium</i>	-	-	25
<i>Alternaria</i>	-	-	25
Druge vrste*	21	14	-

Učestalost pojedinih vrsta plijesni izračunata je kao postotak uzoraka s pozitivnim nalazom određene plijesni u ukupnom broju uzoraka u pojedinoj pilani.

\*Druge vrste plijesni otkrivene u uzorcima s neznatnom učestalošću pojavljivanja: *Auerobasidium*, *A. clavatus*, *Chaetomium*, *Phoma*, *Ulocladium* i neidentificirane vrste.

#### 4.2.2. Opće osobine ispitanika

Osobine kontrolne i izložene skupine ispitanika prikazane su u tablici 5. Statistički značajne razlike između skupina uočene su za dob, stupanj obrazovanja i prebivanje u gradu ili selu. Radnici u Pilani 2 bili su za oko 10 godina mlađi od radnika u Pilani 1, te za oko 7 godina mlađi od kontrolnih ispitanika. U pilanskih radnika prevladavao je seoski način stanovanja (48 od 61 radnika izjavilo je da živi na selu), dok je u kontrolnih ispitanika prevladavao gradski način stanovanja (51 od 61 ispitanika izjavio je da živi u gradu). Svi kontrolni ispitanici imali su srednju, višu ili visoku stručnu spremu, te je stupanj obrazovanja u njih bio znatno viši nego u pilanskih radnika. Razlika je uočena i između radnika na dvije pilane. Naime, udio nekvalificarnih radnika ( $\leq 8$  godina školovanja) bio je gotovo četiri puta veći u Pilani 1 u odnosu na Pilanu 2.

Iako statistički značajne razlike nisu pronađene u intenzitetu i dužini konzumacije cigareta, pušački staž bio je dva puta duži u radnika na Pilani 1 u odnosu na radnike na Pilani 2 i kontrolne ispitanike, a pušački indeks u radnika na Pilani 1 bio je gotovo dva puta veći od pušačkog indeksa u radnika na Pilani 2, te gotovo četiri puta veći od onog u kontrolnih ispitanika.

Visina, tjelesna masa i ITM bili su slični u sve tri skupine ispitanika, kao i udio pretilih osoba koji je prosječno iznosio 11%. Usprkos razlici u životnoj dobi, radni staž u drvnoj industriji bio je sličan u radnika na obje pilane i prosječno je iznosio svega oko 3,5 godine s velikim rasponom: od 2 mjeseca do 26 godina rada. Većina ispitanika u pilanama bavila se izvan radnog vremena poljoprivrednim radovima na obiteljskim seoskim imanjima.

**Tablica 5.** Opće osobine pilanskih radnika i kontrolnih ispitanika

	Kontrolna skupina		Pilanski radnici		Razlike između skupina
	Pilana 1	Pilana 2	Pilana 1	Pilana 2	
<b>Broj ispitanika, n</b>	61	35	26	35	
<b>Dob (godine), aritmetička sredina ± standardna devijacija</b>	38±14 <sup>a</sup>	31±7 <sup>b</sup>	41±13 <sup>a</sup>	31±7 <sup>b</sup>	<b>P&lt;0,01</b>
<b>Navika pušenja cigareta, n (%)</b>					
<b>Nepušači</b>	27 (44)	12 (34)	8 (31)	12 (34)	
<b>Bivši pušači</b>	13 (21)		6 (23)	2 (6)	n.z.
<b>Pušači</b>	21 (43)		12 (46)	21 (60)	
<b>Broj cigareta na dan, medijan (IK raspon)</b>	15 (10-25)		20 (18-25)	15 (10-25)	n.z.
<b>Godine pušenja, medijan (IK raspon)</b>	12 (5-40)		23 (13-33)	12 (8-17)	n.z.
<b>Pušački indeks, medijan (IK raspon)</b>	125 (40-480)		476 (223-760)	250 (120-300)	n.z.
<b>Radni staž u drvnoj industriji (godine), medijan (IK raspon)</b>	-		3 (1-7)	4 (3-7)	n.z.
<b>Prebivalište u gradu/selu, n (%)</b>	51/10 (84/16)		5/21 (19/81)	8/27 (23/77)	<b>P&lt;0,001</b>
<b>Stupanj obrazovanja, n (%)</b>					
<b>NKV (≤8 godina školovanja)</b>	0		9 (35)	3 (9)	
<b>SSS (12 godina školovanja)</b>	38 (62)		17 (65)	32 (91)	<b>P&lt;0,001</b>
<b>VSS (≥15 godina školovanja)</b>	23 (38)		0	0	
<b>Visina (cm), aritmetička sredina ± standardna devijacija</b>	180±6		179±6	178±6	n.z.
<b>Težina (kg), aritmetička sredina ± standardna devijacija</b>	83±13		82±14	79±11	n.z.
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>), medijan (IK raspon)</b>	24,8 (23,1-28,1)		25,3 (22,2-29,3)	24,4 (22,3-26,2)	n.z.
<b>Pretili ispitanici (BMI≥ 30), n (%)</b>	8 (13)		3 (12)	2 (6)	n.z.

IK raspon – interkvartilni raspon (25. do 75. kvartil). <sup>a,b</sup>Statistički značajne (P<0,05) razlike između ispitivanih grupa, ANOVA s *post-hoc* Tukey HSD testom. Kategorijske varijable (pušački status, prebivalište u gradu ili selu, stupanj obrazovanja, pretilost) analizirane su Fisherovim testom. n.z. – nije statistički značajno.

### 4.2.3. Dišni i opći simptomi

Učestalost dišnih i općih simptoma u ispitanika prikazana je u tablici 6. Statistički značajna bila je samo razlika u prevalenciji nadražajnog suhog kašlja koji je bio tri puta učestaliji u radnika u Pilani 1 u odnosu na radnike u Pilani 2, te dva puta učestaliji u odnosu na kontrolne ispitanike. Opći simptomi bili su prisutni samo u jednog ispitanika, radnika u Pilani 2.

Povezanost prevalencije dišnih simptoma s radnom izloženošću analizirana je i uz kontrolu mogućeg utjecaja dobi, pušačkog statusa i atopijskog statusa u modelima logističke regresije (tablica 7.). **Simptomi rinitisa** nisu bili povezani s radnom izloženošću (rad u pilani), ali su značajno **pozitivno korelirali s prisutnošću** objektivnog pokazatelja atopije, t.j. **pozitivnim SPT-om**. Prevalencija **suhog kašlja pozitivno je korelirala s pušenjem cigareta, pozitivnim SPT-om, te s radnim mjestom u Pilani 1** u odnosu na neizloženu kontrolnu skupinu. Model s astmom i/ili kroničnim bronhitisom kao zavisnom varijablom nije dosegao statističku značajnost (Pseudo  $R^2=0,047$ ;  $P=0,363$ ), te nije prikazan.

**Tablica 6.** Prevalencija dišnih i općih simptoma u pilanskih radnika i kontrolnih ispitanika

	Kontrolna skupina	Pilanski radnici		Razlike između skupina
		Pilana 1	Pilana 2	
<b>Rinitis</b>	30 (49)	9 (35)	14 (40)	n.z.
<b>Suhi kašalj</b>	13 (21)	11 (42)	5 (14)	<b>P&lt;0,05</b>
<b>Kašalj s iskašljavanjem*</b>	4 (7)	1 (4)	5 (14)	n.z.
<b>Kronični bronhitis</b>	4 (7)	2 (8)	3 (9)	n.z.
<b>Astma</b>	10 (16)	4 (15)	1 (3)	n.z.
<b>Astma i/ili kronični bronhitis</b>	13 (21)	6 (23)	4 (11)	n.z.
<b>Opći simptomi<sup>†</sup></b>	0	0	1 (3)	n.z.

Rezultati su prikazani kao broj osoba (%). \*Koji ne zadovoljava kriterij kroničnog bronhitis. <sup>†</sup>Groznica i bolovi u zglobovima. Razlike između skupina analizirane su Pearsonovim  $\chi^2$  testom (rinitički simptomi, suhi kašalj) ili Fisherovim testom (kašalj s iskašljavanjem, astma, kronični bronhitis). n.z. – nije statistički značajno.

**Tablica 7.** Rezultati multiple logističke regresije s dišnim simptomima kao zavisnim varijablama

Zavisna varijabla	Prediktori	OI (95% IP)	P
Simptomi rinitisa	<i>Pozitivni SPT</i>	2,74 (1,22 – 6,17)	<b>0,015</b>
	Model: Pseudo R <sup>2</sup> =0,070; P=0,042		
Suhi kašalj	<i>Pušač</i>	3,52 (1,25 – 9,94)	<b>0,017</b>
	<i>Pozitivni SPT</i>	4,77 (1,69 – 13,5)	<b>0,003</b>
	<i>Radna izloženost</i>		
	Kontrola	(ref)	-
	Pilana 1	3,53 (1,15 – 10,9)	<b>0,028</b>
	Pilana 2	0,66 (0,20 – 2,24)	0,509
Model: Pseudo R <sup>2</sup> =0,151; P=0,001			

OI – omjer izgleda (*Odds Ratio*); 95% IP – 95% interval pouzdanosti (*95% Confidence Interval*). U analizu je uključeno ukupno 120 ispitanika, t.j. 24 radnika na Pilani 1, 35 radnika na Pilani 2, te 61 kontrolni ispitanik (dva od 26 radnika na Pilani 1 nemaju nalaz SPT). Kao prediktori u modele su uvršteni dob, pušački status, SPT, te radna izloženost. Prikazani su samo prediktori za koje je nađena statistički značajna ( $P < 0,05$ ) povezanost s određenim dišnim simptomom. Model s astmom/kroničnim bronhitisom kao zavisnom varijablom nije dosegao statističku značajnost, te nije prikazan.

#### 4.2.4. Plućna funkcija

Spirometrijske vrijednosti (FVC, FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>/FVC, protoci u malim dišnim putovima, izraženi kao postotak od očekivane vrijednosti prema CECA II) izmjerene u ponedjeljak, prije početka radne smjene, prikazane su u tablici 8. Rezultati univarijatne statističke analize pokazali su značajne razlike spirometrijskih vrijednosti između skupina. U radnika u Pilani 1 vrijednosti FVC bile su niže od vrijednosti u kontrolnoj skupini i od vrijednosti u radnika u Pilani 2. Vrijednosti FEV<sub>1</sub> nisu se razlikovale između kontrolne skupine i radnika u Pilani 1, ali su vrijednosti u radnika u Pilani 2 bile više i od onih zabilježenih u kontrolnih ispitanika (za oko 10%) i od onih u radnika na Pilani 1 (za oko 16%). Vrijednost omjera FEV<sub>1</sub>/FVC bio je u obje pilane za oko 15% viši od vrijednosti u kontrolnih ispitanika. Vrijednosti protoka u malim dišnim putevima (MEF<sub>50</sub>, MEF<sub>25</sub>, MEF<sub>25-75</sub>) bile su za 15% do 20% više u radnika na Pilani 2 u odnosu na kontrolne ispitanike i radnike na Pilani 1. Učestalost vrijednosti



spirometrije nižih od očekivane nije se značajno razlikovala među skupinama. Dužina radnog staža nije bila povezana sa spirometrijskim parametrima niti u jednoj pilani.

Rezultati multiple linearne regresije (tablica 9.) u kojima je kontroliran mogući utjecaj dobi, pušenja, plućnih simptoma (nadražajni suhi kašalj, simptomi astme i kroničnog bronhitisa), te atopijskog statusa (pozitivni SPT), većinom su potvrdili nalaz univarijatne analize. U odnosu na kontrolnu skupinu, rad na Pilani 2 bio je pozitivno povezan s vrijednostima FVC, FEV<sub>1</sub>, te osobito FEV<sub>1</sub>/FVC, dok je rad na Pilani 1 bio negativno povezan s vrijednostima FVC, a pozitivno povezan s omjerom FEV<sub>1</sub>/FVC. Osim zaposlenja u pilani, značajni prediktor za omjer FEV<sub>1</sub>/FVC bila je dob, koja je bila negativno povezana s navedenim spirometrijskim parametrima.

Za razliku od rezultata dobivenih univarijatnom analizom, nakon kontrole za mogući utjecaj dobi, pušenja, plućnih simptoma i atopijskog statusa, MEF<sub>50</sub>, MEF<sub>25</sub> i MEF<sub>25-75</sub> nisu bili povezani s radom u pilani, već su bili negativno povezani s dobi. Prisutnost simptoma astme ili kroničnog bronhitisa bila je povezana, i to negativno, samo s vrijednošću MEF<sub>25</sub>. Pušenje i nalaz pozitivnog SPT-a nije imao utjecaja na spirometrijske vrijednosti niti u jednom modelu.

U radnika u obje pilane vrijednosti spirometrije izmjerene u ponedjeljak nisu se razlikovale od vrijednosti izmjerenih u petak u istom radnom tjednu (slika 13.).

**Tablica 8.** Vrijednosti spirometrije u pilanskih radnika i kontrolnih ispitanika

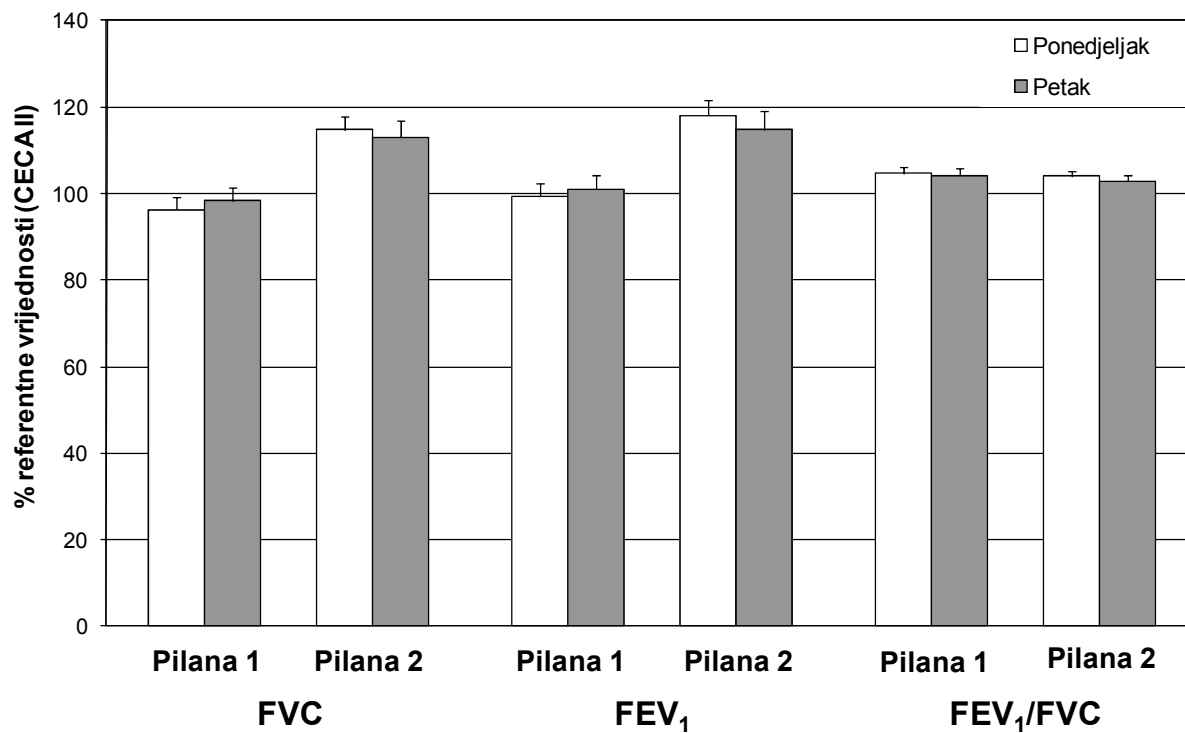
	Kontrolna skupina	Pilanski radnici	
		Pilana 1	Pilana 2
<b>FVC</b>	106,1±16,5 <sup>a</sup>	96,3±15,0 <sup>b</sup>	114,8±18,9 <sup>a</sup>
≤80% od očekivanog	2 (3)	3 (12)	0
<b>FEV<sub>1</sub></b>	105,9±17,2 <sup>a</sup>	99,4±16,0 <sup>a</sup>	118,1±22,1 <sup>b</sup>
≤80% od očekivanog	3 (5)	4 (15)	1 (3)
<b>FEV<sub>1</sub>/ FVC</b>	88,7±13,9 <sup>a</sup>	104,7±7,3 <sup>b</sup>	104,0±7,2 <sup>b</sup>
≤70%	3 (5)	0	0
<b>MEF<sub>50</sub></b>	97,3±29,1 <sup>a</sup>	92,7±27,1 <sup>a</sup>	116,7±36,1 <sup>b</sup>
≤60% od očekivanog	5 (8)	2 (8)	1 (3)
<b>MEF<sub>25</sub></b>	89,1±27,2 <sup>a</sup>	89,9±30,6 <sup>a</sup>	108,3±34,4 <sup>b</sup>
≤60% od očekivanog	8 (13)	5 (19)	2 (6)
<b>MEF<sub>25-75</sub></b>	97,0±27,1 <sup>a</sup>	92,4±26,7 <sup>a</sup>	115,2±35,0 <sup>b</sup>
≤60% od očekivanog	5 (8)	2 (8)	1 (3)

Vrijednosti spirometrije (izražene kao postotak od očekivane vrijednosti prema CECA II) prikazane su kao aritmetička sredina±standardna devijacija, a učestalost vrijednosti nižih od očekivanih kao n (%). <sup>a,b</sup>Statistički značajne ( $P<0,05$ ) razlike između ispitivanih skupina (ANOVA, *post-hoc* Tukey HSD test). Nije bilo statistički značajnih razlika u učestalosti vrijednosti spirometrije nižih od očekivane (Fisherov test).

**Tablica 9.** Rezultati multiple linearne regresije s vrijednostima spirometrije kao zavisnim varijablama

Zavisna varijabla	Prediktori	Koeficijent (95% IP)	$\beta$	P
<b>FVC</b>	<i>Radna izloženost</i>			
	Kontrola	(ref)	-	-
	Pilana 1	-0,090 (-0,169 – -0,011)	-0,219	<b>0,026</b>
	Pilana 2	0,085 (0,014 – 0,156)	0,235	<b>0,019</b>
Model: R <sup>2</sup> =0,074; P=0,028				
<b>FEV<sub>1</sub></b>	<i>Radna izloženost</i>			
	Kontrola	(ref)	-	-
	Pilana 1	-0,047 (-0,130 – 0,037)	-0,106	0,274
	Pilana 2	0,099 (0,023 – 0,174)	0,255	<b>0,011</b>
Model: R <sup>2</sup> =0,087; P=0,016				
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC</b>	<i>Dob</i>	-0,55 (-0,69 – -0,41)	-0.517	<b>&lt;0,001</b>
	<i>Radna izloženost</i>			
	Kontrola	(ref)	-	-
	Pilana 1	18.0 (13.5 – 22,6)	0.534	<b>&lt;0,001</b>
	Pilana 2	11.3 (7.2 – 15,4)	0.380	<b>&lt;0,001</b>
Model: R <sup>2</sup> =0,543; P<0,001				
<b>MEF<sub>50</sub></b>	<i>Dob</i>	-0,005 (-0,010 – 0,001)	-0,206	<b>0,032</b>
Model: R <sup>2</sup> =0,069; P=0,034				
<b>MEF<sub>25</sub></b>	<i>Dob</i>	-0,011 (-0,016 – -0,006)	-0,395	<b>&lt;0,001</b>
	<i>Astma/kronični bronhitis</i>	-0.166 (-0,320 – -0,012)	-0,181	<b>0,035</b>
Model: R <sup>2</sup> =0,190; P<0,001				
<b>MEF<sub>25-75</sub></b>	<i>Dob</i>	-0,005 (-0,010 – -0,001)	-0,219	<b>0,023</b>
Model: R <sup>2</sup> =0,073; P=0,029				

95% IP – 95% interval pouzdanosti (*95% Confidence Interval*);  $\beta$  – standardizirani koeficijent; ref – referentna kategorija. U analizu je uključeno ukupno 120 ispitanika, t.j. 24 radnika na Pilani 1, 35 radnika na Pilani 2, te 61 kontrolni ispitanik (dva od 26 radnika na Pilani 1 nemaju nalaz SPT-a). Vrijednosti spirometrije analizirane su kao postotak od očekivane vrijednosti (CECA II). Kao prediktori u modele su uvršteni dob, pušački status, prisutnost plućnih simptoma (suhi kašalj, astma i/ili kronični bronhitis), SPT te radna izloženost. Prikazani su samo prediktori za koje je nađena statistički značajna (P<0,05) povezanost s određenim spirometrijskim parametrom.



**Slika 13.** Spirometrijske vrijednosti izmjerene u pilanskih radnika na početku i kraju radnog tjedna

Nije bilo statistički značajnih razlika između vrijednosti dobivenih u ponedjeljak i u petak (Studentov t-test za zavisne uzorke).

#### 4.2.5. Bronhodilatatorni test u pilanskih radnika

Tablica 10. prikazuje učestalost pozitivnog bronhodilatatornog testa u pilanskih radnika na početku i kraju radnog tjedna. Udio radnika s pozitivnim bronhodilatatornim testom bio je viši u Pilani 1 u odnosu na Pilanu 2 i u ponedjeljak i u petak. Nije uočena znatna promjena prevalencije pozitivnog testa u petak u odnosu na ponedjeljak u istom radnom tjednu.

Vrijednosti FEV<sub>1</sub> nakon primjene bronhodilatatornog lijeka (salbutamola) u radnika u obje pilane prosječno su porasle za 120 mL (80-280 mL, medijan s interkvartilnim rasponom), t.j. za 2,8% od početne (bazalne) spirometrije i nisu se značajno razlikovale između pilana, niti između testa u ponedjeljak i u petak. Ovaj porast u respiratorno zdravih nepušača (bez simptoma astme i kroničnog bronhitisa, s normalnim vrijednostima FVC i FEV<sub>1</sub>) iznosio je 100 mL (40-280 mL), t.j. 2,1% od početne spirometrije.

Tablica 11. prikazuje rezultate multiple medijane regresije s **promjenom vrijednosti FEV<sub>1</sub> tijekom bronhodilatatornog testa** provedenog u ponedjeljak u radnika u obje pilane kao zavisnom varijablom, te **dobi, pušačkim statusom, simptomima astme, atopijskim statusom (SPT) i radnim mjestom u Pilani 1 ili Pilani 2 kao prediktorima**. Porast vrijednosti FEV<sub>1</sub> nakon primjene salbutamola bila je negativno povezana s dobi radnika, a pozitivno s prisutnošću simptoma astme i pozitivnim objektivnim pokazateljem atopije (pozitivan SPT). Pušački status nije imao utjecaja na promjenu FEV<sub>1</sub>, kao niti radno mjesto (Pilana 1 ili Pilana 2).

**Tablica 10.** Rezultati bronhodilatatornog testa u pilanskih radnika

	<b>Pilana 1</b> (n=26)	<b>Pilana 2</b> (n=31*)	<b>Pilana 1 vs. Pilana 2</b>
<b>Pozitivni bronhodilatatorni test:</b>			
u ponedjeljak	5 (19)	1 (3)	$\chi^2=3,85$ ; P=0,050
u petak	6 (23)	1 (3)	$\chi^2=5,15$ ; <b>P=0,039</b>
<b>ponedjeljak vs. petak</b>	n.z.	n.z.	

Rezultati su prikazani kao n (%). \*U Pilani 2 četiri radnika odbila su provođenje bronhodilatatornog testa. n.z. – nije statistički značajno. Razlike u učestalosti pozitivnog bronhodilatatornog testa između pilana testirane su Fisherovim  $\chi^2$  testom, a između ponedjeljka i petka u pojedinoj pilani McNemarovim testom.

**Tablica 11.** Rezultati multiple medijane regresije s promjenama vrijednostima FEV1 tijekom bronhodilatatornog testa kao zavisnom varijablom

	<b>Koeficijent (95% IP)</b>	<b>P</b>
Dob	-0,17 (-0,22 – -0,12)	<0,001
Astma	7,16 (5,44 – 8,88)	<0,001
Pozitivni SPT	2,41 (1,24 – 3,59)	<0,001
Pseudo R <sup>2</sup>	0,120	

95% IP – 95% interval pouzdanosti (*95% Confidence Interval*). U analizu je uključeno 55 pilanskih radnika, t.j. 24 radnika u Pilani 1 (dva od 26 radnika u Pilani 1 nemaju nalaz SPT) i 31 radnik u Pilani 2 (četiri od 35 radnika u Pilani 2 odbila su provođenje bronhodilatatornog testa). Analizirana je promjena FEV<sub>1</sub> vrijednosti izražena kao % od početne (bazalne) spirometrije. Prikazani su samo prediktori za koje je nađena statistički značajna (P<0,05) povezanost sa zavisnom varijablom.

#### 4.2.6. pH KI-a

Tablica 12. prikazuje vrijednosti pH KI-a uzoraka skupljenih u pilanskih radnika u ponedjeljak i u petak, te jednokratno u kontrolnih ispitanika. Rezultati univarijatne statističke analize pokazali su kako se vrijednosti pH KI-a uzorkovanog u ponedjeljak nisu razlikovale između ispitivanih skupina. Pri sljedećem uzorkovanju KI-a u petak, nakon 4-dnevne radne izloženosti, u radnika u Pilani 1 uočen je pad vrijednosti pH KI-a za 0,39 logaritamskih jedinica u odnosu na vrijednosti izmjerene u uzorcima skupljenim u ponedjeljak prije početka radne smjene. Vrijednosti pH KI-a uzoraka skupljenih u petak bile su u radnika u Pilani 1 značajno niže i od vrijednosti u kontrolnih ispitanika i od vrijednosti u radnika u Pilani 2. U radnika na Pilani 2, naime, nije uočena promjena pH KI-a tijekom radnog tjedna.

Povezanost kiselosti KI-a s radnom izloženosti dišnim štetnostima u pilani analizirana je i multiplom medijanom regresijom u kojoj je kontroliran mogući utjecaj dobi, pušenja, plućnih simptoma (suhi kašalj, astma, kronični bronhitis), plućne funkcije ( $FEV_1$ ) i atopijskog statusa (pozitivni SPT) (tablica 13). Vrijednosti pH KI-a uzorkovanog u ponedjeljak nisu bile povezane niti s jednim ispitivanim prediktorom, uključujući i radnu izloženost (rad u pilani). Vrijednosti pH KI-a uzorkovanog u petak, međutim, bile su negativno povezane s radom na Pilani 1 u odnosu na kontrolnu skupinu, čime je potvrđen nalaz univarijatne statističke analize.

U pilanskih radnika nije nađena povezanost pH KI-a s promjenom vrijednosti  $FEV_1$  tijekom bronhodilatatornog testa, niti u ponedjeljak (Spearmanov  $\rho=0,226$ ,  $P=0,092$ ) niti u petak (Spearmanov  $\rho=0,146$ ,  $P=0,280$ ). Slični su rezultati dobiveni i kada je analiza provedena za svaku pilanu zasebno.

Nije nađena povezanost pH KI-a s radnim stažem niti u jednoj pilani (Spearmanov  $\rho=0,066$ ,  $P=0,750$  za Pilanu 1, Spearmanov  $\rho= -0,024$ ,  $P=0,890$  za Pilanu 2).

Kiselost KI-a nije korelirala s ITM-om (Spearmanov  $\rho= -0,11$ ,  $P=0,306$ ), niti se razlikovala između pretelih ispitanika i ispitanika s normalnom tjelesnom masom (7,99 vs. 8,02,  $z=1,12$ ,  $P=0,264$ ).

**Tablica 12.** Vrijednosti pH KI-a u pilanskih radnika i kontrolnih ispitanika

	Pilana 1		Pilana 2		Kontrolna skupina
	ponedjeljak	petak	ponedjeljak	petak	
<b>Svi ispitanici</b>	n=26		n=35		n=32
	7,88 (7,57-8,03)	7,49 (7,34 - 7,81) <sup>a</sup>	7,96 (7,72- 8,09)	7,92 (7,75- 8,09) <sup>b</sup>	8.01 (7,78-8,13) <sup>b</sup>
<b>ponedjeljak vs. petak</b>	z=2,74, P=0,006		z= 0,19, P=0.851		
<b>Respiratorno zdravi nepušači*</b>	n=9		n=14		n=16
	7.99 (7.57-8.03)	7.50 (7.34-7.74)	7.90 (7.76-8.09)	7.99 (7.76-8.19)	7.82 (7.68-8.10)
<b>ponedjeljak vs. petak</b>	z=2,13, P=0.033		z= -0,28, P=0,778		

Vrijednosti pH KI-a prikazane su kao medijan s interkvartilnim rasponom (25. do 75. kvartil).<sup>a,b</sup>Statistički značajne razlike u vrijednostima pH KI-a izmjerenih u petak u pilanskih radnika, te u kontrolne skupine (Kruskal Wallisova ANOVA, *post-hoc* Mann-Whitney U test). Razlike između ponedjeljka i petka u pojedinoj pilani testirane su Wilcoxonovim testom ekvivalentnih parova. \*Nepušači bez simptoma astme i kroničnog bronhitisa s normalnim vrijednostima FVC i FEV<sub>1</sub>.



**Tablica 13.** Rezultati multiple medijane regresije s vrijednostima kiselosti KI-a kao zavisnom varijablom

	pH KI-a - ponedjeljak		pH KI-a - petak	
	Koeficijent (95% IP)	P	Koeficijent (95% IP)	P
<i>Dob</i>	-0,001 (-0,008 – 0,006)	0,705	-0,001 (-0,009 – 0,009)	0,996
<i>Pušač</i>	0,034 (-0,150 – 0,219)	0,712	-0,023 (-0,252 – 0,206)	0,842
<i>Plućni simptomi</i>				
Suhi kašalj	-0,027 (-0,232 – 0,178)	0,792	-0,037 (-0,295 – 0,221)	0,776
Astma/kronični bronhitis	-0,105 (-0,319 – 0,109)	0,334	0,084 (-0,191 – 0,359)	0,545
<i>FEV<sub>1</sub></i>	-0,001 (-0,005 – 0,003)	0,597	-0,002 (-0,007 – 0,004)	0,585
<i>Pozitivni SPT</i>	-0,157 (-0,347 – 0,033)	0,104	-0,061 (-0,297 – 0,176)	0,611
<i>Radna izloženost</i>				
Kontrola	(ref)	-	(ref)	-
Pilana 1	-0,200 (-0,426 – 0,026)	0,081	-0,518 (-0,809 – -0,226)	<b>0,001</b>
Pilana 2	0,019 (-0,187 – 0,224)	0,857	-0,039 (-0,294 – 0,215)	0,759
Pseudo R <sup>2</sup>	0,065		0,184	

95% IP – 95% interval pouzdanosti (*95% Confidence Interval*); ref – referentna kategorija. U analizu je uključen ukupno 91 ispitanik, t.j. 24 radnika na Pilani 1, 35 radnika na Pilani 2, te 32 kontrolna ispitanika (dva od 26 radnika na Pilani 1 nemaju nalaz SPT).

#### 4.2.7. Objektivni pokazatelji atopije

U tablici 14. prikazan je nalaz objektivnih pokazatelja atopije – ukupnih serumskih IgE protutijela i SPT-a na standardne inhalacijske alergene u pilanskih radnika i u kontrolnoj skupini. S obzirom na mali broj ispitanika s pozitivnim SPT-om na pojedine inhalacijske alergene, rezultati za radnike u Pilani 1 i 2 u drugom dijelu tablice prikazani su sumarno. Koncentracija ukupnih serumskih IgE protutijela bila je niža u radnika na Pilani 1 u usporedbi s kontrolnim ispitanicima, no učestalost povišenih vrijednosti IgE protutijela nije se razlikovala između skupina ( $\chi^2=3,00$ ,  $P=0,223$ ). Učestalost pozitivnog SPT-a u ispitivanim skupinama također je bila slična ( $\chi^2=2.84$ ,  $P=0.242$ ), ali je uočena značajna razlika u prevalenciji pozitivnih kožnih reakcija na pojedine alergene. U kontrolnoj skupini ispitanika zabilježena je veća učestalost pozitivne reakcije na alergene trava, breze, lijeske i pelinolistnog limundžika (*Ambrosia elator*) (tablica 14). Pilanski radnici nisu imali pozitivne kožne reakcije na ispitivane profesionalne alergene hrasta, bukve, jele i jasena. Pozitivan SPT na plijesni uočen je u samo jednog pilanskog radnika, zaposlenika Pilane 1, koji je bio senzibiliziran na *Rhizopus niger*.

**Tablica 14.** Učestalost pozitivnih objektivnih pokazatelja atopije u kontrolnoj i izloženoj skupini ispitanika

	Kontrolna skupina	Pilana 1	Pilana 2
<b>Ukupni serumski IgE</b> (kIU/L), medijan (IK raspon) †	47,6 (11,8-192,5) <sup>a</sup>	11,1 (3,7-56,1) <sup>b</sup>	40,1 (11,7-84,1) <sup>ab</sup>
<b>Povišeni IgE</b> , n (%) ††	18 (31)	4 (17)	6 (17)
<b>Pozitivni SPT</b> , n (%) §	28 (46)	9 (38)	10 (29)
Standardni inhalacijski alergeni, n (%)	Kontrolna skupina	PILANA 1 + PILANA 2	
<b>Mješavina peludi trava</b>	15 (25)	3 (5)*	
<b>Drveće</b>			
<b>Breza</b> ( <i>Betula pendula</i> )	10 (16)	3 (5)*	
<b>Lijeska</b> ( <i>Corylus avellana</i> )	10 (16)	3 (5)*	
<b>Korovi</b>			
<b>Pelinolistni limundžik</b> ( <i>Ambrosia elatior</i> )	11 (18)	2 (3)*	
<b>Pelin</b> ( <i>Artemisia vulgaris</i> )	8 (13)	7 (12)	
<b>Grinje</b>			
<b>Europska grinja</b> ( <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> )	9 (15)	10 (16)	
<b>Američka grinja</b> ( <i>Dermatophagoides farinae</i> )	9 (15)	8 (13)	
<b>Skladišne grinje</b> ( <i>Lepidoglyphus destructor</i> )	4 (7)	10 (16)	
<b>Plijesni</b>			
<b><i>Cladosporium herbarum</i></b>	1 (2)	0	
<b><i>Alternaria alternata</i></b>	1 (2)	0	
<b>Životinje</b>			
<b>Dlaka mačke</b>	7 (12)	1 (2)	
<b>Dlaka psa</b>	3 (5)	0	

IK raspon – interkvartilni raspon (25. do 75. kvartil). †Dva kontrolna ispitanika i dva radnika na Pilani 1 odbili su dati uzorak venozne krvi za mjerenje koncentracije ukupnih serumskih IgE antitijela. ††Ukupni IgE ≥ 150 kIU/L. §Pozitivan kožni ubodni test na najmanje jedan od 12 uobičajenih inhalacijskih alergena. <sup>a,b</sup>Statistički značajne razlike između skupina (Kruskal Wallisova ANOVA, *post-hoc* Mann-Whitney U test s Bonferronijevom korekcijom). \*Statistički značajna razlika u učestalosti pozitivnog SPT-a na određenu vrstu inhalacijskog alergena između pilanskih radnika i kontrolne skupine (Fisherov test, P < 0,05). Latinska imena alergena navedena su u zagradi pokraj hrvatskog naziva.

## **5. RASPRAVA**

### **5.1. Dio I – validacija metode mjerenja pH KI-a**

Izvešće Radne skupine ATS/ERS vezano uz kondenzat izdaha (34) objavilo je glavne metodološke smjernice vezane uz uzorkovanje kondenzata izdaha te određivanje i analizu bioloških pokazatelja od interesa. Na temelju dostupnih podataka u to vrijeme, preporuke vezane za uzimanje hrane i pića prije uzorkovanja KI-a općenite su u smislu odricanja od određenih pića i jela za koje se pretpostavlja da bi mogli imati utjecaja na proučavane biološke pokazatelje u KI-u. Radna skupina ATS/ERS preporučila je, stoga, daljnja istraživanja o mogućim učincima hrane i pića na biološke pokazatelje koji se određuju u KI-u. U objavljenim istraživanjima koja su proučavala promjene pH KI-a u različitim upalnim bolestima dišnog sustava, ispitanicima je većinom savjetovano da ne puše i ne konzumiraju hranu i piće jedan do dva sata prije uzorkovanja KI-a (34, 57, 72, 81, 122). U određenim vrstama istraživanja, međutim, često je teško, čak i neizvedivo, postaviti ovakve zahtjeve u protokolu. Primjer su terenska istraživanja na području medicine rada u kojima nije za očekivati da će se radnici, pogotovo smjenski, moći i htjeti pridržavati navedenih uputa (111, 171). U ovakvim istraživanjima postavlja se pitanje do koje mjere pušenje i konzumacija hrane i pića mogu utjecati na interpretaciju rezultata koji se odnose na kiselost KI-a.

#### **5.1.1. Utjecaj pušenja cigareta na pH KI-a**

Rezultati ovog istraživanja upućuju na postojanje akutnog i kroničnog učinka pušenja cigareta na kiselost KI-a, pri čemu su ovi učinci po smjeru suprotni.

Kronični učinak pušenja očitovao se nižim bazalnim vrijednostima pH KI-a respiratorno zdravih pušača nakon cjelonoćnog odricanja od pušenja u odnosu na vrijednosti dobivene u zdravih nepušača. Ovaj nalaz u skladu je s do sada objavljenim istraživanjima (110-115) i moguće ga je objasniti proupalnim učincima duhanskog dima (116). Moraju se, međutim, uzeti u obzir i drugi mogući mehanizmi, kao što je to povratni učinak odricanja od pušenja (engl. *rebound effect*), koji je uočen, primjerice, za koncentraciju kortizola u krvi pušača (172, 173). Opisano je da je koncentracija kortizola u plazmi aktivnih pušača viša od one u plazmi nepušača i da pušenje pojačava izlučivanje kortizola (173). Već tijekom prvog dana odricanja od pušenja

uočen je nagli pad kortizola u krvi za koji se smatra da je posljedica povratnog učinka, t.j. inercije u mehanizmu povratne sprege koji u pušača sprječava pretjeranu proizvodnju kortizola u organizmu (173).

Ovdje opisani rezultati, nadalje, upućuju na postojanje akutnog učinka aktivnog izlaganja duhanskom dimu na pH KI-a. Već 15 minuta nakon konzumacije jedne cigarete, pH KI-a porastao je u prosjeku za 0,58 logaritamskih jedinica u odnosu na bazalne vrijednosti (nakon cjelonoćnog odricanja od pušenja), izjednačujući se s vrijednostima izmjerenim u zdravih nepušača. Ovaj učinak trajao je kroz čitavo dvosatno razdoblje praćenja. Vrlo sličan akutni učinak aktivnog izlaganja duhanskom dimu na pH KI-a opisali su i Koczulla i sur. (113). U devet respiratorno zdravih dobrovoljaca pušača pH KI-a je tijekom 35 minuta nakon pušenja jedne cigarete porastao, iako ne statistički značajno, za 0,6 logaritamskih jedinica u odnosu na vrijednosti prije pušenja (od 7,18 na 7,78). Slična reakcija na respiratorne štetnosti zabilježena je i u istraživanju u kojem je proučavan utjecaj dimova zavarivanja na pH KI-a u 14 radnika. Tijekom jedne radne smjene zabilježen je trend porasta vrijednosti pH KI-a za prosječno 0,25 logaritamskih jedinica (171). Niti u ovom istraživanju porast vrijednosti pH KI-a nije dosegao statističku značajnost, vjerojatno uslijed malog broja ispitanika.

Nasuprot ovim rezultatima, objavljeno je i istraživanje u kojem nisu uočeni akutni učinci pušenja na kiselost KI-a (114). U istraživanju Papaioannou i sur. (114) u 10 zdravih pušača nisu nađene razlike između bazalnih vrijednosti pH KI-a (prije pušenja cigareta) i vrijednosti pH KI-a izmjerenih 30, 90 i 180 minuta nakon pušenja dvije cigarete. Važno je, međutim, napomenuti da autori nisu našli razlike niti u vrijednostima 8-izoprostana, iako je porast razine spomenutog pokazatelja oksidativnog stresa uočen u sličnom istraživanju (174). Moguće objašnjenje za ove proturječne rezultate može biti niža kumulativna izloženost duhanskom dimu u istraživanju Papaioannou i sur. (114) u usporedbi s druga dva navedena istraživanja (113, 115). U istraživanju Papaioannou i sur. srednja vrijednost pušačkog indeksa iznosila je 324 (raspon 200-400), dok je u istraživanju Koczulle i sur. ona iznosila  $438 \pm 370$ , te u istraživanju opisanom u ovoj Disertaciji 300, s rasponom od 80 do 1200, pri čemu je u 4 od 15 ispitanika pušački indeks iznosio više od 400. Naime, opisano je da je kumulativna doza aktivne izloženosti duhanskom dimu negativno povezana s pH KI-a (113).

Blagu alkalizaciju kondenzata izdaha neposredno nakon pušenja cigarete teško je objasniti, a mogla bi biti povezana s imunološkim i neimunološkim mehanizmima. Provedena

istraživanja na relativno malom broju respiratorno zdravih ispitanika pokazala su pad koncentracije IL-1 $\beta$ , porast koncentracije vodikova peroksida, 8-izoprostana i dušičnog oksida, te značajne razlike u proteinskom sastavu KI-a (174-178) nakon akutnog aktivnog izlaganja duhanskom dimu, što posredno može utjecati na kiselost KI-a. Moglo bi se očekivati da akutno aktivno izlaganje duhanskom dimu dovodi do pada pH KI-a uslijed upalnog odgovora u dišnim putovima, a moguće i zbog blago kiselog pH duhanskog dima (119). Naime, iako pH vodenog ekstrakta duhanskog dima varira od blago kiselog (5,8) do blago alkalnog (7,5), cigaretni dim je uglavnom blago kiseo (pH 5,8-6,3) nasuprot puno alkalnijem dimu cigara (119). Nadalje, smatra se da amonijak, glavni regulator pH duhanskog dima koji nastaje iz aminokiselina, bjelančevina i anorganskih nitrata u duhanu (179), a i dodaje se cigaretama u tijeku proizvodnje radi povećanja iskoristivosti nikotina u organizmu (185), zajedno s visokim puferskim kapacitetom respiratornog epitela sprječava zakiseljavanje tekućine koja oblaže respiratorni epitel (ALF) (179).

Sljedeći mogući čimbenik, nevezan za imunološke mehanizme, mogla bi biti temperatura duhanskog dima (113). Pretpostavlja se kako bi cigaretni dim mogao dovesti do porasta temperature sluznice donjih dijelova dišnih putova, te posljedično promijeniti konstantu disocijacije glavnih puferskih sustava u tekućini koja oblaže dišni epitel, naročito NH $_4^+$  i bikarbonatnog puferskog sustava. Treba istaknuti, međutim, da je ovaj mehanizam, ukoliko je opće prisutan, izrazito kratkotrajan, te se ne očekuje da ima znatnu ulogu u promjenama pH KI-a tijekom dva sata od udisanja duhanskog dima (113).

Imunološki učinci izlaganja duhanskom dimu vrlo su složeni i čini se da uključuju i proupalne i imunosupresivne procese (181, 182). Poznato je da određeni sastojci duhanskog dima kao što su to nikotin i katran imaju imunosupresivni učinak (117, 118). Primjer akutnog imunosupresivnog učinka duhanskog dima uočen unutar tri sata od akutne izloženosti je smanjeni broj upalnih stanica u perifernoj krvi i induciranom sputumu pušača (181,182), inhibicija proliferacije perifernih krvnih stanica i porast koncentracije kortikosterona u štakora izloženih nikotinu (116), te inhibicija stvaranja upalnih citokina u stanicama bronhalnog epitela izloženih duhanskom dimu u pokusima *in vitro* (117). Pokazano je, naime, da nikotin smanjuje stvaranje IL-6, IL-12 i TNF $\alpha$  u alveolarnim makrofazima eksperimentalno zaraženim *Legionellom pneumophiliom* (183), a izlaganje ljudskih mononuklearnih leukocita iz periferne krvi ekstraktima cigaretnog dima dovelo je do smanjenja proizvodnje IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$  (184). U skladu s ovim otkrićima su i podaci koji pokazuju značajan pad koncentracije IL-1 $\beta$  u KI-u 30

minuta nakon popuštene cigarete u zdravih pušača (175). Upitno je, dakako, da li spomenuti mehanizmi mogu dovesti do pada kiselosti KI-a već 15 minuta nakon pušenja cigarete.

Stupanj razrjeđenja KI-a prije i nakon pušenja cigarete također bi možda mogao imati ulogu u opisanim akutnim učincima pušenja na pH KI-a. Rezultati objavljenih istraživanja ne upućuju da stupanj razrjeđenja KI-a bitno utječe na njegovu kiselost (94, 60), no, kao što je već navedeno u Uvodu ove Disertacije, metode mjerenja razrjeđenja KI-a nisu još dovoljno validirane (82-84, 94-97). U do sada provedenim istraživanjima akutnih učinaka pušenja cigareta na kiselost KI-a stupanj razrjeđenja KI-a nije procjenjivan (113, 114). Koczulla i sur. (113) uočili su, međutim, da se provodljivost uzoraka KI-a povećala neposredno nakon pušenja, a pokazano je da je provodljivost KI-a povezana sa stupnjem njegovog razrjeđenja (82). Također je poznato da je provodljivost otopine povezana s njenom pH vrijednošću. U ovom se trenutku, stoga, ne može isključiti mogućnost da je za opažene akutne učinke pušenja na pH KI-a barem djelomično odgovoran i čimbenik razrjeđenja KI-a. Za pretpostaviti je da bi pouzdana metoda utvrđivanja stupnja razrjeđenja KI-a doprinijela razumijevanju mehanizma smanjenja kiselosti KI-a nakon aktivnog izlaganja duhanskom dimu.

Može se zaključiti da u ovom trenutku mehanizmi odgovorni za porast pH KI-a neposredno nakon aktivnog izlaganja duhanskom dimu ostaju neobjašnjeni. Moguće je da se radi o kombiniranom učinku imunoloških, hormonskih i fizikalno-kemijskih procesa u sluznici dišnih putova za čije su razjašnjenje neophodne sofisticirane biokemijske metode analize izdahnutog zraka. S obzirom da do sada još nisu dovoljno razjašnjeni niti porijeklo i sastav KI-a, za vjerovati je da će daljnja istraživanja na tom području, uključujući proteomiku (185, 186), omogućiti bolje razumijevanje procesa koji dovode do promjena kiselosti KI-a u različitim fiziološkim i patološkim procesima. Pokazano je, primjerice, da se proteinski sastav KI-a znatno razlikuje u pušača i nepušača (187), što je u skladu s razlikom u sintezi proteina u plućnom tkivu pušača u odnosu na nepušače (186, 188).

Bez obzira na mehanizam koji je u podlozi akutnog učinka pušenja na pH KI-a, rezultati istraživanja opisanog u ovoj Disertaciji upućuju da on traje najmanje dva sata. Tijekom tog razdoblja vrijednosti pH KI-a u pušača ne razlikuju se od onih u nepušača, što ima znatne implikacije za tumačenje rezultata istraživanja u kojima se od ispitanika nije tražilo odricanje od pušenja (120) ili je razdoblje odricanja trajalo svega jedan do dva sata (34, 57, 72, 80, 122). Moguće je da je upravo prekratko ili nepostojeće razdoblje odricanja od pušenja razlogom

kontradiktornih nalaza o utjecaju pušenja na kiselost KI-a (34, 57, 72, 81, 120). Potrebno je stoga naglasiti važnost odgovarajuće dugog razdoblja odricanja od pušenja prije uzorkovanja KI-a namijenjenog mjerenju pH. Prema ovdje opisanim rezultatima može se preporučiti cjelonočno odricanje od pušenja (najmanje 10 sati), no točnije vremenske odrednice nije moguće predložiti na temelju provedenog protokola. Ukoliko nije realno zahtijevati odricanje od pušenja u tom razdoblju, preporučljivo je barem zabilježiti vrijeme u koje je konzumirana zadnja cigareta prije uzorkovanja KI-a. U znatnom broju istraživanja, posebice starijeg datuma, ovaj podatak, naime, nije naveden. Bolje definiranje vremenskog razdoblja odricanja od pušenja olakšava usporedivost rezultata istraživanja i njihovu interpretaciju.

### **5.1.2. Utjecaj konzumacije hrane i kave na kiselost KI-a**

Nasuprot učincima konzumacije Coca-Cole i mineralne vode (109), rezultati istraživanja opisanog u ovoj Disertaciji ne upućuju na akutni učinak konzumacije standardiziranog doručka ili kave na pH KI-a u respiratorno zdravih odraslih nepušača. Može se pretpostaviti kako unos hrane i pića može na više različitih načina utjecati na pH KI-a, primjerice povećanjem metaboličke proizvodnje CO<sub>2</sub> (189, 190), ulaskom brojnih hlapivih i nehlapivih metaboličkih proizvoda iz krvi i sline u KI (90, 97, 191), te posredno aspiracijom minimalnih količina želučanog sadržaja (tzv. mikroaspiracija želučanog sadržaja) u osoba koje ne boluju od gastroezofagealne refluksne bolesti (tzv. fiziološki refluks) (91).

Brojni hlapivi i nehlapivi metabolički proizvodi, kao što su to amonijak, etanol, glukoza, acetaldehid i mlječna kiselina, izmjereni su u KI-u (90, 97, 187, 191, 193), a neki bi od njih mogli imati utjecaja na pH KI-a. Dakako, treba naglasiti da KI predstavlja izrazito razrjeđene kapljice tekućine koja oblaže dišni epitel (u prosjeku 20.000 puta) (82, 83) i upitno je da li su proizvodi metaboličkih procesa prisutni u KI-u u količini dovoljnoj da utječu na njegov pH.

Poznato je da unos hrane bogate ugljikohidratima povećava metaboličku proizvodnju CO<sub>2</sub> (189, 190), što, međutim, nema utjecaja na parcijalni tlak CO<sub>2</sub> u plućima u zdravih ispitanika (189). U zdravih osoba, naime, porast frekvencije disanja i volumena izdahnutog zraka kompenziraju porast parcijalnog tlaka CO<sub>2</sub> u krvi nakon obroka (189). U ispitanika koji boluju od kronične opstruktivne bolesti pluća ova ventilatorna kompenzacija je nedostatna ili izostaje, već ovisno o stupnju opstruktivnih promjena (193, 194). Istraživanja u ispitanika koji boluju od



kronične opstruktivne bolesti pluća pokazala su kako male promjene u omjeru ugljikohidrata i masti u obroku mogu znatno utjecati na ukupni volumen CO<sub>2</sub> u izdahnutom zraku, podnošenje fizičkog napora i stupanj zaduhe, što se ne zamjećuje u zdravih ispitanika (194). Primjerice, u bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću uočeno je pogoršanje zaduhe i porast frekvencije disanja i parcijalnog tlaka CO<sub>2</sub> na kraju izdaha nakon obroka (194). Potpomognutom ventilacijom smanjio se opisani učinak konzumiranog obroka u ovih bolesnika, t.j. parcijalni tlak CO<sub>2</sub> na kraju izdaha približio se vrijednostima prije obroka, a zaduha se smanjila (194). U istraživanje opisano u Disertaciji uključeni su samo respiratorno zdravi ispitanici u kojih se, kako je navedeno, ne očekuje porast parcijalnog tlaka CO<sub>2</sub> u plućima nakon obroka.

Postoji li i koliki je utjecaj sline na pH KI-a još uvijek je otvoreno pitanje. Određeni autori smatraju da hlapive kiseline i baze iz sline značajno utječu na pH KI-a (66). Hrana, piće i duhanski dim poznati su regulatori lučenja, sastava i kiselosti sline (195-197). Pušenje, primjerice, snizuje pH vrijednost i kapacitet puferskih sustava sline, te mijenja njezin proteinski sastav (196). Izostanak akutnog učinka konzumacije hrane i kave na pH KI-a, te osobito izostanak akutnog zakiseljavanja KI-a nakon pušenja u istraživanju opisanom u ovoj Disertaciji, ne upućuje na značajniji utjecaj sline i njezinih hlapivih sastojaka na pH KI-a. Tome govore u prilog i rezultati istraživanja drugih autora koji nisu uspjeli uočiti utjecaj amonijaka na kiselost KI u ispitanika s upalnim bolestima donjih dišnih putova (76).

Hrana, kava i duhanski dim dovode do porasta sekrecije želučanih sokova i zakiseljavanja želučanog sadržaja (198-203). Poznato je da određene vrste hrane i pića te pušenje pogoršavaju simptome gastroezofagealne refluksne bolesti (201). Može se pretpostaviti da isti podražaji izazivaju fiziološki refluks (mikroaspiraciju) želučane kiseline u zdravih osoba. Refluks želučane kiseline zakiseljava sluznicu u području grkljana i dovodi do aspiracije kiselog želučanog sadržaja (56) pa posredno i KI kao što su pokazali neki autori (91). U istraživanju opisanom u ovoj Disertaciji, međutim, ne očekuje se znatan utjecaj refluksa želučanog sadržaja na pH KI-a nakon konzumacije obroka. Naime, iz istraživanja su isključeni ispitanici koji su bolovali od gastroezofagealnog refluksa, a sastav i količina hrane odabrane za protokol nisu bili visoko provokativni za nastanak refluksa želučane kiseline. S druge strane, za pretpostaviti je da bi konzumacija kave natašte mogla pojačati izlučivanje želučane kiseline i provocirati njezin refluks. Učinci kave na kiselost KI-a, ipak, nisu uočeni. Moguće je da je tome razlog izbor osoba neosjetljivih na nepoželjne učinke kave na gastrointestinalni sustav, što se očituje u malom broju

dobrovoljaca koji su bili spremni uključiti se u ovaj dio istraživanja (sedam ispitanika). Protokolom se od ispitanika zahtijevala konzumaciju kave natašte uz suzdržavanje od jela tijekom sljedećih sat vremena. Samo ispitanici koji su u svom svakodnevnom životu imali običaj na taj način konzumirati kavu, pristali su sudjelovati u ovom dijelu istraživanja. Selekcija i mali broj ispitanika smanjuju mogućnost procjene utjecaja kave na kiselost KI-a.

U objavljenoj literaturi spominje se, također, utjecaj pretilosti na pH KI-a (57, 111). U ovom istraživanju ITM i pH KI-a nisu bili povezani, vjerojatno zbog niske prevalencije pretilosti u ispitanika uključenih u istraživanje kao i isključenja iz istraživanja ispitanika koji boluju od gastroezofagealnog refluksa.

### **5.1.3. Varijabilnost kiselosti KI-a**

Slično podacima objavljenim u literaturi (60, 72), rezultati istraživanja opisanog u Disertaciji ne upućuju na značajnu unutar-dnevnu i unutar-tjednu varijabilnost vrijednosti pH KI-a u respiratorno zdravih ispitanika nepušača. Srednja vrijednost koeficijenta unutar-dnevne (3,7%) i unutar-tjedne varijabilnosti (4,6%) bila je slična vrijednostima opisanim u istraživanju Vaughana i sur. u zdravih dobrovoljaca (60). Autori su naveli koeficijent unutar-dnevne varijabilnosti od 3,5%, te unutar-tjedne varijabilnosti od 4,5%. Navedeni rezultati upućuju na zaključak da cirkadijani ritam nema značajnijeg utjecaja na pH KI-a, te time povećavaju relevantnost procjene utjecaja pušenja, konzumacije hrane i kave na kiselost KI-a.

### **5.1.4. Ograničenja Dijela I istraživanja**

U istraživanju prisutna su određena metodološka ograničenja.

Cjelonoćno suzdržavanje od pušenja nije objektivizirano, primjerice mjerenjem eCO (114). Ispitanicima je, međutim, objašnjena važnost odricanja od pušenja tijekom traženog razdoblja i u istraživanje su uključene samo one osobe koje su se izjasnile da im cjelonoćno suzdržavanje od pušenja ne predstavlja znatnu nelagodu.

Ograničeno razdoblje praćenja pH KI-a tijekom dva sata nakon pušenja cigarete onemogućava točniju procjenu razdoblja u kojem se vrijednosti pH KI-a vraćaju na bazalnu vrijednost i izjednačavaju s vrijednostima u nepušača. Primijenjeni protokol upućuje, međutim,

na zaključak da akutni učinak aktivnog izlaganja duhanskom dimu na pH KI-a traje najmanje dva sata.

Na pH KI-a mogu utjecati i vanjski čimbenici, vezani uz metodu pripreme uzorka i mjerenja pH. Primjerice, u Izvješće Radne skupine ATS/ERS vezano uz kondenzat izdaha (34) navedeno je da način dezinfekcije opreme za skupljanje KI-a može utjecati na biopokazatelje u KI-u. Istraživanja utjecaja postupka dezinfekcije na pH KI-a, međutim, nisu objavljena u dostupnoj literaturi. Kako bi ovaj potencijalni problem bio sveden na najmanju moguću mjeru, u ovom je istraživanju upotrijebljeno uvijek isto dezinfekcijsko sredstvo (Descogen), a dezinficirani nastavci za skupljanje KI-a dobro su isprani tekućom i destiliranom vodom. Naime, pokazano je da su 15-minutnim ispiranjem vodom glavni sastojci Descogena, kiseli pentakalijev bis(peroksimonosulfat) bis(sulfat) i limunska kiselina, u potpunosti odstranjeni s opreme za uzorkovanje KI-a (204).

**U zaključku ovog dijela istraživanja** može se navesti sljedeće:

- U odraslih respiratorno zdravih pušača, akutni i kronični učinak pušenja cigareta na pH KI-a razlikuje se. Dok se kronični učinak očituje u sniženju pH vrijednosti KI-a, akutni učinak očituje se u povišenju vrijednosti pH KI-a koje se tijekom najmanje dva sata nakon pušenja ne razlikuju od vrijednosti u respiratorno zdravih nepušača slične dobi.
- Ispitivani obrok (standardizirani doručak) i konzumacija kave nisu imali utjecaja na kiselost KI-a. Treba, međutim, naglasiti da je zaključak o nepovezanosti konzumacije kave i pH KI-a temeljen na vrlo malom broju ispitanika uz pozitivnu selekciju osoba neosjetljivih na štetne učinke kave na gastrointestinalni sustav.

## **5.2. Dio II - učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav**

Istraživanje je provedeno u ukupno 61 pilanskog radnika u dvije pilane u okolici Zagreba, Pilani 1 i Pilani 2. U odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika, štetni učinci radne izloženosti na dišni sustav bili su prisutni samo u radnika Pilane 1. U radnika Pilane 1, u odnosu na radnike Pilane 2 i kontrolne ispitanike, uočena je veća učestalost suhog kašlja, niže vrijednosti FVC-a i veća učestalost pozitivnog bronhodilatatornog testa. Povećanje kiselosti KI-a nakon tjedne radne izloženosti također je zabilježeno samo u radnika u Pilani 1, a ne i u radnika u Pilani 2. Ovaj nalaz može se povezati s izloženošću vrstama drva s većom proupalnom potentnošću te višim razinama plijesni, starijom životnom dobi, nižim stupnjem obrazovanja i većom kumulativnom dozom izloženosti duhanskom dimu u radnika Pilane 1 u odnosu na radnike Pilane 2. U Pilani 1, naime, uz tvrde vrste drva (hrast i bukva) obrađivalo se i meko drvo (jela i smreka), dok se u Pilani 2 obrađivalo samo tvrdo drvo (hrast, bukva i jasen). Pokazano je da meke vrste drva imaju veću proupalnu potentnost u odnosu na tvrde vrste, o čemu će biti više riječi u daljnjem tekstu. Iako je izloženost prašini drva bila zatno niža od zakonski propisane granične vrijednosti u obje pilane, izloženost plijesnima bila je 2,5 puta viša u Pilani 1 u odnosu na Pilanu 2. S obzirom na karakteristike ispitanika, u usporedbi s radnicima Pilane 2, radnici Pilane 1 bili su za oko 10 godina stariji, nižeg stupnja obrazovanja s četverostruko većim udjelom nekvalificiranih radnika i imali su za oko dva puta viši pušački indeks. Može se pretpostaviti da je međudjelovanje čimbenika izloženosti s jedne strane, te fizioloških i socio-ekonomskih čimbenika s druge strane, uzrokovalo različiti odgovor dišnog sustava na štetnosti iz radnog okoliša u ove dvije skupine pilanskih radnika.

### **5.2.1. Izloženost dišnim štetnostima u pilanama**

Zaprašenosť zraka bila je podjednaka u obje pilane i bila je znatno niža (oko 0,8 mg/m<sup>3</sup> ukupne prašine) od GVI (5 mg/m<sup>3</sup>) (NN 13/2009). Razine zaprašenosťi bile su niže i od 1 mg/m<sup>3</sup> što predstavlja graničnu vrijednost propisanu u nekim zemljama Europe, SAD-u i Australiji (138, 205). Pad plućne funkcije i povećanje prevalencije dišnih simptoma opisani su i pri ovako niskim razinama zaprašenosťi (205) što se objašnjava prisutnošću drugih štetnosti u radnom okolišu pilane.

U ovom disertacijskom istraživanju sve izmjerene vrijednosti endotoksina u zraku (u rasponu od 148-672 EU/m<sup>3</sup>) bile su više od preporučene vrijednosti od 125 EU/m<sup>3</sup> (153), te ujedno i znatno više od razine od oko 100 EU/m<sup>3</sup> za koju se smatra da izaziva upalne promjene u dišnim putevima (206). Slične vrijednosti zabilježene su i u drugim pilanama (205, 207-210) iako su u pojedinim istraživanjima zabilježene i znatno niže (<20 EU/m<sup>3</sup>) (132), ali i znatno više vrijednosti (oko 2000 EU/m<sup>3</sup>) (211, 212). Nije uočena korelacija između razina endotoksina u zraku i u sedimentu prašine, kao niti u većini istraživanja drugih autora u različitim radnim i općim okolišima (213-216). Sedimentirana prašina smatra se rezervoarom endotoksina u unutrašnjim prostorima (215), a koliko će ga dospjeti u zrak ovisi o vrsti proizvodnog procesa, temperaturi i vlazi zraka, te količini čestica prašine u zraku. U pogonima pilana za pretpostaviti je da znatan dio endotoksina u zrak dopijeva direktno iz proizvodnog procesa, tijekom odstranjivanja kore, piljenja i rezanja drva, dakle prije nego što se uopće sedimentira na tlo i druge površine u radnoj prostoriji. Iako je određivanje endotoksina u sedimentiranoj prašini jednostavnije i ekonomičnije, respiratorna izloženost endotoksinu danas se gotovo isključivo procjenjuje na temelju razina endotoksina u zraku. One se, naime, smatraju relevantnijim za izloženost ljudi, a, kao što je ranije navedeno, većinom ne koreliraju s endotoksinom u sedimentu prašine.

Prema objavljenim podacima, u pilanama u kojima se obrađuje svježe drvo izmjeren je široki raspon koncentracija plijesni (217-220), od 10<sup>3</sup> CFU/m<sup>3</sup> u švedskim (218) i francuskim (219) pilanama do 10<sup>6</sup> CFU/m<sup>3</sup> u kanadskim pilanama (220). Velika većina ovih vrijednosti premašuje preporučenu vrijednost od 10<sup>3</sup> CFU/m<sup>3</sup> (132), a u znatnom broju slučajeva i koncentraciju od 10<sup>4</sup> CFU/m<sup>3</sup> preporučenu kao graničnu vrijednost za zdravstvene učinke u izloženih radnika (221). Koncentracije plijesni izmjerene u pilanama uključenim u ovo disertacijsko istraživanje (1,4×10<sup>4</sup> CFU/m<sup>3</sup>) bile su umjerene, s većinom vrijednosti manjom od 10<sup>4</sup> CFU/m<sup>3</sup>. Ipak, koncentracija spora plijesni u Pilani 1 bila je 2,5 puta viša od one u Pilani 2, a vrijednosti veće od 10<sup>4</sup> CFU/m<sup>3</sup> izmjerene su u 20% uzoraka u Pilani 1, dok u Pilani 2 takve razine nisu nađene niti u jednom uzorku. Može se zaključiti da iako koncentracija spora plijesni u zraku pilana nije bila izuzetno visoka, u Pilani 1 ona može predstavljati rizik po zdravlje ljudi. Razlike u razini kontaminacije plijesnima u istraživanim pilanama mogu biti posljedica dužeg čuvanja drvnog materijala na otvorenom, te posljedično veće količine vlage u materijalu, ali i manje učinkovitog rada uređaja za usisavanje drvene prašine nastale pri odstranjivanju kore i

piljenju i rezanju drva. Vrste plijesni koje su bile najučestalije u pilanama u ovom istraživanju, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* i *Paecilomyces spp.*, zabilježene su kao dominantne i u pilanama u drugim dijelovima umjerenog klimatskog pojasa, uz razlike uvjetovane klimatskim čimbenicima i vrsti obrađivanog drva. Primjerice, u pilanama u kojima se obrađivalo uglavnom drvo četinjača kao najučestalije opisane su *Paecilomyces* i *Rhizopus spp.* u poljskim pilanama (222), *Stibella*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* i *Talaromyces spp.* u pilanama u Velikoj Britaniji (223), *Penicillium spp.* u kanadskim pilanama (220), te *Cladosporium spp.* u francuskim pilanama (219). U pilanama u kojima se obrađivalo tvrdo drvo nađene su kao najučestalije *Alternaria*, *Trichoderma* i *Rhizopus spp.* u kanadskim pilanama (224) i *Penicillium spp.* u francuskim pilanama (219). Navedene vrste plijesni mogu inducirati reakcije preosjetljivosti u izloženih osoba, uključujući alergijsku astmu i rinitis te alergijski alevolitis.

### 5.2.2. Dišni simptomi

Izloženost drvnoj prašini i ostalim dišnim štetnostima u drvnoj industriji povezuje se s različitim simptomima i bolestima dišnog sustava, uključujući rinitis, nadražajni suhi kašalj, kronični kašalj s iskašljavanjem, kronični bronhitis, KOPB, astmu, hipersenzitivni pneumonitis i toksični sindrom organskih prašina (134). Iako u mnogim istraživanjima statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu ili opću populaciju nisu dokazane, u većini radova uočen je trend povećanja prevalencije astme, kroničnog bronhitisa, suhog i produktivnog kašlja te rinokonjunktivitisa u izloženih radnika (134). Učestalost navedenih simptoma i bolesti znatno se razlikuje među objavljenim istraživanjima zbog razlika u vrsti prerađivanog drva, vrsti proizvodnog procesa (prerada svježeg ili sušenog drva), razinama dišnih štetnosti, mjerama zaštite na radu, osobinama ispitanika kao i kriterijima po kojima su navedene bolesti i simptomi definirani. Rezultati ovog disertacijskog istraživanja uspoređeni su s objavljenim istraživanjima u kojima su pilanski radnici bili izloženi razinama drvne prašine sličnim onima izmjerenim u pilanama uključenim u disertacijsko istraživanje. Također je uzeta u obzir proupalna potentnost različitih vrsta drva te u raspravu nisu uključena istraživanja u radnika izloženih vrlo alergogenoj i astmogenoj vrsti cedra (crveni cedar, lat. *Thuja plicata*) koja se ne obrađuje u hrvatskim pilanama.

U ovom disertacijskom istraživanju simptomi s najvišom prevalencijom bili su rinitički simptomi i suhi kašalj (tablica 6.). U usporedbi s kontrolnom skupinom, najizrazitiji, statistički značajan porast prevalencije uočen je za suhi kašalj, dok se učestalost ostalih dišnih simptoma

nije značajno razlikovala od kontrolnih ispitanika (tablica 6.). Treba, međutim, naglasiti da relativno mali broj ispitanika u dvije skupine pilanskih radnika (26 i 35 ispitanika) otežava interpretaciju rezultata.

U odnosu na kontrolne ispitanike, povećana učestalost **suhog kašlja** zabilježena je samo u radnika Pilane 1 i iznosila je 42%, slično nalazu Mandryka i sur. (205) koji su zabilježili učestalost ovog simptoma od oko 30% u pilanskih radnika na obradi svježeg tvrdog drva vrste *Eucalyptus*. S druge strane, u radnika Pilane 2 taj postotak bio je značajno niži (14%), a u literaturi su objavljene i niže vrijednosti. U istraživanju Bohadane i sur. (138), primjerice, prevalencija suhog kašlja u radnika u drvnjoj industriji izloženih prašini hrasta i bukve iznosila je do 6%. Povećanu prevalenciju ovog simptoma u radnika Pilane 1 moguće je povezati s većom izloženošću sporama plijesni i većom kumulativnom izloženošću duhanskom dimu u odnosu na radnike Pilane 2. Rezultati logističke regresije sa suhim kašljem kao zavisnom varijablom potvrđuju pozitivnu povezanost pušenja s učestalošću ovog simptoma, kao i pozitivnu povezanost s radom u Pilani 1 nezavisno od učinaka pušenja i drugih potencijalnih *confounding* varijabli (tablica 7.). **Kašalj s iskašljavanjem** (koji ne zadovoljava kriterij kroničnog bronhitisa) uočen je u ukupno 6 pilanskih radnika (10%) i 4 kontrolna ispitanika (7%), što je slično nalazu Bohadane i sur. (10% - 12%) (138) ali znatno niže od prevalencija zabilježenih u većini objavljenih istraživanja, t.j. od 26% do 56% (132, 205, 225, 226). Dva od 4 kontrolna ispitanika s produktivnim kašljem, te svi pilanski radnici s ovim simptomom, bili su aktivni ili bivši pušači. Učestalost suhog i produktivnog kašlja u objavljenim istraživanjima nije se razlikovala s obzirom na vrstu obrađivanog drva (tvrdo ili meko).

Prevalencija **kroničnog bronhitisa** u pilanskih radnika (8%) bila je slična prevalenciji zabilježenoj u kontrolnoj skupini (7%), a i prevalenciji od 7,4% opaženoj u velikoj skupini kontrolnih muških ispitanika profesionalno neizloženih dišnim štetnostima u istraživanju Kern i sur. (227). Sedam od ukupno 9 ispitanika s kroničnim bronhitisom (pilanskih radnika i kontrolnih ispitanika zajedno) bili su aktivni (6 ispitanika) ili bivši (1 ispitanik) pušači. U usporedbi s literaturnim podacima, prevalencija kroničnog bronhitisa u ovom disertacijskom istraživanju nalazi se na donjoj granici raspona prevalencije ove bolesti u pilanskih radnika. U objavljenoj literaturi prevalencija kroničnog bronhitisa znatno varira i kreće se u rasponu od 6% do čak 69% (134, 138), i to, čini se, neovisno o vrsti obrađivanog drva (tvrdo ili meko). Primjerice, u radnika izloženih prašini tvrdog drva prevalencija kroničnog bronhitisa kretala se od 6% (138) do 38%

(205), a u radnika izloženih mekim vrstama drveta (jela, smreka, bor), od 10% (132) do 27% (226). Koncentracije prašine u navedenim istraživanjima nisu se znatno razlikovale, sa srednjim vrijednostima respirabilne prašine manjim od  $2 \text{ mg/m}^3$  zraka.

Prevalencija simptoma **astme** u pilanskih radnika u ovom disertacijskom istraživanju nije se statistički značajno razlikovala između pilana, iako je u Pilani 1 ona iznosila 15%, a u Pilani 2 svega 3%. Također se nije znatnije razlikovala niti od učestalosti u kontrolnoj skupini s obzirom da je u njoj prevalencija bila visoka, oko 16%. Srednja prevalencija astme u odraslih u Hrvatskoj procijenjena je, naime, na oko 5% do 6% (228, 229). U usporedbi s ovim podatkom, prevalencija astme u Pilani 1, a i u kontrolnoj skupini, znatno premašuje vrijednosti očekivane za opću populaciju. Iako je broj ispitanika u Pilani 1 bio premalen da bi test dosegao dovoljnu statističku snagu, trend povećanja prevalencije astme u radnika Pilane 1 potkrepljuje nalaz značajno veće učestalosti pozitivnog bronhodilatatornog testa u ovih radnika u odnosu na radnike Pilane 2 (tablica 10.). Prevalencija astme definirane na temelju kliničke slike u radnika u zaposlenih na obradi svježeg drva kreće se u objavljenim istraživanjima u rasponu od 10% do 73% (134). Za razliku od kroničnog bronhitisa, prevalencija astme čini se da je povezana s vrstom obrađivanog drva. Bohadana i sur. (138), primjerice, također nisu pronašli povećanje prevalencije astme u radnika zaposlenih na preradi tvrdog drva, bukve i hrasta. U navedenom istraživanju prevalencija astme kretala se u rasponu od 3% do 8%. Slična učestalost astme (7,5%) zabilježena je u radnika zaposlenih na obradi svježeg tvrdog drva eukaliptusa u Australiji (205). U pilanskih radnika zaposlenih na preradi drva veće proupalne potentnosti, kao što su bor, smreka i jela, uočena je znatno veća učestalost astme. U pilanskih radnika izloženih prašini bora (*Pinus radiata*) i smreke učestalost simptoma astme iznosila je od 21-24% (223, 225) do oko 30% (226, 230). Rusca i sur. (132) zabilježili su prevalenciju simptoma astme u čak 52% radnika izloženih prašini jela i smreke u švicarskim pilanama. Pri tome se koncentracije drvene prašine nisu znatno razlikovale među istraživanjima i većinom su njihove srednje vrijednosti bile niže od GVI ( $5 \text{ mg/m}^3$  zraka).

Utjecaj izloženosti dišnim štetnostima u pilani na prevalenciju kroničnih upalnih bolesti dišnih puteva, astme i kroničnog bronhitisa, teško je procijeniti u ovom disertacijskom istraživanju zbog malog apsolutnog broja ispitanika oboljelih od navedenih bolesti, te zbog kratkog prosječnog radnog staža u pilani (oko 3,5 godine za obje pilane zajedno). Ovo razdoblje izloženosti prekratko je za razvoj kroničnog bronhitisa, a vjerojatno i za razvoj astme. U istraživanju Hessela i sur. (226), primjerice, rizik nastanka astme u pilanskih radnika u odnosu na



kontrolne ispitanike bio je značajno veći samo u skupini radnika s radnim stažem u pilani većim od 3 godine, a u istraživanju Fransmana i sur. (225) u radnika s radnim stažen u pilani većim od 6,5 godina. Povezanost dužine izloženosti i nastanka kroničnog bronhitisa jasno je pokazana u istraživanju Rusce i sur. (132) u kojem je prevalencija bronhitisa u radnika s  $\leq 5$  godina radnog staža u pilani iznosila 10%, dok je u radnika s više od 5 godina radnog staža (prosječno 13,3 godine) iznosila čak 63%. Mogući učinak zdravog radnika također se ne smije zanemariti s obzirom da je ovo disertacijsko istraživanje prosječno (134).

Simptomi **rinitisa** bili su učestali i u pilanskih radnika (38%) i u kontrolnih ispitanika (49%) u ovom disertacijskom istraživanju, bez razlika među skupinama. Slični rezultati opisani su i u radnika izloženih prašini tvrdog drva (eukaliptus, 41% do 47%) (205) i u radnika izloženih prašini mekog drva (borovina, 36%) (225). Kao i u slučaju prethodno navedenih dišnih simptoma, prevalencija rinitičkih simptoma u radnika na obradi svježeg drva u objavljenoj literaturi kretala se u širokom rasponu, od 9% do 49% (134) i nije bila vezana uz vrstu obrađivanog drva. S obzirom na visoku učestalost rinitičkih simptoma u kontrolnoj skupini, u ovom disertacijskom istraživanju ne može se adekvatno procijeniti njihova povezanost s izloženošću dišnim štetnostima u pilani. Ipak, prema podacima iz literature, navedena prevalencija u izloženih radnika (35% u Pilani 1 i 40% u Pilani 2) nalazi se u gornjem dijelu raspona vrijednosti uočenih u istraživanjima drugih autora.

U zaključku, najučestaliji dišni simptomi u pilanskih radnika su kašalj i simptomi rinitisa. Usporedba prevalencije dišnih simptoma u radnika zaposlenih na obradi mekih i tvrdih vrsta drva upućuje da vrsta drva nema većeg utjecaja na učestalost simptoma rinitisa, kroničnog bronhitisa kao niti suhog ili produktivnog kašlja. Nasuprot tome, učestalost astme veća je u radnika izloženih mekim vrstama drva, primjerice boru, jeli i smreki, vjerojatno zbog veće potentnosti ovih vrsta u izazivanju upalnih promjena u dišnim putevima. Rezultati ovog disertacijskog istraživanja u skladu su s navedenim zaključcima.

### **5.2.3. Plućna funkcija**

U velike većine radnika u obje pilane, t.j. u 21 od 26 radnika u Pilani 1 i u svih radnika u Pilani 2, zabilježena je uredna plućna funkcija (tablica 8.). Vrijednosti FVC-a u radnika Pilane 1, bile su, međutim, za oko 10% niže od vrijednosti u kontrolnih ispitanika, te za oko 19% niže u odnosu na radnike Pilane 2. Smanjenje vrijednosti FEV<sub>1</sub>, omjera FEV<sub>1</sub>/FVC te protoka kroz male dišne

puteve nisu bile snižene u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovi rezultati upućuju na razvoj **restriktivnih promjena u radnika Pilane 1**, bez obzira što je u većine ovih ispitanika spirometrijski nalaz bio u granicama očekivanih vrijednosti.

Niže vrijednosti pokazatelja plućne funkcije u pilanskih radnika u odnosu na kontrolnu skupinu opisane su u mnogim radovima (205, 226, 231-234, 134), iako su objavljena i istraživanja u kojima takve razlike nisu uočene (132, 138, 223, 235). Opisane su restriktivne (205, 231, 233, 234), opstruktivne (226, 232) i opstruktivno-restriktivne promjene plućne funkcije (236). Promjene su opisane i u radnika izloženih mekim (226, 232, 233) i u onih izloženih tvrdim vrstama drveta (205). Pad plućne funkcije povezuje se s dužinom radnog staža u drvnjoj industriji (231, 232, 237), no ovaj odnos nije potvrđen u svim istraživanjima (132). U ovom disertacijskom istraživanju spirometrijske vrijednosti nisu korelirale s dužinom radnog staža već su bile negativno povezane s dobi ispitanika (tablica 9.). Mogući je uzrok ovakvom nalazu kratki prosječni radni staž u pilanskih radnika (oko 3,5 godine) s manje od 10% radnika zaposlenih u pilani (ili drugoj drvno-prerađivačkoj industriji) tijekom 10 ili više godina. S druge strane, oko 80% pilanskih radnika živjelo je na selu i bilo od djetinjstva uključeno u poljoprivredne aktivnosti na obiteljskim imanjima što podrazumijeva izloženost organskoj prašini (238). Stoga trajanje izloženosti organskoj prašini u ovih osoba bolje opisuje njihova dob, a ne radni staž u pilani.

Zanimljiv je nalaz viših vrijednosti FVC-a i FEV<sub>1</sub> u radnika Pilane 2 u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika, čak i uz kontrolu za dob, pušački status, plućne simptome i atopiju. Radnici Pilane 2 imali su vrijednost FVC-a za oko 15% (860 mL) veće od očekivanih, te za oko 9% veće od onih u kontrolnih ispitanika. Vrijednosti FEV<sub>1</sub> bile su za oko 18% (oko 900 mL) veće od očekivanih, te za oko 12% veće od onih u kontrolnih ispitanika. Vrijednosti protoka u malim dišnim putevima bile su veće od očekivanih za 8-17%, te za 18-19% od onih u kontrolnih ispitanika. Ovo opažanje nije jedinstveno u objavljenoj literaturi. Bohadana i sur. (138), primjerice, također su uočili vrijednosti spirometrije više od očekivanih, iako je u njihovom istraživanju razlika između očekivanih i opaženih vrijednosti za FVC (207-339 mL) i FEV<sub>1</sub> (159-281 mL) bila manja od razlike u ovom disertacijskom istraživanju. Razlika opažene – očekivane vrijednosti omjera FEV<sub>1</sub>/FVC u istraživanju Bohadane i sur. (4,0%) bile su slične razlici uočenoj u ovom disertacijskom istraživanju u radnika obje pilane (4,7% u Pilani 1 i 4,0% u Pilani 2). Može se pretpostaviti da je navedeno opažanje rezultat učinka zdravog radnika.

Vrijednosti spirometrije nisu se znatno promijenile nakon tjedne (4-dnevne) radne izloženosti niti u Pilani 1 niti u Pilani 2 (slika 13.). Objavljena istraživanja u pilanskih radnika u kojima se proučavala povezanost dnevne i tjedne izloženost drvnoj prašini s promjenama vrijednosti plućne funkcije pokazala su oprečne rezultate, čak i za izloženost istim vrstama drvene prašine (134). Ashley i sur. (157) i Gandevia (239) također nisu uočili tjednu promjenu spirometrijskih vrijednosti u radnika izloženih prašini crvenog cedra, iako je u istraživanju Gandevie opisan pad vrijednosti FEV<sub>1</sub> nakon dnevne radne smjene. Pad vrijednosti FEV<sub>1</sub> nakon tjedne izloženosti opisan je u pilanskih radnika u istraživanju Dahlqvista i sur. (218), a pad vrijednosti FVC-a u istraživanju Hedenstierne i sur. (234). Dahlqvist i sur. također su uočili da je smanjenje FEV<sub>1</sub> nakon tjedne izloženosti bilo povezano s njegovim smanjenjem nakon 27 mjeseci praćenja u pilanskih radnika. Autori su stoga predložili tjednu promjenu FEV<sub>1</sub> kao biopokazatelj osjetljivosti na respiratorne učinke drvene prašine u izloženih radnika. Navedeni rezultati Dahlqvista i sur. dobiveni su, međutim, u radnika izloženih vrlo visokim koncentracijama plijesni ( $10^6$  CFU/m<sup>3</sup>) u usporedbi s izloženošću opisanom u ovom disertacijskom istraživanju (srednje vrijednosti od  $3,4 \times 10^3$  i  $8,6 \times 10^3$ , s najvišom izmjerenom vrijednošću od  $1,4 \times 10^4$ ).

Nakon primjene bronhodilatatornog lijeka (salbutamola) u pilanskih radnika u ovom disertacijskom istraživanju, vrijednosti FEV<sub>1</sub> u ispitanika u obje pilane prosječno su porasle za 120 mL (za 2,8%) od početne spirometrije. Ovakav porast, koji se nije značajno razlikovao među pilanama, u skladu je s podacima za mušku opću odraslu populaciju. Naime, u istraživanju Kainu i sur. (240) srednja promjena FEV<sub>1</sub> nakon udisanja salbutamola iznosila je +107,4 mL (3,0%), a u istraživanju Johannessena i sur. (241) 112 mL (2,6%). U respiratorno zdravih ispitanika nepušača opisana je razlika od +97,6 mL (2,3%) (240), što je također slično rezultatu dobivenom u ovom disertacijskom istraživanju (+100 mL, t.j. 2,1%). Bronhodilatatorni test u respiratorno zdravih nepušača bio je pozitivan u jednog od 22 respiratorno zdrava ispitanika nepušača, te je učestalost iznosila 4,6%. Ovaj podatak nalazi se unutar raspona vrijednosti od 2,7-7,2% prevalencije pozitivnog bronhodilatatornog testa ispitivanog u 756 respiratorno zdravih osoba (242). Promatrajući, međutim, sve ispitivane radnike u pojedinoj pilani (tablica 10.) uočava se da je prevalencija pozitivnog testa bila značajno viša u radnika Pilane 1 (oko 21%) u odnosu na radnike Pilane 2 (3%). Ovaj nalaz u skladu je s trendom povećanja prevalencije astmatskih simptoma u radnika Pilane 1 u odnosu na Pilanu 2, a potvrđuje ga i rezultat multiple linearne

regresije s promjenom vrijednosti FEV<sub>1</sub> tijekom bronhodilatatornog testa kao zavisnom varijablom (tablica 11). Analiza je pokazala da je promjena FEV<sub>1</sub> bila značajno pozitivno povezana s astmatskim simptomima uz kontrolu za dob, pušački status, atopijski status i radno mjestom u Pilani 1 ili Pilani 2. Tjedna izloženost nije utjecala na nalaz bronhodilatatornog testa niti u jednoj pilani (tablica 10).

#### 5.2.4. Atopija

Učestalost objektivnih pokazatelja atopije, povišenog IgE i pozitivnog SPT-a na uobičajene inhalatorne alergene, u pilanskih radnika u ovom istraživanju nije se razlikovala od učestalosti u kontrolnoj skupini (tablica 14), a bila je i usporediva s nedavno objavljenim podacima za opću odraslu populaciju Hrvatske (243). U pilanskih radnika najučestalije pozitivne reakcije zabilježene su na alergene prašinskih grinja i pelud korova, dok je u kontrolnih ispitanika bila učestala i senzibilizacija na pelud trava i drveća te dlaku mačke (tablica 14). Atopija definirana kao senzibilizacija na jedan ili više uobičajenih dišnih alergena bila je pozitivno povezana s prevalencijom rinitisa, povremenog suhog kašlja i pozitivnim nalazom bronhodilatatornog testa. S druge strane, atopijski status nije imao utjecaja na plućnu funkciju niti na kiselost KI-a.

Oko 16% pilanskih radnika bilo je senzibilizirano na jednu ili obje piroglifidne grinje (*Dermatophagoides pteronyssinus* i *Dermatophagoides farinae*) što je slično učestalosti ove senzibilizacije u općoj urbanoj populaciji kontinentalne Hrvatske (oko 20%) (244). S obzirom da je antigen grinje *Dermatophagoides pteronyssinus* u sedimentu prašine bio ispod razine mjerljivosti u obje pilane, senzibilizacija na prašinske grinje vjerojatno je posljedica izloženosti u općem okolišu, primjerice u domu ispitanika.

S druge strane, niti jedan pilanski radnik nije bio senzibiliziran na profesionalne alergene drva (hrast, bukva, jasen i jela), a samo je jedan radnik bio senzibiliziran na alergene plijesni (*Rhizopus niger*). Objavljeni podaci vezani uz povećanu učestalost senzibilizacije na određene vrste drvene prašine i plijesni oskudni su. U istraživanju Dutkiewicza i sur. (245) uočena je izuzetno visoka prevalencija senzibilizacije na inhalatorne alergene drva, pogotovo mekog (>90%), no razmjerno visoka prevalencija uočena je i u kontrolnih ispitanika (preko 20%). Moguće je da su uzroci ovakvih rezultata metodološke prirode. Naime, autori su kožno testiranje na inhalacijske alergene proveli intradermalnom a ne prick metodom. Osim toga, pripravke alergena pripremali su u svom laboratoriju iz ekstrakta sedimentirane prašine drva, a nisu

upotrijebili komercijalne alergene. U istraživanju Cormiera i sur. (212) uočena je niska prevalencija senzibilizacije i na meke i na tvrde vrste drva (2,7% na bor, 5,4% na jelu/smreku i 6,9% na brezu) u pilanskih radnika u Kanadi. U radu Carossa i sur. (246) senzibilizacija na različite vrste tvrdog i mekog drva kretala se u sličnom rasponu, od 1,1-7,8%, a za većinu vrsta bila je manja od 3%.

Iako mnoge vrste plijesni, uključujući *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* i *Chrysonilia* spp. induciraju atopijsku senzibilizaciju i mogu biti uzrokom alergijske astme i rinitisa (130), na osnovu rezultata objavljenih istraživanja čini se da imunološki odgovor na plijesni u pilanskih radnika nije dominantno I tipa (posredovan IgE antitijelima). Rydjord i sur. (247) pokazali su u norveških pilanskih radnika izloženih izuzetno visokim koncentracijama spora plijesni (do  $10^7$  CFU/m<sup>3</sup>) o dozi ovisan porast koncentracije antitijela klase IgG i IgA na plijesni identificirane u pilanama. S druge strane, koncentracija IgE antitijela na iste plijesni nije se razlikovala od vrijednosti u kontrolnoj skupini. U skupini radnika izloženoj najvišim razinama plijesni čak su uočene niže koncentracije IgE antitijela u odnosu na radnike s nižom izloženošću. Sukladan ovim rezultatima je i nalaz Halpina i sur. (223). Prevalencija senzibilizacije na alergene plijesni u istraživanju ovih autora nije se razlikovala od one u kontrolnih ispitanika, iako su srednje razine izloženosti bile i do 10 puta više od onih zabilježenih u ovom disertacijskom istraživanju.

Navedeni rezultati mogu se pokušati objasniti učinkom zdravog radnika, pogotovo s aspekta intenzivne fluktuacije radne snage u pilanama. Naime, u ovdje opisanom disertacijskom istraživanju kao i u većini istraživanja drugih autora radni staž u pilani većinom je bio manji od 10 godina. Navedenoj fluktuaciji radne snage uzroci mogu biti, međutim, i socio-ekonomske prirode, a ne samo zdravstvene tegobe izloženih radnika. Drugo moguće objašnjenje je da uvjeti rada u pilanama ne ugrožavaju zdravlje radnika-atopičara do te mjere da bi oni bili prisiljeni napustiti radno mjesto. Prevalencija atopičara među pilanskim radnicima usporediva ili čak i viša od one u općoj populaciji uočena je i u istraživanjima drugih autora (212, 236). Ipak, treba naglasiti da se u ovom disertacijskom istraživanju profil senzibilizacije znatno razlikovao između pilanskih radnika i kontrolnih ispitanika. Najizrazitija razlika očitovala se u peterostruko manjoj učestalosti senzibilizacije na pelud trava i trostruko manjoj učestalosti senzibilizacije na pelud drveća u pilanskih radnika u odnosu na kontrolne ispitanike. Moguće je da je ubrzo nakon početka rada u pilani došlo do selekcije atopičara, pri čemu je većina onih senzibiliziranih na

relevantne profesionalne alergene promijenila radno mjesto. Razlika u profilu senzibilizacije između ruralne i urbane populacije također može imati ulogu. Većina pilanskih radnika, naime, živi seoskim načinom života, dok su kontrolnu skupinu sačinjavali većinom gradski stanovnici. Manju učestalost senzibilizacije na alergene iz vanjskog okoliša, prvenstveno na pelud, u seoske u odnosu na gradsku populaciju uočili su i drugi autori (248). Predloženo je objašnjenje za ove razlike kompleksno. S jedne strane ono uključuje stvaranje tolerancije na alergene iz prirodnog vanjskog okoliša u seoske populacije, što se tumači izlaganjem alergenima uz istodobnu veću izloženost infekcijama u ranom djetinjstvu (tzv. higijenska teorija) (148-150). S druge strane, onečišćenje okoliša u urbanim uvjetima života može dovesti do promjene alergogenog potencijala peludi, primjerice kemijski mijenjajući njegov proteinski sastav (249, 250).

Može se zaključiti da iako su određeni dišni simptomi bili povezani s atopijskim statusom, senzibilizacija na alergene iz radnog okoliša nije bila prisutna u izloženih radnika i atopijski status nije predstavljao čimbenik probira za rad u pilani.

### **5.2.5. Kiselost kondenzata izdaha**

Vrijednosti pH KI-a u radnika obje pilane izmjerene u ponedjeljak nakon tjednog odmora bile su u granicama očekivanih vrijednosti objavljenih za zdravu populaciju (tablica 1) i nisu se razlikovale između dvije pilane, niti u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (tablica 11). Nakon četiri dana rada u pilani, međutim, uočen je značajan pad vrijednosti pH KI-a (za 0,39 logaritamskih jedinica) u radnika Pilane 1. Prosječne vrijednosti pH KI-a u radnika Pilane 2 nisu se promijenile nakon tjedne radne izloženosti. Kiselost KI-a nije bila povezana s dobi, radnim stažem u pilani, pušačkim statusom, plućnim simptomima, plućnom funkcijom, atopijskim statusom i stupnjem uhranjenosti.

U dostupnoj literaturi opisano je svega četiri istraživanja u kojima se pH KI-a mjerio u radnika izloženih dišnim štetnostima na radnom mjestu (111, 171, 251, 252). Proučavan je utjecaj dimova koji nastaju pri zavarivanju (171, 251, 252) i izloženosti organskoj prašini u radnika zaposlenih u silosima pšenice (111). Utjecaj navedenih dišnih štetnosti na kiselost KI-a nije bio jednoznačan. Fireman i sur. (251) uočili su razliku u vrijednostima pH KI-a (za 0,48 logaritamskih jedinica) između dviju skupina varioaca. Skupine su se međusobno razlikovale i po dobi, radnom stažu, učestalosti dišnih simptoma i vrsti izloženosti. Skupina radnika s nižim vrijednostima pH KI-a (7,52 logaritamske jedinice) bila je 16 godina starija od skupine varioaca s

višim vrijednostima pH KI-a (8,00), imala je dužu radnu izloženost (21 vs. 10 godina), te peterostruko veću prevalenciju zviždanja u prsima (19% vs. 4%). Ova skupina varioca obrađivala je slitine kadmija, kroma, željeza, olova i nikla, dok je skupina varioca s višim pH KI-a obrađivala samo aluminijske i željezne kovine. Razlike u djelovanju navedenih metala na respiratorni epitel moguće su. Pokazano je, primjerice, da izloženost spojevima kroma, žive i olova različito utječe na imunokompetentne stanice u krvi radnika (253). Iako se dvije skupine varioca nisu razlikovale u plućnoj funkciji, radnici s nižim vrijednostima pH KI-a imali su veći postotak neutrofila u induciranom sputumu u odnosu na radnike s višim vrijednostima pH KI-a (71% vs. 42%). Negativna povezanost pH KI-a s neutrofilijom u induciranom sputumu opisana je i u radovima drugih autora (68) i govori u prilog hipoteze o pH KI-a kao pokazatelju upalnih promjena u dišnim putevima. S druge strane, Boyce i sur. (171) opisali su suprotan učinak izloženosti dimovima zavarivanja na pH KI-a. Autori su uočili granično značajan porast pH KI-a za 0,28 logaritamskih jedinica nakon dnevne radne izloženosti. Vrijednosti pH KI-a na početku radne smjene bile su slične vrijednostima u kontrolnih ispitanika. Treba, međutim, napomenuti da je u ovom istraživanju sudjelovao mali broj ispitanika, 14 varioca i 8 kontrolnih ispitanika, a rezultati nisu kontrolirani za mogući utjecaj pušenja. Kiselost KI-a u varioca proučavana je i u istraživanju Gube i sur. (236). Nisu uočene razlike niti između varioca i kontrolnih ispitanika, kao niti između vrijednosti na početku i kraju radne smjene u izloženih radnika. S obzirom da autori nisu argonizirali uzorke KI-a njihovi se rezultati ne mogu usporediti s ranije navedenim istraživanjima. Pokazano je, naime, da učinak radne izloženosti na kiselost argoniziranih uzoraka KI-a ne mora nužno biti prisutan i u nativnim, neargoniziranim uzorcima (251).

Po vrsti izloženosti ovom disertacijskom istraživanju sličnije je istraživanje Doa i sur. (111) koji su proučavali kiselost KI-a u radnika izloženih organskoj prašini u silosima. Autori su opisali negativnu povezanost pH KI-a s trajanjem dnevne izloženosti dišnim štetnostima na radnom mjestu, t.j. duža dnevna izloženost bila je povezana s većom kiselošću KI-a. Slično kao i u ovom disertacijskom istraživanju, Do i sur. nisu pronašli povezanost pH KI-a i radnog staža u izloženih radnika, iako je radni staž ispitanika u njihovom istraživanju bio znatno duži od onog u pilanskih radnika i prosječno je iznosio 11,4 godine. Za razliku od Doa i sur. koji su uočili negativnu korelaciju pH KI-a s pušačkim statusom i kumulativnom izloženošću duhanskom dimu (pušački indeks), u ovom disertacijskom istraživanju takva povezanost nije nađena. Mogući je uzrok tom nalazu akutni učinak pušenja cigareta na pH KI-a, opisan u Dijelu I ove disertacije.

Naime, oko  $\frac{3}{4}$  radnika u obje pilane pušilo je unutar 2 sata do uzorkovanja KI-a. Rezultati opisani u Dijelu I ove disertacije pokazali su da se akutni učinak pušenja, koji se očituje kao privremeno povišenje pH vrijednosti KI-a, zadržava najmanje 2 sata nakon pušenja jedne cigarete. Vrijednosti pH KI-a u pušača tijekom tog razdoblja izjednačuju se s vrijednostima pH KI-a u nepušača. Moguće da je upravo ovaj mehanizam uzrok proturječnim rezultatima učinka pušenja na kiselost KI-a opisanih u istraživanjima drugih autora (34, 70, 77, 120). Do i sur. (111), kao i druge istraživačke skupine (57, 68), opisali su negativnu povezanost pretilosti s pH KI-a. Ovaj nalaz tumači se većom učestalošću gastroezofagealnog refluksa, ali i stalno prisutnim sistemskim upalnim procesom (blagog stupnja) zbog povećane koncentracije upalnih medijatora u tkivima pretilih osoba (254). U ovom disertacijskom istraživanju povezanost pretilosti i pH KI-a nije nađena, vjerojatno zbog malog broja pretilih osoba među ispitanicima. Pretilost je zabilježena u 5 od ukupno 61 pilanskog radnika, te u 8 od 61 kontrolnog ispitanika. Dodatni mogući razlog je i isključenje iz istraživanja ispitanika koji boluju od gastroezofagealnog refluksa. Kiselost KI-a također nije bila povezana s plućnim simptomima niti s plućnom funkcijom. Povezanost plućnih simptoma s pH KI-a teško je interpretirati u ovom istraživanju. Naime, prevalencija suhog kašlja i kroničnog bronhitisa bila je povezana s pušenjem. Kako razlike u pH KI-a između pušača i nepušača nisu uočene u ovom istraživanju (moguće zbog akutnih učinaka pušenja na kiselost KI-a), nije za očekivati niti da će kiselost KI-a korelirati sa simptomima povezanim s pušačkim statusom. Moguće je, naime, da je akutni učinak pušenja prikrilo eventualnu povezanost navedenih simptoma s kiselošću KI-a. Broj osoba sa simptomima astme (5 od 61 pilanskog radnika i 6 od 32 kontrolna ispitanika u kojih je uzorkovan KI) bio je premalen za analizu i kvalitetnu interpretaciju rezultata. Izostanak korelacije kiselosti KI-a s parametrima plućne funkcije ne iznenađuje s obzirom da je velika većina ispitanika (>84%) imala urednu plućnu funkciju. Negativna povezanost između pH KI-a i FEV<sub>1</sub> uočena je u djece oboljele od astme (255) i u odraslih osoba s astmom, KOPB-om ili bronhiektazijama (68), ali ne i u respiratorno zdravih kontrolnih ispitanika (68). Neovisna povezanost dobi i pH KI-a nije uočena u ovom istraživanju, kao niti u većini istraživanja drugih autora provedenih u zdravih odraslih ispitanika (60, 62, 74). Ima naznaka da se u životnoj dobi iznad 60 godina vrijednosti pH KI-a počinju snižavati (122), no ovaj podatak nije relevantan za opisano disertacijsko istraživanje s obzirom da je u njega bilo uključeno svega 5 osoba starijih od 60 godina (4% od ukupnog broja ispitanika).



Kao što je već ranije navedeno, tjedna radna izloženost dišnim štetnostima u pilani različito je utjecala na kiselost KI-a u radnika Pilane 1 i Pilane 2 (tablica 12). Moguće je objašnjenje ovakvog nalaza kompleksna interakcija čimbenika radnog okoliša, bioloških i socio-ekonomskih osobina radnika. Biološki čimbenici za koje je nađena razlika između radnika u dvije pilane uključuju dob, plućnu funkciju, učestalost pozitivnog bronhodilatatornog testa i dišnih simptoma te kumulativnu izloženost cigaretnom dimu. Unutar samih bioloških čimbenika nađene su značajne korelacije, kao što je negativna povezanost dobi i plućne funkcije (izražene kao postotak od predviđene vrijednosti) koja se može objasniti pozitivnom korelacijom dobi s pušačkim stažem (Spearmanov  $\rho=0,51$ ,  $P<0,001$ ), ali i s dužinom izloženosti bioaerosolima u seoskog stanovništva. Seosko stanovništvo, naime, obično je izloženo različitim vrstama organske prašine već od samog djetinjstva. Socio-ekonomski status prepoznat je kao jedan od čimbenika rizika za nastanak KOPB-a i pada plućne funkcije, neovisno o pušačkom statusu i profesionalnoj izloženosti dišnim štetnostima (256). Pretpostavlja se da je tome razlog prisutnost drugih štetnih čimbenika okoliša i načina života u osoba s niskim socio-ekonomskim statusom, primjerice neodgovarajuće ishrane, pasivnog pušenja i slabije brige o vlastitom zdravlju zbog nedovoljne informiranosti i slabije dostupnosti zdravstvenih usluga (256). Iako kiselost KI-a nije bila u neovisnoj korelaciji niti s jednim navedenim čimbenikom osim s radnim mjestom u Pilani 1 ili Pilani 2, čini se da je njihovo skupno djelovanje uz izloženost štetnim čimbenicima na radnom mjestu dovelo do zakiseljavanja KI-a u radnika Pilane 1. Uz to valja istaknuti da su radnici Pilane 2 imali vrijednosti plućne funkcije značajno više od predviđenih što može upućivati da je učinak zdravog radnika bio u većoj mjeri prisutan u Pilani 2 u odnosu na Pilanu 1. Tome može govoriti u prilog i viši stupanj obrazovanja radnika Pilane 2 koji im, u slučaju nastanka zdravstvenih smetnji, pruža veću mogućnost odabira adekvatnijeg radnog mjesta.

U prilog hipoteze da su u Pilani 1 osim bioloških čimbenika ulogu imali i čimbenici radnog okoliša, prvenstveno razlike u proupalnoj potentnosti obrađivanih vrsta drva i razinama plijesni, govori nalaz pada vrijednosti pH KI-a nakon tjedne radne izloženosti u respiratorno zdravih radnika nepušača, t.j. osoba bez plućnih simptoma i s urednom plućnom funkcijom (tablica 12). Pad vrijednosti pH KI-a iznosio je gotovo polovicu logaritamske jedinice, te je bio statistički značajan usprkos malom broju respiratorno zdravih radnika u Pilani 1 (9 ispitanika). Ovaj nalaz upućuje da su upalne promjene u dišnim putevima prisutne u ovih radnika bile prisutne i na supkliničkoj razini, t.j. u radnika bez dišnih simptoma i s urednom plućnom

funkcijom. U nedavno objavljenom istraživanju Hoffmeyer i sur. (257) pad pH KI-a uočen je u respiratorno zdravih pušača, iako se drugi biopokazatelji upale u dišnim putevima, uključujući metabolite arahidonske kiseline i leukotrijene, nisu značajno razlikovali u odnosu na kontrolne ispitanike, nepušače. Autori su stoga predložili pH KI-a kao *screening* metodu za otkrivanje ranih upalnih promjena u dišnim putevima asimptomatskih pušača. Nepoznanica je, međutim, da li će promjene u dišnim putevima na koje upućuje zakiseljavanje KI-a u respiratorno zdravih ispitanika napredovati u smjeru razvoja plućnih bolesti i oštećenja plućne funkcije. Na ovo pitanje može se odgovoriti tek nakon provođenja longitudinalnog istraživanja u izloženih osoba.

Upalne promjene u dišnim putevima pilanskih radnika mogu biti posredovane alergijskim i nealergijskim mehanizmima. S obzirom da je u pilanskih radnika uključenih u ovo istraživanje izostala senzibilizacija na profesionalne alergene drva i plijesni, a prevalencija atopije bila je slična onoj u kontrolnih ispitanika i u općoj populaciji, može se pretpostaviti da su ključnu ulogu imali nealergijski mehanizmi, prvenstveno iritativni. Sličan je zaključak iznesen u kritičkom osvrtu o povezanosti astme i senzibilizacije na određene sjevernoameričke vrste drva u radnika zaposlenih u drvnoj industriji (258). Analiza objavljenih istraživanja pokazala je da senzibilizacija na prašinu drva nije učestala, te se dišni simptomi mogu povezati s nespecifičnim upalnim odgovorom u dišnim putevima izloženih osjetljivih osoba. U objavljenoj literaturi teško je razlučiti utjecaj određene vrste drva na nastanak i razvoj dišnih smetnji u pilanskih radnika, s obzirom da među istraživanjima postoje brojne metodološke razlike, a radnici su često istodobno izloženi različitim vrstama drva. U *in vitro* istraživanju na ljudskim epitelnim stanicama pokazano je da su prašine smreke ili bora izazvale jači upalni odgovor u odnosu na prašine bukve ili hrasta (259). Opisani rezultati u skladu su s nalazom veće prevalencije astme u radnika zaposlenih na obradi mekih vrsta drva (pr. bora, jele i smreke) (132, 223, 225, 226, 230) u usporedbi s radnicima izloženih prašini tvrdog drva (pr. bukve i hrasta) (138, 205). Osim drvne prašine, endotoksina i plijesni, u pilanama postoje brojne druge respiratorne štetnosti koje se oslobađaju tijekom procesa obrade svježeg drva, a mogu potaknuti upalni odgovor u dišnim putevima (131, 260). Kao primjer mogu se navesti pesticidi (pr. deltametrin) i različiti hlapivi spojevi biološkog porijekla, uključujući masne i rezinske kiseline, voskove, alkohole, terpene, sterole, sterilne estere, glicerol, tanine, flavonoide, kinone i lignine, koji se oslobađaju tijekom rezanja trupaca (131, 223). U razdoblju u kojem je provedeno ovo disertacijsko istraživanje drvo u pilanama nije izlagano pesticidima, u svrhu smanjenja troškova proizvodnje. Kako se u

pilanama uključenim u istraživanje obrađivalo svježe drvo, izvjesna je izloženost ranije navedenim hlapivim spojevima biološkog porijekla, čija vrsta i koncentracija u zraku radnih prostora varira u ovisnosti o vrsti drva, klimatskim uvjetima i vrsti tla s kojega potječu posječeni trupci (135).

### 5.2.6. Ograničenja Dijela II istraživanja

Prva skupina ograničenja ovog dijela istraživanja odnosi se na procjenu izloženosti respiratornim štetnostima u pilanama. Uzorkovanje zraka provedeno je samo tijekom ljetnog razdoblja, te se nisu mogle procijeniti razine izloženosti tijekom hladnijeg doba godine. Poznato je da razine endotoksina i plijesni ovise o godišnjem dobu, s obzirom na promjene u temperaturi i vlazi zraka (266, 267). Za točniju procjenu izloženosti navedenim štetnostima bilo bi preporučljivo provesti uzorkovanje tijekom sva četiri godišnja doba, ili barem jednom tijekom zime ili i kasne jeseni. Zrak je uzorkovan stacionarnim skupljačima. Osobni skupljači zraka omogućili bi bolju procjenu izloženosti na pojedinim radnima mjestima, a i analizu povezanosti izloženosti respiratornim štetnostima i njihovih učinaka na dišni sustav s obzirom na svakog pojedinog radnika, a ne samo za pilanu u cjelini.

Druga skupina ograničenja odnosi se na ispitanike uključene u istraživanje. Veći broj ispitanika i u kontrolnoj i u izloženim skupinama osigurao bi veću statističku snagu i omogućio kvalitetniju interpretaciju rezultata, posebice prevalencije simptoma vezanih uz astmu i kronični bronhitis. Kontrolna skupina ispitanika razlikovala se od pilanskih radnika s obzirom na mjesto prebivanja u selu odnosno gradu, te u odnosu na stupanj obrazovanja. Za obje navedene varijable poznato je da mogu biti povezane sa zdravstvenim statusom, te je njihov mogući utjecaj na promatrane pokazatelje respiratornog zdravlja obrazložen u prethodnom tekstu rasprave ove disertacije. Cjelonočno odricanje od pušenja nije bilo provedivo u ispitanika ovog istraživanja. Većina ispitanika pušila je čak i unutar dva sata do uzorkovanja KI-a. Iz tog razloga utjecaj pušenja na kiselost KI-a nije se mogao adekvatno procijeniti.

Na kraju rasprave o rezultatima Dijela II istraživanja **može se zaključiti** da su u zraku radnog okoliša pilana izmjerene razine endotoksina i plijesni za koje je pokazano da mogu štetno djelovati na dišni sustav izloženih radnika. Zdravstveni učinci izloženosti navedenim dišnim štetnostima u pilanskih radnika uključenih u ovo disertacijsko istraživanje očitovali su se u

porastu prevalencije suhog kašlja i smanjenju plućne funkcije u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika, te povećanju kiselosti KI-a nakon tjedne radne izloženosti. Navedeni štetni učinci u pilanskih radnika bili su, međutim, ovisni o vrsti obrađivanog drva, koncentraciji spora plijesni u zraku radnog okoliša, te o biološkim i socio-ekonomskim osobinama izloženih radnika. S obzirom da je pad pH KI-a nakon tjedne radne izloženosti uočen i u asimptomatskih pilanskih radnika s urednom plućnom funkcijom, čini se da bi kiselost KI-a mogla predstavljati rani, supklinički biopokazatelj učinaka izloženosti organkoj prašini na dišni sustav. Jednostavnost, neinvazivnost i ekonomska dostupnost metode govore u prilog posljednjem zaključku. Metoda, međutim, nije u potpunosti validirana i standardizirana, još uvijek postoje neriješena pitanja o porijeklu uzorka KI-a, utjecaju promjenjivog stupnja njegovog razrjeđenja kao i izvjesne metodološke nedoumice, a rezultati objavljenih istraživanja kontradiktorni su čak i u slučaju profesionalne izloženosti sličnoj vrsti dišnih štetnosti. Stoga su prije uvođenja metode u rutinsku praksu medicine rada potrebna daljnja istraživanja u različitim skupinama izloženih radnika, po mogućnosti usporedno s metodama koje mogu dati više informacija o patofiziološkim mehanizmima uključenim u upalna zbivanja u plućima.

### **5.3. Usporedba neinvazivnih metoda za procjenu upale u dišnim putovima u radnika izloženih dišnim štetnostima**

Usporedno s razvojem dijagnostičkih metoda u medicini, povećava se broj istraživanja u kojima se proučavaju rane, supkliničke promjene u dišnom sustavu osoba izloženih respiratornim štetnostima. Cilj je ovih istraživanja pronaći metode kojima bi se na vrijeme prepoznale osobe s početnim promjenama u dišnom sustavu te spriječio nastanak respiratornih bolesti i oštećenja plućne funkcije. Najčešće su u tu svrhu mjereni različiti biopokazatelji u induciranom sputumu, izdah (FeNO) i KI-u (8). U znatnom broju istraživanja celularnosti i aktivnosti upalnih citokina u induciranom sputumu asimptomatskih radnika izloženih različitim vrstama dišnih štetnosti, primjerice u radnika u papirnoj industriji (261), proizvodnji stočne hrane (262), vatrogastvu (263), te u prometnih policajaca izloženih ispušnim plinovima motornih vozila (264), uočen je značajno veći postotak neutrofilnih leukocita uz viši stupanj aktivacije proupalnih citokina u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Slično kao i u slučaju kiselosti KI-a, istraživanja povezanosti koncentracije FeNO i radne izloženosti dišnim štetnostima nisu, međutim,

jednoznačna. U respiratorno zdravih osoba izloženih dišnim iritansima na svinjogojskoj farmi uočen je porast vrijednosti FeNO nakon tri sata rada (265). S druge strane, u asimptomatskih radnika u cementari opisan je pad FeNO i plućne funkcije nakon jedne radne smjene (262), a sniženje vrijednosti FeNO zabilježeno je i kao akutni učinak pasivne izloženosti duhanskom dimu u respiratorno zdravih nepušača (266). Vrijednost navedenih biopokazatelja kao prediktora razvoja klinički evidentnih plućnih poremećaja nije moguće procijeniti u sadašnjem trenutku jer nedostaju podaci longitudinalnih istraživanja. Potrebno je također istaknuti da spomenuti biopokazatelji upalnih zbivanja često međusobno ne koreliraju. Usporedno istraživanje inducirano sputuma, FeNO-a i kiselosti KI-a u bolesnika s astmom pokazala su, primjerice, kako korelacija pH KI-a i staničnog profila u induciranom sputumu ovisi o težini kliničke slike (267). U bolesnika s teškom kliničkom slikom astme pH KI-a nije korelirao sa staničnim profilom u induciranom sputumu, dok su u bolesnika s umjerenom kliničkom slikom vrijednosti pH KI-a niže od 7,37 bile povezane s eozinofilijom u induciranom sputumu. Vrijednosti FeNO bile su povezane sa staničnim profilom inducirano sputuma neovisno o težini kliničke slike, pri čemu je razina FeNO pozitivno korelirala s eozinofilijom, a negativno s neutrofilijom. U bolesnika s KOPB-om i u zdravih osoba kemotaksijska aktivnost KI-a, mjerena kao indeks kemotaksije neutrofila, bila je povezana s brojem neutrofila u induciranom sputumu, ali nije korelirala s kemotaksijskom aktivnošću inducirano sputuma (268). U odnosu na zdrave ispitanike, u bolesnika s KOPB-om nađene su povišene razine leukotrijena B(4) u KI-u, ali ne i u induciranom sputumu. U administrativnog osoblja zaposlenog u uredima oštećenih poplavom provedeno je mjerenje FeNO i interleukina 8 u KI-u (15). Uspoređene su vrijednosti navedenih biopokazatelja u asimptomatskih radnika s vrijednostima u osoblja s iritativnim simptomima dišnog sustava ali bez kroničnih plućnih bolesti. Nađena je značajno viša koncentracija interleukina 8 u KI-u radnika s iritativnim simptomima u odnosu na asimptomatske radnike, no razlike u FeNO-u nisu uočene. Može se zaključiti da navedene metode nisu međusobno zamjenjive u procjeni upalnih promjena u dišnim putevima, te je potrebno procijeniti daljnjim istraživanjima koja je metoda najpogodnija za procjenu prisutnosti određene patološke promjene dišnog sustava, na što može utjecati stupanj i vrsta promatrane patološke promjene, vrsta radne izloženosti, a moguće i drugi još neprepoznati čimbenici.

## **6. ZAKLJUČCI**

### **6.1. Dio I - validacija metode mjerenja pH KI-a**

5. U odraslih respiratorno zdravih pušača, akutni i kronični učinak pušenja cigareta na pH KI-a razlikuje se. Dok se kronični učinak očituje u sniženju pH vrijednosti KI-a, akutni učinak očituje se u povišenju vrijednosti pH KI-a koje se tijekom najmanje dva sata nakon pušenja ne razlikuju od vrijednosti u respiratorno zdravih nepušača slične dobi.
6. Naglašava se važnost odgovarajuće dugog razdoblja odricanja od pušenja prije uzorkovanja KI-a namijenjenog mjerenju pH. Prema opisanim rezultatima može se preporučiti cjelonoćno odricanje od pušenja (najmanje 10 sati), a ukoliko nije realno zahtijevati odricanje od pušenja u tom razdoblju, preporučljivo je barem zabilježiti vrijeme u koje je konzumirana zadnja cigareta prije uzorkovanja KI-a.
7. Konzumacija standardiziranog doručka nije imala utjecaja na kiselost KI-a u zdravih odraslih nepušača.
8. Konzumacija kave nije imala akutnog učinka na kiselost KI-a u zdravih ispitanika nepušača. S obzirom da se rezultati temelje na vrlo malom broju ispitanika uz pozitivnu selekciju osoba neosjetljivih na štetne učinke kave na gastrointestinalni sustav, potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ispitanika.
1. Dobivene vrijednosti unutar-dnevne i unutar-tjedne varijabilnosti vrijednosti pH KI-a u respiratorno zdravih nepušača u skladu su s podacima objavljenim u sličnim istraživanjima.

### **6.2. Dio II - učinci izloženosti organskoj prašini na dišni sustav**

2. Iako je zapašenost zraka u obje pilane uključene u ovo disertacijsko istraživanje bila znatno niža od zakonski propisane granične vrijednosti, u obje pilane izmjerene su razine endotoksina i plijesni više od vrijednosti za koje se smatra da mogu izazvati upalne promjene u dišnim putevima. Pri tome su razine endotoksina bile podjednake u obje pilane, dok su koncentracije plijesni bile značajno više u Pilani 1 u odnosu na Pilanu 2. Pilane su se razlikovale i po vrsti obrađivanog drva. Dok su u Pilani 2 obrađivane samo tvrde vrste drva, u

Pilani 1 uz tvrde vrste obrađivane su i meke vrste drva, za koje je pokazana veća proupalna potentnost.

3. Radnici u pilanama razlikovali su se i u biološkim i socio-ekonomskim karakteristikama. Radnici Pilane 1 bili su starije životne dobi, nižeg stupnja obrazovanja i s većom kumulativnom dozom izloženosti duhanskom dimu u usporedbi s radnicima Pilane 2.
4. U skladu s izloženošću višim koncentracijama spora plijesni i vrstama drva veće proupalne potentnosti, te starijoj životnoj dobi, nižem stupnju obrazovanja i većoj kumulativnoj dozi izloženosti duhanskom dimu u radnika Pilane 1 u odnosu na radnike Pilane 2, nađena je i veća učestalost dišnih simptoma i niža plućna funkcija u radnika Pilane 1 u usporedbi s radnicima Pilane 2. U radnika Pilane 1, u odnosu na radnike Pilane 2 i kontrolne ispitanike, uočena je veća učestalost suhog kašlja, niže vrijednosti FVC-a i veća učestalost pozitivnog bronhodilatatornog testa. Također, učestalost simptoma astme u radnika Pilane 1 bila je veća od one u radnika Pilane 2 i od one očekivane u općoj odrasloj populaciji.
5. U radnika Pilane 1 zabilježeno je i povećanje kiselosti KI-a nakon tjedne radne izloženosti koje nije uočeno u radnika Pilane 2.
6. Može se pretpostaviti da je međudjelovanje čimbenika izloženosti s jedne strane, te fizioloških i socio-ekonomskih čimbenika s druge strane, uzrokovalo različiti odgovor dišnog sustava na štetnosti iz radnog okoliša u dvije ispitivane skupine pilanskih radnika.
7. Zakiseljavanje KI-a nakon tjedne radne izloženosti uočeno je i u asimptomatskih pilanskih radnika s urednom plućnom funkcijom, te se čini da bi kiselost KI-a mogla predstavljati rani, supklinički biopokazatelj učinaka izloženosti organkoj prašini na dišni sustav. Metoda, međutim, nije u potpunosti validirana i standardizirana, a rezultati objavljenih istraživanja kontradiktorni su čak i u slučaju profesionalne izloženosti sličnoj vrsti dišnih štetnosti. Stoga su prije uvođenja metode u rutinsku praksu medicine rada potrebna daljnja istraživanja u različitim skupinama izloženih radnika, po mogućnosti usporedno s metodama koje mogu dati više informacija o patofiziološkim mehanizmima uključenim u upalna zbivanja u plućima.

## 7. SAŽETAK

Istraživanje se sastojalo od eksperimentalnog i epidemiološkog dijela. U eksperimentalnom dijelu istraženi su akutni učinci pušenja, konzumacije standardiziranog doručka i kave na pH KI-a u 41 zdravog odraslog ispitanika. Učinak konzumacije standardiziranog doručka i kave na pH KI-a nije uočen. Vrijednosti pH KI-a izmjerene u pušača nakon cjelonoćnog suzdržavanja od pušenja bile su prosječno za 0,62 logaritamske jedinice niže od vrijednosti izmjerenih u zdravih nepušača ( $P < 0,001$ ). Nakon konzumacije jedne cigarete pH KI-a u pušača porastao je prosječno za 0,50 logaritamskih jedinica ( $P < 0,001$ ) i time se izjednačio s vrijednostima u nepušača. Ovaj učinak trajao je tijekom cijelog dvosatnog razdoblja praćenja. Preporučuje se stoga cjelonoćno odricanje od pušenja prije uzorkovanja KI-a za mjerenje kiselosti.

U epidemiološkom dijelu u 61 radnika iz dvije pilane (P1 i P2) procijenjena je učestalost respiratornih simptoma i objektivnih pokazatelja atopije, te učinak tjedne radne izloženosti drvnoj prašini na pH KI-a, učestalost pozitivnog bronhodilatatornog testa i plućnu funkciju. Izmjerene su razine dišnih štetnosti na radnom mjestu. Kontrolnu skupinu sačinjavao je 61 odrasli ispitanik, neizložen dišnim štetnostima na radnom mjestu. U pilanama je izmjerena slična razina zapašenosti koja nije prelazila zakonski dopuštenu razinu. Razina endotoksina bila je iznad preporučenih vrijednosti, ali slična u obje pilane. Koncentracija spora plijesni bila je 2,5 puta veća u P1 u odnosu na P2, te je u P1 dosegla razinu koja se povezuje s nastankom upalnih promjena u dišnim putevima. U P2 obrađivane su samo tvrde vrste drva, dok su u P1 uz tvrde vrste obrađivane i meke vrste drva, za koje je pokazana veća proupalna potentnost. U odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika, štetni učinci radne izloženosti na dišni sustav bili su prisutni samo u radnika P1. U radnika P1, u odnosu na radnike P2 i kontrolne ispitanike, uočena je veća učestalost suhog kašlja i pozitivnog bronhodilatatornog testa, te niže vrijednosti spirometrije. Povećanje kiselosti KI-a nakon tjedne radne izloženosti (za prosječno 0,39 log jedinica), zabilježeno je samo u radnika u P1. Ovi rezultati mogu se povezati ne samo s izloženošću vrstama drva s većom proupalnom potentnošću i višim razinama plijesni, već i sa starijom životnom dobi, nižim stupnjem obrazovanja i većom kumulativnom dozom izloženosti duhanskom dimu u radnika P1 u odnosu na radnike P2. Pad pH KI-a nakon tjedne radne izloženosti uočena i u respiratorno zdravih radnika nepušača upućuje da bi kiselost KI-a mogla predstavljati rani, supklinički biopokazatelj učinaka izloženosti organskoj prašini na dišni sustav.

**Ključne riječi:** atopija, drvena prašina, plijesni, pH KI-a, pušenje, prehrana



## 8. SUMMARY

The study comprised experimental and epidemiological section. In experimental section, acute effects of smoking, standardised breakfast and coffee consumption on EBC pH were evaluated in 41 healthy adults. No effect of food and coffee consumption on EBC pH was found. EBC pH values of smokers after overnight smoking abstinence were on average 0.62 logarithmic units lower than values in healthy non smokers ( $P<0.001$ ). Smoking of one cigarette increased EBC pH for 0.50 logarithmic units ( $P<0.001$ ) to the level equal to EBC pH of non-smokers. The observed effect persisted during the two-hour follow-up period indicating the importance of overnight tobacco abstinence for EBC pH measurement.

In epidemiological section, the prevalence of respiratory symptoms and objective atopy markers, as well as the effect of weekly exposure to wood dust on EBC pH, lung function and positive bronchodilatory test, were evaluated in 61 workers from two sawmills (S1 and S2). Respiratory hazards were measured at sawmills. Control group comprised 61 adult subjects, non-exposed to occupational respiratory hazards. Environmental monitoring showed similar level of total and respirable dust, below legal limits of exposure. Endotoxin levels were higher than recommended but similar for both sawmills. Mould spores level was 2.5 times higher in S1 compared to S2, reaching the levels showed to be related to respiratory inflammatory changes. In S2 only hardwood species were processed, while S1 processed also softwood species which possess higher proinflammatory potency. Compared to control subjects and S2 workers, S1 workers had higher prevalence of dry cough and positive bronchodilatory test, and lower spirometry values. Monday/Friday values of EBC pH showed significant decline for 0.39 logarithmic units ( $P=0.012$ ), but only in S1 workers. These results could be related to exposure to wood dust of species with higher proinflammatory potency and higher mould exposure, as well as with older age, lower educational level and higher cumulative smoking dose in S1 compared to S2 workers. The EBC pH decrease after weekly wood dust exposure observed even in respiratory healthy, non-smoking sawmill workers, implies that EBC acidity could be used as an early, subclinical biomarker of wood dust exposure effect.

**Key words:** atopy, EBC pH, smoking, diet, wood dust

## 9. LITERATURA

1. Sigsgaard T, Schlunssen V. Occupational asthma diagnosis in workers exposed to organic dust. *Ann Agric Environ Med* 2004;11:1-7.
2. Thorne PS, Duchaine C, Douwes J i sur. Working Group report 4: exposure assessment for biological agents. *Am J Ind Med* 2004;46:419-22.
3. Kanceljak-Macan B, Žuškin E, Macan J. Organic aerosols and the development of allergic disorders. *Arh Hig Rada Toksikol* 2004;55:213-20.
4. Žuškin E, Šarić M, Zvalić M, Kanceljak B. Pluća i bronhi. U: Šarić M, Žuškin E, urednici. *Medicina rada i okoliša*. Zagreb: Medicinska naklada; 2002. str. 428-54.
5. Balmes JR. Occupational lung diseases. U: LaDou, urednik. *Curr Occup Environ Med*. New York (NY): Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2004. str. 320-44.
6. D'Ippolito R, Chetta A, Foresi A i sur. Induced sputum and bronchoalveolar lavage from patients with hypersensitivity pneumonitis. *Respir Med* 2004;98:977-83.
7. Kodric M, Shah AN, Fabbri LM, Confalonieri M. An investigation of airway acidification in asthma using induced sputum - A study of feasibility and correlation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:905-910.
8. Quirce S, Lemiere C, de Blay F. i sur. Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *Allergy* 2010;65:445-5.
9. Ojoo JC, Mulrennan SA, Kastelik JA, Morice AH, Redington AE. Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis. *Thorax* 2005;60:22-6.
10. Gelb AF, Flynn Taylor C, Shinar CM, Gutierrez C, Zamel N. Role of spirometry and exhaled nitric oxide to predict exacerbations in treated asthmatics. *Chest* 2006;129:1492-9.
11. Hauswirth DW, Sundry JS, Mervin-Blake S. i sur. Normative values for exhaled breath condensate pH and it's relationship to exhaled nitric oxide in healthy African Americans. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:101-6.
12. Kim JY, Hauser R, Wand MP. i sur. Association of expired nitric oxide with urinary metal concentrations in boilermakers exposed to residual oil fly ash. *Am J Ind Med* 2003;44:458-66.

13. Sandrini A, Johnson AR, Thomas PS, Yates DH. Fractional exhaled nitric oxide concentration is increased in asbestosis and pleural plaques. *Respirology* 2006;11:325-29.
14. Battaglia S, den Hertog H, Timmers MC. *i sur.* Small airways function and molecular markers in exhaled air in mild asthma. *Thorax* 2005;60:639-44.
15. Akpınar-Elci M, Stemple KJ, Elci OC, Dweik RA, Kreiss K, Enright PL. Exhaled nitric oxide measurement in workers in a microwave popcorn production plant. *Int J Occup Environ Health* 2006;12:106-10.
16. Sacco O, Sale R, Silvestri M *i sur.* Total and allergen-specific IgE levels in serum reflect blood eosinophilia and fractional exhaled nitric oxide concentrations but not pulmonary functions in allergic asthmatic children sensitized to house dust mites. *Pediatr Allergy Immunol* 2003;14:475-81.
17. Ferrazzoni S, Scarpa MC, Guarnieri G, Corradi M, Mutti A, Maestrelli P. Exhaled Nitric Oxide and Breath Condensate pH in Asthmatic Reactions Induced by Isocyanates. *Chest* 2009;136:155-62.
18. Swierczynska-Machura D, Krakowiak A, Wiszniewska M, Dudek W, Walusiak J, Palczynski C. Exhaled nitric oxide levels after specific inhalatory challenge test in subjects with diagnosed occupational asthma. *Int J Occup Med Environ Health* 2008; 21:219-25.
19. Adisesh LA, Kharitonov SA, Yates DH, Snashell DC, Newman-Taylor AJ, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide is increased in laboratory animal allergy. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:876-80.
20. Maniscalco M, Grieco L, Galdi A, Lundberg JO, Sofia M. Increase in exhaled nitric oxide in shoe and leather workers at the end of the work-shift. *Occup Med (Oxf)*. 2004;54:404-7.
21. Baur X, Barbinova L. Latex allergen exposure increases exhaled nitric oxide in symptomatic healthcare workers. *Eur Respir J* 2005;25:309-16.
22. Tan K, Bruce C, Birkhead A, Thomas PS. Nasal and exhaled nitric oxide in response to occupational latex exposure. *Allergy* 2001;56:627-32.
23. Barbinova L, Baur X. Increase in exhaled nitric oxide (eNO) after work-related isocyanate exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 2006;79:387-95.
24. Chow S, Campbell C, Sandrini A, Thomas PS, Johnson AR, Yates DH. Exhaled breath condensate biomarkers in asbestos-related lung disorders. *Respir Med* 2009;103:1091-97.

25. Koutsokera A, Loukides S, Gourgoulisian KI, Kostikas K. Biomarkers in the exhaled breath condensate of healthy adults: mapping the path towards reference values. *Curr Med Chem* 2008;15:620-30.
26. Ryter SW, Choi AMK. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide From Metabolism to Molecular Therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:251-60.
27. Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006;86:583-50.
28. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1693-722.
29. Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, Kharitonov SA, Cole PJ, Barnes PJ. Increased levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis-a new marker of oxidative stress. *Thorax* 1998; 53:867-70.
30. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533:222-39.
31. Zayasu K, Sekizawa K, Okinaga S, Yamaya M, Ohrui T, Sasaki H. Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1140-43.
32. Pearson P, Lewis S, Britton J, Fogarty A. Exhaled carbon monoxide levels in atopic asthma: A longitudinal study. *Respir Med* 2005;99:1292-6.
33. Deveci SE, Deveci F, Acik Y, Ozan AT. The measurement of exhaled carbon monoxide in healthy smokers and non-smokers. *Respir Med* 2004;98:551-6.
34. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ i sur. ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005;26:523-8.
35. Biernacki WA, Kharitonov SA, Biernacka HM, Barnes PJ. Effect of montelukast on exhaled leukotrienes and quality of life in asthmatic patients. *Chest* 2005;128:1958-1963.
36. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Resta O. I sur. Exhaled markers in the monitoring of airways inflammation and its response to steroid's treatment in mild persistent asthma. *Eur Journal Pharmacol* 2005;519:175-81.

37. Zacharasiewicz A, Erin EM, Bush A. Noninvasive monitoring of airway inflammation and steroid reduction in children with asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:155-160.
38. Gessner C, Scheibe R, Wotzel M i sur. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Res Med* 2005; 99:1229-40.
39. Montuschi P. Exhaled breath condensate analysis in patients with COPD. *Clin Chim Acta* 2005;356:22-34.
40. Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA i sur. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:6–14.
41. Cap P, Pehal F, Chladek J, Maly M. Analysis of exhaled leukotrienes in nonasthmatic adult patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergy* 2005;60:171-6.
42. Vass G, Huszar E, Augusztinovicz M i sur. The effect of allergic rhinitis on adenosine concentration in exhaled breath condensate. *Clin Exp Allergy* 2006;36:742-47.
43. Majewska E, Kasielski M, Luczynski R, Bartosz G, Bialasiewicz P, Nowak D. Elevated exhalation of hydrogen peroxide and thiobarbituric acid reactive substances in patients with community acquired pneumonia. *Resp Med* 2004;98:669-76.
44. Romero PV, Rodriguez B, Martinez S, Canizares R, Sepulveda D, Manresa F. Analysis of oxidative stress in exhaled breath condensate from patients with severe pulmonary infections. *Arch Bronconeumol* 2006;42:113-19.
45. Bonetto G, Corradi M, Carraro S i sur. Longitudinal monitoring of lung injury in children after acute chlorine exposure in a swimming pool. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:545-9.
46. Piotrowski WJ, Antczak A, Marczak J, Nawrocka A, Kurmanowska Z, Gorski P, Eicosanoids in exhaled breath condensate and BAL fluid of patients with sarcoidosis. *Chest* 2007;32:589-596.
47. Lehtonen H, Oksa P, Lehtimaki L i sur. Increased alveolar nitric oxide concentration and high levels of leukotriene B-4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate in patients with asbestosis. *Thorax* 2007;62:602-07.
48. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Carpagnano F. Endothelin-1 is increased in the breath condensate of patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology* 2004;66:180-4.

49. Gessner C, Kuhn H, Toepfer K, Hammerschmidt S, Schauer J, Wirtz H. Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2004;43:215-22.
50. Dupont LJ, Dewandeleer Y, Vanaudenaerde BM, Van Raemdonck DE, Verleden GM. The pH of exhaled breath condensate of patients with allograft rejection after lung transplantation. *Am J Transplant* 2006;6:1486-92.
51. Tate S, MacGregor G, Davis M, Innes JA, Greening AP. Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* 2002;57:926-9.
52. Carpagnano GE, Barnes PJ, Francis J, Wilson N, Bush A, Kharitonov SA. Breath condensate pH in children with cystic fibrosis and asthma: a new noninvasive marker of airway inflammation? *Chest* 2004;125:2005-10.
53. Rosias PPR, Den Hartog GM, Robroeks CMHHT. I sur. Free radicals in exhaled breath condensate in cystic fibrosis and healthy subjects. *Free Radic Res* 2006; 40:901-9.
54. Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G. I sur. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest* 2006;36:362-67.
55. Carpagnano GE, Resta O, Ventura MT i sur. Airway inflammation in subjects with gastro-oesophageal reflux and gastro-oesophageal reflux-related asthma. *J Intern Med* 2006;259:323-31.
56. Mise K, Capkun V, Jurcev-Savicevic A, Sundov Z, Bradaric A, Mladinov S. The influence of gastroesophageal reflux in the lung: a case-control study. *Respirology* 2010;15:837-42.
57. Carpagnano GE, Spanevello A, Sabato R, Depalo A, Turchiarelli V, Foschino Barbaro MP: Exhaled pH, exhaled nitric oxide, and induced sputum cellularity in obese patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Transl Res* 2008;151:45-50.
58. Vlašić Ž. (2010) Kondenzat izdaha kao komplementarna metoda u dijagnostičkoj procjeni djece s astmom i djece s gastroezofagealnom refluksnom bolešću. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
59. Maloča I, Plavec D. EBC analysis in diagnosing a lung disease. *Arh Hig Rada Toksikol* 2006;57:213-27.
60. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN i sur. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J* 2003;22:889-94.

61. Leung TF, Li CY, Yung E, Liu EK, Lam CW, Wong GW. Clinical and technical factors affecting pH and other biomarkers in exhaled breath condensate. *Pediatr Pulmonol* 2006;41:87-94.
62. Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A i sur. Normative data for pH of exhaled breath condensate. *Chest* 2006;129:426-30.
63. Inglis SK, Wilson SM, Olver RE. Secretion of acid and base equivalents by intact distal airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:855-62.
64. Effros RM, Dunning MB 3rd, Biller J, Shaker R. The promise and perils of exhaled breath condensates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:1073-80.
65. Borrill ZL, Smith JA, Naylor J, Woodcock AA, Singh D. The effect of gas standardisation on exhaled breath condensate pH. *Eur Respir J* 2006;28:251-2.
66. Effros RM, Casaburi R, Su J i sur. The effects of volatile salivary acids and bases on exhaled breath condensate pH. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:386-92.
67. Hunt JF, Fang KZ, Malik R i sur. Endogenous airway acidification - Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:694-9.
68. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;65:1364-70.
69. Hunt J. Exhaled breath condensate pH: reflecting acidification of the airway at all levels. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:366-7.
70. Varnai VM, Ljubicic A, Prester L, Macan J. Exhaled breath condensate pH in adult Croatian population without respiratory disorders: how healthy a population should be to provide normative data? *Arh Hig Rada Toksikol* 2009;60:87-97.
71. McCafferty JB, Bradshaw TA, Tate S, Greening AP, Innes JA. Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations. *Thorax* 2004;59:694-8.
72. Bloemen K, Lissens G, Desager K, Schoeters G. Determinants of variability of protein content, volume and pH of exhaled breath condensate. *Resp Med* 2007;101:1331-7.
73. Niimi A, Nguyen LT, Usmani O, Mann B, Chung KF. Reduced pH and chloride levels in exhaled breath condensate of patients with chronic cough. *Thorax* 2004;59:608-12.

74. Brooks SM, Haight RR, Gordon RL. Age does not affect airway pH and ammonia as determined by exhaled breath measurements. *Lung* 2006;184:195-200.
75. Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H i sur. Exhaled breath condensate acidification in acute lung injury. *Respir Med* 2003;97:1188–94.
76. Wells K, Vaughan J, Pajewski TN i sur. Exhaled breath condensate pH assays are not influenced by oral ammonia. *Thorax* 2005;60:27–31.
77. Borrill Z, Starkey C, Vestbo J, Singh D. Reproducibility of exhaled breath condensate pH in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005;25:269–274.
78. Carpagnano GE, Foschino Barbaro MP, Cagnazzo M. i sur. Use of exhaled breath condensate in the study of airway inflammation after hypertonic saline solution challenge. *Chest* 2006;130:321-31.
79. Soyer OU, Dizdar EA, Keskin O, Lilly C, Kalayci O. Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. *Allergy* 2006;61:1016-8.
80. Riediker M, Danuser B. Exhaled breath condensate pH is increased after moderate exercise. *J Aerosol Med.* 2007;20:13-8.
81. Hoffmeyer F, Harth V, Merget R. i sur. Exhaled breath condensate analysis: evaluation of a methodological setting for epidemiological field studies. *J Physiol Pharmacol* 2007;58:289-98.
82. Effros RM, Biller J, Foss B. i sur. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:1500–5.
83. Effros RM, Wahlen K, Bosbous M, et al. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:663–69.
84. Dwyer TM. Sampling airway surface liquid: Non-volatiles in the exhaled breath condensate. *Lung* 2004,182:241-50.
85. Almstrand AC, Bake B, Ljungström E i sur. Effect of airway opening on production of exhaled particles. *J Appl Physiol* 2010;108:584-88.
86. Schwarz K, Biller H, Windt H, Koch W, Hohlfeld JM. Characterization of Exhaled Particles from the Healthy Human Lung-A Systematic Analysis in Relation to Pulmonary Function Variables. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2010;23:371-9.
87. Bondesson E, Jansson LT, Bengtsson T, Wollmer P. Exhaled breath condensate—site and mechanisms of formation. *J Breath Res* 2009;3016005 (6pp)



88. Buck RP, Rondinini S, Covington AK. i sur. Measurement of pH. Definition, standards and procedures. *Pure Appl Chem.* 2002;74: 2169–2200.
89. Greenwald R, Ferdinands JM, Teague WG. Ionic determinants of exhaled breath condensate pH before and after exercise in adolescent athletes. *Pediatr Pulmonol* 2009;44:768-77.
90. Rolla G, Bruno M, Bommarito L. i sur. Breath analysis in patients with end-stage renal disease: effect of haemodialysis. *Eur J Clin Invest* 2008;38:728-33.
91. Ricciardolo FL, Rado V, Fabbri LM, Sterk PJ, Di Maria GU, Geppetti P. Bronchoconstriction induced by citric acid inhalation in guinea pigs: role of tachykinins, bradykinin, and nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:557-62.
92. Carraro S, Folesani G, Corradi M, Zanconato S, Gaston B, Baraldi E. Acid-base equilibrium in exhaled breath condensate of allergic asthmatic children. *Allergy.* 2005;60:476-481.
93. Kullmann T, Barta I, Lazar Z i sur. Exhaled breath condensate pH standardised for CO<sub>2</sub> partial pressure. *Eur Respir J* 2007;29:496-501.
94. Kharitonov SA, Barnes PJ: Exhaled biomarkers. *Chest.* 2006;130:1541-1546.
95. Ono E, Mita H, Taniguchi M. i sur. Comparison of cysteinyl leukotriene concentrations between exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Exp Allergy* 2008;38:1866-74.
96. Esther CR, Jasin HM, Collins LB, Swenberg JA, Boysen G. A mass spectrometric method to simultaneously measure a biomarker and dilution marker in exhaled breath condensate. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008;22:701-705.
97. Baker EH, Clark N, Brennan AL. i sur. Hyperglycemia and cystic fibrosis alter respiratory fluid glucose concentrations estimated by breath condensate analysis. *J Appl Physiol* 2007;102:1969-1975.
98. Vaughan W, Gaston B, MacDonald T. i sur. Acetic acid contributes to breath condensate acidity in asthma [sažetak]. *Eur Respir J* 2001;18:463S.
99. Dudeja PK, Hafez N, Tyagi S. i sur. Expression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>/HCO<sup>-3</sup> exchanger isoforms in proximal and distal human airways. *Am J Physiol* 1999;276:971-8.
100. Hughes JH, Chema S, Lin N, Conant RM, Hamparian VV. Acid lability of rhinoviruses: loss of C and D antigenicity after treatment at pH 3.0. *J Immun.* 1974;112:919-25.

101. McShane D, Davies JC, Davies MG, Bush A, Geddes DM, Alton EW. Airway surface pH in subjects with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2003;1:37-42.
102. Vass G, Huszar E, Barat E. i sur. Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am J Resp Crit Care Med* 2003;167:850-5.
103. Czebe K, Barta I, Antus B, Valyon M, Horváth I, Kullmann T. Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respir Med.* 2008;102:720-5.
104. Kullmann T, Barta I, Antus B, Valyon M, Horváth I. Environmental temperature and relative humidity influence exhaled breath condensate pH. *Eur Respir J.* 2008;31:474-5. Erratum in: *Eur Respir J.* 2008;31:912.
105. Koczulla AR, Noeske S, Herr C. I sur. Ambient temperature impacts on pH of exhaled breath condensate. *Respirology* 2010;15:155-159.
106. Guarnieri G, Ferrazzoni S, Scarpa MC, Lalli A, Maestrelli P. Effects of inhalation of thermal water on exhaled breath condensate in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration.* 2010;79:216-221.
107. Prieto L, Ferrer Am, Palop J, Domenech J, Llusar R, Rojas R. Differences in exhaled breath condensate pH measurements between samples obtained with two commercial devices. *Respir Med.* 2007;101:1715-1720.
108. Koczulla R, Dragonieri S, Schot R. sur. Comparison of exhaled breath condensate pH using two commercially available devices in healthy controls, asthma and COPD patients. *Respir Res.* 2009; 24;10:78.
109. Kullmann T, Barta I, Antus B, Horvath I. Drinking influences exhaled breath condensate acidity. *Lung* 2008;186:263-268.
110. Do R, Bartlett KH, Chu W. i sur. Within- and between-person variability of exhaled breath condensate pH and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in never and current smokers. *Respir Med* 2008;102:457-63.
111. Do R, Bartlett KH, Dimich-Ward H. i sur. Biomarkers of airway acidity and oxidative stress in exhaled breath condensate from grain workers. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178: 1048-54.
112. Hoffmeyer F, Raulf-Heimsoth M, Bruning T: Exhaled breath condensate and airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009;9:16-22.

113. Koczulla AR, Noeske S, Herr C. i sur. Acute and chronic effects of smoking on inflammation markers in exhaled breath condensate in current smokers. *Respiration* 2009;79: 61-7.
114. Papaioannou AI, Koutsokera A, Tanou K. i sur. The acute effect of smoking in healthy and asthmatic smokers. *Eur J Clin Invest* 2010;40:103-9.
115. Ljubičić Čalušći A, Varnai VM, Macan J. Acute effects of smoking and food consumption on breath condensate pH in healthy adults. *Exp Lung Res.* 2011;37: 92-100.
116. Singh SP, Kalra R, Puttfarcken P, Kozak A, Tesfaigzi J, Sopor ML: Acute and chronic nicotine exposures modulate the immune system through different pathways. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;164:65–72.
117. Laan M, Bozinovski S, Anderson GP: Cigarette smoke inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines by suppressing the activation of activator protein-1 in bronchial epithelial cells. *J Immunol* 2004;173:4164-70.
118. Mehta H, Nazzal K, Sadikot RT. Cigarette smoking and innate immunity. *Inflamm Res* 2008;57:497-503.
119. Hoffmann D, Hoffmann I: The changing cigarette: chemical studies and bioassays. In: Shopland DR, ed. Risks associated with smoking cigarettes with low machine-measured yields of tar and nicotine. US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute, Bethesda, MD; 2001:159-191.
120. Yeh MY, Burnham EL, Moss M, Brown LAS. Non-invasive evaluation of pulmonary glutathione in the exhaled breath condensate of otherwise healthy alcoholics. *Respir Med* 2008; 102:248-255.
121. Kullmann T, Barta I, Horváth I. Effect of freezing on exhaled breath condensate pH. *Respir Med* 2007;101:2566.
122. Cruz MJ, Sánchez-Vidaurre S, Romero PV, Morell F, Muñoz X. Impact of age on pH, 8-isoprostane, and nitrogen oxides in exhaled breath condensate. *Chest* 2009;135:462-7.
123. Moloney ED, Mumby SE, Gajdocsi R. i sur. Exhaled breath condensate detects markers of pulmonary inflammation after cardiothoracic surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:64–69.
124. Clary-Meinesz C, Mouroux J, Cosson J, Huitorel P, Blaive B. Influence of external pH on ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles. *Eur Respir J* 1998;11:330-3.

125. Holma B, Lindegren M, Andersen JM. pH effects on ciliomotility and morphology of respiratory mucosa. *Arch Environ Health* 1977;32:216-26.
126. Torrego A, Cimbollek S, Hew M, Chung KF. No effect of omeprazole on pH of exhaled breath condensate in cough associated with gastro-oesophageal reflux. *Cough* 2005;19;1-10.
127. Galea KS, Van Tongeren M, Sleuwenhoek AJ. i sur. Trends in wood dust inhalation exposure in the UK, 1985-2005. *Ann Occup Hyg* 2009;53:657-67.
128. Rylander R. Organic dust induced pulmonary disease- The role of mould derived B-glucan. *Ann Agric Environ Med* 2010;17:9-1.
129. Liebers V, Raulf-Heimsoth M, Bruning T. Health effects due to endotoxin inhalation *Arch Toxicol* 2008;82:203-210.
130. Eduard W. Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting . *Crit Rev Toxicol* 2009;39:799-864.
131. Huff J. Sawmill chemicals and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 2001;109:209-212.
132. Rusca S, Charriere N, Droz PO, Oppliger A. Effects of bioaerosol exposure on work-related symptoms among Swiss sawmill workers *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 81(4):415-421, 2008 Feb.
133. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon. Wood dust and formaldehyde. *Studies of Cancer in Humans* 1995;62: 1-72
134. Jacobsen G, Schaumburg I, Sigsgaard T, Schlunssen V. Non-malignant respiratory disease and occupational exposure to wood dust. Part I. Fresh wood and mixed wood industry. *Ann Agr Env Med* 2010;17:15-28.
135. Demers PA, Teschke K, Kennedy SM. What to do about softwood- A review of respiratory effects and recommendations regarding exposure limits. *Am J Ind Med* 1997;31: 385-98.
136. Vedal S, Enarson DA, Chan H, Ochnio J, Tse KS, Chan-Yeung M. A longitudinal study of the occurrence of bronchial hyperresponsiveness in western red cedar workers. *Am Rev Resp Disease* 1988;137:651-5.

137. Chan-Yeung M, Ashley MJ, Corey P, Willson G, Dorken E, Grzybowski S. A respiratory survey of cedar mill workers. I. Prevalence of symptoms and pulmonary function abnormalities. *J Occup Med* 1978; 20:323–327.
138. Bohadana AB, Massin N, Wild P, Toamain JP, Engel S, Goutet P. Symptoms, airway responsiveness, and exposure to dust in beech and oak wood workers. *Occup Environ Med* 2000;57:268-273.
139. Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: Reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:379-392.
140. Currie CG, McCallum K, Poxton IR. Mucosal and systemic antibody responses to the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157 in health and disease. *J Med Microbiol* 2001;50:345-54.
141. Mueller M, Lindner B, Kusumoto S, Fukase K, Schromm AB, Seydel U. Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J Biol Chem* 2004;279:26307-13.
142. Rylander R. Endotoxin in the environment - exposure and effects. *Endotox Res* 2002; 8:241-52.
143. Reed CE, Milton DK, Rylander R. Endotoxin in the environment - exposure and effects. *Endotox Res* 2002;8:241-52.
144. Fishwick D, Barber C, Beckett P, Bradshaw LM, Rawbone R, Curran AD. Immunologic response to inhaled endotoxin: changes in peripheral cell surface markers in normal individuals. *J Occup Environ Med*. 2004;46:467-72.
145. Simpson JC, Niven RM, Pickering CA, Fletcher AM, Oldham LA, Francis HM. Prevalence and predictors of work related respiratory symptoms in workers exposed to organic dusts. *Occup Environ Med* 1998;55:668-72.
146. Vandebulcke L, Bachert C, Van Cauwenberge P, Claeys S. The innate immune system and its role in allergic disorders. *Int Arch All Imm* 2006;139:159-165.
147. Radon K. The two sides of the "endotoxin coin". *Occup Environ Med*. 2006; 63:73-78.
148. Von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R. i sur. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1230-34.
149. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U. i sur. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *New Engl J Med* 2002;347:869-77.

150. Eduard W, Omenaas E, Bakke PS, Douwes J, Heederik D. Atopic and non-atopic asthma in a farming and a general population. *Am J Ind Med* 2004;46:396-99.
151. Mastrangelo G, Grange JM, Fadda E, Fedeli U, Buja A, Lange JH. Lung cancer risk: Effect of dairy farming and the consequence of removing that occupational exposure. *Am J Epidem* 2005;161:1037-46.
152. Lange JH. Reduced cancer rates in agricultural workers: a benefit of environmental and occupational endotoxin exposure. *Med Hypoth* 2000;55:383-385.
153. Radon K, Danuser B, Iversen M. i sur. Air contaminants in different European farming environments. *Ann Agric Environ Med* 2002;9:41-48.
154. Dutch Expert Committee on Occupational Standards (DECOS). Health-based recommended occupational exposure limit for endotoxins. Publication no. 1998/03WGD. Rijswijk: Health Council of the Netherlands; 1998.
155. Miller JD. Fungi as contaminants in indoor air. *Atmos Environ* 1992;26:2163-2172.
156. Sorenson WG. Fungal spores: Hazardous to health? *Environ Health Perspect* 1999 107:469-72.
157. Ashley MJ, Corey P, Chan-Yeung M, MacLean L, Maledy H, Grzybowski S. A respiratory survey of cedar mill workers. II. Influence of work-related and host factors on the prevalence of symptoms and pulmonary function abnormalities. *J Occup Med* 1978;20:328-32.
158. Melville AM, Pless-Mulloli T, Afolabi OA, Stenton SC. COPD prevalence and its association with occupational exposures in a general population. *Eur Resp J* 2010 36:488-493.
159. 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;16:5-40.
160. Kaić Rak A, Antonić K: Tablice o sastavu hrane i pića. Zavod za zaštitu zdravlja SR Hrvatske, Zagreb, 1990.
161. Puntaric D, Kos A, Smit Z. i sur. Wood dust exposure in wood industry and forestry *Coll Anthropol* 2005;29:207-11.

162. Varnai VM, Macan J, Plavec D, Jureša D. Endotoxin level measurement in the house dust by the end-point *Limulus amoebocyte lysate* method. *Arh Hig Rada Toksikol* 2004;55:175-81.
163. Milton DK, Johnson DK, Park JH. Environmental endotoxin measurement - interference and sources of variation in the *Limulus* assay of house dust. *Am Ind Hyg Assoc J* 1997;58:861-867.
164. Šegvić Klarić M, Pepeljnjak S. A year-round aeromycological study in Zagreb area, Croatia. *Ann Agric Environ Med* 2006;13:55-64.
165. Prester LJ, Brčić Karačonji I, Macan J. Determination of mite allergens in house dust using the enzyme immunoassay. *Arh Hig Rada Toksikol* 2007;58:413-19.
166. Luczynska CM, Arruda LK, Platts-Mills TA, Miller JD, Lopez M, Chapman MD. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, Der p 1 and Der f 1. *J Immunol Methods* 1989;118:227-35.
167. Rylander R, Peterson Y, Donham KJ. Questionnaire evaluating organic dust exposure. *Am J Ind Med* 1990;17:121-6.
168. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V. i sur. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Resp J.* 2005; 26:948-68.
169. Dreborg S, Frew A. Position paper - Allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993;48:49-82.
170. Aberer W, Kranke B. Measurement of IgE antibodies using liquid allergens - an inter-method and inter-laboratory quality assessment. *Wien Klin Wochen* 2002;114:929-37.
171. Boyce PD, Kim JY, Weissman DN, Hunt J, Christiani DC. pH increase observed in exhaled breath condensate from welding fume exposure. *J Occup Environ Med* 2006;48:353-356.-  
do tu poredane ref
172. Xue Y, Morris M, Ni LS. i sur. Venous plasma nicotine correlates of hormonal effects of tobacco smoking. *Pharmacol Biochem Behav* 2010;95:209-15.
173. Ussher M, West R, Evans P, Steptoe A, McEwen A, Clow A, Hucklebridge F. Reduction in cortisol after smoking cessation among users of nicotine patches. *Psychosom Med* 2006;68:299-306.

174. Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G. i sur. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1175-77.
175. Garey K, Neuhauser MM, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Chest* 2004;125:22–26.
176. Guatura SB, Martinez JA, Santos Bueno PC, Santos ML. Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption. *Sao Paulo Med J*. 2000;118:93–98.
177. Nowak D, Kalucka S, Bialasiewicz P, Krol M. Exhalation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med* 2001;30:178-186.
178. Nowak D, Antczak A, Krol M. i sur. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J* 1996;9:652–57.
179. Seeman JI, Carchman RA. The possible role of ammonia toxicity on the exposure, deposition, retention, and the bioavailability of nicotine during smoking. *Food Chem Toxicol* 2008;46:1863-81.
180. Willems EW, Rambali B, Vleeming W, Opperhuizen A, van Amsterdam JG. Significance of ammonium compounds on nicotine exposure to cigarette smokers. *Food Chem Toxicol* 2006;44:678-688.
181. van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004;59:713-21.
182. van der Vaart H, Postma DS, Timens W. i sur. Acute effects of cigarette smoking on inflammation in healthy intermittent smokers. *Respir Res* 2005;6:18-22.
183. Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *J Immunol* 2001;167:6518-24.
184. Ouyang Y, Virasch N, Hao P. i sur. Suppression of human IL-1beta, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha production by cigarette smoke extracts. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:280–87.



185. Gianazza E, Allegra L, Bucchioni E. i sur. Increased keratin content detected by proteomic analysis of exhaled breath condensate from healthy persons who smoke. *Am J Med.* 2004;117:51–54.
186. Kelsen SG, Duan X, Ji R. i sur. Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: a proteomic approach. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:541–550.
187. Bloemen K, Hooyberghs J, Desager K, Witters E, Schoeters G: Non-invasive biomarker sampling and analysis of the exhaled breath proteome. *Proteomics Clin Appl* 2009;3:498–504.
188. Steiling K, Kadar AY, Bergerat A. i sur. Comparison of proteomic and transcriptomic profiles in the bronchial airway epithelium of current and never smokers. *PLoS One* 2009;4:e5043. doi: 10.1371/journal.pone.0005043.
189. Saltzman AA, Salzano JV. Effects of carbohydrate metabolism on respiratory exchange in normal men. *J Appl Physiol* 1971;30:228-31.
190. Efthimiou J, Mounsey PJ, Benson DN, Madgwick R, Coles SJ, Benson KM. Effect of carbohydrate rich versus fat rich loads on gas exchange and walking performance in patients with chronic obstructive lung disease. *Thorax* 1992;47:451-456.
191. Marek E, Muckenhoff K, Streckert HJ, Becher G, Marek W. Measurements of L-lactate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in exhaled breath condensate at rest and mild to moderate exercise in young and healthy subjects. *Pneumologie* 2008;62:541-517.
192. Hunt J. Exhaled breath condensate pH – Reply. *Eur Resp J* 2004; 23:962.
193. Covelli HD, Black JW, Olsen MS, Beekman JF. Respiratory failure precipitated by high carbohydrate loads. *Ann Intern Med* 1981;95:579-81.
194. Vitacca M, Callegari G, Sarv  M. i sur. Physiological effects of meals in difficult-to-wean tracheostomised patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Intensive Care Med* 2005;31:236-242.
195. Lopez de Bocanera ME, Koss de Stisman MA, Bru de Labanda E, Chervonagura de Gepner A: Statistical analysis of salivary pH changes after the intake of black tea and yerba mate supplemented with sweeteners. *J Oral Sci* 1999;41:81-85.
196. Avsar A, Darka O, Topaloglu B, Bek Y. Association of passive smoking with caries and related salivary biomarkers in young children. *Arch Oral Biol* 2008;53:969-74.

197. Moazzez R, Smith BGN, Bartlett DW. Oral pH and drinking habit during ingestion of a carbonated drink in a group of adolescents with dental erosion. *J Dent* 2000;28:395-397.
198. Hou W, Schubert ML. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:593-98.
199. Wu WKK, Cho CH. The pharmacological actions of nicotine on the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci* 2004;94:348 –58.
200. Rubach M, Lang R, Hofmann T, Somoza V. Time-dependent component-specific regulation of gastric acid secretion-related proteins by roasted coffee constituents. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1126:310-14.
201. Huang JQ, Hunt RH. pH, healing rate, and symptom relief in patients with GERD. *Yale J Biol Med* 1999;72:181-94.
202. Gressner OA. About coffee, cappuccino and connective tissue growth factor-Or how to protect your liver!? *Environ Toxicol & Pharmacol* 2009;28:1-10.
203. Tunnicliffe JM, Erdman KA, Reimer RA, Lun V, Shearer J. Consumption of dietary caffeine and coffee in physically active populations: physiological interactions. *Appl Physiol Nutri Metabol* 2008;33:1301-10.
204. de Laurentiis G, Paris D, Melck D. *i sur*.Metabonomic analysis of exhaled breath condensate in adults by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Eur Respir J*. 2008;32:1175–1183.
205. Mandryk J, Alwis KU, Hocking AD. Effects of personal exposures on pulmonary function and work-related symptoms among sawmill workers. *Ann Occup Hyg* 2000;44:281-89.
206. Rylander R, Carvalheiro MF. Airways inflammation among workers in poultry houses. *Int Arch Occup Environ Health*. 2006;79:487–90.
207. Alwis KU, Mandryk J, Hocking AD. Exposure to biohazards in wood dust: bacteria, fungi, endotoxins, and (1-->3)-beta-D-glucans. *Appl Occup Environ Hyg*. 1999; 14:598-608.
208. Duchaine C, Thorne PS, Mériaux A. *i sur*. Comparison of endotoxin exposure assessment by bioaerosol impinger and filter-sampling methods. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:2775-80.
209. Douwes J, McLean D, van der Maarl E, Heederik D, Pearce N. Worker exposures to airborne dust, endotoxin and beta(1,3)-glucan in two New Zealand sawmills. *Am J Ind Med* 2000;38:426-30.

210. Dennekamp M, Demers P, Bartlett K, Davies H, Teschke K. Endotoxin exposure among softwood lumber mill workers in the Canadian province of British Columbia. *Ann Agric Environ Med.* 1999;6:141-6.
211. Rongo LMB, Msamanga GI, Burstyn I, Barten F, Dolmans WM, Heederik D. Exposure to wood dust and endotoxin in small-scale wood industries in Tanzania. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 2004;14:544-50.
212. Cormier Y, Meriaux A, Duchaine C. Respiratory health impact of working in sawmills in eastern Canada. *Arch Environ Health.* 2000;55:424-30.
213. Park JH, Spiegelman DL, Burge HA. i sur. Longitudinal study of dust and airborne endotoxin in the home. *Environ. Health Perspect.* 2000;108:1023–28.
214. Hyvärinen A, Roponen M, Tiittanen P. i sur. Dust sampling methods for endotoxin – an essential, but underestimated issue. *Indoor Air* 2006;16:20-7.
215. Hines CJ, Waters MA, Larsson L, Petersen MR, Saraf A, Milton DK. Characterization of endotoxin and 3-hydroxy fatty acid levels in air and settled dust from commercial aircraft cabins. *Indoor Air* 2003;13:166-73.
216. Rao CY, Cox-Ganser JM, Chew GL, Doekes G, White S. Use of surrogate markers of biological agents in air and settled dust samples to evaluate a water-damaged hospital. *Indoor Air.* 2005;15:89-97.
217. Dutkiewicz J, Krysinska-Traczyk E, Prazmo Z, Skorska C, Sitkowska J. Exposure to airborne microorganisms in polish sawmills. *Ann Agric Environ Med.* 2001;8:71-80.
218. Dahlqvist M, Johard U, Alexandersson R. i sur. Lung function and precipitating antibodies in low exposed wood trimmers in Sweden. *Am J Ind Med.* 1992;21:549-59.
219. Simeray J, Mandin D, Chaumont JP. An aeromycological study of sawmills - effects of type of installation and timber on mycoflora and inhalation hazards for workers. *Int Biodet Biodeg.* 1997;40:11-17.
220. Duchaine C, Meriaux A, Thorne PS, Cormier Y. Assessment of particulates and bioaerosols in eastern Canadian sawmills. *Aihaj.* 2000;61:727-32.
221. Heida H, Bartman F, van der Zee SC. Occupational exposure and indoor air quality monitoring in a composting facility. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1995;56:39-43.
222. Lugauskas A, Krikstaponis A, Sveistyte L. Airborne fungi in industrial environments - Potential agents of respiratory diseases. *Ann Agric Environ Med.* 2004;11:19-25.

223. Halpin DM, Graneek BJ, Lacey J. i sur. Respiratory symptoms, immunological responses, and aeroallergen concentrations at a sawmill. *Occup Environ Med.* 1994;51:165–72.
224. Yang DQ. Isolation of wood-inhabiting fungi from Canadian hardwood logs. *Can J Microb.* 2005;51:1-6.
225. Fransman W, McLean D, Douwes J, Demers PA, Leung V, Pearce N: Respiratory symptoms and occupational exposures in New Zealand plywood mill workers. *Ann Occup Hyg* 2003;47:287–95.
226. Hessel PA, Herbert FA, Melenka LS. i sur. Lung health in sawmill workers exposed to pine and spruce. *Chest.* 1995;108:642–46.
227. Kern J, Mustajbegović J, Schachter EN. i sur. Respiratory findings in farmworkers. *J Occup Environ Med.* 2001;43:905-13.
228. Global strategy for asthma management and prevention. Global initiative for asthma (GINA). Dostupno na: <http://www.ginasthma.org>. 2011; 2011.
229. Žuškin E, Smolej Narančić N, Škarić-Jurić T. i sur. Chronic respiratory symptoms in Croatian Adriatic island metapopulations. *Cro Med J.* 2006;47:627-34.
230. Douwes J, McLean D, Slater T, Pearce N. Asthma and other respiratory symptoms in New Zealand pine processing sawmill workers. *Am J Ind Med.* 2001;39:608-15.
231. Glindmeyer HW, Rando RJ, Lefante JJ, Freyder L, Brisolaro JA, Jones RN: Longitudinal respiratory health study of the wood processing industry. *Am J Ind Med* 2008;51:595–609.
232. Shamssain MH. Pulmonary function and symptoms in workers exposed to wood dust. *Thorax.* 1992;47:84-7.
233. Rastogi SK, Gupta BN, Husain T, Mathur N. Respiratory health effects from occupational exposure to wood dust in sawmills. *Am Indu Hyg Assoc J.* 1989;50:574-8.
234. Hedenstierna G, Alexandersson R, Belin L, Wimander K, Rosén G. Lung function and rhizopus antibodies in wood trimmers. A cross-sectional and longitudinal study. *Int Arch Occup Environ Health.* 1986;58:167-77.
235. Johard U, Eklund A, Dahlqvist M, Ahlander A, Alexandersson R, Ekholm U, Tornling G, Ulfvarsson U. Signs of alveolar inflammation in non-smoking Swedish wood trimmers. *Brit J Ind Med.* 1992;49:428-34.
236. Douwes J, McLean D, Slater T. i sur. Pine dust, atopy and lung function: a crosssectional study in sawmill workers. *Eur Respir J* 2006; 28:791–98.

237. Dahlgvist M, Ulfvarson U. Acute effects on forced expiratory volume in one second and longitudinal change in pulmonary function among wood trimmers. *Am J Ind Med.* 1994 ;25:551-8.
238. American Thoracic Society/Medical section of the American Lung Association: Respiratory Health Hazards in Agriculture. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158: pp S1–S76.
239. Gandevia B. Ventilatory capacity during exposure to western red cedar. *Arch Environ Health.* 1970 Jan;20(1):59-63
240. Kainu A, Lindqvist A, Sarna S, Lundback B, Sovijarvi A. FEV1 response to bronchodilation in an adult urban population. *Chest* 2008;134:387-393.
241. Johannessen A, Lehmann S, Omenaas ER, Eide GE, Bakke PS, Gulsvik A. Post-bronchodilator spirometry reference values in adults and implications for disease management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:1316-1325.
242. Montes de Oca M, Perez-Padilla R, Tálamo C. i sur. PLATINO Team. Acute bronchodilator responsiveness in subjects with and without airflow obstruction in five Latin American cities: the PLATINO study. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010;23:29-35.
243. Macan J, Varnai VM, Maloca I, Kanceljak-Macan B. Increasing trend in atopy markers prevalence in a Croatian adult population between 1985 and 1999. *Clin Exp Allergy.* 2007;37:1756-63.
244. Macan J, Mustac M, Talijancic A, Cvitanovic S, Milkovic-Kraus S. Exposure and allergy to dust mites in general and working environment in Croatia. *Arh Hig Rad Toksikol.* 2004;55:183-92.
245. Dutkiewicz J, Skorska C, Krysinska-Traczyk E. i. sur. Response of sawmill workers to work-related airborne allergens. *Ann Agr Env Med* 2001;8:81-90.
246. Carosso A, Ruffino C, Bugiani M: Respiratory diseases in wood workers. *Br J Ind Med* 1987; 44:553-561.
247. Rydjord B. Eduard W. Stensby B. Sandven P. Michaelsen TE. Wiker HG. Antibody response to long-term and high-dose mould-exposed sawmill workers. *Scand J Immunol* 2007;66:711-18.
248. Loureiro G, Rabaça MA, Blanco B. i sur. Urban versus rural environment – any differences in aeroallergens sensitization in an allergic population of Cova da Beira, Portugal? *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2005;37:187-93.

249. Nordling E, Berglind N, Melén E, Emenius G, Hallberg J, Nyberg F, Pershagen G, Svartengren M, Wickman M, Bellander T. Traffic-related air pollution and childhood respiratory symptoms, function and allergies. *Epidemiology*. 2008. May; 19(3): 401-8.
250. Motta AC, Marliere M, Peltre G, Sterenberg PA, Lacroix G. Traffic-related air pollutants induce the release of allergen-containing cytoplasmic granules from grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol.*, Epub 2006 Feb 20.; 139(4): 294-8
251. Fireman E, Lerman Y, Stark M. i sur. Detection of occult lung impairment in welders by induced sputum particles and breath oxidation. *Am J Ind Med* 2008;51:503-11.
252. Gube M, Ebel J, Brand P i sur. Biological effect markers in exhaled breath condensate and biomonitoring in welders: impact of smoking and protection equipment. *Int Arch Occup Environ Health* 2010;83:803-11.
253. Tanigawa T, Takehashi H, Nakata A. Naive (CD4 $\beta$ CD45RA $\beta$ ) T cell subpopulation is susceptible to various types of hazardous substances in the workplace. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004;17:109–114.
254. Shore SA, Fredberg JJ. Obesity, smooth muscle, and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:925–27.
255. Brunetti L, Francavilla R, Tesse R, Strippoli A, Polimeno L, Loforese A, Miniello VL, Armenio L. Exhaled breath condensate pH measurement in children with asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17:422-7.
256. Johannessen A. Eagan TML. Omenaas ER. Bakke PS. Gulsvik A. Socioeconomic risk factors for lung function decline in a general population. *Eur Resp J*. 2010; 36:480-487.
257. Hoffmeyer F, Harth V, Bunger J, Bruning T, Raulf-Heimsoth M. Leukotriene B<sub>4</sub>, 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub> alpha, and pH in exhaled breath condensate from asymptomatic smokers. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60:57-60.
258. Williams PB. Critical analysis of studies concerning reports of respiratory sensitization to certain wood dusts. *Allergy Asthma Proc*. 2005;26:262-7.
259. Bornholdt J. Saber AT. Sharma AK. Savolainen K. Vogel U. Wallin H. Inflammatory response and genotoxicity of seven wood dusts in the human epithelial cell line A549. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2007;632:78-88.
260. van Kampen V, Merget R, Baur X. Occupational Airway Sensitizers: An Overview on The Respective Literature. *Am J Ind Med* 2000;38:164-218.

261. Sikkeland LIB, Haug T, Stangeland AM. i sur. Airway inflammation in paper mill workers. *J Occup Environ Med.* 2007;49:1135-42.
262. Sikkeland LIB, Eduard W, Stangeland AM. i sur. Occupational exposure to bacterial single cell protein induces inflammation in lung and blood. *Inhalation Toxicology.* 21(8-11):674-681, 2009
263. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 2002; 111:635–646.
264. Dragonieri S. Musti M. Izzo C. Esposito LM. Barbaro MPF. Resta O. Spanevello A. Sputum induced cellularity in a group of traffic policemen. *Sci Tot Environ.* 2006;367:433-36.
265. Sundblad BM, Larsson BM, Palmberg L, Larsson K. Exhaled nitric oxide and bronchial responsiveness in healthy subjects exposed to organic dust. *Eur Respir J.* 2002 ;20:426-31.
266. Maniscalco M. Di Mauro V. Farinaro E. Carratu L. Sofia M. Transient decrease of exhaled nitric oxide after acute exposure to passive smoke in healthy subjects. *Arch Environ Health.* 2002;57:437-440.
267. Fell AK, Notø H, Skogstad M. i sur. A cross-shift study of lung function, exhaled nitric oxide and inflammatory markers in blood in Norwegian cement production workers. *Occup Environ Med.* 2011 Feb 5.
268. Demange V, Bohadana A, Massin N, Wild P. Exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness in workers: a preliminary study in lifeguards. *BMC Pulm Med.* 2009;31;9:53.

# PRILOZI

## Prilog 1. Zdravstveni upitnik

### OPĆI PODACI

ID

Datum pregleda: \_\_\_\_\_

Prezime i ime: \_\_\_\_\_

Datum rođenja: \_\_\_\_\_ Spol : M  Ž

### STANOVANJE:

Adresa: \_\_\_\_\_

Telefon: \_\_\_\_\_ U gradu  U selu

### ZANIMANJE

Naziv zanimanja \_\_\_\_\_

Školska sprema:            nezavršena osnovna škola     NKV     PKV     KV     SSS     VŠS     VSS   
nešto drugo \_\_\_\_\_

### ZAPOSLLENJE

Naziv poduzeća \_\_\_\_\_

Adresa poduzeća \_\_\_\_\_

Naziv sadašnjeg zaposlenja \_\_\_\_\_

God. radnog staža:

Koliko dana u tjednu radite?

Koliko sati dnevno radite?

Koje poslove obavljate (koliko sati)?

Nosite li zaštitna sredstva?

DA

Koja? \_\_\_\_\_

Koliko često? \_\_\_\_\_

NE



## PRETHODNA ZAPOSLENJA

Naziv poduzeća \_\_\_\_\_ God. radnog staža

Naziv poduzeća \_\_\_\_\_ God. radnog staža

Naziv poduzeća \_\_\_\_\_ God. radnog staža

Ukupni radni staž na svim poslovima

## ZDRAVSTVENI UPITNIK

### 1. SADAŠNJE TEGOBE

Da li ste sada bolesni DA NE  
(navesti bolest) \_\_\_\_\_  
(gastrične tegobe) \_\_\_\_\_

Da li sada uzimate lijekove DA NE  
(koje) \_\_\_\_\_

### 2. TEGOBE S OČIMA

#### Tegobe na radnom mjestu

	Ikada		U zadnjih 12 mj.		Bolje vikendom i praznicima	
Svrbež očiju	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Suzenje očiju	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Crvenilo očiju	DA	NE	DA	NE	DA	NE

#### Tegobe izvan posla

	Ikada		U zadnjih 12 mj.	
Svrbež očiju	DA	NE	DA	NE
Suzenje očiju	DA	NE	DA	NE
Crvenilo očiju	DA	NE	DA	NE

### 3. TEGOBE S NOSOM

#### Tegobe na radnom mjestu

	Ikada		U zadnjih 12 mj.		Bolje vikendom i praznicima	
Otežano disanje	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Iscjedak	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Kihanje	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Svrbež	DA	NE	DA	NE	DA	NE

#### Tegobe izvan posla

	Ikada		U zadnjih 12 mj.	
Otežano disanje	DA	NE	DA	NE
Iscjedak	DA	NE	DA	NE
Kihanje	DA	NE	DA	NE
Svrbež	DA	NE	DA	NE

#### 4. TEGOBE U PRSIMA (PLUĆIMA)

Tegobe na radnom mjestu

	Ikada		U zadnjih 12mj		>3mj/god >2god/	Bolje vik.i praznicima	
Kašalj suhi	DA	NE	DA	NE		DA	NE
Kašalj s iskašljajem	DA	NE	DA	NE	DA NE DA NE	DA	NE
Stezanje u prsima	DA	NE	DA	NE		DA	NE
Sipljenje u prsima	DA	NE	DA	NE		DA	NE
Otežano disanje (mirov.)	DA	NE	DA	NE		DA	NE
Otežano disanje (napor)	DA	NE	DA	NE		DA	NE
Promuklost	DA	NE	DA	NE		DA	NE
Povišena temperatura	DA	NE	DA	NE		DA	NE

Tegobe izvan posla

	Ikada		U zadnjih 12mj		>3mj/god>2god
Kašalj suhi	DA	NE	DA	NE	
Kašalj s iskašljajem	DA	NE	DA	NE	DA NE/DA NE
Stezanje u prsima	DA	NE	DA	NE	
Sipljenje u prsima	DA	NE	DA	NE	
Otežano disanje (mirov.)	DA	NE	DA	NE	
Otežano disanje (napor)	DA	NE	DA	NE	
Promuklost	DA	NE	DA	NE	
Povišena temperatura	DA	NE	DA	NE	

#### 5. TEGOBE S KOŽOM

Tegobe na radnom mjestu

	Ikada		U zadnjih 12 mj.		Bolje vikendom i praznicima	
Svrbež	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Crvenilo	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Osip	DA	NE	DA	NE	DA	NE
*Ekcem	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Koprivnjača	DA	NE	DA	NE	DA	NE

Tegobe izvan posla

	Ikada		U zadnjih 12 mj.	
Svrbež	DA	NE	DA	NE
Crvenilo	DA	NE	DA	NE
Osip	DA	NE	DA	NE
Ekcem	DA	NE	DA	NE
Koprivnjača	DA	NE	DA	NE

\*vodeni mjehurići koji svrbe,pucanje kože

## 6. OSTALE TEGOBE

Tegobe na radnom mjestu

	Ikada		U zadnjih 12 mj.		Bolje vikendom i praznicima	
Groznica	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Temperatura	DA	NE	DA	NE	DA	NE
Bolovi u zglobovima	DA	NE	DA	NE	DA	NE

Tegobe izvan posla

	Ikada		U zadnjih 12 mj.	
Groznica	DA	NE	DA	NE
Temperatura	DA	NE	DA	NE
Bolovi u zglobovima	DA	NE	DA	NE

### • DOSADAŠNJE TEGOBE

			Utvrдио liječnik	
Upala sinusa	DA	NE	DA	NE
Upala pluća	DA	NE	DA	NE
Astma	DA	NE	DA	NE
Peludna hunjavica	DA	NE	DA	NE
Kožne alergije	DA	NE	DA	NE
TBC	DA	NE	DA	NE
Drugo	<input type="text"/>			
	<input type="text"/>			

Obiteljska anamneza \_\_\_\_\_

## 8. PUŠENJE

Puшите li: DA NE

Broj cig. dnevno

Broj god. pušenja

Pušački indeks

Jeste li prije pušili: DA NE

Koliko god. ne puši

Koliko cigareta dnevno je pušio

Koliko godina je pušio

Pušački indeks

## 7. FIZIKALNI PREGLED

Krvni tlak: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg

Visina: \_\_\_\_\_

Puls: \_\_\_\_\_

Težina: \_\_\_\_\_

Ždrijelo:

Pluća:

Srce:

Koža:

Ostalo:

KI

Vrijeme i vrsta zadnjeg obroka \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Vrijeme, vrsta, količina zadnjeg pića, kave \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Vrijeme zadnje cigarete, koliko cigareta od jutra, zadnjih sat vremena \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ŽIVOTOPIS

Anita Ljubičić Čalušić, dr. med. rođena je 29.04.1970. u Zagrebu gdje je završila Srednju medicinsku školu-Farmaceutski smjer. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1988. godine te je diplomirala 24.12. 1994. godine. Pripravnički staž odradila je u Gradskom zavodu za javno zdravstvo grada Zagreba od 1995-1997. godine. Nakon položenog Državnog stručnog ispita počinje raditi u Ministarstvu obrane RH kao liječnik u primarnoj zdravstvenoj zaštiti-Ambulanta Borongaj. Početkom 1998. godine upisuje Poslijediplomski stručni studij iz „Ultrazvuka u gastroenterologiji i hepatologiji“. U Ministarstvu obrane radila je do 2004. godine kada odlazi na mjesto višeg stručnog savjetnika u Odjel za primarnu zdravstvenu zaštitu Ministarstva zdravstva RH u kojem vodi brojna stručna povjerenstva s ciljem poboljšanja pružanja zdravstvene zaštite na raznim stručnim područjima, a između ostalih i na području medicine rada. Koordinator je MATRA projekta Nizozemske kraljevine “Strengthening of Croatian Institute of Occupational Health “ ispred Ministarstva zdravstva. Tijekom svog rada u Ministarstvu zdravstva upisuje Doktorski studij iz Biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu sveučilišta u Zagrebu 2005. godine. Istraživanje koje je prijavila u Doktorskoj dizertaciji provela je u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u periodu od 2007-2010. gdje je trenutno zaposlena na radnom mjestu asistent na projektu „Alergotoksični učinci čimbenika općeg i radnog okoliša“ odobrenog od MZOŠ (br. 022-0222411-2410; Klasa: 402-07/06-08/02790; Ur. br.: 533-08-07-0002). Pored znanstveno istraživačkog rada, stručno je aktivna u Centru za kontrolu otrovanja - 24-satnoj informacijskoj službi koja pruža stručne informacije kako zdravstvenim djelatnicima, tako i pravnim i fizičkim osobama u slučaju akutnih otrovanja u Republici Hrvatskoj.

Autor je stručnih i znanstvenih radova, a član je Hrvatske liječničke komore i Hrvatskog toksikološkog društva.

Udana je i ima dvoje djece.

## POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

### Izvorni znanstveni članci

1. Ljubičić Ćalušić A., Varnai VM, Macan J. Acute effects of smoking and food consumption on breath condensate pH in healthy adults. *Exp Lung Res* 2011; 37:97-100.
2. Varnai V.M, Macan J, Ljubičić Ćalušić A. Prester LJ, Kanceljak Macan B. Upper respiratory impairment in restorers of cultural heritage. *Occup Med (Lond)* 2011; 61:45-52.
3. Varnai VM. Ljubičić Ćalušić A. Prester L. Macan J. Exhaled breath condensate pH in adult Croatian population without respiratory disorders: how healthy a population should be to provide normative data? *Arh Hig Rada Toksikol* 2009;60(1)87-97.
4. Filipović-Grčić B, Kniewald H, Grizelj Šovagović R, Rodin U, Ninković Dorotea, Peter B, Juretić E, Vuković J, Stipanović-Kastelić J, Filija A, Ljubičić-Ćalušić A. Mortalitet novorođenčadi u Republici Hrvatskoj u 2005. godini. *Gynecol Perinatol* 2006;15(4):240-247.

### Stručni radovi

1. Ljubičić Ćalušić A., Turk R, Macan J. Profesionalna otrovanja zabilježena u Centru za kontrolu otrovanja Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada tijekom 2008. godine (*Sigurnost* (2009) 51; 3: 285-287)
2. Ljubičić Ćalušić A., Turk R, Macan J. Profesionalna otrovanja zabilježena u Centru za kontrolu otrovanja Instituta za medicinska istraživanja medicine rada tijekom 2009. godine (*Sigurnost* (2010) 52; 2: 197-199)

### Sažeci kongresnih priopćenja

1. Ljubičić A., Golubić R, Milošević M, Golubić K, Mustajbegović J. Diving-what to tell the patients with asthma and why? *Proceedings of 2<sup>nd</sup> Congress of the Alps-Adria Working Community on Maritime, Undersea, and Hyperbaric Medicine*; 18.-21. Oct 2006, Zadar, Croatia. *Book of Proceedings* page No.57
2. Golubić R, Milošević M, Golubić K, Ljubicic A., Mustajbegović J. Short and long term effects of diving on the lung *Proceedings of 2<sup>nd</sup> Congress of the Alps-Adria Working Community on Maritime, Undersea, and Hyperbaric Medicine*; 18.-21. Oct 2006, Zadar, Croatia. *Book of Proceedings* page No.97

Drugi radovi u zbornicima skupova s recenzijom i izvješća

1. Turk, Rajka; Ljubičić Čalušić, Anita. Procjena rizika za biocidne pripravke // DDD i ZUPP 2008- globalno zatopljenje, biološke promjene / Korunić, Zlatko (ur.). Zagreb : Korunić d.o.o. Zagreb, 2008. 253-259 (predavanje, domaća recenzija, objavljeni rad, stručni).
2. Varnai, Veda Marija; Macan, Jelena; Ljubičić Čalušić, Anita; Sabolić Pipinić, Ivana; Turk, Rajka. Izvješće Centra za kontrolu otrovanja za razdoblje od 1.siječnja do 31.prosinca 2009., 2010. (Arh Hig Rada Toksikol -izvješće).
3. Varnai, Veda Marija; Ljubičić Čalušić, Anita; Sabolić Pipinić, Ivana; Macan, Jelena; Turk, Rajka. Izvješće Centra za kontrolu otrovanja za razdoblje od 1.siječnja do 31.prosinca 2008.,2009. (Arh Hig Rada Toksikol -izvješće).